

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN
MISIR ve BUĞDAY ATIKLARINDAN
BİYOETANOL ÜRETİM VERİMİ ÜZERİNE
ÖN İŞLEM ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

EMRAH AHMET ERKURT

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof. Dr. Halil KUMBUR**

**MERSİN
KASIM – 2011**

Emrah Ahmet ERKURT tarafından Prof. Dr. Halil KUMBUR danışmanlığında hazırlanan “Doğu Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Mısır ve Buğday Atıklarından Biyoetanol Üretim Verimi Üzerine Ön İşlem Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof.Dr. Halil KUMBUR

Prof.Dr. Ayla ÖZER

Prof.Dr. Cumali KINACI

Doç.Dr. Ali ÜNYAYAR

Yrd.Doç.Dr. Mehmet Ali MAZMANCI

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04./01./2012 tarih ve 2012-1/17 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. A. Murat GİZİR
Enstitü Müdürü

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN MISIR ve BUĞDAY ATIKLARINDAN BİYOETANOL ÜRETİM VERİMİ ÜZERİNE ÖN İŞLEM ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Emrah Ahmet ERKURT

ÖZ

Dünya üzerinde yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Bu enerji türlerinden biri de güneş ışığını enerji kaynağı olarak kullanan biyokütledir (biyoenerji). Biyoenerjinin global potansiyelini ise tarım mahsulleri ve lignoselülozik materyallerin kalıntıları oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Doğu Akdeniz bölgesinde en fazla üretilen zirai ürünler olan buğday ve mısır'ın atıklarından biyo-yakıt amaçlı etanol üretiminin maksimum miktarda gerçekleştirilebilmesi amaçlanmıştır. Etanol fermantasyonu için gerekli olan şekerlerin kullanılan atıklardan sağlanabilmesi için çeşitli ön işlemler uygulanmıştır. Ön işlemler kendi içinde fiziksel (mekanik ve ultrasonik ön işlemler), kimyasal (piroliz, fenton oksidasyonu, seyreltik ve derişik H₂SO₄ uygulaması, alkali ön işlemler ve ıslak oksidasyon) ve biyolojik (beyaz çürükçül funguslarla ve enzimatik ön işlemler) işlemler olarak gruplandırılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek bazı ön işlem metodları kombine edilmiştir. Maksimum sakarifikasyon verimi % 1,0 H₂SO₄ ile ıslak oksidasyon uygulanmış ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş kombinasyon ortamında sağlanmış ve 1 g/L mısır sapı, mısır koçanı, buğday kepeği ve buğday sapı için saptanan heksoz (glukoz, mannoz, fruktoz ve galaktoz derişimleri toplamı) derişimleri sırası ile 486,62; 361,78; 617,10 ve 201,86 mg/g olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen ön işlemler sırasında oluşan ve etanol fermantasyonunu inhibe eden bileşiklerin (furfural, asetik asit, levunilik asit) saptanması sonucu bu bileşiklerin giderimleri (detoksifikasyonu) fiziksel (diethyl eter ve etil asetat ile ekstraksiyon) kimyasal (Ca(OH)₂ ile yapılan alkali detoksifikasyon) ve biyolojik (lakkaz enzimi ile) olarak ayrı ayrı denenmiştir ve çalışma sonunda Ca(OH)₂ ile yapılan alkali detoksifikasyon en uygun yöntem olarak belirlenmiştir. Ardından ön işlem ve detoksifikasyon uygulanmış 40 g/L numune kullanılarak etanol fermantasyonu yapılmıştır ve mısır sapı, mısır koçanı, buğday kepeği ve buğday sapı için saptanan en yüksek etanol derişimleri sırası ile 6,22; 3,56; 8,01 ve 1,13 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışmada son basamak olarak teorik maliyet analizi yapılmış ve buğday kepeğinden sakkarifikasyon ve ardından etanol üretimi maliyet açısından uygun bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Lignoselülozik hammadde, ön işlem, detoksifikasyon, etanol fermantasyonu, maliyet analizi.

Danışman: Prof. Dr. Halil KUMBUR, Mersin Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı.

INVESTIGATION OF THE PRETREATMENT METHODS ON THE BIOETHANOL PRODUCTION FROM WASTES OF CORN AND WHEAT GROWN IN EASTERN MEDITERRANEAN REGION

Emrah Ahmet ERKURT

ABSTRACT

Need for renewable resources have been increasing. One of these renewable energy sources is the biomass (bioenergy) that uses sunlight as energy source. Agricultural products lignocellulosic materials are the global potentials of bioenergy. Aim of this study was to produce maximum amount of ethanol that would be used as biofuel, from the wheat and corn wastes which are the widespread agricultural wastes of Eastern Mediterranean region. Different pretreatment procedures were used to increase the amount of sugar for ethanol fermentation from wastes. Physical (mechanical and ultrasonic pretreatment methods) chemical (pyrolysis, phenol oxidation, diluted and concentrated H₂SO₄ applications, alkaline pretreatments and wet oxidation) and biological (biodegradation with white rot fungi and their enzymes) pretreatment methods were used and after evaluating the results some of the pretreatment methods were combined. Maximum saccharification was obtained with wet oxidation by using % 1,0 H₂SO₄ followed by enzymatic hydrolysis. After pretreatment, 486.62, 361.78, 617.10 and 201.86 mg/g hexose (sum of the concentrations of glucose, mannose, fructose and galactose) were obtained from 1 g/L corn-stalk, corncob, wheat bran and wheat stalk respectively. During pretreatment processes formation of inhibitors of ethanol fermentation (furfural, acetic acid, levulinic acid) were detected. Physical (extraction by using diethyl ether and ethyl acetate), chemical (alkaline detoxification by using Ca(OH)₂) and biological (by using laccase) removal (detoxification) were studied and alkaline detoxification by Ca(OH)₂ was found to be the appropriate detoxification method. Pretreated and detoxified materials were subjected to ethanol fermentation. Maximum concentrations of ethanol produced from corn-stalk, corncob, wheat bran and wheat stalk were 6.22, 3.56, 8.01 and 1.13 g/L respectively. Last step of this was the theoretical cost analysis. Saccharification followed by ethanol production from wheat straw was found to be cost effective.

Key Words: Lignocellulosic raw-materials, pretreatment, detoxification, ethanol fermentation, cost analysis.

Advisor: Prof. Dr. Halil KUMBUR, Department of Environmental Engineering, University of Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca sağladığı bilimsel katkı, titizlik, sabır, özveri ve anlayışı için tez danışmanım Sayın Prof.Dr. Halil KUMBUR'a,

Tez komitelerimde çalışmalarımı titizlikle inceleyen ve değerli katlılarda bulunan Sayın Prof.Dr. Ayla ÖZER'e ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Mehmet Ali MAZMANCI'ya,

Tez çalışmaları ve yazımı sırasında çok değerli yardımları, özverisi ve anlayışı için sevgili eşim, Sayın Yrd.Doç.Dr. Hatice ATAÇAĞ ERKURT'a,

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'ndeki çalışmalarımı yapabilmem için Merkez Araştırma Laboratuvarının tüm olanaklarını kullanmam konusunda yardımcı olan Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi Rektörü Sayın Prof.Dr. Mehmet Ali YÜKSELEN'e,

sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje no: BAP-FBE ÇM(EAE) -2008 10DR).

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLERİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. LİGNOSELÜLOZİK MADDELER	3
2.1.1. Lignin	4
2.1.2. Selüloz	5
2.1.3. Hemiselüloz	5
2.2. LİGNOSELÜLOZİK BİYOKÜTLEDEN ETANOL ÜRETİMİ	6
2.2.1. Lignosülozik Biyokütlenin Ön İşlemi	7
2.2.1.1. Fiziksel metodlar	7
<i>Ultrasonik uygulama</i>	8
2.2.1.2. Fiziko-kimyasal metodlar	9
2.2.1.3. Kimyasal metodlar	12
<i>Fenton oksidasyonu</i>	13
2.2.1.4. Biyolojik yöntemler.....	14
2.2.1.5. Selülazlar	15
<i>Kompleks olmayan selülaz sistemleri</i>	17
<i>Kompleks selülaz sistemleri (selülozom)</i>	18
<i>Selülazların bazı uygulama alanları</i>	19
<i>Gıda endüstrisinde selülazlar</i>	20
<i>İçecek ve şarap endüstrisinde selülazlar</i>	21
<i>Hayvan yemi endüstrisinde selülazlar</i>	21
<i>Tekstil endüstrisinde selülazlar</i>	21
<i>Kağıt endüstrisinde selülazlar</i>	21
2.2.1.6. Lignoselülozik maddenin enzimatik hidrolizi	22
2.3. ÖN İŞLEM GÖRMÜŞ LİGNOSELÜLOZİK MATERYALİN DETOKSİFİKASYONU.....	25
2.4. FERMANTASYON TEKNOLOJİSİ	27
2.4.1. Glikoliz	28
2.4.2. Fermantasyon.....	28

2.4.3. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar	29
2.5. BİYOETANOL.....	30
2.6. ŞEKERLERDEN ETANOL ÜRETİMİ	33
2.6.1. Kesikli ve Yarı Sürekli Sistemler.....	34
2.6.2. Sürekli Sistemler	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. MATERYAL	37
3.2. YÖNTEM	38
3.2.1. Hammadde İçeriğinin Belirlenmesi	38
3.2.2. Hammaddelere Ön İşlemlerin Uygulanması	38
3.2.2.1. Fiziksel ön işlemler	38
<i>Mekanik ön işlemler</i>	38
<i>Ultrasonik işlemler</i>	39
3.2.2.2. Kimyasal ön işlemler	41
<i>Piroliz</i>	40
<i>Fenton oksidasyonu</i>	41
<i>Seyreltik H₂SO₄ ile ön işlemler</i>	42
<i>Derişik H₂SO₄ ile ön işlemler</i>	42
<i>Alkali ön işlemler</i>	42
<i>Islak oksidasyon</i>	43
3.2.2.3. Biyolojik ön işlemler	43
<i>Beyaz çürükçül funguslarla ön işlem</i>	43
<i>Enzimatik ön işlem</i>	45
3.2.3. Ön İşlem Kombinasyonu	47
3.2.3.1. Islak oksidasyon - enzimatik ön işlem kombinasyonu	47
3.2.3.2. Asidik ıslak oksidasyon - enzimatik ön işlem kombinasyonu	48
3.2.4. Detoksifikasyon Çalışmaları.....	48
3.2.4.1 Fiziksel detoksifikasyon çalışmaları	48
3.2.4.2. Kimyasal detoksifikasyon çalışmaları.....	49
3.2.4.3. Biyolojik detoksifikasyon çalışmaları	49
3.2.5. Etanol Fermantasyonu	49
3.2.5.1. Maya üreme ortamının hazırlanışı.....	49
3.2.5.2. Üreme eğrisinin elde edilmesi	50
3.2.5.3. Fermantasyon ortamları	50
3.2.6. SEM Analizleri	52
3.2.7. Maliyet Analizleri	52
3.2.8. Analitik Prosedür	52
3.2.8.1. Nem tayini.....	52
3.2.8.2. Lignin tayini.....	52
3.2.8.3. Selüloz tayini	53
3.2.8.4. Hemiselüloz tayini.....	54

3.2.8.5. Toplam karbonhidrat tayini	54
3.2.8.6. İndirgen şeker tayini	55
3.2.8.7. Selüloz tayini.....	56
3.2.8.8. Lakkaz tayini.....	58
3.2.8.9. Heksozların tayini	59
3.2.8.10. İnhibitörlerin tayini.....	59
3.2.8.11. Etil alkol tayini.....	60
3.2.8.12. Ham protein tayini.....	60
3.2.9. Deney Akım Şeması.....	61
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	62
4.1. HAMMADDE İÇERİKLERİ	62
4.2. FİZİKSEL ÖN İŞLEMLER.....	62
4.2.1. Mekanik Ön İşlemler.....	62
4.2.2. Ultrasonik Ön İşlemler	66
4.2.2.1. Ultrasonik işlemlerde ortama eklenen H ₂ O ₂ , NaOH, ve H ₂ SO ₄ 'ün etkisi.....	70
<i>MS ile yapılan çalışmalar</i>	70
<i>MK ile yapılan çalışmalar</i>	72
<i>BK ile yapılan çalışmalar</i>	75
<i>BS ile yapılan çalışmalar</i>	77
<i>H₂O₂ ile birlikte NaOH ve H₂SO₄'ün etkisi</i>	80
4.3. KİMYASAL ÖN İŞLEMLER.....	83
4.3.1. Piroliz	83
4.3.2. Fenton Oksidasyonu	84
4.3.2.1. pH optimizasyonu	84
4.3.2.2. Fe ²⁺ derişiminin optimizasyonu	85
4.3.2.3. H ₂ O ₂ derişiminin optimizasyonu.....	86
4.3.2.4. Reaksiyon süresinin etkisi	87
4.3.3. Seyreltik H ₂ SO ₄ 'ün Etkisi	88
4.3.3.1. MS ile yapılan çalışmalar	88
4.3.3.2. MK ile yapılan çalışmalar.....	90
4.3.3.3. BK ile yapılan çalışmalar.....	92
4.3.3.4. BS ile yapılan çalışmalar	93
4.3.4. Derişik H ₂ SO ₄ 'ün Etkisi	95
4.3.4.1. MS ile yapılan çalışmalar	95
4.3.4.2. MK ile yapılan çalışmalar.....	96
4.3.4.3. BK ile yapılan çalışmalar.....	97
4.3.4.4. BS ile yapılan çalışmalar	99
4.3.5. Alkali Ön İşlemler.....	101
4.3.5.1. NaOH ile yapılan ön işlemler	101
<i>MS ile yapılan çalışmalar</i>	101
<i>MK ile yapılan çalışmalar</i>	102
<i>BK ile yapılan çalışmalar</i>	103

<i>BS ile yapılan çalışmalar</i>	105
4.3.5.2. Ca(OH) ₂ ile yapılan ön işlemler.....	107
<i>MS ile yapılan çalışmalar</i>	107
<i>MK ile yapılan çalışmalar</i>	108
<i>BK ile yapılan çalışmalar</i>	109
<i>BS ile yapılan çalışmalar</i>	110
4.3.6. Islak Oksidasyon.....	112
4.3.6.1. MS ile yapılan çalışmalar.....	112
4.3.6.2. MK ile yapılan çalışmalar.....	114
4.3.6.3. BK ile yapılan çalışmalar.....	115
4.3.6.4. BS ile yapılan çalışmalar.....	117
4.4. BİYOLOJİK ÖN İŞLEM ÇALIŞMALARI.....	119
4.4.1. Beyaz Çürükçül Funguslarla Yapılan Ön İşlem Çalışmaları.....	119
4.4.1.1. <i>F. trogii</i> ile yapılan çalışmalar.....	120
<i>MS ile yapılan çalışmalar</i>	120
<i>MK ile yapılan çalışmalar</i>	122
<i>BK ile yapılan çalışmalar</i>	124
<i>BS ile yapılan çalışmalar</i>	126
4.4.1.2. <i>P. chrysosporium</i> ile yapılan çalışmalar.....	127
<i>MS ile yapılan çalışmalar</i>	127
<i>MK ile yapılan çalışmalar</i>	129
<i>BK ile yapılan çalışmalar</i>	131
<i>BS ile yapılan çalışmalar</i>	132
4.4.2. Enzimatik Ön İşlem Çalışmaları.....	134
4.4.2.1. Selülaz enzimi ile ön işlemde pH'nın etkisi.....	134
4.4.2.2. Sıcaklığın etkisi.....	136
4.4.2.3. Temas süresinin etkisi.....	137
4.4.2.4. Çalkalama hızının etkisi.....	138
4.4.2.5. Hammadde derişiminin etkisi.....	139
4.4.2.6. Selülaz derişiminin etkisi.....	140
4.5. ÖN İŞLEM KOMBİNASYONU.....	142
4.5.1. Islak Oksidasyon - Enzimatik Ön işlem Kombinasyonu.....	142
4.5.2. Asidik Islak Oksidasyon – Enzimatik Ön işlem Kombinasyonu.....	143
4.6. HEKSOZLARIN TAYİNİ.....	145
4.7. İNHİBİTÖRLERİN TAYİNİ.....	150
4.8. DETOKSİFİKASYON ÇALIŞMALARI.....	154
4.8.1. Fiziksel Detoksifikasyon.....	154
4.8.2. Kimyasal Detoksifikasyon.....	155
4.8.3. Biyolojik Detoksifikasyon.....	156
4.9. SEM GÖRÜNTÜLERİ.....	160

4.10. ETANOL FERMANTASYONU	165
4.10.1. <i>S. cerevisiae</i> Üreme Eğrisinin Elde Edilmesi	165
4.10.2. Fermantasyon.....	165
4.11. MALİYET ANALİZİ.....	171
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	178
KAYNAKLAR	183
ÖZGEÇMİŞ	194

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Lignoselülozik materyallerden etanol üretimi için ön işlem metodları.	10
Çizelge 2.2. Bazı detoksifikasyon yöntemleri	27
Çizelge 2.3. Fermantasyon teknolojisi ile üretilen maddeler	28
Çizelge 2.4. Biyoetanolün yakıt özellikleri	31
Çizelge 2.5. Ülkelere göre etanolün yakıt olarak kullanımı	32
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan eleklerin gözenek boyutları	39
Çizelge 3.2. Fungusların üretiminde kullanılan sıvı besiyeri içeriği	44
Çizelge 3.3. Sakkarifikasyon için hazırlanan besiyeri içeriği	45
Çizelge 4.1. Hammadde içerikleri	62
Çizelge 4.2. MK'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları	63
Çizelge 4.3. MS'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları	63
Çizelge 4.4. BK'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları	64
Çizelge 4.5. BS'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları	65
Çizelge 4.6. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan heksozlar	148
Çizelge 4.7. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan inhibitörler	152
Çizelge 4.8. Dietil eter ile yapılan ekstraksiyon çalışmaları sonrası saptanan heksozlar ve inhibitörler	154
Çizelge 4.9. Etil asetat ile yapılan ekstraksiyon çalışmaları sonrası saptanan heksozlar ve inhibitörler	155
Çizelge 4.10. Kimyasal detoksifikasyon çalışmaları sonrası saptanan heksozlar ve inhibitörler	156
Çizelge 4.11. Biyolojik detoksifikasyon çalışmaları	157
Çizelge 4.12. Fermantasyon işlemi sonunda hammaddeler için saptanan değerler	171
Çizelge 4.13 Teorik maliyet hesapları çizelgesi	177

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Lignoselülozik bir bitki hücresinde lignin, selüloz ve hemiselülozun şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.2. Lignin, selüloz ve hemiselülozun model kimyasal yapıları	4
Şekil 2.3. Ultrasonik kavitasyon kabarcığı ve normal hava kabarcığı.....	8
Şekil 2.4. Lignoselülozik bir yapının fenton oksidasyonu	14
Şekil 3.1. Piroliz reaktörü.....	40
Şekil 3.2. TK tespiti için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	54
Şekil 3.3. İŞ tespiti için oluşturulan kalibrasyon	56
Şekil 4.1. Mekanik öğütme ve eleme işlemleri sonrası saptanan TK ve İŞ değerleri	65
Şekil 4.2. MK ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi.....	67
Şekil 4.3. MS ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi	67
Şekil 4.4. BK ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi	68
Şekil 4.5. BS ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi	68
Şekil 4.6. Ultrasonik ön işlem çalışmaları sonunda saptanan TK ve İŞ değerleri....	69
Şekil 4.7. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ O ₂ 'in etkisi	70
Şekil 4.8. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi	71
Şekil 4.9. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ SO ₄ 'in etkisi	72
Şekil 4.10. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ O ₂ 'in etkisi	73
Şekil 4.11. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi	73
Şekil 4.12. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ SO ₄ 'in etkisi	74
Şekil 4.13. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ O ₂ 'in etkisi.....	75
Şekil 4.14. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi	76
Şekil 4.15. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ SO ₄ 'in etkisi.....	77
Şekil 4.16. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ O ₂ 'in etkisi.....	78
Şekil 4.17. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi.....	79
Şekil 4.18. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H ₂ SO ₄ 'in etkisi.....	80
Şekil 4.19. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi.....	81
Şekil 4.20. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi	81
Şekil 4.21. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi	82
Şekil 4.22. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi.....	83
Şekil 4.23. Piroliz uygulaması sonrası saptanan TK ve İŞ değerleri.....	84

Şekil 4.24. Fenton oksidasyonunda pH optimizasyonu	85
Şekil 4.25. Fenton oksidasyonunda Fe^{2+} derişiminin optimizasyonu.....	86
Şekil 4.26. Fenton oksidasyonunda H_2O_2 derişiminin optimizasyonu	87
Şekil 4.27. Fenton oksidasyonunda reaksiyon süresinin etkisi	88
Şekil 4.28. MS ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi	89
Şekil 4.29. MS ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	90
Şekil 4.30. MK ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi.....	91
Şekil 4.31. MK ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	91
Şekil 4.32. BK ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi	92
Şekil 4.33. BK ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	93
Şekil 4.34. BS ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi	93
Şekil 4.35. BS ile yapılan ısırl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	94
Şekil 4.36. Seyreltik asitler ile tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri.....	94
Şekil 4.37. MS ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi	95
Şekil 4.38. MS ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	96
Şekil 4.39. MK ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi	96
Şekil 4.40. MK ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	97
Şekil 4.41. BK ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi	98
Şekil 4.42. BK ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	98
Şekil 4.43. BS ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi.....	99
Şekil 4.44. BS ile yapılan ısırl derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	100
Şekil 4.45. Derişik asitler ile tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri.....	100
Şekil 4.46. MS ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi.....	101
Şekil 4.47. MS ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	102
Şekil 4.48. MK ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi	103
Şekil 4.49. MK ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	103
Şekil 4.50. BK ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi	104
Şekil 4.51. BK ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	104
Şekil 4.52. BS ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi.....	105
Şekil 4.53. BS ile yapılan ısırl NaOH ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	106
Şekil 4.54. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri	106
Şekil 4.55. MS ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin TK üzerindeki etkisi	107
Şekil 4.56. MS ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	108
Şekil 4.57. MK ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin TK üzerindeki etkisi.....	108
Şekil 4.58. MK ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	109
Şekil 4.59. BK ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin TK üzerindeki etkisi	109
Şekil 4.60. BK ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi	110
Şekil 4.61. BS ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin TK üzerindeki etkisi	110
Şekil 4.62. BS ile yapılan ısırl $Ca(OH)_2$ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi.....	111
Şekil 4.63. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri	111
Şekil 4.64. MS ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması	113
Şekil 4.65. MS ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması.....	114
Şekil 4.66. MK ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması.....	115
Şekil 4.67. MK ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması	115
Şekil 4.68. BK ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması	116
Şekil 4.69. BK ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması	117

Şekil 4.70. BS ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması	117
Şekil 4.71. BS ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması.....	118
Şekil 4.72. Islak oksidasyon çalışmaları sonunda elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri.....	119
Şekil 4.73. <i>F. trogii</i> 'nin MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi.....	121
Şekil 4.74. <i>F. trogii</i> 'nin MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi.....	122
Şekil 4.75. <i>F. trogii</i> 'nin MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi.....	123
Şekil 4.76. <i>F. trogii</i> 'nin MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi.....	124
Şekil 4.77. <i>F. trogii</i> 'nin BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi	124
Şekil 4.78. <i>F. trogii</i> 'nin BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi.....	125
Şekil 4.79. <i>F. trogii</i> 'nin BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi.....	126
Şekil 4.80. <i>F. trogii</i> 'nin BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi.....	127
Şekil 4.81. <i>P. chrysosporium</i> 'un MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi	128
Şekil 4.82. <i>P. chrysosporium</i> 'un MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi	129
Şekil 4.83. <i>P. chrysosporium</i> 'un MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi	130
Şekil 4.84. <i>P. chrysosporium</i> 'un MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi	130
Şekil 4.85. <i>P. chrysosporium</i> 'un BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi	131
Şekil 4.86. <i>P. chrysosporium</i> 'un BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi	132
Şekil 4.87. <i>P. chrysosporium</i> 'un BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi	133
Şekil 4.88. <i>P. chrysosporium</i> 'un BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi	133
Şekil 4.89. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında pH'nın etkisi.....	135
Şekil 4.90. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında sıcaklığın etkisi	136
Şekil 4.91. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında temas süresinin etkisi	137
Şekil 4.92. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında çalkalama hızının etkisi.....	138
Şekil 4.93. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında hammadde derişiminin etkisi.....	139
Şekil 4.94. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında enzim derişiminin etkisi.....	140
Şekil 4.95. Islak oksidasyon ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri	142
Şekil 4.96. Enzimatik hidroliz ve ardından ıslak oksidasyon gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri	143
Şekil 4.97. Asidik ıslak oksidasyon ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri	144

Şekil 4.98. Enzimatik hidroliz ve ardından asidik ıslak oksidasyon gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri	145
Şekil 4.99. Hektozlar için HPLC ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri	147
Şekil 4.100. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan heksozlar	149
Şekil 4.101. İnhibitörler için HPLC ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri.....	152
Şekil 4.102. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan inhibitörler	153
Şekil 4.103. Kimyasal detoksifikasyon sonrası hammaddelerde saptanan inhibitörler	159
Şekil 4.104. MS'nin önişem öncesi ve sonrası SEM görüntüsü.....	161
Şekil 4.105. MK'nın önişem öncesi ve sonrası SEM görüntüsü.....	162
Şekil 4.106. BK'nın önişem öncesi ve sonrası SEM görüntüsü.....	163
Şekil 4.107. BS'nin önişem öncesi ve sonrası SEM görüntüsü	164
Şekil 4.108. <i>S. cerevisiae</i> üreme eğrisi	165
Şekil 4.109. Fermantasyon sırasında pH değişimi.....	166
Şekil 4.110. MS ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi	167
Şekil 4.111. MK ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi	168
Şekil 4.112. BK ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi	169
Şekil 4.113. BS ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi	170

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

BK	Buğday Kepeği
BS	Buğday Sapı
CU	Colorimetric Unit
DNS	Dinitro Salisilik Asit
FPU	Filter Paper Unit
<i>F. trogii</i>	<i>Funalia trogii</i>
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İŞ	İndirgen Şeker
MK	Mısır Koçanı
MS	Mısır Sapı
PST	Potasyum Sodyum Tartarat
<i>P. chrysosporium</i>	<i>Phanerochaeta chrysosporium</i>
SEM	Scanning Electron Microscope
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TK	Toplam Karbonhidrat

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde enerji kaynaklarının çok büyük bir kısmını yenilenemez enerji kaynakları oluşturmaktadır. Aynı zamanda enerji kaynaklarına olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Dünyada Amerika Birleşik Devletleri en çok petrol tüketen ülkedir, ancak Çin'in çok hızlı ekonomik gelişimi de petrol tüketiminde Amerika Birleşik Devletleri ile aynı rekabet ortamında yer almasına neden olmaktadır. Orta doğudaki devamlı görülen krizler, spekülasyonlar ve diğer faktörler petrol fiyatlarının devamlı olarak yükselmesine sebep olmaktadır [1].

Petrol kaynaklı yakıtların üretimi ve kullanımını sırasında çevreye verdikleri çeşitli negatif etkileri göz ardı edilemez. Özellikle atmosfere salınan yanma artığı gazlar küresel çapta kirlilik yaratmaktadır. Bu problemlerin çözümü ülkelerin geliştireceği ve uygulayacağı alternatif enerji kaynaklarının ortaya çıkarılması ile çözülebilir. Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımının ise insan sağlığına ve çevreye zararlı etkilerinin olmaması gereklidir.

Yenilenebilir enerji türlerinden biri de güneş ışığını enerji kaynağı olarak kullanan biyokütledir (biyoenerji). Biyoenerjinin global potansiyelini ise tarım mahsülleri ve lignoselülozik materyallerin kalıntıları oluşturmaktadır. Bu malzemelerin biyoetanol dönüşümü hem alternatif enerji kaynaklarının kullanımı için önemlidir hem de kirlenici gazların atmosferdeki emisyonlarının düşmesine neden olur.

Biyoetanol kullanımının yaygınlaşmasının önemli sosyal ve ekonomik faydaları vardır. Biyoetanol kullanımının Amerika Birleşik Devletleri'nde ekonomide ve iş imkanlarının artışında bir etkisinin olduğu belirtilmiştir [1]. Buna ilaveten biyoetanol amaçlı yetiştirilen bitkilerin üretiminin geliştirilmesi ise tarım sektörüne itici bir güç sağlayacaktır. Bu durumlar elbette gelişmekte olan ülkeler için çok daha fazla avantajlı olabilir. Çünkü gelişmekte olan ülkelerin tarımsal ürünlerinin artışı ile gelişmiş ülkelerin gün geçtikçe artan tarımsal ürün talepleri nedeni ile bir rekabete girmeleri ve gelişmelerine hız kazanmalarına neden olacaktır.

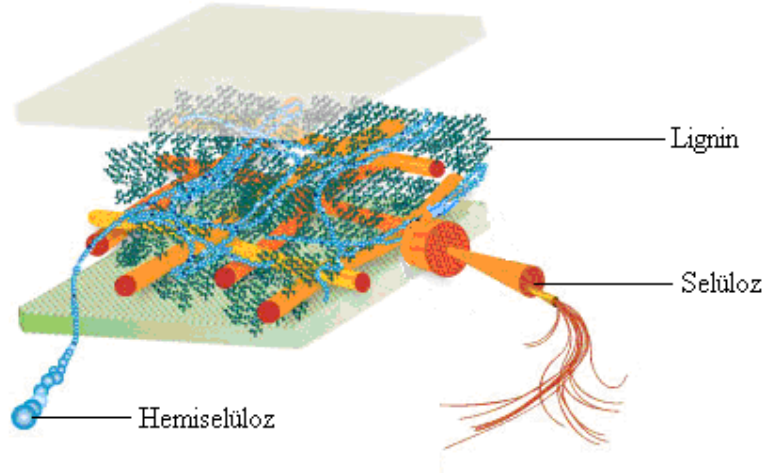
Lignoselülozik materyallerden büyük ölçekli etanol üretimi geliştirmek için dünyada çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Proseste maddenin kompleks yapısı asıl sınırlayıcı faktör olarak gösterilmektedir. Buda lignoselülozik biyokütlenin doğası ve bileşimi ile ilişkilidir. Etanole dönüşüm için öncelikle iki ana polimerin (lignin ve selüloz) fermente olabilir şekerlere dönüştürülmesi gerekmektedir. Fakat bu dönüşüm karışık, enerji tüketen ve çevrimi tam olarak yapılamamış ve halen üzerinde çalışılan bir prosestir [1].

Bu çalışmada, Doğu Akdeniz bölgesinde en fazla üretilen zirai ürünler olan buğday ve mısır'ın atıkları (Mısır Sapı [MS], Mısır Koçanı [MK], Buğday Kepeği [BK], Buğday Sapı [BS]) kullanılarak biyoetanol üretiminin maksimum miktarda gerçekleştirilebilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda etanol fermantasyonu için gerekli olan şekerlerin söz konusu atıklardan sağlanabilmesi için çeşitli ön işlemler uygulanmıştır. Ön işlemler kendi içinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemler olarak gruplandırılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilerek bazı ön işlem metodları kombine edilmiştir. Ayrıca maksimum şeker üretiminin sağlandığı ortamlarda fermantasyonu inhibe edebilecek maddelerin giderimleri çalışılmıştır. Ardından etanol fermantasyonu gerçekleştirilmiş ve son olarak teorik maliyet analizi yapılmıştır.

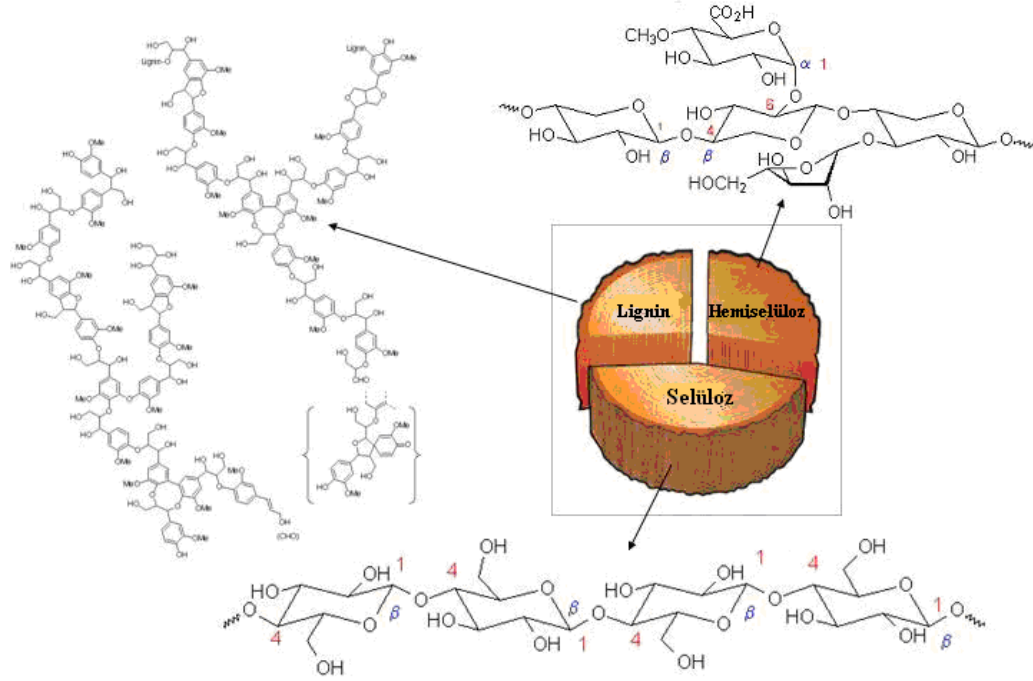
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. LİGNOSELÜLOZİK MADDELER

Lignoselülozik maddeler temel olarak selüloz, hemiselüloz, lignin, üronik asitler ve asetil gruplardan oluşmaktadır [2]. Hemiselülozik ve selülozik kısımlar glukoz, mannoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan oluşan monosakkaritleri içerirler ve bileşimleri tamamen hammaddenin doğasına bağlıdır [3]. Etanol üretimi için incelenen lignoselülozik maddeler buğday sapı, pirinç samanı, ayçiçeği sapları [4] ve mısır koçanı [5], su sümbülü [6] gibi bitkisel atıklardır. Lignoselülozik bir bitki hücresinde lignin, selüloz ve hemiselülozun şematik gösterimi Şekil 2.1.'de ve model kimyasal yapıları Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Lignoselülozik bir bitki hücresinde lignin, selüloz ve hemiselülozun şematik gösterimi.



Şekil 2.2. Lignin, selüloz ve hemiselülozun model kimyasal yapıları.

2.1.1. Lignin

Canlı bitkilerde ligninin biyolojik rolü, hücre duvarının selüloz ve diğer karbonhidratlarla mükemmel bir direnç ve dayanıklılığa sahip bir doku meydana getirmektir. Lignin amorf [7], heterojen ve polifenolik bir yapıya sahip olan, dünya üzerinde selülozdan sonra bitkilerde miktar olarak en fazla bulunan doğal bir polimerdir. Lignin molekül yapısı üç ayrı monomer yapıtaşından oluşmaktadır. Bunlar koniferil, sinapil ve kumaril alkoldür [8, 9].

Lignin aromatik yapıdadır ve bilinen çözücülerde kolay kolay ve tümüyle çözünmez. Monomer ünitelere hidrolizleri mümkün değildir ve diğer doğal polimerlerin en önemli özelliği olan düzgün yapıdan yoksundur. Bu özellikler ligninin yapısı hakkındaki çalışmaları son derece zorlaştırır [8].

Ligninin uzaklaştırılması (delignifikasyon) işlemi ile ürün olarak holoselüloz elde edilmektedir. İdeal bir delignifikasyonun uygulanmasından beklenti, ligninin tamamen uzaklaştırılması ve polisakkaritler üzerine herhangi bir kimyasal etkinin olmamasıdır. Ancak bütün bu beklentileri sağlayacak herhangi bir delignifikasyon tekniği bulunmamaktadır. Bu nedenle delignifikasyon işlemi ile öncelikle elde edilen holoselüloz içeriğinde kalıntı lignin miktarının en az düzeyde bulunması, aynı zamanda işlem sırasında polisakkarit kaybının mümkün olan en düşük miktarda olması ve selüloz molekülünde oksidatif ya da hidrolitik degradasyonun gerçekleşmemesidir [8,10].

2.1.2. Selüloz

Kimyasal olarak selüloz β -(1,4) glukoz bağları ile bağlanmış doğrusal bir polimerdir. Yan yana her iki glukoz molekülü zıt yönde bir araya gelerek yapıyı oluşturmaktadır. Selüloz % 44 karbon, % 6,2 hidrojen ve % 49 oksijen ihtiva eder. Bu bileşim $(C_6H_{10}O_5)_n$ bileşimine karşılık gelir. Saf selüloz hidroliz edildiğinde takribi % 95 verimle D-glukoza dönüşür. Yani selülozun yapı taşı, bir D-glukoz molekülünün bir su molekülü ekşiğine karşılıktır. Bu anhidro-glukoz birimleri, defalarca tekrarlanarak bir zincir molekül meydana getirirler. Bu birimlerin tekrarlanma sayısı, odunda 600'den 1000'e, pamuk ipliklerinde ise 3500'e kadar değer alır. Her bir anhidro-glukoz biriminin üç tane hidroksil (OH) grubu vardır. Selüloz su ve benzen, alkol, aseton, kloroform gibi organik çözücülerde çözünmez. Selüloz, schweitzer çözeltisi adı verilen, bakır-II-hidroksit ve derişik amonyum hidroksit karışımında çözünür [11].

2.1.3. Hemiselüloz

Hemiseluloz farklı şeker ünitelerinin (pentozlar, heksozlar ve şeker asitleri) farklı şekillerde birleşmesi ile oluşmuş dallı bir heteropolisakkarittir. Selulozda 7000-15000 glukoz molekülü düz zincir şeklinde birleşmişken hemiselulozda yaklaşık 200 farklı şeker birimi kısa zincirler şeklinde birleşmiştir. Hemiselulozlar doğada toplam biyokütlenin %30-35'ini oluşturmaktadır. Ksılan, hemiselulozun

başlıca bileşenidir. Ksilan iskelet yapısı yaklaşık % 80'i ksiloz ünitelerine C-2 ve/veya C-3 ile bağlı arabinoz veya gluküronik asitten oluşan monomerik yan zincirden ve arabinoz, ksiloz ve bazende galaktoz ünitelerinden oluşan oligomerik yan zincirden oluşur [12].

Sert odun hemiselülozu daha çok ksilan içerirken yumuşak odun hemiselülozu daha çok glukomannan içermektedir. Dallanma tekrarı ve kompozisyonu ksilanın kaynağına bağlıdır. Değişik kaynaklardaki ksilanların kompozisyonları farklılık gösterir. Örneğin; Pirinç kepeği ksilanı: % 46 ksiloz, % 44,9 arabinoz, % 6,1 galaktoz, % 1,9 glukoz, % 1,1 anhidrouronik asit içerir. Buğday arabinoksilanı: % 65,8 ksiloz, % 33,5 arabinoz, % 0,1 mannoz, % 0,1 galaktoz, % 0,3 glukoz içerir. Mısır lifi ksilanı β -1,4 bağı ile bağlı ksiloz ünitelerinden oluşmuş kompleks heteroksilanlardan biridir ve % 48-54 ksiloz, % 33-35 arabinoz, % 5-11 galaktoz, % 3-6 glukouronik asit içerir [12].

Genel olarak bitkilerde hemiselülozun polimerleşme derecesi selülozdan düşüktür. Ana şekerleri D-ksilopiranoz, D-glukopiranoz, D-galaktopiranoz, L-arabinofuranoz, D-mannopiranoz ve D- glukopiranosiluronik asit ile iz miktarlarda diğer şekerlerdir. Yumuşak odun hemiselülozunun ana iskelet polimer şekerleri D-galaktoz, D-glukoz ve D-mannozdur [12].

2.2. LİGNOSELÜLOZİK BİYOKÜTLEDEN ETANOL ÜRETİMİ

Lignoselülozik biyokütle etanol üretimi için önemli bir hammaddedir. Lignoselülozik bileşikler dünyada en fazla bulunan polimerlerdir. Lignoselülozik biyokütlenin Dünyadaki toplam biyokütlenin % 50'sini oluşturduğu ve yıllık üretiminin 10-50 milyar ton olduğu belirtilmektedir [1].

Genel olarak, biyoetanol üretiminde kullanılan lignoselülozik materyaller beş ana gruba ayrılmaktadır. Ekin kalıntıları (şeker kamışı sapı, mısır koçanı, buğday kepeği, pirinç kepeği, pirinç kabuğu, arpa kepeği, tatlı süpürge darısı sapı, zeytin çekirdeği, kağıt hamuru), kesertelik ağaçlar (kavak, çam, ladin vs), selüloz atıkları

(gazeteler, ofis atıkları, kağıt geri dönüşümü sistem çamuru), otsu bitkiler (yonca, farklı çim tipleri, vs) ve belediye katı atıklarıdır [1].

2.2.1. Lignoselülozik Biyokütlenin Ön İşlemi

Lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasını sağlamak için ön işlemler uygulanmaktadır. Lignoselülozik bileşik bir selüloz ve lignin matrisinin hemiselüloz zinciri ile bağlanmasıyla oluşur. Ön işlem, selülozun kristalleşme derecesini düşürmek ve enzimatik parçalanma için en uygun yapı olan amorf selüloz miktarını artırmak için yapılmaktadır. Buna ilaveten hemiselülozun büyük bir kısmı hidrolize olmalı ve lignin açığa çıkmalı hatta parçalanmalıdır [1].

Selüloz hidrolizinde lignoselülozik materyalin gözenekliliği büyük önem taşır. Ön işlem yapılmadığında selüloz hidroliz verimi teorik olarak %20'nin altındayken, ön işlemden sonra bu verimin % 90'ı geçtiği rapor edilmiştir [1]. Sonuç olarak ön işlemin amacı lignin ve hemiselülozun giderimi, kristal yapıdaki selüloz miktarının azaltılması ve gözenekliliğin artırılmasıdır.

Ön işlem ya şekerlerin oluşumunu sağlamalıdır ya da bir sonraki hidroliz ve fermantasyon prosesleri için inhibitörlerin oluşumunu engelleyerek başarılı bir enzimatik hidroliz ile şeker oluşumu için zemin hazırlamalıdır. Lignoselülozik materyallerin ön işlemi için kullanılan yöntemler Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

2.2.1.1. Fiziksel metodlar

Parçalama ve öğütme gibi fiziksel yöntemlerle atık materyallerin kristal selüloz miktarı azaltılabilmektedir. Bu işlemler selüloz enzimlerinin biyokütle yüzeyindeki etkinliğini artırarak selüloz dönüşümünü artırmaktadır. Fiziksel ön işlemlerin enerji gereksinimi lignoselülozik materyal özelliklerine ve elde edilecek partikül büyüklüğüne göre değişmektedir. Mekanik ön işlem yöntemleri enzim ile selüloz etkileşimini artırmalarına rağmen yüksek enerji ve yatırım maliyetinden dolayı tercih edilmemektedir [13]. Selüloz yüksek sıcaklıklarda hızla parçalandığı

için lignoselülozik biyokütlenin ön işleme için piroliz yöntemi de kullanılabilir [1].

Ultrasonik uygulama

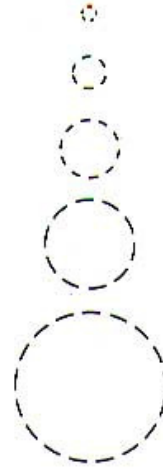
Ultrasonik uygulama sıvı içerisinde oluşturulan yüksek frekansta (25 kHz - 170 kHz) milyonlarca mikroskobik hava kabarcığının (kavitasyon) lignoselülozik maddenin yüzeyine çarparak patlaması sayesinde kimyasal bağlar üzerine etki etmesi esasına dayanmaktadır [14]. Şekil 2.3.'de ultrasonik kavitasyon kabarcığı ve normal hava kabarcığı verilmiştir.

Ultrasonik Kavitasyon Kabarcığı:



Negatif Basınç Yüklü, Yüksek Enerjili Kabarcık

Normal Hava Kabarcığı:



Pozitif Basınç Yüklü, Düşük Enerjili Kabarcık

Şekil 2.3. Ultrasonik kavitasyon kabarcığı ve normal hava kabarcığı.

Ultrasonik uygulamanın fiziksel etkileri; kabarcık oluşumu (yeterince büyük şiddetli ultrases dalgaları sıvılarda kabarcıklaşma yaratır. Bu yol ile sıvı içinde bulunan katı cisimciklerin ve bakterilerin parçalanması sağlanır) ve ısı etkisi (Farklı ortamlarda ve farklı ultrases dalgaları ile yapılan deneyler, ses titreşim enerjisinin ısı enerjisine dönüştüğünü ve ortamın ısındığını göstermiştir) iken kimyasal etkileri ise;

reaksiyonun hızlanması, oksitlenme, bileşim bozulması, kristallenme, kaynama sıcaklığı değişmesi, molekül zincirlerinin parçalanması olarak belirtilmiştir [14].

2.2.1.2. Fiziko-kimyasal metodlar

Fiziko-kimyasal metodlar fiziksel yöntemlerden daha etkilidir. Fiziko-kimyasal metodlar arasında en çok kullanılan yöntem buhar uygulamasıdır. Bu proseste uygulanan basınçlı buhar hemiselüloz ve ligninin bir kısmının çözünebilir oligomerlere dönüşümünü için otohroliz reaksiyonunu sağlamaktadır.

Bu prosesi etkileyen faktörler reaksiyon süresi, sıcaklık, partikül boyutu ve nem içeriğidir. Proses ekonomisi açısından bazı durumlarda (örneğin otsu atıklar) çok küçük partiküllerin kullanımı uygun değildir [15]. Ayrıca bu yöntem ekonomik açıdan sert kereste (kavak, meşe, huş ağacı, akçaağaç) ve zirai atıklar için uygun olmasına rağmen yumuşak kereste (sedir, çam vs) için uygun bir yöntem değildir.

Yaygın kullanılan ön işlem yöntemlerden bir diğeri ise sıvı sıcak su veya termo-hidroliz yöntemidir. Laser ve ark., optimum şartlarda bu yöntemin seyreltik asit ön işleme kadar etkili olduğunu ve bu işlemde nötralize edilmesi gereken asidik bir atık meydana gelmediği için avantajlı olduğunu belirtmişlerdir [16]. Aynı zamanda bu teknoloji ile pentozların geri kazanım hızı artmakta ve inhibitör oluşumu gözlenmemektedir. Ancak bu yöntemde ham madde yüklemesi buhar uygulamasına göre % 50 daha azdır [1].

Diğer fiziko-kimyasal yöntemler ise amonyak uygulaması (Ammonia Fiber Explosion-AFEX) ve CO₂ uygulamalarıdır. Bu yöntemlerin buhar uygulama yöntemine benzer olmasına rağmen verimlerinin düşük olduğu belirtilmiştir [17].

Çizelge 2.1. Lignoselülozik materyallerden etanol üretimi için ön işlem metodları.

Yöntemler	Prosedür/Ajanlar	Ön İşlem Uygulanmış Materyal Örnekleri	Kaynak
Fiziksel Mekanik Parçalama	Parçalama, öğütme	Odun, orman atıkları (kereste, saman), mısır koçanı, yonca, şeker kamışı sapı.	[17]
<i>Fiziko-kimyasal</i> Pirroliz	T>300 °C, ardından soğutma ve yoğunlaştırma	Odun, atık pamuk ve mısır koçanı	[17]
Buhar Uygulama	160-290 °C'de doymuş buharda 0,69-4,85 MPa 1 kaç dk bekletme ve ardından atmosfer basıncına dönüşüm.	Kavak, ökaliptüs ve yumuşak kereste, mısır sapı, buğday kepeği, pirinç kepeği, arpa kepeği, tatlı süpürge darısı, zeytin çekirdeği, çimen, yonca.	[18]
Sıvı Sıcak Su	Basıncılı sıcak su, Basınç 5 MPa'ın üzerinde, T=170-230 °C, 1-46 dk; katı yüklemesi % 20'den az.	Mısır koçanı, zeytin posası, şeker kamışı posası, yonca lifleri	[19]
Amonyak Uygulaması (AFEX)	1-2 kgNH ₃ /kg kuru biyokütle, 90 °C, 30 dk, p=1,12-1,36 MPa.	Kavak talaşı, buğday kepeği, pirinç kabuğu, mısır koçanı, yonca, çimen.	[17]
CO ₂ Uygulaması	4 kg CO ₂ /kg lif p=5,62 MPa	Şeker kamışı posası, yonca, geri kazanım kağıdı	[17]

Çizelge 2.1. (Devam) Lignoselülozik materyallerden etanol üretimi için ön işlem metodları.

<i>Kimyasal</i>			
Ozonla Parçalama	O ₃ , oda sıcaklığı ve basıncı	Kavak talaşı, çam, şeker kamışı posası, buğday kepeği, pamuk, saman, yer fıstığı	[17]
Seyreltik asit ile hidroliz	% 0,75-5 H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ , p~1 MPa, T=120-200 °C	Kavak, şeker kamışı posası, mısır koçanı, çavdar kepeği, pirinç kabuğu, çimen	[20]
Konsantre asit ile hidroliz	% 10-30 H ₂ SO ₄ , T=120-190 °C, 1:1,6 katı:sıvı oranı, % 21-60 per asetik asit, silo tipi sistem	Kavak talaşı, şeker kamışı posası Sert kereste, şeker kamışı posası, mısır koçanı, düşük lignin içerikli kepek (%10-18), şeker kamışı yaprakları.	[20]
Alkalilerle hidroliz	Seyreltik NaOH, 24 saat, 60 °C; Ca(OH) ₂ , 4 saat, 120 °C; Daha düşük sıcaklıklarda (35 °C) H ₂ O ₂ (% 0,5-2,15 v/v) ilavesi ile etkisi artırılabilir.	Şeker kamışı posası,	[1]
Oksidatif Lignin Giderimi	Peroksidaz ve %2 H ₂ O ₂ 20 °C, 8 saat	Mısır koçanı, buğday kepeği,	[20,21]
Islak Oksidasyon	1-2 MPa O ₂ basıncı, 195 °C, 15 dk; su ve az miktarda Na ₂ CO ₃ yada H ₂ SO ₄ ilavesi	Mısır koçanı, buğday kepeği,	[20,21]
Organik çözücülerin kullanımı	Metanol, etanol, aseton, etilen glikol, tri etilen glikol ya da bunların % 1 H ₂ SO ₄ veya HCl ile kar.; 185-198 °C, 30-60 dk, pH 2,0-3,4.	Kavak, karışık yumuşak kereste (ladın, çam vs)	[17,22]

Çizelge 2.1. (Devam) Lignoselülozik materyallerden etanol üretimi için ön işlem metodları.

<i>Biyolojik</i>			
Fungal ön işlem	Kahverengi, beyaz ve yumuşak çürükçül funguslar. Biyokütlenin katı faz fermentasyonu ile selüloz ve hemiselüloz üretimi	Mısır koçanı, buğday kepeği	[17]
Biyo-organik çözücüler	2-8 hafta C. <i>ubvermispora</i> üretimini sonucu oluşan eden etanol ile parçanma (140-200 °C, 2 saat)	Kayın ağacı.	[23]

2.2.1.3. Kimyasal metodlar

Ozon, asitler, alkaliler, peroksit ve organik çözücüler gibi farklı kimyasal maddelerin kullanıldığı ön işlem yöntemidir. H₂SO₄ ve HCl gibi inorganik asitlerin kullanımı daha yaygındır. Seyreltik sülfürik asit ile yüksek hızlarda selüloz hidrolizi sağlanabilmektedir. Ancak bu yöntemin maliyeti buhar ve amonyak uygulamasından daha yüksektir [17]. Seyreltik asitle ön işlem iki basamaklı bir yol ile de tamamlanabilir. İlk basamak furan bileşikleri ve karboksilik asit oluşumunun engellenmesini sağlayan ve 140 °C'de 15 dk gerçekleştirilen hemiselüloz depolimerizasyonudur. İkinci basamak ise 190 °C'de 10 dk gerçekleştirilen selülozun enzimatik hidrolize hazırlanmasıdır [24].

Ön işlem uygulamalarında konsantre asit de kullanılmaktadır. Selüloz dönüşümünün % 21 asit derişimiyle 120 saatte; % 60 asit derişiminde ise 24 saate % 93,1'e ulaştığı belirtilmiştir [1]. Bu yöntem düşük enerji gerektirir ve oda sıcaklığında uygulanmaktadır.

Alkali ön işlemden biyokütleyle seyreltik bazlar eklenerek, şişmeye bağlı iç yüzey alanının artması, polimerleşme ve kristalleşme derecesinin azalması, lignin ve diğer polimerler arasındaki bağların kırılması ve ligninin parçalanmasını sağlamaktadır. Bu yöntemin etkinliği biyokütlenin lignin içeriğine bağlıdır [17]. Genel olarak NaOH gibi bazların yada etanol ve metanol gibi organik çözücülerin kullanılması lignin çözünmesini sağlamaktadır. Ancak bu maddeler pahalı olduğundan bu yöntem büyük ölçekli sistemlerde uygulanamamaktadır.

Fenton oksidasyonu

Fenton oksidasyon prosesi Fe^{2+} ve H_2O_2 karışımı varlığında gerçekleştirilen bir seri oksidasyon ve pıhtılaştırma-yumaklaştırma uygulamasıdır. Oksidasyon uygulamalarında en güçlü oksidanlardan biri olan hidroksil radikali bu proseste üretilip kullanılmaktadır [25].

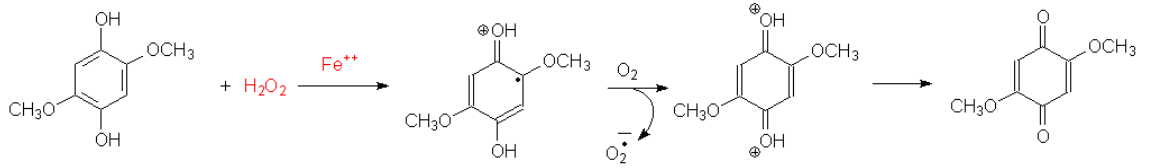
Çoğu metal katalitik etki ile oksidasyon olayını hızlandırma ve verimli kılma özelliğine sahiptir. Demir iyonunun varlığında hidrojen peroksit oksidantı, ortama hidroksil radikalleri (*OH) vermektedir. Bu radikal, flor gazından sonra gelen en kuvvetli oksitleyici özelliği taşımaktadır. Sucul ortamda hidroksil radikali mevcut olmasıyla meydana gelen fenton reaksiyonu, genelde suda bulunabilen demir iyonlarının katalitik etkisi ile oluşmaktadır [26]. Fenton reaksiyonunda *OH oluşumu aşağıda gösterilmiştir [26].



Fenton reaksiyonu elektron alışverişine dayalı bir redoks tepkimesidir. Etkinliği ise meydana geldiği ortamda radikallerin oluşmasıyla ortaya çıkar. Çok aktif yapılara sahip olan kimyasal radikaller en hızlı reaksiyona verirler. Fenton uygulamasında hidroksil radikallerinin doğrudan organik maddelerle tepkime vermesi istenmektedir [27].

Fenton reaksiyonunu etkileyen faktörler arasında; Fe^{+2} / H_2O_2 oranı, sıcaklık, pH, reaksiyon süresi, sayılabilir.

Hidroksil (OH^-) kaynağı olarak H_2O_2 konsantrasyonu da ortam kirlilik yüküne paralel olarak oksidasyonu gerçekleştirebilecek seviyede olmalıdır. Sıcaklık ve pH'ın yüksek olması H_2O_2 'nin bozunmasını hızlandırdığı gibi yüksek pH değeri $Fe(OH)_3$ oluşmasına neden olarak katalitik etkiyi ortadan kaldırır. Oksidasyon süresi ise organik yapıların direncine bağlı olarak dakikalar periyodundan günlerle ifade edilen periyotlara uzayabilmektedir. Lignoselülozik bir yapının fenton oksidasyonuna tabi tutulması ile indirgen şeker oluşumu Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Lignoselülozik bir yapının fenton oksidasyonu.

2.2.1.4. Biyolojik yöntemler

Biyolojik ön işlemler ılımlı çevre koşullarında uygulandığından enerji ihtiyacı düşüktür. Ancak bu proseslerin birçoğunun yavaş oluşu endüstriyel ölçekte uygulanmasını sınırlamaktadır. Birçok beyaz çürükçül fungus lignini parçalayabildiğinden bu canlılar ligninaz üretimi ve lignoselüloz parçalanmasında kullanılmaktadır. Lignin parçalayan enzimleri üreten başlıca mikroorganizmaların ve enzim üretimi için uygulanan fermantasyon tipininin sıvı faz ve katı faz fermantasyon olduğu rapor edilmiştir [1].

Biyokütle ön işlemleri ve hidrolizi sırasında karşılaşılan başlıca sorunlardan biri biyokütlelerin lignin ve hemiselüloz içeriklerindeki farklılıklardır. Bu farklılık, biyokütlenin elde edildiği bitki tipine, ekin yaşına ve hasat etme yöntemine bağlı olmaktadır. Buna bağlı olarak aynı ön işlem yöntemi farklı hammaddelere uygulanmamaktadır [1].

Lignoselülozik maddenin biyolojik ön işleme, güvenli ve çevre dostudur. Bu cazip yönü nedeniyle ilgi görmektedir [28 – 31]. Biyolojik ön işlemede beyaz çürükçül funguslar en umut verici mikroorganizmalardır çünkü onların lignini parçalayabilme yetenekleri vardır.

Son yıllarda çeşitli beyaz çürükçül fungus türleri ile ön işlem çalışmalarının gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Bazı beyaz çürükçül funguslar ile buğday sapının enzimatik hidrolizinin gerçekleştirildiği bildirilmiştir. *Pleurotus florida* ile yapılan çalışmada 60 gün sonunda selülozun %30'unun glukoza çevrildiği rapor edilmiştir [32]. Hattaka tarafından yapılan çalışmada [33], 19 farklı beyaz çürükçül fungus türü ile çalışılmış ve 35 günlük çalışma sonunda *Pleurotus ostreatus* ile maksimum verim elde edildiği ve buğday sapındaki selülozun % 35'nin glukoza çevrildiğini rapor edilmiştir. *Coriolus versicolor* kullanılarak bambu ile yapılan ön işlemede % 37 oranında sakkarifikasyon gerçekleştiği Zhang ve ark. tarafından bildirilmiştir [31].

Bu makaleler göstermektedir ki biyolojik ön işlemler ile önemli ölçüde lignoselüloz çevrimi gerçekleşmektedir. Ancak düşük verim, karbonhidrat kaybı ve uzun bekleme zamanı fungal ön işlemlerin en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca yeni stratejilerin geliştirilmesi ve kullanılması ile bu problemlerin üzerinden gelinebileceği düşünülmektedir. Örneğin ultrasonik uygulama ile lignoselülozik maddelerden lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılması mümkün olabilmektedir [34, 35]. Bu yöntemde hammaddelerin sıvı çözeltileri oluşturularak ultrasonik uygulama gerçekleştirildiğinde hem yüzeylerde erozyon hem de tanecik yüzey alanının küçülmesi gerçekleşmektedir [36]. Bir başka çalışmada ise H₂O₂ kullanılarak selülozun deliginfikasyonu çalışılmıştır. Buğday sapı, meşe ve köknar ile yapılan çalışmada artan H₂O₂ derişimi ile selülozun çevrim veriminde artış saptandığı rapor edilmiştir [37].

2.2.1.5. Selülazlar

Selülazlar, selülozu glukoza parçalayabilme kapasitesindeki hidrolitik enzim grubudurlar. Mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar (memeliler hariç) tarafından

üretilirler ve genellikle bir selüloz sistemi olarak birden fazla farklı enzimden oluşurlar. Selüloz sistemi bileşenleri, başlangıçta katalitik etki şekillerine göre sınıflandırılırken, günümüzde sınıflandırma yapısal özellikler temeli dikkate alınarak yapılmaktadır. Üç ana enzimatik aktivite tipi söz konusudur. Bunlar:

a) Endoglukanazlar (endo-1,4- β -glucanases, yada 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.4).

b) Ekzoglukanazlar (Sellodextrinazlar, 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases) (EC 3.2.1.74) ve sellobiyohidrolazlar (exo-1,4- β -glucanases, ya da 1,4- β -Dglucan cellobiohydrolases, EC 3.2.1.91).

c) Sellobiyazlar (b-glucosidases, yada β -D-glucoside glucohydrolases, EC 3.2.1.21).

Endoglukanazlar, selülozu meydana getiren polisakkarit zincirinin iç bölgelerinde rastgele hidroliz yaparlar ve değişik uzunlukta oligosakkaritler meydana getirirler.

