

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOETANOL ÜRETİMİNDE HAVUÇ POSASI KULLANIM KAPASİTESİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Dilara Nur ÇAKIR**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2022**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### BİYOETANOL ÜRETİMİNDE HAVUÇ POSASI KULLANIM KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

Dilara Nur ÇAKIR

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Tez çalışmasında gıda endüstrisinin önemli bir atığı olan havuç posasının biyoetanol üretimi için hammadde olarak kullanım kapasitesi araştırılmıştır. Fermantasyon deneyleri için yerel şeker fabrikasından temin edilen atık sudan izole edilen mayalar ve ayrıca Ankara Üniversitesi Kültür Koleksiyonunda bulunan *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* kullanılmıştır. Yapılan mikrobiyal tanılama sonucu izole edilen mayaların *Candida boidinii* olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda şeker ve etanol konsantrasyonunu artırmak amacıyla, seyreltik asit ile ön işlem uygulanan, farklı başlangıç hammadde konsantrasyonları denenmiştir. Daha sonrasında hammadde enzimatik hidrolize tabi tutulmuş ve deney ortamına organik ve inorganik katkılamaların etkileri araştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* ile yapılan çalışmalarda en yüksek etanol üretimine, başlangıç hammadde konsantrasyonu 100 g/L, *Candida boidinii*'de ise 150 g/L olduğunda ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda enzimatik hidrolizin etanol üretimini artırdığı belirlenmiştir. 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselüloz varlığında 48. saatte en yüksek biyoetanol konsantrasyonları elde edilmiştir. Etanol konsantrasyonları, *S. cerevisiae* için 17.76 g/L, *P. stipitis* için 10.97 g/L ve *C. boidinii*-1 için 20.36 g/L olarak tespit edilmiştir. Deney ortamına yapılan maya özütü, pepton ve çeşitli inorganik bileşikler içeren katkılama sonucu da etanol üretiminin arttığı belirlenmiştir. En yüksek biyoetanol konsantrasyonu *S. cerevisiae* için 48. Saatte 27.48 g/L'dir. *P. stipitis* için ise 96. Saatte 11.32 g/L'dir. *C. boidinii*-1 için ise 72. Saatte 32.55 g/L olarak saptanmıştır.

**Aralık 2022, 117 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** havuç atığı, biyoetanol, enzimatik hidroliz, fermentasyon, *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *C. boidinii*

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### DETERMINATION OF BIOETHANOL PRODUCTION CAPACITY OF CARROT POMACES

Dilara Nur ÇAKIR

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

Supervisor: Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

In this thesis, the capacity of carrot pulp, which is an important waste of the food industry, for bioethanol production was investigated. For the fermentation experiments, yeasts isolated from the wastewater obtained from the local sugar factory. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* in Ankara University Culture Collection were used. As a result of the identification, the isolated yeasts were determined to be *Candida boidinii*. In order to increase the sugar and ethanol concentration, different initial raw material concentrations, which were pretreated with dilute acid, were tested. In addition, the raw material was subjected to enzymatic hydrolysis and the effects of organic and inorganic additives were investigated. In the studies conducted with *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, the highest ethanol production was reached when the initial raw material concentration was 100 g/L and 150 g/L in *Candida boidinii*. It was determined that enzymatic hydrolysis increased ethanol production. In the presence of 15 FPU cellulase and 15 U/mL hemicellulase, the highest bioethanol concentration at 48 hours was determined as 17.76 g/L for *S. cerevisiae*, 10.97 g/L g/L for *P. stipitis* and 20.36 g/L for *C. boidinii*. It was determined that ethanol production increased with the addition of yeast extract, peptone and various inorganic compounds to the medium. The highest bioethanol concentration was 27.48 g/L at 48th hour for *S. cerevisiae*. It was determined as 11.32 g/L at 96th hour for *P. stipitis* and 32.55 g/L at 72th hour for *C. boidinii*.

**December, 2022, 117 pages**

**Key Words:** carrot waste, bioethanol, enzymatic hydrolysis, fermentation, *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *C. boidinii*

## TEŞEKKÜR

Tez alıőmamın her aşamasında beni ynlemdiren, bilgi, neri ve yardımlarını esirgemeyen ve büyük emeği geen Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı ğretim üyelerinden hocalarım sayın Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e ve Prof. Dr. Sevgi ERTUğRUL KARATAY'a saygı ve teőekkürlerimi sunarım.

Çok değerli katkılarından dolayı TİK yesi sayın Prof. Dr.Zmriye AKSU'ya (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım boyunca beni cesaretlendiren ve hayat boyu desteklerini esirgemeyen, annem Refika ÇAKIR, babam Aytekin ÇAKIR, kardeőim Büőra Naz ÇAKIR'a sabır ve anlayıőlarından dolayı en içten teőekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince bana destek veren laboratuvar arkadaőlarıma özellikle de Aybüke Kut'a teőekkürlerimi sunarım.

Dilara Nur ÇAKIR  
Ankara, Aralık 2022

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1 Etanolün Genel Özellikleri.....	4
2.2 Biyoetanolün Avantajları .....	5
2.3 Biyoetanolün Tarihçesi, Dünyada ve Ülkemizdeki Güncel Durum .....	6
2.4 Biyoetanolün Üretimi.....	9
2.5 Hammaddenin Tipine Göre Biyoetanol Grupları (Biyoetanol Nesilleri).....	11
2.6 Lignoselülozik Biyokütlenin Özellikleri ve Etanol Üretim Basamakları.....	22
2.7 Lignoselülozik Biyoküttele Kullanılan Ön İşlem Yöntemleri .....	27
2.7.1 Fiziksel ve fizikokimyasal ön işlemler .....	27
2.7.2 Kimyasal ön işlemler .....	31
2.7.3 Biyolojik ön işlemler .....	36
2.7.4 Fermentasyon stratejileri.....	39
2.8 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Başlıca Mikroorganizmalar .....	42
2.8.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
2.8.2 <i>Pichia stipitis</i> .....	46
2.8.3 <i>Zymomonas mobilis</i> .....	47
2.8.4 <i>Candida boidinii</i> .....	49
2.8.5 Etanol üretiminde kullanılan diğer mikroorganizmalar .....	50
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	55
3.1 Materyal.....	55
3.1.1 Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmalar .....	55
3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan hammadde.....	55
3.2 Yöntem .....	55

3.2.1 Maya izolasyonu, saflaştırılması ve tanılanması.....	55
3.2.2 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri.....	56
3.2.3 Optimum başlangıç hammadde konsantrasyonunun belirlenmesi.....	57
3.2.4 Hammaddeye ön-işlem uygulaması .....	57
3.2.5 Enzimatik hidrolizin indirgen şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisinin belirlenmesi.....	57
3.2.6 Besiyeri zenginleştirmesinin biyoetanol üretimine etkisi belirlenmesi.....	58
3.2.7 Fermentasyon deneyleri .....	58
3.3 Analitik Yöntemler .....	59
3.3.1 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi .....	59
3.3.2 Şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	59
3.3.3 Mikrobiyal gelişmenin belirlenmesi.....	59
3.3.4 Kinetik parametrelerin değerlendirilmesinde kullanılan denklemler.....	60
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	61
4.1 Başlangıç Havuç Konsantrasyonunun Şeker konsantrasyonu ve Etanol Üretimine Etkisi .....	61
4.2 Enzimatik Hidrolizin Biyoetanol Üretimine Etkisi.....	69
4.3 Enzimatik Hidrolizin Mikrobiyal Gelişime Etkisi.....	76
4.4 Besiyeri Katkılmasının Biyoetanol Üretimine Etkisi.....	78
4.5 Kinetik Parametrelere İlişkin Sonuçlar .....	86
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	88
5.1 Başlangıç Havuç Konsantrasyonunun Şeker konsantrasyonu ve Etanol Üretimine Etkisi .....	88
5.2 Enzimatik Hidrolizin Biyoetanol Üretimine Etkileri.....	90
5.3 Besiyeri Katkılmasının Biyoetanol Üretimine Etkisi.....	91
5.4 Sonuç ve Öneriler.....	93
KAYNAKLAR .....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	116

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat derece
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Etanol
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
Ca(OH) <sub>2</sub>	Kalsiyum hidroksit
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
cm	Santimetre
g	Gram
h	saat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
kg	kilogram
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
L	Litre
mg	Miligram
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	milimetre
NaCl	Sodyum klorür
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	Sodyum hidroksit
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
nm	nanometre
rpm	Dakikadaki devir
ZnSO <sub>4</sub>	Çinko sülfat
T	Sıcaklık
α	Alfa
β	Beta

### Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADH	Alkol dehidrojenaz enzimi
AFEX	Amonyaklı buhar patlaması
ATP	Adenozin trifosfat
CBP	Konsolide biyoişleme

DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	Dinitrosalisilik asit
EDA	2-keto-3-deoksi-glukonat aldolaz,
EDD	6-fosfoglukonat dehidrataz;
ENO	Enolaz
FBPA	Fruktoz-1,6-bifosfat aldolaz
FID	Alev iyonlaştırıcı dedektör
FPU	Filtre kağıdı birimi
GAPDH	
GI	iseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GC	Gaz kromatografi
GFOR	Glukoz-fruktoz oksidoredüktaz;
GK	Glukokinaz;
GNTK	Glukonat kinaz;
GPDH	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz;
HK	Heksokinaz
HMF	5-hidroksimetilfurfural
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
OPEC	Petrol İhraç Eden Ülkeler Örgütü
PDC	Piruvat dekarboksilaz
PFK	Fosfofruktokinaz
PGI	Fosfoglukoizomeraz
PGK	Fosfogliserat kinaz
PGL	Fosfoglukonolaktonaz
PGM	Fosfogliseromutaz
PYK	Piruvat kinaz
SHCF	Ayrı hidroliz ve birlikte fermentasyon
SHF	Ayrılmış hidroliz ve fermentasyon
SSCF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon
SSF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon
TPI	Trioz fosfat izomeraz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Farklı nesillerde biyoetanol üretim süreci .....	21
Şekil 2.2 Lignoselülozun yapısı .....	24
Şekil 2.3 Ön işleme tabi tutulan lignoselülozik biyokütlenin durumu.....	27
Şekil 2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da Embden Meyerhoff Yolağı.....	45
Şekil 2.5 <i>Zymomonas mobilis</i> 'te Entner-Doudoroff Yolağı .....	48
Şekil 3.1 Mayaların izolasyon aşamasında kaydedilen mikroskop görüntüsü.....	56
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlardaki havuç posası miktarlarında başlangıç şeker konsantrasyonu, ortamda kalan şeker konsantrasyonu ve biyoetanol miktarı .....	64
Şekil 4.2 Enzimatik hidrolizin etanol üretimine ve indirgen şeker konsantrasyonuna etkisi .....	70
Şekil 4.3 Besiyeri katkılmasının farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında kullanılan şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisi.....	79

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Etanolün fizikokimyasal özellikleri .....	4
Çizelge 2.2 Dünyada yıllık etanol yakıt üretimi .....	10
Çizelge 2.3 Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve karşılaştırmalı etanol üretim potansiyelleri .....	12
Çizelge 2.4 Farklı biyoetanol üretim nesillerinin avantaj ve dezavantajları .....	22
Çizelge 4.1 Başlangıç havuç posası miktarının ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisi .....	67
Çizelge 4.2 Farklı başlangıç biyokütle konsantrasyonlarında enzimatik hidroliz öncesi ve sonrası şeker konsantrasyonu .....	69
Çizelge 4.3 Enzimatik hidrolizin, farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında etanol üretimine etkisi .....	73
Çizelge 4.4 Farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında enzimatik hidrolizin ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonuna (g/L) etkisi .....	75
Çizelge 4.5 Enzimatik hidrolizin mikrobiyal gelişime etkisi (g/L).....	77
Çizelge 4.6 Besiyeri katkılanması ile enzimatik hidrolizin etanol üretimine etkisi.....	82
Çizelge 4.7 Besiyeri katkılanmasının farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında ortamdaki şeker konsantrasyonuna (g/L) etkisi .....	84
Çizelge 4.8 Farklı havuç posası konsantrasyonlarında mayalara ait bazı kinetik parametreler.....	87

## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artması ve giderek daha çok ülkenin endüstrileşmesiyle fosil yakıtların yakın gelecekte tükeneyeceği tahmin edilmektedir. Ancak dünya genelinde enerji tüketiminin artmaya devam etmesi, biyoyakıt kullanımında artışa katkı sağlamaktadır. Ayrıca fosil yakıtların neden olduğu çevresel etkiler, sera gazı salımları ve küresel ısınma, tüm dünya ülkelerini ilgilendiren ve acil çözüm üretilmesi gereken bir konu haline gelmiştir.

OECD tarafından yayınlanan “2030 yılına kadar OECD Çevre Tahmin Raporu”nda 2030 yılına kadar, ülkelerin yeni politikalar uygulamaması durumunda; küresel sera gazı emisyonlarının %37, 2050 yılına kadar da %52 oranında artış göstereceğinin tahmin edildiği bildirilmektedir. Bu durumun 2050 yılına kadar küresel sıcaklığın 1.7-2.4°C aralığında artması sonucunu doğuracağı ayrıca, kuraklıklarda, fırtınalarda ve sellerde artışa yol açacağı da bildirilmiştir. Bu nedenle çevreyi olumsuz etkileyen enerji, taşımacılık vb. sektörlerde öncelikli eylem politikalarının geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Anonymous, 2008).

BP tarafından yayınlanan Dünya Enerjisinin İstatistiksel İncelemesi raporunda, petrolün, enerji sektöründe % 33,1 oranla en büyük payı elinde tutmaya devam ettiği, kömür sektörünün ikinci en büyük yakıt olmasına rağmen 2019’da payını kaybettiği ve % 27,0 ile 2003’ten bu yana en düşük seviyesinde olduğu bildirilmiştir. Hem doğal gazın hem de yenilenebilir enerjinin payı sırasıyla % 24,2 ve % 5,0 ile rekor seviyelere yükseldiğine de yer verilmiştir. Yenilenebilir enerji şu anda enerji karışımının yalnızca % 4,3’ünü oluşturan nükleer enerjiyi geride bıraktığı da raporda yer almaktadır (Anonymous, 2020).

OECD Türkiye Çevresel Performans İncelemesi’nde, Türkiye’nin enerji portföyünün %88’ini fosil yakıtların oluşturduğu bildirilmiş ve yenilenebilir enerji kaynaklarının kapasitesinin artmasına rağmen, yenilenebilir enerjilerin payının 2005 yılından bu yana sabit kaldığı yer almıştır (Anonim 2019).

Tüm bunlar göz önüne alındığında, dünyada ve ülkemizde yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynakları üzerine çalışmaların yoğunlaştığı göze çarpmaktadır.

Biyoetanol de çevresel sürdürülebilirliği ve fosil yakıtlara göre yenilenebilirliği nedeniyle ilgi çekici ekoyakıtlardan biri olarak kabul edilir (Halder vd., 2019). Tüm biyoyakıtlar içinde gelecekte alternatif bir yakıt olarak, etanol öne çıkmakta olup, dünya çapında önemli ölçüde üretilmeye başlanmıştır (Bajpai, 2013). Etanolün yüksek oktan sayısına sahip olması benzin-etanol karışımının performansını artırmaktadır. Ayrıca, biyoetanol benzine kıyasla daha yüksek oksijen içerir. Bu da benzinin yanmasına kıyasla toksik madde emisyonunu azaltmaktadır (Aditiya vd., 2016; Halder vd., 2019).

