



**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS**

**SEBZE SAPLARINDAN (DOMATES, BİBER, PATLICAN)  
BİYOETANOL ÜRETİMİNDE ENZİMATİK ETKİNLİĞİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ömer ÖZYÜREK**

**ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**TEMMUZ 2011  
DÜZCE**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS**

**SEBZE SAPLARINDAN (DOMATES, BİBER, PATLICAN)  
BİYOETANOL ÜRETİMİNDE ENZİMATİK ETKİNLİĞİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ömer ÖZYÜREK**

**ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**TEMMUZ 2011  
DÜZCE**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ömer ÖZYÜREK

## **ÖNSÖZ**

Bu araştırma için beni yönlendiren, yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Yalçın Çöpür'e en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımın istatistik analizini yapmamda yardımlarını esirgemeyen sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet Özcan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ayhan Tozluođlu ve Selva Kütük'e ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen Düzce Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

**Temmuz 2011**

**Ömer ÖZYÜREK**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>ii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILAN HAMMADDELER</b> .....	<b>6</b>
<b>2.2. BİYOETANOL ÜRETİMİ</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1. MATERYAL TEMİNİ VE ÖRNEK HAZIRLAMA</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2. ÖN MUAMELELER</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.1. Öğütme (Milling)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.2. Buhar Patlatma</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.3. Kimyasal Ön Muameleler</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3. ENZİMATİK HİDROLİZ</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4. FERMANTASYON</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5. ANALİTİK METOTLAR</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6. İSTATİSTİK YÖNTEMLERİ</b> .....	<b>27</b>
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>28</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1. HAMMADDENİN KİMYASAL KARAKTERİZASYONU</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2. BUHARPATLATMA ÖN MUAMELESİ</b> .....	<b>32</b>

<b>5.3. KİMYASAL ÖN MUAMELELERİN LİGNİNE ETKİSİ .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4.KİMYASAL ÖN MUAMELELERİN GLİKOZA ETKİSİ .....</b>	<b>37</b>
<b>5.5.KİMYASAL ÖN MUAMELELERİN KSİLOZA ETKİSİ .....</b>	<b>39</b>
<b>5.6. ENZİMATİK HİDROLİZ .....</b>	<b>42</b>
<b>5.7. FERMANTASYON .....</b>	<b>43</b>
<b>5.8. ÖNERİLER .....</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>45</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>54</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>57</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

<b>Şekil 2.1</b>	: Biyokütleden biyoetanol üretiminde kullanılan prosesler .....	<b>10</b>
<b>Şekil 2.2</b>	: Lignoselülozik biyokütle üzerinde ön muamelenin etkisinin şematik olarak gösterimi .....	<b>11</b>
<b>Şekil 3.1</b>	: Biyoetanol üretiminde iş akışı .....	<b>23</b>
<b>Şekil 5.1</b>	: Kimyasal ön muamelelerin lignin miktarına etkisi .....	<b>36</b>
<b>Şekil 5.2</b>	: Kimyasal ön muamelelerin glikoz miktarına etkisi .....	<b>38</b>
<b>Şekil 5.3</b>	: Kimyasal ön muamelelerin ksiloz miktarına etkisi.....	<b>40</b>
<b>Şekil 5.4</b>	: Enzimatik hidroliz sonucunda tam kuru hammaddeye oranla toplam şeker dönüşümü .....	<b>43</b>

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b>	: Biyoetanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri .....	<b>6</b>
<b>Çizelge 2.2</b>	: Ön muamele yöntemleri (lignin uzaklaştırıcı ve hemiselülozları hidrolize edici) .....	<b>12</b>
<b>Çizelge 3.1</b>	: Öğütülmüş numunelerin sınıf dağılımı .....	<b>24</b>
<b>Çizelge 3.2</b>	: Buhar Patlatma Parametreleri .....	<b>25</b>
<b>Çizelge 3.3</b>	: Uygulanan kimyasal analizler ve kullanılan yöntemler .....	<b>27</b>
<b>Çizelge 4.1</b>	: Domates, biber ve patlıcan saplarının kimyasal bileşiminin literatürle kıyaslanması .....	<b>28</b>
<b>Çizelge 4.2</b>	: Buhar patlatma ön muamelesinin hammaddelerdeki kütleli değişimi .....	<b>29</b>
<b>Çizelge 4.3</b>	: Numunelerin buhar patlatma ön muamele önce ve sonrası kimyasal bileşimi .....	<b>29</b>
<b>Çizelge 4.4</b>	: Kimyasal ön muamele işlemlerinin verimi .....	<b>29</b>
<b>Çizelge 4.5</b>	: Kimyasal ön muamele sonrası sıvıya geçen şeker .....	<b>29</b>
<b>Çizelge 4.6</b>	: Kimyasal ön muamele uygulamalarının lignin, glikoz ve ksiloz üzerine etkisi .....	<b>30</b>
<b>Çizelge 4.7</b>	: Süre, işlem ve kimyasal muamelenin glikoz, ksiloz ve lignin üzerine etkisi .....	<b>30</b>
<b>Çizelge 4.8</b>	: Enzimatik hidroliz sonrası tam kuru hammaddeye oranla toplam şeker verimi .....	<b>31</b>



## SEMBOL LİSTESİ

<b>B</b>	: bor
<b>BP</b>	: buhar patlatma
<b>Ca</b>	: kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	: kalsiyum klorür di hidrat
<b>Cl</b>	: klor
<b>Cu</b>	: bakır
<b>CO</b>	: karbonmonoksit
<b>CO<sub>2</sub></b>	: karbondioksit
<b>Fe</b>	: demir
<b>HPLC</b>	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: sülfürik asit
<b>İYA</b>	: iğne yapraklı ağaç
<b>K</b>	: kelvin
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	: mono potasyum fosfat
<b>kPA</b>	: kilo paskal
<b>Mg</b>	: magnezyum
<b>mM</b>	: milimolar
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	: magnezyum sülfat hepta hidrat
<b>Mn</b>	: mangan
<b>Mo</b>	: molibden
<b>N</b>	: azot
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	: sodyum borhidrür
<b>NaOH</b>	: sodyum hidroksit
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: amonyum sülfat
<b>Ni</b>	: nikel
<b>P</b>	: fosfor
<b>pH</b>	: Asitlik veya bazlık derecesi
<b>ppm</b>	: milyonda bir kısım
<b>S</b>	: kükürt
<b>TAPPI</b>	: Tecnic Association of the Pulp and Paper Industry
<b>U</b>	: unit
<b>UV</b>	: ultraviyole
<b>% v/v</b>	: hacimce yüzde
<b>wt</b>	: ağırlıksal oran
<b>w/v</b>	: ağırlık/hacim
<b>w/w</b>	: ağırlık/ağırlık
<b>YA</b>	: yapraklı ağaç
<b>Zn</b>	: çinko

**SEBZE SAPLARINDAN (DOMATES, BİBER, PATLICAN)  
BİYOETANOL ÜRETİMİNDE ENZİMATİK ETKİNLİĞİN  
ARAŞTIRILMASI  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Ömer ÖZYÜREK**

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Temmuz 2011**

**ÖZET**

Bu çalışma kapsamında lignoselülozik materyallerden ekonomik değeri düşük/yok olan ve hasat edildikten sonra çürümeye bırakılan veya yakılmak suretiyle yok edilirken çevreye zarar veren sebze saplarından biyoetanol üretim olanakları araştırılmıştır. Bu materyaller yüksek polisakkarit içeriğine (%65-80) haiz olup bu atık materyalin endüstriyel olarak değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Biyoetanol üretimi fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltacağı gibi petrol bazlı yakıtların neden olduğu sera gazı emisyonu etkisini de azaltacaktır. Esasen etanol gibi bir yakıtın varlığı ve kullanılabilirliği motorun ilk üretildiği tarihten beri biliniyor olmasına rağmen çevre sorunu ve enerji krizlerinin artması ile dünyada geçtiğimiz 30 yılda, ülkemizde ise son yıllarda bu konu hakkındaki çalışmalar artmıştır. Etanolün yanması sonucu, petrol ürünlerine göre daha düşük oranlarda CO, CO<sub>2</sub> ile yanıcı olmayan hidrokarbonlar, azot oksitler ve uçucu organik bileşiklerin oluşması bu konunun önemini daha da çok artırmaktadır.

Bu çalışmada örnekler önce ön muamele işlemlerinden buhar patlatma ve öğütme işlemine, sonrasında ise kimyasallar ((%2'lik (w/v)) NaBH<sub>4</sub>, NaOH ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile 30 ve 90 dk. süreyle muamele edildikten sonra enzim uygulamaları ile fermantasyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Bu kapsamda, bu çalışma için, henüz biyoetanol üretiminde hammadde kaynağı olarak hiç araştırılmamış sebze sapları (domates, biber, patlıcan) kullanılarak biyoetanol üretim olanakları değerlendirilmiştir.

Bu araştırmada bulunan sonuçlara göre; enzimatik hidrolizde en yüksek tam kuru hammaddeye oranla şeker verimi buhar patlatma yapılmış örneğin 30 dk. NaOH (%30.1) ve öğütme işlemine tabi tutulan örneğin 30 dk. NaOH (%27.4) ile mumelesi sonucunda elde edilmiştir. Bu tez araştırmasında elde edilen sonuçlara göre domates, biber ve patlıcan saplarının biyoetanol üretiminde alternatif hammadde kaynakları olabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler : Sebze sapları, lignoselülozik materyaller, ön muamele, enzimatik hidroliz, fermantasyon**

**Sayfa Adedi : 57**

**Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Yalçın ÇÖPÜR**

# EXAMINING ENZYMATIC DIGESTIBILITY OF VEGETABLE STALKS (TOMATO, PEPPER and EGGPLANT) FOR BIO-ETHANOL PRODUCTION

(M.Sc. Thesis)

Ömer ÖZYÜREK

DUZCE UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

July 2011

## ABSTRACT

Increase in environmental pollution and energy dependency forces researchers to search for alternative energy resources, and bio-ethanol seems to be an effective alternative motor fuel. Compared to the petroleum based materials, bio-ethanol had lower combustion and releases lower rates of CO, CO<sub>2</sub>, non-combustible hydrocarbons, nitrogen oxides, and volatile organic compounds.

The aim of this study is to investigate bio-ethanol production from vegetable stalks (tomato, pepper and eggplant). Vegetable stalks are lignocellulosic materials with no economic value burnt or left in the field after harvests leading to environmental pollution. These materials have high polysaccharide contents (%65-80), and they seem to have potential for bio-ethanol production. For the study, integrated steam explosion/dry-milling and chemical pretreatments were applied before enzymatic hydrolysis. Stalks were steam exploded at 198-200 °C at 15 psi for 5 minutes and dry milled using mechanical grinder. Subsequently, each sample was pretreated with chemicals at a solid loading of 10% (w/v) of sodium borohydrate (NaBH<sub>4</sub>), sodium hydroxide (NaOH), and sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The chemical pretreatments were made with 2% (w/v) concentration under the temperature of 121 °C at 15 psi for residence times of 30 and 90 min.

Results showed that after enzymatic hydrolysis of Celluclast 1.5 L (700 U/g) and Novozym 188 (250 U/g) mixture, the highest sugar yields of 30.1% and 27.4% (% out of dry matter) were observed for steam exploded and milled materials respectively after they were both treated with NaOH for 30 min. According to the observed results of this thesis research, vegetable stalks make good alternative raw material for bio-ethanol production.

**Science Code :**

**Key Words : Vegetable stalks, lignocellulosic materials, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation**

**Page Number: 57**

**Adviser : Associate Professor Yalçın ÇÖPÜR**

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak insan ihtiyaçları her geçen gün artmakta ve bu ihtiyaçların karşılanabilmesi için de üretimin artırılması kaçınılmaz olmaktadır. Bu noktada önemli üretim fonksiyonlarından biri olan enerjinin de bol miktarda elde edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda daha temiz ve yaşanabilir bir çevre için alternatif enerji kaynakları bulunmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Öte yandan fosil kökenli enerji kaynaklarının yakın gelecekte tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olması, enerji fiyatlarının hızla yükselmesi ve çevresel problemlerle karşılaşılması insanları yenilenebilir temiz enerji kaynaklarına yöneltmiştir. Ormanların ve doğal kaynakların daha rasyonel kullanımı ve doğal ekolojik dengenin korunması için fosil yakıtlardan yayılan karbon emisyonunun düşürülmesi önemli konuların başında gelmektedir. Bu gibi nedenlerden dolayı alternatif yeni enerji kaynakları üzerine çalışmalar artarak devam etmektedir. Bu hassas konuya yönelmenin bir yolu da alternatif ve yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak biyoatıklardan ve özellikle de lignoselülozik atıklardan biyoenerji üretilmesidir. Fosil kökenli yakıt kaynaklarının yerine günümüzde sağladığı avantajlarıyla özellikle enerji sektöründe bir devrim haline gelen biyoetanol üretiminin odun biyokütlesi ve buğday, mısır vs. gibi yiyecek kaynakları yerine farklı lignoselülozik yenilenebilir hammadde kaynaklarından sağlanabiliyor olması özellikle bu sektör ve ülke ekonomisi için önem arz etmektedir. Yıllık bitki ve tarımsal atıkların enerji sektöründe değerlendirilmesiyle hem ormanlara olan talebin azalacağı hem de var olan potansiyelleri ile orman endüstrisinde ve enerji üretimi amaçlı kullanım alanlarında önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

Bu amaçla bol miktarda bulunan ve yenilenebilen kaynaklardan olan lignoselülozik maddelerden yararlanma konusunda, biyokütle miktarının yükseltilmesine, kimyasal maddelere dönüştürmeye ve uygun işleme olanaklarına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Lignoselülozik maddelerin sürekli bir şekilde temini için boş alanların hızlı gelişen ağaç türleri ile ağaçlandırılması, ağacın tamamının kullanımına gidilerek atıkların değerlendirilmesi ile üretimin daha da artırılabilceği düşünülmektedir. Buna ilaveten lignoselülozik maddelerden olan yıllık bitkiler ve tarımsal atıkların (saman, göl kamışı, pamuk sapı, ayçiçeği ve tütün sapsarı) enerji üretiminde değerlendirilmesi hem

ormanlara olan müdahaleyi önlemesi, hem de diğer enerji kaynaklarına ikame olabilmesi bakımından oldukça önemlidir.

Biyometanol üretimi fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltacağı gibi petrol bazlı yakıtların neden olduğu sera gazı emisyonu etkisini de azaltacaktır. Esasen etanol gibi bir yakıtın varlığı ve kullanılabilirliği motorun ilk üretildiği tarihten beri biliniyor olmasına rağmen çevre sorunu ve enerji krizlerinin artması ile dünyada geçtiğimiz 30 yılda, ülkemizde ise son yıllarda bu konu hakkındaki çalışmalar artmıştır. Ülkemiz biyoyakıt sürecinin daha çok başında yer almakla birlikte son zamanlarda özellikle mısır ve buğdaydan elde edilen biyometanolün benzinle harmanlanarak kullanıldığı ve bu şekilde piyasaya biyobenzin olarak sürüldüğü görülmektedir. Bu noktada şu önemli konu belirtilmelidir ki biyometanol buğday, mısır vs. gibi yiyecek kaynaklarından kolaylıkla üretilebilmesine karşılık böyle bir durumda her bir biyoyakıt açlık çeken bir dünyayı doyurabilecek ürünleri tüketmiş olacaktır. Besin üretimini azaltmadan biyoyakıtlardan yarar sağlamanın tek yolu, besin kaynaklarını biyoyakıt üretiminden çıkararak bunun yerine genelde atılan, yakılan ya da toprağa gömülen sap, yaprak, hatta talaş gibi lignoselülozik yan ürünlerden etanol elde etmektir. Bu maddelerin büyük bir bölümü, bitkideki hücre zarını oluşturan güçlü şeker molekülü zincirlerine sahip selülozdur. Bu selülozik kaynaktan glikoz fermente edilerek, besinlerle hiç rekabete girmeden bol miktarda biyoyakıt elde edilebilir. Bunun yanında bu tarımsal atıkların kullanımı hem üreticiye ekstra bir gelir sağlayacak hem de bunların yakılmasıyla ortaya çıkan çevre problemlerinin önüne geçilmiş olacaktır.

Ülkemizin yıllık enerji tüketimi 2006 yılında 93 milyon ton eşdeğer petrol (TEP) olduğu ve bu tüketim miktarının yıllık %5 oranında arttığı belirlenmiştir. 2006 yılı enerji açığını kapatmak için enerji ithalatına 28 milyon dolar ödendiği göz önüne alındığında artan enerji ihtiyacımızın ekonomik, güvenli, dışa bağımlılığı en az seviyeye indirecek yenilenebilir kaynaklardan –biyokütle, rüzgâr, güneş– üretiminin ülkemiz için ne kadar önem arz ettiği görülmektedir (Anon 2011d)

Bu çalışma kapsamında lignoselülozik maddelerden biri olan ve çürümeye bırakılan veya yakılmak suretiyle yok edilirken çevreye zarar veren domates, biber ve patlıcan saplarından biyometanol üretim olanakları araştırılacaktır. Türkiye'nin yaş sebze üretim

alanı 1994-2007 yılları arasında 0.8 milyon hektardan %12.5'lik artışla 0.9 milyon hektara ve buna bağılı olarak yaş sebze üretimi 19.6 milyon tondan %24.5'lik artışla 24.4 milyon tona yükselmiştir. 2009 yılında ise sebze ürünleri üretim miktarının bir önceki yıla göre %1.6 oranında azalarak yaklaşık 26.8 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Anon 2010a). Bu rakamla Türkiye; Çin ve Hindistan'dan sonra 3. sırada yer almaktadır. Yaş sebzeler içinde domates %41'lik oranla ilk sırada yer almaktadır (Anon 2010c). Bu materyaller yüksek polisakkarit içeriğine (%65-80) haiz olup bu atık materyalin endüstriyel olarak değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Son yıllarda bu atıklardan levha ürünleri üretim olanakları araştırılmıştır (Güntekin ve diğ., 2008, 2009, Güntekin ve Karakuş, 2008).

Bu çalışmadaki hipotezimiz; yüksek polisakkarit içeriğine sahip (%65-80) atık sebze saplarının (domates, biber, patlıcan) içermiş oldukları şeker ünitelerini ayrıştırıp fermente ederek biyoetanol elde edilebileceğidir. Amacımız ise; ekonomik değeri düşük/yok olan ve yakılarak yok edilirken çevre kirlenmesine neden olan sebze sapı atıklarının ekonomik değere dönüştürülmesi ve ülke ekonomisine kazandırılmasıdır.

## 2. GENEL KISIMLAR

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde artması sonucunda aşırı kullanımdan dolayı fosil kökenli kömür, petrol, doğalgaz vb. gibi yenilenemeyen enerji kaynağı rezervlerinin önümüzdeki yıllarda tükenmekle karşı karşıya kalacağı aşikârdır. Diğer taraftan enerji kullanan endüstrilerin sürekli gelişmesi enerji gereksiniminin artmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda üretilen enerji ile tüketimi arasındaki farkı kapatmak için yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi artmıştır.

