

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDÜSTRİYEL ÇAY ATIĞINDAN BİYOETANOL ÜRETİMİ

Eda AÇIKEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDÜSTRİYEL ÇAY ATIĞINDAN BİYOETANOL ÜRETİMİ

Eda AÇIKEL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Biyoetanol; fosil bazlı, yenilenemeyen yakıtlara sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatiftir. Ancak farklı şeker kaynaklarını fermente edebilen mikroorganizmaların bulunmayışı lignoselülozik etanol üretimi için sorun teşkil etmektedir. Bu bağlamda, mevcut çalışma, ilk kez ko-fermantasyon stratejisi uygulayarak endüstriyel çay atıklarından biyoetanol üretimini optimize etmeyi amaçlamıştır. Bu amaçla, yeni izole edilen ksiloz fermenter *Candida boidinii* ve *Saccharomyces cerevisiae*, %20 (w/v) seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş endüstriyel çay atığı içinde ayrı ayrı ve birlikte fermentasyona tabi tutulmuştur. Mayalar tek başına kullanıldığında *C. boidinii* ve *S. cerevisiae* sırasıyla 12.1 g/L ve 14.1 g/L biyoetanol üretimi gerçekleştirmiştir. Aynı koşullar altında ko-fermantasyon stratejisi ile %25 *S. cerevisiae*-%75 *C. boidinii* inokülasyon oranı uygulandığında ise % 70'lik bir iyileşme sağlanmış ve biyoetanol üretimi 21.9 g/L'ye yükselmiştir. Ayrıca bu optimum koşullarda, $Y_{P/S}$, teorik verim ve Q_p değerleri 48 saat sonunda sırasıyla 0.44 g/g, %78.7 ve 0.45 g/L.s olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, endüstriyel çay atıklarının ko-fermantasyonunun katma değerli biyoetanol üretimi için ekonomik olarak umut vaat ettiğini göstermektedir.

Kasım 2022, 70 sayfa

Anahtar kelimeler: *Candida boidinii*; *Saccharomyces cerevisiae*; endüstriyel çay atığı; biyoetanol; ko-fermantasyon

ABSTRACT

Master Thesis

BIOETHANOL PRODUCTION FROM INDUSTRIAL TEA WASTE

Eda AÇIKEL

Ankara University
Graduate School of Natural Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Bioethanol is a promising alternative to non-renewable fuels because of its sustainability and eco-friendly properties. However, lignocellulosic bioethanol has some major drawbacks such as lack of the microorganisms have wide substrate spectrum. In this sense, the purpose of the study was to produce bioethanol from industrial tea waste with co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida boidinii* for the first time. In this context, a novel pentose fermenter isolate of *C.boidinii*, and *S.cerevisiae* produced 12.1g/L and 14.1g/L bioethanol, respectively when the microorganisms were used separately in 20 % (w / v) enzymatically hydrolyzed industrial tea waste. However the same amount increased by 70% and reached to 21.9 g/L during co-fermentation with 25% *S. cerevisiae*-75% *C. boidinii* inoculation ratio. In addition, at optimized conditions, $Y_{P/S}$, teoritical yield and Q_p values were determined as 0.44 g/g, %78.7 and 0.45 g/L.h at the end of 48 h, respectively. This work depicts the importance of industrial tea waste co-fermentation as a cost effective approach for second generation bioethanol production.

November 2022, 70 pages

Key Words: *Candida boidinii*; *Saccharomyces cerevisiae*; industrial tea waste; bioethanol; co-fermentation

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum tez çalışmasının araştırılmasında bana mentörlük eden, yardımlarını ve desteğini Lisans eğitimimden beri esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevgi Ertuğrul KARATAY’a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmasının her basamağında engin tecrübesiyle bana yol gösteren ve destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ’e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve Öğr. Gör. Dr. Ekin Demiray’a (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu) bilimsel yeniliklere karşı olan ilgisi ve merakıyla olduğu rol modelden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi tarafından “Endüstriyel Çay Atığından Biyoetanol Üretimi” başlıklı proje ile desteklenmiş olan bu yüksek lisans tezi için Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli lisansüstü arkadaşlarım Nazlıhan TEKİN, Aybüke KUT ve Ahzucan GERBAGA’ya manevi destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Tanıdığım günden bu yana desteklerini benden esirgemeyen değerli dostlarım; Büşra ÖZTEKİN, Belgin ŞAFAK ve Mustafa DALCI’ya teşekkür ederim. Lisans ve Lisansüstü eğitim hayatımda yol arkadaşım olan değerli arkadaşım Hilal DURMUŞ’a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, koşullar ne olursa olsun maddi ve manevi desteklerini her daim üzerimde hissettiğim sevgili babam Mehmet AÇIKEL ve sevgili annem Rabia AÇIKEL’e sonsuz teşekkür ederim.

Türk kadınlarının eğitim ve bilimdeki yolunu aydınlatan, Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK’e teşekkürü bir borç bilirim.

‘Ne mutlu Türk’üm diyene!’

Eda AÇIKEL
Ankara, Kasım 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Etanolün Genel Özellikleri	5
2.2 Biyoetanol Üretimi	6
2.3 Biyoetanol Üretiminin Geçmişten Günümüze Gelişimi.....	8
2.4 Fermantasyon Stratejileri	10
2.5 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler	12
2.5.1 Birinci grup hammaddeler	12
2.5.2 İkinci grup hammaddeler.....	13
2.5.3 Üçüncü grup hammaddeler.....	14
2.5.4 Dördüncü grup hammaddeler	14
2.6 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ön-İşlemler	15
2.6.1 Fiziksel ön-işlemler.....	18
2.6.2 Fiziko-kimyasal ön-işlemler	19
2.6.3 Kimyasal ön-işlemler	21
2.6.4 Biyolojik ön-işlemler	23
2.7 Biyoetanol Üretiminde Sıklıkla Kullanılan Mikroorganizmalar.....	24
2.7.1 Mayalar	24
2.7.2 Bakteriler	26
2.7.2.1 Diğer bakteriler	27
2.8 Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalar.....	28
2.8.1 Ko-fermantasyon stratejisi ile yapılan bazı çalışmalar	31

3. MATERİYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1 Kimyasallar ve Reaktifler	34
3.2 Maya İzolasyonu, PCR ve Tanımlanması	34
3.3 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Ön-İşlemi.....	35
3.4 Enzimatik Hidroliz.....	36
3.5 İntibitörlerin Mikrobiyal Büyüme ve Biyoetanol Üretimine Etkisi	36
3.6 Fermantasyon Deneyleri.....	36
3.7 Analitik Yöntemler	37
3.8 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Bazı Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi	38
3.9 Mayaların Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	39
3.10 Mayaların Glukoz ve Ksiloz Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	39
3.11 İstatistiksel Analiz	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Kimyasal Bileşimi.....	40
4.2 Farklı Ön-İşlem Yöntemlerinin Fermente Edilebilir Şeker Konsantrasyonlarına Etkisi	40
4.3 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun İnhibitör Bileşikler ve Biyoetanol Üretimine Etkisi	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
5.1 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Kimyasal Bileşimi.....	51
5.2 Farklı Ön-İşlem Yöntemlerinin Fermente Edilebilir Şeker Konsantrasyonlarına Etkisi.....	51
5.3 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun İnhibitör Bileşikler ve Biyoetanol Üretimine Etkisi	52
5.4 Sonuç ve Öneriler.....	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ATP	Adenozin trifosfat
C1	Bir karbonlu şekerler
C ₂ H ₅ OH	Etanol
C5	Beş karbonlu şekerler
C6	Altı karbonlu şekerler
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
cm	Santimetre
CO	Karbon monoksit
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	Distile su
g	Gram
h	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
kPa	Kilopaskal
L	Litre
M	Molar

mg	Miligram
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
NaCl	Sodyum klorür
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NaOH	Sodyum klorür
nm	Nanometre
NO _x	Azot oksit
<i>p</i>	İstatistiksel anlamlılık değeri
rpm	Dakikadaki devir
T	Sıcaklık
ZnSO ₄	Çinko sülfat
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
ADH	Alkol Dehidrojenaz Enzimi
AFEX	Amonyak Lifi Genleşmesi
AHP	Alkali Hidrojen Peroksit
CB	<i>Candida boidinii</i>
COVID-19	Korona Virüs Hastalığı-19
ÇAYKUR	Türkiye Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNS	Dinitrosalisilik Asit

EÇA	Endüstriyel Çay Atığı
ED	Entner-Doudoroff Yolağı
EMP	Emlden-Meyerhof-Parnas Yolağı (Glikoliz)
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EYA	Esnek yakıtlı araç
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FID	Alev İyonlaştırıcı Dedektör
FPU	Filtre Kağıdı Birimi (Filter Paper Units)
GC	Gaz Kromatografisi
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
HEAL	Sağlık ve Çevre İttifakı
5-HMF	5-Hidroksimetilfurfural
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IL	İyonik Sıvılar
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilatı
KDPG	2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Potato Dekstroz Agar
PPP	Pentoz Fosfat Yolağı
SE	Buhar Patlaması
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SHF	Ayrı Hidroliz ve Fermantasyon
SSCF	Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-fermantasyon
SSF	Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Fermantasyon
SSJCF	Tatlı Sorgum Küspesi ve Suyunun Eş Zamanlı Sakkarifikasyon ve Ko-fermantasyonu
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WO	Yaş Oksidasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bitki hücre çeperi içerikleri	16
Şekil 2.2 Lignoselülozik hammaddenin ön-işlem sonrası degradasyonunun gösterimi ..	17
Şekil 4.1 Ko-fermantasyon yaklaşımıyla EÇA'dan biyoetanol üretiminin şematik gösterimi	41
Şekil 4.2 Farklı ön-işlem türlerinin EÇA'nın şeker konsantrasyonunun azaltılması üzerindeki etkisi	43
Şekil 4.3 Sentetik YPD besiyeri varlığında <i>S. cerevisiae</i> ve <i>C. boidinii</i> OK041521'in biyoetanol üretimi ve mikrobiyal büyümesi sırasında artan inhibitör konsantrasyonları. (a)	45
Şekil 4.4 <i>S. cerevisiae</i> ve <i>C. boidinii</i> OK041521'in fermentasyonu sırasında sentetik YPX ve YPD besiyerlerinde kalan ksiloz ve glukoz konsantrasyonları. (b) ..	46
Şekil 4.5 EÇA besiyerinde ko-fermente edilmiş <i>S. cerevisiae</i> ve <i>C. boidinii</i> OK041521'in etanol üretimi. (c)	47
Şekil 4.6 EÇA besiyerinde glukoz bazlı şeker kalıntıları. (d)	48
Şekil 4.7 EÇA besiyerinde ksiloz bazlı şeker kalıntıları. (e)	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Ultrasonikasyon destekli/desteksiz seyreltik asit ve AHP ile dört farklı kombinasyonda ön-işleme tabi tutulmuş enzimatik hidroliz öncesi ve sonrasındaki (yıkanmamış ve yıkanmış) %10 EÇA’da indirgen şeker konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	42
Çizelge 4.2 Seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş EÇA varlığında mayaların inhibitör bileşikleri, indirgen şeker, etanol konsantrasyonları ve büyüme kinetiği.....	44
Çizelge 4.3 Seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş EÇA'nın fermantasyonu / ko-fermantasyonundan elde edilen mayaların kinetik parametreleri ve büyüme kinetikleri	49

1. GİRİŞ

Gelişen teknoloji ve artan nüfus ile birlikte ihtiyaç duyulan enerji miktarı da buna bağlı olarak artmaktadır. Kullanılmakta olan fosil yakıtlar sınırlı olduğu ve yanmaları sonucu oluşan zararlı gazlarla çevreye zarar verdiği için rüzgar enerjisi, jeotermal enerji, hidrojen enerjisi, biyokütle enerjisi gibi alternatif ve yenilenebilir kaynaklardan enerji üretmek adına çeşitli çalışmaların yapılması büyük önem arz etmektedir (Bull 2001; Maroušek ve Maroušková 2021). Potansiyellerine rağmen, rüzgar ve güneş enerjisinin yüksek maliyet, düşük verimlilik veya iklim değişikliklerine karşı duyarlılık gibi bazı önemli dezavantajları bulunmaktadır (Panwar vd. 2011). Bununla birlikte, biyokütle bazlı enerji üretimi, hammaddelerin bol bulunması, geniş coğrafi dağılımları ve düşük maliyetleri göz önüne alındığında umut verici bir potansiyele sahiptir (Kliestik vd. 2020; Valaskova vd. 2020). Biyokütle bazlı yenilenebilir enerji kaynakları arasında biyoetanol, üzerinde en çok çalışma yapılan ve endüstriyel anlamda en çok üretilen moleküldür. Ek olarak, etanol kullanımı CO ve NO_x kirleticilerin fosil yakıtlara kıyasla daha düşük konsantrasyonda yayılmasına neden olur ve içten patlamalı motorlarda kullanıldığında CO₂ ve sera gazı emisyonlarını %94'e kadar azaltabilir (Schmer vd. 2008; Amaya-Delgado vd. 2018). Sayılan sebeplerden ötürü, çeşitli biyoyakıtlar arasında biyoetanol, en yüksek üretim kapasitesine sahip olup, üzerinde en yoğun çalışılan yenilenebilir enerji kaynaklarından (Mardoyan ve Braun 2015). Aynı zamanda HEAL'in 2018 yılındaki raporunda belirttiği üzere; Türkiye, Avrupa'da hava kirliliğine bağlı erken ölüm oranlarının en yüksek olduğu ülke olarak karşımıza çıkmaktadır. Oksijenin azalması, küresel ısınma, asit yağmurları, iklim değişiklikleri, havadaki zararlı partiküller nedeniyle solunum yolu hastalıkları gibi birçok olumsuz duruma neden olmaktadır. Tüm bu olumsuz etkiler göz önünde bulundurulduğunda yenilenebilir enerji konusunda yeni araştırmalar yapılması ve uygulamaya geçirilmesi büyük ehemmiyete sahiptir (Health and Environment Alliance 2018).

Yenilenemeyen enerji çeşitleri, düşük maliyete ve yüksek verime sahip oldukları için, ülkelerin jeopolitik önemi açısından avantaj sağlamaktadır. Fakat bu sınırlı enerji kaynakları uzun vadede ekoloji ve insan sağlığı üzerinde kalıcı hasarlar yaratmakta ve bu kaynaklara sahip olmayan ülkeler açısından ithalat ihtiyacından dolayı dışa

bağımlılık yaratmaktadır. Türkiye fosil yakıt üretimi açısından kayda değer bir kaynağa sahip olmadığı için bu konuda neredeyse tamamen dışa bağımlıdır (Bekar 2020). Bu anlamda yerli ve yenilenebilir enerji kaynakları enerji konusundaki dışa bağımlılığımızın azaltılması adına umut vaad etmektedir. Bunun için ülkemizde de bu konu kapsamında çeşitli hedefler belirlenmiştir. Örneğin, ortaya çıkan tarım atıklarının ülke ekonomisine kazandırılabilmesi için yenilenebilir enerji üretimi ve kalkınma planları bulunmaktadır. Onbirinci Kalkınma Planı (2019-2023)'nın "407.6. maddesinde "Ekonomik ömrünü tamamlamış ve verimliliği azalmış çay ve fındık gibi uzun ömürlü ve katma değeri yüksek bitkisel ürünlerin verimliliğini artırmak üzere ekim alanlarının yenilenmesi desteklenecektir." şeklinde belirtilmiştir. Buna göre bu tez çalışması ile petrol ithalatının ve buna bağlı olarak dışa bağımlılığımızın azaltılmasına bilimsel anlamda katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

Çay (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), Dünya çapında en çok tüketilen içeceklerden biridir ve bu nedenle her yıl milyonlarca ton çay ve endüstriyel çay atığı (EÇA) üretilmektedir (Yan vd. 2021). Çinliler, 3.000 yıldan uzun bir zamandır antikanserojen, antioksidan, lipid metabolizması düzenleyici özellikleri gibi sağlık yararları ve eşsiz aroması nedeniyle çay üretmekte ve tüketmektedirler (Yan vd. 2020). Çay, ülkemizde bol miktarda üretilen bir bitki olması nedeniyle bununla doğru orantılı olarak çay atıkları da ülkemizde bol miktarda bulunmaktadır. Karadeniz Bölgesi'nde bulunan çay fabrikalarında her yıl yaklaşık olarak 40.000 ton çay atığı ortaya çıkmaktadır. Bu miktar yanlış yapılan hasatlarla birlikte daha da artış göstermektedir. Değerli bir lignoselülozik hammadde kaynağı olarak çay atıkları değerlendirilmeden çevreye atılarak çürümeye bırakılması veya çöplüklere boşaltılması nedeniyle büyük bir çevresel kirlilik yaratmakta ve biyolojik bir yük oluşturmaktadır (Usta 2015). FAO 2018 yılı verilerine göre; Dünya kuru çay üretiminde Türkiye 270.000 ton ile 6. sırada, Dünya çay tarım alanları sıralamasında ise 84.000 hektar alan ile 7. sıradadır (FAO 2018). TÜİK 2019 verilerine göre ise çay yetiştirilmeye ayrılan 822.470 dekar alandan, 1.450.000 ton yaş çay yaprağı üretimi gerçekleştirilmiştir (Türkiye İstatistik Kurumu 2022). 3.2 kg'lık yıllık kişi başına tüketilen çay miktarı ile de Türkiye, Dünya sıralamasında birinci sırada yer almaktadır (ÇAYKUR 2019).

Endüstriyel çay atıkları, toplama sırasında oluşan çay yapraklarındaki saplardan ve çay yaprakları işlendikten sonra boşaltılan kalıntıdan oluşmaktadır. Çay atıkları, toplam yaş çay ağırlığının %20'sini meydana getirmektedir. Çay atığı; selüloz, hemiselüloz, lignin, tein, polifenoller, saponinler, pektin, amino asitler, vitaminler ve pigmentler açısından oldukça zengindir (Gao ve Ogata 2020).

Biyoeanol üretim sürecinde biyokütlenin etkin kullanımı için farklı metabolik özelliklere sahip yeni mayaların tanımlanması büyük önem arz etmektedir. Yeni maya izolatları, ormanlar gibi doğal çürüme ortamlarından, endüstriyel atıklardan ya da farklı çevrelerden izole edilebilmektedir (Valdes vd. 2020). İzole edilen mayaların, sahip oldukları farklı metabolik yollar ile hammaddenin etkin tüketiminin yanı sıra sentezledikleri farklı hidrolitik enzimler ile de enzimatik hidroliz basamağındaki ticari enzim gereksiniminin azaltılabileceği ya da tamamen bertaraf edilebileceği veya farklı şekerlerden etanol üretilabileceği yapılan araştırmalar doğrultusunda öngörülmektedir (Mihajlovski vd. 2020). Ko-fermantasyon yöntemi; aynı besiyerinde farklı metabolik yolları kullanan, farklı mayalar tercih edilerek, glukoz ve ksiloz gibi farklı şekerlerin eş zamanlı fermentasyonunu mümkün kılmaktadır (Wang vd. 2020). Ko-fermantasyon sayesinde karışık şekerler verimli bir şekilde kullanılarak, ürün miktarında artış sağlanmaktadır (Wirawan vd. 2020). Bu nedenlerden dolayı yapılan tez çalışmasında yerel yeni maya izolatları kullanılmıştır.

Saccharomyces cerevisiae, biyoeanol üretimi için halen birincil mikroorganizma olmasına rağmen en büyük dezavantajı, fermentasyon için ksiloz gibi pentoz şekerlerini kullanamamasıdır. Ko-fermantasyon stratejisi ile heksoz ve pentoz fermenter mayalar birleştirildiğinden, bu yaklaşım uygun maliyetli biyoeanol üretimi için yararlı yöntemlerden biridir ve genel biyoeanol üretim verimini arttırmaktadır (Raina vd. 2020).

Candida boidinii, Ascomycota şubesine aittir ve toprak, deniz suyu veya şeker içeren ürünler gibi çeşitli ortamlardan izole edilebilmektedir. Genom büyüklüğü 5900 protein kodlayan gen ile 19.000.000 bp civarındadır. *C. boidinii* türlerinin GC içeriği %30.9 ile %32.7 arasında değişmektedir (Camiolo vd. 2017). Türün morfolojisi, 2–4×4–20 µm ile

uzun oval ya da silindirik şekildedir. Hücreler tek, çift veya zincirler halinde bulunabilmektedir. Pelikül oluşumu da gözlemlenebilmektedir (Kurtzman vd. 2011). Bu türlerin pentoz şekerlerini kullanabilmesi bir diğer avantajlarıdır. Hem pentoz hem de heksoz şekerlerini kullanabilen mikroorganizmaların olmaması, ticari ölçekte ikinci nesil etanol için ciddi bir darboğaz oluşturmaktadır. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasının temel amacı, *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* mayalarının ko-fermantasyonu ile EÇA'den biyoetanol üretimini artırmaktır.

Lignoselülozik şekerlerin daha verimli kullanılması için yeni izole edilen pentoz ve heksoz fermenter *C. boidinii* ve heksoz fermenter *S. cerevisiae* farklı inokülüm oranları ile birlikte kullanılmıştır. Bu amaçla, EÇA'dan şeker verimini maksimize etmek için alkali hidrojen peroksit (AHP) ve seyreltik asit/otoklav gibi yaygın ön-işlem teknikleri karşılaştırılmıştır.

Tez çalışmasında endüstriyel çay atıkları kullanılarak, yerel maya izolatlarından etkin bir şekilde biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu mayaların, endüstriyel çay atıklarından biyoetanol üretimine ilişkin herhangi bir çalışma olmaması kullanılacak mikroorganizmaların özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyoetanolün Genel Özellikleri

Etanol; yiyecek ve içecek, sağlık, farmakoloji ve enerji gibi birçok alanda uzun yıllardır kullanılmaktadır. Petrole alternatif bir yakıt kaynağı oluşturmasının yanı sıra halen yaşanmakta olan COVID-19 pandemisi sürecinde ve sonrasında ihtiyaç duyulan dezenfeksiyon malzemesi olarak da kullanım potansiyeline sahiptir. Ekonomik olarak düşük maliyete sahip çeşitli atık maddelerden (evsel, zirai, tarımsal, ormancılık ve mikrobiyel hücreler gibi) elde edilmesi, düşük karbon emisyonuna sahip olması, çevre dostu, yenilenebilir ve sürdürülebilir bir yakıt olması gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedir. Etanol mevcut dünya pazarındaki en popüler alkollü biyoyakıttır. Henry Ford etanol için “geleceğin yakıtı” olarak adlandırmıştır (Vohra vd. 2014).