Biyoetanol üretiminde hammadde kritik öneme sahiptir. Bunun nedeni ise, biyokütlenin bileşenlerinin genel etanol veriminde oynadığı roldür. Farklı hammaddelerden biyoetanol veriminin analizinde, biyokimyasal bileşimle birlikte, bulunabilirlik, nakliye, işleme maliyeti ve fosil yakıt alternatifi olabilme verimliliği önem kazanmaktadır. Biyoetanol üretimi için hammaddeler, bileşimlerine ve kullanılan teknolojiye bağlı olarak farklı nesillere bölünmüştür (Mohapatra vd., 2019).

Birinci nesil biyoetanol, şeker kamışı, mısır, pancar veya buğday gibi yüksek şeker ve nişasta içeriğine sahip gıda ürünlerinden elde edilmektedir (Mohapatra vd., 2019; Sharma vd., 2019). Ancak, gıda ürünlerinden birinci nesil biyoetanol üretimi yakıt ve gıda endüstrisi arasında tartışmalara neden olmaktadır (Esmaceli vd., 2020).

İkinci nesil biyoetanol üretiminde, tarım ve orman atıklarından elde edilen hammadde kullanılmaktadır. Mısır, arpa, yulaf, pirinç, buğday, sorgum ve şeker kamışı gibi mahsullerden elde edilen lignoselülozik biyokütle, esas olarak biyoetanol üretiminde kullanılmaktadır. Bu hammaddeler arasındaki lignoselülozik malzemeler, daha fazla işlenebilen fermente edilebilir şekere dönüştürülür ve nihai ürün olarak biyoetanol elde edilir (Kim ve Dale, 2004; Aditiya vd., 2016; Krishnan vd., 2020).

Üçüncü nesil biyoetanol üretiminde mikroalgler son yıllarda çeşitli yetenekleriyle öne çıkmaktadır. Bunlar, CO<sub>2</sub> fiksasyon yetenekleri ve yüksek lipit üretim kapasiteleridir.

Ayrıca gıda veya yem bitkileri ile rekabet etmemeleri ve ekilebilir olmayan arazilerde üretilebilir olmaları da önemlidir (Dragone vd., 2010). Ancak, mikroalglerin düşük biyokütle konsantrasyonu ve bu alg hücrelerinin küçük boyutlu olması, alg biyokütlelerinin buldukları ortamdan geri kazanılmasını nispeten maliyetli hale getirmektedir (Demirbaş, 2010).

Dördüncü nesil biyoyakıt üretiminde genetiği değiştirilmiş algler kullanılmaktadır (Abdullah vd., 2019). Ancak bu üretim yöntemi yeni olup, fotobiyoreaktörün yüksek maliyeti ve ilk yatırımın yüksek olması gibi dezavantajlara sahiptir (Moravvej vd., 2019).

Her yıl milyarlarca ton yiyecek çöpe atılmakta olup, bu atıklar birikerek çevre kirliliğine neden olmaktadır. Biyoetanol üretiminde yenilenebilir kaynakların kullanılması ise bu çevre kirliliğini çözmeye potansiyeline sahiptir (Chauhan vd., 2021; Ramos-Andrés vd., 2021). Meyve sebze atıkları ise bol miktarda bulunduğundan biyoetanol üretiminde biyokütle kaynakları arasında artan bir ilgiye sahiptir (Maitan-Alfenas vd., 2015; Kruczek vd., 2016; Lin vd., 2021). Bu tür atıklar selüloz, hemiselüloz ve lignin açısından zengin olup, etanol gibi değerli ürünlere dönüştürülebilmektedir (Maitan-Alfenas vd., 2015). Bu atıklar arasında havuç posası, serbest şekerleri vakuollerde biriktirdiği için biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Havuç ayrıca; karotenoidler, pektin, Vitamin B ve K gibi çeşitli ek besinlere de sahiptir (Aimaretti vd., 2012; Jafari vd., 2017; Ramos-Andrés vd., 2021).

Yukarıda belirtilen nedenler göz önüne alınarak, bu tez çalışmasında biyoetanol üretimi için hammadde olarak havuç posası kullanılmıştır. Fermantasyon deneyleri için yerel şeker fabrikasından temin edilen atık sudan izole edilen mayalar ve ayrıca Ankara Üniversitesi Kültür Koleksiyonunda bulunan *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* kullanılmıştır. Şeker ve etanol konsantrasyonunu artırmak amacıyla, seyreltik asit (%1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile ön işlem, farklı başlangıç biyokütle (50 g/L,100 g/L,150 g/L,200 g/L) denemeleri, enzim etkisi (15 FPU/g substrat selülaz ve 15 U/mL hemiselülaz) ve besiyeri katkılanması parametreleri araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Etanolün Genel Özellikleri

Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), berrak, renksiz ve yanıcı bir sıvı olup, çözücü, mikrop öldürücü, içecek, antifriz ve yakıt olarak kullanılan bir bileşiktir. Kimyasal formülü  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ 'tır. Hidroksil grubu, etanolün yapısındaki önemli bir bileşen olup, etanolün tüm kimyasal özellikleri esas olarak bu gruptan türetilmiştir (Criddle, 2005). Etanolün molekül ağırlığı 46.07 gram, özgül ağırlığı  $0.79 \text{ kg/dm}^3$ , buhar basıncı 50 mmHg, kaynama sıcaklığı  $78.5^\circ\text{C}$ 'dir (Balat vd., 2008). Etanolün fiziko-kimyasal özellikleri Çizelge 2.1 Etanolün fizikokimyasal özellikleri 'de verilmiştir (Walker, 2011).

Çizelge 2.1 Etanolün fizikokimyasal özellikleri (Walker, 2011)

Parametre	Özellik
Molekül Formülü	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Görünüm	Renksiz Sıvı
Kaynama Noktası	$78.37^\circ\text{C}$
Donma Noktası $-117^\circ\text{C}$	$-117^\circ\text{C}$
Parlama Noktası	$12.8^\circ\text{C}$
Kendi kendine tutuşma sıcaklığı	$425^\circ\text{C}$
Yanma ısısı	$26.800 \text{ kJ/kg}$

Etanol, benzinden daha yüksek bir oktan sayısına ve daha yüksek buharlaşma ısısına sahip olması nedeniyle (Hahn-Hägerdal vd., 2006), benzinle harmanlanma özelliğine sahiptir. Oktan sayısı, yakıtın kalitesinin belirlenmesini sağlayan bir faktördür. Yüksek oktan sayısı ile motorlarda erken ateşleme riski ortadan kalkmaktadır (Adıgüzel, 2013). Benzin için gerekli olan minimum oktan sayısı motorun vuruntusunu önleyerek sürüşün

devamlılığını sağlamaktadır. Bu nedenle düşük oktanlı benzin, standart 87 oktanı elde etmek için %10 etanol ile karıştırılarak kullanılmaktadır. Bununla beraber denatüre etanol (%98 etanol), galon başına benzinden yaklaşık %30 daha az enerji içermektedir. Etanolün yakıt ekonomisi üzerindeki etkisi, yakıttaki etanol içeriğine ve motorun benzinle mi yoksa etanolla mi çalışacak şekilde optimize edilmiş olduğuna bağlı olarak değişmektedir (Anonymous, 2022).

Son yıllarda petrol bazlı yakıtlara alternatif olarak çeşitli biyoyakıt türleri araştırılmaktadır (Laopaiboon vd., 2009; Guo vd., 2015). Biyoetanol de, fermantasyon süreciyle karbonhidratlardan elde edilen ve fosil yakıtlara kıyasla çevresel sürdürülebilirliği ve yenilenebilirliği nedeniyle artık tercih edilen eko-yakıtlardan biri olarak kabul edilen bir alkoldür (Halder vd., 2019; Krishnan vd., 2020).

## **2.2 Biyoetanolün Avantajları**

Biyoetanol çevresel sürdürülebilirliği ve fosil yakıtlara göre yenilenebilirliği nedeniyle ilgi çekici ekoyakıtlardan biri olarak kabul edilmektedir (Halder vd., 2019). Yüksek oktan sayısı nedeniyle benzinli motorda benzinle karıştırılarak kullanıma uygundur ve düşük setan sayısı ve yüksek buharlaşma ısısı dizel motorda kendiliğinden tutuşmayı engeller. Etanol, yanma sonucu ortaya çıkan partikül ve NOx emisyonlarını azaltan ve %35 oksijen içeren bir yakıttır. Oksijen içeriği ise yanma verimini artırmaktadır (Balat vd., 2008).

Hammadde açısından bakıldığında, etanolü yakıt olarak, çoğu ülke üretme kabiliyetine sahip olduğundan, ucuz bir enerji kaynağıdır. Mısır, şeker kamışı veya tahıl hemen hemen her ülkede yetişir ve bu da etanol üretimini fosil yakıtlara kıyasla ekonomik hale getirerek dışa bağımlılığı azaltmaktadır (Ayas, 2018). Amerikan Enerji Verimliliği ve Yenilenebilir Enerji Ofisi tarafından, Amerika Birleşik Devletleri'nde etanolün %94' ü mısır tanesindeki nişastadan üretilmekte olup, mısırdan üretilen etanolün, yakıt üretme sürecinin, yakıtın kendisinde bulunan enerji miktarından daha fazla enerji gerektirmediği, bu nedenle avantajlı olduğu belirtilmektedir. Selülozik etanol üretiminde hammaddeler, atıklar gibi, başka bir endüstrinin yan ürünleridir (odun,

mahsul artıkları) ya da mısırla karşılaştırıldığında düşük su ve gübre gereksinimleri olan, şalgam ve miscanthus gibi özel mahsullerdir. Gıda bazlı olmayan hammaddelerin selülozik etanole dönüştürülmesi sürecine katkı sağlamak için biyokütle kullanıldığında, üretimde kullanılan fosil yakıt enerjisi miktarı daha da azalmaktadır (Anonymous, 2022).

Hammadde kaynaklarının çeşitliliği de etanolün avantajlarından biridir. Mısır ve şeker kamışı etanol yakıtı üretiminde başlıca hammadde olmasına rağmen, nişasta ve şeker içeren hemen hemen her mahsul veya bitki üretimde kullanılabilir. Etanolün diğer yakıt kaynaklarına göre önemli bir diğer avantajı, çevre kirliliğine neden olmamasıdır. Taşıtlarda etanolün kullanılması, çevresel toksinleri önemli ölçüde azaltmaktadır. Etanol belirli oranda benzinle karıştırılarak kullanılmaktadır. Benzinin küçük bileşimi bir ateşleyici görevi görürken, etanol görevlerin geri kalanını üstlenmektedir. Etanolün benzin karışımı, saf benzine kıyasla daha temiz yandığı için sera gazı emisyonunu en aza indirerek küresel ısınmanın önüne geçmede etkilidir. Ayrıca etanol, güneşten gelen enerjinin faydalı enerjiye dönüştürülmesinin sonucu olması nedeniyle yenilenebilir bir kaynak olarak sınıflandırılmaktadır. Etanol üretimi, şeker kamışının büyümesini ve daha sonra etanol yakıtına dönüştürülmesini sağlayan fotosentez süreciyle başlamaktadır. (Ayas, 2018).

Bununla birlikte etanolün çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır: Hammadde kaynaklarının üretilmesi için büyük araziler gerektirmektedir. Distilasyon işlemi uzun zaman almakta ve fazla miktarda ısı harcaması gerektirmektedir.

### **2.3 Biyoetanolün Tarihi, Dünyada ve Ülkemizdeki Güncel Durum**

On dokuzuncu yüzyılda gerçekleşen Sanayi Devrimi, mekanize enerjinin, yani daha önce insan veya hayvan emeğiyle yapılan işleri yapabilen veya rüzgâr gibi doğal bir kaynağın yerini alabilen motorların geliştirilmesiyle mümkün olmuştur. Bu motorların ana kullanım amacı, özellikle ulaşımda çok uzun mesafelerin aşılması için daha verimli olmaları, zamandan ve emekten tasarruf sağlamalarıdır. Önceleri buharlı motorlar tek seçenek iken, yıllar içinde başka motorlar geliştirilmiştir. Bunlardan en göze çarpanı,

içten yanmalı motordur. İçten yanmalı motorun öncülleri olarak kabul edilebilecek çalışmalar on altıncı ve on yedinci yüzyıllarda yapılmış olsa da, içten yanmalı motorun ilk versiyonunu geliştiren Amerikalı mucit Samuel Morey (1762-1843)'dir. Daha sonra, 1860'ların başında, içten yanmalı motorun dört zamanlı versiyonu, Alman mucit Nikolaus August Otto (1832–91) tarafından Michael Joseph Zons ile işbirliği içinde geliştirilmiştir. Günümüzde Otto motoru olarak da adlandırılan ve kıvılcım ateşlemeli (veya benzinli) motorun icadı bu şekilde gerçekleşmiştir. Motorun geliştirilmesinden sonraki birkaç yıl içinde farklı türde yakıtlar test edilmiştir. Buji ateşlemeli motorun ilk günlerinden itibaren ilgi çeken yakıtlardan biri, çeşitli biyokütlelerin fermantasyonundan elde edilen etanol olmuştur (Knothe, 2012).

1880'lerde, tahıldan üretilen etanol otomobilde kullanılmış ve Paris'te bir alkol yakıtı sergisinde sunulmuştur. 1908 yılında Ford Model-T otomobili üretilmiştir. Ford, Model T'yi, alkol, benzin veya "gazohol" karışımı kullanmak üzere ayarlanabilen karbüratörlerle donatmıştır (Solomon vd., 2007).

Biyometanol yakıt olarak 1900'lerin başına kadar Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca Brezilya'da, 1925'ten beri bir ulaşım yakıtı olarak biyometanol kullanmıştır. Ancak biyometanol, özellikle II. Dünya Savaşı'ndan sonra petrol bazlı yakıttan daha pahalı hale geldiğinden, 1970'lerdeki petrol krizine kadar büyük ölçüde göz ardı edilmiştir (Balat, 2009).