Fosil kökenli yakıt kaynakları yıllardır dünyanın her yerinde enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ham petrolün, dünya enerji kaynaklarının %38'ini, kömürün %25'ini ve doğal gazın da %22'sini oluşturmasıyla, dünya enerji gereksiniminin %85'i fosil kökenli yakıt kaynaklarından sağlanmaktadır. Dünya petrolünün ise yaklaşık olarak %75'i Orta Doğu ülkelerinde bulunmakta olup, ülkemiz gibi petrol fakiri ülkeler yakıt teminindeki aksamalardan ve fiyat artışlarının neden olduğu ekonomik ve stratejik aksaklıklardan bir hayli etkilenmektedirler (Zerbe, 1982). Bu sebeple de 1970'li yıllarda meydana gelen petrol krizinden sonra ülkeler kendi kaynaklarını kullanarak dışa bağımlılıklarını azaltabilmek için yeni alternatif enerji kaynakları bulma ve yararlanma zorunluluğunu hissetmişlerdir.

Son yıllarda çeşitli ülkelerde biyoyakıt üretim programları uygulanmakta olup, bu programların kısa vadedeki amaçları alternatif taşıt yakıtları, katkı maddeleri ve çeşitli yağların düşük maliyetli biyokütlelerden üretimi için gerekli teknolojileri üretmek; orta ve uzun vadeli programlarda ise enerji amaçlı bitkiler yetiştirmektir. Günümüzde dünyada yapılan çalışmaların büyük bir kısmı ise yenilenebilir tarım bitkilerinden biyoetanol ve biyodizel üretimidir. Özellikle son zamanlarda odun hammaddesi yerine yıllık bitki ve tarımsal atıkların bu amaç için kullanılmasıyla hem ormanlara olan talebin azaltılması amaçlanmakta hem de orman endüstrisinde ve enerji üretimi amaçlı kullanım alanlarında bir boşluğu doldurması amaçlanmaktadır (Güler ve Akgül, 2001).

Fosil yakıtlarının enerji amaçlı kullanılması sonucu, atmosferdeki CO<sub>2</sub> emisyon miktarı 150 yıl içinde büyük oranda artarak 280 ppm'den 365 ppm'e çıkmıştır. Atmosferdeki CO<sub>2</sub> emisyonunun dünya çapında sınırlandırılması Kyoto protokolü ile kabul edilmiş ve

Avrupa Birliđi ülkeleri 2010 yılına kadar enerji tüketiminin %12'sini yenilenebilir doğal kaynaklardan üretmeyi hedeflemişlerdir (Galbe ve Zacchi, 2002).

Yüksek miktarda elde edilebilen bölgelerde biyokütlenin enerji üretmek için kullanılması, teknolojilerdeki ilerlemeler ve çevresel ihtiyaçlar ile beraber önem kazanmıştır. Bu noktada, yenilenebilir doğal kaynaklardan kimyasal ve biyolojik yolla elde edilen yakıt değeri yüksek biyoetanolün kullanılması birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (Zerbe, 1982). Ayrıca etanolün yanması sonucu, petrol ürünlerine göre daha düşük oranlarda CO, CO<sub>2</sub> ile yanıcı olmayan hidrokarbonlar, azot oksitler ve uçucu organik bileşiklerin oluşması bu konunun önemini daha da çok artırmaktadır (Galbe ve Zacchi, 2002).

Biyoetanolün fosil yakıtlara göre üstünlükleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Çevre ve iklim korumalı oluşu, dolayısıyla Kyoto antlaşmasına uygunluğu,
- Enerji bakımından ele alındığında; benzine göre 2-3 oktan daha yüksek enerji vermesi ve daha temiz bir enerji maddesi olması,
- Bileşiminde; daha az formaldehit bulunması, kükürt bulunmaması, yandığında daha az karbondioksit ve karbonmonoksit vermesi,
- Biyolojik parçalanabilirliği, suda çözünebilirliği, daha ucuz oluşu, ayrıca tarıma katkı sağlamasıdır (Anon 2010b)

Biyoetanol özellikle polisakkarit ve disakkarit bileşimine sahip biyokütleden üretilen bir üründür. Benzin ile kullanıldığında oktan sayısını artırır, CO ve hidrokarbonlar gibi zararlı gazların emisyonlarını azaltarak tam yanma sağlar. Biyoetanol buhar ile etilenin kimyasal reaksiyonu sonucu üretilmesine rağmen genellikle şekerin fermantasyonu ile üretilir (Anon 2011a, b). Etanol veya etil alkol temiz renksiz bir sıvı olup, biyolojik olarak bozunur ve çevre açısından bir tehdit oluşturmaz. Etanol yüksek oktanlı bir yakıt olup, petrolde oktan artırıcı olarak kullanılır. Etanol ile benzin karıştırılarak emisyonu azaltmak ve tam bir yanma sağlamak mümkündür. Yaygın olarak karıştırılan kullanma oranları %10 etanol ve %90 petrol şeklindedir (Ballesteros ve diğ., 1991).



## 2.1. BİYOETANOL ÜRETİMİNDE KULLANILAN HAMMADDELER

Biyofuel (biyoetanol, biyoyakıt) bitki yağlarından, şeker pancarından, tahıllardan, organik atıklardan ve işlenmiş biyokütlelerden elde edilebilir. Kullanılan biyolojik hammaddenin kayda değer miktarda etanole dönüşebilen nişasta veya selüloz gibi içeriğe sahip olması bu noktada önem arz etmektedir (Malça ve Freire, 2006).

Biyoeanol üretiminde kullanılan hammaddeler üç sınıfa ayrılmaktadır:

1. Sakkaroz içeren hammaddeler (şeker pancarı, şeker kamışı, sorgum vb.),
2. Nişastalı materyaller (buğday, mısır, arpa vb.),
3. Lignoselülozik biyokütle (odun, saman, ot, sebze sapları vb.).

Biyoeanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Biyoetanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri (Linoj Kumar ve diğ., 2006).

Hammadde	Biyoetanol üretim potansiyeli (litre/ton)
Şeker kamışı	70
Şeker pancarı	110
Tatlı patates	125
Patates	110
Kassava	180
Mısır	360
Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340
Sorgum	60
Bagasse	280

Biyoeanol üretiminde en önemli problem üretimde kullanılacak hammaddenin varlığıdır. Kullanılacak hammaddenin mevsimsel değişimi ve coğrafik konumu biyoetanol üretiminde önemli etkenler olmaktadır. Hammadde maliyetlerindeki değişim biyoetanol üretim maliyetlerini büyük ölçüde etkilemektedir (Zarzycki ve Polska, 2007). Bu noktada şu önemli konu belirtilmelidir ki biyoetanol buğday, mısır vs. gibi yiyecek kaynaklarından kolaylıkla üretilebilmesine karşılık böyle bir durumda her bir biyoyakıt açlık çeken bir dünyayı doyurabilecek ürünleri tüketmiş olacaktır. Besin üretimini azaltmadan biyoyakıtlardan yarar sağlamanın tek yolu, besin kaynaklarını

biyoyakıt üretiminden çıkararak bunun yerine genelde atılan, yakılan ya da toprağa gömülen sap, yaprak, hatta talaş gibi lignoselülozik materyallerden etanol elde etmektir. Bu maddelerin büyük bir bölümü, bitkideki hücre zarını oluşturan güçlü şeker molekülü zincirlerine sahip selülozdur. Bu selülozik kaynaktan glikoz fermente edilerek, besinlerle hiç rekabete girmeden bol miktarda biyoyakıt elde edilebilir. Ayrıca bu tarımsal atıkların kullanımı hem üreticiye ekstra bir gelir sağlayacak hem de bunların yakılmasıyla ortaya çıkan çevre problemlerinin önüne geçilmiş olacaktır.

Biyoetanol üretiminde kullanılan *sakkaroz içeren hammaddeler* şeker kamışı ve şeker pancarından oluşmaktadır (Zarzycki ve Polska, 2007). Sakkaroz veya diğer adlarıyla sükroz veya çay şekeri,  $C_{12}H_{22}O_{11}$  formülüyle gösterilen ve bir glikoz ve bir fruktoz molekülünün bir araya gelmesiyle meydana gelen disakkarittir (Anon 2011d). Bunlar, nişastalı hammaddelere veya lignoselülozik biyokütlelere nazaran sadece disakkarit yapısında olduğu için biyoetanole dönüşümünün daha kolay olması nedeniyle üretimde tercih sebebidir. Çünkü ön hidroliz gerektirmezler ve disakkaritler sadece maya hücreleri tarafından degradasyona uğratılabilir (Cardona ve Sanchez, 2007).

Avrupa ülkelerinde daha çok pancar melasları sakkaroz içeren hammaddeler olarak biyoetanol üretimde kullanılmaktadır (Cardona ve Sanchez, 2007). Şeker pancarı kullanımının başlıca avantajları ise üretimde toprağın nadas süresinin kısa oluşu, daha yüksek biyoetanol verimi sağlanması, iklim değişikliklerine olan toleransı, üretimde daha az su ve gübre gerektirmesidir. Diğer taraftan sorgum ise kuraklığa dayanıklı önemli tarımsal ürünlerden biridir. Özellikle gelişmekte olan ülkeler için bu hammadde kaynağı gerek biyoetanol üretiminde gerekse kimyasal maddeler ve enerji üretiminde büyük potansiyele sahiptir.

Biyoetanol üretiminde kullanılabilecek diğer bir hammadde kaynağı da *nişasta bazlı materyallerdir*. Nişasta bir homopolimer olarak tanımlanan biyopolimer olup, sadece tek monomer, D-glukozdan oluşur (Pongsawatmanit ve diğ., 2007). Nişastadan biyoetanol elde edebilmek için bu karbonhidrat zincirinin koparılarak glikoz şurubunun elde edilmesi amacıyla mayalar kullanılmaktadır. (Cardona ve Sanchez, 2007).

Nişasta uzun zincirli glikoz moleküllerinden oluşmakta ve bu yapının fermente edilebilir şekerlere dönüşümü için çeşitli hidroliz teknikleri uygulanabilmektedir. Nişastanın fermente edilebilir şekerlere dönüşümü, nişastanın suyla reaksiyonunu kapsayan hidroliz işleminden geçmektedir (Yoosin ve Sorapipatana, 2007). Enzimatik ve asit hidroliz işlemleri uygulanarak da hidroliz işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Nişasta bazlı biyoetanol endüstrisi yaklaşık 30 yıldır yaşamakta olup, geçen zaman içinde enzim verimliliğinde sağlanan iyileşmeler yanında işlem süresi ve maliyetlerin düşürülmesi biyoetanol verimliliğini olumlu yönde etkilemiştir (Mabee ve diğ., 2006).

Biyoetanol üretiminde kullanılan diğeri bir hammadde ve aynı zamanda bu çalışmanın hammadde kaynağı *lignoselülozik biyokütledir*. Lignoselülozik biyokütle selüloz, hemiseluloz ve lignin olmak üzere üç temel yapı taşından oluşmaktadır. Selüloz lignoselülozik biyokütlenin ana bileşeni olup biyokütlenin ağırlıkça %40-50'sini oluşturmaktadır (Gurgel ve diğ., 1995). Hücrelerin direnç değerinden sorumludur. Selüloz  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glikozidik bağı ile bağılı glikoz birimlerinden oluşmaktadır. Binlerce glikoz birimlerinin bir araya gelmesiyle selüloz zincirleri meydana gelir. Selüloz zincirlerinin, içerdikleri hidroksil grupları ile hidrojen köprü bağları oluşturarak bir araya gelmesiyle fibriller meydana gelmektedir (Granström ve diğ., 2000). Bitkideki selüloz miktarı hücre çeper içeriğine bağılı olup bitki türleri ve çeşitleri arasında farklılık göstermektedir. Bitkinin yaşı ve bitki kısımları ayrıca selüloz miktarını etkilemektedir.

Hemiselülozlar yapı taşı olarak 5 karbonlu pentoz (ksiloz ve arabinoz), 6 karbonlu heksoz (mannoz, glikoz, galaktoz) ve üronik asitlerinden oluşan heterojen polimerlerdir. Hemiselüloz polimerlerinin içerikleri bitki türü ve dokusuna bağılıdır. Ksilanlar yapraklı ağaç odunlarında en fazla miktarda bulunan selülozik olmayan polisakkaritlerdir. Ksilan ana zincirinin yaklaşık %80'i ksiloz içermekte olup ana zincire O-2 ve/veya O-3 bağı ile bağılı arabinoz, ksiloz ve bazen de galaktoz birimlerini içeren oligomerik yan dallarla karşılaşmak mümkündür (Saulnier ve Thibault, 1999). İğne yapraklı ağaçlarda ise galaktoglukomannanlar ve glukomannanlar ana hemiselüloz bileşenleri olup ksilanlar az miktarda bulunmaktadırlar.

Hemiselülozlar lignoselülozik odunsu biyokütlenin yaklaşık %30'unu oluşturan, selülozdan sonra ikinci en önemli odun polisakkarit kısmıdır (McMillan, 1994). Odun

dışı bitkilerde ise hemiselüloz oranı biraz daha yüksek olabilmektedir. Mısır sapı, mısır koçanı, buğday sapı, pirinç sapı ve şeker kamışı gibi farklı tarımsal atıklarda hemiselüloz oranı %40'lara ulaşabilmektedir. Yapraklı ağaç odunlarında arabinoz oranı toplam pentozun %2-4'ünü oluştururken, bu oran otsu bitkilerde %10-20'lere ulaşmaktadır. Arabinoz içeriğinin mısır liflerinde ise %30-40'lara ulaşabileceği bildirilmektedir (Kormelink ve Voragen, 1993).

Çoğu yapraklı ağaç odunu hemiselülozlarında en baskın pentoz şekeri ksilan iken, enerji ürünleri olarak ifade edilen switchgrass (dallı darı) gibi diğer otsu bitkiler ve tarımsal atık hemiselülozlarında ise en baskın şeker arabinoz olabilmektedir. Bu ise biyoetanol üretimi için kullanılan hammadde ve bu hammadde içeriğinin önemini göstermektedir.

Lignin polisakkaritlerden sonra hücre çeperinde en fazla miktarda bulunan dallanmış yapıdaki fenolik bileşendir. Lignin doğada oldukça fazla miktarda bulunan ve ekonomik öneme sahip doğal hammadde olması nedeniyle yapısı ve biyosentezi konusunda birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. İğne yapraklı ağaç odun ve yapraklı ağaç odunlarının lignin içerikleri %20-40 arasında değişirken bu oran bagasse (bagas= şeker kamışı artığı veya sapı), mısır koçanı, fıstık kabuğu ve saman gibi otsu bitkilerde %10-40 arasında sınırlı kalmaktadır (Yaman, 2004).

Lignin polimeri yapıtaşları p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol olarak adlandırılan birimlerinden oluşmaktadır. Her bir ünite bir diğeriyle birçok tipte bağlantı yaparak lignin polimerini oluşturmaktadır. Lignin yapısındaki ve miktarındaki farklılıklar bitki grupları ve türleri arasında farklılık arz etmekte olup ayrıca bitkinin yaşı, hücre tipi ve tek bir hücrenin farklı kısımlarında farklılık arz etmektedir (Fengel ve Wegener, 1984). İğne yapraklı ağaç lignini başlıca guayasil (G-üniteleri) birimlerini içermekte olup, az miktarda p-hidroksifenil (H-üniteleri) birimleri içermektedir. Yapraklı ağaç lignini hem siringil (S-üniteleri) hem de guayasil (G-üniteleri) birimleri ve az miktarda p-hidroksi fenil (H-üniteleri) birimleri içermektedir (Fengel ve Wegener, 1984).

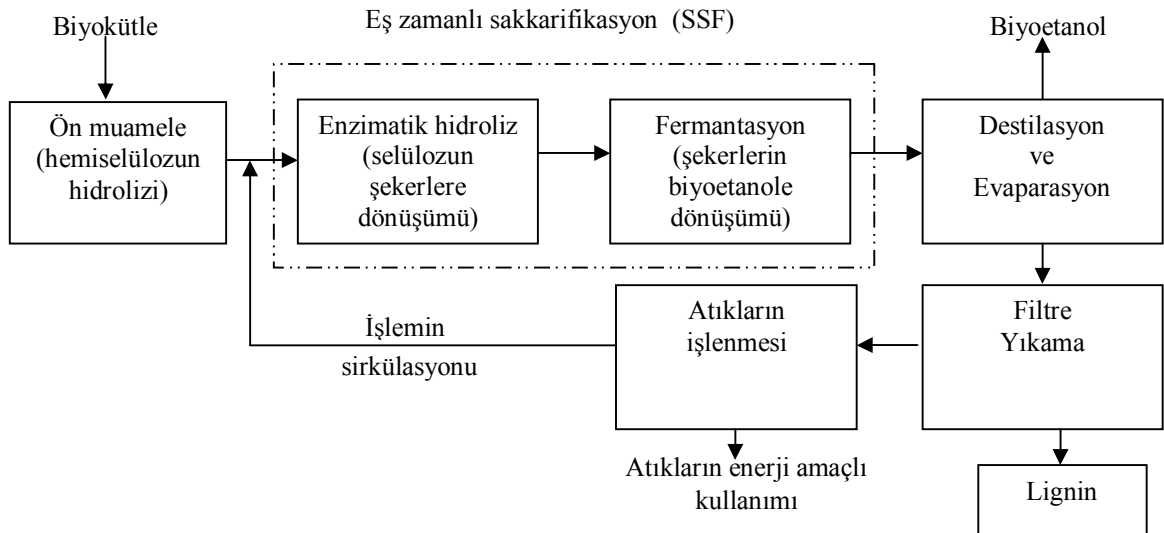
Lignin hücre çeperinin mikrobiyal hücumlara karşı dirençli olmasını sağlamaktadır. Hücre çeperinde diğer temel bileşenler ile de bağ yapmaktadır. Polisakkarit ve

proteinlerle olan karşılıklı bağlarla oldukça karmaşık üç boyutlu ağlar oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler ve karbonhidratlar arasındaki bu bağ liflerin bireysel hale getirilmeleri ve kullanımlarını zorlaştırmaktadır (Fengel ve Wegener, 1984).

Mineraller bitkilerin büyüme ve gelişmeleri için gereklidir. Bunların bitkilerdeki oranları %0,1-1,5 (kuru madde) arasındadır. Makro besinlerden olan N, P, S, K, Mg ve Ca gibi organik bileşikler proteinler ve nükleik asitler için gereklidir ve bitkide ozmotik basıncı sağlamaktadırlar. Mikro besinlerden olan Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl ve Ni gibi bileşenler genellikle enzim üretimi veya aktivasyonunu etkilemekte olup bunların bitkilerdeki miktarları düşüktür. Bitkilerdeki mineral maddelerin oranları bitki yaşı veya gelişme dönemi, bitki türü ve diğer minerallerin konsantrasyonuna ve aynı zamanda bitkide bulunduğu kısma bağlı olarak değişmektedir (Fengel ve Wegener, 1984).

