

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**LİGNOSELÜLOZİK BİYOKÜTLEDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ SIRASINDA
ÖN İŞLEM KOŞULLARININ ETANOL VERİMİNE ETKİSİ**

Simel BAĞDER ELMACI

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

09.10.2015

Simel BAĞDER ELMACI

ÖZET

Doktora Tezi

LİGNOSELÜLOZİK BİYOKÜTLEDEN BİYOETANOL ÜRETİMİ SIRASINDA ÖN İŞLEM KOŞULLARININ ETANOL VERİMİNE ETKİSİ

Simel BAĞDER ELMACI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Bu çalışmada, lignoselülozik bir madde olan çam odununun sıcak su ile muamele ve iyonik sıvı ile işlemi olmak üzere, iki farklı yöntem ile farklı koşullarda ön işleme tabi tutularak, enzimatik hidrolize daha elverişli hale getirilmesi ve enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen şekerin yüksek verimle etanole dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Ön işlemler sürecinde incelenen parametreler arasında işlem sıcaklığı, işlem süresi, biyokütle konsantrasyonu ve işlem öncesi partikül büyüklüğü yer almaktadır. *Pinus banksiana* ve *Pinus sylvestris* türü çam odunlarına farklı sıcaklık ve sürelerde, sıcak su ön işlemler uygulanmıştır. Bu işlemleri takiben gerçekleştirilen enzimatik hidroliz sonucunda, ön işlem uygulanmış biyokütledeki selüloz içeriğine göre, sırasıyla % 9-16 ve % 4-5 aralığında oldukça düşük glikoz verimleri elde edilebilmiştir. Farklı enzim konsantrasyonları, farklı enzim karışımları (β -glukozidaz, pektinaz, endoglukanaz ilavesi, yüzey aktif madde ilavesi) kullanılarak ve farklı ön işlem uygulamaları (iki aşamalı ön işlem, maleik asit ile ön işlem) ile enzimatik hidroliz verimi arttırılmaya çalışılmıştır. Yüksek enzim dozunun (150 FPU/g glukoz) kullanıldığı ve hidroliz ortamına polietilen glikol yüzey aktif maddesinin eklendiği denemelerde, % glikoz veriminde artış sağlanmıştır.

Çam odununun enzimatik hidrolize elverişli hale gelmesinde, EMIMAc (1-etil-3-metil imidazolyum asetat) iyonik sıvısının oldukça etkili olduğu görülmüştür. Sarıçam odunu için en uygun olarak saptanan, 500-850 μ m partikül büyüklüğü ve % 5 biyokütle konsantrasyonunda, 140 °C'de 45 dakikada EMIMAc ile ön işlemi sonrasında biyokütlenin % 56'sının glikoza dönüştüğü belirlenmiştir. Seçilen koşullarda ön işleme tabi tutulan biyokütle örneklerinin simultane sakkarifikasyon ve fermantasyonu (SSF) ve enzimatik hidrolizatın fermantasyonu sonucunda, sırasıyla % 86 ve % 96 etanol verimine ulaşılmıştır.

Ekim 2015, 147 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, lignoselülozik biyokütle, ön işlem, enzimatik hidroliz, fermantasyon, iyonik sıvı, çam

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

EFFECT OF PRETREATMENT CONDITIONS ON ETHANOL YIELD DURING BIOETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

Simel BAĞDER ELMACI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

In this study, it was aimed to enhance the enzymatic hydrolysis of pine wood, which is a lignocellulosic material, and subsequently to produce ethanol efficiently through the application of two different pretreatment methods, including liquid hot water and ionic liquid pretreatment, at different conditions. The investigated parameters during pretreatment processes were pretreatment temperature, pretreatment duration time, biomass concentration and particle size prior to pretreatment. *Pinus banksiana* and *Pinus sylvestris* pine wood samples were subjected to liquid hot water pretreatment at different temperature and time conditions. Subsequently, the glucose yields, on basis of the cellulose content of the pretreated biomass, obtained upon enzymatic saccharification of the pretreated biomass samples were extremely low, ranging between 9-16 % and 4-5 % for *Pinus banksiana* and *Pinus sylvestris*, respectively. The hydrolysis yields were tried to be enhanced by using different enzyme loadings, different enzyme mixtures (addition of β -glucosidase, pectinase, endogluconase and addition of surfactant) and different pretreatment applications (two stage pretreatment, maleic acid pretreatment). The glucose yields were shown to increase with the use of high enzyme concentration (150 FPU/g glucan) and the addition of polyethylene glycol surfactant.

It was determined that EMIMAc (1-ethyl-3-methylimidazolium-acetate) ionic liquid pretreatment improved the enzymatic digestibility of the pine wood. The conversion of biomass to glucose was 56 % for the yellow pine wood pretreated at the optimum conditions (500-850 μ m particle size; 5 % biomass concentration and 140 °C-45 min EMIMAc pretreatment). The biomass samples pretreated at the selected conditions were subjected to simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and fermentation of enzymatic hydrolyzate, resulting in ethanol yields of 86 % and 96 %, respectively.

October 2015, 147 pages

Key Words: Bioethanol, lignocellulosic biomass, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, ionic liquid, pine

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı); çalışmalarımda önemli katkılarda ve önerilerde bulunan Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Ufuk BÖLÜKBAŞI (ODTÜ, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) hocalarıma; tezimi değerlendirerek, düzeltilmesine katkıda bulunan jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN ve Prof. Dr. Hüseyin ERTEN hocalarıma; çalışmalarım boyunca desteğini gördüğüm Sayın Doç. Dr. Aslı İŞÇİ YAKAN hocama; laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Erinç BAHÇEGÜL'e (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi) ve Arş. Grv. Naciye KUTLU'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı); bu çalışma kapsamında 8 ay süreyle beni misafir araştırmacı olarak kabul eden ve laboratuvarında çalışma imkanı sunan Sayın Prof. Dr. Michael R. LADISCH'e (Purdue Üniversitesi, Ziraat ve Biyoloji Mühendisliği Bölümü); laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, Yenilenebilir Kaynaklar Mühendisliği Laboratuvarı (LORRE, Laboratory of Renewable Resources Engineering) çalışanları, Dr. Eduardo XIMENES, Dr. Youngmi KİM, Rick HENDRICKSON, Linda LIU ve Tommy KREKE'ye ve beni her zaman destekleyen, her zaman yanımda olan annem Remziye BAĞDER, babam Müfit BAĞDER, kardeşim Miraç BAĞDER'e ve ideallerimi gerçekleştirmek için seçtiğim yolda her koşulda yanımda olan ve sevgisiyle bana güç veren değerli eşim Cemal ELMACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Simel BAĞDER ELMACI
Ankara, Ekim 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Biyoetanol.....	4
2.2 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler.....	7
2.2.1 Sakkaroz içeren hammaddeler.....	9
2.2.2 Nişastalı hammaddeler.....	10
2.2.3 Lignoselülozik hammaddeler.....	11
2.3 Lignoselülozik Hammaddelerden Biyoetanol Üretim Basamakları.....	20
2.3.1 Ön işlem.....	20
2.3.1.1 Sıcak su ile ön işlem.....	26
2.3.1.2 İyonik sıvı ile ön işlem.....	28
2.3.2 Enzimatik hidroliz.....	38
2.3.3 Fermantasyon.....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1 Materyal.....	48
3.2 Yöntem.....	48
3.2.1 Odun örneklerinin ön işlem için hazırlanması.....	48
3.2.2 Boyut küçültme işlemi.....	49
3.2.3 Bileşim analizleri.....	49
3.2.4 Ön işlem.....	49
3.2.4.1 Sıcak su ile ön işlem yöntemi.....	49
3.2.4.1.1 <i>P. sylvestris</i> çam odununa uygulanan farklı ön işlem denemeleri.....	54
3.2.4.2 İyonik sıvı ile ön işlem.....	55
3.2.5 Enzimatik hidroliz.....	56

3.2.5.1 <i>P. banksiana</i> çam odununun hidroliz verimini arttırmaya yönelik denemeler.....	57
3.2.5.2 Ön işlem sıvısı içeren ortamda avicel hidrolizi.....	59
3.2.6 Fermantasyon.....	59
3.2.6.1 Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF).....	59
3.2.6.2 Enzimatik hidrolizatın fermantasyonu.....	60
3.2.7 HPLC analizleri.....	61
3.2.8 İstatistik analizler.....	62
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	63
4.1 <i>P. banksiana</i> Çam Odunu ile Gerçekleştirilen Sıcak Su ile Ön İşlem Denemeleri....	63
4.1.1 Bileşim analizleri.....	63
4.1.2 Ön işlem koşullarının optimizasyonu.....	66
4.1.2.1 Glikoz geri kazanımı.....	67
4.1.2.2 Ksiloz geri kazanımı.....	68
4.1.2.3 Galaktoz geri kazanımı.....	70
4.1.2.4 Mannoz geri kazanımı.....	71
4.1.2.5 Arabinoz geri kazanımı.....	73
4.1.2.6 Hemiselüloz geri kazanımı.....	74
4.1.3 Enzimatik hidroliz.....	76
4.1.3.1 <i>P. banksiana</i> çam odununun hidroliz verimini arttırmaya yönelik denemeler.....	78
4.1.3.2 Ön işlem sıvısı içeren ortamda avicel hidrolizi.....	85
4.2 <i>P. sylvestris</i> Çam Odunu ile Gerçekleştirilen Sıcak Su ile Muamele Ön İşlem Denemeleri.....	87
4.2.1 Bileşim analizleri.....	87
4.2.2 Ön işlem koşullarının optimizasyonu.....	90
4.2.2.1 Ön işlem sonrası şekerlerin geri kazanım oranları.....	91
4.2.3 Enzimatik hidroliz.....	97
4.3 <i>P. sylvestris</i> Çam Odununun Sıcak Su ile Muamele Ön İşlem Etkinliğini Arttırmaya Yönelik Denemeler.....	101
4.3.1 Bileşim analizleri.....	101
4.3.2 Enzimatik hidroliz denemeleri.....	102
4.4 <i>P. sylvestris</i> Çam Odunu ile Gerçekleştirilen İyonik Sıvı ile Ön İşlem Denemeleri..	106
4.4.1 Bileşim analizleri.....	107
4.4.2 Enzimatik hidroliz denemeleri.....	112

4.4.3 Fermantasyon denemeleri.....	119
4.4.3.1 Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF).....	119
4.4.3.2 Enzimatik hidrolizatın fermantasyonu.....	121
5. SONUÇ.....	125
KAYNAKLAR.....	129
EK 1 Selülaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi: Filtre Kâğıdı Aktivitesi (FPU).....	141
ÖZGEÇMİŞ.....	144

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
d/d	Dakikada Devir
dm	Desimetre
g	Gram
K	Kelvin
kg	Kilogram
m	Metre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
cm	Santimetre
%	Yüzde

Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMIMCl	1-allil-3-metil imidazolyum klorür
BMIMCl	1-bütül-3-metil imidazolyum klorür
CBP	Konsolide biyoproses
EMIMAc	1-etil-3-metil imidazolyum asetat
EMIMCl	1-etil-3-metil imidazolyum klorür
EMIMDEP	1-etil-3-metil imidazolyum dietil fosfat
FPU	Filter paper unit, filtre kâğıdı aktivitesi
HMF	5-hidroksimetil-furfural
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
ÖTV	Özel Tüketim Vergisi
PEG	Polietilen glikol
SHF	Ayrı hidroliz ve fermantasyon
SSCF	Simultane sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon
SSF	Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Lignoselülozun yapısı.....	14
Şekil 2.2	Selülozun moleküler yapısı.....	15
Şekil 2.3	Selüloz lifinin fibriler yapısı.....	15
Şekil 2.4	Yumuşak yapılı odunlarda bulunan galaktoglukomannanın yapısı.....	17
Şekil 2.5	Fenil propan ünitesi. H: Hidroksifenil ünitesi G: Guayasil ünitesi S: Siringil ünitesi.....	18
Şekil 2.6	p-kumaril, koniferil ve sinapil alkolün yapısı.....	18
Şekil 2.7	Yumuşak yapılı odunlarda ligninin yapısı.....	19
Şekil 2.8	Biyokütleden etanol üretim prosesi.....	20
Şekil 2.9	Ön işlemin lignoselülozik biyokütle üzerindeki etkisinin şematik olarak gösterimi.....	21
Şekil 2.10	Selülozik etanol üretiminde kullanılan ön işlem yöntemleri.....	23
Şekil 2.11	Ön işlem prosesi.....	24
Şekil 3.1	<i>P. banksiana</i> çam odununun ön işlemin için kullanılan sıcak su ile muamele sistemi.....	50
Şekil 3.2	<i>P. sylvestris</i> çam odununun ön işlemin için kullanılan Parr reaktör sistemi....	52
Şekil 4.1	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda glikozun geri kazanımı.....	67
Şekil 4.2	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda ksilozun geri kazanımı.....	69
Şekil 4.3	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda galaktozun geri kazanımı.....	70
Şekil 4.4	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda mannozun geri kazanımı.....	72
Şekil 4.5	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda arabinozun geri kazanımı.....	73
Şekil 4.6	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda hemiselüloz (ksiloz + mannoz + galaktoz + arabinoz) geri kazanımı.....	75
Şekil 4.7	Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (<i>P. banksiana</i>) odununun 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	77
Şekil 4.8	Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (<i>P. banksiana</i>) odununun 30 FPU/g glukoz Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	80
Şekil 4.9	İki farklı koşulda (200 °C-5 dakika ve 210 °C-5 dakika) sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (<i>P. banksiana</i>) odununun 150 FPU/g glukoz Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	81
Şekil 4.10	Farklı ön işlem ve hidroliz koşullarının çam odununun hidroliz verimine etkisi.....	83
Şekil 4.11	Yüzey aktif madde ilavesinin hidroliz verimine etkisi.....	85
Şekil 4.12	Ön işlem sıvısı varlığında avicel hidrolizi.....	86
Şekil 4.13	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda glikozun geri kazanımı.....	92
Şekil 4.14	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda ksilozun geri kazanımı.....	94
Şekil 4.15	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda galaktozun geri kazanımı.....	96

Şekil 4.16	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda mannoz ve arabinozun geri kazanımı.....	97
Şekil 4.17	Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (<i>P. sylvestris</i>) odununun 20 FPU/g glukan Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	98
Şekil 4.18	Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (<i>P. sylvestris</i>) odununun 40 FPU/g glukan Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	99
Şekil 4.19	200 °C-20 dakika ve 200 °C-30 dakika ön işlem uygulanan örneklerin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	103
Şekil 4.20	% 5, 10 ve 15 (w/w) biyokütle konsantrasyonunda 200 °C-30 dakika ön işlem uygulanan örneklerin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi ile elde edilen % glikoz verimleri.....	103
Şekil 4.21	% 5, 15 katı madde yüklemesi ile farklı partikül büyüklüğüne sahip örneklerin 200 °C-30 dakikada ön işlemi sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidrolizi ile elde edilen % glikoz verimleri.....	105
Şekil 4.22	Ön işlem uygulanmamış farklı partikül boyutundaki çam örneklerinin ve avicelin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz sonunda elde edilen % glikoz verimleri.....	106
Şekil 4.23	Farklı koşullarda EMIMAc ile ön işlem sonundaki çözülme oranları.....	109
Şekil 4.24	Farklı koşullarda EMIMAc ile ön işlem sonunda glikozun geri kazanımı....	111
Şekil 4.25	Farklı koşullarda EMIMAc ile ön işlem sonunda biyokütleden ekstrakte olan lignin oranı.....	111
Şekil 4.26	a. EMIMAc ile farklı sürelerde ön işleme tabi tutulan <2.5 mm, b. 500-850 µm, c. 363-500 µm, d. <363 µm partikül büyüklüğündeki çam odunu örneklerinin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen glikoz miktarları (g/L).....	113
Şekil 4.27	EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan 500-850 µm partikül boyutundaki çam odunu örneklerinin 10 FPU/g toplam kuru madde ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile, % 2 ve % 5 biyokütle konsantrasyonunda gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen glikoz miktarları (g/L)	118
Şekil 4.28	a. EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan 500-850 µm partikül boyutundaki çam odunu örneklerinin 20 FPU/g toplam kuru madde, b. 10 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen SSF denemeleri süresince belirlenen glikoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL).....	120
Şekil 4.29	a. EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan α-selülozun 20 FPU/g α-selüloz, b. 10 FPU/g α-selüloz Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen SSF denemeleri süresince belirlenen glikoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL)	121
Şekil 4.30	a. EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan 500-850 µm partikül boyutundaki çam odunu örneklerinin 20 FPU/g toplam kuru madde, b. 10 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen 72 saatlik enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatların fermantasyonu süresince belirlenen glikoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL).....	122
Şekil 4.31	a. EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan α-selülozun 20 FPU/g α-selüloz, b. 10 FPU/g α-selüloz Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen 72 saatlik enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatların fermantasyonu süresince belirlenen glikoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL).....	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Türkiye’de biyoetanol üretimi yapan tesisler.....	5
Çizelge 2.2	Biyoetanol üretimi için kullanılan hammaddeler ve üretim potansiyelleri....	8
Çizelge 2.3	Biyoetanol hammadde kaynakları.....	9
Çizelge 2.4	Biyoetanol üretimi için kullanılabilir çeşitli lignoselülozik hammaddelerin biyokimyasal bileşimleri (% kuru madde bazında).....	12
Çizelge 2.5	Literatürde rapor edilmiş çam odununa ilişkin bileşim sonuçları.....	13
Çizelge 3.1	<i>P. banksiana</i> çam odununa uygulanan farklı ön işlem koşulları.....	51
Çizelge 3.2	<i>P. sylvestris</i> çam odununa uygulanan farklı ön işlem koşulları.....	53
Çizelge 3.3	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa uygulanan farklı ön işlem koşulları.....	54
Çizelge 3.4	<i>P. sylvestris</i> türü çam odununa EMIMAc ile uygulanan farklı ön işlem koşulları.....	56
Çizelge 4.1	Ham çam (<i>P. banksiana</i>) odununun bileşimi.....	63
Çizelge 4.2	Sıcak su ile ön işlem uygulanmış çam (<i>P. banksiana</i>) odununun bileşimi....	65
Çizelge 4.3	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonundaki çözülme oranları.....	66
Çizelge 4.4	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda glikozun geri kazanımı.....	68
Çizelge 4.5	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda ksilozun geri kazanımı.....	69
Çizelge 4.6	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda galaktozun geri kazanımı.....	71
Çizelge 4.7	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda mannozun geri kazanımı.....	72
Çizelge 4.8	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda arabinozun geri kazanımı.....	74
Çizelge 4.9	Çam (<i>P. banksiana</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda hemiselüloz geri kazanımı.....	75
Çizelge 4.10	Ham sarıçam (<i>P. sylvestris</i>) odununun bileşimi.....	87
Çizelge 4.11	Sıcak su ile ön işlem uygulanmış sarıçam (<i>P. sylvestris</i>) odununun bileşimi	89
Çizelge 4.12	Sarıçam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonundaki çözülme oranları.....	90
Çizelge 4.13	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda glikozun geri kazanımı.....	92
Çizelge 4.14	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda ksilozun geri kazanımı.....	94
Çizelge 4.15	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda galaktozun geri kazanımı.....	95
Çizelge 4.16	Çam (<i>P. sylvestris</i>) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda mannoz ve arabinozun geri kazanımı.....	96
Çizelge 4.17	Sıcak su ile ön işlem uygulanmış sarıçam (<i>P. sylvestris</i>) odununun bileşimi (200 °C-20 dakika/200 °C-30 dakika; % 15 kuru madde, w/w).....	101
Çizelge 4.18	Farklı biyokütle konsantrasyonlarında, 200 °C’de 30 dakika süresince sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (<i>P. sylvestris</i>) odununun bileşimi (Sıcaklık 200 °C, Süre 30 dakika ve Şiddet 4.42 log R ₀).....	102
Çizelge 4.19	Farklı koşullarda EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulmuş sarıçam (<i>P. sylvestris</i>) odununun bileşimi (% kuru madde (w/w), 5).....	108
Çizelge 4.20	Partikül büyüklüğü ve ön işlem süresinin biyokütlenin glikoza dönüşüm oranına (%) etkisi.....	115

Çizelge 4.21	Farklı enzimatik hidroliz koşullarının biyokütlenin glikoza dönüşüm oranına (%) etkisi.....	119
Çizelge 4.22	EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan çam odunu örneklerinin fermantasyonları ile elde edilen etanol verimleri (%).....	124

1. GİRİŞ

Doğada fosil yakıtların giderek azalması ve bu yakıtların tüketiminin yarattığı çevresel sorunlar, yeni ve sürdürülebilir enerji kaynaklarının aranmasını zorunlu kılmaktadır. Her ne kadar enerji kaynağı olarak güneş, rüzgâr ve dalga gibi doğal kaynaklar ile hidrojen, biyogaz ve nükleer kaynaklar ile endüstride kullanılmış bitkisel yağlardan elde edilen biyoyakıt kullanımı üzerinde yoğun çalışmalar yapılsa da maliyetler ve çevresel tepkiler de önem taşımaktadır. Örneğin, çevre dostu olarak sunulan rüzgâr enerjisinin kuşların göç yollarını değiştirdiği ve güneş enerjisi için kullanılan panellerin üretimi için doğaya yoğun şekilde sera gazı salınması çeşitli çevresel itirazlara yol açmaktadır. Biyokütleden üretilen yenilenebilir yakıtların petrolün yerini alması, ümit verici bir yaklaşımdır. Bu kapsamda, lignoselülozik hammaddelerden etil alkol üretimi için teknolojilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

AB’de çok sayıda otomobilde hububattan ve şeker pancarından üretilen yakıtlar kullanılmaktadır. Brezilya’da ise, şeker kamışından elde edilen yakıtların kullanımı oldukça yaygındır. Üretim pahalı olmasına karşın, çevreyi daha az kirletmesi, çiftçiye yeni bir kazanç imkânı sağlaması, yenilenebilir temiz bir yakıt kaynağı olması, fosil yakıtlardan % 40-80 daha az sera gazı yayması ve petrole bağımlılığı azaltması nedeniyle, önemli bir yakıt olarak değerlendirilmektedir.

Fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle iyi bir yakıt olan etanol, şeker içeren hammaddeler, nişastalı hammaddeler ve lignoselülozik biyokütleden fermantasyon yolu ile üretilebilmektedir. Mevcut biyoetanol üretimi, nişasta ve şekerlerden etil alkol eldesi şeklindedir, ancak sürdürülebilirliği konusunda ciddi tartışmalar bulunmaktadır. Bu bağlamda, lignoselülozik hammaddelerden biyoetanol üretimi, lignoselülozik hammaddelerin besin maddeleri ile rekabete girmemesi ve alışlagelmiş tarımsal hammaddelerden daha ucuz olması nedeniyle ilgi çekici bir alternatiftir. Lignoselüloz, en bol bulunan yenilenebilir biyokütle olup; dünyada yıllık üretiminin 10^{10} milyon ton olduğu tahmin edilmektedir. Tarım ve ormancılık kalıntıları veya lignoselülozik ürünler gibi çeşitli lignoselülozik hammaddelerin etil alkole biyolojik dönüşümü pek çok yarar

sağlamakla birlikte, ekonomik ve teknolojik engellerden dolayı gelişimi halen gecikmektedir (Alvira vd. 2010).

Biyoetanolün endüstriyel ölçekte üretimi için göreceli olarak ucuz, kolay ve bol bulunan substratların kullanımı gerekmektedir. Etil alkol, mısırdan (nişastalı hammadde) ya da şeker kamışından (şekerli hammadde) üretildiğinde, hammadde, üretim maliyetinin yaklaşık % 40-70'ini oluşturmaktadır. Tarım, ormancılık veya endüstri atıklarının kullanılmasıyla hammadde maliyeti önemli ölçüde düşürülebilmektedir (Cardona vd. 2010).

Lignoselüloz; selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere 3 karbohidrattan oluşan kompleks bir polimerdir. Yüksek miktarlarda ve düşük maliyette bulunabilirliği nedeniyle, biyoetanol üretimi için cazip bir hammadde olarak değerlendirilmektedir. Ancak, günümüzde lignoselülozdan etil alkol üretiminin maliyeti yüksek olması sebebiyle, henüz arzulan oranda endüstride kullanılamamaktadır (Cardona vd. 2010).

Lignoselülozik hammaddelerden etil alkolün büyük çapta üretiminin geliştirilmesi için, günümüzde pek çok çalışma yapılmaktadır. Ancak, bu hammaddelerin işlenmelerinin büyük oranda karmaşık ve pahalı olması temel sınırlayıcı faktördür. Bu durum, lignoselülozik biyokütlenin yapısı ve bileşimi ile ilişkilidir. Öncelikle lignoselülozun yapısında % 75 oranında bulunan selüloz ve hemiselülozun, fermente olabilir şekerlere parçalanması gerekmektedir. Parçalanma işlemi, kompleks ve enerji gerektiren bir işlem olup, henüz endüstriyel boyutta tam anlamıyla geliştirilememiştir. Modern genetik ve diğer araçların gelişmesiyle birlikte, lignoselüloziklerin yapısındaki inatçı fraksiyonlardan şekerlerin üretilmesi ve etil alkole dönüştürülmesi işlem maliyetinin ileride düşürülmesi beklenmektedir (Cardona vd. 2010).

Lignoselülozik biyokütleden etil alkol üretimi; ön işlem, enzimatik hidroliz, fermantasyon ve ürünün ayrılması/damıtma olmak üzere 4 temel aşamadan oluşmaktadır (Mosier vd. 2005b, Balat vd. 2008, Margeot vd. 2009). Lignoselülozun fermente olabilir monosakkaritlere hidrolizi, selülozun parçalanabilirliği çeşitli

fizikokimyasal, yapısal ve bileşimsel faktörler nedeniyle engellendiğinden, halen teknik anlamda problemlidir. Lignoselülozun bu yapısal karakteristiklerinden dolayı ön işlem, hidroliz aşamasında fermente olabilir şekerleri elde etmek için önemli bir aşama olarak gösterilmektedir. Ön işlemin amacı, enzim hidroliz hızını ve selüloz ile hemiselülozun fermente olabilir şekerlere dönüşüm verimini arttırmak için, hidrolize engel olan yapısal ve bileşimsel engelleri değiştirmek ya da uzaklaştırmaktır. Bu engeller, selülozik biyokütlenin yapısında bulunan lignin, selüloz ve hemiselüloz olup, bu bileşenlerin ön işlem ile yapılarının bozulup parçalanması sağlanmaktadır. Ön işlem ile lignoselülozik materyal, karbohidrat polimerlerini fermente olabilir şekerlere dönüştüren enzimlere ve selülaz üreten mikroorganizmalara daha uygun hale getirilmektedir (Balat vd. 2008, Alvira vd. 2010).

Petrol ve petrol ürünleri açısından dışa bağımlı olan ülkemizde, çeşitli tarım, ormancılık veya endüstri atıkların değerlendirilerek, alternatif ve yenilenebilir bir enerji kaynağı olan etil alkole dönüştürülmesi prosesindeki sorunların ele alınması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın temel amacı; lignin içeriği ve yapısı nedeniyle hidrolizi karmaşık, yumuşak bir odun türü olan çamın biyoetanole dönüşüm sürecindeki uygun ön işlem koşullarının belirlenerek, şeker ve dolayısıyla etanol veriminin maksimum düzeye çıkarılmasıdır. Literatürde çamın ön işlemine ilişkin çalışmaların çoğunda, ön işlem yöntemi olarak asitle katalizlenmiş buhar patlatma ön işlemi kullanılmıştır. Bu çalışmada ise, zararlı kimyasal kullanımının olmadığı, çevresel açıdan avantajlı yöntemler olan, sıcak su ile ön işlem ve iyonik sıvı ön işlem yöntemleri kullanılmıştır. Lignoselülozik bir madde olan çam odununun iki farklı yöntem ile farklı koşullarda ön işleme tabi tutularak, enzimatik hidrolize daha elverişli hale getirilmesi ve enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen şekerin yüksek verimle etanole dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Ön işlem yöntemleri; farklı sıcaklık, süre, biyokütle konsantrasyonu ve partikül büyüklüklerinde uygulanarak, çam odunundan biyoetanol üretim prosesi için en uygun ön işlem koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyoetanol

Biyoetanol, hammaddesi şeker pancarı, mısır, buğday ve odunsular gibi şeker, nişasta veya selüloz özlü tarımsal ürünlerin fermantasyonu ile elde edilen ve benzinle belirli oranlarda harmanlanarak kullanılan alternatif bir yakıttır (Anonim 2015a). Biyokütleden biyoetanol üretimi, hem ham petrol tüketimini hem de çevre kirliliğini azaltması bakımından büyük önem taşımaktadır. Biyoetanolla karıştırılmış yakıtların taşıt araçlarında ve kısmen sanayide kullanımı, petrol kullanımını ve sera gazı emisyonunu kayda değer ölçüde azaltabilmektedir (Balat vd. 2008).

Son yıllarda, biyoyakıtların kullanımı ve üretimi önemli ölçüde artmıştır. Biyoetanol, dünya çapında toplam biyoyakıt üretiminin % 85'ini oluşturmaktadır. Sera gazı salınımını azaltması ve enerji bağımsızlığı ile bölgesel ekonomik gelişimi arttırması gibi yararları bulunmaktadır. Etil alkol ABD'de esas olarak mısırdan; Brezilya'da ise şeker kamışından elde edilmektedir (Sainz 2009).

Genellikle ulaştırma yakıtı olarak benzinle harmanlanarak kullanılabilen bir yakıt olan biyoetanol, benzinle karışım oranlarına göre aşağıdaki şekilde adlandırılmaktadır (Narin 2008):

E2 : % 2 Biyoetanol + % 98 Benzin

E5 : % 5 Biyoetanol + % 95 Benzin

E10 : % 10 Biyoetanol + % 90 Benzin

E85 : % 85 Biyoetanol + % 15 Benzin

Bazı ülkelerde biyoetanol-benzin karışımlarının kullanıldığı biyoyakıt programları uygulanmaktadır. Bunlar içerisinde, ABD (E10 ve esnek yakıtlı taşıtlar için E85), Kanada (E10 ve esnek yakıtlı taşıtlar için E85), İsviçre (E5 ve esnek yakıtlı taşıtlar için E85), Hindistan (E5), Avustralya (E10), Tayland (E10), Çin (E10), Kolombiya (E10), Peru (E10), Paraguay (E7) ve Brezilya (E20, E25 ve esnek yakıtlı taşıtlar için herhangi

bir karışım) yer almaktadır (Balat vd. 2008). Brezilya’da E100 (% 100 Biyoetanol) ile çalışan ulaşım araçları da kullanılmaktadır (Bayrakçı 2009).

Türkiye’de biyoetanol üretimi oldukça yeni bir prosestir ve halen üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Türkiye’de birinci nesil biyoetanol üreten bazı tesisler çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Ünlü ve Durmaz-Hilmioğlu 2014).

Çizelge 2.1 Türkiye’de biyoetanol üretimi yapan tesisler (Ünlü ve Durmaz-Hilmioğlu 2014)

Etanol üretim tesisi	Kullanılan hammadde	Üretim kapasitesi (L/gün)
Erzurum	Şeker pancarı	40.000
Eskişehir	Şeker pancarı	65.000
Turhal	Şeker pancarı	45.000
Malatya	Şeker pancarı	40.000
Çumra	Şeker pancarı	300.000
Tarkim	Buğday ve mısır	100.000
Tezkim	Buğday ve mısır	70.000
Amasya	Şeker pancarı	60.000

Türkiye’deki şeker fabrikalarının çoğu biyoetanol üretiminde hammadde olarak melası kullanmaktadır (Ünlü ve Durmaz-Hilmioğlu 2014). Melas, şeker pancarından şeker üretimi sırasında yan ürün olarak çıkan ve yaklaşık % 50 oranında şeker içeren bir üründür. Şeker fabrikalarındaki mevcut teknolojiler ile melasın içerisindeki şeker alınamadığından kullanılamamaktadır. Bu nedenle, Eskişehir ve Konya’daki şeker fabrikalarında, melastaki şekerin fermantasyonu yöntemiyle, etanol üretilebilmektedir (Bayrakçı 2009).

Türkiye’de biyoetanol benzine % 2 oranında ilave edilmektedir. Türkiye’de biyoetanol pazarının gelişmesi, AB’nin hedeflediği benzine biyoetanol ilave oranına Türkiye’de de izin verilmesi ile mümkün olacaktır. Bu da yürürlükteki ÖTV mevzuatının değiştirilmesi ile gerçekleşebilir (Ünlü ve Durmaz-Hilmioğlu 2014). Türkiye’de

biyoetanolün benzine karıştırılabilmesi için yasal olarak % 5'lik onay bulunmasına karşın, ÖTV indirimi yalnızca % 2'lik orana uygulanmaktadır (Bayrakçı 2009).

Benzinle karıştırılan biyoetanol, benzinin emisyon kalitesini iyileştirdiği gibi yapısındaki oksijen nedeniyle benzinin daha verimli ve temiz yanmasına da yardımcı olmaktadır (Ünlü ve Durmaz-Hilmioğlu 2014). Ancak, son dönemde motorinle harmanlanarak da kullanılabilir. E-Dizel olarak adlandırılan karışımda motorinin içerisinde genellikle % 15 biyoetanol bulunmaktadır. Biyoetanol ulaştırma sektörünün dışında, elektrik üretiminde, küçük ev aletlerinde ve kimyasal madde üretiminde de kullanılabilir (Narin 2008).

Biyoetanol (etil alkol, hububat alkolü, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) oda sıcaklığında sıvı olan bir alkoldür (Balat vd. 2008). Biyoetanol, yenilenebilir, biyolojik kökenli, sera gazı salınımına az etki eden, çevre dostu alternatif bir yakıt olarak dikkat çekmektedir (Adıgüzel 2013). Biyoetanol, benzine kıyasla daha yüksek oktan sayısına, daha geniş yanabilme aralığına, daha yüksek yanma hızına ve daha yüksek buharlaşma sıcaklığına sahiptir. Bu özellikler biyoetanolle, yüksek sıkıştırma (basınç) oranı, kısa yanma zamanı gibi avantajlar kazandırmaktadır. Biyoetanolün benzine göre dezavantajlı yönleri ise, enerji yoğunluğunun benzinden daha düşük olması (biyoetanol, benzinin sahip olduğu enerjinin % 66'sına sahiptir), korozif olması, daha düşük alev parlaklığı ve buhar basıncına sahip olması, suyla karışabilir olması ve ekosisteme toksik etkide bulunmasıdır (Balat vd. 2008). Biyoetanolün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ise; özgül ağırlığı 0.79 kg/dm^3 , buhar basıncı 50 mm Hg, kaynama sıcaklığı $78.5 \text{ }^\circ\text{C}$, dielektrik katsayısı 24.3, molekül ağırlığı 46.1 şeklindedir (Adıgüzel 2013). Biyoetanol, % 35 oranında oksijen içeren oksijenli bir yakıt olduğundan, yanmadan kaynaklanan azot oksit (NO_x) emisyonu düşüktür (Balat vd. 2008). Yakıtın daha verimli yanmasını sağlamak için, içeriğindeki oksijen oranının artırılması gerekmektedir. Yakıtlarda genellikle oktan sayısını arttırmak amacıyla, benzen ve metil tersiyer bütül eter (MTBE) gibi kanserojen maddeler kullanılmaktadır. Oysa bu amaç için biyoetanolün kullanılması, hem yakıtın daha verimli yanmasına hem de buna bağlı olarak zararlı egzoz gazlarında azalmaya neden olacağından, daha çevreci bir alternatiftir (Ahmed 2011).

Biyoeanolün avantajlarını aşağıda sıralanan şekilde özetlemek mümkündür (Adıgüzel 2013):

- Yerli, yenilenebilir ve temiz bir yakıt kaynağıdır.
- Fosil kökenli yakıtlara olan bağımlılığı azaltır.
- Düşük maliyet ile yakıt oktan sayısını arttırmak mümkündür.
- Genelde bütün araçlarda kullanılabilir.
- Üretimi ve muhafaza edilmesi ve taşınması diğer yenilenebilir enerji kaynaklarına göre daha kolaydır.
- Biyoyakıtlar fosil yakıtlardan % 40-80 daha az sera gazı yayar.
- Zararlı sera gazı emisyonlarını ve küresel ısınmayı azaltır.
- Asit yağmurlarını azaltır.
- Daha az su kirliliği ve daha az atık oluşturur.
- Net ve pozitif enerji dengesine sahiptir.
- Tarımsal alanlarda yaşayan insanlar için yeni bir istihdam sağlar.

2.2 Biyoeanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Biyoeanol, $(CH_2O)_N$ tipik kimyasal formüle sahip her tür karbohidrattan üretilmektedir (Walker 2010). Biyoeanol üretiminde kullanılan kaynaklar, sakkaroz içeren hammaddeler (şeker pancarı, tatlı sorgum, şeker kamışı), nişastalı hammaddeler (buğday, mısır, arpa) ve lignoselülozik biyokütle (odun, saman, otlar) olmak üzere üç grupta sınıflandırılmaktadır (Balat vd. 2008). Bu üç hammadde grubunun dışında, son yıllarda çeşitli araştırmalara konu olmuş diğer bir hammadde kaynağı ise, mikroalglerdir (Adıgüzel 2013). Biyoeanol üretiminde kullanılacak hammaddeler ve üretim potansiyelleri çizelge 2.2'de verilmiştir (Kumar vd. 2006, Balat vd. 2008, Chakraborty ve Gaikwad 2012).

Çizelge 2.2 Biyoetanol üretimi için kullanılan hammaddeler ve üretim potansiyelleri (Kumar vd. 2006, Balat vd. 2008, Chakraborty ve Gaikwad 2012)

Hammadde	Biyoetanol üretim potansiyeli (L/ton)
Şeker kamışı	70
Şeker pancarı	110
Tatlı patates	125
Patates	110
Manyok	180
Darı	360
Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340
Tatlı sorgum	60
Bagas ve diğer selülozik biyokütle	280

Biyoetanol üretiminde kullanılan hammadde kaynakları, birinci ve ikinci nesil olmak üzere iki farklı türdedir. Birinci nesil olarak adlandırılan şeker ve nişasta bazlı hammaddeler, aynı zamanda insan ve hayvan besini de olduklarından, sosyal, ekonomik ve çevresel açıdan bazı dezavantajlara sahiptirler. Bu hammaddelere alternatif olarak, ikinci nesil hammadde olarak lignoselülozik biyokütle kullanılabilir. Lignoselülozik biyokütle, karbonun yeryüzünde en fazla bulunan formudur (Üçüncü 2011). Çizelge 2.3’de biyoetanol üretimi için kullanılan birinci ve ikinci nesil hammadde kaynakları görülmektedir (Walker 2010).

Çizelge 2.3 Biyoetanol hammadde kaynakları (Walker 2010)

Birinci nesil hammaddeler		İkinci nesil hammaddeler
Şekerli hammaddeler	Niştalı hammaddeler	Lignoselülozik hammaddeler
– Şeker kamışı	– Hububatlar (mısır, buğday,	– Odun
– Şeker pancarı	tritikale)	– Tarımsal atıklar (saman,
– Tatlı sorgum	– Kök ürünleri (patates,	mısır sapı)
– Peyniraltı suyu	manyok)	– Kentsel katı atıklar
– Meyve artıkları	– İnulin (polifruktan) kök	– Atık kâğıt, hamur kâğıt
– Şekerleme endüstrisi atıkları	ürünleri (hindiba, enginar)	

Biyoetanol üretimi ile ilgili temel problemlerden biri, üretim için uygun hammaddenin sağlanmasıdır. Biyoetanol için uygun hammaddenin bulunması, mevsimden mevsime ve coğrafi bölgeye bağlı olarak değişmektedir. Hammaddelerin fiyatı da oldukça değişken olup, biyoetanol üretim maliyetini yüksek oranda etkilemektedir. Hammadde, üretim maliyetinin üçte birini oluşturduğundan, biyoetanol üretimini maksimuma çıkarmak büyük önem taşımaktadır (Balat vd. 2008).

2.2.1 Sakkaroz içeren hammaddeler

Biyoetanol üretiminde öncelikli olarak kullanılan hammaddeler, şeker kamışı ve şeker pancarıdır. Dünyadaki şeker üretiminin üçte ikisi şeker kamışından, üçte biri ise şeker pancarından yapılmaktadır. Bu iki hammadde farklı coğrafi bölgelerde yetişmektedir. Şeker kamışı tropikal ve alt tropikal ülkelerde yetişirken, şeker pancarı sadece ılıman iklime sahip ülkelerde yetişmektedir (Balat vd. 2008). Avrupa ülkelerinde, biyoetanol üretiminde en çok kullanılan sakkaroz içeren hammadde, pancar melasıdır. Şeker pancarı, daha kısa bir yetiştirme dönemine sahip olması, daha yüksek verime sahip olması, iklim değişikliklerine daha fazla tolerans göstermesi ve daha düşük miktarda su ve gübre gereksiniminden dolayı avantajlıdır. Şeker pancarı, şeker kamışına kıyasla, % 35-40 oranında daha az su ve gübreye ihtiyaç duymaktadır (Kumar vd. 2006). Bu iki enerji ürününün dışında, tatlı sorgum da gelecek vaat eden bir hammadDEDİR. Bunun nedeni, tatlı sorgum saplarından ekstrakte edilen özsuynun yüksek sakkaroz içeriğine

sahip olması, tanelerinin nişasta içeriğinin fazla olması ve küspesinin önemli bir lignoselülozik biyokütle kaynağı olmasıdır. Sakkarozun etanole dönüşümü, nişastalı maddeler ve lignoselülozik biyokütlenin dönüşümünden daha kolaydır. Çünkü, bu disakkarit, hammaddenin ön hidrolizine gerek duyulmaksızın, mayalar tarafından parçalanabilmektedir (Cardona ve Sánchez 2007).

2.2.2 Nişastalı hammaddeler

Biyoetanol üretiminde kullanılabilecek diğer bir kaynak, nişasta bazlı hammaddelerdir. Nişasta bir biyopolimer olup, D-glikoz monomerlerinden oluşan bir homopolimer olarak tanımlanmaktadır. Biyoetanol üretimi için, öncelikle, nişastayı oluşturan glikoz birimleri arasındaki bağların kırılması ve glikoz şurubunun oluşturulması gerekmektedir. Oluşan glikoz şurubu ise, daha sonra mayalar tarafından biyoetanole dönüştürülmektedir. Bu tip hammadde kaynakları daha çok Kuzey Amerika ve Avrupa'da kullanılmaktadır. Mısır ve buğday, bu amaçla en çok kullanılan hammaddeler arasındadır (Balat vd. 2008). Tropik ülkelerde ise, ticari etanol üretiminde manyok gibi nişastalı kök ürünleri kullanılabilmektedir (Cardona ve Sánchez 2007).

Nişasta, kaynağına göre farklı oranlarda olmak üzere, amiloz (% 16-30) ve amilopektin (% 65-85) polimerlerinin bileşiminden oluşmaktadır. Amiloz, α -1,4 bağlarıyla bağlanmış lineer bir glikoz polimeridir. Amilopektin ise, α -1,6 bağlanma yapısında yan zincirler de içeren çok dallı bir glikoz polimeridir (Prasad vd. 2007). Nişasta, bu şekilde uzun zincirli glikoz monomerlerinden oluştuğundan, öncelikle uygun bir hidroliz yöntemi ile fermente edilebilir şekerlere parçalanması gerekmektedir. Enzimatik ve asidik hidroliz olmak üzere başlıca iki tip hidroliz reaksiyonu bulunmaktadır. Nişastanın yüksek sıcaklıkta amilazlar tarafından hidrolizi endüstriyel açıdan "sıvılaştırma" olarak bilinmektedir. Nişastanın enzimatik hidrolizine etki eden faktörler, substratlar, enzim aktivitesi ve sıcaklık, pH gibi reaksiyon koşullarıdır. Nişasta bazlı biyoetanol endüstrisi, ticari olarak 30 yıldır kullanılmaktadır. Bu nedenle, gerek enzim etkinliği ve biyoetanol verimini artırma, gerekse proses maliyetleri ve süresini azaltma konusunda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Nişastalı hammaddelerin dönüşümü sırasında maliyeti

arttıran iki temel neden bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, *Saccharomyces cerevisiae* mayasının nişastayı parçalayamamasından dolayı, yüksek miktarlarda amilolitik enzimlere (α -amilaz, glukoamilaz) ihtiyaç duyulmasıdır. İkincisi ise, yüksek biyoetanol verimine ulaşmak için nişastalı maddelerin yüksek sıcaklıklarda (140-180 °C) pişirilme gereksinimidir (Balat vd. 2008).

2.2.3 Lignoselülozik hammaddeler

Tarımsal atıklar (mısır sapları, buğday samanı), odun ve enerji ürünleri gibi lignoselülozik biyokütle, dünyada en bol bulunan yenilenebilir kaynaklardır ve dolayısıyla biyoetanol üretimi için ilgi çeken bir hammaddedir. Lignoselülozik biyokütle yılda 442 milyar litre biyoetanol üretilebilme potansiyeline sahiptir. Ürün atıkları ve kalıntılarında toplam biyoetanol üretim potansiyeli, yılda 491 milyar litre olup, mevcut dünya biyoetanol üretiminden 16 kat daha fazladır (Balat vd. 2008). Biyoetanol üretimi için çok sayıda lignoselülozik materyal test edilmiştir (Sánchez ve Cardona 2008). Genel olarak, etil alkol üretiminde kullanılacak lignoselülozik materyaller 6 gruba ayrılmıştır. Bunlar; ürün artıkları (şeker kamışı küspesi, mısır sapları, buğday samanı, pirinç samanı, pirinç kabukları, arpa samanı, tatlı sorgum küspesi, zeytin çekirdeği ve pulpu), sert ağaçlar (titrek kavak, akkavak), yumuşak ağaçlar (çam, ladin), selüloz atıkları (gazete kâğıdı, atık kâğıt, geri dönüşümlü kâğıt atık), otsu biyokütle (yonca unu, dallı darı, bermuda çimeni, çayır otu) ve kentsel katı atıklardır (Cardona vd. 2010).

Pirinç samanı, dünyada en bol bulunan lignoselülozik atık maddelerinden biridir. Yıllık üretimi 731 milyon ton olup, bunun 667.6 milyon tonu Asya'da, 37.2 milyon tonu Amerika'da, 20.9 milyon tonu Afrika'da, 3.9 milyon tonu Avrupa'da ve 1.7 milyon tonu ise Okyanus Ülkelerindedir. Bu miktardaki pirinç samanından elde edilebilecek biyoetanol potansiyeli 205 milyar ton/yıldır. Bu miktar da, tek tip bir biyokütle hammaddesinden üretilebilecek en yüksek miktardaki üründür. Lignoselülozik çok yıllık bitkiler (çalılar, otsular gibi), yüksek verimli ve düşük maliyetli oluşları, verimsiz topraklarda dahi gelişebilmeleri, çevreye zararlarının az olması gibi nedenlerden dolayı

gelecek vaat eden hammadde kaynaklarındandır. Biyoetanol üretimi için uygun çeşitli hammadde kaynaklarının biyokimyasal bileşimleri çizelge 2.4’de verilmiştir. Bu hammaddeler içerisinde, çam en yüksek toplam şeker içeriğine sahip olduğundan, en yüksek biyoetanol üretim potansiyeline sahiptir. Lignin içeriği, hammadde kaynaklarının çoğunda % 27 civarındadır. Ancak, çimler genellikle daha az lignin içermektedirler (Balat vd. 2008).

Çizelge 2.4 Biyoetanol üretimi için kullanılabilir çeşitli lignoselülozik hammaddelerin biyokimyasal bileşimleri (% kuru madde bazında) (Balat vd. 2008)

Hammadde	Sert odunlu ağaçlar			Yumuşak odunlu ağaç	Otsular
	Yalancı akasya	Melez kavak	Okalıptüs	Çam	Dallı darı
Selüloz (Glukan;6C)	41.61	44.70	49.50	44.55	31.98
Hemiselüloz	17.66	18.55	13.07	21.90	25.19
Ksilan (5C)	13.86	14.56	10.73	6.30	21.09
Arabinan (5C)	0.94	0.82	0.31	1.60	2.84
Galaktan (6C)	0.93	0.97	0.76	2.56	0.95
Mannan (6C)	1.92	2.20	1.27	11.43	0.30
Lignin	26.70	26.44	27.71	27.67	18.13
Kül	2.15	1.71	1.26	0.32	5.95
Asitler	4.57	1.48	4.19	2.67	1.21
Çözünenler	7.31	7.12	4.27	2.88	17.54

Bu çalışmada lignoselülozik hammadde olarak yumuşak bir odun türü olan çam seçilmiştir. Biyoetanol üretim prosesi için çamın seçilmesi; ülkemizde yaygın olarak yetişmesi, sert odunlu ağaçlara kıyasla daha kısa sürede yetiştirilebilmesi ve yumuşak odunların lignin içeriği ve yapısı nedeniyle hidrolizinin karmaşık olması gibi nedenlere dayanmaktadır. Bu çalışmada elde edilen bileşim sonuçlarını literatür verileri ile kıyaslayabilmek amacıyla, farklı çalışmalarda elde edilmiş sonuçlar çizelge 2.5’de derlenmiştir.