Bununla birlikte, etanolün yakıt olarak kullanımı 1970'lerde yeniden canlanmıştır. İlk olarak, Brezilya, 1973'te OPEC Arap petrol ambargosuna yanıt olarak 1975'te "Proalcool" Programını başlatmıştır. 1980'lerin sonlarında Brezilya'daki arabaların yarısından fazlası %95 susuz etanol (E95) kullanmıştır. Ancak yine 1980'lerin sonunda şekerde yaşanan kıtlık ve fiyat artışları nedeniyle bu oran %20'ye düşmüştür (Solomon vd., 2007). Buna rağmen etanol, ulaşımda toplam yakıt tüketiminin %40'ını oluşturmaktadır. Ayrıca Brezilya, araç yakıtı için en az %25 susuz alkol-benzin karışımı kullanma politikasını sürdürmektedir (Halder vd., 2019).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD), etanol endüstrisini Brezilya'dan daha yavaş bir şekilde yeniden inşa etmesine rağmen, iki ülke bugün üretim ve kullanımda lider konumlarını korumaktadır (Solomon vd., 2007). Amerika Birleşik Devletleri'nde uygulamaya konulan 1978 tarihli Enerji Vergisi Yasası ile E10'u (%10 v/v benzin-biyoetanol karışımı) tüketim vergisinden muaf tutulmuştur. Daha sonra, başka bir uygulamayla da, etanol tesislerinin inşasına yatırım için kredi garantisi verilmiştir (Gnansounou ve Dauriat, 2005). Amerikan Enerji Verimliliği ve Yenilenebilir Enerji Ofisi'ne göre, ulaştırma sektörü, ABD'nin toplam enerji ihtiyacının yaklaşık %30'unu ve ABD petrol tüketiminin %70'ini oluşturmaktadır. Yakıt tüketimini azaltmak için etanol ve diğer alternatif yakıtların ve ileri teknolojilerin kullanılması, ulusal güvenliği güçlendirmeye ve işletmeler ve tüketiciler için ulaşım enerji maliyetlerini düşürmeye devam etmektedir (Anonymous, 2022).

ABD ve Brezilya'dan sonra, Avrupa ülkeleri de biyoetanol üretimine önem vermiştir. 1920- 1930 yılları arasında başka bölgelerde şeker kamışı ve melastan etanol üretilirken, Avrupa ülkelerinde etanol üretiminde patates, üzüm ve diğer mahsuller birincil hammaddeler olarak kullanılmaktaydı. Etanol kullanımı, birçok ülkede zorunlu olarak diğer yakıtlarla harmanlama ya da vergi teşvikleri yoluyla teşvik edilmiştir. Bazı bölgelerde ise etanol, ithal benzinden daha ucuzdu. Etanol kullanımını teşvik eden bu eylemlerde enerji güvenliğinin yanı sıra, fazla mahsulleri kullanarak tarım sektörüne gelir sağlama konusu da önemli bir rol oynamıştır. Ancak, İkinci Dünya Savaşı'ndan kısa bir süre önce ve İkinci Dünya Savaşı sırasında, etanol üretimi azalmıştır (Knothe, 2012). Savaşın bitmesiyle birlikte sentetik etanol üretimi, selülozik etanol üretim tesislerinin kapanmasına neden olmuşsa da 2004 yılında Kanada'da lignoselülozik hammaddenin kullanıldığı bir üretim tesisi işletilmeye başlanmıştır (Tampier vd., 2004; Lin ve Tanaka, 2006). 2006 yılında Brezilya'da, 15 milyar litre saf biyoetanol üretmek için, 300'den fazla biyoetanol üretim tesisi çalışmaya başlamıştır. Amerika'da aynı yıllarda 80'den fazla kuruluşta 10 milyar litre biyoetanol üretilmiştir (Klein, 2005).

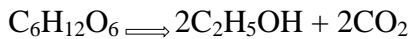
Türkiye'de biyoyakıtlarla ilgili çalışmalar 1931 yılında Ziraat Kongresi'nde ilk kez dile getirilmiştir. Ülkemizde 2005 yılında ticari motor biyoyakıtı uygulaması başlamıştır.

Üretilen biyoetanolda yerli kaynaklar kullanılmış olup, kurşunsuz benzine %2 oranında karıştırılarak piyasaya sunulmuştur (Anonim, 2007).

Türkiye'de biyoetanol üreten 12 fabrika bulunmaktadır. Bunlardan sekizi biyoyakıt üretme kapasitesine sahip olmakla birlikte, sadece üçünde (TARKİM/İstanbul, TEZKİM/Adana, Çumra Şeker Fabrikası/Konya) yakıt olarak biyoetanol üretilmektedir (Ozdingis ve Kocar, 2018). Türkiye'de şeker pancarı tarımı, üretim kotasına uygun olarak 3,5 milyon dekada yapılmaktadır. Geri kalan 4,5 milyon dekarlık arazi biyoetanol üretiminde kullanılmak üzere şeker pancarı üretimi için kullanılabilir. Bu şekilde Türkiye'nin yıllık 2-2,5 milyon ton biyoetanol üretim potansiyeli bulunmaktadır (Acaroğlu ve Aydoğan, 2012). Ayrıca ülkemiz arazilerinin %33.1'i ekili tarımda kullanılmakta olup, kullanılmayan arazilerin yaklaşık %3'ünü içeren bölgelerde tarım yapılabilmesi söz konusudur. Bu bölgeler etanol üretiminde kullanılacak bitkilerin tarımında kullanılabilir (Anonim, 2007). Bu arazilere patates, şeker pancarı ve buğday ekilmesi halinde yıllık 5.8, 8.7 ve 13.7 milyar litre biyoetanol üretilmesi sağlanabilecektir (Melikoğlu ve Albostan, 2011).

#### **2.4 Biyoetanölün Üretimi**

Fermantasyon, biyoetanol üretiminin arkasındaki temel teknolojidir. İlkel kabilelerin bile bu teknolojiyi uzun zaman önce kullandıkları, şeker bakımından zengin ürünlere maya ekleyerek şekerin alkole dönüşmesini sağladıkları bilinmektedir (Roddy, 2012). Biyolojik olarak üretilen ve kimyasal olarak üretilen alkoller arasında kimyasal bir fark bulunmamaktadır (Ayas, 2018). Basit şeker glukozunu alkole dönüştürmek için temel reaksiyon aşağıdaki gibidir (Roddy, 2012):



Biyolojik olarak biyoetanol üretimi farklı nesillere ayrılmıştır. Birinci nesil hammaddeler (mısır ve şeker kamışı vb.) gıda olarak kullanımlarından dolayı sınırlıdır (Mohapatra vd., 2019). Ancak gıda dışı tarım atıklarına benzer şekilde lignoselülozik

biyokütleden ikinci nesil hammaddeler elde edilmektedir. Mısır, arpa, yulaf, pirinç, buğday, sorgum ve şeker kamışı gibi mahsullerden elde edilen lignoselülozik biyokütle, esas olarak biyoetanol üretiminde kullanılmaktadır. Bu ham maddeler biyoetanol üretiminde kullanılmak üzere fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilir (Kim ve Dale, 2004; Aditiya vd., 2016; Krishnan vd., 2020).

Biyoyakıt üretiminde kullanılacak hammaddeler ucuza temin edilerek, daha yüksek verimle dönüştürülebilmektedir. Dolayısıyla, ucuz ve yüksek verimli biyoenerjilerin üretiminde toplam maliyet, yaygın olarak kullanılan fosil yakıttan sağlanan enerjilerle rekabet edebilecek bir konuma gelmektedir (Ozdingis ve Kocar, 2018). **Şekil 2.1**, Amerikan Renewable Fuels Association'e göre 2016'dan 2021'e kadar ülke ve bölgelere göre küresel etanol üretimini göstermektedir.

Çizelge 2.2 Dünyada yıllık etanol yakıt üretimi (Milyar Galon) (Anonymous, 2021)

Bölge	2016	2017	2018	2019	2020	2021	Dünya-daki üretim %
ABD	15,413	15,936	16,091	15,778	13,941	15,000	%55
Brezilya	6,870	6,760	8,080	8,790	8,080	7,500	%27
Avrupa Birliği	1,240	1,320	1,360	1,380	1,260	1,300	%5
Çin	730	850	810	1,010	930	860	%3
Hindistan	270	210	420	470	510	820	%3
Kanada	450	460	460	500	430	440	%2
Diğer Ülkeler	627	664	729	682	659	740	%3
Toplam	26,170	26,870	28,630	29,330	26,410	27,310	

Amerikan Enerji Verimliliği ve Yenilenebilir Enerji Ofisi'ne göre, genel olarak, küresel üretim artmaya devam etmekle birlikte üretim, 2020'de COVID-19 salgını nedeniyle dünya çapında düşmüştür. Amerika Birleşik Devletleri, 2021'de 15 milyar galonla dünyanın en büyük etanol üreticisi konumundadır. ABD ve Brezilya birlikte dünyadaki etanolün %80'den fazlasını üretmektedir. ABD etanolünün büyük çoğunluğu mısırdan üretilirken, Brezilya öncelikle şeker kamışı kullanılmaktadır

## **2.5 Hammaddenin Tipine Göre Biyoetanol Grupları (Biyoetanol Nesilleri)**

Biyoyakıtlar, elde edildiği hammadde tipine bağlı olarak dört farklı nesilde sınıflandırılır. Biyoyakıtların ana "içeriği" olan hammadde, biyoyakıt üretimine yönelik ilk girişimlerden bu yana bazı köklü dönüşümler geçirmiştir. Bir biyoyakıt nihai olarak nişasta, şeker, selüloz ve çeşitli hammaddeler tarafından sağlanan ürünlerden elde edilmektedir. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoyakıtlar olarak ayırımın nedeni, orijinal hammadde kaynağının belirtilebilmesi içindir. En yaygın kullanılan birinci nesil biyoyakıt hammaddeleri; mısır, buğday, soya fasulyesi ve şeker kamışı gibi gıda mahsullerinden oluşan veya doğrudan bunlardan elde edilen ürünlerdir (Capodaglio ve Bolognesi, 2019). Birinci gruptaki hammaddeler, nişasta içeren hammaddeler (mısır, buğday, arpa, patates vb.) ve sükröz içeren hammaddeler (şeker kamışı, şeker pancarı, süpürge darısı) olarak kendi içinde ikiye ayrılabilir (Robak ve Balcerek, 2018). Nişasta, kolayca glukoz hidrolize edilebilirken, heksoz, fruktoz ve glukozdan oluşan bir disakkarit olan sakkaroz ise mayalar tarafından kolayca fermente edilebilir (Balat vd., 2008). Ancak bu hammaddeler pahalı olmaları yanında, yetiştirilmek için özel gereksinimlere de ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca, doğrudan gıda arzı ile rekabet etmekte, gelişmekte olan ülkelerde temel gıda fiyatlarında artışa ve orman arazilerinin kullanımını gibi etik ve sürdürülebilir kalkınma sorunlarını gündeme getirmektedir (Capodaglio ve Bolognesi, 2019).

Çizelge 2.3 Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler ve karşılaştırmalı etanol üretim potansiyelleri (Linoj vd., 2006)

Hammadde	Etanol Potansiyeli (L/ton)
Şeker Pancarı	110
Şeker Kamışı	70
Tatlı Patates	125
Kassava	180
Patates	110
Mısır	360
Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340

Birinci nesil hammaddelerle ilgili yapılan çalışmalara örnekler aşağıda sunulmaktadır:

Mısır ununun ticari olarak temin edilen a-amilaz ve glucoamilaz ile iki aşamalı enzimatik hidrolizi ve elde edilen hidrolizatların *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol fermantasyonu üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada *S. cerevisiae*'nin inokulum konsantrasyonu %1'den %2'ye yükseltildiğinde, fermantasyon süresinin sırasıyla 48'den 32 saate düşürülebildiği bulunmuş ve yaklaşık 63 g/L etanol elde edilmiştir. Etanol üretkenliği ise 1.60 g/L.h olarak belirlenmiştir (Mojović vd., 2006).

Lignoselülozik atıklara enzimatik hidrolize uğramış buğday ilave edilen bir çalışmada, *S. cerevisiae* ATCC 96581 ile fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Sonuçta ortamdaki heksoz şekerlerinin %73'ü kullanılmış ve 36 mmol/L.h etanol üretkenliği elde edilmiştir (Brandberg vd., 2007).

Tatlı patatesin kullanıldığı bir diğer çalışmada biyoetanol üretim kapasitesi çeşitli ölçeklerde araştırılmıştır. Etanol üretiminde eş zamanlı sakkarifikasyon ve

fermantasyon yöntemi (SSF) yöntemi kullanılmıştır. Fermentasyonda maya olarak termotolerant ve osmotolerant *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Tespit edilen etanol konsantrasyonu, etanol üretkenliği ve teorik etanol verimi sırasıyla 128.5 g/L, 4.89 g/L.h ve %91.4 olarak bildirilmiştir (Zhang vd., 2011).

Tatlı patateslerden enzimatik nişasta hidrolizi ve biyoetanol üretimi de incelenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak bulunan maksimum etanol konsantrasyonu 100 g/L'ye yakın (sırasıyla kuru madde/su oranı 1:2 ve 1:3 (w/v) için 98 ve 97 g/L) olarak bulunmuştur (Lareo vd., 2013).

*Saccharomyces cerevisiae* Y2084 ve Vin13 mikroorganizmaları tarafından kaju elma suyunun fermente edilmesiyle biyoetanol üretimi başka bir çalışmada amaçlanmıştır. 100 g/L biyokütle varlığında, pH 4.5 değerinde *S. cerevisiae* Y2084 en yüksek etanol üretimini gerçekleştirmiş ve bu miktarın 68 g/L olduğu belirlenmiştir (Deenanath vd., 2013).

*Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 tarafından selülozik etanol üretimi de araştırılmıştır. Bir asit-baz ön işlemi uygulanıp, 50°C'de 72 saat sakkarifikasyonun ardından, tatlı sorgum hidrolizatı, 37, 42 ve 45 °C sıcaklıkta etanol üretmek için kullanılmıştır. 42°C'de ve 24 saatte yaklaşık 17.83 g/L selülozik etanole 2769.8 L/ha<sub>sorgum</sub> verimle ulaşılmıştır (Tinôco vd., 2021).

İkinci nesil biyoetanol üretiminin, birinci nesilde kullanılan hammaddelerin olumsuz yönleri nedeniyle daha başarılı olacağı tahmin edilmektedir (Aditiya vd., 2016). İkinci nesil üretimde kullanılan hammaddeler, gıda dışı tarım atıkları gibi lignoselülozik biyokütleden elde edilmektedir. Gıda ürünlerinin ikinci nesil olarak kabul edilebilmesinin tek yolu, gıda amaçlarını zaten yerine getirmiş olmalarıdır (Capodaglio ve Bolognesi, 2019). Mısır, arpa, yulaf, pirinç, buğday, sorgum ve şeker kamışı gibi mahsullerden elde edilen lignoselülozik biyokütle, biyoetanol üretiminde kullanılmak üzere fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmektedir (Kim ve Dale, 2004; Aditiya vd., 2016; Krishnan vd., 2020). Bu malzemelerle biyoetanol üretiminde ek arazi gereksinimi olmadığından gıda üretimi üzerinde herhangi bir etkisi de olmamaktadır (Dutta vd.,

2014). Ayrıca, ikinci nesil hammaddelerin, hiçbir gıda değeri olmamasına ek olarak, minimum çevresel etkiye sahip olması, çok miktarda su veya gübre gerektirmemesi de hammadde olarak kullanılmalari için önemlidir (Capodaglio ve Bolognesi, 2019). Lignoselülozik biyokütle doğada bol miktarda bulunur ancak, ekonomik olarak sürdürülebilir biyoetanol üretimi için lignoselülozik biyokütlede bulunan şekerleri düşük maliyetle serbest bırakmak zorlayıcı bir durumdur (Wang vd., 2012; Dutta vd., 2014).

Literatürde ikinci nesil biyoetanol üretimine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır.