## 2.2. BİYOETANOL ÜRETİMİ

Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanole dönüşümü dört ana aşamadan oluşmaktadır: *Ön muamele, hidroliz, fermantasyon ve ürünlerin ayrılması/distilasyon*. Basit bir şekilde biyokütlenin biyoetanole dönüşümü Şekil 2.1 de gösterilmiştir.



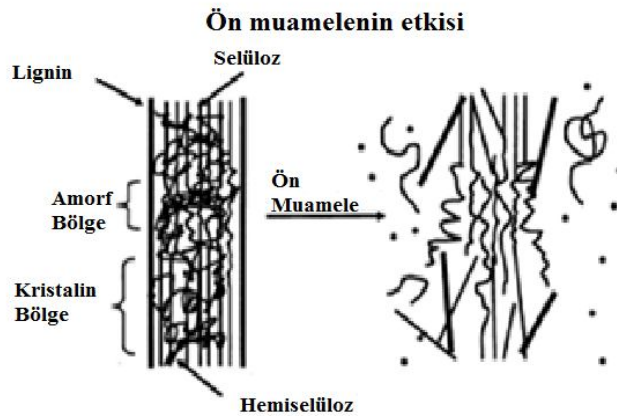
Şekil 2.1: Biyokütleden biyoetanol üretiminde kullanılan prosesler (Balat ve diğ., 2008)

Lignoselülozik maddelerin biyodönüşümünde birinci adım *boyut küçültme* ve *ön muameledir* (Anon 2011c). Ön muamele selülozun dönüşümünde önemli bir araçtır. Şekil 2.2’de gösterildiği üzere ön muamele selülozik biyokütlenin yapısını değiştirerek selülozu enzimler açısından daha kolay ulaşılabilir bir yapıya dönüştürmekte ve karbonhidratların fermente edilebilir şekerlere ve selülaz üretici mikroorganizmalara dönüşümünü kolaylaştırmaktadır (Mosier ve diğ., 2005, Patel ve diğ., 2007)

Ön muamelenin başarılı olabilmesi için:

1. Şekerlerin formasyonunu artırmalı ya da şekerleri daha sonraki hidroliz işlemleri için uygun yapıya dönüştürebilmeli,
2. Karbonhidratların degradasyonunu ve kaybını önlemeli,
3. Sonraki hidroliz ve fermantasyon işlemlerinde yan ürün inhibitörlerinin oluşumu önlemeli,
4. Maliyeti olumsuz etkilememelidir.

Ön muamele aşaması asit veya enzim katalizörlü hidroliz işlemlerinin etkisini kolaylaştırmak amacıyla lignoselülozik yapının fiziksel bozulmasına katkıda bulunmakla birlikte yöntemin ekonomikliğini de büyük ölçüde etkilemektedir (Mabee ve diğ., 2006). Yapılan çalışmalar karbonhidratların biyoetanol dönüşümünde maliyet ve süreç açısından en önemli belirleyici faktörün ön muamele olduğunu göstermiştir. Bu konuyla ilgili olarak ön muamelelerin maliyetini düşürücü birçok araştırma ve geliştirme (AR-GE) yaklaşımı mevcuttur (Chandel ve diğ., 2007). Maliyet araştırmaları ve etkin ön muameleler biyoetanol üretim teknolojisinin temelini oluşturmaktadır (Hamelinck ve diğ., 2005).



Şekil 2.2: Lignoselülozik biyokütle üzerinde ön muamelenin etkisinin şematik olarak gösterimi (Hsu ve diğ., 1980).

Ön muameleler; mekanik (Rivers ve Emert, 1987), buhar patlatılması (Brownell ve Saddler, 1987, Zhang ve diğ., 2007), amonyak lif patlatılması (Alizadeh ve diğ., 2005, Indacochea ve diğ., 2006), süperkritik CO<sub>2</sub> muamelesi (Kim ve Hong, 2001), alkali veya asit ön muamelesi (Silverstein ve diğ., 2007, Champagne, 2007), ozon ön muamelesi (Indacochea ve diğ., 2006) ve biyolojik ön muameleyi (Patel ve diğ., 2007) kapsamaktadır.

Çizelge 2.2 de çeşitli ön muameleler karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Aşağıda ön muamele işlemlerinden bazıları hakkında detaylı bilgi verilecektir.

Çizelge 2.2: Ön muamele yöntemleri (lignin uzaklaştırıcı ve hemiselülozları hidrolize edici) (Hamelinck ve diğ., 2003, 2005)

Ön muamele metodu	Kimyasallar	Sıcaklık/ Basınç	Reaksiyon süresi (dk.)	Ksiloz verimi (%)	Aşağı yönde enzimatik etki	Maliyet
Seyreltik asit hidrolizi	Asit	433 K	2-10	75-90	<%8	+
Alkali hidrolizi	Baz			60-75	%55	++
Katalizlenmemiş buhar patlatılması	-	433-533 K	2	45-65	%90	-
Asit katalizörlü buhar patlatılması	Asit	433-493 K			%88 (2 adım)	-
Amonyak lif patlatılması	Amonyak	363 K	30		%50-90 (2 adım)	
CO <sub>2</sub> patlatılması	CO <sub>2</sub>	5.2 bar			%75 (2 adım)	

Biyokütlenin ön parçalanmasında kullanılan ve bu çalışmamızda kullandığımız işlemlerden biri *buhar patlatmadır (steam explosion, otohizoliz)*. Buhar patlatma işlemi lignoselülozik materyallerde kullanılan en genel ön muamele işlemlerinden birisi olup bu yöntemde hammadde basınçlı buharla patlatılır, basıncın aniden düşürülmesiyle lignoselülozik yapı parçalanır ve hemiselüloz fraksiyonlarının hidrolizine, lignin bileşenlerinin depolimerizasyonuna ve defibrasyona neden olur. Bu işlemde amaç hemiselüloz ve selülozda var olan monomerik şekerleri serbest bırakmaktır (Cara ve diğ., 2008). Hammaddedeki pentozan içeriği buhar patlatılması işleminde uygulanacak parametreleri belirlemede ön bilgi sağlamaktadır. Öyle ki, yüksek sıcaklıktaki buhar hemiselüloz moleküllerindeki asetil gruplarını asetik asite, ksilan polimerlerini ise ksiloz ve ksiloz oligomerlerine dönüştürmektedir. Dolayısıyla düşük pentozan içeriğine

sahip hammaddelerde daha yoğun koşullarda buhar patlatma yapmak yada asidik koşullarda çalışmak gerekebilmektedir (Vaithanomsat ve diğ., 2009).

Buhar patlatma işlemiyle hemiselülozun degradasyonu ve çözülebilirliği yüksek sıcaklık ve kısa reaksiyon süresi (270 °C, 1 dk.) veya düşük sıcaklık, yüksek reaksiyon süresi (190 °C, 10 dk.) işlemlerinin her iki şekliyle de sağlanabilir (Duff, ve Murray, 1996). Uygulamada buhar lignoselülozik materyal içerisine işlemekte ve hemiselülozun hidrolizine katkıda bulunarak doğal asitlerin hemiselülozdan serbest kalmasını sağlamaktadır. Uygulama sonrasında basınç serbest bırakılarak materyalde fazla kayıp olmaksızın lifler bireysel hale dönüştürülmektedir (Mabee ve diğ., 2006). Bu yöntem kavramsal olarak basit olmakla beraber hemiselülozlardan elde edilen şekerlerin verimi %65'lerden daha düşüktür (Wyman, 1999). Buhar patlatma ön muamelesi süresince açığa çıkan asetik asit ve diğer asitlerin hemiselülozun hidrolizine katkı sağladığı düşünülmektedir. Buhar patlatma ardı ardına gelen reaksiyonları ve bunların sonucunda oluşan kimyasal etkileri kapsamaktadır. Çünkü hemiselüloz içerisinde var olan asetil gruplarının hidroliziyle oluşan asetik asit adeta bir katalizör olarak reaksiyon süresince ksiloz ve az miktarda glikoz degradasyonuna katkı sağlamaktadır. Ayrıca su yüksek sıcaklıklarda asit gibi etki etmektedir (Mosier ve diğ., 2005).

Buhar patlatma ön muamelesinin lignoselülozik hammaddeler üzerine etkileri özetlenirse (Jeoh, 1998):

1. Selülozun amorf kısımlarında kristallliği artırır.
2. Hemiselülozlar kolaylıkla hidrolize edilebilir.
3. Delignifikasyonu artırır.

Delignifikasyon ve hemiselüloz hidrolizi bitki hücrelerindeki por hacmini artırır ve bu daha sonraki selüloz hidrolizi için faydalıdır. Bununla birlikte selülozun kristalliğinin oran olarak artması buhar patlatılması ön muamelesinin bir dezavantajıdır. Çünkü bu selülozun asit hidrolizini engelleyici bir etki gösterir (Ladisich, 1989).

Buhar patlatma ön muamelesinin en önemli avantajı mekanik liflendirme (%70'ten fazla enerji gerektirir) ile karşılaştırıldığında daha düşük enerji kullanımını gerektirmesi ve geri dönüşüm ve çevresel açıdan ortaya çıkabilecek maliyetleri azaltması olarak



gösterilebilir. Bu yöntemin tarımsal atıklar ve sert odunlar için maliyet açısından oldukça etkin olduğu düşünülebilir; ancak yumuşak odunlar için aynı durum söz konusu değildir (Balat ve diğ., 2008).

*Öğütme* (milling, lignoselülozik biyokütlenin küçük parçalara ayrılması) lignoselülozik biyokütlenin mekanik bir ön muamelesidir. Bu işlemin amacı biyokütlenin boyutunu ve selülozun kristalliğini azaltmaktır. Biyokütlenin boyutunun küçültülmesi materyalin spesifik alanın artmasına ve polimerizasyon dercesinin (DP) azalmasına yol açmaktadır (Palmowski ve Muller, 1999). Öğütme aynı zamanda biyokütlerde makaslama etkisine sebep olmaktadır (Hendriks ve Zeeman, 2009). Öğütme işleminin bu etkileri sebebiyle lignoselülozik materyal takip eden enzimatik hidroliz için daha uygun hale getirilmektedir. Bununla birlikte öğütme işlemi zaman alıcı, enerji yoğun ve pahalı bir işlemdir. Selülozun ulaşılabilirliğini azaltan ve selülaz enziminin etkisini kısıtlayan lignin materyalinin öğütme ile uzaklaştırılmadığı için kimyasal ön muamele işlemine göre daha az etkilidir (Zheng ve diğ., 2009).

Lignoselülozik materyaller selülozun kristalinitesini azaltmak için çeşitli yöntemlerle öğütülebilirler. Lignoselülozik materyalin boyutu genellikle yongalamadan sonra 10-30 mm arasında, öğütmeden sonra ise 0,2-2 mm arasında değişmektedir (Millet ve diğ., 1976). Öğütmenin maliyeti elde edilmek istenen parça büyüklüğüne ve atık biyokütlenin özelliklerine bağlıdır.

*Asit ön muamelesi* lignoselülozik biyokütleden yüksek verimlerde şeker üretimini amaçlamaktadır (Lee, 2005). Asit ön muamelesinin sülfürik asit (Parajo ve diğ., 1993), perasetik asit (Teixeira ve diğ., 1999), nitrik asit ve fosforik asit (Hussein ve diğ., 2001) gibi farklı çeşitleri mevcuttur. Asit ön muamelesinde selülozu hirolize etmek amacıyla seyreltik veya konsantre asitler kullanılabilir (Lee, 2005). Bütün bu ön muamele metotları içerisinde seyreltik asit ön muamelesi en fazla tercih edilen metottur (Dale ve Moelhman, 2000, Tucker ve diğ., 2003, Karimi ve diğ., 2006, Agbogbo ve Wenger, 2006).

Genel olarak seyreltik asit ön muamelesinin iki farklı uygulanış şekli mevcuttur:

1. Düşük katı madde oranı (%5-10 w/w) ve yüksek sıcaklıktaki ( $T > 433$  K) sürekli sistemler,
2. Yüksek katı madde oranı (%10-40 w/w) ve düşük sıcaklıktaki ( $T < 433$  K) kesintili sistemler (Silverstein, 2004).

Ön muamele koşullarına ve kullanılan substrata bağlı olarak, seyreltik asit ön muamelesi ile lignoselülozik hammaddeden %80-95 verimle hemiselülozik şekerlerin elde edilebileceği belirtilmiştir (Torget ve diğ., 1996, Jeffries ve Jin, 2000, Karimi ve diğ., 2006). Son yıllarda lignoselülozik biyokütlenin seyreltik sülfürik asit ile ön muamelesi, hemiselülözün hidrolizi amacıyla veya selülözün enzimatik hidrolizi için çoğunlukla tercih edilen bir yöntemdir (Howard ve diğ., 2003).

*Alkali ön muamelesi*, diğer ön muamele teknolojileri ile karşılaştırıldığında daha düşük basınç ve sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. Alkali ön muamelesi çevre koşullarında uygulanabilmesine karşılık muamele süresi saat veya günlerle ifade edilecek kadar uzundur. Bazı alkalilerin geri dönüşümü olmayan tuzlara dönüşümü veya ön muamele sırasında meydana gelen reaksiyonlarla biyokütle içerisine tuz gibi işlemleri yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (Silverstein, 2004). Alkali ön muamelesinin en önemli özelliği kullanılan alkalinin diğer bileşenler üzerinde büyük etkiler oluşturmaksızın lignini uzaklaştırabilme kapasitesine sahip olmasıdır (McMillan, 1997). Alkali ön muamelesi için daha çok seyreltik sodyum hidroksit kullanılmaktadır (Lee, 2005). Sodyum hidroksit muamelesi lignoselülozik biyokütlenin şişmesine, iç yüzey alanının artmasına, kristallik derecesinin düşmesine ve ligninin yapısında bozulmalara sebebiyet vermektedir. Ekonomik ve çevresel koşullar göz önüne alındığında, seyreltik sodyum hidroksit muamelesinin konsantre sodyum hidroksit muamelesine nazaran kullanılması daha uygun olmaktadır. (Li ve diğ., 2004).

*Biyolojik ön muamele* işleminde lignoselülozik madde içerisindeki lignini çözmek amacıyla mantarlar kullanılmaktadır. Biyodelignifikasyon olarak tanımlanan işlemler biyokütle içerisindeki ligninin mikroorganizmalar tarafından biyolojik degradasyonu ifade edilmektedir. Bu yöntem 1980'li yıllarda ilk anıldığında pahalı olması, uzun muamele süresi gerektirmesi, bazı yönleriyle yetersiz olması ve mikroorganizmaların

lignin türevlerince zehirlenebilir yapıda olması gibi nedenler yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamakla beraber gelecekte daha etkin bir yöntem olabileceği düşünülmektedir (Hamelinck ve diğ., 2003, 2005). Biyolojik ön muamele fazlasıyla kolay olmakla birlikte elde edilen verim düşük ve delignifikasyon oranı oldukça yavaştır. Ayrıca yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde bu ön muamele işlemini kapsayan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Wyman, 1999).

Ön muamele işleminin ardından biyokütlenin fermente edilebilir şekerlere dönüşümünde gerekli olan ikinci adım su molekülünün ilavesiyle ana molekülün parçalanmasını ifade eden *hidroliz* işlemidir (Balat ve diğ., 2008).  $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$  reaksiyonunda gösterildiği gibi selüloz seyreltik asit, konsantre asit veya enzim (selülaz) yoluyla katalizlenir. Selüloz polimerini glikoza hidrolizleyen yöntemlerden bir kısmı son birkaç yıl içerisinde geliştirilmiştir. Bu yöntemler genellikle selüloolitik enzimleri veya farklı konsantrasyonlarda sülfürik asitleri hidroliz amacıyla kullanmaktadır. Bu uygulamalarda enzim kullanımı durumunda pahalı yatırımlar gerekli olmakta, buna karşılık sülfürik asitin bu işlemde kullanımının daha ucuz olduğu görülmesine rağmen uygulamada sülfürik asit kullanımının en önemli dezavantajı yüksek sıcaklık derecelerinin gerekliliğidir (Mosier ve diğ., 2002). Ayrıca enzimatik uygulamada (pH 4.8 ve sıcaklık 318-323 K) daha yüksek verim sağlanabilmektedir. Alkali veya asit hidroliz işlemlerinin neden olduğu korozyon problemleri bu uygulamaları sınırlamaktadır (Balat ve diğ., 2008).

Lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi saf selüloza nazaran glukon olmayan lignin ve hemiselüloz gibi bileşenler nedeniyle oldukça karmaşıktır (Zhang ve Lynd, 2004). Hidroliz işlemi farklı uygulamalar ile gerçekleştirilebilmekte olup aşağıda bunlardan kısaca bahsedilecektir.

*Asit katalizörlü selüloz hidrolizi* karmaşık heterojen bir reaksiyondur ve hidrolitik kimyasal reaksiyonlar kadar fiziksel bazı faktörleri de kapsamaktadır (Xiang ve diğ., 2003). Monosakkaritlerin yoğun degradasyonu istenilmeyen kimyasalların oluşumuna neden olabilmektedir. Meydana gelmesi mümkün olan yan reaksiyonların sayısı, tamamıyla uygulanan asidin lignoselülozik metaryele nüfuzuna bağlıdır. Öte yandan

asit hidrolizi sonrası uygulanan enzimatik hidroliz işlemi ile mısır sapında verimin %100 oranında, meşe odununda ise %90 oranında arttığı gözlemlenmiştir (Jeoh, 1998).

Lignoselülozik biyokütle asitle hidroliz edildiğinde, değişmeden kalan lignin ve selüloz fraksiyonları yanında ksilanın ksiloza dönüştürüldüğü de belirtilmektedir. Bu durum ksilanın selüloza göre daha fazla amorf yapıda olması, polimerizasyon derecesinin (DP) düşük olması ve asit muamelesi sonucunda hidroliz işlemine daha çok dayanıksız olması ile açıklanabilir (Rahman ve diğ., 2007). Asit hidrolizi ksilozu hızlı bir şekilde furfural ve diğer kondenzasyon yan ürünlerine degrade etmektedir. Oluşan bu degradasyon ürünleri ise mikroorganizmaların etkisini yavaşlatan inhibitörler olarak kabul edilmektedir. İnhibitör etkisi gösteren bileşikler furfural, 5-hidroksimetil furfural (HMF), asetat, hidroksibenzaldehit (HBA), siringaldehid (SGA) ve vanilin gibi ürünlerdir (Rao ve diğ., 2006). Asit hidrolizinin yaygın olarak kullanılan iki şekli var olup bunlar seyreltik asit ve konsantre asit uygulamalarıdır.