Etanol, petrokimya endüstrisinde yaygın olarak etilenin hidrolizi sonucu elde edilen ve birçok uygulama alanına sahip bir alkoldür. Bu alkol, biyolojik organik fermantasyonu yoluyla üretildiğinde ise biyoetanol olarak isimlendirilebilir. Bu nedenle etanol ve biyoetanol kimyasal olarak özdeş (C_2H_5OH) olmasına rağmen karbon atomlarının izotopik bileşimindeki tek farklılık kökenlerinden kaynaklanmaktadır (Mayorga 2021).

Etanolün kimyasal formülü C_2H_5OH olan etanolün molekül ağırlığı 46.07 g/mol, yoğunluğu 0.789 g/mL, kaynama noktası 78.5 °C, donma noktası -114.1 °C'dir (Adıgüzel 2013). Aynı zamanda etanol benzinle belirli oranlarda harmanlanarak kullanılan alternatif bir yakıttır. İçten yanmalı motorlara herhangi bir modifikasyon ihtiyaç duyulmadan %10 miktarında harmanlanarak kullanılabilir. Biyoetanolün en yaygın kullanım şekli; E-10 (%10 Biyoetanol+%90 Benzin) ve E-85 (%85 Biyoetanol+%15 Benzin)'dir (Baeyans vd. 2015).

Biyoetanol; hammaddesi şeker pancarı, şeker kamışı, mısır, buğday ve saman gibi tarımsal atıklar olan şeker, nişasta ve selüloz içerikli tarımsal ürünlerin fermantasyonu ile elde edilen renksiz, uçucu ve yanıcı bir sıvıdır (Marlair vd. 2009).

Etanol (etil alkol, biyoetanol), hem yakıt hem de benzin katkılanması olarak en çok kullanılan sıvı biyoyakıttır. Etanolün sahip olduğu yüksek oksijen içeriği nedeniyle daha az miktarda katkı maddesi gerektirir (Sánchez ve Cardona 2008). Benzinin oksijen içeriğini artırmak için oksijenli bir yakıt olan etanol kullanabilmektedir. Bu sayede çok daha iyi hidrokarbon oksidasyonunun gerçekleştirilmesinin yanı sıra sera gazlarının da azaltılmasına katkı sağlanmaktadır (Mood vd. 2013).

Biyoetanolün birçok avantajının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Biyoetanol suda çözünmediği için yakıt enjektörü ve elektrikli yakıt pompası gibi motor bileşenleri üzerinde korozyon bir etkiye sebep olabilmektedir. Higroskopik bir yapıya sahip olması sebebiyle çevreden daha fazla su çekmektedir. Buharlaşması zor olan saf etanol motora doğrudan yakıt olarak verildiğinde, soğuk havalarda araç için çalıştırma sorunu yaratabilmektedir. Yakıt seyreltmesinden dolayı her zaman performansta tribolojik etkiye neden olmaktadır. Biyoetanol suyla karışabilmesine karşın yağ ile karışmaz bunun sonucunda biyoetanol-su-yag karışımı içerisinde emülsiyon oluşumu meydana gelmektedir. Bu durumdan kaynaklanan ciddi motor arızalarının önüne geçilebilmesi için sık sık motor yağının değiştirilmesi gerekmektedir (Khuong vd. 2017).

2.2 Biyoetanol Üretimi

Etanol, petrokimyasal kaynaklardan sentetik olarak veya mikroorganizmalar aracılığıyla şekerlerin fermantasyonu sonucunda biyolojik olarak üretilmektedir. Uzun yıllardır etanolün kozmetik, ilaç, tıp, gıda, yakıt ve diğer endüstriyel alanlarda kullanımı mevcuttur (Thatoi vd. 2014). Etanolün bu derece kapsamlı kullanımı, üretim hacminin de artırılmasına sebep olmuştur. Bu nedenle düşük maliyetli, çevre dostu ve sürdürülebilir etanolün üretimi için son yıllarda çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla biyoetanol üretiminde çoğunlukla evsel, zirai ve endüstriyel atıklar gibi yüksek şeker miktarına sahip hammaddeler kullanılmaktadır. Bu hammaddelerin biyoetanole dönüşümü; ön-işlem yöntemleriyle biyokütlenin kısmen ya da tamamen parçalanması, daha sonra yapının enzimatik depolimerizasyon ile fermente edilebilir C5 ve C6'lu monomerlere dönüştürülmesi ve son basamakta da mikrobiyel aktivite (fermantasyon)

sonucu basit şekerlerin sindirilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Kumar vd. 2020). Biyoetanolün üretimi sürecinde, mikroorganizmalar fermantasyon sırasında çeşitli metabolik yollar kullanmaktadır.

Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Glikoliz) biyoetanol üretiminde mikroorganizmaların kullandığı yollardan biridir ve 2 evrede gerçekleşmektedir. Birinci evrede glukoz ATP ile fosforile edilerek glukoz 6-fosfat oluşur. İkinci evrede ise; oluşan glukoz 6-fosfat, pirüvata dönüştürülür. Bu işlemde oluşan pirüvik asit, organizmada bulunan enzim türüne göre; laktik asit, etil alkol ya da başka bir fermantasyon ürününe dönüşür. Bu anlamda bu yolak ile bir çok mikroorganizma son ürün olarak biyoetanol ve CO₂ meydana getirerek alkol fermantasyonunu gerçekleştirir (Caputto vd. 1967; Jambo vd. 2016; Azhar vd. 2016).

Entner-Doudoroff yolağı, biyoetanol üretimi için glukozun anaerobik olarak parçalanmasında kullanılan bir diğer yoldur. Glukoz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi ile bir ara ürün olan 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonata (KDPG) dönüştürülür. Sonraki basamakta oluşan bu ara ürün, KDPG aldolaz enzimi ile pirüvata dönüştürülür. Bu son ürün alkol dehidrogenaz (ADH) ile etanol üretimi gerçekleşir (Siebers vd. 1997; Chen vd. 2016).

Pentoz fosfat yolağında (PPP) ise ksiloz, arabinoz gibi pentoz şekerleri (C5) fermente edilmektedir. Pentozlar elektron vericileri olarak kullanıldıklarında daha fazla katabolize olmadan önce riboz fosfat ve benzer bileşikler oluşturmak için genelde fosforile olurlar. D-ksiloz, ksiloz kinaz enzimi ile D-ksiluloz-5-fosfata dönüştürülür. Fosfopentoz epimeraz, transaldolaz ve transketolaz gibi enzimler aracılığıyla, EMP yolağında da kullanılmakta olan gliseraldehit-3-fosfata dönüşümü ile alkol fermantasyonu sonrasında etanol oluşumu gerçekleştirilir. Bu metabolik yolak ile yapılan yıkımdan ATP elde edilmez (Kruger ve von Shaewen 2003; Hahn-Hägerdal vd. 2007; Rastogi ve Shrivastava 2017).

2.3 Biyoetanol Üretiminin Geçmişten Günümüze Gelişimi

Ham petrolün keşfi, 1800'lerin ortalarında Amerika Birleşik Devletleri tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu keşifle birlikte petrol kökenli yakıtların fiyatlarında meydana gelen düşüş, otomobiller ve fabrikalardaki üretimde yakıt olarak kullanılmasının akabinde endüstriyel dönemin en önemli itici güçlerinden biri olmasına neden olmuştur (Cseke vd. 2009). 1970'lerde dünya genelinde patlak veren petrol krizi, fosil yakıt rezervlerinin sınırlılığına ilişkin kaygıları ön plana çıkarmıştır (Tye vd. 2011). Fosil yakıt rezervlerinin sınırlılığı ve hızlı tüketimi, iklim değişikliği ve petrole karşı olan bağımlılık sürdürülebilir ve çevre dostu alternatif enerji kaynakları arayışına yönelime neden olmuştur.

1925 yılında Brezilya'da otomobil yakıtı olarak biyoetanol kullanılmaya başlanmış ve kullanılan benzin miktarından yaklaşık olarak 70 kat fazla biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Boddey vd. 2008). Brezilya'da biyoetanol, gazohol (%24 biyoetanol, %76 benzin) olarak adlandırılan benzinle karıştırılmış bir karışım halinde veya saf olarak doğrudan kullanılabilir (Liu vd. 2019).

Etanol üretiminin ilk kanıtının yaklaşık olarak 9000 yıl öncesinde Çin'e ait olduğu bulunmuştur. Antik dönemde Mısırlılar ise doğal bir fermantasyon yöntemi kullanarak bitkisel atıklardan alkol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Etanolün yakıt olarak ilk kullanımı 1826 yılında ABD'de Samuel Morey tarafından içten yanmalı bir motorda gerçekleştirilmiştir. 1800'lü yıllarda hububatlardan üretilmiş olan etanol, Paris'te alkollü yakıt toplantısında tanıtılarak otomobilde kullanılmıştır. Ancak 1908'de Ford Model-T otomobili üretimi sonrasında yakıt olarak etanol ya da etanol-benzin karışımlarının kullanılabilmesi mümkün olmuştur (Balat 2009; Halder vd. 2019).

2011 yılı içerisinde dünya genelinde gerçekleşen CO₂ emisyonunun ulaştığı miktar yaklaşık olarak 34 milyar tondur ve yılda 1.2 trilyon dolardan fazla küresel karbon emisyon maliyeti getirisine sebep olmuştur (Halder vd. 2019). Etanol üretiminin temel motivasyonu ulaşımda kullanılan yakıtta duyulan ihtiyaçtır. Yalnız ABD'de ulaşımda

kullanılan yakıt tüketim miktarı 530 milyar litrenin üstündeyken, biyoetanol üretimi 2005'te yalnızca 15 milyar litre olarak gerçekleşmiştir (Rass-Hansen vd. 2007).

2017 yılında küresel ölçekte birincil enerji tüketimi 13.511,2 milyon ton petrol eşdeğerine ulaşmıştır ve bu toplam petrol tüketimin yaklaşık %34.21'ini oluşturmaktadır (British Petroleum 2009).

Geçtiğimiz 15 yılda, etanol üretim sürecinin verimliliğini ve karlılığını artırmak amacıyla teknolojik iyileştirmeler için birçok önemli değişiklik meydana gelmiştir. Mısır ve nişastalı hammadde fermantasyonunda, hidrolizat içerisinde bulunan fermente edilemeyen materyali azaltmak için mekanik fraksiyonlama yöntemi geliştirilmiştir (EPA 2010).

Avrupa Birliği (AB)'ne üye devletler, 2021-2030 yılları arasında yenilenebilir enerji ve enerji verimliliği kazanımlarının sera gazı emisyonunun azaltılmasına ilişkin AB genelinde hedeflenen amaç ve politikaları içeren 2030 iklim ve enerji sistemi üzerinde uzlaşmışlardır (Bonenkamp vd. 2020).

Ülkemizde ise Resmi gazetede yayımlanan 7 Temmuz 2012 tarih ve 30098 sayılı "Benzin Türlerine Etanol Harmanlanması Hakkında Tebliğ"e göre; piyasaya akaryakıt olarak arz edilen benzin türlerinin, yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanol içeriğinin: 1/1/2013 tarihinden itibaren en az %2 (v/v), 1/1/2014 tarihinden itibaren en az %3 (v/v) oranında yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanol içermesi zorunludur." şeklinde bildirilmiştir (Resmi Gazete Tebliği 2018).

Yaklaşık olarak yarısı ulaşım sektörü tarafından kullanılan fosil yakıtlar, toplam küresel enerji tüketiminin yaklaşık %85,18'ini meydana getirmektedir. Fosil yakıtların tüketim miktarı göz önünde bulundurulduğunda gelecek 40-50 yıl içerisinde fosil yakıt rezervlerinin azalacağı öngörülmektedir (Vohra vd. 2014).

Otomobillerde kullanılan fosil yakıtlar, Dünya genelindeki toplam karbon monoksit (CO) emisyonlarının yaklaşık olarak %70'inden fazlasından, toplam nitrojen oksit (NO_x) emisyonlarının %40'ından, toplam karbondioksit (CO₂) emisyonlarının %19'undan ve toplam sera gazı emisyonlarının %14'ünden sorumlu olduğu bilinmektedir (Cseke vd. 2009).

Günümüzde birçok araçta 'biyoyakıt' olarak adlandırılan %10-15 etanol katkılı yakıt kullanılmaktadır ve motorlar standart olarak saf hidratlı etanol (%93 etanol, %7 su) veya %85 etanol-%15 benzin içeren, E-85 karışımları ile çalışacak şekilde dizayn edilmektedir. Brezilya'da ise Esnek Yakıtlı Araçlar (EYA), herhangi bir biyoetanol-benzin karışımıyla kullanılabilir nitelikte üretilmektedir. Ulusal Otomotiv ve Araç Üreticileri Birliği, Esnek Yakıtlı Araçlar'ın yaklaşık olarak %85'inden fazlasının Brezilya'da üretildiğini bildirmiştir. Hem İsveç hem de Belçika, biyoetanolün ulaşım yakıtı olarak kullanımını artırmayı amaçlamaktadır (Magnusson ve Nilsson 2002).

Biyoetanol gibi fosil bazlı olmayan, çevreci, yenilenebilir ve sürdürülebilir yakıtların üretimine öncelik verilmesi elzemdir. Bunun yanısıra artan enerji ihtiyacını karşılamak için umut vadetmektedir.

2.4 Fermantasyon Stratejileri

Fermantasyon ile elde edilecek biyoetanol verimini artırmak için, çeşitli ön-işlem yöntemleriyle fermantasyonun ilişkisini değerlendiren yaklaşımlar mevcuttur. Bunlardan başlıcaları; SSF (aynı zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon), SHF (ayrı zamanlı hidroliz ve fermantasyon) ve SSCF (aynı zamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermentasyon) olarak bilinmektedir.

SHF yönteminin temeli, hidroliz ve fermantasyonun iki ayrı aşamada gerçekleştirilmek üzere ayrılmasına dayanır. Klasik biyoetanol üretim sürecinde olduğu gibi, enzim kullanılarak hammaddeyi monomerik şekerlere dönüştürmek amacıyla ilk aşamada hidroliz yapılır. Sonrasında hidroliz aşamasından elde edilen monomerik şekerlerin

kullanılacağı fermantasyon aşaması gerçekleştirilir. Bunun yanısıra, SHF yöntemindeki önemli bir sorun ise hidroliz sırasında elde edilen şekerler tarafından son ürün inhibisyonunun meydana gelmesidir (Alfani vd. 2000). SHF, enzimatik hidroliz ve fermantasyonun sırayla gerçekleştirildiği bir yöntemdir. Bu işlemde, nişastalı biyokütlenin veya ön işleme tabi tutulmuş lignoselülozik biyokütlenin enzimatik sakarifikasyonu, önce sakarifiye edici enzimin optimal sıcaklığında gerçekleştirilir (Ishizaki ve Hasumi 2014).

SSF yönteminde hidroliz ve fermantasyon eş zamanlı olarak tek bir aşamada gerçekleştirilir. Yöntem esnasında; hammadde, enzim ve maya sistemli bir şekilde bir araya getirilerek, ortama salınan şekerlerin hızla biyoetanole dönüştürülmesi sağlanır. SSF yöntemiyle, şeker kalıntıları uzaklaştırılarak son ürün inhibisyonu sınırlandırılabilir (Cantarella vd. 2004).

Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanole dönüştürülmesindeki en önemli engellerden biri de eş zamanlı olarak heksoz ve pentoz şekerlerinin kullanımı için uygun fermentatif mikroorganizmaların seçimidir (Malik vd. 2021).

Eş zamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermentasyon (SSCF) yöntemi, tek bir biyoreaktörde enzimatik hidroliz ve hem heksoz hem de pentoz şekerlerin fermantasyonunun gerçekleştiği süreçleri kapsamaktadır. Ko-fermentasyon sayesinde karışık şekerler verimli bir şekilde kullanılarak, ürün miktarında artış sağlanmaktadır (Wirawan vd. 2020). Bu yaklaşım, aynı besiyerinde farklı metabolik yolları kullanan, farklı mayalar tercih edilerek, glukoz ve ksilozun eş zamanlı fermantasyonunu mümkün kılmaktadır (Wang vd. 2020). Bundan dolayı SSCF yöntemi, hidroliz sonrası ortamda çok miktarda C5 şekerlerinin (pentozlar) bulunduğu durumlarda önerilmektedir. SSCF yönteminde, aynı reaktörde heksoz ve pentoz şekerler fermente edilebilirken, SSF yönteminde fermantasyon sırasında pentozlar etkin olarak kullanılamaz. Ancak her iki yöntemde de kısa bir enzimatik hidroliz işlemine, düşük maliyete ve SHF yönteminden daha yüksek miktarda etanol verimine sahiptir (Yasuda vd. 2014). SHF ile karşılaştırıldığında SSCF, daha düşük maliyet, daha kısa işlem süresi, daha düşük kontaminasyon riski ve

enzimatik hidroliz sırasında daha az inhibitör etki gibi birçok avantajı sahiptir (Jin vd. 2010).

2.5 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammadde kaynakları dört farklı gruba ayrılmaktadır. Bu hammaddeler birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü grup olmak üzere sınıflandırılmıştır. Birinci grupta; gıda olarak da tüketilen tarımsal ürünler ikinci grupta; orman ve tarımsal atıklar (sap ve kepek gibi kısımlar) belediye atıkları üçüncü grupta; yüksek miktarda yağ veya selüloz içeren fotosentetik sucül organizmalar (mikroalgler ve siyanobakteriler gibi) ve dördüncü grup ise metabolizma ve genetik mühendisliği çalışmaları sonucunda elde edilen hammadde ve mikroorganizmaları içermektedir.

2.5.1 Birinci grup hammaddeler

Günümüzde biyoetanol üretiminde kullanılan birinci grup hammaddelerin çoğu şeker ve nişasta içeriği bakımından zengindir (Susmozas vd. 2020). M.Ö. 6000'den beri biyoetanol üretimi için kullanılan en eski hammadde şeker kamışıdır. (Halder vd. 2019). Şeker kamışı, şeker pancarı ve tatlı sorgum gibi bitkiler etanol üretimi için hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerin en önemli avantajları, dönüm başına yüksek şeker verimi elde edilmesi ve dönüştürme maliyetlerinin düşük olmasıdır. Bu hammaddelerin en önemli dezavantajı ise doğadaki mevcudiyetlerinin mevsime bağlı olmasıdır (Vohra vd. 2014; Azapagic vd. 2014).

Niştastalı hammaddeden biyoetanol üretimi ilk olarak 12. yüzyılda İrlanda'da gerçekleştirilmiştir. Nişasta içerikli besinler Kuzey Amerika ve Avrupa'da etanol üretimi için en çok kullanılan hammaddelerdir. Tropikal ülkelerde ise yumrular gibi diğer niştastalı ürünler (örneğin; manyok) tercih edilmektedir. Tahıllar (mısır, buğday veya arpa) ana nişasta kaynaklarıdır. Örneğin; mısır %60-70 oranında nişasta içermektedir. Tahıllarda depo maddesi olan nişasta; amiloz ve amilopektin içeren monomer yapılarındaki glukoz birimlerinin uzun zincirler halinde bir araya gelmesinden

oluşmaktadır. Nişastadan etanol üretmek için, bu kompleks karbonhidrat zincirlerinin parçalanması gerekmektedir. Bu polimer yapılar, gluko-amilaz enzimi tarafından katalize edilen bir hidrolitik reaksiyon yoluyla glukoza parçalanmaktadır. Elde edilen monomerik şekerler ise dekstroza veya bir glukoz izomeri olan D-glukoz olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, birinci nesil hammaddeler gıda ürünleriyle rekabet yarattığından dolayı gıda krizine yol açabilir ve etik değildir (Vohra vd. 2014; Halder vd. 2019; Mizik 2021).

2.5.2 İkinci grup hammaddeler

İkinci grup biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler; tarımsal, evsel ve endüstriyel alanlarda açığa çıkan lignoselülozik karakterdeki atıkları içermektedir (Nanda vd. 2015; Clauser vd. 2021). Lignoselülozik biyokütlenin dirençli yapısı genel olarak lignoselüloz bazlı biyoetanol üretiminin ekonomik bir hale getirilmesinde bir engel teşkil etmektedir (Kumar vd. 2020). Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretim teknolojisi; ön-işlemlerle biyokütle matriksindeki kristalin yapının parçalanması, enzimatik depolimerizasyon ile fermente edilebilir C5 ve C6'lu monomerlere dönüştürülmesi, son basamakta da fermentasyon sonucu basit şekerlerin sindirilmesi ile etanol üretimi olarak üç basamakta gerçekleştirilmektedir (Kumar vd. 2020).

Lignoselülozik biyokütlenin hidrolizasyonunda fiziksel, kimyasal, fiziko-kimyasal ya da biyolojik ön-işlemler gibi farklı ön-işlem yöntemleri kullanılmaktadır (Mosier vd. 2005). Bunlar arasında en sık kullanılanı ise lignoselülozun seyreltik asit ve selüloz gibi enzimlerle kombine şekilde hidroliz edilmesidir (Hsu vd. 2010). Bu işlem sırasında lignin, hemiselüloz ve selüloz yapıları etkin bir şekilde degrades olduğundan bu yöntem fermentasyon sırasında ihtiyaç duyulan şekerlerin açığa çıkması için fazlasıyla etkilidir (Huang vd. 2021). Bu iki yöntem (seyreltik sülfirik asit + enzimatik hidroliz) görece ucuz ve etkili yöntemler olduklarından bilimsel araştırmaların yanı sıra endüstriyel biyoetanol üretiminde de kullanılmaktadır (Kumar vd. 2009).

2.5.3 Üçüncü grup hammaddeler

Üçüncü grup biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler siyanobakteriler ve mikroalgler gibi sucul fotosentetik organizmalardan elde edilmektedir (Clauser vd. 2021; Nazari vd. 2021). Fotosentetik mikroorganizmalar olan mikroalgler; karbonhidrat, lipid ve protein içeriklerinden dolayı fermantasyon için besin kaynağı olarak kullanılabilir (Bhatia vd. 2020). Diğer hammaddelerle karşılaştırıldıklarında daha fazla sürdürülebilir ve ticari avantajlar sağlamaktadırlar. Hızlı ve pratik olarak topraklı ya da topraksız her yerde gelişim göstermeleri, ekstrem koşullarda gelişebilmeleri, mevsim koşullarından bağımsız büyüebilmeleri, fotosentez için CO₂ kullanabilmeleri dolayısıyla atmosfere salınan sera gazı emisyonlarının azalmasına yardımcı olmaları, çok daha kısa bir sürede hasat edilmeleri gibi birçok avantaja sahiptir (Harun vd. 2009).