Çizelge 2.5 Literatürde rapor edilmiş çam odununa ilişkin bileşim sonuçları

Hammadde	Bileşim (%)							
	Glukan	Mannan	Ksilan	Arabinan	Galaktan	Lignin	Kül	Referans
Çam	33.8	10.9	8.5	2.6	5.6	34.7	0.5	(Karunanithy vd. 2012)
Çam	38.7	22.9*				26.4	0.2	(von Sivers ve Zacchi 1995)
Çam (<i>P. radiata</i>)	45.3	12.2	6.4	1.5	2.1	26.8	0.2	(Araque vd. 2008)
Çam (<i>P. radiata</i>)	45.1	24.4*				27.2	ND	(Fissore vd. 2010)
Loblolly çam (<i>P. taeda</i>)	42.4	9.1	6.3	1.1	1.8	28.0+0.7	ND	(Wei vd. 2011)
Loblolly çam (<i>P. taeda</i>)	42.0	9.6	7.8	1.6	2.6	29.4+0.5	ND	(Sannigrahi vd. 2010)
Loblolly çam (<i>P. taeda</i>)	44.3	10.0	6.5**		1.8	29.2	ND	(Wu vd. 2010)
Lodgepole çamı (<i>P. contorta</i>)	44.9	11.5	6.2	1.9	3.0	26.2+0.4	ND	(Ewanick vd. 2007)
Lodgepole çamı (<i>P. contorta</i>)	45.4	11.8	6.3	1.3	2.0	24.8+0.3	0.3	(Pan vd. 2007)
Lodgepole çamı (<i>P. contorta</i>)	42.6	11.0	6.9	1.6	2.2	27.1	ND	(Zhu vd. 2010)
Lodgepole çamı (<i>P. contorta</i>)	45.4	11.5	6.2	1.7	3.2	28.5+0.5	ND	(Kumar vd. 2010)

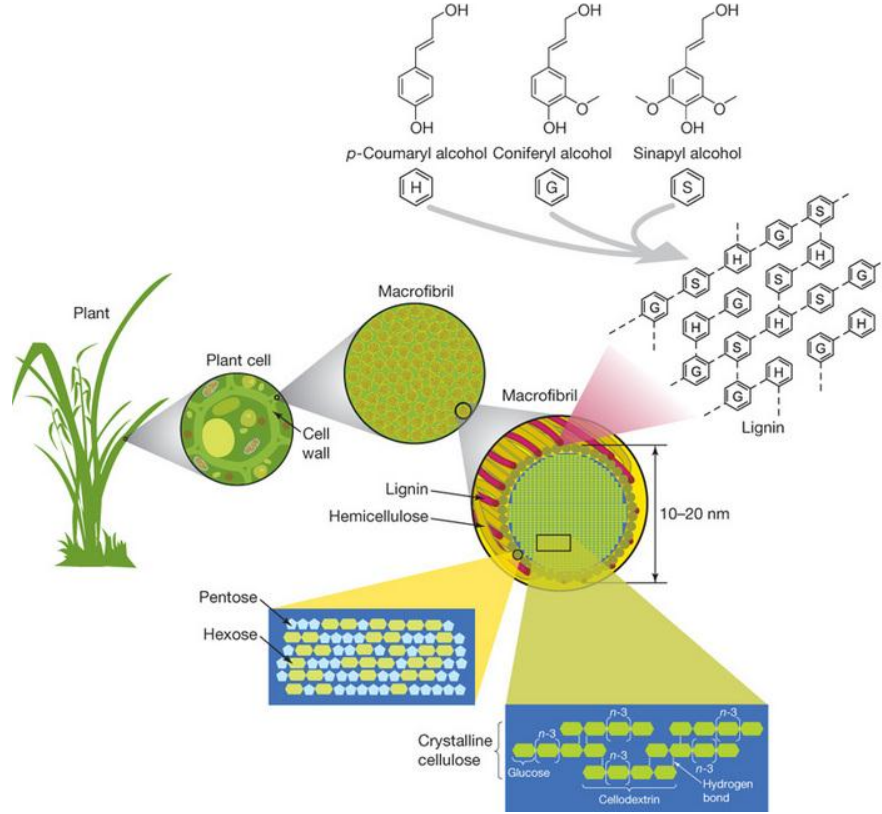
* Mannan+ksilan+arabinan+galaktan

**Ksilan+arabinan

ND; Belirlenmedi

Lignoselülozik biyokütle selüloz ($C_6H_{10}O_5$)_x, hemiselüloz (ksilan ($C_5H_8O_4$)_m gibi) ve lignin [$C_9H_{10}O_3 \cdot (OCH_3)_{0.9-1.7}$]_n olmak üzere 3 temel polimerden oluşmaktadır (Balat vd. 2008). Lignoselülozun yapısı şekil 2.1’de gösterilmiştir (Rubin 2008). Bu bileşenler dışında, yapının geri kalan kısmını çözünenler, asitler, tuzlar ve mineraller oluşturmaktadır. Karbohidrat polimerleri olan selüloz ve hemiselüloz, genellikle kuru ağırlığın üçte ikisini oluşturmaktadırlar. Bu polisakkaritler, çeşitli yöntemlerle yapılan hidrolizle önce basit şekerlere dönüşmekte ve daha sonra uygun mikroorganizmalar ile

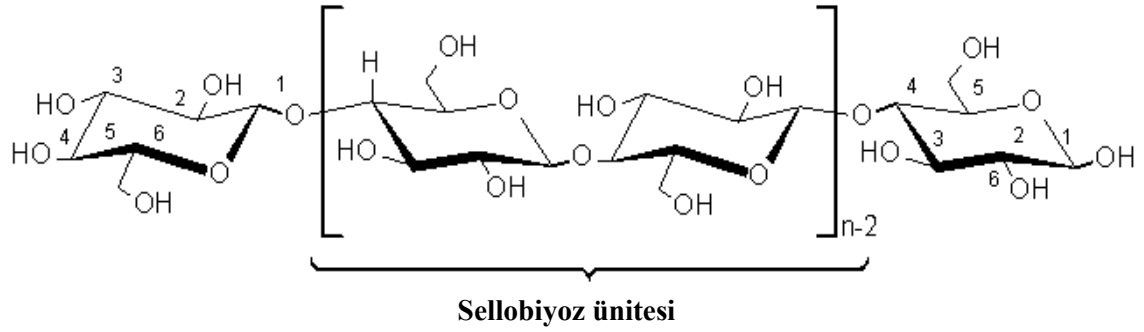
etanole fermente olmaktadır. Lignin ise, etanol üretiminde kullanılmamaktadır (Hamelinck vd. 2005).



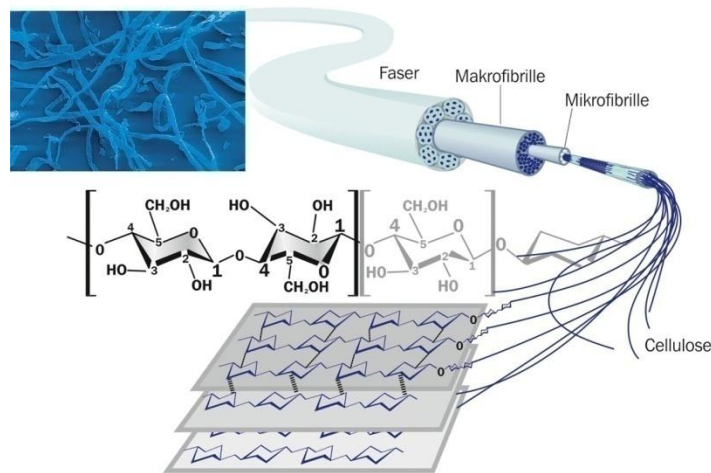
Şekil 2.1 Lignoselülozun yapısı (Rubin 2008)

Selüloz, lignoselülozik biyokütlenin temel bileşeni olup, biyokütlenin ağırlıkça yaklaşık % 40-50'sini oluşturmaktadır. β -D glukopiranoz birimlerinin 1,4 glikozidik bağları ile birbirine bağlanmasıyla oluşan doğrusal bir homopolisakkarittir. Her glikoz molekülünden bir molekül suyun uzaklaşması ile oluşan glikoz anhidrit, 5.000-10.000 glikoz birimi içeren uzun selüloz zincirlerine polimerize olmaktadır. Selüloz polimerinin tekrar eden temel birimi ise, iki glikoz anhidrit birimi içeren sellobiyozdur (Balat vd. 2008), (Şekil 2.2). Her bir glikoz anhidrit birimi, üç adet hidroksil (OH) grubu içermektedir (Erkurt 2011). Glikoz birimlerinin bir araya gelmesiyle selüloz zincirleri, selüloz zincirlerinin içerdikleri hidroksil grupları ile hidrojen köprü bağları oluşturarak bir araya gelmesiyle fibriller meydana gelmektedir (Özyürek 2011). Bir diğer deyişle selüloz molekülleri demetler şeklinde birbirleriyle birleşmişlerdir. En

küçük demet elementel fibril olup, aynı yönde uzanan 40 kadar selüloz molekülünden meydana gelmektedir (Koçoğlu-Soydan 2012). Elementel fibriller de, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleriyle bir araya gelerek daha büyük demetleri, mikrofibrilleri oluştururlar. Hemiselüloz ve lignin, mikrofibrillerin etrafını sarmaktadır. Mikrofibrillerin bir araya gelmesiyle de selüloz lifi meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Lignoselüloziklerde selüloz, selüloz zincirlerinin birbirine paralel olacak şekilde düzgün sıralandığı kristalin bölgeler ve moleküllerin düzensiz olarak sıralandığı amorf bölgelerden oluşmaktadır (Pérez vd. 2002, Koçoğlu-Soydan 2012). Amorf bölge, kristalin bölgeye kıyasla enzimlerle daha kolay hidrolize olmaktadır (Laureano-Perez vd. 2005).



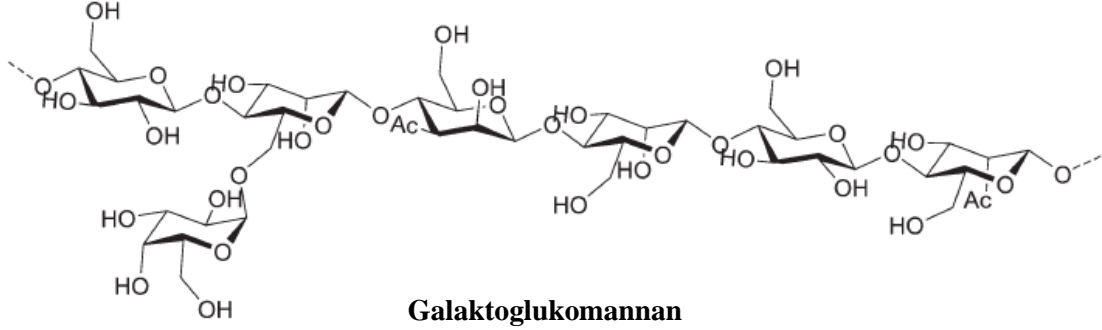
Şekil 2.2 Selülozun moleküler yapısı (Cardenas-Toro vd. 2014)



Şekil 2.3 Selüloz lifinin fibriller yapısı (Anonymous 2015)

Lignoselülozik yapı içerisindeki ikinci temel bileşen ise, “polioz” olarak da bilinen hemiselülozdur (Balat vd. 2008). Hemiselüloz, kompleks bir karbohidrat polimeri olup, biyokütlenin ağırlıkça yaklaşık % 25-30’unu oluşturmaktadır (Pérez vd. 2002). Hemiselüloz 5 karbonlu pentoz (D-ksiloz ve L-arabinoz), 6 karbonlu heksoz (D-glikoz, D-mannoz, D-galaktoz) ve üronik asitler (4-O-metil-glukuronik, D-galakturonik, D-glukuronik asit) gibi farklı şeker ünitelerinin farklı şekillerde birleşmesi ile oluşan dallı bir polisakkarittir (Pérez vd. 2002, Erkurt 2011, Koçoğlu-Soydan 2012). Şeker molekülleri birbirine genellikle β -1,4-, bazen de β -1,3-glikozidik bağlarıyla bağlanmışlardır (Pérez vd. 2002). Şeker üniteleri dışında, asetil grubu gibi bileşenleri de az miktarda içermektedir (Hamelinck vd. 2005). Hemiselüloz zinciri, homopolimer (genellikle tek tip şeker molekülünün tekrar etmesi) ya da heteropolimer (farklı şekerlerin karışımı) şeklinde olabilir (Koçoğlu-Soydan 2012). Hemiselüloz, dallanmış, amorf yapısı ve selüloza kıyasla daha düşük molekül ağırlığı nedeniyle, hidrolize edilmesi kısmen daha kolay olan bir polisakkarittir (Hamelinck vd. 2005). Lignoselülozik yapı içerisinde, termokimyasal uygulamalara en duyarlı bileşenler hemiselülozlardır. Bitki hücre duvarında, hemiselülozların selüloz fibrillerini koruyucu bir kılıf gibi sardığı ve selülozun etkin bir şekilde hidrolizi için hemiselülozların en az % 50’sinin uzaklaştırılması gerektiği ileri sürülmektedir (Agbor vd. 2011). Diğer yandan, fermantasyonu inhibe edici hemiselüloz parçalanma ürünleri olan furfurallar ve hidroksimetil furfuralların oluşumunun önüne geçmek için, sıcaklık, süre gibi ön işlem koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir (Agbor vd. 2011, Mood vd. 2013). Sert odun hemiselülozunun temel bileşeni glukoronoksilan iken, yumuşak odun hemiselülozu daha çok glukomannan içermektedir (Pérez vd. 2002). Ksilan, asit ya da alkali etkisi ile kolaylıkla ekstrakte olurken, glukomannanın ekstraksiyonu için daha yüksek konsantrasyonda alkaliye ihtiyaç duyulmaktadır (Agbor vd. 2011). Yumuşak odunlu ağaçlar, yüksek ksiloz içeriğine sahip sert odunlu ağaçların aksine, yüksek oranda mannoz ve glikoz ünitelerinden oluşmaktadır. Ayrıca sert odunlu ağaçların hemiselülozu, yumuşak odunlu ağaçlarınkine kıyasla daha yüksek oranda asetillenmiştir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000). Yumuşak odunlu ağaçlarda hemiselüloz, temel olarak bir heksoz olan mannozdan oluşmuştur ve mayalar tarafından fermente edilebilmektedir (Galbe ve Zacchi 2002). *Pinus sylvestris* türünde, hemiselüloz galaktoglukomannan yapısındadır. Bu yapıda, glikoz ve mannoz üniteleri temel iskeleti

oluştururken, galaktoz üniteleri bu iskelete bağlanmış yan zincirleri oluşturmaktadır (Hundt vd. 2013). Şekil 2.4'de, yumuşak yapılı odunlarda bulunan galaktoglukomannanın yapısı verilmiştir (Brandt vd. 2013).

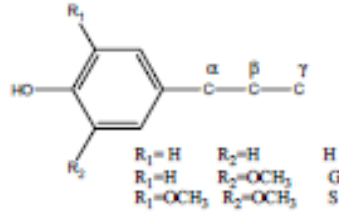


Şekil 2.4 Yumuşak yapılı odunlarda bulunan galaktoglukomannanın yapısı (Brandt vd. 2013)

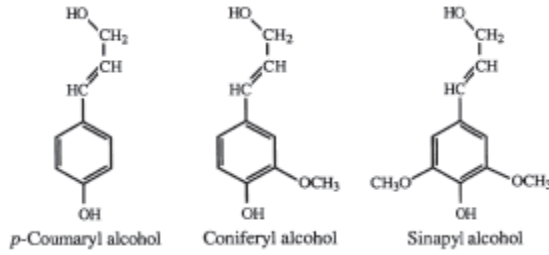
Biyokütlenin ağırlıkça % 10-25'i olan lignin, tüm lignoselülozik biyokütlelerin yapısında mevcuttur. Dolayısıyla lignin, etanol üretim proseslerinde kalıntı olarak yer almaktadır. Lignin az sayıda organizma tarafından organik asitler, fenoller ve vanilin gibi daha değerli ürünlere parçalanabilmektedir. Kimyasal prosesler yoluyla da değerli yakıt katkıları üretilebilmektedir. Bu yan ürünler, etanol teknolojisinin rekabetini önemli ölçüde arttırabilmektedir (Hamelinck vd. 2005).

Lignin, başta odunsu biyokütle olmak üzere, biyokütlenin hücre duvarında bulunan, yüksek oranda dallanmış, mononükleer aromatik bir polimerdir (Balat vd. 2008). Amorf bir fenilpropanoid polimeri olarak nitelendirilen lignin, hemiselüloz ve selüloza, sırasıyla ester ve hidrojen bağları ile bağlanarak, adeta bir yapıştırıcı olarak rol oynamaktadır (Lopes vd. 2013). Ligninin temel yapı taşı, şekil 2.5'de görüldüğü gibi, bir aromatik çekirdek ile bir propan zincirinden oluşan fenil propan üniteleridir (Adıgüzel 2013). Yapısal olarak lignin, koniferil alkol (guayasil propanol), sinapil alkol (siringil propanol) ve p-kumaril alkol (p-hidroksifenil propanol) olmak üzere üç fenil propan alkol biriminin polimerizasyonu ile oluşmuş kompleks bir makromoleküldür (Pérez vd. 2002, Canilha vd. 2012) (Şekil 2.6, Jeffries 1994). Fenil propan üniteleri (aromatik halka+3 karbonlu alkil zinciri), birbirine C-C ve eter (C-O-C) bağları (başta

aril-gliserol ve β -aril eter olmak üzere) ile bağlanarak lignini meydana getirirler (Pérez vd. 2002).

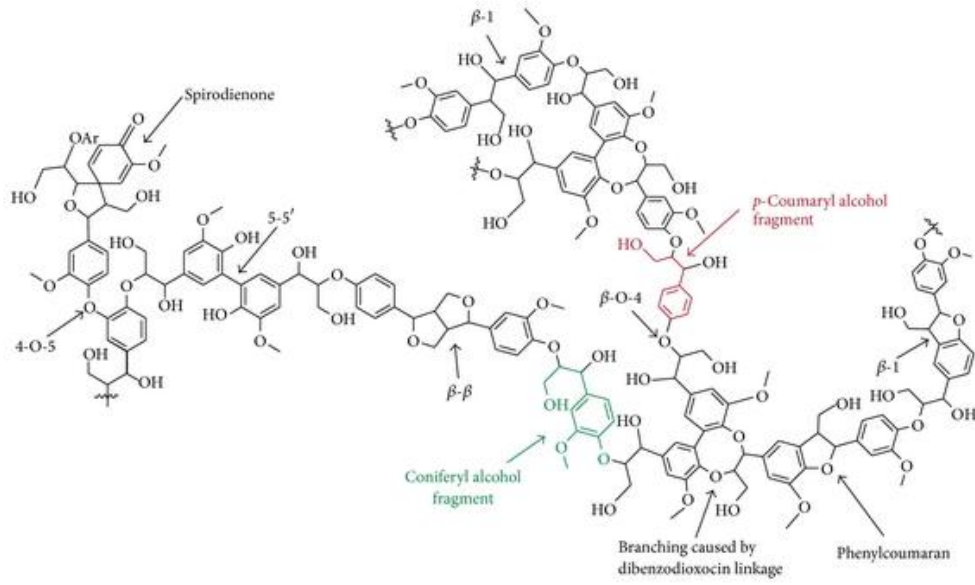


Şekil 2.5 Fenil propan ünitesi. H: Hidroksifenil ünitesi G: Guayasil ünitesi S: Siringil ünitesi (Üner 2003)



Şekil 2.6 *p*-kumaril, koniferil ve sinapil alkolün yapısı (Jeffries 1994)

Yumuşak yapılu odunlarda ligninin temel bileşeni koniferil alkol iken, sert yapılu odunlarda lignin, guayasil ve siringil ünitelerinden oluşmaktadır. Otsu bitkiler ise, guayasil, siringil ve *p*-hidroksifenil üniteleri içermektedir (Jeffries 1994). Şekil 2.6'da görüldüğü gibi, guayasil ligninleri 3. karbon atomunda metoksi grubu içerirken, siringil ligninleri 3. ve 5. karbon atomlarında metoksi grubu içermektedirler (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000). Yumuşak yapılu odunlarda ligninin yapısı şekil 2.7'de gösterilmiştir (Zakzeski vd. 2010).



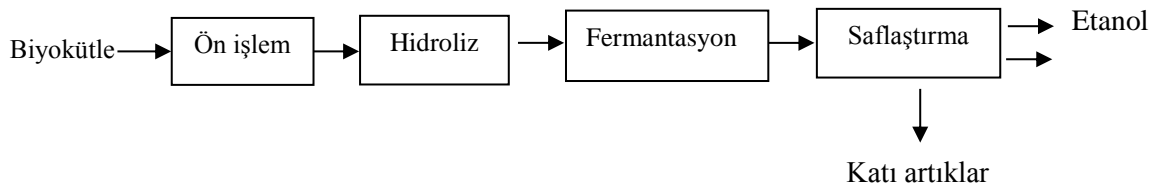
Şekil 2.7 Yumuşak yapılı odunlarda ligninin yapısı (Zakzeski vd. 2010)

Bitki hücre duvarında, lignin ve hemiselülozlar, selüloz elementel fibrillerini sararak, lignoselülozik yapıyı kimyasal ve biyolojik parçalanmaya karşı dirençli kılmaktadırlar (Canilha vd. 2012). Lignin, aynı zamanda hücre duvarına yapısal direnç ve sızdırmazlık özelliği de kazandırmaktadır (Pérez vd. 2002, Agbor vd. 2011). Lignin, lignoselülozik biyokütlenin bileşenlerini birbirine bağlayan bir yapıştırıcı niteliğinde olup, bu özelliğinden ötürü biyokütleyi suda çözünmez kılmaktadır. Selüloz mikrofibrilleri ile yakın bağlantısı nedeniyle lignin, lignoselülozik biyokütlenin enzimatik ve mikrobiyel olarak hidrolizini engelleyen temel etken olarak tanımlanmaktadır (Agbor vd. 2011). Hem yumuşak hem de sert yapılı odunlarda lignin içeriği genellikle ağırlıkça % 20-40 arasında değişirken, bagas (küspe), mısır koçanı, pirinç kabuğu ve sapı gibi otsu bitkilerde ise bu oran % 10-40 arasında değişmektedir (Balat vd. 2008). Genel olarak, yumuşak yapılı odunlar sert yapılı odunlardan daha fazla lignin içermektedirler (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000). Lignin içeriği ve dağılımı, lignoselülozik maddelerin enzimatik hidrolizini zorlaştıran ve enzimin selüloza ulaşmasını engelleyen temel unsurlardandır. Bu nedenle, delignifikasyon olarak adlandırılan lignin uzaklaştırma işlemi ile enzimatik hidroliz sonucu elde edilen şeker veriminin arttırılabileceği bildirilmektedir (Canilha vd. 2012). Lignin, enzimin selüloza

bağlanmasını engelleyen fiziksel bir bariyer olmasının yanı sıra, hidrolitik enzimlerin lignine özgül olmayan şekilde (nonspesifik olarak) adsorpsiyonu, selülitik enzimlerin lignin-karbohidrat kompleksine nonproduktif olarak bağlanması ve lignin türevlerinin mikroorganizmalara toksik etkilerinin olması gibi olumsuz etkilere de sebep olmaktadır (Agbor vd. 2011).

2.3 Lignoselülozik Hammaddelerden Biyoetanol Üretim Basamakları

Lignoselülozik biyokütleden etil alkol üretim prosesi ön işlem, hidroliz, fermantasyon ve ürünün ayrılması/damıtma olmak üzere 4 temel aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.8). Ön işlem aşamasında, lignoselülozik matriksin yapısının bozulması, hidrolizde selülitik enzimler aracılığıyla selülozun glikoza parçalanması, fermantasyon aşamasında maya suşları ile glikozun etil alkole metabolize edilmesi ve ürünün ayrılması aşamasında yakıt spesifikasyonlarını sağlamak için etil alkolün ayrılması ve saflaştırılması amaçlanmaktadır (Mosier vd. 2005b, Balat vd. 2008, Margeot vd. 2009).



Şekil 2.8 Biyokütleden etanol üretim prosesi (Koçoğlu-Soydan 2012)

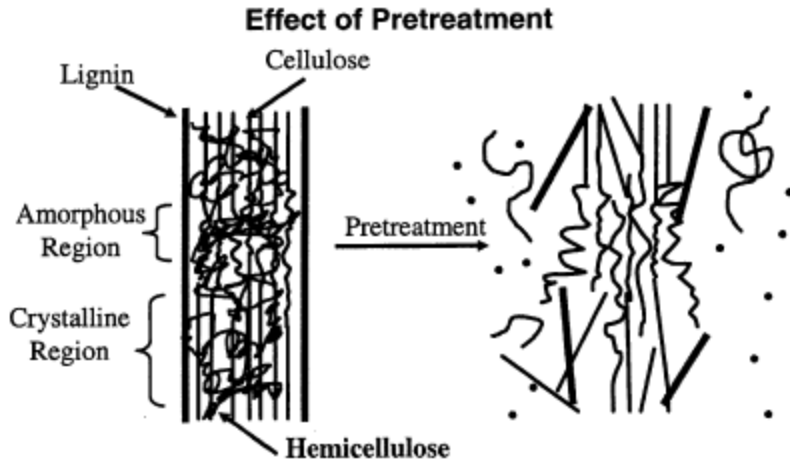
2.3.1 Ön işlem

Lignoselülozik maddelerin biyoetanolle biyodönüşümünde ilk aşama, boyut küçültme ve ön işlemdir (Balat vd. 2008). Ön işlem selülozun dönüşüm işleminde önemli bir araçtır. Ön işlemin amacı; selülozik biyokütlenin yapısını değiştirerek, selülozu, karbohidrat polimerlerini fermente olabilir şekerlere dönüştüren enzimler için daha kolay ulaşılabilir ve elverişli bir hale getirmektir (Mosier vd. 2005b). Ön işlem ile, hidrolize engel olan yapısal ve bileşimsel unsurlar olan lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılması, selülozun

kristal yapısının bozulması ve biyokütlenin porozitesinin artırılması hedeflenmektedir (Sun ve Cheng 2002). Ön işlemin lignoselülozik biyokütle üzerindeki etkisi şekil 2.9'da gösterilmiştir (Mosier vd. 2005b). Ön işlemin başarılı olabilmesi için aşağıdaki gereksinimleri karşılaması gerekmektedir:

1. Şekerlerin oluşumunu ya da daha sonraki enzimatik hidroliz aşamasında şeker oluşturma yeteneğini arttırmalı,
2. Karbohidratların parçalanmasını ve kaybını önlemeli,
3. Hidroliz ve fermantasyon işlemlerinde inhibitör etki gösterebilecek yan ürünlerin oluşumunu önlemeli,
4. Enerji ihtiyacını en aza indirmeli ve uygun maliyetli olmalıdır (Sun ve Cheng 2002, Balat vd. 2008).

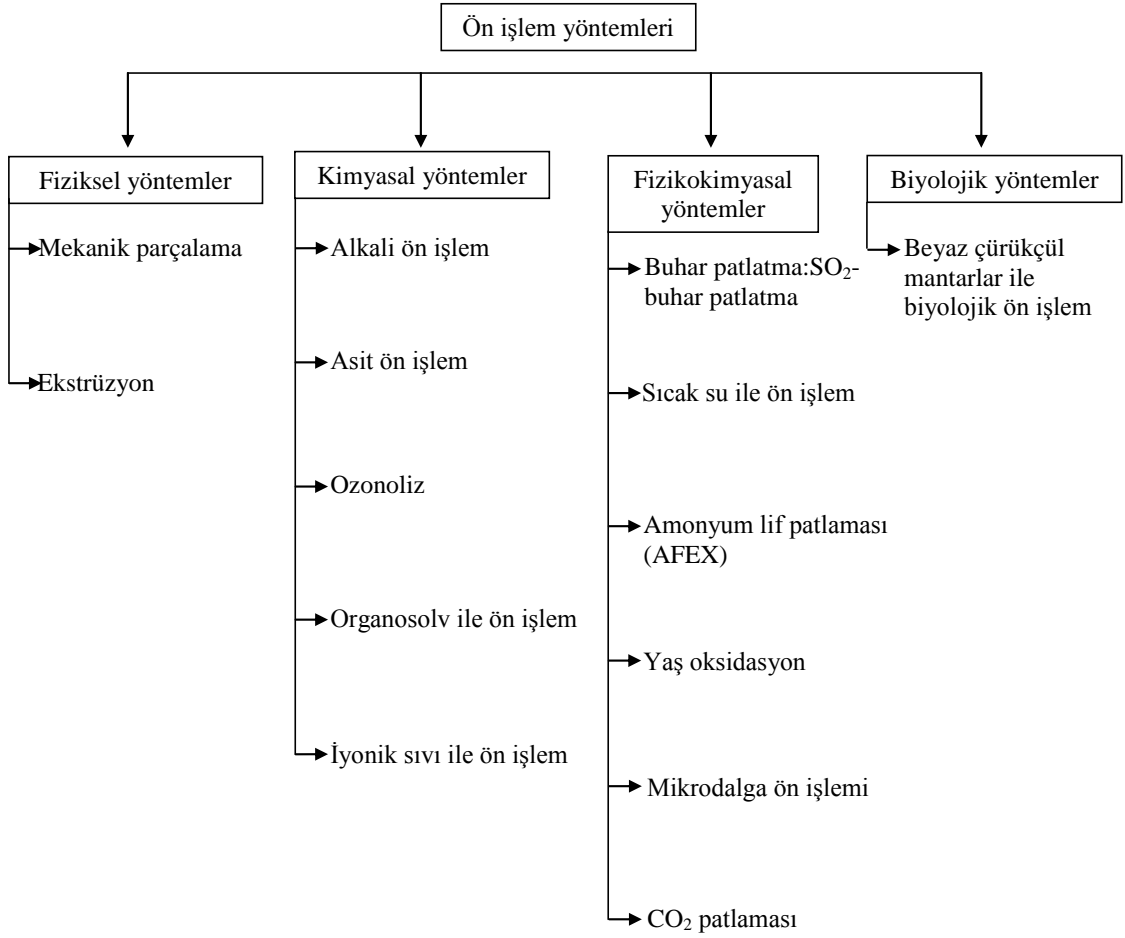
Ayrıca; biyokütlenin küçük partiküllere öğütülmesi, enerji gerektiren ve maliyetli bir işlem olduğundan, ön işlem yöntemi boyut küçültme işlemi gerektirmemelidir (Yang ve Wyman 2008).



Şekil 2.9 Ön işlemin lignoselülozik biyokütle üzerindeki etkisinin şematik olarak gösterimi (Mosier vd. 2005b)

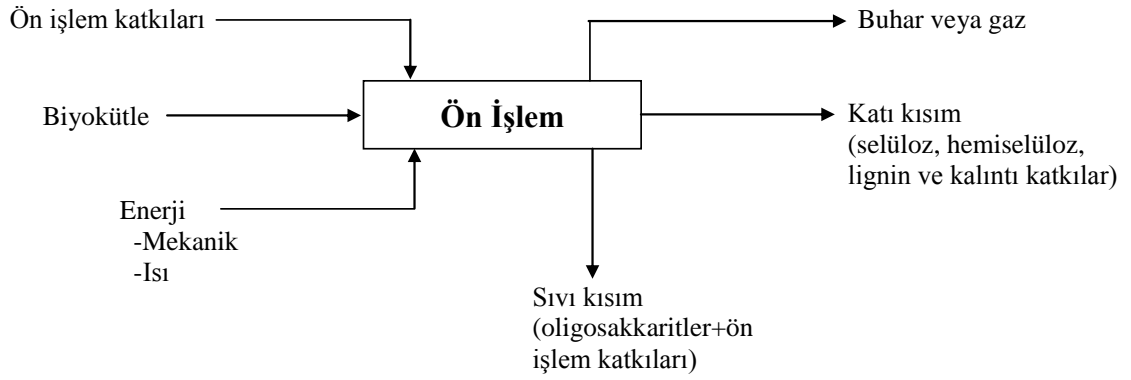
Ön işlem aşaması, asit veya enzim katalizli hidroliz işlemi kolaylaştırmak için lignoselülozik yapının parçalanmasını sağlamasının yanı sıra, diğer biyoetanol üretim

basamaklarının etkinliğini ve son olarak, proses ekonomisini de büyük ölçüde etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, selülozik biyoetanol teknolojisinin başarısının en temel belirleyicisinin ön işlem olduğunu göstermiştir. Çünkü selüloz ve hemiselülozun ne ölçüde ve ne kadar maliyette biyoetanole dönüşebileceğini belirleyen ön işlemdir (Balat vd. 2008). Ön işlem, selülozik biyokütlenin fermente edilebilir şekerlere dönüşümü işleminde en pahalı işlem basamaklarından biri olarak kabul edilmektedir (Mosier vd. 2005b). Bu konuya ilişkin, ön işlemlerin maliyetini düşürmeye ve etkinliğini arttırmaya yönelik pek çok AR-GE çalışmaları mevcuttur (Mosier vd. 2005b, Balat vd. 2008). Selülozik biyokütlenin uygun maliyetli bir şekilde ön işlemi, selülozik biyoetanol teknolojisinde aşılması gereken sorunların başında gelmektedir (Balat vd. 2008). Selülozik etanol üretiminde kullanılan ön işlem yöntemleri, biyolojik, fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal olmak üzere 4 farklı grup altında toplanmışlardır (Sun ve Cheng 2002, Alvira vd. 2010) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Selülozik etanol üretiminde kullanılan ön işlem yöntemleri (Alvira vd. 2010)

Şekil 2.11’de ön işlem prosesi şematik olarak gösterilmiştir. Ön işlemde, katkılar ve/veya enerji kullanımı ile ön işlem görmemiş hammaddeden daha reaktif yapıda katı kısım ve çözüner oligo- ve monosakkaritler içeren sıvı kısım oluşmaktadır (Mosier vd. 2005b).



Şekil 2.11 Ön işlem prosesi (Mosier vd. 2005b)

Ön işlem ve hidroliz aşamaları, biyoetanol prosesinin geniş çapta ticarileşmesine mani olan ekonomik engeller olarak ortaya çıkmaktadır (Berlin vd. 2006). Lignoselülozik hammaddeye uygulanan ön işlem aşamasındaki temel problemlerden biri, enzimatik hidroliz ve hücre gelişmesine inhibitör etkili bileşiklerin oluşmasıdır. Ön işlem süresince açığa çıkan, heksoz ve pentozların parçalanma ürünleri olan 5-hidroksimetil-furfural (HMF) ve furfural, zayıf organik asitler ve ligninin parçalanması sonucunda oluşan fenolik bileşiklerin, enzimler ve mayalar üzerinde inhibitör etkili oldukları gösterilmiştir (Erdei vd. 2010).

Özellikle yumuşak odunlu ağaçların fizikokimyasal yapısı nedeniyle, selülozun parçalanabilirliği oldukça güçtür. Günümüzdeki ön işlem araştırmaları, daha az enzim miktarı ve daha kısa biyodönüşüm süresi ile ön işlem uygulanmış biyokütlenin sonraki enzimatik hidroliz aşamasını destekleyen yeni yaklaşımların tanımlanması, değerlendirilmesi ve geliştirilmesi üzerinedir. Çeşitli hammaddeler üzerinde çok sayıda ön işlem yöntemi araştırılmıştır. Farklı lignoselülozik materyaller farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olduklarından, her hammaddenin özelliklerine bağlı olarak uygun ön işlem teknolojilerinin seçilmesi gerekmektedir. Biyokütleyle uygulanan ön işlem, biyoetanol üretiminde teknik açıdan kritik bir aşama olarak değerlendirilmesinin yanı sıra, proseste en temel ekonomik maliyetlerden biridir. Uygun ön işlemin seçimi; selülozun parçalanabilirliği, maya için inhibitör etkili toksik bileşiklerin oluşması, karıştırma gücü gereksinimleri, işlem sonrası enerji ihtiyacı ve atık su uygulaması

ihtiyacı gibi sonraki işlem aşamalarındaki tüm faktörler üzerinde önemli rol oynamaktadır (Alvira vd. 2010).

Lignoselülozik hammaddeye uygulanacak ideal ön işlem, selüloz, hemiselüloz ve lignini ayırabilmelidir. Böylece selülaz enzimleri saf selülozla reaksiyona girebilir. Ön işlem koşulları, lignin ve hemiselüloz bileşenlerini selülozdan ayıracak, aynı zamanda tüm karbohidratların geri kazanımını maksimuma çıkaracak ve hemiselüloz şekerlerinin fermantasyon inhibitörlerine dönüşümünü en aza indirecek şekilde seçilmelidir. Özellikle, yumuşak odunlu ağaçlarda bu koşulları optimize etmek oldukça güçtür (Chandra vd. 2007). Yumuşak odunlu ağaçlar, genel olarak, sert odunlu ağaçlar ve tarımsal atıklara oranla daha dayanıklı yapıdadırlar. Bunun nedeni, yumuşak odunluların daha sert bir yapıya sahip olmaları ve daha fazla lignin içermeleridir. Ayrıca, asetillenmiş grupları sert odunlulardan daha az olması sebebiyle otohizoliz aynı ölçüde gerçekleşmemektedir. Bu nedenle, asitle katalizlenen buhar ön işlemi en uygun ön işlem metodu olarak görülmektedir (Galbe ve Zacchi 2002).

Buhar patlatma ön işleminin, en uygun maliyetli ön işlem yöntemlerinden biri olarak tanımlanmasına karşın, yumuşak odunlu ağaçlarda, sert odunlu ağaçlara ve tarımsal atıklara kıyasla daha az etkin olduğu belirtilmektedir (Sun ve Cheng 2002). Alkali (NaOH) uygulamasının da, lignin içeriği % 26'dan yüksek olan yumuşak odunlu ağaçlar için uygun olmadığı belirtilmektedir (Sun ve Cheng 2002). Alkali ön işlem, odunsu materyallerden ziyade, tarımsal atıklar ve otsu ürünler için daha etkili bir ön işlem şeklidir. Bu durum, AFEX (ammonia fiber explosion) işlemi için de geçerlidir (Galbe ve Zacchi 2002). Li vd. (2013), seyreltik asit ve iyonik sıvı (EMIMAc; 1-etil-3-metil imidazolyum asetat) ön işlemi uygulanmış çam örneğinin enzimatik hidrolizi (24 h) sonucundaki glikoz verimlerini karşılaştırmışlar ve seyreltik asit ve iyonik sıvı ön işlemi ile, sırasıyla % 9, % 62 glikoz verimine ulaştıklarını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Cox ve Ekerdt (2013), asidik bir iyonik sıvı olan 1-H-3-metil imidazolyum klorürün sarıçam odunu için etkin bir ön işlem yöntemi olduğunu belirtmişlerdir. Uju vd. (2013) geliştirdikleri perasetik asit-iyonik sıvı ön işlem uygulamasında, çam odunu için 25 saat sonunda % 75 glikoz verimine ulaştıklarını belirtmişlerdir. Literatür

verilerinden de anlaşılacağı üzere, iyonik sıvı ön işlemleri yumuşak odunlu bir ağaç olan çam için uygun bir ön işlem metodu olarak değerlendirilebilmektedir.

2.3.1.1 Sıcak su ile ön işlem

Biyokütlenin sıcak su uygulaması ile ön işlemini tanımlamak için solvoliz ve hidrotermoliz gibi terimler kullanılmaktadır (Agbor vd. 2011). Sıcak su ile ön işlem, buhar patlatma ön işlemine benzemekle birlikte, bu yöntemde buhar yerine, yüksek sıcaklıklardaki (160-240 °C) sıvı fazda bulunan su kullanılmaktadır (Behera vd. 2014). Bu yöntemde, basınç uygulanarak (doyma noktasının üzerindeki basınçta) suyun yüksek sıcaklıklarda sıvı fazda kalması sağlanmaktadır (Alvira vd. 2010, Sarkar vd. 2012). Bu yöntem hidrotermal bir ön işlem yöntemi olup, yüksek oranda oligomer formunda hemiselüloz şekerlerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu uygulama, genellikle 170-230 °C aralığındaki sıcaklıklarda, 5 MPa basıncın üzerinde ve 20 dakika sürede gerçekleştirilmektedir. Düşük düzeylerde de olsa, istenmeyen parçalanma ürünlerinin oluşumu da söz konusudur. Furfural, karboksilik asit gibi bu maddeler, mikrobiyel gelişmeyi inhibe ettiklerinden etanol fermentasyonu için toksiktirler. Bu ön işlem yöntemi ile elde edilen ksiloz geri kazanım oranlarının yüksek olması (% 88-98) ve ön işlemde asit veya herhangi bir kimyasal maddenin kullanılmaması nedeniyle, hem çevresel hem de ekonomik açıdan cazip bir yöntemdir (Sarkar vd. 2012).

Sıcak su ile ön işlemin amacı, başta hemiselülozu çözündürmek, selülozu daha kolay ulaşılabilir hale getirmek ve fermentasyon inhibitörlerinin oluşumunu engellemektir. Ön işlem sonrasında elde edilen karışım filtre edilerek, selülozca zengin katı kısım ve hemiselüloz türevi şekerlerden oluşan sıvı kısım elde edilebilmektedir. İnhibitör maddelerin oluşumunu engellemek için, ön işlem süresince pH'nın 4-7 aralığında tutulması gerekmektedir. Bunun nedeni, bu pH aralığında hemiselülozik şekerlerin oligomerik formda bulunması ve monomer oluşumunun en az düzeyde olmasıdır. Buna bağlı olarak da, parçalanma ürünlerinin oluşumu azalmaktadır (Alvira vd. 2010).

Sıcak su uygulamasının, mısır koçanı, şeker kamışı küspesi, mısır sapı, buğday samanı, çavdar samanı gibi farklı türdeki lignoselülozik maddelerin ön işlemi için etkin bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Bu yöntem ile hemiselülozun % 80'den fazlasının çözünebildiği ve hemiselülozun uzaklaşmasıyla, selülozun parçalanabilirliğinin arttığı bildirilmiştir (Mood vd. 2013). Ön işlem süresince lignin kısmen depolimerize olmakta ve çözünmektedir. Lignin kaynaklı çözünür maddelerin tekrar kondense olması nedeniyle yalnızca sıcak su ile ligninin tamamen uzaklaşması mümkün olmamaktadır (Alvira vd. 2010).

Sıcak su ile ön işlem yöntemi, herhangi bir katalizör ya da kimyasal gereksiniminin olmaması, düşük sıcaklıklara ihtiyaç duyması, parçalanma ürünlerinin oluşumunu en aza indirmesi, yıkama ya da nötralizasyon aşamasına gereksinimin olmaması, büyük çapta uygulamalar için çözücü maliyetinin düşük olması gibi birçok avantaj sunmaktadır. Ayrıca, biyokütle partiküllerinin ön işlem süresince parçalanması nedeniyle, boyut küçültme işlemine gereksinim duyulmaması, prosesin büyük ölçekli kullanımını cazip hale getirmektedir (Behera vd. 2014).

Sıcak su ile ön işlemde, hemiselülozdan *O*-asetil ve üronik asit gruplarının, asetik asit ve diğer organik asitleri oluşturmak üzere ayrılması, işlemin etkisini hem arttırmakta, hem de zorlaştırmaktadır. Bu asitlerin açığa çıkması, oligosakkaritlerin oluşumunu ve ayrılmasını katalizlemektedir. Ancak, başta hemiselüloz olmak üzere, polisakkaritler monomerik şekerlere hidrolize olabilmektedir. Oluşan monomerik şekerler ise, sonrasında fermantasyon inhibitörleri olan aldehitlere (pentozlardan furfural ve heksozlardan HMF) parçalanabilmektedirler (Mosier vd. 2005b).

Suyun pK_a değeri sıcaklıktan etkilenmektedir. 200 °C'deki saf suyun pH değeri yaklaşık olarak 5.0'dır. Su, alışılmadık dışında yüksek dielektrik katsayısına sahip olduğundan, iyonik maddelerin ayrışmasına neden olmaktadır. Su, hemiselülozu çözme yeteneğindedir. 220 °C ve 2 dakika ön işlem koşullarında, çoğu biyokütledeki ligninin 1/2-2/3'si çözünebilmektedir. Biyokütle hidrolizi süresince, sıcak su hemiasetal bağları parçalamakta ve asitlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yolla, biyokütledeki eter

bağları kopmaktadır. Yumuşak yapılı odunların, nedeni çok iyi açıklanamamakla birlikte, çözülmeye karşı daha dirençli oldukları belirtilmektedir (Mosier vd. 2005b).

Mosier vd. (2005a) tarafından yapılan çalışmada, mısır sapı örneklerine 190 °C’de 15 dakika boyunca sıcak su ile ön işlem uygulanmış ve sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz ile selülozun % 90 oranında dönüştüğü belirlenmiştir.

Pérez vd. (2007), buğday samanının ön işlemi için sıcak su ile muamele yöntemini kullanmışlar ve hemiselüloz türevi şekerlerde maksimum % 53 geri kazanım oranı ve % 96 enzimatik hidroliz verimi elde etmişlerdir.

2.3.1.2 İyonik sıvı ile ön işlem

İyonik sıvıların lignoselülozik biyokütlenin ön işleminde kullanılması, son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Alvira vd. 2010). İyonik sıvılar, karbohidratları ve lignini aynı anda çözme yeteneğindedirler (Mood vd. 2013). Bu sıvılar, lignoselülozik maddelerin tek tek alt bileşenlerinin (selüloz, lignin) yanı sıra, odunsu materyalin tamamını çözme gibi özgün özelliklere sahip olduklarından, lignoselüloziklerin ön işlemi için etkin bir alternatif yöntem olarak gösterilmektedirler (Doherty vd. 2010, Wu vd. 2011).

İyonik sıvılar, erime sıcaklığı 100 °C’nin altında olan organik tuzlar olarak tanımlanmaktadır (Lee vd. 2009, Mood vd. 2013). Bir başka deyişle, iyonik sıvılar oda sıcaklığında ya da oldukça düşük sıcaklıklarda sıvı fazda olan tuzlardır (Alvira vd. 2010). İsimlerinden de anlaşılacağı üzere, organik bir katyon ve inorganik bir anyon çiftinden oluşan iyonik sıvılar, tamamen iyonik özelliktedirler (Holm ve Lassi 2011). İyonik sıvıların öne çıkan en önemli özellikleri, ihmal edilebilir düzeyde buhar basıncına sahip olmaları, yüksek ısıl kararlılık göstermeleri ve geniş bir sıcaklık aralığında sıvı fazında olma eğilimleridir (Alvira vd. 2010, Lopes vd. 2013). Oldukça düşük buhar basıncına sahip olmaları nedeniyle, atmosfere karışma oranları azdır (Lopes vd. 2013). Ayrıca, kullandıklarında toksik veya patlayıcı gaz

oluşturmadıklarından, geleneksel uçucu çözücülere kıyasla, çevreye dost, “yeşil” çözücüler olarak tanımlanmaktadır (Alvira vd. 2010, Holm ve Lassi 2011).

İyonik sıvıların viskozite, erime noktası, polarite, hidrojen bağı alkaliliği (Mora-Pale vd. 2011), hidrofobisite, çözme gücü (Lopes vd. 2013), hidroliz direnci (Holm ve Lassi 2011) gibi çözücü özellikleri, farklı anyon ve katyon gruplarının seçimi ile değişebilmektedirler (Mora-Pale vd. 2011). Sayısız anyon katyon alternatiflerinin olması nedeniyle, istenilen spesifik özelliklere sahip iyonik sıvıların sentezlenebileceği belirtilmektedir. İyonik sıvıların yapısındaki katyon gruplarına bağlı alkil gruplarının uzunlukları ve dallanma şekilleri değiştirilerek, istenilen özelliklerin ayarlanması mümkün olmaktadır (Holm ve Lassi 2011). Esas olarak, katyonun yapısı (alkil gruplarının simetrisi ve uzunluğu, hidrofobik grupların varlığı vb.) ve anyon yükünün delokalizasyon derecesi, iyonik sıvıların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini etkileyen iki temel faktördür (Mood vd. 2013).