*Seyreltik asit hidrolizi* selüloz biyokütlesini biyoetanole dönüştürmede bilinen en eski teknolojidir (Anon 2008c.). Seyreltik asit hidrolizinde hemiselüloz fraksiyonları, selüloz fraksiyonlarına nazaran daha düşük sıcaklıklarda depolimerize olmaktadır. Bu yöntemde hemiselülozdan ksiloz veya diğer şekerleri elde etmek amacıyla seyreltik asitle biyokütle işleme sokulmaktadır (Chandel ve diğ., 2007).

Seyreltik asit hidrolizi selüloz ve hemiselüloz arasındaki farklılıktan ötürü iki kademe uygulanmaktadır. Birinci kademe daha düşük sıcaklıklarda hemiselülozun hidrolizi sağlanırken, ikinci kademe daha yüksek sıcaklıklarda biyokütlenin selüloz kısmının hidrolizi gerçekleştirilir (Demirbas, 2006, 2007). Seyreltik asit yönteminin en önemli avantajı kesintisiz işlemi kolaylaştıran hızlı reaksiyon oranı olmakla beraber en büyük dezavantajı ise elde edilen düşük şeker verimidir. Ayrıca hızlı kesintisiz yöntemlerde daha iyi asit penetrasyonu sağlayabilmek amacıyla hammaddenin boyutsal olarak küçültülmesi önem arz etmektedir (Badger, 2002).

*Konsantre asit hidrolizi* yönteminde ise ekonomik uygulanabilirliği sağlamak için şeker veriminin optimizasyonu ve asit geri kazanımının etkin şekilde gerçekleştirilebilmesi gerekmektedir (Demirbas, 2004, 2007). Konsantre asit yönteminde reaksiyon süresi

seyreltik asit yöntemine nazaran daha uzundur (Anon 2011c). Bu yöntemin en önemli avantajı yüksek şeker verimi sağlamasıdır. Konsantre asit yöntemi, seyreltik asit yöntemine nazaran daha fazla maliyet düşürücü potansiyele sahiptir (Demirbas, 2005). Konsantre sülfürik veya hidroklorik asitle çalışmak zor olmakla beraber, kullanılan tüm asitlerin yöntemin ekonomikliğini sağlamak amacıyla geri dönüştürülebilir ve tekrar konsantre olabilir nitelikte olması gerekir (Jeffries ve Jin, 2000).

Bir diğer hidroliz metodu *enzimatik hidroliz* işlemi olup, enzimlerin bitki proteinlerinde bazı kimyasal reaksiyonlara sebep olması ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemin uygulanmasında son yıllarda iki teknolojik gelişme sağlanmış olup bunlar enzimatik ve direkt mikrobiyal dönüşüm metotlarıdır (Demirbas, 2005).

Selüloz hidrolizinde substratın lignin ve hemiselüloz içeriği, yüzey alanı ve selülozun kristallik derecesi gibi yapısal parametreler lignoselülozik materyallerin enzimatik hidroliz işlemi oldukça etkilemektedir. Enzimatik hidroliz işlemiyle lignoselülozlarda var olan glukanın yalnızca %20'si (wt) çözülebilir hale getirilebilirken, yapılan ön muamele işlemleri sayesinde enzimatik etkinin artırılacağı belirtilmiştir. Uygun koşullar altında ön muamele işlemiyle selülozun neredeyse tamamı orijinal materyal içinde kalmakta ve bu da enzimatik hidrolizi büyük ölçüde etkilemektedir (Zhang ve Lynd, 2004).

Selülaz enzim sistemleri çözünmez selülozik substrat üzerine etki ettiğinde eş zamanlı olarak üç süreç ortaya çıkmaktadır (Mosier ve diğ., 2002):

1. Çözünmemiş kalıntı selülozda kimyasal ve fiziksel değişiklikler,
2. Selüloz molekülünün yüzeyinden çözülebilir kısımların ayrılmasını kapsayan birincil hidroliz işlemi,
3. Çözülebilir ve düşük moleküler ağırlıklı kısımların ve hatta glikozun hidrolizini kapsayan ikincil hidroliz işlemleridir.

Selülozik materyallerin enzimatik hidroliz oranı oldukça hızlı bir şekilde düşmektedir. Genel olarak enzimatik selüloz degradasyonu hızlı birincil faz ve bunu takip eden ve substrat tamamen tükeninceye kadar devam eden daha yavaş ikincil faz süreçlerinin toplamıyla karakterize edilebilir (Nutt, 2006).

Selülozun enzimatik hidrolizinde geniş çerçevede kullanılan enzimler endo-glukonazlar veya endo-1,4- $\beta$ -glukanazlar (EG), ekzogluksanazlar veya sellobiyohidrolazlar (CBH) ve  $\beta$ -glukosidazlardır (BGL) (Howard ve diğ., 2003, Zhang ve diğ., 2006). Bahsedilen bu enzim türleri içinde EG enzimleri selüloz zincirinde rastgele kopmalara neden olarak degradasyon etkisini artıran en etkin türdür (Oyekola, 2004). EG selüloz zincirinin duyarlı olan intramoleküler  $\beta$ -1,4 glukozidik bağlarını hidrolizlerken, ekzo-glukonazlar çözülebilir sellobiyoz veya glikoz kısımlarını serbest bırakmak amacıyla selüloz zincirlerini uç noktalarından koparır. BGL ise sellobiyoz inhibisyonunu engellemek amacıyla sellobiyozu glikoza hidrolizler (Zhang ve diğ., 2006). BGL sellobiyozun glikoza hidrolizini katalizleyerek hidroliz işlemini tamamlar (Heikinheimo, 2002).

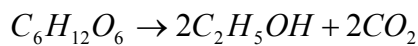
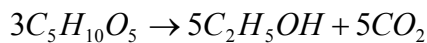
Bakteriler ve mantarlar lignoselülozik materyallerin hidrolizi için kullanılan selülaz enzimini üretebilmektedirler. Bu mikroorganizmalar aerobik ya da anaerobik, mezofilik ya da termofilik olabilirler. *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* ve *Streptomyces* sınıfına ait olan bakteriler selülaz enzimi üretebilmektedirler (Sun, 2002). Filamentli mantarlar selülaz ve hemiselülaz enzimlerinin asıl kaynağını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Trichoderma sp.* (*T. viride*, *T. reesei*, *T. logibrachiatum*) türlerinin kristalin selülozu degrade etme kapasitesine sahip en üretken tür oldukları belirlenmiştir.

Mısır lifleri %15 selüloz ve %35 hemiselüloz yanında %20 nişasta içermektedir (Saha ve diğ., 1998). Saha ve Bothast (1999), mısır lifindeki nişasta, selüloz ve hemiselülozun fermente edilebilir şekerlere dönüşümü için çeşitli ön muamele işlemlerini de kapsayan (sıcak su, alkali ve seyreltik asit) enzimatik sakkarifikasyon yöntemlerini denemişler ve sıcak su ön muamelesinin (121 °C, 1 sa.) nişasta ve selülozun enzimatik sakkarifikasyonunu kolaylaştırdığını ancak hemiselülozun enzimatik sakkarifikasyonunu etkilemediğini ortaya koymuşlardır. Alkali ile ön muamele görmüş mısır liflerinin (10:1 w/w, 121 °C, 3 sa.) hemiselülaz enzimiyle hidrolizi de benzer sonuçlar vermiştir. Elde edilen sonuçlar mısır lifi hemiselülozlarını monomerik şekerlere verimli bir şekilde dönüştüren hiçbir ticari hemiselülaz enziminin olmadığını ortaya koymuştur. Ancak hemiselüloz ve nişasta bileşiklerinin seyreltik asit ön muamelesiyle basit şekerlere dönüştürülmesi ile arta kalan selüloz kısmı ticari olarak

kullanımı olan herhangi bir enzim ile glikoza dönüştürülebilir. Bu yöntem mısır liflerinin seyreltik asit ile ön muamelesini (%15 katı madde w/v, %0.5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v/v, 121°C, 1 sa., pH 5.0) ve ardından ön muamele görmüş liflerin ticari selüloz ve β-glukosidaz enzimleriyle sakkarifikasyonunu kapsamakta olup, elde edilen monomerik şekerlerin verimi %85-100 arasında değişmektedir. Bu yöntemle furfural ve HMF gibi fermentatif mikroorganizmalar için inhibitör olarak kabul edilen yan ürünlerin oluşumu söz konusu değildir. Bu yüzden seyreltik asit ön muamelesi inhibitör bileşiklerinin oluşumunu engellemek ve devam eden enzimatik sakkarifikasyonda selülozun fermente olabilen şekerlere daha mükemmel bir şekilde dönüşümünü sağlamak amacıyla nispeten düşük sıcaklıklarda uygulanır.

Asit veya alkali hidroliz işlemleriyle karşılaştırıldığında enzimatik işlem daha ılımlı koşullar altında (pH 4.8 ve sıcaklık 318-323 K) gerçekleştirilir ve kazanda korozyon problemlerine neden olmaz (Sun, 2002). Enzimatik hidroliz işlemi asit katalizörlü hidroliz işlemlerine nazaran daha iyi verim sağlaması dolayısıyla daha fazla tercih edilmekte olup, yöntemin maliyet üzerindeki olumsuz etkileri ise son yıllarda üreticilerin üretimlerinde modern biyoteknolojiyi kullanmalarına bağlı olarak minimize edilmeye çalışılmaktadır (Pan ve diğ., 2005).

Genellikle asit muamelesiyle hidrolize olmuş lignoselülozlardan elde edilen hidrolizatlar biyoetanol üretimi amacıyla daha çok maya gibi mikroorganizmalar ile muamele edilerek *fermantasyon* işlemi gerçekleştirilmektedir. Lignoselüloz hidrolizatları glikoz haricinde ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz ve oligosakkaritleri de içermekte olup, kullanılan mikroorganizmaların tüm bu şekerleri etkin bir şekilde fermente edebilme kapasitesine sahip olması gerekir (Katahira ve diğ., 2006). Aşağıda belirtilen reaksiyonlara bağlı olarak ksiloz ve glikozdan kg başına elde edilen maksimum teorik verim 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg CO<sub>2</sub>'dir (Balat ve diğ., 2008, Hamelinck ve diğ., 2003, 2005).



Fermentasyon işleminde kullanılan bazı mikroorganizmalar fermente edilebilir şekerleri besin kaynağı (yiyecek) olarak görebilmekte ve bunun sonucunda etil alkol ve diğer

bazı yan ürünler oluşabilmektedir. Bu mikroorganizmalar daha çok glikoz gibi 6 karbonlu şekerleri tüketmektedirler. Bu yüzden yüksek glikoz içeriğine sahip selülozik biyokütlelerin biyoetanole dönüşümü daha kolay olmaktadır. Öte yandan etanolojenler olarak isimlendirilen mikroorganizmaların, biyokütleden elde edilen şekerlerin yalnızca çok az bir kısmını biyoetanole dönüştürebildiği belirlenmiştir (Demirbas, 2005).

Fermantasyon amacıyla yakın gelecekte çok daha fazla öneme sahip olacağı düşünülen etanolojenik bakteriler ise *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis* türleridir (Dien ve diğ., 2003). Yapılan çalışmalarda *Z. mobilis* bakterisi türlerinin glikoz bazlı hammaddelerden hızlı ve etkin bir şekilde biyoetanol üretme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiş olup, *Z. mobilis* ile yapılan karşılaştırılabilir performans denemelerinde geleneksel mayalara nazaran %5 daha yüksek verim ve beş katından daha fazla hacimsel verimlilik elde edildiği gözlemlenmiştir. *Z. mobilis* glikoz fermantasyonunda %97'den fazla biyoetanol verimi ve %12 (w/v)'den fazla biyoetanol konsantrasyonu sağlamaktadır (Mohagheghi ve diğ., 2002).

*K. oxytoca* ise enterik bir bakteri türü olup kağıt ve kağıt hamurunda gelişme gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bakteri pH 5.0 ve 308 K sıcaklık derecesinde gelişme gösterme kapasitesine sahip olup, sellobiyoz ve sellotriyoz kadar heksoz ve pentoz içeren şekerlerde etkili olmaktadır. *E. coli* ve *K. oxytoca*, *Z. mobilis* nazaran daha fazla şeker substratı üzerinde etkin olmaktadır (Dien ve diğ., 2003).

Son yıllarda ise, bakterilerle etanol fermantasyonunun (özellikle pentozların etanole fermantasyonu) sınırlı düzeyde gerçekleşmesi nedeniyle, bakteriler üzerinde genetik çalışmalar yapılarak (bakterilerin genleri ile oynanarak) özellikle 5 karbonlu şekerleri fermente etme yetenekleri artırılmaya çalışılmaktadır. Nichols ve diğ. (2001), glikoz fosfo-transferans (ptsG) mutasyonuna sahip etanolojenik *E. coli* türleri ile yaptıkları çalışmalarda mutantların karışık şekerleri (glikoz, ksiloz, arabinoz) sıralı olmaktan ziyade eş zamanlı olarak %87-94 verimlerde etanol fermente edebildiklerini göstermişlerdir.

Fermantasyon işlemi amacıyla en fazla kullanılan mikroorganizmalardan biride mayalardır. *Saccharomyces cerevisiae*, heksozlardan yüksek biyoetanol üretimi sağlaması ve lignoselülozik biyokütlenin asit hidrolizatlarında inhibitör bileşikleri



yüksek toleransı nedeniyle biyoetanol üretiminde kullanılan en etkin maya türüdür; ancak bu maya ksiloz ve arabinoz gibi 5 karbonlu şekerleri etanole fermente edememektedir. *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* ve *Candida shehate* mayaları ise doğal yapılarıyla ksilozu etanole fermente etme kapasitesine sahiptirler (Wang ve diğ., 1980, Schneider ve diğ., 1981, Bothast ve Saha, 1997). Ksilozdan etanol üretiminde bu mayaların kullanımını; mayaların düşük etanol toleransı, uzun fermentasyon süresi, optimal seviyede oksijen ile besleme oranının kontrolündeki zorluk ve ayrıca lignoselülozik materyalin ön muamele veya hidrolizi süresince oluşan inhibitörlere karşı hassas olmaları gibi faktörler sınırlamaktadır. Ayrıca izomeraz enzimleri kullanılarak ksiloz ksiluloza dönüştürülebilir ve ksilulozda ticari mayalar kullanılarak etanole dönüştürülebilir (Gong ve diğ., 1981, Hahn-Hagerdal ve diğ., 1986), ancak bu yöntem maliyet açısından uygun değildir. Arabinoz ise hemiselüloz hidrolizatlarında kaynağa bağlı olarak var olan bir diğer 5 karbonlu şekerdir ve yalnızca birkaç maya türü arabinozu etanole fermente edebilir (Dien ve diğ., 1996, Chen ve Gong, 1985). Görüldüğü üzere doğal olarak bulunan hiçbir maya türü tüm şekerleri etanole fermente edememektedir. Fermantasyon işlemi kesintili veya kesintisiz sistemlerden oluşabilmektedir. En uygun yöntemin seçilmesi ise mikroorganizmaların kinetik özelliklerine, lignoselülozik hidrolizatın tipine ve yöntemin ekonomikliğine bağlıdır (Chandel ve diğ., 2007).

Fermantasyon sonrasındaki işlem *etanol eldesidir*. Biyokütlenin hidrolizi ve fermantasyonunda ilerleyen teknolojik gelişmeler ve ticari uygulanabilirlik çalışmaları yanında, fermantasyon sonucunda elde edilen ürünlerin toplanması üzerine de gerekli çalışmaların yapılması önem arz etmektedir. Öyle ki, fermantasyon ürünleri çoğunlukla sudan daha uçucu olup, toplanmaları daha çok distilasyon yoluyla yapılmaktadır. Fermantasyon sonucu oluşan ve uçucu ürünleri içeren süspansiyon halindeki materyalden ürünlerin toplanmasında ticari olarak geliştirilmiş distilasyon teknolojisi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Madson ve Lococo, 2000). Distilasyon sistemiyle sıvı karışım içinde biyoetanol sudan ayrılabilir. İşlenmemiş biyoetanolün su içeriği ise genel olarak %80'den fazladır. Etanolü %95.6 konsantrasyonuna (etanolün suyla eş kaynar karışımı) ulaştırmak amacıyla oldukça yüksek enerji gereksinimi vardır.

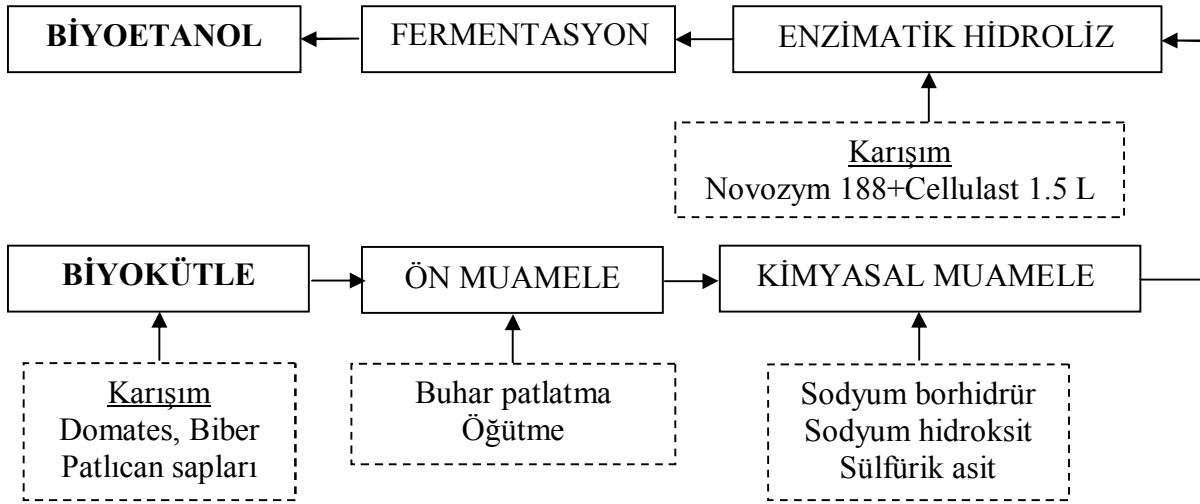
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL TEMİNİ VE ÖRNEK HAZIRLAMA

Bu çalışmada hammadde olarak kullanılan domates (*Solanum lycopersicum*), biber (*Capsicum annuum*) ve patlıcan (*Solanum melongena*) sapsarı Antalya'nın Alanya ilçesinin Payallar bölgesindeki seralardan temin edilmiştir. Alınan hammaddeler Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Laboratuvarları'na getirilip kök ve yaprakları bağ makası yardımıyla temizlenerek 3-5 cm uzunluklarda boyutlandırılmıştır. Numuneler hava kurusu hale getirildikten sonra rutubet miktarları (Tappi T 264) belirlenmiş ve plastik torbalar içerisinde muhafaza edilmiştir.