2.5.4 Dördüncü grup hammaddeler

Son olarak dördüncü grup biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ise hücresel düzeydeki modifikasyonları kapsayan ve metabolizma mühendisliği teorisiyle ilgili olan, mikro veya makro algler gibi CO₂'den yakıt üretimi gerçekleştiren, herhangi bir kaynağa uygulanan genetik mühendisliğine dayanmaktadır. Genetik modifikasyon, hammaddeye istenen özellikleri ekleyerek daha düşük üretim maliyetlerine ve daha yüksek üretkenliğe neden olabilmektedir (Mayorga 2021).

Metabolizma ve biyoproses mühendisliğindeki son gelişmeler, mikroorganizmaların doğal metabolik yollarının tasarlanmasına ve dördüncü grup biyoyakıt üretiminde heterolog yollar kurulmasında köprü görevi görmüştür. Bakteriler, siyanobakteriler, algler ve mantarlar gibi mikroorganizmalar başlangıç aşamasında öncü moleküller olan farklı substratları kullanarak farklı dördüncü grup biyoyakıt üretimini sağlayan metabolik çeşitliliklerinden dolayı biyoyakıtların heterolog sentezi için konakçı olarak kullanılabilirler. Mikrobiyal kontaminasyon ise dördüncü grup biyoyakıtların büyük ölçekli ticarileştirilmesinde karşılaşılan potansiyel engellerden biridir (Malik vd. 2021).

Bunun yanı sıra birinci grup için sürdürülebilirlik sorunları (etanol ve gıda), ikinci grup için yüksek miktardaki enerji ve su tüketimi, üçüncü grup için olumsuz nitrojen dengesi ve dördüncü grup için ise pahalı ve yoğun enerji tüketimi gibi dikkate değer dezavantajlar bulunmaktadır (Mizik 2021).

2.6 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Ön-İşlemler

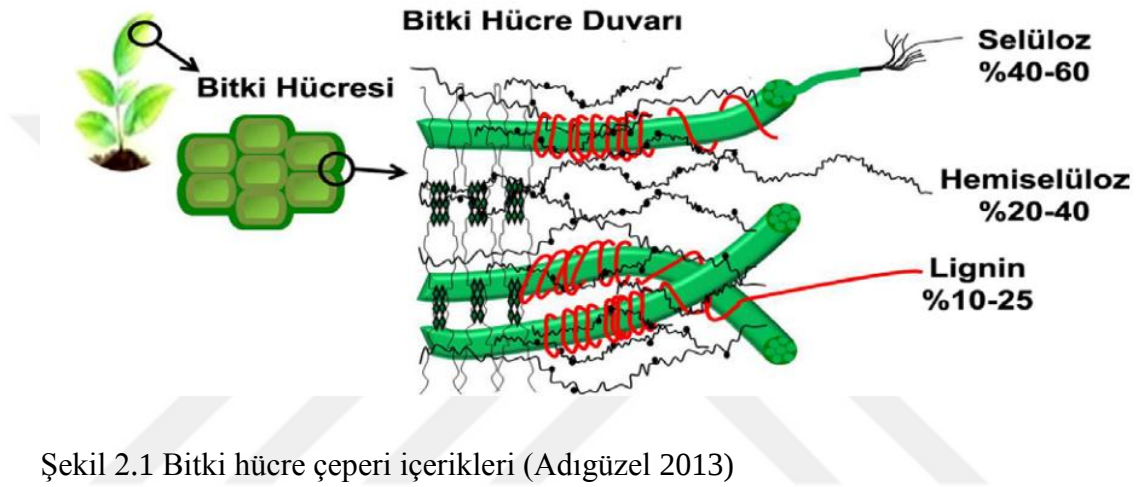
Gelişmekte olan toplumların nüfus artışları ile birlikte enerji ihtiyacı da artmaktadır. Fosil yakıtlarının sınırlı rezerve sahip olması ve elektrik üretimi, motorlu taşıt yakıtı, ısınma, sağlık, sanayi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılması sürdürülebilir ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilginin artmasına neden olmaktadır.

Sürdürülebilir enerji kaynakları içerisinde en önemlilerinden biri de biyoetanoldür. Biyoetanol başlıca şeker pancarı, mısır koçanı, hububatların kabukları, odun kalıntıları gibi şeker, selüloz ve nişasta içerikli tarımsal ve endüstriyel bitki atıklarından elde edilmektedir. Ormancılık ve tarım atıkları; buğday, arpa, sorgum ve pirinç gibi otsu bitkilerin kabukları ve samanları; mısır koçanı; şalt çimi, şeker kamışı küspesi, pamuk sapı, bambu, su sümbülü vb. bitkisel kaynaklar başlıca lignoselülozik biyokütleyi meydana getirmektedir (Rahmati vd. 2020).

Biyokütle, sürdürülebilir enerji üretiminde yeryüzündeki bolluğundan dolayı en önemli biyoyakıt kaynağını oluşturmaktadır. Gerek tarımsal üretim sonucu ortaya çıkan ürün artıkları gerek ormancılık faaliyetleri sonucu ortaya çıkan atıklar lignoselülozik hammaddenin başlıcalarıdır. Lignoselülozik hammadde; selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır. Selüloz ve hemiselüloz polimer formundaki şeker kaynakları oldukları için fermantasyon sürecinde kullanılamamaktadır. Fermente edilebilir monosakkaritler halinde parçalanabilmeleri için bazı ön-işlem basamaklarına tabi tutulmaları gerekmektedir (Nagarajan vd. 2017).

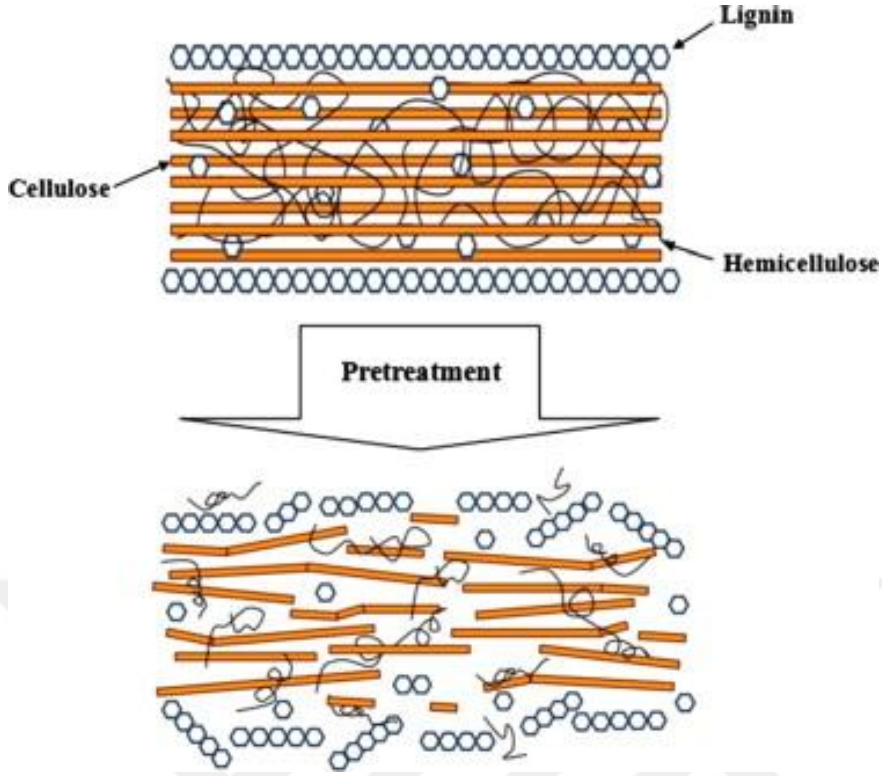
Selüloz, bitki hücre çeperinin ana bileşelerinden olmasının yanı sıra dünyada en bol bulunan doğal polimerlerinden biridir. Selüloz zincirleri içeriklerinde bulunan hidroksil

gruplarının hidrojen bağı ile birleşmesi sonucu fibriler bir yapı meydana getirir. Bu yapı biyolojik olarak parçanabilir niteliktedir (Şahin 2013). Hemiselüloz; yapısal olarak pentoz, heksoz ve üronik asitten meydana gelen heterojen özellikte bir polimerdir. Lignin; hidrofobik, amorf yapıya sahip, dallanmış yapıda fenolik bir polimerdir. Odunun karbonhidrat içermeyen kısmıdır (Çöpür vd. 2011). Lignin, selüloz ve hemiselüloz fibrillerini bir arada tutmaktadır ve bitkilere yapısal olarak destek sağlamaktadır (Cheng ve Timilsina 2011).



Şekil 2.1 Bitki hücre çeperi içerikleri (Adıgüzel 2013)

Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimi; ön-işlemlerle biyokütledeki kompleks yapının parçalanması ve enzimatik depolimerizasyon ile fermente edilebilir C5 ve C6'lu monomerlere dönüştürülmesini kapsamaktadır (Kumar vd. 2020). Bu yapının bozunmasını sağlamak için fiziksel ve fizikokimyasal, kimyasal, biyolojik gibi çeşitli ön-işlem yöntemleri benimsenmiştir. Ön-işlem yöntemleri, lignoselülozik yapıdan lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılmasını sağlarken aynı zamanda kristallliği azaltarak, hidroliz için gerekli olan gözenekli yüzey alanını arttırmaktadır (Wyman vd. 2005).



Şekil 2.2 Lignoselülozik hammaddenin ön-işlem sonrası degradasyonunun gösterimi (Mood vd. 2013)

Evrensel ön-işlem sürecini tahmin etmek oldukça güçtür çünkü farklı hammaddeler, farklı doğaya sahiptir. Geçtiğimiz on yılda çok sayıda farklı ön-işlem teknolojisi sunulmuştur. Ön-işlem yöntemleri uygulanan farklı kuvvetlere veya tüketilen enerjiye göre biyolojik, fiziksel, kimyasal ve fiziko-kimyasal ön işlemler olarak sınıflandırılabilirler. Bu yöntemlerin farklı kombinasyonları da mevcuttur (Alvira vd. 2010).

Lignoselülozik atıkların ön-işlemi sırasında ortama bazı inhibitör bileşikler salınabilmektedir. Bu bileşiklerin en önemlileri arasında furfural, 5-Hidroksimetilfurfural (5-HMF), asetik asit ve formik asit bulunmaktadır. Bu inhibitör bileşiklerin ortamda aşırı miktarda bulunması durumunda hücre gelişiminin azalması ya da durmasına; bu durum fermentasyon etkinliğinin düşmesine neden olmaktadır (Palmqvist ve Hahn-Hagerdal 2000). Bu bağlamda uygulanan ön-işlemler sonucunda ortaya çıkan inhibitör maddelerin ölçülmesi önem taşımaktadır.

2.6.1 Fiziksel ön-işlemler

Öğütme gibi mekanik ön-işlemlerin temel hedefi, yüzey alanının artırılması ve enzimatik hidroliz basamağında substratların daha ulaşılabilir olması için partikül boyutunun küçültülmesi ve kristalin yapının degradasyonudur. Bu ön-işlem yönteminde, bilye veya disk taşıma ekipmanlarının kullanımı ile hem kuru hem de ıslak durumda gerçekleştirilebilmektedir. En etkili parametreler ise öğütme ekipmanlarının sayısı, boyutu ve alt tabaka parçacık boyutu olarak sıralanabilir (Silveira vd. 2015).

Ultrasound ön-işlemi; biyokütlenin işlenmesi için eşsiz bir fiziko-kimyasal ortam yaratmaktadır. Lignin bariyerini degrades eder, hemiselülozları bertaraf eder ve ön-işlemden kullanılan kimyasalların selüloz nanokristallerine erişilebilirliğini arttırmaktadır. Ultrasound ön-işlemi, reaksiyonlarda kütle ve ısı transferini yoğunlaştırdığından dolayı heterojen reaktanların, ara ürünlerin temasını ve ayrılmasını arttırmaktadır (He vd. 2017). Ultrasound, akustik iletimin neden olduğu şok dalgaları, kesme kuvvetleri ve üretilen mikro-kabarcıkların çökmesi neticesiyle suyun ayrışmasıyla oluşan serbest radikallerin ($-OH$ ve $-H$) neden olduğu kimyasal etkiler aracılığıyla fiziksel etkilere neden olmaktadır (Wang vd. 2018; Olguin-Maciel vd. 2022). Ultrasonik ön-işlemden, lignoselülozik yüzeyde bulunan mum ve silikon içeren bileşenlerin uzaklaştırılması, hammaddelerin yoğun yapısının parçalanması ve lignoselüloza ulaşılabilirliğin artırılması için salınım ve kaviteasyon oluşturmak amacıyla ultrasonik alan kullanılmaktadır. Ultrasonik ön-işlem yöntemi, herhangi bir katalizör eklenmeden oldukça temiz ve güvenlidir. Ultrasound dalgası delignifikasyonda önemli bir role sahiptir. Etkilerini arttırmak için diğer ön-işlem yöntemlerine yardımcı olması amacıyla kullanılmaktadır (Yoo vd. 2017; Zhang vd. 2018).

Dondurma ön-işlemi; biyokütlenin fiziksel ön-işlemi için yakın zamanda geliştirilen yeni bir yaklaşımdır. Polisakkaritlerinin hidrolitik enzimlere erişilebilirliğini arttırmak ve hücre duvarlarını parçalamak için dondurma/çözme yöntemi tercih edilebilir. Yüksek maliyetli bir ön-işlem yöntemi olmasına rağmen daha düşük olumsuz çevresel etki, daha

az tehlikeli kimyasalların uygulanması ve yüksek etkinlik gibi sahip olduğu avantajlar nedeniyle yoğun ilgi görmektedir (Chang vd. 2011; Yuan vd. 2019).

Mikrodalga ön-işleminde 0.3-300 GHz frekanslı mikrodalga radyasyon uygulaması ile gerçekleştirilir. Isıtma, geleneksel ısıtma yöntemlerinden daha verimlidir çünkü ısı alışverişi yüzey boyunca değil, ısıtılan ortamın hacminin tamamında sıcaklıkta bir artışa neden olmaktadır. Daha kısa ısıtma süresi, daha yüksek performans ve neredeyse sürecin hemen başlatılması ve durdurulması gibi birçok avantaja sahiptir. Diğer taraftan mikrodalga radyasyonunun bir sonucu olarak, karbonhidratların dehidrasyonuna elverişli koşulların etkisiyle furfural ve 5- hidroksimetilfurfural (HMF) gibi inhibitör ürünler oluşmaktadır. Bu ön-işlem yönteminde termal etki (biyokütle ısınması ve basınç artışı) haricinde, dipollerin salınım hareketinin neden olduğu, selülozun yapısındaki hidrojen bağlarını kıran termal olmayan etkiler de gözlemlenebilmektedir (Mikulski ve Kłosowski 2020).

2.6.2 Fiziko-kimyasal ön-işlemler

Buhar patlaması (Steam Explosion) (SE) ön-işlemi, reaktördeki hammaddenin yüksek buhar basıncına (2000–5000 kPa) tabi tutulmasıyla kullanılmaktadır. Biyokütle, ön-işlem süresinin kısıtlılığına karşın, genellikle 200 ila 260 °C arasında değişkenlik gösteren yüksek bir sıcaklığa erişmektedir. Hammadde dışarı çıkarıldığında, atmosferik basınca doğru ani bir dekompresyona tabi tutulur. Ancak bu denli yüksek sıcaklık (260 °C'ye kadar) ve yüksek basınç (5000 kPa'ya kadar) yüksek bir enerji tüketimine neden olmaktadır. SE, genellikle hem hemiselüloz hem de ligninin uzaklaştırılmasıyla sonuçlanmaktadır. Ayrıca, şekerlerin, esas olarak formik asit, asetik asit, furfural, 5-HMF, vb. gibi çok sayıda fermantasyon inhibitörlerine degradasyonuna neden olmaktadır. Bu inhibitörler mikrobiyal büyümeyi ve aktiviteyi önemli ölçüde azalttıkları için istenmez ve fermantasyon sürecine engel olmaktadır. Bu nedenden dolayı fermente edilebilir şekerlerin veriminde önemli miktarda azalma meydana gelmektedir ki bu da hem etanol veriminin hem de etanol üretkenliğinin azalması anlamına gelmektedir. Diğer ön-işlem yöntemleriyle karşılaştırıldığında SE ön-işlemi, dikkate değer miktarda düşük çevresel etki içermesi, daha düşük sermaye yatırımı gerektirmesi ve daha az

zararlı kimyasallar içermesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır (Smichi vd. 2020; He vd. 2017).

CO₂ ile süper kritik patlama ön-işleminde, çözücü olan CO₂ ortam koşullarında gaz halinde olduğu ve kendiliğinden katı matristen yani çözünen maddeden kolayca ayrıldığı için avantaja sahiptir. Bu yöntemin çevresel sürdürülebilirliğinin güvencesi CO₂'nin tekrar kazanımı ve yeniden kullanılabilirliğidir. Bunun yanı sıra, geleneksel sıvı çözücülerini buharlaştırmak için ayırma ve sıcaklıkla ilgili basamaklar bu ön-işlem yönteminde atlanır, bu durum ise enerji tasarrufu ve güvenlik yeterliliği ile sonuçlanır (Mitraka vd. 2022). Yüksek sıcaklıkta uygulanan ön-işlem, enerji israfı ve yüksek ekipman arzını gerektirir. Dahası yüksek sıcaklık, şekerlerin bir bölümünün bozunmasını kolaylaştırdığı için hammaddelerin toplam şeker veriminde azalmaya neden olur (Moharreri vd. 2022).

Amonyak lifi genişmesi (AFEX), selülozik biyokütlenin ön-işlemi için temel reaktan olarak uçucu bir kimyasal bileşik olan amonyağın kullanımına dayanan termo-kimyasal bir ön-işlem yöntemidir. Diğer su bazlı termo-kimyasal ön-işlemlerle karşılaştırıldığında AFEX, biyokütlerde önemli bir değişiklik meydana getirmeyen, atık üretimi ve yıkama adımı maliyeti gerektirmeyen kurudan kuruya bir süreçtir. AFEX ön-işleminin ardından biyokütleye düşük ölçüde nitrojen ilave edilerek, protein içermeyen nitrojen kaynağı olarak geniş getiren hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir (Chundawat vd. 2020).

Yaş oksidasyon (WO) yöntemi, yüksek sıcaklık ve basınçta oksidatif ajanların kullanıldığı sulu bir ön-işlemdir. Mekanizma, oluşan hidroksil radikalleri ve organik asitler tarafından otokatalizasyonu içermektedir (Arvaniti vd. 2012).

Hidrotermal ön-işlem; biyokütleyi ön-işleme tabi tutmak için suyun sıvı ya da buhar ya da her ikisinin ısı ile birlikte kullanımını ifade etmektedir. Otohizoliz buhar patlamasının, sert odun enzimatik hidrolizini verimli bir şekilde arttırırken, yumuşak ağaçlar için daha az etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Díaz vd. 2010). İşlem, yüksek sıcaklıklar nedeniyle hemiselülozun bozunmasına ve selülozun hidroliz

potansiyelini arttırmasının yanı sıra sıklıkla inhibe edici hidrolizatlar ürettiği de gözlemlenmiştir. Sert odun ve tarımsal yan ürünleri fraksiyonlamak için hidrotermal ön-işlemler uygulandığında hemiselülozdaki asetil gruplarının hidrolizi sonucunda asetik asit oluşmaktadır. Yüksek sıcaklık, ön-işlem esnasında salınan şekerlerin parçalanmasını uyarır, heksoz şekerlerinden 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve pentoz şekerlerinden furfural gibi bozunma ürünleri olan furan türevlerinin üretilmesine neden olmaktadır. Furfural ve HMF oluşumu istenmez çünkü bu ürünler fermente edilebilir şekerlerin kaybının yanı sıra fermentasyonun engellenmesine de neden olabilir (Negro vd. 2003; Scapini vd. 2021).

2.6.3 Kimyasal ön-işlemler

Lignoselülozik hammaddenin kimyasal ön-işleminde asit, alkali ve organosolvent gibi farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak en yaygın tercih edilen ön-işlem yöntemi seyreltik asit ön-işlemidir. En önemli tercih sebebi düşük maliyetli olmasıdır. Bununla beraber ön-işlem sonucunda meydana gelen yan ürün oluşumu, fermentasyon için önemli bir inhibitör kaynağı oluşturmaktadır (Tutt vd. 2012). Seyreltik asitlerin daha yüksek oranlarda kullanımı durumunda kristalin bölgeleri azalttığı ancak glukozu degrade ettiği gözlemlenmiştir. Seyreltik asit hidrolizi selüloz ve hemiselüloz arasındaki farklılıktan ötürü iki basamakta uygulanmaktadır. İlk basamakta daha düşük sıcaklıklarda hemiselülozun hidrolizi sağlanırken, ikinci basamakta daha yüksek sıcaklıklarda biyokütlenin selüloz kısmının hidrolizi gerçekleştirilmektedir. Seyreltik asit yönteminin en önemli avantajı hızlı reaksiyon oranı olmasına karşın en büyük dezavantajı ise düşük şeker verimidir. Ayrıca aralıksız yöntemlerde daha verimli asit penetrasyonunun sağlanabilmesi için hammaddenin partikül boyutunun küçültülmesi önem arz etmektedir (Kumar vd. 2010).

Konsantre asit yönteminde, selülozun tamamının hızlı bir şekilde glukoz ve hemiselülozun ise düşük miktarda degradasyona maruz bırakılması sonucunda heksozlara dönüşümünü mümkün kılmaktadır. Yöntemin ekonomik uygulanabilirliğini sağlamak amacıyla gerekli olan faktörler şeker veriminin optimizasyonu ve asit geri kazanımının etkin şekilde gerçekleştirilebilmesidir. Konsantre asit yönteminde

reaksiyon süresi seyreltik asit yöntemine nazaran daha uzundur. Konsantre asit yönteminin en önemli avantajı yüksek şeker verimi sağlamasıdır (Musatto vd. 2008).

Alkali ön-işleminde ksilan polimerlerindeki asetil grupları parçalanmakta, selülozun kristalin yapısında porlar açılmakta, lignin ve bileşenleri değiştirilerek uzaklaştırılmaktadır. Etkin olmasına rağmen maliyetli olması en büyük dezavantajdır (David vd. 2020).