İyonik sıvıların fiziksel özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda, erime noktasının iyonlardaki yük dağılımı, hidrojen bağlama kapasitesi, van der Waals kuvvetleri gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Holm ve Lassi 2011). Örneğin, sıvı tuzlar (molten salts) grubunda yer alan, inorganik bir tuz olan NaCl'nin erime noktası 803 °C iken (Holm ve Lassi 2011, Tadesse ve Luque 2011), EMIMAc iyonik sıvısının erime noktası -20 °C'den düşüktür (Sun vd. 2009). İyonik sıvılar da NaCl gibi bir anyon ve bir katyon çiftinden oluşmuştur. Ancak, anyon ve katyonlar NaCl'de atomik iyonlar iken, iyonik sıvılarda asimetrik yapılu moleküler iyonlardır. Bu nedenle, iyonlar kolayca bir araya gelip kristal paketlenmesi yapamazlar, dolayısıyla erime noktaları daha düşüktür (Anonim 2015b). Bir başka deyişle, iyonik sıvılarda erime noktasının düşük olmasının sebebi, küçük inorganik katyonların büyük asimetrik organik katyonlarla yer değiştirmiş olmasıdır. İyonik sıvıların çoğu sudan yoğun olup, yoğunlukları 1-1.6 g/cm³ arasında değişmektedir. Alkil zincirinin uzunluğu arttıkça, yoğunluk azalmaktadır. Yağlara benzer olarak, iyonik sıvılar çoğunlukla viskoz yapıdadırlar. Yüksek viskozite, kütle transferini zorlaştırdığından ve heterojen yapıda sıvı-sıvı sistemlerin karıştırılması için güç gereksinimini arttırdığından istenmeyen bir özelliktir. Ancak, katyon grubundaki

alkil zincirinin uzunluğundaki bir artış, viskozitenin direkt olarak artmasına neden olmayacaktır (Holm ve Lassi 2011).

İyonik sıvıları selülozik biyokütle ön işleminde bu denli popüler kılan nokta, oldukça ılımlı koşullarda selülozu çözme yeteneklerinin olmasıdır (Vancov vd. 2012). İyonik bir sıvının ([N-etilpiridinyum][Cl]) selülozu çözebildiğini gösteren ilk çalışma, 1934 yılında yayınlanmıştır (Graenacher 1934). Günümüzde ise, selülozu çözebilen 20'den fazla iyonik sıvının bulunduğu bilinmektedir. İyonik sıvılar, selülozun yanı sıra, lignin, lignoselüloz gibi diğer biyomateryalleri de çözme yeteneğindedir. Lignoselülozik maddeler iyonik sıvılar ile muamele edildiklerinde, çözülmüş selülozu lignin ve hemiselülozdan ayırmanın yolu, su gibi bir antisolvent ilavesi ile selülozu çöktürmektir (Holm ve Lassi 2011).

İyonik sıvıların selülozu çözme kapasitesi, iyonik sıvının anyon grubu ile selülozun yapısındaki hidroksil grupları arasında oluşan hidrojen bağlarına dayandırılmaktadır. İyonik sıvının anyon grubunun selülozu çözmede önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Şimdiye kadar tanımlanan uygun iyonik sıvıların, hidroksil grupları ile güçlü hidrojen bağı oluşturabilen anyonlar (klorür, karboksilatlar (asetat, format, propiyonat, laktat), dialkil fosfatlar, dialkil ve trialkilfosfonatlar, aminoasit anyonları) içerdikleri belirtilmektedir (Brandt vd. 2013). Kamlet-Taft β parametresi olarak tanımlanan anyon grubunun hidrojen bağı bazikliği, iyonik sıvıların çözme gücünü etkileyen belirleyici unsurdur. Brandt vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, β değeri 0.8'in üzerinde olan iyonik sıvıların çam odunu talaşı üzerine daha fazla şişirme etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte, katyon grubunun da, selülozu çözmede etkili olduğu sanılmaktadır. Katyon grubundaki alkil zincirinin uzunluğunun artması, selülozun çözünürlüğünü azaltmaktadır (Sun vd. 2011, Brandt vd. 2013).

Zhang vd. (2010) tarafından, sellobiyozun EMIMAc iyonik sıvısında çözünmesi üzerine yapılan çalışmada, selülozun çözünmesinin temelinde yatan mekanizmanın sellobiyozun yapısındaki hidroksil grupları ile iyonik sıvının hem anyon hem de katyon

grupları arasında oluşan hidrojen bağları olduğu öne sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre, selüloz iyonik sıvının içerisine ilave edildiğinde, hidrojen bağı alıcısı olarak rol oynayan küçük asetat anyonu, hidroksil gruplarının hidrojen atomları ile; büyük imidazolyum katyon grubu ise, hidroksil gruplarının oksijen atomları ile etkileşime girmektedir. Selülozun yüzeyinde açıklık oluştuktan sonra, anyon ve katyon grupları selüloz hidrosillerine devamlı olarak hücum etmekte, selülozun yapısındaki hidrojen bağlarını bozmakta ve böylece selülozun çözünmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, iyonik sıvının selülozu çözebilmesi için, anyon grubunun iyi bir hidrojen bağı alıcısı olması, katyon grubunun orta düzeyde bir hidrojen bağı vericisi olması ve katyon grubunun büyüklüğünün çok fazla olmaması gerektiği belirtilmiştir.

Biyokütlenin ayrıştırılmasında en çok kullanılan iyonik sıvılar, imidazolyum tuzlarıdır (Agbor vd. 2011). İyonik sıvılar arasında, özellikle 1-allil-3-metil imidazolyum klorür (AMIMCl), EMIMAc, 1-bütül-3-metil imidazolyum klorür (BMIMCl) ve 1-etil-3-metil imidazolyum dietil fosfat (EMIMDEP), selülozu çözme kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı, son yıllarda dikkat çekmektedirler (Mood vd. 2013). Bu tez çalışmasında, iyonik sıvı olarak EMIMAc kullanılmıştır. EMIMAc iyonik sıvısının, yüksek hidrojen bağı alkaliliği ve düşük viskoziteye sahip olması nedeniyle, selülozu çözmede en etkili solventlerden biri olduğu gösterilmiştir (Cheng vd. 2012, Haykir vd. 2013). EMIMAc'in lignoselülozik biyokütleden önemli miktarda lignin uzaklaştırma yeteneğinde olduğu da belirlenmiştir. Dallı darı, akçaağaç tozu, sarıçam, pirinç sapı, kavak, mısır sapı gibi pek çok lignoselülozik hammadde, EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutularak, enzimatik hidroliz ile açığa çıkan fermente olabilir şekerlerin miktarı arttırılmıştır (Haykir vd. 2013).

İyonik sıvı ile ön işlem yöntemi pek çok avantaja sahip olmasına karşın, yüksek maliyetli olduğundan, büyük ölçekli kullanım için henüz uygun değildir (Wu vd. 2011). Endüstriyel anlamda ilgi çeken bu yöntemin ticarileşmesi için çalışmalar devam etmektedir (Holm ve Lassi 2011). Bu nedenle, fermente edilebilir biyokütle verimini optimize etmek için, iyonik sıvının kimyası, nem içeriği, hammadde, partikül boyutu, ön işlem süresi ve sıcaklığı gibi değişkenler üzerine araştırmalar yapılmaktadır (Wu vd. 2011).

Endüstriyel ölçekte iyonik sıvıların odunsu biyokütlenin ön işleminde kullanılabilmesi için, çeşitli parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bunlardan en önemlileri olarak, maliyet, fiziksel özellikler, toksisite, koroziflik, nem toleransı ve biyoparçalanabilirlik sayılabilir. İyonik sıvıların büyük ölçekli uygulamalarında dikkate alınması gereken önemli kriterlerden biri toksisitedir. Örneğin, selüloz için iyi bir çözücü olan BMIMCl, EMIMCl'ye (1-etil-3-metil imidazolyum klorür) kıyasla daha ılımlı düzeyde toksisiteye sahiptir. Klorür içeren iyonik sıvılar yerine EMIMAc'nin kullanımı, biyoparçalanabilir olması ve toksik ve korozif olmaması nedeniyle, daha iyi bir alternatif olarak kabul edilmektedir. İyonik sıvıların korozifliği, ön işlem için kullanılacak ekipmanların materyalinin seçiminde etkili olduğundan, ekonomik açıdan önemli bir parametredir. EMIMAc ve 1,3-dimetil imidazolyum dimetil fosfat gibi halojen içermeyen iyonik sıvılar korozif değildirler ve bu nedenle, selüloz için uygun çözücülerdir. Viskozite de pratik açıdan önemlidir, çünkü iyonik sıvının viskozitesi yüksek olduğunda, daha yüksek çözünme sıcaklığına gereksinim duyulacaktır. Viskoziteyi düşürmek amacıyla, dimetil sülfoksit (DMSO), polietilen glikol (PEG) gibi yardımcı çözücüler kullanılabilir. Odun talaşının nem miktarı ve partikül boyutunun, iyonik sıvıların odunsu biyokütleyi ayrıştırma etkinliğini önemli düzeyde etkilediği belirtilmiştir. Büyük partikül boyutuna sahip ve nem içeriği yüksek olan odunsu biyoküttele, iyonik sıvıların biyokütleyi parçalama gücü azalmaktadır (Mäki-Arvela vd. 2010).

İyonik sıvıların özelliklerinin (viskozite, erime noktası, anyonik ve katyonik özellikleri, hidrojen bağı bazikliği gibi hidrojen bağlama özellikleri) yanı sıra, sıcaklık, süre, biyokütlenin tipi ve partikül boyutu, katı/sıvı oranı, nem içeriği gibi ön işleme özgü koşullar da iyonik sıvılar ile biyokütle arasındaki etkileşimde rol oynamaktadır (Lopes vd. 2013).

Biyokütlenin partikül boyutu, lignoselülozik maddelerin ön işleminde en önemli parametrelerden biridir. Çünkü kimyasalların lignoselülozik maddelere teması ve difüzyonuna doğrudan etki etmektedir (Lopes vd. 2013). Küçük partikül boyutuna sahip biyokütle örneklerinin iyonik sıvıda çözünmeye daha elverişli oldukları belirtilmektedir. Bu durum, küçük partiküllerin yüzey alanının artması ve daha küçük partikül boyutuna

ulaşmak için daha fazla mekanik güç kullanarak yapının parçalanması gibi faktörlerle ilişkilendirilmiştir (Sun vd. 2009).

Literatürde farklı partikül boyutuna sahip biyoküteller ile yapılan çalışmalarda, farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sun vd. (2009), farklı boyuttaki yumuşak yapılı odun (sarıçam) örneklerinin EMIMAc ve BMIMCl iyonik sıvılarındaki çözünürlüklerini belirlemiştir. Partikül boyutunun <0.125 mm'den 0.5-1 mm'ye artması ile sarıçam odunun EMIMAc iyonik sıvısı ile çözünme oranının % 99'dan yalnızca % 93'e düştüğü belirlenmiştir. Bir başka deyişle, odunsu biyokütlenin partikül boyutunun artmasına karşın, EMIMAc iyonik sıvısının odunu çözmedeki etkinliği büyük oranda değişmemiştir. Ancak, BMIMCl iyonik sıvısı ile yapılan denemelerde ise, partikül boyutunun çözünme oranına etkisinin daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Partikül boyutunun <0.125 mm'den 0.25-0.5 mm'ye artması ile çözünme oranı % 53'ten % 26'ya düşmüştür. Sun vd. (2009) tarafından yapılan bu çalışmada, EMIMAc iyonik sıvısının BMIMCl'ye kıyasla daha etkili olduğu, boyut küçültme için gerekli enerji ihtiyacını azalttığı için kullanımının daha ekonomik olduğu sonucuna varılmıştır.

Nguyen vd. (2010), partikül boyutunun pirinç samanının EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işlemine etkisini incelenmişlerdir. Çalışma <2 mm, 2-5 mm ve >10 mm olmak üzere 3 farklı boyuttaki pirinç samanı örnekleri ile yürütülmüş olup, ön işlem sonrasında selüloz geri kazanımı ve glikoz dönüşüm verimleri hesaplanmıştır. En küçük partiküle sahip örneklerde en yüksek glikoz dönüşüm oranı elde edilmesine karşın, selüloz miktarında ciddi bir kayıp olmuştur. 2-5 mm partikül boyutundaki örneklerin glikoz dönüşüm oranlarının, >10 mm partikül boyutundaki örneklerden önemli ölçüde yüksek, <2 mm partikül boyutundakilere ise yakın bir değer olarak belirlenmiştir.

Bahcegul vd. (2012), belirli bir biyokütlenin ön işlemi için en uygun partikül boyutunun, kullanılan iyonik sıvının tipine bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Bahcegul vd. (2012) yaptıkları çalışmada, dört farklı partikül boyutundaki (<0.15 mm, 0.15-0.5 mm, 0.5-1.0 mm ve 1.0-2.0 mm) pamuk saplarının EMIMAc ve EMIMCl iyonik sıvıları ile ön işlemi sonucu elde edilen verimlilikleri karşılaştırmışlardır.

EMIMAc ile ön işlemden sonra, en küçük partiküle sahip (<0.15 mm) pamuk sapı örneklerinde daha büyük partikül boyutlarına kıyasla, glikoz veriminde bir azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuç, EMIMAc ile ön işlemden biyokütlenin partikül boyutunun selülozun geri kazanım oranına etki edebildiğini göstermektedir. Aksine, EMIMCl'nin küçük partikül boyutlarında glikoz üretimi açısından daha verimli çalıştığı belirlenmiştir. İki iyonik sıvı arasındaki bu farklılık, denenen iyonik sıvıların farklı çözündürme hızlarına sahip olmaları ile açıklanmıştır. EMIMAc, küçük partiküle sahip örnekler için daha hızlı bir çözündürme hızı gösterdiğinden, polimerin küçük moleküllü, suda çözünen bileşiklere parçalanması daha fazla gerçekleşmiştir. Bu nedenle, selülozun bir kısmı çözünerek sıvı kısma geçtiğinden, ön işlem sonrası elde edilen katı kısımda daha düşük glikoz verimi elde edilmiştir. Farklı iyonik sıvılar için farklı biyokütle boyutlarının uygun olduğu enzimatik hidroliz sonuçları ile de desteklenmiştir.

Genel olarak, yüksek sıcaklıklarda lignoselülozik biyokütlenin iyonik sıvılarda çözünme hızı artmaktadır. Bu durum, muhtemelen sıcaklığın selülozun üç boyutlu yapısındaki hidrojen bağları üzerine zayıflatıcı etkisinden kaynaklanmaktadır. Düşük sıcaklıklarda, biyokütlenin şişmesi ve çözünebilmesi için daha uzun sürelere ihtiyaç duyulmaktadır (Lopes vd. 2013). Bir polarizasyon mikroskobu (hot stage polarizing microscope) kullanarak, odun talaşının AMIMCl iyonik sıvısında çözünmesi sırasındaki fiziksel değişimler izlenmiştir. Wang vd. (2011) tarafından yapılan bu çalışmada, 50 °C'nin altında odun örneklerinin orijinal hallerini koruyarak aynı lifli yapıya sahip oldukları, şişmenin 70 °C'de başladığı ve çözünmenin 100 °C'de gerçekleştiği belirlenmiştir. Çözünme hızının 120 °C'de arttığı ve bu sıcaklıkta 10 dakika sonra lifli yapı kaybolarak, rengin koyulaştığı gözlemlenmiştir. 120 °C'de 30 dakika sonrasında da daha fazla bir değişim gözlenmemiştir. Reaksiyon süresi 4 saate kadar çıkarılmasına karşın, tümüyle siyah bir görüntü elde edilemediğinden, AmimCl iyonik sıvısının odun örneklerini kısmen çözebildiği sonucuna varılmıştır.

Sıcaklığın artması, iyonik sıvının viskozitesinin azalmasına neden olduğundan, lignoselülozik biyokütlenin şişmesini ve ön işlem sırasındaki karıştırmayı kolaylaştıran önemli bir etmendir. Viskozite, erime noktası gibi iyonik sıvının fizikokimyasal özellikleri sıcaklığa bağlı olup, ön işlem koşullarını etkilemektedirler. Örneğin,

AmimCl düşük viskoziteye sahip olduğundan, düşük sıcaklıklarda kullanılabilir. Ancak, [benzylmim][Cl] gibi aromatik yan zincir içeren iyonik sıvılar, yüksek erime noktası ve viskoziteye sahip olduklarından, ön işlem için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duymaktadırlar. Sıcaklık, ön işlem sonrası biyokütlenin geri kazanımını da etkilemektedir (Lopes vd. 2013). Bazı çalışmalarda, yüksek sıcaklıklarda yüksek geri kazanım verimlerinin elde edildiği gösterilmiştir (Kimon vd. 2011, Yoon vd. 2012). Bu çalışmaların sonuçları, yüksek sıcaklıklarda şekerlerin parçalanmasına bağlı olarak, daha düşük geri kazanım verimlerinin elde edileceğine ilişkin önermeyle çelişmektedir. Bu çelişkili veriler, farklı bileşime ve morfolojiye sahip biyokütle örneklerinin sıcaklık artışına karşı farklı davranış sergilemeleri ile açıklanmaktadır (Lopes vd. 2013).

Wang vd. (2011), çam odunu örneklerine AMIMCl iyonik sıvısı ile 90 °C ve 120 °C'de ön işlem uyguladıkları çalışmada, en yüksek geri kazanım verimini 120 °C'de elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ancak, aynı sıcaklıkta katalpa örneklerinde, biyokütlenin parçalanmasına bağlı olarak, tam tersi bir sonuç elde edilmiştir. Çam örneklerinde ön işlem sıcaklığı 140 °C'ye çıkarıldığında, katalpa örneklerinin 120 °C'deki davranışına benzer şekilde, çözünen biyokütlenin önemli bir kısmı parçalanmıştır.

Biyokütlenin parçalanmasına sebep olacak yüksek sıcaklıklara çıkılmadan, biyokütlenin iyonik sıvılar içinde tamamen çözünmesi gerçekleşmeyebilmektedir. Bu nedenle, ön işlemde kullanılacak sıcaklık biyokütleyle uygun olacak şekilde seçilmelidir (Lopes vd. 2013).

Yüksek sıcaklıklar, iyonik sıvılarda lignin ekstraksiyonunu da kolaylaştırmaktadır. Tan vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, alkilbenzen-sülfonat (EMIMABS) iyonik sıvısı ile ön işlem uygulanan şeker kamışı küspesi örneklerinde, ön işlem sıcaklığının 170 °C'den 190 °C'ye çıkarılması ile daha fazla ligninin uzaklaştığı belirtilmiştir. Benzer sonuçlar, odun talaşı ve tritikale samanı örnekleri için de belirlenmiştir. Ligninin uzaklaştırılması (delignifikasyon) için en uygun sıcaklığın, ligninin camlaşma sıcaklığı (glass transition temperature) olan 165 °C civarı olduğu varsayılmaktadır. Ancak, bu sıcaklık ligninin kimyasal bileşiminden (monolignol bileşimi ve konsantrasyonu)

etkilendiğinden, farklı biyokütle örnekleri arasında değişkenlik göstermektedir. Yüksek ön işlem sıcaklıklarında, ligninin kendiliğinden yoğunlaşma reaksiyonları gerçekleşebilmektedir. Ligninin yoğunlaşması ile beraber molekül ağırlığında bir artış meydana gelmektedir. Bunun sonucunda çökelen lignin, ön işlem uygulanmış biyokütlerde geri kazanılır. Öte yandan, yoğunlaşmadan sonra ligninin çözünürlüğünün inhibisyonu, ön işlem uygulanmış biyokütlerde geri kazanılan lignin oranını arttıran diğer önemli bir noktadır. Buna rağmen, eğer yüksek sıcaklıklar uzun ön işlem süreleri ile desteklenirse, yoğunlaşmış ligninin ayrışarak çözünmesi mümkün olmaktadır. Özetlenecek olursa, yüksek ön işlem sıcaklıkları, ön işlemin etkinliğini arttırmakta, ancak aynı zamanda karbohidratlar ve ligninin daha fazla parçalanmasına ve ligninin özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır. Yüksek sıcaklıkların kullanımı ile enerji ihtiyacının artması da, sürdürülebilir ve ekonomik prosesler için bir dezavantajdır. Bu nedenle, ön işleminde biyokütleye ve kullanılan iyonik sıvıya uygun sıcaklıkların seçilmesi oldukça önemlidir (Lopes vd. 2013).

Ön işlem süresi, uygulanan sıcaklık ile bağlantılı olarak, ön işlemin etkinliğini etkileyen önemli bir faktördür. Verimli sonuçların, yüksek sıcaklık ve kısa süre ya da düşük sıcaklık ve uzun süre koşullarında elde edilebileceği varsayılmaktadır (Lopes vd. 2013). Sun vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, EMIMAc iyonik sıvısı ile 110 °C’de ön işleme tabi tutulan sarıçam ve kızıl meşe örneklerinin, sırasıyla, 46 ve 25 saat sonunda tamamen çözündükleri belirlenmiştir. Ancak, biyokütlenin çözünürlüğünü arttırmak için uygulanan uzun ön işlem sürelerinin, çözünmüş biyopolimerlerin ya da iyonik sıvıların parçalanmasına da sebep olduğu belirtilmektedir (Sun vd. 2009).

Biyokütlenin parçalanmaya karşı gösterdiği direnç, biyokütlenin türü (otsu biyokütle, yumuşak yapılı odun, sert yapılı odun vb.) ve yaş, hasat yöntemi, kurutma düzeyi, depolama koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bunlara ek olarak, selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşimi, ulaşılabilen yüzey alanı, kristallenme derecesi, polimerizasyon derecesi gibi lignoselülozik biyokütlenin kimyasal ve fiziksel özellikleri ön işlemin etkinliğini etkileyen faktörlerdendir. Bu nedenle, iyonik sıvı ile uygulanan ön işleminde, biyokütlenin tipi ve konsantrasyonu mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (Lopes vd. 2013). Genel olarak, yumuşak yapılı odunlar sert yapıllardan daha düşük

yoğunluğa sahip olduklarından, iyonik sıvılarda daha kolay çözünmektedirler (Wang vd. 2011). Wang vd. (2011), AMIMCl iyonik sıvısı ile uygulanan ön işlemin farklı odunsu biyokütle örneklerine (çam, kavak, Çin şemsiye ağacı, katalpa) etkilerini araştırmışlar ve ön işlem uygulanmış biyokütlerdeki selüloz içeriği, biyokütlenin iyonik sıvı ile çözünme ve geri kazanım oranları açısından en yüksek değerlere çam örneklerinde ulaşmışlardır. Benzer şekilde, Li vd. (2010), üç farklı biyokütle örneğinin (çam, Norveç ladini termomekanik pulpu, *Eucalyptus grandis*) AMIMCl ile ön işlem etkinliğini karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmada, ön işlemin etkinliği, enzimatik hidroliz sonrası ham ve ön işlem uygulanmış odun örneklerinin odun verimleri arasındaki fark temel alınarak tanımlanmıştır. Odunsu biyokütlenin yoğunluğunun artması ile birlikte, çam>Norveç ladini termomekanik pulpu>*Eucalyptus grandis* şeklindeki sıra ile ön işlemin etkinliği azalmıştır. Yüksek yoğunluğa sahip odunların daha sıkı bir yapıya sahip olmaları nedeniyle, ön işleme yapının bozulmasının daha zor olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, yüksek yoğunluğa sahip, sert yapılı odunların ön işleme için, yüksek sıcaklık ve uzun süre koşullarının uygulanması gerektiği belirtilmektedir (Li vd. 2010). Sun vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada ise, EMIMAc iyonik sıvısında, kızıl meşe (sert yapılı) örneklerinin, sarıçam (yumuşak yapılı) örneklerine kıyasla nispeten daha iyi çözüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuç, yumuşak yapılı odunlarda lignin içeriğinin daha yüksek olması ile ligninin yapısı ve dağılımının yumuşak ve sert yapılı odunlarda farklı olması şeklinde açıklanmıştır.

Katı/sıvı oranı, yani biyokütlenin konsantrasyonu, iyonik sıvıların çözme kapasitesini, biyokütlenin geri kazanım verimini, biyokütlenin enzimatik parçalanmaya elverişliliğini, glikoz verimini ve ön işlem koşullarını önemli ölçüde etkilemektedir. Sun vd. (2009), % 4-10 (w/w) aralığındaki başlangıç biyokütle oranının 110 °C’de 16 saatte EMIMAc ile gerçekleştirilen ön işleme etkisini araştırmışlar ve en uygun konsantrasyonun % 5 olduğunu saptamışlardır. Başlangıç biyokütle konsantrasyonu arttıkça, eklenen biyokütlenin daha düşük bir kısmı çözünmektedir. Düşük biyokütle konsantrasyonları, moleküllerin çözüldükçe dağılmasını kolaylaştırmakta ve daha yüksek çözünürlük ve geri kazanım oranlarına ulaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Wang vd. (2011), çam odunu örneklerinin başlangıç konsantrasyonları % 1'den % 5'e çıkarıldığında, biyokütlenin AMIMCl iyonik sıvısında çözünme oranının % 35'ten % 26'ya düştüğünü bildirmişlerdir.

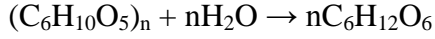
Yüksek katı/sıvı oranı, ön işlem sonunda elde edilen selülozun enzimatik hidrolize elverişliliğini de etkilemektedir. Aynı zamanda, yüksek oranda katı yüklemesi, karıştırmayı zorlaştırmakta, karışımda ısı ve kütle transferini kısıtlamakta ve iyonik sıvının biyokütleyle ulaşmasını engellemektedir. Ancak, Tan ve Lee (2012), yüksek biyokütle konsantrasyonunda (ağırlıkça % 12) ön işlemin etkinliğinin arttığını, ancak aynı zamanda selülozun büyük oranda kayba uğradığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, selülozu enzimatik parçalanmaya elverişli hale getirirken, toplam verimi de koruyabilmek için, selülozun çözünme ve parçalanması arasında bir denge kurulmalıdır. Yüksek oranda katı yüklemesi durumunda ön işlemin etkinliğinin artması, konsantre biyokütlerde partiküllerin daha fazla çarpışması ve böylece, biyokütle ile iyonik sıvı arasındaki temasın artması ile açıklanmıştır. Düşük biyokütle konsantrasyonları, BMIMCl gibi yüksek viskoziteli iyonik sıvılarda çalışılırken, karışma ve kütle transferi problemlerine neden olabilmektedir (Tan ve Lee 2012).

İyonik sıvı ile ön işlem prosesinde, gerek iyonik sıvıdan gerekse biyokütleden kaynaklanan nem miktarına dikkat edilmelidir. İyonik sıvının içerdiği nem miktarı ağırlıkça % 1'in üzerine çıktığında, selülozun çözünürlüğünün azaldığı bildirilmektedir. Nem içeriği yüksek olduğunda, su molekülleri selülozla hidrojen bağı oluşturmak için iyonik sıvıların anyon grubu ile yarışa girmektedir. Bunun sonucunda, lignoselülozik biyokütle yalnızca kısmî olarak çözünebilmektedir. Bu nedenle, iyonik sıvılar ön işlemde önce mutlaka kurutulmalıdır (Lopes vd. 2013).

2.3.2 Enzimatik hidroliz

Ön işlemin ardından biyokütlenin fermente edilebilir şekerlere dönüşümünde gerekli olan ikinci aşama hidrolizdir (Balat vd. 2008). Ligninin uzaklaştırıldığı ve hemiselülozun hidrolizinin gerçekleştiği aşama ön işlem olarak tanımlanırken, esas

hidroliz aşaması olan selülozun hidrolizi “hidroliz” olarak kısaltılmıştır (Hamelinck vd. 2005). Hidroliz, bir su molekülünün ilavesiyle ana molekülün parçalanması anlamına gelmektedir ve aşağıdaki reaksiyon ile ifade edilebilir (Balat vd. 2008).



Selülozun glikoz şekerlerine dönüştüğü hidroliz reaksiyonu, seyreltik asit, konsantre asit veya enzim (selülaz) ile katalizlenmektedir. 2. Dünya Savaşı sırasında Güney Pasifik'te, bir küfün pamuklu kumaşları ve çadırları parçaladığı görülmüştür. Bu küfün, aslında selülozu hidroliz eden selülaz enzimi üreticisi *Trichoderma reesei* olduğu anlaşılmıştır. Bu enzimlerin selülozik etanol üretiminde odun hidrolizi için ilk olarak kullanımı ile birlikte, enzimatik hidroliz aşaması selülozun asitle hidrolizi aşamasının yerini almıştır (Hamelinck vd. 2005). Enzimatik hidroliz, kimyasal hidrolize kıyasla birçok avantaja sahiptir. Alkali veya asit hidroliz işlemlerinin aksine, korozyon problemleri ile karşılaşılmadığından, bakım maliyetleri de daha düşük olmaktadır. Ön işlem uygulanmadan gerçekleştirilen hidroliz verimi < % 20 iken, ön işlem ile verimin % 90'ın üzerine çıkarılabileceği belirtilmiştir. Lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi saf selüloza nazaran oldukça karmaşıktır. Bunun nedeni ise, lignoselülozik biyokütlenin glukoz olmayan lignin ve hemiselüloz gibi bileşenler de içermesidir (Balat vd. 2008).

Hem bakteriler (*Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* ve *Streptomyces* spp.) hem de küfler (*Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* ile *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* ve *Penicillium* spp.) selülozik maddelerin hidrolizi için selülaz enzimi üretebilmektedirler (Canilha vd. 2012). Bu mikroorganizmalar, aerobik ya da anaerobik, mezofilik ya da termofilik olabilirler (Chakraborty ve Gaikwad 2012). Selülaz üreten mikroorganizmalar arasında üzerinde en çok çalışılanlar, *Aspergillus* ve *Trichoderma* cinsine ait küflerdir (Canilha vd. 2012). Selülitik bakterilerden de, *Clostridium thermocellum* ve *Bacteroides cellulosolvens* yüksek spesifik aktiviteye sahip selülazlar üretebilmektedirler (Chakraborty ve Gaikwad 2012).

Lignoselülozik maddelerin hidrolizinde en çok kullanılan selüloz enzimi, *Trichoderma reesei*'den elde edilmektedir. *Trichoderma* spp., en az iki sellobiyohidrolaz, beş endoglukonaz ve üç endoksilanaz üretme yeteneğindedir. Ancak, *Trichoderma reesei* selüloz sistemi β -glukozidaz içermez ve bu durum selülozun glikoza çevriminde büyük verim kaybına neden olmaktadır. Buna karşın, *Aspergillus* oldukça etkin bir β -glukozidaz üreticisidir. Pek çok çalışma, *Trichoderma* selüloz enzimine β -glukozidaz enziminin ilavesi ile gerçekleştirilmiştir (Sarkar vd. 2012). Örneğin, *Trichoderma reesei* ZU-02 selüloz enzimi ve *Aspergillus niger* ZU-07 sellobiyaz enziminin birlikte kullanıldığı bir çalışmada, hidroliz veriminin % 81.2'ye kadar ulaştığı sonucuna varılmıştır (Chen vd. 2008). Bunun yanı sıra, son yıllarda *Aspergillus niger*'den alınan genlerin *Trichoderma reesei*'ye aktarılması ile selüloz aktivitesinin artırılacağı belirtilmektedir (Erkurt 2011).

Selüloz enzim grubu, selüloz lifinin belirli bölgelerine spesifik olarak etki ederek, sinerjetik olarak çalışan enzimlerin kompleks bir karışımıdır (Hamelinck vd. 2005). Hidroliz prosesinde endoglukonazlar (EG, endo-1,4- β -glukanazlar, E.C. 3.2.1.4), ekzoglukanazlar (CBH, sellobiyohidrolazlar, E.C. 3.2.1.91) ve β -glukozidazlar (BGL, E.C. 3.2.1.21) olmak üzere 3 temel selüloz enzim grubu yer almaktadır. Endoglukanazlar, selüloz zincirinin iç kısımlarındaki duyarlı olan β -1,4 bağlarını rastgele biçimde parçalayarak, serbest lif uçları ortaya çıkartır (Balat vd. 2008). Ekzoglukanazlar, selüloz zincirinin indirgen veya indirgen olmayan uçlarını keserek, son ürün olarak glikoz ya da sellobiyoz (sellobiyohidrolaz) açığa çıkarırlar. Ekzoglukanazlar, aynı zamanda mikrokristal yapıdaki selülozu da hidrolize etmektedirler (Erkurt 2011). β -glukozidazlar ise, sellobiyoz inhibisyonunu engellemek için sellobiyozu glikoza hidrolize ederler. Bu enzimler, sellobiyozun glikoza hidrolizini katalizleyerek hidroliz işlemini tamamlamaktadırlar (Balat vd. 2008). Özetle, enzimatik hidroliz süresince, selüloz selüloz enzimleri aracılığıyla, mayalar veya bakteriler tarafından etanole fermente edilebilir indirgen şekerlere parçalanmaktadır (Chakraborty ve Gaikwad 2012).

Selülozun selüloz enzimleri ile enzimatik hidrolizinde gerçekleşen ilk olay, selüloz adsorpsiyonu, yani selülozların selüloz moleküllerine bağlanmasıdır. Bilindiği gibi,

selüloz molekülleri sıvı ortamda çözünür değildir. Ancak, enzimatik reaksiyonlar ile polimerizasyon dereceleri oligomerik forma düştüğünde çözünür hale gelmektedirler (Bahçegül 2013). Selülaz enzim sistemleri çözünmeyen selülozik substrat üzerine etki ettiklerinde, selülaz adsorpsiyonunu takiben, eş zamanlı olarak üç süreç ortaya çıkmaktadır: (1) henüz çözünmemiş, katı haldeki kalıntı selülozda meydana gelen kimyasal ve fiziksel değişiklikler (selülozun polimerizasyon derecesinin düşmesi, enzimlere ulaşılabilir yüzey alanının artması gibi), (2) selüloz moleküllerinin yüzeyinden çözünür ara ürünlerin açığa çıktığı birincil hidroliz aşaması, (3) açığa çıkan çözünür ara ürünlerin düşük molekül ağırlıklı ürünlere ve son olarak glikoza hidrolizini içeren ikincil hidroliz aşamasıdır (Zhang ve Lynd 2004, Balat vd. 2008). İkincil hidroliz, birincil hidrolize göre daha hızlı gerçekleşmektedir. İlk aşamada kalıntı selülozda meydana gelen kimyasal değişikliklerin, polimerizasyon derecesi ve zincir uçlarının konsantrasyonlarındaki değişimler olduğu belirtilmektedir. Polimerizasyon derecesinin düşürülmesi, hem endoglukanazlar hem de ekzoglukanazların aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Ancak, endoglukanazlar, selüloz moleküllerinin iç kısımlarına etki ederken, ekzoglukanazlar sadece zincir uçlarına etli etmektedirler. Bu nedenle, endoglukanazların polimerizasyon derecesini düşürmedeki etkisi, ekzoglukanazlarınkine kıyasla daha belirgindir. Endoglukanazlar, esas olarak katı haldeki selülozda meydana gelen kimyasal değişimlerden sorumlu iken, ekzoglukanazların ise, çözünmede etkili oldukları düşünülmektedir. Polimerizasyon derecesinin düşürülmesine ilişkin olarak belirtilmesi gereken önemli bir nokta da, endoglukanazlar ve ekzoglukanazların aksine, β -glukozidazların yalnızca sıvı fazdaki hidrolizde aktivite gösterebilmeleridir (Zhang ve Lynd 2004, Bahçegül 2013).

Selülozik maddelerin enzimatik hızları, oldukça hızlı bir şekilde düşmektedir. Genel olarak, selülozun enzimatik olarak parçalanması, hızlı bir başlangıç fazı ile bunu takip eden ve substratın tamamı tükeninceye kadar devam eden yavaş bir ikincil faz ile karakterize edilmektedir. Bu süreç, genellikle selülozun kolay ulaşılabilir kısımlarının hızlı bir şekilde hidrolizi, şiddetli ürün inhibisyonu ve absorbe olan enzim moleküllerinin yavaş bir şekilde inaktivasyonu ile açıklanmıştır (Balat vd. 2008).

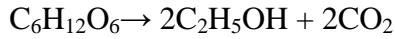
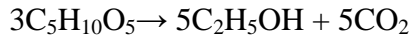
Enzimatik hidrolizde maksimum düzeyde verim elde edilebilmesi için, hidroliz sıcaklığı ve süresi, pH, enzim dozu, substrat konsantrasyonu gibi koşulların optimize edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, son ürün inhibisyonu ve biyokütledeki yapısal engeller de enzimatik hidrolizin verimliliğini etkileyebilmektedir (Canilha vd. 2012). Substratın lignin içeriği, selülozun kristallenme ve polimerizasyon derecesi gibi yapısal özellikleri selülozun hidrolizine olumsuz yönde etki ederken, yüzey alanı lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizini kolaylaştıran bir etmendir. Düşük substrat konsantrasyonu düşük hidroliz hızı ve verimine neden olurken, yüksek enzim dozu da maliyetin artmasına neden olmaktadır. Ancak, inhibisyona neden olabileceğinden, substrat/enzim oranının çok yüksek olmaması gerekmektedir. Hidroliz verimi, bazı yüzey aktif maddelerin ilavesi, farklı mikroorganizmalardan elde edilen selülaz karışımlarının kullanımı ve pektinaz gibi diğer enzimlerin ilavesi ile artırılabilir. Hidrolizin ara ve son ürünleri olan, sellobiyoz ve glikoz, selülaz aktivitesini inhibe edebilmektedir (Hamelinck vd. 2005). Son ürün inhibisyonunu engellemek ve işlem süresini kısaltmak için, hidroliz ve fermantasyonun birlikte gerçekleştirildiği, simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) veya simultane sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon (SSCF) olarak adlandırılan yöntemler kullanılabilir (Canilha vd. 2012).

2.3.3 Fermantasyon

Hidroliz sırasında açığa çıkan glikoz monomerleri mayalar tarafından etanole dönüştürülebilmektedir (Ladisich 2010). Ticari olarak nişasta ve şeker bazlı etanol üretiminde *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmaktadır (Gray vd. 2006). Ancak, lignoselüloz hidrolizatları, glikozun yanı sıra, ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz ve oligosakkaritleri de içermektedir (Balat vd. 2008). *S. cerevisiae* ise, pentoz şekerlerini fermente edememektedir. Biyokütle kaynaklı etanol verimini arttırmak için, genetik mühendislik tekniklerinin kullanılarak, hem heksoz hem de pentoz şekerlerini fermente edebilen mikroorganizmaların geliştirilmesi yaklaşımları mevcuttur (Gray vd. 2006).

Etanol üretim yönteminin ticari olarak kullanılabilir olabilmesi için, fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmaların çok sayıda substratı fermente edebilmesi, etanol veriminin yüksek olması, yüksek etanol konsantrasyonu ve yüksek sıcaklığa dayanıklılık göstermesi, hidrolizatta bulunan inhibitör maddelere toleransının olması ve selüloolitik aktivite göstermesi gerekmektedir (Sarkar vd. 2012).

Aşağıda belirtilen reaksiyonlara bağlı olarak, 1 kg şeker (ksiloz ve glikoz) başına elde edilen maksimum teorik verim, 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg CO₂'dir (Hamelinck vd. 2005, Balat vd. 2008).



Fermantasyonda yer alan bazı mikroorganizmalar, fermente edilebilir şekerleri besin kaynağı olarak kullanabilir ve fermantasyon işleminde etanol ve diğer yan ürünlere dönüştürebilirler. Bu mikroorganizmalar, daha çok glikoz gibi 6 karbonlu şekerleri kullanmaktadırlar. Bu nedenle, yüksek glikoz içeriğine sahip selülozik biyokütlelerin biyoetanole dönüşümü daha kolay olmaktadır. Diğer yandan, etanolojenler olarak adlandırılan mikroorganizmalar, biyokütleden elde edilen şekerlerin yalnızca çok az bir kısmını biyoetanole dönüştürebilmektedirler. Önemli miktarda biyoetanol (>% 1, w/v) üretebilen belirli sayıda mikroorganizma bulunmaktadır (Balat vd. 2008).

Ksilozu fermente eden mikroorganizmalar arasında, bakteri, maya ve küfler bulunmaktadır. Günümüzde, ksilozu fermente eden bakteriler, hem doğal hem de genetik modifiye organizmaları içermektedir. Bu organizmaların çoğu, SSF işlemi için uygun özellikler taşımaktadır. Biyoetanol üreten mayalar arasında en etkin olanlardan biri olan *S. cerevisiae*'nin, heksozlardan yüksek etanol üretimi, yüksek biyoetanol toleransı ve lignoselülozik biyokütlenin asit hidrolizatında bulunan inhibitör maddelere karşı tolerans gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir. Ancak bu maya, daha önce de belirtildiği gibi, ksiloz ve arabinoz gibi pentoz şekerleri fermente

edemediğinden, lignoselülozik hidrolizattan biyoetanol üretimi için uygun değildir (Balat vd. 2008).

Endüstriyel fermantasyon uygulamaları için yakın gelecekte en fazla umut vaat eden etanolojenik bakteriler ise, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis* türleridir. *Z. mobilis* bakteri türlerinin glikoz bazlı hammaddelerden hızlı ve etkin bir şekilde biyoetanol üretme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. *Z. mobilis* ve geleneksel mayaların performansının karşılaştırıldığı fermantasyon denemelerinde, *Z. mobilis* türü ile, geleneksel mayalara kıyasla, % 5 daha yüksek verim ve beş katından daha fazla hacimsel verimliliğe ulaşıldığı gözlemlenmiştir. *Z. mobilis* ile gerçekleştirilen glikoz fermantasyonlarında teorik etanol veriminin % 97'den fazlasına ulaşıldığı ve üretilen biyoetanol konsantrasyonunun % 12 (w/v)'den fazla olduğu bildirilmiştir. *Z. mobilis* etanolojenik bir bakteri olarak pek çok avantaja sahip olmasına karşın, sadece glikoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiğinden lignoselülozik biyokütlenin dönüşümü için çok uygun değildir. Çünkü, 5 karbonlu şekerleri etanole fermente edememektedir. *E. coli* ve *K. oxytoca* türleri ise, arabinozu metabolize etme yeteneğinde olduklarından, tüm lignoselülozik bazlı şekerleri fermente edebilecekleri belirtilmektedir. *E. coli* ve *K. oxytoca*, *Z. mobilis*'e göre daha fazla şeker substratı üzerinde etkin olmaktadır (Balat vd. 2008).

Pentozu fermente edebilen *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* ve *Candida parapsilosis*, sert yapılı odunlar ve tarımsal atıklar için oldukça uygundur. Çünkü, bu lignoselülozik hammaddeler yüksek oranda ksiloz içermektedirler. Yumuşak yapılı odunlar ise, oldukça düşük konsantrasyonlarda pentoz şekeri (% 6-7) içerdiklerinden, çoğunlukla *S. cerevisiae* ile fermente edilmektedirler (Ewanick 2006).

Biyoetanol üretiminin performansı, fermantasyonda kullanılacak mikroorganizmalara ilişkin sıcaklık aralığı, pH aralığı, alkol toleransı, gelişme hızı, verimlilik, ozmotik tolerans, özgüllük, verim, genetik stabilite ve inhibitör toleransı gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Örneğin; bakterilerin çoğu, 6.5-7.5 gibi oldukça dar bir pH aralığında gelişme gösterebilirken, maya ve küfler 3.5-5.0 pH aralığını tolere

edebilmektedirler. Mikroorganizmaların çoğu ise, % 10-15 (w/v)'ten yüksek biyoetanol konsantrasyonlarını tolere edememektedirler (Balat vd. 2008).

Lignoselülozik hidrolizatın fermantasyonu için çoğunlukla kullanılan iki yöntem, SSF ve "ayrı hidroliz ve fermantasyon" (SHF)'dir. SHF proseslerinde enzimatik hidroliz ve fermantasyon basamakları ayrı olarak gerçekleştirilmektedir. Ön işleme tabi tutulmuş lignoselülozik biyokütle, öncelikle selüloz enzimleri aracılığıyla monomerik şekerlere parçalanır. Daha sonra, açığa çıkan fermente edilebilir şekerler ayrı bir üniteye etanole dönüştürülür (Axelsson 2011). Bu yöntemin en önemli avantajı, fermantasyon ve hidroliz proseslerinin ayrı ayrı kendi optimum koşullarında yürütülebilmesidir. Reaksiyon tek bir fermentörde gerçekleştirilmediğinden, her iki prosese göre uygun koşulların ayarlanması mümkün olmaktadır. Enzimatik hidroliz için optimum sıcaklık 45-50 °C iken, fermantasyon için 30 °C civarındadır. SHF'nin diğer bir avantajı, fermantasyonun hücre geri beslemesi ile sürekli sistemde yürütülebilmesidir (Galbe ve Zacchi 2002). Sürekli sistemin tercihen kullanılabilir olmasının nedeni, fermantasyon aşamasından önce lignin kalıntısının uzaklaştırılmış olmasıdır. Lignin ve maya bir arada olduğunda, lignini uzaklaştırmak daha da zorlaşmaktadır. SHF'nin en büyük dezavantajı ise, son ürün inhibisyonu, yani selüloz hidrolizi sırasında açığa çıkan glikoz, sellobiyoz gibi son ürünlerin selüloz enzimini inhibe etmesidir. Glikoz, β -glukozidaz enzimini inhibe etmekte ve bunun sonucunda, sellobiyoz miktarı artmaktadır. Çünkü β -glukozidaz enzimi sellobiyozun glikoza hidrolizini katalizleyen enzimdir. Bunun yanı sıra, sellobiyozun kendisi de selülozlar üzerinde inhibitör etkilidir. SHF yöntemi ile makul bir etanol verimine ulaşabilmek için, düşük biyokütle konsantrasyonları ve yüksek enzim dozları kullanılmalıdır. SHF yönteminin diğer bir dezavantajı da, kontaminasyon riskidir. Hidrolizde reaksiyon süreleri oldukça uzun (1-4 gün) olduğundan, şeker çözeltisine mikrobiyel kontaminasyon riski mevcuttur (Axelsson 2011).

SHF yöntemine alternatif olan diğer bir yöntem, hidroliz ve fermantasyonun tek bir aşamada gerçekleştirildiği SSF'tir (Axelsson 2011). SSF'nin SHF'den daha iyi bir alternatif olduğu ve lignoselülozik etanol üretiminde oldukça başarılı olduğu belirtilmektedir (Sarkar vd. 2012). SSF yönteminin SHF'ye kıyasla en önemli avantajı,

üretilen glikozun etanol üreten mikroorganizmalar (*S. cerevisiae*) tarafından hemen fermente edilmesidir. Bu yolla, β -glukozidaz enziminin son ürün inhibisyonu engellenmektedir. Üretilen etanol de hidrolizi inhibe edici etki gösterebilmektedir, ancak bu etki, sellobiyoz ve glikozunki kadar şiddetli değildir. SSF yönteminin diğer bir avantajı, hidroliz ve fermantasyon proseslerinin birleştirilmesi nedeniyle, tek bir reaktöre ihtiyaç duyulması ve üretim maliyetinin düşmesidir (Galbe ve Zacchi 2002). Yapılan çalışmalarda, SSF yönteminde, SHF'ye nazaran, daha yüksek etanol verimine ulaşıldığı ve daha az enzim ilavesine ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir. Ancak, SSF yöntemine ilişkin bir dezavantaj, hidroliz ve fermantasyon işlemleri için optimum koşulların uyuşmamasıdır. SSF işlemi genellikle, hem selülozlar hem de fermantatif mikroorganizmalar için optimum olmayan, 35 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir (Axelsson 2011). SSF'nin en önemli dezavantajlarından biri de, maya lignin kalıntısı ile karışacağından, mayanın tekrar kullanılması ve geri döngüsünün zor olmasıdır (Galbe ve Zacchi 2002). SSF'nin endüstriyel boyutta SHF'den daha başarılı olduğu kanıtlanmış olmasına karşın, ısıya ve inhibitör maddelere dayanıklı selülozların oluşturulması gibi enzim teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, SHF ile de oldukça yüksek hidroliz verimlerine ulaşılabileceği belirtilmektedir (Axelsson 2011).