Ekzoglukanazlar ise selüloz zincirinin indirgenen ve indirgenmeyen ucundan itibaren sırasal olarak hidroliz yaparlar ve son ürün olarak glukoz (glukanohidrolaz) ya da sellobioz (sellobiohidrolaz) açığa çıkarırlar. Ekzoglukanazlar aynı zamanda mikrokristal selülozu da hidrolize etmektedirler. β -Glukozidazlar sellodekstrin ve sellobiozu glukozu parçalayan enzimlerdir. Selülozların çoğunluğunun genel özelliği, hem katalitik hemde karbonhidrat bağlayan yapıları içeren modüler bir şekilde olmalarıdır. Selüloz bağlayan modül (CBM: Cellulose Binding Module) çözünmeyen selülozda muhtemelen katalitik bölgeyi substrata yaklaştırıp selülozun hidrolizini kolaylaştırmaktadır. CBM özellikle ekzoglukanazların hidroliz işlevinin başlangıcında önemlidir. Selüloz sistemleri, her bir enzimin kendi bireysel aktivitelerinin toplamından daha yüksek bir sinerjik aktiviteye sahiptir. Sinerjik aktivitenin 4 formu bildirilmiştir [38]. Bunlar:

a) Endoglukanazlar ve ekzoglukanazların arasındaki endo-ekzo sinerji.

b) Selüloz zincirinin indirgenen ve indirgenemeyen uçlarından ekzoglukanaz uygulamaları arasındaki ekzo-ekzo sinerji.

c) İlk iki enzimin son ürünü olarak sellobiozu (ve Sellodektrin) alan β -glukozidaz ve ekzoglukanazların arasındaki sinerji.

d) Katalitik domain ve CBM arasındaki intra-moleküler sinerji. Selüloz sistemleri sadece üç enzimi de temsil eden bir birliktelik değil, daha çok selülozun etkin hidrolizi için koordinasyon sunan bir etkiye sahiptirler [38].

Mikroorganizmalar selülozun tam hidrolizi için, doğal olarak lignin ve hemiselüloz polimeri içine gömülmüş substratlar için farklı adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Selülitik filamentöz mantarlar ve aktinomisetlerin, lif uzantıları boyunca selülozik substratlara nüfuz etme kabiliyetleri vardır. Serbest selülazların (CBM'li ya da CBM'siz) üretimi bu şartlarda selülozun etkin hidrolizi için yeterli olmaktadır. Bu sistemlerdeki enzimler molekül ağırlık bakımından büyük stabil kompleksler oluşturmazlar. Bu yüzden kompleks olmayan (Non-Complex) sistem olarak adlandırılır. Buna rağmen, anaerobik bakterilerin selülozik materyal içine etkin olarak nüfuz olma kabiliyetleri yoktur. Bu yüzden selülozun parçalanabilmesi için diğer mikroorganizmalar selülaz sentezi yapabilmek için ATP'nin sınırlı olması nedeniyle alternatif mekanizma bulmak zorundadırlar. Bu durum mikroorganizmaların selülozom (cellulosomes) denen kompleks selülaz sistemlerini geliştirmelerini zorunlu hale getirmiştir.

Kompleks olmayan selülaz sistemleri

Son 50 yılın en fazla incelenen konusu *Tricoderma reesei*' nin selülaz sistemi olmuştur. *T.reesei* en az 2 ekzoglukanaz (CBH-I ve II), 5 endoglukanaz (EGI, II,III, IV, ve V), ve 2 β -glukozidaz (BGL-I ve II) üretir.

İki ekzoglukanazın (sellobiohidrolaz) varlığı, mikrokristal selüloz zincirinin indirgenen (CBH-I) ve indirgenmeyen (CBH-II) uçları için *T.reesei*' nin gösterdiği özel tercihe bağlanmıştır. Bu düşünce iki enzim arasında gözlenen ekzo-ekzo sinerji ile de desteklenmiştir. Sellobiohidrolaz aktivitesi mikrokristal selülozun hidrolizi için

gereklidir. Sellobiohidrolazların her ikisi de selüloz polimerizasyonunu (zincir uzunluğu) düşürmede çok yavaşlardır. Endoglukanazların amorföz bölgelerden selüloz zincirini keserek zincirin kısaltılmasından birincil olarak sorumlu olduğu düşünülmektedir. Böylece CBH ların etkisine açık yeni selüloz zinciri oluşturulmaktadır. Henüz *T.reesei* de 5 endoglukanaz varlığının nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Aynı zamanda endoglukanazlar arasındaki sinerji de gösterilememiştir. Buna rağmen bazı endoglukanazların (EG-I) ksilanaz aktiviteleri gibi geniş substrat özgülüğü de vardır.

CBM nin varlığı bir endoglukanaz aktivitesi ya da endo-ekzo sinerjisi için gerekli değildir. CBH-I ve CBH-II' nin temel ürünü olan sellobiozlar sellobiohidrolazların ve endoglukanazların aktivitesini de inhibe ederler.

T.reesei nin en az iki β -glukozidaz enzimi üretmesi sellobioz ve kısa oligosakkaritlerin hidrolizini kolaylaştırır. Hem BGL-I ve hem de BGL-II' nin büyük çoğunluğu hücre duvarına bağlı olarak kalsalar da, süpernatantlardan da izole edilmişlerdir. β -glukozidazın mantar hücre duvarlarına yakın bulunması, selüloz hidrolizinden açığa çıkan glukozun, çevreye dağılarak kaybını azaltmaktadır [38].

Kompleks selülaz sistemleri (selülozom)

Selülozomlar, selüloz, hemiselüloz ve pektini parçalayabilen ekstrasellüler enzim kompleksleridir. Selülozom sistemlerine sahip mikroorganizmalar anaerobik ortamlarda ürerler. Selülozomların kompozisyonları türden türe değişkenlik göstermesine rağmen, *Clostridium* ve ruminant bakterilerden *Ruminococcus* türlerinde benzerlik gösterirler. Selülozomların yapısı incelendiği zaman enzimatik özelliği olmayan, scaffoldin adı verilen temel bir protein ile buna bağlanmış enzimatik alt ünitelerden oluştuğu görülür. Scaffoldin (Scaffoldin) proteini CbpA, CipA ya da CipC denen proteinlerden oluşur ve bunlarla kompleks oluşturan bir çok selülozomal enzimler vardır. Nonenzimatik protein (scaffoldin) bir çok kohez (cohesin) denen bölgeyi ve selüloz bağlayan bölgeleri (CBM yada CBD, Cellulose Binding Domain) içerir. Bunlardan başka, hidrofilik bölge, dockerin II bölgesi,

enzim kodlayan bölge ve görevi bilinmeyen tanımlanmamış bölgeler mevcuttur. Kohezin bölgeleri, skafoldin proteinlerde her zaman mevcut olup, selülozomal enzimlerin dockerin bölgeleri için bağlanma noktalarına sahiptir. Kohezin-dockerin birlikteliği selülozomun bir araya gelmesinde anahtar rol oynar. CBM selülozomu, selülazı substrata sıkıca bağlamakla görevlidir. Kristal selüloza amorf selülozdan daha etkin bağlanma özelliği göstermektedir. Ayrıca CBM selülozomu, omurgası selülozunkine benzeyen kitine de bağlanır.

CBM selülozomları farklılık gösterebilirler ve aminoasit dizilerine göre birçok familyaya ayrılabilirler. Aynı zamanda, CBM selülozomlar sadece skafoldin proteinlerle bulunmaz daha önce de bahsedildiği gibi selülozomal ya da selülozomal olmayan selülazlarla da bulunabilirler.

Selülazların bazı uygulama alanları

Ticari olarak kullanılan enzimlerin içerisinde selülazlar, proteazlardan ve amilazlardan sonra endüstriyel olarak üçüncü önemli biyoteknolojik enzimlerdir. Selülozu hidrolizde eden enzimler geniş çapta mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Böyle enzimler çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Ticari olarak en çok kullanılan selülaz *Trichoderma sp.* tarafından üretilmektedir. Ayrıca selülazlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir [38].

Selülozik materyallerin enzimatik hidrolizi üzerine gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemler günümüzde oldukça artmıştır. Yenilenemeyen kaynakların gittikçe azalması; selülozu gıda, enerji, yakıt ve diğer ürünler için temel ham materyal haline getirmiştir [38].

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok

yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır [39].

Selülozların ana uygulama alanları gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyo yakıt, kimya, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirlilik giderimidir [39] Bazı uygulamalar ayrıntılı olarak incelendiğinde çok farklı kullanım alanlarının olduğu görülür.

Gıda endüstrisinde selülozlar

- a) Tohumlardan yağ ve meyve suyu ekstraksiyonunda,
- b) Meyve sularının berraklaştırılmasında,
- c) Tahılların homojen olarak su çekmesini sağlamak ve yeterince ıslanmasının artırılmasında,
- d) Soya sosu gibi fermente soya gıdaların üretiminde soyanın dış zarının uzaklaştırılmasında,
- e) Kokonat ve soya fasulyesinden protein izolasyonunda,
- f) Mısır ve tatlı patatesten nişasta üretiminde,
- g) Sindirimini artırmak amacı ile yosunlarının jelatinizasyonunda,
- h) Su yosunlarından agar ekstraksiyonunda,
- i) Gıda katkısı maddesi olarak kullanılan öğütülmüş lignoselülozik materyalin parçalanmasında,
- j) Selülozik atıklardan çözünür şeker, glukoz ve selooligosakkarit üretiminde,
- k) Bioetanol üretimi için substrat eldesinde,
- l) Kurutulmuş sebze ve çorba karışımlarının geri sulandırımının artırılmasında,
- m) Polisakkarit, protein, enzim ve tat verici maddelerin açığa çıkışını kolaylaştırmak amacıyla bitki hücre duvarlarının uzaklaştırılmalarında kullanılmaktadır [38].

n) Sıvı kazancını artırmak ve iyi bir renk elde etmek için alkol üretiminde kullanılmaktadır.

o) Zeytinyağlarının ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır [39].

p) Bira mayalanması ve şarap üretiminde kullanılmaktadır [38].

İçecek ve şarap endüstrisinde selülozlar

Rekombinant mayalardan elde edilen β -1,3 ve β -1,4 glukozazlar şaplarda aroma artışının sağlanması, biranın filtrasyonunun kolaylaştırılması ve düşük kalite arpada bulunan β -1,3 ve β -1,4 glukoz hidrolizinde kullanılmaktadırlar [38].

Hayvan yemi endüstrisinde selülozlar

a) Ruminant ve monogastrik hayvanların yemlerinde sindirilebilirliği artırmak amacı ile

b) Lignoselülozik materyallerin ön işlemden geçirilmesinde, hububatların kabuklarından arındırılmasında, ruminant ve monogastrik hayvanların selülozda yararlanmalarını artırmak için silaj yapımında kullanılırlar.

Tekstil endüstrisinde selülozlar

a) Kumaşlarda boyanın fazlasını almada (biostoning),

b) Bir çok yıkama sonunda pamuk kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde,

c) Pamuk yada pamuklu kumaşların yıkanması, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında kullanılır [38].

Kağıt endüstrisinde selülozlar

Selüloz enzimi kağıt endüstrisinde de kullanılmakta olup kağıt endüstrisi denilince; hammadde olan odun ve hurda kağıdın işlenmesinden, ağartılmasından, kağıdın yapımı ve atık suyun arıtılmasını da içine alan işlemler zinciri

kastedilmektedir. Selüloz enzimi de bu işlemler sırasında özellikle kağıdın ağartılması işleminde sıkça kullanılan bir enzimdir [38].

Enzimatik hidroliz, enerjinin idareli kullanılması ve toksik maddelerin veya aşındırıcı asitlerin kullanılmasına ihtiyaç bırakmamasından dolayı oldukça avantajlıdır. Bu nedenle selülozun, selüloz ile hidrolizi geniş ölçüde araştırılan bir konudur. Ön muamelenin ve selüloz üretiminin pahalı olması gibi ekonomik problemler ve hidroliz sırasında enzimin inaktif olması gibi nedenler selülozun, glukozu enzimatik olarak hidrolizi önünde engel oluşturmaktadır. Bu nedenle araştırmalar selüloz aktivitesini artırmak üzerine gerçekleştirilmektedir.

2.2.1.6. Lignoselülozik maddenin enzimatik hidrolizi

Lignoselülozik maddelerin enzimatik hidrolizinde en sık kullanılan enzimler selülozlardır. Çünkü lignoselülozik maddenin hidrolizinden elde edilecek ürün glukoz yada heksozlardır. Bu maddelerin oluşumu selülozun hidrolizinden geçmektedir.

Selüloz ile lignoselülozik maddelerin hidrolizinde tüm biyokimyasal olaylarda olduğu gibi ortam şartları büyük önem taşır. Bunlar öncelikle; pH ve sıcaklıktır. Ardından enzim derişimi, substrat derişimi, çalkalma hızı ve enzim inhibisyonuna neden olabilecek madde varlığı da önem taşımaktadır.

Hidroliz basamağının maliyetinde en önemli kısım enzim fiyatlarının düşürülmesi bir başka deyişle kullanılan enzimden maksimum verimin elde edilmesi ve bu şartlarda enzimin inaktif olana kadar tekrar tekrar kullanılmasıdır [40].

Lignoselülozik maddenin hidrolizinde selülozlar 1970'li yılların başlarından beri kullanılmaktadır ve bu amaçla en çok kullanılan selüloz ise *T. reesei*'den elde edilmektedir [41]. Ancak *T. reesei* selüloz sistemi beta-glukosidaz içermez ve bu durum selülozun glukozu çevriminde büyük verim kaybına neden olur. Bu engel son yıllarda *Aspergillus niger*'den alınan genlerin *T. reesei*'ye modifiye edilmesi ile

aşmıştır ve 7 FPU/mL den 60 FPU/mL'ye ulaşan selüloz aktiviteleri elde edilebilmiştir [42].

Enzim aktivitesi yüksek olsa dahi kullanılan substratın derişimi de önem taşır. Düşük substrat derişimlerinde yüksek glukoz çevrim verimi elde edilse de, miktar olarak elde edilen glukoz ise sistemi ekonomik kılmayabilir. Yüksek substrat yüklemelerinde ise homojen bir karışımın elde edilememesi gibi fiziksel problemler ortaya çıkabilmektedir [43].

Lignoselülozik maddenin enzimatik sakkarifikasyonunda, enzim ile muameleden önce ön işlem ya da işlemlere gerek olmaktadır. Bu durum sistem ekonomisini negatif yönde etkilemektedir ancak bu sayede ortamda var olan lignin yapısının bozulması ve kristal yapıdaki selülozun parçalaması sağlanmaktadır [44-46]. Tipik ön işlem çalışmaları bu tezin kapsamına da alınan asidik ön işlemler, ısı ön işlemler, alkali ön işlemler ve bunların kombinasyonlarıdır. Etkili bir ön işlem için, ücretlerin düşürülmesi, selüloz çözünürlüğünün artırılması, alt ve üst operasyon koşullarının kolaylaştırılması gibi çalışmalar halen devam etmektedir [45].

Şeker üretiminde sakkarifikasyon kritik bir adımdır. Lignoselülozik biyokütlenin porozitesini ortaya çıkaran selüloz kristalitesi, lignin ve hemiselüloz içeriği nedeniyle selülozun hidrolizi negatif yönde etkilenmektedir [47]. Ön işlem yöntemleri genellikle materyallerin porozitesi azaltmak üzerinedir. Buda lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılması ve kristal haldeki selülozun indirgenmesi ile gerçekleştirilmektedir [12].

Maa ve arkadaşları prinç kabuğunun sakkarifikasyonunda enzimatik uygulamadan önce mikro dalgaların kullanılması ile ön işlem uygulamışlardır. Enzimatik uygulamadan önce 24 dk, 680 W mikro dalga uygulama ile sakkarifikasyonun % 30,3 arttığını rapor etmişlerdir [49].

Gou ve arkadaşları biçilmiş çimler üzerinde, enzimatik ön işlemden önce seyreltik sülfürik asitin etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda sakkarifikasyon

veriminin 2 kat arttığı, laktik asit fermantasyonu yapıldığında şeker pancarında alınan verimden % 70 daha fazla verim alındığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar bu verim artışının asitle muamele sonunda çim üzerindeki spesifik yüzey alanı artışa bağlı olduğunu ve bu şekilde selüloz daha fazla substrat ile reaksiyona girebildiğini rapor etmişlerdir [50].

Bir başka çalışmada Disteller's isimli polimerik şeker üreten bir firmanın hammaddesi üzerinde enzimatik uygulamadan önce ıslak oksidasyon ve amonyaklı ıslak oksidasyon ön işlemleri uygulanmıştır. Çalışma sonucunda her iki ön işlem uygulamasında da verim artışı olduğu ve 24 saatlik enzimatik uygulama sonunda bu artışların sırası ile %70 ve %90'a ulaştığı rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar bu yöntem sonunda inhibitör oluşumunun gözlenmediğini ve sakarifikasyon işleminin ardından yapılacak olan etanol fermantasyonu ile teorik olarak %100 çevrimin gerçekleşeceğini bildirmişlerdir [51].

Martin ve arkadaşları gri çim den etanol üretimini yaptıkları çalışmalarında ilk olarak 195°C'de 10 dk ıslak oksidasyon uygulamışlardır. Araştırmacılar bu ön işlem ardından hapılan enzimatik hidroliz ile selüloz dönüşüm veriminin % 93,6 arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca ıslak oksidasyonda asit kullanmadıkları için ortamda fermantasyonu engelleyecek hiçbir maddenin oluşmadığını da bildirmişlerdir [52].

Zheng ve ark, karaya vurmuş deniz yosunları ile yaptıkları sakarifikasyon çalışmasında enzimatik uygulamadan önce seyreltik sülfürik asit (%1,4) ile 165 °C'de 8 dk ön işlem uygulamışlardır. Yalnızca enzimatik uygulama ile 22,5 mg/mL glukoz elde ederken asitik ön işlem uygulaması sonucunda bu değer % 60 artarak 36 mg/mL'ye ulaştığını rapor etmişlerdir [53].

2.3. ÖN İŞLEM GÖRMÜŞ LİGNOSELÜLOZİK MATERYALİN DETOKSİFİKASYONU

Lignoselülozik biyokütlenin ön işlemi ve hidrolizi sırasında fermente edilebilir şekerlerin yanı sıra bir sonraki fermantasyon adımını inhibe edebilecek bileşikler de meydana gelmektedir. İnhibe edici bileşikler, hemiselülozu meydana getiren organik ve şeker asitlerinin (formik, glukuronik galaktronik asit) ve suda çözülebilir fenol türevlerinin hidrolizi ile meydana gelmektedir. İnhibitörler çözülmüş şekerlerin (furfural) ve ligninin (sinamaldehit, para hidroksibenzenaldehit, syringaldehidat) degradasyonu sırasında da oluşabilmektedirler. Ayrıca korozif maddeler (metal iyonları) de inhibisyona neden olmaktadır [54]. Bu nedenle uygulanacak ön işlem ve hidroliz işlemlerinin tipine göre fermantasyondan önce detoksifikasyona gerek duyulur. Detoksifikasyon işlemleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollarla yapılabilmektedir. Detoksifikasyon metodlarından bazıları Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Alkali uygulama en çok tercih edilen detoksifikasyon metodudur. Bu metotla özellikle asidik ön işlemler sırasında oluşan furaldehitler ve fenolik bileşikler uzaklaştırılabilmektedir. [55]. CaOH veya amonyakla detoksifikasyon, NaOH yada KOH ile detoksifikasyondan daha iyi sonuç vermiştir. Ancak bu farklılığın sebebi anlaşılammıştır.

Diğer detoksifikasyon yöntemleri ise;

Kireç ile nötralizasyon ardından aktif karbon ilavesi ve asetik asit giderimi için filtrasyon,

Moleküler eleklerle asetik asit, furfural ve çözünebilir ligninin kısmi giderimi,

Uçucu inhibitörlerin buharlaştırılarak uzaklaştırılması,

Nötralizasyondan sonra aktif karbon, diatomite, bentonit ve zeolit ile adsorpsiyon [56].

Piroliz ile ön işlem yapılmış biyokütleden kaynaklanan seyreltik çözeltilerin detoksifikasyon için alternatif bir biyolojik yöntem de önerilmiştir [57]. Bu yöntemde plastik bir desteğe tutuklanmış karışık aerobik bakteri kültürü kullanılmıştır. Bu şekilde biyofilm içerisindeki hücreler biyokütle ön işlemi sırasında açığa çıkan toksik maddelere daha dirençli olmaktadır.

Çizelge 2.2. Bazı detoksifikasyon yöntemleri

Yöntem	Prosedür/Ajanlar	Kaynak
Fiziksel Yöntemler		
Evaporasyon	Evaporasyon, uçucu ve uçucu olmayan fraksiyonların ayrılması ve uçucu olmayan fraksiyonların seyreltilmesi	[54]
Ekstraksiyon	Organik çözücüler, 3:1 organik faz:sulu faz hacimsel oranı, Süper kritik çözücüler, 20 MPa, 40 °C ardından basınç azaltılması.	[54]
Adsorpsiyon	Aktif karbon, 0,05-0,20 g/g glukoz Kehribartaşı (hidrofobik polimerik adsorbent), % 8 (w/v), 1,5 saat, 25 °C, etanol ile rejenerasyon ve ardından kireç ile nötralizasyon.	[1]
Kimyasal Yöntemler		
Nötralizasyon	Ca(OH) ₂ yada CaO, pH=6, ardından membran filtrasyonu yada adsorpsiyon.	[56]
Alkalilerle detoks.	Ca(OH) ₂ , pH 9,0-10,5, ardından H ₂ SO ₄ yada HCl ile pH'nın 5,5-6,5'a ayarlanması.	[58]
İyon değişimi	Zayıf baz reçinesi (Amberlyst A20), NH ₃ ile rejenerasyon, Poli(4-vinil piridin)	[17]
Biyolojik Yöntemler		
Enzimatik detoks.	<i>Trametes vericolor</i> 'dan lakkaz ve lignin peroksidaz: 30 °C, 12 saat.	[1]
Mikrobiyal detoks.	<i>Trichoderma reesei</i> , Plastik desteğe tutuklanmış <i>Pseudomonas putida</i> ve <i>Streptomyces setonii</i> karışık kültürü.	[57]

Oliva ve ark., kavak ağacına buhar uygulanarak yapılan ön işlem sırasında oluşan bileşiklerin termofil bir maya türü olan *Kluyveromyces marxianus*'a inhibisyon etkisini çalışmışlardır. Çalışma sonuçları mikrobiyal büyümenin etanol üretiminden daha fazla etkilendiği ve bu mikroorganizmanın aromatik bileşiklere karşı önemli bir direnç gösterdiği rapor edilmiştir [59]. İnhibitörlere karşı dirençli türler oluşturmak üzere genetik modifikasyon çalışmaları devam etmektedir. Ön işlem ve hidroliz aşamalarında inhibitör oluşumunu minimuma indiren yöntemlerin seçilmesinin gerektiğini ve bunun en etkili detoksifikasyon metodu olduğunu belirtilmiştir [1].

2.4. FERMANTASYON TEKNOLOJİSİ

Başlangıcı milattan 2500 yıl öncelerine dayanan, Mısırlıların bira yapımında kullandıkları, fermantasyonun ilk adımları, 1789 yılında Lavosier tarafından atılmış, 1815 yılında Gay Lusac tarafından formüle edilmiştir.



Dums ve Bullay ise daha sonra bu Gay Lusac formülünü;



olarak düzenlemişlerdir [60].

Fermantasyon 1839 yılında da Alman kimyager Liebig tarafından mekanik bir parçalanma olarak tanımlanmıştır. Pasteur ise 1857 yılında fermantasyonun maya tarafından gerçekleştirilen fizyolojik ve biyolojik bir olay olduğunu ispatlamıştır.

Günümüzde bu teknoloji ile antibiyotik, vitamin, amino ve nükleik asitler ve biyogaz, etanol gibi yakıtlar üretilmektedir. Bunların dışında atık suların mikrobiyolojik olarak arıtılması gibi işlemler de fermantasyon teknolojisinin başka uygulamalarındandır [60].

Tarım ülkesi olan Türkiye’de fermantasyon sektörü biyoendüstrimizin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. 20 yılı aşan süreden beri fermantasyon teknolojisi ile üretim yapan kuruluşlarımız vardır. Ancak, bilimsel araştırmaların eksik olması nedeniyle eğitim ve üretimde daha çok yabancı araştırmacıların bulgularından yararlanılmış, üretimde etkin olan kısımlar belirsiz kalmıştır.

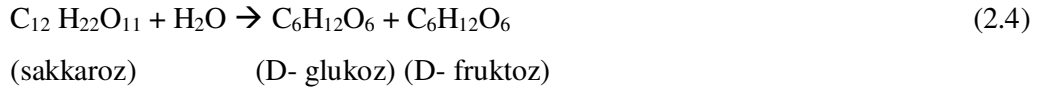
Çizelge 2.3. Fermantasyon teknolojisi ile üretilen maddeler [60].

Yiyecek ve İçecekler	Endüstriyel	Farmosötik	Vitaminler	Enzimler
Bira	Asetik asit	Basitrasin	Ergosterol	Amilaz
Ekmek	Aseton	Kandisisin	Riboflavin	Selülaz
Peynir	Aspartik asit	Nistatin	Vitamin A	Diestaz
Kakao	Tartarik asit	Mitomisin C	Vitamin B2	İntervaz
Kahve	Süksinik asit	Penisilin	Vitamin B12	Maltaz
Koji	İtokonik asit	Polimisin		Zimaz
Çay	Lizin	Tetrasiklin		
Sirke	Vanilin	Streptomisin		
Sarap	Fuzel yağı	Vankomisin		

2.4.1. Glikoliz

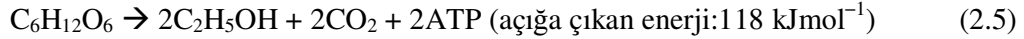
Canlılar yaşamlarını devam ettirebilmek için sürekli enerji elde etmek zorundadır. Enerjiyi de ancak besin maddelerini yakarak yani daha küçük moleküllere parçalayarak elde ederler. Canlıların besin maddelerini yakarak onlardan enerji elde etmelerine solunum denir. Bazı canlılar hücrelerinde bulunan yapılar sayesinde ortamda da oksijen varsa besinleri CO₂ ve H₂O’ya kadar yakabilirler. Oksijen kullanmayan canlılar ise glukoz molekülünü ancak pürivata kadar yakabilirler.

Pürivat molekülü henüz tam olarak yakılmadığından bağları arasında hala enerji vardır. Bu yüzden pürivata kadar yıkabilen canlılar yani oksijen kullanamayan canlılar 1 mol glukozdan daha az enerji elde ederler. Canlılar ister oksijenli ister oksijensiz solunum yapsın başlangıç reaksiyonları hücrenin stoplazmasında gerçekleşir ve hep aynıdır. Bu reaksiyon dizisine glikoliz denir. Maya hücreleri salgıladıkları invertaz enzimi yardımıyla ortamdaki sakkarozu D-glukoz ve D-fruktoza dönüştürürler.



2.4.2. Fermantasyon

Fermantasyon (mayalanma), karbonhidratların alkol ve asitlere dönüştürülmesidir. Fermantasyon işlemi pek çok farklı besin maddesinin üretiminde kullanılmaktadır. Yoğurt, boza, alkollü içkiler fermantasyon yoluyla üretilen pek çok besinden bazılarıdır. Sembolle eşitliği:



Hücre içine giren glukoz stoplazmada bir seri tepkimeye girerek pürivata dönüşür. Maya hücreleri oksijensiz solunum yapabildikleri için, pürivat kademesinden ancak biraz daha ileri bir parçalanmayı gerektirirler. Fermantasyonda son elektron alıcısı, oksijenin yerine hayvanlarda laktik asit, mayalarda etanol, bazı bakterilerde gliserol ya da sirke bakterilerinde asetik asittir. Maya hücrelerinde glikoz, dekarboksile (CO_2 çıkarılarak) edilerek asetaldehite dönüştürülür. Daha sonra asetaldehit etanole indirgenir. Gerekli enzimler olmadığı için hayvanlarda ve insanlarda asetaldehit ve etanol meydana gelmez. Bu oksijensiz solunuma ise Etanol Fermantasyonu denir [60].

2.4.3. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Birçok organik maddenin elde edilmesinde olduğu gibi etil alkolün elde edilmesinde de mayaların büyük önemi vardır. Diğer yöntemlerle elde edilmesi zor olan organik maddeler, mayalar kullanılarak fermantasyon yolu ile kolayca elde edilirler. Bu nedenle etil alkol üretimi yapan fabrikalarda maya üretim üniteleri de bulunmaktadır.

Fermantasyon teknolojisinde daha yüksek verim elde edilmesi, fermantasyon işleminin daha ekonomik olması ve çevre kirliliğine neden olmaması açısından fermantasyon için kullanılacak mikroorganizmaların belli özelliklere sahip olması gereklidir. Çok sayıda substratla kullanılabilme özelliğine sahip olması, kontaminasyondan arınmış olması, fermantasyon ortamından kolayca ayrılabilmesi, genetik değişikliğe dirençli olması, yüksek karbon-biyokütle dönüşümü sağlaması, geniş pH aralığında üreyebilmesi, son ürünün zehirleyici olmaması, yüksek oranda sindirilebilmesi, bitki, hayvan ve insanlar üzerinde patojen etkisinin olmaması gibi özelliklere sahip olmalıdır [60].

Alkolik fermantasyonda en büyük rolü üstlenen mayalar; tek hücreli, spor yaparak veya tomurcuklanarak çoğalan 8-10 µm büyüklüğünde bitkisel kökenli mikroskopik canlılardır. Mayalar doğada çok yaygındır. Toprakta özellikle de şeker ve karbonhidrat bakımından zengin olan besin maddelerinde bulunurlar. Üzüm ve meyve üzerinde yabani olarak yasarlar, meyvelerin sıkılması ile öz suya geçerler, uygun şartlarda ürerler, ısıtmakla (kaynatmak, pastörize etmek) ölürler. Tomurcuklanma ile çoğalmada, maya hücresinin uç tarafında bir şişkinlik meydana gelir. Bu şişkinlik giderek büyür ve bir tomurcuk şeklini alır. Uygun büyüklüğe gelince ana hücreden kopar. Bu hücre de aynı şekilde çoğalmaya devam eder. Maya hücrelerini morfolojik olarak ayırt etmek zor olmasına rağmen kural olarak genellikle yuvarlak veya eliptik bir şekil gösterir [60]. *Saccharomyces cerevisiae* yumurta şeklinde, tek hücreli, uzun çapı 0,01 mm olan bir mayadır. Azot ve tuzlara (P_2O_5 , SO_2 , K_2O , MgO) ihtiyacı vardır. Bu nedenle saf şeker çözeltilerinde fermantasyon başlayabilir fakat devam etmez.

2.5. BİYOETANOL

Biyoetanol (etil alkol, mısır, arpa, buğday alkolü, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ veya EtOH) birçok farklı biyolojik hammadde ve değişik teknolojilerle üretilen bir sıvı biyoyakıttır. Biyoetanol cazip bir alternatif yakıttır çünkü biyolojik kaynaklıdır ve bu nedenle yenilenebilir bir enerjidir. Ayrıca yüksek oksijen yüzdesi (% 35) nedeniyle yanmalı motorlarda egsoz gazında CO, NO_x ve partikül miktarında da azalma olmaktadır [61].

Biyoetanol yüksek oktan sayısı (107), yüksek yanma hızı ve benzine göre daha yüksek buharlaşma sıcaklığına sahiptir. Bu özellikler sayesinde yüksek sıkıştırma oranı, kısa yanma süresi ve motorun daha az ısınmasına neden olur. Biyoetanolün bu teorik avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da mevcuttur. Örneğin benzine göre daha düşük enerji içeriği (% 66 daha az), korozif etkisi, düşük alev boyutu, düşük buhar basıncı (soğuk havalarda motorun çalışma problemi) ve ekosisteme olan toksik etkisidir [61]. Biyoetanolün bazı yakıt özellikleri Çizelge 2.4.'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Biyoetanolün yakıt özellikleri [61].

Yakıt Özelliği	Etanol
Setan sayısı	8
Oktan sayısı	107
Kendi kendine alev alma sıcaklığı (K)	606
Potansiyel buharlaşma ısı (MJ/kg)	0,91
Alt ısı değeri (MJ/kg)	26,7

Etanol sıvı biyo-yakıtlar arasında benzine ve diğer yakıtlara en fazla karıştırılarak kullanılan biyo-yakıttır. Bazı ülkeler benzine etanol ilave etmeye ya önceden beri devam etmektedir ya da yeni yeni başlamaktadır (Çizelge 2.5.). Dünyada biyoetanol üretimine bakıldığında dikkate değer biçimde artış görülmektedir. Çünkü bazı ülkeler ithal ettikleri petrol miktarını azaltmak için yollar aramaktadır ya da tarımsal ekonomilerini artırmak istemekte veya hava kalitelerini iyileştirmek istemektedir [1].

Çizelge 2.5. Ülkelere göre etanolün yakıt olarak kullanımı

Ülke	Hammadde	Benzin içindeki etanol yüzdesi, % (v/v)
Brezilya	Şeker kamışı	24
ABD	Mısır	10
Kanada	Mısır, buğday, arpa	7,5-10
Kolombiya	Şeker kamışı	10
İsveç	Buğday	5
Hindistan	Şeker kamışı	5
Tayland	Manyok, şeker kamışı, pirinç	10

2007'de Dünyada etil alkol üretimi yaklaşık 51 milyar litreye ulaşmıştır. ABD ve Brezilya bir numaralı üretici ülkelerdir. Ortalama olarak üretilen etanolün % 73'ü yakıt olarak, % 17'si içeceklerde ve kalan % 10'u endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır [62].

Etanolün bir yakıt olarak kullanılabilmesi için suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. En eski yöntem, basitçe damıtmaktır, fakat bu yöntemle, su etanol karışımı azeotrop oluşturduğu için % 95-96 saflıktan öteye gitmek mümkün değildir. Çözelti karışımı damıtmayı sürdürerek, % 96'dan daha saf etanol elde edilmesi mümkün değildir. Benzinle karıştırılabilmek için, en az % 95.5 ile % 99.9 arasında bir saflığa ihtiyaç duyulmaktadır. En yaygın saflaştırma yöntemi, moleküler elek kullanarak fiziksel adsorplama prosesidir [60].

Genel olarak, bir benzin karışımındaki etanol miktarı yükseldikçe, standart araba motorları için uygunluğu azalmaktadır. Saf etanol kauçuk ve plastiklerle reaksiyona girdiği ya da onları çözdüğü için tadilat görmemiş motorlarda direk olarak kullanılamaz. Bu nedenle, en fazla yarar için, ateşleme zamanı ve sıkıştırma oranının değiştirilmesi gerekir. Saf benzin yakıtlı bir aracı, saf etanol yakıtlı bir araca dönüştürmek, alan olarak % 30-40 kadar daha büyük karbüratör kullanımını gerektirir. Etanolla çalışan motorlar, 13 °C'nin altındaki sıcaklıklarda yanmayı maksimize edebilmek ve yanmamış, buharlaşmamış etanolü minimize edebilmek için, soğuk ortamda çalıştırma sistemine ihtiyaç duyarlar. Etanolün %10 ile %30 arasında bir karışımda kullanılması durumunda, hiçbir motor tadilatına ihtiyaç

duyulmamaktadır. Pek çok yeni araç, bu oranlardaki karışımlarda güvenle çalışabilirler [60].

Biyoetanol lignoselülozik biyokütleden ve diğer tarım ürünlerinin atıklarından elde edilebilmektedir. Ham maddenin türüne göre üretim prosesi farklılık göstermektedir. Bu nedenle tasarım spektrumu ve uygulanan teknolojiler değişiklik gösterir. Fakat hepsinde asıl amaç lignoselülozik materyalin çok basamaklı olarak şekerlere çevrimi ve elde edilen şekerlerin ise fermantasyonla etanole çevrimidir. Bu konudaki yeni araştırmalar etanol endüstrisi maliyetlerinin azaltılması ve benzin ile olan rekabetin artırılmasını için proses integrasyonunu içermektedir.

2.6. ŞEKERLERDEN ETANOL ÜRETİMİ

Şekerlerden etanol üretiminde ana hammadde şeker kamışıdır. Şeker kamışının suyu yada şeker fabrikalarından çıkan melasdan üretim yapılmaktadır. Brezilya'da etanolün % 79'u taze şeker kamışı suyundan ve kalan miktarı ise melasdan elde edilmektedir [63]. Hindistan'da şeker kamışı melası etanol üretimi için ana hammadde olarak kullanılmakta, şeker kamışı suyu ise bu amaçla kullanılmamaktadır [13]. Pancar melasları da etanol fermantasyonu için kullanılan diğer kaynaklardır.

Şeker kamışındaki sukrozu kolayca kullanılabilir heksozlar olan glukoz ve fruktoza hidroliz edebilme yeteneğinden dolayı en çok kullanılan mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Havalandırma *S. cerevisiae*'dan etanol üretiminde ve gelişiminde önemli bir faktördür. Bu mikroorganizmanın anaerobik şartlar altında gelişebilme yeteneği olmasına rağmen, yağ asitleri ve steroller gibi maddelerin sentezi için az miktarda da olsa oksijene ihtiyaç duyar. Oksijen büyüme ortamına bazı kimyasalların (örneğin karbamid peroksit) ilavesi ile sağlanabilir. Bu şekilde aynı zamanda bakteriyel kontaminasyonun da önüne geçilmiş olur [64].

Diğer mayalardan *Schizosaccharomyces pombe* yüksek basınç ve yüksek katı içeriğine karşı toleranslı olduğu için bazı avantajlar sağlar [1]. Bakteriler

arasında en çok umut verici tür ise *Zymomonas mobilis*'dir çünkü bu mikroorganizma düşük enerji gereksinimi ile yüksek etanol üretimini (teorik olarak maksimum % 97) sağlayabilmektedir. Bununla birlikte fermente edebildiği substratlar (glukoz, fruktoz ve sukroz) oldukça azdır [1].

Yüksek osmatik basınç şeker kamışı melasından etanol üretiminde negatif bir etki doğurur. Bu osmatiklik ise doğrudan şeker ve tuz derişimi ile ilişkilidir. Farklı çalışmalar göstermiştir ki *S. cerevisiae* türleri yüksek tuz ve sıcaklık toleransını sağlamaktadır. Örneğin protoplazma birleştirmesi ile floküle kültürleri 35 °C'de ve % 22 melas derişiminde geliştirmiştir [1]. Bu şartlar altında kesikli kültür ile etanol derişimi 91 g/L'ye, ve verimlilik ise 2,7 g/L.h'e olarak saptanmıştır. Buna rağmen tuz ve melas bünyesindeki farklı maddelerin inhibisyonları nedeni ile negatif etki devamlı olmaktadır. Tüm bunlara rağmen melas yine de maya gelişimi için içeriğindeki diğer nütrientler nedeni ile önerilmektedir.

2.6.1. Kesikli ve Yarı Sürekli Sistemler

Kesikli sistem ile etanol üretiminde en tipik sistem Melle-Boinot prosesidir. Bu proses ham maddenin tartımı ve sterilizasyonunu takiben H₂SO₄ ile pH düzenlenmesi ve Brix değerinin 14-22 arasında ayarlanmasından geçer. Ardında mayalar ile fermantasyona tabi tutulur. Şarap için ürün santrifüjlenir ve etanol separatöre gönderilir, çökelen maya tekrar fermentöre gönderilir yada yüksek hücre derişimine ulaşan kültür ayrılarak kurutulur. Geri döngülü kültür ile fermantasyonda düşük substrat derişimi kullanılır. Etanol ortamda birikir. Bu tür kültür rejimi hücre geri döngüsü ile yapılır. Besleme akış hızı oldukça önemli bir parametredir çünkü yüksek substrat ya da ürün derişimleri inhibisyona neden olarak fermantasyonu durdurabilir.

Sukrozun lineer yada eksponansiyel olarak artırılması ile etanol üretiminin % 10-14 oranında azaldığı belirtilmiştir [65]. Beslemeli kesikli sistemlerde besleme miktarının optimizasyonu etanol üretimi yüzdesinin artırılmasında kritik rol oynar. Yine bu tür sistemlerde oksijen limitlemesi büyük önem taşır.

Tekrarlı fermantasyon sistemlerinde floküle maya tiplerinin kullanılması önemli bir rol oynar. Bu proseste fermentasyon tamamlandıktan sonra mayalar ayrı bir ortamda toplanır ve taze ortama tekrar aşılanırlar. Bu yolla yüksek hücre derişimine ulaşılır ve inhibisyon etkisi azaltılmış olur. Bu tekrarlı kültürler kültür özelliğini kaybedene kadar yada hücreler ölene kadar devam ettirilir. Bu durumda sistem durdurulur ve yeni hücreler sisteme ilave edilir [65].

2.6.2. Sürekli Sistemler

Sürekli sistemlerin tasarımı ve gelişimi daha fazla maliyet gerektirmektedir. Ancak sürekli sistemlerin birçok avantajı vardır. Bu avantajların bazıları reaktörlerin yapım maliyetlerinin düşük olması, daha az bakım ve operasyon gereksinimleri, kolay proses kontrolü ve yüksek verimliliğidir. Bu avantajlarından dolayı Brezilya'da etanol üretiminin % 30'u sürekli sistemlerle yapılmaktadır [66]. Bu avantajların hepsi bu proseslerde yüksek hücre derişimine dayanır. Bu yüksek yoğunluğa ise hücrelerin immobilizasyonu, geri kazanımı ve geri beslenmesi ile ulaşılır.

En önemli dezavantajı ise maya kültürlerinin anaerobik şartlar altında uzun zaman etanol üretim verimlerini sabit tutamayıp verimin düşmesidir. Buna ilaveten yüksek sulandırmalarla verimliliklerini artırmanın yolları mevcuttur. Buda substrat tüketimi tamamlanmadan yeniden ilave edilmesinden geçer.

Havalandırmanın da sürekli sistemlerde önemli bir rolü vardır. Glukoza bağlı olarak hücre derişimi havalandırmanın artırılmasıyla artar ancak bu mikroaerobik ve aerobik şartlarda ise etanol üretimi azalır. Mikroaerobik şartlarda etanol ile hücre büyümesi inhibisyonu tam anaerobik kültürasyon ile kıyaslandığında azalır [67].

Sürekli prosesler ürün inhibisyonu etkisini azaltır. Kademeli sürekli sistemlerde, ilk reaktörde elde edilen etanol kolaylıkla uzaklaştırılır ve bu şekilde devamında görülebilecek inhibisyon azaltılır. Diğer konfigürasyonlarda (örneğin Biostill teknoloji) tek fermentörde bile inhibisyon azaltılabilmektedir. Birçok farklı

reaktör versiyonu inhibisyonu azaltmak için önerilmiştir. Ancak bunların hiç biri ticari seviyeye henüz ulaşamamıştır. Bunların bir çoğu maya flokları oluşturan kule yada akışkan yataklı reaktör tipleridir. Bu tip reaktörler yüksek hücre derişimlerinde (70-100 g/L) ve yüksek etanol verimi ile uzun süre stabil olarak çalışabilirler. Ayrıca kendi kendini yenileyebilirler ve karıştırma ya da santrifüje gerek duymazlar [1]. Verimliliği artırmak için bir başka yaklaşımda sentezlenen etanolü vakumla ya da membranlarla ortamdan uzaklaştırmaktır. Ancak bu uygulama maliyet artırmaktadır.

Sürekli sistemlerde kültürün stabilizasyonu diğer önemli parametrelerden biridir. Eğer sistem istikrarsız bir duruma yaklaşırsa, giriş parametrelerinde (dilüsyon hızı, sıcaklık, substrat derişimi gibi) bir değişim olursa ve durum dengelenmezse sistemde verim hızla düşer ya da tamamen durur [68].

Sürekli sistemlerde etanol fermantasyonunda kullanılan yöntemlerden bir de tutuklanmış hücrelerin kullanımüdür. Bu yöntemle düşük hücre derişimi kullanılarak yüksek verim elde edilebilmektedir. Bu yöntemde hücreler gözenekli katı desteklere (kalsiyum aljinat, karaginan, poliakrilamid gibi) tutuklanır. Son zamanlarda tutuklanmış hücrelerin kullanımı sadece araştırmalarla sınırlıdır. Ticari olarak halen uygulamaya geçilememiştir [1].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Çalışmada kullanılan mısır koçanı (MK) ve mısır sapı (MS), Günyurdu Köyü, Yenice, Mersin'den Eylül 2008 tarihinde ürünlerin hasatı sırasında temin edilmiştir. Buğday sapı (BS) da yine aynı bölgeden alınmıştır. Buğday kepeği (BK) ise ilaçlanmamış olarak Hıdıroğlu Un Fabrikasından (Tarsus/Mersin) alınmıştır.

Etanol fermentasyonu için gerekli olan fermente edilebilir ürünlerin (glukoz, galaktoz, fruktoz, mannoz) açığa çıkarılması amacıyla doğu Akdeniz bölgesinde en fazla üretilen zirai ürünler olan mısır ve buğdaya ait kalıntılar (mısır koçanı [MK] ve mısır sapı [MS] ile buğday kepeği [BK] ve buğday sapı [BS]) kullanılmıştır. Bu materyaller birbirini takiben üretilmektedir. Ekim ayında buğday ekilmekte, Mayıs ayında hasat edilmektedir. Ardından mısır ekilmekte ve Eylül ayında hasat edilmektedir. Bu şekilde yıl içinde devamlı olarak üretim söz konusudur.

Materyal seçimi aşağıda belirtilen koşullara göre yapılmıştır:

- Üretilen atığın içeriği (uygulanacak ön işlem ve hidroliz işlemleri sonucunda fermente edilebilir bileşiklerin oluşabilme potansiyeli),
- Yıllık üretim miktarının olası bir sistemde işlenecek kadar fazla ve kolay bulunabilir olması,
- Toplama ve depolama olanağının olması (örneğin yüksek nem içeriğine sahip atıkların depolanma problemi vs)
- Tehlikeli olabilecek madde içermemesi (örneğin aynı amaçla kullanılan şeker pancarı melasları ağır metal içermektedir yine evsel katı atıklarda sağlığa zararlı maddeler bulunabilir).

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tamamı analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich ve Merck'den sağlanmıştır. Ayrıca, HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) analizleri için HPLC saflığında kimyasallar kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hammadde İçeriğinin Belirlenmesi

MK, MS, BK ve BS’da nem oranı (%), lignin, selüloz, hemiselüloz, toplam karbonhidrat (TK) ve indirgen şeker (İŞ) miktarları “Analitik Prosedür” başlıklı kısım altında verilen yöntemlere göre belirlenmiştir.

3.2.2. Hammaddelere Ön İşlemlerin Uygulanması

MK, MS, BK ve BS üzerinde fermente olabilir şekerlerin açığa çıkarılması amacıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik ön işlemler uygulanmış ve ön işlem verimleri, saptanan TK ve İŞ değerlerine göre belirlenmiştir. Ardından verimin artırılabilmesi amacıyla ön işlem kombinasyonu uygulanmıştır. Ön işlem uygulamalarından önce zirai alandan gelen hammaddeler 4 defa çeşme suyu ile yıkanmış ve 40 °C’de 24 saat kurutulmuştur.

3.2.2.1. Fiziksel ön işlemler

Mekanik ön işlemler

Kurutulmuş hammaddeler öncelikle çelik bıçaklı parçalayıcı (Waring) ile parçalanmış ardından kahve değirmeni (Bosh) ile öğütülmüştür. Öğütülen hammaddelerin tanecik boyutlarına göre ayrılması amacıyla, hammaddeler elekten (Retsch) geçirilmiştir. Kullanılan eleklerin gözenek boyutları Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan eleklerin gözenek boyutları

Elek No	Gözenek boyutu (μm)	Mesh No
1	1400 ve üstü	14
2	600-1400	30
3	500-600	35
4	300-500	50
5	212-300	70
6	75-212	200
7	45-75	325
8	0-45	(elek altı)

Tanecik boyutunun fermente edilebilir ürün oluşumuna etkisinin saptanması amacıyla her elekten alınan numunelerde TK ve İŞ tayinleri yapılmıştır.

Uygulanan tüm ön işlem çalışmalarında mekanik öğütme sonucu her bir hammadde için en yüksek TK ve İŞ miktarının saptandığı tanecik boyutu aralığı kullanılmıştır.

Ultrasonik işlemler

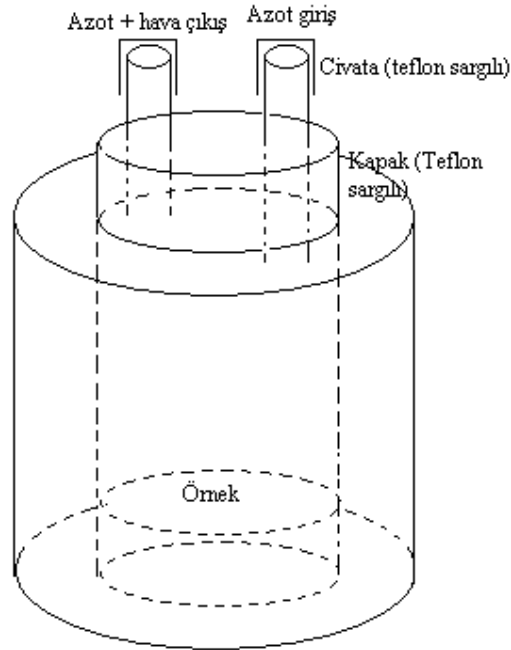
Ultrasonik ön işlem ile en yüksek TK ve İŞ değerlerinin saptanması amacıyla, öncelikle optimum hammadde derişiminin (1, 5, 10 ve 20g/L) ve zamanın (15, 30, 60, 90 ve 120 dk) etkisi ayrı ayrı çalışılmıştır. Ardından, optimum hammadde derişimi ve işlem süresi koşullarında farklı derişimlerde NaOH (0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 M), H₂SO₄ (% 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0) ve H₂O₂'ile (% 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0) ultrasonik işlemler yapılmıştır. Bu maddelerin, hammaddelerdeki TK ve İŞ değerlerine etkilerinin araştırılması amacıyla NaOH, H₂SO₄ ve H₂O₂ ayrı ayrı ve birleştirilerek çalışılmıştır. Çalışmalarda TK ve İŞ analizlerinden önce ortamların pH'ı nötralize (pH 6-8) edilmiştir. Nötralizasyon için 1,0 M NaOH ve % 70'lik H₂SO₄ kullanılmıştır. Ayrıca kalan H₂O₂'in uzaklaştırılması amacıyla ortama 1,0 M

KMnO₄ eklenerek reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dk beklenmiş, daha sonra 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek TK ve İŞ analizleri yapılmıştır. Çalışmalar Emla S 100 H (20 kHz, 550 W) model ultrasonik banyoda sürdürülmüştür.

3.2.2.2. Kimyasal ön işlemler

Piroliz

Çalışmada kullanılan piroliz reaktörü Lefkoşa/KKTC organize sanayinde, paslanmaz çelikten yaptırılmıştır. Reaktör temel olarak üzerinde gaz girişi ve çıkışının yapılabilmesine olanak veren bir kapak ve çift cidarlı bir gövdeden oluşmaktadır (Şekil 3.1.). Reaktörün örnek yerleştirme kısmı hacmi 75,36 cm³'tür.



Şekil 3.1. Piroliz reaktörü

Piroliz uygulaması için 70 °C'de 24 saat ve ardından 105 °C'de 2 saat kurutulmuş numuneler, desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak, reaktöre yerleştirilmiştir. Ardından teflon contalı kapak sıkıca kapatılmış ve reaktör

içerisinden azot gazı geçirilerek ortamda bulunan oksijen gazı uzaklaştırılmıştır. Gaz giriş ve çıkış kapakları da teflon contalı cıvatalar ile sıkıca kapatılmış ve 5 g hammadde için ayrı ayrı 300, 350 ve 400 °C'de 20 dk piroliz işlemi yapılmıştır [56]. Piroliz uygulaması sonrası reaktörden alınan numuneler tartılmıştır. 1 g/L olacak şekilde sulandırılan numuneler siyah bant filtre kağıdından süzölmüş, ardından 6000 rpm'de santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan kısımlarda TK ve İŞ analizleri yapılmıştır.

Fenton oksidasyonu

MS, MK, BK ve BS'nin 1 g/L derişiminde hazırlanan çözeltilerinde fenton oksidasyonu ile TK ve İŞ değerlerinin değişimi araştırılmıştır. Fenton oksidasyonunun verimini doğrudan etkileyen pH, Fe²⁺ derişimi (Fe²⁺ kaynağı olarak FeSO₄.7H₂O kullanılmıştır) ve H₂O₂ derişimi ayrı ayrı çalışılmış ve son olarak reaksiyon süresinin etkisi araştırılmıştır.

pH'nın optimize edilmesi amacıyla Fe²⁺ 150 mM ve H₂O₂ 250 mM olacak şekilde hazırlanan çözeltilerde 7 farklı pH değeri (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ve 7,0) çalışılmıştır.

Optimum pH değerinin saptanmasının ardından ilk olarak Fe²⁺'nin etkisi 5 farklı derişim ile (100, 150, 250, 350 ve 500 mM) çalışılmış ve en uygun değer saptanmıştır. Daha sonra optimum H₂O₂ değerinin saptanması amacıyla optimum pH ve Fe²⁺ derişiminde 5 farklı H₂O₂ (100, 250, 350, 500 ve 750 mM) derişimi çalışılmıştır.

pH, Fe²⁺ ve H₂O₂ için belirlenen optimum değerlerde reaksiyon süresinin etkisinin araştırılması amacıyla 10 dk, 20 dk, 30 dk, 60 dk, 90 dk, 120 dk, 240 dk, 360 dk, 720 dk (12 sa) ve 1440 dk (24 sa)'lık reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon sırasında deneyler; öncelikle pH'ın ayarlanması ardından Fe²⁺'nin ilavesi ve son olarak H₂O₂ ilavesi ile başlatılmış ve 30 dk 200 rpm'de

çalkalanarak, oda sıcaklığında (18 ± 3 °C) gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda ortamlardan alınan numunelerde pH nötralizasyonu yapılmış (1,0 M NaOH ve % 70'lik H₂SO₄ ile) ve kalan H₂O₂'in uzaklaştırılması amacıyla ortama 1,0 M KMnO₄ eklenerek reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dk beklenmiş, daha sonra 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek elde edilen duru fazda TK ve İŞ analizleri yapılmıştır.

Seyreltik H₂SO₄ ile ön işlemler

MS, MK, BK ve BS'nin 1 g/L derişiminde ayrı ayrı % 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ve 5,0 H₂SO₄ içeren çözeltileri ve H₂SO₄ içermeyen (kontrol) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 5 mL'si ısıya dayanıklı kapaklı cam tüplere eklenmiş ve termoreaktörde (Hack) 121 ± 5 °C'de 0, 10, 30, 60, 120 ve 180 dk reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda alınan örneklerde TK ve İŞ analizlerinden önce ortamların pH'ı nötralize (pH 6-8) edilmiştir. Nötralizasyon için 2,0 M NaOH kullanılmış ve ardından örnekler 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.

Derişik H₂SO₄ ile ön işlemler

MS, MK, BK ve BS'nin 1 g/L derişiminde ayrı ayrı % 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 ve 30,0 H₂SO₄ içeren çözeltileri ve H₂SO₄ içermeyen (kontrol) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 5 mL'si ısıya dayanıklı kapaklı cam tüplere eklenmiş ve termoreaktörde (Hack) 121 ± 5 °C'de 0, 10, 30, 60, 120 ve 180 dk reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda alınan örneklerde TK ve İŞ analizlerinden önce ortamların pH'ı nötralize (pH 6-8) edilmiştir. Nötralizasyon için 12,0 M NaOH kullanılmış ve ardından örnekler 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.

Alkali ön işlemler

MS, MK, BK ve BS'nin 1 g/L derişiminde ayrı ayrı % 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ve 5,0 NaOH ve Ca(OH)₂ içeren (w/v) çözeltileri ve NaOH/Ca(OH)₂ içermeyen (kontrol) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 5 mL'si ısıya dayanıklı kapaklı cam tüplere eklenmiş ve termoreaktörde (Hack) 121 ± 5 °C'de 0, 10, 30, 60, 120 ve 180

dk reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda alınan örneklerde TK ve İŞ analizlerinden önce ortamların pH'ı nötrale (pH 6-8) edilmiştir. Nötralizasyon için % 70'lik H₂SO₄ kullanılmış ve ardından örnekler 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.

Islak oksidasyon

Hammadeler üzerinde basınç ve sıcaklığın her ikisinin birden uygulanması işlemine ıslak oksidasyon işlemi ismi verilmektedir [1]. Bu nedenle çalışmanın bu kısmını 1.2 Mpa basınçta, 121 °C'de farklı zaman aralıklarında (10, 20, 30, 60, 120 ve 180 dk) gerçekleştirilmiştir. Hammaddeler 1 g/L derişimde çalışılmıştır. Islak oksidasyon işleminin veriminin belirlenmesi amacıyla asidik, alkali ve nötr ortamlar oluşturulmuş ve TK ve İŞ değerlerindeki değişimler saptanmıştır.

Asidik şartlar % 98'lik H₂SO₄ ile alkali şartlar ise % 40'lık NaOH çözeltisi ile sağlanmıştır. Çalışmada hem asidik hem de alkali şartlar % 0,5; 1,0; 2,0 ve 4,0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Otoklavda (Şimşek) 1,2 Mpa ve 121 °C'nin sağlanması ile zaman başlatılmış ve süre sonunda alınan örnekler buzlu su banyosunda hızla soğutulmuştur. Ardından pH nötralizasyonu (2,0 M NaOH ve % 70'lik H₂SO₄ ile) yapılmış ve örnekler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek TK ve İŞ analizleri için hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.3. Biyolojik ön işlemler

Beyaz çürükçül funguslarla ön işlem

Çalışmada kullanılan *Funalia trogii* ATCC 200800 (*F. trogii*) ve *Phanerochaeta chrysosporium* (*P. chrysosporium*) ME 446; Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Çevresel Biyoteknoloji laboratuvarından sağlanmıştır. Fungusların devamlılığı Potato Dextrose Agar (PDA)

besi yerine aylık ekimler yapılarak sağlanmıştır. PDA'ya ekim yapılan funguslar 30 °C'de 7 gün inkübe edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

PDA'da üretilmiş fungusların sıvı ortama adaptasyonunun ve kütle miktarının artırılması amacıyla Jeya ve arkadaşlarının [48] önerdiği şekilde hazırlanan sıvı besiyerine (Çizelge 3.2.) aşılama yapılmıştır. Fungusların aşılmasından önce besiyeri 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Ardından PDA'da üretilmiş funguslardan 1 cm² büyüklüğe sahip 5 parça kesilerek 100 mL besi yerine ayrı ayrı olacak şekilde aşılama yapılmış ve aşılama ortamları 12000 rpm'de 15 sn politron homojenizatör ile homojenize edilmiştir. Aşılama yapılmış ortamlarda fungus gelişiminin sağlanması amacıyla çalkalamalı su banyosunda 150 rpm, 30 °C'de 7 gün inkübasyon uygulanmıştır.

Çizelge 3.2. Fungusların üretiminde kullanılan sıvı besiyeri içeriği.

Kullanılan madde	Derişim (g/L)
Glukoz	10,00
KH ₂ PO ₄	0,80
NH ₄ NO ₃	2,00
Na ₂ HPO ₄	0,40
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,06
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,005
MnSO ₄ .H ₂ O	0,005

Beyaz çürükçül funguslarla çalışmada kullanılan hammaddelerin sakkarifikasyonunun araştırılması amacıyla Jeya ve arkadaşlarının [48] önerdiği besiyeri (Çizelge 3.3.) modifiye edilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Sakkarifikasyon için hazırlanan besiyeri içeriği.

Kullanılan madde	Derişim (g/L)
Hammaddeler (MS,MK,BK,BS)	Farklı derişimlerde
KH_2PO_4	0,80
NH_4NO_3	2,00
Na_2HPO_4	0,40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50

Hammaddeler 75-212 μm olacak şekilde öğütülmüştür ve sakkarifikasyon için hazırlanan besiyerine ayrı ayrı 1,0; 5,0; 10,0 ve 20,0 g/L olacak şekilde eklenmiştir. Ayrıca kontrol amacıyla 5 g/L hammadde içeren (fungus aşılması yapılmamıştır-Kontrol) ve hammadde içermeyen (fungus aşılması yapılmıştır-Fungus Konrtol) ortamlar hazırlanmıştır. 250 mL'lik erlenlere 100 mL olacak şekilde alınan çözeltiler 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilerek aşılama hazır hale getirilmiştir.

Sakkarifikasyonun gerçekleşeceği ortama aşılınmaları için sıvı ortamda 7 günlük inkübasyon sonucu üretilen funguslar 12000 rpm'de 15 sn homojenize edilmiştir ve 100 mL'lik sakkarifikasyon ortamlarına 5 mL olacak (% 5) şekilde aşılınmıştır.

Aşılamanın ardından numuneler çalkalamalı su banyosuna yerleştirilerek 150 rpm, 30 °C'de 35 gün boyunca inkübe edilmiş ve inkübasyonun başlangıcında, 2., 4., 6., 8., 10., 15., 20., 25., 30. ve 35. günlerinde erlenlerden steril ortamda numuneler alınmıştır. Alınan numuneler 6000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenmiş ve ardından TK ve İŞ tayinleri yapılmıştır.

Enzimatik ön işlem

Beyaz çürükçül funguslarla ön işlem çalışmalarının ardından ticari selülaz (Sigma C 2605, *Aspergillus* sp.'dan izole) ile sakarifikasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bu amaçla ayrı ayrı pH'nın, sıcaklığın, temas süresinin, çalkalama hızının, hammadde ve enzim derişimlerinin etkisi araştırılmıştır.