Alkali hidrojen peroksit (AHP) ön-işleminde tercih edilen serbest radikal hidrojen peroksit; alkali koşullarda lignin ile reaksiyona girerek delignifikasyona neden olmaktadır (Yan vd. 2020). Lignoselülozik hammaddenin içeriğinde bulunan lignin kısımlarının etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlayan çevreci yöntemlerden biridir. Bu yöntem genellikle oda sıcaklığında, pH 10'da gerçekleştirilir ve sıklıkla ultrasonikasyon gibi yöntemlerle beraber kullanılmaktadır. Bu yöntem, lignini degradesyona uğratarak selüloz ve hemiselülozu enzimatik saldırılara karşı açık hale getirir ve bu yöntemin uygulanması sırasında fermentasyon inhibitörleri oluşmaz. Buna karşın, metodun selüloz ve hemiselüloza iyi derecede etki edememesi ve yüksek biyokütle varlığında düşük verimle çalışması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Rabemanolontsoa ve Saka 2016).

Organosolvent ön-işlem yöntemleri arasında etanol-organosolv prosesi lignoselülozların biyolojik olarak parçalanabilmesi için en umut vadeci yöntemlerden biri olarak kabul görmektedir. Etanol-organosolv ön-işlemi; lignini lignoselülozlardan uzaklaştırmak için lignin ve lignin-karbonhidrat bağlarının kısmi hidrolizasyonunda etanol ve su kullanımını kapsamaktadır. Lignin enzimatik hidrolizin önündeki temel engeldir, hidrolitik enzimlere geri dönüşümsüz bağlanarak selülazların selüloza erişimi kısıtlar ve bunun sonucunda hidrolizi engeller. Organosolv ön-işlemi genellikle, biyokütledeki lignini degrades edebilen sülfürik asit gibi güçlü bir inorganik asit katalizörü kullanılarak gerçekleştirilir. Diğer kimyasal ön-işlemlerle karşılaştırıldığında, organosolv ön-işleminin temel ve eşsiz avantajlarından biri, ligninin değerli bir yan ürün olarak geri kazanılmasına olanak sağlamasıdır. Bunun yanı sıra kullanılan solvent minimum enerji tüketimi ile geri kazanılabilmektedir. Çevresel etki bakımından

değerlendirildiğinde ise ligninin ayrılması atık su arıtımı konusundaki negatif etkileri azaltabilir (Amiri vd. 2014).

Ozonolizis diğer alternatif ön-işlem yöntemleri arasında, lignoselülozik biyokütlenin delignifikasyonunda en umut verici oksidatif ön-işlem yöntemlerinden biridir. Ozon en güçlü oksitleyici ajanlardan biridir ve güçlü bir endotermik reaksiyon sonucunda oksijenden elde edilir. Terminal oksijendeki ozon, elektron eksikliği nedeniyle karbonhidratlardan ziyade elektronca zengin bir substrat olan lignine saldırır. Ozonolizis, son zamanlarda, petrokimyasal yakıtlarla harmanlamaya uygun bileşikler üretmek için ligninin depolimerizasyonunda çözücülerle kullanılmaktadır. Örneğin; ikinci grup biyoyakıt üretiminde (temel olarak etanol ve biyogaz, bunun yanı sıra bütanol ve biyohidrojen) ve enzim üretimi gibi biyokütle kullanılan endüstriyel işlemlerde büyük bir gelişmeye neden olabileceği öngörülmektedir (Travaini vd. 2016).

2.6.4 Biyolojik ön-işlemler

Biyolojik ön-işlem yönteminde lignoselülozik madde içerisindeki lignini çözmek amacıyla mantarlar kullanılmaktadır. Biyo-delignifikasyon olarak tanımlanan bu işlemde biyokütle içerisindeki ligninin mikroorganizmalar tarafından biyolojik degradasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu ön-işlem şekli kolay uygulanabilirliğinin yanı sıra elde edilen verim düşük ve delignifikasyon oranı oldukça yavaştır (Suryadi vd. 2022).

Bir diğer hidroliz metodu enzimatik hidroliz işlemi olup, selüloz hidrolizinde substratın lignin ve hemiselüloz içeriği, yüzey alanı ve selülozun kristallik derecesi gibi yapısal parametreler lignoselülozik materyallerin enzimatik hidroliz işlemini oldukça etkilemektedir (Siacor vd. 2020). Burada lignoselülozik biyokütlerdeki kompleks şeker yapılarının (hemiselüloz ve selüloz) biyolojik olarak parçalanabilmesi için çoğunlukla ticari selülaz ve hemiselülaz gibi enzimler kullanılmaktadır (Joshi vd.2019). Son yıllarda, etanol üretim süreçlerinde lignoselülozik biyokütlenin enzimatik olarak sakkarifikasyonunun arttırılması için kullanılan bu çevre dostu yaklaşım, ön-işlem yöntemi olarak yoğun ilgi görmektedir (Alvira vd. 2010).

2.7 Biyoetanol Üretiminde Sıklıkla Kullanılan Mikroorganizmalar

Eski dönemlerden beri biyoetanol üretimi için fermantasyon aşamasında birçok mikroorganizmanın kullanıldığı bilinmektedir. Bu mikroorganizmaların başlıcaları mayalar olmakla birlikte sıklıkla bakteriler ve genetik manipülasyon sonucu metabolik olarak değiştirilmiş mikroorganizmalar da kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların sahip olduğu; düşük maliyetli besi ortamlarında hızlı gelişim gösterebilmesi, bazılarının ekstrem koşullara karşı olan dayanıklılığı, etanol toleransının ve etanol veriminin yüksekliği gibi avantajlara sahip olması tercih nedenleri arasında sayılabilir (Simas-Rodrigues vd. 2015).

Fermantasyon, monosakkaritlerin fermentatif mikroorganizmalar varlığında, uygun sıcaklık ve pH aralıkları gibi destekleyici koşullarda biyoetanol ve diğer yan ürünlere metabolik bir dönüşüm aktivitesi olarak tanımlanabilir (Phwan vd. 2018).

2.7.1 Mayalar

Biyoetanol üretiminde kullanılan mayalar genellikle kullanılacak hammaddenin şeker profiline (C5 veya C6) göre daha verimli ürün oluşumu için tercih edilmektedir. Aşağıda biyoetanol üretiminde sıklıkla kullanılan mikroorganizma örneklerinden bahsedilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae, antik çağlardan beri gıda alanında kullanılmakta olan bir mayadır. Etanol fermantasyonu için en yaygın olarak kullanılan ökaryotik mikroorganizma olmuştur. Düşük maliyeti ve kolay erişilebilirliği nedeniyle geleneksel olarak etanol üretiminde başlangıç kültürü olarak tercih edilmektedir. Pek çok *S. cerevisiae* suşu, diğer maya türleriyle karşılaştırıldığında düşük pH değerleri, yüksek şeker konsantrasyonları ve etanole karşı toleransa sahip olması gibi birçok avantaja sahiptir (Demir vd. 2006; Rogers vd. 2007; Láinez vd. 2019). Oksijen varlığında veya düşük şeker miktarlarında dahi etanol üretebilmektedir. Yüksek ozmotik dirence sahip olmakla beraber 4.0 gibi

düşük pH seviyelerini de tolere edebilmektedir. 11 - 38 °C sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. Metabolizması oksidatif fermantasyona sahip olacak şekilde gelişmiştir, yani oksijen varlığında bile maya, glukoz fazla olduğunda fermentatif metabolizma kullanır. Bu metabolik özellik genellikle Crabtree etkisi olarak adlandırılmaktadır. Evrimsel süreçte milyonlarca yıldır süregelen bu özelliği sayesinde hızlı glukoz tüketimi ve antiseptik nitelikteki etanol üretme yeteneği nedeniyle ekolojik nişinde avantaj sahibidir (Papini vd. 2012; Dai vd. 2018). Çevresel stres etkenlerine karşı dayanıklıdır. *S. cerevisiae*, GRAS bir maya olarak ekmek, bira, alkol ve enzim sanayisinde kullanılmaktadır (Origone vd. 2018; Suna ve Çopur 2018). *S. cerevisiae*, etanol fermantasyonunda ana metabolik yolak olarak glikolizi (EMP) kullanır, üretilen piruvat ise anaerobik koşullarda CO₂ çıkışı ile etanole indirgenir (Liu vd. 2019).

Saccharomyces cerevisiae, esasen yüksek bir etanol toleransına sahip olduğu ve anaerobik fermantasyon koşullarında yaşayabildiği için, endüstriyel etanol üretiminde tercih edilen ilk mayadır. Prokaryotların aksine, *S. cerevisiae* düşük pH koşullarını tolere edebilir ve büyük ölçekli endüstriyel üretim için çok önemli olan faj enfeksiyonuna dirençlidir (Govinden vd. 2001; Shi vd. 2022).

Kluyveromyces marxianus

Kluyveromyces marxianus, ilk olarak 1888'de E. C. Hansen tarafından tanımlanmıştır. Daha sonrasında bu mayayı üzümden izole eden Marx'tan sonra *Saccharomyces marxianus* olarak isimlendirmiştir (Lodder ve Kreger-van Rij 1952).

K. marxianus, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri, lağım suyu, mısır ve üzüm gibi bitkilerde bulunabilmektedir (Yu vd. 2021). Pentoz ve heksoz şekerler gibi geniş bir substrat spektrumu, yüksek büyüme hızı, aşırı miktarda şekere maruz kaldığında daha az fermente olma eğilimi ve bir diğer ayırt edici özelliği ise 44 ile 52 °C arasındaki sıcaklıklara karşı termotolerant oluşu gibi birçok özelliğe sahiptir. *Kluyveromyces* sp., GRAS grubuna (genel olarak güvenli kabul edilen) dahildir ve FDA ("Gıda ve İlaç Dairesi") tarafından farmasötik ve gıda kullanımları için güvenli kabul edilmektedir (Láinez vd. 2019; Leonel vd. 2021). Crabtree negatif bir maya olmasının yanı sıra

yalnızca glukoz değil, aynı zamanda arabinoz, sellobiyoz, laktoz ve ksiloz gibi çeşitli şekerleri de asimile edebilmesi bakımından diğer maya türlerinden farklıdır (Sakihama vd. 2019).

Pichia stipitis

Pentoz fermentatif bir maya olan *P. stipitis*, karbon kaynağı olarak sadece ksiloz kullanmaktadır. *P. stipitis*, Crabtree negatif, haploid formda bir mayadır. Crabtree pozitif bir maya olan *S. cerevisiae*'den farklı olarak, *P. stipitis*'te fermantasyonun düzenlenmesi, etanol üretiminin yalnızca oksijen sınırlayıcı hale geldiğinde devreye girdiği oksijen seviyelerine bağlıdır (Papini vd. 2012). GRAS bir mayadır (Lee vd. 2021). Osmotik basınca karşı düşük bir dirence sahip olduğu için yoğun şeker ortamında etanol üretimi gerçekleştiremez (Prasad vd. 2020).

Candida boidinii

Biyoeanol üretiminde tercih edilen bir diğer maya olan *C. boidinii* meyve epidermisi ve mangrov çevresi gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir. Biyoeanol üretimi, biyofilm oluşturma yeteneği ve lipaz aktivitesi gibi biyoteknolojik potansiyele sahip fermentatif bir mayadır. Düşük pH seviyelerine dayanıklıdır. Crabtree negatif olan bu mayanın, C1 bileşiklerinin metabolizmasında yer alan metilotrofik mikroorganizmaların meydana getirdiği metanolü kullanıyor olabildiği düşünülmektedir (Araujo vd. 1995; Osawa vd. 2009; Sauer vd. 2010; Fehér vd. 2021). GRAS olmayan bir mayadır (Boundy-Mills vd. 2019).

2.7.2 Bakteriler

Zymomonas mobilis

Bu bakteri ilk olarak, Meksika'nın geleneksel pulque içkisinde, tropikal Afrika'da üretilen palmye şaraplarında ve olgunlaşmış balda, şeker bakımından zengin bitki özlerinin fermente edilmesiyle bulunmuştur (Swings ve Ley 1977).

Z. mobilis, piruvat dekarboksilaz ve alkol dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla ED yolağı ile glukozdan etanol üreten, anaerobik, Gram-negatif bir bakteridir. Bu mikroorganizmalar pentoz şekerlerini kullanamadıklarından dolayı maksimum üretkenliğin önünde bir engel teşkil etmektedirler (Komati Reddy vd. 2015; Liu vd. 2019). Doğada bulunan *Z. mobilis*, etanol üretmek için karbon kaynağı olarak sadece heksoz şekerleri (glukoz, fruktoz ve sükroz) kullanabilmektedir. Bunun yanı sıra, ön-ışleme tabi tutulmuş lignoselülozik biyokütle hidrolizatlarında en çok bulunan ikinci şeker olan ksiloz gibi pentoz şekerleri kullanamaz. Model bir etanolojenik suş olan *Z. mobilis*, yüksek şeker alım oranı, etanol verimi, glukoz toleransı ve etanole karşı olan yüksek direnci gibi sahip olduğu eşsiz özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir (Rogers vd. 2007; Zhang vd. 2019).

Escherichia coli

Gram negatif, enterik ve çubuk formda bir bakteridir (DeMars vd. 2016). Doğada bulunan *E. coli*, anaerobik koşullar altında bir mol glukozdan, iki mol asetat ve bir mol etanol halinde metabolize edebildiği için endojen bir işlem yoluyla etanol üretebilen bir bakteridir (Koppolu ve Vasigala 2016). Etanol fermantasyonunda gliserolü metabolize edebilir (Yazdani ve Gonzalez 2008).

2.7.2.1 Diğer bakteriler

Çoğu termofilik bakteri; selülaz ve hemiselülaz enzimleri üretir. Biyokütle dönüştürme işlemi açısından önemli bir maliyet avantajı olan harici hidrolitik enzimlerin eklenmesine ihtiyaç duyulmadan biyokütleyi etanole fermente edebilir. Bu bakteriler ayrıca lignoselülozik hidrolizatlarda bulunan hem pentoz hem de heksoz şekerlerini metabolize edebilmektedir. Termofilik bir anaerobik bakteri olan *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485, 45 – 65 °C sıcaklık aralığında ve 4.0 - 6.5 pH aralığında gelişim gösterir. Hemiselüloz ve ksilan polimerlerinin yanı sıra sellobiyoz, glukoz, ksiloz, mannoz, galaktoz ve arabinozun da dahil olduğu selülozik biyokütledeki birincil şekerleri de doğrudan fermente edebilme yeteneğine sahiptir. *Thermoanaerobacter etanolicus*, 69 °C'de etanol üretimi yapabilen ekstrem

termofilik, spor oluşturmayan, etanol üreten anaerobik bir bakteridir. Anaerobik ve termofilik bir bakteri olan *Clostridium thermocellum*, 60 °C'de ve pH 7.0'da, selülozu doğrudan etanole fermente edebilmektedir (Kumar vd. 2009).

2.8 Literatürde Yer Alan Bazı Çalışmalar

Sudhakar vd. (2021) gerçekleştirdikleri çalışmalarında *S. cerevisiae* aracılığıyla, harcanmış *Ganoderma lucidum* mantarından elde edilen 8.28 mg/g indirgen şekerden 5 günlük inkübasyon sonrası nihai etanol verimi 1.57 g/L elde etmişlerdir.

Chupaza vd. (2021), *Azolla filiculoides* bitkisinden *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Candida lusitanae* ve *K. marxianus* mayaları aracılığıyla ayrı ayrı olarak biyoetanol üretimini gerçekleştirmiş ve elde edilen değerleri karşılaştırmışlardır. Ayrıca sülfürik asit (H_2SO_4), nitrik asit (HNO_3) ve hidroklorik asit (HCl) ön-işlem metodlarını karşılaştırarak, %25 verimle 16.7 g/L yüksek monosakkarit konsantrasyonunun elde edildiği H_2SO_4 yöntemini seçmişlerdir. Bununla birlikte Viscozyme, Celluclast ve Cellic C-Tec2 enzimleri karşılaştırılarak 35.8 g/L yüksek monosakkarit içeriğinden dolayı enzimatik hidroliz için Viscozyme enzimini seçmişlerdir. Etanol üretimi; *K. marxianus*'den 26.8 g/L, *C. lusitanae*'den 23.2 g/L, *S. cerevisiae*'den 18.2 g/L ve *P. stipitis*'den 13.7 g/L olarak belirlenmiştir.

Fehér vd. (2021) çalışmalarında mısır lifini hammadde olarak kullanarak iki basamaklı asit hidroliz uygulayarak SSF ve SHF yöntemiyle biyoetanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Asidik ve enzimatik fraksiyonlamadan sonra selüloz hidrolizi sonucu glukoz içeriği sırasıyla 64 g/L ve 25 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek etanol üretimi, SHF ile *C. boidinii* tarafından 30.3 g/L ve *S. cerevisiae* tarafından 26.1 g/L olarak elde edilmiştir.

Raj ve Krishnan (2020) yaptıkları bir çalışmada sulu amonyak ön-işlemi sonrası şeker kamışı küspesinden iki aşamalı enzimatik hidroliz sonucu elde edilen ksiloz ve glukozdan *Candida tropicalis* aracılığıyla ksilitol ve etanol üretimi

gerçekleştirmişlerdir. Nihai ksilitol verimi % 83.14 ve etanol verimi ise % 94.65 olarak bulunmuştur.

Prajapati vd. (2020) gerçekleştirdikleri bir çalışmada şeker kamışı küspesinin *Aspergillus tubingensis* enzimatik kokteyliyle enzimatik hidrolizi sonrası *Candida shehatae* aracılığıyla etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. 24 saatte glukozun tamamı tükenmiş, 120 saate kadar ise ksilozun kullanımı devam etmiştir. % 77.9 fermantasyon verimliliği ile 15.54 g/L maksimum etanol üretimi gerçekleşmiştir.

M'barek vd. (2020), Fas'ta çürümüş odun kalıntısından elde ettikleri *Fusarium solani* ve *Fusarium oxysporum* fungusları aracılığıyla zeytin değirmeni atıklarından etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Maksimum etanol üretimini 2.47 g/L olarak *F. solani*'den elde edilmiştir.

Mazaheri ve Pirouzi (2020), patates kabuklarıyla yaptıkları çalışmada *Z. mobilis* bakterisi aracılığıyla etanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. %20 patates kabuğundan α -amilaz ve amiloglukozidaz ile enzimatik hidrolizi sonucu 88.2 g/L indirgen şeker elde etmişlerdir. 61.3 g/L başlangıç şekerinin %78.9'u kullanılarak 23.3 g/L maksimum etanol konsantrasyonu elde etmişlerdir.

Mohapatra vd. (2020), Odisha'nın Atri kaplıcalarından izole ettikleri termofilik bakteriler; *Bacillus paranthracis* ve *Bacillus nitratreducens* aracılığıyla *Pennisetum sp.*'den etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Ultrasonikasyon destekli NaOH ön-işlem sonrası 7.5 g/L substrat konsantrasyonu kullanarak 0.39 g/L maksimum etanol konsantrasyonu elde etmişlerdir. Buna ek olarak 0.009 g/L asetat, 0.13 g/L laktat varlığı tespit edilmiştir.

Prasad vd. (2020) çalışmalarında, selülitik fungal suşlar aracılığıyla pirinç kalıntısından etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Enzimatik aktivite sonucu en yüksek indirgen şeker miktarı *Trichoderma reesei* ile elde etmişlerdir. Mikrodalga destekli alkali ön-işlem ve *T. reesei* aracılığıyla gerçekleştirilen selülitik aktivite sonrası 55.6 g/L şeker tespit

etmişlerdir. *S. cerevisiae* aracılığıyla 22.6 g/L, *P. stipitis* aracılığıyla ise 25.3 g/L maksimum etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir.

Nweze vd. (2021), yaptıkları bir çalışmada Nijerya'nın Nsukka bölgesindeki yerel hayvanat bahçesi, market ve ormandan izole edilen toplamda 320 termotolerant maya arasından; 30 g/L ksilozdan 7 g/L'den fazla etanol üretebilen 3 termotolerant mayayı seçmişlerdir. Hem glukoz hem de ksiloz kullanımı için en iyi mayanın *Pichia kudriavzevii* olduğunu belirlemişlerdir. 24 saat içinde 3 izolat da ortamdaki glukozun tamamını tüketmiştir. Fermantasyon ortamlarındaki ksilozun tüm koşullarda 96 saat içerisinde tamamen tükendiğini gözlemlemişlerdir.

Mishra ve Ghosh (2020), kans çiminden ko-kültür fermantasyonu aracılığı ile etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Başlangıç şeker konsantrasyonu; glukoz zengin fraksiyon için 40.32 g/L, ksiloz zengin fraksiyon için 21.87 g/L olarak bulmuşlardır. Maksimum etanol konsantrasyonu; glukoz zengin ortamda detoksifiye edilmemiş 26.9 g/L ve detoksifiye edilmiş 26.94 g/L olarak bulmuşlardır. Ksiloz zengin ortamda ise detoksifiye edilmemiş 21.69 g/L ve detoksifiye edilmiş 22.48 g/L olarak bulmuşlardır.

Shankar vd. (2020) su sümbülü ve muz yaprağından bireysel maya suşları aracılığıyla ksilitol ve etanolün ko-üretimini gerçekleştirmişlerdir. Su sümbülü yaprağının selüloz içeriği; %16.59 ve muz yaprağının selüloz içeriği; %19.89 olarak bulmuşlardır. Enzimatik hidroliz sonrası *S. cerevisiae* tarafından üretilen maksimum etanol; muz yaprağı; 8.1 g/L, su sümbülü yaprağı; 6.18 g/L olarak tespit etmişlerdir. Asit hidrolizi sonrası *C. tropicalis* tarafından üretilen maksimum ksilitol; muz yaprağı; 13.1 g/L, su sümbülü yaprağı; 11.2 g/L olarak tespit etmişlerdir.

Zhao vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada asit hidrolizi sonrası % 91.2 toplam şeker verimi ile 1 kg konjac tozundan; 34.2 g/L glukoz ve 51.6 g/L mannoz elde etmişlerdir. *Gluconobacter oxydans* aracılığı ile 340 g mannonik asit ve *C. shehatae* aracılığı ile 100 g etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir.

2.8.1 Ko-fermantasyon stratejisi ile yapılan bazı çalışmalar

Ko-fermantasyon yönteminde amaç ortamda bulunan farklı şeker profillerinin eş zamanlı olarak farklı mikroorganizmalar aracılığıyla etkin bir şekilde tüketilmesini içermektedir. Ko-fermantasyon stratejisinin kullanıldığı bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Wirawan vd. (2020) immobilize edilmiş *Zymomonas mobilis* ve süspende edilmiş *Pichia stipitis* hücreleri aracılığıyla sürekli iki aşamalı biyoetanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. SHCF’de 0.36 g etanol/ g selülozun etanol üretkenliği 1.868 g/L/h olarak bulmuşlardır. SSCF’de ise 0.414 g etanol/ g selüloz etanol üretkenliği ile 0.705 g/L/h olarak bulmuşlardır.