*Mischantus* sp. ile yapılan çalışmada biyokütle NaOH ile ön işleme tabi tutulmuş, ardından % 83.9 oranında glukoz dönüşümü sağlayan enzimatik hidroliz (50 FPU/g selüloz ve 30 CbU/g β-glukosidaz) uygulanmıştır. *S. cerevisiae* ile fermentasyonda maksimum biyoetanol (59.2 g/L) elde edilmiştir (Han vd., 2011).

*Miscanthus* (Illinois klonu), dev kamış, *Miscanthus* (Q42641), fil otu, şeker kamışı, pirinç kabuğu ve soya fasulyesinden etanol üretimi araştırılmıştır. Solvent bazlı ön işleme selülozu degrade etmek için 60 dakika boyunca 30°C'de %72 w/w H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ön işlem yapılmıştır. Ekstrakte edilen selüloz, selüloz ile hidrolize edilmiştir. *Miscanthus* (Illinois), dev kamış, *Miscanthus* (Q42641), fil otu ve şeker kamışından, pirinç kabuğu ve soya fasulyesi ile karşılaştırıldığında gram biyokütle başına daha fazla miktarda glukoz açığa çıkmıştır. Fermentasyon işleminde *Saccharomyces cerevisia* ATCC24859 ve ATCC4126 suşları kullanılmış ve 0.375–0.405 g etanol/g glukoz etanol üretilmiştir (Ge vd., 2011).

Kâğıt atıklarından etanol üretimi de araştırılmıştır. Atıklar, (i) doğrudan enzim hidrolizi ve (ii) sülfürik asit muamelesini takiben enzimatik hidroliz olmak üzere iki yöntemle hidrolize edilmiştir. Doğrudan enzim hidrolizi, daha iyi bir glukoz verimi (750 mg/g) sağlamıştır. Biyoetanol üretimini artırmak için yeni bir “Etanol Tuzak Sistemi” kullanılmıştır. %12 w/v biyoetanol, *Saccharomyces cerevisiae* C-19 ile fermentasyon yoluyla elde edilmiştir (Obara vd., 2012).

Havuç atıkları da etanol üretiminde kullanılmıştır. 2.5 saat enzimatik hidrolizin ardından 53.1 g/L toplam Şeker varlığında 15.4 g/L etanol üretilmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak, 1000 kg havuç atığından 25.6 L biyoetanol üretiminin mümkün olduğunu bildirilmiştir (Aimaretti vd., 2012).

Okalıptüsten biyoetanol üretiminin laboratuvar ölçekli bir çalışmasında, okalıptüs ağacı hidrotermal ön işleme (4 saat boyunca 150  C) ön işleme tabi tutulmuştur. Hidroliz için selülağ (20 FPU/g substrat) kullanılmış ve 50 C'de 72 saat inkübasyon yapılmıştır. Fermentasyon için *S. cerevisiae* suşu ile ayrılmış hidroliz ve fermentasyon (SHF) yöntemi kullanılmıştır. 72 saatte 53.5 g/L biyoetanol üretilmiştir (Fujii vd., 2014).

Pirinç samanıyla yapılan çalışmada, amonyaklı buhar patlaması ön işlemi kullanılarak %93.6'lık maksimum glukoz verimi elde edilmiştir. %97 verimle biyoetanol, eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon yöntemi (SSF) ile elde edilmiştir (Cha vd., 2014).

Muz atıklarının biyoetanol üretiminde ön işlem yöntemlerinin araştırıldığı bir çalışmada biyokütle asidik ve bazik ön işlemlere tabi tutulmuştur. Asidik ön işlemden %5 sülfürik asit kullanılmıştır. Etanol üretimi için optimal koşul 180 C ve 25 dakika olarak belirlenmiştir. Bazik ön işlemden %1 sodyum hidroksit kullanılmıştır. 50  C ve 51 dakika işlem süresinin optimum olduğu belirlenmiştir (Gabhane vd., 2014).

Palm yağı fabrikasından elde edilen lignoselulozik atığın biyoetanol üretiminin araştırıldığı bir çalışmada daha fazla verim elde etmek için SHF ve SSF yöntemleri karşılaştırılmıştır. Fermentasyonda *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Biyokütle, 150 C'de 30 dakika boyunca %10 NaOH (sulu) ile ön işleme tabi tutulmuştur. SHF ve SSF prosesleri ile sırasıyla 72 saatte % 4.74 biyoetanol ve 24 saatlik fermentasyonda ise % 6.05 biyoetanol elde edilmiştir (Dahnum vd., 2015)

Başka bir çalışmada da palm yağı fabrikasından elde edilen lignoselulozik atık kullanılmıştır. Ön işlem için %1 NaOH kullanılmış, bu da % 90.3 oranında lignini azaltmıştır. Daha sonra ksilanaz ve selülağ eklenerek hidrolize edilmiştir. Ardından, *S.*

*cerevisiae* ile fermentasyon iki gün boyunca devam etmiş ve pilot ölçekte 540–655 mL (etanol)/3.82–4.63 kg (substrat) üretilmiştir (Richana vd., 2015).

Çeşitli narenciye kabuklarından etanol üretiminin amaçlandığı çalışmada narenciye kabukları enzimatik hidrolize uğratılmış ve fermentasyon basamağında *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Sonuçta en yüksek etanol ise 29.5 g/L ile mandalina kabuğundan elde edilirken, en düşük etanol miktarı 14.4 g/L ile yeşil limon kabuğundan elde edilmiştir. Portakal kabuğunun ise teorik etanol verimi %93.1'e ulaşmıştır (Choi vd., 2015).

Yeşil hindistan cevizi kabuğu lifleriyle yapılan çalışmada, ön işlemden önce alkali yöntemi kullanılmıştır. Biyokütle enzimatik hidrolizle deşere edilmiş ve fermentasyonda *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Biyoetanol dönüşüm verimliliği, fermente edilebilir şekerlerin %59.6'sına kadar ulaşmıştır (Cabral vd., 2016).

Patates kabuğu atıklarıyla yapılan çalışmada, asitle hidroliz işleminde %0.5 HCl kullanılmış, ardından ticari ve genetiği değiştirilmiş *S. cerevisiae* ile fermentasyon gerçekleştirilmiştir. İnokulum miktarı olarak 2 g/L *S. cerevisiae* seçilmiştir. Deney sonunda ticari olarak satın alınan *S. cerevisiae* %2.83 ve genetiği değiştirilmiş *S. cerevisiae* ile %2.64 verimle biyoetanol elde edilmiştir (Sheikh vd., 2016).

Ekstrakte edilmiş zeytin posasıyla yapılan çalışmada, zeytin posası seyreltik HCl ile ön işleme tabi tutulmuş ve ardından enzimatik hidroliz ve fermentasyonu kapsayan SHF ve SSF işlemleri yapılmıştır. SSF ile 72 saatlik süreçte SHF'den (0.36 g/g) daha iyi fermentasyon verimi (0.46 g/g) alınmıştır (Fernandes vd., 2016).

Başka bir çalışmada ön işleme tabi tutulmuş mısır koçanının biyoetanol üretim kapasitesi araştırılmıştır. Bunun için, aynı anda glukoz ve ksiloz kullanan *Spathaspora passalidarum* U1-58 kullanılmıştır. U1-58'in etanol fermentasyon potansiyelini test etmek için, ayrı hidroliz ve birlikte fermentasyon (SHCF) ve eşzamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermentasyon (SSCF) yöntemleri kullanılmıştır. En yüksek etanol 42.46 g/L ve

%72.12 verim ile SHCF'de elde edilirken, 53.24 g/L etanol ve %75.35 verim SSCF'de elde edilmiştir (Yu vd., 2017).

Şeker kamışı küspesinin, 0.29 M NaOH ve %0.78 (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile ön işleme tabi tutulduğu bir çalışmada, selülozik fraksiyonun %95.4 oranında kullanımı sağlanmıştır. Hidrolizde selülaz enzimi kullanılmış, ardından *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 ile fermentasyon yapılmıştır. Sonuçta 31.50 g/L biyoetanol üretilmiştir (Hilares vd., 2018).

Okalıptusun 150 °C'de alkali ekstrüzyon ön işlemi, biyoetanol üretiminde kullanılmak üzere, enzimatik hidroliz yoluyla en yüksek glukoz ve ksilan dönüşümünün elde edilmesini sağlanmıştır. Sırasıyla %40 ve %70'e yakın verim elde edilmiştir (Duque vd., 2018).

Şeker kamışı küspesinin 140°C'de 1 saat boyunca %5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisiyle ön işleme tutulması ve hidrolizi sonrasında %97.6 glukoz elde edilmiştir. Ardından, 37°C' de 72 saatlik fermentasyon sonunda 7.27 g/L biyoetanol üretilmiştir (Nosratpour vd., 2018).

Zeytin ağacının budama atıkları, üzüm bağının budama atıkları ve badem kabuklarından etanol üretimi araştırılmıştır. Atık biyokütle, 30 dakika süreyle %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi içinde bekletilmiş ve ardından buhar patlaması reaktörüne yüklenmiştir. Ön işlem için karışımlar, 10 dakika boyunca 195°C'de buharla ısıtılmıştır. Daha sonra biyokütle, hidroliz ve fermentasyon için bir selüloolitik enzim kokteyli Cellic CTec2 ile hidroliz edilmiştir. Fermentasyonda endüstriyel *Saccharomyces cerevisiae* "Ethanol Red" suşu ve SSF yöntemi kullanılmıştır. Ulaşılan en yüksek biyoetanol konsantrasyonları badem kabukları için 47.8 g/L, zeytin ağacının budama atıkları için 41.1 g/L ve üzüm bağının budama atıkları için 21.4 g/L olmuştur (Nitsos vd., 2018).

Başka bir çalışmada da zeytin ağacı biyokütlesine asidik ön işlem uygulanarak etanol üretimi araştırılmıştır. Etanol üretiminde %0.89 sülfürik asit içeren ortamda ve 150 g/L başlangıç biyokütlesinde en çok verim elde edildiği tespit edilmiştir. Fermentasyonda *S.*

*cerevisiae*, rekombinant *E.coli* MM160 kullanılmıştır. Çalışma sonunda zeytin ağacı biyokütlesinden 14.4 g/L etanol üretilmiştir (Martínez-Patiño vd., 2018).

Yer elması saplarının kullanıldığı çalışmada, biyokütle %5 nitrik asitle muamale edilmiş, ardından selülazlar,  $\beta$ -glukosidazlar ve hemiselülazların bir karışımı ile enzimatik hidroliz aşaması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra *Saccharomyces cerevisiae* suşları ile fermentasyon yapılmıştır. Biyokütlenin katı kısmı olmadan üretilen biyoetanol konsantrasyonu, katı kısmın (0.5 g/L) varlığından 3 kat daha fazla olarak elde edilmiştir (1.5 g/L). Bu çalışma sonucunda toplam 9.5 g/L etanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Dziekońska-Kubczak vd., 2018).

Başka bir çalışmada pamuk sapı organosolv ve hidrotermal proseslerde ön işleme tabi tutulup, ardından selülaz kullanılarak hidrolize uğratılmıştır. *S. cerevisiae*'nin kullanıldığı çalışmada 47.0 g/L biyoetanol elde edilmiştir (Dimos vd., 2019).

Buğday ve çavdar kullanılarak mikrodalga ve seyreltik asit ön işleminin etkinliğini, salınan şeker konsantrasyonu, fermentasyon inhibitörlerinin oluşumu ve uzaklaştırılması ve fermentasyon verimliliği araştırılmıştır. *S. cerevisiae* fermentasyon basamağında kullanılmış olup, 20 g/L etanol elde edilmiştir (Mikulski ve Kłosowski, 2020).

Buğday samanının *Saccharomyces cerevisiae* NX11424 ile fermentasyonu ile etanol üretimi araştırılmıştır. Fermentasyon için SHF yöntemi kullanılmıştır. Sonuçta 37 g/L etanol elde edilmiştir (Chen vd., 2021).

Sürdürülebilir olarak kabul edilen üçüncü nesil hammadde olan algal biyokütleden elde edilen biyoetanol, dünya çapında ilgi görmektedir (Hebbale ve Ramachandra, 2022). Bunun başlıca nedeni alglerin herhangi bir karasal bitkiye kıyasla daha yüksek fotosentez ve hızlı büyüme oranına sahip olması (Dutta vd., 2014), makroalg yetiştiriciliğinin tarımsal arazi kullanımına engel olmaması ve tatlı su gerektirmemesidir (Tan vd., 2020). Biyoetanol, karbonhidrat açısından zengin alg biyokütlesinden

üretilmektedir. Alg biyokütlesinden üretilen biyoetanol ile ulaşım sektöründe fosil yakıtlara (benzin) olan bağımlılık, benzinin yerini alması veya benzinle karıştırılmasında etkili olduğu için azaltılabilecektir (Jambo vd., 2016). Makroalglerin denizde büyük ölçekli yetiştirilmesi, makroalg bazlı biyorafineri için önemli miktarda tedarik sağlayabilir. Biyorafineriye entegre edilebilecek uygun makroalg türleri, *Laminaria japonica*, *Eucheuma cottonii* (*Kappaphycus alvarezii*), *Undaria pinnatifida* ve *Gracilaria verrucosa*'dır (Tan vd., 2020). Etanol üretiminde kullanılabilen mikro alg türleri ise, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Dunaliella* sp., *Chlamydomonas* sp.'dir (Özçimen vd., 2015). Ancak, algal biyokütleden başarılı biyoetanol üretimi için ele alınması gereken zorluklar şunlardır: Uygun biyokatalizörler ve optimal süreçlerle büyük maliyet düşüşlerinin sağlanması gerekir. Polisakkaritlerin fermente edilebilir şekerlere dönüştürme kabiliyetine sahip enzimlere sahip mikroorganizmaların taranması gerekmektedir. Büyük ölçekli üretimin ekonomik olması ve %100 verim elde etmek için makroalgal biyokütlerde bulunan tüm şekerlerin kullanılması gerekir. Ekonomik olarak uygulanabilir algal biyoetanol, ancak teknolojik yeniliklerle gerçeğe dönüştürülebilir. Biyoetanol üretmek için algleri çok büyük hacimlerde ve çok düşük maliyetle elde etmek, biyoteknoloji firmalarının üstlenmesi gereken en büyük zorluktur (Hebbale ve Ramachandra, 2022).