SSF ve SHF yöntemlerinin dışında, “konsolide biyoproses” (CBP) ve SSCF diğer alternatif yöntemlerdir. CBP, aynı zamanda “direkt mikrobiyel dönüşüm” (DMC) olarak da bilinmektedir (Sarkar vd. 2012). CBP proseslerinde, etanol ve gerekli tüm enzimler, tek bir mikroorganizma topluluğu tarafından birlikte tek bir reaktörde üretilmektedir (Hamelinck vd. 2005). Bu yöntemde, selülozu direkt olarak etanole dönüştürecek mikroorganizmaların tekli veya çoklu kültürleri kullanılmaktadır (Sarkar vd. 2012). CBP uygulamaları, enzim satın alma veya üretme için yatırım ve işletme maliyeti gerektirmemektedir (Hamelinck vd. 2005, Sarkar vd. 2012). *Clostridium thermocellum*, *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces* sp.'nin lignoselülozu etanole dönüştürme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir. Ancak; düşük etanol verimi ve uzun fermantasyon süresi (3-12 gün) nedeniyle, CBP'nin çok verimli bir işlem olmadığı belirtilmektedir (Sarkar vd. 2012). Henüz hem selüloz ve diğer enzimleri yeterli düzeylerde üretebilecek, hem de yüksek konsantrasyonda ve verimde etanol üretebilecek bir mikroorganizma türü ya da uygun bir karışık kültür bulunmamaktadır

(Hamelinck vd. 2005). Bir diğer alternatif yöntem olan SSCF’de, pentoz ve heksoz fermantasyonu eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Balat vd. 2008). *C. shehatae* ve *S. cerevisiae* kombinasyonunun SSCF prosesi için uygun olduğu belirtilmektedir (Cardona ve Sánchez 2007, das Neves vd. 2007).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada lignoselülozik hammadde olarak, ülkemizde yaygın olarak yetişen çam ağacı odunu seçilmiştir. *Pinus banksiana* ve *Pinus sylvestris* olmak üzere iki farklı türde çam odunu kullanılmıştır. *P. banksiana* türü çam, Purdue Üniversitesi Ormanlık ve Doğal Kaynaklar Bölümü (Forestry and Natural Resources Department) (Dr. Richard Meilan)'tan temin edilmiştir. *P. sylvestris* çamı ise, "T.C. Orman ve Çevre Bakanlığı" aracılığı ile temin edilmiştir. *P. banksiana* çamı ile yapılan denemeler Purdue Üniversitesi, Yenilenebilir Kaynaklar Mühendisliği Laboratuvarı'nda (LORRE, Laboratory of Renewable Resources Engineering), *P. sylvestris* çamı ile yapılan denemeler ise, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

Enzimatik hidroliz denemelerinde kullanılan Cellic CTec 2 selüloz enzimi Novozymes (Danimarka)'den temin edilmiştir. Cellic CTec 2 enziminin selüloz aktivitesi Ghose (1987) tarafından önerilen yöntemle göre, 218 FPU/mL olarak ölçülmüştür (EK 1).

3.2 Yöntem

3.2.1 Odun örneklerinin ön işlem için hazırlanması

P. banksiana türü çam ağacından odunsu biyokütle hazırlanırken, 5 yaşındaki ağacın yaprak ve kabukları ayrılmış ve 45 °C'lik inkübatörde nem oranı % 10'un altına düşüncüye kadar kurutulmuştur. Kaba öğütücüde parçalandıktan sonra, 2 mm partikül boyutunda olacak şekilde değirmende (Wiley mill) öğütülmüştür. Biyokütlenin % nem içeriği, otomatik infrared nem tayin cihazı (Mettler Toledo) ile % 5.32 olarak belirlenmiştir.

P. sylvestris türü odunsu biyokütle hazırlanırken, laboratuvara kabukları ayrılmış şekilde getirilen odun örnekleri, 45 °C'lik inkübatörde nem oranı yaklaşık olarak % 10'un altına düşünceye kadar kurutulmuş ve marangozhanede yaklaşık 5x2x2 cm boyutlarında kesilmiştir. Daha sonra, tekrar 45 °C'lik inkübatörde kurutulduktan sonra, keser yardımıyla parçalanıp, yaklaşık 2.5 mm partikül boyutunda (elek açıklığı: 0.097 inç) olacak şekilde değirmende (APEX Communiting Mill, Model 314) öğütülmüştür. Biyokütlenin % nem içeriği 105 °C'deki etüvde, % 8.45 olarak belirlenmiştir.

3.2.2 Boyut küçültme işlemi

2.5 mm partikül boyutunda olacak şekilde öğütülmüş odun örnekleri, değirmende (Perten Laboratory Mill, Model 3303) ikinci bir öğütme işleminden geçirildikten sonra, 850, 500 ve 363 µm gözenek çapına sahip elekler yardımıyla kademeli olarak elenmiştir. Böylece 850, 500 ve 363 µm'lik elekten geçebilen, 3 farklı partikül boyutuna sahip odun talaşı örnekleri elde edilmiştir.

3.2.3 Bileşim analizleri

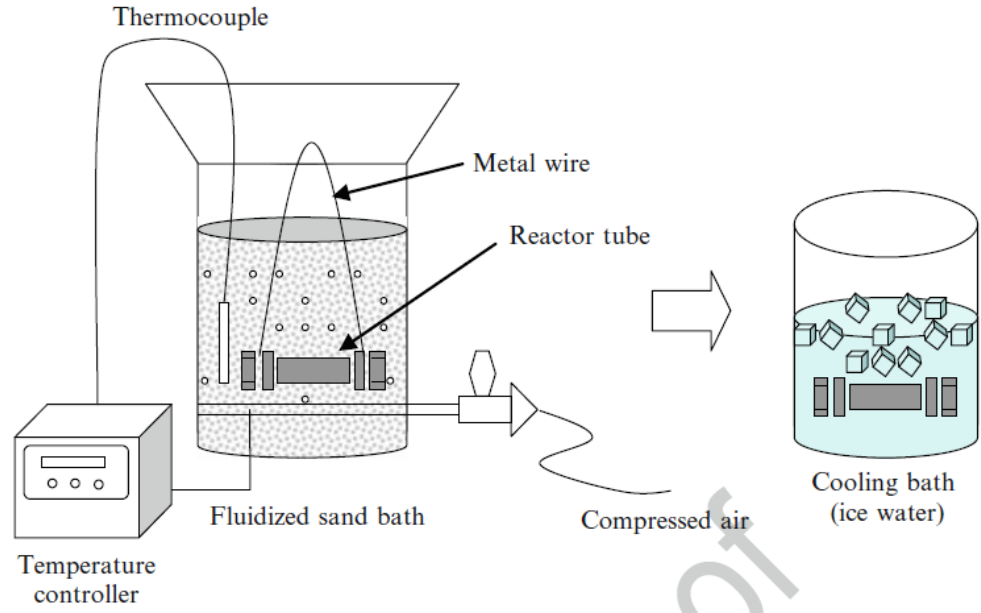
Biyokütlenin bileşimi, NREL (National Renewable Energy Laboratory) LAP standart analitik metotları ile belirlenmiştir (Sluiter vd. 2005, Sluiter vd. 2008). Bu kapsamda; glukoz, ksilan, arabinan, mannan, asitte çözünen lignin, asitte çözünmeyen lignin analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bileşim analizleri 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

3.2.4 Ön işlem

3.2.4.1 Sıcak su ile ön işlem yöntemi

Sıcak su ile ön işlem yöntemi, 2 farklı sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm ön işlem denemeleri 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. *P. banksiana* türü odun örneklerine uygulanan ön işlem, işlem koşulları ve ekipmanı Ladisch vd. (1998), Kohlmann vd.

(1995), Weil vd. (1994) tarafından geliştirilen ve Kim vd. (2009a) tarafından özetlenen sıcak su ile muamele yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ön işlem koşulları çizelge 3.1’de verilmiştir. % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içerecek şekilde bulamaç halinde hazırlanan odun parçacıkları ve su karışımı, ön işlem öncesinde oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmiş ve böylece biyokütlenin ıslanması sağlanmıştır. Her ön işlem tüpü için toplam 40 mL hacimde çalışılmıştır. Odun parçacıkları karışımını içeren reaksiyon tüpleri, ön işlem sıcaklığına ayarlanmış akışkanlaştırılmış kum banyosu (Tecam® SBL-1, Cole–Parmer, Vernon Hills, IL) içerisine yerleştirilmiştir. Ön işlemden sonra, reaktör tüpleri soğuk suya daldırılıp 10 dakika süresince soğutulmuştur.



Şekil 3.1 *P. banksiana* çam odunun ön işlemi için kullanılan sıcak su ile muamele sistemi (Kim vd. 2009a)

Çizelge 3.1 *P. banksiana* çam odununa uygulanan farklı ön işlem koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)*	Şiddet (log R ₀)	% kuru madde (w/w)
190	10	3.65	15
190	20	3.95	15
190	40	4.25	15
200	5	3.64	15
200	10	3.94	15
200	20	4.25	15
210	2.5	3.64	15
210	5	3.94	15
210	10	4.24	15

*+ 5 dakika ön ısıtma

Ön işlemin şiddeti, Overend vd. (1987) tarafından şiddet faktörü olarak tanımlanan ve aşağıda formülü verilen eşitlikle ifade edilmiştir (Larsson vd. 1999).

$$R_0 = t \cdot e^{(T-100)/14.75}$$

t: Ön işlem süresi (dakika)

T: Ön işlem sıcaklığı (°C)

Her bir koşul için 3 reaktör tüpünde ön işlem gerçekleştirilmiş ve ön işlem sonrası elde edilen bulamaç tartılarak, ön işlem sırasında tüplerden sızma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bulamacın pH değeri ölçüldükten sonra, Whatman No. 1 filtre kâğıdından vakum yardımıyla filtre edilmiş ve filtrat hacmi ölçüldükten sonra bileşim analizleri yapılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır. Elde edilen katı kısım ise, yaklaşık 300 mL kaynar su ile yıkanarak filtre edilmiştir. Yıkama sonrası elde edilen yıkama suyunun hacmi de belirlenerek bileşim analizleri için saklanmıştır. Yıkamış katı kısım tartılarak derin dondurucuda bileşim analizleri için saklanmıştır.

P. sylvestris türü çam odununa uygulanan yüksek sıcaklıkta ön işlem ise, Parr reaktör sisteminde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g

toplam madde) içecek şekilde, bulamaç halinde hazırlanan öğütülmüş odun ve su karışımı, ön işlem öncesinde oda sıcaklığında 20 saat boyunca bekletilmiş ve daha sonra Parr reaktörde (Parr 4525 reactor ve Parr 4848 reactor controller, ABD) farklı sıcaklık ve sürelerde, 120 d/d karıştırma hızında ön işleme tabi tutulmuşlardır (Şekil 3.2). Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ön işlem koşulları çizelge 3.2’de verilmiştir. Her ön işlem koşulu için toplam 200 mL hacimde çalışılmıştır. Parr reaktörde çalışılırken ± 3 °C sıcaklık salınımları ihmal edilmiştir.



Şekil 3.2 *P. sylvestris* çam odununun ön işleme için kullanılan Parr reaktör sistemi

Çizelge 3.2 *P. sylvestris* çam odununa uygulanan farklı ön işlem koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	% kuru madde (w/w)
190	10	3.65	15
190	20	3.95	15
190	40	4.25	15
200	5	3.64	15
200	10	3.94	15
200	20	4.25	15
210	2.5	3.64	15
210	5	3.94	15
210	10	4.24	15

Ön işlem sonrası elde edilen bulamaç tartılarak, ön işlem sırasında tüplerden sızma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bulamacın pH değeri ölçüldükten sonra, Whatman No. 1 filtre kâğıdından vakum pompası (Sartorius stedim, Almanya) yardımıyla filtre edilmiş ve filtrat hacmi ölçüldükten sonra, bileşim analizleri yapılmak üzere +4 °C’de saklanmıştır. Elde edilen katı kısım ise, yaklaşık 1000 mL kaynar su ile yıkanarak filtre edilmiştir. Yıkama sonrası elde edilen yıkama suyunun hacmi ve yıkanmış katı kısmın ağırlığı belirlendikten sonra, derin dondurucuda bileşim analizleri için saklanmıştır.

Ön işlem sonrası elde edilen katı kısım, 45 °C’deki etüvde gece boyunca bekletilerek kurutulduktan sonra, bu katı kısmın bileşimi NREL (National Renewable Energy Laboratory) tarafından önerilen LAP standart analitik prosedürler ile belirlenmiştir (Sluiter vd. 2008). Analiz edilen bileşenler; glukan, ksilan, arabinan, mannan, galaktan, asitte çözünen lignin ve asitte çözünmeyen lignindir. Ön işlem sıvısı ve ön işlem yıkama suyunun çözünür mono- ve oligosakkarit dağılımı LAP014 kullanılarak belirlenmiştir (Sluiter vd. 2006).

3.2.4.1.1 *P. sylvestris* çam odununa uygulanan farklı ön işlem denemeleri

200 °C’de 20 ve 30 dakikada gerçekleştirilen ön işlem denemeleri: % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içecek şekilde, bulamaç halinde hazırlanan öğütülmüş odun ve su karışımı, ön işlem öncesinde oda sıcaklığında 20 saat boyunca bekletilmiş ve daha sonra Parr reaktörde (Parr 4525 reactor ve Parr 4848 reactor controller, ABD), 120 d/d karıştırma hızında 200 °C-20 dakika ve 200 °C-30 dakika ön işleme tabi tutulmuşlardır (Çizelge 3.3). Ön işlem sonrasında, yukarıda “Bölüm 3.2.4.1”de Parr reaktör için açıklanan prosedür izlenmiştir.

Çizelge 3.3 Çam (*P. sylvestris*) odununa uygulanan farklı ön işlem koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	% kuru madde (w/w)
200	20	4.25	15
200	30	4.42	15

Farklı katı yükleme oranlarında gerçekleştirilen ön işlem denemeleri: % 5, 10 ve 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içecek şekilde hazırlanan öğütülmüş odun ve su karışımı, ön işlem öncesinde oda sıcaklığında 20 saat boyunca bekletilmiş ve daha sonra Parr reaktörde (Parr 4525 reactor ve Parr 4848 reactor controller, ABD), 120 d/d karıştırma hızında 200 °C’de 30 dakika ön işleme tabi tutulmuşlardır. Ön işlem sonrasında, yukarıda “Bölüm 3.2.4.1”de Parr reaktör için açıklanan prosedür izlenmiştir.

Farklı biyokütle partikül boyutlarında gerçekleştirilen ön işlem denemeleri: 850, 500 ve 363 µm’lik elekten geçebilen, 3 farklı partikül boyutuna sahip odun talaşı örnekleri, % 5 ve 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) oranında, 200 °C’de 30 dakika Parr reaktörde ön işleme tabi tutulmuşlardır. Ön işlem sonrasında, yukarıda “Bölüm 3.2.4.1”de Parr reaktör için açıklanan prosedür izlenmiştir.

3.2.4.2 İyonik sıvı ile ön işlem

Öğütülmüş *P. sylvestris* türü çam odunu örnekleri, % 5 (w/w, g öğütülmüş çam odunu/g iyonik sıvı) biyokütle konsantrasyonunda, 140 °C'de EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulmuşlardır. Farklı süre ve partikül boyutunda gerçekleştirilen ön işlem koşulları, çizelge 3.4'de verilmiştir. İyonik sıvı ile ön işlem, silikon yağ banyosuna yerleştirilmiş 50 mL'lik hacimdeki cam beherlerde, sıcaklık sensörlü bir manyetik karıştırıcı üzerinde, atmosfere açık olarak gerçekleştirilmiştir. 350 d/d karıştırma hızında ve toplam 10 mL hacimde çalışılmıştır. Ön işlem süresi sonunda, çözeltinin oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek soğuması sağlanmıştır. Daha sonra, ön işlem sonrasında elde edilen bu çözeltiliye antisolvent olarak 100 mL saf su ilave edilerek, biyokütlenin çökmesi sağlanmış ve 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ön işleme tabi tutulmuş katı kısmı ayırmak için, çözelti kaba filtre kâğıdı ile süzülmüştür. Elde edilen katı kısım, 5 defa 100 mL saf su ile yıkanarak kalıntı iyonik sıvının uzaklaşması sağlanmıştır. Yıkama aşamasının ardından, örnekler 60 °C'de 16 saat boyunca etüvde kurutulmuştur (Haykir vd. 2013). Kurutma sonrası örnekler tartılarak, ön işlem sonrasında biyokütlenin çözülme oranı % olarak hesaplanmıştır. Biyokütlenin çözülme oranı, ön işleme tabi tutulan biyokütlenin ağırlığından, ön işlem sonrası elde edilen biyokütlenin ağırlığının çıkarılıp, ön işleme tabi tutulan biyokütlenin ağırlığına oranlanmasıyla hesaplanmaktadır. Tüm ön işlem denemeleri 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4 *P. sylvestris* türü çam odununa EMIMAc ile uygulanan farklı ön işlem koşulları

Süre (dakika)	Partikül büyüklüğü
15	
30	<2.5 mm
45	
15	
30	500-850 µm
45	
15	
30	363-500 µm
45	
15	
30	<363 µm
45	

(Sıcaklık: 140 °C ve % kuru madde (w/w): 5)

3.2.5 Enzimatik hidroliz

Ön işlem sonrasında elde edilen katı kısmın % nem içeriği belirlenmiş ve bu katı kısım sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 4.8) içerisinde, % 1 oranında glukoz ya da % 2 oranında toplam kuru madde içerecek şekilde, 50 °C’de 150-200 d/d’de enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. Hidrolizde 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec 2 ya da 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec 2 (Novozymes, Danimarka) enzimi kullanılmıştır. 72-168 saat süren hidroliz denemeleri boyunca, 3. ve 72. saatlerde ya da 6, 24, 48, 72 ve 168. saatlerde örnekler alınmıştır. Alınan örnekler, öncelikle 9838xg karıştırma hızında 10 dakika santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısmı 0.45 µm gözenek çaplı filtreler ile filtre edilmiş ve HPLC analizleri için -20 °C’deki derin dondurucuda saklanmıştır. Enzimatik hidroliz denemeleri, 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Glikoz verimi, ön işlem uygulanmış biyokütle örneklerinden elde edilebilecek maksimum teorik verim esas alınarak hesaplanmıştır.

3.2.5.1 *P. banksiana* çam odununun hidroliz verimini arttırmaya yönelik denemeler

Farklı konsantrasyonlarda Cellic Ctec2 enzimi ile hidroliz: Çam odununa 9 farklı koşulda uygulanan ön işlem sonrasında elde edilen katı kısmın % nem içeriği belirlenmiş ve bu katı kısım sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 4.8) içerisinde % 1 oranında glukoz içerecek şekilde 50 °C'de enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. Hidrolizde 30 FPU/g glukoz Cellic Ctec 2 enzimi kullanılmıştır. Hidroliz işlemi, 72 saat boyunca 200 d/d karıştırma hızındaki çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

20 ve 30 FPU/g glukoz Cellic Ctec 2 ile gerçekleştirilen hidrolizlerde % glukoz verimi oldukça düşük düzeylerde kaldığından, 200 °C 5 dakika ile 210 °C 5 dakika ön işlem uygulanan örnekler, aynı hidroliz koşullarında 150 FPU/g glukoz oranında enzim ile hidroliz edilmiştir.

Spezyme karışımı (20 FPU/g glukoz Spezyme CP + 30 CBU/g glukoz Novozyme 188 + 200 OSX/g glukoz Multifect Pectinase) ile hidroliz: Farklı enzim karışımlarının hidrolize etkisi olup olmadığını belirleyebilmek için, Cellic Ctec 2 enzimi yerine Spezyme karışımı (20 FPU/g glukoz Spezyme CP + 30 CBU/g glukoz Novozyme 188 + 200 OSX/g glukoz Multifect Pectinase) kullanılmıştır. 200 °C 5 dakika ile 210 °C 5 dakika ön işlem sonrasında elde edilen katı kısımlar, sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 4.8) içerisinde % 1 oranında glukoz içerecek şekilde 50 °C'de 200 d/d'de karıştırılarak enzimatik olarak hidroliz edilmiştir.

İki aşamalı ön işlem (200 °C'de 5 dakika + 220 °C'de 20 dakika) sonrası hidroliz: % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içerecek şekilde bulamaç halinde hazırlanan odun parçacıkları ve su karışımı, öncelikle 200 °C'de 5 dakika ön işleme tabi tutulmuş, daha sonra ön işlem sonrası elde edilen bulamaç Whatman No. 1 filtre kâğıdından vakum yardımıyla filtre edilmiştir. Elde edilen katı kısım, yaklaşık 300 mL kaynar su ile yıkanarak tekrar filtre edilmiştir. Yıkanmış katı kısmın % nem içeriği belirlendikten sonra, yine % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde)

içecek şekilde bulamaç hazırlanmıştır. Bu karışım, 2. ön işlem basamağı olan 220 °C’de 20 dakika ön işleme tabi tutulmuştur.

İki aşamalı ön işlem uygulanan bu katı kısım, sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 4.8) içerisinde % 1 oranında glukoz içecek şekilde, 50 °C’de ve 200 d/d’de 72 saat boyunca enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. Hidrolizde 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec 2 enzimi kullanılmıştır.

% 1 maleik asit (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) ile ön işlem sonrası hidroliz: % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içecek şekilde bulamaç halinde hazırlanan odun parçacıkları ve su karışımının içerisinde % 1 (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) oranında maleik asit ilave edilmiş ve elde edilen bu karışım, 200 °C’de 5 dakika ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlem sonrası elde edilen katı kısmın hidrolizi de, 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec 2 enzimi ile gerçekleştirilmiştir.

Endoglucanase C ilavesi ile hidroliz: 200 °C 5 dakika ile 210 °C 5 dakika ön işlem uygulanan örnekler, 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec2 ve Endoglucanase C enzimi ile 50 °C’de pH 4.8’de 72 saat boyunca hidroliz edilmiştir.

% 1 maleik asit ile ön işlem sonrası, Cellic Ctec2 + Endoglucanase C ile hidroliz: % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içecek şekilde bulamaç halinde hazırlanan odun parçacıkları ve su karışımının içerisinde, % 1 (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) oranında maleik asit ilave edilmiş ve elde edilen bu karışım, 200 °C’de 5 dakika ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlem sonrası elde edilen katı kısmın hidrolizi de, 20-40 FPU/g glukoz Cellic Ctec 2 ve Endoglucanase C enzimi ile gerçekleştirilmiştir.

% 1 maleik asit ile ön işlem sonrası, % 0.2 (v/v) PEG4000 yüzey aktif maddesi içeren ortamda hidroliz: % 15 kuru madde (w/w, g kuru madde/g toplam madde) içerecek şekilde bulamaç halinde hazırlanan odun parçacıkları ve su karışımının içerisine, % 1 (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) oranında maleik asit ilave edilmiş ve elde edilen bu karışım, 200 °C’de 5 dakika ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlem sonrası elde edilen katı kısmın hidrolizi, 20 FPU/g glukon Cellic Ctec 2 enzimi ve Endoglucanase C ile gerçekleştirilmiştir. Hidrolizde sodyum sitrat tamponunu içerisine, % 0.2 (v/v) oranında PEG4000 yüzey aktif maddesi ilave edilmiştir.

3.2.5.2 Ön işlem sıvısı içeren ortamda avicel hidrolizi

Bu denemede, substrat olarak mikro kristalli saf selüloz olan Avicel Ph101 kullanılmıştır. Çam (*P. banksiana*) odununun 9 farklı koşulda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmasıyla elde edilen ön işlem sıvısı içeren ortamda, Avicel Ph101’in hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Hidrolizde sodyum sitrat tamponu yerine ön işlem sıvıları kullanılarak, ön işlem sıvısında oluşabilecek inhibitör maddelerin hidrolize etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Substrat olarak çam odunu yerine saf selüloz kullanımı ile de, enzim hidrolizini etkileyen substrat kaynaklı etkenler elemine edilmiştir. Ön işlem sıvısının pH’sı amonyum hidroksit ile 4.8’e ayarlanmıştır. Kontrol olarak, sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 4.8) içeren ortamda avicel hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Hidrolizde 77 FPU/g avicel Cellic Ctec 2 enzimi kullanılmıştır. Hidroliz işlemi, % 1 avicel içeren ortamda, 1.5 mL hacimde, 50 °C’de 800 d/d karıştırma hızındaki çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Fermantasyon

3.2.6.1 Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF)

SSF denemeleri, % 5 (w/w) kuru madde, % 1 (w/v) maya ekstraktı, % 2 (w/v) pepton, 0.05 M sitrat tamponu (pH 4.8) ve Cellic Ctec 2 (Novozymes, Danimarka) selülaz enzimi (10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde) içeren besi ortamında, NREL (National

Renewable Energy Laboratory) LAP standart analitik metotları ile gerçekleştirilmiştir (Dowe ve McMillan 2008). Bu amaçla hazırlanan 10 kat konsantre YP Broth, 1.0 M sitrat tamponu (pH 4.8) ve ön işleme tabi tutulmuş biyokütle, ayrı ayrı 121 °C'de 30 dakika otoklavda sterilize edilmişlerdir. Kontrol olarak, biyokütle yerine α -selüloz kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiştir. YPG Broth (pH 4.5) besiyerinde 28 °C'de aktifleştirilen 24 saatlik maya kültürleri (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 20618), Thoma lamı ile sayılarak, fermantasyon besiyerine yaklaşık 10^6 hücre/mL düzeyinde aşılantmışlardır. SSF işlemleri, 35 °C'de 168 saat boyunca 150 d/d karıştırma hızındaki çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. SSF işlemleri süresince 6, 24, 48, 72 ve 168. saatlerde örnek alınmıştır. Alınan örnekler öncelikle 9838xg karıştırma hızında 10 dakika sanrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı 0.45 μ m gözenek çaplı filtreler ile filtre edilmiş ve HPLC analizleri için -20 °C'deki derin dondurucuda saklanmıştır. Denemeler 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.2 Enzimatik hidrolizatın fermantasyonu

Ön işlem uygulanmış çam odununun, % 5 (w/w) kuru madde miktarında, 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec 2 enzimi ile 72 saatlik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatlar, etil alkol üretimi için kullanılmıştır. Hidrolizatlara % 1 (w/v) maya ekstraktı ve % 2 (w/v) pepton ilave edilerek hazırlanan fermantasyon besiyerleri, yaklaşık 10^6 hücre/mL düzeyinde *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 20618 maya kültürü ile aşılantmışlardır. Fermantasyon işlemleri, 35 °C'de 168 saat boyunca 150 d/d karıştırma hızındaki çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süresince 0, 6, 24, 48, 72 ve 168. saatlerde örnek alınmıştır. Alınan örnekler öncelikle 9838xg karıştırma hızında 10 dakika sanrifüjlendikten sonra, süpernatant kısmı 0.45 μ m gözenek çaplı filtreler ile filtre edilmiş ve HPLC analizleri için -20 °C'deki derin dondurucuda saklanmıştır. Denemeler 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 HPLC analizleri

P. banksiana türü çam odunu örneklerinde, biyokütlenin bileşimi ve ön işlemler ile hidroliz işlemleri sonrası elde edilen katı ve sıvı kısımlardaki şeker analizleri, Waters™ HPLC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. HPLC sistemi, bir Milton Roy mini pompa (Milton Roy Co., Ivyland, PA), Waters™ 717 plus oto örnekleme ve Waters™ 2414 refraktif indeks dedektörden (Waters Corp., Milford, MA) oluşmaktadır. Glikoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve galaktoz, 80 °C'de Bio-Rad Aminex HPX-87P kolon kullanılarak ayrılmıştır. Mobil faz olarak, 0.6 mL/dk akış hızında su kullanılmıştır. Asetik asit analizi için, Bio-Rad Aminex HPX-87H kolon kullanılmış ve kolon sıcaklığı 60 °C olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak, 5 mM H₂SO₄ kullanılmış ve akış hızı 0.6 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. HPX-87P kolonda analiz edilecek örnekler, CaCO₃ ile pH 5-6'ya nötralize edilmiş ve 1 gece boyunca +4 °C'de bekletildikten sonra, filtre edilip HPLC'ye enjekte edilmiştir. Tüm örnekler HPLC analizleri öncesinde 0.2 µm'lik filtreler kullanılarak filtre edilmiştir.

P. sylvestris türü çam odunu örneklerinde ise, ön işlem öncesi ve sonrasında biyokütlenin bileşimi ve enzimatik hidroliz ile açığa çıkan şekerlerin analizi için, Shimadzu HPLC sistemi kullanılmıştır. HPLC sistemi, pompa (LC-20AD), oto örnekleme (SIL-20A HT), gaz giderici (DGU-20A₃), kolon fırını (CTO-10AS VP) ve refraktif indeks dedektörden (RID-10A) oluşmaktadır. Glikoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve galaktoz, 80 °C'de Transgenomic CarboSep COREGEL-87P kolon kullanılarak ayrılmıştır. Mobil faz olarak, 0.5 mL/dakika akış hızında su kullanılmıştır. Analiz edilecek örnekler, öncelikle CaCO₃ ile pH 5-6'ya nötralize edilmiş ve 1 gece boyunca +4 °C'de bekletildikten sonra 0.45 µm'lik filtreler kullanılarak filtre edilip HPLC'ye enjekte edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için, (4 g/L glikoz + 2 g/L ksiloz + 2 g/L galaktoz + 2 g/L arabinoz + 4 g/L mannoz), (2 g/L glikoz + 1 g/L ksiloz + 1 g/L galaktoz + 1 g/L arabinoz + 2 g/L mannoz), (1 g/L glikoz + 0.5 g/L ksiloz + 0.5 g/L galaktoz + 0.5 g/L arabinoz + 1 g/L mannoz), (0.5 g/L glikoz + 0.25 g/L ksiloz + 0.25 g/L galaktoz + 0.25 g/L arabinoz + 0.5 g/L mannoz), (0.25 g/L glikoz + 0.125 g/L ksiloz + 0.125 g/L galaktoz + 0.125 g/L arabinoz + 0.25 g/L mannoz) şeklinde olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda şeker karışımları kullanılmıştır.

Fermentasyon süresince glikoz ve etil alkol konsantrasyonunun belirlenmesi için, Transgenomic ICSeP COREGEL-87H3 kolon kullanılmış ve kolon sıcaklığı 55 °C olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak, 5 mM H₂SO₄ kullanılmış ve akış hızı 0.6 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (Haykir ve Bakir 2013). Kalibrasyon eğrisi için, (4 g/100 mL glikoz + 4 g/100 mL etil alkol), (2 g/100 mL glikoz + 2 g/100 mL etil alkol), (1 g/100 mL glikoz + 1 g/100 mL etil alkol), (0.5 g/100 mL glikoz + 0.5 g/100 mL etil alkol) şeklinde olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda glikoz, etil alkol karışımları kullanılmıştır.

3.2.8 İstatistik analizler

Ön işlem öncesi farklı partikül büyüklüğüne sahip biyokütle örneklerinin, farklı sürelerde EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulmasının, biyokütlenin glikoza dönüşüm oranına etkisi, varyans analiz yöntemi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistik analizleri için, “Minitab statistical software, version 14 (Minitab Inc., State College, PA, USA)” ve “MSTAT” paket programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *P. banksiana* Çam Odunu ile Gerçekleştirilen Sıcak Su ile Ön İşlem Denemeleri

4.1.1 Bileşim analizleri

Çam (*P. banksiana*) odununun ön işlem öncesi ve farklı koşullarda uygulanan sıcak su ile ön işlem sonrasındaki bileşimi, çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Ham odunun bileşimine bakıldığında, karbohidratların toplam bileşimin yaklaşık % 65’ini oluşturduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1 Ham çam (*P. banksiana*) odununun bileşimi

Bileşen	% Kuru Madde Cinsinden*
Glukan	41.7±1.95
Ksilan	8.3±0.32
Galaktan	3.6±0.23
Arabinan	2.0±0.09
Mannan	10.9±0.48
Asetil	-
Asitte Çözünmeyen Lignin	30.5±0.13
Asitte Çözünen Lignin	4.6±0.02
Kül	0.5±0.03
Toplam Kütle	102.1

*Değerler, aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Yumuşak odunlu ağaçlar, yüksek ksiloz içeriğine sahip sert odunlu ağaçların aksine, yüksek oranda mannoz ve glikoz ünitelerinden oluşmaktadır. Ayrıca, sert odunlu ağaçların hemiselülozu yumuşak odunlu ağaçlarınkine kıyasla daha yüksek oranda asetillenmiştir. Yumuşak odunlu ağaçların lignin içeriği de yüksektir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000). Genel olarak, bu çalışmada kullanılan çam odununun bileşim oranlarının, literatürde rapor edilen aralıklarda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.5).

Özellikle, Sannigrahi vd. (2010) tarafından, *P. taeda* türüne ait çam odunu için rapor edilen bileşim değerlerine benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir.

Sıcak su ile ön işlem uygulanmış çamın bileşimi incelendiğinde, hemiselüloz şekerleri olan galaktan ve arabinanın ön işlem sonunda tamamen çözülerek ön işlem sıvısına geçtiği; ksilan ve mannanın ise, kısmen çözüldüğü belirlenmiştir. Benzer şekilde, Kumar vd. (2010) yaptıkları çalışmada, Lodgepole çamı örneklerine 200 °C'de, 5 dakika süresince, % 4 SO₂ içeren ortamda (log Ro = 3.64) buhar patlatma ön işlemi uygulamışlar ve ön işlem sonunda hemiselüloz şekerlerinden galaktan ve arabinanın tamamen uzaklaştığını, ancak ksilan ve mannanın ise katı kısımda kaldığını belirlemişlerdir.

Hemiselülozun ön işlemle uzaklaşması ve suda çözünen fraksiyona geçmesinin, selülozca zengin, suda çözünmeyen fraksiyonun enzimatik hidrolizini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Kumar vd. 2010). Ön işlem koşullarına bağlı olarak, hemiselüloz şekerleri ya polimerik formda katı fraksiyonda kalmakta ya da ön işlemin şiddeti yüksekse, sıvı fraksiyonda monomerler olarak geri kazanılmaktadırlar. Belirli koşullarda da, şekerlerin bir kısmı parçalanarak, hem şeker hem de etanol veriminin düşmesine neden olmaktadır. Ön işlem sonrasında substratta kalan hemiselülozun, selüloz enzimlerinin selülozik substrata ulaşmasını engellediği gösterilmiştir. Bu nedenle, ön işlemin şiddeti hemiselülozun parçalanmadan çözünmesine olanak verecek şekilde ayarlanması önerilmektedir. Böylece, elde edilen şekerlerin fermente edilebilir formda kalması sağlanabilmektedir (Bura vd. 2009).

Lignoselülozik maddelerin çözünmeyen fraksiyonunu oluşturan selülozun ise, hemiselülozun çözülmesine bağlı olarak katı kısımdaki oranının arttığı belirlenmiştir. Ligninin de aynı şekilde ön işlem sonrasında yüzdesel olarak oranının arttığı belirlenmiştir. Ön işlemin şiddeti arttıkça, glukan ve lignin oranı artarken; ksilan ve mannanın oranı azalmıştır.

Çizelge 4.2 Sıcak su ile ön işlem uygulanmış çam (*P. banksiana*) odununun bileşimi

Sıcaklık (°C)	Süre* (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Yıkanmış Katı Kısımın Bileşimi					Toplam (%)
			Glukan (%)	Ksilan (%)	Mannan (%)	Asitte Çözünmeyen Lignin (%)	Asitte Çözünen Lignin (%)	
190	10	3.65	46.2	3.9	5.5	41.0	3.3	99.9
190	20	3.95	47.8	3.6	4.7	42.4	3.2	101.7
190	40	4.25	48.6	2.9	2.4	46.0	3.2	103.1
200	5	3.64	46.7	3.8	5.1	41.6	3.2	100.4
200	10	3.94	48.2	2.9	3.7	44.4	3.1	102.3
200	20	4.25	49.8	2.4	1.8	48.4	3.3	105.7
210	2.5	3.64	47.1	3.1	4.8	42.3	3.1	100.4
210	5	3.94	47.8	2.6	3.5	43.7	3.1	100.7
210	10	4.24	50.2	2.3	0.8	45.7	3.1	102.1

*+ 5 dakika ön ısıtma

Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda elde edilen toplam çözülme oranları, çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, % 22-29 olarak hesaplanmıştır. Genel olarak, ön işlemin şiddeti arttıkça biyokütlenin çözülme oranının arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.3 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonundaki çözülme oranları

Sıcaklık (°C)	Süre* (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Toplam çözülme oranı (%)
190	10	3.65	22
190	20	3.95	25
190	40	4.25	28
200	5	3.64	24
200	10	3.94	29
200	20	4.25	29
210	2.5	3.64	25
210	5	3.94	27
210	10	4.24	29

*+ 5 dakika ön ısıtma

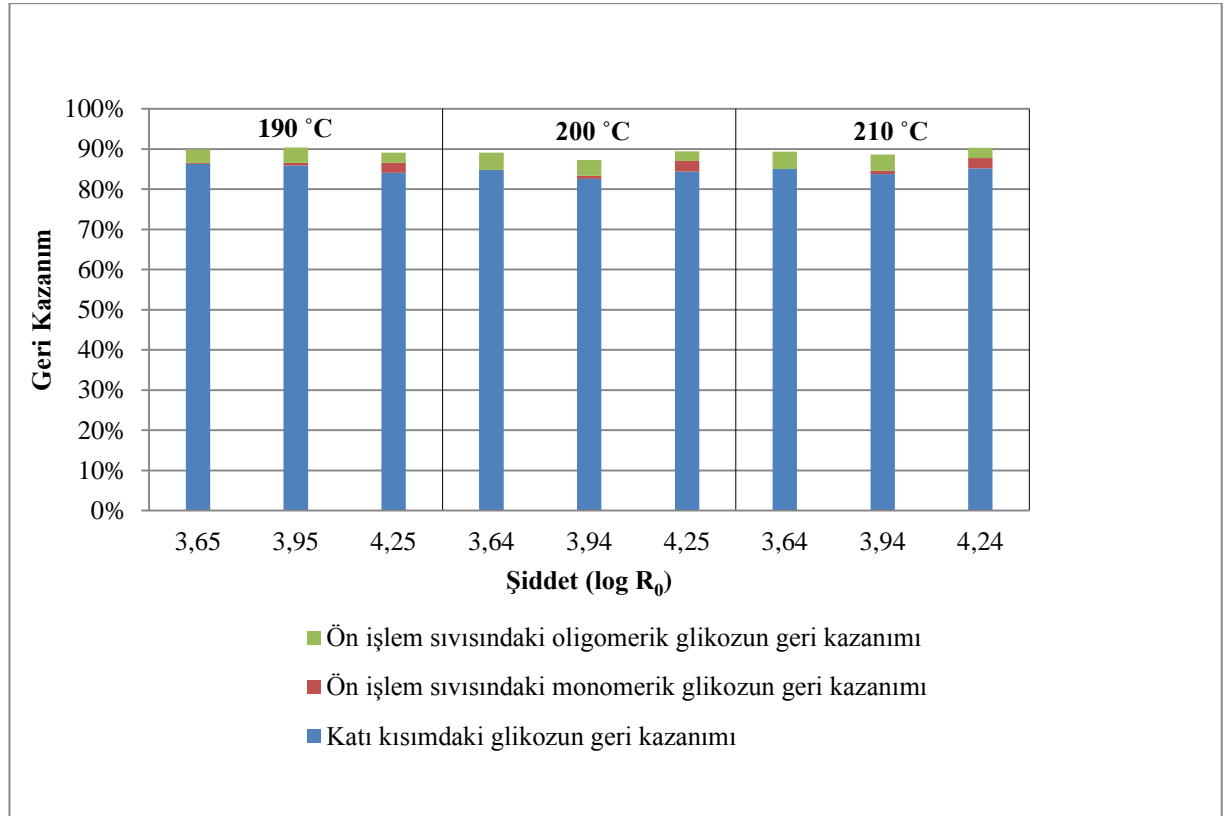
4.1.2 Ön işlem koşullarının optimizasyonu

Bu çalışmada, çam odunu farklı ön işlem koşullarında sıcak su ile muamele yöntemi ile ön işleme tabi tutularak, şeker parçalanmasının sınırlı olduğu, yani şekerlerin geri kazanımının yüksek olduğu, aynı zamanda çözünmeyen kısımdaki selülozun enzimatik parçalanmaya uygun hale geldiği en uygun ön işlem koşulunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, çam (*P. banksiana*) odunu için en uygun ön işlem koşulunu belirleyebilmek için, 9 farklı sıcaklık ve sürede (190 °C’de 10, 20 ve 40 dakika; 200 °C’de 5, 10 ve 20 dakika; 210 °C’de 2.5, 5 ve 10 dakika) ön işlem uygulanmıştır. Ön işlem uygulanmamış çam, ön işleme tabi tutulmuş, yıkanmış katı kısım ve ön işlem sıvısının şeker bileşimleri kullanılarak kütle denkliği hesaplamaları yapılmıştır. Farklı ön işlem koşulları uygulanan çam odunlarının bileşimleri (glukan, ksilan, mannan, galaktan, arabinan, asitte çözünen lignin, asitte çözünmeyen lignin), ön işlem sıvısının bileşimi (gluko-oligomerler, ksilo-oligomerler, manno-oligomerler, galakto-oligomerler, arabino-oligomerler, glikoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz, şeker parçalanma ürünleri) belirlenerek şekerlerin geri kazanım oranları hesaplanmıştır. Daha sonra, ön işlem sonrasında elde edilen katı kısımlar enzimatik olarak hidroliz

edilmiştir. Geri kazanım hesaplamalarına göre, hemiselüloz geri kazanım oranı yüksek olan ve enzimatik hidroliz sonucundaki % glikoz verimi en yüksek olan ön işlem koşullarının seçilmesi hedeflenmiştir. Özetle, toplam hemiselüloz verimi ve enzim hidrolizi sonucunda elde edilen glikoz verimleri esas alınarak, çam için en uygun ön işlem koşulu belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1.2.1 Glikoz geri kazanımı

Şekil 4.1 ve çizelge 4.4’de, 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımdaki ve sıvı kısımdaki monomerik ve oligomerik glikozun geri kazanım oranları verilmiştir. Tüm ön işlem koşulları için glikoz geri kazanımının oldukça yüksek olup % 90 düzeylerinde olduğu ve glikozun büyük oranda katı kısımda kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda glikozun geri kazanımı

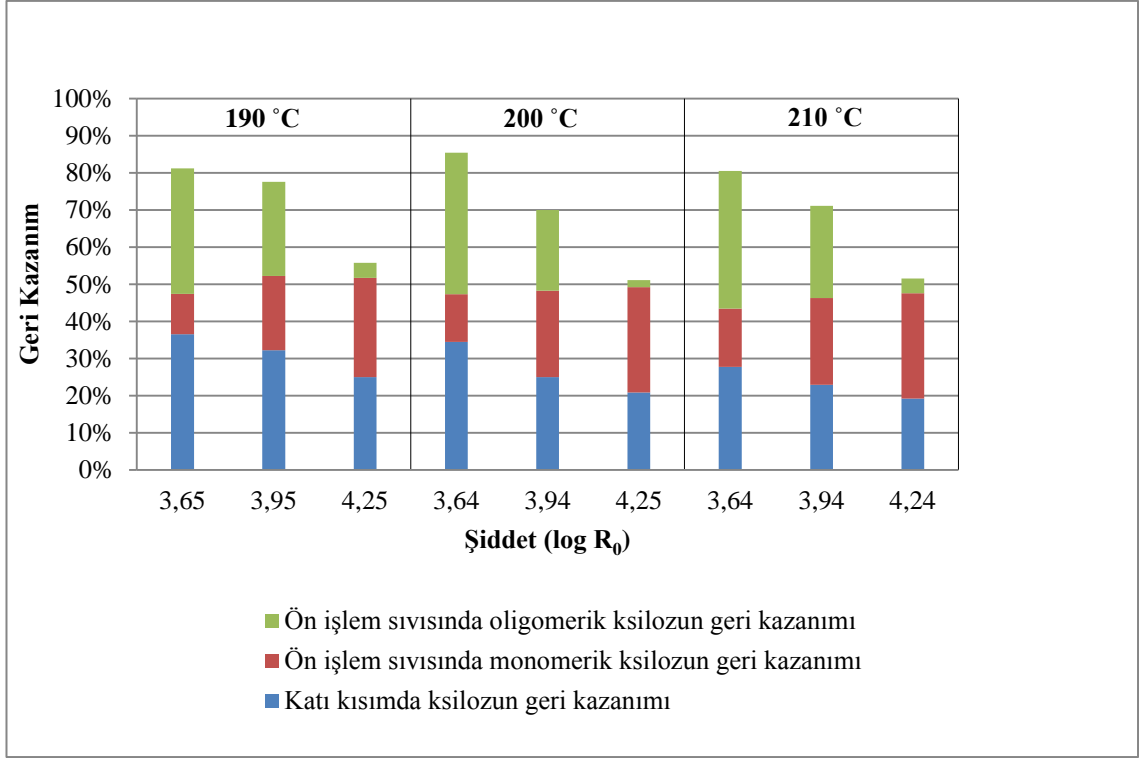
Çizelge 4.4 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda glikozun geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre* (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Glikozun Geri Kazanımı (%)	Sıvı Kısımda Glikozun Geri Kazanımı (%)	Toplam Glikoz Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	86.3	3.6	89.9
190	20	3.95	85.9	4.4	90.3
190	40	4.25	84.1	5.0	89.1
200	5	3.64	84.8	4.3	89.1
200	10	3.94	82.6	4.7	87.3
200	20	4.25	84.4	5.0	89.4
210	2.5	3.64	85.0	4.3	89.3
210	5	3.94	83.8	4.8	88.6
210	10	4.24	85.2	5.1	90.3

*+ 5 dakika ön ısıtma

4.1.2.2 Ksiloz geri kazanımı

Şekil 4.2 ve çizelge 4.5’de, 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımdaki ve sıvı kısımdaki monomerik ve oligomerik ksilozun geri kazanım oranları verilmiştir. Bir hemiselüloz şekeri olan ksilozun geri kazanım oranlarına bakıldığında, % 51.1-85.5 aralığında değiştiği ve ön işlemin şiddeti arttıkça geri kazanım oranlarının azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.2 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda ksilozun geri kazanımı

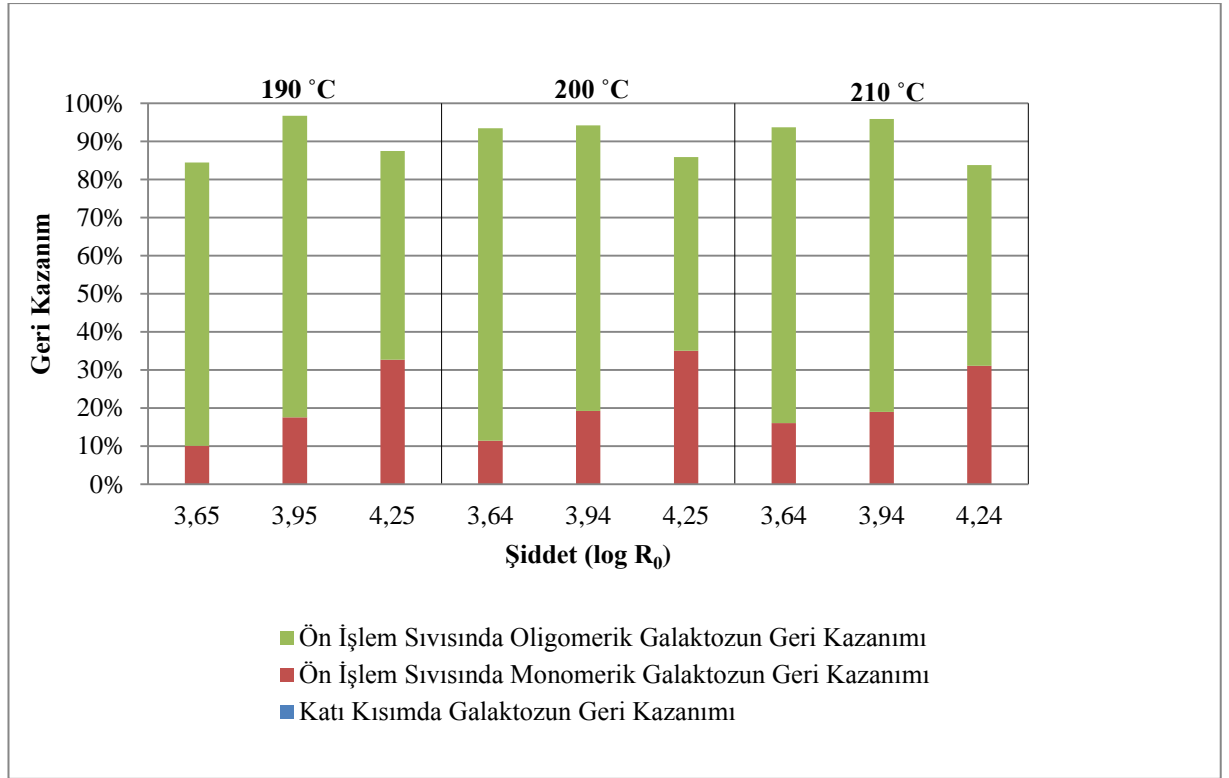
Çizelge 4.5 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda ksilozun geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre* (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Ksilozun Geri Kazanımı (%)	Sıvı Kısımda Ksilozun Geri Kazanımı (%)	Toplam Ksiloz Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	36.5	44.7	81.2
190	20	3.95	32.3	45.4	77.7
190	40	4.25	25.0	30.7	55.7
200	5	3.64	34.5	51.0	85.5
200	10	3.94	25.0	45.1	70.1
200	20	4.25	20.8	30.3	51.1
210	2.5	3.64	27.7	52.8	80.5
210	5	3.94	22.9	48.2	71.1
210	10	4.24	19.2	32.4	51.6

* + 5 dakika ön ısıtma

4.1.2.3 Galaktoz geri kazanımı

Şekil 4.3 ve çizelge 4.6'da, 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımdaki ve sıvı kısımdaki monomerik ve oligomerik galaktozun geri kazanım oranları verilmiştir. Galaktozun toplam geri kazanım yüzdelerinin oldukça yüksek olduğu ve ön işlem ile tamamının sıvı kısma geçtiği belirlenmiştir.