Karagöz vd. (2012), *S.cerevisiae* ve *P. stipitis* aracılığıyla, alkali hidrojen peroksit ön-işlemine tabi tuttukları kolza tohumu samanından selüloz ve hemiselülozun fermente edilebilir şekerlere dönüşümünü gerçekleştirmişlerdir. Ön-işlem sonrası oluşan katı ve sıvı fazı süzerek ayırmışlardır. Katı fraksiyonu, aynı kap içinde eş zamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon işleminde kullanmışlardır. Optimal koşulları; 1 saat + 50 °C + %5 (v/v) H₂O₂ olarak belirlemişlerdir. Ancak optimum delignifikasyonun 0,5 M MgSO₄ eklendiğinde gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ön-işlemden elde edilen sıvı fraksiyondan 5.73 g/L, katı fraksiyondan ise *P. stipitis* aracılığıyla ko-fermantasyon sonrasında 14.07 g/L etanol eldesiyle sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada Malik vd. (2021), lignoselülozik bir biyokütle olan pamuk sapının hammadde olarak kullanımıyla, immobilize edilmiş mayalar tarafından (*Saccharomyces cerevisiae* YPH499 ve *Pachysolen tannophilus*) ko-fermantasyon sonucu biyoetanol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Pamuk sapının lignoselülozik yapısının monosakkaritlere degradasyonu biyolojik ve kimyasal ön-işlemler vasıtasıyla elde edilmiştir. Fermantatif mayalar, bu enzimatik hidroliz sonucu ortaya çıkan pentoz ve heksoz şekerlerini kullanarak biyoetanol üretimini gerçekleştirmiştir. Biyoetanolün üretimi sonucunda spektroskopik analizler (FTIR, XRD, SEM ve TGA dahil) yapılmış olup, toplamda beş döngü sonunda maksimum şeker verimliliğini ölçmüşlerdir.

Sonuçlara bakıldığında ise her bir döngü sonunda verimliliğin giderek azaldığını tespit etmişlerdir.

Bunun yanı sıra genetik modifikasyona uğratılmış tek bir mikroorganizma aracılığıyla da eş zamanlı olarak ko-fermantasyon stratejisi ile pentoz ve heksoz şekerlerin etkin bir şekilde tüketimi gerçekleştirilmesiyle biyoetanol üretimi gerçekleştirilmektedir. Buna ilişkin bazı örnekler aşağıda verilmiştir.

İkinci grup bir hammadde olan şalt çiminden yabancı maya türleri aracılığıyla ko-fermantasyon stratejisi ile yaptıkları bir çalışmada Antunes vd. (2022), biyokütlenin (şalt çimi) fermente edilebilir şeker (C5 ve C6) verimini arttırmak için seyreltik asit ve alkali ön-işleme tabi tutmuşlardır. Yeni izole edilmiş yabancı bir maya olan *Scheffersomyces parashehatae* UFMG-HM-60.1b'yi kullanmışlardır. Kontrol için *S. cerevisiae* 174'ü kullanmış ve C6 şekerler için 0.46 g/g etanol $Y_{p/s}$ ve 0.70 g/L saat Q_p değerleri elde ederlerken, yabancı suş için ise bu değerleri 0.29 g/g $Y_{p/s}$ ve 0.38 g/L h Q_p olarak bulmuşlardır.

Fernández-Sandoval vd. (2019), çalışmalarında lignoselülozik biyokütleden etanol üretimi için tek basamaklı ve iki basamaklı sürekli kültür ortamlarında, karışık şekerlerin (7.5 g/L glukoz ve 42.5 g/L ksiloz) ko-fermantasyonunu karşılaştırmak için etanolojenik *E.coli* MS04'ü kullanmışlardır. Ortam koşulları; mikro havalandırmalı, mineral içeren, düşük seyreltme oranı olarak belirlemişlerdir. Tek basamaklı sürekli kültür koşullarında düşük seyreltme oranında (0.05 h^{-1}), 0.9 g/L saat hacimsel etanol üretkenliği elde edilirken, iki basamaklı sürekli kültür koşullarında 0.15 h^{-1} seyreltme oranında ise etanol verimi ve toplam şeker tüketiminde meydana gelen hafif bir azalma ile birlikte hacimsel etanol üretkenliğin 1.6 g/L saate kadar arttığını belirlemişlerdir.

Bir diğer çalışmada ise Zhang vd. (2018), asit ön-işleme tabi tutmuş oldukları tatlı sorgum küspesi ve suyunu karışık olarak, eş zamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon (SSJCF) ile etanol üretiminde kullanmışlardır. Sülfürik asit konsantrasyonunun etanol üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmişler ve işlem esnasında dikkate değer biçimde çift fazlı fermentasyon meydana geldiğini

gözlemlemişlerdir. 20 FPU/g selüloz ve başlangıç süresinde %2 sülfirik asit ile optimize ettikleri koşullarda, 216 saatlik inkübasyon sonrasında 120.41 ± 0.4 g/L etanol ile taze tatlı sorgum sapı; su ve monosakaritten zengin selülozik biyokütleden ise (toplam etanol üretimi; tatlı sorgum suyundan birinci grup ve tatlı sorgum küspesinden ikinci grup etanol üretimi olmak üzere) 67.75 g/kg etanol verimi elde etmişlerdir.



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Kimyasallar ve Reaktifler

Deneylerde glukoz monohidrat, ksiloz, etanol, pepton, maya özütü, patates dekstroza agar (PDA), formik asit ($\geq 98\%$), asetik asit (100%), sülfürik asit (98%), sodyum potasyum tartarat tetrahidrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 , sitrik asit monohidrat, NaOH ve hidrojen peroksit (35% Merck/Almanya), 5-hidroksimetilfurfural ve selüloz enzimi (CelliCtec2/Sigma Aldrich) kullanılmıştır. 1 M stok sodyum sitrat tamponu, NREL protokolüne göre (Adney ve Baker 2008) hazırlanmış ve deneyler sırasında 50 mM'ye seyreltilmiştir. Deneyler sırasında aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır:

Laboratuvar tipi değirmen (MiproLab/Türkiye), otoklav (ALP/CL-40 M/Almanya), ultrasonik su banyosu (ISOLAB/621.05006/Almanya), çalkalayıcı inkübatör (Gerhardt/Almanya/THO500), spektrofotometre (Shimadzu/UV-1201 V/Japonya), gaz kromatografisi (Shimadzu/GC2010/Japonya), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Shimadzu/Japonya), kırılma indisi dedektörü (Shimadzu/RID10-A/Japonya), santrifüjler (Hettich/Rotofix 32A ve Rotina 35 R/Almanya) ve su banyosu (Mettler/WB22 ve WNB22/Almanya).

3.2 Maya İzolasyonu, PCR Ve Tanımlanması

Örnekler, şeker fabrikası atıklarından/Ankara'dan toplanmıştır. Örnekler santrifüjlenmiş ve Potato Dextrose Agar (Merck-Almanya) ve 600.000 IU penisilin içeren Petri plakalarına 0.1 mL inokulum olarak yayılmıştır. İnkübasyon sıcaklığı $30^\circ C$ olarak ayarlanmıştır. Tek koloniler tekrarlı yayma plak tekniği ile saflaştırılmış ve saf koloniler $+4^\circ C$ 'de muhafaza edilmiştir. ITS bölgelerini büyötmek için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır (Glass ve Donaldson 1995). PCR ve dizileme işlemleri için dış laboratuvardan (BM LAB/Ankara) hizmet alımı yapılmıştır.

PCR koşulları aşağıdaki gibidir (her adım için 30 döngü):

Denatürasyon: 94°C 1 dakika boyunca, Bağlanma: 55°C 45 saniye boyunca, Uzama: 72°C 45 saniye boyunca gerçekleştirilmiştir. Harici bir laboratuvarında (BM Lab, Ankara, Türkiye) DNA dizilemesi için ABI 3100 Genetic Analyzer cihazı kullanılmıştır. Suşlar, DNA, 18S rDNA gen dizisi ve PCR analizlerinin NCBI/BLAST sonuçlarına göre tanımlanmıştır. BLAST sonuçlarına göre izolatın *C. boidinii* olduğu doğrulanmıştır. Mikroorganizmanın ITS dizisi GenBank veri tabanında OK041521 erişim numarası ile saklanmaktadır.

3.3 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Ön-İşlemi

Çalışmada kullanılan EÇA, Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü (Çay-Kur)/Rize'den kuru halde temin edilerek laboratuvar tipi 0.1 cm'lik bir değirmende öğütülmüş ve deneylerde kullanılabilecek kadar vidalı kapaklı bir şişede saklanmıştır. Seyreltik asit ile ön-ışlem deneyleri için %1 (v/v) sülfirik asit (H₂SO₄/Merck-Germany) kullanılmıştır. EÇA, seyreltik asit ile ön-ışleminden hemen sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Seyreltik asit ön-ışlemi sonrasında EÇA'nın pH'ı 0.7-0.8 olarak bulunmuştur. AHP ön-ışlemi ise Saha ve Cotta'ya (2014)'e göre küçük değışikliklerle gerçekleştirilmiştir. AHP ön ışlemi için %1 H₂O₂ kullanılmış ve deneylerden önce pH, NaOH ile 11.5'e ayarlanmıştır. AHP, 72 saat boyunca 25°C'de gerçekleştirilmiş ve sonrasında EÇA, 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Ultrasonikasyon destekli seyreltik asit ve AHP ön-ışlemi için sırasıyla EÇA'ya %1 (v/v) sülfirik asit (H₂SO₄/Merck-Germany) ve %1 H₂O₂ uygulandıktan sonra 30 °C'de 30 dakika boyunca (50 Hz/400 W) ultrasonik su banyosunda tutulmuştur (Zhang ve Cai 2008; Hendriks ve Zeeman 2009). Her iki ön-ışlem yönteminde de geri plandaki şekerleri önlemek için yıkanmış ve yıkanmamış biyokütle kullanılmıştır.

3.4 Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz için bir selüloz olan CelliCTec2 kullanılmıştır. Enzim konsantrasyonu, 15 Filtre Kağıdı Birimi (FPU)/g selüloza ayarlanmıştır. Enzimatik hidroliz 50°C'de gerçekleştirilmiş ve hidrolizatın pH'ı, çalkalayıcı inkübatörde 100 rpm'de 50 mM sitrat tamponu ile 4.8'e ayarlanmıştır. Enzimatik hidroliz 72 saat boyunca devam ettirilmiştir (Adney ve Baker 2008).

3.5 İnhibitörlerin Mikrobiyal Büyüme ve Biyoetanol Üretimine Etkisi

Artan inhibitör konsantrasyonlarının mayaların mikrobiyal büyümesi ve etanol üretimine etkileri sentetik YPD (3.0 g/L maya özütü, 5.0 g/L pepton, 20.0 g/L glukoz) besiyerinde araştırılmıştır. Bu amaçla beş farklı YPD besiyeri hazırlanmış ve bu besiyerlerinin bileşimleri aşağıda verilmiştir.

Besiyeri 1: Yalnızca YPD,

Besiyeri 2: YPD, 0.5 g/L asetik asit, 0.01 g/L formik asit, 0.01 g/L HMF,

Besiyeri 3: YPD, 1 g/L asetik asit, 0.05 g/L formik asit, 0.05 g/L HMF,

Besiyeri 4: YPD, 5 g/L asetik asit, 0.1 g/L formik asit, 0.1 g/L HMF,

Besiyeri 5: YPD, 10 g/L asetik asit, 0.2 g/L formik asit, 0.2 g/L HMF.

3.6 Fermantasyon Deneyleri

İnkübasyon sıcaklığı, fermantasyon deneyleri için 100 rpm karıştırma hızında 96 saat boyunca 30°C'ye ayarlanmıştır. EÇA besiyerine, ZnSO₄ (0.05 g/L), CaCl₂ (0.1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0.5 g/L), KH₂PO₄ (1.0 g/L), pepton (5.0 g/L) ve maya özütü (3.0 g/L) ilave edilmiştir. Her bir mayanın ksiloz asimilasyon kapasitesi ko-fermantasyon deneylerinden önce sentetik ksiloz, pepton, maya özütü içeren (YPX) besiyerinde araştırılmıştır. YPX besiyeri içeriği; maya özütü (3.0 g/L), pepton (10.0 g/L) ve ksiloz (20.0 g/L) olarak kullanılmıştır. Toplam inokülasyon oranı *S. cerevisiae* için 4.3×10^7

CFU/mL, *C. boidinii* için 4.7×10^7 CFU/mL'ye yaklaşık olarak karşılık gelen %5'e (v/v) ayarlanmıştır.

Mayaların beş farklı inokülasyon oranı (% v/v, 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 bu oranların yaklaşık olarak karşılığı; 4.3×10^7 CFU/mL *S. cerevisiae*, 3.2×10^7 CFU/mL *S. cerevisiae*/ 1.1×10^7 CFU/mL *C. boidinii*, 2.1×10^7 CFU/mL *S. cerevisiae*/ 2.3×10^7 CFU/mL *C. boidinii*, 1.0×10^7 CFU/mL *S. cerevisiae*/ 3.5×10^7 CFU/mL *C. boidinii* ve 4.7×10^7 CFU/mL *C. boidinii*) ko-fermantasyon deneyleri için seçilmiştir.

3.7 Analitik Yöntemler

Etanol tayini için gaz kromatografi sistemi kullanılmıştır. 1.5 mL alınan numuneler, GC analizinden önce süzölmüş ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant filtrasyonu için 0.22 µm membran filtre kullanılmış ve enjeksiyon hacmi 1 µL olarak ayarlanmıştır. Etanol ölçümü için Restek Rtx-Wax kolonu (60 metre uzunluk, 0.25 milimetre iç çap) ve alev iyonizasyon dedektörü (FID) kullanılmıştır. GC analizinde mobil faz olarak azot gazı kullanılmıştır. İlk ve son kolon sıcaklıkları sırasıyla 50 ve 150°C'ye ayarlanmıştır. Dedektör ve enjeksiyon portunun sıcaklıkları sırasıyla 160°C ve 140°C olarak ayarlanmıştır (Wistara vd. 2016). EÇA'da bulunan 5-hidroksimetilfurfural (HMF), asetik asit ve formik asidin ölçümü için kırılma indisi detektörü (RID-10A) ve Coregel 87H3 (Transgenomik) kolonu ile donatılmış HPLC kullanılmıştır. Analizden önce, 1.5 mL alınan numuneler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant, HPLC analizinden önce 0.22 µm membran filtreden süzölmüştür. Toplam akış 0.6 mL/dk'ya ayarlanmış ve kolon sıcaklığı sürekli olarak 70°C'de tutulmuştur. Mobil faz olarak 5 mM H₂SO₄ kullanılmıştır (Motoda vd. 2019). Toplam indirgen şeker, dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemiyle ölçölmüştür (Miller 1959). Enzim aktivitesi (Filtre Kağıdı birimi/FPU) (Adney ve Baker 2008)'e göre tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi Filtre Kağıdı Birimi (FPU) 121 FPU/mL olarak bulunmuştur.

Aşağıda sunulan denklem (1), teorik etanol verimlerinin hesaplanmasını göstermektedir (Kim ve Lee 2007).

Denklem (1):

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

Hacimsel etanol üretkenliği (Q_p) değerleri Denklem (2), daha önce (Roca ve Olsson 2003) tarafından elde edilmiştir.

Denklem (2):

$$Q_p \text{ (g/Ls)} = \frac{\text{Etanol (g/L)}}{t_{\text{maksimum etanol}}}$$

$Y_{P/S}$ değerleri Denklem (3), (Yücel ve Aksu 2015)'ya göre hesaplanmıştır:

Denklem (3):

$$Y_{P/S} \text{ (g/g)} = \frac{\text{Maksimum etanol (g/L)}}{\text{Tüketilen şeker (g/L)}}$$

Spesifik büyüme hızı (μ), Denklem (4)'e göre birim zaman başına biyokütledeki (g/L) artış olarak hesaplanmıştır (Oliveira vd. 2011).

Denklem (4):

$$\mu_{\text{maks.}} = (1/s): \frac{\ln(x_2: x_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Bu denklemde x biyokütle (g/L), t ise her bir numuneden belirli bir zamanda alınan örneği göstermektedir.

3.8 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Bazı Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi

EÇA'nın nem içeriği (Nielsen 2017)'e göre belirlenmiştir. EÇA'nın hemiselüloz içeriği NREL protokolüne göre (Sluiter vd. 2008) hesaplanmıştır. EÇA'nın selüloz

konsantrasyonu, standart ISO protokolü 5498–1981'e göre ölçülmüştür (Śmiechowska ve Dmowski 2006). Selüloz ölçümü harici bir laboratuvar (Düzen Norwest/Ankara) tarafından yapılmıştır.

3.9 Mayaların Toplam Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Mayaların toplam protein içeriği Lowry yöntemine göre belirlenmiştir (Lowry vd. 1951).

3.10 Mayaların Glukoz ve Ksiloz Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi

Mayaların farklı şeker kullanım kapasitelerinin belirlenmesi adına iki farklı sentetik besiyeri hazırlanmıştır. Sentetik besiyerlerine (YPD; pH: 4.8, maya özütü (3.0 g/L), pepton (10.0 g/L), glukoz (20.0 g/L), XPY; pH: 4.8, maya özütü (3.0 g/L), pepton (10.0 g/L), ksiloz (20.0 g/L)) *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* mayaları inoküle edilmiştir.

3.11 İstatistiksel Analiz

Varyans Analizi (ANOVA) ile test edilen gruplar arasındaki farkın anlamlılığını belirlemek için SPSS 25.0 yazılımı ile istatistiksel analizler yapılmıştır.

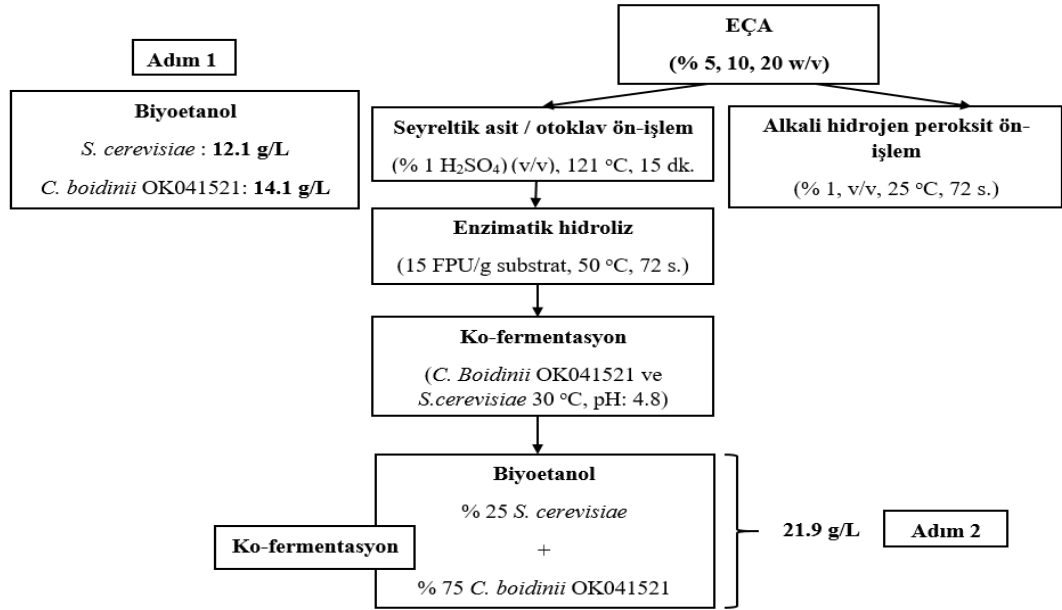
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Kimyasal Bileşimi

Çalışmanın bu bölümünde EÇA'nın bazı yapısal ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Hammaddenin selüloz, hemiselüloz ve nem içerikleri sırasıyla %33.8, %18.9 ve %7.8 olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada enzimatik hidroliz öncesi %10 biyokütle konsantrasyonunda glukoz, arabinoz ve diğer şekerler sırasıyla %34.43, %28.67 ve %36.90 olarak tespit edilmiştir. Enzimatik hidrolizden sonra EÇA besiyerinde baskın şeker olarak glukozun bulunduğu ve bu şekerin EÇA besiyerindeki yüzdesinin %34.43'ten %56.20'ye yükseldiği gözlemlenmiştir.

4.2 Farklı Ön-İşlem Yöntemlerinin Fermente Edilebilir Şeker Konsantrasyonlarına Etkisi

Farklı ön-işlem yöntemlerinin fermente edilebilir şeker konsantrasyonlarına etkisini değerlendirmek için EÇA'nın genel ön-işlemi ve hammaddeden biyoetanol üretim yaklaşımları Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ön-işlem tipinin selülozik fraksiyonun enzimatik hidrolizi üzerindeki etkisini görmek için, ön-işlem uygulanmış EÇA su ile yıkanmış ve böylece hemiselüloz kaynaklı şekerler giderilmiştir.