Selüloz aktivitesinin maksimum olduğu pH'nın belirlenmesi amacıyla 0,1 M Sitrik asit – sodyum sitrat tamponu kullanılarak başlangıç pH'ları 4,0; 4,2; 4,5; 4,8; 5,0 ve 5,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH optimizasyonu sırasında diğer ortam koşulları ise sıcaklık, çalkalama hızı, temas süresi, hammadde ve enzim derişimi için sırası ile 50 °C, 150 rpm, 48 saat, 5 g/L ve 15 FPU/g olacak şekilde ayarlanmıştır.

Maksimum sakarifikasyon verimi için 6 farklı sıcaklığın (35, 40, 45, 50, 55, 60 °C) etkisi araştırılmıştır. Sıcaklığın optimizasyonu sırasında diğer ortam koşulları ise pH, çalkalama hızı, temas süresi, hammadde ve enzim derişimi için sırası ile 4,8; 150 rpm, 48 saat, 5 g/L ve 15 FPU/g olacak şekilde ayarlanmıştır.

Enzimatik hidroliz işlemlerinde temas süresinin etkisini belirlemek amacıyla ilk 24 saat 6 saat ara ile ve ardından 12 saat ara ile toplam 96 saat olacak şekilde denemeler yapılmıştır. Temas süresinin optimizasyonu sırasında diğer ortam koşulları ise pH, sıcaklık, çalkalama hızı, hammadde ve enzim derişimi için sırası ile 4,8; 50 °C, 150 rpm, 5 g/L ve 15 FPU/g olacak şekilde ayarlanmıştır.

Maksimum sakarifikasyon verimi için 5 farklı çalkalama hızının (0, 50, 100, 150, 200 rpm) etkisi araştırılmıştır. Bu işlemler sırasında diğer ortam koşulları ise pH, sıcaklık, temas süresi, hammadde ve enzim derişimi için sırası ile 4,8; 50 °C, 36 saat, 5 g/L ve 15 FPU/g olacak şekilde ayarlanmıştır.

Maksimum selüloz çevriminin gerçekleşebilmesi amacıyla çalışmada kullanılan hammaddenin (MS, MK, BK ve BS) 4 farklı derişimi (1, 5, 10 ve 20 g/L) çalışılmıştır. Çalışmalar sırasında diğer ortam koşulları ise pH, sıcaklık, temas süresi, çalkalama hızı ve enzim derişimi için sırası ile 4,8; 50 °C, 36 saat, 100 rpm ve 15 FPU/g olacak şekilde ayarlanmıştır.

Maksimum sakarifikasyonun gerçekleştirilebilmesi amacıyla 5 farklı enzim derişimi (10, 15, 20, 25, 30 FPU/g) çalışılmıştır. Bu işlemler sırasında diğer ortam koşulları ise pH, sıcaklık, temas süresi, çalkalama hızı ve hamadde derişimi için sırası ile 4,8, 50 °C, 36 saat, 100 rpm ve 5 g/L olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilen işlemin sonunda epondorf tüplerine alınan numuneler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan numunelerde TK ve İŞ analizleri yapılmıştır.

3.2.3. Ön İşlem Kombinasyonu

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik ön işlem çalışmalarının ardından her aşamada saptanan maksimum TK ve İŞ değerleri ile sistem ekonomisi göz önünde tutularak TK ve İŞ miktarlarını daha fazla artırmak amacıyla farklı ön işlem kombinasyonları oluşturulmuştur.

3.2.3.1. Islak oksidasyon - enzimatik ön işlem kombinasyonu

İlk olarak ıslak oksidasyon için 1,2 MPa basınç ve 121 °C sıcaklıkta 30 dk işlem süresine tabi tutulan 5 g/L derişime sahip hammaddeler, ön işlem sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve epondorf tüplerine örnek alınmıştır. Daha sonra tüm ortamların pH'sı 4,8 olacak şekilde ayarlanmış ve üzerlerine 25 FPU/g_{hammadde} selüloz ilave edilerek 50 °C'de 36 saat boyunca 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda tutulmuştur. İşlemin sonunda epondorf tüplerine alınan numuneler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan numunelerde TK ve İŞ analizleri yapılmıştır.

İkinci basamakta ise yukarıda anlatılan kombinasyonun tam tersi yani ilk olarak enzimatik uygulama ardından ıslak oksidasyon denemeleri yine yukarıda yazılı şartlar değiştirilmeden çalışılmıştır.

3.2.3.2. Asidik ıslak oksidasyon - enzimatik ön işlem kombinasyonu

Asidik ıslak oksidasyon – enzimatik ön işlem kombinasyonu çalışmalarında ilk olarak asidik ıslak oksidasyon için % 1,0 sülfürik asit içeren ortamlar (hammadde derişimi 5 g/L) 1,2 MPa basınç ve 121 °C sıcaklıkta 30 dk işlem süresine tabi tutulmuş, ön işlem sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve ependorf tüplerine örnek alınmıştır. Daha sonra tüm ortamların pH'sı 4,8 olarak ayarlanmış ve üzerlerine 25 FPU/g_{hammadde} selüloz ilave edilerek 50 °C'de 36 saat boyunca 100 rpm'de çalkalamalı su banyosunda tutulmuştur. İşlemin sonunda ependorf tüplerine alınan numuneler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan numunelerde TK ve İŞ analizleri yapılmıştır.

İkinci basamakta ise yukarıda anlatılan kombinasyonun tersi, yani ilk olarak enzimatik uygulama ardından ıslak oksidasyon denemeleri yine yukarıda yazılı şartlar değiştirilmeden çalışılmıştır.

3.2.4. Detoksifikasyon Çalışmaları

Ön işlem uygulamaları sırasında oluşabilecek asetik asit, furfural ve levunilik asit daha sonraki etanol fermantasyonunu inhibe edebileceğinden [69] bu maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir [1]. Bu amaçla fiziksel, kimyasal ve biyolojik detoksifikasyon işlemleri yapılmıştır.

3.2.4.1 Fiziksel detoksifikasyon çalışmaları

Ekstraksiyon işleminde organik çözücü olarak dietil eter ve etil asetat kullanılmış ve işlemler çözücü : numune oranı 3 : 1 olacak şekilde 3 kez yapılmıştır. Ayrımların gerçekleşmesi sonrası toplanan örneklerde herhangi bir şeker kaybının olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla inhibitörlerin yanı sıra heksozlar da HPLC'de analizlenmiştir [70]. Analizlerden önce numuneler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan örnekler 0,2 mikron'luk enjektör tipi filtrelerden (Millipor) geçirilmiştir.

3.2.4.2. Kimyasal detoksifikasyon çalışmaları

5 g/L Ca(OH)₂ kullanılarak alkali detoksifikasyon uygulanmıştır. Yöntemde pH öncelikle 10,5'e kadar yükseltilmiş, ardından 1,0 N H₂SO₄ ile tekrar 6,5'a düşürülmüştür [58]. Heksozların ve inhibitörlerin analizinde seyrelmeler göz önünde tutulmuştur. Deneme sonunda numuneler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan örnekler 0,2 mikron'luk enjektör tipi filtrelerden (Millipor) geçirilerek HPLC'de analiz edilmiştir.

3.2.4.3. Biyolojik detoksifikasyon çalışmaları

Ticari olarak satılan lakkaz (fenol oksidaz) enzimi ile enzimatik detoksifikasyon uygulanmıştır. Çalışmalar; çalkalamalı su banyosunda, 100 mL'lik erlenler kullanılarak 30 mL örnek hacminde, 50 °C'de, pH'nın 6,0 olarak 0,1 M sodyum-fosfat tamponu ile tamponlandığı ortamlarda, 125 rpm çalkalama hızında, 3 farklı lakkaz aktivitesi (45,0; 90,0 ve 200,0 CU) içeren ortamlarda 12 saat boyunca sürdürülmüştür [71]. Ayrıca 12 saat boyunca herhangi bir kontaminasyon olmaması amacıyla ortamlara 200 mg/L olacak şekilde amoksisilin trihidrat ilave edilmiştir. Deneme sonunda numuneler 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan örnekler 0,2 mikron'luk enjektör tipi filtrelerden (Millipor) geçirilerek HPLC'de analiz edilmiştir.

3.2.5. Etanol Fermantasyonu

Çeşitli ön işlemlerden geçirilen mısır (MS, MK) ve buğday (BS, BK) atıklarında, etanol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon için *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır.

3.2.5.1. Maya üreme ortamının hazırlanışı

Fermantasyondan önce, *Saccharomyces cerevisiae*'nin ortam koşullarına adaptasyonunun kolay olması için ön üretim ortamı hazırlanmıştır. Üreme ortamına;

10 g/L glukoz, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L MgSO₄.7H₂O, 5 g/L maya özütü, 0,5 g/L CaCl₂ ilave edilmiş ve başlangıç pH değeri % 0,1'lik H₂SO₄ ile 4,25 olacak şekilde ayarlanmıştır [72]. Ardından ortama; otoklavda, 121 °C'de, 1,2 atm basınçta, 15 dk sterilizasyon uygulanmıştır. Sterilizasyon sonrası 10 g/L maya ortama ilave edilerek 30 °C ve 150 rpm olacak şekilde çalkalamalı su banyosunda 48 saatlik maya üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.2. Üreme eğrisinin elde edilmesi

Fermantasyon ortamında aktifliği yüksek mikroorganizmaların kullanılması amacıyla üreme eğrisi oluşturulmuştur. Bu doğrultuda çalışmada belirli zaman aralıklarında (3., 6., 9., 12., 15., 18., 21. 24. 30. 36. 42. ve 48. saatler) üreme ortamından numuneler alınmıştır. Alınan numuneler 600 nm'de absorpsanları okunmuş ve mikroorganizma sayısındaki değişim izlenmiştir. Absorpsan okumalarının 0,6-0,9 arasında olabilmesi için gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

3.2.5.3. Fermantasyon ortamları

Önceden saptanan optimum koşullarda ön işlem görmüş MS, MK, BK ve BS'nin 40 g/L'lik çözeltilerinin başlangıç pH'ları % 0,1'lik H₂SO₄ ile 4,25 olacak şekilde ayarlanmış [72] ve *Saccharomyces cerevisiae* ön üretim ortamından, aktifliği en yüksek mikroorganizmaların bulunduğu (logaritmik üreme safhası) aralıkta alınan aşından hacimce % 7 olacak şekilde aşılama yapılmıştır.

Fermantasyon sırasında oluşan CO₂ gazının uzaklaştırılması ve oksijen girişinin engellenmesi amacıyla ağızlarına serum hortumu yerleştirilerek parafilm ile kapatılan erlenlerin içinden aşılama yapıldıktan hemen sonra, mevcut oksijen gazını uzaklaştırmak için azot gazı geçirilmiş ve ardından hortumların ucu, fermantasyon ortamlarının dış ortam koşullarından etkilenmemesi için, içi su dolu olan bir erlenin içerisine yerleştirilmiştir. 250 mL'lik erlenler içerisinde 100 mL fermantasyon ortamında, 28 °C'de, 150 rpm'de 60 saat boyunca fermantasyon devam ettirilmiştir. Fermantasyon süresi boyunca çeşitli zamanlarda (0., 6., 12., 18., 24., 30., 36., 42.,

48., 54. ve 60. saatler) alınan örneklerde pH, toplam heksoz (glukoz + fruktoz + mannoz + galaktoz) tayini ve etanol miktarı HPLC ile analiz edilmiştir.

Çalışmada başlangıç şeker miktarı belirli olan her bir hammadde için ayrı ayrı sentetik olarak oluşturulmuş kontrol grupları da kullanılarak, kontrol/numune etanol verimi kıyaslanmıştır. Bu şekilde ön işlemler sonrası yapılan detoksifikasyon çalışmaları neticesinde, ortamda giderilmeden kalan inhibitörlerin etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Kontrol gruplarına inorganik besin maddeleri, numunelerde I-XRF (Jeol, jsm-6610) ile ölçülen miktarlara eşit olacak şekilde ilave edilmiştir.

Fermentasyon işlemi sonunda hammaddeler için saptanan değerler aşağıda belirtilen ifadelerle dayanarak hesaplanmıştır.

$$\text{Maksimum etanol (hacimce \%)} = \frac{\left(\frac{C_{e,\max}}{10} \right)}{0,789} \quad (3.1)$$

$$\text{Maksimum etanol miktarı (g/g}_{\text{hamdde}}) = \frac{C_{e,\max}}{C_{h,0}} \quad (3.2)$$

$$\text{Etanol üretim hızı (g/L.saat)} = \frac{C_{e,\max}}{t_{\max}} \quad (3.3)$$

$$\text{Mayanın alkol üretim verimi (\%)} = \left(\frac{C_{e,\max}}{(C_{s,0} - C_{s,\max}) \times 0,511} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Etanol verimi (\%)} = \left(\frac{C_{e,\max}}{C_{s,0}} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

$C_{s,0}$: başlangıç şeker derişimi (g/L),

$C_{e,\max}$: maksimum etanol derişimi (g/L)

$C_{h,0}$: başlangıç hammadde derişimi (g/L)

t_{\max} : maksimum etanol miktarının saptandığı süre (saat)

$C_{s,\max}$: t_{\max} 'da şeker derişimi (g/L)

0,511: teorik olarak (% 100) heksozların ($C_6H_{12}O_6$) etanole çevrim oranıdır.

$d_{\text{etanol}} = 0,789$ g/mL

3.2.6. SEM Analizleri

Numuneler üzerinde yapılan ön işlem ve detoksifikasyon çalışmaları sonrası yapılarda meydana gelen değişimlerin görsel olarak ortaya çıkarılması amacıyla numuneler ayrı ayrı başlangıç ve ön işlem sonrası olmak üzere SEM (scanning electron microscope – JEOL, JSM-6610LV marka)'de analizlenmiştir. Görüntülerin daha net elde edilmesi amacıyla hazırlanan preparatlar öncelikle vakum altında Altın ile kaplanmıştır (EMITECH SC7620 Sputter Coter).

3.2.7. Maliyet Analizleri

Çalışmada en uygun ön işlem olarak belirlenen şartların ve fermantasyon basamağının, 1 ton hammadde için giderleri hesaplanmıştır. Ardından 1 ton hammadde için elde edilen etil alkol ve fermantasyon sonrası kalan posa kısmının (ham protein miktarı belirlenerek yem katkı maddesi olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır) gelirleri hesaplanarak önerilen sistemin fizibilitesi (teorik) oluşturulmuştur.

3.2.8. Analitik Prosedür

3.2.8.1. Nem tayini

Numunelerin nem içeriklerinin belirlenmesi amacıyla, 10 g örnek 105 °C'de 2 saat kurutulmuş ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Tartım sonrası tekrar desikatöre yerleştirilen örnek 30 dk sonra tekrar tartılmıştır. İki tartım arasındaki fark, 0,005 g'ı geçmeyinceye kadar devam edilerek sabit tartım elde edilmiştir. Daha sonra ağırlık azalmasına bağlı olarak nem içerikleri belirlenmiştir.

3.2.8.2. Lignin tayini

Lignin tayini için 1,0 g 105 °C'de 2 saat kurutulmuş numune üzerine (m_n) 15 mL % 72'lik H₂SO₄ ilave edilerek 20 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Ardından

karışım 1L'lik erlene alınarak üzerine 560 mL distile su eklenmiş ve geri soğutucu altında 4 saat kaynatılmıştır. Süre sonunda karışım mavi bant filtre (125 mm Filtrak) kullanılarak filtrelenmiş, asitten arındırmak için 500 mL kaynar distile su ile yıkanarak pH 6-7 aralığına kadar yükseltilmiştir. Daha sonra numune 2 saat süreyle 105 °C'de kurutulmuş ve desikatörde soğutulmuş ve tartılmıştır [73].

3.2.8.3. Selüloz tayini

Selüloz tayini için 1,0 g 105 °C'de 2 saat kurutulmuş numune (m_n) 1 L'lik erlene aktarılmış ve üzerine 200 mL 0,255 N'lik sıcak sülfürik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Çözelti, geri soğutucu altında 30 dakika kaynatılmış ve numune filtre kağıdından (mavi bant, 125 mm Filtrak) geçirilerek ve kaynar haldeki damıtık su ile asitlik giderilene kadar (pH 6-7) yıkanmıştır.

Filtrede kalan numune 200 mL 0,313 N'lik kaynar sodyum hidroksit çözeltisi kullanılarak 1 L'lik erlene aktarılmış ve geri soğutucu altında 30 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra numune filtre kağıdından (mavi bant, 125 mm Filtrak) geçirilerek ve kaynar haldeki damıtık su ile yıkanarak tüm sodyum hidroksit çözeltisinin tamamının geri alınması (pH 6-7) sağlanmıştır. Ardından filtrat 15 mL % 95'lik etil alkol ile çalkalanmış ve porselen krozeeye aktarılmış, 105°C'deki etüvde 2 saat kurutulmuş ve numune kütlesi (m_e) kaydedilmiştir.

Krozedeki kurutulmuş malzeme 30 dakika süreyle 600°C'deki fırında yakılmış, desikatörde soğutulup tartılmıştır. Bu değerden krozenin darası çıkarılarak yakma sonucu eritme kabında kalan numune kütlesi (m_y) kaydedilmiştir. Örneklerdeki selüloz miktarı (m_s) aşağıdaki bağıntı ile hesaplanmıştır [74]:

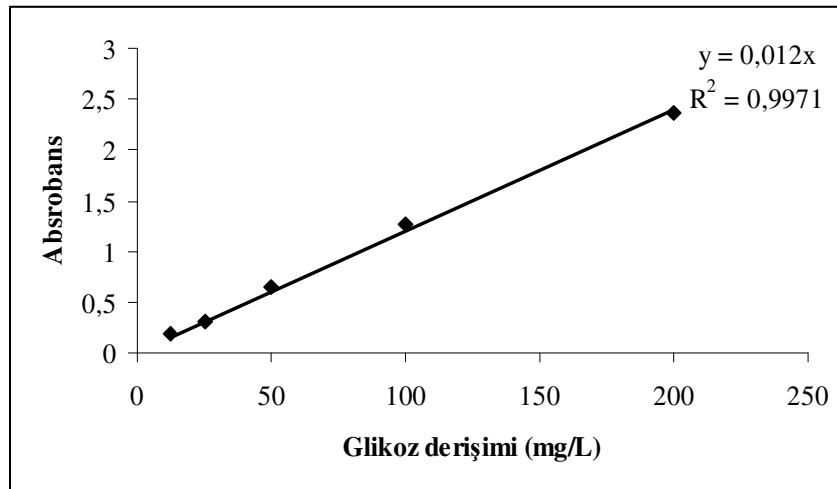
$$m_s = \frac{m_e - m_y}{m_n} \quad (3.6)$$

3.2.8.4. Hemiselüloz tayini

Hemiselüloz miktarının tayin edilmesi amacıyla holoselüloz miktarı saptanmış ve selüloz miktarıyla farklı alınarak hesaplanmıştır. Analizde 250 mL'lik kapaklı cam şişe içerisine 150 mL seyreltik (%1) asetik asit 2 g NaClO₂ ve 1,0 g 105 °C'de 2 saat kurutulmuş numune eklenmiştir. Ardından karışım 80 °C'de su banyosunda (Elektro-mag) 1 saat tutulmuştur. Daha sonra karışım mavi bant filtre (125 mm Filtrak) ile filtrelenmiştir. Bu işlem üç defa tekrar edilmiş ve filtrat önce aseton ardından distile su ile yıkanarak 105 °C'de 2 saat etüvde (Nüve) kurutulmuş ve 1 mg hassasiyet ile tartılarak holoselüloz miktarı saptanmıştır [75].

3.2.8.5. Toplam karbonhidrat (TK) tayini

TK tayini Rao ve Pattabiraman'ın [76] önerdiği Fenol-Sülfürik asit kolorimetrik yöntemiyle yapılmıştır. Deney; 1 mL örnek üzerine 1 mL % 5'lik fenol ve 5 mL derişik H₂SO₄ ilavesi, ardından vorteks ile karıştırma ve 30 dk reaksiyonun ardından 488 nm'de spektrofotometrede okuma ile tamamlanmaktadır. Sonuçlar glukozun standart çözelti olarak kullanılması ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.2.) ile derişim olarak ifade edilmiştir. Deneyler üç paralel olarak yapılmış ve sonuçların ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. TK tespiti için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

3.2.8.6. İndirgen şeker (İŞ) tayini

İndirgen şekerler glukoz, fruktoz, mannoz, galaktoz, gliseraldehit, laktoz, arabinoz ve maltoz'u içerirler. Başka bir deyimle pentoz ve heksozlardır. Ancak sukroz ve trihaloz indirgen şekerlerin dışında tutulurlar [77].

Şeker molekülündeki anomerik karbon (oksijen atomlarına çift bağ ile bağlanmış karbon $-C=O$) serbest hale gelince indirgen şeker meydana gelir. Şeker molekülleri zincir yapılı moleküller olabildikleri gibi halka yapıda da olabildiklerinden bu iki form arasında bir denge kurulabilir. Asetal ya da ketal bağları olan şekerler serbest aldehit zincirleri oluşturamadığından indirgen şeker değildirler dolayısıyla bunlar herhangi bir "indirgen şeker test solüsyonu" ile reaksiyon vermezler. İndirgen olmayan bir şeker, seyreltik hidroklorik asit ile hidrolize edildiğinde yapısındaki asetal ya da ketal hemiasetal ya da hemiketala dönüşür. Hidrolizden ve asit nötralizasyonundan sonra elde edilen ürün test solüsyonlarıyla reaksiyon veren indirgen bir şeker olabilir [77].

İŞ'lerin tayininde Miller'in önerdiği [77] dinitro salisilik asit (DNS) ile kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan çözeltiler ve deneyin yapılışı aşağıda açıklanmıştır:

DNS çözeltisi:

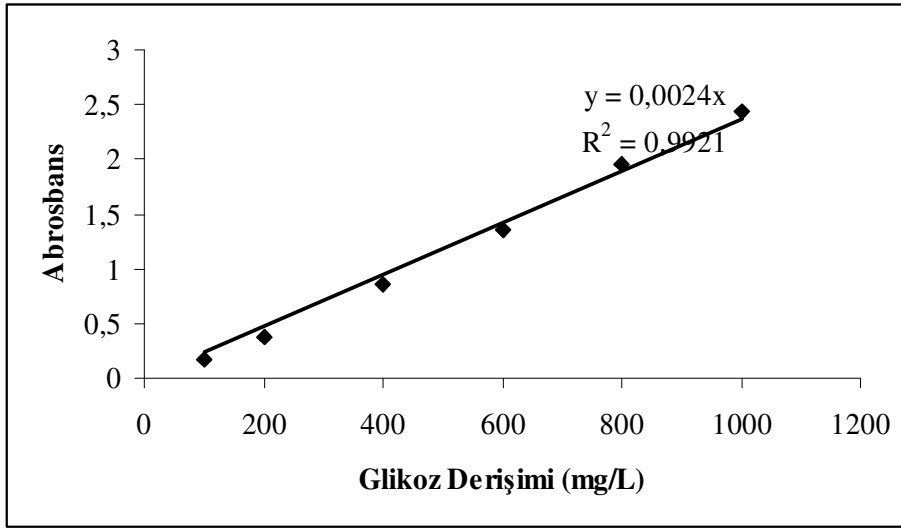
10,0 g DNS, 2,0 g fenol, 0,5 g Na_2SO_3 , 10,0 g NaOH 1L distile su içerisinde çözülmüştür.

Potasyum Sodyum Tartarat (PST) çözeltisi:

40,0 g PST 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

Deneyin yapılışı:

3 mL örnek üzerine 3 mL DNS çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırılmıştır. Karışım 90-100 °C'de 15 dk bekletilmiştir. Süre sonunda oluşan kahverengi-kırmızı rengin korunması amacıyla karışım üzerine 1 mL PST çözeltisi ilave edilerek numuneler buzlu suda hızla soğutulmuştur. Soğutulan numuneler spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda okunmuştur. İŞ tayininde kalibrasyon eğrisi glukoz kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.3.). Deneyler üç paralel olarak yapılmış ve sonuçların ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3. İŞ tespiti için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.

3.2.8.7. Selülaaz tayini

Deneylerde kullanılan selülaazın (Sigma C2605) aktivitesinin FPU (fitler paper unit) cinsinden belirlenmesi ve deney süresi boyunca analizlenmesi amacıyla Ghose'un [79] önerdiği yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde selülaaz tarafından oluşturulan glukozun belirlenmesi hedef alınmıştır.

Yöntemde kullanılan çözeltiler ve deneyin yapılışı aşağıda açıklanmıştır:

DNS çözeltisi:

10,6 g DNS ve 19,8 g NaOH 1416 mL distile su içerisinde çözülmüş ve ardından ortama 306 g sodyum potasyum tartarat, 50 °C'de eritilmiş 7,6 mL fenol ve 8,3 g sodyum metabisülfite eklenmiştir.

Sitrat tamponu:

210 g sitrik asit mono hidrat 1 L'de distile suda çözülmüş ve pH'ı 4,5 olana kadar NaOH_(k) ilave edilmiştir. pH'ı 4,5 olarak sabitlenen 1 M'lık çözeltiden deneyde kullanılmak üzere 0,05 M olacak şekilde sulandırma yapılmıştır. Sulandırma sonucunda ortam pH'ı 4,8 olarak belirlenmiştir.

Deneyin Yapılışı

1. Substrat olarak kullanılmak üzere 1,0 cm x 6,0 cm (yaklaşık 50 mg) olacak şekilde Whatman No. 1 filtre kağıtları hazırlanmıştır.
2. Filtre kağıtları sargı yapılmış biçimde cam tüplerin diplerine yerleştirilmiş ve üzerlerine 1 mL sitrat tamponu ilave edilerek 50 °C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilmiştir
3. 5 farklı şekilde sitrat tamponu ile seyreltme yapılan enzim kaynağından 0,5 mL tüplere ilave edilmiş ve 60 dk reaksiyon gerçekleştirilmiştir.
4. Reaksiyon sonunda su banyosundan alınan tüplere 3 mL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve kaynayan suyun bulunduğu ortamda 10 dk beklenmiştir.
5. Süre sonunda tüpler buzlu suya alınarak aniden soğutulmuştur.
6. Soğutulan örnekler spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunmuştur.

Kontrol gurupları

1. kontrol: sadece 1,5 mL sitrat tamponu içeren ortam.

2. kontrol (enzim kontrol): 1 mL sitrat tamponu ve 0,5 mL enzim içeren ortam.

3. kontrol (substrat kontrol): 1,5 mL sitrat tamponu ve Whatman No. 1 filtre kağıdı içeren ortam.

Hesaplama

1. Öncelikle DNS çözeltisi kullanılarak A_{540} 'da glukoz standart eğrisi oluşturulmuştur.

2. Ardından seyreltme yapılmış selülaz numunlerinde glukoz değerleri saptanmış ve seyreltmeye karşılık glukozu gösteren lineer bir eğri oluşturulmuştur.

3. Bu eğri üzerinde 2,0 mg/0,5 mL'ye karşılık gelen seyreltme miktarı belirlenerek aşağıdaki formülde gösterildiği şekilde selülaz aktivitesi FPU cinsinden belirlenmiştir:

$$FPU = \frac{0,37}{2,0 \text{ mg glukoz oluşturan seyreltilmiş enzim}} \quad (3.7)$$

* 0,37 sabit terimi glukozun equivalent değeridir:

$$\frac{2,0 \text{ mg glukoz} / 0,18016 \text{ mg glukoz}/\mu\text{mol}}{(0,5 \text{ mL seyreltilmiş enzim} \times 60 \text{ dk})} = 0,37 \mu\text{mol}/\text{dk.mL} \quad (3.8)$$

3.2.8.8. Lakkaz tayini

Lakkaz (02:p-difenol oksido-redüktaz, EC. 1.10.3.2) aktivitesinin ölçümünde Guaikol (Sigma) substrat olarak kullanılmıştır ve guaikolün oksidasyonuna bağlı olarak oluşan rengin 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV 2550) ölçümü ile lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Lakkaz aktivitesi ölçümünde reaksiyon karışımı 10 μm guaikol /5mL 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,0) içerecek şekilde hazırlanmış guaikol çözeltisinin 4,9 mL' sine 0,1 mL enzim kaynağı eklenerek 30 °C'de 60 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Lakkaz aktivitesi

inkübasyon karışımının optik yoğunluğunda 0,1 birim artışa neden olan enzim aktivitesi kolorimetrik ünite (Colorimetric Unit:CU) olarak tanımlanmaktadır [80].

3.2.8.9. Heksozların tayini

Numuneler heksoz analizlerinden önce; 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan örnekler 0,2 µm'luk enjektör tipi filtrelerden (Millipor) geçirilmiştir.

HPLC'de heksozların (glukoz, mannoz, fruktoz ve galaktoz) analizi; taşıyıcı fazın deiyonize su olarak kullanıldığı, 0,5 mL/dk akış hızıyla, 65 °C'de, 10 µL örnekleme yapılarak, 40 dk kromatografi uygulanarak yapılmıştır [81]. Heksozların tayini için Shimadzu marka HPLC sistemde Coregel-87H3 (Transgenomic) kolon kullanılmış ve refraktif indeks detektör (Shimadzu RID-10A) ile sonuçlar alınmıştır. Numunelerin analizlerinden önce heksozlar için ayrı ayrı standart eğriler oluşturulmuştur. Heksozlar için standart derişimleri 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 g/L olarak hazırlanmıştır.

3.2.8.10. İnhibitörlerin tayini

HPLC'de etanol fermantasyonunu inhibe eden maddelerin (asetik asit, levunilik asit ve furfural) analizleri ise taşıyıcı fazın 5 mM H₂SO₄ olarak kullanıldığı, 0,5 mL/dk akış hızıyla, 65 °C'de, 10 µL örnekleme yapılarak (Shimadzu Auto sampler), 50 dk kromatografi uygulanmıştır [81]. Bu maddelerin tayini için Shimadzu marka HPLC sistemde Coregel-87H3 (Transgenomic) kolon kullanılmış ve UV/VIS detektör (Shimadzu SPD-20A) ile 227 nm'de sonuçlar alınmıştır. Numunelerin analizlerinden önce bu maddeler için ayrı ayrı standart eğriler oluşturulmuştur. Standart derişimleri 25,0; 50,0; 100,0; 250,0 ve 500,0 mg/L olarak hazırlanmıştır.

3.2.8.11. Etil alkol tayini

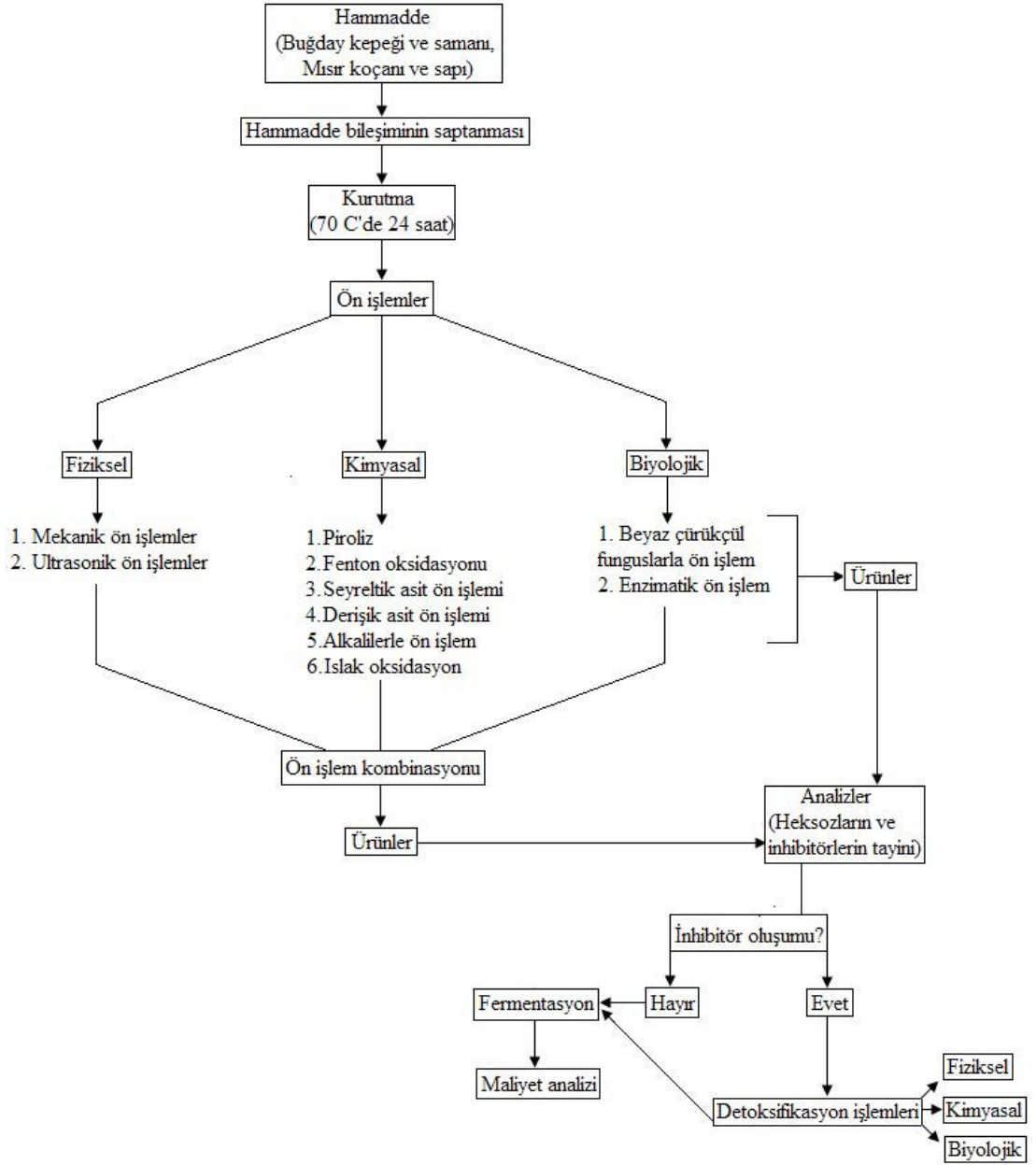
Numuneler heksoz analizlerinden önce; 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiş ve duru fazdan alınan örnekler 0,2 µm'luk enjektör tipi filtrelerden (Millipor) geçirilmiştir.

HPLC'de etil alkol analizi; taşıyıcı fazın 5 mM H₂SO₄ olarak kullanıldığı, 0,5 mL/dk akış hızıyla, 65 °C'de, 10 µL örnekleme yapılarak, 40 dk kromatografi uygulanmıştır [82]. Etanol tayini için Shimadzu marka HPLC sistemde Coregel-87H3 (Transgenomic) kolon kullanılmış ve refraktif indeks detektör (Shimadzu RID-10A) ile sonuçlar alınmıştır. Numunelerin analizlerinden önce etanol standart eğrisi oluşturulmuştur. Etanol için standart derişimleri 3,79; 7,57; 37,87; 75,74 ve 113,62 g/L olarak hazırlanmıştır.

3.2.8.12. Ham protein tayini

Fermantasyon sonrası, etil alkol distilasyonunun ardından, ortamda kalan posanın ham protein miktarının belirlenmesi amacıyla numunelerin, AOAC 992.15:1992'ye göre Mersin İl Kontrol Laboratuvarında protein miktarları analiz edilmiştir [83].

3.2.9. Deney Akım Şeması



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. HAMMADDE İÇERİKLERİ

Deneyleerde kullanılan hammaddelerin içerikleri Materyal ve Metod bölümünde ifade edilen yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hammadde içerikleri (tanecik boyutu 75-212 µm).

Hammadde	Nem (%)	Lignin (mg/g)	Selüloz (mg/g)	Hemiselüloz (mg/g)	TK (mg/g)	İŞ (mg/g)
MK	3,63	159,32	394,26	376,42	20,88	10,40
MS	1,53	134,71	471,37	313,92	132,31	114,22
BK	5,20	149,80	411,32	418,88	76,54	6,18
BS	2,92	161,72	424,29	363,91	27,80	3,83

4.2. FİZİKSEL ÖN İŞLEMLER

4.2.1. Mekanik Ön İşlemler

Selüloz hidrolizinde ligninoselülozik materyalin gözenekliliği büyük önem taşır. Ön işlem yapılmadığında selüloz hidroliz verimi teorik olarak %20'nin altındayken, ön işlemde sonra bu verimin % 90'ı geçtiği rapor edilmiştir [1].

Çalışmada her bir hammadde için 8 farklı elek üzerinde toplanan örneklerde fermente olabilir şekerlerin saptanması amacıyla TK ve İŞ analizleri yapılmıştır.

MK ile yapılan çalışmalar sonucunda tanecik boyutunun küçülmesi ile TK ve İŞ miktarlarında artış saptanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. MK'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları.

Elek No	TK (mg/g)	İŞ (mg/g)
1	3,99	2,97
2	7,15	4,56
3	9,27	6,54
4	11,78	7,56
5	17,18	7,79
6	20,88	10,40
7	22,44	13,16
8	24,27	13,70

MS ile yapılan çalışmalar sonucunda da tanecik boyutunun küçülmesi TK ve İŞ miktarları ile orantılı olduğu saptanmıştır. Ancak 4 numaralı elekten (300-500 µm) sonra TK miktarları hemen hemen sabit kalırken İŞ miktarlarında artış söz konusudur. Sonuçlar Çizelge 4.3.'de verilmiştir. İŞ miktarı partikül boyutunun küçülmesi ile artış göstermektedir. Ancak eleğin gözenek büyüklüğünün küçülmesi ile maliyet ters orantılı olduğu için uygun elek numarası 6 olarak belirlenebilir. MS ile yapılan çalışmada yüksek miktarda TK ve İŞ saptanmıştır. Bu bulgu TK içerisindeki fermente olabilir ürünleri ifade eden İŞ'nin fazla olduğunu ve fermentasyon sonucu daha yüksek ürün elde edilebileceği anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.3. MS'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları.

Elek No	TK (mg/g)	İŞ (mg/g)
1	75,84	39,93
2	107,29	75,01
3	120,92	93,44
4	134,01	103,58
5	132,93	109,30
6	132,31	114,22
7	134,01	121,33
8	132,80	122,20

BK ile yapılan çalışmalarda öğütülmemiş tanecik boyutunun diğer hammaddelere göre daha küçük olması nedeniyle 1 numaralı elekte numune toplanamamıştır. BK ile yapılan çalışmalarda 6 numaralı eleğe kadar TK ve İŞ miktarında artış saptanırken 7 ve 8 numaralı eleklerde ise bu değerlerde düşüş saptamıştır. Bu düşüşe neden olarak BK içerisinde bulanabilecek tanecik boyutu küçük olan toz ve diğer maddelerin neden olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. BK'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları.

Elek No	TK (mg/g)	İŞ (mg/g)
1	-	-
2	61,09	0,29
3	63,79	0,50
4	70,19	2,40
5	72,97	4,29
6	76,54	6,18
7	43,51	3,87
8	41,64	3,41

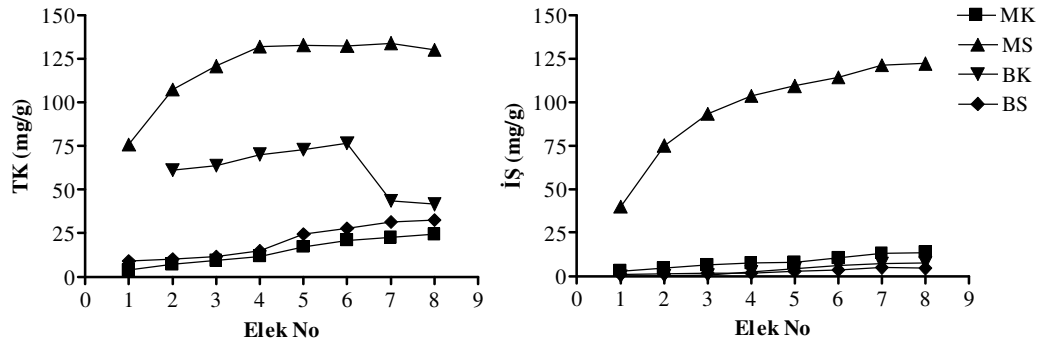
Yukarıdaki çizelgede de görüldüğü gibi İŞ derişimi oldukça düşüktür. Bu sonuç BK içeriğindeki ligninoselülozik materyalin daha yüksek olduğunu ve sadece elekten geçirilerek uygulanan ön işlem ile İŞ miktarının istenilen seviyeye çıkarılamayacağını göstermektedir.

BS ile yapılan çalışmalar sonucunda da düşük İŞ miktarı saptanmıştır. Elek numarası artışı ile TK ve İŞ miktarları artmaktadır. Sonuçlar Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. BS'nın farklı partikül boyutlarında saptanan TK ve İŞ miktarları.

Elek No	TK (mg/g)	İŞ (mg/g)
1	8,93	0,97
2	10,22	1,39
3	11,72	1,81
4	14,75	1,89
5	24,52	2,99
6	27,80	3,83
7	31,42	4,88
8	32,62	4,50

Mekanik öğütme ve eleme ile farklı tanecik boyutlarına ayrılan hammaddelerde saptanan TK ve İŞ değişimini gösteren grafikler Şekil 4.1. de verilmiştir.



Şekil 4.1. Mekanik öğütme ve eleme işlemleri sonrası saptanan TK ve İŞ değerleri.

Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi hammaddeler arasında TK değeri en yüksek olan MS'dir. Ardından BK, BS ve MK gelmektedir. En yüksek İŞ değeri de MS'de saptanmıştır. Ardından MK, BK ve BS gelmektedir. Mekanik öğütme çalışmaları sonucunda tanecik boyutunun TK ve İŞ miktarları açısından önem taşıdığı saptanmıştır.

Özellikle MS ile yapılan çalışma bulgularının diğer hammaddelere göre daha verimli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 4 farklı hammadde için de 6 numaralı eleğin daha verimli olduğu saptanmıştır. Elek boyutunun daha fazla azaltılması ile verim artış göstermektedir ancak ekonomik açıdan değerlendirildiğinde ise verim artışı ile maliyetin birbirini dengelemeyeceği düşünülmektedir.

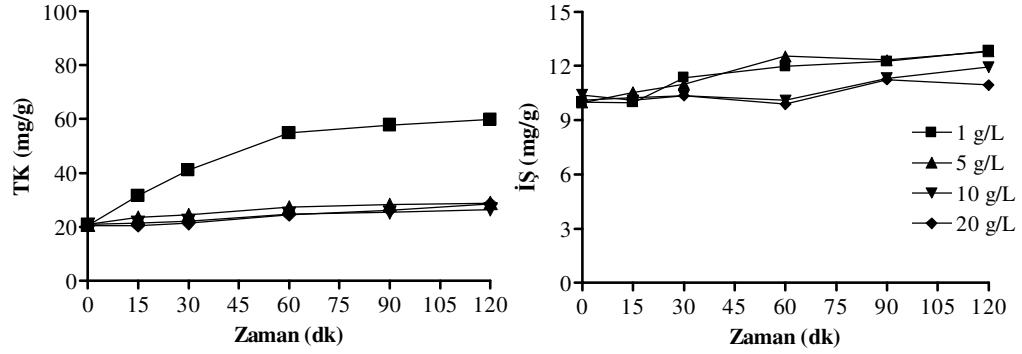
Ligninoselülozik yapıca zengin olan materyallerde (kavak, ladin vs) mekanik öğütme ile tanecik boyutunun küçültülmesi işleminin, kristal haldeki selüloz yapısının bozulmasında önemli rol oynadığı, bu şekilde daha sonra uygulanacak olan işlemlerde fermente olabilir ürünlerin ortaya çıkarılmasının daha kolay olacağı rapor edilmiştir [17]. Spesifik yüzey alanının artırılması ile ligninoselülozik materyelin hidrolizinde materyal türü, öğütme şekli ve süresine bağlı olarak % 5 – 25 oranında artış, aynı zamanda hidroliz süresinde de % 23-59 oranında azalmanın olduğu rapor edilmiştir [84]. Tanecik boyutu 40 mesh'in (385 µm) üzerinde yapılan öğütmenin ise hidroliz verimi ve hızında daha az etkili olduğu bildirilmiştir [85].

4.2.2. Ultrasonik Ön İşlemler

Tanecik boyutunun etkisinin çalışıldığı kısım sonunda her bir hammadde için optimum TK ve İŞ miktarının saptandığı 6 numaralı elekten alınan numuneler ile ultrasonik ön işlem çalışmaları da dahil olmak üzere diğer tüm ön işlem çalışmaları yapılmıştır. Ultrasonik ön işlemlerin TK ve İŞ miktarları üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla MK, MS, BK, BS'nın ayrı ayrı 1g/L, 5 g/L, 10 g/L ve 20 g/L'lik çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler 100 mL erlenlere 50 mL olacak şekilde eklenmiştir. 15-120 dk arasında değişen sürelerde ultrasonik dalgaların etkisi araştırılmıştır.

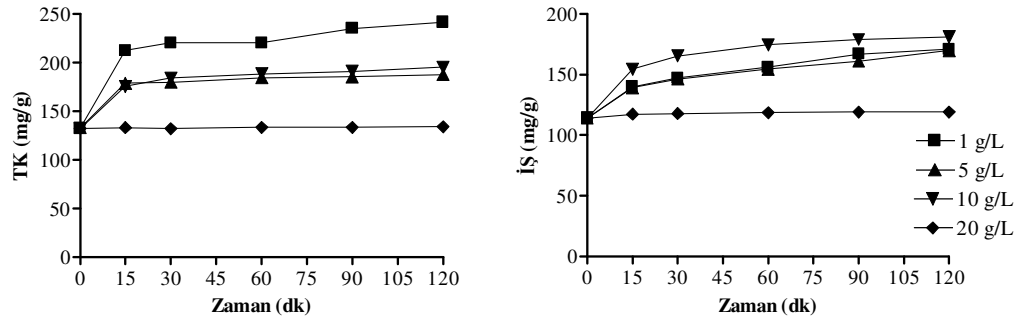
MK ile yapılan çalışmalar sonucunda 1g/L derişim için TK değerinde zamanla artış saptanmış, çalışılan diğer derişimlerde ise anlamlı bir artış belirlenmemiştir. İŞ değerlerinde ise tüm konsantrasyonlar için zamanla belirgin bir artış saptanmamıştır (Şekil 4.2.). 1 g/L derişimde Ultrasonik uygulama süresi ile 1

g/L için TK değerinin 60.dk'ya kadar lineer bir şekilde arttığını ve daha sonra azalan bir artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.2.). Ayrıca yüksek derişimlerde daha düşük TK ve İŞ saptanması ultrasonik dalgaların artan derişimle birlikte yeterli etkileşime girmediği fikrini doğurmuştur.



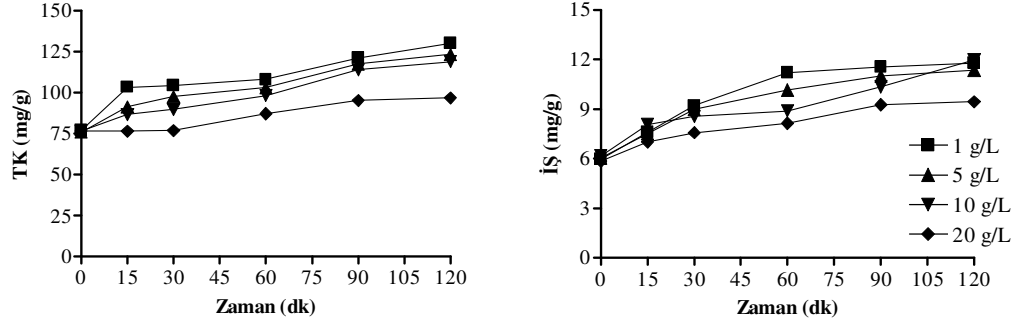
Şekil 4.2. MK ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi.

MS ile yapılan çalışmalarda ise 1, 5 ve 10 g/L derişimlerde ilk 15 dakika sonunda TK miktarında hızlı bir artış görülürken 20 g/L'lik ortamda artış saptanmamıştır. 120 dk boyunca 1, 5 ve 10 g/L'lik ortamlardaki İŞ miktarı artış gösterirken, 20 g/L'lik ortamlarda artış söz konusu değildir. MK'ya benzer şekilde yoğun ortam olan 20 g/L'de ultrasonik dalgaların etkisi ile TK değişimi, seyreltik ortam olan 1g/L'ye göre oldukça düşük olmuştur (Şekil 4.3.).



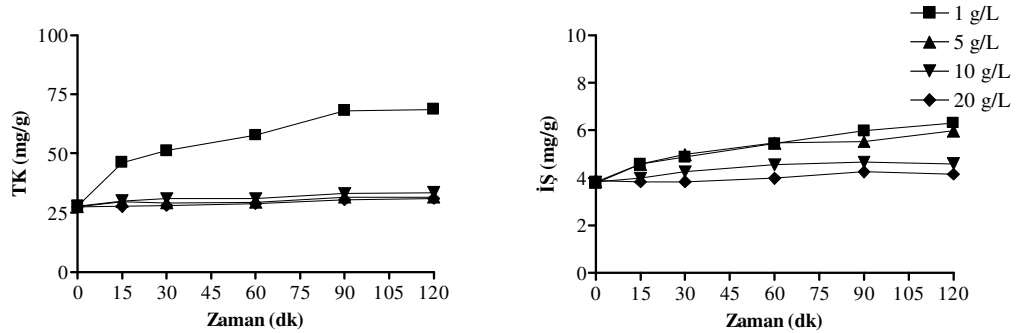
Şekil 4.3. MS ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi.

BK ile yapılan çalışma bulgularına göre, zamanla TK değişimi kullanılan materyalin derişimi ters orantılı olarak artmıştır. İŞ miktarlarında ise tüm derişimler için artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. BK ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi.

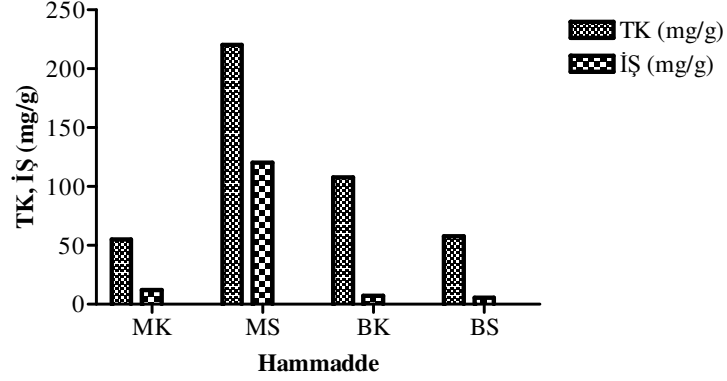
BS ile yapılan çalışmada ise 1 g/L derişimde TK değerinde 90. dk'ya kadar artış gözlemlenmiştir. Diğer derişimlerde ise önemli bir artış gözlenmemiştir. İŞ değerlerinde ise 1 ve 5 g/L için artış gözlemlenirken 10 ve 20 g/L için artış önemsenecek seviyede saptanmamıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. BS ile yapılan ultrasonik işlemler sonucu TK ve İŞ değişimi.

Ultrasonik ön işlem çalışmalarının bu kısmında 120 dk'lık işlem süresi yeterli olmasına rağmen ortamın ısınması ve ilk 60 dk'dan sonra TK ve İŞ miktarlarında önemli değişimlerin gözlenmemesi nedeni ile 60 dk'lık işlem süresi optimum süre olarak belirlenmiştir. TK açısından değerlendirilme yapıldığında bütün hammaddeler için 1 g/L derişim de saptanan artışlar diğer derişimlere göre daha

fazladır. Bu nedenle ultrasonik çalışmalar sonunda optimum hammadde derişimi 1 g/L olarak saptanmıştır. Tüm hammaddeler için 1 g/L derişimde 60 dk sonunda saptanan TK ve İŞ miktarları Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Ultrasonik ön işlem çalışmaları sonunda saptanan TK ve İŞ değerleri (1 g/L derişim ve 60 dk'lık işlem sonrası).

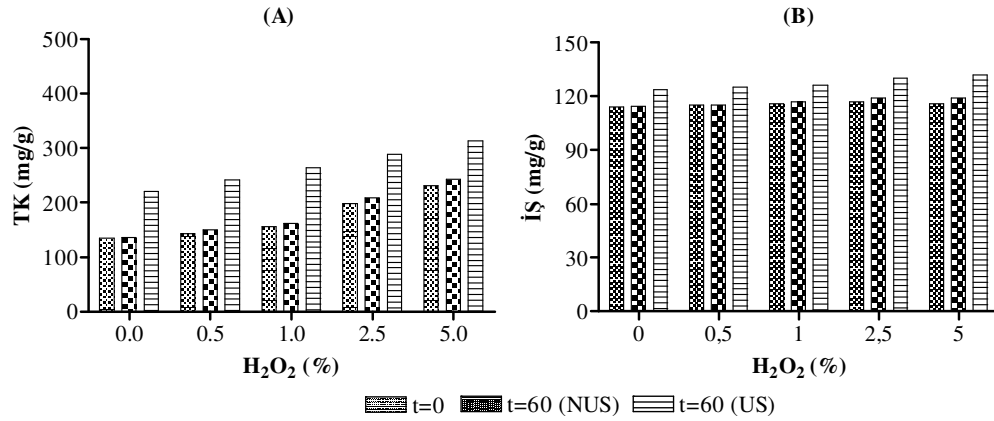
Ön işlem çalışmalarının amacı TK miktarını artırmak ve aynı zamanda TK bünyesinde olan İŞ miktarlarını ortaya çıkartmaktır. Sadece TK'daki artış fermentasyon için gerekli olan heksozlar ve pentozlardaki artışı ifade etmemektedir. Bu çalışmada İŞ oranının artırılması ile fermente olabilir ürünlerin artırılması hedeflenmektedir.

MS ile yapılan çalışmada 1g/L derişim için 60 dk sonunda TK miktarı 220,21 mg/g'ye ulaşmıştır. Aynı koşullarda İŞ miktarı ise 120,33 mg/g olarak ölçülmüştür. 10g/L'de ise 60 dk sonunda 174,65 mg/g İŞ ve TK değeri ise 188,67 mg/g olarak ölçülmüştür. Çalışmanın amacı yüksek TK'lar elde edip bu TK'lar içindeki İŞ miktarını artırmak olduğu için optimum değer 1 g/L olarak belirlenmiştir.

4.2.2.1. Ultrasonik işlemlerde ortama eklenen H₂O₂, NaOH, ve H₂SO₄'ün etkisi

MS ile yapılan çalışmalar

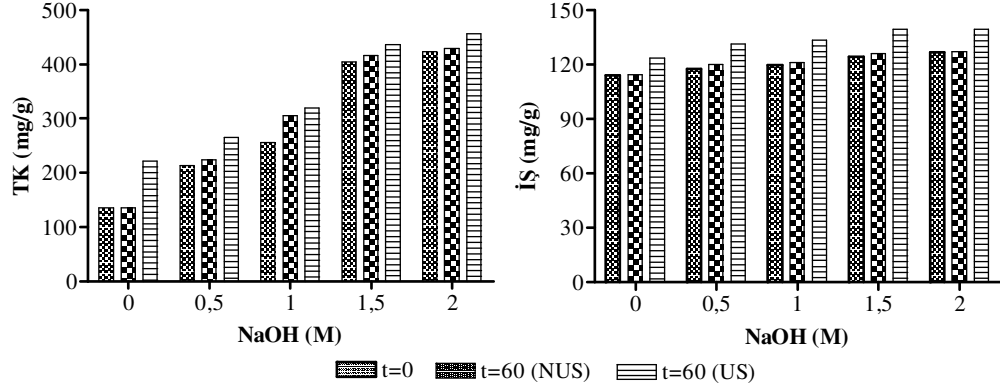
MS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂O₂ derişimine bağılı olarak artış saptanırken (kontrol: 135,44; % 5,0 H₂O₂ içeren ortam 243,11 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandıında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂O₂ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 313,25 mg/g TK ve 132,05 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 243,11 ve 119,07 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.7.'de görülmektedir.



Şekil 4.7. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂O₂'in etkisi (1 g/L MS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

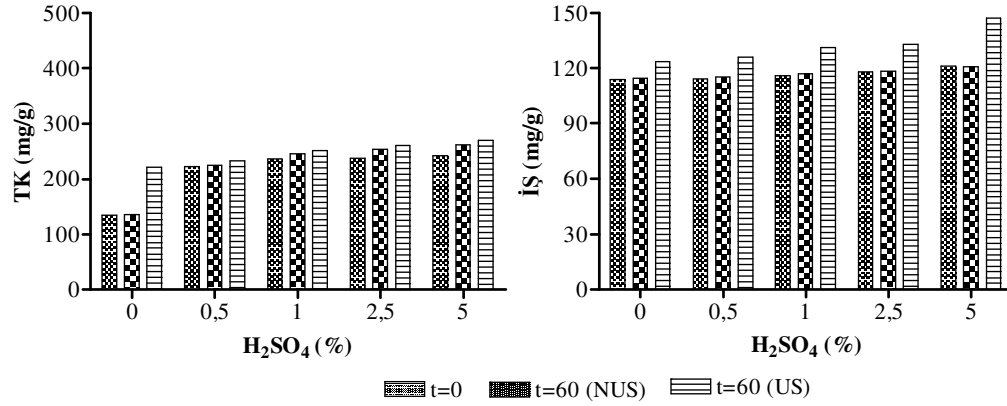
MS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen NaOH derişimine bağılı olarak artış saptanırken (kontrol: 135,44; 2,0 M NaOH içeren ortam 429,15 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandıında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar

saptanmıştır. Örneğin 2,0 M NaOH içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 456,68 mg/g TK ve 139,45 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 429,15 ve 127,427 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.8.'de görülmektedir.



Şekil 4.8. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi (1 g/L MS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

MS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂SO₄ derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 135,44; % 5,0 H₂SO₄ içeren ortam 262,12 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 270,11 mg/g TK ve 147,84 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 262,12 ve 120,99 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9.'de verilmiştir.

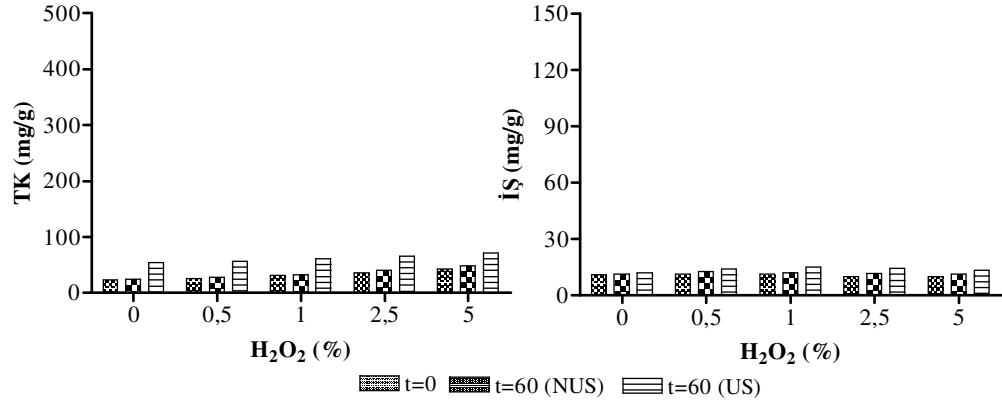


Şekil 4.9. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂SO₄'in etkisi (1 g/L MS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

MS ile yapılan çalışmalar sonucunda TK açısından en etkili kimyasalın NaOH olduğu İŞ açısından ise kimyasallar arasında gözle görülür bir farkın olmadığı saptanmıştır.

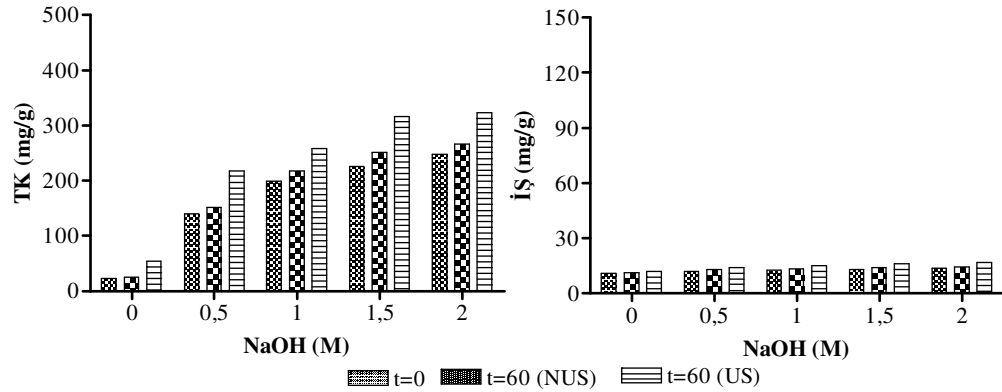
MK ile yapılan çalışmalar

MK ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂O₂ derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 25,01; % 5,0 H₂O₂ içeren ortam 48,98 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂O₂ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 71,33 mg/g TK ve 13,32 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 48,98 ve 11,23 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.10.'da görülmektedir.