Şekil 4.3 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda galaktozun geri kazanımı

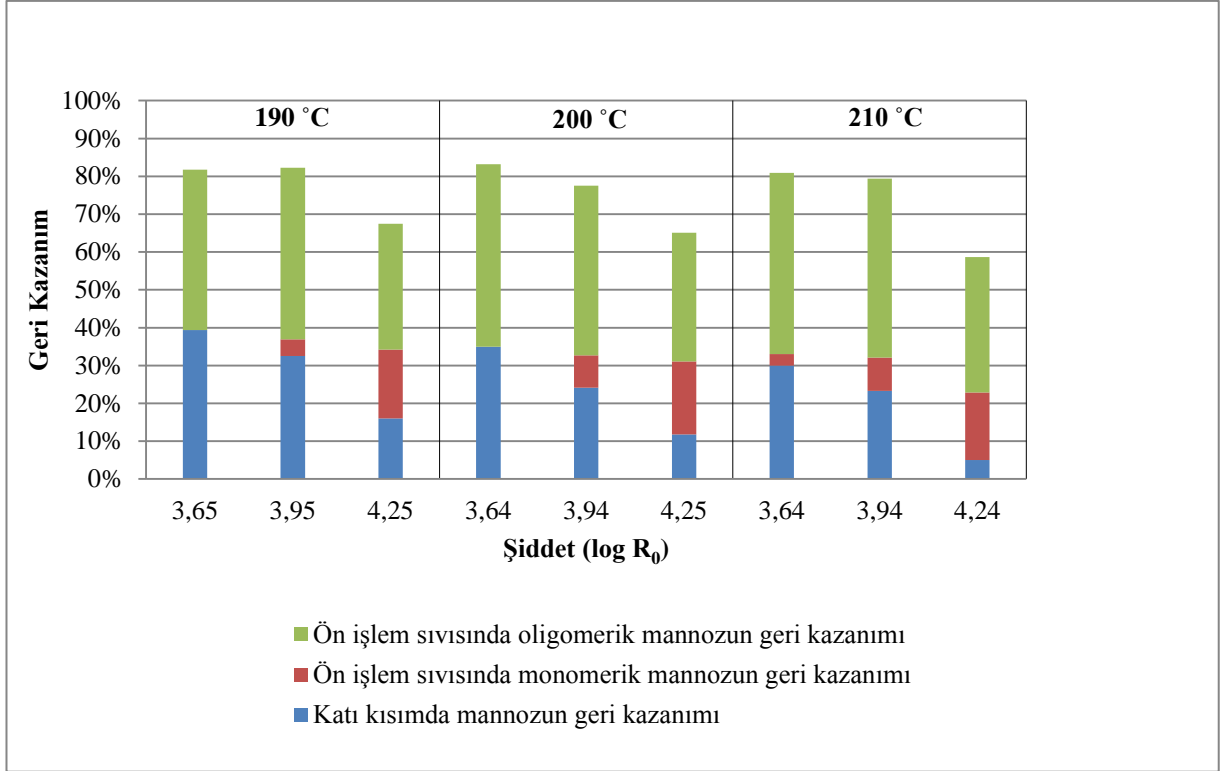
Çizelge 4.6 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda galaktozun geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre* (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Galaktozun Geri Kazanımı (%)	Sıvı Kısımda Galaktozun Geri Kazanımı (%)	Toplam Galaktoz Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	0.0	84.5	84.5
190	20	3.95	0.0	96.7	96.7
190	40	4.25	0.0	87.5	87.5
200	5	3.64	0.0	93.4	93.4
200	10	3.94	0.0	94.2	94.2
200	20	4.25	0.0	85.9	85.9
210	2.5	3.64	0.0	93.7	93.7
210	5	3.94	0.0	95.9	95.9
210	10	4.24	0.0	83.8	83.8

*+ 5 dakika ön ısıtma

4.1.2.4 Mannoz geri kazanımı

Şekil 4.4 ve çizelge 4.7’de, 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımdaki ve sıvı kısımdaki monomerik ve oligomerik mannozun geri kazanım oranları verilmiştir. Mannozun geri kazanım oranları % 58.6-83.2 aralığında değişmektedir.



Şekil 4.4 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda mannozun geri kazanımı

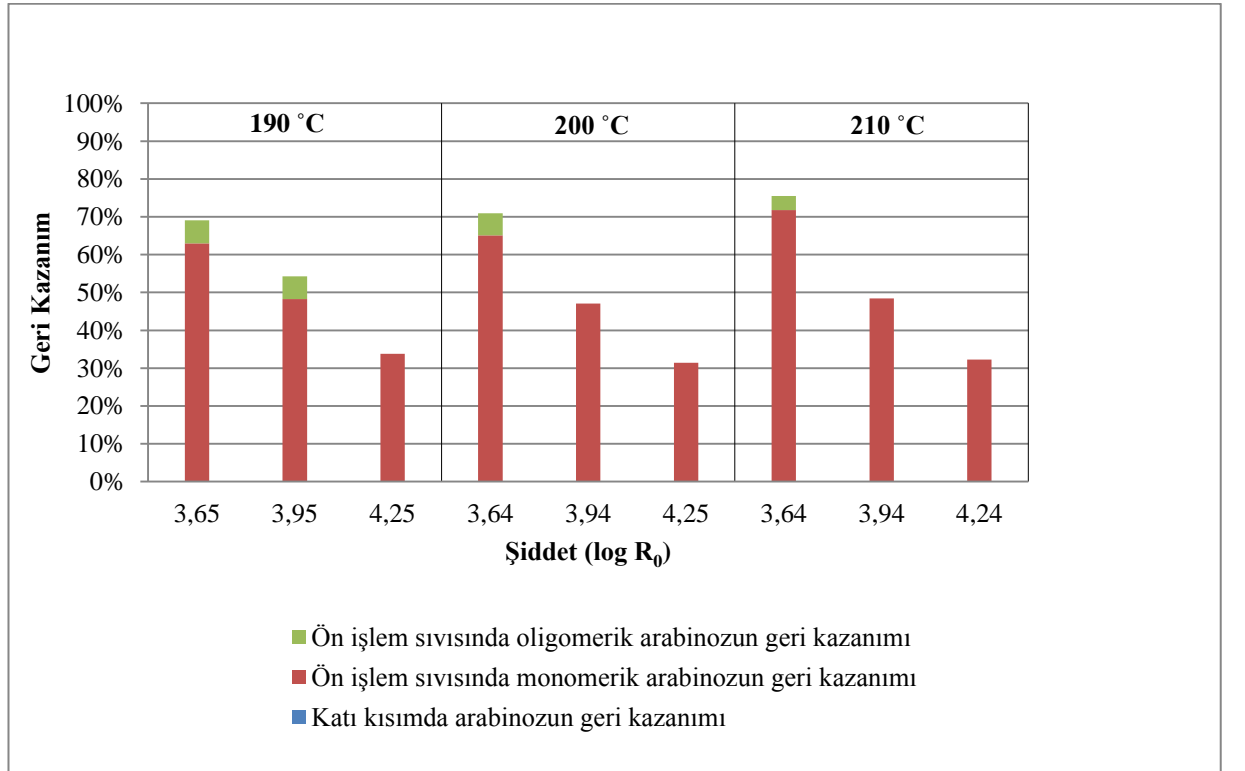
Çizelge 4.7 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda mannozun geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre* (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Mannozun Geri Kazanımı (%)	Sıvı Kısımda Mannozun Geri Kazanımı (%)	Toplam Mannoz Geri Kazanımı (%)
190	10	3,65	39.4	42.4	81.8
190	20	3,95	32.5	49.8	82.3
190	40	4,25	16.0	51.4	67.4
200	5	3,64	35.0	48.2	83.2
200	10	3,94	24.1	53.4	77.5
200	20	4,25	11.8	53.3	65.1
210	2.5	3,64	29.9	51.0	80.9
210	5	3,94	23.3	56.1	79.4
210	10	4,24	5.0	53.6	58.6

*+ 5 dakika ön ısıtma

4.1.2.5 Arabinoz geri kazanımı

Şekil 4.5 ve çizelge 4.8’de, 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımdaki ve sıvı kısımdaki monomerik ve oligomerik arabiozun geri kazanım oranları verilmiştir. Arabinoz, lignoselülozik yapıda ön işleme en duyarlı yapı olan hemiselüloz şekeridir ve ön işlem sırasında en kolay parçalanandır. Tüm ön işlem koşullarında hemiselüloz sıvı kısma geçmiştir. Genel olarak arabinoz geri kazanımlarının düşük olması, arabiozun şeker parçalanma ürünlerine dönüştüğünü göstermektedir.



Şekil 4.5 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda arabiozun geri kazanımı

Çizelge 4.8 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda arabinozun geri kazanımı

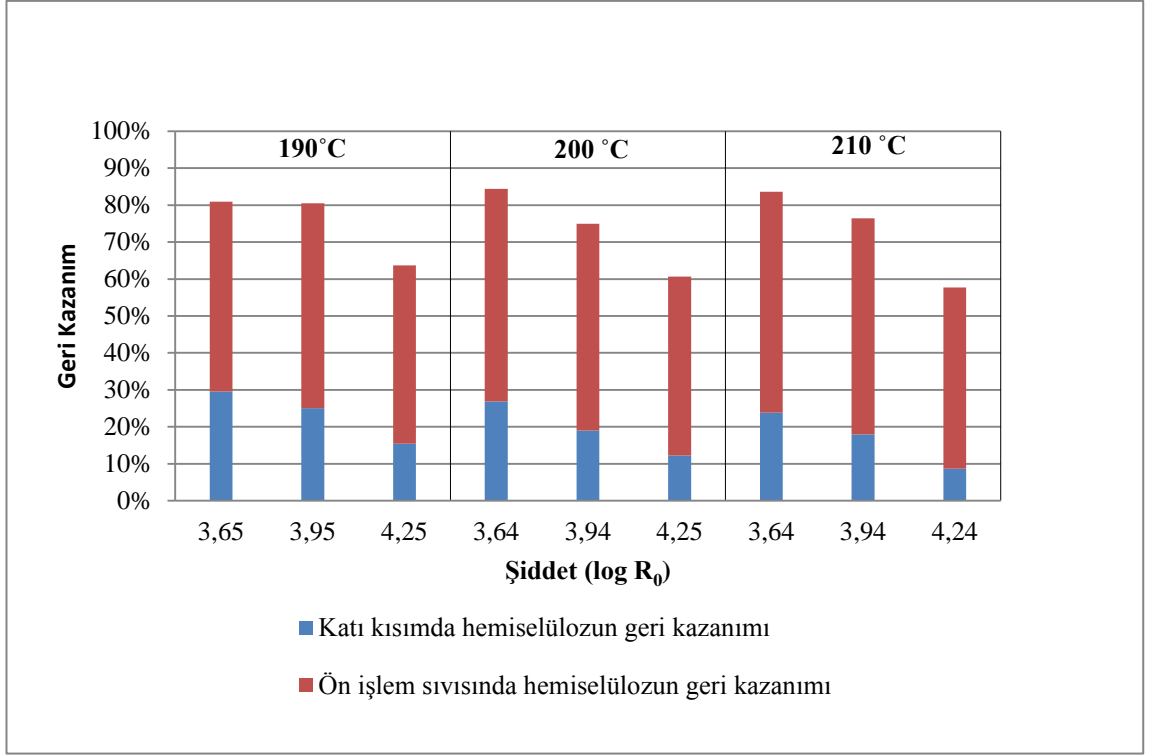
Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Arabinozun Geri Kazanımı (%)	Sıvı Kısımda Arabinozun Geri Kazanımı (%)	Toplam Arabinoz Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	0.0	69.0	69.0
190	20	3.95	0.0	54.3	54.3
190	40	4.25	0.0	33.8	33.8
200	5	3.64	0.0	70.9	70.9
200	10	3.94	0.0	47.1	47.1
200	20	4.25	0.0	31.4	31.4
210	2.5	3.64	0.0	75.5	75.5
210	5	3.94	0.0	48.4	48.4
210	10	4.24	0.0	32.2	32.2

*+ 5 dakika ön ısıtma

4.1.2.6 Hemiselüloz geri kazanımı

Ksiloz, mannoz, galaktoz ve arabinoz şekerleri esas alınarak hesaplanan hemiselüloz geri kazanım oranlarına göre, en yüksek toplam hemiselüloz veriminin % 84.4 oranı ile 200 °C’de 5 dakika ön işlem uygulanan örnekte sağlandığı belirlenmiştir (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.9). Genel olarak, denenen tüm sıcaklıklarda ön işlemin şiddeti arttıkça, hemiselüloz geri kazanım oranlarının azaldığı belirlenmiştir.

Sıcak su ile ön işlem yöntemi ile mısır sapı, şeker kamışı küspesi ve buğday samanı gibi otsu biyokütlelerde, hemiselülozun % 80’den fazlasının çözünebildiği ve hemiselülozun uzaklaşmasıyla, selülozun parçalanabilirliğinin arttığı gösterilmiştir (Alvira vd. 2010). Bu çalışmada da, hemiselülozun çözülme oranlarının, ön işlem sıcaklığı ve şiddetine bağlı olarak artış göstermekle birlikte, % 70.5-91.3 aralığında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.6 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda hemiselüloz (ksiloz + mannoz + galaktoz + arabinoz) geri kazanımı

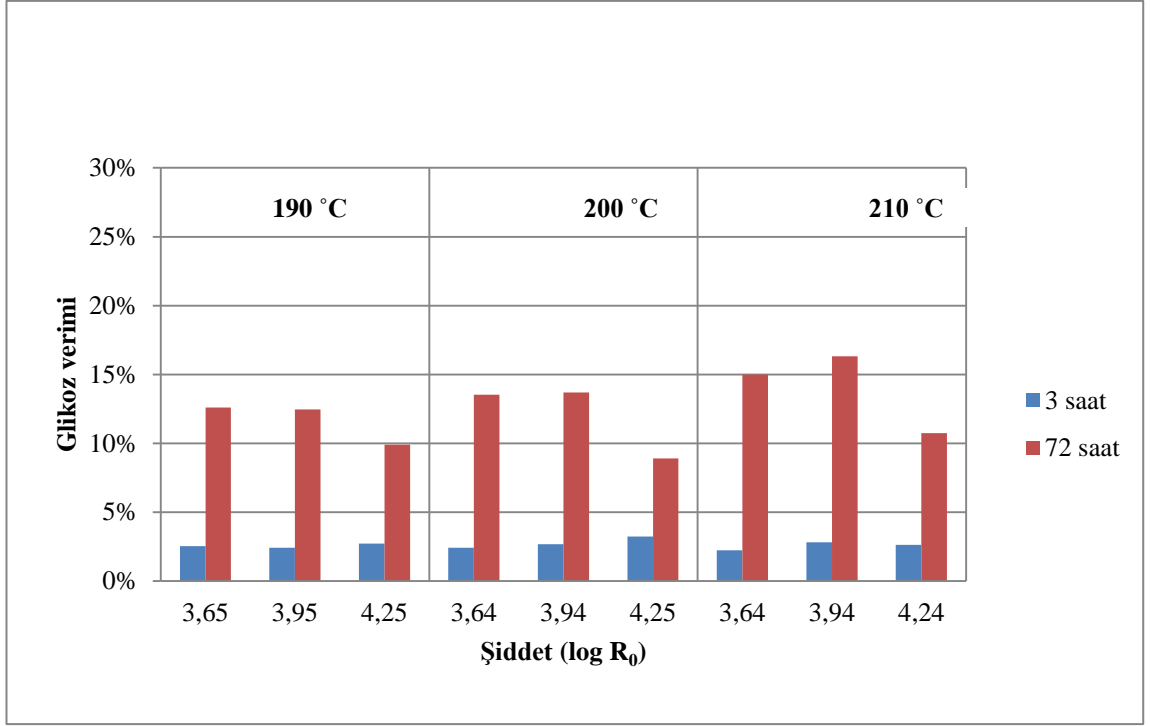
Çizelge 4.9 Çam (*P. banksiana*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda hemiselüloz geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Hemiselüloz Geri Kazanımı (%)	Sıvı Kısımda Hemiselüloz Geri Kazanımı (%)	Toplam Hemiselüloz Geri Kazanımı (%)	Hemiselülozün Çözülmesi (%)
190	10	3.65	29.5	51.4	80.9	70.5
190	20	3.95	25.1	55.4	80.5	74.9
190	40	4.25	15.4	48.2	63.6	84.6
200	5	3.64	26.9	57.5	84.4	73.1
200	10	3.94	18.9	56.0	74.9	81.1
200	20	4.25	12.2	48.4	60.6	87.8
210	2.5	3.64	23.9	59.8	83.7	76.1
210	5	3.94	17.9	58.6	76.5	82.1
210	10	4.24	8.7	49.1	57.8	91.3

*+ 5 dakika ön ısıtma

4.1.3 Enzimatik hidroliz

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde elde edilen % glikoz veriminin oldukça düşük olduğu görülmüş ve bu durum yumuşak ağaç türlerinin lignin oranının yüksek olmasına bağlanmıştır. Bilindiği gibi, lignin enzimin selüloza bağlanmasını engelleyen fiziksel ve kimyasal bir bariyerdir. Ön işlemin şiddeti arttıkça, glikoz veriminin artması beklenirken, en yüksek şiddette (log R₀:4.25) ön işleme tabi tutulan örneklerde, verimin nispeten azaldığı görülmektedir (Şekil 4.7). Oysaki, hemiselülozun en fazla uzaklaştığı bu örneklerde, selülaz enzimlerinin selüloza ulaşılabilirliğinin artması beklenmektedir. Bu nedenle, elde edilen düşük glikoz verimlerinin ligninin miktarı ve yapısında meydana gelen değişiklikler ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Sun (2013) tarafından yapılan çalışmada, çam örneklerine farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan sıcak su ile ön işlemin enzimatik hidroliz verimine etkisi araştırılmıştır. Ön işlemin şiddeti arttıkça glikoz verimi artmasına karşın, denenen en yüksek ön işlem şiddetinde (215 °C’de 8 dakika) dahi, % 30’dan daha düşük glikoz verimine (% 26) ulaşıldığı belirtilmiştir.



Şekil 4.7 Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (*P. banksiana*) odununun 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glüköz verimleri

Sonuç olarak, çam (*P. banksiana*) odunu için en uygun sıcak su ile ön işlem koşulunu belirleyebilmek için yapılan denemeler sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde, oldukça düşük glüköz verimleri elde edilmiştir. Bu nedenle, optimum ön işlem koşullarını net olarak belirtmek güç olsa da; en yüksek toplam hemiselüloz veriminin (% 84.4) sağlandığı, 200 °C’de 5 dakika ön işlem ve en yüksek glüköz veriminin (% 16) elde edildiği, 210 °C’de 5 dakika ön işlem, en uygun ön işlem koşulları olarak seçilmiştir. Genel olarak, *P. banksiana* türü çam odununa uygulanan sıcak su ile muamele ön işlem yönteminin, hemiselüloz şekerlerini uzaklaştırmada etkili olduğu, ancak çözünmeyen kısımdaki selülozu enzimatik parçalanmaya elverişli hale getirmede başarılı olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.1.3.1 *P. banksiana* çam odununun hidroliz verimini arttırmaya yönelik denemeler

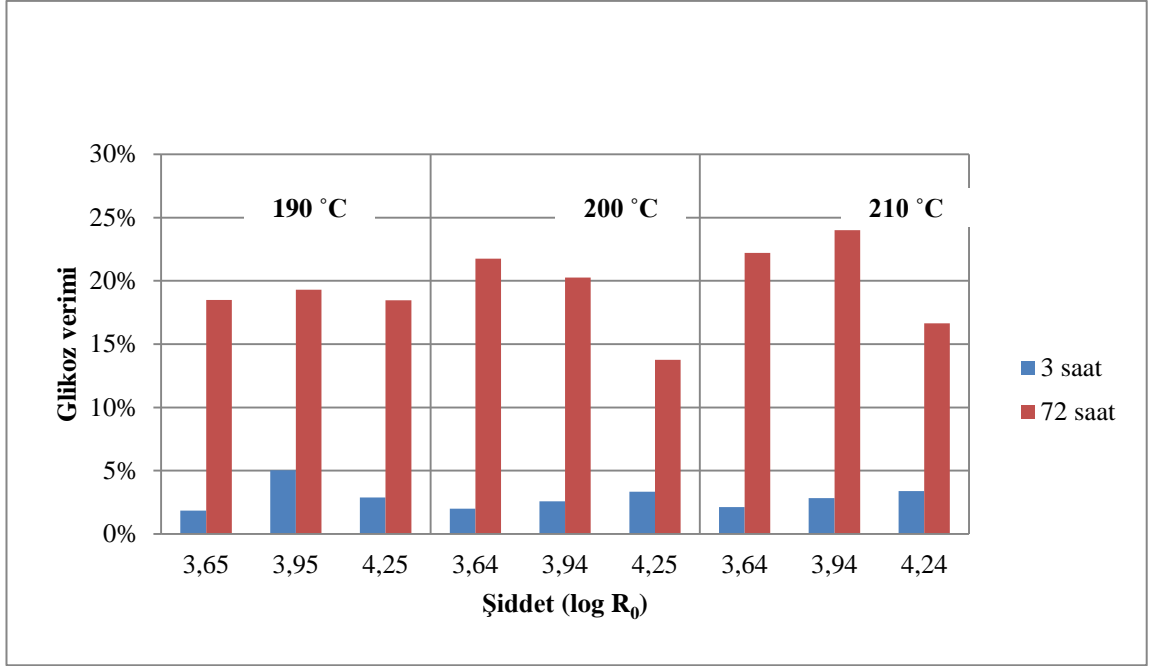
Çam (*P. banksiana*) odununun 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde elde edilen % glikoz veriminin oldukça düşük olması sebebiyle, farklı enzim konsantrasyonları, farklı enzim karışımları kullanılarak ve farklı ön işlem uygulamaları ile enzimatik hidroliz verimleri arttırılmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen hidroliz denemelerinin koşulları aşağıda sıralanmıştır;

- 30 FPU/g glukon Cellic Ctec2 kullanılarak,
- 150 FPU/g glukon Cellic Ctec2 kullanılarak,
- Spezyme karışımı (20 FPU/glukon Spezyme CP + 30 CBU/g glukon Novozyme 188 + 200 OSX/ g glukon Multifect Pectinase) kullanılarak,
- İki aşamalı ön işlem (200 °C'de 5 dakika + 220 °C'de 20 dakika) sonrası, 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 kullanılarak,
- % 1 maleik asit (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) ile ön işlem sonrası, 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 kullanılarak,
- 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 enzimine Endoglucanase C eklenerek,
- % 1 maleik asit (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) ile ön işlem sonrası, 20 ve 40 FPU/g glukon Cellic Ctec2 + Endoglucanase C kullanılarak,
- % 1 maleik asit (w/w) (g maleik asit/g toplam kuru madde) ile ön işlem sonrası, % 0.2 (v/v) PEG4000 yüzey aktif maddesi içeren ortamda 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 + Endoglucanase C kullanılarak farklı hidroliz denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Selüloz enziminin konsantrasyonu belirli ölçüde arttırıldığında, hidroliz verimi ve hızı artabilmekte, ancak aynı zamanda, proses maliyeti de ciddi oranda artmaktadır. Laboratuvar çalışmalarında kullanılan enzim dozu, genellikle 10 FPU/g selülozdur. Çünkü bu konsantrasyonda, makul bir sürede (48-72 saat) ve enzim maliyetinde yüksek glikoz verimleri sağlanabilmektedir. Ancak, substratın tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak, hidrolizde kullanılan selüloz enzim konsantrasyonu 7-33 FPU/g substrat

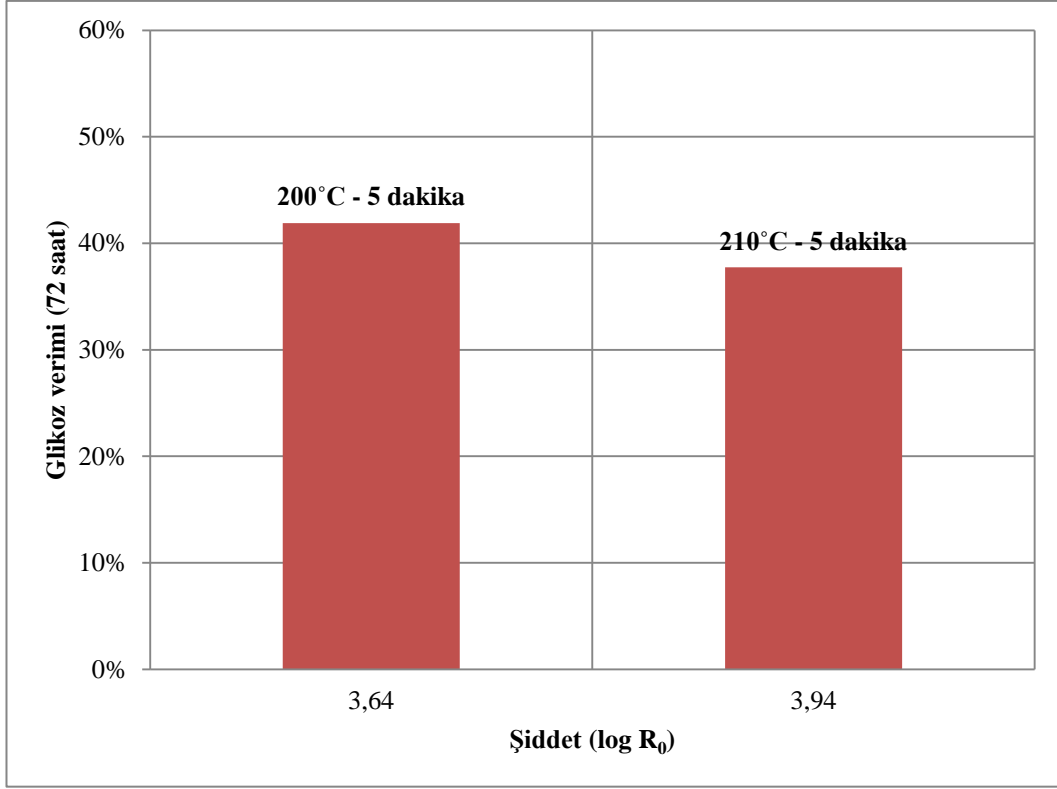
aralığında değişmektedir (Sun ve Cheng 2002). Özellikle, yumuşak yapılı odunların hidrolizinde çok yüksek enzim konsantrasyonları kullanılabilir (Galbe ve Zacchi 2002). Lignoselülozik biyokütle olarak yumuşak yapılı odunlar kullanıldığında, ön işlem sonrası sıvı fraksiyonda yüksek hemiselüloz verimine ulaşmak ve düşük enzim dozlarında kolay hidrolize olabilen, selülozca zengin bir katı fraksiyon elde etmek oldukça güçtür. Örneğin; kabul edilebilir düzeylerde hemiselüloz geri kazanımının elde edildiği ön işlem koşullarında, yumuşak yapılı odundan ön işlem sonrasında elde edilen katı fraksiyonun hidrolizinin zor olduğu gösterilmiştir. Bu durumda, % 60'ın üzerinde hidroliz verimlerine ulaşabilmek için, 20 FPU/g selülozun üzerindeki enzim konsantrasyonlarının kullanılması gerektiği belirtilmektedir (Kumar vd. 2011). Tengborg vd. (2001), SO₂ ile muamele sonrası buhar patlatma ön işlemine tabi tutulan ladin örneklerine (% 5 kuru madde) 220 FPU/g selüloz oranında selülaz enzimi eklendiğinde dahi, 72 saatlik hidroliz işlemi sonunda selülozun yalnızca % 78 oranında dönüşüme uğradığını bildirmişlerdir.

Hidroliz denemelerinde enzim konsantrasyonunun 20 FPU/g glukandan 30 FPU/g glukana arttırılması durumunda, 72 saat sonundaki % glikoz veriminde kayda değer bir artış görülmediği belirlenmiştir. 20 FPU/g glukana Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekteştirilen hidroliz denemesinde olduğu gibi, en yüksek % glikoz verimi (% 24) 210 °C'de 5 dakika ön işlem uygulanan örnekte elde edilmiştir (şekil 4.8). 20 FPU/g glukana Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekteştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde olduğu gibi, ön işlem şiddeti arttıkça, glikoz veriminin artmadığı, hatta nispeten azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.8 Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (*P. banksiana*) odununun 30 FPU/g glukan Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glukoz verimleri

200 °C 5 dakika ile 210 °C 5 dakika ön işlem uygulanan örnekler, 150 FPU/g glukan oranında enzim ile hidroliz edildiğinde, 72 saat sonundaki % glukoz verimleri, sırasıyla, % 42 ve % 38 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu denemede, enzim konsantrasyonu çok yüksek olmasına karşın istenilen glukoz verimine ulaşılamamıştır.



Şekil 4.9 İki farklı koşulda (200 °C-5 dakika ve 210 °C-5 dakika) sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (*P. banksiana*) odununun 150 FPU/g glukoz Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glukoz verimleri

Hidroliz veriminin, bazı yüzey aktif maddelerin ilavesi, farklı mikroorganizmalardan elde edilen selüloz karışımlarının kullanımı ve pektinaz gibi diğer enzimlerin ilavesi ile artırılabilirliği belirtilmektedir (Sun ve Cheng 2002, Hamelinck vd. 2005).

Trichoderma reesei selüloz sistemlerine β -glukozidazların ilavesi ile daha yüksek şeker verimlerine ulaşabilmektedir. β -glukozidazlar, selüloz aktivitesinin inhibitörü olan sellobiyozu hidrolize etmektedir. Hemiselülozlar ya da pektinazlar, selülozlarla birlikte kullanıldığında, selüloz dönüşüm miktarında artış olduğu gösterilmiştir. *Aspergillus ustus* ve *Trichoderma viride*'den elde edilen enzim karışımı, alkali ile muamele edilmiş şeker kamışı küspesinin hidrolizinde kullanıldığında, % 90 selüloz dönüşüm verimine ulaşıldığı bildirilmiştir (Mononmani ve Sreekantiah 1987). Ramos vd. (1993) tarafından yapılan çalışmada, buhar patlatma yöntemi ile ön işleme tabi tutulmuş *Eucalyptus viminalis* örneklerinin hidrolizinde Celluclast ve Novozym ticari selüloz karışımları

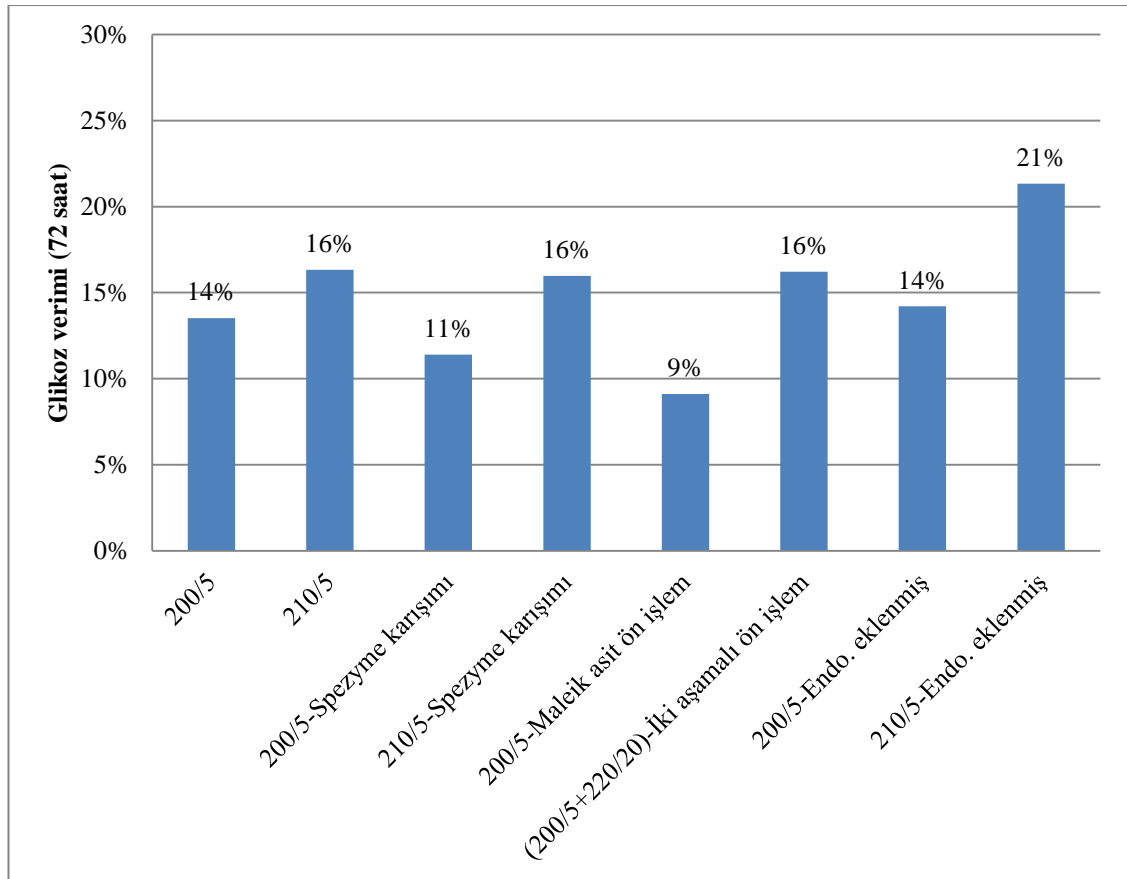
kullanılmış ve hidroliz sonunda, biyokütlenin neredeyse tamamının şekere dönüştüğü belirlenmiştir. Baker vd. (1994) tarafından, mikrokristalli selülozun şekere dönüşümünde fungal sellobiyohidrolaz (*Trichoderma reesei* CBH I) ile sinerjik etki gösteren, ısıya dayanıklı bir endoglukanaz (*Acidothermus cellulolyticus* E1) ve bakteriyel bir endoglukanaz (*Thermomonospora fusca* E5) enzimi bulunmuştur.

Maleik asit ve fumarik asit gibi organik asitler, ön işlemden sülfürik asite alternatif olarak önerilmektedirler. Her iki asitin de polisakaritlerin hidrolizini arttırdığı, ancak, sülfürik asitin aksine, serbest şekerlerin furfural ve HMF'ye parçalanmasını desteklemedikleri bilinmektedir (Kootstra vd. 2009).

İki aşamalı ön işlem yöntemi ile, tek aşamalı ön işleme kıyasla daha yüksek şeker verimlerine ulaşıldığı ileri sürülmektedir. Ön işlemden toplam şeker verimini maksimuma çıkarmak için, hem glikoz hem de hemiselüloz şekerlerinin veriminin yüksek olması istenmektedir (Söderström vd. 2003b). Mayalar tarafından fermente edilebilir şekerler olan heksozlar ele alınacak olursa, önceki çalışmalarda glikoz ve mannozun maksimum hidroliz koşullarının farklı olduğu gösterilmiştir. Glukanın tamamen hidrolizi için, mannana göre daha şiddetli ön işlem koşullarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu veriden hareketle, hem selüloz hem de hemiselülozdan maksimum oranda şeker eldesi için, iki aşamalı ön işlem yöntemi önerilmiştir. Bu yöntemde, ılımlı koşullarda gerçekleştirilen ilk aşamada hemiselülozun hidrolizi, ikinci aşamada ise, daha şiddetli koşullarda selülozun yapısının zayıflatılarak enzimatik hidrolize daha elverişli hale gelmesi hedeflenmektedir (Tengborg vd. 1998, Söderström vd. 2003b, Söderström vd. 2004). İki aşamalı ön işlemin, selülozdan glikoz oluşum verimini azaltmaksızın, hemiselüloz şekerlerinin geri kazanımını arttırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Nguyen vd. 2000, Söderström vd. 2002, Söderström vd. 2003b, Söderström vd. 2003a). İki aşamalı ön işlemin birinci basamağında, düşük şiddet (bu çalışmadaki koşullar: 200°C'de 5 dakika) koşullarında hemiselüloz fraksiyonunun hidrolizi amaçlanmaktadır. Birinci ön işlem sonrasında filtrasyonla ayrılan katı kısım yıkanıp, ikinci kez daha yüksek şiddette (bu çalışmadaki koşullar: 220°C'de 20 dakika) bir ön işleme tabi tutulmaktadır. İkinci aşamada selülozun parçalanması hedeflenmektedir. İki işlem basamağı arasında katı materyalin yıkanması, hemiselüloz

şekerlerin ayrılmasını sağlamakta ve daha şiddetli ön işlem koşulları altında oluşan HMF, furfural gibi şeker kaynaklı inhibitör maddelerin miktarını azaltmaktadır (Söderström vd. 2004, Bösch vd. 2010).

Şekil 4.10'da farklı ön işlem ve hidroliz uygulamalarının çam odununun hidrolizi sonunda elde edilen glikoz verimine etkisi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, Cellic Ctec2 enzimi yerine Spezyme karışımı kullanıldığında, ön işlemde maleik asit kullanıldığında, 2 aşamalı ön işlem uygulandığında ya da enzim karışımına Endoglucanase C ilave edildiğinde hidroliz verimlerinde önemli bir artış sağlanmadığı belirlenmiştir.



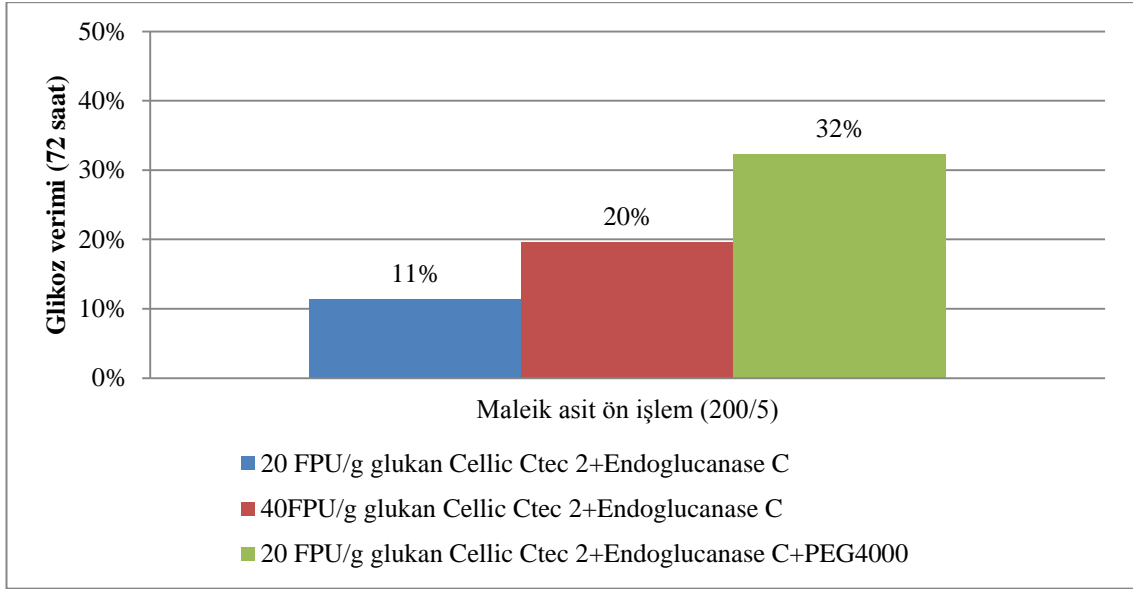
Şekil 4.10 Farklı ön işlem ve hidroliz koşullarının çam odununun hidroliz verimine etkisi

Hidroliz ortamına yüzey aktif maddelerin ilavesi, selülozun yüzey özelliklerini değiştirebilmekte ve selülazın selüloza geri dönüşümsüz olarak bağlanmasını en aza indirmektedir. Enzimatik hidrolizde kullanılan yüzey aktif maddeler arasında, iyonik olmayan Tween 20, Tween 80, PEG, Tween 81, Emulgen 147, amfoterik Anhitole 20BS, katyonik Q-86W, ramnolipit ve basitrasın yer almaktadır. İyonik olmayan yüzey aktif maddelerin selüloz hidrolizini geliştirmede daha etkin olduklarına inanılmaktadır (Sun ve Cheng 2002).

Ovalbumin ve jelatin gibi ekzojen proteinler ligninin üzerindeki bölgelere bağlanmakta ve ligninin selülotik enzimlerle olan interaksyonunu azaltmaktadır. Polivinilpirroliden ve PEG gibi yüzey aktif ajanlar da, fenolik gruplara karşı yüksek affiniteleri ile benzer etki göstermektedirler (Pan vd. 2005). Bu çalışmada, çam odununun hidrolizindeki düşük glikoz veriminin ligninden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirleyebilmek amacıyla, hidroliz ortamına PEG eklenerek hidroliz gerçekleştirilmiştir.

Çok sayıda etilen bazlı yüzey aktif maddenin selülozun enzimatik hidrolizini arttırmada etkili olduğu bilinmektedir. Ancak, bu konuda enzimin stabilizasyonu, substratın yapısını değiştirme, enzim substrat etkileşimini etkileme gibi pek çok etki mekanizması olduğu öne sürülmektedir. Bazı çalışmalar da PEG ilavesinin lignoselülozun glikoza dönüşümünü arttırdığını göstermektedir. PEG ilavesi ile oluşan bu artışın temelinde yatan mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, bu maddelerin hidrolitik enzimlerin substratta bulunan lignine non-spesifik olarak bağlanmasını engellemesine dayandırılmaktadır (Ouyang vd. 2010). Şekil 4.11'de % 1 maleik asit ilavesi ile 200 °C'de 5 dakika ön işleme tabi tutulan çam odununun, 20 FPU/ glukon Cellic Ctec2+Endoglucanase C; 40 FPU/ glukon Cellic Ctec2+Endoglucanase C; 20 FPU/glukon Cellic Ctec2+Endoglucanase C+PEG4000 yüzey aktif maddesi içeren ortamlardaki hidroliz verimleri görülmektedir. Hidrolizde % 0.2 (v/v) oranında PEG4000 yüzey aktif maddesi kullanıldığında, aynı enzim konsantrasyonunda, % glikoz veriminin % 11'den % 32'ye yükseldiği belirlenmiştir. Ouyang vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada, bovine serum albumin (BSA), polietilen glikol (PEG 2000, 4000, 6000, 8000), Tween 20, polivinil alkol (PVA1750), pepton, yeast extract gibi katkıların Avicel Ph101'in enzimatik hidrolizine etkisi araştırılmış ve en etkili

katkının PEG4000 olduğu belirlenmiştir. Avicel Ph101'in hidrolizinde 0.05 g/g glukun PEG4000 kullanıldığında, hidroliz veriminin % 91 oranında (% 41.1'den % 78.9'a) arttığı tespit edilmiştir.



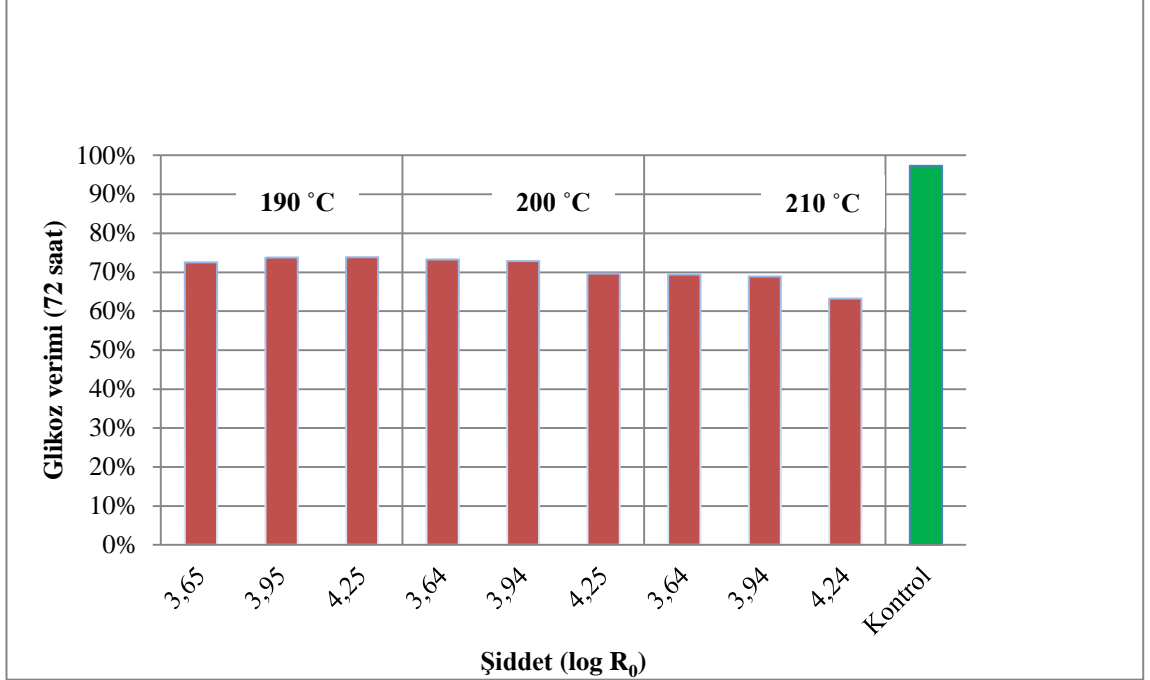
Şekil 4.11 Yüzey aktif madde ilavesinin hidroliz verimine etkisi

Çam (*P. banksiana*) odununun sıcak su ile ön işlem sonrasında, hidroliz verimini arttırmaya yönelik denemeler arasında, yalnızca çok yüksek enzim dozunun (150 FPU/g glukun) kullanıldığı ve hidroliz ortamına polietilen glikol yüzey aktif maddesinin eklendiği denemelerde % glikoz veriminde artış sağlanmıştır.

4.1.3.2 Ön işlem sıvısı içeren ortamda avicel hidrolizi

Çam (*P. banksiana*) odununun 9 farklı koşulda ön işleme tabi tutulmasıyla elde edilen ön işlem sıvısı içeren ortamda, Avicel Ph101'in hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak, sodyum sitrat tamponu (50 mM, pH 4.8) içeren ortamda deneme tekrarlanmıştır. Hidroliz ortamında ön işlem sıvısı bulunduğunda, avicelin hidrolizi ile oluşan glikozun yaklaşık % 70 civarında olduğu, ön işlem sıvı içermeyen kontrolde ise, % 97 oranında glikoz verimine ulaşıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.12). Bu sonuçlar, ön işlem sıvısında

oluşmuş olabilecek inhibitör maddelerin selüloz hidrolizini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.12 Ön işlem sıvısı varlığında avicel hidrolizi

4.2 *P. sylvestris* Çam Odunu ile Gerçekleştirilen Sıcak Su ile Muamele Ön İşlem Denemeleri

4.2.1 Bileşim analizleri

Sarıçam (*P. sylvestris*) odununun ön işlem öncesi ve farklı koşullarda uygulanan sıcak su ile ön işlem sonrasındaki bileşimi, çizelge 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. HPLC’de arabinoz ve mannoz şekerleri arasında tam bir ayırım sağlanamadığından, mannan ve arabinan miktarlarının toplamı verilmiştir. Ham odunun bileşimine bakıldığında, karbohidratların toplam bileşiminin % 64’ünü oluşturduğu görülmektedir.

Çizelge 4.10 Ham sarıçam (*P. sylvestris*) odununun bileşimi

Bileşen	% Kuru Madde Cinsinden*
Glukan	35.3±4.24
Ksilan	6.3±0.78
Galaktan	3.7±0.76
Mannan+Arabinan	18.4±1.57
Asetil	ND
Asitte Çözünmeyen Lignin	30.5±0.55
Asitte Çözünen Lignin	5.5±0.13
Kül	ND
Toplam Kütle	99.7

*Değerler, aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.
ND; Belirlenmedi

P. sylvestris türünde, hemiselüloz galaktoglukomannan yapısındadır. Bu yapıda, glikoz ve mannoz üniteleri temel iskeleti oluştururken, galaktoz üniteleri bu iskelete bağlanmış yan zincirleri oluşturmaktadır (Hundt vd. 2013). Yumuşak odunlu ağaçlarda hemiselüloz, temel olarak, bir heksoz olan mannozdan oluştuğundan, mayalar tarafından fermente edilebilmektedir (Galbe ve Zacchi 2002).