Şekil 4.1 Ko-fermantasyon yaklaşımıyla EÇA'dan biyoetanol üretiminin şematik gösterimi

Bu ön-işlem ve yıkama sonrasında elde edilen indirgen şeker miktarları Çizelge 4.1’de gösterilmektedir. Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi seyreltik asit ve AHP ön-işlem tiplerine ultrasonikasyonun herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ultrasonikasyon destekli ön-işlem uygulanan ve enzimatik hidrolize tabi tutulmuş yıkanmayan %10 EÇA’dan seyreltik asit ve AHP ön-işlem ile sırasıyla en yüksek 38.19 g/L ve 25.29 g/L glukoz ve 16.84 g/L ve 8.28 g/L ksiloz bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Ultrasonikasyon destekli/desteksiz seyreltik asit ve AHP ile dört farklı kombinasyonda ön-işleme tabi tutulmuş enzimatik hidroliz öncesi ve sonrasındaki (yikanmamış ve yıkanmış) %10 EÇA'da indirgen şeker konsantrasyonlarının karşılaştırılması

İndirgen şeker konsantrasyonu (%10 EÇA, w/v kuru ağırlık)						
Ön-işlem Tipi	Enzimatik hidroliz uygulanmayan indirgen şeker miktarı (%10 EÇA) (g/L)		Enzimatik hidroliz sonrası yıkanmamış %10 EÇA indirgen şeker miktarı (g/L) ^e		Enzimatik hidroliz sonrası yıkanmış %10 EÇA indirgen şeker miktarı (g/L) ^e	
	Glukoz	Ksiloz	Glukoz	Ksiloz	Glukoz	Ksiloz
Seyreltik asit+Otoklav ^a	17.27 ±0.5	10.05 ±0.3	38.19 ±2.9	16.84 ±1.2	18.02 ±6.1	7.57 ±3.5
Seyreltik asit +Ultrasonikasyon+Otoklav ^b	12.17 ±1.2	3.72 ±0.6	20.32 ±11.5	11.66 ±6.6	9.95 ±0.4	4.41 ±0.2
AHP+Otoklav ^c	8.72 ±1.6	2.64 ±0.4	25.29 ±3.6	8.28 ±2.1	12.51 ±5.0	6.22 ±2.9
AHP+Ultrasonikasyon+Otoklav ^d	11.91 ±2.3	2.73 ±0.8	13.78 ±2.6	7.91 ±1.5	6.73 ±0.3	3.86 ±0.1

^aSeyreltik asit+Otoklav; %1 H₂SO₄, v/v, pH:4.8, 121 °C ve 15 dk otoklav

^bSeyreltik asit+Ultrasonikasyon+Otoklav; %1 H₂SO₄, v/v, pH:4.8, 30 °C ve 30 dk Ultrasonikasyon, 121 °C ve 15 dk otoklav

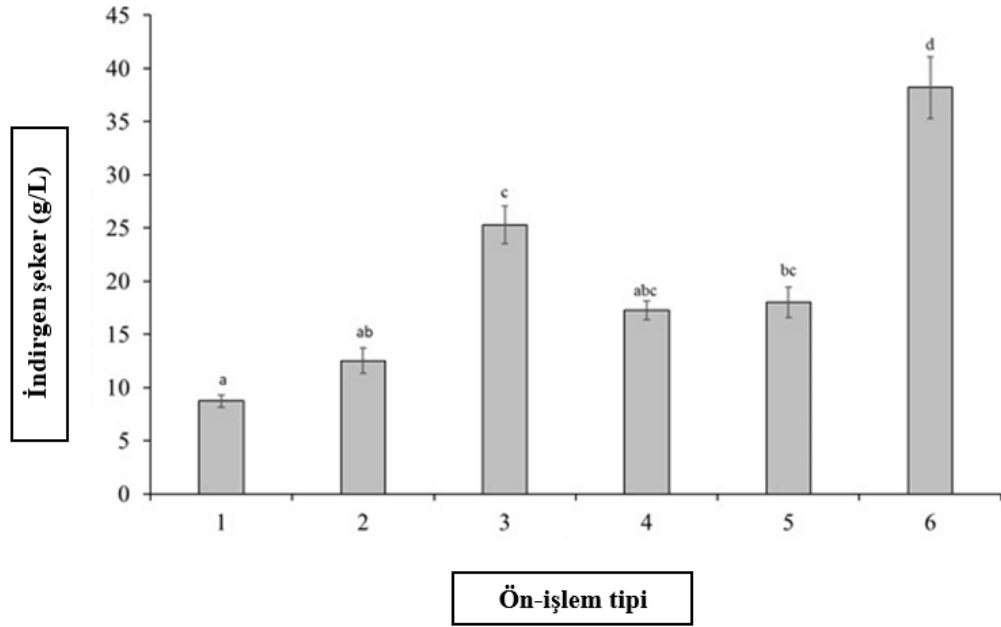
^cAHP+Otoklav; %1 H₂O₂, v/v, pH:11.5, 25 °C, 72 saat, 121 °C ve 15 dk otoklav

^dAHP+Ultrasonikasyon+Otoklav; %1 H₂O₂, v/v, pH:11.5, 25 °C, 72 saat, 30 °C ve 30 dk Ultrasonikasyon, 121 °C ve 15 dk otoklav

^eEnzimatik hidroliz; 15 FPU/g selüloz, 50 °C ve 72 saat

Şeker konsantrasyonları açısından AHP ve seyreltik sülfürik asit ön-işlemlerinin karşılaştırılması Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre, seyreltik asit ön-işlemi, tüm gruplarda önemli ölçüde yüksek şeker konsantrasyonlarına neden olmuştur. Seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş EÇA hidrolizatından elde edilen maksimum şeker miktarı 38.19 g/L olarak bulunmuştur. Ancak bu değer, EÇA'nın AHP ön-işlemine ve enzimatik hidrolize tabi tutulmuş bütün hidrolizatında sadece 25.29 g/L olarak bulunmuştur. AHP ve seyreltik asit+otoklav ile ön-işleme tabi tutulmuş yıkanmış biyokütlenin indirgen şeker konsantrasyonları sırasıyla 12.51 g/L ve 18.02 g/L olarak bulunmuştur. Sadece seyreltik asitle ön-işleme tabi tutulan fakat enzimatik hidroliz uygulanmayan EÇA'dan ise 17.27 g/L indirgen

şeker elde edilmiştir. Bu değer, enzimatik hidroliz olmadan sadece AHP ile ön-işleme tabi tutulmuş yıkanmış EÇA örneğinde ise sadece 8.72 g/L olarak bulunmuştur.



*Aynı gruplarda bulunan farklı üst simgeler anlamlı farklılık göstermektedir.

Şekil 4.2 Farklı ön-işlem yöntemlerinin EÇA'nın indirgen şeker konsantrasyonuna etkisi (Biyokütle konsantrasyonu: %10, enzim konsantrasyonu: 15 FPU/g selüloz)
1: Yalnızca AHP ön-işlemi, 2: AHP + enzimatik hidroliz + EÇA'nın yıkanmış fraksiyonu, 3: AHP + enzimatik hidroliz + EÇA bulamacının tamamı, 4: Yalnızca seyreltik asit ön-işlemi, 5: Seyreltik asit + enzimatik hidroliz + EÇA'nın yıkanmış fraksiyonu, 6: Seyreltik asit + enzimatik hidroliz + EÇA hidrolizatının tamamı

4.3 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun İnhibitör Bileşikler ve Biyoetanol Üretimine Etkisi

Çizelge 4.2 seyreltik asitle ön-işleme tabi tutulmuş EÇA varlığında mayaların biyoetanol üretimleri ile inhibitör bileşiklerin ve indirgen şekerlerin konsantrasyonlarını göstermektedir. Çizelgeye göre %20 başlangıç biyokütle konsantrasyonu kullanıldığında maksimum glukoz ve ksiloz miktarları sırasıyla 54.43 g/L ve 23.61 g/L olarak gözlemlenmiştir. Aynı şekerler %5 EÇA varlığında ise 25.26 g/L ve 10.54 g/L olarak bulunmuştur. Sonuçlar, daha yüksek EÇA konsantrasyonu kullanımının daha yüksek indirgen şeker konsantrasyonu ile sonuçlandığını göstermiştir.

Çizelge 4.2 Seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş EÇA varlığında mayaların inhibitör bileşikler, indirgen şeker, etanol konsantrasyonları ve büyüme kinetiği (pH: 4.8, enzim konsantrasyonu: 15 FPU/g selüloz, fermentasyon süresi: *S. cerevisiae* için 24 saat, *C. boidinii* OK041521 için 48 saat)

		Biyokütle konsantrasyonu (%, w/v kuru ağırlık)		
		5	10	20
Asetik asit (g/L)		0.66 ^f ±0.1	0.80 ^f ±0.1	0.90 ^f ±0.0
Formik asit (g/L)		0.023 ^g ±0.0	0.032 ^g ±0.0	0.034 ^g ±0.0
5-HMF (g/L)		0.33 ^h ±0.0	0.67 ⁱ ±0.0	0.76 ^j ±0.0
İndirgen şeker (g/L)	Glukoz	25.26 ^a ±0.3	38.19 ^{a,b} ±2.9	54.43 ^b ±6.6
	Ksiloz	10.54 ^c ±1.1	16.84 ^d ±1.2	23.61 ^e ±0.4
Biyoetanol konsantrasyonu (g/L)	<i>C. boidinii</i>	6.46 ^k ±0.5	11.58 ^l ±0.2	14.1 ^l ±1.1
	<i>S. cerevisiae</i>	5.99 ^m ±0.5	10.92 ^{m,n} ±0.3	12.1 ⁿ ±1.4
$\mu_{maks.}$ (1/saat)	<i>C. boidinii</i>	0.09 ^o ±0.0	0.10 ^o ±0.0	0.11 ^o ±0.0
	<i>S. cerevisiae</i>	0.15 ^p ±0.0	0.16 ^p ±0.0	0.17 ^p ±0.0

*5-HMF: 5-Hidroksimetilfurfural

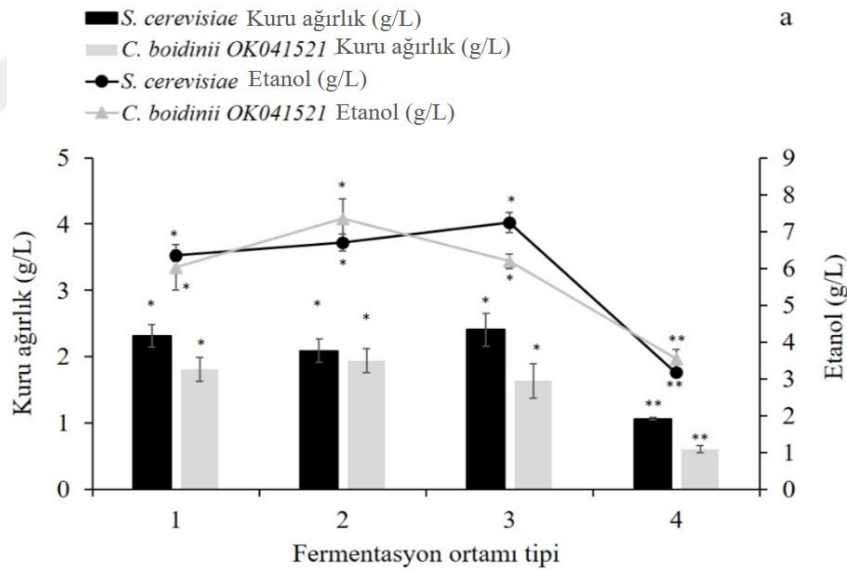
** Aynı satırda üst simgedeki farklı harfler anlamlı farklılık gösterir

Ayrıca, daha yüksek konsantrasyonda biyokütle kullanımı beklenildiği gibi daha yüksek konsantrasyonda inhibitör bileşik miktarına neden olmuştur. EÇA konsantrasyonu %5'ten %20'ye kadar artırıldığında asetik asit, formik asit ve HMF konsantrasyonları sırasıyla 0.66 g/L, 0.023 g/L ve 0.33 g/L'den 0.90 g/L, 0.034 g/L ve 0.76 g/L'ye yükselmiştir. Mayaların etanol üretiminde de benzer bir eğilim gözlemlenmiştir. %20 EÇA konsantrasyonunda *C. boidinii* ve *S. cerevisiae*'nin en yüksek etanol miktarları sırasıyla 14.1 g/L ve 12.1 g/L olarak tespit edilmiştir.

Yüksek biyokütle konsantrasyonu ve 24-48 saatlik hidroliz, ticari ikinci nesil etanol üretimi için ciddi engeller olarak kabul edilmektedir (Dias vd., 2011). Benzer şekilde mevcut çalışmada da en yüksek etanol üretimi %20 gibi yüksek biyokütle

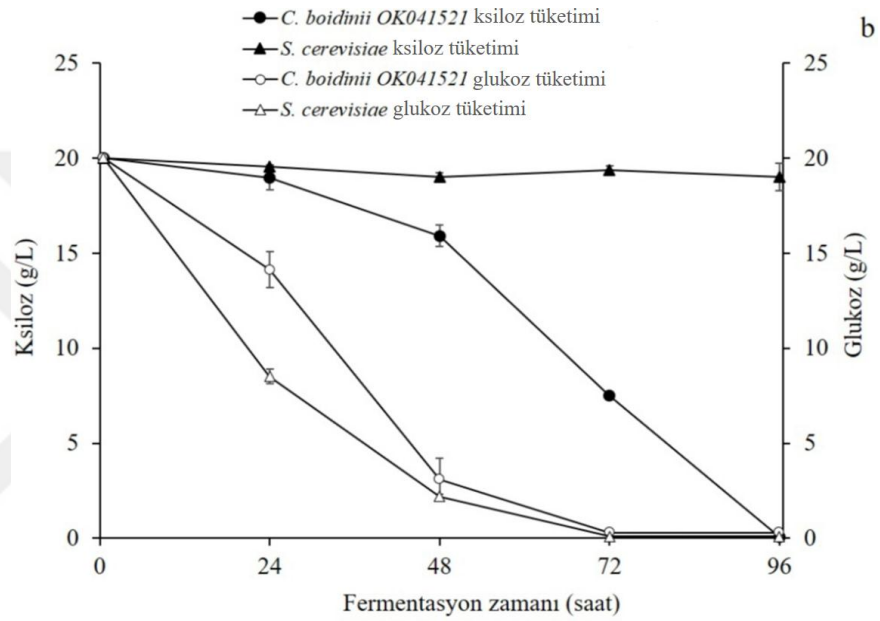
konsantrasyonu ve 24-48 saatlik fermentasyon süresinde gözlenmiştir. Ayrıca, biyokütle miktarı %5'ten %20'ye yükseldiğinde biraz daha yüksek $\mu_{maks.}$ değerleri elde edilmiştir. En yüksek $\mu_{maks.}$, %20 EÇA varlığında *C. boidinii* ve *S. cerevisiae* için sırasıyla 0.11 1/saat ve 0.17 1/saat olarak bulunmuştur. Aynı mayalar için %5 EÇA kullanıldığında ise bu değerler 0.09 ve 0.15 1/saat'e düşmüştür.

Artan inhibitör konsantrasyonlarının mayaların mikrobiyal büyümesi ve etanol üretimindeki etkileri sentetik YPD besiyerinde araştırılmıştır. Bu amaçla asetik asit (0, 0.5, 1.0, 5.0 ve 10 g/L), formik asit (0, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.2 g/L) ve HMF (0, 0.01, 0.05, 0.1 ve 0.2 g/L) artan konsantrasyonlarını içeren beş farklı besiyeri hazırlanmıştır. Mayaların etanol üretimi ve mikrobiyal büyümesi Şekil 4.3 (a)'da sunulmaktadır. En yüksek biyoetanol konsantrasyonları sırasıyla Besiyeri 2'de *S. cerevisiae* (7.24 g/L) ve Besiyeri 3'te *C. boidinii*'de (7.34 g/L) gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3 (a) Sentetik YPD (maya özütü: 3 g/L, pepton 10 g/L, glukoz: 20 g/L) besiyeri varlığında *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* OK041521'in biyoetanol üretimi ve mikrobiyal büyümesi sırasında artan inhibitör konsantrasyonları (Besiyeri 1: Yalnızca YPD, Besiyeri 2: YPD, 0.5 g/L asetik asit, 0.01 g/L formik asit, 0.01 g/L HMF, Besiyeri 3: YPD, 1 g/L asetik asit, 0.05 g/L formik asit, 0.05 g/L HMF, Besiyeri 4: YPD, 5 g/L asetik asit, 0.1 g/L formik asit, 0.1 g/L HMF, Besiyeri 5: YPD, 10 g/L asetik asit, 0.2 g/L formik asit, 0.2 g/L HMF)

Biyoetanol konsantrasyonlarını artırmak için ko-fermantasyon stratejisi, etanol verimini artırılabilir ve genel işlem maliyetlerini azaltılabileceği için gelişmemiş ancak umut vadeci bir yöntemdir (Chen 2011). Şekil 4.4 (b), sentetik YPX ve YPD besiyerinde her iki mayanın fermentasyonu sırasında ksiloz ve glukoz konsantrasyonlarını göstermektedir. Sonuçlar, 96 saatlik fermentasyon süresinin sonunda hem ksiloz hem de glukozun *C. boidinii* tarafından neredeyse tamamen tüketildiğini göstermektedir.

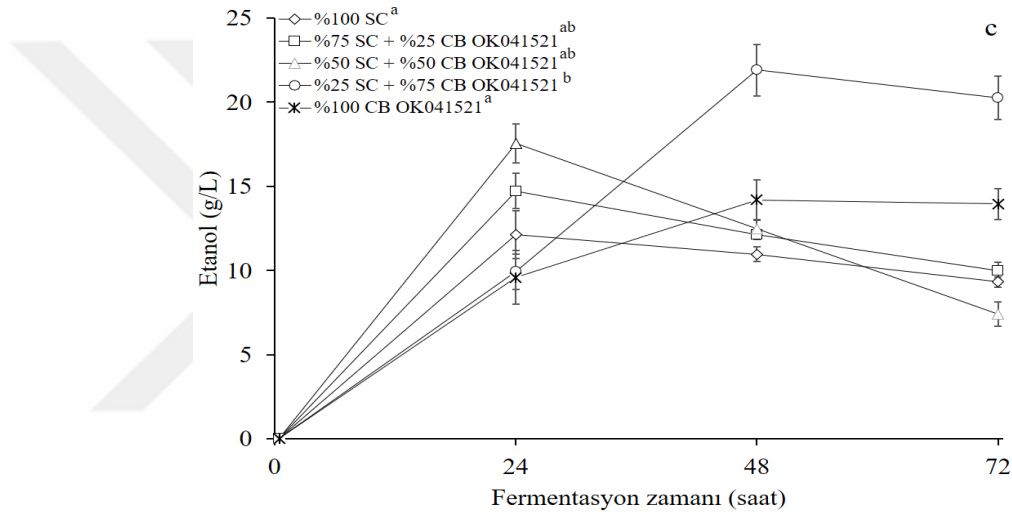


Şekil 4.4 (b) *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* OK041521'in fermentasyonu sırasında sentetik YPX ve YPD besiyerlerinde kalan ksiloz ve glukoz konsantrasyonları (pH: 4.8, YPX: Maya özütü: 3.0 g/L, pepton: 10.0 g/L, ksiloz: 20.0 g/L, YPD: Maya özütü: 3.0 g/L, pepton: 10.0 g/L, glukoz: 20.0 g/L)

Şekil 4.5 (c)'de gösterilen EÇA besiyerinde ko-fermantasyon için maya konsantrasyonları sırasıyla %100 *C. boidinii*, %100 *S. cerevisiae*, %25 *C. boidinii* / %75 *S. cerevisiae*, %25 *S. cerevisiae* / %75 *C. boidinii*, %50 *C. boidinii* / %50 *S. cerevisiae* olarak kullanılmıştır.

Mayaların etanol üretimi ve şeker tüketimi Şekil 4.5 (c)–4.7 (e)'de gösterilmiştir. Şekil 4.5 (c)'de ko-fermantasyon adımı, *S. cerevisiae* inokülasyon oranı %25'e

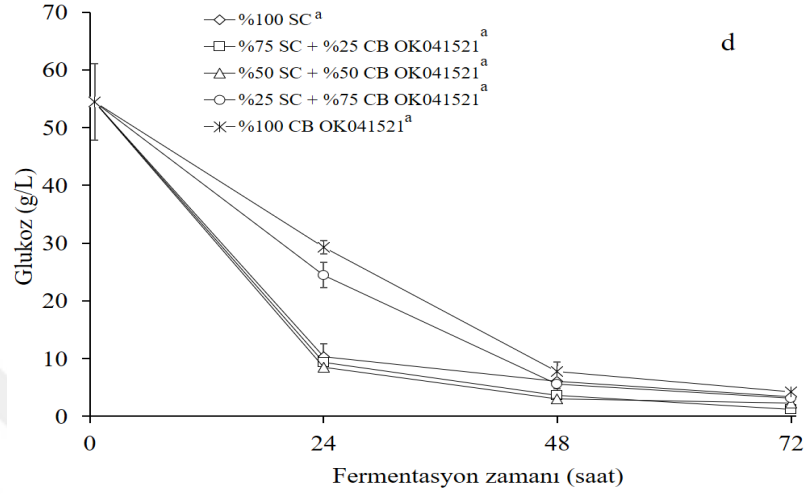
düşürüldüğünde etanol üretimi kademeli olarak artmış ve %25 *S. cerevisiae*-%75 *C. boidinii* içeren EÇA besiyerinde maksimum etanol 21.91 g/L olarak gözlemlenmiştir. Yalnızca *S. cerevisiae* veya yalnızca *C. boidinii* içeren EÇA besiyerinde bu değerler sırasıyla 12.1 g/L ve 14.1 g/L olarak saptanmıştır. Bu durum ko-fermantasyon besiyerinin, *S. cerevisiae* inokülasyon oranının düşük olması durumunda *S. cerevisiae* tarafından domine edilememesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Bu şekilde, bir Crabtree negatif bir maya olan *C. boidinii*, büyüme ve etanol üretimi için uygun koşullara erişmiş olabileceği düşünülmektedir. (Osawa vd. 2009).



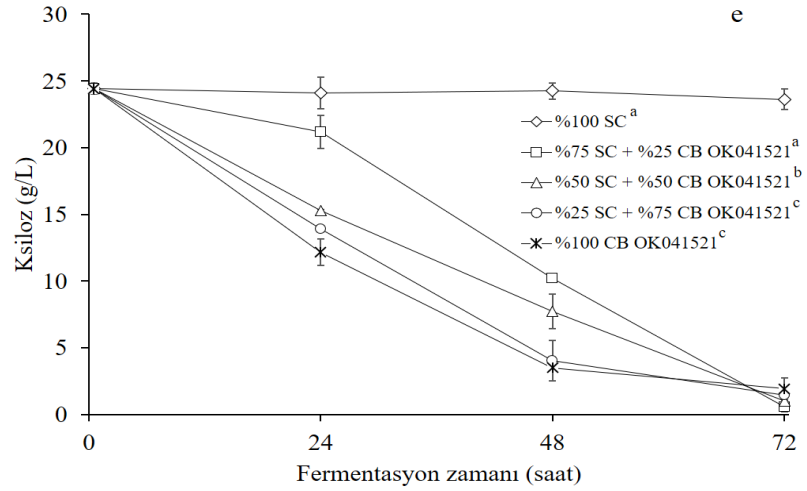
Şekil 4.5 (c) EÇA besiyerinde ko-fermente edilmiş *S. cerevisiae* ve *C. boidinii* OK041521'in etanol üretimi

Şekil 4.6 (d) ve 4.7 (e)'de ko-fermente edilmiş EÇA besiyerinin glukoz ve ksiloz konsantrasyonları gösterilmiştir. Sonuçlara göre, artan *S. cerevisiae* oranları, artan *C. boidinii* oranlarına göre daha hızlı glukoz tüketimi ile sonuçlanmış ve 48 saat sonunda glukoz neredeyse tamamen tükenmiştir. EÇA besiyerinde daha yavaş ksiloz tüketimi gözlemlenmesine rağmen %100 *S. cerevisiae* içeren EÇA besiyeri dışındaki tüm gruplarda ksilozun etkin olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, artan *C. boidinii* oranları, önemli ölçüde daha yüksek ksiloz tüketimine neden olmuştur. *C. boidinii*'nin Crabtree negatif doğasının yavaş glukoz tüketim oranlarına neden olabilmesine karşın,

bu mayanın etkin ksiloz asimilasyon kapasitesi daha yüksek etanol üretimi ile sonuçlanmıştır.