Uygulamada domates biber ve patlıcan sapsarı eşit miktarda olacak şekilde (tam kuru ağırlığa göre) karıştırılarak çalışmanın bundan sonraki tüm aşamalarında bu karışım kullanılmıştır. Ön muamele işlemleri bu çalışmada öğütme (milling, grinding) ve buhar patlatma (steam explosion) olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Biyometanol üretiminde izlenen aşamalar Şekil 3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Biyometanol üretiminde iş akışı

## 3.2. ÖN MUAMELELER

### 3.2.1. Öğütme (Milling)

Boyut küçültme işlemi Wiley değirmeninde numunelerin mekanik olarak öğütülmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Öğütülen numuneler sarsak elekte ebatlarına sınıflandırılmış ve sınıf dağılımı Çizelge 3.1 de verilmiştir. %16'lık atık miktarı fazla olmakla birlikte laboratuvar çalışmalarının hassaslığını etkileyeceği için kullanılmamıştır. Endüstriyel ölçekli çalışmalar için bu kısım üretim aşamasında kullanılabilir. Öğütülen numunelerin rutubet miktarları (Tappi T 264) belirlenmiş ve plastik torbalar içerisinde muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1: Öğütülmüş numunelerin sınıf dağılımı

Sebze Sapı Karışımı			
20 mesh	40 mesh	60 mesh	Atık
%35	%42	%7	%16

### 3.2.2. Buhar Patlatma (Steam Explosion)

Buhar patlatma (steam explosion) ön muamele işlemi için 990 g numune (tam kuru) buhar patlatma haznesine yerleştirilerek patlatma işlemi yüksek basınçlı reaktörde gerçekleştirilmiştir. Buhar patlatmada yeknesaklığın sağlanması için reaktörde ön ısıtma işlemi uygulanmak suretiyle reaktör önce 100 °C sıcaklığa getirilmiş ve daha sonra numune buhar patlama cihazının sızdırmaz haznesine (reaktör) konularak 198-200 °C sıcaklık ve 15 bar basınç altında 5 dakika süreyle buhar muamelesine tabi tutulmuştur (Çizelge 3.2). İşlem esnasında uygulanan buhar lignoselülozik yapı içerisine işlemekte ve lignini yumuşatmaktadır. Süre bitiminde basıncın aniden düşürülmesiyle (buhar patlatma- steam explosion) lifler bireysel hale getirilmiştir. Ardından buhar patlatma ön muamelesi gerçekleştirilen numuneler filtrasyona tabi tutulup sıvı kısmı uzaklaştırıldıktan sonra numunenin katı kısmı poşetlenip tartılmış ve numunelerin rutubeti tayin edilmiştir (Tappi T 264). Buhar patlatma neticesinde çözünen ve yapıdan uzaklaşan madde miktarı verim hesaplanarak belirlenmiştir. Numuneler bir sonraki işlem için -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2: Buhar Patlatma Parametreleri

Hammadde	Maksimum sıcaklığa çıkış (dk.)	Bekleme Süresi (dk.)	Basınç (bar)	Son Sıcaklık (°C)	Son Basınç (bar)
Karışım	1.16'	5	15	200	15.5

### 3.2.3. Kimyasal Ön Muameleler

Öğütme ve buhar patlatma ön muamele işlemleri sonrasında elde edilen katı materyallerden tam kuru ağırlığı 40 g'a denk gelecek şekilde numuneler tartılarak kilitli poşetlere konulmuştur. Kimyasal ön muamele işlemi için %2 (w/v) konsantrasyonunda NaBH<sub>4</sub>, NaOH ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlardan 400 ml alınarak içlerinde numuneler olan poşetlere konularak (10% (w/v) katı madde oranında) numuneler kimyasal ön muameleye tabi tutulmuşlardır. Kimyasal ön muamele işlemleri 121 °C sıcaklık ve 15 psi (103.4 kPA) basınç altında 30 ve 90 dakika süreyle otoklav içerisinde gerçekleştirilmiştir. Süre bitiminde numuneler filtrasyona tabi tutularak sıvı ve katı kısma ayrılmıştır. Sıvı materyaller gerekli analizler yapılan kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Katı materyaller hava kuru hale getirildikten sonra rutubetleri belirlenerek (Tappi T 264) kimyasal ön muamele sonrası verimleri (%) hesaplanmıştır. Ardından bu materyaller gerekli kimyasal analizler ve hidroliz işlemlerinin yapılması için öğütülüp elendikten sonra 60-80 mesh'lik kısımlar kilitli poşetlerde muhafaza edilmiştir

### 3.3. ENZİMATİK HİDROLİZ

Hidrolitik deneylerde ön işlem (öğütme, buhar patlatma, buhar patlatma+kimyasal ön muamele ve öğütme+kimyasal ön muamele) görmüş olan 1 g (tam kuru) numuneler Celluclast 1.5 L (700 U/g) ve Novozym 188 (250 U/g) enzim karışımları (50% v/v) ile %2 katı madde oranıyla 50 ml 50mM sodyum asetat tamponuna 0.02% w/v (0.0031M) sodyum azid (mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için) ilave edilerek pH 5.0'de muamele edilmiştir. Enzim reaksiyonu çalkantılı inkübatörde 42 °C ve 100 rpm'de 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Numunelerden periyodik aralıklarla (0, 6, 24, 48 ve 72 saat) 1.5 ml örnek alınıp epondorf tüplere konularak devam eden enzimatik reaksiyonu sonlandırmak için 10 dk. boyunca kaynayan su banyosunda bekletilmiş ve ardından

10.000 rpm de 5 dk. boyunca satrifüj edilmiştir. Daha sonra numuneler ilgili analizler yapılana kadar -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **3.4. FERMANTASYON**

Enzimatik hidroliz işlemi sonrası elde edilen hidrolizatlar 5000 rpm’de 10 dk. santrifüj edildikten sonra süzüntüden 20 ml alınarak 100 ml’lik şişelere boşaltılmıştır. 5 g/L konsantrasyonundaki maya özütü ve 3.75 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.375 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ilave edilmiştir. 5% (v/v)’lik *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 mayası ile 30 °C, 100 rpm’de 72 saat süreyle fermantasyona tabi tutulmuştur. Şişeler içinden 0, 6, 24, 48 ve 72 sa. aralıklarla 1 ml örnek çekilmiş ve 0.45µm membran filtreden geçirilerek bu örneklerde HPLC analizi ile glikoz, ksiloz ve etanol konsantrasyonları tespit edilmiştir.

### **3.5. ANALİTİK METODLAR**

Tüm ön muameleler ve hidroliz işlemleri sonrası elde edilen katı ve sıvı kısımlardaki şeker analizleri ve katı kısımdaki asitte çözünen ve çözünmeyen lignin içerikleri NREL yöntemine (Laboratory Analytical Procedures (LAP) from the National Renewable Energy Laboratory) göre belirlenmiştir. (Sluiter ve diğ., 2008). HPLC’deki şeker analizleri öncesinde monosakkaritleri içeren asit hidrolizatlarının pH derecesi kolonun zarar görmemesi için kalsiyum karbonatla 7 düzeyine getirilmiştir. HPLC analizleri Agilent 1200 sistemi ve bu sisteme bağlı RID (refractive index detector) dedektör ile gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak uygulanmıştır. Mobil faz olarak 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmış ve akış hızı dakikada 0.5 ml olacak şekilde belirlenmiştir. Şekerlerin (sellobiyoz, glikoz, ksiloz ve arabinoz) kromatografik ayrılması işlemi için Shodex SH1011 No: H810110 kolonu kullanılmış ve kolon sıcaklığı 60°C olarak gerçekleştirilmiştir. Asitte çözünmeyen lignin içerikleri tartımla, asitte çözünen lignin içeriği ise 320 nm dalga boyunda saf suya karşı UV spektrometrede belirlenmiştir. İndirgen şekerler (540 nm dalga boyunda) DNS (3,5-Dinitrosalisilic acid, 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoik acid) metoduyla belirlenmiştir (Sluiter ve diğ., 2008). Farklı sürelerde (0, 6, 24, 48, 72 sa.) uygulanan enzimatik hidrolizden sonra indirgen şeker içeriği tam kuru maddeye oranla yüzde olarak hesaplanmıştır.

Öte yandan ham ve buharla patlatılmış numunelerde gerçekleştirilen diğer tüm analizler için, Wiley tipi değirmende öğütülen sebze sapsarı laboratuvar tipi sarsak elekte elenmiş ve 60-80 mesh'lik elek üzerinde kalan kısımların rutubet miktarları (Tappi T 264) belirlenerek cam kavanozlarda muhafaza edilmiştir. Çizelge 3.3 de belirtilen kimyasal özellikler ayrı ayrı her bir hammadde için ve üç numune eşit oranda karıştırılıp bu karışım için belirlenmiştir.

Çizelge 3.3: Uygulanan kimyasal analizler ve kullanılan yöntemler

<b>Kimyasal Analiz Adı</b>	<b>Kullanılan Yöntem</b>
Soğuk Su Çözünürlüğü	TAPPI T 207 om-88.
Sıcak Su Çözünürlüğü	TAPPI T 207 om-88.
%1'lik NaOH Çözünürlüğü	TAPPI T 212 om-88.
Alkol-Benzen Çözünürlüğü	TAPPI T 204 om 88.
Holoselüloz Tayini	Wise'nin klorit metodu (Wise ve Karl 1962).
$\alpha$ -selüloz	TAPPI T 429 cm-84.
Lignin	TAPPI T 222 om-98.
Kül	TAPPI T 211 om-85.

### 3.6. İSTATİSTİK YÖNTEMLERİ

Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen değerler tek yönlü (ANOVA) ve çoklu varyans analiziyle değerlendirilmiş olup ortalamalar TUKEY testiyle karşılaştırılmıştır. İstatistik analizlerden önce verilerin normal dağılıma yaklaştırılması için verilere arcsinüs dönüşümü yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

Çizelge 4.1: Domates, biber ve patlıcan saplarının kimyasal bileşiminin literatürle kıyaslanması

Kimyasal içerik (%)	Domates sapı	Biber sapı	Patlıcan sapı	Literatür			
				Ekin sapı	Mısır koçanı	YA	İYA
				Mustajoki ve diğ., 2010	Varga ve diğ., 2002	Fengel ve Wegener, 1984	Fengel ve Wegener, 1984
Alkol benzen çözünürlüğü	10.4±0.68*	2.49±0.43	10.5±0.52	2.10		2-6	2-8
Sıcak su çözünürlüğü	27.0±0.22	9.22±0.24	17.9±0.18			2-7	3-6
Soğuk su çözünürlüğü	29.1±0.54	8.87±0.02	22.1±0.08			4-6	2-3
%1'lik NaOH çözünürlüğü	52.3±0.53	29.4±0.20	43.8±0.23			14-20	9-16
Holoselüloz tayini	61.7±0.75	78.7±0.14	66.4±0.62		69.2	70-78	63-70
Asitte çözünmeyen lignin	16.0±0.90	27.8±0.20	29.7±0.96		22.1	30-35	25-35
Asitte çözünen lignin	1.98±0.79	0.56±0.02	0.78±0.03				
Kül	13.4±0.08	5.80±0.02	7.24±0.08	6.80	6.30	0.35	0.35
α-selüloz	38.2±0.11	45.0±0.49	35.9±0.35			38-50	29-47
Glikoz	29.9±0.21	45.1±1.48	30.1±1.27	38.4			
Mannoz				0.40			
Ksiloz	20.8±0.78	26.1±0.57	20.7±0.28	20.1			
Galaktoz				0.80			
Arabinoz	1.90±0.43	2.90±0.07	1.10±0.06	3.00			

\* Tam kuru ağırlığa oranla yüzde değerler olup üç ölçümün ortalaması ve standart sapmasıdır. Değerlerde alkol benzen düzeltmesi yapılmıştır.

Çizelge 4.2: Buhar patlatma ön muamelesinin hammaddelerdeki kütleli değışimi

	Ham numune	Buhar patlatma-katı
Kuru madde (g)	990	844
Holoselüloz (g)	628	442
Lignin (g)	244	264
Kül (g)	107	101

Çizelge 4.3: Numunelerin buhar patlatma ön muamele önce ve sonrası kimyasal bileşimi

Kimyasal içerik (%)	Ham numune	Buhar patlatılmış numune
Alkol benzen çözünürlüğü	10.0±0.00*	15.4±1.40
Holoselüloz	63.4±0.66	52.4±0.49
Asitte çözünmeyen lignin	23.8±0.71	31.3±0.00
Asitte çözünen lignin	0.82±0.04	1.02±0.26
Kül	10.8±0.16	12.0±0.14
Glikoz	32.3±0.57	35.2±1.25
Ksiloz	13.4±0.49	11.9±0.50
Arabinoz	1.40±0.07	0.36±0.05

\* Tam kuru ağırlığa oranla yüzde değerler olup üç ölçümün ortalaması ve standart sapmasıdır. Değerlerde alkol benzen düzeltmesi yapılmıştır.

Çizelge 4.4: Kimyasal ön muamele işlemlerinin verimi

Hammadde	Süre (dk.)	Kimyasal ön muamele verimi (%)		
		Sodyum borhidrür	Sodyum hidroksit	Sülfürik asit
Buhar patlatılmış karışım	30	92.3	77.2	75.6
	90	77.5	49.7	59.0
Öğütülmüş karışım	30	96.5	87.5	83.0
	90	88.3	74.3	76.3

Çizelge 4.5: Kimyasal ön muamele sonrası sıvıya geçen şeker

Hammadde	Süre (dk.)	Sıvıdaki şeker (%)		
		Sodyum borhidrür	Sodyum hidroksit	Sülfürik asit
Buhar patlatılmış karışım	30	1.55±0.01*	1.25±0.08	2.80±0.09
	90	1.50±0.04	1.63±0.09	3.26±0.17
Öğütülmüş karışım	30	0.28±0.00	0.32±0.00	3.49±0.25
	90	0.32±0.00	0.62±0.03	5.40±0.50

\* İki ölçümün ortalama ve standart sapma değerleridir.



Çizelge 4.6: Kimyasal ön muamele uygulamalarının lignin, glikoz ve ksiloz üzerine etkisi (%)

Hammadde	Süre (dk.)	Sodyum borhidrür			Sodyum hidroksit			Sülfürik asit		
		Lignin *	Glikoz	Ksiloz	Lignin	Glikoz	Ksiloz	Lignin	Glikoz	Ksiloz
Buhar patlatılmış karışım	30	27.9±0.24**	40.5±1.34	13.6±0.57	31.5±1.45	38.6±1.63	10.5±0.81	42.1±1.88	43.9±1.13	13.0±0.71
	90	29.2±0.00	38.0±0.14	12.7±0.72	30.7±1.66	42.7±0.57	10.3±0.07	48.2±1.19	43.0±1.06	13.3±0.81
Öğütülmüş karışım	30	20.6±0.47	32.4±1.74	16.6±0.28	20.8±0.24	36.3±0.42	14.1±0.57	28.8±0.24	43.2±2.26	17.3±0.71
	90	23.5±0.01	37.0±0.21	18.3±0.07	24.4±0.95	40.7±1.20	12.9±0.14	30.0±0.45	42.7±0.85	15.4±0.30

\*Asitte çözünen ve çözünmeyen lignin değerlerinin toplamıdır.

\*\* Üç ölçümün ortalama ve standart sapma değerleridir.

Çizelge 4.7: Süre, işlem ve kimyasal muamelenin glikoz, ksiloz ve lignin üzerine etkisi

Faktör	Muamele	Glikoz (%)	Ksiloz (%)	Lignin (%)
Süre	30 dk.	39.6 <sup>a*</sup>	14.4 <sup>a</sup>	27.9 <sup>a</sup>
	90 dk.	40.6 <sup>a</sup>	13.8 <sup>a</sup>	30.3 <sup>b</sup>
İşlem	Öğütme	39.4 <sup>a</sup>	16.1 <sup>a</sup>	24.0 <sup>a</sup>
	Patlatma	40.8 <sup>a</sup>	12.2 <sup>b</sup>	34.2 <sup>b</sup>
Kimyasal	Sodyum borhidrür	36.0 <sup>a</sup>	15.1 <sup>a</sup>	24.7 <sup>a</sup>
	Sodyum hidroksit	41.2 <sup>b</sup>	12.3 <sup>b</sup>	26.0 <sup>b</sup>
	Sülfürik asit	43.1 <sup>b</sup>	15.0 <sup>a</sup>	36.6 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı harfle gösterilen değerler istatistiki olarak farkı değildir (TUKEY)

\* TUKEY çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre (p<0.05)

Çizelge 4.8: Enzimatik hidroliz sonrası tam kuru hammaddeye oranla toplam şeker verimi (%)

Süre (sa.)	Ham numune **	Buhar patlatma	BP+NaOH 30 dk.	Öğütme+NaOH 30 dk.
0	0.92±0.07 <sup>a*</sup>	1.08±0.06 <sup>b</sup>	0.21±0.02 <sup>c</sup>	0.04±0.01 <sup>d</sup>
6	10.6±1.51 <sup>a</sup>	10.1±0.28 <sup>a</sup>	14.7±0.65 <sup>b</sup>	14.2±0.63 <sup>b</sup>
24	16.4±0.60 <sup>a</sup>	17.9±1.78 <sup>a</sup>	23.7±1.03 <sup>b</sup>	21.5±0.45 <sup>b</sup>
48	21.4±0.22 <sup>a</sup>	24.1±0.38 <sup>b</sup>	30.4±1.39 <sup>c</sup>	26.5±0.87 <sup>d</sup>
72	21.3±0.96 <sup>a</sup>	24.6±1.63 <sup>b</sup>	30.1±0.26 <sup>c</sup>	27.4±0.77 <sup>d</sup>

\*Harflendirme % 95 güven aralığında işlemler arısındaki farkı göstermekte olup, süreler arasındaki farkı göstermemektedir.

\*\* Dört ölçümün ortalama ve standart sapma değerleridir.

<sup>a, b, c, d</sup> Aynı harfle gösterilen değerler istatistiki olarak farklı değillerdir (TUKEY)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. HAMMADDENİN KİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Domates, biber ve patlıcan saplarının kimyasal bileşiminin literatürle kıyaslanması Çizelge 4.1 de verilmiştir. Sebze saplarının  $\alpha$ -selüloz ve holoselüloz içeriği yapraklı ve iğne yapraklı ağaçlar aralığındadır (Fengel ve Wegener, 1984). HPLC analizi sonucundaki glikoz içerikleri ise en yüksek %45.1 ile biber sapında bulunurken, patlıcan sapında %30.1, domates sapında ise %29.9 olarak kuru maddeye oranla tespit edilmiştir. Hemiselülozun ana bileşenini oluşturan ksiloz ise %20 nin üzerindedir. Arabinoz az miktarda bulunurken mannoz ve galaktoz bu çalışmada tespit edilememiştir. Ekin sapıyla kıyaslandığında biber sapı yüksek glikoz içeriğine sahip olsa da domates ve patlıcan sapı daha düşük glikoz içeriğine sahiptir (Mustajoki ve diğ., 2010). Domates ve patlıcan saplarının alkol benzen, sıcak ve soğuk su çözünürlükleri biber sapına ve yapraklı ve iğne yapraklı ağaçlara göre daha yüksektir. Patlıcan ve biber sapının lignin içeriği mısır koçanı ve iğne yapraklı ve yapraklı ağaçlarla benzer görülmektedir (Varga ve diğ., 2002, Fengel ve Wegener, 1984). Domates sapı diğer lignoselülozik materyallerle kıyaslandığında en düşük lignin miktarına sahipken diğer taraftan en yüksek kül miktarına sahiptir. HPLC analizi sonucu toplam şeker miktarları domates sapında %51.5, biber sapında %74.1 ve patlıcan sapında %51.9 olarak tespit edilmiştir. Holoselüloz içeriği ve HPLC analizi sonucundaki toplam şeker miktarındaki farklılıkların HPLC analizindeki yoğun sülfürik asit hidrolizinin sebep olduğu şeker degradasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Badger, 2002). Hammaddelerdeki polisakkarit içeriğinin yaklaşık 60%'larda olması o hammaddenin biyoetanol üretimine elverişli olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmekte olup üç hammadde de bu açıdan biyoetanol üretimine uygunluk göstermektedir.