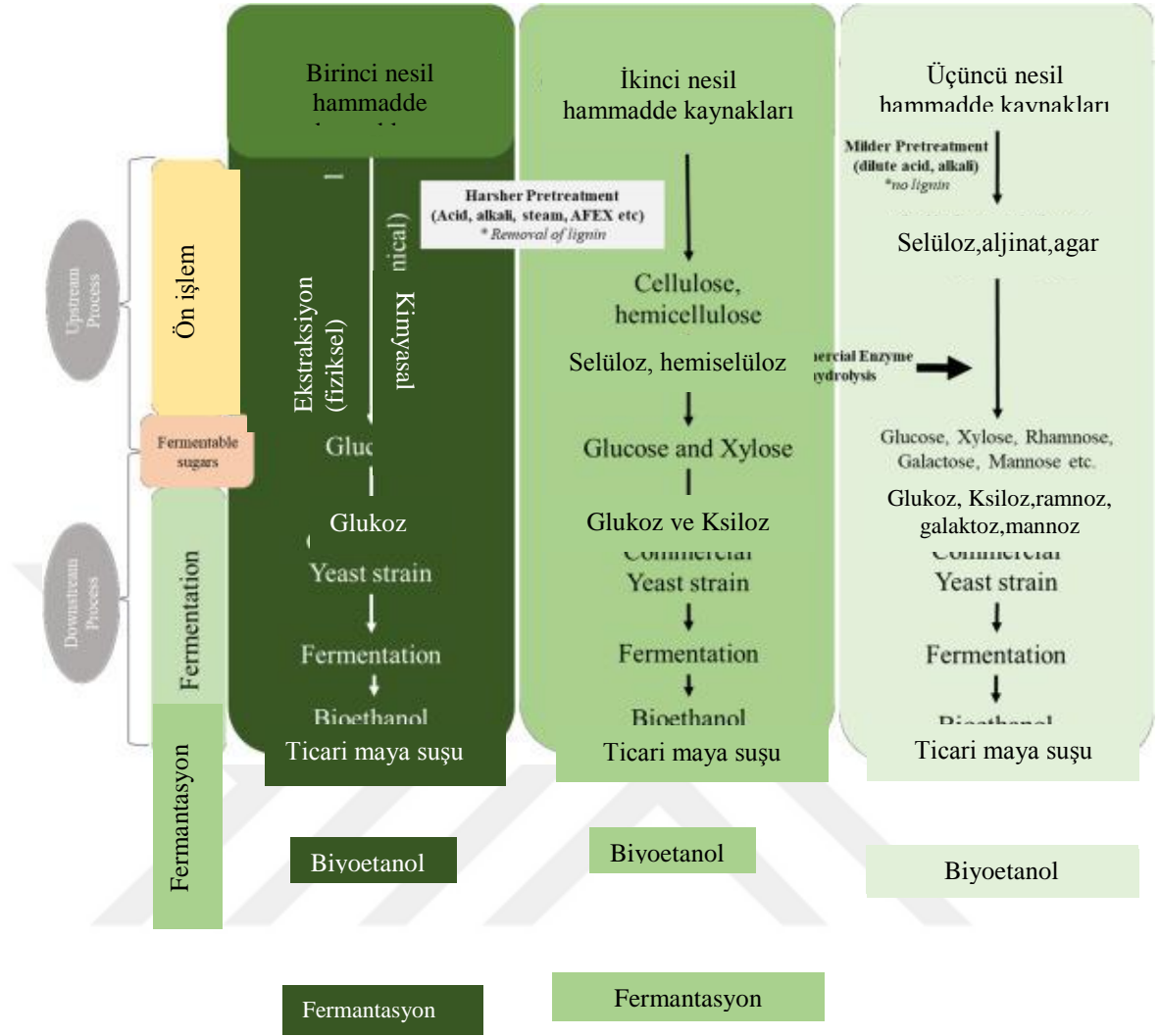
Denizlerdeki algler, biyoetanol üretimi için çok iyi bir potansiyele sahiptir. Yapılan bir araştırmada biyoetanol üretimi için *Enteromorpha* türleri kullanılmıştır. Bu algler içerdiği %70-72 arasında değişen oranlarda karbonhidrat bakımından oldukça zengindir. Algal biyokütlenin etanole dönüşümü için farklı ön işlemler, hidroliz ve fermantasyon işlemleri yürütülmüştür. Biyokütle, nitrik asit, buharla parlama ve seyreltik sülfürik asit gibi farklı ön işlemlere tabi tutulmuş, ardından polisakkaritlerin monomerlerine veya fermente edilebilir şekerlerine bozunması için kimyasal ve enzimatik olarak hidroliz yapılmıştır (Nahak vd., 2011).

*Chlorococcum* sp. ile yapılan bir çalışmada 15 g/L biyokütle, %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 30 dakika ön işleme tabi tutulmuştur. Araştırmacılar deneyler sonucunda en yüksek etanol konsantrasyonunu 7.20 g/L olarak elde etmiştir. Teorik etanol verimi ise yaklaşık %52 olarak bulunmuştur (Harun ve Danquah, 2011).

Deniz yosunlarından elde edilen yapısal karbonhidratların etanol üretiminde kullanılmasının araştırıldığı bir çalışmada *Undaria pinnatifida*, *Chlorella vulgaris* ve *Chlamydomonas reinhardtii* kullanılmıştır. Ön işlem seyreltik asit hidrolizi ve enzimatik işlem ile gerçekleştirilmiştir. Optimal koşulları bulmak için çeşitli sıcaklıklarda, asit konsantrasyonlarında, pH koşullarında ve sürelerde deneyler yapılmıştır. Biyoetanol üretimini test etmek için daha önce geliştirilmiş etanolik *E. coli* W3110 suşu kullanılmış olup, maksimum biyoetanol verimi, 0.4 g etanol/g biyokütle olarak belirlenmiştir (S. Lee vd., 2011).

Miranda vd. yaptıkları çalışmada *Scenedesmus obliquus* 'un biyokütle olarak kullanılarak etanol üretimini araştırmıştır. Biyokütle fiziksel ve fizikokimyasal ön işlemlerden geçirilmiştir. Deney sonuçları, kuru *Scenedesmus obliquus* biyokütlesinin 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 120 °C'de 30 dakika muamelesi sonucu şekerlerin %96.5'inin ekstrakte edildiğini göstermiştir (Miranda vd., 2012).

Hossain vd. *Spirulina* mikroalgiyle etanol üretim çalışması gerçekleştirmiştir. Biyokütlenin ön işleminde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Hidrolizattan ortalama 15.2 g/L indirgeyici şeker ekstrakte edildiği bildirilmiş olup, fermentasyonda *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Böylelikle mikroalgin kullanılabilir karbonhidratlara sahip olduğu gösterilmiştir. Elde edilen etanol yüzdesinin ortalama değeri numuneler arasında yüzde 0.85-1.0 arasında değişmektedir (Hossain vd., 2015).



Şekil 2.1 Farklı nesillerde biyoetanol üretim süreci (Hebbale ve Ramachandra, 2022)

Dördüncü nesil biyoyakıt üretimini artırmak için genetiği değiştirilmiş algler kullanılmaktadır. Genetiği değiştirilmiş alglerle üretilen biyoyakıt, fosil yakıtlara bir alternatif olmasına rağmen, potansiyel çevresel ve sağlıkla ilgili riskler devam etmektedir. Algal biyoyakıt, yüksek enerji içeriği, düşük emisyon ve kirletici olmayan doğası nedeniyle fosil yakıtlar için umut verici bir alternatiftir (Abdullah vd., 2019). Son yıllarda, üretim maliyetlerini optimize etmek için alg türlerinin genetik ve metabolik mühendisliğinde ilerleme sağlanmıştır. Ek olarak, biyoyakıt elde etmek için algal biyokütle üretimi ve biyokütle işleme teknikleri açısından da birçok teknik yön iyileştirilmiştir (Shuba ve Kifle, 2018). Bununla birlikte, düşük verim ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle alg biyoyakıtının üretimi ekonomik olarak uygun değildir (Abdullah vd., 2019).

Farklı biyoetanol üretim nesillerinin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4 Farklı biyoetanol üretim nesillerinin avantaj ve dezavantajları (Dutta vd., 2014).

<b>Nesil</b>	<b>Avantaj</b>	<b>Dezavantaj</b>
Birinci	Sera gazı salınımını azaltır. Düşük maliyetli dönüşüm teknolojisi kullanılır.	Düşük verim Gıda ürünü yetiştirilmesi için gerekli arazilerle rekabet ve gıda krizine yol açar.
İkinci	Sera gazı salınımını azaltır.  Gıda atıkları hammadde olarak kullanılır.  Gıda mahsulü ile rekabeti yoktur.  Ekilebilir olmayan arazilerin kullanılır.	Biyokütlenin yakıtı maliyet etkin bir şekilde dönüştürülmesi için lignoselülozik hammaddenin maliyetli ön işleme tabi tutulması gerekmektedir.
Üçüncü	Alg yetiştirilmesi kolaydır. Yüksek büyüme hızına sahiptir.  Gıda mahsulü ile rekabeti yoktur. Atık sularda ya da deniz suyunda yetiştirilebilir.	Açık havuz sisteminde alg yetiştiriciliği (karıştırma, filtrasyon, santrifüjleme vb.) için daha fazla enerji tüketilir.  Algin düşük lipid içeriğine sahip olması problemdir.  Açık havuz sisteminde kontaminasyon sorunu olabilir.  Foto-biyoreaktör yüksek maliyetlidir.
Dördüncü	Yüksek verim ve yüksek üretim hızına sahiptir.	İlk yatırımın yüksek maliyetlidir ve bu nesil üretim henüz araştırma aşamasındadır.

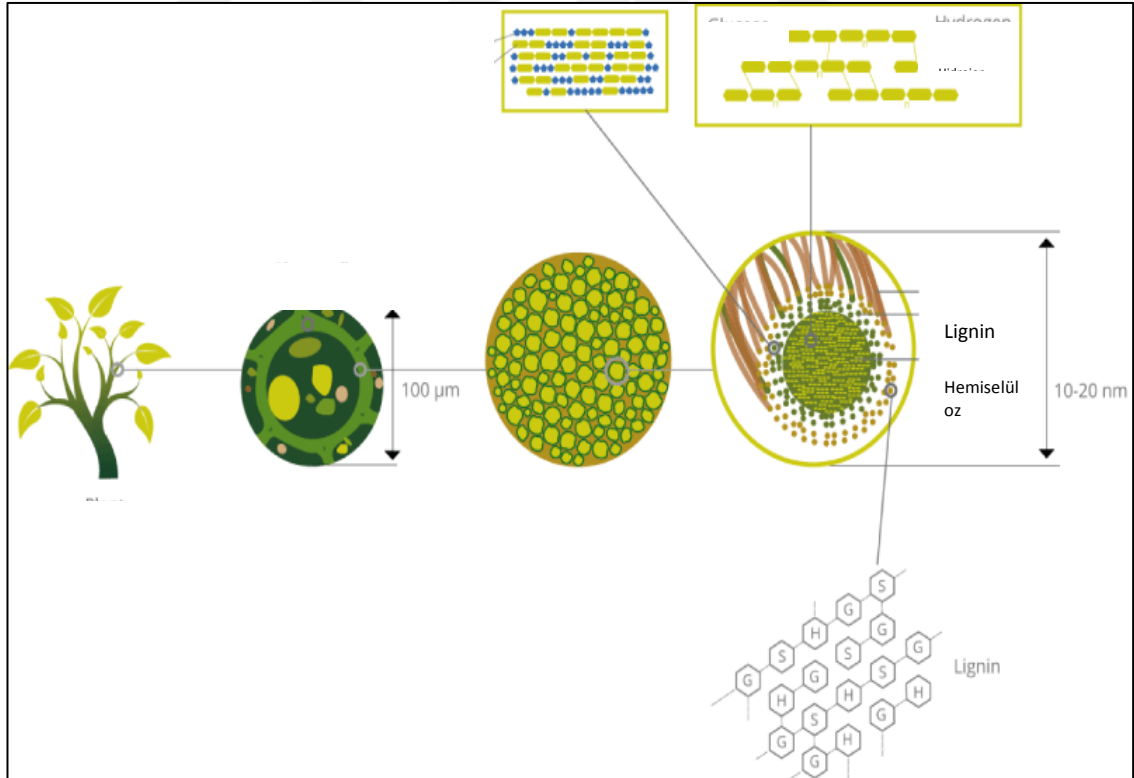
## 2.6 Lignoselülozik Biyokütlenin Özellikleri ve Etanol Üretim Basamakları

Lignoselülozik biyokütle, bol, yenilenebilir ve ucuz enerji kaynakları olan ormancılık, tarım, tarımsal sanayi ve gıda atıklarından oluşmaktadır (Maitan-Alfenas vd., 2015). Polisakkaritler (selüloz, hemiselüloz) ve lignin lignoselülozun başlıca bileşenleridir

(Hassan vd., 2018). Polimerik bileşenlerin yanı sıra, klorofil, reçineler ve tapenoidler de küçük miktarlardaki bileşenler olarak yer almaktadır (Halidar ve Purkait, 2021) Polisakkaritler şeker polimerleri olmaları nedeniyle potansiyel bir fermente edilebilir şeker kaynağıdır. Genel olarak, tahıl atıkları (örneğin pirinç, buğday samanı, mısır küspesi ve şeker kamışı küspesi) büyük miktarda lignoselüloz içerirken, çimen, meyve ve sebze atıkları daha az lignoselülozik içeriğe sahiptir (Hassan vd., 2018). Bu ana bileşenlerin içerikleri bitki tür ve çeşitlerine, iklim ve toprak koşullarına ve gübreleme uygulamalarına bağlı olarak değişse de mısır unu, buğday ve pirinç samanı gibi tarımsal artıklar %30-40 selüloz, %20-30 oranında hemiselüloz ve %10-20 lignin içermektedir (Zabed vd., 2016). Karmaşık bir karbonhidrat karışımı olan lignoselüloz, degradasyona karşı dirençli olması nedeniyle etanol üretimi için, etkili bir ön işlem ve hidroliz gerektirmektedir (Bušić vd., 2018; Liu vd., 2019).

Selüloz, bitki hücre duvarlarının birincil yapısal bileşeni olup, biyolojik bozulmaya karşı dirençlidir (Wang vd., 2012). Selüloz,  $\beta \rightarrow 1, 4$ -glikozidik bağlarla birbirine bağlanan doğrusal, dallanmamış bir D-glikoz homopolimeridir (Zhao vd., 2012). Bu lineer polimerin temel yapı taşı, bir glukoz-glukoz dimeri olan sellobiyozdur (Speight, 2011). Glukozdan, selüloz sentaz kompleksi tarafından sitoplazma içinde sentezlenen selüloz, zar boyunca taşınır. Bu yapı daha sonra, birincil hücre duvarlarının büyük bir kısmı olan hemiselülozlardan ve ligninden oluşan matris içine gömülmek üzere amorf bir yapı olarak gelişir (Verbančić vd., 2018). Bitki hücrelerinin büyümesi yavaşladığında veya durduğunda, plazma zarları ve birincil hücre duvarları arasında, ksilem liflerine daha fazla kristalin selüloz mikrofibrilleri dahil edilerek, ikincil hücre duvarları geliştirilir (Kumar vd., 2016). Selülozun yapısındaki hidrojen bağları stabilizasyonu sağlamada görevlidir. Bu bağlar kristal bir matris yapısı meydana getirmektedir. Bu bağların çok olması ve çeşitli hidroksil grupları arasındaki çapraz bağlar oluşması, selülozun mikrofibriller oluşturmasına neden olmaktadır. Selülozun bu özel yapısı onu suda çözünmeye ve depolimerizasyona karşı dirençli kılmaktadır (Mosier vd., 2005). Ancak, sakkarifikasyon olarak da bilinen selülozun hidrolizi sonucunda ise glukoz monomerleri üretilmektedir (Speight, 2011).