Şekil 4.6 (d) EÇA besiyerinde glukoz bazlı şeker kalıntıları (pH: 4.8, EÇA: %20, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CB: *Candida boidinii* OK041521)



Şekil 4.7 (e) EÇA besiyerinde ksiloz bazlı şeker kalıntıları (pH: 4.8, katı konsantrasyonu: %20, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CB: *Candida boidinii* OK041521)

Çizelge 4.3'de ko-fermantasyonlu ve ko-fermantasyonsuz koşullara ait kinetik parametrelerin karşılaştırması verilmiştir. Ko-fermente edilmiş EÇA besiyeri varlığında

kinetik parametrelerin de iyileştirildiği görülebilmektedir. Örneğin, %100 *S. cerevisiae* ve %100 *C. boidinii* içeren besiyeri varlığında sırasıyla teorik verimin %100 *S. cerevisiae* 24 saat sonunda %43.6'sına ve %100 *C. boidinii* ise 48 saat sonunda %51.0'ına ulaşmıştır. %25 *S. cerevisiae* -%75 *C. boidinii* içeren besiyeri varlığında ise bu değer %78.7 olarak artmıştır. Çizelge 4.3'de gösterildiği gibi, daha yüksek *S. cerevisiae* konsantrasyonları, hem 24 hem de 48 saatlik fermantasyon süreleri için daha yüksek $\mu_{maks.}$ değerleri ile sonuçlanmıştır. Optimize edilmiş koşullarda en yüksek biyoetanol 48 saat sonunda 21.9 g/L olarak bulunmuştur ve biyoetanol konsantrasyonları tüm gruplarda şeker tüketimiyle paralel olarak azalmıştır. Bu durum ortamdaki biriken etanolün tüketimiyle ilişkilidir. Etanol metabolizması boyunca gliserol üretilmemiş ve redoks dengesi yeniden düzenlenmiştir (Babazadeh vd. 2017; Thomson vd. 2005).

Çizelge 4.3 Seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş EÇA'nın fermantasyonu / ko-fermantasyonundan elde edilen mayaların kinetik parametreleri ve büyüme kinetikleri (pH: 4.8, katı konsantrasyonu: %20, enzim konsantrasyonu: 15 FPU/g selüloz)

	Zaman (saat)	İnokülasyon Oranı (%)				
		%100 SC	%100 CB	%75 SC + %25 CB	%50 SC + %50 CB	%25 SC + %75 CB
Teorik (%)	24	43.6	34.4	52.9	63.0	35.8
	48	39.4	51.0	43.6	44.8	78.7
$Y_{P/S}$ (g/g)	24	0.27	0.38	0.32	0.38	0.33
	48	0.22	0.30	0.23	0.24	0.44
Q_p (g/L.s)	24	0.50	0.39	0.61	0.73	0.41
	48	0.22	0.29	0.25	0.26	0.45
Etanol (g/L)	24	12.1	9.5	14.7	17.5	9.9
	48	10.9	14.1	12.1	12.4	21.9
$\mu_{maks.}$ (1/s)	24	0.27	0.20	0.26	0.25	0.24
	48	0.14	0.11	0.13	0.13	0.12

*SC: *Saccharomyces cerevisiae*, CB: *Candida boidinii* OK041521

EÇA besiyerinde 24 saat sonunda %100 *S. cerevisiae* konsantrasyonu varlığında maksimum $\mu_{maks.}$ 0.27 1/saat olarak elde edilmiştir. %100 *C. boidinii* kullanıldığında ise

bu değer 0.20 1/saat olarak gözlemlenmiştir. Öte yandan, fermantasyon için %100 *C. boidinii* kullanıldığında en düşük $\mu_{maks.}$ 0.11 1/saat olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, *S. cerevisiae*'nin oksijen varlığında glukoz kullanma yeteneği ile ilgili olarak *C. boidinii*'den daha hızlı büyüme hızına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca sentetik YPD ve XPY besiyerlerinde mayaların spesifik büyüme oranları da hesaplanmıştır. YPD'de her iki maya da *S. cerevisiae* için 0.25 1/saat ve *C. boidinii* için 0.12 1/saat olarak EÇA'ya benzer büyüme eğilimleri göstermiştir. Ek olarak, XPY besiyerinde her iki maya için daha düşük $\mu_{maks.}$ değerleri tespit edilmiş ve *S. cerevisiae* ve *C. boidinii*'nin spesifik büyüme oranları sırasıyla 0.03 1/saat ve 0.07 1/saat'e düşmüştür.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fosil kaynaklı yakıtların sınırlı olması ve çevreye karşı olan dezavantajları nedeniyle yeni ve sürdürülebilir enerji kaynaklarının araştırılması elzemdir. Yapılan tez çalışmasında endüstriyel çay atıklarının biyoetanol üretimine etkileri araştırılmıştır.

5.1 Endüstriyel Çay Atığının (EÇA) Kimyasal Bileşimi

Yapılan tez çalışmasında EÇA'nın selüloz içeriği %33.8 ve hemiselüloz içeriği %18.9 olarak bulunurken, Gürten (2008) tarafından ise çay atığının selüloz içeriği %30.2 ve hemiselüloz içeriği %19.9 olarak belirtilmiştir. Literatürde yer alan bir çalışmada çay atığı hidrolizatından fermente edilebilir şekerlerin; glukoz, ksiloz, fruktoz, mannoz ve arabinoz gibi şekerler içerdiği belirtilmiştir (Qi vd. 2020), tez çalışmasında ise baskın şeker glukoz olmakla birlikte arabinoz ve diğer şekerlerin mevcudiyeti tespit edilmiştir. Uddin vd. (2009), yaptıkları bir çalışmada ise çay atığındaki nem oranını %11.02 olarak bulmuşlardır. Mevcut tez çalışmasında da bu değer %7.8 olarak belirlenmiştir.

5.2 Farklı Ön-İşlem Yöntemlerinin Fermente Edilebilir Şeker Konsantrasyonlarına Etkisi

Seyreltik asit ön-işleminden elde edilen daha yüksek şeker konsantrasyonları, iki olası yolla açıklanabilir. Birincisi, seyreltik asit ön-işlemi, selülozun yapısal olarak parçalanmasına ve hemiselülozun tamamen bozulmasına neden olurken, AHP esas olarak lignin yapısını etkilemektedir (Rabemanolontsoa ve Saka 2016). Benzer şekilde AHP ön-işlemi sonrası daha düşük hemiselüloz bozunma oranı da Silva vd. (2015) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar, seyreltik asit ve AHP ile ön-işlem görmüş şeker kamışı posasının hemiselüloz içeriğini sırasıyla %6.57 ve %14.20 olarak elde etmişlerdir. İkinci olarak, AHP ön işleme genellikle %2 gibi daha düşük biyokütle konsantrasyonlarında etkili olmaktadır.

Endüstriyel ölçekte şeker verimini arttırmada daha yüksek biyokütle konsantrasyonu istendiği için mevcut çalışmada %10 başlangıç EÇA kullanılmıştır.

5.3 Başlangıç Biyokütle Konsantrasyonunun İnhibitör Bileşikler ve Biyoetanol Üretimine Etkisi

Düşük asit konsantrasyonlarında etanol miktarlarının artmasının nedeni, zayıf asitlerin ve furan türevlerinin uyarıcı etkileridir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000). Düşük inhibitör konsantrasyonlarının mikrobiyal büyümeye olumlu etkileri daha önce rapor edilmiştir. Örneğin, Bhatia vd. (2019), sırasıyla %0.6, %0.02 ve %0.04 asetat, furfural ve HMF varlığında *Ralstonia eutropha*'nın mikrobiyal büyümesi ve PHA birikimine olumlu etkilerini gözlemlemiştir. Başka bir çalışmada ise Bhatia vd. (2017b), lignoselülozik hidrolizatlarda (empty fruit bunch) geliştirilen *Rhodococcus sp.* YHY 01'in HMF ve vanilinin doymuş yağ asidi içeriğini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, Besiyeri 3'ten sonrasında etanol konsantrasyonları önemli ölçüde azalmış ve Besiyeri 5'te herhangi bir etanol veya mikrobiyal büyüme tespit edilmemiştir. Büyüme ve etanol üretiminde gözlenen bu gerileme, artan inhibitör konsantrasyonlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, *Candida* ve *Saccharomyces* cinslerine ait türlerin önemli miktarda protein içerdiğini ortaya koyan literatürdeki önceki çalışmalarla uyumludur. Örneğin, yapılan bir çalışmada 72 saat sonunda YPD besiyerinde *Candida utilis*'in protein içeriği 43.7 g/100 g_{dw} olarak bulunmuştur (Kurcz vd. 2018). Başka bir çalışmada ise Gerçek vd. (2021), *S. cerevisiae*'nin toplam protein içeriğini 16.79-17.67 mg/g hücre pelleti arasında elde etmişlerdir.

Mayalar, özellikle *Candida* türleri, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrileri için kritik hammaddeler olan proteinler, eksojen amino asitler, sitrik asit veya biyolojik polisakkaritler gibi çok çeşitli biyoteknolojik ürünler üretmektedirler. Ayrıca, maya biyokütlesi magnezyum veya selenyum gibi mikro-elementlerle desteklendiğinde, bu biyokütle bir protein veya prebiyotik polisakkarit kaynağı olarak kullanılabilir (Kieliszek vd. 2017). Fermantasyondan elde edilen maya biyokütlesi sürdürülebilir biyoajanlar olarak değerlendirilebilir niteliktedir. Bu nedenlerle hem YPD hem de EÇA besiyerlerinde test edilen mayaların protein içerikleri de belirlenmiştir. YPD besiyerinde *S. cerevisiae* ve *C. boidinii*'nin protein konsantrasyonları sırasıyla 53.81 g/100 g ve

52.97 g/100 g olarak elde edilmiştir. Ayrıca EÇA besiyerinde yetiştirilen mayalarda protein içerikleri 40.96 g/100 g ve 52.24 g/100 g olarak bulunmuştur.

5.4 Sonuç ve Öneriler

Sıfır maliyeti, geniş coğrafi yayılımı ve yüksek şeker potansiyeli nedeniyle EÇA, rekabetçi biyo-bazlı bileşikler üretmek için uygun bir adaydır. Bu nedenlerle mevcut çalışmada, önemli bir tarımsal-endüstriyel hammadde olan endüstriyel çay atıkları, sırasıyla, seyreltik asit ile ön-işleme tabi tutulmuş ve enzimatik olarak hidrolize edilmiş endüstriyel çay atıklarından 14.1 g/L ve 12.1 g/L etanol üreten *C. boidinii* ve *S. cerevisiae* kullanılarak ko-fermantasyon yaklaşımı ile etkin bir katma değerli bileşik olan etanole dönüştürülmüştür. Ayrıca, biyoetanol üretimi, ko-fermantasyon stratejisi ile yaklaşık %70 artarak 21.9 g/L'ye ulaşmıştır. Bu çalışma, *S. cerevisiae* ve *C. boidinii*'nin ko-fermantasyonunun, fermentasyon için pentozlar ve heksozlar daha verimli kullanıldığından, geleneksel lignoselülozik biyoetanol üretimi için umut verici bir alternatif olduğunu göstermektedir.

Ayrıca mevcut çalışmada farklı ön-işlem uygulamalarına ultrasonikasyonun etkisi araştırılmıştır. Deneyler sonucunda ultrasonikasyonun ön işlem yöntemlerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Buna göre en yüksek glukoz ve ksiloz miktarı ultrasonikasyon desteksiz olarak enzimatik hidrolize tabi tutulan seyreltik asit ön-işlemi ile %10 yıkanmamış EÇA varlığında 38.19 g/L ve 16.84 g/L olarak elde edilmiştir. Bu değerler aynı koşullarda AHP ön-işlemi için ise 25.29 g/L glukoz 8.28 g/L ksiloz olarak saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında yaklaşık olarak benzer değerlerin gözlenmesi ve kullanılan enerjinin getirdiği maliyet göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada ilerleyen deneylerde ultrasonikasyon destekli ön-işlem tercih edilmemiştir.

Ko-fermente edilmiş EÇA besiyeri varlığında kinetik parametreler de iyileştirilmiştir. %100 *S. cerevisiae* ve %100 *C. boidinii* içeren besiyeri varlığında sırasıyla teorik

verimin %100 *S. cerevisiae* 24 saat sonunda %43.6'sına ve %100 *C. boidinii* ise 48 saat sonunda %51.0'ına ulaşmıştır. %25 *S. cerevisiae* -%75 *C. boidinii* içeren besiyeri varlığında ise bu değer %78.7 olarak belirlenmiştir. Daha yüksek *S. cerevisiae* konsantrasyonları sonucunda ise 24 ve 48 saatlik fermantasyon süreleri için daha yüksek μ_{maks} değerleri gözlemlenmiştir.

Çalışmada EÇA'dan ko-fermantasyon ile farklı maya konsantrasyonları kullanılarak etanol üretimi arttırılmış ve etkin bir şekilde etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında hedeflenen amaçlara ulaşılmıştır.



KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A. O. (2013). Biyoetanölün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220. Araujo vd. 1995
- Adney, B., & Baker, J. (2008). Measurement of Cellulase Activities:.
- Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., & Cantarella, M. (2000). Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 184-192.
- 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
- Amaya-Delgado, L., Flores-Cosío, G., Sandoval-Núñez, D., Arellano-Plaza, M., Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2018). Comparative of lignocellulosic ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. In *Special topics in renewable energy systems*. IntechOpen.
- Amiri, H., Karimi, K., & Zilouei, H. (2014). Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. *Bioresource technology*, 152, 450-456.
- Antunes, F. A. F., Rajan, K., Djioleu, A., Rocha, T. M., Brumano, L. P., de Souza Melo, Y. C., ... & da Silva, S. S. (2022). Sustainable second-generation ethanol production from switchgrass biomass via co-fermentation of pentoses and hexoses using novel wild yeasts. *BioEnergy Research*, 15(2), 1157-1168.
- Antunes, F. A. F., Rajan, K., Djioleu, A., Rocha, T. M., Brumano, L. P., de Souza Melo, Y. C., ... & da Silva, S. S. (2022). Sustainable second-generation ethanol production from switchgrass biomass via co-fermentation of pentoses and hexoses using novel wild yeasts. *BioEnergy Research*, 15(2), 1157-1168.
- Arvaniti, E., Bjerre, A. B., & Schmidt, J. E. (2012). Wet oxidation pretreatment of rape straw for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 39, 94-105.
- Azapagic, A., Perdan, S., & Clift, R. (Eds.). (2004). *Sustainable development in practice: case studies for engineers and scientists*. John Wiley & Sons.
- Babazadeh, R., Lahtvee, P. J., Adiels, C. B., Goksör, M., Nielsen, J. B., & Hohmann, S. (2017). The yeast osmostress response is carbon source dependent. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y., & Tan, T. (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60-88.

- Balat, M. (2009). New biofuel production technologies. *Energy Educ Sci Technol Part A*, 22(2), 147-61.
- Bekar, N. (2020). Yenilenebilir Enerji Kaynakları Açısından Türkiye'nin Enerji Jeopolitiği. *Türkiye Siyaset Bilimi Dergisi*, 3(1), 37-54.
- Bhatia, L., Bachheti, R. K., Garlapati, V. K., & Chandel, A. K. (2020). Third-generation biorefineries: a sustainable platform for food, clean energy, and nutraceuticals production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-16.
- Bhatia, S. K., Gurav, R., Choi, T. R., Jung, H. R., Yang, S. Y., Moon, Y. M., ... & Yang, Y. H. (2019). Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119. *Bioresource technology*, 271, 306-315.
- Bhatia, S. K., Kim, J., Song, H. S., Kim, H. J., Jeon, J. M., Sathiyarayanan, G., ... & Yang, Y. H. (2017). Microbial biodiesel production from oil palm biomass hydrolysate using marine *Rhodococcus* sp. YHY01. *Bioresource technology*, 233, 99-109.
- Boddey, R. M., Soares, L. H. D. B., Alves, B. J., & Urquiaga, S. (2008). Bio-ethanol production in Brazil. In *Biofuels, solar and wind as renewable energy systems* (pp. 321-356). Springer, Dordrecht.
- Bonenkamp, T. B., Middelburg, L. M., Hosli, M. O., & Wolffenbuttel, R. F. (2020). From bioethanol containing fuels towards a fuel economy that includes methanol derived from renewable sources and the impact on European Union decision-making on transition pathways. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 120, 109667.
- Boundy- Mills, K., Karuna, N., Garay, L. A., Lopez, J. M., Yee, C., Hitomi, A., ... & Jeoh, T. (2019). Conversion of cassava leaf to bioavailable, high- protein yeast cell biomass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(6), 3034-3044.
- British Petroleum. (2009). BP Statistical Review of World Energy. London: British Petroleum.
- Bull, S. R. (2001). Renewable energy today and tomorrow. *Proceedings of the IEEE*, 89(8), 1216-1226.
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., ... & Arroyo-López, F. N. (2017). Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in genomic sciences*, 12(1), 1-14.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., & Alfani, F. (2004). Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 39(11), 1533-1542.
- Caputto, R. A. N. W. E. L., Barra, H. S., & Cumar, F. A. (1967). Carbohydrate metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 36(1), 211-246.

- Chang, K. L., Thitikorn-amorn, J., Hsieh, J. F., Ou, B. M., Chen, S. H., Ratanakhanokchai, K., ... & Chen, S. T. (2011). Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and bioenergy*, 35(1), 90-95.
- Chang, K. L., Thitikorn-amorn, J., Hsieh, J. F., Ou, B. M., Chen, S. H., Ratanakhanokchai, K., ... & Chen, S. T. (2011). Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and bioenergy*, 35(1), 90-95.
- Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fährnrich, B., Roettger, M., ... & Gutekunst, K. (2016). The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), 5441-5446.
- Cheng, J. J., & Timilsina, G. R. (2011). Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. *Renewable Energy*, 36(12), 3541-3549.
- Chundawat, S. P., Pal, R. K., Zhao, C., Campbell, T., Teymouri, F., Videto, J., ... & Ong, R. G. (2020). Ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment of lignocellulosic biomass. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (158), e57488.
- Classics Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Clauser, N. M., González, G., Mendieta, C. M., Kruyeniski, J., Area, M. C., & Vallejos, M. E. (2021). Biomass waste as sustainable raw material for energy and fuels. *Sustainability*, 13(2), 794.
- Cseke, L. J., Podila, G. K., Kirakosyan, A., & Kaufman, P. B. (2009). Plants as sources of energy. In *Recent Advances in Plant Biotechnology* (pp. 163-210). Springer, Boston, MA.
- ÇAYKUR, 2019. “ÇAY SEKTÖRÜ RAPORU”. <http://www.caykur.gov.tr/Pages/Yayinlar/YayinDetay.aspx?ItemType=5&ItemId=721>. Son erişim tarihi: 26 Mayıs 2022.
- Çöpür, Y., Tozluoğlu, A., & Özyürek, Ö. (2011). Selülozik biyoetanol üretim teknolojisi. *Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Ormancılık Dergisi*, 7(1), 10-37.
- da Silva Martins, L. H., Rabelo, S. C., & da Costa, A. C. (2015). Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 191, 312-321.
- Dai, Z., Huang, M., Chen, Y., Siewers, V., & Nielsen, J. (2018). Global rewiring of cellular metabolism renders *Saccharomyces cerevisiae* Crabtree negative. *Nature communications*, 9(1), 1-8.
- David, A. N., Sewsynker-Sukai, Y., Sithole, B., & Kana, E. G. (2020). Development of a green liquor dregs pretreatment for enhanced glucose recovery from corn

- cobs and kinetic assessment on various bioethanol fermentation types. *Fuel*, 274, 117797.
- DeMars, Z., Biswas, S., Amachawadi, R. G., Renter, D. G., & Volkova, V. V. (2016). Antimicrobial susceptibility of enteric gram negative facultative anaerobe bacilli in aerobic versus anaerobic conditions. *PLoS One*, 11(5), e0155599.
- Demir, M. K., Elgün, A., & Bilgiçli, N. (2006). Sıvı ferment yöntemi ile ekmek üretiminde kullanılan maya (*Saccharomyces Cerevisiae*) performansına katkı maddeleri ve ortam şartlarının etkisi. *Gıda*, 31(6).
- Díaz, M. J., Cara, C., Ruiz, E., Romero, I., Moya, M., & Castro, E. (2010). Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw. *Bioresource Technology*, 101(7), 2428-2435.
- EPA, U. (2010). Renewable fuel standard program (RFS2) regulatory impact analysis. *United States Environmental Protection Agency, Washington, DC*. <https://www.epa.gov/> Erişim tarihi: 13 Ekim 2022.
- FAO, 2018. "The Twenty-third Session of the Intergovernmental Group on Tea". <http://www.fao.org/3/MX217EN/mx217en.pdf>. Son erişim tarihi: 7 Eylül 2020.
- Fehér, A., Bedő, S., & Fehér, C. (2021). Comparison of Enzymatic and Acidic Fractionation of Corn Fiber for Glucose-rich Hydrolysate and Bioethanol Production by *Candida boidinii*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 65(3), 320-330.
- Fernández-Sandoval, M. T., Galíndez-Mayer, J., Bolívar, F., Gosset, G., Ramírez, O. T., & Martínez, A. (2019). Xylose–glucose co-fermentation to ethanol by *Escherichia coli* strain MS04 using single-and two-stage continuous cultures under micro-aerated conditions. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-11.
- Gao, P., & Ogata, Y. (2020). CHAMU: An effective approach for improving the recycling of tea waste. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 711, No. 1, p. 012024). IOP Publishing.
- Gerçek, E., Zengin, H., Erişir, F. E., & Yılmaz, Ö. (2021). Biochemical changes and antioxidant capacity of naringin and naringenin against malathion toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 241, 108969.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Govinden, R., Pillay, B., Van Zyl, W. H., & Pillay, D. (2001). Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* *XYL1* genes. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(1), 76-80.
- Gürten, İ. I. 2008. ÇAY ATIĞINDAN ADSORBENT ÜRETİMİ VE ÜRETİLEN ADSORBENTİN ADSORPSİYON ÖZELİKLERİNİN İNCELENMESİ,

Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 136, Ankara.

- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(5), 937-953.
- Halder, P., Azad, K., Shah, S., & Sarker, E. (2019). Prospects and technological advancement of cellulosic bioethanol ecofuel production. In *Advances in eco-fuels for a sustainable environment* (pp. 211-236). Woodhead Publishing.
- Harun, R., Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 199-203.
- He, Z., Wang, Z., Zhao, Z., Yi, S., Mu, J., & Wang, X. (2017). Influence of ultrasound pretreatment on wood physiochemical structure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 136-141.
- Health and Environment Alliance (2018). "Fossil Fuel Subsidies and Health". <https://www.env-health.org/wp-content/uploads/2018/06/fossil-fuel-subsidies-and-health-briefing.pdf>. Son erişim tarihi: 15 Aralık 2021.
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- Hsu, T. C., Guo, G. L., Chen, W. H., & Hwang, W. S. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 101(13), 4907-4913.
- Huang, C., Zhan, Y., Cheng, J., Wang, J., Meng, X., Zhou, X., ... & Ragauskas, A. J. (2021). Facilitating enzymatic hydrolysis with a novel guaiacol-based deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresource technology*, 326, 124696.
- Ishizaki, H., & Hasumi, K. (2014). Ethanol production from biomass. *Research approaches to sustainable biomass systems*, 243-258.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third
- Jin, M., Lau, M. W., Balan, V., & Dale, B. E. (2010). Two-step SSCF to convert AFEX-treated switchgrass to ethanol using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). *Bioresource Technology*, 101(21), 8171-8178.
- Jojima, T., Igari, T., Noburyu, R., Watanabe, A., Suda, M., & Inui, M. (2021). Coexistence of the Entner–Doudoroff and Embden–Meyerhof–Parnas pathways enhances glucose consumption of ethanol-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 1-9.
- Karagöz, P., Rocha, I. V., Özkan, M., & Angelidaki, I. (2012). Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresource technology*, 104, 349-357.

- Khuong, L. S., Masjuki, H. H., Zulkifli, N. W. M., Mohamad, E. N., Kalam, M. A., Alabdulkarem, A., ... & Jamshaid, M. (2017). Effect of gasoline–bioethanol blends on the properties and lubrication characteristics of commercial engine oil. *RSC advances*, 7(25), 15005-15019.
- Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: a review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185-198.
- 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.
- Kliestik, T., Nica, E., Musa, H., Poliak, M., & Mihai, E. A. (2020). Networked, smart, and responsive devices in industry 4.0 manufacturing systems. *Economics, Management and Financial Markets*, 15(3), 23-29.
- Komati Reddy, G., Lindner, S. N., & Wendisch, V. F. (2015). Metabolic engineering of an ATP-neutral Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Corynebacterium glutamicum*: growth restoration by an adaptive point mutation in NADH dehydrogenase. *Applied and environmental microbiology*, 81(6), 1996-2005.
- Koppolu, V., & Vasigala, V. K. (2016). Role of *Escherichia coli* in biofuel production. *Microbiology insights*, 9, MBI-S10878.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 236-246.
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., & Verma, P. (2020). Bioethanol production: generation-based comparative status measurements. In *Biofuel production technologies: critical analysis for sustainability* (pp. 155-201). Springer, Singapore.
- Kumar, L., Chandra, R., Chung, P. A., & Saddler, J. (2010). Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields?. *Bioresource technology*, 101(20), 7827-7833.
- Kumar, M., Pandey, A. K., Kumari, S., Wani, S. A., Jakeer, S., Tiwari, R., ... & Gaur, N. A. (2020). Secretome produced by a newly isolated *Aspergillus flavus* strain in engineered medium shows synergy for biomass saccharification with a commercial cellulase. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., & Adhikari, D. K. (2009). Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry- Plant Equipment- Process Engineering- Biotechnology*, 32(4), 517-526.
- Kurcz, A., Błażej, S., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., & Kieliszek, M. (2018). Application of industrial wastes for the production of microbial single-cell protein by fodder yeast *Candida utilis*. *Waste and biomass valorization*, 9(1), 57-64.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The yeasts* (pp. 87-110). Elsevier.
- Láinez, M., Ruiz, H. A., Arellano-Plaza, M., & Martínez-Hernández, S. (2019). Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renewable energy*, 138, 1127-1133.
- Lee, D. J., Yim, J. H., Jung, S., Jang, M. S., Jeong, G. T., Jeong, K. H., ... & Kwon, E. E. (2021). Valorization of animal manure: A case study of bioethanol production from horse manure. *Chemical Engineering Journal*, 403, 126345.
- 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.
- Liu, C. G., Li, K., Wen, Y., Geng, B. Y., Liu, Q., & Lin, Y. H. (2019). Bioethanol: New opportunities for an ancient product. In *Advances in Bioenergy* (Vol. 4, pp. 1-34). Elsevier.
- Lodder, J., & Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). The yeasts-a taxonomic study. *The yeasts-a taxonomic study*.
- M'barek, H. N., Arif, S., Taidi, B., & Hajjaj, H. (2020). Consolidated bioethanol production from olive mill waste: Wood-decay fungi from central Morocco as promising decomposition and fermentation biocatalysts. *Biotechnology Reports*, 28, e00541.
- Magnusson, R., Nilsson, C., & Andersson, B. (2002). Emissions of aldehydes and ketones from a two-stroke engine using ethanol and ethanol-blended gasoline as fuel. *Environmental science & technology*, 36(8), 1656-1664.
- Malik, K., Salama, E. S., El-Dalatony, M. M., Jalalah, M., Harraz, F. A., Al-Assiri, M. S., ... & Li, X. (2021). Co-fermentation of immobilized yeasts boosted bioethanol production from pretreated cotton stalk lignocellulosic biomass: Long-term investigation. *Industrial Crops and Products*, 159, 113122.
- Malik, S., Shahid, A., Liu, C. G., Khan, A. Z., Nawaz, M. Z., Zhu, H., & Mehmood, M. A. (2021). Developing fourth-generation biofuels secreting microbial cell factories for enhanced productivity and efficient product recovery; a review. *Fuel*, 298, 120858.
- Mardoyan, A., & Braun, P. (2015). Analysis of Czech subsidies for solid biofuels. *International Journal of Green Energy*, 12(4), 405-408.
- Marlair, G., Rotureau, P., Breulet, H., & Brohez, S. (2009). Booming development of biofuels for transport: Is fire safety of concern?. *Fire and Materials: An International Journal*, 33(1), 1-19.
- Maroušek, J., & Maroušková, A. (2021). Economic considerations on nutrient utilization in wastewater management. *Energies*, 14(12), 3468.

- Mazaheri, D., & Pirouzi, A. (2020). Valorization of *Zymomonas mobilis* for bioethanol production from potato peel: fermentation process optimization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
- Mihajlovski, K., Rajilić-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2020). Enzymatic hydrolysis of waste bread by newly isolated *Hymenobacter* sp. CKS3: Statistical optimization and bioethanol production. *Renewable Energy*, 152, 627-633.
- Mikulski, D., & Kłosowski, G. (2020). Microwave-assisted dilute acid pretreatment in bioethanol production from wheat and rye stillages. *Biomass and bioenergy*, 136, 105528.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mishra, A., & Ghosh, S. (2020). Saccharification of kans grass biomass by a novel fractional hydrolysis method followed by co-culture fermentation for bioethanol production. *Renewable Energy*, 146, 750-759.
- Mitraka, G. C., Kontogiannopoulos, K. N., Tsivintzelis, I., Zouboulis, A. I., & Kougias, P. G. (2022). Optimization of supercritical carbon dioxide explosion for sewage sludge pre-treatment using response surface methodology. *Chemosphere*, 297, 133989.
- Mizik, T. (2021). Economic Aspects and Sustainability of Ethanol Production—A Systematic Literature Review. *Energies*, 14(19), 6137.
- Mohapatra, S., Jena, S., Jena, P. K., Badhai, J., Acharya, A. N., & Thatoi, H. (2020). Partial consolidated bioprocessing of pretreated *Pennisetum* sp. by anaerobic thermophiles for enhanced bioethanol production. *Chemosphere*, 256, 127126.
- Moharreri, E., Jafari, T., Suib, S. L., Srinivasan, N., Ghobadi, A. F., Ju, L. K., & Elliott, J. R. (2017). Improved understanding of CO₂-water pretreatment of guayule biomass by high solids ratio experiments, rapid physical expansion, and examination of textural properties. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(3), 645-652.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, YY, Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımı için umut verici teknolojilerin özellikleri. *Bioresource teknolojisi*, 96 (6), 673-686.
- Motoda, T., Yamaguchi, M., Tsuyama, T., & Kamei, I. (2019). Down-regulation of pyruvate decarboxylase gene of white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60 modify the metabolism of sugars and productivity of extracellular peroxidase activity. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127(1), 66-72.

- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M., & Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and microbial technology*, 43(2), 124-129.
- Nagarajan, S., Skillen, N. C., Irvine, J. T., Lawton, L. A., & Robertson, P. K. (2017). Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77, 182-192.
- Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, AK ve Kozinski, JA (2015). Biyorafinasyon için lignoselülozik biyokütlenin sürdürülebilirliği üzerine bir değerlendirme. *Yenilenebilir ve Sürdürülebilir Enerji İncelemeleri* , 50 , 925-941.
- Nazari, M. T., Mazutti, J., Basso, L. G., Colla, L. M., & Brandli, L. (2021). Biofuels and their connections with the sustainable development goals: a bibliometric and systematic review. *Environment, Development and Sustainability*, 23(8), 11139-11156.
- Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J. M., Cabañas, A., & Ballesteros, M. (2003). Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. In *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 87-100). Humana Press, Totowa, NJ.
- Nielsen, S. S., 2017. Food Analysis Laboratory Manual (Ed. D. R. Heldman) 123. Third Edit. West Lafayette, Indiana: Springer. <http://cst.ur.ac.rw/library/FoodSciencebooks/batch1/FoodAnalysisLaboratoryManualSecondEdition.pdf>. Son erişim tarihi: 10.11.2021.
- Nweze, J. E., Ndubuisi, I., Murata, Y., Omae, H., & Ogbonna, J. C. (2021). Isolation and evaluation of xylose-fermenting thermotolerant yeasts for bioethanol production. *Biofuels*, 12(8), 961-970.
- Olguin-Maciél, E., Jiménez-Villarreal, I. A., Toledano-Thompson, T., Alzate-Gaviria, L., & Tapia-Tussell, R. (2022). Effect of ultrasound pretreatment combined with enzymatic hydrolysis of non-conventional starch on sugar yields to bioethanol conversion. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-9.
- Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., & Converti, A. (2011). Growth and survival of mixed probiotics in nonfat fermented milk: the effect of inulin. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 457-462.
- Origone, A. C., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Querol, A., & Lopes, C. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast*, 35(1), 157-171.
- Osawa, F., Fujii, T., Nishida, T., Tada, N., Ohnishi, T., Kobayashi, O., ... & Yoshida, S. (2009). Efficient production of l- lactic acid by Crabtree- negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, 26(9), 485-496.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, 74(1), 25-33.

- Panwar, N. L., Kaushik, S. C., & Kothari, S. (2011). Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15(3), 1513-1524.
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., & Nielsen, J. (2012). Scheffersomyces stipitis: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1-16.
- 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.
- Prajapati, B. P., Jana, U. K., Suryawanshi, R. K., & Kango, N. (2020). Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 152, 653-663.
- Prasad, S., Kumar, S., Yadav, K. K., Choudhry, J., Kamyab, H., Bach, Q. V., ... & Gupta, N. (2020). Screening and evaluation of cellulytic fungal strains for saccharification and bioethanol production from rice residue. *Energy*, 190, 116422.
- Qi F, Shen P, Hu R, Xue T, Jiang X, Qin L, et al. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate. *Biotechnol Biofuels* 2020;13(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01712-0>.
- Rabemanantsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource technology*, 199, 83-91.
- Rahmati, S., Doherty, W., Dubal, D., Atanda, L., Moghaddam, L., Sonar, P., ... & Ostrikov, K. K. (2020). Pretreatment and fermentation of lignocellulosic biomass: reaction mechanisms and process engineering. *Reaction Chemistry & Engineering*, 5(11), 2017-2047.
- Raina, N., Slathia, P. S., & Sharma, P. (2020). Response surface methodology (RSM) for optimization of thermochemical pretreatment method and enzymatic hydrolysis of deodar sawdust (DS) for bioethanol production using separate hydrolysis and co-fermentation (SHCF). *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-21.
- Raj, K., & Krishnan, C. (2020). Improved co-production of ethanol and xylitol from low-temperature aqueous ammonia pretreated sugarcane bagasse using two-stage high solids enzymatic hydrolysis and *Candida tropicalis*. *Renewable Energy*, 153, 392-403.
- Rass- Hansen, J., Falsig, H., Jørgensen, B., & Christensen, C. H. (2007). Bioethanol: fuel or feedstock?. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(4), 329-333.
- 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.

- 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.
- Rogers, P. L., Jeon, Y. J., Lee, K. J., & Lawford, H. G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Biofuels*, 263-288.
- Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2014). Alkaline peroxide pretreatment of corn stover for enzymatic saccharification and ethanol production. *Industrial Biotechnology*, 10(1), 34-41.
- Sakihama, Y., Hidese, R., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2019). Increased flux in acetyl-CoA synthetic pathway and TCA cycle of *Kluyveromyces marxianus* under respiratory conditions. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270-5295.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., & Branduardi, P. (2010). 16 years research on lactic acid production with yeast—ready for the market?. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 229-256.
- Scapini, T., Dos Santos, M. S., Bonatto, C., Wancura, J. H., Mulinari, J., Camargo, A. F., ... & Treichel, H. (2021). Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass for hemicellulose recovery. *Bioresource Technology*, 342, 126033.
- Schmer, M. R., Vogel, K. P., Mitchell, R. B., & Perrin, R. K. (2008). Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 464-469.
- Shankar, K., Kulkarni, N. S., Sajjanshetty, R., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2020). Co-production of xylitol and ethanol by the fermentation of the lignocellulosic hydrolysates of banana and water hyacinth leaves by individual yeast strains. *Industrial Crops and Products*, 155, 112809.
- Shankar, K., Kulkarni, N. S., Sajjanshetty, R., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2020). Co-production of xylitol and ethanol by the fermentation of the lignocellulosic hydrolysates of banana and water hyacinth leaves by individual yeast strains. *Industrial Crops and Products*, 155, 112809.
- Shi, X. C., Zhang, Y., Wang, T., Wang, X. C., Lv, H. B., Laborda, P., & Duan, T. T. (2021). Metabolic and Transcriptional Analysis of Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* for Xylose Fermentation: A Feasible and Efficient Approach. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, 26(6), 2425-2434.
- Siacor, F. D. C., Lobarbio, C. F. Y., & Taboada, E. B. (2021). Pretreatment of mango (*Mangifera indica* L. Anacardiaceae) seed husk for bioethanol production by dilute acid treatment and enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1338-1350.
- Siebers, B., Wendisch, V. F., & Hensel, R. (1997). Carbohydrate metabolism in *Thermoproteus tenax*: in vivo utilization of the non-phosphorylative Entner-

- Doudoroff pathway and characterization of its first enzyme, glucose dehydrogenase. *Archives of microbiology*, 168(2), 120-127.
- Silveira, M. H. L., Morais, A. R. C., da Costa Lopes, A. M., Oleksyszzen, D. N., Bogel-Łukasik, R., Andreus, J., & Pereira Ramos, L. (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*, 8(20), 3366-3390.
- Simas-Rodrigues, C., Villela, H. D., Martins, A. P., Marques, L. G., Colepicolo, P., & Tonon, A. P. (2015). Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4097-4108.
- Simas-Rodrigues, C., Villela, H. D., Martins, A. P., Marques, L. G., Colepicolo, P., & Tonon, A. P. (2015). Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4097-4108.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. L. A. P. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16.
- Sudhakar, M. P., Ravel, M., & Perumal, K. (2021). Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*. *Fuel*, 306, 121680.
- Suna, S., & Çopur, Ö. U. (2018). A New Approach: Replacement and alternative foods for food industry. *Alternative and Replacement Foods*, 1-30.
- Suryadi, H., Judono, J. J., Putri, M. R., Ecclesia, A. D., Ulhaq, J. M., Agustina, D. N., & Sumiati, T. (2022). Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*, e08865.
- Susmozas, A., Martín-Sampedro, R., Ibarra, D., Eugenio, M. E., Iglesias, R., Manzanares, P., & Moreno, A. D. (2020). Process strategies for the transition of 1G to advanced bioethanol production. *Processes*, 8(10), 1310.
- Swings, J., & De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological reviews*, 41(1), 1-46.
- Şahin, H. T., & Şahin, H. T. Suyun kağıt yapısının oluşumuna etkisi üzerine bir inceleme.
- T.C. Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı. (2019). “Onbirinci Kalkınma Planı 2019-2023”. <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=onbirinci+kalk%C4%B1nma+plan%C4%B1+2019-2023>. Son erişim tarihi: 19 Ekim 2020.
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383-399.

- Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P., & Benner, S. A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature genetics*, 37(6), 630-635.
- Travaini, R., Martín-Juárez, J., Lorenzo-Hernando, A., & Bolado-Rodríguez, S. (2016). Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource Technology*, 199, 2-12.
- Tutt, M., Kikas, T., & Olt, J. (2012). Influence of different pretreatment methods on bioethanol production from wheat straw. *Agronomy Research*, 10(1), 209-276.
- Türkiye İstatistik Kurumu, 2022. “Meyveler İçecek ve Baharat Bitkileri, Çay Üretimi, 1988-2021”.
<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/DownloadIstatistikselTablo?p=F9K04wNJau6Gf6j1sut2rFu0/grWOX/0WZFIR2or2STPHm4g4un422MvUXXGD8so>. Son erişim tarihi: 26 Mayıs 2022.
- Tye, Y. Y., Lee, K. T., Abdullah, W. N. W., & Leh, C. P. (2011). Second-generation bioethanol as a sustainable energy source in Malaysia transportation sector: Status, potential and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4521-4536.
- Uddin, M. T., Islam, M. A., Mahmud, S., & Rukanuzzaman, M. (2009). Adsorptive removal of methylene blue by tea waste. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1), 53-60.
- Usta, B. (2015). Karadeniz Bölgesindeki Organik Atıkların Değerlendirilmesi (Yayınlanmamış Bitirme Tezi). T.C. ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ, MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ, ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI, Samsun.
- Valaskova, K., Throne, O., Kral, P., & Michalkova, L. (2020). Deep learning-enabled smart process planning in cyber-physical system-based manufacturing. *Journal of Self-Governance and Management Economics*, 8(1), 121-127.
- Valdés, G., Mendonça, R. T., Parra, C., & Aggelis, G. (2020). Patterns of lignocellulosic sugar assimilation and lipid production by newly isolated yeast strains from Chilean Valdivian forest. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(4), 1124-1146.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584.
- Wang, X., Jin, M., Balan, V., Jones, A. D., Li, X., Li, B. Z., ... & Yuan, Y. J. (2014). Comparative metabolic profiling revealed limitations in xylose- fermenting yeast during co- fermentation of glucose and xylose in the presence of inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(1), 152-164.
- Wang, Z., Hou, X., Sun, J., Li, M., Chen, Z., & Gao, Z. (2018). Comparison of ultrasound-assisted ionic liquid and alkaline pretreatment of Eucalyptus for enhancing enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, 254, 145-150.

- Wirawan, F., Cheng, C. L., Lo, Y. C., Chen, C. Y., Chang, J. S., Leu, S. Y., & Lee, D. J. (2020). Continuous cellulosic bioethanol co-fermentation by immobilized *Zymomonas mobilis* and suspended *Pichia stipitis* in a two-stage process. *Applied Energy*, 266, 114871.
- Wistara, N. J., Pelawi, R., & Fatriasari, W. (2016). The effect of lignin content and freeness of pulp on the bioethanol productivity of Jabon wood. *Waste and biomass valorization*, 7(5), 1141-1146.
- Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., & Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource technology*, 96(18), 1959-1966.
- Yan, K., Yan, L., Meng, L., Cai, H., Duan, A., Wang, L., ... & Abbas, M. (2021). Comprehensive analysis of bacterial community structure and diversity in Sichuan dark tea (*Camellia sinensis*). *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Yan, X., Cheng, J. R., Wang, Y. T., & Zhu, M. J. (2020). Enhanced lignin removal and enzymolysis efficiency of grass waste by hydrogen peroxide synergized dilute alkali pretreatment. *Bioresource technology*, 301, 122756.
- Yasuda, M., Nagai, H., Takeo, K., Ishii, Y., & Ohta, K. (2014). Bio-ethanol production through simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiegrass (*Pennisetum purpureum* Schumach). *SpringerPlus*, 3(1), 1-8.
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2008). Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic engineering*, 10(6), 340-351.
- Yélamo Mayorga, J. (2021). *Global potential of bioethanol production from biowaste* (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Yoo, C. G., Pu, Y., & Ragauskas, A. J. (2017). Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 5-11.
- Yuan, H., Lan, Y., Zhu, J., Wachemo, A. C., Li, X., & Yu, L. (2019). Effect on anaerobic digestion performance of corn stover by freezing-thawing with ammonia pretreatment. *Chinese journal of chemical engineering*, 27(1), 200-207.
- Yücel, H. G., & Aksu, Z. (2015). Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. *Fuel*, 158, 793-799.
- Zhang, C., Wen, H., Chen, C., Cai, D., Fu, C., Li, P., ... & Tan, T. (2019). Simultaneous saccharification and juice co-fermentation for high-titer ethanol production using sweet sorghum stalk. *Renewable energy*, 134, 44-53.
- Zhang, C., Wen, H., Chen, C., Cai, D., Fu, C., Li, P., ... & Tan, T. (2019). Simultaneous saccharification and juice co-fermentation for high-titer ethanol production using sweet sorghum stalk. *Renewable energy*, 134, 44-53.

- Zhang, K., Lu, X., Li, Y., Jiang, X., Liu, L., & Wang, H. (2019). New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(5), 2087-2099.
- Zhang, Q., & Cai, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1130-1135.
- Zhang, Q., Zhao, M., Xu, Q., Ren, H., & Yin, J. (2019). Enhanced enzymatic hydrolysis of sorghum stalk by supercritical carbon dioxide and ultrasonic pretreatment. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188(1), 101-111.
- Zhao, J., Zhang, X., Lei, W., Ji, X., Zhou, X., & Xu, Y. (2020). Mannonic acid and bioethanol production from konjac using a two-step bioprocess with *Candida shehatae* and *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Renewable Materials*, 8(1), 79.