### 5.2. BUHAR PATLATMA ÖN MUAMELESİ

Sebze sapları enzimatik hidroliz ve fermentasyon işlemlerinin etkisini arttırmak için buhar patlatma (steam explosion), öğütme ve daha sonra çeşitli kimyasal ön muamele işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Çizelge 4.3 de ham ve buhar patlatılmış sebze saplarının kimyasal bileşimi gösterilmiştir. Buhar patlatma işlemi sonucunda elde edilen sebze sapı karışımındaki katı madde geri kazanımı %85.2 (w/w) olarak bulunmuştur. Yaklaşık

%15 lik kütle kaybının yüksek sıcaklıkta buhar uygulamasının lignin, hemiselüloz ve ekstraktifleri çözünmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buhar patlatma işlemi gerçekleştirilmiş örnekler incelendiğinde buhar patlatma işlemi neticesinde katı maddede oluşan hemiselüloz kaybı, lignin ve ekstraktif madde oranında artışa neden olmuştur. Şekil 5.2 ve 5.3 de görüldüğü gibi buhar patlatma ön muamelesi yapıdan ağırlıklı olarak hemiselülozları ve düşük molekül ağırlıklı karbonhidratları uzaklaştırmakta ve yapıdaki lignin miktarını oran olarak artırmaktadır. Buhar patlatma işlemi delignifikasyonu artırmış ve yapıdaki hemiselülozların bir kısmının parçalanmasına sebep olmuştur. Bu nedenle, buhar patlatma işlemi sonrası holoselüloz içeriği %63.4'ten %52.4'e inmiştir. Muamele görmemiş sebze saplarıyla karşılaştırıldığında glikoz oranının yapıdan hemiselüloz ve lignin uzaklaşmasına bağlı olarak arttığı görülmüştür.

Buhar patlatma işlemi glikoz miktarındaki değişim hariç ( $p>0.05$ ) lignin ve ksiloz miktarında istatistikî olarak anlamlı bir değişime sebep olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Öte yandan buhar patlatma işlemi neticesinde elde edilen glikoz içeriğinin oran olarak artması buhar patlatma muamelesinin hemiselülozları selülozdan uzaklaştıran ve böylece sonraki enzimatik hidroliz işlemlerinin verimliliğini artıran bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Biyoetanol üretimi için önem arz eden glikoz içeriği ve bir diğer önemli bileşen olan lignin içeriğinin değişimi dikkate alınmış ve bu materyaller bağlamında kütle balansları değerlendirilmiştir. Buhar patlatma sonrası DNS metoduyla sıvıdaki şeker miktarı 2 g olarak tespit edilmiştir. DNS metoduyla sıvıya geçen glikoz harici diğer şekerler tespit edilemediği için 2 g gibi düşük bir değer elde edilmiştir. Bu da buhar patlatma ön muamelesinin hemiselülozları parçaladığının ve glikoza zarar veremediğinin bir göstergesidir. Buhar patlatılması ön muamelesi sonrasında hammaddelerdeki kütleli değişim Çizelge 4.2 de verilmiştir. Lignin miktarının açıklanamayan bir sebeple daha yüksek olduğu görülmektedir.

### 5.3. KİMYASAL ÖN MUAMELELERİN LİGNİNE ETKİSİ

Kimyasal ön muamele uygulamalarının lignin, glikoz ve ksiloz üzerine etkisi Çizelge 4.6 de gösterilmiştir. İşlem (öğütme ve buhar patlatma), süre (30 ve 90 dk.) ve kimyasal (sodyum borhidrür, sodyum hidroksit ve sülfürik asit) faktörleri ve bunların karşılıklı etkileşimlerinin lignin, glikoz ve ksiloz üzerindeki etkisi istatistiksel olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Lignin üç boyutlu, kompleks aromatik bir polimer olup, selüloz ve hemiselülozların etrafında bir zar gibi bulunmakta ve polisakkarit ve lifleri bir arada tutarak sert bir yapı oluşturmaktadır (Fan ve diğ., 1987). Dolayısıyla da biyokütlenin enzimatik hidrolizi açısından karbonhidratlara ulaşmada bir engel oluşturan bu yapının çeşitli ön muamele teknikleriyle uzaklaştırılması büyük önem taşımaktadır. Kimyasal muameleler sonucunda çözünen lignin oranları Şekil 5.1 de ve kimyasal muameleler sonrası verim yüzdelilerindeki değişim Çizelge 4.4 de gösterilmiş olup artan süreye bağlı olarak verimin azaldığı görülmüştür. Sodyum borhidrür seçici bir pişirme elemanı olup, geleneksel kraft pişirme yöntemlerinde hali hazırda kullanılmaktadır. Sodyum borhidrür bir katalizör gibi hareket ederek seçici lignin delignifikasyonu sağlamakta (Copur ve Tozluoglu, 2007) ve soyulma reaksiyonlarını önleyerek hemiselülozların degradasyonunu önlemektedir (Hoiye ve diğ., 2005). Ancak  $\text{NaBH}_4$ 'ün biyoetanol üretimi üzerine etkisi şimdiye kadar çalışılmamıştır.

Şekil 5.1 de görüldüğü gibi buhar patlatma yapılmış numunenin sodyum borhidrürle muamelesi lignin miktarında anlamlı bir azalmaya sebep olmuş ve bu azalış sürenin artışına bağlı olarak artmıştır ( $p < 0.05$ ). Öğütme ön muamelesi yapılmış numunenin 30 dk. sodyum borhidrürle muamelesi lignin miktarında anlamlı bir azalmaya sebep olmuş ( $p < 0.05$ ), fakat 90 dk. muamelesindeki azalış daha düşük olmuştur. Bununla birlikte sürenin artışına bağlı olarak lignin miktarındaki değişimde anlamlı bir fark görülmemektedir ( $p > 0.05$ ).

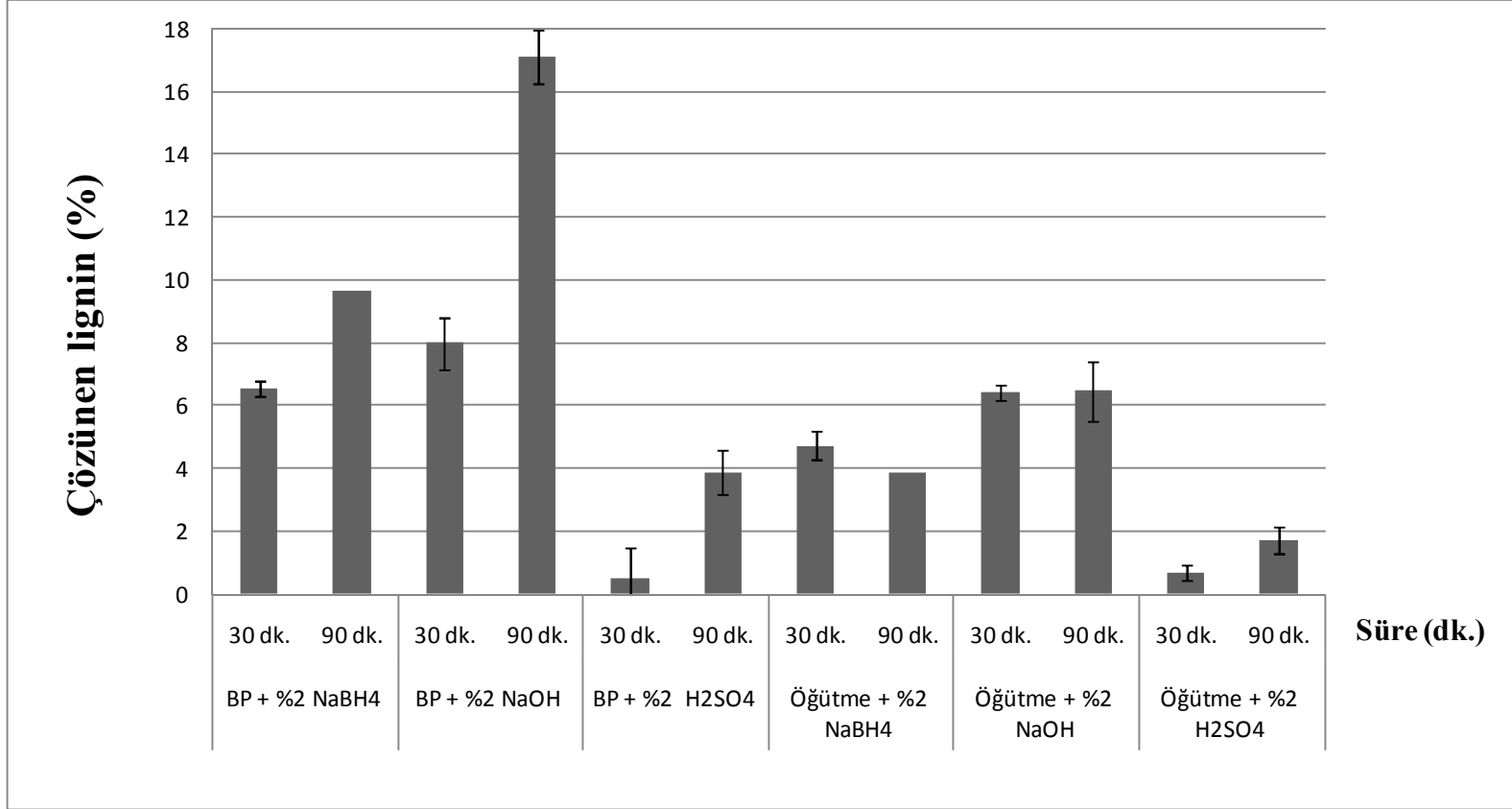
Sodyum hidroksit ön muamelesi sülfürik asit ön muamelesine alternatif bir ön muamele metodudur. Sodyum hidroksit biyokütledeki selüloz ve hemiselülozun hidrojen bağlarına etki etmekte ve lignin-ksilan arasındaki ester bağlarını koparmaktadır ve

böylece biyokütlenin porozitesi artmaktadır (Fan ve diğ., 1987; Akın ve diğ., 1992; Simpson ve diğ., 2003; Sun ve diğ., 2005; Silverstein 2007). Bu etkiler sonucunda selülozu şişirmekte ve bir kısım lignin ve hemiselülozları yapıdan çözerek uzaklaştırmaktadır (Chen ve Sharma-Shivappa, 2007).

Buhar patlatma yapılmış numunenin sodyum hidroksit ile muamelesi sonucunda önemli miktarda lignin yapıdan uzaklaştırılmıştır. Sürenin artmasına bağlı olarak daha fazla lignin yapıdan uzaklaştırılmıştır ( $p<0.05$ ). Yine öğütme ön muamelesi yapılmış numunenin sodyum hidroksit ile muamelesinde en fazla oranda lignin yapıdan uzaklaşmış fakat sürenin artmasıyla anlamlı bir fark görülmemiştir ( $p>0.05$ ).

Lignoselülozik biyokütlenin ön muamelesinde seyreltik asit muamelesi en fazla tercih edilen muamele metotlarından biridir. Bu ön muamele süresince yüksek sıcaklıklarda monomerik şekerler ve çözülebilir oligomerler işlem görmüş materyalden çözülerek serbest hale gelmektedir. Hemiselülozların yapıdan uzaklaştırılması poroziteyi artırmakta ve enzimatik hidroliz işleminin verimliliğini olumlu yönde etkilemektedir (McMillan, 1994).

Buhar patlatma yapılmış numunenin sülfürik asit ile muamelesinde beklendiği gibi diğer kimyasallara göre daha az lignin uzaklaşmıştır. Sürenin artmasına bağlı olarak çözünen lignin miktarında anlamlı bir fark görülmüştür ( $p<0.05$ ). Öğütme ön muamelesi yapılmış numunenin sülfürik asit ile muamelesinde ise buhar patlatma yapılmış numunelere göre çözünen lignin miktarı daha olmakla birlikte benzer etkiler görülmüştür. Yine sürenin artmasına bağlı olarak çözünen lignin miktarında anlamlı bir fark görülmüştür ( $p<0.05$ ).



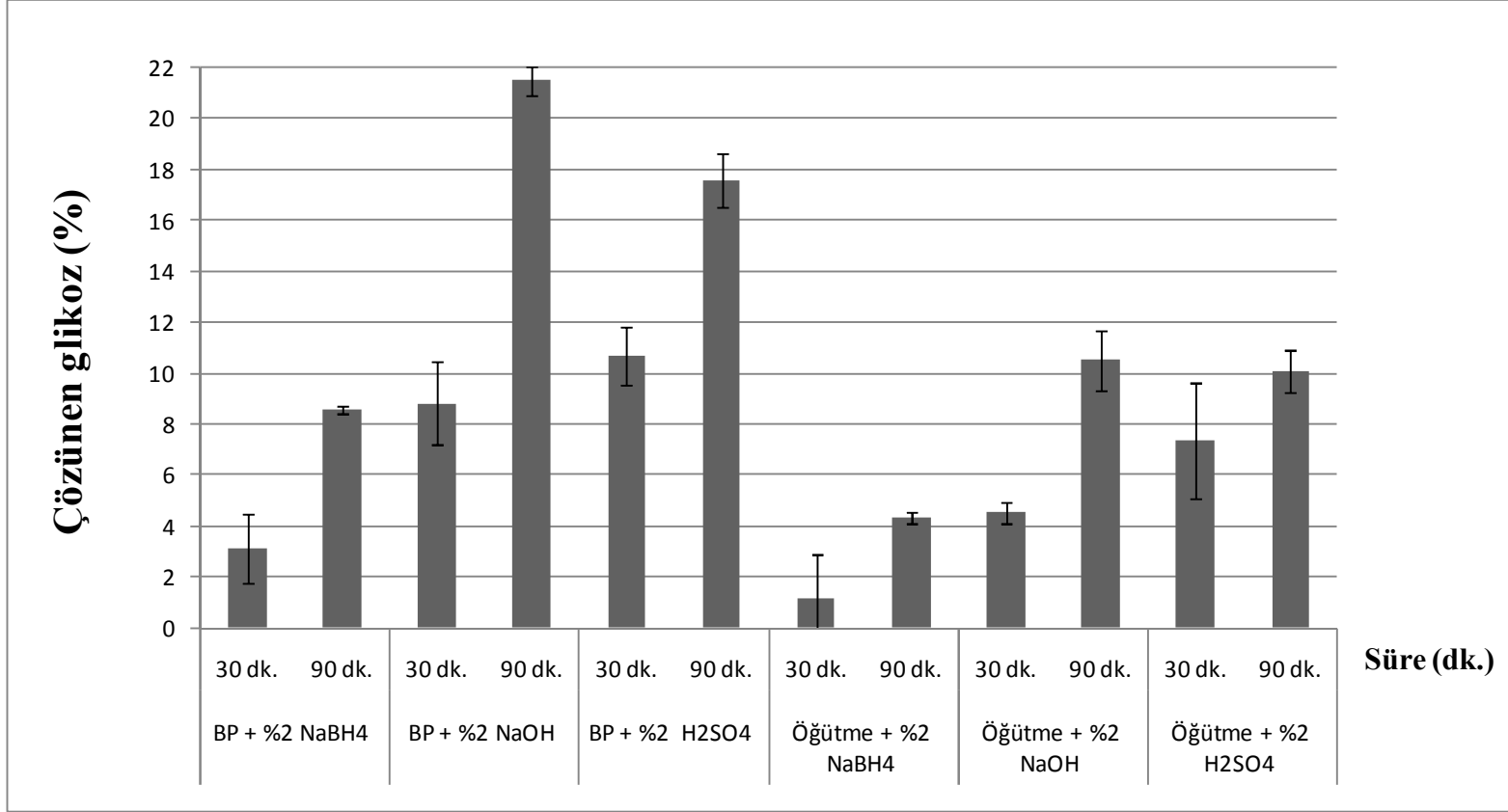
Şekil 5.1: Kimyasal ön muamelelerin lignin miktarına etkisi

#### 5.4. KİMYASAL ÖN MUAMELELERİN GLİKOZA ETKİSİ

Glikoz lignoselülozik biyokütlenin ana bileşenlerinden selülozun yapı taşı olup biyoetanol üretiminde asıl istenen bileşendir. Kimyasal muameleler sonucunda çözünen glikoz oranları Şekil 5.2 de gösterilmiştir. Çizelge 4.6 da görüldüğü üzere tüm kimyasal muameleler sonucunda glikoz miktarında oransal bir artış gözlenmekle birlikte ( $p<0.05$ ), Çizelge 4.7 da görüldüğü gibi öğütme ve buhar patlatma ön muameleleri arasında anlamlı bir fark görülmemektedir ( $p>0.05$ ).

Her iki ön muameleli numunelerin sodyum borhidrürle muamelesi sonucunda en düşük oranda glikozu yapıdan uzaklaştırdığı görülmektedir. Bu da sodyum borhidrürün glikoza fazla zarar vermediğinin bir kanıtıdır. Sürenin artmasına bağlı olarak daha fazla glikozun yapıdan uzaklaştığı görülmektedir. Buhar patlatma ve öğütme ön muamelelerine tabi tutulan numunelerin sodyum hidroksitle muamelesi sonucunda yapıdan en fazla oranda glikozun uzaklaştığı görülmektedir. Bu etki sürenin artmasıyla daha fazla olmakla birlikte buhar patlatma ön muamelesinde daha fazla belirgindir. Sodyum hidroksitten sonra en fazla glikozu uzaklaştıran kimyasal sülfürik asit olmuştur. Yine sülfürik asit muamelesinde de sürenin artışıyla uzaklaşan glikoz miktarı da artmıştır. Benzer şekilde buhar patlatma ön muameleli numunedeki etkinin daha fazla olduğu görülmektedir.