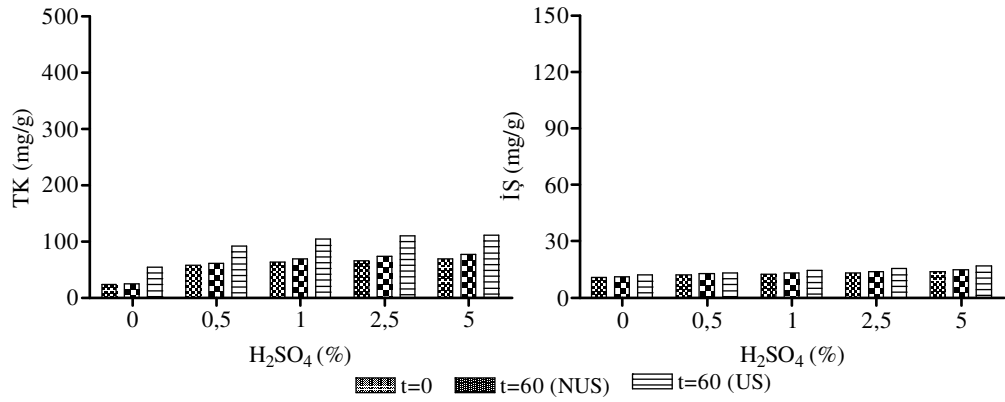
Şekil 4.10. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂O₂'in etkisi (1 g/L MK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

MK ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen NaOH derişimine bağı olarak artış saptanırken (kontrol: 25,01; 2,0 M NaOH içeren ortam 266,41 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 NaOH içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 323,18 mg/g TK ve 16,76 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 266,41 ve 14,30 mg/g olarak saptanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi (1 g/L MK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

MK ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂SO₄ derişimine bağı olarak artış saptanırken (kontrol: 25,01; % 5,0 H₂SO₄ içeren ortam 77,16 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 111,25 mg/g TK ve 16,87 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 77,16 ve 14,76 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.12.'de görülmektedir.

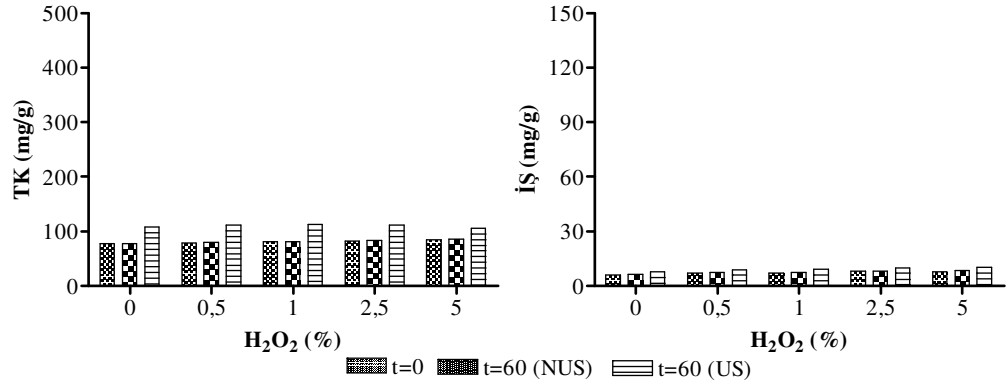


Şekil 4.12. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂SO₄'in etkisi (1 g/L MK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

MK ile yapılan çalışmalarda sonucunda TK açısından en etkili kimyasalın NaOH olduğu İŞ açısından ise kimyasallar arasında bir farkın olmadığı saptanmıştır.

BK ile yapılan çalışmalar

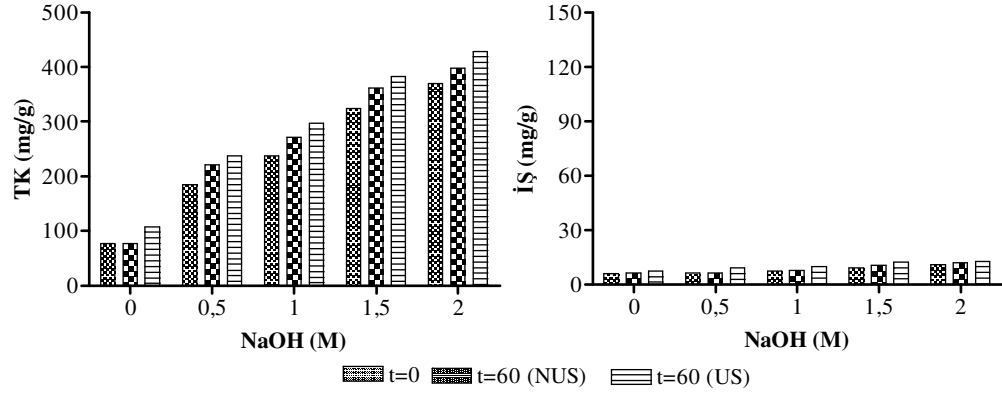
BK ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H_2O_2 derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 77,04; % 5,0 H_2O_2 içeren ortam 75,60 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H_2O_2 içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 112,01 mg/g TK ve 10,09 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 75,60 ve 8,55 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.13.'de görülmektedir.



Şekil 4.13. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H_2O_2 'in etkisi (1 g/L BK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

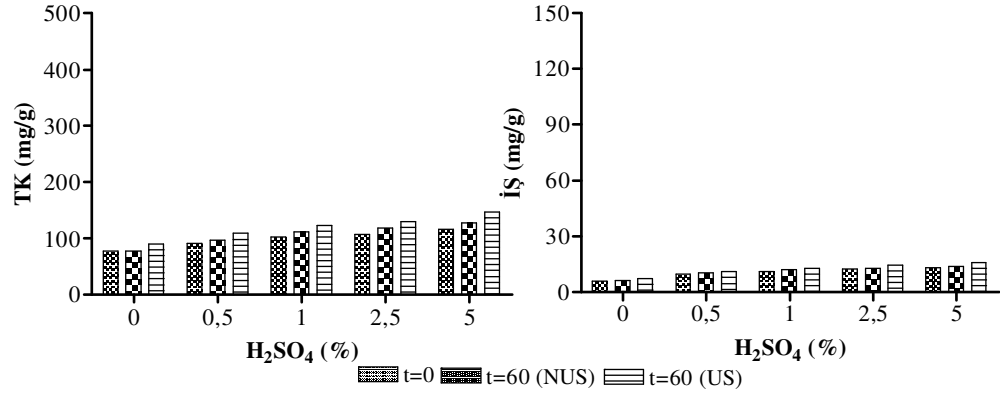
BK ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen NaOH derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 77,04; 2,0 M NaOH içeren ortam 398,08 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin 2,0 M NaOH içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 428,91 mg/g TK ve 12,87 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan

ortamda 398,08 ve 11,89 mg/g olarak saptanmıştır. TK artışı İŞ'ye göre daha yüksek olmuştur. Sonuçlar Şekil 4.14.'de görülmektedir.



Şekil 4.14. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi (1 g/L BK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂SO₄ derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 77,04; % 5,0 H₂SO₄ içeren ortam 127,65 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 146,54 mg/g TK ve 16,01 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 127,65 ve 14,00 mg/g olarak saptanmıştır. TK artışı İŞ'ye göre daha yüksek olmuştur. Sonuçlar Şekil 4.15.'de görülmektedir.

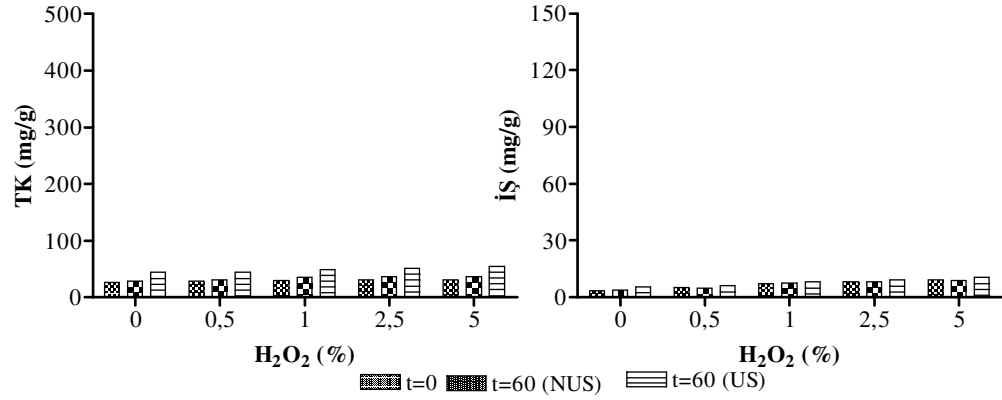


Şekil 4.15. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂SO₄'in etkisi (1 g/L BK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BK ile yapılan çalışmalar sonucunda TK açısından en etkili kimyasalın NaOH olduğu İŞ açısından ise kimyasallar arasında farkın olmadığı saptanmıştır.

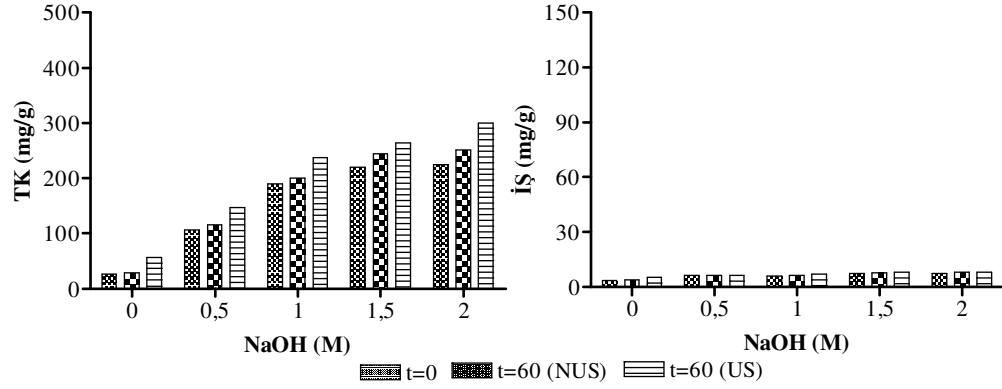
BS ile yapılan çalışmalar

BS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂O₂ derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 28,52; % 5,0 H₂O₂ içeren ortam 36,70 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂O₂ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 55,21 mg/g TK ve 10,45 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 36,70 ve 8,99 mg/g olarak saptanmıştır. TK artışı İŞ'ye göre daha yüksek olmuştur. Sonuçlar Şekil 4.16.'da görülmektedir.



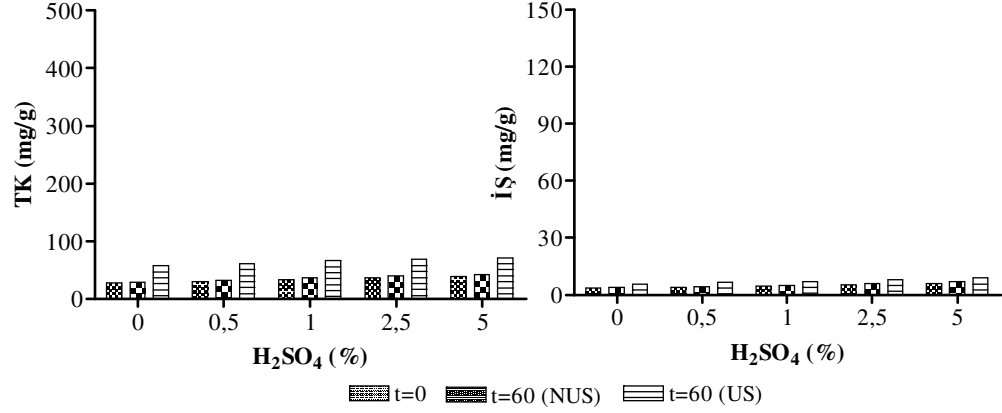
Şekil 4.16. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂O₂'in etkisi (1 g/L BS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen NaOH derişimine bağılı olarak artış saptanırken (kontrol: 28,52; 2,0 M NaOH içeren ortam 251,08 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin 2,0 M NaOH içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 300,81 mg/g TK ve 8,34 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 251,08 ve 7,98 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.17.'de görülmektedir.



Şekil 4.17. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde NaOH'in etkisi (1 g/L BS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BS ile ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan işlemlerde 60 dk'lık işlem sonunda TK miktarlarında eklenen H₂SO₄ derişimine bağlı olarak artış saptanırken (kontrol: 28,52; % 5,0 H₂SO₄ içeren ortam 41,33 mg/g) İŞ miktarlarında ise artış belirlenmemiştir. Ultrasonik işlem uygulandığında ise süre sonunda TK ve İŞ miktarlarında ultrasonik işlem uygulanmadan yapılan çalışmalara göre artışlar saptanmıştır. Örneğin % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda ultrasonik işlem sonunda 71,11 mg/g TK ve 8,80 mg/g İŞ elde edilirken bu değerler ultrasonik işlem uygulanmayan ortamda 41,33 ve 7,02 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.18.'de görülmektedir.



Şekil 4.18. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere farklı derişimlerde H₂SO₄'in etkisi (1 g/L BS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BS ile yapılan çalışmalar sonucunda TK açısından en etkili kimyasalın NaOH olduğu IŞ açısından ise kimyasallar arasında farkın olmadığı saptanmıştır.

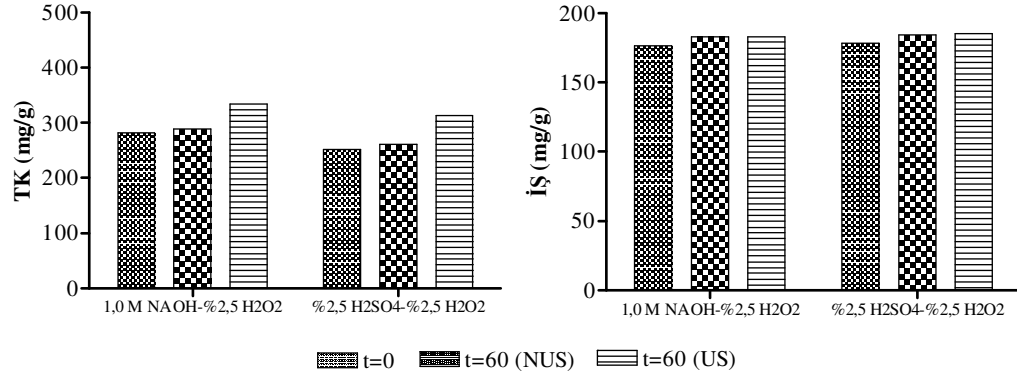
Çalışmalar sonucunda tüm hammaddeler için NaOH derişimini artmasıyla TK miktarlarında artış saptanmıştır. IŞ miktarlarına bakıldığında ise kullanılan kimyasal maddelerin TK değişiminde olduğu gibi bir etkisinin bulunmadığı görülmektedir. En yüksek TK ve IŞ değerlerine MS ile yapılan çalışmada 2,0 M NaOH ile ulaşılmıştır.

H₂O₂ ile birlikte NaOH ve H₂SO₄'ün etkisi

H₂O₂, NaOH ve H₂SO₄ ayrı ayrı denenmesinin ardından optimum değerler olarak belirlenen miktarlar olan % 2,5 H₂O₂ - 1,0 M NaOH ve % 2,5 H₂O₂ - % 2,5 H₂SO₄ karışımları oluşturulmuş ve bu şekilde ultrasonik ön işlemlerin TK ve IŞ'ye etkisi araştırılmıştır.

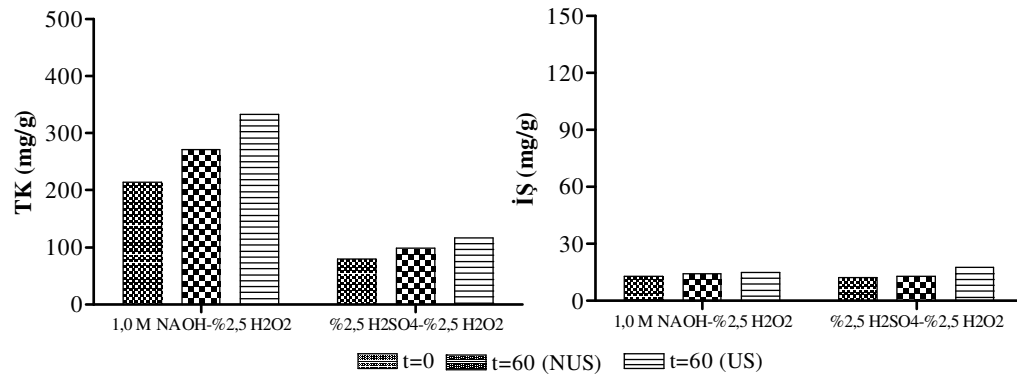
MS ile ultrasonik işlem uygulanarak yapılan işlemlerde; NaOH-H₂O₂ karışımında saptanan TK değeri (333,74 mg/g) H₂SO₄-H₂O₂ karışımında saptanan

değerlerden (313,25 mg/g) daha fazla bulunmuştur. İŞ açısından bakıldığında ise karışım çözeltilerin etkisinin olmadığı saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.19.'da verilmiştir.



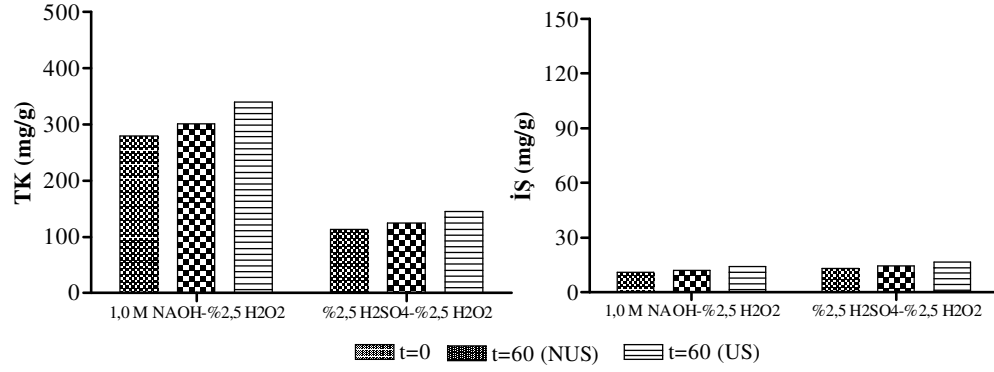
Şekil 4.19. MS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi (1 g/L MS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

MK ile ultrasonik işlem uygulanarak yapılan işlemlerde; NaOH-H₂O₂ karışımında saptanan TK değeri (309,22 mg/g) H₂SO₄-H₂O₂ karışımından (110,24 mg/g) daha yüksek bulunmuştur. İŞ açısından bakıldığında ise karışım çözeltilerin etkisinin olmadığı saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.20.'de verilmiştir.



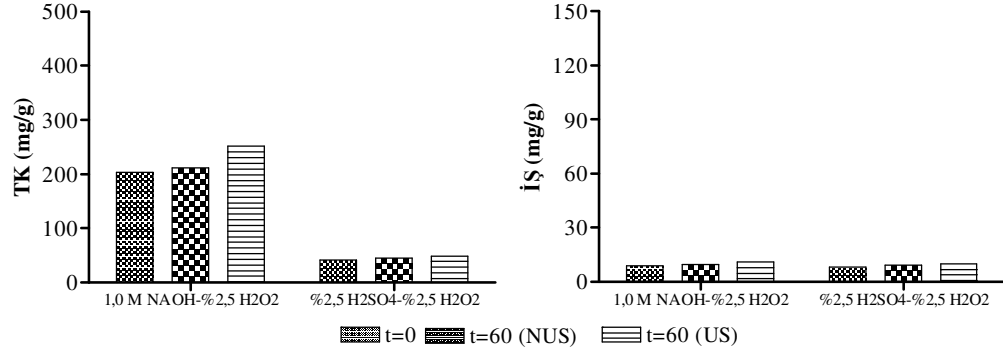
Şekil 4.20. MK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi (1 g/L MK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BK ile ultrasonik işlem uygulanarak yapılan işlemlerde; NaOH-H₂O₂ karışımında saptanan TK değeri (en yüksek değerdir: 340,08 mg/g) H₂SO₄-H₂O₂ karışımından (145,87 mg/g) daha yüksek bulunmuştur. İŞ açısından bakıldığında ise karışım çözeltilerin etkisinin olmadığı saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.21.'de verilmiştir.



Şekil 4.21. BK ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi (1 g/L BK, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

BS ile ultrasonik işlem uygulanarak yapılan işlemlerde; NaOH-H₂O₂ karışımında saptanan TK değeri (250,14 mg/g) H₂SO₄-H₂O₂ karışımına (48,54 mg/g) göre oldukça yüksek bulunmuştur. İŞ açısından bakıldığında ise karışım çözeltilerin etkisinin olmadığı saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.22.'de verilmiştir.



Şekil 4.22. BS ile yapılan ultrasonik ön işlemlere karışım çözeltilerin etkisi (1 g/L BS, ultrasonik işlem süresi 60 dk, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, NUS: ultrasonik işlem görmeyen numuneler, US: ultrasonik işlem gören numuneler).

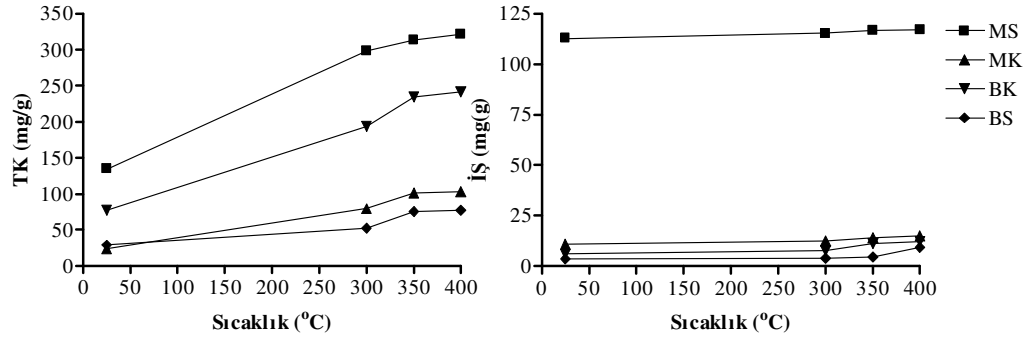
% 2,5 H₂O₂ - 1,0 M NaOH ve % 2,5 H₂O₂ - % 2,5 H₂SO₄ karışımları ile gerçekleştirilen ultrasonik olmayan ve ultrasonik ön işlemlerin sonucunda en yüksek verimler BK'inde en düşük verimler ise BS'de saptanmıştır.

Sun ve ark [86], şeker kamışı posası içeriğindeki hemiselüloz ve lignini ortamdan ayırabilmek için ultrasonik ön işlemlerin etkisini çalışmışlardır. Çalışma safsu, alkali (NaOH, 0,5-2,0 M arası) ve alkali H₂O₂ (% 0,5-3,0 arası) ortamlarda yapılmıştır. Araştırmacılar çalışma sonucunda alkali H₂O₂ içeren ortamlarda ultrasonik dalgaların etkisiyle hücre duvarında bulunan lignin ve hemiselüloz arasındaki bağların kırıldığını, lignin ve hemiselülozun % 90'a kadar serbest hale geldiğini ve ekstrakte edilebildiğini rapor etmişlerdir.

4.3. KİMYASAL ÖN İŞLEMLER

4.3.1. Piroliz

Hammaddelere farklı sıcaklıklarda 20 dk'lık piroliz uygulaması sonrası saptanan TK ve İŞ değerleri Şekil 4.23.'de sunulmuştur.



Şekil 4.23. Piroliz uygulaması sonrası saptanan TK ve İŞ değerleri.

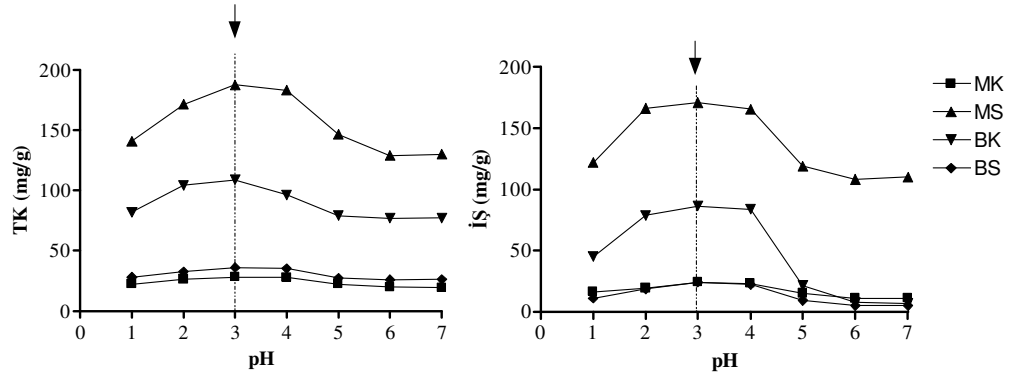
Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi TK değerlerinde uygulama sıcaklığındaki artışa paralel olarak artış saptanırken, İŞ değerlerinde ise anlamlı bir artış belirlenmemiştir. MS, MK, BK ve BS için başlangıçta saptanan TK değerleri sırası ile 134,58; 24,01; 76,89 ve 28,76 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 400 °C'lik piroliz uygulamasından sonra sırası ile 321,34; 103,21; 241,31 ve 77,23 mg/g'a ulaşmıştır. İŞ değerleri ise MS, MK, BK ve BS için başlangıçta 113,09; 11,25; 5,87; ve 3,72 mg/g ve 400 °C'lik piroliz uygulamasından sonra sırası ile 117,10; 14,98; 12,13 ve 9,34 mg/g olarak saptanmıştır. Yu ve Zhang [56], piroliz ile uygulamanın odunsu bitkiler gibi lignin içeriği yüksek hammaddeler için daha uygun olduğunu, pirolizin tek başına bir sakkarifikasyon yöntemi değil bir ön basamak olabileceğini ve en önemli dezavantajının yüksek enerji gereksinimi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma bulguları ışığında piroliz işleminin; İŞ oluşumu açısından verimsiz ve yüksek enerjiye ihtiyacı olması nedeniyle, sakkarifikasyon için uygun olmadığı kararına varılmıştır.

4.3.2. Fenton Oksidasyonu

4.3.2.1. pH optimizasyonu

Yüksek pH değerlerinde H₂O₂ daha fazla çözüneceği için teorik olarak reaksiyon veriminin daha yüksek olması beklenmektedir. Ancak fenton oksidasyonu için Fe²⁺ kullanılıyor olması yüksek pH'larda (>6,0) demirin Fe(OH)₃ şeklinde

çökmesine neden olmaktadır. Buda verimin düşmesine neden olur. Bu nedenle araştırmacılar fenton oksidasyonu için optimum pH aralığının 2 ile 4 arasında olduğunu belirtmişlerdir [87]. Bu çalışmada 7 farklı pH'da denemeler yapılmış ve optimum pH 3 olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.24.'de verilmiştir.

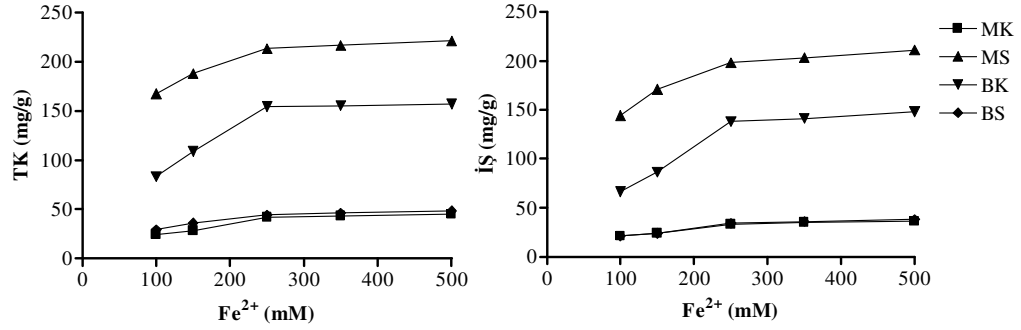


Şekil 4.24. Fenton oksidasyonunda pH optimizasyonu (1 g/L hammadde, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, Fe²⁺ 150 mM, H₂O₂ 250 mM, 30 dk reaksiyon süresi).

Şekil 4.24.'de de görüldüğü gibi verimli pH aralığı 2-4'tür Ancak pH 3'de tüm hammaddeler için en yüksek değerler elde edilmiştir. MK, MS, BK ve BS için pH 3'de saptanan TK değerleri sırası ile 28,18; 187,87; 108,92 ve 36,14 mg/g, İŞ değerleri ise 24,22; 171,12; 86,54 ve 24,19 mg/g olarak saptanmıştır.

4.3.2.2. Fe²⁺ derişiminin optimizasyonu

pH'nın 3 olarak belirlenmesinden sonra Fe²⁺ derişiminin etkisini saptamak amacıyla 5 farklı Fe²⁺ derişimi (100, 150, 250, 350 ve 500 mM) çalışılmıştır. Fenton oksidasyonunda Fe²⁺/H₂O₂'in molar oranı reaksiyon verimin etkilediği için öncelikle Fe²⁺ derişimi optimize edilmiştir. Çalışmada H₂O₂ 250 mM olarak sabitlenmiştir. Reaksiyon sonunda (Şekil 4.25.) optimum Fe²⁺ derişimi 250 mM olarak saptanmıştır.

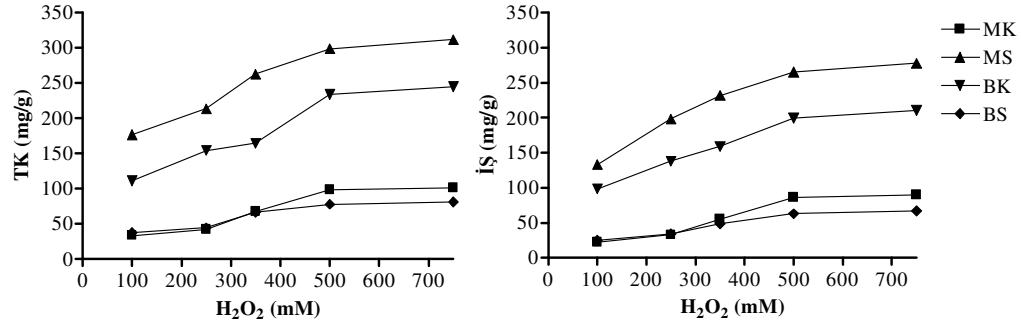


Şekil 4.25. Fenton oksidasyonunda Fe²⁺ derişiminin optimizasyonu (1 g/L hammadde, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, pH 3, H₂O₂ 250 mM, 30 dk reaksiyon süresi).

250 mM Fe²⁺ derişimine kadar hem TK miktarında hem de İŞ miktarında artışın gerçekleştiği Şekil 4.25.'de görülmektedir. Ancak 250 mM Fe²⁺ derişiminden daha yüksek derişimlerde TK ve İŞ değerlerindeki artış hemen hemen durmuştur. Ayrıca daha fazla demir kullanılması ekonomik açıdan da uygun değildir. Optimum değer olarak belirlenen 250 mM Fe²⁺ derişiminde MK, MS, BK ve BS için saptanan TK değerleri sırası ile 42,12; 213,22; 154,23 ve 44,34 mg/g, İŞ değerleri ise 33,21; 198,23; 138,23 ve 34,21mg/g olarak saptanmıştır.

4.3.2.3. H₂O₂ derişiminin optimizasyonu

pH'nın 3, Fe²⁺'nin 250 mM derişimde optimum değerlerinin belirlenmesinin ardından H₂O₂ miktarının etkisini belirlemek amacıyla 5 farklı H₂O₂ derişimi (100, 250, 350, 500 ve 750 mM) çalışılmıştır. Çalışma sonunda artan H₂O₂ ile birlikte TK ve İŞ değerleri artarken 500 mM'dan daha yüksek derişimlerde be değerlerdeki artış önemsizleşmiştir. Bu nedenle optimum değer 500 mM olarak belirlenirken, optimum Fe²⁺/H₂O₂'in molar oranı ise 0,5 olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.26.'de verilmiştir.

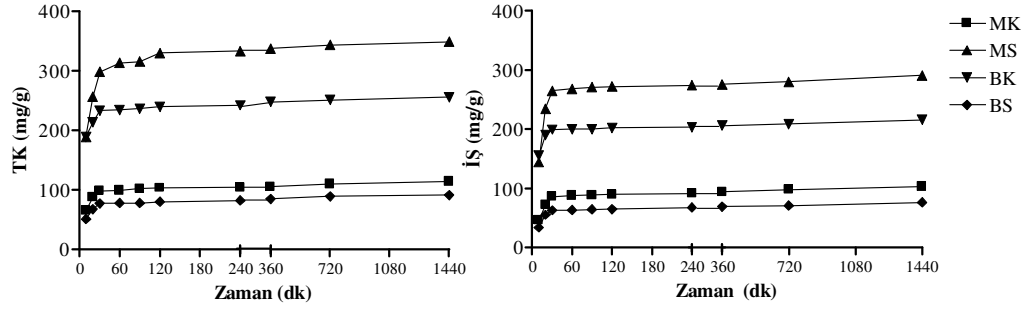


Şekil 4.26. Fenton oksidasyonunda H₂O₂ derişiminin optimizasyonu (1 g/L hammadde, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, pH 3, Fe²⁺ 250 mM, 30 dk reaksiyon süresi).

Optimum değer olarak belirlenen 500 mM H₂O₂ derişiminde MK, MS, BK ve BS için saptanan TK değerleri sırası ile 98,34; 298,12; 233,45 ve 77,65 mg/g, İŞ değerleri ise 86,12; 265,28; 199,34; 63,12 mg/g olarak saptanmıştır.

4.3.2.4. Reaksiyon süresinin etkisi

Fenton oksidasyonunda reaksiyon süresinin kullanılan hammaddeye göre saniyelerden günlere kadar devam edebileceği bildirilmiştir [26]. Bu nedenle optimum koşulların saptanmasının ardından reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla 10 – 1440 dk arasında değişen sürelerde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda hammaddelerin tümü için genel olarak reaksiyonun 60. dk'dan sonra sabitlendiği (MK ile TK derişiminde 120 dk) saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.27.'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Fenton oksidasyonunda reaksiyon süresinin etkisi (1 g/L hammadde, oda sıcaklığı, 100 mL çalışma hacmi, pH 3, Fe²⁺ 250 mM, H₂O₂ 500 mM).

Şekilde de görüldüğü üzere 60 dk reaksiyon süresi yeterlidir. 60 dk'lık işlem sonunda MK, MS, BK ve BS için saptanan TK değerleri sırası ile 99,13; 313,23; 234,40 ve 77,89 mg/g, IŞ değerleri ise 88,22; 268,23; 200,12 ve 63,44 mg/g olarak saptanmıştır.

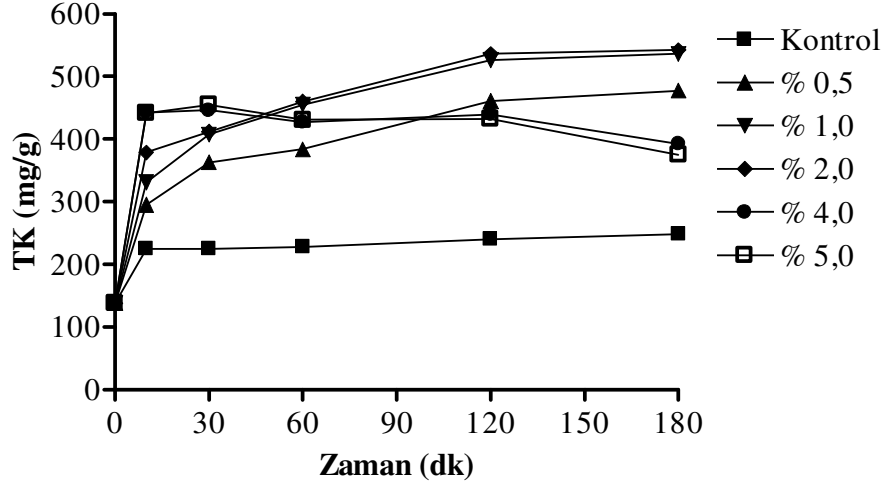
Fenton oksidasyonu çalışmaları sonucunda TK ve IŞ miktarlarında kontrol gruplarına göre artışlar saptanmıştır. Ancak reaksiyon sonunda oluşan çamur, demirin oksitlenmesi sonucu oluşan renk ve kullanılan kimyasal madde miktarının fazla oluşu bu sistemin önemli dezavantajlarıdır.

4.3.3. Seyreltik H₂SO₄'ün Etkisi

4.3.3.1. MS ile yapılan çalışmalar

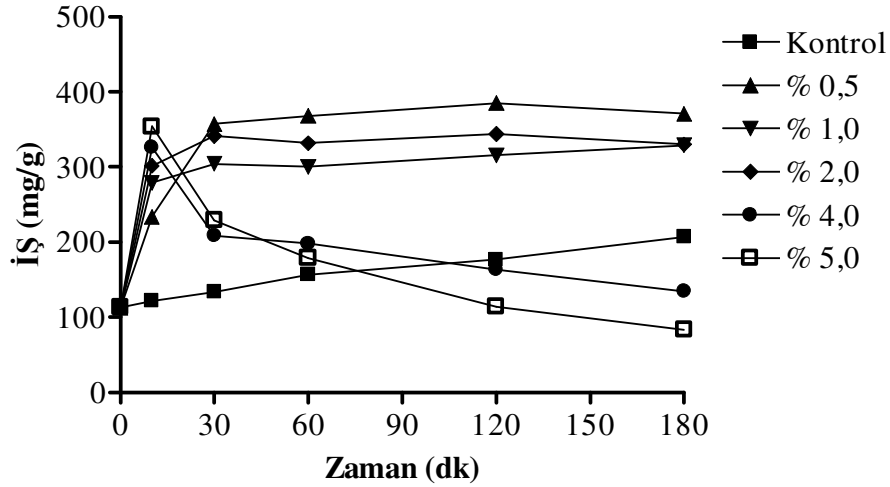
MS ile yapılan çalışmada TK değişimi Şekil 4.28.'de verilmiştir. En yüksek TK miktarı 180. dakika sonunda % 2,0 H₂SO₄ içeren ortamda 542,12 mg/g olarak saptanmıştır. Ancak 120. dk'dan sonra TK 536,61 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu nedenle optimum ısı işlem süresi 120 dk olarak belirlenmiştir. Asit içermeyen ortam (Kontrol) ile asit içeren ortamlar kıyaslandığında ise ısı asidik ön işlemin oldukça etkili olduğu görülmektedir. % 4 ve % 5 asit içeren ortamlarda ise 30 dk. dan sonra TK derişiminde azalma saptanmıştır (örneğin % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda 30 dk'da

TK; 454,81 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 375,43 mg/g olarak belirlenmiştir). Bu azalışa neden olarak karbonhidrat yapısının artan asidik ortam ve ısı ile bozulduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.28. MS ile yapılan ısıt seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

MS ile yapılan çalışmada asit derişiminin % 2'ye kadar artışıyla İŞ değerinde de artış saptanmıştır. İŞ değişimine bakıldığında en yüksek İŞ miktarı 10. dk sonunda % 0,5 H₂SO₄ içeren ortamda 385,04 mg/g olarak saptanmıştır. Bu dakikadan sonra ise daha fazla artış saptanmamıştır. Asit içermeyen ortam (kontrol) ile asit içeren ortamlar kıyaslandığında ise ısıt asidik ön işlemin oldukça etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.29.). TK değişiminde olduğu gibi İŞ'de de % 4 ve % 5 asit içeren ortamlarda 10. dk'dan sonra azalış görülmektedir.

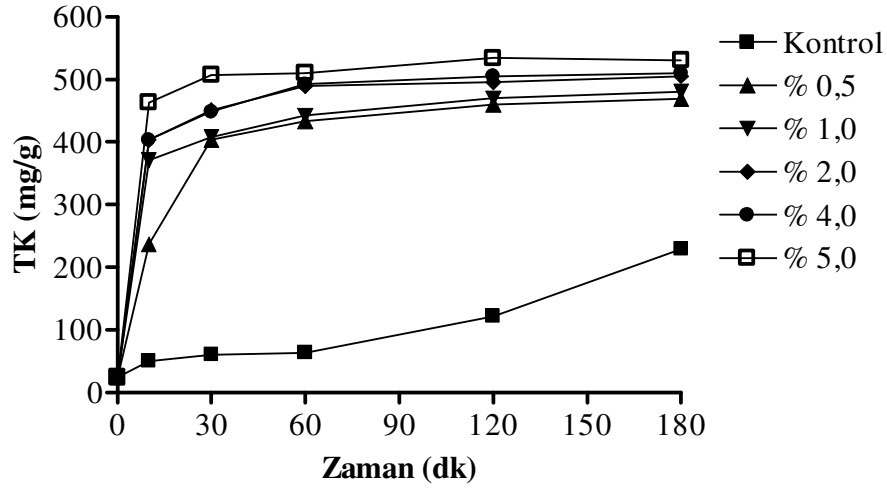


Şekil 4.29. MS ile yapılan ısıl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Aldoz ve ketozlar (İndirgen şekerler) asit çözeltilerinde ısıtıldıklarında dehidrasyona uğrayarak furan türevleri oluşmaktadır [89]. Aldopentozların dehidrasyonu ile furfurallar, aldohexozların dehidrasyonu ile hidroksimetil furfurallar (HMF) oluşur. HMF ve furfurallar daha sonra parçalanarak levülinik asit, formik asit, laktik asit, asetik asit, asetal gibi ürünlere dönüşürler [89]. Bu durum yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir. Öncelikle TK ve İŞ artışı görülürken zamanla bu değerlerin azalışı sonuçların literatür ile örtüştüğünü göstermektedir.

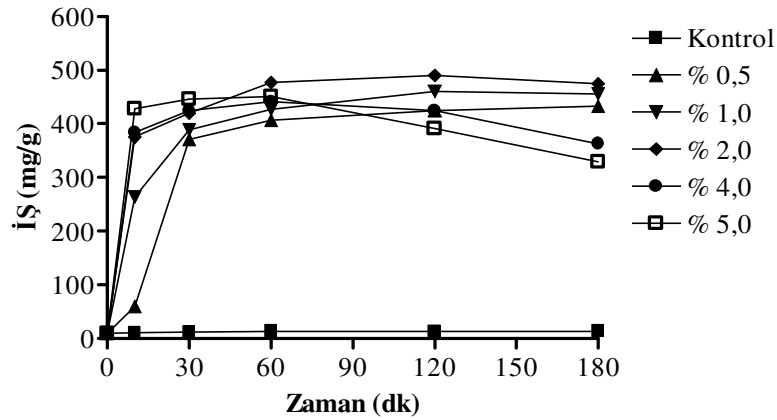
4.3.3.2. MK ile yapılan çalışmalar

MK ile yapılan çalışmada TK değişimi Şekil 4.30.'da verilmiştir. En yüksek TK miktarı 180. dakika sonunda % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda 534,24 mg/g olarak saptanmıştır. Ancak tüm ortamlar için 60. dk'dan sonra TK miktarlarında değişimler saptanmamıştır. Asit içermeyen ortam ile asit içeren ortamlar kıyaslandığında ise ısıl asidik ön işlemin oldukça etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.30. MK ile yapılan ısıl seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

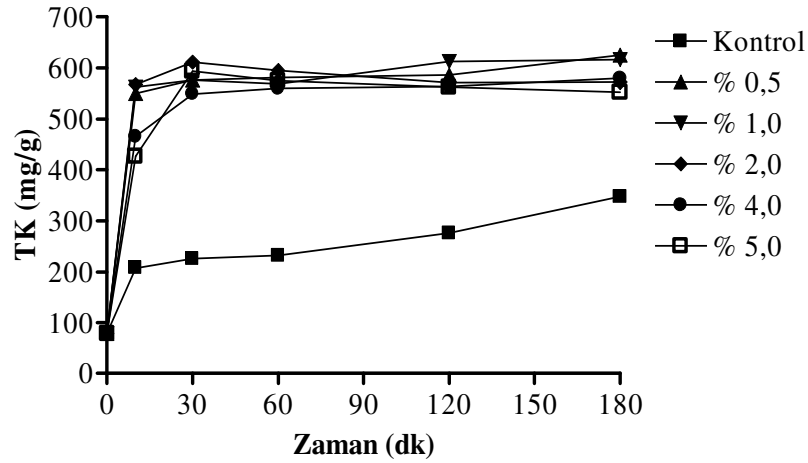
MK ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında (Şekil 4.31.) en yüksek İŞ miktarı 120. dk sonunda % 2,0 H₂SO₄ içeren ortamda 490,23 mg/g olarak saptanmıştır. Yüksek asit içeren ortamlarda ise (% 4 ve 5) 30. dk'dan sonra azalış belirlenmiştir (örneğin % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda 30 dk'da TK; 446,81 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 329,86 mg/g olarak belirlenmiştir). Asit içermeyen ortam ile asit içeren ortamlar kıyaslandığında ise ısıl asidik ön işlemin oldukça etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.31. MK ile yapılan ısıl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

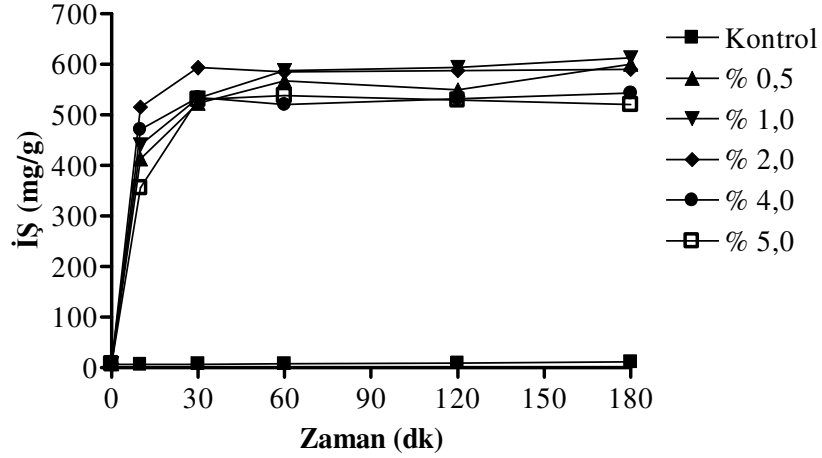
4.3.3.3. BK ile yapılan çalışmalar

BK ile yapılan çalışmada TK değişimine bakıldığında (Şekil 4.32) en yüksek TK miktarı 180. dakika sonunda % 0,5 H₂SO₄ içeren ortamda 625,39 mg/g olarak saptanmıştır. Ayrıca % 2 asit içeren ortamda da 30. dk sonunda 611,73 mg/g olarak saptanmıştır. Uzun sıcaklık uygulama daha fazla maliyet getireceği için % 2 asit içeren ortamda 30 dk.'lık uygulama optimum değer kabul edilebilir. 30. dk'dan sonra asit içeren ortamlarda saptana TK değerlerinde dikkate değer bir değişim saptanmamıştır.



Şekil 4.32. BK ile yapılan ısıt seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

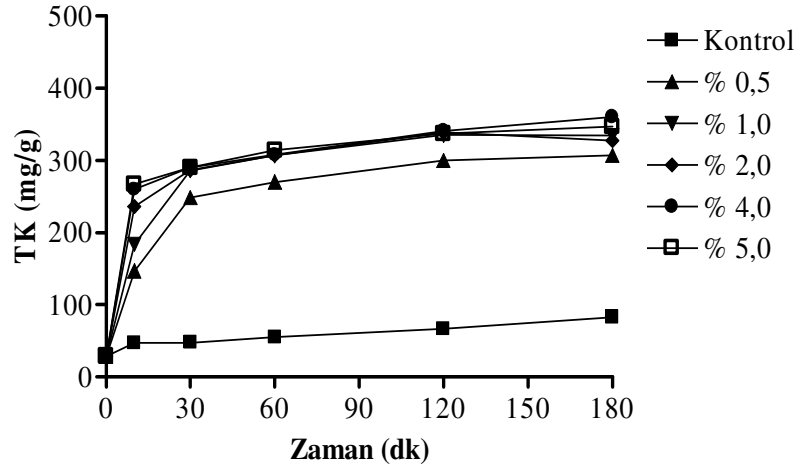
BK ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında (Şekil 4.33) en yüksek İŞ miktarı 180. dk sonunda % 1,0 H₂SO₄ içeren ortamda 612,14 mg/g olarak saptanmıştır. % 0,5 H₂SO₄ içeren ortamlarda 180. dk'dan sonra ise 601,34 mg/g olarak belirlenmiştir. Diğer ortamlarda ise 60. dk'dan sonra artış gözlenmemiştir. Asit içermeyen ortam ile asit içeren ortamlar kıyaslandığında ise ısıt asidik ön işlemin oldukça etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.33. BK ile yapılan ısıl seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BK, , 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

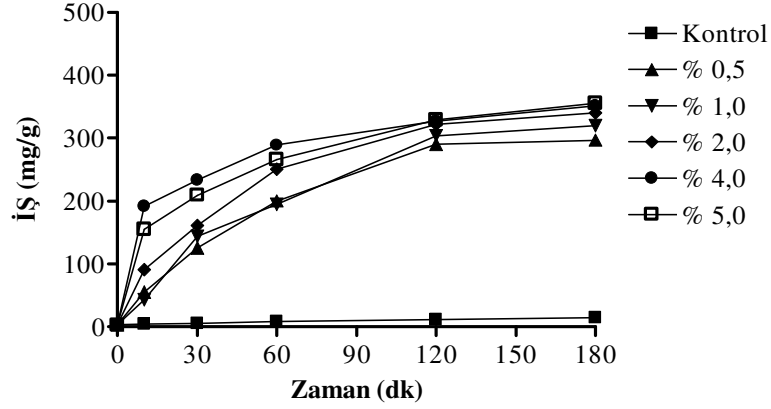
4.3.3.4. BS ile yapılan çalışmalar

BS ile yapılan çalışmada TK değişimine bakıldığında en yüksek TK miktarı 180. dakika sonunda % 4,0 H₂SO₄ içeren ortamda 357,53 mg/g olarak saptanmıştır. Ayrıca tüm ortamlarda diğer hammaddelere ters olarak 180. dk'ya kadar TK artışı devam etmiştir. Sonuçlara Şekil 4.34.'de verilmiştir.



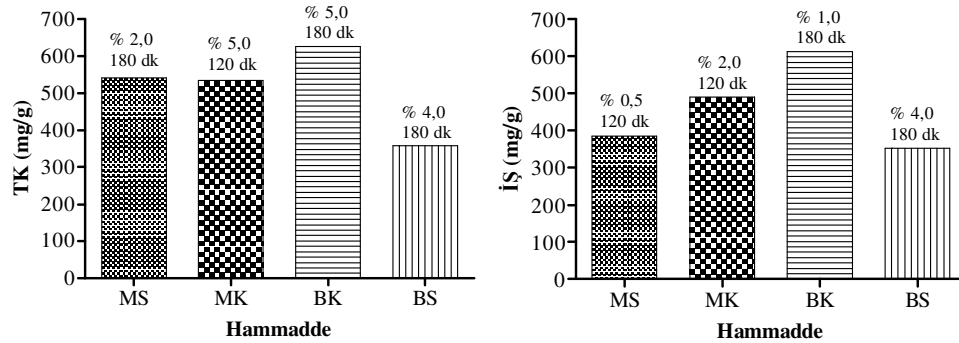
Şekil 4.34. BS ile yapılan ısıl seyreltik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

BS ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında en yüksek İŞ miktarı 180. dk sonunda % 5,0 H₂SO₄ içeren ortamda 352,11 mg/g olarak saptanmıştır. Asit içermeyen ortam ile asit içeren ortamlar kıyaslandığında ise ısıtılı asidik ön işlemin oldukça etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.35.).



Şekil 4.35. BS ile yapılan ısıtılı seyreltik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Seyreltik H₂SO₄ ile yapılan çalışma bulguları değerlendirildiğinde özellikle İŞ açısından önceden yapılan ön işlemlere göre çok büyük bir artış ve verim söz konusudur. Fermantasyon için gerekli olan yüksek İŞ miktarları bu ön işlemler ile sağlanabilmektedir. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri Şekil 4.36'da verilmiştir.



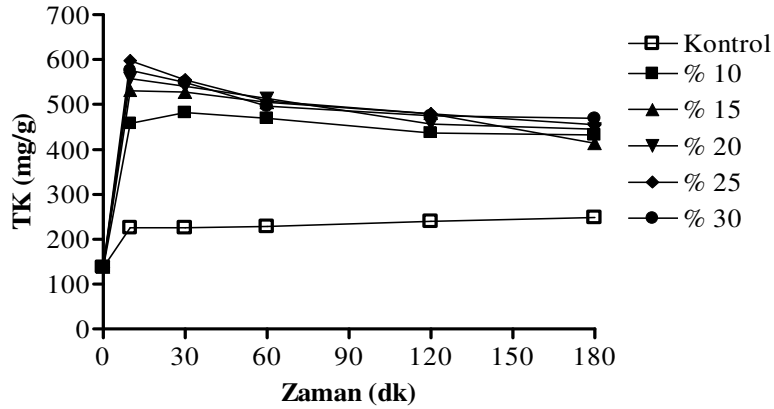
Şekil 4.36. Seyreltik asitler ile tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri (1g/L hammadde, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi en büyük değerden en küçük değere doğru sırası ile TK miktarı BK>MS>MK>BS iken İŞ miktarı ise BK>MK>MS>BS olarak saptanmıştır. Ancak tüm hammaddeler için sistem ekonomisi de göze alındığında optimum asit derişimi % 1,0 ve reaksiyon süresi ise 60 dk. olarak belirlenmiştir.

4.3.4. Derişik H₂SO₄'ün Etkisi

4.3.4.1. MS ile yapılan çalışmalar

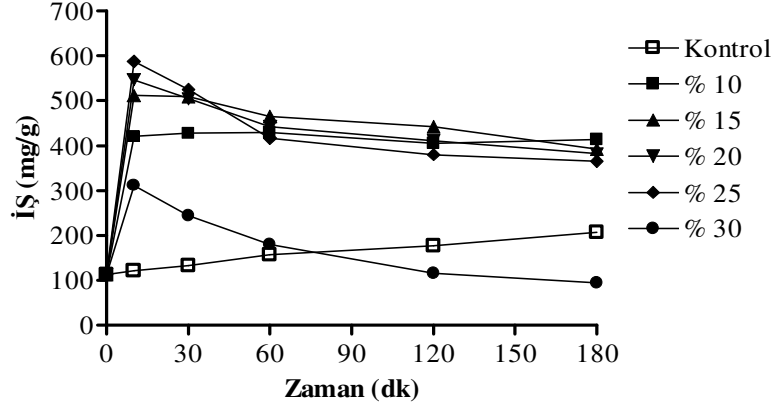
MS ile yapılan çalışmada TK değişimine bakıldığında (Şekil 4.37.) en yüksek TK miktarı 10. dakika sonunda % 25 H₂SO₄ içeren ortamda 597,85 mg/g olarak saptanmıştır. Ayrıca 10. dk'dan itibaren tüm derişimler için TK değeri azalmıştır (örneğin % 30,0 H₂SO₄ içeren ortamda 10 dk'da TK; 576,14 mg/g iken bu değeri 180. dk sonunda 469,22mg/g olarak belirlenmiştir).



Şekil 4.37. MS ile yapılan ısı derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

MS ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında en yüksek İŞ miktarı 10. dk sonunda % 25 H₂SO₄ içeren ortamda 587,01 mg/g olarak saptanmıştır. 10 dk'lık işlemden sonra tüm derişimler için İŞ miktarı azalış göstermiştir. Azalış derişime orantılı olarak artmıştır (örneğin % 25 H₂SO₄ içeren ortamda 10 dk'da İŞ;

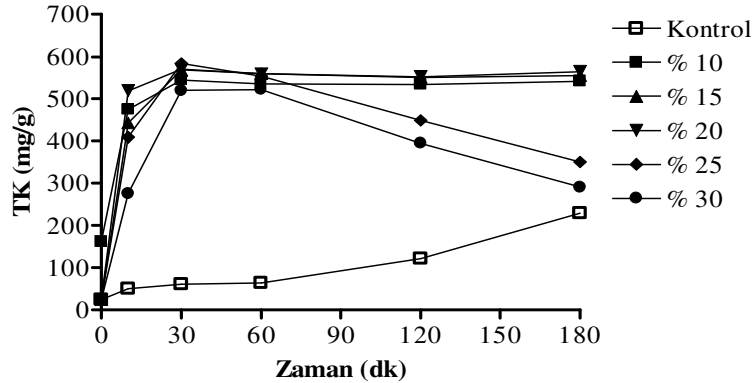
587,01 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 365,10 mg/g olarak belirlenmiştir).
Sonuçlar Şekil 4.38.'de verilmiştir.



Şekil 4.38. MS ile yapılan ısıl derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

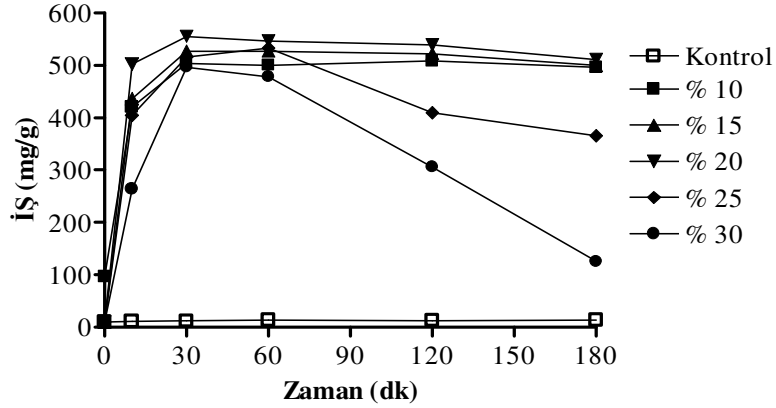
4.3.4.2. MK ile yapılan çalışmalar

MK ile yapılan çalışmada TK değişimine bakıldığında (Şekil 4.39.) en yüksek TK miktarı 30. dakika sonunda % 25 H₂SO₄ içeren ortamda 584,02 mg/g olarak saptanmıştır. Ayrıca % 25 ve % 30 asit içeren ortamlarda 30. dk'dan itibaren TK değeri azalmıştır (örneğin % 30 H₂SO₄ içeren ortamda 30 dk'da TK; 520,26 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 291,62 mg/g olarak belirlenmiştir).



Şekil 4.39. MK ile yapılan ısıl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

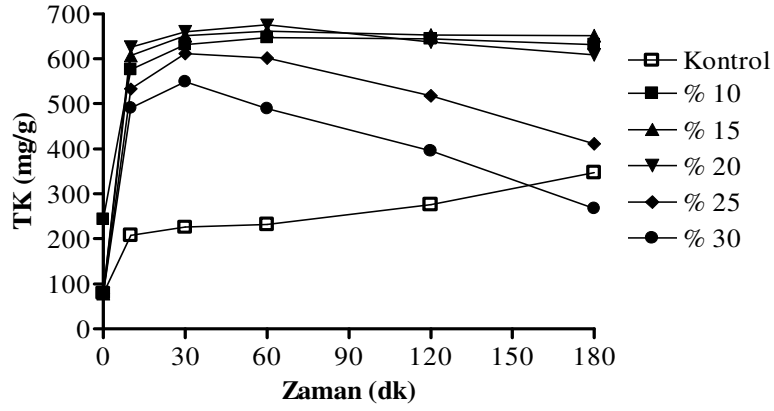
MK ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında en yüksek İŞ miktarı 60. dk sonunda % 20 H₂SO₄ içeren ortamda 546,39 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.40.'da erilmiştir.



Şekil 4.40. MK ile yapılan ısıt derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

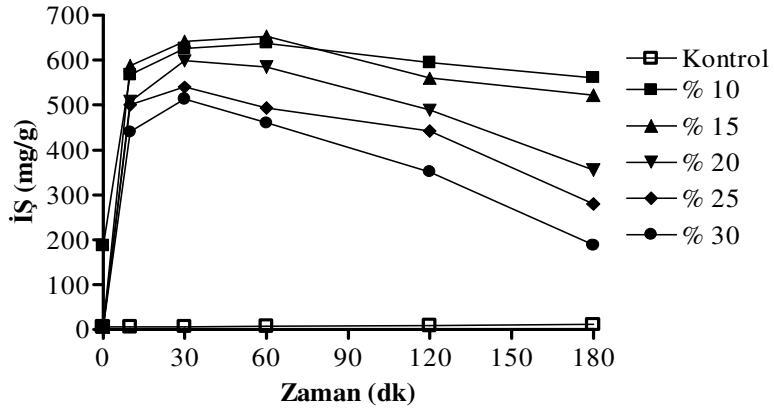
4.3.4.3. BK ile yapılan çalışmalar

BK ile yapılan çalışmada TK değişimine bakıldığında (Şekil 4.41.) en yüksek TK miktarı 60. dakika sonunda % 20 H₂SO₄ içeren ortamda 675,22 mg/g olarak saptanmıştır. Bu değer şüana kadar en yüksek değer olarak belirlenmiştir. Ayrıca 60. dk'dan itibaren tüm derişimler için TK değeri azalmıştır (örneğin % 20 H₂SO₄ içeren ortamda 60 dk'da TK; 675,22 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 609 mg/g olarak belirlenmiştir).