Selülozla karşılaştırıldığında, hemiselüloz, birkaç monomerin kısa, doğrusal ve oldukça dallı zincirlerinden oluşan bir heteropolimerdir. Hemiselülozdaki başlıca monomerler arasında heksozlar ( $\beta$ -D-glukoz,  $\alpha$ -D-galaktoz ve  $\beta$ -D-mannoz) ve pentozlar ( $\beta$ -D-ksiloz ve  $\alpha$ -L-arabinoz) bulunur (Zabed vd., 2016). Hemiselüloz fraksiyonunda monosakkaritler dışında üronik asit adı verilen şeker asitleri de bulunmaktadır (Peng vd., 2012). Hemiselülozlar ve selüloz arasındaki yapısal benzerlik sayesinde, hemiselülozlar ve selüloz mikrofibrilleri arasında güçlü bir kovalent olmayan bağ ile hemiselülozların gömülmesi ve selüloz ve lignin ile iç içe geçmesi sağlanmaktadır. Bu durum, bitki hücre duvarları için güç ve dayanıklılık sağlamaktadır. Ancak hemiselülozlar doğada yan zincirleri aracılığıyla dallanır ve selülozun lineer ve kristal yapısından farklı amorf bir yapı oluşturur. Bu nedenle, hemiselülozlar, lignoselülozik biyokütlenin ön işleme sırasında kolayca monomer şekerlere hidrolize edilebilmektedir. Ancak, hemiselülozların hidrolizinin önemli bir yan ürünü olan asetik asit, mikrobiyal büyümeyi ve etanol fermantasyonunu engellemektedir (Liu vd., 2019).



Şekil 2.2 Lignoselülozun yapısı (Streffer, 2014)

Lignin, biyokütlenin, özellikle odunsu türlerin hücre duvarlarında yüksek oranda bulunan, dallanmış, mononükleer aromatik polimerler olup, bir lignoselülozik kompleks oluşturmak için bitişik selüloz liflerine bağlanmaktadır (Klass, 1998). Lignin, heterojen bir polimer olarak kabul edilir (Boerjan vd., 2003). Ayrıca lignin, fenil propiyonik alkolün üç ana fenolik bileşen olan p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolden oluşmaktadır. Lignin, bu üç bileşenin polimerizasyonu ile sentezlenir ve oranları, farklı bitki dokuları ve hücre duvarı katmanları arasında değişmektedir (Streffer, 2014). Yumuşak ağaç kabukları en yüksek lignin seviyesine sahip olup (%30-60), bunu sert ağaç kabukları (%30-55) izlemektedir. Çimenler ve tarımsal kalıntılar ise en düşük lignin seviyesine (sırasıyla %10-30 ve %3-15) sahiptir (Limayem ve Ricke, 2012). Lignin, mikrobiyal fermantasyon yoluyla etanol üretimi için hammadde olarak kullanılmayan şeker bazlı olmayan bir polimerdir (Liu vd., 2019). Bunun nedeni ise, üç boyutlu polimer molekülün yapısının, enzimlerin faaliyetini engellemede etkili olmasıdır (Robak ve Balcerek, 2018). Ayrıca bu nedenle ligninin, selülozun hidrolizini de azalttığı düşünülmektedir (Esteghlalian vd., 2001).

Lignoselülozik biyokütleden etanol üretimi üç ana adımdan oluşmaktadır. Bu adımlar ön işlem, hidroliz ve fermantasyon olarak sıralanabilir (Maitan-Alfenas vd., 2015).

Biyokütleye ön işlem uygulanması, biyokütle yapısını değiştirerek karbonhidratların fermente edilebilir şekerlere hidrolizinde kullanılacak enzimlerin daha iyi çalışabilmelerini sağlamada gereklidir (Njoku vd., 2012). Ön işlem, üretim maliyetinde önemli bir yere sahip olup, çok çeşitli ön işlem yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler tipik olarak kullanılan biyokütle ve enzimlere göre değişiklik gösterebilmektedir (Xu ve Huang, 2014).

İkinci basamak olan hidroliz, polisakkaritlerin monomerik şekerlere dönüştürülmesi sürecidir (Casey vd., 2013). Hidroliz işlemi, uzun karbonhidrat zincirini (selüloz veya nişastadan) su molekülü ilavesiyle ayırır ve genellikle enzim veya asit tarafından katalize edilmektedir. Büyük ölçüde selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşan lignoselülozik maddeler, enzimatik olarak parçalanabilmektedir. Selüloz, hidrojen bağlarının oluşturduğu belirli bir kristallik derecesine sahiptir. Bu kristallik, hidroliz

sürecini etkilemektedir. Kristallik yüksek olduğunda hidroliz hızı yavaşlamakta ve enzim adsorpsiyonu daha düşük seviyelerde gerçekleşmektedir (Yang vd., 2011). Selülaz, selüloz bileşimini parçalayan bir enzimdir. Selülazlar, endoglukanaz, ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukosidaz olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Aditiya vd., 2016).

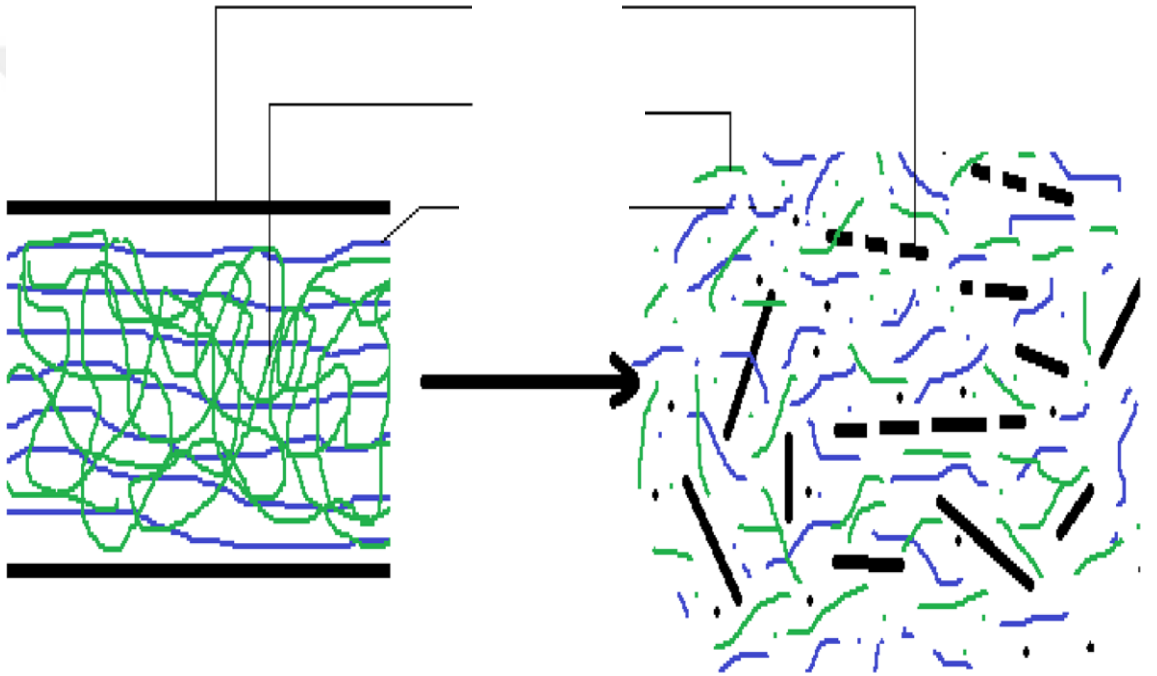
Selülozdan farklı olarak, hemiselülozun daha amorf özelliğe sahip olması hidrolize edilmesini kolaylaştırmaktadır (Aditiya vd., 2016). Hemiselülazlar, galaktanların, ksilanların ve mannanların parçalanması ve hidrolizinde yer almakta olup, endoksilanaz,  $\beta$ -D ksilosidaz gibi enzimlerden oluşmaktadır (Meena vd., 2018).

Ligninin varlığı ise hidrolizin gerçekleşmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hidrolizin etkinliğini en üst düzeye çıkarmak için ligninin uzaklaştırılması gerekmektedir (Yang ve Wyman, 2006). Ligninin parçalanmasında rol oynayan enzimler peroksidaz ve lakkaz enzimleri şeklinde iki gruba ayrılmaktadır (Sindhu vd., 2016). Mikroorganizmalar, yalnızca biyokütlenin karmaşık karbonhidratından türetilen daha basit şeker formunu kullanabildiğinden hidroliz işlemine ihtiyaç duyulmaktadır (Mosier vd., 2002; Ferreira vd., 2009).

Fermantasyon, biyoetanol üretiminde kritik bir süreçtir (Aditiya vd., 2016). Hidroliz sonucu açığa çıkan fermente edilebilir şekerler, çeşitli mikroorganizmalar tarafından etanol ve diğer ürünlere fermente edilebilmektedir (Casey vd., 2013). Örneğin, glukozu fermente eden *Zymomonas mobilis* gibi bir bakteri türü, "gıda" olarak glukoz açısından zengin hidrolizatı tercih eder ve ürün olarak etanolü ortama bırakır. Teorik olarak, her bir kilogram glukoz ve ksiloz, 0,51 kg etanol ile 0,49 kg karbondioksit üretebilmektedir (Hamelinck vd., 2005).

## 2.7 Lignoselülozik Biyokütlerde Kullanılan Ön İşlem Yöntemleri

Ön işlem yöntemleri, fiziksel, kimyasal, biyolojik ve/veya bunların kombinasyonundan oluşmaktadır. Ön işlemin amacı, selüloz, hemiselüloz ve lignini parçalamaktır. Bu polimerlerin parçalanmasıyla, enzimatik hidroliz ve diğer biyorafineri prosesleri için kolaylıkla erişilebilen daha küçük parçalar elde edilmektedir (Şekil 2.4) Bunun sonucunda ise çeşitli katma değerli ürünler daha fazla verimle üretilmektedir (Sharma vd., 2019).



Şekil 2.3 Ön işleme tabi tutulan lignoselülozik biyokütlenin durumu (Sharma vd., 2019)

### 2.7.1 Fiziksel ve fizikokimyasal ön işlemler

Fiziksel ön işlem yöntemleri olan, kırma, parçalama, doğrama, öğütme, ultrasonik ön işlem, mikrodalga ışıması ile biyokütle küçültülmektedir. Bu işlemlerle hidroliz için partikül boyutunu azaltmak ve yüzey alanını artırarak biyokütlenin mekanik olarak parçalanması amaçlanmaktadır (Aditiya vd., 2016; Sharma vd., 2019). Yapılan

karşılaştırma çalışmaları parçalanmış biyokütleden, daha büyük olan biyokütleye göre 1.5 kat daha fazla ürün elde edildiğini göstermiştir (Zeng vd., 2007).

Farklı öğütme işlemleri (bilyeli öğütme, iki silindirli öğütme, çekiçli öğütme, kolloid öğütme ve vibro enerjili öğütme) lignoselülozik malzemelerin enzimatik hidrolizini artırmak için kullanılmaktadır (Taherzadeh ve Karimi, 2008). Öğütme, parçalama ve kırma gibi işlemler sonucunda hammadde boyutunun 10-30 mm ile 0.2-2 mm arasında değiştiği bilinmektedir (Harmsen vd., 2010). Öğütmenin türü ve süresi ile, biyokütlenin türü, spesifik yüzey alanındaki artışı, selüloz kristalliğinde azalmayı belirlemektedir (Taherzadeh ve Karimi, 2008). Öğütme tekniklerine bağlı olarak, hidroliz veriminin %5-25 oranında arttığı belirlenmiştir (Hendriks ve Zeeman, 2009). Fiziksel ön işlemlerde yaşanan en büyük zorluk, fazla enerji tüketimine sebep olmasıdır. Bu işlemlerin, tüm biyoetanol üretiminde toplam enerji tüketiminin üçte birini kullandığı bildirilmiştir (Aden vd., 2002). Öğütme işleminde gerekli olan enerji tüketiminin azaltılması için ıslak disk değirmeni ile öğütme işlemi geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemde fermentasyon için gerekli olan glukoz ve ksiloz gibi bazı şeker konsantrasyonlarında diğer öğütme işlemlerine göre azalmalar olabildiği tespit edilmiştir (Harmsen vd., 2010). Öğütmenin yüksek enerji gereksinimi ve enerji fiyatlarının sürekli artışı nedeniyle, bu sürecin ekonomik olarak uygulanabilir olmaması muhtemeldir (Hendriks ve Zeeman, 2009).

Ekstrüzyon, hammaddelerin kesmeli karıştırıcıda ısıtma işlemine (>300 °C) tabi tutulduğu daha gelişmiş bir mekanik parçalama yöntemidir (Zhan vd., 2006; Kumar ve Sharma, 2017). Ekstrüzyonda, maddeler, ekstrüderden geçiş sırasında fiziksel ve kimyasal değişikliklerle sonuçlanan ısıtma, karıştırma ve kesme işlemlerine tabi tutulmaktadır (Alvira vd., 2010). Böylece enzimin karbonhidratlara daha iyi ulaşması sağlanmaktadır (Zhan vd., 2006). Ayrıca diğer ön işlem yöntemleri ile birleştirildiğinde, mekanik ekstrüzyon daha iyi performans gösterir ve indirgeyici şekerlerin toplam verimini artırabilmektedir (Kumar ve Sharma, 2017).

Mikrodalga bazlı ön işlem, hem termal hem de termal olmayan etkiler söz konusu olduğundan, fizikokimyasal bir süreç olarak kabul edilmektedir (Keshwani, 2009).

Mikrodalga ışıması, bir nesnenin iç ısınmasına neden olmak için elektromanyetik alan uygulaması yapmaktadır. Biyoetanol üretiminde, bu ön işlem, önceden işlenmiş biyokütlenin yapısal bozulması amacıyla uygulanmaktadır. Lignoselülozik biyokütleyle uygulanan mikrodalga, madde dahili olarak ısıtılana kadar yapıyı titreterek polar bağları etkilemektedir. İşlem sonucunda, karmaşık lignoselülozik yapı kırılarak enzimatik müdahaleye uygun hale getirilmektedir (Ma vd., 2009). Mikrodalga ışıması, kolay uygulanan bir işlem olması, düşük enerji gereksinimi, kısa sürede yüksek ısıtma kapasitesi, minimum inhibitör üretimi ve selüloz fraksiyonunun yapısal organizasyonunu bozması nedeniyle sık kullanılan bir yöntemdir (Kumar ve Sharma, 2017).

Buhar patlaması, lignoselülozik biyokütle için en yaygın olarak kullanılan fiziko-kimyasal ön arıtmadır. Biyokütlenin saniyeler ile birkaç dakika arasında değişen bir süre boyunca basınçlı buhara tabi tutulduğu ve ardından aniden basıncının düşürüldüğü hidrotermal bir ön işlemdir. İşlem sırasında, hemiselülozun çoğu hidrolize edilmektedir. Böylece enzimlerden daha etkili şekilde çalışmasına katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte, hemiselülozun uzaklaştırılması nedeniyle lignin içeriği arttığından, buhar patlaması işlemi delignifikasyon ile sonuçlanmamaktadır. Örneğin, buharla patlatılmış Douglas köknarının lignin içeriği, işlenmemiş Douglas köknarından daha fazladır (Pan vd., 2005).