Hundt vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *P. sylvestris* türü çam odununun bileşimi % 42.9 selüloz, % 12 mannan, % 4.3 ksilan, % 27.9 lignin, % 2.6 ekstraktif şeklinde belirlenmiştir. Bu verilere göre, yapılan çalışmada belirlenen % glukun miktarının literatür verilerine göre düşük olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada, *P. banksiana* türü için belirlenen glukun değerlerine kıyasla, *P. sylvestris* türünün daha düşük oranda glukun ve ksilan içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Galaktan ve lignin miktarlarının ise, incelenen her iki türde de yakın değerler olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.10).

Ön işlem uygulanmış sarıçamın bileşimi incelendiğinde, hemiselüloz şekerleri olan galaktan ve mannan ile arabinanın, 200 °C-10 dakika, 200 °C-20 dakika, 210 °C-2.5 dakika koşullarında ön işlem uygulanan örnekler dışındakilerde, tamamen çözülerek ön işlem sıvısına geçtiği görülmektedir. Ksilanın ise, uygulanan ön işlemlere dayanıklı olduğu ve değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Yalnızca, en şiddetli ön işlem koşullarından biri olan 210 °C-10 dakika ön işlem uygulanan örnekte ksilanın tamamen uzaklaştığı görülmektedir. Lignoselülozik maddelerin çözünmeyen fraksiyonunu oluşturan selülozun ise, sadece yüksek şiddetteki ön işlem koşullarında, katı kısımdaki oranının kısmen arttığı belirlenmiştir. Lignin de, benzer şekilde, ön işlem sonrasında neredeyse aynı kalmıştır. En şiddetli ön işlem koşullarından olan 200 °C-20 dakika ve 210 °C-10 dakika ön işlem uygulanan örneklerde, lignin miktarında yüzdesel olarak çok düşük oranda bir artış belirlenmiştir. Hundt vd. (2013), yumuşak odunlu ağaçlara uyguladıkları alkali poliyol ön işlemi sonucunda biyokütlenin selüloz, lignin ve ksilandan oluştuğunu belirtmişlerdir.

Etkin bir enzimatik hidroliz işleminin gerçekleşebilmesi için, pek çok ön işlem yönteminde, biyokütleden ligninin uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Örneğin, seyreltik amonyak ya da NaOH kullanılarak gerçekleştirilen alkali ön işlemlerde aril-eter bağlarının kopmasıyla ligninin parçalanması artmaktadır. Buna karşın, sıcak su ile muamele, buhar patlatma, seyreltik asit gibi hidrotermal ön işlem yöntemlerinde, asitte çözünmeyen ligninin önemli bir kısmı ön işlem uygulanmış biyoküttele kalmaktadır. Seyreltik asit ile yapılan ön işlemin, çoğunlukla biyokütlenin asitte çözünmeyen lignin miktarında artışa neden olduğu belirtilmektedir. Lignin miktarındaki net artışın, ligninin

aynı anda gerçekleşen depolimerizasyon ve repolimerizasyon reaksiyonları ile birlikte ligninin yapısındaki değişimlerden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Ligninin ön işlem süresince değişebilecek özellikleri camlaşma sıcaklığı (glass transition temperature) ölçülerek değerlendirilebilmektedir (Ko vd. 2015).

Çizelge 4.11 Sıcak su ile ön işlem uygulanmış sarıçam (*P. sylvestris*) odununun bileşimi

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet(10g R ₀)	Yıkamış Katı Kısımın Bileşimi						
			Glukoz (%)	Ksiloz (%)	Mannan + Arabinoxilan (%)	Galaktan (%)	Asitte Çözünmeyen Lignin (%)	Asitte Çözünen Lignin (%)	Toplam (%)
190	10	3.65	34.7	6.3	0.0	0.0	31.2	3.3	75.5
190	20	3.95	39.6	6.8	0.0	0.0	31.5	3.2	81.1
190	40	4.25	39.1	6.2	0.0	0.0	31.3	3.2	79.8
200	5	3.64	28.2	5.1	0.0	0.0	30.8	3.2	67.3
200	10	3.94	36.9	6.0	18.0	3.2	31.2	3.1	98.4
200	20	4.25	39.7	5.3	18.6	2.8	33.4	3.3	103.1
210	2.5	3.64	33.9	5.8	18.7	3.5	31.7	3.1	96.7
210	5	3.94	36.5	6.4	0.0	0.0	31.8	3.1	77.8
210	10	4.24	37.2	0.0	0.0	0.0	33.0	3.1	73.3

Çizelge 4.12 Sariçam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonundaki çözülme oranları

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Toplam çözülme oranı (%)
190	10	3.65	1
190	20	3.95	6
190	40	4.25	6
200	5	3.64	3
200	10	3.94	3
200	20	4.25	9
210	2.5	3.64	4
210	5	3.94	4
210	10	4.24	8

Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda elde edilen toplam çözülme oranları, çizelge 4.12’de görüldüğü gibi, % 1-9 olarak hesaplanmıştır. Genel olarak, ön işlemin şiddeti arttıkça biyokütlenin çözülme oranında bir artış görülse de, farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ön işlemlerin sarıçam odunu üzerinde etkili olmadığı anlaşılmaktadır.

4.2.2 Ön işlem koşullarının optimizasyonu

Çam (*P. sylvestris*) odunu örnekleri, 9 farklı sıcaklık ve sürede (190 °C’de 10, 20 ve 40 dakika; 200 °C’de 5, 10 ve 20 dakika; 210 °C’de 2.5, 5 ve 10 dakika) Parr reaktörde ön işleme tabi tutularak, en uygun ön işlem koşulunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Farklı ön işlem koşulları uygulanan çam odunlarının bileşimleri (glukan, ksilan, mannan, galaktan, arabinan, asitte çözünen lignin, asitte çözünmeyen lignin) belirlenmiştir. Daha sonra, ön işlem sonrasında elde edilen katı kısımlar, 20 FPU/g glukan ve 40 FPU/g glukan selülaz (Cellic Ctec2, Novozymes, Danimarka) enzimi ile hidroliz edilmiştir. 72 saatlik hidroliz sonrasında % glikoz verimleri hesaplanmıştır. Ön işlem uygulanmamış çam, ön işleme tabi tutulmuş ve yıkanmış katı kısımda şeker bileşimleri kullanılarak kütle denkliği hesaplamaları yapılmıştır. Enzim hidrolizi sonucunda elde edilen glikoz

verimleri de esas alınarak, sarıçam için en uygun ön işlem koşulu belirlenmeye çalışılmıştır.

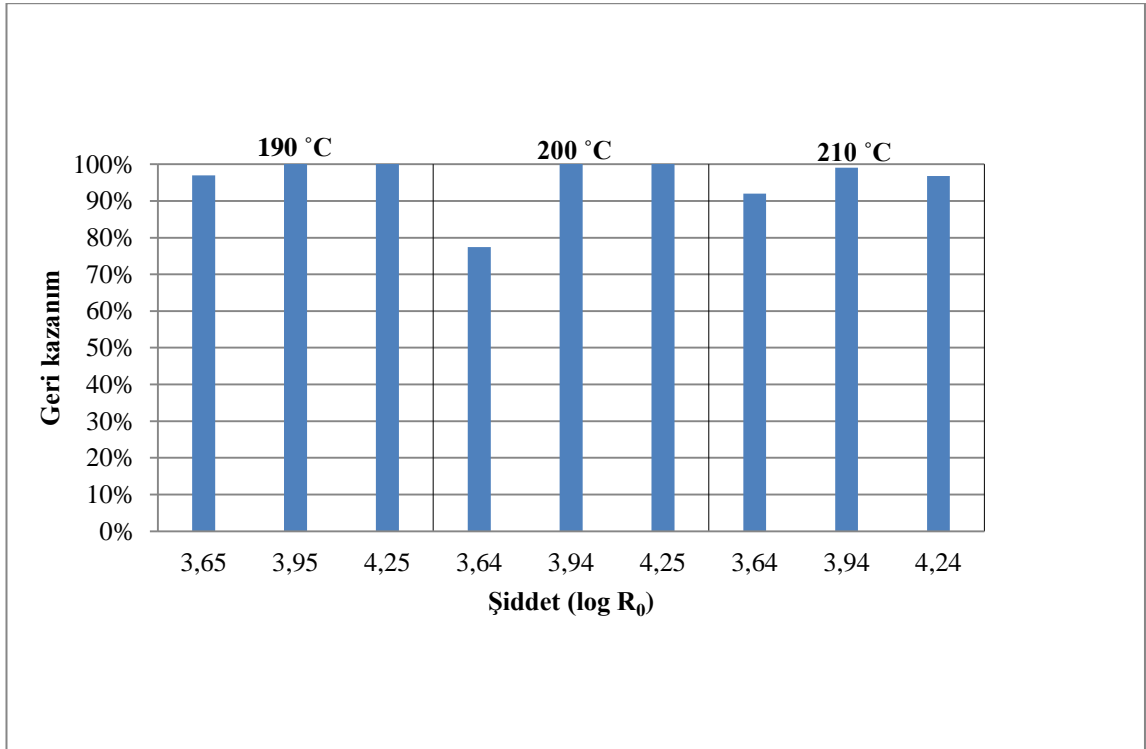
4.2.2.1 Ön işlem sonrası şekerlerin geri kazanım oranları

Çizelge 4.13 ve şekil 4.13’de 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımdaki glikozun geri kazanım oranları verilmiştir. Ön işlem sonrasında glikozun büyük oranda katı kısımda kaldığı belirlenmiştir. Selüloz, lignoselülozik maddelerin suda çözünmeyen kısmını oluşturduğundan (Kumar vd. 2010), katı kısımda kalması beklenen bir durumdur. Ancak, Kumar vd. (2010) çam örneklerine uyguladıkları % 4 SO₂ muamelesi sonrası 200 °C’de 5 dakika (log R₀:3.64) buhar patlatma ön işlemi sonrasında, glukanın katı kısımdaki geri kazanım oranının % 80 olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Clark vd. (1989) tarafından çam örnekleri ile yapılan çalışmada, buhar patlatma ön işlemi sonrasında glukanın % 26 oranında sıvı kısma geçtiği belirtilmiştir.

Yapılan çalışmada, yalnızca, 200 °C’de 5 dakika ön işlem uygulanan örneklerde katı kısımdaki glikozun geri kazanım oranının % 77.4 olduğu belirlenmiştir. Bu örneklere ait diğer şeker bileşenlerinin konsantrasyonları da düşük olduğundan beklenen değerlerden düşüktür.

Çizelge 4.13 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda glikozun geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Glikozun Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	97.0
190	20	3.95	105.6
190	40	4.25	104.4
200	5	3.64	77.4
200	10	3.94	101.3
200	20	4.25	102.2
210	2.5	3.64	92.0
210	5	3.94	99.1
210	10	4.24	96.8



Şekil 4.13 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda glikozun geri kazanımı

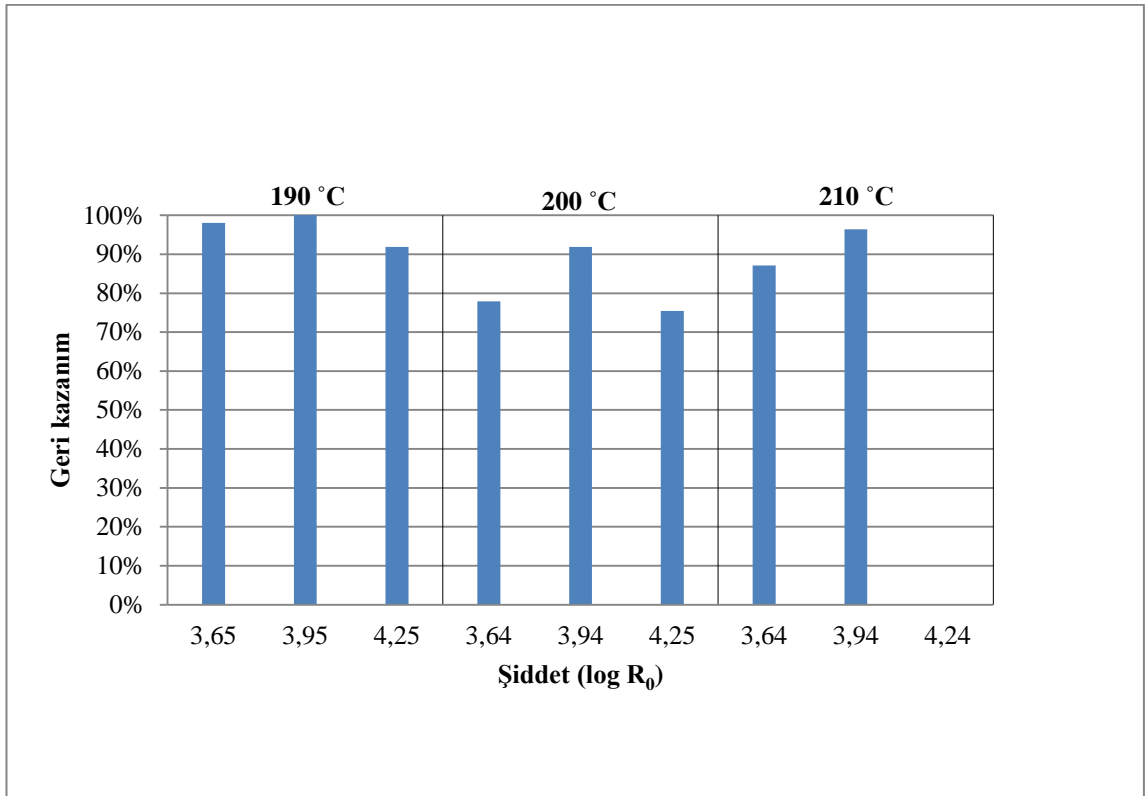
Çizelge 4.14 ve şekil 4.14’de, 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımda ksilozun geri kazanım oranları verilmiştir. 210 °C-10 dakika dışındaki ön işlem koşullarında ksilanın büyük oranda katı kısımda kaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Hundt vd. (2013), *P. sylvestris*’e uyguladıkları alkali poliyol ön işlemi sonucunda, galaktoglukomannanın parçalandığını, ancak ksilanın glukuronik asit yan zincirleri nedeniyle stabil kaldığını belirtmişlerdir.

Lignoselülozik biyokütlenin, başta ksilan olmak üzere, hemiselülozik bileşeni, lignoselülozik matriks içerisinde selülozu saran ve selülazların selüloza ulaşmasını engelleyen fiziksel bir bariyer olduğu kabul edilmektedir (Bura vd. 2009). Bura vd. (2009), ksilan miktarının buhar ön işlemine tabi tutulmuş mısır sapı ve melez kavağın enzimatik hidroliz verimlerine etkisini araştırdıkları çalışmada, ön işlem uygulanmış tüm biyokütle örneklerindeki glukan içeriğinin yaklaşık aynı olduğunu (% 50-58), ancak mısır saplarına (% 5-20 ksilan) göre, daha düşük ksilan içeriğine sahip kavak örneklerinde (% 1-3 ksilan) daha yüksek glikoz verimine ulaşıldığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, ön işlem uygulanmış tüm örneklerdeki lignin miktarları da birbirine yakın olduğundan, selülozun glikoza dönüşüm verimini etkileyen temel etkenin ksilanın uzaklaşması olduğu belirtilmiştir. Jeoh vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada da, benzer şekilde, mısır sapının seyreltik asit ön işlemi ile suda çözünmeyen fraksiyonda kalan ksilan miktarı azaldıkça, selülozun glikoza dönüşüm veriminin arttığı belirlenmiştir.

Ön işlem sonrası biyokütlerde kalan ksilan oranının, selülozun parçalanabilirliğinin önemli bir göstergesi olduğu gösterilmiştir. Selülozun yüzeyine absorbe olan ksilan selülaz enzimlerinin aktivitesini engellemektedir (Bura vd. 2009). Ancak, bu çalışmada, *P. sylvestris* türü sarıçama farklı koşullarda uygulanan sıcak su ile ön işlemler sonrası ksilanın uzaklaşmaması ve neredeyse tamamının suda çözünmeyen katı kısımda kalması, selüloz hidroliz verimlerinin düşük olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.14 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda ksilozun geri kazanımı

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Ksilozun Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	98.1
190	20	3.95	100.4
190	40	4.25	91.9
200	5	3.64	77.9
200	10	3.94	91.9
200	20	4.25	75.5
210	2.5	3.64	87.1
210	5	3.94	96.4
210	10	4.24	0.0

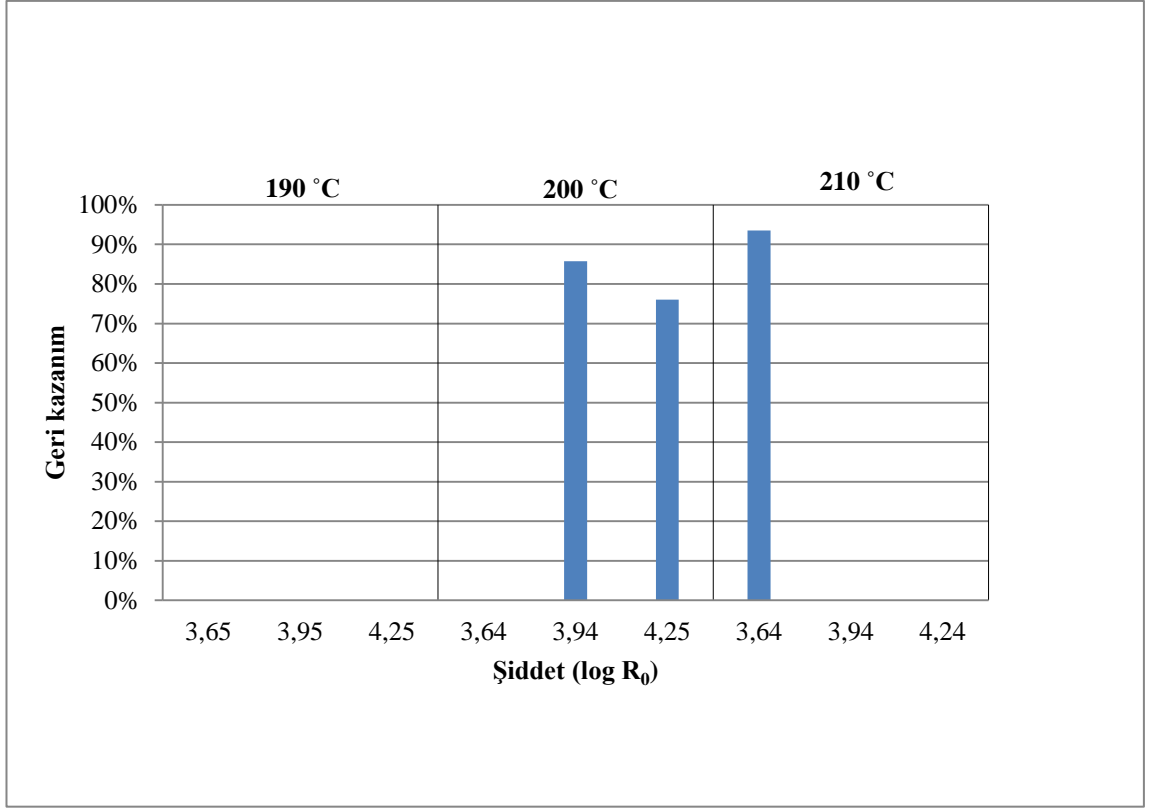


Şekil 4.14 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda ksilozun geri kazanımı

Çizelge 4.15, şekil 4.15 ile çizelge 4.16, şekil 4.16’da 9 farklı ön işlem koşulunda, ön işlem sonunda elde edilen katı kısımda galaktoz ve mannoz ile arabinoza ait geri kazanım oranları verilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi, hemiselüloz şekerleri olan galaktan ve mannan ile arabinanın ön işlem sonunda 200 °C-10 dakika, 200 °C-20 dakika, 210 °C-2.5 dakika koşullarında ön işlem uygulanan örnekler dışındakilerde, tamamen çözülerek ön işlem sıvısına geçtiği görülmektedir.

Çizelge 4.15 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda galaktozun geri kazanımı

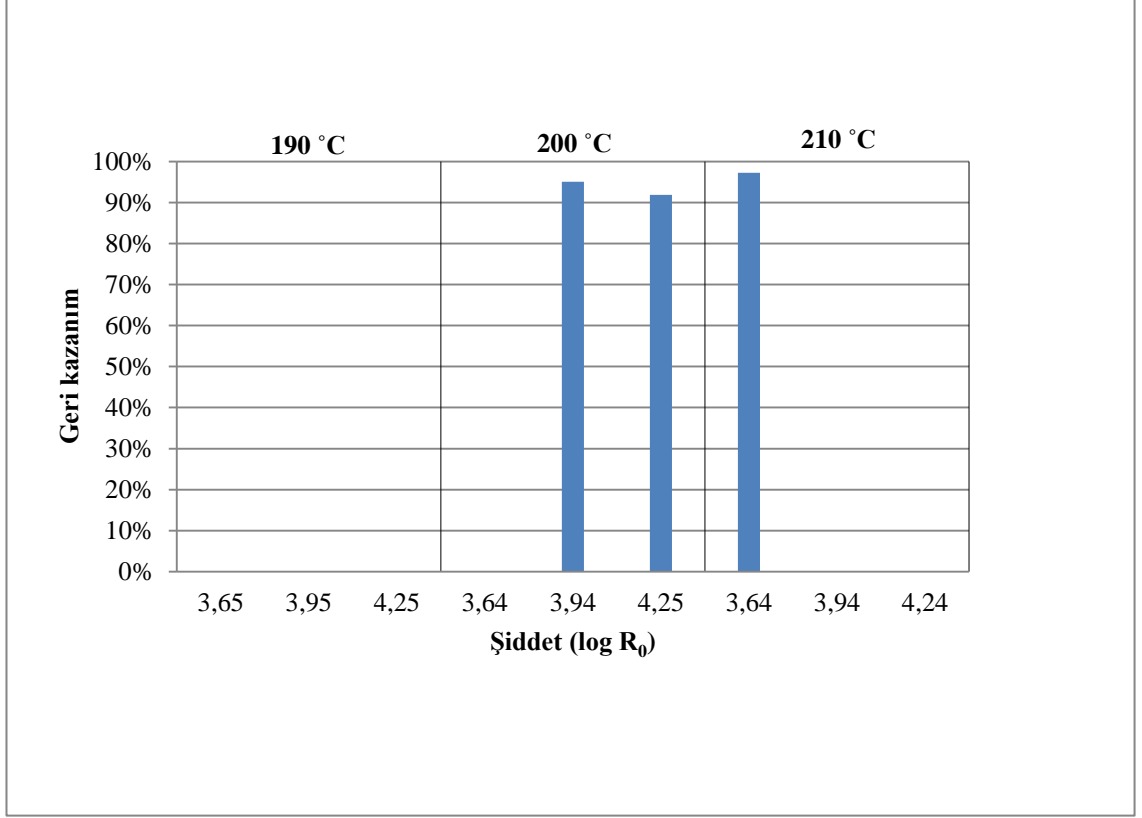
Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Galaktozun Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	0.0
190	20	3.95	0.0
190	40	4.25	0.0
200	5	3.64	0.0
200	10	3.94	85.7
200	20	4.25	76.0
210	2.5	3.64	93.5
210	5	3.94	0.0
210	10	4.24	0.0



Şekil 4.15 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda galaktozun geri kazanımı

Çizelge 4.16 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda mannoz ve arabinozun geri kazanımı

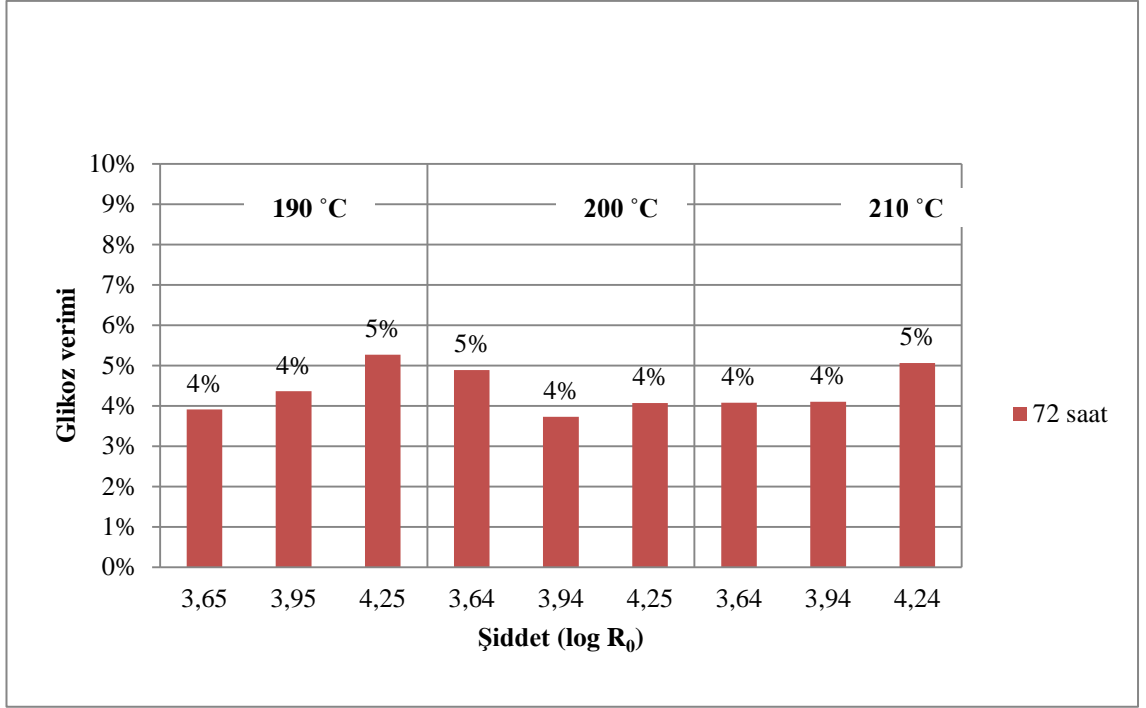
Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	Katı Kısımda Mannoz ve Arabinozun Geri Kazanımı (%)
190	10	3.65	0.0
190	20	3.95	0.0
190	40	4.25	0.0
200	5	3.64	0.0
200	10	3.94	95.1
200	20	4.25	91.8
210	2.5	3.64	97.3
210	5	3.94	0.0
210	10	4.24	0.0



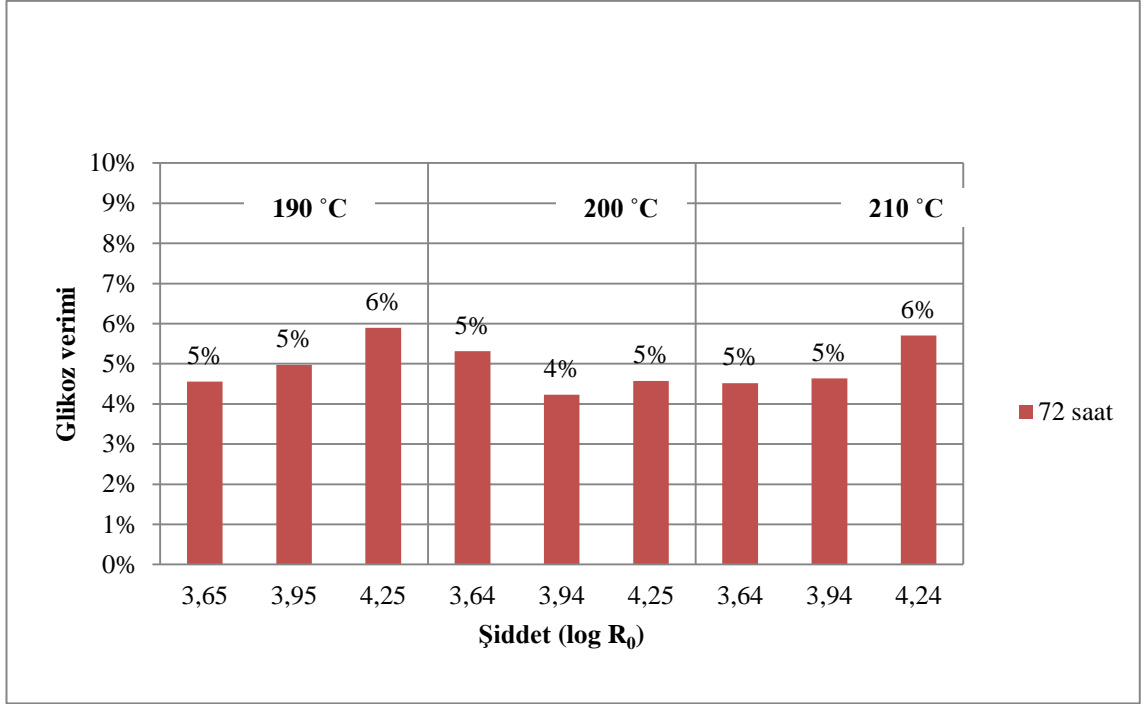
Şekil 4.16 Çam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda mannoz ve arabinozun geri kazanımı

4.2.3 Enzimatik hidroliz

20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde elde edilen % glikoz veriminin oldukça düşük olduğu (% 4-5) belirlenmiştir (Şekil 4.17). Enzim konsantrasyonu 2 katına çıkarıldığında da, 72 saat sonundaki glikoz veriminde kayda değer bir artış görülemedi (Şekil 4.18).



Şekil 4.17 Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (*P. sylvestris*) odununun 20 FPU/g glukon Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glikoz verimleri



Şekil 4.18 Farklı koşullarda sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (*P. sylvestris*) odununun 40 FPU/g glukan Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glüköz verimleri

Kumar vd. (2010) tarafından çalışmada, % 4 SO₂ muamelesi sonrası 200 °C'de 5 dakika (log R₀:3.64) buhar patlatma ön işleme uygulanan çam örnekleri 20 FPU/g selüloz konsantrasyonunda selülaz enzimi ile hidroliz edilmiş ve % 67 oranında glüköz dönüşümü elde edilmiştir.

Gerek ön işleme sağlanan % çözülme oranlarının çok düşük olması ve ön işleme en duyarlı bileşen olan hemiselülozun ön işleme tam olarak uzaklaştırılamamış olması, gerekse enzimatik hidrolizle elde edilen glüköz verimlerinin yok denecek kadar olması seçilen ön işlem yönteminin ve koşullarının sarıçam odunu için uygun olmadığını göstermektedir.

Yumuşak odunlu ağaçlarda, ön işlem koşullarının, lignin ve hemiselüloz bileşenlerini selülozdan ayıracak, aynı zamanda tüm karbohidratların geri kazanımını maksimuma çıkaracak ve hemiselüloz şekerlerinin fermantasyon inhibitörlerine dönüşümünü en aza

indirecek şekilde optimize edilmesi oldukça güçtür (Chandra vd. 2007). Yumuşak odunlu ağaçlar, genel olarak, sert odunlu ağaçlar ve tarımsal atıklara oranla daha dayanıklı yapıda olup, daha fazla lignin içermektedirler. Ayrıca, asetilenmiş grupları sert odunlulardan daha düşük olması sebebiyle, otohizoliz aynı ölçüde gerçekleşmemektedir. Bu nedenle, asitle katalizlenen buhar ön işleme en uygun ön işlem metodu olarak görülmektedir (Galbe ve Zacchi 2002). Yumuşak yapılu odunların SO_2 ya da H_2SO_4 katalizörlüğünde buhar ile ön işleme, en fazla araştırılmış ön işlem yöntemidir (Tengborg vd. 1998, Söderström vd. 2003b, Kumar vd. 2010). Sıcak su ile ön işlem yöntemi ise, otohizolize dayanmaktadır. Ön işlem süresince, hemiselülozdan açığa çıkan asetik asit ve diğer organik asitler, hemiselülozun asit katalizli hidrolizini ve çözünmesini sağlamaktadırlar (Kim vd. 2009b, Kim vd. 2014). Diğer bir deyişle, hemiselülozun yapısında bulunan asetik asit yan grupları, ön işlem süresince bir katalizör gibi rol oynamaktadır (Bura vd. 2009). Katalizör kullanılmadan gerçekleştirilen sıcak su ile ön işlem yönteminin çam odununda etkili olmamasının sebebinin, çamın düşük asetil içeriği ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sarıçam (*P. sylvestris*) odunu için Parr reaktörde en uygun sıcak su ile ön işlem koşulunu belirleyebilmek için yapılan denemeler sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde, oldukça düşük glikoz verimleri elde edilmiştir. Parr reaktörde gerçekleştirilen ön işlemler sonrası elde edilen glikoz verimleri (% 4-5, enzim konsantrasyonu: 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec2), *P. banksiana* çam odununa uygulanan sıcak su ile ön işlem yöntemi ile elde edilen enzimatik hidroliz verimlerinden (% 9-16, enzim konsantrasyonu: 20 FPU/g glukoz Cellic Ctec2) de daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu sonucun, *P. banksiana* çam odununa uygulanan sıcak su ile muamele ön işlem yönteminin, hemiselüloz şekerlerini uzaklaştırmada etkili olması, ancak *P. sylvestris* çam odununa Parr reaktörde uygulanan ön işlem yönteminde ksilanın uzaklaşmaması ve neredeyse tamamının suda çözünmeyen katı kısımda kalmış olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durumda, her iki ön işlem sisteminde de tatmin edici sonuçlar elde edilememiş olmasına karşın, akışkanlaştırılmış kum banyosu içerisinde gerçekleştirilen sıcak su ile ön işlem sisteminin, Parr reaktör sistemine kıyasla ısı iletimi yönünden daha avantajlı olduğu söylenebilir.

Denenen tüm ön işlem koşullarında gerek glikoz verimlerinin gerekse uzaklaşan hemiselüloz oranlarının düşük olması sebebiyle, sarıçam için optimum ön işlem koşullarını net olarak belirtmek güçtür. Bu nedenle, en yüksek toplam biyokütle çözülme oranının (% 9) ve glukun miktarının (% 39.7) sağlandığı, 200 °C’de 20 dakika ön işlem en uygun ön işlem koşulu olarak seçilmiştir.

4.3 *P. sylvestris* Çam Odununun Sıcak Su ile Muamele Ön İşlem Etkinliğini Arttırmaya Yönelik Denemeler

Parr reaktörde yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen ön işlem yöntemi, 200 °C’de 2 farklı sürede (20 ve 30 dakika), 3 farklı biyokütle konsantrasyonunda (% 5, 10, 15, w/w) ve 3 farklı partikül büyüklüğünde (500-850 µm, 363-500 µm, <363 µm) gerçekleştirilen denemeler ile geliştirilmeye çalışılmıştır.

4.3.1 Bileşim analizleri

Sarıçam odununa farklı koşullarda uygulanan ön işlem sonrasında elde edilen katı kısmın glukun ve lignin içerikleri, çizelge 4.17 ve 4.18’de verilmiştir. 200 °C’de 20 ve 30 dakikada gerçekleştirilen ön işlemler sonunda, glukun ve lignin miktarlarında önemli bir farklılık belirlenmemiştir.

Çizelge 4.17 Sıcak su ile ön işlem uygulanmış sarıçam (*P. sylvestris*) odununun bileşimi (200 °C-20 dakika/200 °C-30 dakika; % 15 kuru madde, w/w)

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Şiddet (log R ₀)	% kuru madde (w/w)	Glukun (%)	Asitte Çözünmeyen Lignin (%)	Asitte Çözünen Lignin (%)
200	20	4.25	15	37.8	33.0	4.8
200	30	4.42	15	35.0	33.8	4.7

Ön işlemde biyokütle konsantrasyonu arttıkça, glukun ve ligninin miktarının oransal olarak azaldığı görülmektedir. Katı madde oranının artmasıyla birlikte, ısı ve kütle

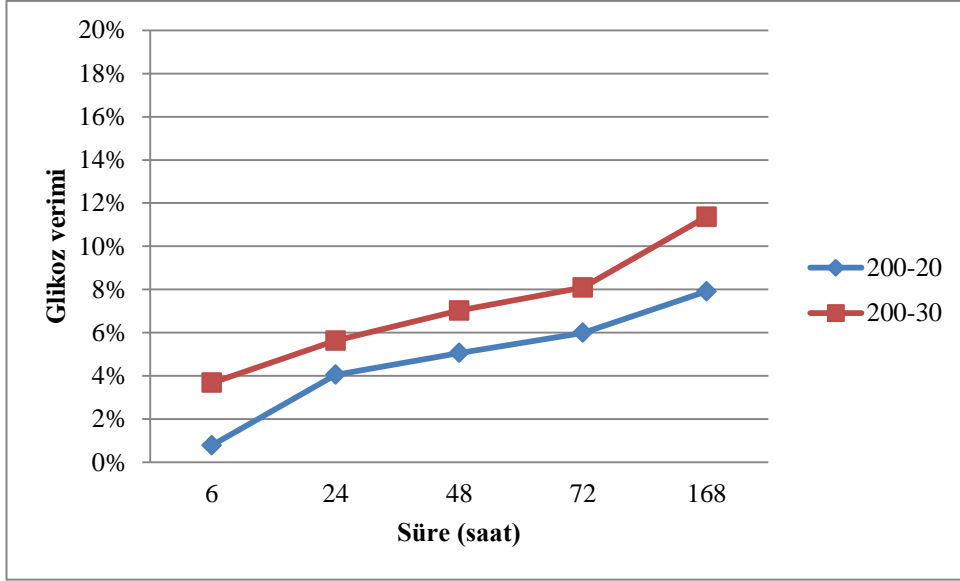
transferinin zorlaşması ve ön işlemin etkinliğinin azalması beklenen bir durumdur (Modenbach ve Nokes 2012). Bu nedenle, kuru madde miktarının düşük olduğu (% 5) denemelerde, daha yüksek oranda hemiselüloz uzaklaşmış ve gluklan ile ligninin miktarları oransal olarak artmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 Farklı biyokütle konsantrasyonlarında, 200 °C’de 30 dakika süresince sıcak su ile ön işleme tabi tutulmuş çam (*P. sylvestris*) odununun bileşimi (Sıcaklık 200 °C, Süre 30 dakika ve Şiddet 4.42 log R₀)

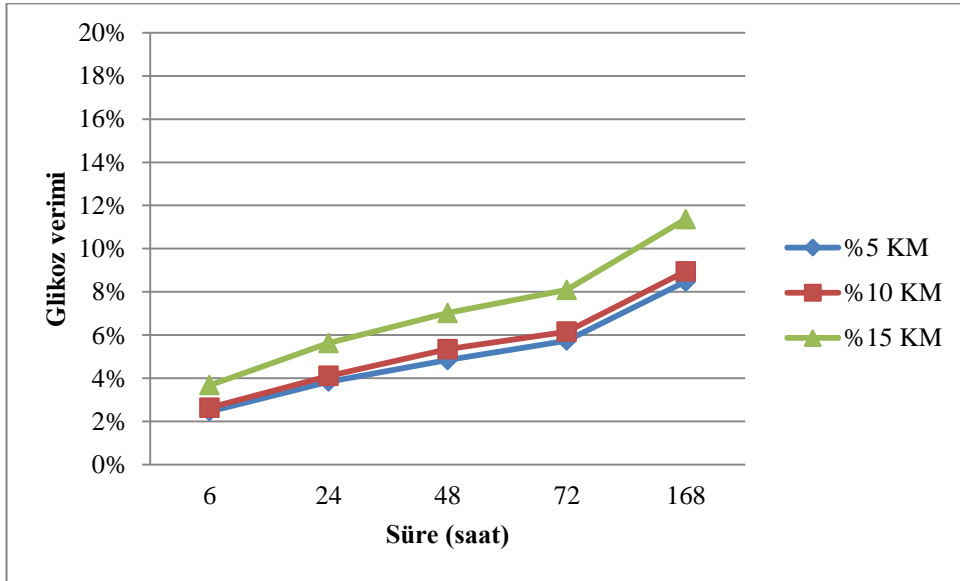
% kuru madde (w/w)	Glukan (%)	Asitte Çözünmeyen Lignin (%)	Asitte Çözünen Lignin (%)
5	44.8	34.7	4.5
10	41.3	34.7	4.8
15	35.0	33.8	4.7

4.3.2 Enzimatik hidroliz denemeleri

200 °C-20 dakika ve 200 °C-30 dakika ön işlem uygulanan örneklerin, 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile hidrolizi sonucu elde edilen % glikoz verimleri şekil 4.19’da verilmiştir. 168 saat sonunda 200 °C-20 dakika ve 200 °C-30 dakika ön işlem uygulanan örnekler için % glikoz verimleri, sırasıyla, % 8 ve % 11 olarak hesaplanmıştır. Genel olarak elde edilen glikoz verimleri oldukça düşük olmasına karşın, kısmen de olsa, 200 °C-20 dakika ön işlem koşuluna kıyasla, daha yüksek oranda dönüşümün sağlandığı 200 °C-30 dakika ön işlem koşulu seçilerek, diğer denemeler bu koşullarda gerçekleştirilmiştir.



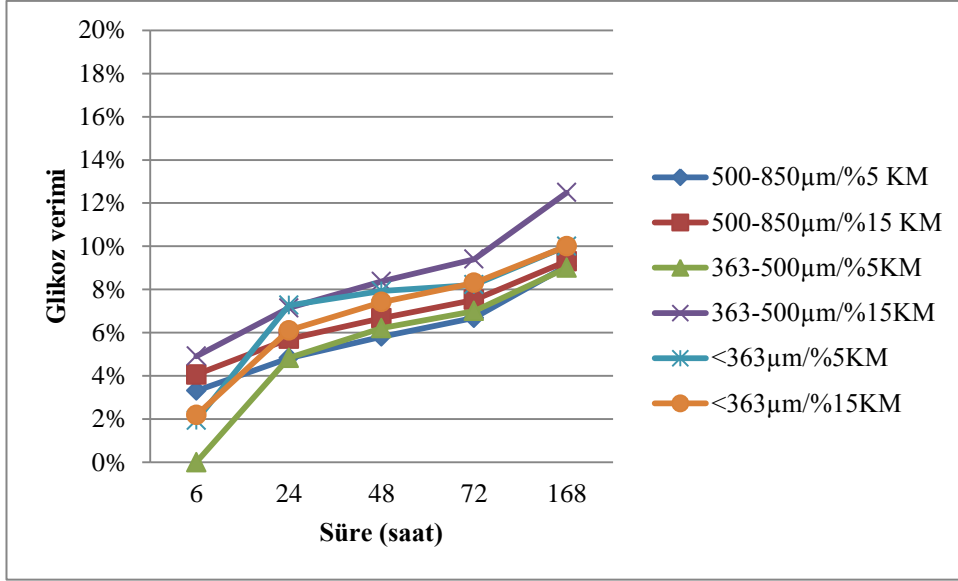
Şekil 4.19 200 °C-20 dakika ve 200 °C-30 dakika ön işlem uygulanan örneklerin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen % glüköz verimleri



Şekil 4.20 % 5, 10 ve 15 (w/w) biyokütle konsantrasyonunda 200 °C-30 dakika ön işlem uygulanan örneklerin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi ile elde edilen % glüköz verimleri

% 5, 10 ve 15 katı madde yüklemesi ile 200 °C'de ve 30 dakikada gerçekleştirilen ön işlem denemeleri sonucunda elde edilen katı kısım, 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile hidroliz edilmiş ve 6, 24, 48, 72, 168 saat sonunda hesaplanan % glikoz verimleri, şekil 4.20'de gösterilmiştir. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi, farklı biyokütle konsantrasyonlarında ön işleme tabi tutulan sarıçam örneklerinin enzimatik hidrolizi, çok benzer bir seyir izlemiştir. Yalnızca, ön işlemde kullanılan biyokütle konsantrasyonu arttıkça, kayda değer olmasa da, % glikoz veriminde bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak, % 15 katı madde oranında 200 °C'de 30 dakikada gerçekleştirilen ön işlem denemeleri sonucunda elde edilen % 11 glikoz verimi de, oldukça düşük bir dönüşüm oranıdır.

Partikül boyutunun küçük olmasının biyokütlenin enzimatik olarak parçalanmasını kolaylaştırdığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Dasari ve Berson 2007, Yeh vd. 2010). Bu nedenle, partikül boyutunun ön işlem ve enzimatik hidroliz verimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, 2.5 mm boyutundaki odun parçacıkları ikinci bir öğütme işleminden geçirildikten sonra, 3 farklı partikül boyutunda olacak şekilde ayrılan odun talaşları (500-850 µm, 363-500 µm, <363 µm) ile denemeler gerçekleştirilmiştir. 3 farklı boyutta elde edilen odun talaşları, 200 °C'de 30 dakikada ve % 5-15 katı madde miktarlarında ön işleme tabi tutulmuşlardır. Ön işlem sonrası ayrılan katı kısımların, 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz denemeleri sonunda elde edilen % glikoz verimleri şekil 4.21'de gösterilmiştir. Farklı partikül iriliğine sahip çam örnekleri ile farklı biyokütle oranlarında gerçekleştirilen denemelerde, 168 saatlik enzimatik hidroliz profillerinin benzer seyirde ilerlediği sonucuna varılmıştır. Partikül boyutunun küçülmesiyle, % glikoz verimlerinde önemli bir artış belirlenmemiştir.

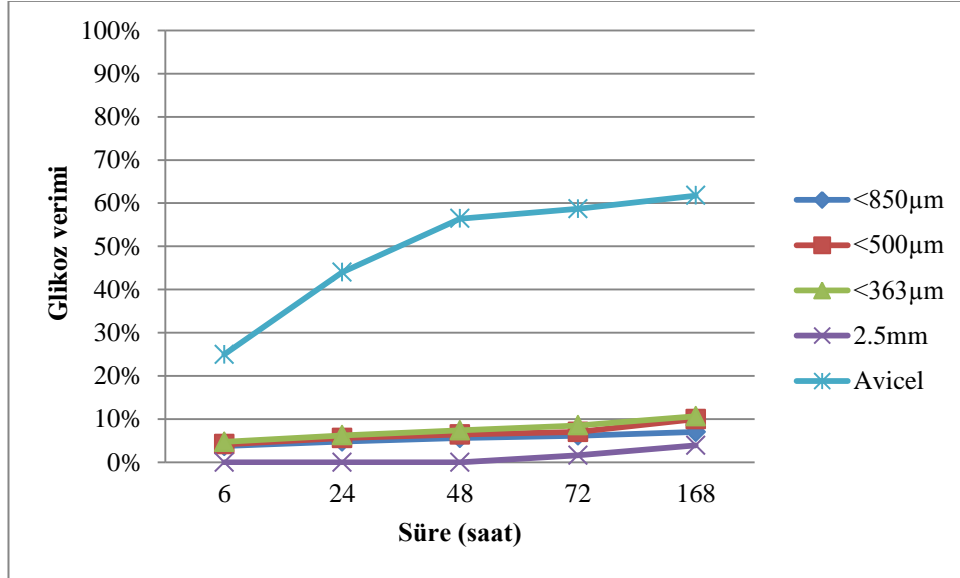


Şekil 4.21 % 5, 15 katı madde yüklemesi ile farklı partikül büyüklüğüne sahip örneklerin 200 °C-30 dakikada ön işlemi sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidrolizi ile elde edilen % glüköz verimleri

Kullanılan ön işlem yönteminin etkinliğini kontrol amacıyla, farklı partikül boyutuna sahip, ön işlem uygulanmamış sarıçam odunu örnekleri, aynı hidroliz koşullarında enzimatik olarak hidroliz edilmişlerdir. Şekil 4.22’de görüldüğü gibi, partikül boyutu küçüldükçe, % glüköz verimi artmaktadır. <2.5 mm partikül boyutundaki odun örneklerinde glüköz dönüşümü neredeyse hiç gerçekleşmemiş; yalnızca, 72 ve 168. saatlerde, sırasıyla % 2, % 4 oranında glüköz verimleri hesaplanmıştır. Ön işlem uygulanmamış kontrol örneklerinde elde edilen glüköz verimi, ön işlem uygulanmış örneklerdeki verimler ile (Şekil 4.21) neredeyse aynı düzeydedir. Bu durum, seçilen ön işlem yönteminin ve koşullarının sarıçam odunu için uygun olmadığını net bir biçimde ortaya koymaktadır.

Kullanılan enzimin aktivitesi ile ilgili bir problem olup olmadığını belirlemek için, kontrol olarak, mikro kristalli saf selüloz olan Avicel Ph101’in hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, substrat olarak çam odunu yerine saf selüloz kullanımı ile de, enzim hidrolizini etkileyen substrat kaynaklı etkenler elemine edilmiştir. Hidroliz işlemi, % 2 avicel içeren ortamda 20 FPU/g avicel Cellic Ctec2 enzimi ile

gerçekleştirilmiş ve 168 saatlik enzimatik hidroliz sonunda % 62 glikoz verimine ulaşılmıştır.



Şekil 4.22 Ön işlem uygulanmamış farklı partikül boyutundaki çam örneklerinin ve avicelin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz sonunda elde edilen % glikoz verimleri

Sonuç olarak; Parr reaktörde yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen ön işlem yöntemini geliştirmeye yönelik yapılan uygulamaların (farklı biyokütle konsantrasyonu, farklı partikül boyutu), sarıçamın enzimatik hidroliz verimini arttırmada etkin bir sonuç vermediği gözlenmiştir.