Şekil 4.41. BK ile yapılan ısıl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

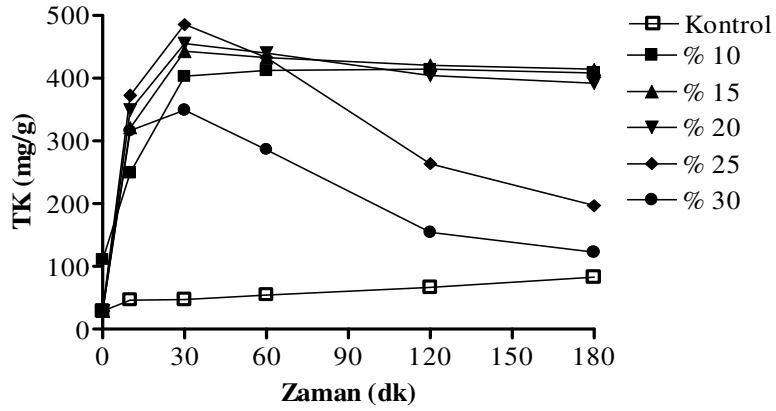
BK ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında en yüksek İŞ miktarı 60. dk sonunda % 15 H₂SO₄ içeren ortamda 653,18 mg/g olarak saptanmıştır. Ayrıca aynı ortamda 30 dk. sonunda ise 642,07 mg/g olarak saptanmıştır. İŞ değeri % 15 H₂SO₄ içeren ortamda 30 dk'lık işlem sonunda ham numuneye göre yaklaşık 90 kat artarak şuna kadar saptanan en yüksek değere ulaşmıştır. Sonuçlar Şekil 4.42.'de verilmiştir.



Şekil 4.42. BK ile yapılan ısıl derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

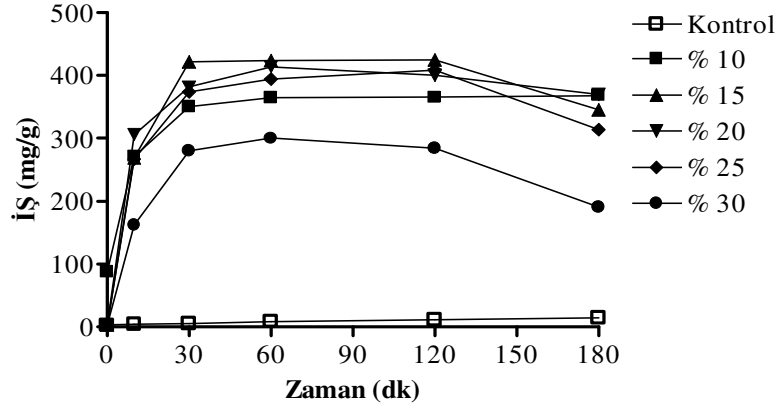
4.3.4.4. BS ile yapılan çalışmalar

BS ile yapılan çalışmada TK değişimine bakıldığında en yüksek TK miktarı 30. dakika sonunda % 25 H₂SO₄ içeren ortamda 485,92 mg/g olarak saptanmıştır. Ayrıca 30. dk'dan itibaren tüm özellikle % 25 ve % 30 H₂SO₄ içeren ortamlarda TK değeri azalmıştır (örneğin % 30 H₂SO₄ içeren ortamda 30 dk'da TK; 349,39 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 123,08 mg/g olarak belirlenmiştir). Sonuçlar Şekil 4.43.'de verilmiştir.



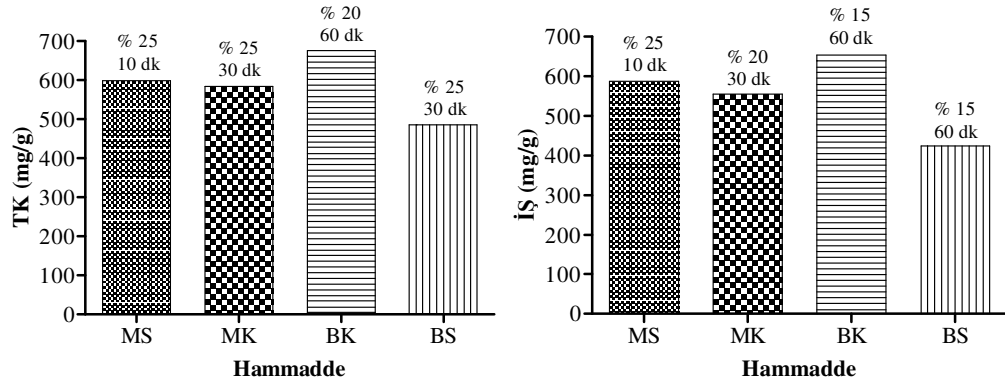
Şekil 4.43. BS ile yapılan ısıl derişik asit ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

BS ile yapılan çalışmada İŞ değişimine bakıldığında en yüksek İŞ miktarı 60. dk sonunda % 15 H₂SO₄ içeren ortamda 424,01 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.44.'de verilmiştir.



Şekil 4.44. BS ile yapılan ısıt derişik asit ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Derişik H_2SO_4 ile yapılan ön işlem çalışmaları sonuçları değerlendirildiğinde özellikle hem TK hemde İŞ değerleri seyreltik asit ile yapılan çalışma bulgularına göre daha yüksek saptanmıştır. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri Şekil 4.45.'de verilmiştir.



Şekil 4.45. Derişik asitler ile tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri (1g/L hammadde, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Şekil 4.45.'de de görüldüğü gibi en büyük değerden en küçük değere doğru sırası ile TK miktarı $BK > MS > MK > BS$ iken İŞ miktarı ise $BK > MS > MK > BS$ olarak

saptanmıştır. Çalışma sonunda optimum reaksiyon süresi 10 dk ve asit miktarı ise % 20 olarak belirlenmiştir.

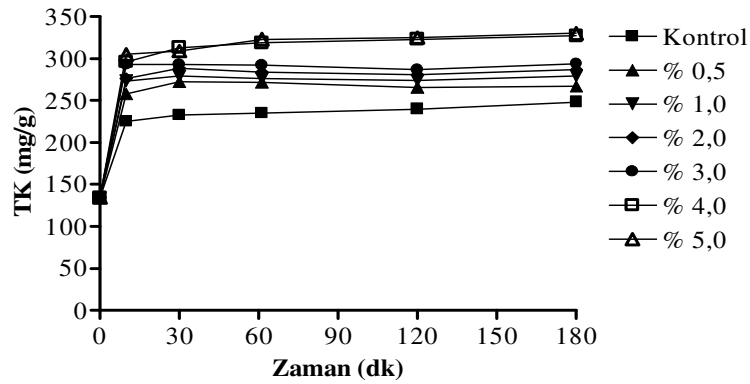
Derişik asit kullanımı ile verim seyreltik asit kullanımında elde edilenden daha yüksektir ancak aynı zamanda maliyeti de artırmaktadır. Ayrıca yüksek asit derişimleri ile yapılan hidroliz işlemleri sonucunda pentozların oluşumu sırasında furfural, heksozların oluşumu sırasında ise 3,5 hidroksi metil fufural oluştuğu ve bu maddelerin etanol fermantasyonunu engellediği (inhibe edici özelliği) bildirilmiştir [1].

4.3.5. Alkali Ön İşlemler

4.3.5.1. NaOH ile yapılan ön işlemler

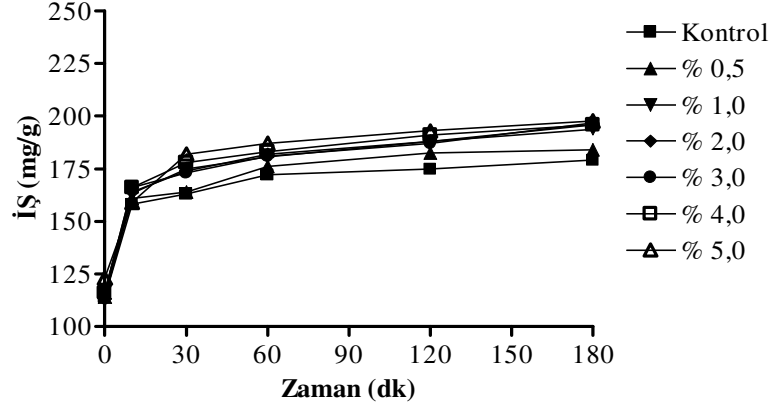
MS ile yapılan çalışmalar

MS ile yapılan ön işlem çalışmaları sonucunda NaOH derişimi arttıkça TK değeri de artış göstermiştir. En yüksek TK değeri 180. dk sonunda % 5,0 NaOH içeren ortamda 330,12 mg/g saptanmıştır. Ancak 30. dk sonunda % 4,0 NaOH içeren ortamda ise 313,44 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu nedenle optimum değer olarak bu koşullar belirlenebilir. Genel olarak 30 dk.'lık ısı işlemi tüm ortamlar için yeterli olduğu Şekil 4.46.'da da görülmektedir.



Şekil 4.46. MS ile yapılan ısı NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

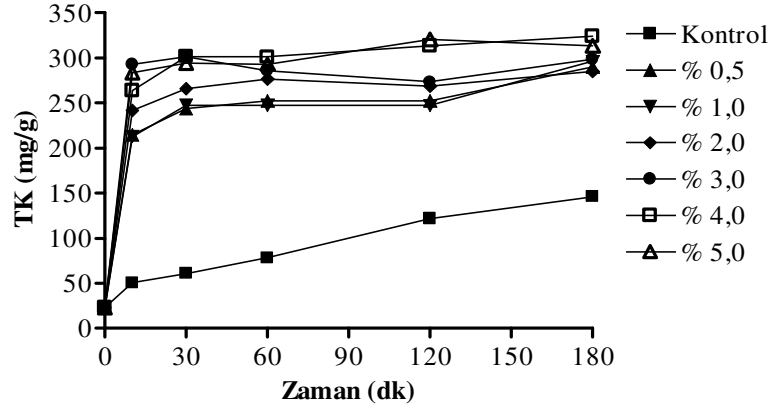
MS ile yapılan alkali (NaOH) ön işlem çalışmaları sonucunda İŞ değerlerinde kontrol ile karşılaştırma yapıldığında artış çok az gerçekleşmiş ve 180.dk sonunda % 5'lik baz içeren ortamda 197,8 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.47.'da verilmiştir.



Şekil 4.47. MS ile yapılan ısıl NaOH ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

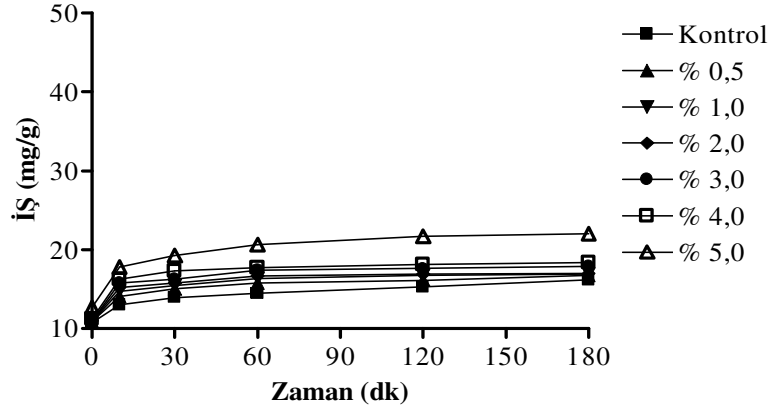
MK ile yapılan çalışmalar

MK ile yapılan alkali (NaOH) ön işlem çalışmaları sonucunda NaOH derişimi arttıkça TK değeri de artış göstermiştir. En yüksek TK değeri 180. dk sonunda % 5,0 NaOH içeren ortamda 324,51 mg/g saptanmıştır. Ancak 30. dk sonunda % 4,0 NaOH içeren ortamda ise 301,34 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu nedenle optimum değer olarak bu koşullar belirlenebilir (Şekil 4.48.).



Şekil 4.48. MK ile yapılan ısıl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

İŞ değerlerine bakıldığında MS'de saptanan sonuçlara benzer şekilde bir artış (asidik ön işlemlerle kıyaslandığında) saptanmamış olup (Şekil 4.49.), maksimum İŞ değeri % 5 NaOH içeren ortamda 22,01 mg/g olarak belirlenmiştir.

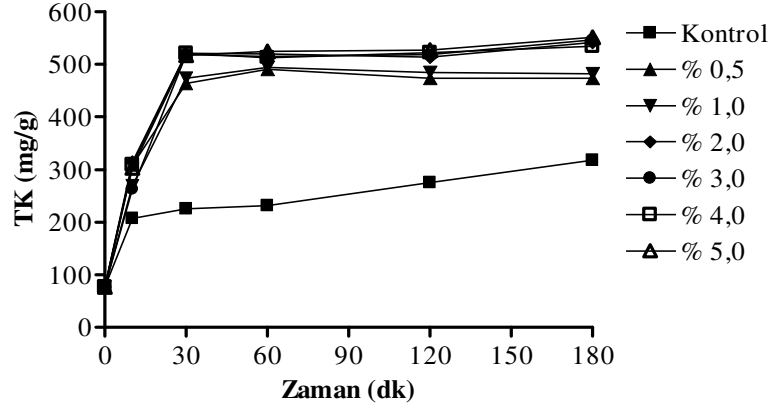


Şekil 4.49. MK ile yapılan ısıl NaOH ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

BK ile yapılan çalışmalar

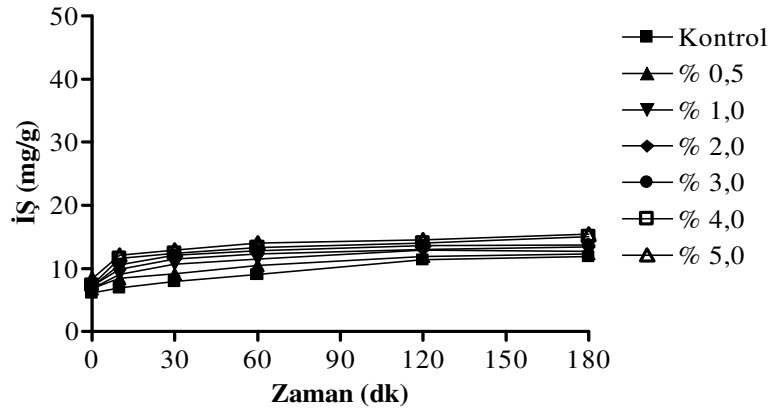
BK ile yapılan çalışmalar sonucunda % 3, 4 ve 5 NaOH içeren ortamlarda saptanan TK değerleri birbirine yakın olarak saptanmıştır (Şekil 4.50.). Uygun ısıl

işlem süresi 30 dk ve 30. dk sonunda saptanan en yüksek TK değeri ise 520,84 mg/g olarak % 4,0 NaOH içeren ortamda saptanmıştır. Ancak bu değer asidik ön işlemlerde saptanan değerden daha düşük olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.50. BK ile yapılan ısıl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

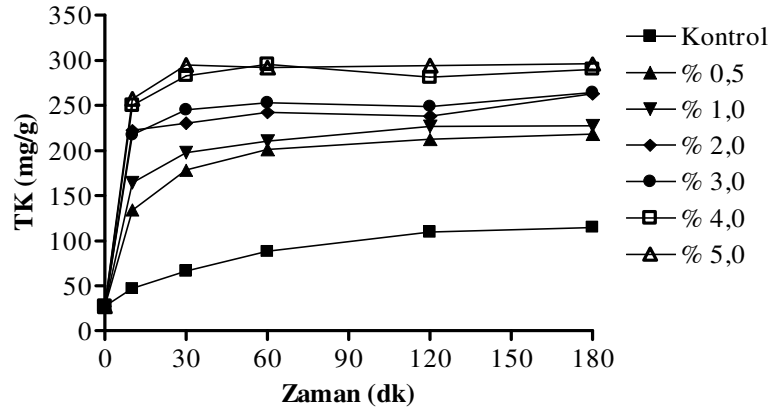
İş değerlerine bakıldığında MS ve MK'de saptanan sonuçlara benzer şekilde artış (asidik ön işlemlerle kıyaslandığında) saptanmamıştır (Şekil 4.51.). Maksimum İş değeri % 4 NaOH içeren ortamda 180. dk.'da 15,06 mg/g olarak saptanmıştır.



Şekil 4.51. BK ile yapılan ısıl NaOH ön işleminin İş üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

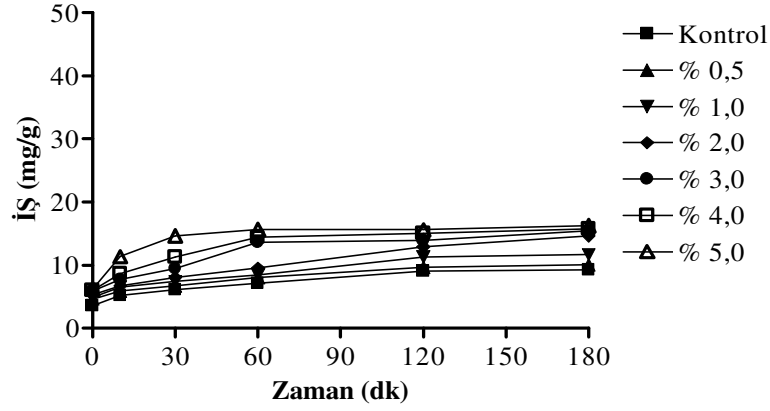
BS ile yapılan çalışmalar

NaOH ile gerçekleştirilen ön işlem çalışmalarında en düşük TK değerleri BS ile saptanmıştır. Diğer hammaddelerde olduğu gibi BS’de de NaOH derişimine bağılı olarak TK değeri artış göstermiştir (Şekil 4.52.). Maksimum TK değeri 180. dk sonunda % 5,0 NaOH içeren ortamda 295,43 mg/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.52.’de verilmiştir.



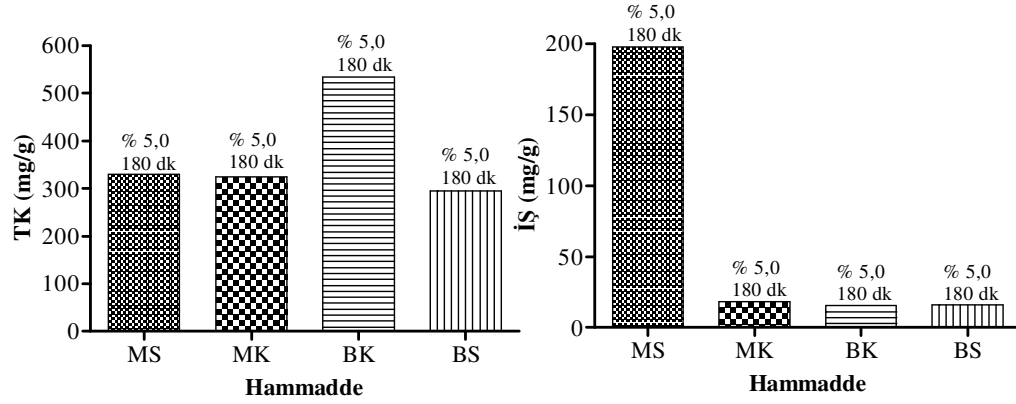
Şekil 4.52. BS ile yapılan ısıl NaOH ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

İŞ değerlerine bakıldığında MS, MK ve BK’nde saptanan sonuçlara benzer şekilde artış (asidik ön işlemlerle kıyaslandığında) saptanmamıştır (Şekil 4.53.). Kontrol grubunda maksimum İŞ 180. dk sonunda 9,25 mg/g olarak saptanırken, % 5,0 NaOH içeren ortamda bu değeri ancak 16,23 mg/g olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.53. BS ile yapılan ısı NaOH ön işleminin IŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Farklı NaOH derişimleri ile gerçekleştirilen ön işlem çalışmaları sonucunda TK değerlerinde artış saptanırken IŞ değerlerinde değişimler belirlenmemiştir. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve IŞ değerleri Şekil 4.54.'de verilmiştir.



Şekil 4.54. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve IŞ değerleri (1g/L hammadde, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Şekil 4.54.'de de görüldüğü gibi en büyük değerden en küçük değere doğru sırası ile TK miktarı BK>MS>MK>BS iken IŞ miktarı ise MS>MK>BK>BS olarak

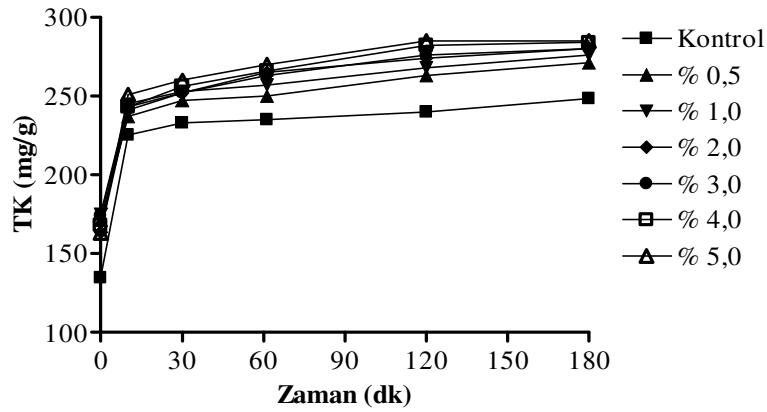
saptanmıştır. Optimum değerler ise 60 dk reaksiyon süresi ve % 5,0 NaOH miktarı olarak belirlenmiştir.

4.3.5.2. Ca(OH)₂ ile yapılan ön işlemler

Hammaddelerin hidrolizinde NaOH ile yapılan alkali ön işlemin ardından, Ca(OH)₂'nin de etkisinin araştırılması amacıyla NaOH ile yapılan çalışmada olduğu gibi; MS, MK, BK ve BS'nin 1 g/L derişiminde ayrı ayrı % 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 ve 5,0 Ca(OH)₂ içeren (w/v) çözeltileri ve Ca(OH)₂ içermeyen (kontrol) çözeltileri hazırlanarak ısıl işlem uygulanmıştır.

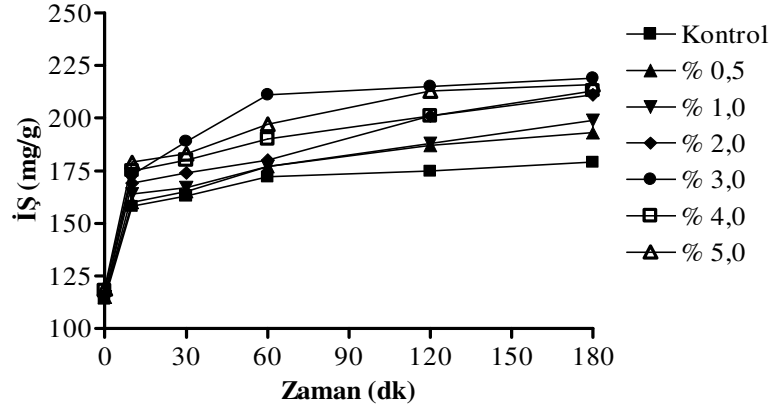
MS ile yapılan çalışmalar

MS ile yapılan alkali (Ca(OH)₂) ön işlem çalışmaları sonucunda Ca(OH)₂ derişimi arttıkça TK değeri de artış göstermiştir. En yüksek TK değeri 180. dk sonunda % 5,0 Ca(OH)₂ içeren ortamda 285,17 mg/g saptanmıştır. Genel olarak 120 dk.'lık ısıl işlemin tüm ortamlar için yeterli olduğu Şekil 4.55.'de de görülmektedir.



Şekil 4.55. MS ile yapılan ısıl Ca(OH)₂ ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

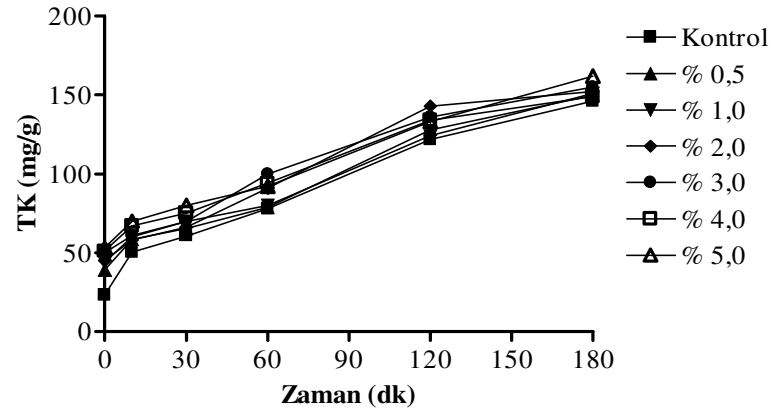
MS ile yapılan alkali ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ön işlem çalışmaları sonucunda İŞ değerlerinde kontrol ile karşılaştırma yapıldığında belirgin bir artış gerçekleşmiş ve 180.dk sonunda % 3'lük baz içeren ortamda 216,21 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.56.'da verilmiştir.



Şekil 4.56. MS ile yapılan ısı $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

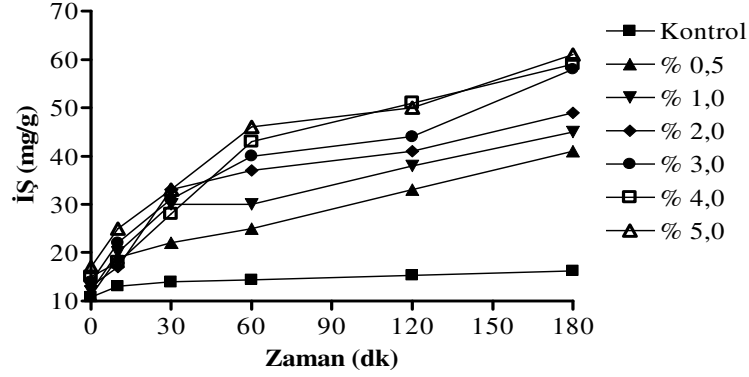
MK ile yapılan çalışmalar

MK ile yapılan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ön işlem çalışmaları sonucunda $\text{Ca}(\text{OH})_2$ derişimi arttıkça TK değeri de artış göstermiştir. En yüksek TK değeri 180. dk sonunda % 5,0 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ içeren ortamda 162,51 mg/g saptanmıştır. (Şekil 4.57.).



Şekil 4.57. MK ile yapılan ısı $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

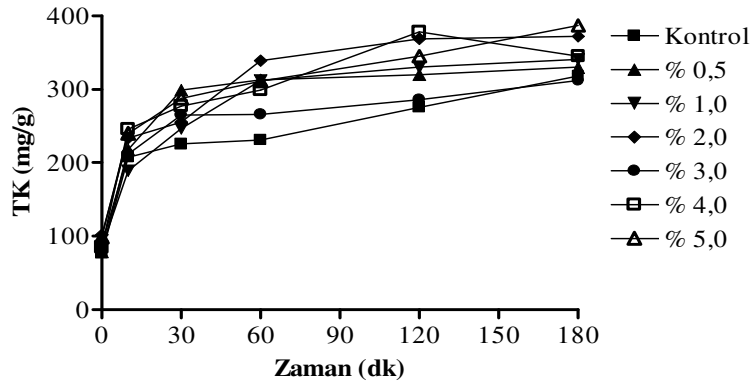
İŞ değerlerine bakıldığında; ısıl işlemin süresine bağlı olarak artış görülmektedir. Çalışma sonucunda maksimum İŞ değeri % 5 NaOH içeren ortamda 180. dk sonunda 61,04 mg/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.58.'de verilmiştir.



Şekil 4.58. MK ile yapılan ısıl $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L MK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

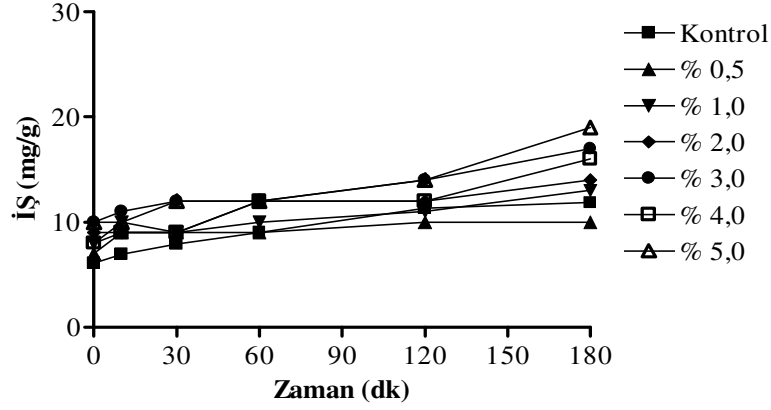
BK ile yapılan çalışmalar

BK ile yapılan çalışmalar sonucunda uygun ısıl işlem süresinin 30 dk olduğu Şekil 4.59.'den de görülmektedir. En yüksek TK değeri ise 180. dk sonunda 342,91 mg/g olarak % 5,0 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ içeren ortamda saptanmıştır. Ancak bu değer asidik ön işlemlerde saptanan değerden daha düşük olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.59. BK ile yapılan ısıl $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

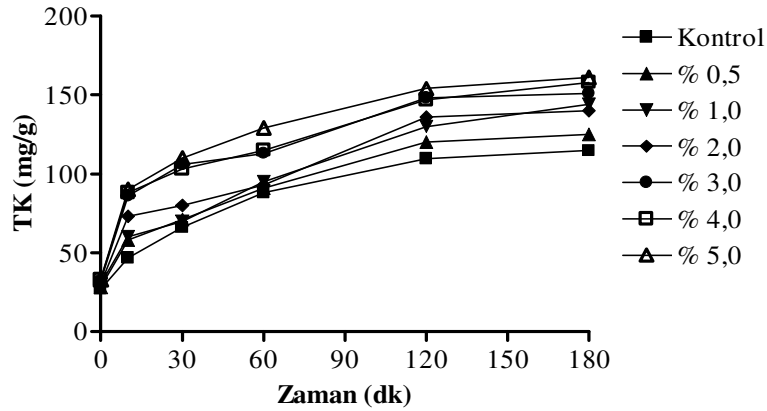
İŞ değerlerine bakıldığında ise belirgin ya da istenilen miktarda artış saptanmamıştır (Şekil 4.60.). Maksimum İŞ değeri % 5 Ca(OH)₂ içeren ortamda 180. dk.'da 19,06 mg/g olarak saptanmıştır.



Şekil 4.60. BK ile yapılan ısıl Ca(OH)₂ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BK, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

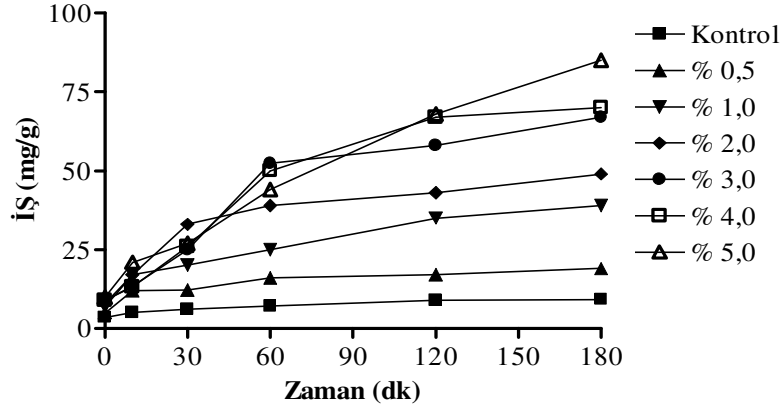
BS ile yapılan çalışmalar

Ca(OH)₂ ile gerçekleştirilen ön işlem çalışmalarında en düşük TK değerleri NaOH ile yapılan ön işlem çalışmalarında da olduğu gibi BS ile saptanmıştır. En yüksek TK değeri 180. dk sonunda % 5,0 Ca(OH)₂ içeren ortamda 161,23 mg/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.61.'de verilmiştir.



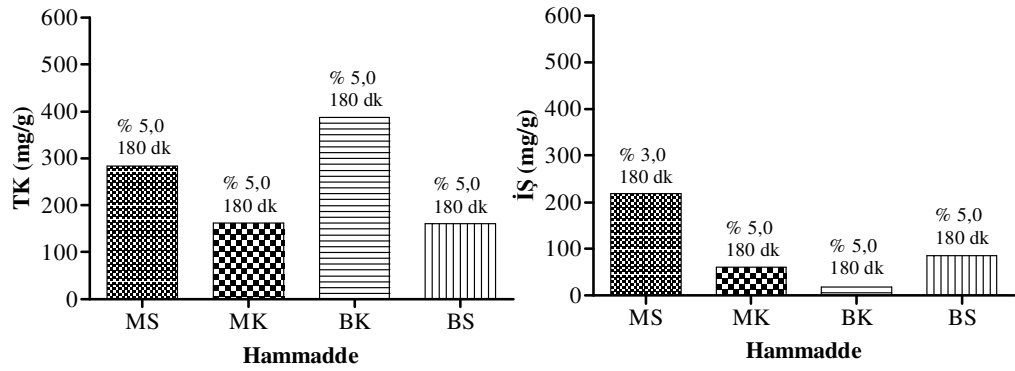
Şekil 4.61. BS ile yapılan ısıl Ca(OH)₂ ön işleminin TK üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

İŞ değerlerine bakıldığında ise ısıtma işlem süresine bağlı olarak artış saptanmıştır. (Şekil 4.62.). Çalışma sonunda maksimum İŞ değeri 180 dk. sonunda % 5 Ca(OH)₂ içeren ortamda 85,18 mg/g olarak saptanmıştır.



Şekil 4.62. BS ile yapılan ısıtma Ca(OH)₂ ön işleminin İŞ üzerindeki etkisi (1 g/L BS, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Farklı Ca(OH)₂ derişimleri ile gerçekleştirilen ön işlem çalışmaları sonucunda tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri ve koşulları Şekil 4.63.'de verilmiştir.



Şekil 4.63. Tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri (1g/L hammadde, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

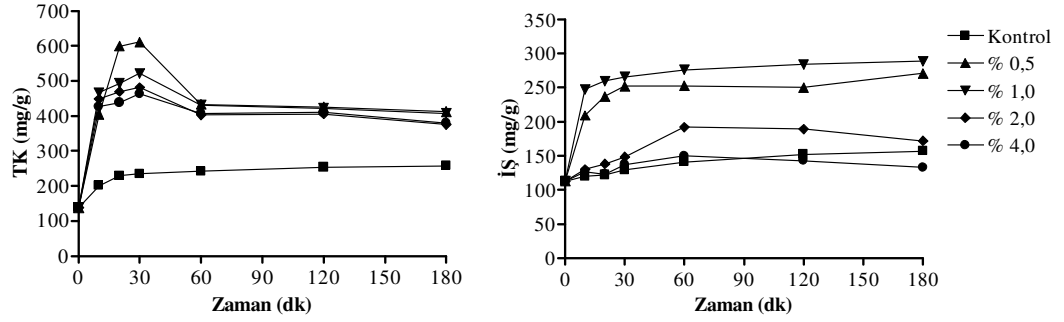
Şekil 4.63.'de de görüldüğü gibi en büyük değerden en küçük değere doğru sırası ile TK miktarı BK>MS>MK>BS iken İŞ miktarı ise MS>BS>MK>BK olarak saptanmıştır. Optimum değerler ise 120 dk reaksiyon süresi ve % 5,0 Ca(OH)₂ miktarı olarak belirlenmiştir.

4.3.6. Islak Oksidasyon

Islak oksidasyon işleminin veriminin belirlenmesi amacıyla asidik, bazik ve nötr ortamlar oluşturulmuş ve 1,2 MPa basınç altında 121 ± 2 °C'de ıslak oksidasyon işlemi yapılarak TK ve İŞ değerlerindeki değişimler araştırılmıştır.

4.3.6.1. MS ile yapılan çalışmalar

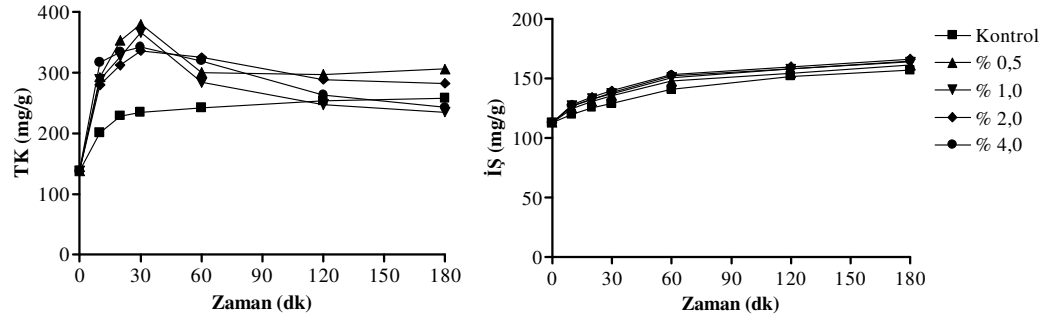
MS ile asidik ıslak oksidasyon işlemi çalışması sonucunda TK değişimi Şekil 4.65.'da verilmiştir. En yüksek TK miktarı 30. dakika sonunda % 0,5 H₂SO₄ içeren ortamda 611,27 mg/g olarak saptanmıştır. Farklı derişimlerde asit içeren ortamların hepsinde 30 dk'ya kadar artış görülürken 30. dk'dan sonra ise düşüş saptanmıştır (örneğin % 4,0 H₂SO₄ içeren ortamda 10 dk'da TK; 426,81 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 380,19 mg/g olarak belirlenmiştir). Bu azalışa neden olarak karbonhidrat yapısının yüksek asidik ortam, ısı ve basınç ile bozulduğu düşünülmektedir. Seyreltik asitlerle yapılan ısıl ön işlem çalışması ile bu çalışmanın sonuçlarının paralellik göstermesi aldoz ve ketoz yapıların asidik ortamda parçalandığını ve TK-İŞ değerlerinin düştüğünü göstermektedir. Asit içermeyen ortamda ise TK miktarında 180 dk'ya kadar artış söz konusudur.



Şekil 4.64. MS ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L MS, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

İŞ değişiminde ise TK'da olduğu gibi 30 dk.'da sonra azalış söz konusu değildir. Maksimum İŞ değeri 180. dk'da % 2 asit içeren ortamda 289,87 mg/g olarak saptanmıştır (Şekil 4.64). Sadece ısıl işlem ile yapılan asit uygulamasında saptanan maksimum İŞ değeri (385,04 mg/g) ile ıslak oksidasyonla saptanan İŞ değeri kıyaslandığında ısıl işlemle elde edilen İŞ daha yüksektir. Bu sonuç basınç altında İŞ miktarının azaldığını bir başka deyişle yapıların bozulduğunu göstermektedir.

MS ile yapılan alkali (NaOH) ıslak oksidasyon ön işlem çalışmaları sonucunda en yüksek TK değeri 30. dk sonunda % 0,5 NaOH içeren ortamda 380,02 mg/g saptanmıştır. Ancak 30. dk sonunda TK değerlerinde azalış belirlenmiştir. Genel olarak 30 dk. ısıl işlem ise tüm ortamlar için yeterli olmuştur. Sonuçlar Şekil 4.65.'de görülmektedir.

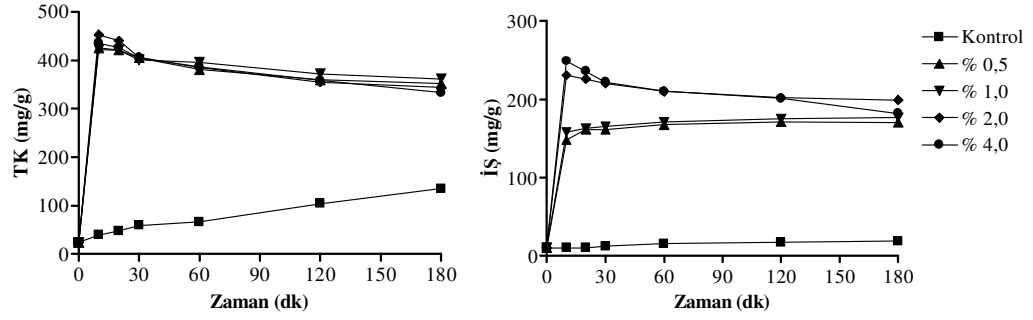


Şekil 4.65. MS ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L MS, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

Alkali ortamda İŞ artışı ise hemen hemen hiç belirlenmemiştir. Maksimum İŞ değeri % 2,0 NaOH içeren ortamda 166,17 mg/g olarak saptanmıştır. Alkali ortam ile asidik ortam kıyaslandığında asidik ortamda saptanan İŞ ve TK değerleri daha yüksektir. Ancak basınç altında değerlerde basınç olmayan ortama göre azalış belirlenmiştir (Şekil 4.65).

4.3.6.2. MK ile yapılan çalışmalar

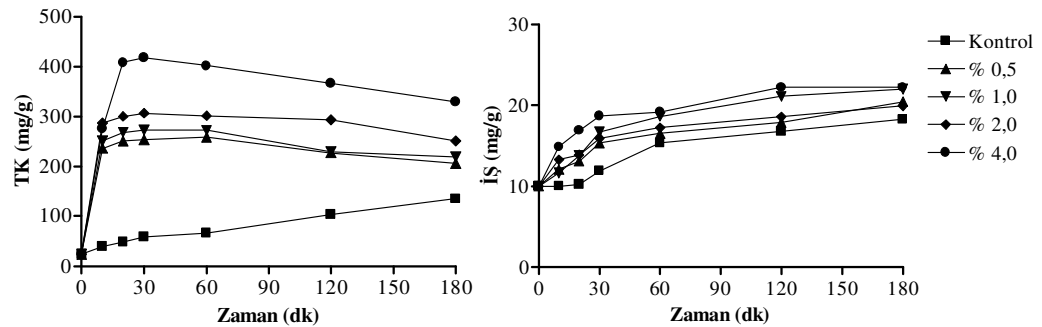
MK ile asidik ıslak oksidasyon işlemi çalışması sonucunda en yüksek TK miktarı 10. dakika sonunda % 2,0 H₂SO₄ içeren ortamda 453,16 mg/g olarak saptanmıştır. Farklı derişimlerde asit içeren ortamların hepsinde 10. dk'ya kadar artış görülürken bu dakikadan sonra ise düşüş saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.66.'da verilmiştir.



Şekil 4.66. MK ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L MK, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

İŞ sonuçlarına bakıldığında ise (Şekil 4.66.), 10 dk'ya kadar artış saptanırken daha sonra hemen hemen sabitlenmiştir. En yüksek İŞ değeri 10 dk sonunda % 4,0 asit içeren ortamda 248,61 mg/g olarak saptanmıştır.

MK ile yapılan alkali (NaOH) ıslak oksidasyon ön işlem çalışmaları sonuçları Şekil 4.67.'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi en yüksek TK değeri 30. dk sonunda % 4,0 NaOH içeren ortamda 418,82 mg/g saptanmıştır. Ancak 30. dk sonunda TK değerlerinde azalış belirlenmiştir (örneğin % 4,0 NaOH içeren ortamda 30 dk'da TK; 418,82 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 318,20 mg/g olarak belirlenmiştir). Genel olarak 30 dk. ısıl işlem ise tüm ortamlar için yeterli olmuştur. Asit içermeyen ortam ile asit içeren ortamlar arasında oldukça büyük fark belirlenmiştir.

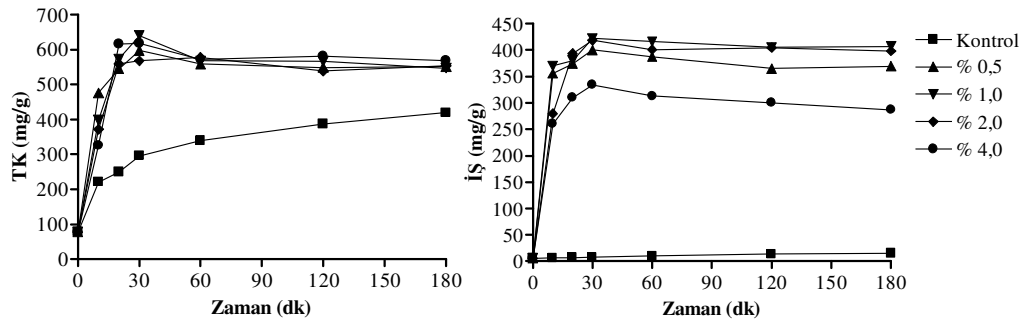


Şekil 4.67. MK ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L MK, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

MK ile alkali ortamda İŞ artışı artışı ise Şekil 4.67.'de görülmektedir. Maksimum İŞ değeri % 4,0 NaOH içeren ortamda 22,20 mg/g olarak saptanmıştır. Alkali ortam ile asidik ortam kıyaslandığında asidik ortamda saptana İŞ ve TK değerleri daha yüksektir.

4.3.6.3. BK ile yapılan çalışmalar

BK ile asidik ıslak oksidasyon işlemi çalışması sonucunda en yüksek TK miktarı 30. dakika sonunda % 1,0 H₂SO₄ içeren ortamda 640,49 mg/g olarak saptanmıştır. Farklı derişimlerde asit içeren ortamların hepsinde 30 dk'ya kadar artış görülürken bu dakikadan sonra (kontrol hariç) ise düşüş saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.68.'de verilmiştir.

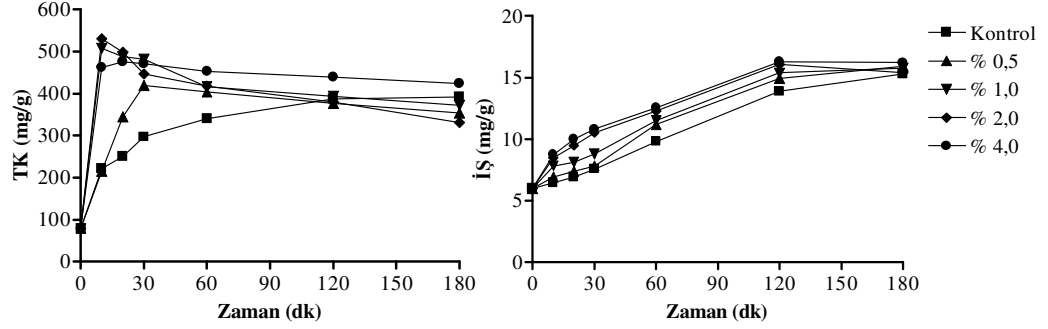


Şekil 4.68. BK ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L BK, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

İŞ artışı da 30. dk'ya kadar devam etmiştir. En yüksek İŞ değeri % 2,0 asit içeren ortamda 30 dk sonunda 418,01 mg/g olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.68.'de görülmektedir.

BK ile alkali ıslak oksidasyon çalışmaları sonucunda TK, % 2,0 NaOH içeren ortamda 10 dk sonunda 530,67 mg/g olarak saptanmıştır. 10. dk'dan sonra ise TK değeri tüm alkali ortamlarda azalmıştır (örneğin % 4,0 NaOH içeren ortamda 10 dk'da TK; 262,64 mg/g iken bu değer 180. dk sonunda 424,52 mg/g olarak belirlenmiştir). Sonuçlar Şekil 4.69.'da verilmiştir.

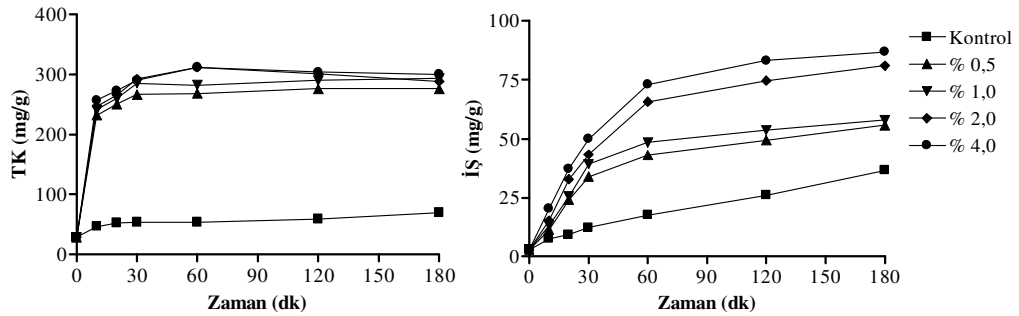
İŞ değeri ise asidik uygulamaya göre oldukça düşük belirlenmiştir. Alkali uygulama sonucunda saptanan maksimum İŞ değeri 180. dk sonunda % 4,0 NaOH içeren ortamda 16,21 mg/g olarak saptanmıştır (Şekil 4.69.).



Şekil 4.69. BK ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L BK, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

4.3.6.4. BS ile yapılan çalışmalar

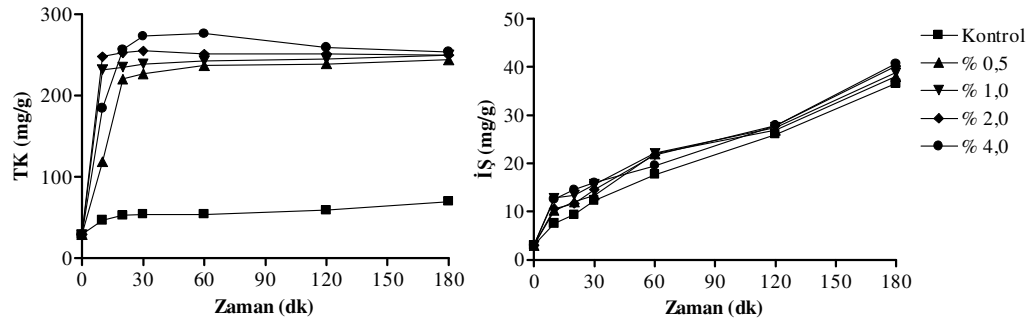
BS ile asidik ıslak oksidasyon işlemi çalışması sonucunda TK değişimi Şekil 4.70.'de verilmiştir. En yüksek TK miktarı 60. dakika sonunda % 4,0 H₂SO₄ içeren ortamda 312,01 mg/g olarak saptanmıştır. Asit içermeyen ortamda ise TK miktarında 180 dk'ya kadar artış söz konusudur.



Şekil 4.70. BS ile yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L BS, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

Asidik işlem sonucunda İŞ değişimi Şekil 4.70.'de verilmiştir. En yüksek İŞ değeri 180 dk. sonunda % 4,0'lık asidik ortamda 87,14 mg/g olarak saptanmıştır. Şekilde de görüldü gibi İŞ artışı asit derişimi ile orantılı olarak değişmiştir.

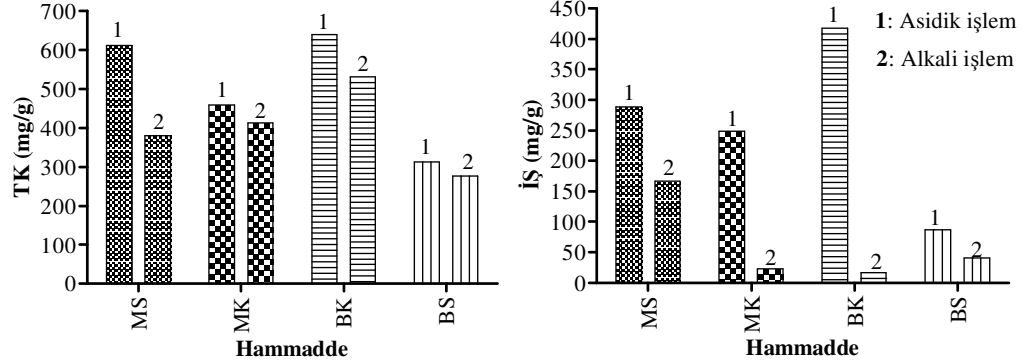
BS ile alkali ıslak oksidasyon çalışmaları sonucunda TK, % 4,0 NaOH içeren ortamda 60 dk sonunda 276,14 mg/g olarak saptanmıştır. 60. dk'dan sonra ise TK değeri tüm alkali ortamlarda hemen hemen sabit kalmıştır. Sonuçlar Şekil 4.71.'da verilmiştir.



Şekil 4.71. BS ile yapılan alkali ıslak oksidasyon çalışması (1 g/L BS, 120 °C, 1,2 MPa, 5 mL çalışma hacmi).

BS ile alkali ıslak oksidasyon çalışmaları sonucunda İŞ değişimi Şekil 4.71.'de görülmektedir. NaOH derişimi arttıkça İŞ değeride artış göstermiştir. Ancak asidik ortamla kıyaslandığında bu artış oldukça düşüktür. NaOH ile yapılan çalışmada maksimum İŞ değeri % 4,0 NaOH içeren ortamda 180. dk sonunda 40,71 mg/g olarak saptanmıştır.

Farklı asidik ve alkali ortamlarda gerçekleştirilen ıslak oksidasyon ön işlem çalışmaları sonucunda tüm hammaddeler için elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri Şekil 4.72.'de verilmiştir.



Şekil 4.72. Islak oksidasyon çalışmaları sonunda elde edilen maksimum TK ve İŞ değerleri (1g/L hammadde, 1,2 MPa, 120 °C, 5 mL çalışma hacmi).

Şekil 4.72.'de de görüldüğü gibi TK ve İŞ için asidik ıslak oksidasyonda elde edilen değerler alkali ıslak oksidasyonda saptanan değerlerden daha yüksek saptanmıştır. En büyük değerden en küçük değere doğru sırası ile TK miktarı BK>MS>MK>BS iken İŞ miktarı ise BK>MS>MK>BS olarak saptanmıştır. Optimum değerler ise sistem ekonomisi göz önünde tutularak % 1,0 H₂SO₄ içeren ortamda 30 dk'lık reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

4.4. BİYOLOJİK ÖN İŞLEM ÇALIŞMALARI

4.4.1. Beyaz Çürükçül Funguslarla Yapılan Ön İşlem Çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında özellikle beyaz çürükçül funguslar tarafından daha fazla üretildiği bilinen lignoselülazlardan faydalanarak sakkarifikasyon uygulanması amacıyla, sıvı faz fermantasyon yöntemi kullanılarak *F. trogii* ve *P. chrysosporium*'un MS, MK, BK ve BS ile ön işlem uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada; 35 gün sürdürülen fermantasyon boyunca maksimum TK ve İŞ miktarlarının saptanması ve bu miktarların saptandığı fermantasyon sürelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

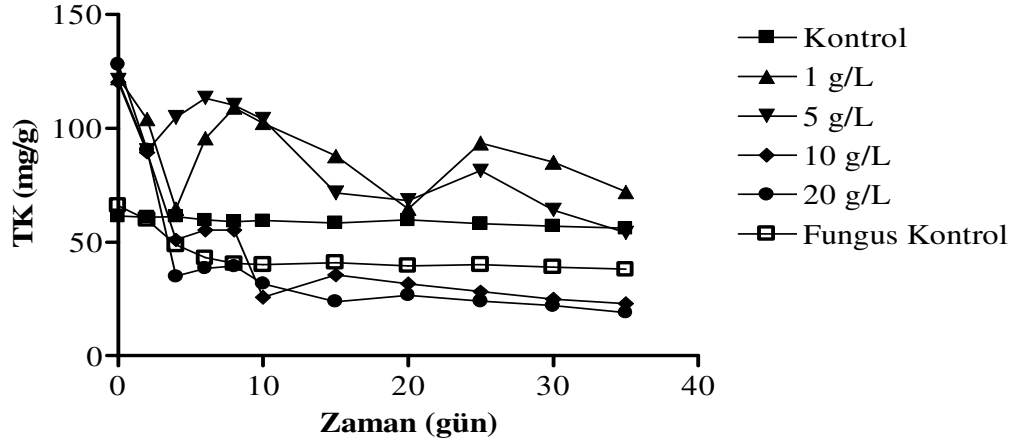
4.4.1.1. *F. trogii* ile yapılan çalışmalar

F. trogii son zamanlarda lignoselülozik enzim üretiminde ve diğer biyoteknolojik yöntemlerde sıkça kullanılan bir beyaz çürükçül fungustur. Sıvı, katı ve yarı katı fermantasyon yöntemleri gibi çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilen fungus üretiminde en önemli nokta maksimum enzim sentezinin gerçekleştirilmesi için fungusu strese sokmaktır. Bunun için en sık kullanılan yöntem ise üretim ortamının azot ve karbonca sınırlandırılmasıdır. Bu çalışmada da sakkarifikasyon için hazırlanan besiyeri (Çizelge 3.3.) fungus tarafından kolayca kullanılabilir azot ve karbon kaynağı içermemektedir. Bu ana fikirden yola çıkarak çalışma amacı, fungusun strese sokulması ile üretilen lignoselüloz miktarının artırılması ve bu şekilde hammaddelerin daha hızlı parçalanarak TK ve İŞ miktarlarının da artırılmasıdır.

MS ile yapılan çalışmalar

F. trogii ile gerçekleştirilen sıvı faz fermantasyon çalışması sonucunda, Şekil 4.73.'de de görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan grupta (Fungus Kontrol-MS içermeyen) TK miktarı başlangıçtan itibaren 6. güne kadar azalmış ve daha sonraki günlerde azalış hemen hemen sabitlemiştir. Başlangıçta 66,02 mg/g olarak ölçülen TK, 6. günün sonunda 40,82 mg/g'a düşmüş ve bu değer 35. günün sonunda ise 38,27 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu durum fungusun 6. günden sonra ilave besin maddesine ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Ayrıca kontrol grubundaki fungus gelişimi, hammadde içeren ortamlarla yapılan kıyaslama (görsel) doğrultusunda daha yavaş ve daha az gerçekleşmiştir.

Yalnızca MS içeren (fungus içermeyen-Kontrol) grupta ise başlangıçtan 35. günün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyonun başlangıcında ölçülen TK 61,40 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 56,82 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan MS'nin kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.73.).

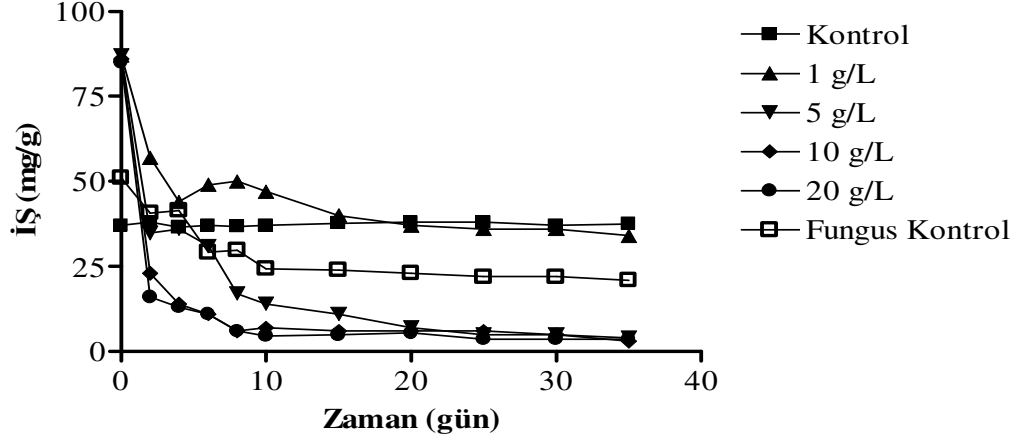


Şekil 4.73. *F. trogii*'nin MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

Farklı derişimlerde MS içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MS için sırası ile 122,23; 121,17; 120,26 ve 128,41 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 4. güne kadar azalarak yine sırası ile 104,06; 90,14; 89,37 ve 90,43 mg/g'a düşmüştür. Ancak 4. günden sonra fungusun strese girmesi ve enzim üretmesi sonucunda lignoselülozik materyali parçalamasına bağlı olarak TK artışı saptanmıştır. 8. güne kadar devam eden artış sonucunda ortamlarda 109,06; 110,23; 55,20 ve 39,47 mg/g TK belirlenmiştir. 8. günden inkübasyonun sonuna kadar yine TK azalışları ve artışları Şekil 4.74'de de görülmektedir. Ancak inkübasyon boyunca ölçülen hiçbir TK değeri başlangıç TK değerini yani MS'den gelen miktarı geçememiştir. Bu tezin amacı hammaddelerdeki TK ve İŞ değerlerinin artırılması olduğu için *F. trogii* ile yapılan MS fermantasyonu ön işleminin TK artırımı için yeterli olmadığını ortaya koymuştur.

İŞ değerlerine bakıldığında, kontrol grupları (kontrol, fungus kontrol) için TK'da saptanana benzer şekilde değişimler gözlenmiştir (Şekil 5.11.). Farklı derişimlerde MS içeren ortamlardaki İŞ değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MS için sırası ile 87,14; 87,92; 86,45 ve 85,10 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 5, 10 ve 20 g/L MS içeren ortamlarda inkübasyon sonuna kadar azalış göstermiştir. 1 g/L MS içeren ortamda ise azalış ve artış

saptanmıştır. Ancak TK'da da olduğu gibi ölçülen hiçbir İŞ değeri başlangıç İŞ değerini yani MS'den gelen miktarı geçememiştir. Sonuçlar Şekil 5.74.'de verilmiştir.



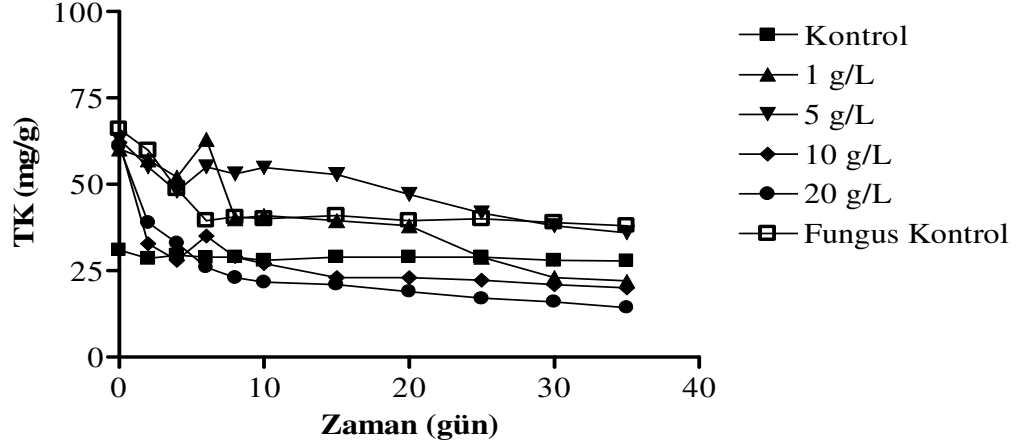
Şekil 4.74. *F. trogii*'nin MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

MK ile yapılan çalışmalar

Yalnızca MK içeren (fungus içermeyen-Kontrol) grupta beklendiği gibi inkübasyonun başlangıcından 35. gününün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyon başlangıcında ölçülen TK 31,17 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 29,74 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan MS'nin kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını göstermiştir (Şekil 5.75.).