Bu ön işlemden, hemiselülozda bulunan asetil gruplarının hidrolizi (otohidroliz) nedeniyle mekanik kuvvetleri ve kimyasal etkileri birleşmektedir. Otohidroliz, yüksek sıcaklık, asetil gruplarından asetik asit oluşumunu teşvik ettiğinde gerçekleşir; ayrıca su, yüksek sıcaklıklarda asit görevi de görebilmektedir. Mekanik etkilere ise, basıncın aniden düşmesi ve patlayıcı dekompresyon nedeniyle liflerin ayrılması neden olmaktadır (Alvira vd., 2010). Parçacık boyutu, sıcaklık, uygulanma süresi, nem gibi bazı parametreler bu yöntemin etkinliğini etkilemektedir. Düşük bütçeli bir yöntem olan buhar patlaması, sert odunsu materyal ve tarımsal atıklarda etkiliyken yumuşak odunsu materyallerde etkin çalışmamaktadır. Ek olarak hemiselüloz kaynaklı, asetik asit gibi fermentasyon inhibitörlerinin oluşumu da gözlenmektedir. Bu yöntem amonyak ile de beraber kullanılarak amonyaklı buhar patlaması (AFEX) olarak da isimlendirilmektedir.

Yüksek sıcaklık ve basınç altında sıvı amonyağa (1-2 kg sıvı amonyak/kg hammadde) maruz bırakılan hammaddede selüloz, hemiselüloz ya da lignin tamamen bozunmamakla birlikte yapısı değişmekte ve su tutma kapasitesi ile degradasyonu artmaktadır (Kumar vd., 2009). AFEX ön işlemi, odunsu biyokütle ve diğer yüksek ligninli hammaddeler üzerinde sınırlı etkinlik gösterirken, tarımsal kalıntılar ve otsu hammaddeler üzerinde daha etkilidir (Wyman vd., 2005; Kumar ve Sharma, 2017).

Likit sıcak su ön işlemi herhangi bir katalizör veya kimyasal kullanmayan bir hidrotermal ön işlemdir. Suyu yüksek sıcaklıklarda (160-240 °C) sıvı halde tutmak ve lignoselülozun yapısında değişikliklere neden olmak için basınç uygulanmaktadır. Bu işlemin amacı, esas olarak hemiselülozun yapısını bozmak, selülozu daha erişilebilir hale getirmek ve inhibitör oluşumunu önlemektir. Genel olarak, sıvı sıcak su ön işlemi, maliyet tasarrufu potansiyeli, katalizör gereksinimi olmaması ve düşük korozyon potansiyeli nedeniyle ilgi çekicidir. Aynı zamanda, daha yüksek su girdisi nedeniyle çözünür hale getirilmiş hemiselüloz ve lignin ürünlerinin daha düşük konsantrasyonda mevcut olması ve daha sonra bozunmadan kaynaklı ürünlerin konsantrasyonunun az olması gibi bir avantaja sahiptir. Buhar patlaması ile karşılaştırıldığında, daha düşük inhibitör oluşmaktadır. Ancak, işlemde su ihtiyacı ve enerji gereksinimi daha yüksektir (Alvira vd., 2010).

Karbondioksit patlaması da lignoselülozik biyokütlenin ön işlemi için kullanılmaktadır. Bu yöntem, karbondioksitin bir süper kritik akışkan olarak kullanılmasına dayanmaktadır. Süper kritik akışkan ifadesi, gaz halinde olan ancak kritik noktasının üzerindeki sıcaklıklarda sıvı benzeri bir yoğunluğa sıkıştırılan bir akışkan anlamı taşımaktadır. Süper kritik ön işlem koşulları, substrat kullanılabilirliğini artırarak ligninin etkili bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Alvira vd., 2010).

Son yıllarda uygulanan ön işlemler arasında ultrason teknolojisi de yer almaktadır. Bu ön işlemde, 20 kHz ila 1 MHz aralığında ultrason, karmaşık lignoselülozik yapıyı ağrı kıran oksitleyici radikallerin üretilmesi için biyokütle işleminde kullanılmaktadır (Luo vd., 2014). Ultrason teknolojisi, daha az reaksiyon süresi ve biyokütle dönüşüm sürecindeki etkinliği nedeniyle diğer yöntemler arasında önde gelen ön işlem

uygulamalarından biri olarak ortaya çıkmıştır. Ultrason uygulamasının temel amacı, hemiselüloz ve lignin arasındaki eter bağlarının kırılmasıyla lignoselülozik biyokütlenin bütünlüğünü bozmaktır (Haldar ve Purkait, 2021). Bu nedenle, istenen ön işlem hedeflerini karşılamak için sonikasyonun gücü ve süresi, biyokütlenin özelliklerine göre optimize edilmelidir (Kumar ve Sharma, 2017).

Oksidatif ön işlem, fizikokimyasal ön işlem türlerinden olup, hidrojen peroksit ve ozon gibi oksitleyici reaktiflerle uygulanmaktadır. Hidrojen peroksit, hidrolizi sonucu lignin bozunması ve hidroksil radikallerinin oluşumunu sağladığından yaygın olarak kullanılan bir oksidandır (Yan vd., 2020). Birçok durumda kullanılan oksitleyici seçici değildir ve bu nedenle hemiselüloz ve selüloz kayıpları meydana gelebilir. Lignin oksitlendiğinden ve çözümlenir aromatik bileşikler oluştuğundan, inhibitörlerin oluşumunda yüksek bir risk mevcuttur (Hendriks ve Zeeman, 2009).

Darbeli elektrik alanı ön işlemi, hücre zarında gözenekler oluşturarak biyokütlerde bulunan selülozun açığa çıkarılarak selülozu meydana getiren şekerleri parçalayacak maddelerin girişine izin vermektedir. Bu ön işlemde, biyokütle kısa süreler için (nano ila milisaniye) 5.0–20.0 kV/cm arasında ani bir yüksek voltaj patlamasına maruz bırakılmaktadır. Bu işlemin avantajı, çok kısa darbe süresi (100  $\mu$ s) nedeniyle düşük enerji gereksinimi ve arıtmanın ortam koşullarında gerçekleştirilebilmesidir (Kumar ve Sharma, 2017).

### **2.7.2 Kimyasal ön işlemler**

Lignoselülozik yapıdaki bağların bozulması, selüloz ve hemiselülozun ortaya çıkarılması için, alkali, asit, organosolv, ozonoliz ve iyonik sıvı kullanımı gibi kimyasal ön işlemler uygulanmaktadır.

Asit ön işlemlerinin temel amacı, biyokütlenin hemiselülozik yapısının bozulmasını sağlamak ve selülozu enzimler için daha erişilebilir hale getirmektir. Bu tip ön işlemler, konsantre veya seyreltilmiş asit ile gerçekleştirilebilir (Alvira vd., 2010).

Kimyasal ön işlem, kimyasal maddelerin daha kolay elde edilebilmesi, depolama problemi olmaması ve uygun depolama ile dayanıklılıklarının fazla olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Kimyasal maddeler lignoselülozik duvarları ve nişastanın kompleks karbonhidrat zincirini, daha az enerji gerektiren doğrudan kimyasal reaksiyon yoluyla bozmaktadır (Mosier vd., 2005). Ancak konsantre asit kullanımı, furfural, 5-hidroksimetilfurfural, fenolik asitler ve aldehitler gibi inhibe edici bileşiklerin oluşumu nedeniyle etanol üretiminde pek tercih edilmemektedir. Ayrıca, konsantre asit ön işlemleri kullanıldığında oluşan korozyon sorunları önemli bir dezavantajdır (Alvira vd., 2010).

Seyreltik asit ön işlemi, endüstriyel uygulamalar için daha uygun bir yöntem olarak görünmektedir (Taherzadeh ve Karimi, 2008). Bu ön işlem, kovalent bağlar gibi bağları bozarak lignoselülozik direnci ölçüde azaltabilmektedir (Li vd., 2010).

Çeşitli biyokütlelerin ön işlemi için farklı asitler kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan asitlerden bazıları, sülfürik asit, hidroklorik asit, nitrik asit, fumarik asit, oksalik ve maleik asittir (Alvira vd., 2010; Kumar ve Sharma, 2017).

Ticari olarak en yaygın kullanılan asit seyreltik sülfürik asittir (Kumar ve Sharma, 2017). Sülfürik asit ön işlemi, hemiselülozların çözünmesine yol açarak, kovalent bağları, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri ile bağlanan lignoselülozik yapının bozunmasını sağlamaktadır (Li vd., 2010). Seyreltilmiş  $H_2SO_4$  ön işlemi, selüloz hidrolizini önemli ölçüde artırmaktadır. Seyreltik asitle selülozdan glukoz verimi neredeyse %100'e yükselmektedir (Mosier vd., 2005). Literatürde de sülfürik asitle muamelenin yapıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Pirinç kabuklarıyla yapılan bir çalışmada seyreltik  $H_2SO_4$  ön işlemi ve ticari enzimler kullanılarak pirinç kabuğundan %60 verimle fermente edilebilir şeker elde edilmiştir (Saha vd., 2005). Bermuda otu ve çavdar samanının %1.5 sülfürik asit ile ön muamelesi ve ardından enzimatik hidroliz sonucu, bermuda otu ve çavdar samanından sırasıyla %19.71 ve %22.93 indirgeyici şeker elde edilmiştir (Sun ve Cheng, 2005). Lu vd., 80, 100 ve  $120^{\circ}C$ 'de %2, %4 ve %6 sülfürik asit konsantrasyonları kullanarak mısır samanını ön işleme tabi tutmuştur. Mısır samanı ön muamelesi için optimum koşullar, %2.0  $H_2SO_4$  konsantrasyonu ve  $120^{\circ}C$ 'de

43 dakikalık bir reaksiyon süresi olarak hesaplanmıştır. %77'ye kadar ksiloz verimi elde edilirken, glukoz verimi %8.4 olarak tespit edilmiştir (Lu vd., 2007).

Zeytin ağacı biyokütlesinden seyreltik asit ön işleme tabi tutularak fermente edilebilir şekerlerin üretimi Cara vd. tarafından incelenmiştir. Ön işlem %0.2, %0.6, %1.0 ve %1.4 (w/w) sülfürik asit konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Hammaddedeki hemiselülozik şekerlerin maksimum %83'ü 170 °C'de ve %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda elde edilen ön hidrolizatta geri kazanılmıştır (Cara vd., 2008). Başka bir çalışmada enzim erişilebilirliğini arttırmak için pirinç samanı seyreltik sülfürik asit ile ön işleme tabi tutulmuştur. Optimum seyreltik asit %1.2 olarak tespit edilmiş ve pirinç samanı seyreltik asit ile muamele edildikten sonra 24 saatte glukoz yaklaşık %90 oranında geri kazanılmıştır (Kim vd., 2012).

*Eulaliopsis binata*'nın (Hindistan ve Çin'de yaygın olarak bulunan çok yıllık bir çimen) seyreltilmiş H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile optimum koşullarda ön işleme uğratılması sonucu, düşük seviyelerde inhibitör oluşumu ile %21.02 toplam şeker, %3.22 lignin ve %3.34 asetik asit ortaya çıkmıştır (Tang vd., 2013). Şeker pancarı küspesine %0.66 sülfürik asitle ön işlem uygulanan bir çalışmada, enzimatik hidroliz verimi %33'ten %93'e çıkmıştır. Ayrıca toplam indirgeyici şeker verimi %62'ye ulaşmıştır (Zheng vd., 2013). *Panicum virgatum*, L. bitkisi üzerinde seyreltik asit ön işleminin ksiloz ve glukoz konsantrasyonlarına etkisi incelenmiştir. Ön işlem sonucu ksiloz konsantrasyonunun maksimum 21.71 g/L'ye ulaştığı belirlenmiştir (Djioleu ve Carrier, 2016). Mısır samanının, seyreltik (%1) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 dakika boyunca 165°C'de ön işleme tabi tutulmasıyla %80 oranında monomerik ksiloz verimine ulaşılmıştır (Sievers vd., 2017). Şeker kamışı küspesinin seyreltik asit (%2 v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile hidrolizinin kinetik ve termodinamik özelliklerini araştırılmış ve maksimum ksiloz verimi 0.81g/g hemiselüloz olarak bulunmuştur (Tizazu ve Moholkar, 2018). Mısır sapının kullanıldığı başka bir çalışmada, mısır sapının %2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'le muamele edilmesi sonucu %75.68 oranında hemiselüloz degradasyonu gözlenmiştir (Jehadin vd., 2021).

Fumarik veya maleik asitler gibi organik asitler, etanol üretiminde selüloz hidrolizini artırmak için alternatifler olarak değerlendirilmektedir. Her iki asit, buğday samanından

hidroliz verimleri ve ön işlem sırasında oluşan inhibitör bileşiklerin oluşumu açısından sülfürik asit ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, 150 °C'de ve %20-30 (w/w) kuru buğday samanının ön işleminde organik asitlerin kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, maleik ve fumarik asit ön işlemlerinde sülfürik aside göre daha az miktarda furfural oluşmuştur (Kootstra vd., 2009).

Oksalik asit ise mayalar ve diğer mikroorganizmalar için sülfürik ve asetik asitlere göre daha az toksik olup, glikolizi engellememektedir. Mısır koçanlarının ön işlemi için oksalik asit kullanılan bir çalışmada, mısır koçanı 168°C'de 26 dakika ön işleme tabi tutulmuştur. Oksalik asit ile uygulanan ön işlemi sonucu toplam %13 şeker verimi elde edilmiştir. Ayrıca, daha az miktarda inhibitör üretildiği belirlenmiştir (J.-W. Lee vd., 2011).

Asitle muamelenin aksine, alkali ön muamele yöntemleri genel olarak oda sıcaklığında ve basıncında gerçekleştirilir. En yaygın olarak kullanılan alkali reaktifler, sodyum, potasyum, kalsiyum ve amonyum tuzlarının hidroksil türevleridir (Kumar ve Sharma, 2017). Bazı bazların lignoselülozik biyokütle üzerindeki etkisi, biyokütlenin lignin içeriğine bağlı olarak alkali ön işlemlerinin temelini oluşturmaktadır. Alkali ön işlemler kullanılan kimyasala göre iki gruba ayrılabilir: (1) sodyum veya kalsiyum hidroksit kullanan ön işlemler (2) amonyak kullanan ön işlemler. NaOH, lignoselülozik biyokütlenin ön işleminde yoğun olarak çalışılan en güçlü bazlardan biridir. Bu ön işlemler, selüloz sindirilebilirliğini arttırmakla birlikte, selüloz ve hemiselülozun asit ya da hidrotermal işlemlere göre daha az çözünürlüğünü sağlamaktadır. Bununla birlikte, alkali ön işlem, lignin çözünürlüğünde daha etkin bir rol oynamaktadır (Carvalho vd., 2008). Alkali ön işlemin etkinliği, lignoselülozik biyokütlenin özelliğine, kullanılan alkaliye ve reaksiyon koşullarına bağlıdır (Liu vd., 2019). Alkali ön işlemin önemli bir dezavantajı, alkalinin geri kazanılamaz tuzlara dönüştürülmesi ve/veya ön arıtma reaksiyonları sırasında tuzların biyokütleyle dahil edilmesidir. Bu durumda büyük miktarda tuzun arıtılması, alkali ön işlemini zorlaştıran bir konu haline almaktadır (Zheng vd., 2009). Ayrıca işlem sırasında üretilen önemli miktardaki tuzlar, mikrobiyal büyümeyi ve uygun şekilde uzaklaştırılmadıklarında etanol fermantasyonunu engellediği ve daha fazla atık su ürettiği için büyük bir problemdir. Bu problemler için

alternatif bir çözüm, sodyum hidroksit in amonyak ile değiştirilmesidir. Ancak amonyak, lignoselülozik biyokütlenin delignifikasyonunda daha az etkili olan zayıf bir bazdır (Liu vd., 2019). Bunlar dışında  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ile muamele de çalışılmıştır.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ile ön işlem sonucu, kristallik indeksini artıran lignin gibi amorf maddeler uzaklaştırılır (Alvira vd., 2010).  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ayrıca asetil gruplarını hemiselülozdan uzaklaştırır, enzimlerin engelini azaltır ve selüloz sindirilebilirliğini arttırır. Kireçle ön işlem, NaOH veya KOH ön işlemlerine kıyasla daha düşük maliyetli olup,  $\text{CO}_2$  ile reaksiyona sokularak hidrolizattan kolayca geri kazanılabilir (Mosier vd., 2005).