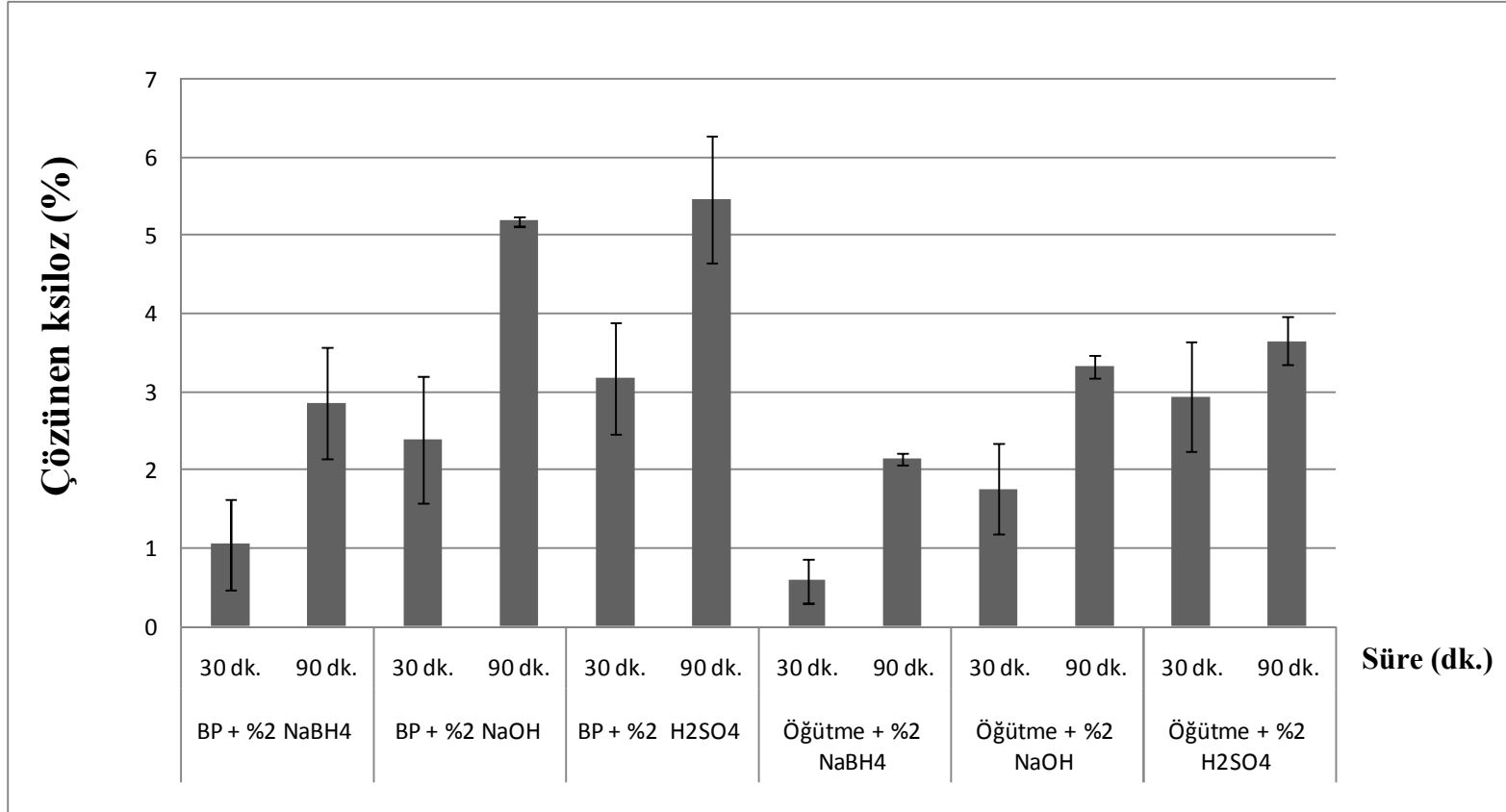


Şekil 5.2: Kimyasal ön muamelelerin glikoz miktarına etkisi

## 5.5. KİMYASAL ÖN MUAMELELERİN KSİLOZA ETKİSİ

Kimyasal muameleler sonucunda çözünen ksiloz oranları Şekil 5.3 de gösterilmiştir. Çizelge 4.7 da görüldüğü gibi öğütme ve buhar patlatma ön muameleleri arasında anlamlı bir fark görülmektedir ( $p < 0.05$ ).

Buhar patlatma ve öğütme ön muameleli numunenin sodyum borhidrürle muamelesinde ksiloz miktarındaki azalış diğer kimyasallara göre en düşük seviyededir. Sürenin artmasına bağlı olarak çözünen ksiloz oranı da artmaktadır. Hemiselülozlar amorf, düşük moleküler ağırlıklı, heterojen ve dallanmış polisakkaritler olmaları dolayısıyla alkali atağına karşı yarı kristalin selüloza nazaran daha hassastırlar. Buhar patlatma yapılmış numunenin sodyum hidroksitle muamelesinde yapıdan oldukça fazla oranda ksilozun uzaklaştığı görülmekte olup, sürenin artmasıyla birlikte daha fazla ksilozun yapıdan uzaklaştığı görülmektedir. Öğütme ön muameleli numunenin sodyum hidroksitle muamelesinde de benzer etkiler görülmekte olup çözünen ksiloz miktarı biraz daha düşüktür. Patlatma yapılmış numunenin sülfürik asitle muamelesinde çözünen ksiloz oranı sodyum hidroksit muamelesine yakın olup biraz daha fazladır. Bu etki buhar patlatma yapılmış numunede daha belirgindir. Sürenin artmasıyla her iki ön muameleli numunede de çözünen ksiloz oranı artmış olup bu fark buhar patlatma ön muamelesinde daha belirgindir. Kimyasal ön muamele sonrası sıvıya geçen toplam şeker yüzdeleri Çizelge 4.5 de gösterilmiştir.



Şekil 5.3: Kimyasal ön muamelelerin ksiloz miktarına etkisi

Elde edilen veriler diğerk kimyasal ön muamelelerle karşılaştırıldığında her iki ön muamele içinde en fazla çözünen ksiloz yüzdesi sülfürik asit ve sodyum hidroksit ön muamelesi sonrasında gerçekleşmiştir. Sodyum hidroksit muamelesi böylesine yüksek oranlarda gerçekleşen ksiloz çözünürlüğüne ek olarak sağladığı yüksek lignin redüksiyonu da enzimatik hidroliz işleminin verimliliğini olumlu yönde etkileyebilecektir.

Sülfürik asit ile yapılan ön muamele işleminde uygulama süresinin 30 dakikadan 90 dakikaya uzamasına bağlı olarak yapıdan karbonhidratların bir miktar daha fazla uzaklaştırıldığı görülmektedir. Yüksek miktarda karbonhidratları uzaklaştırması sonucunda yapıdaki lignin miktarında oransal olarak belirgin bir artış olduğu gözlemlenmesine rağmen çözünen lignin miktarı diğerk kimyasallar göre en düşüktür. Buhar patlatma ön muamelesinde bir miktar karbonhidrat uzaklaştığı için sülfürik asit ile muamele işleminde lignin miktarındaki oransal artış öğütme ön muamelesine göre daha belirgindir. Literatür incelendiğinde lignoselülozik biyokütlenin sülfürik asit ile işlemin neticesinde baskın olarak yapıdaki hemiselülozu etkilediği ve lignin degradasyonu üzerine etkisinin daha az olduğu belirtilmiştir (Silverstein, 2004, 2007). Ön muamele işlemleri süresince biyokütlenin selüloz kısmının zarar görmemesi istenmekle birlikte, sülfürik asitin glikoz üzerinde de etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar literatür ile karşılaştırılabilir nitelikte olup, her üç hammadde için de incelendiğinde sülfürik asit ön muamelesinin lignin üzerindeki etkisi minimal seviyededir. Sadece lignin redüksiyonun enzimatik parçalanmayı artıran bir etken olmadığı da literatürde belirtilmektedir (McMillan, 1994).

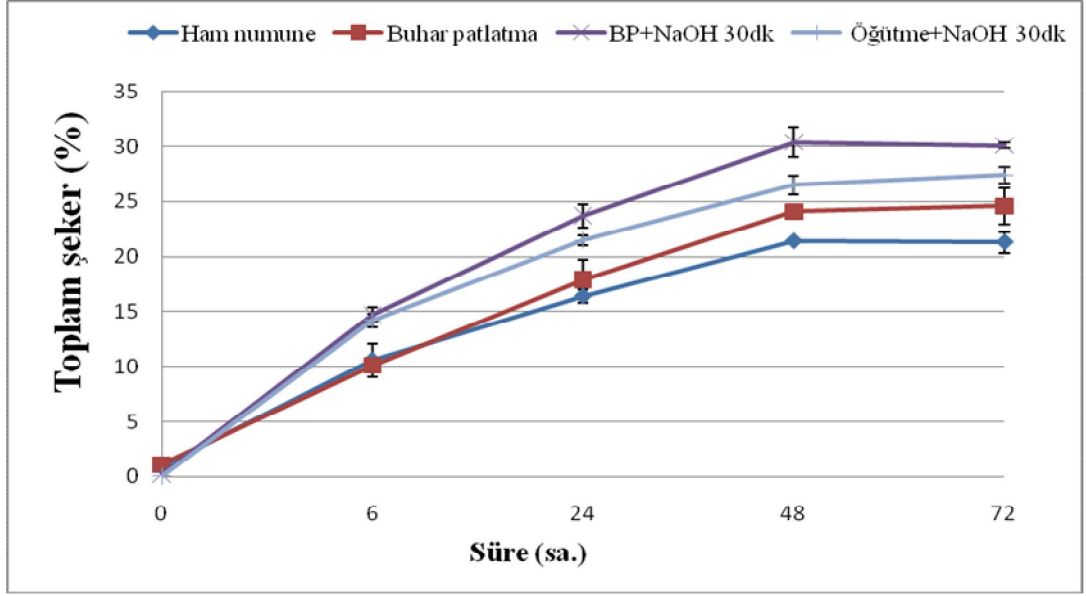
Varga ve diğ. (2002), mısır koçanını (corn stover) %10 luk sodyum hidroksit ile 1 saat otoklavda bekleterek yaptığı ön muamele sonucunda lignindeki azalmayı %95 olarak tespit etmiştir. Lignindeki bu yüksek azalış %10 gibi yüksek konsantrasyonda sodyum hidroksit kullanımından kaynaklanabilir (Silverstein, 2007). Biz bu çalışmada %2 konsantrasyonla sınırlı kaldığımız için lignin miktarındaki azalışın daha sınırlı olduğu görülmektedir. Lignin miktarındaki değişim göze alındığında sodyum borhidrürle sodyum hidroksitin benzer etkileri gözlemlenmiştir. Dolayısıyla sodyum borhidrürün sodyum hidroksite alternatif bir kimyasal olarak biyokütlenin enzimatik hidrolizi öncesinde ön muamele için kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 5.6. ENZİMATİK HİDROLİZ

Enzimatik hidroliz için optimum kimyasal muameleyi belirlemek için muamele görmüş katı materyallerdeki glikoz/lignin oranı ve aynı zamanda ekonomik olması dikkate alınmıştır. Buna göre buhar patlatma ve öğütme ön muameleli numunelerin sodyum hidroksitle 30 dk. süresince muamele görmüş örnekler optimum olarak bu çalışmada seçilmiştir. Ayrıca enzimatik hidroliz işlemi, kontrol olarak kabul edilen ham ve buharla patlatılmış numunelere de uygulanmıştır.

72 saatlik hidroliz işlemi sonunda hidrolizattan belirli aralıklarla (0, 6, 24, 48 ve 72 saat) alınan sıvıda şeker analizleri gerçekleştirilmiş ve tam kuru maddeye oranla toplam şeker dönüşümü belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz işlemi sonrası örneklerdeki tam kuru hammaddeye oranla toplam şeker dönüşümü Şekil 5.4 de ve tam kuru hammaddeye oranla toplam şeker verimi ve işlemler arasındaki istatistiki değerlendirme Çizelge 4.8 de gösterilmiştir. Celluclast 1.5 L ve Novozyme 188 enzim karışımına bağlı enzimatik hidroliz işlemi sonucu en yüksek şeker dönüşümü buhar patlatma ön muameleli numunenin sodyum hidroksitle muamelesi (%30.1) için belirlenmiş olup, bunu öğütme ön muameleli numunenin sodyum hidroksitle muamelesi (%27.4) izlemiştir. Buhar patlatma ve sodyum hidroksit muamelesi %41, öğütme ve sodyum hidroksit muamelesi %29 oranında enzimatik hidrolizi artırmıştır. Yine buhar patlatma muamelesi yalnız başına % 16 oranında enzimatik hidrolizi arttırmıştır.

Chen ve diğ. (2009), mısır koçanı (corn stover) %2 konsantrasyondaki sodyum hidroksitle yapmış oldukları kimyasal muamele sonucunda daha fazla lignin uzaklaşmasına bağlı olarak (altı kat daha fazla) enzimatik hidroliz sonrası asit ön muamelesine göre iki kat daha fazla hidroliz verimi elde etmişlerdir. Buna dayanarak denilebilir ki, enzimatik hidrolizin etkisini artırmada lignin çok önemli rol oynamaktadır. Yine sodyum hidroksit muamelesi sonrasında yapılan enzimatik hidroliz sonucundaki hidrolizat daha yüksek oranda fermente edilebilir şeker (özellikle glikoz ve kslioz) ve daha az inhibitör içermektedir (Chen ve diğ., 2009).



Şekil 5.4: Enzimatik hidroliz sonucunda tam kuru hammaddeye oranla toplam şeker dönüşümü

## 5.7. FERMANTASYON

HPLC analizi sonucunda örneklerin glikoz ve ksiloz içeriklerinin değişmeden kaldığı ve etanol konsantrasyonunun oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni araştırıldığında enzimatik hidroliz için hazırlanan tampon çözeltisinde mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için katılan sodyum azidin konsantrasyonunun yüksek olduğu anlaşılmıştır (Fales, 1952). Enzimatik hidrolizi, tekrar edecek numune bulunmadığından fermantasyon işlemi bu çalışma kapsamında tekrar edilememiştir.

## 5.8. ÖNERİLER

Ekonomik değeri düşük/yok olan ve endüstriyel olarak kullanım alanına sahip olmayan sebze sapları yüksek polisakkarit içeriğinden (yaklaşık %65-80) dolayı biyoetanol üretimi için alternatif bir biyokütle kaynağı olabilir. Yüksek holoselüloz içeriğinden dolayı (%78.7) biyoetanol üretimi için biber sapının bu çalışmada kullanılan materyaller arasında en uygun hammadde olacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda sadece biber sapından biyoetanol üretim olanakları araştırılabilir.

Buhar patlatma ön muamelesi ile öğütme ön muamelesi arasında glikoz verimi açısından anlamlı bir fark olmasa da ( $p>0.05$ ), ksiloz ve lignin üzerindeki etkisi açısından pozitif yönde fark vardır ( $p<0.05$ ). Ayrıca enzimatik hidrolizi kolaylaştırıcı etkisi de daha fazladır. Yine öğütme ön muamelesine göre daha az zaman ve enerji ihtiyacı olduğundan dolayı daha ekonomiktir. Bu çalışmada uygulanan kimyasal ön muamele uygulamaları içinde en etkili kimyasalın sodyum hidroksit olduğu görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- AGBOGBO, F., WENGER, K., 2006, Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*, *Biotechnol lett.*, (28), 2065–2069.
- AKIN, D. E., HARTLEY, R. D., RIGSBY, L. L., MORRISON W. H., 1992, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (58), 207–214.
- ALIZADEH, H., TEYMOURI, F., GILBERT, T.I., DALE, B.E., 2005, Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 124 (1-3), 1133–1141.
- ANON, 2011a, <http://www.abengoabioenergy.com/bioethanol/index.cfm?page=0&lang=1>. [Ziyaret Tarihi: 27 Aralık 2011].
- ANON, 2011b, [http://www.esru.strath.ac.uk/EandE/Web\\_sites/0203/biofuels/what\\_bioethanol.htm#bio\\_production](http://www.esru.strath.ac.uk/EandE/Web_sites/0203/biofuels/what_bioethanol.htm#bio_production), [Ziyaret Tarihi: 27 Aralık 2011].
- ANON, 2011c, [www.ethanol-gec.org/information/briefing/20a](http://www.ethanol-gec.org/information/briefing/20a). [Ziyaret Tarihi: 22 Haziran 2011].
- ANON, 2011d, [http://www.mmo.org.tr/genel/bizden\\_detay.php?kod=35&tipi=10006](http://www.mmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=35&tipi=10006) [Ziyaret Tarihi: 11 Mart 2011].
- ANON, 2010a, Meyve ve Sebze Ürünleri Üretim Miktarı. <http://www.tuik.gov.tr>, [Ziyaret Tarihi: 30 Mart 2010]. Anonim, 2006
- ANON, 2010b, [www.pankobirlik.com.tr](http://www.pankobirlik.com.tr), [Ziyaret Tarihi: 29 Aralık 2010].
- ANON, 2010c, <http://www.fao.org/faostat>. [Ziyaret Tarihi: 07.11.2010].
- ANON, 2011d, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sakkaroz> [Ziyaret Tarihi: 24.05. 2011].
- BADGER, P.C., 2002, Ethanol from cellulose: a general review, in: JANICK J, WHIPKEY A, (eds.), Trends in new crops and new uses. ALEXANDRIA, VA: ASHS Press; 17–21.
- BALAT, M., BALAT, H., ÖZ, C., 2008, Progress in bioethanol processing, *Progress in energy and combustion science*, 34 (5), 551–573.
- BALLESTEROS, I., BALLESTEROS, M., CABAÑAS, A., CARRASCO, J., MARTIN, C., NEGRO, J.M. 1991, Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) of cellulose to ethanol, *Appl Biochem Biotechnol*, (28–29), 307–315.
- BOTHAST, R.J., SAHA, B.C. 1997, Ethanol production from agricultural biomass substrates, *Adv Appl Microbiol.*, (44), 261–286.



- BROWNELL, H.H., SADDLER, J.N. 1987, Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis, *Biotechnol Bioeng.*, 29 (2), 228–235.
- CARA, C. E., RUIZ, M., BALLESTEROS, P., MANZANARES, M.J., NEGRO and E. CASTRO, 2008, Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning, *Fuel* 87 (6), 692–700.
- CARDONA, C.A., SANCHEZ, O.J., 2007, Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*, (98), 2415–2457.
- CHAMPAGNE, P., 2007, Feasibility of producing bioethanol from waste residues: A Canadian perspective, *Resources. Conserv Recycl.*, 50 (3), 211–230.
- CHANDEL, A.K., ES, C., RUDRAVARAM, R., NARASU, M.L., RAO, L.V., RAVINDRA, P. 2007, Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal, *Biotechnology molecular biology review*, 2 (1), 14–32.
- CHEN, L.F., GONGI C.S. 1985, Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate to xylitol by a hydrolyzate-acclimatized yeast, *J. Food Sci.*, (50), 226–228.
- CHEN, Y., SHARMA-SHIVAPPA, R.R., 2007, Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production, *Biochemistry and Biotechnology*, 276-290.
- CHEN, M., ZHAO, J., XIA, L., 2009, Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility, *Biomass and Bioenergy*,(33), 1381-1385.
- COPUR, Y., TOZLUOGLU, A. 2007, The effect of AQ and NaBH<sub>4</sub> On Bio-Kraft Delignification (*Ceriporiopsis Subvermispota*) Of *Brutia Pine* Chips, *Original Research Article International Biodeterioration & Biodegradation*, 60 (2): 126-131.
- DALE, M.C., MOELHMAN, M., 2000, Enzymatic simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of biomass to ethanol in a pilot 130 L multistage continuous reactor separator, *Ninth Biennial Bioenergy Conference*, Buffalo, New York, October 15–19.
- DEMIRBAS, A., 2004, Ethanol from cellulosic biomass resources, *Int. Journal of Green Energy*, 1 (1), 79–87.
- DEMIRBAS, A., 2005., Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass, *Energy Sources.*, (27), 327–337.
- DEMIRBAS, A. 2006, Global biofuel strategies. *Energy edu sci technol.*, (17), 32–63.
- DEMIRBAS, A. 2007, Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy combustion science*, 33 (1), 1–18.