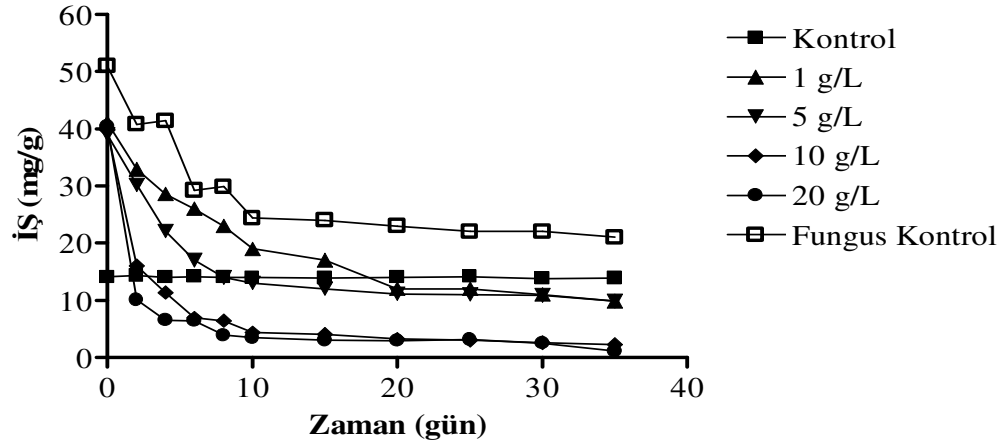
Farklı derişimlerde MK içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MK için sırası ile 60,32; 63,03; 62,11 ve 61,88 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 4. güne kadar azalarak yine sırası ile 52,26; 48,51; 28,39; ve 33,19 mg/g'a düşmüştür. 20 g/L MK içeren ortamdaki azalış 35. güne kadar devam etmiş ancak 1, 5 ve 10 g/L MK içeren ortamlarda TK 4-6. günler arası artarken 6. günden inkübasyon sonuna kadar azalmıştır. İnkübasyon sonunda ortamlarda saptanan TK değeri sırası ile 22,04; 36,22; 20,62 ve 14,40 mg/g

olarak saptanmıştır. İnkübasyon boyunca ölçülen hiçbir TK değeri başlangıç TK değerini geçememiştir. Bu sonuç; *F. trogii* ile yapılan MK fermentasyonu ön işleminin TK artırımı için yeterli olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 5.75).



Şekil 4.75. *F. trogii*'nin MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

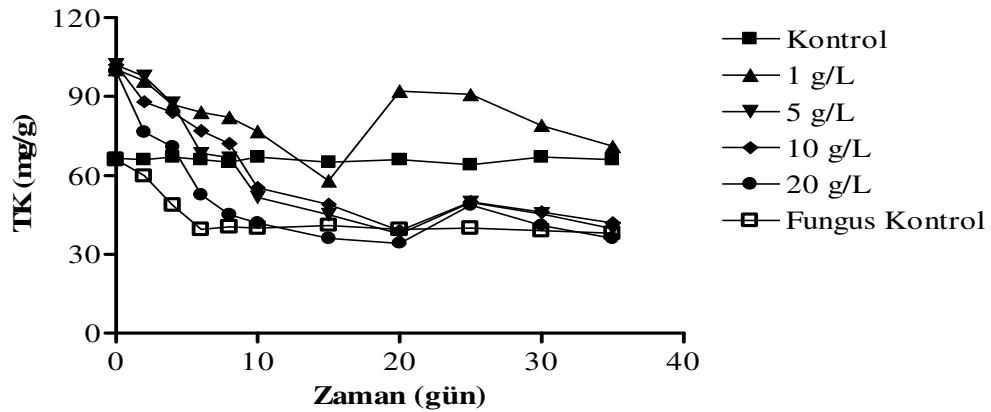
MK ile yapılan inkübasyon boyunca İŞ değişimine bakıldığında (Şekil 4.76.), kontrol grupları (kontrol, fungus kontrol) için TK'da saptanana benzer şekilde değişimler gözlenmiştir. Farklı derişimlerde MK içeren ortamlardaki İŞ değişimine bakıldığında ise; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MS için sırası ile 41,12; 39,17; 39,81; 40,40 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 1, 5, 10 ve 20 g/L MK içeren ortamlarda inkübasyon sonuna kadar azalış göstererek sırası ile 9,91; 9,80; 2,32 ve 1,09 mg/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.76.'de verilmiştir.



Şekil 4.76. *F. trogii*'nin MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

BK ile yapılan çalışmalar

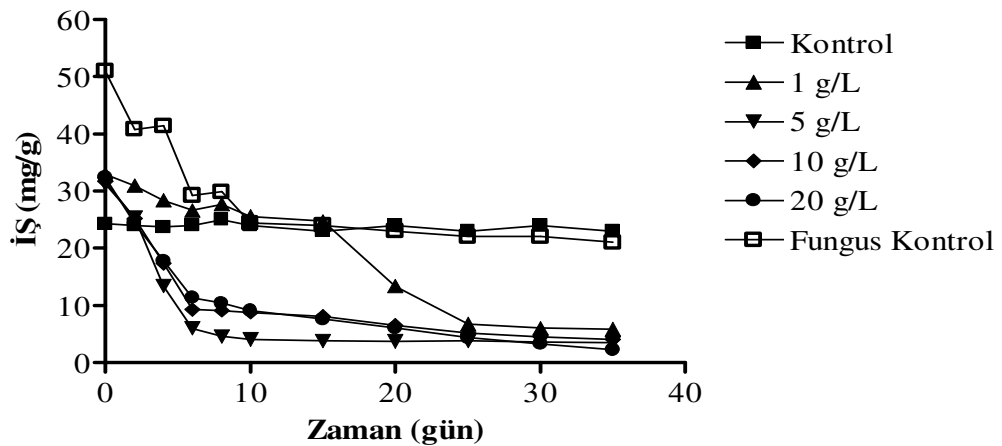
BK'nın kontrol (fungus içermeyen-Kontrol) grubunda başlangıçtan 35. günün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyonun başlangıcında ölçülen TK 66,40 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 60,13 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan MS'nin kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.77.).



Şekil 4.77. *F. trogii*'nin BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

Farklı derişimlerde BK içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L BK için sırası ile 100,37; 102,08; 102,14; ve 99,79 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 1 g/L BK için 15. güne kadar (57,91 mg/L) ve 5, 10 ve 20 g/L BK için ise 20. güne kadar azalarak sırası ile 37,73; 39,00; 34,26 mg/g'a kadar düşmüştür. 1g/L BK içeren ortamda 15-20. günler arasında TK artışı saptanırken 5, 10 ve 20 g/L için ise 20-25. günler arasında TK artışı saptanmıştır. Ancak inkübasyon boyunca ölçülen hiçbir TK değeri başlangıç TK değerini geçememiştir. Bu sonuç; *F. trogii* ile yapılan BK fermantasyonu ön işleminin TK artırımı için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Sonuçlar Şekil 4.77.'de verilmiştir.

İŞ değerlerine bakıldığında, kontrol grupları (kontrol, fungus kontrol) için TK'da saptanana benzer şekilde değişimler gözlenmiştir (Şekil 4.78.). Farklı derişimlerde BK içeren ortamlardaki İŞ değişimine bakıldığında ise; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L BK için sırası ile 32,90; 31,23; 31,70 ve 32,47 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler tüm ortamlarda inkübasyon sonuna kadar azalış göstererek 35. gün sonunda sırası ile 5,81; 3,47; 4,05 ve 2,23 mg/g olarak belirlenmiştir.

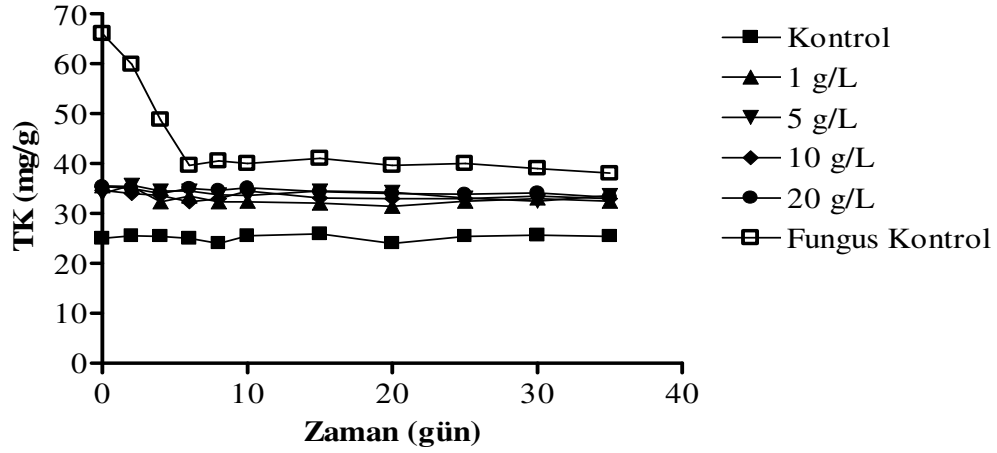


Şekil 4.78. *F. trogii*'nin BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

BS ile yapılan çalışmalar

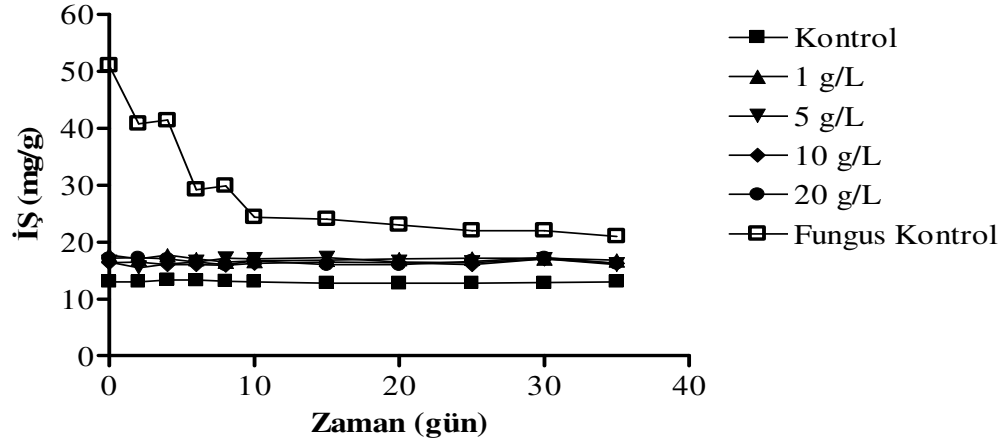
Yalnızca BS içeren (fungus içermeyen-Kontrol) grupta inkübasyonun başlangıcından 35. gününün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyon başlangıcında ölçülen TK 25,62 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 25,12 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan BS'nin kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını göstermiştir (Şekil 4.79.).

Farklı derişimlerde BS içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında *F. trogii*'nin ortamlarda gelişemediği görülmektedir. Çünkü TK azalışı hiçbir ortamda gerçekleşmemiştir. Bu sonuç; *F. trogii* ile yapılan S fermantasyonu ön işleminin TK artırımını için yeterli olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.79.).



Şekil 4.79. *F. trogii*'nin BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

Farklı derişimlerde BS içeren ortamlardaki İŞ değişimi de TK değişimine benzer şekilde gerçekleşmiştir. Sonuçlar Şekil 4.80.'de verilmiştir.



Şekil 4.80. *F. trogii*'nin BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

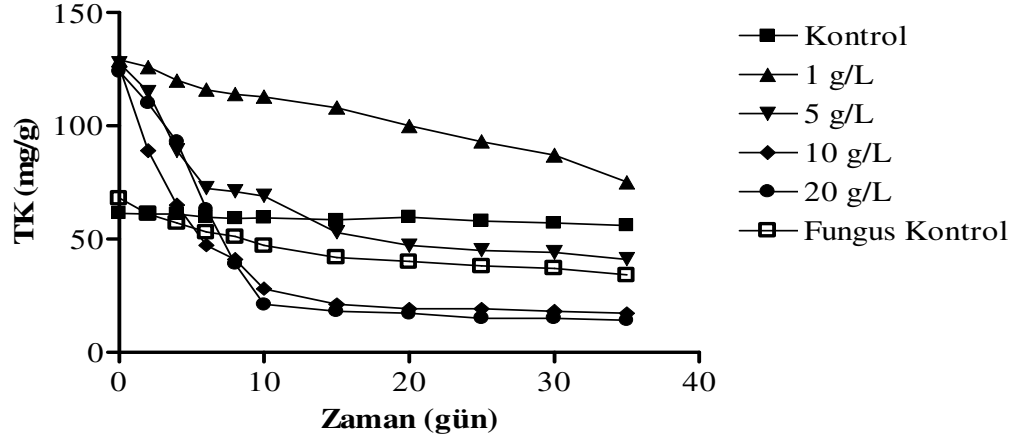
4.4.1.2. *P. chrysosporium* ile yapılan çalışmalar

P. chrysosporium uzun zamandır üzerinde sıkça çalışılan ve halen çalışmalar yapılan, özellikle selüloz üretiminde ve diğer biyoteknolojik yöntemlerde kullanılan bir beyaz çürükçül fungustur. Literatürde sıkça kullanılması ve bu şekilde diğer çalışmalarla kıyaslanmanın daha kolay yapılabilmesi amacıyla seçilmiştir. Çalışmalar *F. trogii* ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi azot ve karbonca sınırlandırılmış besin içeren ortamda (Çizelge 3.3.) gerçekleştirilmiştir.

MS ile yapılan çalışmalar

P. chrysosporium ile gerçekleştirilen sıvı faz fermantasyon çalışması sonucunda, Şekil 4.81'de görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan grupta (Fungus Kontrol-MS içermeyen) TK miktarı başlangıçtan itibaren inkübasyonun sonuna kadar azalış göstermiştir. Başlangıçta 68,04 mg/g olarak ölçülen TK, 35. günün sonunda 34,12 mg/g'a düşmüştür. Kontrol grubundaki fungus gelişimi, hammadde içeren ortamlarla yapılan kıyaslama (görsel) doğrultusunda daha yavaş ve daha az gerçekleşmiştir.

Yalnızca MS içeren (fungus içermeyen-Kontrol) grupta ise başlangıçtan 35. günün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyonun başlangıcında ölçülen TK 61,40 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 56,82 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan MS'nin kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.81.).

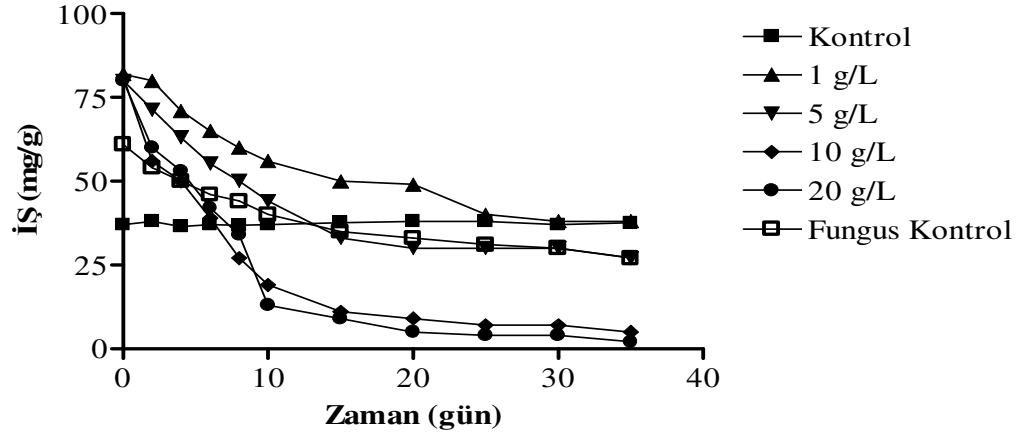


Şekil 4.81. *P. chrysosporium*'un MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

Farklı derişimlerde MS içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MS için sırası ile 129,21; 127,65; 126,11 ve 124,98 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler başlangıç MS derişimindeki artışa paralel olarak hızla azalmıştır. Bir başka deyişle fungus gelişimi hammadde miktarına paralel olarak artmıştır. İnkübasyon boyunca TK artışına saptanmamış ve inkübasyon sonunda TK miktarları sırası ile 75,20; 41,32; 17,88 ve 14,03 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu durum; *P. chrysosporium* ile yapılan MS fermentasyonu ön işleminin TK artırımı için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Sonuçlar Şekil 4.81.'de verilmiştir.

İŞ değişiminde bakıldığında da TK değişimine benzer şekilde azalışlar saptanmıştır. İnkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MS için sırası ile 82,11; 80,79; 81,2 ve 80,48 mg/g olarak saptanırken, bu değerler 35. günün sonunda yine

sırası ile 38,12; 27,77; 5,19 ve 2,84 olarak saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.82.'de gösterilmiştir.



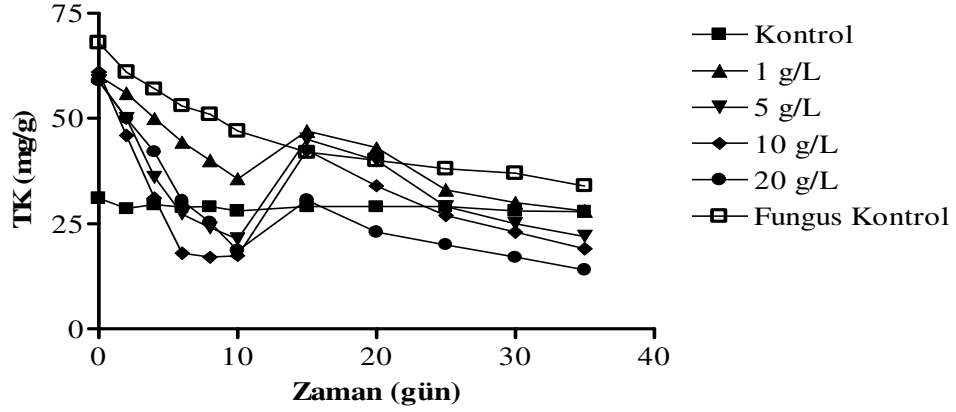
Şekil 4.82. *P. chrysosporium*'un MS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

MK ile yapılan çalışmalar

MK'nın kontrol (fungus içermeyen-Kontrol) grubunda beklendiği gibi başlangıçtan 35. günün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyonun başlangıcında ölçülen TK 31,46 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 27,99 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan MK'nın kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.83.).

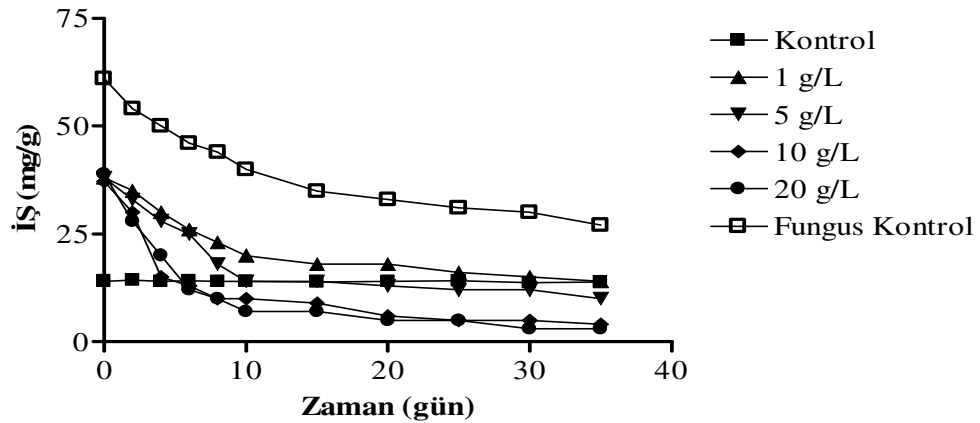
Farklı derişimlerde MK içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L MK için sırası ile 60,13; 58,99; 61,10 ve 58,98 mg/g olarak saptanmış ve bu değerler 10. güne kadar azalarak yine sırası ile 35,71; 21,33; 17,46 ve 18,67 mg/g'a düşmüştür. Ardından 10-15. günler arasında TK artarak sırası ile 47,12; 45,95; 42,46 ve 30,66 mg/g'a yükselmiştir. 15. günden inkübasyon sonuna kadar ise tüm ortamlarda TK hızla tüketilmiştir. 10-15. günler arasında gerçekleşen TK artışı umut vericidir ancak inkübasyon boyunca ölçülen hiçbir TK değeri başlangıç TK değerini yani MK'den gelen miktarı geçememiştir.

Bu nedenle *P. chrysosporium* ile MK fermantasyonu ön işleminin TK artırımı için gerekli olmadığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.83. *P. chrysosporium*'un MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

İş değişiminde bakıldığında ise TK da olduğu gibi artışlar söz konusu değildir. İnkübasyon başlangıcından bitişine kadar İş değerleri azalış göstermiştir (Şekil 4.84). İnkübasyonun başlangıcında İş değeri; 1, 5, 10 ve 20 g/L MK için sırası ile 38,10; 38,42; 37,88 ve 38,91 mg/g olarak saptanırken, bu değerler 35. günün sonunda sırası ile 14,65; 10,83; 4,41 ve 3,05 mg/g olarak saptanmıştır.

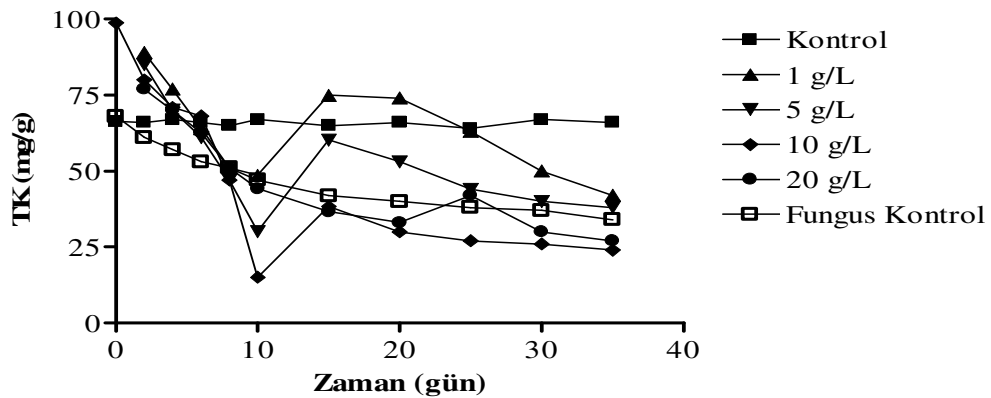


Şekil 4.84. *P. chrysosporium*'un MK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İş değişimi (150 rpm, 30 °C).

BK ile yapılan çalışmalar

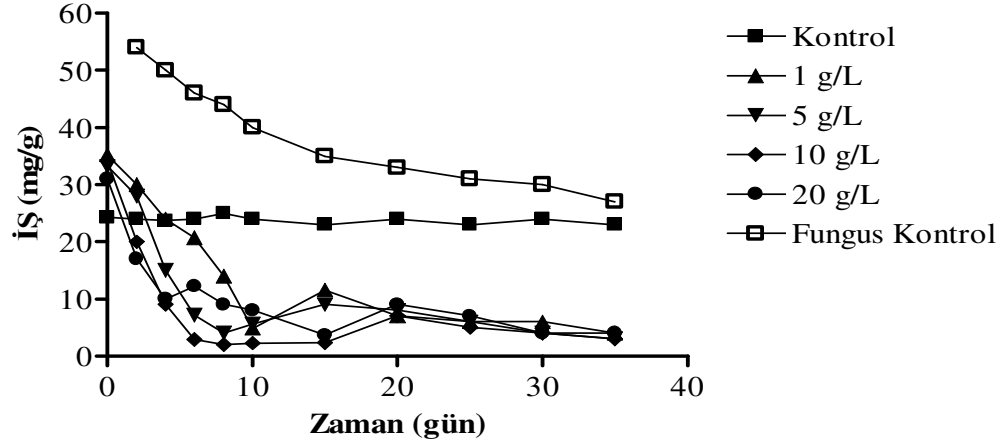
BK'nın kontrol (fungus içermeyen-Kontrol) grubunda başlangıçtan 35. günün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyonun başlangıcında ölçülen TK 66,40 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 66,01 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan BK'nın kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.85.).

Farklı derişimlerde BK içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında; inkübasyonun başlangıcında 1, 5, 10 ve 20 g/L BK için sırası ile 101,22; 100,63; 98,78 ve 102,37 mg/g olarak saptanmıştır. 20 g/L BK içeren ortamda TK inkübasyonun sonuna kadar azalış göstermiş ve 35. günde 27,54 mg/g olarak ölçülmüştür. 1, 5 ve 10 g/L BK içeren ortamlarda ise TK; 10. güne kadar azalmış ve 10. günün sonunda sırası ile 48,74; 30,11; 15,05 mg/g olarak belirlenmiştir. Ardından 10-15. günler arasında TK artarak 15. gün sonunda sırası ile 47,12; 45,95 ve 42,46 mg/g bulunmuştur. 15. günden inkübasyon sonuna kadar ise bu ortamlarda TK hızla tüketilmiştir. Çalışma sonuçlarına bakıldığında; inkübasyon boyunca ölçülen hiçbir TK değeri başlangıç TK değerini yani BK'den gelen miktarı geçememiştir. Bu nedenle *P. chrysosporium* ile BK fermantasyonu ön işleminin TK artırımı için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. Sonuçlar Şekil 4.85.'de verilmiştir.



Şekil 4.85. *P. chrysosporium*'un BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

BK ile yapılan çalışmada İŞ değişiminde bakıldığında ise TK da olduğu gibi önemli artışlar söz konusu değildir. İnkübasyonun başlangıcında İŞ değeri; 1, 5, 10 ve 20 g/L BK için sırası ile 35,21; 33,23; 34,12 ve 31,27 mg/g olarak saptanırken, bu değerler 35. günün sonunda sırası ile 4,07; 3,14; 3,81 ve 4,61 mg/g olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.86’da verilmiştir.



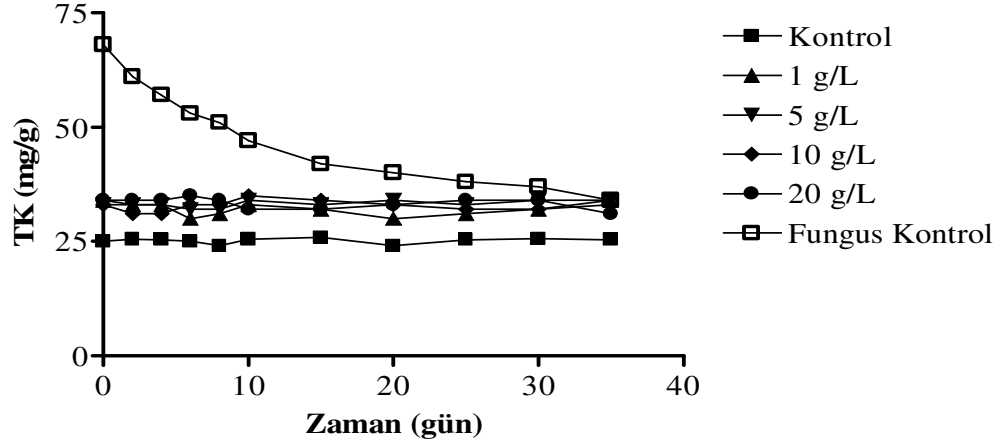
Şekil 4.86. *P. chrysosporium*'un BK ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

BS ile yapılan çalışmalar

Kontrol grubunda (fungus içermeyen-Kontrol) inkübasyonun başlangıcından 35. gününün sonuna kadar TK değişimi olmamıştır. İnkübasyon başlangıcında ölçülen TK 25,11 mg/g iken bu değer 35. gün sonunda 25,40 mg/g olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ortamda bulunan BS'nin kontamine olmadığını, zamanla ve çalkalamanın etkisi ile parçalanarak ortama TK ilavesi yapmadığını göstermiştir (Şekil 4.87.).

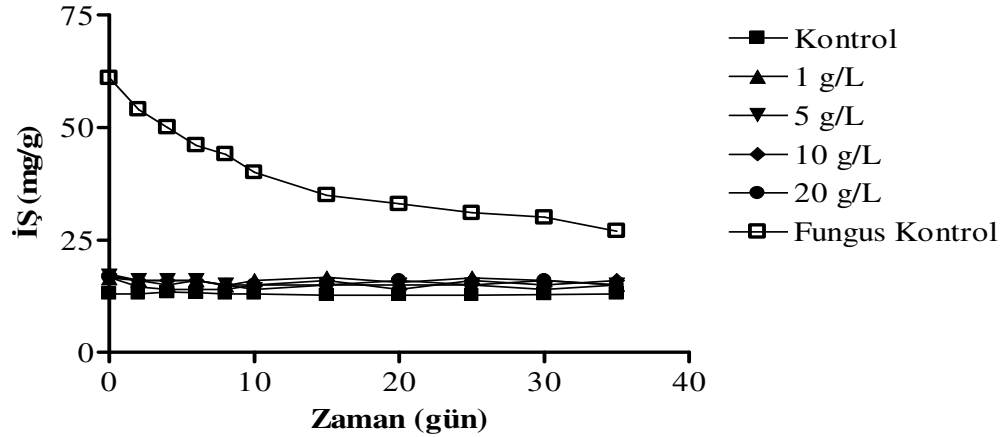
Farklı derişimlerde BS içeren ortamlardaki TK değişimine bakıldığında *P. chrysosporium*'un ortamlarda yetirince gelişemediği görülmektedir. Çünkü TK azalışı hiçbir ortamda gerçekleşmemiştir. Bu sonuç; *P. chrysosporium* ile yapılan BS

fermantasyonu ön işleminin TK artırımı için gerekli olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.87.).



Şekil 4.87. *P. chrysosporium*'un BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan TK değişimi (150 rpm, 30 °C).

Farklı derişimlerde BS içeren ortamlardaki İŞ değişimi de TK değişimine benzer şekilde gerçekleşmiştir. İŞ değişiminin olmayışı fungusun gelişemediğini bir kez daha ispatlamıştır. Sonuçlar Şekil 4.88.'de verilmiştir.



Şekil 4.88. *P. chrysosporium*'un BS ile gerçekleştirilen inkübasyonu boyunca saptanan İŞ değişimi (150 rpm, 30 °C).

Shi ve ark. [90], *P. chrysosporium* ile pamuk sapında lignin giderimi ve karbonhidrat kazanımını çalışmışlardır. Çalışma sıvı fazda, çalkalamalı (150 rpm) ve statik olmak üzere iki farklı inkübasyon ortamında gerçekleştirilmiştir. 14 gün sürdürülen inkübasyon boyunca her iki günde bir örnek alınarak; lignin, karbonhidrat (glukoz, ksiloz, arabinoz ve galaktoz) ve selüloz analizleri yapılmıştır. Çalışma sonunda statik ortamda % 20,7 lignin giderimi sağlanırken, % 29,0 karbonhidrat geri kazanımı sağlanmıştır. Çalkalamalı ortamda ise lignin giderimi % 33,9 olarak belirtilirken, karbonhidrat kazanımının % 18,4 olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca ilk 10 gün boyunca her iki ortamda da selüloz aktivitesinin oldukça düşük olduğu ve 10–14. günler arasında aktivitenin belirgin bir şekilde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalkalamalı ortamda lignin gideriminin statik ortama göre daha fazla olmasına rağmen karbonhidrat geri kazanımının daha fazla olduğu statik ortamın uygulanmasının uygun olacağını ve inkübasyondan önce asit hidrolizi yapılarak verimin artırılabilirliğini belirtmişlerdir.

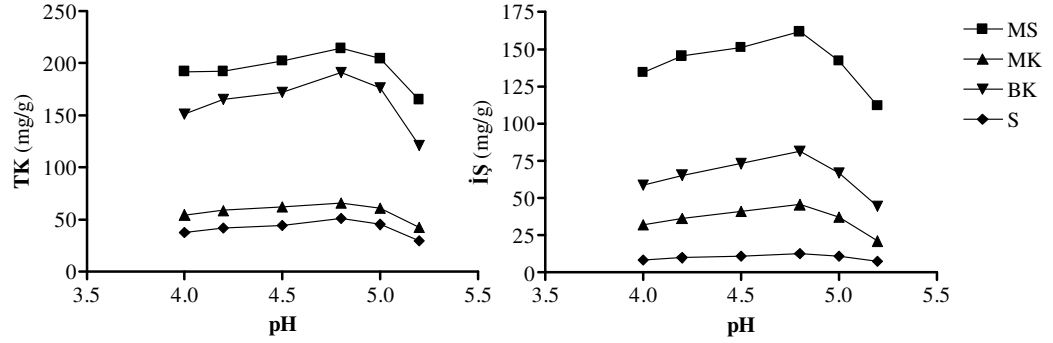
Bu çalışmada beyaz çürükçül funguslarla gerçekleştirilen sakkarifikasyon çalışmaları sonucunda denenen tüm hammadde türleri ve derişimleri için TK ve İŞ değerlerinde başlangıç miktarlarını aşan artışlar saptanamamıştır.

4.4.2. Enzimatik Ön İşlem Çalışmaları

Ticari selülozun aktivitesi Ghose'nin [79] önerdiği şekilde yapılmış ve 19,3 FPU/mL olarak saptanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda ortamlardaki hammadde miktarına (FPU/g) göre selüloz eklemesi yapılmıştır

4.4.2.1. Selüloz enzimi ile ön işlemden pH'nın etkisi

Tüm hammaddelerin 5 g/L çözeltileri hazırlanmış ve üzerlerine 15 FPU/g olacak şekilde selüloz ilave edilmiştir. 50 °C ve 150 rpm'de 48 saat sürdürülen işlemin sonunda saptanan TK ve İŞ değerleri Şekil 4.89.'da verilmiştir.



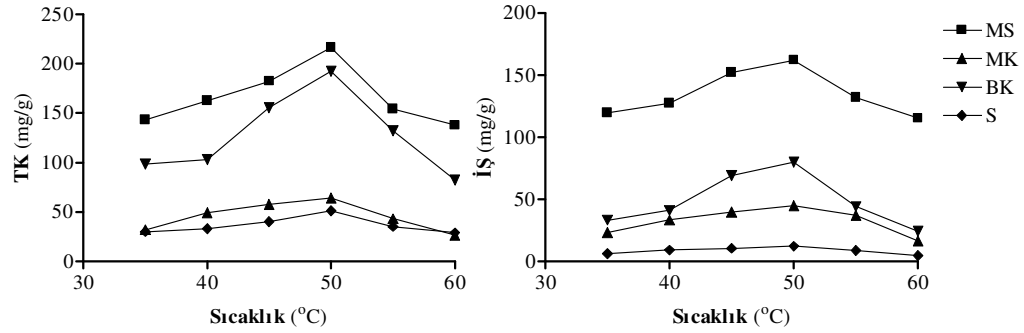
Şekil 4.89. Selülaz ile ön işlem çalışmalarında pH'nın etkisi (sıcaklık: 50 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, temas süresi: 48 saat, selülaz derişimi: 15 FPU/ghammadde ve hammadde derişimi: 5 g/L).

Şekil 4.89.'da da görüldüğü üzere TK ve İŞ için optimum pH 4,8 olarak saptanmıştır. İşlem başlangıcında MS, MK, BK ve BS için saptanan TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler 48 saatlik temas süresi sonunda yine sırası ile 214,10; 65,99; 191,23 ve 51,22 olarak belirlenmiştir. pH optimizasyonu sırasında İŞ değerleri ise başlangıçta MS, MK, BK ve BS için sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 mg/g iken işlem sonunda ise 161,71; 45,54; 81,23 ve 12,56 mg/g olarak saptanmıştır.

Sharma ve ark [91], ayçiçeği koçanında enzimatik sakarifikasyon gerçekleştirdikleri çalışmalarında pH'ın etkisini araştırmışlardır. pH 4-6 arası (4,0; 4,5; 5,0-5,5 ve 6,0) yaptıkları çalışmada, ortam şartlarını bu çalışmadaki şartlara benzerdir (sıcaklık: 50 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, temas süresi: 72 saat, selülaz derişimi: 25 FPU/ghammadde ve hammadde derişimi: % 5). Araştırma sonucunda optimum pH olarak 5,0 belirlerlerken bu değerde saptanan İŞ değerini ise 436,6 mg/g olarak rapor etmişlerdir.

4.4.2.2. Sıcaklığın etkisi

Maksimum sakarifikasyon verimi için 6 farklı sıcaklığın (35, 40, 45, 50, 55, 60 °C) çalışıldığı araştırmanın sonunda 50 °C’de gerçekleştirilen enzimatik hidroliz sonuçları diğer sıcaklıklara göre daha yüksek saptanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.90.’da verilmiştir.



Şekil 4.90. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında sıcaklığın etkisi (pH 4,8; çalkalama hızı: 150 rpm, temas süresi: 48 saat, selüloz derişimi: 15 FPU/ghammadde ve hammadde derişimi: 5 g/L).

İşlem başlangıcında MS, MK, BK ve BS için saptanan TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler 48 saatlik temas süresi sonunda yine sırası ile 216,22; 64,29; 192,34 ve 51,20 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık optimizasyonu sırasında İŞ değerleri ise başlangıçta MS, MK, BK ve BS için sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 mg/g iken işlem sonunda ise 162,28; 44,91; 79,97 ve 12,11 mg/g olarak saptanmıştır.

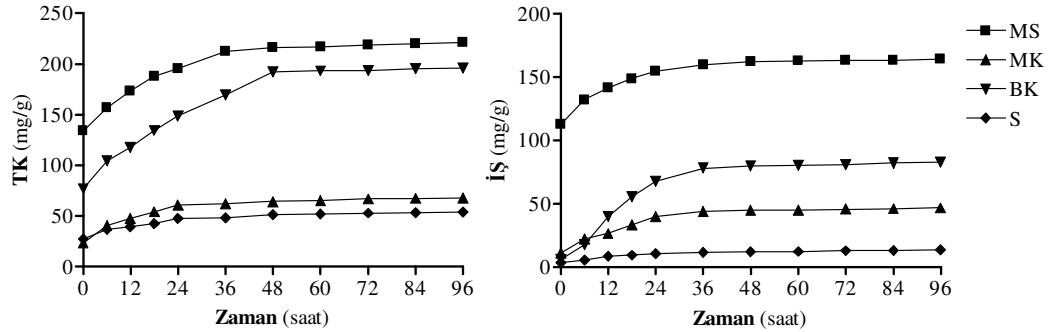
Yang ve ark [92], ultrasonik ön işlem ve ardından enzimatik hidrolizin selüloz sakarifikasyonuna etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında enzimatik hidrolizde sıcaklığın etkisini de araştıran çalışmacılar, üç farklı sıcaklıkta (40, 50 ve 60 °C) 24 saat hidroliz reaksiyonu gerçekleştirmişler ve optimum sıcaklık olarak 50 °C’yi belirlemişlerdir. 10 mg/mL derişiminde selüloz kullandıkları çalışmada 40

°C'de % 83,36, 50 °C'de % 93,09 ve 60 °C'de ise % 80,09 oranında selüloz çevriminin gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Bir başka çalışmada ise ayçiçeği koçanı kullanılarak 40, 45, 50, 55 ve 60 °C'de selüloz ile gerçekleştirilen 72 saatlik enzimatik hidroliz denemeleri sonucunda optimum sıcaklık 50 °C olarak saptanırken verim % 54,6 olarak rapor edilmiştir [91].

4.4.2.3. Temas süresinin etkisi

Enzimatik hidroliz işlemlerinde temas süresinin etkisini belirlemek amacıyla ilk 24 saat 6 saat ara ile ve ardından 12 saat ara ile toplam 96 saat olacak şekilde denemeler yapılmıştır. Çalışma bulguları Şekil 4.91.'de verilmiştir. Şekil 4.91.'de de görüldüğü gibi TK ve İŞ 36. saate kadar artış gösterirken daha sonraki zamanlarda yapılan ölçümlerde artışın hemen hemen sabitlendiği görülmektedir.



Şekil 4.91. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında temas süresinin etkisi (pH 4,8; sıcaklık 50 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, selüloz derişimi: 15 FPU/ghammadde ve hammadde derişimi: 5 g/L).

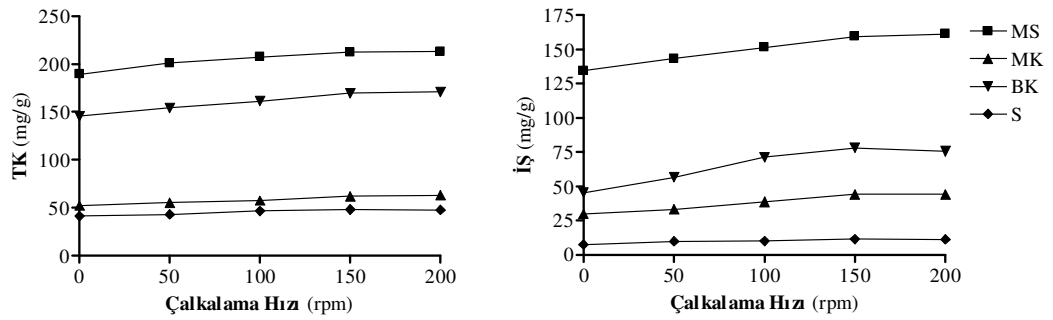
İşlem başlangıcında MS, MK, BK ve BS için saptanan TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler ilk 36 saat sonunda sırası ile 212,30; 64,11; 169,70 ve 48,37 olarak, 96. saatin sonunda ise 221,34; 67,99; 196,22 ve 53,99 olarak belirlenmiştir. temas süresinin optimizasyonu sırasında İŞ değerleri

ise başlangıçta MS, MK, BK ve BS için sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 mg/g iken bu değerler ilk 36 saat sonunda sırası ile 159,34; 44,11; 78,14 ve 11,65 olarak, 96. saatin sonunda ise 164,10; 46,78; 82,93 ve 13,60 olarak belirlenmiştir.

Zheng ve ark [53], substrat olarak deniz yosunu kullandıkları çalışmalarında selüla ile gerçekleştirdikleri hidroliz reaksiyonunun ilk 24 saatte % 87'sinin tamamlandığını ve 120. saatin sonunda ise bu değer % 92,2 olarak ölçüldüğünü rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise selüloz hidrolizinin (enzimatik) ilk 24 saatlik reaksiyonu 2'şer saatlik periyotlar halinde incelenmiş ve 24 saat sonuna kadar reaksiyonun lineer bir biçimde artış gösterdiğini ve 36. saat sonunda sabitlendiği bildirilmiştir [92]. Selüla ile gerçekleştirilen sakarifikasyonda temas süresinin optimizasyonunun araştırıldığı bir başka çalışmada da ayçiçeği koçanı kullanılmıştır. 72 saat devam ettirilen reaksiyon sonunda optimum süre 48 saat olarak belirlenmiştir [91].

4.4.2.4. Çalkalama hızının etkisi

Maksimum sakarifikasyon verimi için 5 farklı çalkalama hızının (0, 50, 100, 150, 200 rpm) etkisi araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.92.'de verilmiştir.

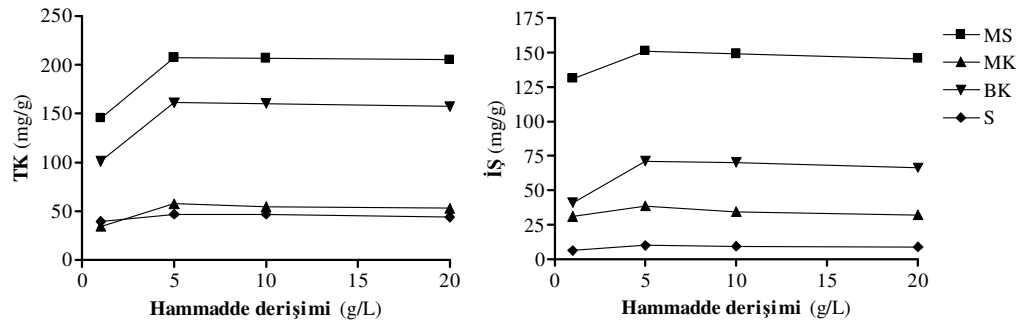


Şekil 4.92. Selüla ile ön işlem çalışmalarında çalkalama hızının etkisi (pH 4,8; sıcaklık 50 °C, temas süresi 36 saat, selüla derişimi: 15 FPU/ghammadde ve hammadde derişimi: 5 g/L).

Şekil 4.92.'de de görüldüğü gibi TK ve İŞ değerleri için 100 rpm çalkalama hızı optimum değerdir. Statik ortamda saptanan TK ve İŞ değerleri MS, MK, BK ve BS için sırası ile TK: 189,44; 52,10; 145,66 ve 41,2 mg/g, İŞ: 134,45; 29,87; 45,55 ve 7,50 mg/g olarak belirlenirken 100 rpm'de saptanan TK ve İŞ değerleri MS, MK, BK ve BS için sırası ile TK: 207,60; 57,70; 161,31 ve 46,72 mg/g, İŞ: 151,32; 38,71; 71,3 ve 10,16 mg/g olarak belirlenmiştir. Bu bulgu 36 saatlik işlem için çalkalama gereksinimi ortaya koymaktadır.

4.4.2.5. Hammadde derişiminin etkisi

Maksimum selüloz çevriminin gerçekleşebilmesi amacıyla çalışmada kullanılan 4 farklı lignoselülozik maddenin (MS, MK, BK ve BS) 4 farklı derişimi (1, 5, 10 ve 20 g/L) çalışılmıştır. Bulgular Şekil 4.93.'de verilmiştir.



Şekil 4.93. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında hammadde derişiminin etkisi (pH 4,8; sıcaklık 50 °C, temas süresinin 36 saat, çalkalama hızı 100 rpm ve selüloz derişimi: 15 FPU/ghammadde).

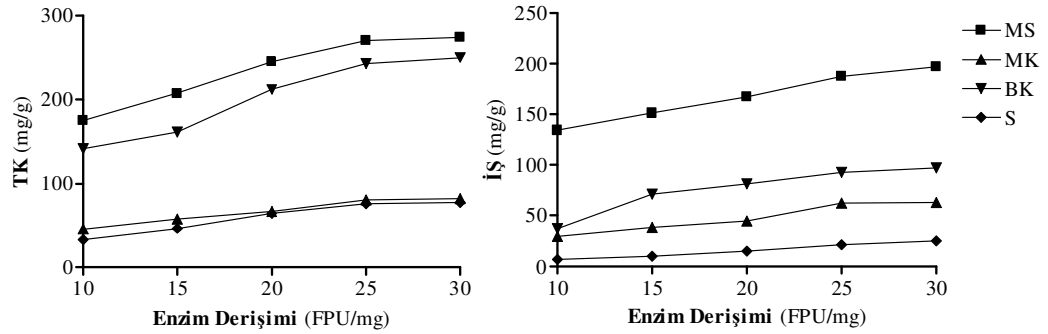
5 g/L derişimde yapılan hidroliz işlemi optimum değer olarak saptanmıştır. Şekil 4.93.'de de görüldüğü gibi hammadde derişimi arttıkça TK ve İŞ değerlerinde bazı küçük azalışlar belirlenmiştir. Benzer bulgular Sharma ve ark [91] tarafından yapılan çalışmada da rapor edilmiştir. Araştırmacılar ayçiçeği koçanı kullandıkları çalışmalarında hammadde derişimi % 5'in üzerine çıktığında enzim derişimi g hammadde başına aynı olmasına rağmen selüloz çevriminin oldukça düştüğünü rapor etmişlerdir. Bu durum ortamda bulunan hammadde yoğunluğu

nedeniyle hidroliz hızının düşmesi ile açıklanabilir. Eşit verimlerin elde edilmesi için hidroliz temas süresinin uzatılmasının gerekliliği düşünülmektedir. Ancak temas süresinin uzatılması ise sisteme ek maliyet doğuracaktır.

Zheng ve arkadaşları ise selüloz ile yaptıkları hidrolizde substrat derişimi artışıyla selüloz çevriminin orantılı olarak azaldığını ve bu azalışın artan substrat derişimi ile enzim substrat birleşiminin azalması nedeniyle gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [53].

4.4.2.6. Selüloz derişiminin etkisi

Enzimatik optimizasyon çalışmalarının son basamağı olarak 5 farklı selüloz derişimi (10, 15, 20, 25, 30 FPU/g) çalışılmıştır. Çalışma sonunda belirlenen TK ve İŞ değerleri Şekil 4.94.'de verilmiştir.



Şekil 4.94. Selüloz ile ön işlem çalışmalarında enzim derişiminin etkisi (pH 4,8; sıcaklık 50 °C, temas süresi 36 saat, çalkalama hızı 100 rpm ve hammadde derişimi: 5 g/L).

Şekil 4.94.'de de görüldüğü gibi TK ve İŞ değerleri enzim derişimi 25 FPU/g'a kadar artış göstermiştir. 10 FPU/g'da saptanan TK değerleri MS, MK, BK ve BS için sırası ile 175,27; 45,88; 141,73 ve 33,21 mg/g, bu değerler 25 FPU/g için 270,25; 80,69; 242,84 ve 76,29 mg/g olarak saptanmıştır. İŞ değerleri de benzer

şekilde 10 FPU/g'da MS, MK, BK ve BS için sırası ile 134,22; 29,50; 37,12 ve 6,60 mg/g, bu değerler 25 FPU/g için 187,51; 62,34; 93,06 ve 21,23 mg/g olarak belirlenmiştir.

Zheng ve ark. karaya vurmuş deniz yosunları ile yaptıkları çalışmalarında selüloz derişimini optimizasyonunu 10-160 FPU/g arasında çalışmışlar ve artan selüloz derişimi ile verimin arttığını ancak bu artışın 60 FPU/g'a kadar hızla, daha üst derişimlerde ise daha yavaş olduğunu bu nedenle optimum değer olarak 60 FPU/g'ın belirlendiğini rapor etmişlerdir [53].

Bir başka çalışmada ise saf selüloz'un (20 mg/mL) enzimatik hidrolizinde 10-60 FPU/g selüloz derişimi denenmiş ve optimum değer olarak 20 FPU/g saptanmıştır [92].

Selüloz ile hammaddelerin hidroliz işlemleri sonucunda optimum değerler pH, sıcaklık, temas süresi, çalkalama hızı, hamadde ve enzim derişimi için sırası ile; 4,8; 50 °C, 36 saat, 100 rpm, 5 g/L ve 25 FPU/g olarak saptanmıştır. Başlangıçta TK değerleri MS, MK, BK ve BS için sırasıyla; 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler optimum şartlarda gerçekleştirilen hidroliz işlemlerinden sonra sırası ile 270,25; 80,69; 242,84 ve 76,29 mg/g olarak saptanmıştır.

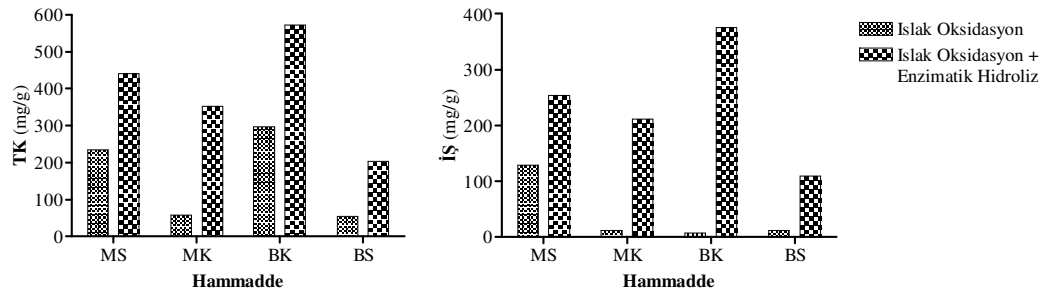
İş değerleri ise başlangıçta MS, MK, BK ve BS için sırasıyla: 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 mg/g iken optimum şartlarda gerçekleştirilen hidroliz işlemlerinden sonra sırası ile 187,51; 62,34; 93,06 ve 21,23 mg/g olarak saptanmıştır.

Enzimatik hidrolizde elde edilen verimler, özellikle asidik ve ısı ön işlem çalışmalarında elde edilen verimlerden daha düşüktür. Bu nedenle verimin daha da artırılabilmesi için çalışmanın bundan sonraki kısımlarında yüksek verim elde edilen şartların kombinasyonları denenmiştir.

4.5. ÖN İŞLEM KOMBİNASYONU

4.5.1. Islak Oksidasyon - Enzimatik Ön İşlem Kombinasyonu

Bu ön işlem kombinasyonu 2 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Birinci basamakta ilk olarak ıslak oksidasyon uygulanmış ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci basamakta ise ilk olarak enzimatik hidroliz işlemi ardından ıslak oksidasyon uygulanmıştır. Islak oksidasyon çalışmaları 5 g/L hammadde derişiminde, 1,2 MPa basınç ve 121 °C sıcaklıkta 30 dk; enzimatik hidroliz işlemleri ise optimum şartlarda (pH: 4,8; 50 °C, 36 saat, 100 rpm, 5 g/L hammadde ve 25 FPU/g enzim derişimi) gerçekleştirilmiştir. Birinci basamak sonuçları Sonuçlar Şekil 5.95.'de, ikinci basamak sonuçları ise Şekil 5.96.'de verilmiştir.

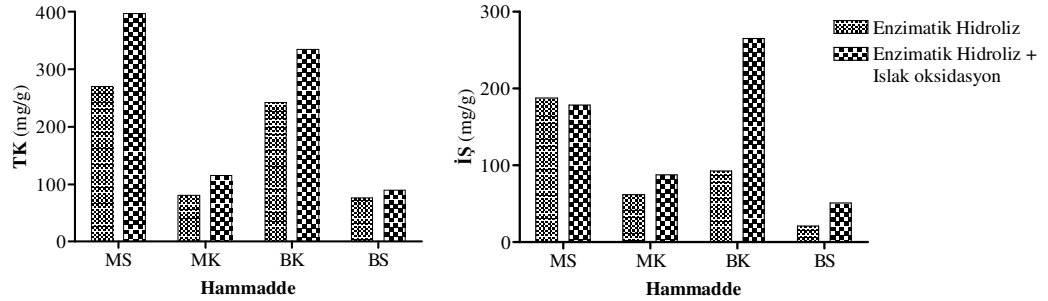


Şekil 4.95. Islak oksidasyon ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri.

Islak oksidasyonun ardından enzimatik hidroliz uygulandığında verimlerin oldukça arttığı Şekil 4.95.'de de görülmektedir. MS, MK, BK ve BS için başlangıçta saptanan TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler ıslak oksidasyon sonunda 234,78; 58,4; 296,7 ve 54,30 mg/g, ardından yapılan enzimatik işlem sonunda ise 440,61; 353,34; 572,30 ve 203,3 mg/g olarak belirlenmiştir. İŞ değerleri ise MS, MK, BK ve BS için başlangıçta sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 iken bu değerler ıslak oksidasyon sonunda 129,21; 11,94; 7,57 ve

12,30 mg/g, ardından yapılan enzimatik işlem sonunda ise 254,16; 211,45; 376,17 ve 109,93 mg/g olarak belirlenmiştir.

Enzimatik ön işlem ve ardından yapılan ıslak oksidasyon çalışmalarında ise (2. basamak) birinci basamakta saptanan değerlerden daha düşük verim elde edilmiştir (Şekil 4.96.). MS, MK, BK ve BS için başlangıçta saptanan TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler enzimatik işlem sonunda 270,25; 80,69; 242,84 ve 76,29 mg/g, ardından yapılan ıslak oksidasyon sonunda ise 397,43; 115,27; 335,21 ve 89,55 mg/g olarak belirlenmiştir. İŞ değerleri ise MS, MK, BK ve BS için başlangıçta sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 iken bu değerler enzimatik işlem sonunda 187,51; 62,34; 93,06 ve 21,33 mg/g, ardından yapılan ıslak oksidasyon sonunda ise 178,22; 88,23; 265,20 ve 51,33 mg/g olarak belirlenmiştir.



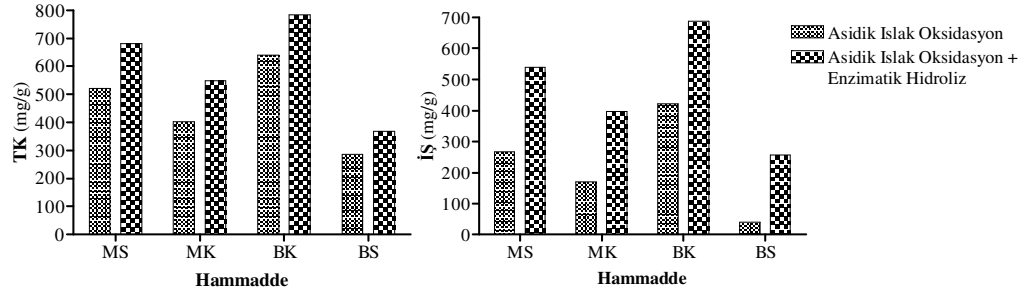
Şekil 4.96. Enzimatik hidroliz ve ardından ıslak oksidasyon gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri.

4.5.2. Asidik Islak Oksidasyon – Enzimatik Ön işlem Kombinasyonu

Bu ön işlem kombinasyonu da 2 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Birinci basamakta ilk olarak % 1,0 H₂SO₄ ile ıslak oksidasyon uygulanmış ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci basamakta ise ilk olarak enzimatik hidroliz işlemi ardından % 1,0 H₂SO₄ ile ıslak oksidasyon uygulanmıştır. Islak oksidasyon çalışmaları 5 g/L hammadde derişiminde, 1,2 MPa basınç ve 121 °C

sıcaklıkta 30 dk; enzimatik hidroliz işlemi ise optimum şartlarda (pH: 4,8; 50 °C, 36 saat, 100 rpm, 5 g/L hammadde ve 25 FPU/g enzim derişimi) gerçekleştirilmiştir.

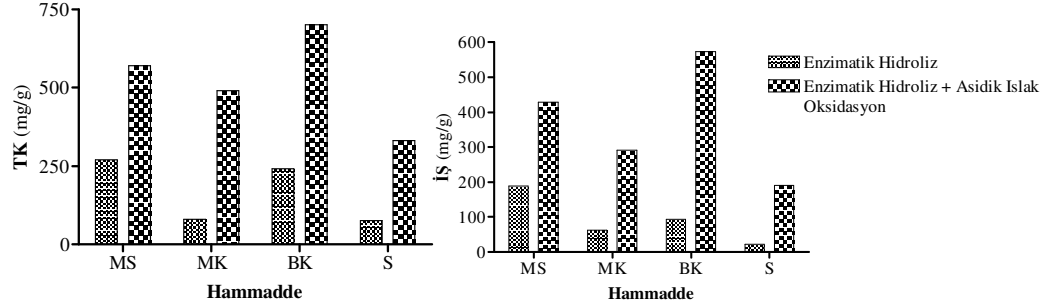
Birinci basamak sonuçları incelendiğinde şüana kadar yapılan tüm çalışmalar içerisinde en yüksek TK ve İŞ değerleri saptanmıştır (Şekil 4.97). Başlangıçta MS, MK, BK ve BS için TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler asidik ıslak oksidasyon sonunda 521,93; 401,22; 640,81 ve 285,24 mg/g, ardından yapılan enzimatik işlem sonunda ise 681,72; 549,21; 785,29 ve 369,18 mg/g olarak belirlenmiştir. İŞ değerleri ise MS, MK, BK ve BS için başlangıçta sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 iken bu değerler asidik ıslak oksidasyon sonunda 266,32; 171,47; 422,83 ve 39,30 mg/g, ardından yapılan enzimatik işlem sonunda ise 539,59; 397,58; 686,72 ve 255,74 mg/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.97. Asidik ıslak oksidasyon ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri.

İkinci basamak olan enzimatik ön işlem ve ardından yapılan asidik ıslak oksidasyon çalışmalarında ise; birinci basamakta saptanan değerlerden daha düşük verim elde edilmiştir. (Şekil 5.98). MS, MK, BK ve BS için başlangıçta saptanan TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler enzimatik işlem sonunda 270,25; 80,69; 242,84 ve 76,29 mg/g, ardından yapılan asidik ıslak oksidasyon sonunda ise 570,63; 491,23; 701,37 ve 332,61 mg/g olarak belirlenmiştir. İŞ değerleri ise MS, MK, BK ve BS için başlangıçta sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve

3,61 iken bu değerler enzimatik işlem sonunda 187,51; 62,34; 93,06 ve 21,33 mg/g, ardından yapılan ıslak oksidasyon sonunda ise 429,33; 291,19; 537,70 ve 191,37 mg/g olarak belirlenmiştir.