4.4 *P. sylvestris* Çam Odunu ile Gerçekleştirilen İyonik Sıvı ile Ön İşlem Denemeleri

Parr reaktörde yüksek sıcaklıkta uygulanan ön işlem ile sarıçam için kabul edilebilir düzeylerde glikoz verimi elde edilemediğinden, literatür verilerinde (Li vd. 2010, Wang vd. 2011, Li vd. 2013) yumuşak odunlu bir ağaç olan çam için uygun olduğu belirtilen iyonik sıvı ön işlem metodu kullanılmıştır. Bu yöntemle, biyokütlenin enzimatik hidrolize elverişli hale getirilmesi amaçlanmıştır. Sıcaklık, süre, biyokütlenin tipi ve partikül boyutu, katı/sıvı oranı, nem içeriği gibi ön işleme özgü koşulların, iyonik sıvılar

ile biyokütle arasındaki etkileşimi etkilediği belirtilmektedir (Lopes vd. 2013). Bu çalışmada, ön işlem süresi ve biyokütlenin ön işlem öncesi partikül boyutu gibi parametrelerin, *P. sylvestris* türü çam odununun iyonik sıvı ile ön işlem verimliliğine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 140 °C’de % 5 biyokütle konsantrasyonunda, 3 farklı sürede (15, 30 ve 45 dakika) ve 4 farklı partikül büyüklüğünde (<2.5 mm, 500-850 µm, 363-500 µm, <363 µm) gerçekleştirilen denemeler ile sarıçam için en uygun ön işlem koşulu belirlenmeye çalışılmıştır.

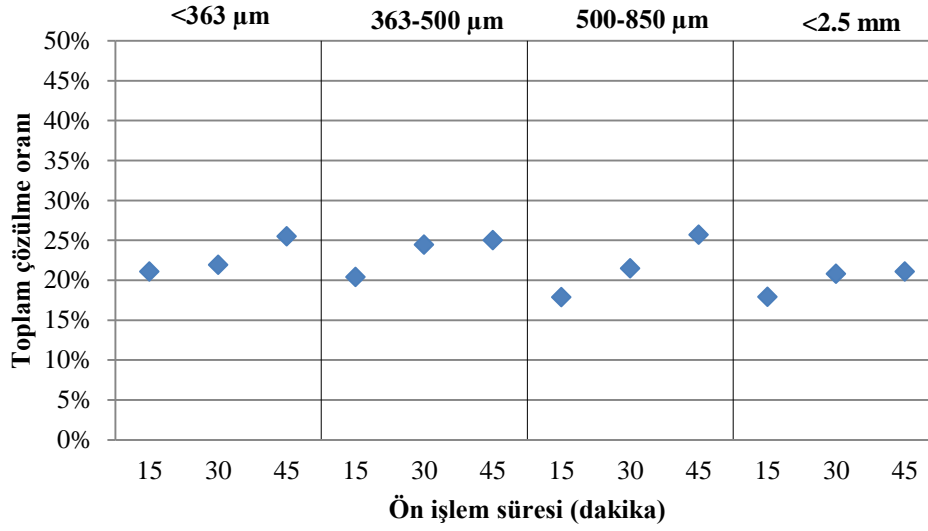
4.4.1 Bileşim analizleri

Sarıçam (*P. sylvestris*) odununa farklı koşullarda EMIMAc iyonik sıvısı ile uygulanan ön işlem sonrasında elde edilen katı kısmın glukan ve lignin içerikleri, çizelge 4.19’da verilmiştir. Genel olarak, en büyük partikül büyüklüğüne sahip örnekler (<2.5 mm) haricinde, ön işlem süresi uzadıkça % glukan miktarının arttığı, % lignin miktarının ise neredeyse aynı kaldığı görülmektedir.

Çizelge 4.19 Farklı koşullarda EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulmuş sarıçam (*P. sylvestris*) odununun bileşimi (% kuru madde (w/w), 5)

Partikül büyüklüğü	Ön işlem koşulları	Glukan (%)	Asitte Çözünmeyen Lignin (%)
<2.5 mm	140 °C-15 dakika	54.1	17.5
	140 °C-30 dakika	49.8	20.1
	140 °C-45 dakika	38.1	26.7
500-850 µm	140 °C-15 dakika	35.3	28.3
	140 °C-30 dakika	48.2	29.0
	140 °C-45 dakika	48.0	30.0
363-500 µm	140 °C-15 dakika	39.0	30.4
	140 °C-30 dakika	36.8	28.7
	140 °C-45 dakika	43.0	25.0
<363 µm	140 °C-15 dakika	36.2	29.7
	140 °C-30 dakika	33.0	29.7
	140 °C-45 dakika	43.1	29.6

EMIMAc ile ön işlem sonucunda elde edilen toplam çözülme oranları, şekil 4.23’de görüldüğü gibi, % 17.9-25.7 olarak hesaplanmıştır. Li vd. (2013), 160 °C’de 3 saat boyunca iyonik sıvı EMIMAc ile muamele ettikleri çam örneklerinde, katı kısım için % 62.8 oranında geri kazanım elde ettiklerini belirtmişlerdir. Genel olarak, ön işlem süresi uzadıkça, toplam çözülme oranlarında artış gözlenmiştir. Wang vd. (2011), AmimCl iyonik sıvısı ile 100 °C’de % 5 biyokütle konsantrasyonunda ön işleme tabi tuttukları çam odunu örneklerinde, ön işlem süresi uzadıkça biyokütlenin çözülme oranının arttığı belirlemişlerdir. Ön işlem süresi 6 saatten 24 saate çıktığında, çözülme oranı % 19’dan % 26’ya yükselmiştir.

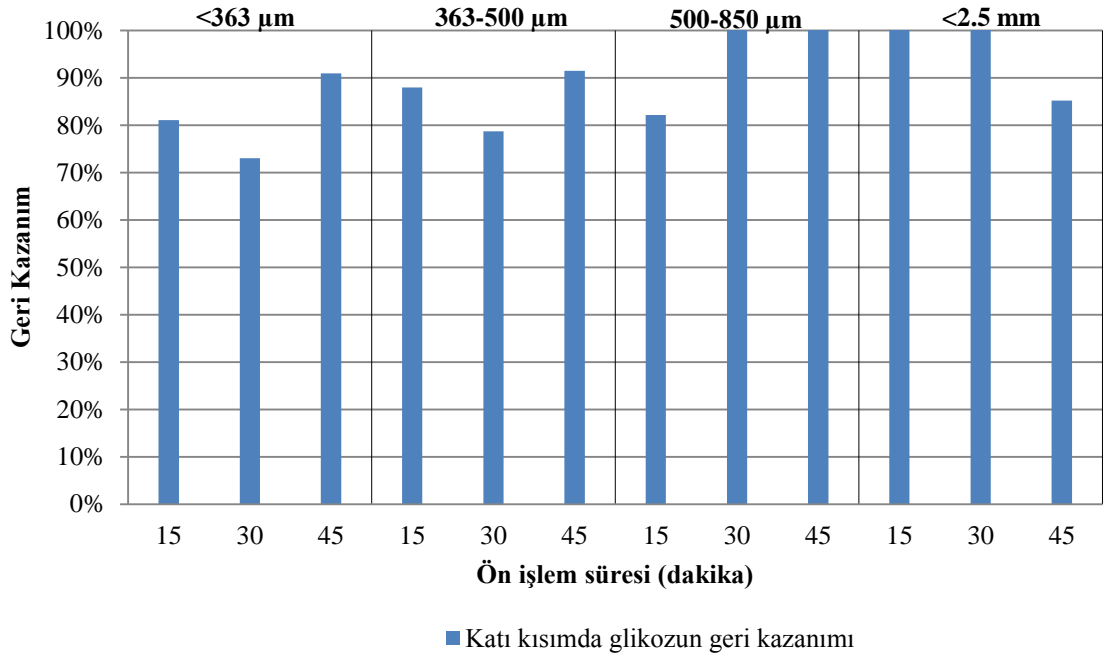


Şekil 4.23 Farklı koşullarda EMIMAc ile ön işlem sonundaki çözülme oranları

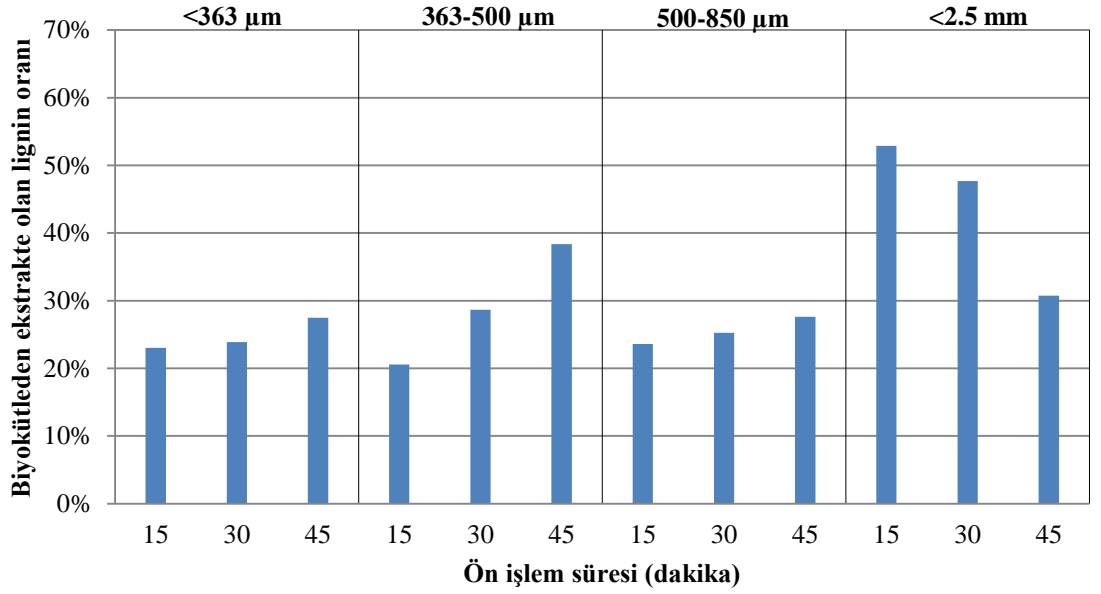
Şekil 4.23’de görüldüğü gibi, ön işlem süresinin aksine, biyokütlenin partikül büyüklüğünün çözülme oranlarına önemli düzeyde etki etmediği sonucuna varılmıştır. Lignoselülozik biyokütlenin partikül boyutu, iyonik sıvının lignoselülozik yapıya difüzyonu ile ilişkili olduğundan, biyokütlenin yapısının bozulmasına etki eden en önemli faktörlerden biridir. Büyük partikül boyutundaki biyokütlerde, klorür bazlı iyonik sıvıların düşük çözme kapasitesine sahip oldukları belirtilmektedir (Bahcegul vd. 2012). Ancak, Sun vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, sarıçam odunun partikül boyutunun artırılmasıyla, EMIMAc iyonik sıvısının biyokütleyi çözündürmedeki etkinliğinde kayda değer bir azalma görülmemiştir. Sarıçamın partikül büyüklüğü <0.125 mm’den 0.5-1.0 mm’ye artırıldığında, biyokütlenin toplam çözülme oranı, sadece, % 99’dan % 93’e düşmüştür. EMIMAc iyonik sıvısının bu özelliğinin, asetat anyonun yüksek alkalilik özelliğinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Sun vd. 2009). Bu çalışmada da, özellikle <363 µm, 363-500 µm ve 500-850 µm partikül boyutundaki odun örneklerinin EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işlemi sonucunda, neredeyse aynı oranlarda çözülme gerçekleşmiş, yalnızca en büyük partikül boyutuna sahip örneklerde çok düşük düzeyde bir azalma belirlenmiştir. Viell ve Marquardt (2011), partikül boyutunun odunun EMIMAc iyonik sıvısında zamana bağlı olarak çözülmesi üzerine etkisini araştırmışlar ve ön işlemin başlangıç aşamalarında, küçük odun partiküllerinin

büyük olanlara kıyasla daha hızlı parçalandığını belirlemişlerdir. Ancak, uzun ön işlem uygulamalarında farklı partikül boyutundaki örneklerde benzer çözülme oranları gözlenmiştir. Bu çalışmada da, şekil 4.23'de görüldüğü gibi benzer sonuçlar elde edildiği söylenebilir.

EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işlemin sarıçam odununun yapısı üzerine etkisini ortaya koymak için, ön işlem uygulanmamış biyokütleden ön işlem ile ekstrakte olan lignin oranları hesaplanmıştır (Şekil 4.25). İyonik sıvı ön işlemi ile biyokütleden ekstrakte olan lignin oranlarının, partikül büyüklüğü ve ön işlem süresine göre değişkenlik göstermekle birlikte, genel olarak, % 21 ile % 53 aralığında seyrettiği belirlenmiştir. Haykir vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, pamuk sapının EMIMAc ile 150 °C'de 30 dakika ön işlemi sonunda ligninin % 45'inin uzaklaştığı belirtilmiştir. En büyük partikül büyüklüğüne sahip biyokütle örnekleri (<2.5 mm) hariç tutulacak olursa, ön işlem süresi uzadıkça biyokütleden uzaklaşan lignin miktarının arttığı görülmektedir. Aksine, <2.5 mm boyutundaki çam odunu örneklerinde, ön işlem süresi uzadıkça biyokütleden uzaklaşan lignin miktarının azaldığı belirlenmiştir. Ligninin en yüksek oranda uzaklaştığı örnekler ise, en büyük partikül büyüklüğüne sahip biyokütle örneklerinin (<2.5 mm) 140 °C'de 15 ve 30 dakika ön işleme tabi tutulmasıyla elde edilmiştir. Çizelge 4.19 ve şekil 4.24'de görüldüğü gibi, bu koşullarda ön işleme tabi tutulmuş biyokütle örneklerinin % glukan ve katı kısımda glikozun geri kazanım oranlarının diğer örneklere kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, daha yüksek oranda ligninin uzaklaşması nedeniyle glukanın oransal olarak artışı şeklinde açıklanabilmektedir. Ancak, biyokütlenin partikül büyüklüğünün, iyonik sıvı ile ön işlem sonrasında sarıçam odununun bileşimi üzerine etkisini genel olarak yorumlamak mümkün olmamıştır.



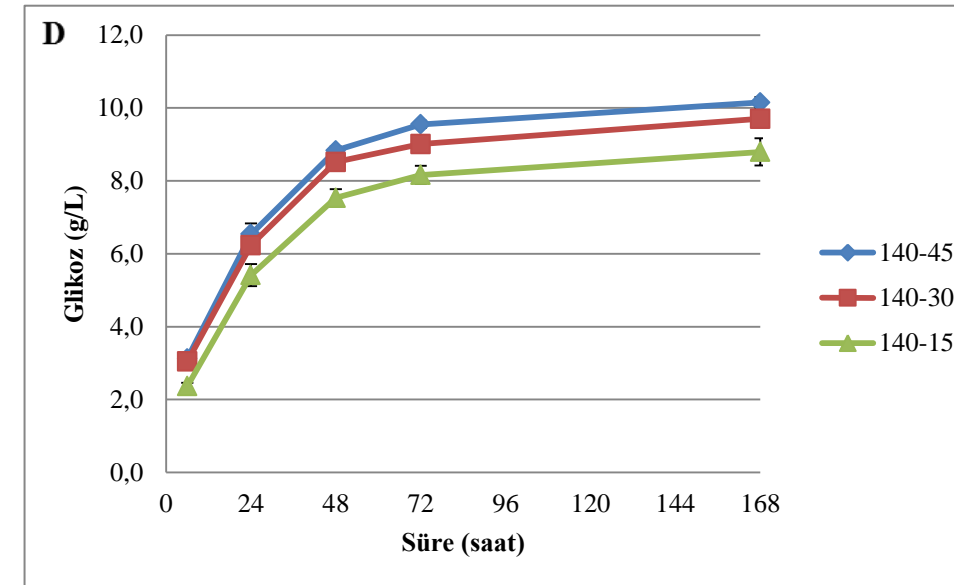
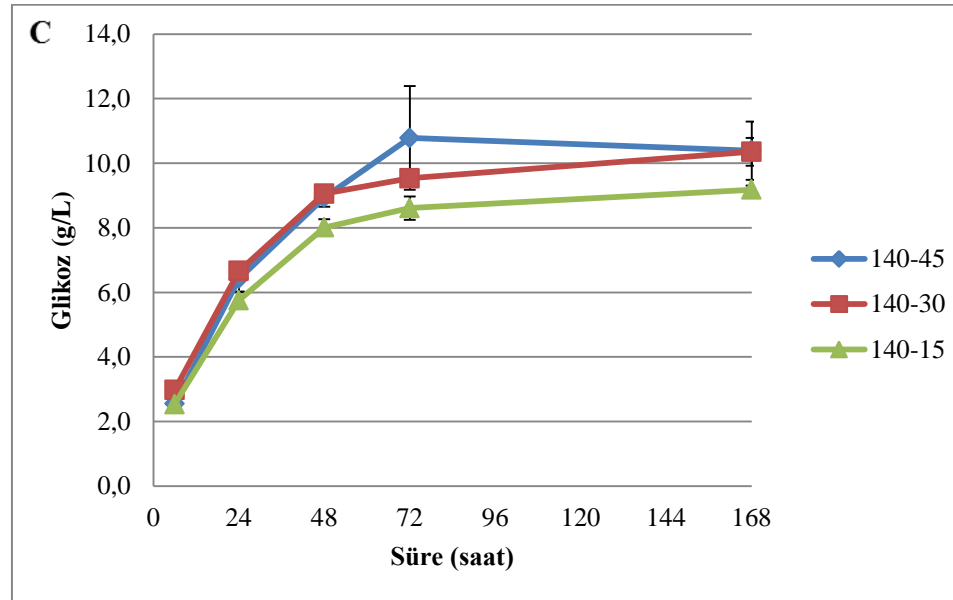
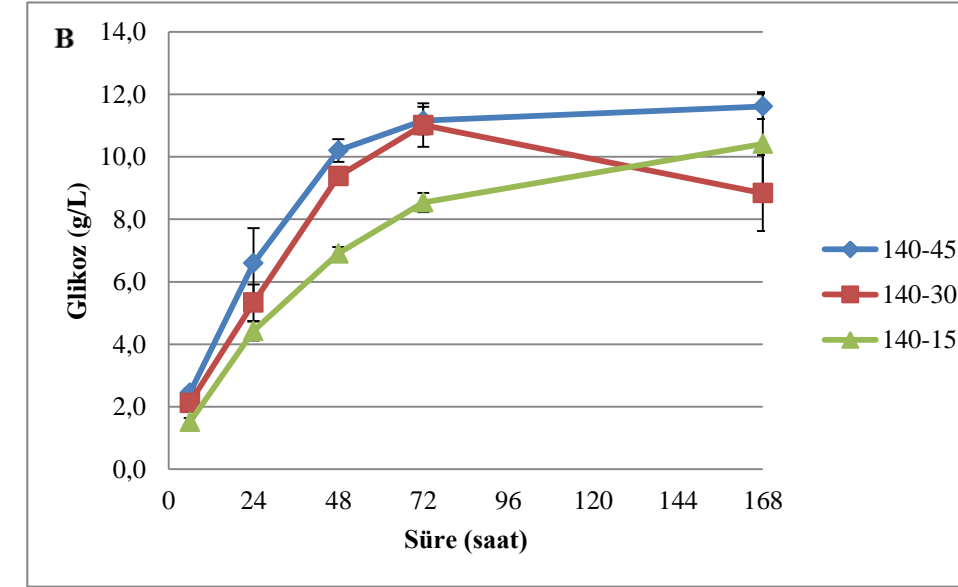
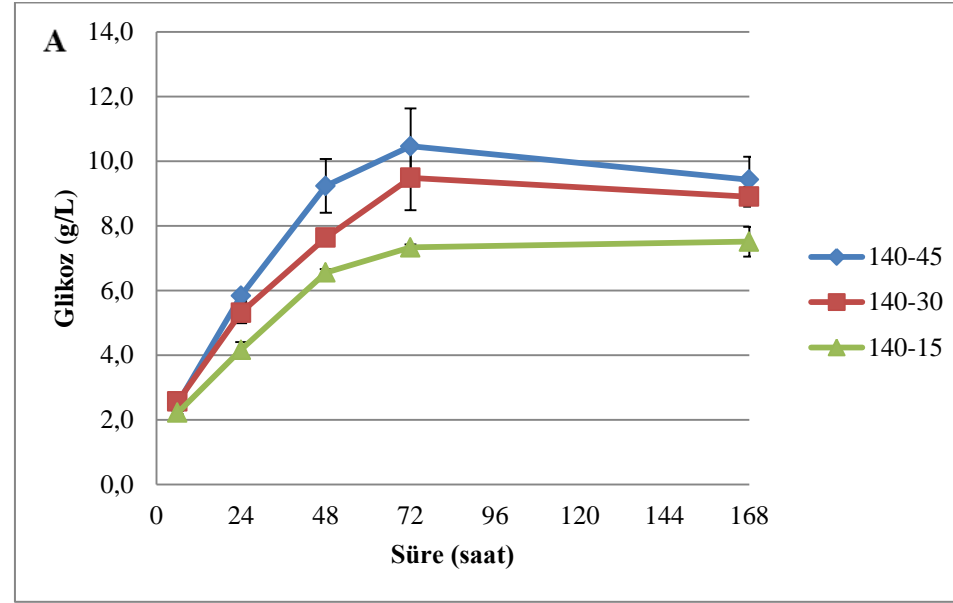
Şekil 4.24 Farklı koşullarda EMIMAc ile ön işlem sonunda glikozun geri kazanımı



Şekil 4.25 Farklı koşullarda EMIMAc ile ön işlem sonunda biyokütleden ekstrakte olan lignin oranı

4.4.2 Enzimatik hidroliz denemeleri

Sarıçam odununun EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme için en uygun koşulları belirlemek amacıyla, 140 °C'de % 5 biyokütle konsantrasyonunda, 3 farklı sürede (15, 30 ve 45 dakika) ve 4 farklı partikül büyüklüğünde (<2.5 mm, 500-850 µm, 363-500 µm, <363 µm) ön işlem denemeleri gerçekleştirilmiştir. Biyokütlenin EMIMAc ile ön işleme tabi tutulması ile elde edilen katı kısım, 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile hidroliz edilmiş ve 6, 24, 48, 72 ve 168 saat sonunda belirlenen glikoz miktarları (g/L) şekil 4.26' da gösterilmiştir. Denenen tüm partikül boyutlarında, ön işlem süresi arttıkça, açığa çıkan glikoz miktarının arttığı gözlenmektedir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26.a. EMIMAc ile farklı sürelerde ön işleme tabi tutulan <2.5 mm, b. 500-850 μm, c. 363-500 μm, d. <363 μm partikül büyüklüğündeki çam odunu örneklerinin 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen glikoz miktarları (g/L)

Denenen ön işlem koşulları içerisinde en uygun süre ve partikül büyüklüğünü seçebilmek için, biyokütlenin glikoza dönüşüm oranı (%) aşağıda belirtilen eşitlik ile hesaplanmıştır:

Biyokütlenin glikoza dönüşüm oranı (%);

$$\frac{C_{\text{glikoz}}}{C_{\text{biyokütle}}} \times 100$$

C_{glikoz} : Enzimatik hidrolizattaki glikoz konsantrasyonu (g/L)

$C_{\text{biyokütle}}$: Enzimatik hidrolize tabi tutulacak olan biyokütlenin hidroliz tamponundaki başlangıç konsantrasyonu (g/L)

Farklı koşullarda EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan biyokütle örneklerinin bileşimi incelendiğinde, sonuçların çok tutarlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, sarıçam için uygun ön işlem koşulunun seçiminde % glikoz verimi yerine biyokütlenin glikoza dönüşüm oranı (%) esas alınmıştır. Her bir ön işlem koşulu için hesaplanan biyokütlenin glikoza dönüşüm oranı (%) verileri çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20 Partikül büyüklüğü ve ön işlem süresinin biyokütlenin glikoza dönüşüm oranına (%) etkisi

Partikül büyüklüğü	Ön işlem koşulları	Glikoza dönüşüm oranı (%)				
		Süre (saat)				
		6	24	48	72	168
<2.5 mm	140 °C-15 dakika	11	21	33	37 ^{Bc*}	38
	140 °C-30 dakika	13	27	38	47 ^{Bb}	44
	140 °C-45 dakika	13	29	46	53 ^{Ba}	48
500-850 µm	140 °C-15 dakika	8	22	35	43 ^{Ac}	52
	140 °C-30 dakika	11	27	47	55 ^{Ab}	44
	140 °C-45 dakika	12	33	51	56^{Aa}	58
363-500 µm	140 °C-15 dakika	13	29	40	43 ^{ABc}	46
	140 °C-30 dakika	15	33	45	48 ^{ABb}	52
	140 °C-45 dakika	13	32	45	54 ^{ABa}	52
<363 µm	140 °C-15 dakika	12	27	38	41 ^{Bc}	44
	140 °C-30 dakika	15	31	43	45 ^{Bb}	50
	140 °C-45 dakika	16	33	44	48 ^{Ba}	51

**A, B* Farklı büyük harflerle gösterilen değerler, partikül büyüklükleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05).

**a, b* Farklı küçük harflerle gösterilen değerler, ön işlem süreleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05).

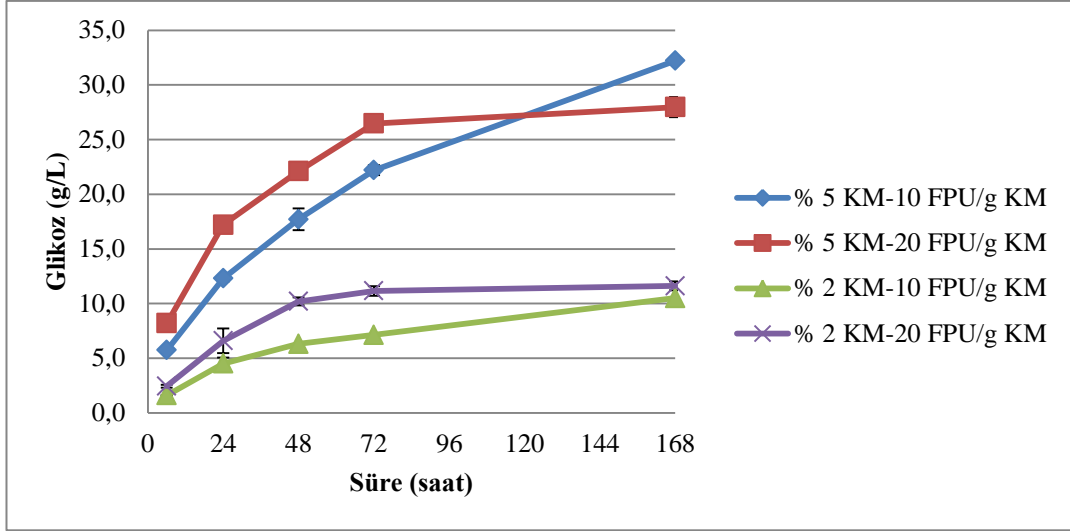
Yapılan varyans analizinde, 72 saatlik enzimatik hidroliz ile biyokütlenin glikoza dönüşüm oranı (%) üzerine partikül büyüklüğü ve ön işlem süresi arasındaki interaksiyonun istatistiksel açıdan önemli olmadığı saptanmıştır (p>0.05). Ancak, bu parametreler tek tek ele alındığında, farklı partikül büyüklüğünde ve farklı sürede EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan biyokütle örneklerinin glikoza dönüşüm oranları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0.05). Beklenen şekilde, ön işlem süresi uzadıkça, biyokütlenin glikoza dönüşümü artmıştır (Çizelge 4.20). Farklı partikül boyutları karşılaştırılacak olursa, en büyük partikül büyüklüğüne sahip örnekler haricinde, küçük partiküle sahip biyokütle örneklerinin büyük olanlara kıyasla daha düşük glikoza dönüşüm oranına sahip oldukları belirlenmiştir. En düşük glikoza dönüşüm oranlarına, <2.5 mm ve <363 µm partikül boyutuna sahip biyokütle örneklerinde ulaşılmıştır. Benzer şekilde, Bahcegul vd. (2012), EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan en küçük partikül boyutuna sahip pamuk sapı örneklerinde, enzimatik hidroliz ile en düşük glikoz verimine ulaştıklarını belirtmişlerdir.

Enzimatik hidrolizin 72. saatinde ulaşılan glikoz dönüşüm oranları esas alındığında, Duncan oklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre en yüksek verimin 500-850 μm partikül büyüklüğündeki biyokütle örneklerinin 140 $^{\circ}\text{C}$ 'de 45 dakika ön işleme tabi tutulmasıyla elde edildiği sonucuna varılmıştır. Partikül boyutunun küçük olması, spesifik yüzey alanının yüksek olmasına bağlı olarak, enzimlerin selüloza ulaşmasını kolaylaştırmakta ve biyokütleyi enzimatik hidrolize daha elverişli hale getirmektedir (Alvira vd. 2010). Yapılan pek çok çalışmada da, partikül boyutunun küçülmesinin biyokütlenin enzimatik parçalanmasını arttırdığı gösterilmiştir (Dasari ve Berson 2007, Yeh vd. 2010). Küçük partikül boyutunun enzimatik hidroliz üzerindeki olumlu etkilerini gösteren çalışmaların aksine, büyük partiküle sahip biyokütlenin daha iyi enzimatik parçalanma gösterdiğini ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır (Ballesteros vd. 2000). Boyut küçültme işleminde, substratın boyutunun küçülmesinin yanı sıra, biyokütlenin hidrolize olabilmeye yeteneğini etkileyen diğer substrat özellikleri de değişebilmektedir (Ju vd. 2013).

Lignoselülozik biyokütlenin iyonik sıvılar ile n işleminde, biyokütlenin tamamen ayrışması gerçekleşmese de, enzimatik hidrolize elverişli bir lignoselülozik yapı elde edilebileceği belirtilmiştir (Wu vd. 2011, Haykir ve Bakir 2013). Wu vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, mısır saplaları yüksek biyokütle konsantrasyonunda (% 50, w/w) EMIMAc ile ön işleme tabi tutulduğunda, biyokütlenin tamamı zlmese de, yüksek glikoz verimleri (~ % 80) elde edilmiştir. Aynı çalışmada, biyokütlenin enzimatik parçalanmaya elverişli hale gelmesi için, biyokütleden yüksek oranda ligninin uzaklaşmasının elzem olmadığı, selülozun kristalli yapısının bozulmasının enzimlerin selüloza ulaşmasında en kritik nokta olduğu vurgulanmıştır (Wu vd. 2011). Nitekim bu çalışmada da, çözülme oranları ve ön işlem ile uzaklaşan lignin miktarları çok yüksek olmasa da, biyokütlenin glikoza dönüşüm oranlarının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Biyokütlenin glikoza dönüşüm oranlarının % 37-56 aralığında olması, biyokütledeki selülozun neredeyse tamamının glikoza dönüştüğünü göstermektedir. Çünkü, biyokütleye farklı koşullarda, iyonik sıvı ile uygulanan ön işlemler sonrasındaki glukoz miktarları % 33.0-54.1 olarak bulunmuştur (izelge 4.19).

Hidroliz sıcaklığı ve süresi, pH, enzim dozu, substrat konsantrasyonu gibi koşullar enzimatik hidrolizin verimini etkilemektedir (Canilha vd. 2012). Düşük substrat konsantrasyonu düşük hidroliz hızı ve verimine neden olurken, yüksek enzim dozu da maliyetin artmasına neden olmaktadır. Ancak, inhibisyona neden olabileceğinden, substrat/enzim oranının çok yüksek olmaması gerekmektedir. Hidrolizin ara ve son ürünleri olan, sellobiyoz ve glikoz, selüloz aktivitesini inhibe edebilmektedir (Hamelinck vd. 2005).

Sarıçam odunu için seçilen koşullarda (500-850 µm partikül büyüklüğü, % 5 biyokütle konsantrasyonu, 140 °C'de 45 dakika) EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan örnekler, 2 farklı biyokütle konsantrasyonunda (% 2 ve 5) ve 2 farklı enzim konsantrasyonunda (10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2) hidroliz edilmişlerdir. Hidroliz süresince 6, 24, 48, 72 ve 168 saat sonunda belirlenen glikoz miktarları (g/L) ve biyokütlenin glikoza dönüşüm oranları (%), sırasıyla şekil 4.27 ve çizelge 4.21'de verilmiştir. İncelenen her iki biyokütle konsantrasyonunda da, hidrolizde kullanılan enzim konsantrasyonu arttıkça, açığa çıkan glikoz miktarlarının da arttığı görülmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 EMIMAc ile 140 °C’de 45 dakika ön işleme tabi tutulan 500-850 µm partikül boyutundaki çam odunu örneklerinin 10 FPU/g toplam kuru madde ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile, % 2 ve % 5 biyokütle konsantrasyonunda gerçekleştirilen hidrolizi sonunda elde edilen glikoz miktarları (g/L)

10 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 selülaaz enzimi varlığında, % 5 biyokütle konsantrasyonunda daha yüksek glikoza dönüşüm oranına ulaşılmış; 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 selülaaz enzimi varlığında ise, her iki biyokütle konsantrasyonu için yakın değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.21). Düşük enzim dozunda, düşük biyokütle konsantrasyonu düşük hidroliz verimine neden olmuş, ancak enzim dozunun artmasıyla, bu etki ortadan kalkmıştır.

Çizelge 4.21 Farklı enzimatik hidroliz koşullarının biyokütlenin glikoza dönüşüm oranına (%) etkisi

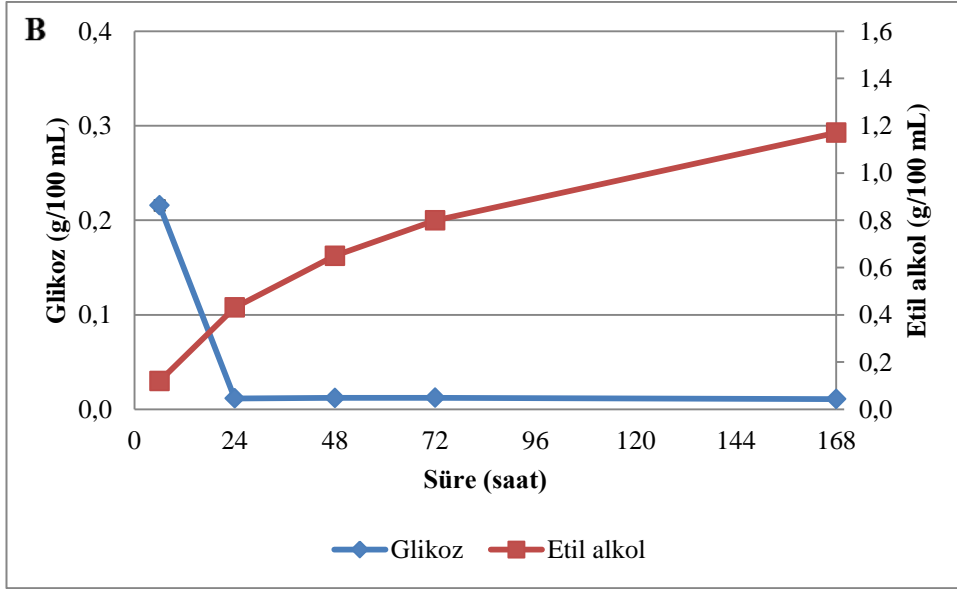
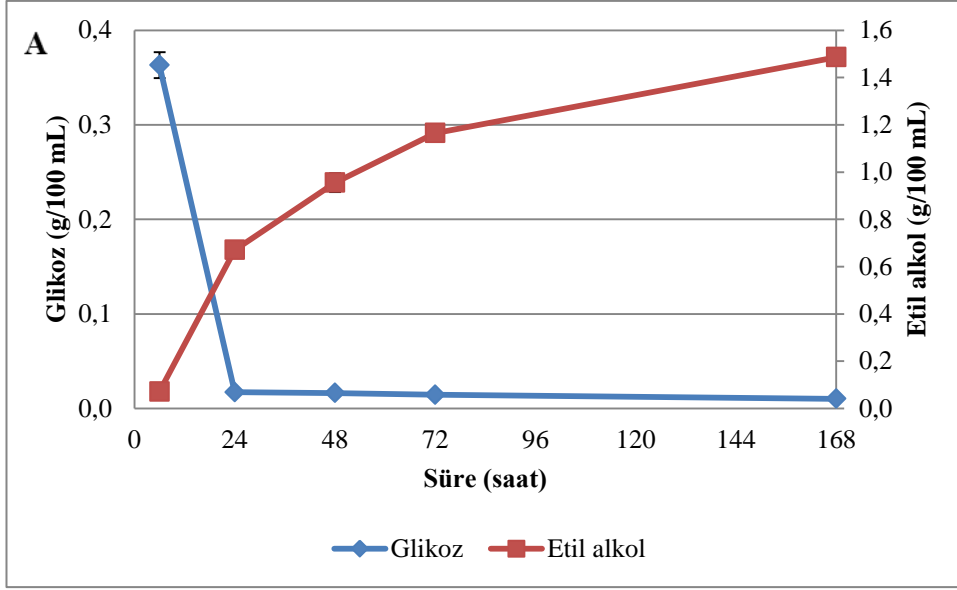
Enzimatik hidroliz koşulları	Glikoza dönüşüm oranı (%)				
	Süre (saat)				
	6	24	48	72	168
% 5 KM-10 FPU/g KM	11	25	35	44	64
% 5 KM-20 FPU/g KM	16	34	44	53	56
% 2 KM-10 FPU/g KM	8	23	32	36	53
% 2 KM-20 FPU/g KM	12	33	51	56	58

4.4.3 Fermantasyon denemeleri

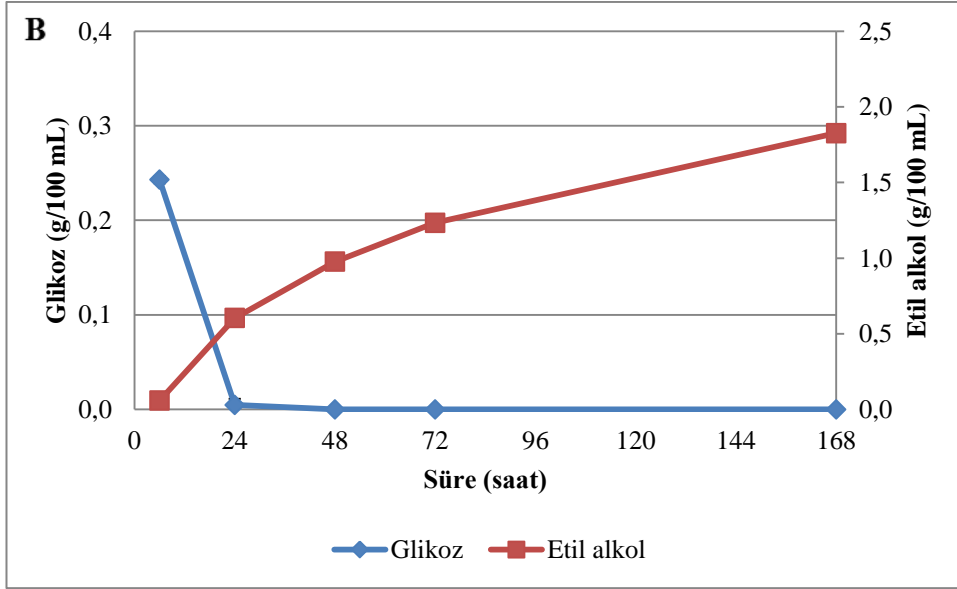
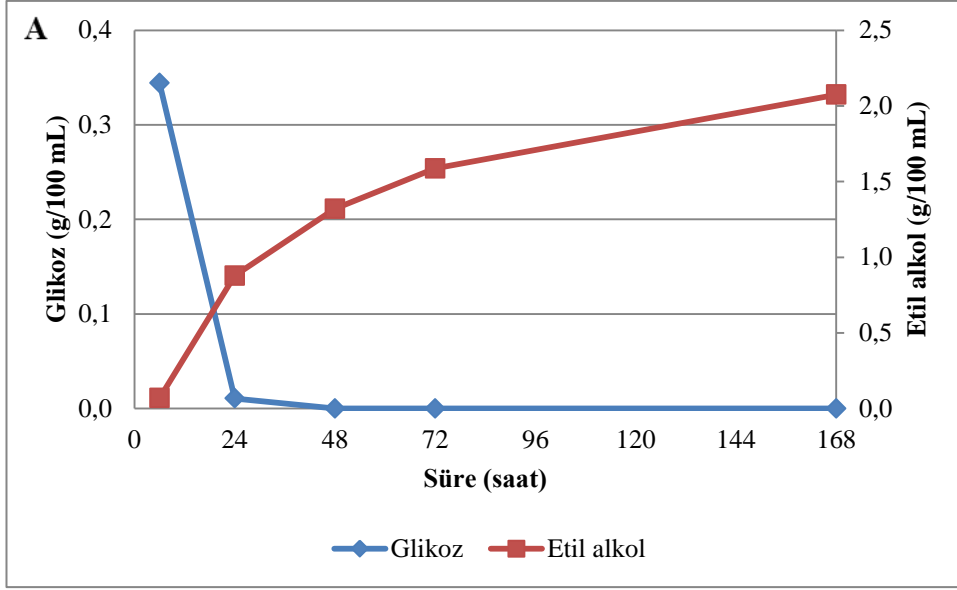
Sarıçam odunu için en uygun koşullar olarak, 500-850 µm partikül büyüklüğündeki biyokütlenin % 5 biyokütle konsantrasyonunda, 140 °C’de 45 dakikada EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme seçilmiştir. Bu nedenle, bu koşullarda ön işleme tabi tutulan biyokütle örneklerinin SSF ve enzimatik hidrolizatın fermantasyonu olmak üzere 2 farklı yöntem ile fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

4.4.3.1 Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF)

SSF denemeleri süresince izlenen glikoz ve etil alkol konsantrasyonları, şekil 4.28 ve 4.29’da verilmiştir. Şekil 4.28.a ve 4.28.b incelenecek olursa, SSF denemelerinde kullanılan enzim miktarı arttırıldığında, fermantasyonun 7. gününde elde edilen etil alkol konsantrasyonlarının da arttığı belirlenmiştir. 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanıldığında, sırasıyla, 1.17 ve 1.49 g/100 mL konsantrasyonda etil alkol üretimi gerçekleşmiştir. Benzer şekilde, α -selüloz ile gerçekleştirilen kontrol denemelerinde 10 ve 20 FPU/g α -selüloz Cellic Ctec2 enzimi kullanıldığında, sırasıyla, 1.83 ve 2.07 g/100 mL etil alkol elde edilmiştir. Genel olarak SSF denemelerinde, glikoz yalnızca 6. saatte tespit edilmiştir. Fermantasyonun ilerleyen aşamalarında, enzimatik hidroliz ile açığa çıkan glikozun, mayalar aracılığıyla etil alkole dönüştüğü görülmektedir.



Şekil 4.28.a. EMIMAc ile 140 °C’de 45 dakika ön işleme tabi tutulan 500-850 µm partikül boyutundaki çam odunu örneklerinin 20 FPU/g toplam kuru madde, b. 10 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen SSF denemeleri süresince belirlenen glüköz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL)

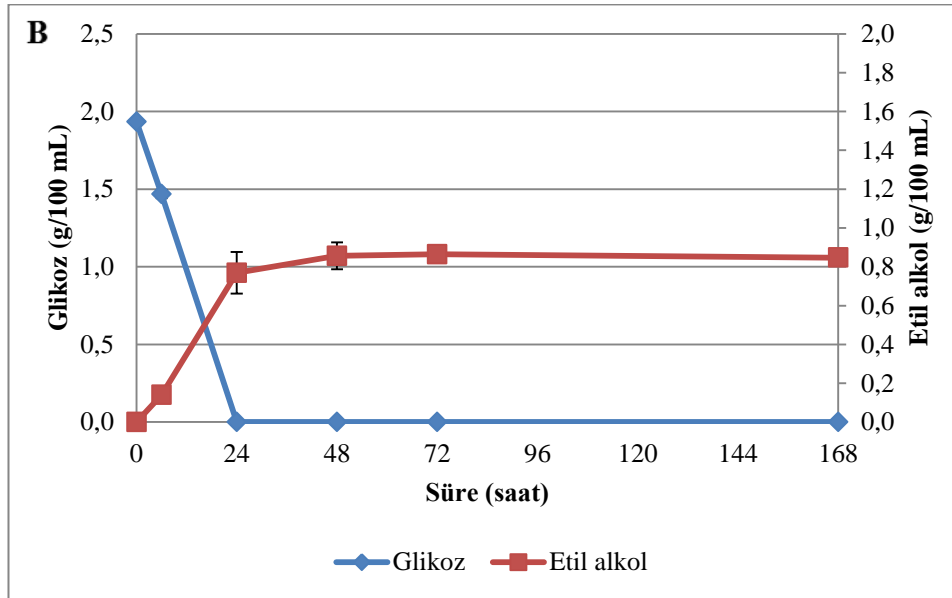
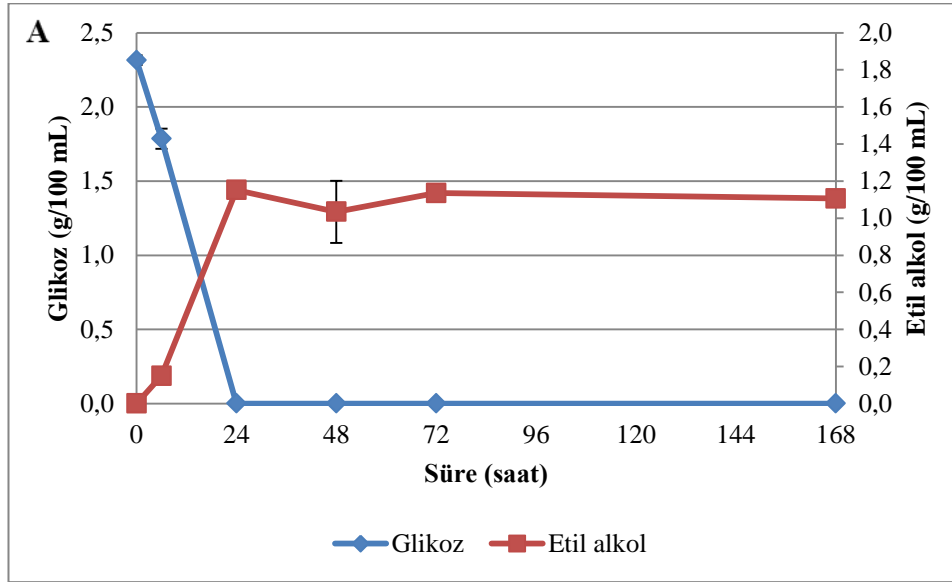


Şekil 4.29.a. EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan α -selülozun 20 FPU/g α -selüloz, b. 10 FPU/g α -selüloz Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen SSF denemeleri süresince belirlenen glukoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL)

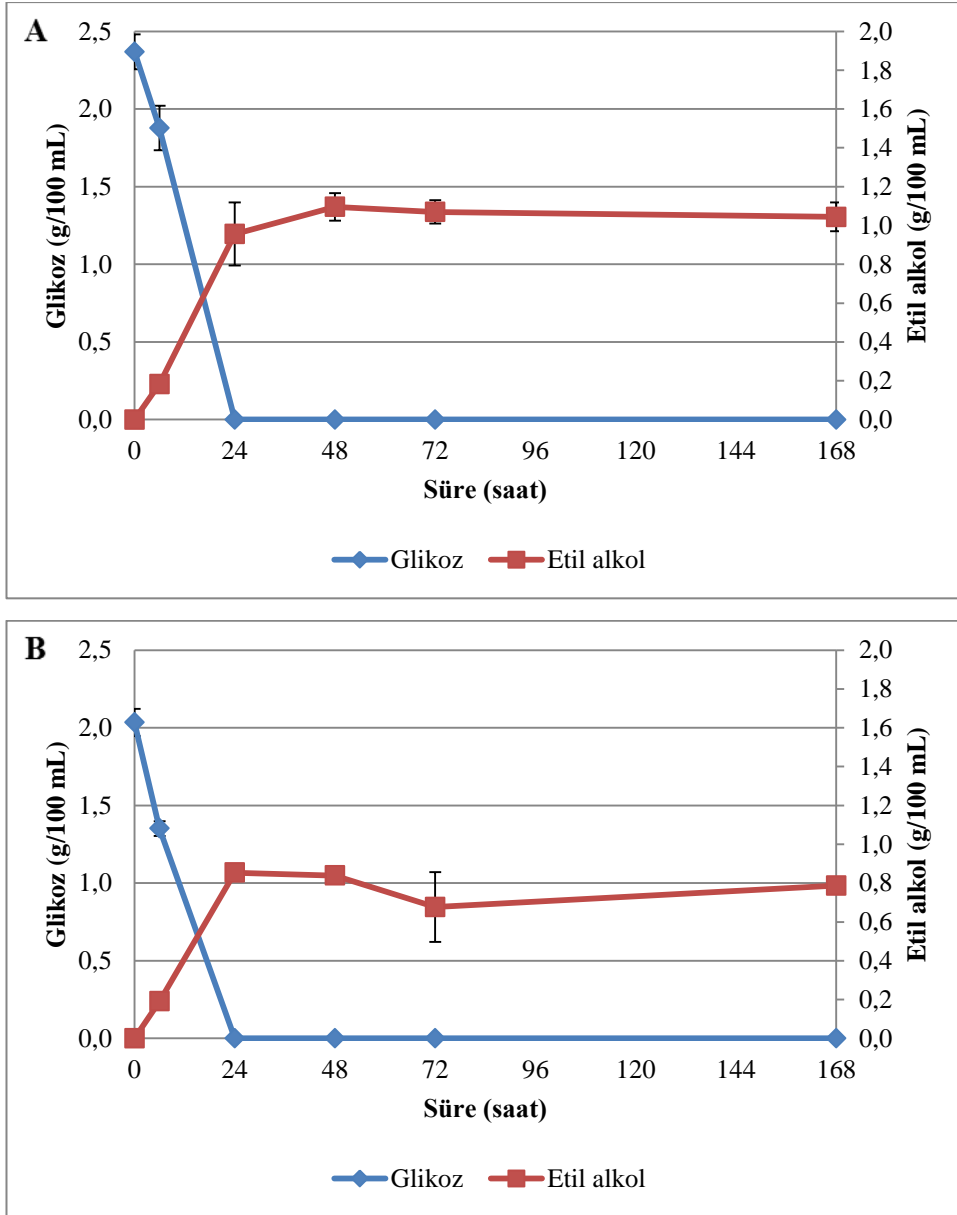
4.4.3.2 Enzimatik hidrolizatın fermantasyonu

EMIMAc ile ön işleme tabi tutulan biyokütle örneklerinin, 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec 2 enzimi ile 72 saatlik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatların

fermantasyonu süresince belirlenen glikoz ve etil alkol miktarları, şekil 4.30'da verilmiştir. Gerek çam odunu ile gerekse α -selüloz ile gerçekleştirilen kontrol denemelerinde (Şekil 4.31), fermentasyonun 24. saatinde glikozun tamamının mayalar tarafından fermente edildiği gözlenmiştir.