- DIEN, B.S., KURTZMAN, C.P., SAHA, B.C., BOTHAST, R.J. 1996, Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Appl Biochem Biotechnol.*, (57-58), 233–242.
- DIEN, B.S., COTTA, M.A., JEFFRIES, T.W. 2003, Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status, *Appl Microbiol Biotechnol.*, (63), 258–266.
- DUFF, S.J.B., MURRAY, W.D. 1996, Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55 (1), 1–33.
- FALES, W. F., 1952, The effect of sodium azide on alcoholic fermentation, 157-167.
- FAN, L.T., GHARPURAY, M.M., LEE, Y.-H., 1987, Cellulose hydrolysis, in: *Biotechnology Monographs. Springer*, Berlin, pp. 8.
- FENGEL, D., WEGENER, G., 1984, *Wood chemistry, Ultrastructure, Reactions.* Walter de Gruyter, Berlin New York, 3-11-008481-3.
- GALBE, M., ZACCHI, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood, *Appl Microbiol Biotechnol*, (59), 618-628.
- GONG, C.S., CHEN, L.F., FLICKINGER, M.C., CHIANG, L.C., TSAO, G.T. 1981, Production of ethanol from D-Xylose By Using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl Environ Microbiol.*, (41), 430–436.
- GRANSTORM, T., OJAMA, H., LEISOLA, M., 2001, Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (55), 36–42.
- GURGEL, P.V., MANCHILHA, I.M., PECANHA, R.P., SIQUEIRA, J.F.M., 1995, Xylitol Recovery from Fermented Sugarcane Bagasse Hydrolyzate, *Bioresource Technology*, 52 (3), 219–223.
- GÜLER, C., AKGÜL, M., 2001. Enerji üretiminde odun ve tarımsal artıkların değerlendirilmesi, *Yenilenebilir enerji kaynakları sempozyumu ve sergisi, Bildiriler kitabı, Kayseri*, TMMOB Yayın No: E/2001/275, 265-272.
- GUNTEKIN, E, UNER, B., KARAKUŞ, B., 2009, Chemical composition of tomato (*Solanum lycopersicum*) stalk and suitability in the particleboard production. *Journal of Environmental Biology*, 30 (5), 731-734.
- GUNTEKIN, E., UNER, B., ŞAHİN, H.T. ve KARAKUŞ, B., 2008, Pepper stalks (*Capsicum annum*) as raw material for particleboard manufacturing, *Journal of applied sciences* 8 (12), 2333-2336.
- GUNTEKIN, E., KARAKUŞ, B. 2008, Feasibility of using eggplant (*Solanum melongena*) stalks in the production of experimental particleboard, *Industrial crops and products*,(27), 354-358.

- HAHN-HAGERDAL, B., BERNER, S., SKOOG, K. 1986, Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* using respiratory inhibitor azide, *Appl Microbiol Biotechnol.*, (24), 287–293.
- HAMELINCK, C.N., VAN HOOIJDONK, G., FAAIJ, A.P.C., 2003, *Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses*, scientific report- NWS-E-55. Utrecht University, Utrecht, The Netherlands: Copernicus Institute, Department of Science, Technology and Society, 35pp.
- HAMELINCK, C.N., Van HOOIJDONK, G., 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.
- HEIKINHEIMO, L., 2002, *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton. Espoo 2002, VTT Publications 483, VTT Technical Research Centre of Finland.
- HOIJE A., GRONDAHL M., TOMMERAAS K., GATENHOLM P., 2005, Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks, *Carbohydr Polym*, (61), 266–275.
- HOWARD, R.L., ABOTSI, E., VAN RENSBURG, E.L.J., HOWARD, S., 2003, Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production, *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 602–619.
- HSU, T.A., LADISCH, M.R., TSAO, G.T., 1980. Alcohol from cellulose. *Chemical Technology* 10 (5), 315–319.
- HUSSEIN, M.Z.B., RAHMAN, M.B.B.A., YAHAYA, A.H.J., HIN, T.Y.Y, AHMAD, N. 2001, Oil palm trunk as a raw material for activated carbon production, *Journal of Porous Material*, 8 (4), 327–334.
- INDACOECHEA, I., BOLADO, S., GARCI'A-CUBERO, M.T., DIEZ, R., 2006, Pretreatment processes of lignocellulosic material for bioethanol conversion: Ozonolysis. 17th international congress of chemical and process engineering, Chisa, Prague.
- JEFFRIES, T.W., JIN, Y.S., 2000, Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts, *Advances in Applied Microbiology*, (47), 221–268.
- JEOH, T. 1998, *Steam explosion pretreatment of cotton gin waste for fuel ethanol production*, Master's Thesis, Virginia Tech. University.
- KARIMI, K., EMTIAZI, G., TAHERZADEH, M.J., 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme and microbial technology*, 40 (1), 138–144.

- KATAHIRA, S., MIZUIKE, A., FUKUDA, H., KONDO, A., 2006, Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain, *Appl Microbiol Biotechnol.*, (72), 1136–1143.
- KIM, K.H., HONG, J., 2001, Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis, *Bioresource Technol.*, 77 (2), 139–144.
- KORMELINK, F.J.M., VORAGEN, A.G. 1993, Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by A combination of purified xylan-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38 (5), 688–695.
- LADISCH, M. R. 1989, *Biomass Handbook*, Gordon and Breach Science Publishers, New York, 434-451.
- LEE, Y.J., 2005, *Oxidation of sugarcane bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide*, Master's Thesis, Department of food science, Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- LI, Y., RUAN, R., CHEN, P.L., LIU, Z., PAN, X., LIN, X., 2004, Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. *Transactions of the ASAE*, 47 (3), 821–825.
- LINOJ KUMAR, N.V., DHAVALA, P., GOSWAMI, A., MAITHEL, S. 2006. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. *Asian Biotechnology and Development Review* 8 (2), 31–49.
- MABEE, W.E., SADDLER, J.N., NIELSEN, C., NIELSEN, L.H., JENSEN, E.S. 2006, Renewable-Based Fuels for Transport. In: Renewable Energy for Power and Transport. *Risø Energy Report 5*, November, 47–50.
- MABEE, W.E., GREGG, D.J., ARATO, C., BERLIN, A., BURA, R., GILKES, N. 2006, Updates on softwood-to-ethanol process development, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (129–132), 55–70.
- MADSON, P.W., LOCOCO, D.B. 2000, Recovery of volatile products from dilute high-fouling process streams, *Appl Biochem Biotechnol.*, (84–86), 1049–1061.
- MCMILLAN, J.D. 1993, Pretreatment of lignocellulosic biomass. in: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. (eds) Enzymatic conversion of biomass for fuel production. *American Chemical Society, Washington, D.C.*, 292–323.
- MCMILLAN, J.D. 1997, Bioethanol production: status and prospects, *Renew energy*, (10), 295–302.
- MILLER, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, (31), 426-428.

- MILLET, M.A., BAKER, A.J., SCATTER, L.D., 1976, Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification, *Biotech. Bioeng. Symp.* 6, 125–153.
- MOHAGHEGHI, A., EVANS, K., CHOU, Y.C., ZHANG, M. 2002, Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA–integrated xylose/arabinose fermenting strain of *zymomonas mobilis AX101*, *Appl Biochem Biotechnol.*, (98–100), 885–898.
- MOSIER, N.S., LADISCH, C.M., LADISCH, M.R., 2002, Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation, *Biotechnology bioengineering*, 79 (6), 610–618.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., HOLTZAPPLE, Y.Y.L.M., LADISCH, M., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, (96), 673–686.
- MUSTAJOKI, S., LEPONIEMI, A., DAHL, O., 2010, Alkaline peroxide bleaching of hot water treated wheat straw, *Bioresources*, 5 (2), 808-826.
- NICHOLS, N.N., DIEN, B.S., BOTHAST, R.J. 2001, Use of catabolic repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol, *Appl Microbiol Biotechnol.*, (56), 120–125.
- NUTT, A., 2006, *Hydrolytic and oxidative mechanisms involved in cellulose degradation*, Acta Universitatis Upsaliensis, Upsala, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 185.
- OYEKOLA, O.O., 2004, *The enzymology of sludge solubilisation under biosulphidogenic conditions: isolation, characterisation and partial purification of endoglucanases*, Masters Thesis, Rhodes University.
- PALMOWSKI, L., MULLER, J., 1999, Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. In: *II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. Barcelona*, 137–144.
- PAN, X., ARATO, C., GILKES, N., GREGG, D., MABEE, W., PYE, K.L., 2005, Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (4), 473–481.
- PARAJO, J.C., VAZQUEZ, D., ALONSO, J.L., SANTOS, V., DOMINGUEZ, H. 1993, Prehydrolysis of eucalyptus wood with dilute sulphuric acid: operation at atmospheric pressure, *Holz als Roh- und Werkstoff*, (51), 357–363.
- PATEL, S.J., ONKARAPPA, R., KS, S. 2007, Fungal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production, *Electronic Journal of Environmental, Agric. Food Chem.*, 6 (4), 1921–1926.

- PONGSAWATMANIT, R., TEMSIRIPONG, T., SUWONSICHON, T., 2007, Thermal and rheological properties of tapioca starch and xyloglucan mixtures in the presence of sucrose. *Food Research International*, 40 (2), 239–248.
- RAHMAN, S.H.A., CHOUDHURY, J.P., AHMAD, A.L., KAMARUDDIN, A.H., 2007, Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose, *Bioresource Technology*, (98), 554–559.
- RAO, R.S., JYOTHI, C.P., PRAKASHAM, R.S., SARMA, P.N., RAO, L.V., 2006, Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technol.*, 97 (15), 1974–1978.
- RIVERS, D.B., EMERT, G.H., 1987, Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition, *Biotechnol Lett.*, 9 (5), 365–368.
- SAHA, B.C., BOTHAST, R.J., 1999, Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76 (2), 65–77.
- SAHA, B.C., DIEN, B.S., BOTHAST, R.J., 1998, Fuel ethanol production from corn fiber: current status and technical prospects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (70–72), 115–125
- SAULNIER, L., THIBAUT, J.F. 1999, Ferulic acid and diferulic acids as Components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (79), 396–402.
- SCHNEIDER, H., WANG, P.Y., CHAN, Y.K., MALESZKA, R. 1981, Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol Lett.*, (3), 89–92.
- SILVERSTEIN, R.A. 2004, *A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol*, Master's Thesis (adv: R. Sharma), Biological And Agricultural Engineering, North Carolina State University.
- SILVERSTEIN, R.A., CHEN, Y., SHARMA-SHIVAPPA, R.R., BOYETTE, M.D., OSBORNE, J., 2007, A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, *Bioresource Technol.*, 98 (16), 3000–3011.
- SIMPSON, A. J., KINGERY, W. L., HATCHER, P. G., 2003, *Environmental Science & Technology*, (37), 337–342.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D., 2008, Determination of structural carbonhydrates and lignin in biomass, *Technical report NRELL/TP-510-42618*, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colarado.

- SUN, Y., 2002, *Enzymatic hydrolysis of rye straw and bermudagrass for ethanol production*, PhD thesis, Biological And Agricultural Engineering, North Carolina State University.
- SUN, J. X., XU, F., SUN, X. F., XIAO, B., SUN, R. C., 2005, Polymer Degradation Stability, (88), 521–531.
- TEIXEIRA, L.C., LINDEN, J.C., SCHROEDER, H.A. 1999, Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel, *Renewable Energy*, 16 (1-4) 1070–1073.
- TORGET, R., HATZIS, C., HAYWARD, T.K., HSU, T.A., PHILIPPIDIS, G.P., 1996, Optimization of reverse-flow, two-temperature, dilute-acid pretreatment to enhance biomass conversion to ethanol, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (58), 85–101.
- TUCKER, M.P., KIM, K.H., NEWMAN, M.M., NGUYEN, Q.A., 2003, Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (105), 165–178.
- VAITHANOMSAT, P. SINSUPHA CHUICHULCHERM, WARAPORN APIWATANAPIWAT, 2009, Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment, *World academy of Science, Engineering and technology*, (49), 140-143.
- VARGA, E., SCENGYEL, Z., RECAEY, K., 2002, Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98–100, 73-87.
- WANG, P.Y., SHOPSIS, C., SCHNEIDER, H. 1980, Fermentation of a pentose by yeasts, *Biochem Biophys Res Commun.*, (94), 248–254.
- WYMAN, C.E., 1999, Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges, *Annu. Rev. Energy Environ.*, (24), 189–226.
- XIANG, Q., LEE, Y.Y., PETTERSSON, P.O., TORGET, R.W., 2003, Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of  $\alpha$ -cellulose, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (105–108), 505–514.
- YAMAN, S. 2004, Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks, *Energy conversion and management*, (45), 651–671.
- YOOSIN, S., SORAPIPATANA, C. 2007, A study of ethanol production cost for gasoline substitution in thailand and its competitiveness. *thammasat Int. J. Sc. Technol.*, 12 (1), 69–80.

- ZHANG, Y.H.P., LYND, L.R., 2004, Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems, *Biotechnology Bioengineering*, 88 (7), 797–824.
- ZHANG, Y.H.P., HIMMEL, M.E., MIELENZ, J.R., 2006, Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, (24), 452–481.
- ZHANG, L., WANG, T., JIAO, S., HAO, C., MAO, Z., 2008, Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw, 2007, *Bioresource and technology*, 99 (17), 8512-8515.
- ZARZYŃSKI, A., POLSKA, W. 2007. Bioethanol production from sugar beet- European and polish perspective. In: *The first TOSSIE Workshop on technology improvement opportunities in The European sugar industry, January 25–26<sup>th</sup>. Ferrara, Italy.*
- ZHENG, Y., ZHONGLI, P., ZHANG, R., 2009, Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *Int J Agric & Biol Eng*, 2 (3), 51-68.
- ZERBE, J.I. 1982. Energy properties of wood. in: *Fuelwood management and utilization seminar: Proceedings. East Lansing, MI; 6-13, USA.*



## EKLER

### EK 1

Çizelge Ek 1: Süre, işlem ve kimyasal muamele faktörleri ve bunların karşılıklı etkileşiminin glikoz içeriğinde meydana gelen değişimlere ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
İşlem	5.76	1	5.76	2.534	0.124
Süre	3.300	1	3.300	1.452	0.240
Kimyasal	111.432	2	55.716	24.513	0.000
İşlem * süre	1.013	1	1.013	0.446	0.511
İşlem * kimyasal	17.743	2	8.871	3.903	0.034
Süre * kimyasal	10.167	2	5.083	2.236	0.129
İşlem * süre * kimyasal	5.716	2	2.858	1.257	0.302

### EK 2

Çizelge Ek 2: Süre, işlem ve kimyasal muamele faktörleri ve bunların karşılıklı etkileşiminin ksiloz içeriğinde meydana gelen değişimlere ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
İşlem	93.767	1	93.767	152.673	0.000
Süre	2.007	1	2.007	3.268	0.083
Kimyasal	40.744	2	20.372	33.170	0.000
İşlem * süre	2.614	1	2.614	4.256	0.050
İşlem * kimyasal	1.037	2	0.519	0.844	0.442
Süre * kimyasal	1.427	2	0.714	1.162	0.330
İşlem * süre * kimyasal	3.774	2	1.887	3.072	0.065

### EK 3

Çizelge Ek 3: Süre, işlem ve kimyasal muamele faktörleri ve bunların karşılıklı etkileşiminin lignin içeriğinde meydana gelen değişimlere ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
İşlem	369.280	1	369.280	1821.108	0.000
Süre	21.314	1	21.314	105.108	0.000
Kimyasal	388.027	2	194.014	956.779	0.000
İşlem * süre	0.267	1	0.267	1.316	0.263
İşlem * kimyasal	42.821	2	21.410	105.585	0.000
Süre * kimyasal	2.737	2	1.369	6.749	0.005
İşlem * süre * kimyasal	12.044	2	6.022	29.697	0.000

### EK 4

Çizelge Ek 4: İşlem ve süre faktörleri ve bunların karşılıklı etkileşiminin enzimatik hidroliz sonucundaki glikoz içeriği içeriğinde meydana gelen değişimlere ilişkin varyans analizi

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)
İşlem	409.664	7	58.523	156.742	0.000
Süre	12268.852	4	3067.213	8214.832	0.000
İşlem * süre	643.910	28	22.997	61.592	0.000

### EK 5

Çizelge Ek 5: Glikoz içeriğindeki değişimlere ilişkin varyans analizi (ANOVA)

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Gruplar arası	213.260	13	16.405	7.715	0.000
Gruplar içi	59.540	28	2.126		
Toplam	272.800	41			

## EK 6

Çizelge Ek 6: Ksiloz içeriğindeki değişimlere ilişkin varyans analizi (ANOVA)

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Gruplar arası	158.464	13	12.190	18.685	0.000
Gruplar içi	18.267	28	0.652		
Toplam	176.731	41			

## EK 7

Çizelge Ek 7: Lignin içeriğindeki değişimlere ilişkin varyans analizi (ANOVA)

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Gruplar arası	857.037	13	67.311	373.454	0.000
Gruplar içi	5.047	28	0.180		
Toplam	880.084	41			

## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Soyadı, adı : ÖZYÜREK, Ömer  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 12.10.1984 Aybastı/ ORDU  
Medeni hali : Bekar  
Gsm : 0 (507) 787 81 99  
e-mail : omerozyurek@duzce.edu.tr

### **Eğitim**

#### **Derece**

Lisans

Lise

#### **Eğitim Birimi**

İstanbul Üniversitesi/ Orman End. Müh.

Mehmed Bayazıd Lisesi

#### **Mezuniyet tarihi**

2007

2002

### **İş Deneyimi**

#### **Yıl**

2010-2011

#### **Yer**

Düzce Üniversitesi

#### **Görev**

Araştırma Görevlisi

### **Yabancı Dil**

İngilizce

### **Yayınlar**

### **Hobiler**

Bisiklete binmek, Kitap okumak, Seyahat