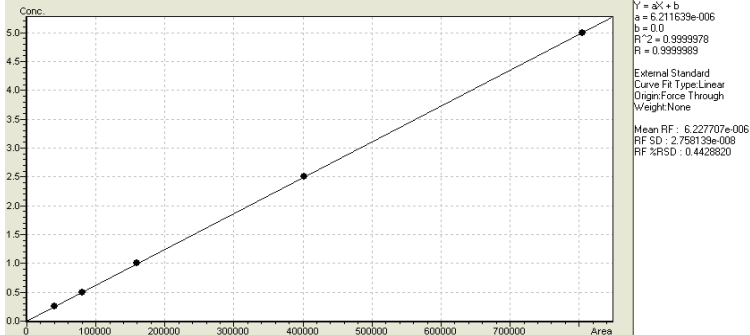
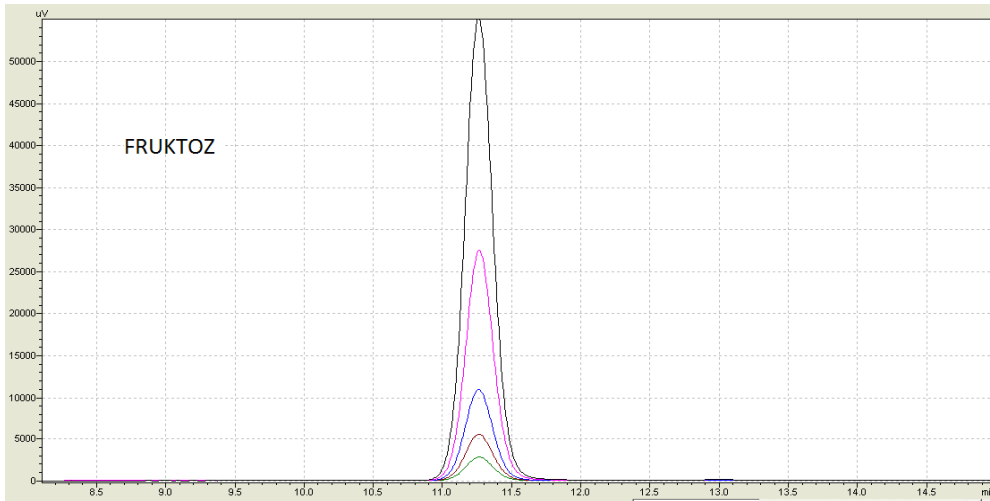
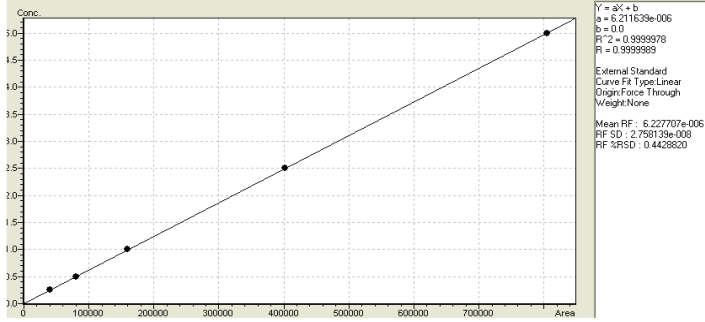
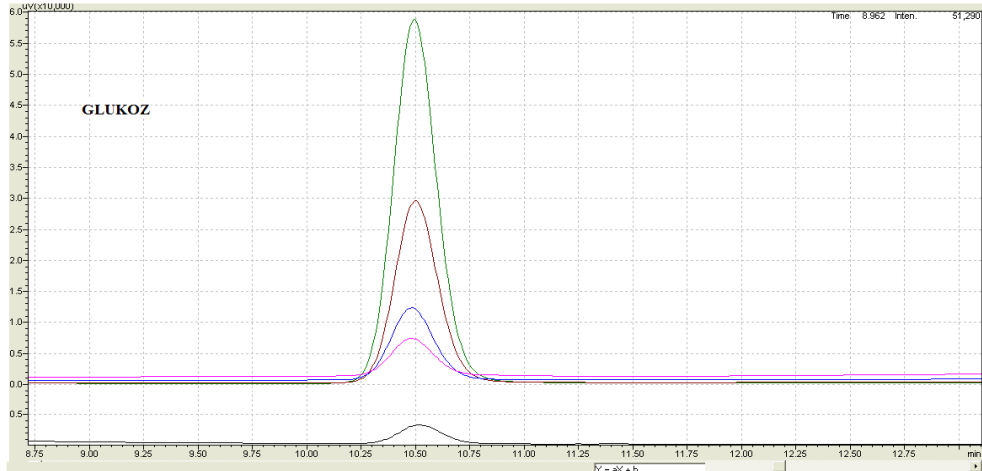
Şekil 4.98. Enzimatik hidroliz ve ardından asidik ıslak oksidasyon gerçekleştirilmiş ortamlarda saptanan TK ve İŞ değerleri.

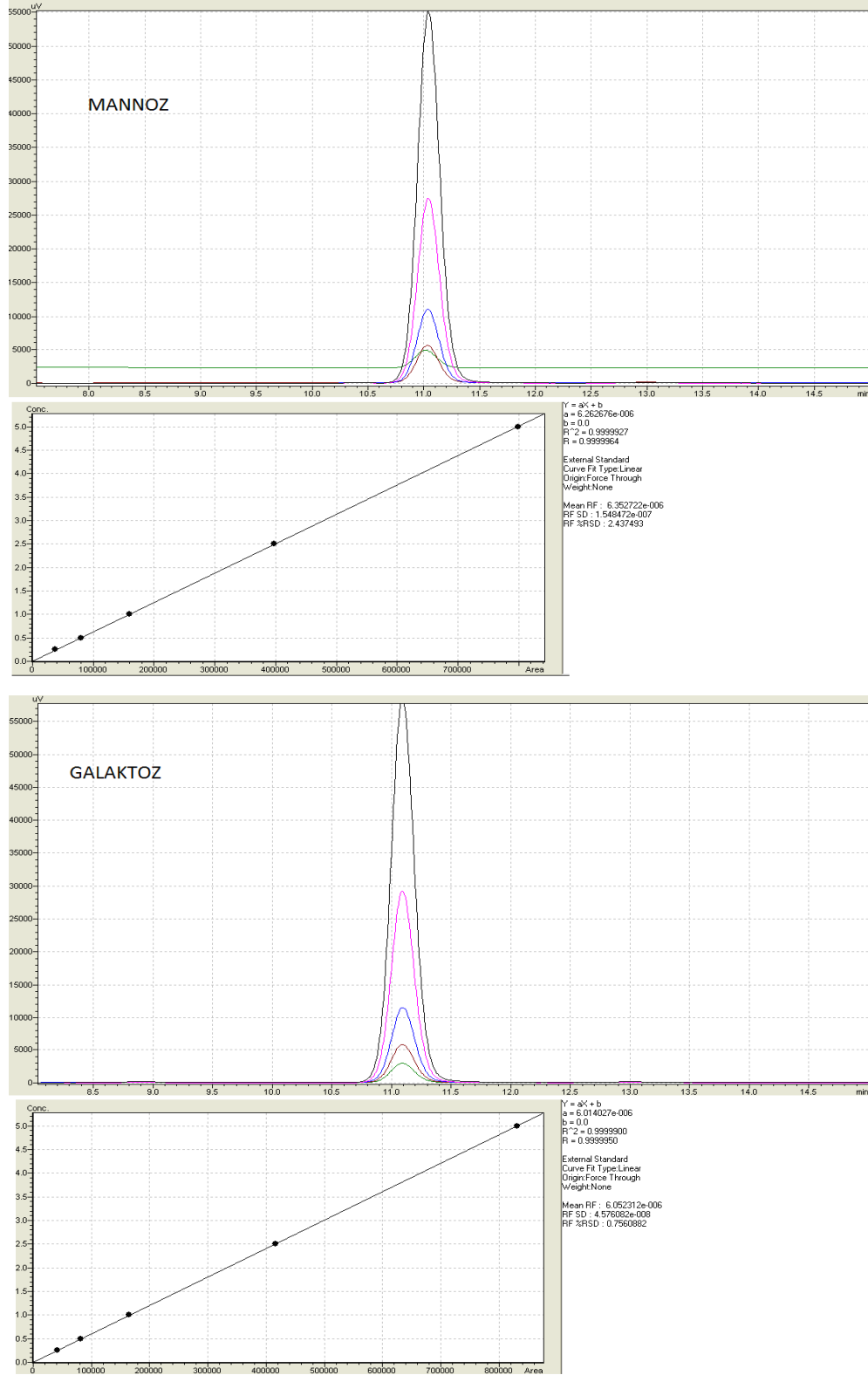
Ön işlem kombinasyonu çalışmaları sonunda en uygun kombinasyonun asidik ıslak işlem – enzimatik hidroliz olduğu saptanmıştır. Bu ortamda diğerlerine göre daha yüksek verim elde edilmesinin sebebi olarak lignoselülozik yapının asit, sıcaklık basınç altında bozulması ve ardından selülazın ilave edilmesi ile enzimin daha fazla selüloz ile reaksiyona girmesi olarak düşünülmüştür.

Çalışmada maksimum TK ve İŞ değerleri elde edilmiş ve optimizasyon işlemleri bitmiştir. Bundan sonraki basamakta ise optimum şart olarak belirlenen ortamlarda HPLC ile heksozların ve inhibitörlerin analizleri yapılmıştır.

4.6. HEKSOZLARIN TAYİNİ

Glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz için ayrı ayrı 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 g/L derişimlerde standartlar hazırlanmış ve uygulanan kromatografi şartlarında her bir maddenin kolonda alıkonma zamanına ya da gecikme zamanına (rt) göre (Glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz için sırasıyla; 10,482; 11,267; 11,033; 11,093 dk) oluşan pikler kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Oluşan pikler ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.99.'da verilmiştir.



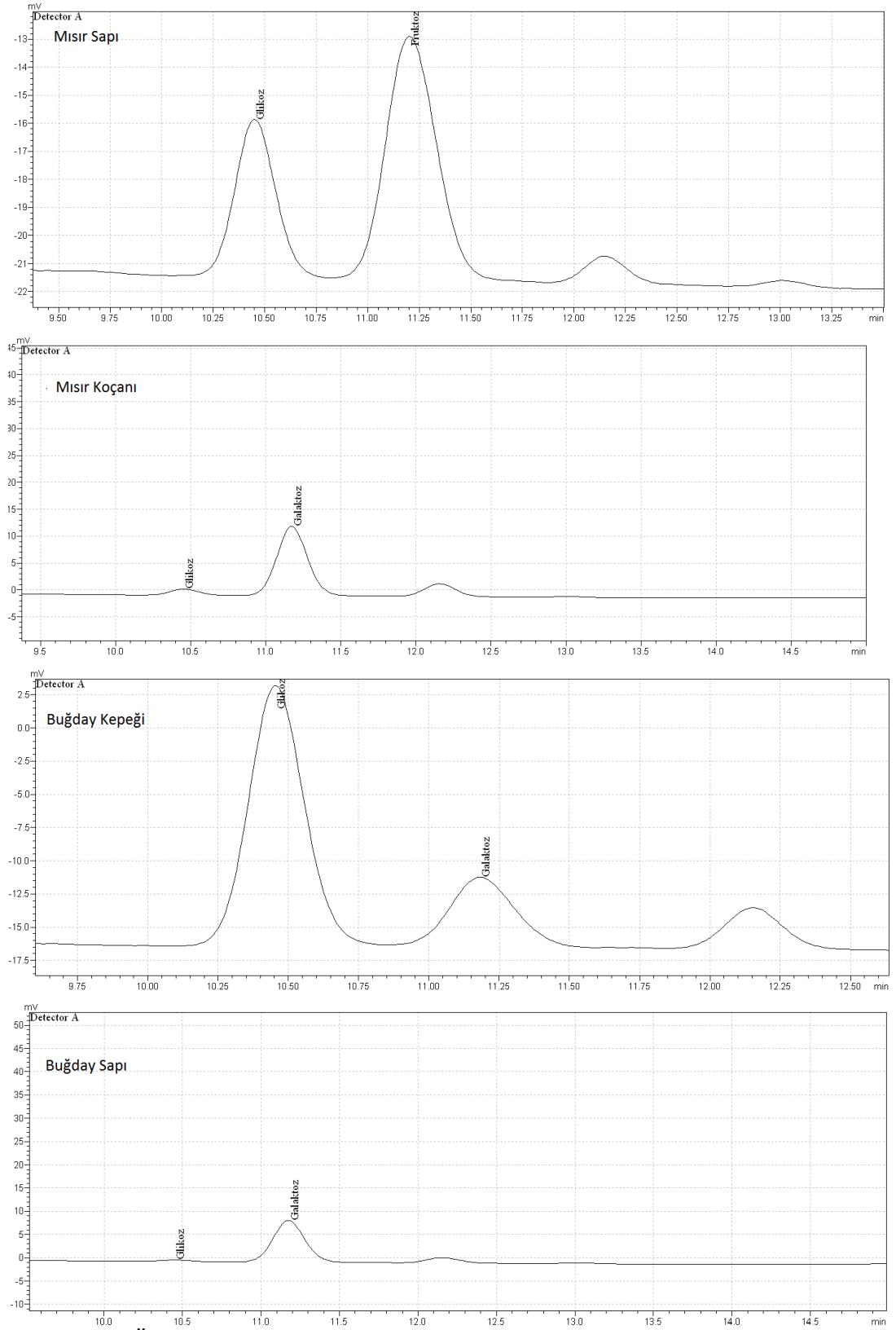


Şekil 4.99. Hektozlar için HPLC ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri.

Maksimum TK ve İŞ'nin saptandığı ön işlem kombinasyonu olan % 1,0 H₂SO₄ ile asidik - ıslak oksidasyon – enzimatik ön işlem kombinasyonu çalışmalarından elde edilen örneklerde yapılan heksoz tayinleri bulguları Çizelge 4.6. ve Şekil 4.100.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan heksozlar.

Hammadde	Glukoz (mg/g)	Fruktoz (mg/g)	Mannoz (mg/g)	Galaktoz (mg/g)	Toplam (mg/g)
MS	163,03	323,59	-	-	486,62
MK	28,17	-	-	333,61	361,78
BK	468,99	-	-	148,11	617,10
BS	6,18	-	-	195,68	201,86

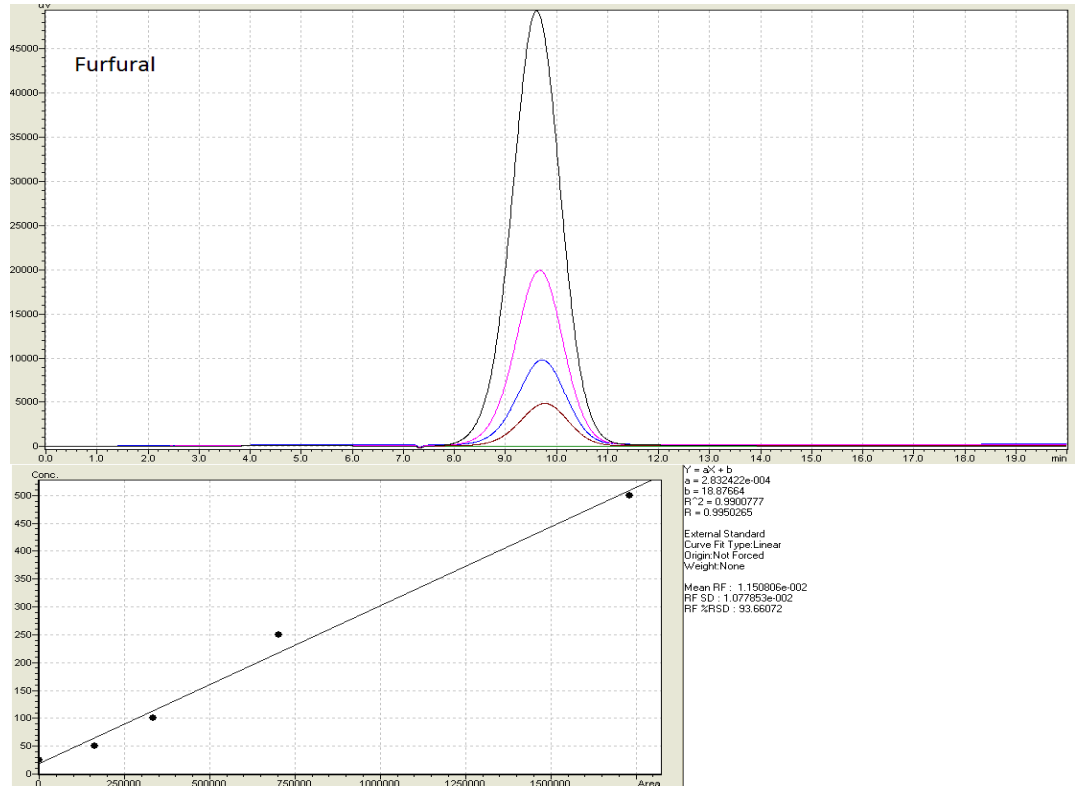
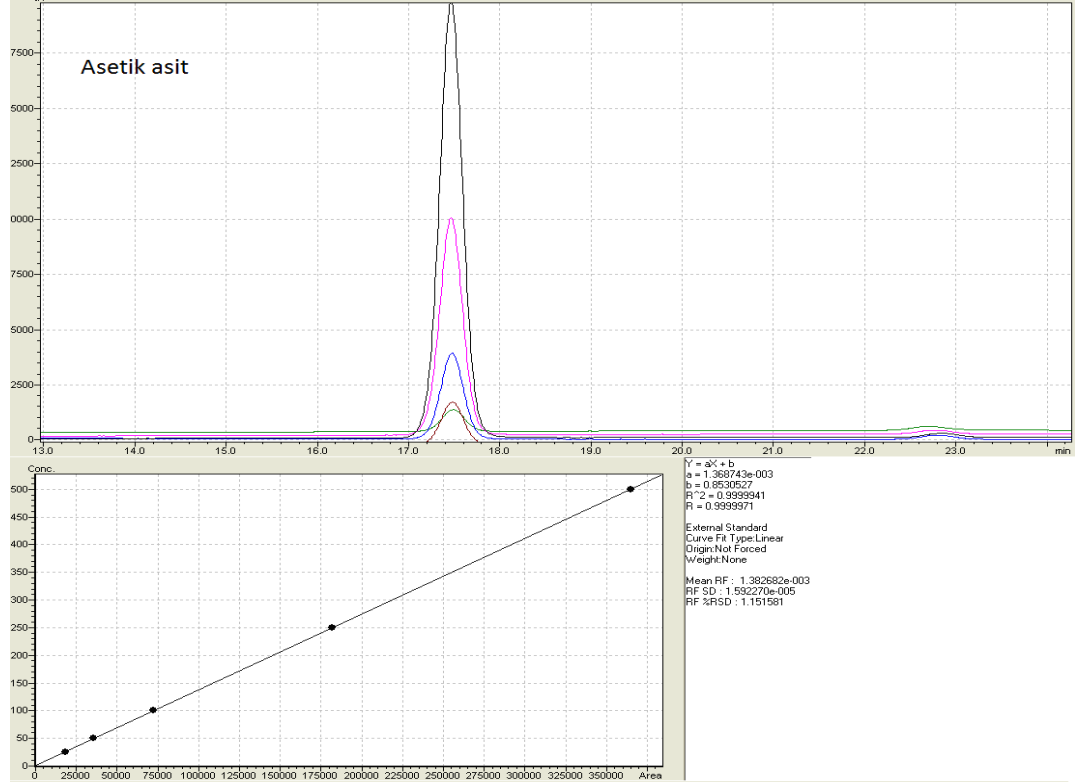


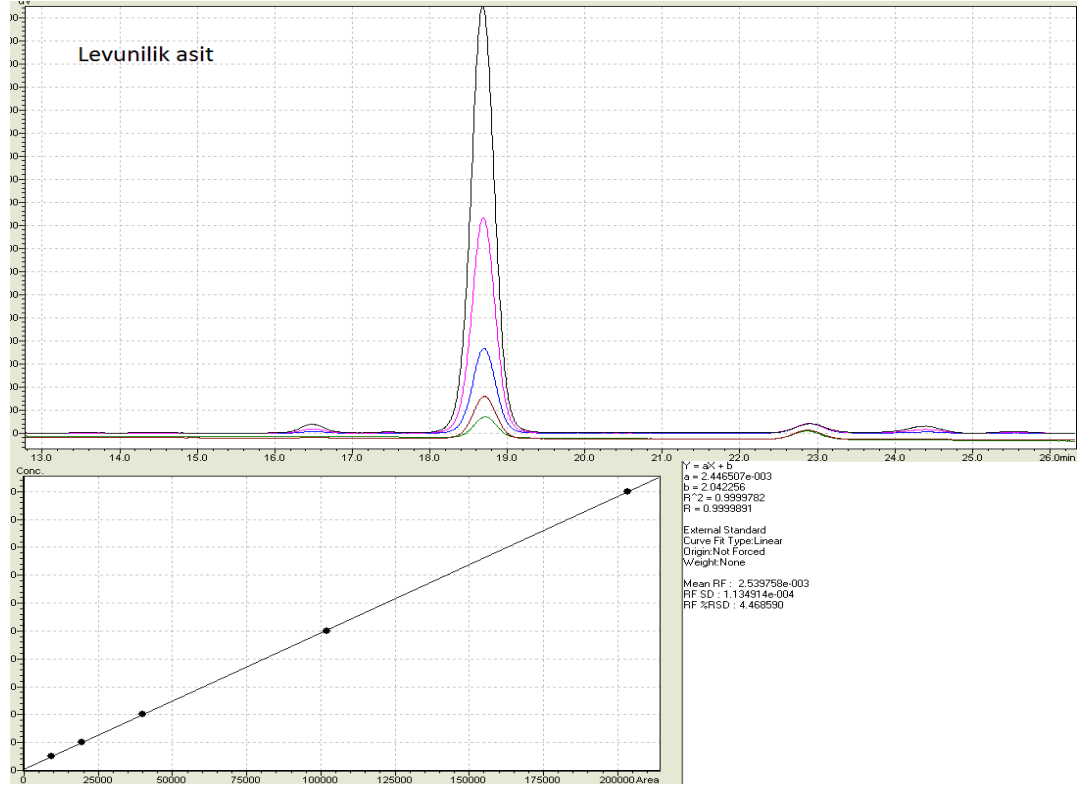
Şekil 4.100. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan heksozlar.

Hammaddelerde HPLC ile saptanan heksozların toplam miktarları (Tablo 4.6.) ve daha önceden kolorimetrik yöntemle belirlenen indirgen şeker miktarları karşılaştırıldığında, tüm hammaddeler için İŞ değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bu durum İŞ tayininde sadece Glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz değil; bunların yanında diğer olası heksozların ve pentozların da ölçülmesinden kaynaklandığını göstermektedir. Buna rağmen HPLC ile yapılan analizlerin daha güvenilir olması ve sadece heksozların (kolaylıkla fermente edilebilir şekerlerin) belirlenmiş olması, bundan sonra yapılacak olan etanol fermantasyonu için daha net sonuçlar vermiştir.

4.7. İNHİBİTÖRLERİN TAYİNİ

Furfural, asetik asit ve levunilik asit için ayrı ayrı 25, 50, 100, 250 ve 500 mg/L derişimlerde standartlar hazırlanmış ve uygulanan kromatografi şartlarında her bir maddenin kolonda alıkonma zamanına yada gecikme zamanına (rt) göre (Furfural, asetik asit ve levunilik asit için sırasıyla; 9,715; 18,683 ve 17,467 dk) oluşan pikler kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Oluşan pikler ve kalibrasyon eğrileri Şekil 4.101.'de verilmiştir.



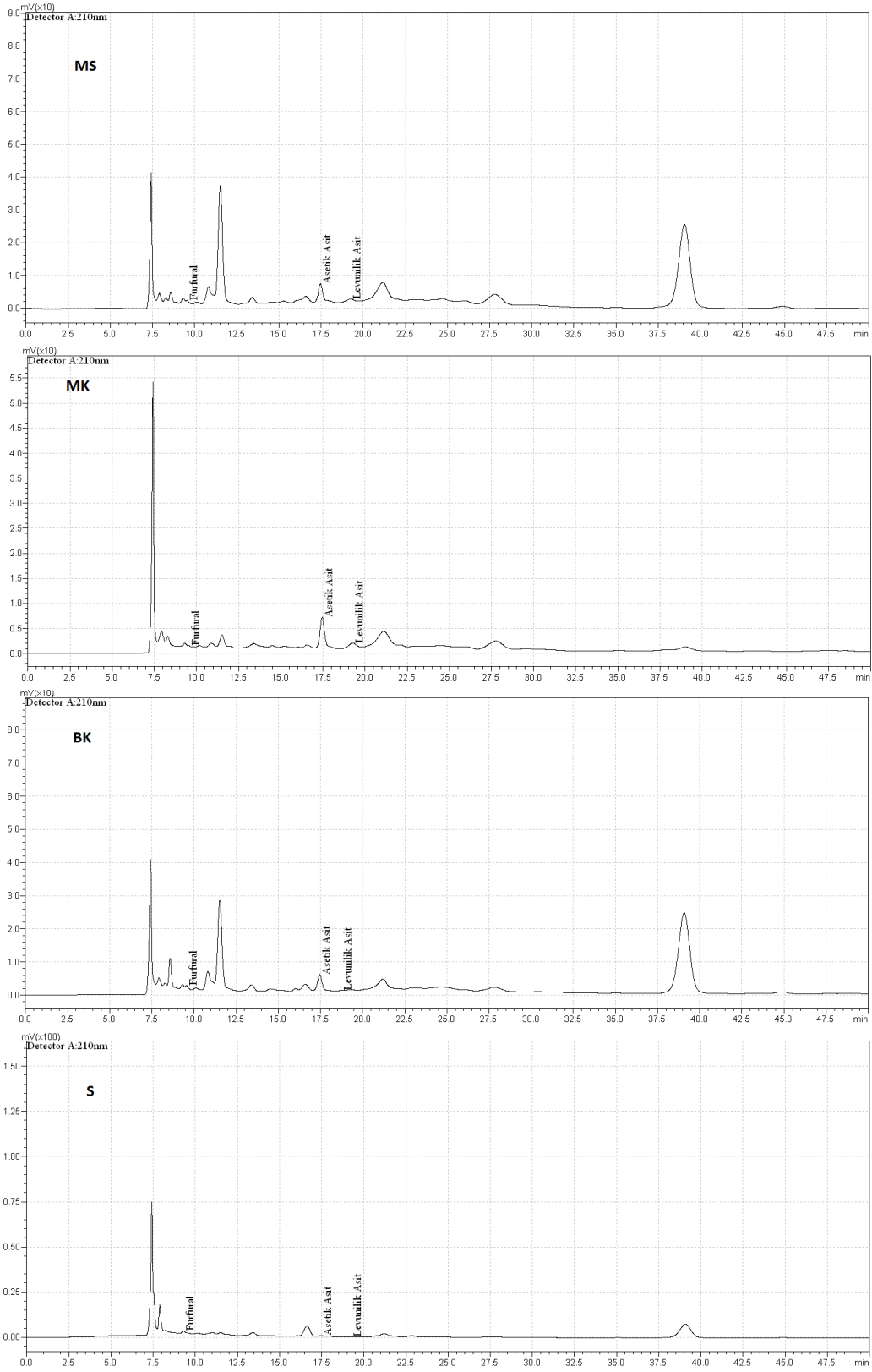


Şekil 4.101. İnhibitörler için HPLC ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri.

Maksimum TK ve İŞ'nin saptandığı ön işlem kombinasyonu olan % 1,0 H₂SO₄ ile asidik - ıslak oksidasyon – enzimatik ön işlem kombinasyonu çalışmalarından elde edilen örneklerde yapılan inhibitör madde tayinleri bulguları Çizelge 4.7. ve Şekil 4.102.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan inhibitör maddeler.

Hammadde	Furfural (mg/g)	Asetik asit (mg/g)	Levunilik asit (mg/g)
MS	5,93	37,28	18,42
MK	4,50	35,26	18,77
BK	7,29	37,58	22,90
BS	6,79	31,27	27,03



Şekil 4.102. Ön işlem kombinasyonu sonrası hammaddelerde saptanan inhibitörler.

Hiçbir ön işlem yapılmamış hammaddelerin sudaki çözeltilerinden alınan örneklerde inhibitör maddelerin hiçbirine rastlanmazken asidik ıslak oksidasyon ve ardından enzimatik ön işlem görmüş numunelerde aranan tüm inhibitörlerin hepsinden belirli miktarlarda saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda inhibitörlerin farklı yöntemlerle giderimleri çalışılmıştır.

4.8. DETOKSİFİKASYON ÇALIŞMALARI

4.8.1. Fiziksel Detoksifikasyon

Dietil eter ve etil asetat (çözücü:numune = 3:1) ile gerçekleştirilen ekstraksiyon deneyleri sonucunda saptanan heksoz ve inhibitör madde miktarları ve giderimleri, dietil eter ile yapılan ekstraksiyon için Çizelge 4.8.'de, etil asetat ile yapılan ekstraksiyon için ise Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Dietil eter ile yapılan ekstraksiyon çalışmaları sonrası saptanan heksozlar ve inhibitörler (¹ başlangıç, ² ekstraksiyon sonrası).

	MS (mg/g)	MK (mg/g)	BK (mg/g)	BS (mg/g)
Glukoz ¹	163,03	28,17	468,99	6,18
Glukoz ²	146,33	23,44	411,42	6,09
Kayıp (%)	10,24	16,79	12,34	1,45
Fruktoz ¹	323,59	-	-	-
Fruktoz ²	301,72	-	-	-
Kayıp (%)	6,75	-	-	-
Mannoz ¹	-	-	-	-
Mannoz ²	-	-	-	-
Kayıp (%)	-	-	-	-
Galaktoz ¹	-	333,61	148,11	195,68
Galaktoz ²	-	296,63	122,52	174,61
Kayıp (%)	-	11,08	17,28	10,81
Levunilik asit ¹	18,42	18,77	22,90	27,03
Levunilik asit ²	15,52	14,37	19,33	23,84
Giderim (%)	15,74	23,44	15,59	11,80
Asetik asit ¹	37,28	35,26	37,58	31,27
Asetik asit ²	26,77	23,41	27,22	23,21
Giderim (%)	28,19	33,61	27,57	25,78
Furfural ¹	5,93	4,50	7,29	6,79
Furfural ²	4,99	4,14	6,77	6,02
Giderim (%)	15,85	8,00	7,13	11,34

Çizelge 4.9. Etil asetat ile yapılan ekstraksiyon çalışmaları sonrası saptanan heksozlar ve inhibitörler (1 başlangıç, 2 ekstraksiyon sonrası).

	MS (mg/g)	MK (mg/g)	BK (mg/g)	BS (mg/g)
Glukoz ¹	163,03	28,17	468,99	6,18
Glukoz ²	131,24	20,28	395,27	5,98
Kayıp (%)	19,5	28,01	15,72	3,23
Fruktoz ¹	323,59	-	-	-
Fruktoz ²	297,63	-	-	-
Kayıp (%)	8,02	-	-	-
Mannoz ¹	-	-	-	-
Mannoz ²	-	-	-	-
Kayıp (%)	-	-	-	-
Galaktoz ¹	-	333,61	148,11	195,68
Galaktoz ²	-	287,31	117,16	164,48
Kayıp (%)	-	13,88	20,90	15,94
Levunilik asit ¹	18,42	18,77	22,90	27,03
Levunilik asit ²	13,56	12,17	17,94	21,77
Giderim (%)	26,38	35,16	20,90	19,46
Asetik asit ¹	37,28	35,26	37,58	31,27
Asetik asit ²	24,79	20,95	25,57	20,81
Giderim (%)	33,50	40,58	31,96	33,45
Furfural ¹	5,93	4,50	7,29	6,79
Furfural ²	4,12	3,85	6,01	5,23
Giderim (%)	30,52	14,44	17,56	22,97

Etil asetat ile yapılan detoksifikasyon verimleri daha yüksek olmasına rağmen, heksozlarda meydana gelen kayıplar dietil eter ile yapılan işleme göre daha yüksek bulunmuştur. Bulgular tüm detoksifikasyon çalışmaları sonunda tartışılmıştır.

4.8.2. Kimyasal Detoksifikasyon

Ca(OH)₂ ile yapılan alkali detoksifikasyon bulguları Çizelge 4.10.'da sunulmuştur. Heksoz kayıplarının daha düşük ve inhibitör giderimlerinin daha yüksek olması fiziksel detoksifikasyon yöntemine göre bu yöntemin daha uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.10. Kimyasal detoksifikasyon çalışmaları sonrası saptanan heksozlar ve inhibitörler (¹ başlangıç, ² uygulama sonrası).

	MS (mg/g)	MK (mg/g)	BK (mg/g)	S (mg/g)
Glukoz ¹	163,03	28,17	468,99	6,18
Glukoz ²	159,34	27,44	460,84	6,03
Kayıp (%)	2,26	2,59	1,74	2,43
Fruktoz ¹	323,59	-	-	-
Fruktoz ²	315,37	-	-	-
Kayıp (%)	2,54	-	-	-
Mannoz ¹	-	-	-	-
Mannoz ²	-	-	-	-
Kayıp (%)	-	-	-	-
Galaktoz ¹	-	333,61	148,11	195,68
Galaktoz ²	-	309,34	141,45	191,79
Kayıp (%)	-	7,27	4,50	1,99
Levunilik asit ¹	18,42	18,77	22,90	27,03
Levunilik asit ²	10,90	9,7	11,01	11,77
Giderim (%)	40,83	48,32	51,92	56,46
Asetik asit ¹	37,28	35,26	37,58	31,27
Asetik asit ²	16,34	13,17	17,01	11,92
Giderim (%)	56,17	62,65	54,74	61,88
Furfural ¹	5,93	4,50	7,29	6,79
Furfural ²	2,71	1,92	2,97	2,81
Giderim (%)	54,30	57,33	59,26	58,62

4.8.3. Biyolojik Detoksifikasyon

Ticari lakkaz enziminin aktivitesi 493,44 CU olarak belirlenmiş ve detoksifikasyon için üç farklı aktivitesi (45,0; 90,0 ve 200,0 CU) ile detoksifikasyon uygulaması yapılmıştır. Çalışma bulguları Çizelge 4.11.'de sunulmuştur.

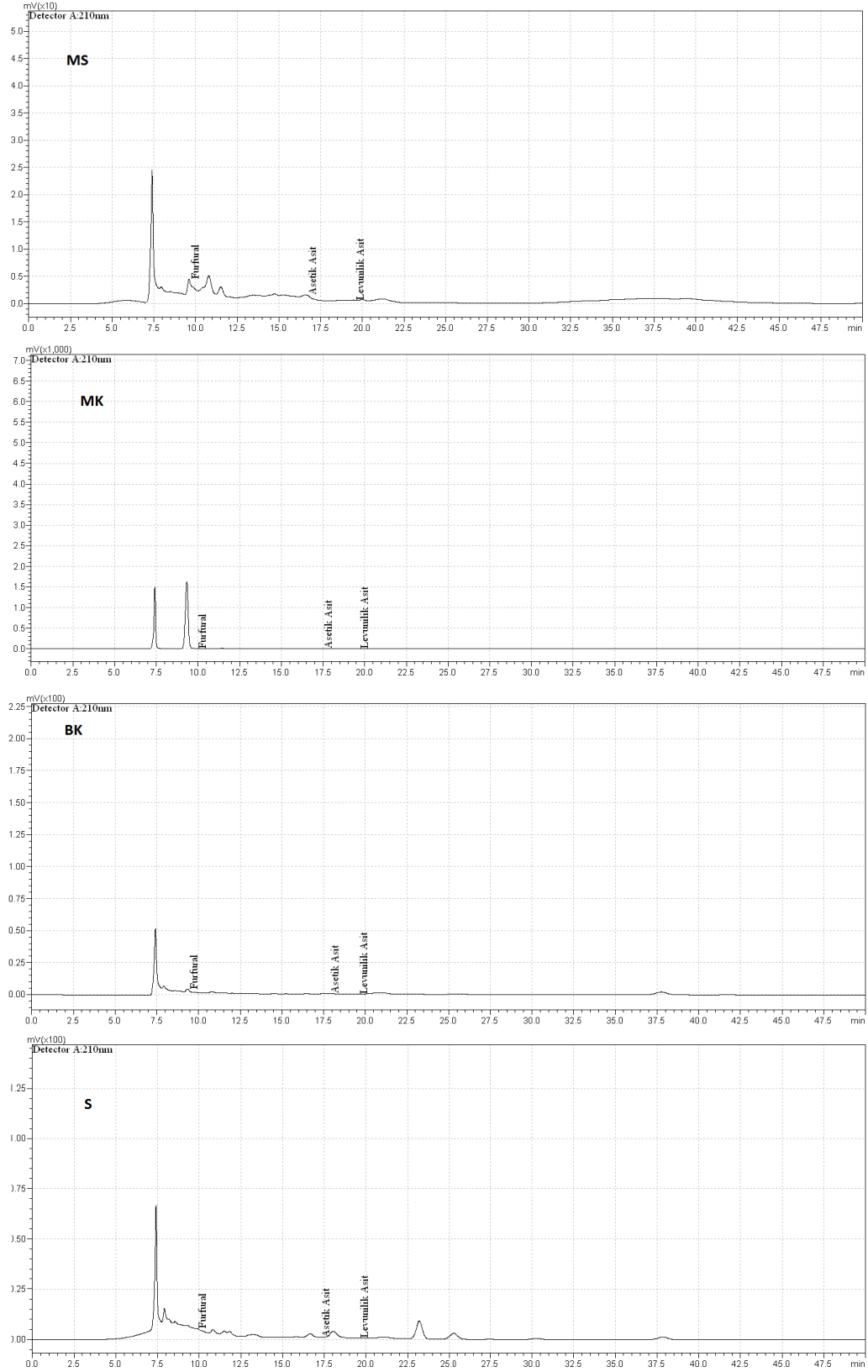
Çizelge 4.11. Biyolojik detoksifikasyon çalışmaları (¹ başlangıç, ² uygulama sonrası).

Lakkaz		MS (mg/g)	MK (mg/g)	BK (mg/g)	BS (mg/g)
45,00 CU	Glukoz ¹	163,03	28,17	468,99	6,18
	Glukoz ²	160,22	27,98	460,23	6,11
	Kayıp (%)	1,72	0,67	1,87	1,13
	Fruktoz ¹	323,59	-	-	-
	Fruktoz ²	320,34	-	-	-
	Kayıp (%)	1,00	-	-	-
	Mannoz ¹	-	-	-	-
	Mannoz ²	-	-	-	-
	Kayıp (%)	-	-	-	-
	Galaktoz ¹	-	333,61	148,11	195,68
	Galaktoz ²	-	319,83	145,63	191,26
	Kayıp (%)	-	4,13	1,67	2,26
	Lev. asit ¹	18,42	18,77	22,90	27,03
	Lev. asit ²	18,11	18,72	22,31	26,54
Giderim (%)	1,68	0,27	2,58	1,81	
90,00 CU	Asetik asit ¹	37,28	35,26	37,58	31,27
	Asetik asit ²	35,64	33,42	35,27	30,96
	Giderim (%)	4,40	5,22	6,14	1,00
	Furfural ¹	5,93	4,50	7,29	6,79
	Furfural ²	5,51	4,42	7,01	6,52
	Giderim (%)	4,40	1,78	1,78	3,98
	Glukoz ¹	163,03	28,17	468,99	6,18
	Glukoz ²	160,93	27,25	458,34	6,14
	Kayıp (%)	1,29	3,27	2,27	0,65
	Fruktoz ¹	323,59	-	-	-
	Fruktoz ²	320,13	-	-	-
	Kayıp (%)	1,10	-	-	-
	Mannoz ¹	-	-	-	-
	Mannoz ²	-	-	-	-
Kayıp (%)	-	-	-	-	
Galaktoz ¹	-	333,61	148,11	195,68	
Galaktoz ²	-	325,23	144,91	190,96	
Kayıp (%)	-	2,51	2,16	2,41	
Lev. asit ¹	18,42	18,77	22,90	27,03	
Lev. asit ²	18,01	17,23	21,94	26,72	
Giderim (%)	2,23	8,20	4,19	1,15	
Asetik asit ¹	37,28	35,26	37,58	31,27	
Asetik asit ²	36,49	34,11	34,65	30,28	
Giderim (%)	2,12	3,26	7,80	3,17	
Furfural ¹	5,93	4,50	7,29	6,79	
Furfural ²	5,12	4,31	6,94	6,35	
Giderim (%)	13,66	4,22	5,12	6,48	

Çizelge 4.11.(devam) Biyolojik detoksifikasyon çalışmaları (¹ başlangıç, ² uygulama sonrası).

Lakkaz		MS (mg/g)	MK (mg/g)	BK (mg/g)	BS (mg/g)
200,00 CU	Glukoz ¹	163,03	28,17	468,99	6,18
	Glukoz ²	161,31	26,99	462,41	5,92
	Kayıp (%)	1,10	4,19	1,40	4,21
	Fruktoz ¹	323,59	-	-	-
	Fruktoz ²	321,37	-	-	-
	Kayıp (%)	0,69	-	-	-
	Mannoz ¹	-	-	-	-
	Mannoz ²	-	-	-	-
	Kayıp (%)	-	-	-	-
	Galaktoz ¹	-	333,61	148,11	195,68
	Galaktoz ²	-	319,37	146,13	192,47
	Kayıp (%)	-	4,27	1,34	1,64
	Lev. asit ¹	18,42	18,77	22,90	27,03
	Lev. asit ²	17,26	17,77	21,65	26,52
	Giderim (%)	6,30	5,33	5,46	1,89
Asetik asit ¹	37,28	35,26	37,58	31,27	
Asetik asit ²	35,65	33,42	35,63	29,98	
Giderim (%)	4,37	5,22	5,19	4,13	
Furfural ¹	5,93	4,50	7,29	6,79	
Furfural ²	4,97	3,776	6,22	5,83	
Giderim (%)	16,19	16,44	14,68	14,14	

Lakkaz enzimi ile gerçekleştirilen detoksifikasyon işlemleri sonuçları incelendiğinde; lakkaz enzimi aktivitesi artışı ile inhibitör maddelerin giderimlerinde de artış saptanmıştır. Ayrıca lakkaz aktivitesi artışı heksozların kaybına neden olmamıştır. Buna rağmen kimyasal detoksifikasyon uygulamasında saptanan inhibitör giderimleri diğer yöntemlerde saptanan değerlerden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu nedenle en uygun yöntemin kimyasal detoksifikasyon olduğuna karar verilmiştir. Ca(OH)₂ ile yapılan işlem sonrası HPLC'den alınan piklerin görüntüsü Şekil 4.103.'de verilmiştir.

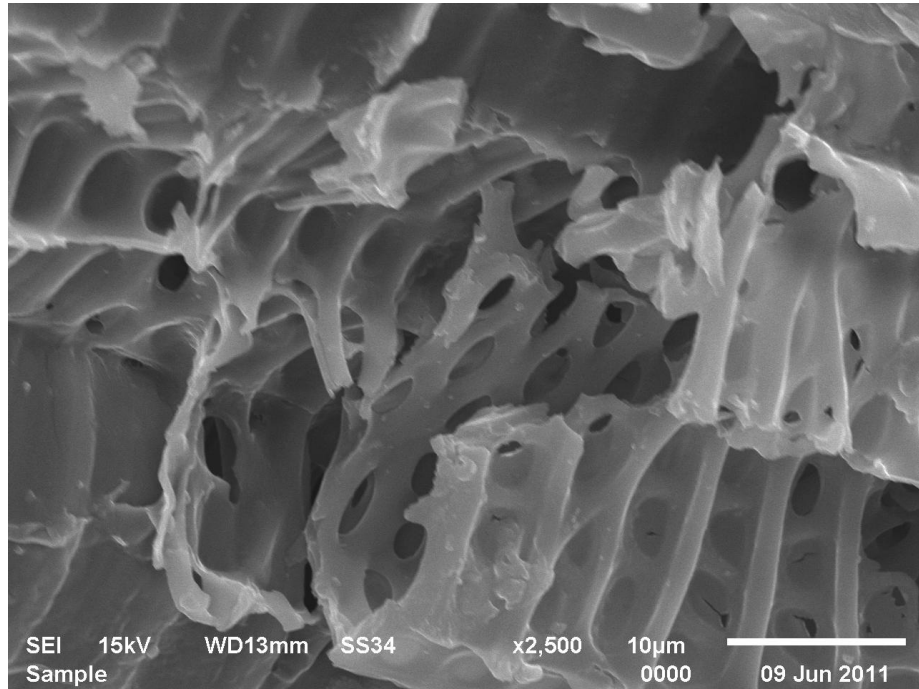
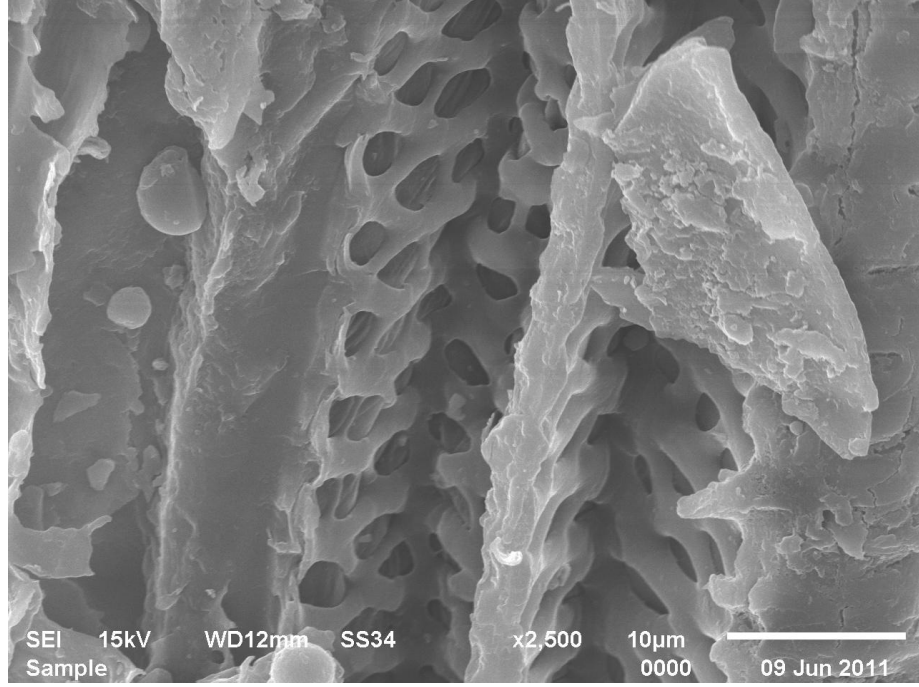


Şekil 4.103. Kimyasal detoksifikasyon sonrası hammaddelerde saptanan inhibitörler.

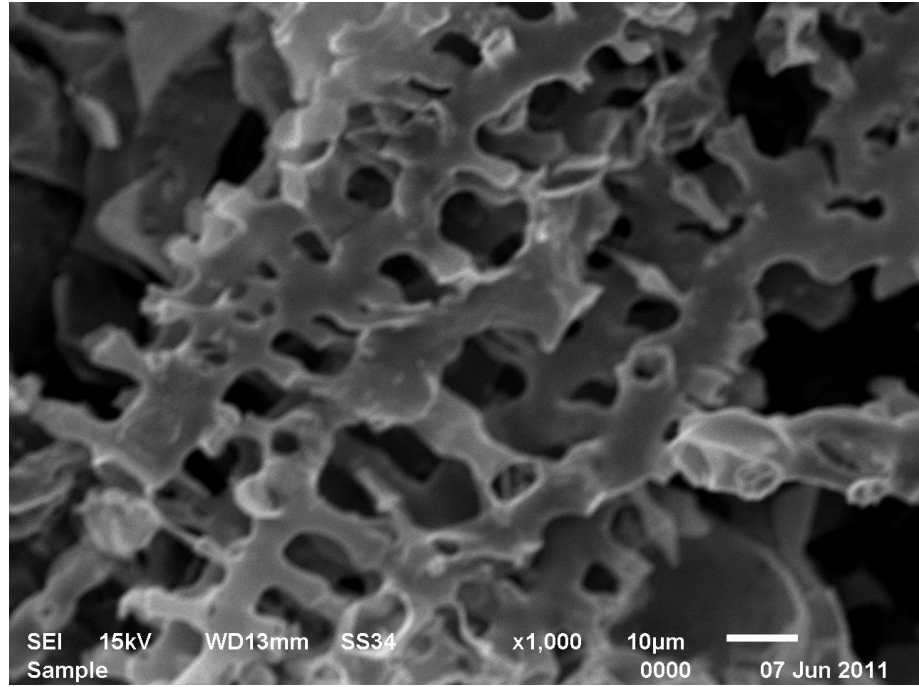
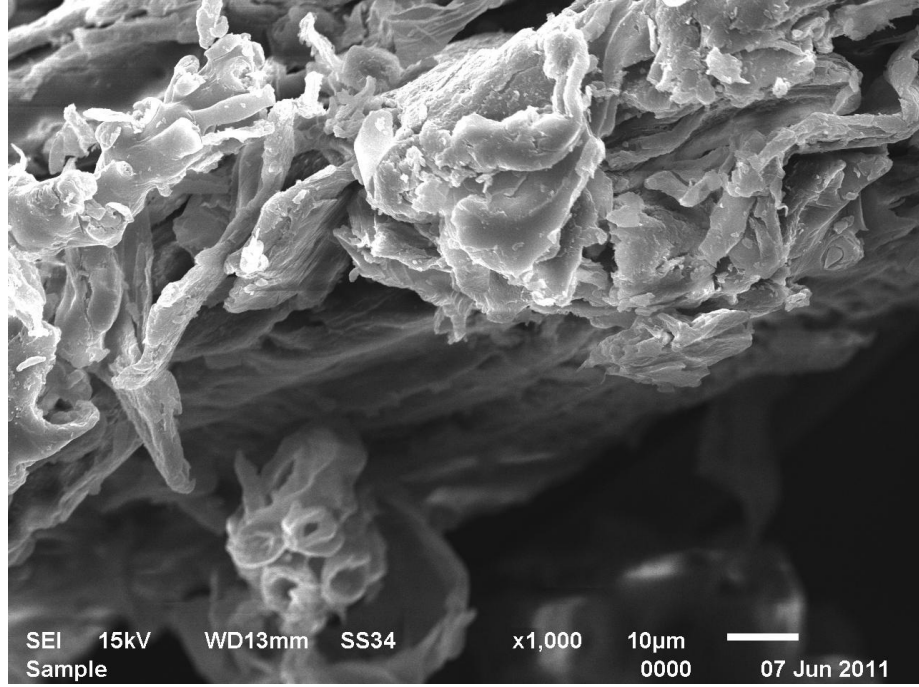
Zayıf organik asitler olan levunilik asit ve asetik asidin meydana getirdiği inhibisyonun furan aldehit bileşiği olan furfural'a göre daha düşük olduğu rapor edilmiştir [93]. Bununla birlikte toksik etkinin fermantasyonda kullanılan mikroorganizma türüne göre değiştiği bir başka makalede bildirilmiştir [94]. Bu çalışmada etanol fermantasyonu için *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Xu ve arkadaşları [93] mısır koçanının asit hidrolizinden elde ettikleri monomer şekerler ile gerçekleştirdikleri *S. cerevisiae* fermantasyonunda inhibitörlerin etkilerini araştırmışlar ve asetik asit için maksimum tolere edilebilir değeri 21,03 mg/g_{hammadde}, levunilik asit için 12,87 mg/g_{hammadde} ve furfural için ise 3,94 mg/g_{hammadde} olarak belirlediklerini rapor etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında; bu çalışmada kimyasal detoksifikasyon sonrası saptanan inhibitör miktarları *S. cerevisiae* için tolere edilebilir sınırların altında bulunmuştur (Çizelge 4.10).

4.9. SEM GÖRÜNTÜLERİ

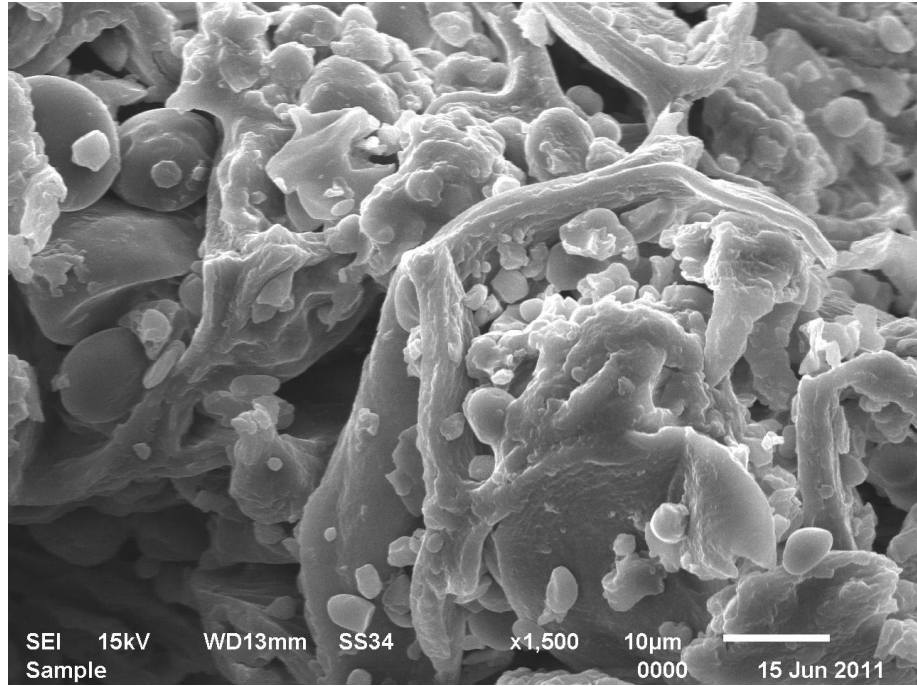
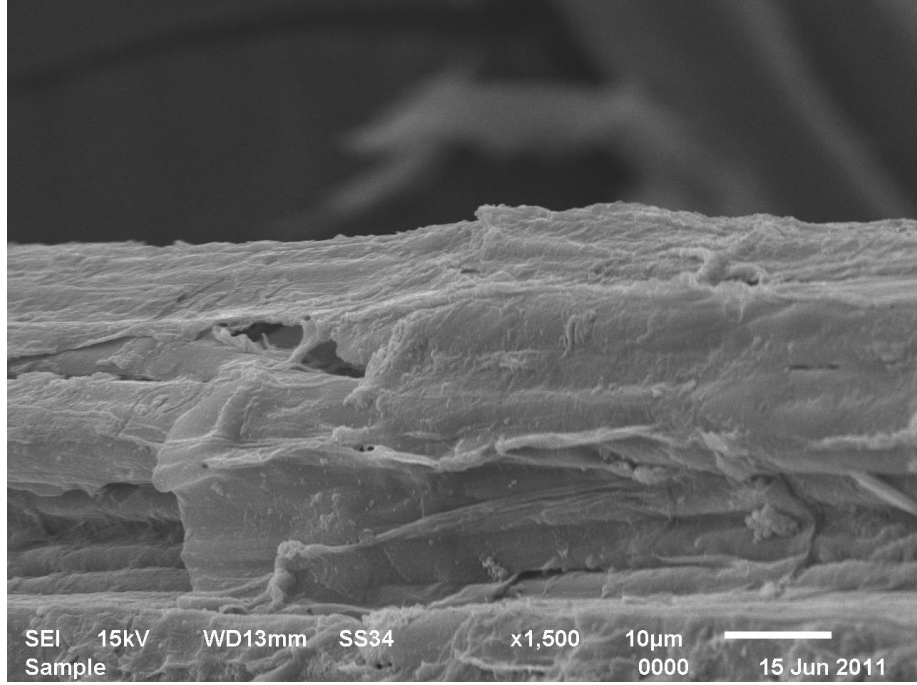
MS, MK, BK ve BS'nin ön işlem öncesi ve ön işlem sonrası SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.104 - 4.107'de verilmiştir. Şekiller incelendiğinde ön işlemler sonrası hammaddelerde meydana gelen yapısal bozukluklar açıkça görülmektedir.



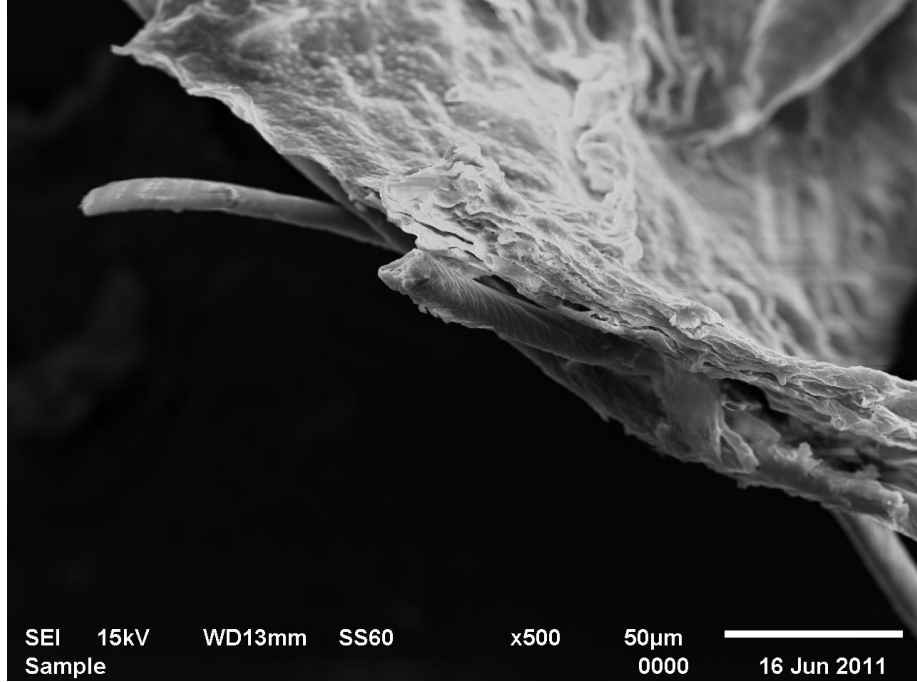
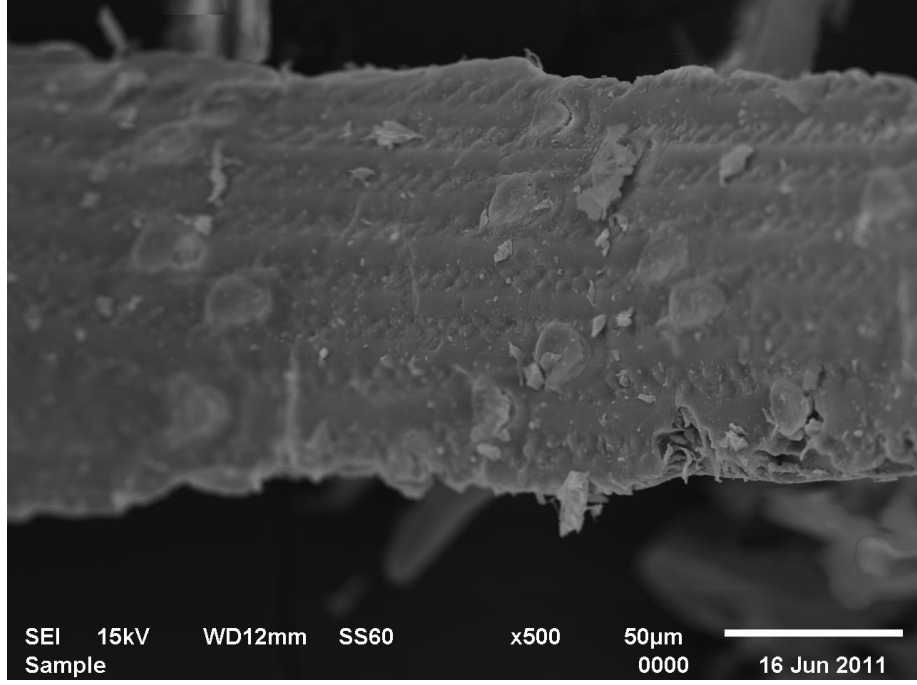
Şekil 4.104. MS'nin önişlem öncesi (üstte) ve sonrası (altta) SEM görüntüsü.



Şekil 4.105. MK'nın önişem öncesi (üstte) ve sonrası (altta) SEM görüntüsü.



Şekil 4.106. BK'nın önışem öncesi (üstte) ve sonrası (altta) SEM görüntüsü.

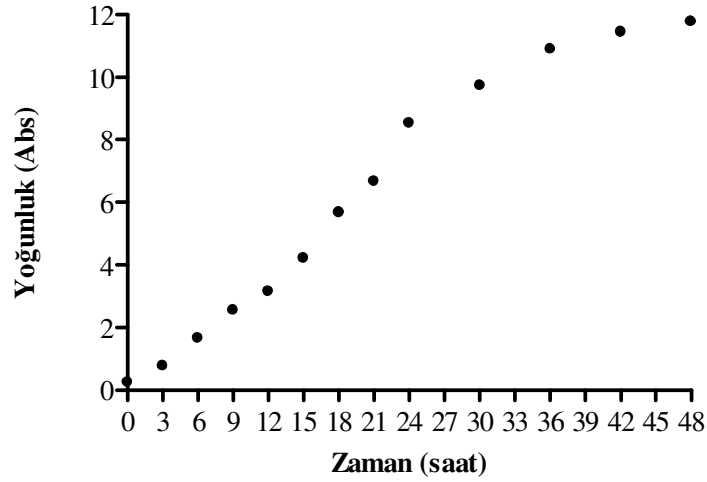


Şekil 3.107. BS'nin önişem öncesi (üstte) ve sonrası (altta) SEM görüntüsü.

4.10. ETANOL FERMANTASYONU

4.10.1. *S. cerevisiae* Üreme Eğrisinin Elde Edilmesi

3., 6., 9., 12., 15., 18., 21. 24. 30. 36. 42. ve 48. saatlerde üreme ortamından alınan numunelerde 600 nm’de yapılan bulanıklık ölçümleri sonuçları Şekil 4.108.’de verilmiştir.