Şekil 4.30.a. EMIMAc ile 140 °C'de 45 dakika ön işleme tabi tutulan 500-850 μ m partikül boyutundaki çam odunu örneklerinin 20 FPU/g toplam kuru madde, b. 10 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen 72 saatlik enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatların fermentasyonu süresince belirlenen glikoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL)



Şekil 4.31.a. EMIMAc ile 140 °C’de 45 dakika ön işleme tabi tutulan α -selülozun 20 FPU/g α -selüloz, b. 10 FPU/g α -selüloz Cellic Ctec2 enzimi ile gerçekleştirilen 72 saatlik enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen hidrolizatların fermantasyonu süresince belirlenen glikoz tüketimi ve etil alkol üretimi (g/100 mL)

Çizelge 4.22 EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan çam odunu örneklerinin fermantasyonları ile elde edilen etanol verimleri (%)

Fermantasyon yöntemi	Enzim konsantrasyonu	Etanol verimi (%)			
		Süre (saat)			
		6	24	48	72
SSF	10 FPU/g KM	9	32	48	59
	20 FPU/g KM	5	49	70	86
Enzimatik hidrolizatın fermantasyonu	10 FPU/g KM	14	78	87	88
	20 FPU/g KM	13	98	88	96

Çizelge 4.22’de, EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işleme tabi tutulan çam odunu örneklerinin iki farklı yöntem ile fermantasyonları sonunda elde edilen etanol verimleri verilmiştir. Fermantasyonun 72. saatindeki % etanol verimlerini esas alacak olursak, enzimatik hidroliz ve fermantasyonun ayrı olarak yürütüldüğü denemelerde daha yüksek etanol verimine ulaşıldığı gözlenmiştir. SSF yönteminde, 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanıldığında, sırasıyla, % 59 ve % 86 etanol verimi elde edilmiştir. Enzimatik hidrolizatın fermente edildiği denemelerde ise, 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanıldığında, sırasıyla, % 88 ve % 96 etanol verimi elde edilmiştir. Enzimatik hidroliz ve fermantasyon işlemlerinin ayrı olarak yürütüldüğü sistemlerin en önemli avantajı, her iki işleme göre en uygun koşulların ayarlanabilmesidir. Ancak, bu yöntemin en önemli dezavantajı da, son ürün inhibisyonu, yani selüloz hidrolizi sırasında açığa çıkan glikoz, sellobiyoz gibi son ürünlerin selülaz enzimini inhibe etmesidir (Galbe ve Zacchi 2002). Bu çalışmada, fermantasyon denemelerinde düşük biyokütle konsantrasyonu (% 5) kullanıldığından, son ürün inhibisyonun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Buna bağlı olarak da, enzimatik hidrolizatın fermente edildiği denemelerde, SSF’ye kıyasla daha yüksek etanol verimi elde edilmiştir. Shafiei vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada, 120 °C’de 15 saat EMIMAc ile ön işleme tabi tutulan ladin parçaları ve talaşında, sırasıyla % 66.8 ve % 81.5 etanol verimine ulaşıldığı belirtilmiştir.

5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- ✓ Lignin içeriği ve fizikokimyasal yapısı nedeniyle, hidrolizi zor, yumuşak bir odun türü olan çam, farklı ön işlem koşullarında sıcak su ile muamele yöntemi ile ön işleme tabi tutularak, şeker parçalanmasının sınırlı olduğu, yani şekerlerin geri kazanımının yüksek olduğu, aynı zamanda çözünmeyen kısımdaki selülozun enzimatik parçalanmaya uygun hale geldiği en uygun ön işlem koşulunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Sıcak su ile ön işlem çalışmaları, *P. banksiana* ve *P. sylvestris* olmak üzere, iki farklı çam türü ile ve iki farklı ön işlem sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, çam için en uygun ön işlem koşulunu belirleyebilmek amacıyla, 9 farklı sıcaklık ve sürede (190 °C’de 10, 20 ve 40 dakika; 200 °C’de 5, 10 ve 20 dakika; 210 °C’de 2.5, 5 ve 10 dakika) ön işlemler uygulanmıştır.
- ✓ *P. banksiana* çam odunu için en uygun sıcak su ile ön işlem koşulunu belirleyebilmek için yapılan denemeler sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde, oldukça düşük glikoz verimleri elde edilmiştir. Bu nedenle, optimum ön işlem koşullarını net olarak belirtmek güç olsa da, en yüksek toplam hemiselüloz veriminin (% 84.4) sağlandığı, 200 °C’de 5 dakika ön işlem ve en yüksek glikoz veriminin (% 16) elde edildiği, 210 °C’de 5 dakika ön işlem, en uygun ön işlem koşulları olarak seçilmiştir. Genel olarak, *P. banksiana* çam odununa uygulanan sıcak su ile muamele ön işlem yönteminin, hemiselüloz şekerlerini uzaklaştırmada etkili olduğu, ancak çözünmeyen kısımdaki selülozu enzimatik parçalanmaya elverişli hale getirmede başarılı olmadığı sonucuna varılmıştır.
- ✓ Enzimatik hidroliz denemelerinde elde edilen % glikoz veriminin oldukça düşük olması sebebiyle, farklı enzim konsantrasyonları, farklı enzim karışımları (β -glukozidaz, pektinaz, endoglukanaz ilavesi, yüzey aktif madde ilavesi) kullanılarak ve farklı ön işlem uygulamaları (iki aşamalı ön işlem, maleik asit ile ön işlem) ile

enzimatik hidroliz verimleri arttırılmaya çalışılmıştır. Çam (*P. banksiana*) odununun sıcak su ile ön işlem sonrasında, hidroliz verimini arttırmaya yönelik denemeler arasında, yalnızca çok yüksek enzim dozunun (150 FPU/g gluklan) kullanıldığı ve hidroliz ortamına polietilen glükol yüzey aktif maddesinin eklendiği denemelerde % glüköz veriminde artış sağlanmıştır.

- ✓ Sarıçam (*P. sylvestris*) odunu için de, Parr reaktörde en uygun sıcak su ile ön işlem koşullarını belirleyebilmek için yapılan denemeler sonrasında gerçekleştirilen enzimatik hidroliz denemelerinde, oldukça düşük glüköz verimleri elde edilmiştir. Parr reaktörde gerçekleştirilen ön işlemler sonrası elde edilen glüköz verimleri (% 4-5, enzim konsantrasyonu: 20 FPU/g gluklan Cellic Ctec2), *P. banksiana* çam odununa uygulanan sıcak su ile ön işlem yöntemi ile elde edilen enzimatik hidroliz verimlerinden (% 9-16, enzim konsantrasyonu: 20 FPU/g gluklan Cellic Ctec2) de daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu sonucun, *P. banksiana* çam odununa uygulanan sıcak su ile muamele ön işlem yönteminin, hemiselüloz şekerlerini uzaklaştırmada etkili olması, ancak *P. sylvestris* çam odununa Parr reaktörde uygulanan ön işlem yönteminde ksilanın uzaklaşmaması ve neredeyse tamamının suda çözünmeyen katı kısımda kalmış olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu durumda, her iki ön işlem sisteminde de tatmin edici sonuçlar elde edilememiş olmasına karşın, akışkanlaştırılmış kum banyosu içerisinde gerçekleştirilen sıcak su ile ön işlem sisteminin, Parr reaktör sistemine kıyasla ısı iletimi yönünden daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Denenen tüm ön işlem koşullarında gerek glüköz verimlerinin gerekse uzaklaşan hemiselüloz oranlarının düşük olması sebebiyle, sarıçam için optimum ön işlem koşullarını net olarak belirtmek güçtür. Bu nedenle, en yüksek toplam biyokütle çözülme oranının (% 9) ve gluklan miktarının (% 39.7) sağlandığı, 200 °C'de 20 dakika ön işlem en uygun ön işlem koşulu olarak seçilmiştir.
- ✓ Parr reaktörde yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen ön işlem yöntemi, 200 °C'de 2 farklı sürede (20 ve 30 dakika), 3 farklı biyokütle konsantrasyonunda (% 5, 10, 15, w/w) ve 3 farklı partikül büyüklüğünde (500-850 µm, 363-500 µm, <363 µm) gerçekleştirilen denemeler ile geliştirilmeye çalışılmış, ancak bu uygulamaların,

sarıçamın enzimatik hidroliz verimini arttırmada etkin bir sonuç vermediği gözlenmiştir.

- ✓ Sıcak su muamelesi ile ön işlem yöntemi uygulanarak, çamdan oldukça düşük düzeylerde glikoz verimi elde edildiğinden, çam için uygun olduğu belirtilen iyonik sıvı ön işlem yöntemi kullanılmıştır. Bu kapsamda, 140 °C'de % 5 katı madde oranında, 3 farklı sürede (15, 30 ve 45 dakika) ve 4 farklı partikül büyüklüğünde gerçekleştirilen denemeler ile sarıçam (*P. sylvestris*) için en uygun ön işlem koşulu belirlenmeye çalışılmıştır. Sarıçam odunu için en uygun koşullar olarak, 500-850 µm partikül büyüklüğündeki biyokütlenin % 5 katı madde oranında, 140 °C'de 45 dakikada EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işlemi seçilmiştir.
- ✓ Genel olarak, en büyük partikül büyüklüğüne (<2.5 mm) sahip örnekler haricinde, ön işlem süresi uzadıkça % glukan miktarının arttığı, % lignin miktarının ise neredeyse aynı kaldığı görülmektedir. EMIMAc ile ön işlem sonucunda elde edilen toplam çözülme oranları, % 17.9-25.7 olarak hesaplanmıştır. <363 µm, 363-500 µm ve 500-850 µm partikül boyutundaki odun örneklerinin EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işlemi sonucunda, neredeyse aynı oranlarda çözülme gerçekleşmiş, yalnızca en büyük partikül boyutuna sahip örneklerde çok düşük düzeyde bir azalma belirlenmiştir. Genel olarak, ön işlem süresi uzadıkça, toplam çözülme oranlarında artış gözlenmiştir. Ancak, biyokütlenin partikül büyüklüğünün çözülme oranlarına önemli düzeyde etki etmediği sonucuna varılmıştır. EMIMAc iyonik sıvısı ile ön işlemin sarıçam odununun yapısı üzerine etkisini ortaya koymak için, ön işlem uygulanmamış biyokütleden ön işlem ile ekstrakte olan lignin oranları hesaplanmıştır. İyonik sıvı ön işlemi ile biyokütleden ekstrakte olan lignin oranlarının, partikül büyüklüğü ve ön işlem süresine göre değişkenlik göstermekle birlikte, genel olarak, % 21 ile % 53 aralığında olduğu belirlenmiştir. Denenen tüm partikül boyutlarında, ön işlem süresi arttıkça, açığa çıkan glikoz miktarının arttığı gözlenmektedir. Beklenen şekilde, ön işlem süresi uzadıkça, biyokütlenin glikoza dönüşümü artmıştır. Farklı partikül boyutları karşılaştırılacak olursa, en büyük partikül büyüklüğüne sahip örnekler haricinde, küçük partiküle sahip biyokütle örneklerinin büyük olanlara kıyasla daha düşük glikoza dönüşüm oranına sahip

oldukları belirlenmiştir. En düşük glikoza dönüşüm oranlarına, <2.5 mm ve <363 µm partikül boyutuna sahip biyokütle örneklerinde ulaşılmıştır. Genel olarak, çözülme oranları ve ön işlem ile uzaklaşan lignin miktarları çok yüksek olmasa da, biyokütlenin glikoza dönüşüm oranlarının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Biyokütlenin glikoza dönüşüm oranlarının % 37-56 aralığında olması, biyokütlerdeki selülozun neredeyse tamamının glikoza dönüştüğünü göstermektedir. Çünkü, biyokütleyle farklı koşullarda, iyonik sıvı ile uygulanan ön işlemler sonrasındaki glukoz miktarları % 33.0-54.1 olarak bulunmuştur.

- ✓ Seçilen koşullarda ön işleme tabi tutulan biyokütle örneklerinin simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) ve enzimatik hidrolizatın fermantasyonu olmak üzere 2 farklı yöntem ile fermantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon denemeleri, 35 °C'de 150 d/d'de, 2 farklı konsantrasyonda (20 ve 10 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2) selülaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SSF denemelerinde kullanılan enzim miktarı artırıldığında, fermantasyonun 7. gününde elde edilen etil alkol konsantrasyonlarının da arttığı belirlenmiştir. Enzimatik hidrolizatın fermantasyonu denemelerinde, gerek çam odunu ile gerekse α-selüloz ile gerçekleştirilen kontrol denemelerinde, fermantasyonun 24. saatinde glikozun tamamının mayalar tarafından fermente edildiği gözlenmiştir. Enzimatik hidroliz ve fermantasyonun ayrı olarak yürütüldüğü denemelerde daha yüksek etanol verimine ulaşıldığı gözlenmiştir. SSF yönteminde, 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanıldığında, sırasıyla, % 59 ve % 86 etanol verimi elde edilmiştir. Enzimatik hidrolizatın fermente edildiği denemelerde ise, 10 ve 20 FPU/g toplam kuru madde Cellic Ctec2 enzimi kullanıldığında, sırasıyla, % 88 ve % 96 etanol verimi elde edilmiştir. Bu çalışmada, fermantasyon denemelerinde düşük biyokütle konsantrasyonu (% 5) kullanıldığından, son ürün inhibisyonun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Buna bağlı olarak da, enzimatik hidrolizatın fermente edildiği denemelerde, SSF'ye kıyasla daha yüksek etanol verimi elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A.O. 2013. Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammadde Kaynakları. BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 2(2), 204-220.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29 (6), 675-685.
- Ahmed, A.M. 2011. Çeşitli Dallı Darı (*Panicum virgatum*) Türlerinin Biyoetanol Üretimi İçin Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, 80, İzmir.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861.
- Anonim. 2015a. Web Sitesi: <http://www.enerji.gov.tr/tr-TR/Sayfalar/Biyoyakit>, Erişim Tarihi: 18.08.2015.
- Anonim. 2015b. Web Sitesi: https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0yonik_s%C4%B1v%C4%B1, Erişim Tarihi: 18.08.2015.
- Anonymous. 2015. Web Sitesi: http://www.jrs.eu/jrs_en/innovative-funktionen/uebersicht-funktionen-jrs-produkte/index.php, Erişim Tarihi: 18.08.2015.
- Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, D., Rodríguez, J., Mendonça, R. and Baeza, J. 2008. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 214-219.
- Axelsson, J. 2011. Separate Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Spruce. Yüksek lisans tezi, Linköping University, Department of Physics, Chemistry and Biology, 50, Sweden.
- Bahcegul, E., Apaydin, S., Haykir, N.I., Tatli, E. and Bakir, U. 2012. Different ionic liquids favor different lignocellulosic biomass particle sizes during pretreatment to function efficiently. *Green Chemistry*, 14(7), 1896-1903.
- Bahçegül, E. 2013. Effect of biomass pretreatment conditions on the glucose and biodegradable film production from lignocellulosic wastes. Doktora tezi, Middle East Technical University, Natural and Applied Sciences, Biotechnology Department, 118, Ankara.

- Baker, J.O., Adney, W.S., Nieves, R.A., Thomas, S.R., Wilson, D.B. and Himmel, M.E. 1994. A new thermostable endoglucanase, *Acidothermus cellulolyticus* E1: synergism with *Trichoderma reesei* CBH1 and comparison to *Thermomonospora fusca* E5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45(1), 245-256.
- Balat, M., Balat, H. and Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Navarro, A.A., Gonzalez, A., Carrasco, J. and Ballesteros, M. 2000. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84(6), 97-110.
- Bayrakçı, A.G. 2009. Değişik Biyokütle Kaynaklarından Biyoetanölün Elde Edilmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Güneş Enerjisi Anabilim Dalı, 71, İzmir.
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N. and Kumar, S. 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91-106.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S. and Saddler, J. 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*, 125(2), 198-209.
- Bösch, P., Wallberg, O., Joelsson, E., Galbe, M. and Zacchi, G. 2010. Impact of dual temperature profile in dilute acid hydrolysis of spruce for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 3(15).
- Brandt, A., Gräsvik, J., Halletta, J.P. and Welton, T. 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15(3), 550-583.
- Brandt, A., Hallett, J.P., Leak, D.J., Murphy, R.J. and Welton, T. 2010. The effect of the ionic liquid anion in the pretreatment of pine wood chips. *Green Chemistry*, 12, 672-679.
- Bura, R., Chandra, R. and Saddler, J. 2009. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnology Progress*, 25(2), 315-322.
- Canilha, L., Chandel, A.K., Milessi, T.S.S., Antunes, F.A.F., Freitas, W.L.C., Felipe, M.G.A. and Silva, S.S. 2012. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, Article ID 989572, 15 pages.
- Cardenas-Toro, F.P., Alcazar-Alay, S.C., Forster-Carneiro, T. and Meireles, M.A.A. 2014. Obtaining oligo- and monosaccharides from agroindustrial and agricultural residues using hydrothermal treatments. *Food and Public Health*, 4(3), 123-139.

- Cardona, C.A. and Sánchez, Ó.J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415-2457.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A. and Paz, I.C. 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754-4766.
- Chakraborty, S. and Gaikwad, A. 2012. Production of Cellulosic Fuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section A: Physical Sciences*, 82(1), 59-69.
- Chandra, R.P., Bura, R., Mabe W.E., Berlin, A., Pan, X. and Saddler, J.N. 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 67-93.
- Chen, M., Zhao, J. and Xia, L. 2008. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymers*, 71(3), 411-415.
- Cheng, G., Varanasi, P., Arora, R., Stavila, V., Simmons, B.A., Kent, M.S. and Singh, S. 2012. Impact of ionic liquid pretreatment conditions on cellulose crystalline structure using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *The Journal of Physical Chemistry*, 116(33), 10049-10054.
- Clark, T.A., Mackie, K.L., Dare, P.H. and McDonald, A.G. 1989. Steam explosion of the softwood *Pinus radiata* with sulphur-dioxide addition. II. process characterization. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 9(2), 135-166.
- Cox, B.J. and Ekerdt, J.G. 2013. Pretreatment of yellow pine in an acidic ionic liquid: Extraction of hemicellulose and lignin to facilitate enzymatic digestion. *Bioresource Technology*, 134, 59-65.
- das Neves, M.A., Kimura, T., Shimizu, N. and Nakajima, M. 2007. State of the art and future trends of bioethanol production. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 1(1), 1-14.
- Dasari, R.K. and Berson, R.E. 2007. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137, 289-299.
- Doherty, T.V., Mora-Pale, M., Foley, S.E., Linhardt, R.J. and Dordick, J.S. 2010. Ionic liquid solvent properties as predictors of lignocellulose pretreatment efficacy. *Green Chemistry*, 12(11), 1967-1975.
- Dowe, N. and McMillan, J. 2008. SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, Issue Date: 10/30/2001.

- Erdei, B., Barta, Z., Sipos, B., Réczey, K., Galbe, M. and Zacchi, G. 2010. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. *Biotechnology for Biofuels*, 3(16), 1-9.
- Erkurt, E.A. 2011. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yetiştirilen Mısır ve Buğday Atıklarından Biyoetanol Üretim Verimi Üzerine Ön İşlem Etkisinin Araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, 197, Mersin.
- Ewanick, S.M. 2006. Bioconversion of mountain pine beetle-killed Lodgepole pine to ethanol. Yüksek lisans tezi, The University of British Columbia, The Faculty of Graduate Studies, 128, Canada.
- Ewanick, S.M., Bura, R. and Saddler, J.N. 2007. Acid-catalyzed steam pretreatment of Lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 737-746.
- Fissore, A., Carrasco, L., Reyes, P., Rodríguez, J., Freer, J. and Mendonça, R.T. 2010. Evaluation of a combined brown rot decay–chemical delignification process as a pretreatment for bioethanol production from *Pinus radiata* wood chips. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(9), 893-900.
- Galbe, M. and Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 618-628.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Graenacher, C. 1934. Cellulose Solution. US 1943176 A.
- Gray, K.A., Zhao, L. and Emptage, M. 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 141-146.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G. and Faaij, A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4), 384-410.
- Haykir, N.I. and Bakir, U. 2013. Ionic liquid pretreatment allows utilization of high substrate loadings in enzymatic hydrolysis of biomass to produce ethanol from cotton stalks. *Industrial Crops and Products*, 51, 408-414.
- Haykir, N.I., Bahcegul, E., Bicak, N. and Bakir, U. 2013. Pretreatment of cotton stalk with ionic liquids including 2-hydroxy ethyl ammonium formate to enhance biomass digestibility. *Industrial Crops and Products*, 41, 430-436.
- Holm, J. and Lassi, U. 2011. Ionic Liquids in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, In: *Ionic Liquids: Applications and Perspectives*, Kokorin, A. (ed), InTech, 545-560, Croatia.

- Hundt, M., Schnitzlein, K. and Schnitzlein, M.G. 2013. Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of softwood: Effect of pulping severity and pulp properties on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresource Technology*, 134, 307-315.
- Jeffries, T.W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses, In: *Biochemistry of microbial degradation*. Ratledge, C. (ed), Springer Science+Business Media B.V., 233-277, Netherlands.
- Jeoh, T., Ishizawa, C.I., Davis, M.F., Himmel, M.E., Adney, W.S. and Johnson, D.K. 2007. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 112-122.
- Ju, X., Grego, C. and Zhang, X. 2013. Specific effects of fiber size and fiber swelling on biomass substrate surface area and enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 144, 232-239.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. and Gibbons, W.R. 2012. Extrusion pretreatment of pine wood chips. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(1), 81-99.
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S. and Ladisch, M.R. 2009a. Liquid hot water pretreatment of cellulosic biomass, In: *Methods in Molecular Biology*. Mielenz, J.R. (ed), Humana Press, 93-102, Totowa
- Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N.S. and Ladisch, M.R. 2014. Severity factor coefficients for subcritical liquid hot water pretreatment of hardwood chips. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(2), 254-263.
- Kim, Y., Mosier, N.S. and Ladisch, M.R. 2009b. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnology Progress*, 25(2), 340-348.
- Kimon, K.S., Alan, E.L. and Sinclair, D.W.O. 2011. Enhanced saccharification kinetics of sugarcane bagasse pretreated in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride at high temperature and without complete dissolution. *Bioresource Technology*, 102(19), 9325-9329.
- Ko, J.K., Kim, Y., Ximenes, E. and Ladisch, M.R. 2015. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(2), 252-262.
- Koçoğlu-Soydan, D. 2012. Buğday Saplarından Biyoetanol Üretimi: Asit Hidrolizi ve Enzimatik Hidrolizin Etkisi. Yüksek lisans tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, 70, Gebze.
- Kohlmann, K.L., Sarikaya, A., Westgate, P.J., Weil, J., Velayudhan, A., Hendrickson, R. and Ladisch, M.R. 1995. Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates, In: 207th American chemical society national meeting, ACS symposium

- series No. 618. Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates. Penner, M. and Saddler, J. (eds), American Chemical Society, 237-255, Washington DC.
- Kootstra, A.M.J., Beftink, H.H., Scott, E.L. and Sanders, J.P.M. 2009. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 2(31).
- Kumar, L., Chandra, R. and Saddler, J. 2011. Influence of steam pretreatment severity on post-treatments used to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwoods at low enzyme loadings. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2300-2311.
- Kumar, L., Chandra, R., Chung, P.A. and Saddler, J. 2010. Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields? *Bioresource Technology*, 101(20), 7827-7833.
- Kumar, L., Dhavala, P., Goswami, A. and Maithel, S. 2006. Liquid Biofuels in South Asia: Resources and Technologies. *Asian Biotechnology and Development Review*, 8(2), 31-49.
- Ladisch, M. 2010. Bioenergy: Renewable Liquid Fuels, In: *Bio-inspired Innovation and National Security*. Armstrong, R.E., Drapeau, M.D., Loeb, C.A. and Valdes, J.J. (eds), National Defence University Press, 119-138, Washington.
- Ladisch, M.R., Kohlmann, K., Westgate, P., Weil, J. and Yang, Y. 1998. Processes for treating cellulosic material. US 5846787 A.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. and Nilvebrant, N.O. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 151-159.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H. and Dale, B.E. 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 1081-1099.
- Lee, S.H., Doherty, T.V., Linhardt, R.J. and Dordick, J.S. 2009. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), 1368-1376.
- Li, B., Asikkala, J., Filpponen, I. and Argyropoulos, D.S. 2010. Factors affecting wood dissolution and regeneration of ionic liquids. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(5), 2477-2484.
- Li, C., Sun, L., Simmons, B.A. and Singh, S. 2013. Comparing the recalcitrance of eucalyptus, pine, and switchgrass using ionic liquid and dilute acid pretreatments. *Bioenergy Research*, 6(1), 14-23.

- Lopes, A.M.C., João, K.G., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, E. and Bogel-Lukasik, R. 2013. Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. *Sustainable Chemical Processes*, 1(3), 1-31.
- Mäki-Arvela, P., Anugwom, I., Virtanen, P., Sjöholm, R. and Mikkola, J.P. 2010. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids-A review. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 175-201.
- Manonmani, H.K. and Sreekantiah, K.R. 1987. Saccharification of sugar-cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(8), 484-488.
- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R. and Monot, F. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 372-380.
- Modenbach, A.A. and Nokes, S.E. 2012. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment-a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1430-1442.
- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M. and Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.
- Mora-Pale, M., Meli, L., Doherty, T.V. Linhardt, R.J. and Dordick, J.S. 2011. Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(6), 1229-1245.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M. and Ladisch, M.R. 2005a. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 96(18), 1986-1993.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005b. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673-686.
- Narin, M. 2008. Dünyada ve Türkiye’de Enerji Tarımı, 2. Ulusal İktisat Kongresi, 20-22 Şubat, DEÜ İİBF İktisat Bölümü, 1-18, İzmir.
- Nguyen, Q.A., Tucker, M.P., Keller, F.A. and Eddy, F.P. 2000. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84(1), 561-576.
- Nguyen, T.A.D., Kim, K.R., Han, S.J., Cho, H.Y., Kim, J.W., Park, S.M., Park, J.C. and Sim, S.J. 2010. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 101(19) 7432-7438.

- Ouyang, J., Dong, Z., Song, X., Lee, X., Chen, M. and Yong, Q. 2010. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. *Bioresource Technology*, 101(17), 6685-6691.
- Overend, R.P., Chornet, E. and Gascoigne, J.A. 1987. Fractionation of lignocelluloses by steam aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society a Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 321(1561), 523-536.
- Özyürek, Ö. 2011. Sebze Saplarından (Domates, Biber, Patlıcan) Biyoetanol Üretiminde Enzimatik Etkinliğin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, 57, Düzce.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25-33.
- Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D.J. and Saddler, J.N. 2005. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 124(1), 1069-1079.
- Pan, X., Xie, D., Yu, R.W., Lam, D. and Saddler, J.N. 2007. Pretreatment of Lodgepole pine killed by mountain pine beetle using the ethanol organosolv process: fractionation and process optimization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(8), 2609-2617.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. and Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.
- Pérez, J.A., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I. and Manzanares, P. 2007. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(10), 929-938.
- Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50 (1), 1-39.
- Ramos, L.P., Breuil, C. and Saddler, J.N. 1993. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(1), 19-25.
- Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454, 841-845.
- Sainz, M.B. 2009. Commercial cellulosic ethanol: The role of plant-expressed enzymes. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45(3), 314-329.

- Sánchez, Ó.J. and Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270-5295.
- Sannigrahi, P., Miller, S.J. and Ragauskas, A.J. 2010. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. *Carbohydrate Research*, 345(7), 965-970.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S. and Aikat, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19-27.
- Shafiei, M., Zilouei, H., Zamani, A., Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2013. Enhancement of ethanol production from spruce wood chips by ionic liquid pretreatment. *Applied Energy*, 102, 163-169.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. and Templeton, D. 2005. Determination of ash in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, Issue Date: 7/17/2005.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. and Templeton, D. 2006. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, Issue Date: 12/08/2006.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. and Crocker, D. 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, Issue Date: 4/25/2008.
- Söderström, J., Galbe, M. and Zacchi, G. 2004. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. *Biotechnology Progress*, 20(3), 744-749.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M. and Zacchi, G. 2002. Two-step steam pretreatment of softwood with SO₂ impregnation for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(1), 5-21.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M. and Zacchi, G. 2003a. Combined use of H₂SO₄ and SO₂ impregnation for steam pretreatment of spruce in ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108, 127-140.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M. and Zacchi, G. 2003b. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 24(6), 475-486.
- Sun, N., Rahman, M., Qin, Y., Maxim, M.L., Rodríguez, H. and Rogers, R.D. 2009. Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chemistry*, 11(5), 646-655.

- Sun, N., Rodríguez, H., Rahmana, M. and Rogers, R.D. 2011. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? *Chemical Communications*, 47(5), 1405-1421.
- Sun, T.T.W. 2013. Impact of Pretreatment Methods on Enzymatic Hydrolysis of Softwood. Yüksek lisans tezi, University of Toronto, Graduate Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, 82, Canada.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Tadesse, H. and Luque, R. 2011. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. *Energy and Environmental Science*, 4(10), 3913-3929.
- Tan, H.T. and Lee, K.T. 2012. Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*, 183, 448-458.
- Tan, S.S.Y., MacFarlane, D.R., Upfal, J., Edye, L.A., Doherty, W.O.S., Patti, A.F., Pringle, J.M. and Scott, J.L. 2009. Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. *Green Chemistry*, 11(3), 339-345.
- Tengborg, C., Galbe, M. and Zacchi, G. 2001. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnology Progress*, 17(1), 110-117.
- Tengborg, C., Stenberg, K., Galbe, M., Zacchi, G., Larsson, S., Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. 1998. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70(1), 3-15.
- Uju, Abe, K., Uemura, N., Oshima, T., Goto, T. and Kamiya, N. 2013. Peracetic acid-ionic liquid pretreatment to enhance enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 138, 87-94.
- Üçüncü, C. 2011. Chemical Composition Analysis of Agroindustrial Waste and Their Potential Usage in Bio-ethanol Production. Yüksek lisans tezi, Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology, 82, İzmir.
- Üner, B. 2003. Kraft hamurundan kalıntı ligninin izole edilmesi ve yapısı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2, 83-100.
- Ünlü, D. ve Durmaz-Hilmioğlu, N. 2014. Yenilenebilir Enerji Kaynağı Olarak Biyokütleden Biyoetanol Üretiminin İncelenmesi, Uluslararası Enerji ve Güvenlik Kongresi, 23 – 24 Eylül, Kocaeli Üniversitesi, 714-724, Kocaeli.
- Vancov, T., Alston, A.S., Brown, T. and McIntosh, S. 2012. Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels. *Renewable Energy*, 45, 1-6.

- Viell, J. and Marquardt, W. 2011. Disintegration and dissolution kinetics of wood chips in ionic liquids. *Holzforschung*, 65(4), 519-525.
- von Sivers, M. and Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*, 51(1), 43-52.
- Walker, G.M. 2010. *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*. Ventus Publishing ApS, 114.
- Wang, X., Li, H., Cao, Y. and Tang, Q. 2011. Cellulose extraction from wood chip in an ionic liquid 1-allyl-3-methylimidazolium chloride (AmimCl). *Bioresource Technology*, 102(17), 7959-7965.
- Wei, L., Shrestha, A., Tu, M. and Adhikari, S. 2011. Effects of surfactant on biochemical and hydrothermal conversion of softwood hemicellulose to ethanol and furan derivatives. *Process Biochemistry*, 46(9), 1785-1792.
- Weil, J., Westgate, P.J., Kohlmann, K.L. and Ladisch, M.R. 1994. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(11), 1002-1004.
- Wu, H., Mora-Pale, M., Miao, J., Doherty, T.V., Linhardt, R.J. and Dordick, J.S. 2011. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass at high loadings in room temperature ionic liquids. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2865-2875.
- Wu, S., Chang, H., Jameel, H. and Philips, R. 2010. Novel green liquor pretreatment of loblolly pine chips to facilitate enzymatic hydrolysis into fermentable sugars for ethanol production. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30(3), 205-218.
- Yang, B. and Wyman, C.E. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 26-40.
- Yeh, A.I., Huang, Y.C. and Chen, S.H. 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 192-199.
- Yoon, L.W., Ang, T.N., Ngoh, G.C. and Chua, A.S.M. 2012. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. *Biomass and Bioenergy*, 36, 160-169.
- Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerius, A.L. and Weckhuysen, B.M. 2010. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*, 110(6), 3552-3599.
- Zhang, J., Zhang, H., Wu, J., Zhang, J., He, J. and Xiang, J. 2010. NMR spectroscopic studies of cellobiose solvation in EmimAc aimed to understand the dissolution

mechanism of cellulose in ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(8), 1941-1947.

Zhang, Y.H.P. and Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose:noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797-824.

Zhu, J.Y., Zhu, W., Obryan, P., Dien, B.S., Tian, S., Gleisner, R. and Pan, X.J. 2010. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine:preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1355-1365.

EK 1 Selülaaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi: Filtre Kâğıdı Aktivitesi (FPU)

Selülaaz enzim aktivitesi substrat olarak filtre kâğıdının kullanılması ile ölçülmüştür.

Substrat: Whatman No.1 filtre kâğıdı (1x6 cm)(≈50 mg)

Metod:

1. Hacmi en az 25 mL olan bir test tüpüne 1 mL 0.05 M Na-sitrat (pH 4.8) tamponu ilave edilir.
2. Sitrat tamponunda seyreltilmiş enzimden (1/500, 1/750, 1/1000) 0.5 mL eklenir.
3. Filtre kâğıdı şeridi merdiven şeklinde bükülerek sıvının içerisine atılır. Filtre kâğıdı tam olarak sıvının içerisine batmazsa, cam bir çubuk yardımıyla itilebilir.
4. Karışım 50 °C'de 60 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrasında tüplere 3 mL DNS ilave edilip karıştırılır.
6. Tüpler kaynayan su içerisinde 5 dakika süreyle kaynatılır. Tüm örnekler, enzim körleri, glikoz standartları ve şahit beraberce kaynatılmalıdır. Kaynatma sonrasında tüpler soğuk su banyosuna aktarılır.
7. Tüpler soğutulduktan sonra içerisine 20 mL saf su ilave edilir ve tüp içeriği iyice karıştırılır.
8. Pulp tamamen dibe çöktüğünde (en az 20 dakika sonra), oluşan renk şahide karşı 540 nm'de spektrofotometrede ölçülür.

Şahit	Enzim kör
1.5 mL sitrat tamponu	1 mL sitrat tamponu
3 mL DNS	0.5 mL seyreltilmiş enzim
5 dakika kaynatma + 20 mL saf su	3 mL DNS
Filtre kâğıdı var	5 dakika kaynatma + 20 mL saf su
	Filtre kâğıdı yok

Standartlar	Enzim
1 mL sitrat tamponu	1 mL sitrat tamponu
0.5 mL standart	0.5 mL seyreltilmiş enzim
3 mL DNS	3 mL DNS
5 dakika kaynatma + 20 mL saf su	5 dakika kaynatma + 20 mL saf su
Filtre kâğıdı var	Filtre kâğıdı var

Glikoz Standartlarının Hazırlanması

Stok çözelti: 10 mg/mL konsantrasyonda glikoz çözeltisi

Dilüsyonlar:

1 mL glikoz stok çöz. + 0.5 mL tampon = 1:1.5 = 6.7 mg/mL (3.35 mg/0.5 mL)

1 mL glikoz stok çöz. + 1 mL tampon = 1:2 = 5.0 mg/mL (2.5 mg/0.5 mL)

1 mL glikoz stok çöz. + 2 mL tampon = 1:3 = 3.3 mg/mL (1.65 mg/0.5 mL)

1 mL glikoz stok çöz. + 4 mL tampon = 1:5 = 2.0 mg/mL (1.0 mg/0.5 mL)

Hesaplama

1. Glikoz konsantrasyonuna (mg/0.5 mL olarak) karşı 540 nm'de ölçülen absorbans değerleri aritmetik grafiğe işlenerek glikoz standart kurvesi çizilir.
2. Standart kurve kullanılarak her bir enzim örnek tüpünden açığa çıkan glikoz miktarı hesaplanır.
3. Reaksiyon sonunda 2 mg glikoz oluşumunu sağlayacak enzimin konsantrasyonu belirlenir. Filtre kâğıdı selüloz aktivitesini hesaplamak için, 50 mg filtre kâğıdından 60 dakikada oluşan 2 mg indirgen şeker (glikoz olarak) değeri esas alınmıştır (% 4 dönüşüm). Açığa çıkan indirgen şekerin miktarı, analiz karışımındaki enzim miktarının lineer bir fonksiyonu olmadığı için; yani, aynı sürede enzim miktarı 2 kat arttırıldığında, oluşan indirgen şekerin miktarı 2 kat artmadığından % 4 oranda dönüşüm noktası esas alınmıştır. Analiz bu koşullarda gerçekleştirildiğinde hidroliz hızının lineer olduğu ve son ürün inhibisyonundan etkilenmediği varsayılmaktadır.

Enzim konsantrasyonu = 1/Dilüsyon = Enzimin dilüsyondaki hacmi / Dilüsyonun toplam hacmi

4. FPU reaksiyonunda 2 mg glikoz açığa çıkaran enzim miktarı (kritik enzim konsantrasyonu = mL/mL) 0.37 Ünite içerir.

$$FPU = \frac{0,37}{2 \text{ mg glikozoluşturan enzim konsantrasyonu}} \text{U/mL}$$

$$\frac{FPU}{\text{mL}} = \frac{2 \text{ mg glikoz} \frac{1 \text{ } \mu\text{mol glikoz}}{0,18 \text{ mg glikoz}} \frac{1}{60 \text{ dk}} \frac{1}{0,5 \text{ mL}}}{\frac{1}{\text{Dilüsyon}}}$$

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Simel BAĞDER ELMACI
Doğum Yeri : Ayvalık
Doğum Tarihi : 1983
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Ayvalık Süper Lisesi (1997-2001)
Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
(2001-2005)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı (Eylül 2005-Ekim 2008)

Çalıştığı Kurumlar:

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (Araştırma
Görevlisi) (Aralık 2005-Devam ediyor)

Yayınlar (SCI)

Bağder Elmacı, S., Özçelik, F., Tokatlı, M., Çakır, İ. 2014. Technological properties of indigenous wine yeast strains isolated from wine production regions of Turkey. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(5), 835-847. Doi: 10.1007/s10482-014-0138-z

Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P. 2015. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiologica*, 60(3), 241-251. Doi: 10.1007/s12223-014-0363-x

Bağder Elmacı, S., Gülgör, G., Tokatlı, M., Erten, H., İşci, A., Özçelik, F. 2015. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(3), 675-686. Doi: 10.1007/s10482-014-0362-6

Tokatlı, M., Gülgör, G., **Bağder Elmacı, S.**, Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. (2015). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 315819, 8 pages. Doi: 10.1155/2015/315819

Yağmur, G., Tanguler, H., Leventdurur, S., **Bağder Elmacı, S.**, Ünal Turhan, E., Francesca, N., Settanni, L., Giancarlo, M., Erten, H. 2016. Identification of predominant lactic acid bacteria and yeasts of Turkish Sourdoughs and selection of starter cultures for liquid sourdough production using different flours and dough yields. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 66(2). Doi: 10.1515/pjfn-2015-0041

Hakemli Dergiler

Bağder, S., Özçelik, F. 2009. *Saccharomyces* Dışındaki Mayaların Şarap Aromasına Etkileri. Gıda, 34(4), 239-244.

Uluslararası Kongre Sunum

Bağder, S., Arneborg, N. 2007. Growth of *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces thermotolerans* strains in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*, 2. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi, 24-26 Ekim, 114, İstanbul.

Bağder, S., Özçelik, F. 2009. The possibility of using endogenic yeasts isolated from different wine regions in Turkey as wine starter, 27th International Specialized Symposium on Yeasts, 26-29 Ağustos, 72, Paris, Fransa.

Tokatlı, M., Dursun, D., **Bağder, S.**, Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from pickles in Ankara Çubuk region, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, 27-30 Eylül, 141, Ankara.

Arslankoz, N., **Bağder, S.**, Tokatlı, M., Özçelik, F. 2010. Antifungal activity of lactic acid bacteria, 1st International Congress on Food Technology, 03-06 Kasım, 90, Antalya.

Tokatlı, M., **Bağder, S.** 2010. Bacteriocins of lactic acid bacteria and their food applications, 1st International Congress on Food Technology, 03-06 Kasım, 91, Antalya.

Bağder, S., Tokatlı, M., Çakır, İ., Özçelik, F. 2010. Identification of indigenous wine yeasts by different molecular methods, 1st International Congress on Food Technology, 03-06 Kasım, 100, Antalya.

Tokatlı, M., Arslankoz, N., **Bağder, S.**, Özçelik, F. 2011. The properties of pickles fermented with LAB isolated from traditional pickles in Ankara-Cubuk region, Euro-Mediterranean Symposium for Fruit and Vegetable Processing, 18-21 Nisan, 126, Avignon/Fransa.

Arslankoz, N., Tokatlı, M., **Bağder, S.**, Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2012. Evidence for proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from pickles, 23rd International ICFMH Symposium FoodMicro 2012, 3-7 Eylül, 562, İstanbul.

Şanlıbaba, P., **Bağder, S.**, Tokatlı, M., Arslankoz, N., Özçelik, F. 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from pickles, 23rd International ICFMH Symposium FoodMicro 2012 3-7 Eylül, 775, İstanbul.

Şanlıbaba, P., Tokatlı, M., **Bağder, S.**, Dursun, D., Özçelik, F. 2012. Characterization of lactic acid bacteria based on genotypic analyses, 15. European Congress on Biotechnology, 23-26 Eylül, 125, İstanbul.

Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Gülgör, G., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2013. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Cubuk pickles, The 2nd International Symposium on “Traditional Foods From Adriatic to Caucasus”, 24-26 Ekim, 56, Ohrid/Makedonya. (**Simel Bağder Elmacı** tarafından sunulmuştur).

Özçelik, F., Kentel, Z.B., **Bağder Elmacı, S.** 2013. Microbiological and chemical changes during storage of pasteurized boza, The 2nd International Symposium on “Traditional Foods From Adriatic to Caucasus”, 24-26 Ekim, 253, Ohrid/Makedonya.

Bağder Elmacı, S., Gülgör, G., Tokatlı, M., Özçelik, F. 2014. The inhibitory effect of chitosan against microorganisms involved in the different stages of wine production, 2nd International Congress on Food Technology, 05-07 Kasım, 27, Kuşadası. (**Simel Bağder Elmacı** tarafından sunulmuştur).

Güler, F., **Bağder Elmacı, S.**, Özçelik, F. 2014. Proteolytic system of lactic acid bacteria, 2nd International Congress on Food Technology, 05-07 Kasım, 166, Kuşadası.

Ulusal Kongre Sunum

Tokatlı, M., Özçelik, F., **Bağder, S.** 2007. Biyoteknolojik uygulamalar ile gıdaların besin değerinin artırılması, 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim, 52, Antalya.

Yıldız, G., Özçelik, F., Köksal, H., **Bağder, S.**, Abacıoğlu, Ö. 2008. Organik bor üretilebilirliği ve broyler rasyonlarında bor ile humatın kullanımı, 2. Ulusal Bor Çalıştayı, 17-18 Nisan, 597-604, Ankara.

Bağder, S., Özçelik, F. 2008. Malolaktik fermantasyonun şarap aroması üzerine etkisi, Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 131-132, Erzurum. (**Simel Bağder** tarafından sunulmuştur).

Bağder, S., Özçelik, F., Tokatlı, M. 2008. Şarap üretiminde SO₂ düzeyini azaltmak amacıyla kullanılacak antimikrobiyel bileşikler, Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 1105-1106, Erzurum.

Bağder, S., Özçelik, F. 2008. Şarap fermantasyonunda starter kültür kullanımı, Ulusal Bağcılık ve Şarap Sempozyumu ve Sergisi, 6-8 Kasım, 227-231, Denizli. (**Simel Bağder** tarafından sunulmuştur).

Bağder, S., Acılıoğlu, Ö., Tokatlı, M., Özçelik, F. 2008. Malolaktik fermantasyonda aroma değişimi, Ulusal Bağcılık ve Şarap Sempozyumu ve Sergisi, 6-8 Kasım, 399-403, Denizli.

Özçelik, F., Kentel, Z.B., **Bağder, S.** 2009. Bozanın pastörizasyonunda ısı değişimleri, 2. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 27-29 Mayıs, 637-640, Van.

Bağder, S., Arslankoz, N., Tokatlı, M., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2012. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilik düzeyleri, Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim, 270, Hatay.

Özçelik, F., Tokatlı, M., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., **Bağder, S.** 2012. Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretim yeteneklerinin belirlenmesi, Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim, 271, Hatay.

Tokatlı, M., Arslankoz, N., **Bağder, S., Şanlıbaba, P., Özçelik, F.** 2012. Laktik asit bakterilerinin enzim profillerinin belirlenmesi, Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim, 274, Hatay.

Şanlıbaba, P., Tokatlı, M., Arslankoz, N., **Bağder, S., Özçelik, F.** 2012. Laktik asit bakterilerinin farklı pH değerlerinde gelişme yetenekleri, Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim, 279, Hatay.

Arslankoz, N., Tokatlı, M., Şanlıbaba, P., **Bağder, S., Özçelik, F.** 2012. Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri, Türkiye 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim, 280, Hatay.

Bağder, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. 2012. Turşudan izole edilen laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit üretim yeteneklerinin belirlenmesi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım, 94, Antalya.

Şanlıbaba, P., Tokatlı, M., Arslankoz, N., **Bağder, S., Özçelik, F.** 2012. Turşudan izole edilen laktik asit bakterilerinin asit üretim yeteneklerinin ve hızlarının belirlenmesi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım, 126, Antalya.

Tokatlı, M., Şanlıbaba, P., **Bağder, S., Özçelik, F.** 2013. Seçilmiş starter kültürler ile üretilen turşu örneklerinde meydana gelen mikrobiyolojik değişimler, 4. Gıda Güvenliği Kongresi, 14-15 Mayıs, 58-59, İstanbul.

Tokatlı, M., **Bağder, S., Şanlıbaba, P., Özçelik, F.** 2013. Seçilmiş starter kültürler ile üretilen turşu örneklerinde meydana gelen kimyasal değişimler, 4. Gıda Güvenliği Kongresi, 14-15 Mayıs, 109, İstanbul.