Şekil 4.108. *S. cerevisiae* üreme eğrisi.

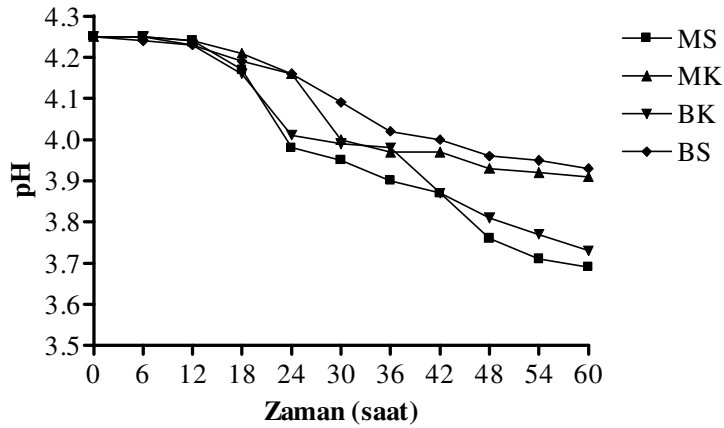
Şekil 4.108.’de de görüldüğü gibi logaritmik ürüme safhası 0. – 30. saatler arası gerçekleşmektedir. Bu nedenle ön üretim ortamından fermantasyon ortamına aşılama için en uygun zaman 15. saat olarak belirlenmiştir.

4.10.2. Fermantasyon

40 g/L hammadde derişimi için, çalışmanın bundan önceki bölümlerinde saptanan optimum ön işlem şartlarında asidik (% 1,lik H₂SO₄ ile) ısııl (1,2 MPa basınç ve 121 °C sıcaklıkta 30 dk) ön işlem ve ardından enzimatik hidroliz (pH: 4,8; 50 °C, 36 saat, 100 rpm ve 25 FPU/g_{hammadde} enzim derişimi) uygulanmış hammaddelere, optimum detoksifikasyonun da (5 g/L Ca(OH)₂ ile) uygulanmasının ardından saptanan toplam heksoz miktarları MS, MK, BK ve BS için 17,761; 13,616;

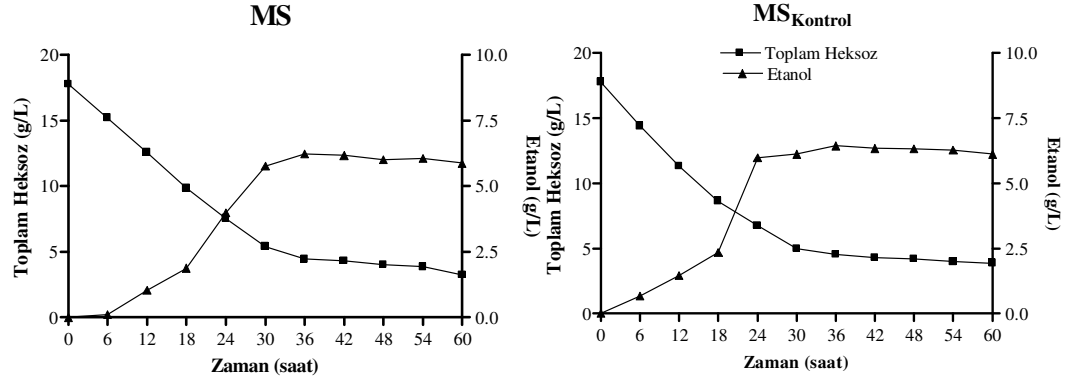
22,358 ve 7,328 g/L olarak saptanmıştır. Bu değerlere eşit miktarlarda heksoz içeren kontrol grupları da hazırlanmış, numunelerde yapılan pH ayarlamasının ardından aşılama işlemi ile birlikte, hammaddelerden ve bunların kontrol gruplarından fermantasyon süresi boyunca çeşitli zamanlarda (0., 6., 12., 18., 24., 30., 36., 42., 48., 54. ve 60. saatler) alınan örneklerde pH, toplam heksoz tayini ve etanol miktarı analiz edilmiştir.

Tüm örneklerde yapılan pH analizleri sonucundan 60 saatlik fermantasyon işlemi boyunca ortamlarda ölçülen pH değerleri Şekil 4.109.'da verilmiştir. 4,25 olan başlangıç pH'ları MS içeren ortamda 3,69'a gerilerken MK, BK ve BS için ise sırası ile 3,91; 3,73 ve 3,93 olarak saptanmıştır. *S. cerevisiae* ile etanol üretiminde optimum pH değerinin 4,25 olduğu, bu değer 3,5'e düşmesi durumunda, fermantasyon performansının % 50 ye kadar azalabileceği belirlenmiştir [72]. Çalışmada pH 3,5 değerinin altına düşmemiştir.



Şekil 4.109. Fermantasyon sırasında pH değişimi.

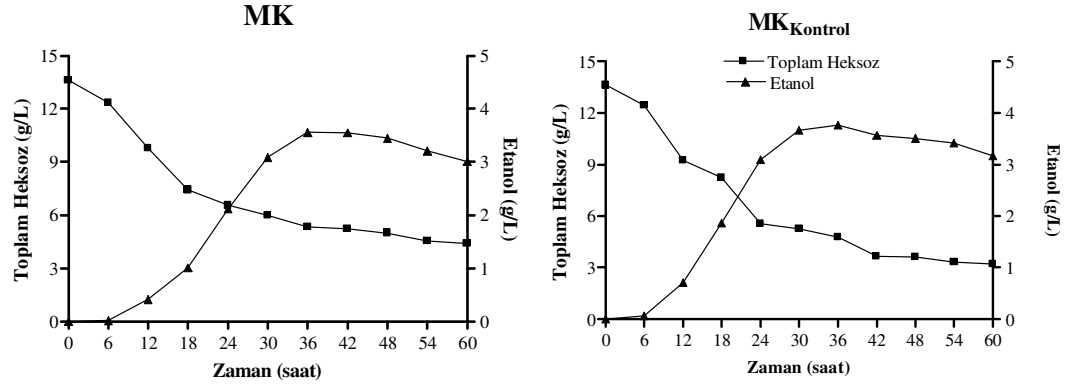
MS ve MS_{kontrol} ile yapılan fermantasyon çalışmaları sırasında heksoz tüketimi ve etil alkol üretimini gösteren bulgular Şekil 4.110.'da verilmiştir.



Şekil 4.110. MS ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi (28 °C, 150 rpm).

Şekil 4.110.'da da görüldüğü gibi üretilen maksimum etanol miktarları kontrol ve numende birbirine yakın olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda en yüksek etanol miktarı 36. saatte 6,43 g/L saptanırken, ön işlemler görmüş hammadde de 30. saatte 6,22 g/L olarak belirlenmiştir. Bu sonuç yapılan detoksifikasyon işlemi sonrası maya gelişiminin gerçekleşebildiğini ve detoksifikasyonun başarılı olduğunu ortaya koymuştur. 60 saatlik fermantasyon boyunca iki ortamda da şeker tüketimi ilk 30 saat boyunca hızla gerçekleşmiş, ancak 60. saat sonunda tamamı tüketilememiştir. Kontrol ve numune için 60. saat sonunda saptanan şeker miktarları sırası ile 3,25 ve 3,87 g/L'dir.

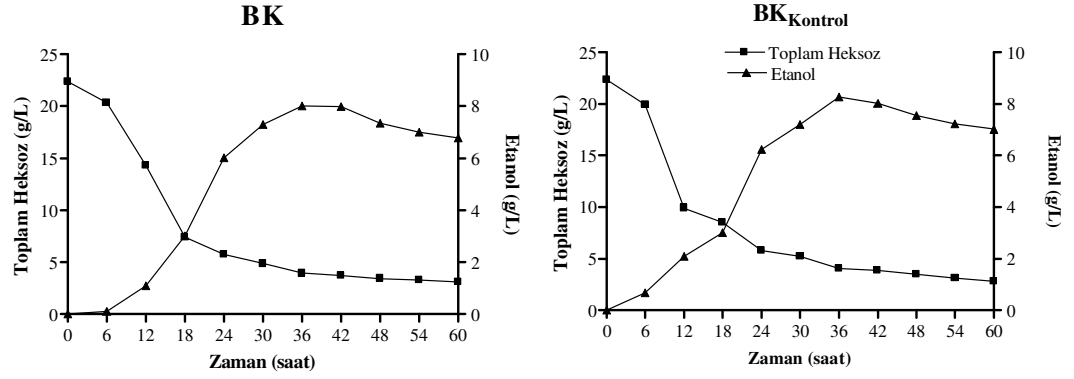
MK ve MK_{kontrol} ile yapılan fermantasyon çalışmaları sırasında heksoz tüketimi ve etil alkol üretimini gösteren bulgular Şekil 4.111.'de verilmiştir.



Şekil 4.111. MK ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi (28 °C, 150 rpm).

Şekil 4.111.'de de görüldüğü gibi, MS sonuçlarına benzer şekilde, üretilen maksimum etanol miktarları birbirine yakın olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda en yüksek etanol miktarı 36. saatte 3,76 g/L saptanırken, ön işlemler görmüş hammadde de 36. saatte 3,56 g/L olarak belirlenmiştir. Bu sonuç yapılan detoksifikasyon işlemini sonrası maya gelişiminin gerçekleşebildiğini ve detoksifikasyonun başarılı olduğunu ortaya koymuştur. 60 saatlik fermantasyon boyunca MK içeren ortamda şeker tüketimi lineer olarak devam ederken, kontrol grubunda 30. saate kadar hızla gerçekleşmiştir. Kontrol ve numune için 60. saat sonunda saptanan şeker miktarları sırası ile 3,21 ve 4,40 g/L'dir.

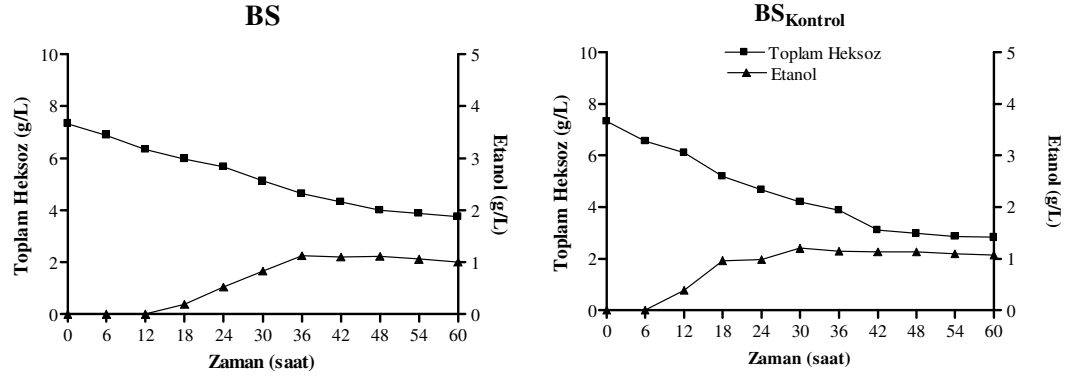
BK ve BK_{kontrol} ile yapılan fermantasyon çalışmaları sırasında heksoz tüketimi ve etil alkol üretimini gösteren bulgular Şekil 4.112.'de verilmiştir.



Şekil 4.112. BK ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi (28 °C, 150 rpm).

Şekil 4.112.'de de görüldüğü gibi, BK sonuçları da MS ve MK'ya benzer şekilde belirlenmiştir. BK ve kontrol grubunda hızlı bir şeker tüketimi ve etanol üretimi olmuştur. Üretilen maksimum etanol miktarları birbirlerine yakın olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda en yüksek etanol miktarı 36. saatte 8,25 g/L saptanırken, ön işlemler görmüş hammadde de ise yine 36. saatte 8,01 g/L olarak belirlenmiştir. Bu sonuç yapılan detoksifikasyon işlemi sonrası maya gelişiminin gerçekleşebildiğini ve detoksifikasyonun başarılı olduğunu ortaya koymuştur. 60 saatlik fermantasyon boyunca BK ve kontrolü için şeker tüketimi ilk 24 saat boyunca lineer olarak devam etmiş ve daha sonra tüketim hızı düşmüştür. Kontrol ve numune için 60. saat sonunda saptanan şeker miktarları sırası ile 2,85 ve 3,12 g/L'dir.

BS ve BS_{kontrol} ile yapılan fermantasyon çalışmaları sırasında heksoz tüketimi ve etil alkol üretimini gösteren bulgular Şekil 4.113.'de verilmiştir.



Şekil 4.113. BS ile yapılan fermantasyon işlemi sırasında toplam heksoz ve etanol değişimi (28 °C, 150 rpm).

Şekil 4.113’de de görüldüğü gibi, BS ile yapılan fermantasyon işleminde, başlangıç şeker miktarına bağlı olarak maya gelişimi ve etanol üretimi diğer hammaddelere göre daha düşük olarak saptanmıştır. BS ve onun kontrolünde şeker tüketimi fermantasyon boyunca lineer olarak devam etmiştir. Üretilen maksimum etanol miktarları birbirlerine yakın olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda en yüksek etanol miktarı 36. saatte 1,15 g/L saptanırken, ön işlemler görmüş hammaddede de 36. saatte 1,13 g/L olarak belirlenmiştir. Bu sonuç yapılan detoksifikasyon işlemi sonrası maya gelişiminin gerçekleştiğini ve detoksifikasyonun başarılı olduğunu ortaya koymuştur. 60 saatlik fermantasyon sonunda S ve kontrolü saptanan şeker miktarları sırası ile 2,83 ve 3,76 g/L olarak belirlenmiştir.

Hammaddelere uygulanan fermantasyon işlemi sonunda kontrol gruplarında etanol miktarı ve şeker tüketimi, az bir farkla da olsa numunelere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu fark göz ardı edilebilecek kadar düşüktür. Ancak, bu duruma sebep olarak, giderimi gerçekleştirilen inhibitör maddelerin dışında madde/maddelerin yada literatüre göre inhibisyon limitlerinin altında olmasına rağmen giderilmeden kalan inhibitörlerin neden olabileceği düşünülmektedir.

Fermantasyon işlemi sonunda hammaddeler için saptanan değerler Çizelge 4.12.’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Fermantasyon işlemi sonunda hammaddeler için saptanan değerler (hesaplamalar bölüm 3.2.5.3.'de açıklanmıştır).

	MS	MK	BK	S
Başlangıç şeker derişimi (g/L)	17,76	13,62	22,36	7,33
Maksimum etanol üretimi için geçen zaman (saat)	36	36	36	36
Şeker derişimi (36. saat, g/L)	4,45	5,34	3,95	4,65
Maksimum etanol (g/L)	6,22	3,56	8,01	1,13
Maksimum etanol (hacimce %)	0,79	0,45	1,02	0,14
Maksimum etanol (g/g _{hamdde})	0,16	0,09	0,20	0,03
Etanol üretim hızı (g/L.saat)	0,17	0,10	0,22	0,03
Mayanın alkol üretim verimi (%)	91,47	84,16	85,12	82,48
Etanol verimi (%)	35,02	26,14	35,82	15,42

Etanol üretiminin başlangıç şeker derişimine bağlı olarak değiştiği Çizelge 4.12.'den de açıkça görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda teorik olarak hesaplandığında 1 ton MS, MK, BK ve BS için sırasıyla; 202,78; 114,06; 253,49 ve 38,02 L etanol elde edilecektir.

4.11. MALİYET ANALİZİ

Hammaddelerin kaynaklarından alınarak, etanol distilasyonu sonuna kadar tüm basamaklar için hesaplanan teorik maliyetler aşağıda verilmiştir.

Hamadde fiyatları

MS ve MK zirai alanda yakılarak yada parçalanarak bırakıldığı için herhangi bir masrafı yoktur. BK ve BS'nın 1 ton maliyeti sırası ile 380 ve 24 TL'dir [95-96].

Ulaşım

Uygulamanın zirai alana uzaklığı ortalama 40 km kabul ederek ton başına 10 TL olarak kabul edilmiştir.

Yıkama ve Kurutma:

Yıkama için 4 m³ su kullanılacağı öngörülerek, 1 m³ su fiyatı işyerleri için 2,88 TL'dir [97]. Buna göre masraf: 4 x 2.88 = 11,52 TL'dir.

Parçalama ve Eleme

1 ton hammaddeyi parçalama, öğütme ve eleme için 10 TL masraf kabul edilmiştir.

Asidik ıslak oksidasyon

Su: 40 g/L hammadde olacak şekilde yapılacak çalışma için 1 ton hammaddeye gereken su miktarı 25 m³'dür. Suyun m³'ü 2,88 TL olduğundan masraf: 25 x 2.88 = 72 TL'dir.

H₂SO₄: çalışmada % 1,0 H₂SO₄ kullanılmıştır. Teknik H₂SO₄ (% 79'luk) fiyatı 1,5 TL/L [98] olduğuna göre 25 m³ çözelti için:

$$25000 \text{ L} \times (1/100) \times (100/79) \times 1,5 = 493,42 \text{ TL}$$

Karıştırma ve için harcanan elektrik: 25 m³'lük bir tankı karıştırmak için gerekli pervane tipi karıştırıcı için gereksinim 0,08 kWh/m³ [99] ve Sanayi tipi elektrik ücreti 17,216 kWh/Kr [100] ise:

$$25 \times 0,08 \times 17,216 = 0,35 \text{ TL}$$

$$\text{Toplam: } 493,42 + 0,35 = 493,77 \text{ TL}$$

Islak oksidasyon: asitlendirilmiş hammaddelerin buharlı basınçlı ısı işlemi için kullanılacak olan otoklavın gücü 60 kWh ve çalışma hacmi 2,5 m³ tür [101]. Otoklavın 30 dk işlem (1,2 atm ve 121 °C) şartına gelebilmesi için geçen süre 30 dk kabulü ile 1 saat çalışacağı ve Sanayi tipi elektrik ücreti 17,216 kWh/Kr olduğuna göre 25 m³ çözeltiye (10 defa çalışacaktır) uygulanacak işlemin masrafı:

$$60 \times (17,216/100) \times 10 = 103,30 \text{ TL}$$

Nötralizasyon: % 1 H₂SO₄ içeren ortamın nötralizasyonu:

H₂SO₄ + 2NaOH → Na₂SO₄ + 2H₂O reaksiyonu gereğince olacağı için 98 g H₂SO₄ için 80 g NaOH gereklidir.

25 m³ çözelti içerisinde:

25000 L x (1/100) x (100/79) = 316,46 L H₂SO₄ bulunmaktadır. H₂SO₄'ün yoğunluğu 1,84 kg/L olduğuna göre:

$$1,84 \times 316,46 = 582,29 \text{ kg olarak hesaplanır.}$$

98 kg H₂SO₄ nötralizasyonu için 80 kg NaOH gerektiğine göre 582,29 kg için:

$$(582,29 \times 80) / 98 = 475,34 \text{ kg NaOH gerektirir. 1 kg teknik NaOH 1 TL [102]}$$

olduğuna göre nötralizasyon maliyeti 475,34 TL'dir.

Karıştırma ve için harcanan elektrik: 25 m³'lük bir tankı karıştırmak için gerekli pervane tipi karıştırıcı için gereksinim 0,08 kWh/m³ [99] ve Sanayi tipi elektrik ücreti 17,216 kWh/Kr [100] ise:

$$25 \times 0,08 \times 17,216 = 0,35 \text{ TL}$$

$$\text{Toplam: } 475,34 + 0,35 = 475,69 \text{ TL}$$

Enzimatik işlem

Selülaz: çalışmada optimum selülaz derişimi 25 FPU/g olarak saptanmıştır. Buna göre 1 ton hammadde için gerekli enzim aktivitesi 25.106 FPU'dur. Çin üretimi sanayi tipi selülazın aktivitesi 160000 FPU/g ve fiyatı ise 1 \$/kg'dır (1 \$ 1,6 TL olarak hesaplanmıştır) [103]. Buna göre maliyet:

$$(25.106/160000) \times 1,6/1000 = 0,25 \text{ TL}$$

Karıştırma ve ısıtma için harcanan elektrik: 25 m³ lük bir tankı karıştırmak için gerekli pervane tipi karıştırıcı için gereksinim 0,08 kWh/m³ [10] ve ısıtma için gereksinim 4 adet 12 kWh'lik rezistans ile yapılacaktır [104]. Rezistanstarın reaksiyon süresinin % 75'inde çalışır halde olacağı kabulü ve elektrik ücreti 17,216 kWh/Kr ise 36 saatlik işlem için masraf:

$$(36 \times 0,08 \times 25 + 36 \times 4 \times 12 \times 0,75) \times 17,216/100 = 235,51 \text{ TL}$$

Detoksifikasyon

Ca(OH)₂ ilavesi: 5 g/L derişimde Ca(OH)₂ ilave edileceğine göre 25 m³ için (25000 x 5)/1000 = 125 kg Ca(OH)₂ gereklidir. 1 ton Ca(OH)₂ 200 TL [105] ise masraf: 200 x 125/1000 = 25 TL

Karıştırma masrafı ile: 25 + 0,35 = 25,35 TL'dir.

pH dengeleme işlemi: % 79'luk H₂SO₄ ile pH 4,25'e ayarlanmıştır.

H₂SO₄ + Ca(OH)₂ → CaSO₄ + 2H₂O reaksiyonu gereği 125 kg/25m³ Ca(OH)₂ içeren ortamın pH'sını 4,25 olarak ayarlanabilmesi için:

H⁺ + OH⁻ → H₂O reaksiyonuna göre

125 kg Ca(OH)₂ den gelen OH⁻ miktarı 57,43 kg'dır.

1 kg H⁺ ile 17 kg OH⁻ nötrleştiğine göre (normal şartlar kabul edilmiştir) 57,43 kg OH⁻ için 3,38 kg H⁺ gereklidir. Ayrıca 25 m³ ortamın pH'sının 4,25 olabilmesi için gereken H⁺ derişimi ise

pH = -log[H] denkleminde göre hesaplandığında 1,77 kg olarak hesaplanır. Buna göre gerekli H⁺ miktarı 3,38 + 1,77 = 5,15 kg'dır. Asit olarak % 79'luk H₂SO₄ kullanıldığına ve 2 kg H⁺ için 98 kg H₂SO₄ gerektiğine göre gerekli H₂SO₄ miktarı (asit yoğunluğu 1,84 kg/L):

$$(5,15 \times 98 / 2) / 1,84 \times (100/79) = 173,60 \text{ L'dir.}$$

% 79'luk H₂SO₄'in litresi 1,5 TL olduğuna göre maliyet:

$$173,6 \times 1,5 = 260,40 \text{ TL'dir.}$$

Karıştırma ile toplam masraf: 260,40 + 0,35 = 260,75 TL'dir.

Fermantasyon

Karıştırma ve ısıtma için harcanan elektrik: 25 m³ lük bir tankı karıştırmak için gerekli pervane tipi karıştırıcı için gereksinim 0,08 kWh/m³ [99] ve ısıtma için gereksinim 4 adet 12 kWh'lik rezistans ile yapılacaktır [103]. Rezistanstarın işlem süresinin % 50'sinde çalışır halde duracağı kabulü ile, elektrik ücreti 17,216 kWh/Kr ise her bir hammadde için maksimum etanol üretim süresine göre masraflar:

$$\text{MS: } (36 \times 0,08 \times 25 + 42 \times 4 \times 12 \times 0,5) \times 17,216/100 = 161,10 \text{ TL}$$

$$\text{MK: } (36 \times 0,08 \times 25 + 36 \times 4 \times 12 \times 0,5) \times 17,216/100 = 161,10 \text{ TL}$$

$$\text{BK: } (36 \times 0,08 \times 25 + 30 \times 4 \times 12 \times 0,5) \times 17,216/100 = 161,10 \text{ TL}$$

$$\text{BS: } (36 \times 0,08 \times 25 + 42 \times 4 \times 12 \times 0,5) \times 17,216/100 = 161,10 \text{ TL}$$

Etil alkol distilasyonu için hacanan elektrik: pervane tipi karıştırıcı [99] kullanılacak ve ısıtma 6 adet 12 kWh'lik rezistans ile yapılacaktır [104]. Rezistanstarın işlem süresinin (12 saat kabul edilmiştir) % 85'inde çalışır halde olacağı kabulü ile, elektrik ücreti 17,216 kWh/Kr ise distilasyon masrafı:

$$(12 \times 0,08 \times 25 + 12 \times 6 \times 12 \times 0,85) \times 17,216/100 = 130,57 \text{ TL}$$

İşçilik Ücreti

01.01.2011-31.06.2011 tarihleri arası 16 yaş üstü brüt asgari ücret 26,55 TL [106] ve 8 günlük çalışma için işçi masrafı:

$$26,55 \times 8 = 212,40 \text{ TL'dir}$$

Etil Alkol

1 ton MS, MK, BK ve BS için sırasıyla; 190,11; 114,07; 266,16 ve 38,02 L etil alkol elde edilecektir. 1 L etil alkol fiyatı 7,5 TL [107] ise elde edilen gelirler:

$$\text{MS: } 202,78 \times 7,5 = 1520,85 \text{ TL}$$

$$\text{MK: } 114,06 \times 7,5 = 855,45 \text{ TL}$$

$$\text{BK: } 253,49 \times 7,5 = 1901,18 \text{ TL}$$

$$\text{BS: } 38,02 \times 7,5 = 285,15 \text{ TL}$$

Protein ve karbonhidrat içeriği yüksek besi hayvanı yemi

Numunelerin içeriğindeki lignin, selüloz ve hemiselüloz'un yapılan ön işlem çalışmaları neticesinde belirli oranlarda parçalanması sonucu besi hayvanları için sindirimi daha kolay yem haline geldiği düşünülmektedir. Bununla beraber fermantasyon sonunda kalan şekerler ve daha da önemlisi maya içeriğinden dolayı yüksek protein içeriği posanın besi hayvanı yemi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Fermantasyon sonunda Mersin İl Kontrol Laboratuvar'ında yapılan analizlere göre MK, MS, BK ve BS için ham protein miktarı sırası ile % 14,88; 16,10; 30,78 ve 16,38 olarak belirlenmiştir. % 18 protein içeriğine sahip besin katkı maddesini fiyatı 33,5 TL/50 kg'dır [108]. Fermantasyon sonunda 1 ton hammaddenin 100 kg'ını kayıp olarak varsayarak besin katkı yemi gelirleri hesaplandığında:

$$\text{MK: } (14,88/18) \times (1000 - 100) \times (33,5 / 50) = 498,48 \text{ TL}$$

$$\text{MS } (16,10/18) \times (1000 - 100) \times (33,5 / 50) = 539,35 \text{ TL}$$

$$\text{BK: } (30,78/18) \times (1000 - 100) \times (33,5 / 50) = 1031,13 \text{ TL}$$

$$\text{BS: } (16,38/18) \times (1000 - 100) \times (33,5 / 50) = 548,73 \text{ TL}$$

olarak bulunur.

Yukarıda hesaplamaları yapılan maliyetlerin özet olarak gösterimi Çizelge 4.13.'de verilmiştir. Yapılan hesaplama sonucunda BK'nın önerilen uygulamada maliyet açısından en uygun hammadde olduğu saptanmıştır. Ancak ilk olarak pilot ölçekli ardından sanayi tipi bir sistemde bu maliyetlerin çok daha altında maliyetlerle üretim yapılabileceği bilinmektedir.

Çizelge 4.13 Teorik maliyet hesapları çizelgesi.

UYGULAMA	GİDER (TL/ton hammadde)				GELİR (TL/ton hammadde)			
	MS	MK	BK	BS	MS	MK	BK	BS
Hammadde	0,00	0,00	380,00	24,00				
Ulaşım	10,00	10,00	10,00	10,00				
Yıkama ve Kurutma	11,52	11,52	11,52	11,52				
Parçalama ve eleme	10,00	10,00	10,00	10,00				
Asidik Islak Oksidasyon								
Su (25 m3)	72,00	72,00	72,00	72,00				
H ₂ SO ₄ (teknik % 79'luk) % 1 ve karıştırma	493,77	493,77	493,77	493,77				
Islak Oksidasyon	103,30	103,30	103,30	103,30				
Nötralizasyon işlemi (NaOH + karıştırma)	475,69	475,69	475,69	475,69				
Enzimatik işlem								
Selülaz	0,25	0,25	0,25	0,25				
Karıştırma ve ısıtma için harcanan elektrik	235,51	235,51	235,51	235,51				
Detoksifikasyon								
Ca(OH) ₂ (5g/L), karıştırma	25,35	25,35	25,35	25,35				
pH dengeleme işlemi	260,75	260,75	260,75	260,75				
Fermantasyon								
Fermantasyonda karıştırma ve ısıtma için elektrik	161,10	161,10	161,10	161,10				
Etil alkol distilasyonu için hacanan elektrik	130,57	130,57	130,57	130,57				
İşçilik ücreti (8 gün için)	212,40	212,40	212,40	212,40				
Etil Alkol					1520,85	855,45	1901,18	285,15
Protein ve karbonhidrat içeriği yüksek besi hayvanı yemi					498,48	539,35	1031,13	548,73
Toplam	2202,21	2202,21	2582,21	2226,21	2019,33	1394,80	2932,31	833,88

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Doğu Akdeniz bölgesinde mevsimlere bağlı olarak dönüşümlü üretilen mısır ve buğday atıklarına, çeşitli ön işlemlerin ve bunların kombinasyonlarının uygulanması ile özellikle fermente olabilir ürünlerin (heksozlar) oluşturulmasının amaçlandığı çalışmanın sonuçları ve öneriler bölümlere bağlı olarak aşağıdaki paragraflarda sunulmuştur.

Çalışmada ilk olarak hammadde içerikleri saptanmıştır. Ardından maksimum sakkarifikasyonun gerçekleştirilebilmesi amacıyla fiziksel, kimyasal, biyolojik ön işlemler ve bu ön işlemlerin kombinasyonları uygulanmıştır.

Fiziksel ön işlem çalışmaları mekanik ve ultrasonik işlemlerinden oluşmuştur. Mekanik ön işlemlerde hammaddeler öğütülmüş ve farklı gözenekliliğe sahip eleklerden geçirilerek tanecik boyutunun TK ve İŞ üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hammaddeler için de 6 numaralı eleğin (75 -212 mikron) daha verimli olduğu belirlenmiştir.

Ultrasonik ön işlemlerde ilk olarak farklı hammadde derişimi ve zamanın etkisi ayrı ayrı çalışılmıştır ve 1 g/L hammadde derişimi ve 60 dk'lık ultrasonik işlem süresi optimum değer olarak saptanmıştır. Ardından, optimum hammadde derişimi ve işlem süresi koşullarında farklı derişimlerde NaOH, H₂SO₄ ve H₂O₂'ile ayrı ayrı ve birleştirilerek ultrasonik işlemler yapılmıştır. Çalışma sonucunda NaOH derişiminin artmasıyla TK derişimlerinde artış saptanmıştır. İŞ derişimlerine bakıldığında ise kullanılan kimyasal maddelerin TK derişiminde olduğu gibi bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. En yüksek TK ve İŞ değerlerine MS ile yapılan çalışmada 2,0 M NaOH ile ulaşılmıştır. H₂O₂ ile birlikte NaOH ve H₂SO₄'ün etkisinin araştırılması sonunda ise H₂O₂ - NaOH ve H₂O₂ - H₂SO₄ karışımları için en yüksek TK derişimi 340,13 mg/g ile BK'da, İŞ derişimi ise 185,01 mg/g olarak MS'de saptanmıştır.

Kimyasal ön işlem çalışmalarında piroliz, fenton oksidasyonu, seyreltik ve derişik H₂SO₄ uygulaması, alkali ön işlemler ve ıslak oksidasyon uygulamalarının TK ve İŞ üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

5 g hammadde için ayrı ayrı 300, 350 ve 400 °C’de 20 dk piroliz işlemleri sonucunda ise 400 °C’lik piroliz uygulamasının optimum şart olarak saptanmıştır. Ancak, çalışma bulguları ışığında piroliz işleminin; İŞ oluşumu açısından verimsiz ve yüksek enerjiye ihtiyacı olması nedeniyle, sakkarifikasyon için uygun olmadığı kararına varılmıştır.

Fenton oksidasyonu çalışmalarında pH, Fe²⁺ derişimi, H₂O₂ derişimi ve reaksiyon süresinin etkisi araştırılmış ve optimum değerler pH 3, Fe²⁺ 250 mM, H₂O₂ 500 mM, 60 dk reaksiyon süresi olarak bulunmuştur.

Farklı derişimlerde seyreltik H₂SO₄ ve reaksiyon süreleri ile yapılan ısı ön işlem çalışmaları sonucunda optimum H₂SO₄ miktarı % 1,0 ve reaksiyon süresi ise 60 dk olarak belirlenmiştir.

Farklı derişimlerde derişik H₂SO₄ ve reaksiyon süreleri ile yapılan ısı ön işlem çalışmaları sonucunda optimum H₂SO₄ miktarı % 20,0 ve reaksiyon süresi ise 10 dk olarak belirlenmiştir.

Farklı derişimlerde NaOH ve Ca(OH)₂ ile yapılan alkali ısı ön işlem çalışmaları sonucunda optimum NaOH miktarı % 5,0 ve reaksiyon süresi ise 60 dk olarak belirlenirken, Ca(OH)₂ miktarı ise % 5,0 ve reaksiyon süresi ise 120 dk olarak belirlenmiştir.

Islak oksidasyon ön işleminin için asidik, alkali ve nötr ortamlar oluşturularak 1,2 MPa basınç altında 121 ± 2 °C’de 0-180 dk ön işlem uygulanmıştır. Çalışma sonunda asidik ıslak oksidasyon veriminin alkali ıslak oksidasyona göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Optimum H₂SO₄ derişimi % 1,0 ve reaksiyon süresi ise 30 dk olarak belirlenmiştir.

Biyolojik ön işlem uygulamalarında beyaz çürükçül funguslarla ve enzimatik (selüloz ile) çalışmalar yapılmıştır. Beyaz çürükçül funguslarla sıvı faz fermantasyon yöntemi kullanılarak *F. trogii* ve *P. chrysosporium*'un MS, MK, BK ve BS ile ön işlem uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yapılan sakkarifikasyon çalışmaları sonucunda denenen tüm hammadde türleri ve derişimleri için başlangıç TK ve İŞ derişimlerini aşan derişimler belirlenmemiştir.

Selüloz ile gerçekleştirilen biyolojik ön işlem çalışmalarında pH, sıcaklık, temas süresi, çalkalama hızı, başlangıç hammadde derişimi ve selüloz derişiminin etkisi araştırılmış ve sonuçlar sırası ile 4,8; 50 °C, 36 saat, 100 rpm, 5 g/L ve 25 FPU/g olarak saptanmıştır.

Islak oksidasyon - enzimatik ön işlem ve asidik ıslak oksidasyon - enzimatik ön işlem kombinasyonu oluşturularak yapılan işlem sonrası % 1,0 H₂SO₄ ile ıslak oksidasyon uygulanmış ve ardından enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiş kombinasyon ortamında yapılan tüm çalışmalar içerisinde en yüksek TK ve İŞ değerleri saptanmıştır. Başlangıçta MS, MK, BK ve BS için TK değerleri sırası ile 134,11; 23,66; 77,01 ve 27,19 mg/g iken bu değerler asidik ıslak oksidasyon sonunda 521,93; 401,22; 640,81 ve 285,24 mg/g, ardından yapılan enzimatik işlem sonunda ise 681,72; 549,21; 785,29 ve 369,18 mg/g olarak belirlenmiştir. İŞ değerleri ise MS, MK, BK ve BS için başlangıçta sırası ile 112,77; 11,02; 5,99 ve 3,61 iken bu değerler asidik ıslak oksidasyon sonunda 266,32; 171,47; 422,83 ve 39,30 mg/g, ardından yapılan enzimatik işlem sonunda ise 539,59; 397,58; 686,72 ve 255,74 mg/g olarak belirlenmiştir.

Optimum ön işlem uygulaması sonrası ortamlarda etanol fermantasyonunu inhibe eden maddelerin HPLC ile varlığının tespit edilmesi sonucunda bu maddelerin giderim (detoksifikasyon) çalışmaları yapılmıştır. Detoksifikasyon çalışmaları ise fiziksel (diethyl eter ve etil asetat ile ekstraksiyon) kimyasal (Ca(OH)₂ ile yapılan alkali detoksifikasyon) ve biyolojik (lakkaz enzimi ile) olarak ayrı ayrı denemiştir. Çalışma sonunda Ca(OH)₂ ile yapılan alkali detoksifikasyon uygun yöntem olarak belirlenmiştir.

Ön işlem çalışmaları öncesi ve sonrası olmak üzere hammaddelerin SEM görüntüleri alınmış ve görüntülerde yapısal bozukluklar saptanmıştır. Bu sonuç yapılan ön işlemlerin hammaddeler üzerindeki etkisini görsel olarak da göstermiştir.

Optimum ön işlem kombinasyonunda yapılan sakkarifikasyon çalışması ve ardından detoksifikasyon sonrası 40 g/L hammadde derişiminde etanol fermantasyonu yapılmıştır. Fermantasyondan önce maya ön üretim ortamı hazırlanmış ve aktif hücrelerin yoğun bulunduğu fazdan alınan aşı ile fermantasyon başlatılmıştır. Uygulama sonucunda saptanan maksimum etanol derişimleri ise MS, MK, BK ve BS için sırası ile 6,22; 3,56; 8,01 ve 1,13 g/L olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın son basamağında teorik maliyet analizi yapılmıştır. Yapılan hesaplama sonucunda BK'nın önerilen uygulamada maliyet açısından en uygun hammadde olduğu saptanmıştır.

Günümüz petrol fiyatları ile biyoetanol fiyatları kıyaslandığında petrol kaynaklı yakıtların daha ekonomik olduğu bilinmektedir. Ancak Dünya'da petrol fiyatlarının devamlı olarak artışı ve kaynakların azalışı göz önünde tutulduğunda ileride biyoetanol kullanımının daha avantajlı olacağı ve bu tür çalışmalara hız katılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Önerilen ön işlem uygulamasının, maliyetinin düşürülmesi ve teknolojik olarak uygulanabilirliği için pilot ölçekli bir sistemde denemelerin yapılması gerekmektedir.

Maddi değeri olmayan zirai atıkların işlenmesi ile biyoetanol üretimi ve kullanımı ile;

Petrol kaynaklı atıklara kıyasla, atmosfer kirliliğinin azaltılabileceği,

Ülkemizin petrol bağımlılığının azaltılabileceği,

Yeni istihdam alanı yaratılabileceği,

gerçekleri göz önünde bulundurularak, bu tür araştırmaların ülkemiz bölgelerine bağlı olarak üretilen zirai ürünlerin atıklarında da çalışılması önerilmektedir.

Ayrıca elde edilen şekerler (heksozlar) ile sadece etanol eldesi değil, şekerlerin substrat olarak kullanılması ile farklı yollarla elde edilen asetik asit, sitrik asit ve buna benzer ürünlerin de elde edilebileceği göz önünde tutularak, bu ürünlerin eldesinin de araştırılmasının gerektiği önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Sanchez, O.J., Cardona, C.A. “Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks”, *Bioresource Technology*, 99: 5270–5295, (2008).
- [2] Beyatlı, Y., “Biyoteknoloji ve Biyoprotein Üretimi”, *Kükem Derneği Bilimsel Yayınları*, Ankara, 54-59, (1996).
- [3] Telli Okur, M., “Ayçiçeği tohum kabuğu hemiselüloz hidrolizatının alkole fermantasyon koşullarının ve kinetiğinin incelenmesi”, *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2003).
- [4] Sharma, S.K., Kalra, K.L., Grewal, H.S., “Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up”, *Bioresource Technology*, 85: 31- 33, (2002).
- [5] Saraçoğlu Eken, N., Arslan, Y., “Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*”, *Biotechnol. Lett.*, 22(10): 855-858, (2000).
- [6] Nigam, J.N., “Bioconversion of water-hyacinth (*Eichornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylosefermenting yeast”, *J. Biotechnol.*, 97: 107-116, (2002).
- [7] Goring, D.A.I. “The lignin paradigm. In: Glasser, W.G., Sarkanen, K.V. (Ed.), *Lignin Properties and Materials*”, American Chemical Society, Washington, DC., (1989).
- [8] Fengel, D., Wegener, G. “Wood, Chemistry, Ultrastructure, reactions”, *Walter de Gruyter*. Berlin, (1984).
- [9] Sjöström, E. “Wood Chemistry, Fundamentals and Applications”, Second edition, *Acedemic Press, Inc.*, San Diego, (1993).
- [10] Fengel, D., Uçar, H., Wegener, G., “Zur Isolierung und charakterisierung der Polysaccharide des Buchenholzes”, 233-239, (1979).
- [11] <http://www.populerbilim.com.tr/arsiv/0810/b00.htm>
- [12] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Hemisel%C3%BCloz>

- [13] Ghosh, P., Ghose, T.K. “Bioethanol in India: recent past and emerging future”, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 85: 1-27, (2003).
- [14] Sint, M.V., Guarini, J.M., Guesalaga, A., Perez-Correa, J.R., Vargas, Y. “Ultrasound based measurements of sugar and ethanol concentrations in hydroalcoholic solutions”, *Food Control*, 19: 31–35, (2008).
- [15] Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. “Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes”, *Process Biochemistry*, 38:187–192, (2002).
- [16] Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal Jr., M.J., Lynd, L.R. “A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol”, *Bioresource Technology*, 81:33–44, (2002).
- [17] Sun, Y., Cheng, J. “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review”, *Bioresource Technology*, 83:1–11, (2002).
- [18] Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I. “Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875”, *Process Biochemistry*, 39:1843–1848, (2004).
- [19] Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Cabanas, A., Ballesteros, M. “Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplas biomass”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105(8): 87–100, (2003).
- [20] Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C. “Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term”, *Biomass and Bioenergy*, 28: 384–410, (2005).
- [21] Kaar, W.E., Holtzapple, M.T. “Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover”, *Biomass and Bioenergy*, 18:189–199, (2000).
- [22] Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J. “Biorefining of softwoods using ethanol organosolv

- pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products”, *Biotechnology and Bioengineering*, 90(4): 473–481, (2005).
- [23] Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. “Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi”, *Journal of Biotechnology*, 103: 273–280, (2003).
- [24] Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., “Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol”, *Biotechnology Progress*, 21:816–822, (2005a).
- [25] Nam, S., Renganathan, V., Tratnyek, P.G.. “Substituent effects on azo dye oxidation by the Fe^{3+} -EDTA- H_2O_2 system”, *Chemosphere*, 45: 59-65, (2001).
- [26] M.K., Soo., “Landfille Leachate Treatment By A Photoassisted Fenton Reaction”, *Wat. Sci. Tec*, 35(4): 239-248, (1997).
- [27] www.h2o2.com
- [28] Akin, D.E., Sethuraman, A., Morrison, W.H., Martin, S.A., Eriksson, K.E. “Microbial delignification with white-rot fungi improves forage digestibility”, *Appl. Environ. Microb.*, 59: 4274–4282, (1993).
- [29] Keller, F.A., Hamilton, J.E., Nguyen, Q.A. “Microbial pretreatment of biomass – potential for reducing severity of thermo-chemical biomass pretreatment”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 105: 27–41, (2003).
- [30] Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T. “Evaluation of pretreatment with *P. ostreatus* for enzyme hydrolysis of rice straw”, *J. Biosci. Bioeng.*, 100: 637–643, (2005).
- [31] Zhang, X.Y., Xu, C.Y., Wang, H.X. “Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis”, *J. Biosci. Bioeng.*, 104: 149–151, (2007).

- [32] Muller, H.W., Trosch, W. “Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production”, Appl. Microbial. Biot., 24: 180–185, (1986).
- [33] Hattaka, A.I. “Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose”, Appl. Microbial. Biot., 18: 350–357, (1983).
- [34] Sun, R., Tomkinson, J. “Comparative study of lignins isolated by alkali and ultrasonic-assisted alkali extractions from wheat straw”, Ultrason. Sonochem., 9(2): 85–93, (2002).
- [35] Sun, R., Tomkinson, J. “Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw”, Carbohydr. Polym., 50(3): 263–271, (2002).
- [36] Kadimaliev, D.A., Revin, V.V., Atykyan, N.A., Samuilov, V.D. “Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*”, Appl. Biochem. Microb., 39: 488–492, (2003).
- [37] Yang, B., Boussaid, A., Mansfield, S.D., Gregg, D.J., Saddler, J.N. “Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded soft wood substrates”, Biotechnol. Bioeng., 77: 678–684, (2002).
- [38] Aygan, A., “Haloalkalofil *Bacillus* Sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği”, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 203 s., (2008).
- [39] Özşahin, A.D., “Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus* Sp.Suşlarından Elde Edilen Selülaz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması”, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 58 s., (2006).

- [40] Saddler, J.N., Gregg, D.J. “Ethanol production from forest products wastes”, Bruce. A., Palfreyman, J.W, London, 207 s., (1998).
- [41] Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hagerdal, B. “Fungal cellulolytic enzyme production: a review”, Proc. Biochem., 26: 65–74, (1991).
- [42] Tshiteya, R.M. “Conversion technologies-biomass to ethanol–alcohol fuels”, National Renewable Energy Lab (NREL), Reference Report No. 3, (1992).
- [43] Rudolf, A., Alkasrawi, M., Zacchi, G., Liden, G. “A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce”, Enzyme Microb Technol, 37: 195–204, (2005).
- [44] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”, Bioresour. Technol, 96: 673–686, (2005).
- [45] Wyman, C.E. “Biomass ethanol: technical progress, opportunities and commercial challenges”, Annu. Rev. Energ. Environ., 24: 189–226, (1999).
- [46] Wyman, C.E. “What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol”, Trends Biotechnol., 25: 153–157, (2007).
- [47] Zhang, Q., Cai, W. “Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3”, Biomass Bioenergy, 32: 1130–1135, (2008).
- [48] Jeya, M., Zhang, Y.W., Kim, I.Wn, Lee, J.K. “Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM”, Process Biotech, 21: 5155–61, (2009).
- [49] Maa, H., Liu, W.W., Chen, X., Wua, Y.J., Yu, Z.L. “Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment”, Bioresource Technology, 100: 1279–1284, (2009).

- [50] Guo, G.L., Chen, W.H., Chen, W.H., Men, L.C., Hwang, W.S. “Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production”, *Bioresource Technology*, 99: 6046–6053, (2008).
- [51] Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Bals, B., Balan, V., Dale, B.E. “Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers’ grains at high-solids loadings”, *Bioresource Technology*, 99: 5206–5215, (2008).
- [52] Martin, C., Thomsen, M.H., Nielsen, H.H., Thomsen, A.B. “Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover–ryegrass mixtures”, *Bioresource Technology*, 99(18): 8777-82, (2008).
- [53] Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., Wang, D. “Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production”, *Applied Energy*, 86: 2459–2465, (2009).
- [54] Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. “Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition”, *Bioresource Technology*, 74:25–33, (2000b).
- [55] Persson, P., Andersson, J., Gorton, L., Larsson, S., Nilvebrant, N.-O., Jonsson, L.F. “Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5318–5325, (2002a).
- [56] Yu, Z., Zhang, H. “Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*”, *Biomass and Bioenergy*, 24:257–262, (2003).
- [57] Khiyami, M.A., Pometto III, A.L., Brown, R.C. “Detoxification of corn stover and corn starch pyrolysis liquors by *Pseudomonas putida* and *Streptomyces setonii* suspended cells and plastic compost support biofilms”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:2978–2987, (2005).

- [58] Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F., Hahn-Hagerdal, B., Jonsson, L.J. “Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 31:274–282, (2002).
- [59] Oliva, J.M., Ballesteros, I., Negro, M.J., Manzanares, P., Cabanas, A., Ballesteros, M. “Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*”, *Biotechnology Progress*, 20:715–720, (2004).
- [60] Soyuduru, D., “Fermantasyonla Etanol Üretiminde Etanol Veriminin Arttırılması” Yüksek Lisans Tezi, 118 sayfa, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği ABD, Eylül 2007, Ankara.
- [61] Hansen, A.C., Zhang, Q., Lyne, P.W.L. “Ethanol–diesel fuel blends a review”, *Bioresource Technol*, 96: 277–285, (2005).
- [62] Renewable Fuels Association, Industry statistics, <http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics>, (2007).
- [63] Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M. “Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks”, *Biomass and Bioenergy*, 19: 63-102, (2000).
- [64] Narendranath, N.V., Thomas, K.C., Ingledew, W.M. “Use of urea hydrogen peroxide in fuel alcohol production”, Patent CA2300807, (2000).
- [65] Echegaray, O., Carvalho, J., Fernandes, A., Sato, S., Aquarone, E., Vitolo, M. “Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation”, *Biomass and Bioenergy*, 19: 39-50, (2000).
- [66] Monte Alegre, R., Rigo, M., Joekes, I. “Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysotile”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(4): 751-757, (2003).

- [67] Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribe Larrea, J.-L., Goma, G., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E. “Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 537-542, (2004).
- [68] Laluece, C., Souza, C.S., Abud, C.L., Gattas, E.A.L., Walker, G.M. “Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29:140-144, (2002).
- [69] Li, W.Z., Xu, J., Wang, J., Yan, Y.J., Zhu, X.F., Chen, M.Q., Tan, Z.C., “Studies of Monosaccharide Production through Lignocellulosic Waste Hydrolysis Using Double Acids”, *Energy & Fuels*, 22:2015–2021, (2008).
- [70] Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. “Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification”, *Bioresour. Technol.*; 74: 17-24, (2000).
- [71] Jonsson, L.J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.O., Hahn-Hägerdal, B. “Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 691-697, (1998).
- [72] Pramanik, K., “Parametric studies on batch alcohol fermentation using *Saccharomyces crevisiae* yeast extracted from tody”, *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 34 (4): 487-492 (2003).
- [73] Türk Standardı, “Lignin Tayini”, TS 4497, Nisan 1985.
- [74] Türk Standardı, “Katı Atıklar-Selüloz Tayini”, TS 12085, Ekim 1996.
- [75] Teramoto, Y., Lee, S.H., Endo, T. “Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking”, *Bioresource Technology*, 18: 8856-8863, (2008).

- [76] Rao, P., Pattabiraman, T.N. "Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses" *Analytical Biochemistry*, 181(1): 18-22, (1989).
- [77] http://en.wikipedia.org/wiki/Reducing_sugar
- [78] Miller, G.L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducty sugar". *Analytical Biochemistry*, 31(3): 426-428, (1959).
- [79] Ghose, T.K. "Measurement of cellulase activitiespure", *Appl. Chem.*, 59(2): 257-268, (1987).
- [80] Sık, S. and Unyayar, A., "Phanerochaete chrysosporium and Funalia trogii for the Degradation of Cotton Stalk and Their Laccase, Peroxidase, Ligninase and Cellulase Enzyme Activities under Semi-solid State Conditions", *J. Biology*, 22: 287-298, (1998).
- [81] Linde, M., Galbe, M., Zacchi, G. "Bioethanol production from non-starch carbohydrate residues in process streams from a dry-mill ethanol plant", *Bioresource Technology*, 99: 6505-6511, (2008).
- [82] Popiel, P.O., Lisiecki, P., Nielsen, J.B.H., Thomsen, A.B., Thomsen, M.H. "Ethanol production from maize silage as lignocellulosic biomass in anaerobically digested and wet-oxidized manure", *Bioresource Technology* 99: 5327-5334, (2008).
- [83] AOAC, Official Method 992.15, "Crude protein in meat and meat products including pet foods" *Combustion Method*, (1992).
- [84] Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass", *Bioresource Technology*, 100: 10-18, (2009).
- [85] Chang, V.S., Holtzapple, M.T. "Fundamental factors affecting enzymatic reactivity", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 23: 5-37, (2000).

- [86] Sun, J.X., Sun, R.C., Sun, X.F., Su, Y.Q. “Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse”. Carbohydrate Research, 339(2): 291-300, (2004).
- [87] Uslu, M.Ö., Balcıoğlu, I.A., “Comparison of the ozonation and Fenton process performances for the treatment of antibiotic containing manure”, Science of the Total Environment, 11: 3450-8, (2009).
- [89] <http://www.payidar.net/kimya/129887-karbonhidratlar.html>
- [90] Shi, J., Sharma-Shivappa, R.R., Chinn, M.S. “Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*”, Bioresource Technology, 100: 4388–4395, (2009).
- [91] Sharma, S.K., Kalra, K.L., Grewal, H.S. “Enzymatic saccharification of pretreated sun flower stalks”, Biomass and Bioenergy, 23: 237 – 243, (2002).
- [92] Yang, F., Li, L., Li, Q., Tan, W., Liu, W., Xian, M. “Enhancement of enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media by ultrasonic intensification”, Carbohydrate Polymers, 81: 311–316, (2010).
- [93] Xu, J., Thomsen, M.H., Thomsen, A.B. “Ethanol production from hydrothermal pretreated corn stover with a loop reactor”, Biomass and Bioenergy, 34: 334-339, (2010).
- [94] Tian, S., Zhou, G., Yan, F., Yu, Y., Yang, X. “Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification”, Biotechnology Advances, 27: 656-660, (2009).
- [95] <http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/piyasabulteni/piyasagunluk.pdf>
- [96] <http://www.tarimgonulluleri.com/-fp28648.html>
- [97] <http://www.meski.gov.tr/tr/butce/2011-ucret-tarifesi.pdf>
- [98] http://www.koniks.com/topic.asp?TOPIC_ID=34294

- [99] http://www.biokim-aritma.com/Bolum_4_Fiziksel_Arytma.pdf
- [100] <http://yenisafak.com.tr/Ekonomi/?i=141830>
- [101] <http://www.otoklav.com/index.php/buhar-otoklav-sterilizator>
- [102] <http://kanolaolive.tr.gg/KANOLA-BIO-DIZEL-HESAPLAMASI.htm>
- [103] <http://www.diytrade.com/china/4/products/7647215/Cellulase.html>
- [104] <http://www.picproje.org/index.php?topic=12630.0>
- [105] <http://www.arage27.com/files/projeler/99911239>
- [106] <http://www.calismadunyasi.com/2011-yili-asgari-ucret>
- [107] <http://www.emboykimya.com.tr/index.php>
- [108] http://www.karyem.com/index.php?id=11&no_cache=1

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Emrah Ahmet ERKURT

Doğum Tarihi: 02/04/1979

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Çevre Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	1998-2002
Yüksek Lisans	Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2002-2006

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör	Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü	2004-2008

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. Mazmancı, M.A., Unyayar, A., Erkurt, E.A., Arkçi, N.B., Bilen, E., Özyurt, M. “Colour removal of textile dyes by culture extracts obtained from white rot fungi” African Journal of Microbiology Research, 3(10): 585-589, (2009).
2. Erkurt E.A., Unyayar A., Kumbur H. “Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process” Process Biochem., 42: 1429–1435, (2007).
3. Unyayar, A., Demirbilek, M., Turkoglu, M., Celik, A., Mazmancı, M.A., Erkurt, E.A., S., Ünyayar, Cekic, O., Atacag, H., “Evaluation of cytotoxic and mutagenic

effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* extracts on mammalian cells” Drug and Chemical Toxicology 1: 69–83, (2006).

4. Unyayar, A., Mazmanci, M.,A., Ataçag, H, Erkurt, E.,A., Coral, G., A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii* : one step isolation and identification”, Enzyme Microb. Technol. 36: 10-16, (2005).

5. Unyayar, A., Mazmanci M.,A., Erkurt, E.,A., Ataçag, H., Gizir, M., “Decolorization kinetics of the azo dye Drimaren Blue X3LR by laccase” Reaction Kinetics and Catalysis Letters, 86(1): 99-107 (2005).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. Taner, F., Eryılmaz, M., Erkurt, E.A. “Biomass potential in The Black Sea, Marmara Sea, Aegen Sea as biogas source” 18th World Energy Council. Prodicing Book p:1-9, B. Aires, Argentina, 13-19 October 2001.

2. Unyayar, A., Mazmanci, M.A., Erkurt, E.A., Ataçag, H. “Decolorization of the azo dye Drimaren Blue X3LR by the crude Fitrates of *Funalia trogii*”, 7th. International Diffuse Pollution Conference, Prodicing book p.: 14: 88-92, Dublin, Ireland, 17-22 August 2003.

3. Unyayar, A., Mazmanci, M.A., Erkurt, E.A., Erkurt, H.A. “Reactive dye decolorization by some white rot fungi under static conditions” European Ecological Congress, Kuşadası/İzmir,Turkey, 8-13 November 2005.

4. Erkurt, E.A., Mazmanci, M.A., Erkurt H.A., Unyayar, A. “Decolorization of Drimarene Blue K2-RL Bb *Funalia trogii* ATCC 200800 culture filtrate immobilized in alginate beads” Environment: Survival and Sustainability, p.: 552, Near East University, Nicosia-Turkish Republic of Northern Cyprus, 19-24 February 2007.

Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler :

1. Erkurt, E.A., Erkurt, H.A., Unyayar, A. “Decolorization of azo dyes by white rot fungi”, The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 9, (Editor: Erkurt, H.A.), Springer, Germany, 157-167, (2010).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Ataçağ, H., Özyurt, M., Taner, F., Erkurt, E.A. “Reaktif Black 5’in aerobik-anaerobik koşullarda biyolojik parçalanması” XII. Biyoteknoloji Kongresi. Bildiri Kitabı sh.: 132-136, Ayvalık, Balıkesir, 17 – 21 Eylül 2001.

2. Erkurt, E.A., Ünyayar, A., Mazmancı, M.A., Ataçağ, H. “Drimaren Blue X3LR’nin renk gideriminden sorumlu *Funalia trogii* enziminin araştırılması”, XIII. Biyoteknoloji Kongresi. Bildiri Kitabı sh.: 256-268 Çanakkale, 25 – 29 Ağustos 2003.

3. Mazmancı, M.A., Ünyayar, A., Erkurt, E.A., “Drimaren Blue X3LR’nin tutuklanmış funguslar tarafından renk giderimi” V. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Ankara, 1 – 4 Ekim 2003.

4. Erkurt, H.A., Özyurt, M., Özer, A., Erkurt, E.A. “Levafix Brown E2R ve Cibacron Red C2G’nin *Aspergillus oryzae* ile renk gideriminde ortam bileşenlerinin araştırılması” 14. Biyoteknoloji Kongresi. Osmangazi Üni. Eskişehir, 31 Ağustos-Eylül 2005.

5. Ünyayar, A., Erkurt, E.A., Mazmancı, M.A., Ataçağ, H., Aslan, Z., Özyazıcıoğlu, L. “Beyaz çürükçül funguslar kullanılarak tekstil endüstrilerinde sıkça kullanılan bazı boyar maddelerin renk gideriminin araştırılması”. 14. Biyoteknoloji Kongresi. Osmangazi Üni. Eskişehir, 31 Ağustos- Eylül 2005.

6. Ayten, N., Ay, T., Ünyayar, A., Erkurt E.A., Mazmancı, M.A. "*Luffa cylindrica*'ya tutuklanmış beyaz çürükçül fungus *Funalia trogii* ATCC 200800 ile Drimaren Blue K2RL boyar maddesinin renk giderimi" VI. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi. Bildiri Kitabı sh.: 143-149, İstanbul, 24 – 26 Kasım 2005.

7. Kumbur, H., Erkurt, E.A., Gülçiçek, O. “Mersin Üniversitesi Çiftikköy, Yenişehir ve Tece kampus sularının mikrobiyolojik yönden incelenmesi” Ulusal Çevre Sempozyumu 2007, Bildiri Özetleri Kitabı Sh.: 195, Mersin, 18-21 Nisan 2007.
8. Erkurt, H.A., Özyurt, M., Özer, A., Erkurt, E.A. “Aktif ve inaktif *Aspergillus Oryzae* boyar madde adsorpsiyon kapasitesinin literatürde yer alan biyosorbentlerle karşılaştırılması” Ulusal Çevre Sempozyumu 2007, Bildiri Özetleri Kitabı Sh.: 179, Mersin, 18-21 Nisan 2007.
9. Dizge, M.G., Dizge, N., Erkurt, E.A., “Beyaz çürükçül fungusların atıksu arıtımında kullanımı” 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, Bildiri Kitabı Sh.: 731-736, İzmir, 24-27 Ekim 2007.
10. Erkurt, E.A., Unyayar, A., Kumbur, H. “Remazol Brilliant Royal ve Drimaren Blue CL-BR'nin beyaz çürükçül funguslar tarafından renk giderimlerinin araştırılması”, İTÜ XI. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu, Bildiri Kitabı Sh.: 373-381, İstanbul, 11-13 Haziran 2008.
11. Kumbur H., Erkurt E.A. Akdeniz, H., Kamalak, D., “Mersin çöp deponi alanı sızıntı sularında fenton oksidasyon tekniği ile KOİ gideriminin araştırılması”, Çevre Sorunları Sempozyumu, Bildiri Özetleri Kitabı Sh.: 54, Kocaeli, 14-17 Mayıs 2008.
12. Kumbur H., Erkurt E.A., Yıldırım, V., Tekinşen E., “Tekstil boyar maddelerinin fenton oksidasyonu ve ultrasonik işlemlerle renk giderimlerinin araştırılması, İTÜ XII. Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu, Bildiri Kitabı Sh.: 483-490, İstanbul, 16-18 Haziran 2010.
13. Ataçağ, E.H., Erkurt, E.A., Paşaoğulları A.N., Kıdak R, Akanser, A., Doğan, Ş., “Dikmen çöp sızıntı suyunun karakterizasyonu ve fenton yöntemiyle arıtılması” UKAY 2011. Uluslararası Kıbrıs Üni.-KAKAD, Bildiri Kitabı Sh.: 97-102, 7-10 Eylül 2011.