Ozonoliz, lignoselülozik bir biyokütle ön işlemi olarak geçmiş yıllarda kullanılmakta olup, son yıllarda verimliliği ve zorlayıcı olmayan çalışma koşulları nedeniyle tekrar yaygınlaşmaktadır. Ozon, karbonhidratlar yerine lignin ile reaksiyona girerek biyokütlenin bozulmasını ve delignifikasyonunda rol oynamaktadır. Dolayısıyla da enzimatik hidroliz yoluyla şeker salınımını sağlamaktadır. Ön işleme tabi tutulmuş biyokütleden elde edilen hidrolizat, başta etanol, metan ve hidrojen olmak üzere ikinci nesil yakıt üretimi için şeker kaynağı olarak kullanılmaktadır (Travaini vd., 2016). Ön işlem genellikle oda sıcaklığında ve normal basınçta gerçekleştirilerek ve sonraki hidroliz ve fermantasyonu etkileyebilecek engelleyici bileşiklerin oluşumuna yol açmamaktadır (Alvira vd., 2010). Kısa zincirli karboksilik asitler, üretilen başlıca inhibitör bileşikler olsa da, suyla yıkama ile uygun şekilde uzaklaştırılabilmektedir. Furfural ve HMF (5-hidroksimetilfurfural) gibi diğer ön işlemler sonucu ortaya çıkan en yaygın inhibitör bileşikler, ozonla ön işleme tabi tutulmuş hidrolizatlarda bulunmamaktadır. Ozonoliz, çeşitli lignoselülozik biyokütlelerde çok düşük karbonhidrat kayıpları ile yüksek delignifikasyon (~%80) ve toplam şeker salım verimi (~%75) sağlayan etkin bir ön işlemdir (Travaini vd., 2016).

Organosolvent işlemi, etanol, metanol, etilen glikol, aseton gibi sulu organik çözücülerin belirli sıcaklık ve basınç koşulları altında biyokütleyle eklenmesini içermektedir (Alriols vd., 2009). Lignini çözündürmek ve enzimatik hidroliz için uygun işlenmiş selüloz sağlamak için metanol, etanol, aseton, etilen glikol yanı sıra tetrahidrofurfuril alkol dahil çok sayıda organik veya sulu solvent karışımı kullanılmaktadır. Diğer kimyasal ön işlemlerle karşılaştırıldığında, organosolv işleminin

ana avantajı, yan ürün olarak nispeten saf ligninin geri kazanılmasıdır (Zhao vd., 2009). Genellikle bu işlem bir asit, baz veya tuz katalizörü varlığında gerçekleşir (Bajpai, 2016). Organosolv ön işlemindeki sıcaklık, ilgili biyokütle ve katalizörün tipine bağlıdır ve 200°C'ye kadar çıkabilir. Bu işlem esas olarak katma değerli bir ürün olan ligninin ekstraksiyonu için kullanılır. Lignin dışında, organosolv ön işleminde C5 ve C6 şekerlerinin selüloz fraksiyonu ve hemiselüloz şurubu da üretilir (Agbor vd., 2011).

### 2.7.3 Biyolojik ön işlemler

Biyolojik ön işlem düşük enerji gerektirmesi, kimyasal madde içermemesi, daha az kirlilik ve daha yüksek verim nedeniyle tercih edilmektedir. Doğada bulunan bakteri ve mantarlar, biyokütlenin verimli bir şekilde parçalanması için farklı lignoselüloolitik enzimler salgılayarak ve 5- ve 6- karbonlu şekerlerin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Sharma vd., 2019). Bu mikroorganizmalar, hücre dışına hidrolitik enzim (hidrolazlar gibi) ya da lignini depolimerize eden ligninolitik enzim salgılayarak degrade eder ya da değiştirirler (Pérez vd., 2002). Bakterilerin, bitkilerin çürüme süreçlerinde önemli olduğu düşünülmektedir. Kendi başlarına nüfuz edemedikleri için genellikle mantarlarla aynı anda ağaç hücrelerini istila etmektedirler. Bakteriler, hücre dışı mantar enzimleri tarafından değişikliğe uğratılmış bitki hücre duvarı bileşenlerini kullanırken, mantarlara da gereksinim duydukları maddeleri sağlayabilmektedir. Ek olarak, bitkide yaşayan bazı bakterilerin atmosferik nitrojeni sabitleme yeteneği, misel gelişimini artırarak bitki ayrışma hızı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmaktadır. Çok çeşitli aktinomisetler ve diğer bakteriler, lignoselülozu parçalayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır. Bitki bozunmasının en sıra dışı modellerinden biri, bakterilerin esas olarak bitki hücre duvarlarının içini bozarak tüneller oluşturduğu bakteriyel tünellemedir. Bakteriler tarafından bitki çürümesinin bir başka modeli, bakterilerin selüloz mikrofibrillerine paralel olarak bitki hücre duvarlarında oluklar oluşturduğu çizgili erozyondur (Chen vd., 2010).

Yukarıda verilen özelliklere sahip, biyolojik ön işlemde kullanılan ve çeşitli biyokütle parçalayıcı enzimler üreten birçok bakteri bulunmaktadır. Lignoselülozik biyokütlenin ön işleminde en verimli bakteri suşlarının seçimi, enzimatik hidroliz ve fermentasyonu

etkileyen önemli adımlardır. Bazı bakterilerin (*Clostridium* sp., *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Thermomonospora* sp., *Streptomyces* sp. vb.) doğal biyopolimerleri hidrolize ettiği bilinmektedir. (Sharma vd., 2019). Bakteriler, zorlu koşullarda hayatta kalabilir ve lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımı için iyi bir potansiyele sahiptir. *Paenibacillus* ve *Bacillus* suşlarından izole edilmiş selülazların geniş bir pH spektrumunda yüksek termostabiliteye ve/veya aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. *Cellulomonas flavigena* ve *Terendinibacter turnerae* gibi suşlardan, daha geniş substrat kullanımı sunan işlevli selülazlar üretilmektedir (Maki vd., 2009). Bununla birlikte, *Zymomonas mobilis* gibi anaerobik bakteriler de selüloolitik adaydır ve yüksek etanol verimi için sakkaroz, glukoz ve fruktozun fermentasyonunda kullanılabilir (Dien vd., 2003).

Biyolojik ön işlemden, lignoselülozik biyokütledeki lignini bozunduran organizmalar kullanılmaktadır (Sindhu vd., 2016). Kahverengi, beyaz ve yumuşak çürükçül mantarlar bu organizmalar arasında yer almaktadır (Chen vd., 2010). Bu organizmalar sayesinde biyokütle enzimatik hidrolize daha duyarlı hale gelmektedir. Genel olarak, kahverengi ve yumuşak çürükçüller selülozu sindirip, ligninde küçük modifikasyonlar yapmaktadır (Bajpai, 2016). Beyaz çürükçül mantarlar ise peroksidazlar ve lakkazlar (lignin parçalayıcı enzimler) ile ligninin yapısını bozmaktadır (Kumar vd., 2009; Bajpai, 2016).

Bir basidiomycete olarak beyaz çürükçül mantarlar doğada yaygındır ve özellikle orman ekosistemlerinde aktiftir (Chen vd., 2010). Ön işlem için yaygın olarak kullanılan beyaz çürükçül mantar türleri, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* ve *Pleurotus ostreatus*'tur. Bu basidiomycetes türlerinin yanı sıra, lignoselülozik hammaddenin parçalanması için *Bjerkandera adusta*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* ve *Lepista nuda*'da çalışılan türler arasındadır (Shi vd., 2008; Kumar vd., 2009). Beyaz çürükçül mantarlar ligninin bozunmasıyla, karbon ve enerji kaynağı olan holoselüloza erişim sağlamaktadır. Degradasyon sürecinde, selüloz tipik olarak endo- ve ekzo-glukanazlar ve  $\beta$ -glukosidazlar tarafından, hemiselüloz endo-glikanazlar ve glikosidazlar tarafından ve lignin spesifik olmayan enzimler tarafından parçalanır. Bazı beyaz çürükçül mantar

türleri, selülozu parçalamadan lignin veya hemiselülozu parçalayabilmektedir. Diğerleri, selüloz ve hemiselülozları önemli ölçüde bozmadan lignini seçici olarak degrade etmektedir. Bu tür özellikler, beyaz çürükçül mantarların biyoyakıt üretiminde kullanılmasını olanaklı hale getirmektedir (Chen vd., 2010).

Kahverengi çürükçül mantarlar, üretilen selüloolitik enzimler ve selüloz bozunma modeli açısından beyaz çürükçül mantarlardan önemli ölçüde farklıdır. Kahverengi çürükçül mantarlar, selülozu büyük ölçüde depolimerize eder ve beyaz çürükçül mantarlarına kıyasla bitkinin dayanıklılığını ciddi şekilde azaltır. Kahverengi çürükçül mantarlardan bazıları *Serpula lacrymans*, *Postia placenta*, *Coniophora puteana* ve *Gloeophyllum trabeum*'dur (Chen vd., 2010).

Yumuşak çürükçül mantarlar, beyaz ve kahverengi çürükçül mantarlarının bulunmadığı belirli koşullarda aktiftir. Yumuşak çürüklere neden olan mantarlar arasında karasal ortamlarda *Chaetomium globosum*, *Hemicola grisea*, *Petriella setifera*, *Phialophora mutabilis* ve *Trichurus spiralis* gibi Ascomycota ve mitosporik türler ve deniz ve nehir ağzı ortamlarında *Lulworthia*, *Halosphaeria* ve *Pleospora* türleri bulunur. Yumuşak çürükçül mantarı *Trichoderma reesei*, biyokütleyi kimyasal ara ürünlere ve etanol gibi biyoyakıtlara dönüştüren basit şekerlere depolimerize etmek için kullanılan, endüstriyel selülaz ve hemiselülaz kaynağı olarak kullanılmaktadır (Chen vd., 2010).

Bakteri ve mantarların yanı sıra böcekler, solucanlar, gastropodlar ve geviş getiren hayvanlar gibi lignoselülozu parçalama konusunda güçlü bir yeteneğe sahip başka makro organizmalar da vardır. Bu makroorganizmalar, selülozik biyokütlenin mekanik, enzimatik, bağırsak florası ve/veya bunların kombinasyonu ile parçalanması için bazı fizyolojik mekanizmalarla oluşturulmuştur. Bu organizmalar, fiziksel parçalanma için kendi özel besleme/çiğneme mekanizmalarına ve selülozun verimli bir şekilde sindirilmesi için farklı enzimatik bileşenlere sahiptir (Sharma vd., 2019).

#### 2.7.4 Fermentasyon stratejileri

Biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan, ayrılmış hidroliz ve fermentasyon (SHF), eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon (SSF) ve eş zamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyon (SSCF) olmak üzere üç işlem vardır.

Ayrılmış hidroliz ve fermentasyon (SHF) yönteminde, lignoselülozik malzemelerin hidrolizi etanol fermentasyonundan ayrılmaktadır. Bu yöntemle hidroliz ve fermentasyon süreçlerinin her birinden tam olarak yararlanılması amaçlanmaktadır. SHF'de hidrolizat, glukozu fermente etmek için birinci reaktöre alınır. Daha sonra etanol damıtılır ve hidrolizatın geri kalanı, ksiloz bileşenlerinin fermente edilmesini sağlamak için ikinci reaktöre aktarılır. Benzer şekilde etanol daha sonra distilasyon işlemi ile uzaklaştırılır. Enzimatik hidroliz ve fermentasyonun ayrılması, fermentasyon yapan organizmalar daha düşük sıcaklıklarda şeker kullanımı gerçekleştirdiğinden enzimin daha iyi performansla yüksek sıcaklıkta çalışmasına izin vermektedir (Balat vd., 2008; Canilha vd., 2012). Örneğin, selülozlar genellikle 45-50 °C arasında çalışırken etanol üreten mayaların çoğu 30-37 °C'de çalışmaktadır. Bu işlemin dezavantajı ise, hidrolizden sonra hidroliz hızını azaltan ve dolayısıyla daha düşük verimle ve daha yavaş etanol üretimine neden olan inhibisyon oluşumudur. Serbest kalan şekerler, özellikle sellobiyoz ve glukoz tarafından selüloz aktivitesinin inhibisyonu, SHF'nin ana dezavantajıdır. Ortamdaki sellobiyoz miktarı 6 g/L gibi düşük bir konsantrasyonda olması halinde bile, selülozun aktivitesi %60 oranında azalmaktadır. Ortamdaki glukoz da inhibitör etki göstererek selüloz aktivitesini engellese de sellobiyozdan daha düşük bir oranda inhibisyon yapmaktadır (Tahezadeh ve Karimi, 2007; Balat vd., 2008; Canilha vd., 2012). SHF'deki bir başka olası sorun da kontaminasyon riski oluşmasıdır. Hidroliz işlemi örneğin, bir ile dört gün gibi uzun süre almaktadır. Bu durumda seyreltik bir şeker çözeltisi, 45-50°C gibi oldukça yüksek sıcaklıklarda olsa dahi mikrobiyal kontaminasyon riski taşımaktadır. Olası bir diğer kontaminasyon kaynağı da enzimler olabilmektedir. Enzimin, otoklavda deaktivasyonu nedeniyle filtre edilmesi gerektiğinden büyük ölçekte sterilize edilmesi zordur (Tahezadeh ve Karimi, 2007).

Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon (SSF): Ön işlem ve enzimatik hidroliz adımlarından elde edilen şekerler, bakteri, maya veya filamentli mantarlar tarafından fermente edilir. Ancak, enzimatik hidroliz ve fermentasyon aynı zamanda SSF olarak adlandırılan bir adımda gerçekleştirilebilmektedir (Hahn-Hägerdal vd., 2006). Bu yöntemde SHF'nin aksine, enzimlerin şekerleri serbest bırakmak için hidroliz yapılmasına ve arada herhangi bir ayırma işlemi olmadan bu şekerleri hemen etanole fermente edilmesine izin verilmektedir. Bu sayede hidroliz işleminden sonra oluşan monomerlerin indirgenmesi de engellenmiş olmaktadır. Son ürün inhibisyonunu ortadan kaldırarak daha iyi etanol verimi elde edilebilmesi ayrı reaktörlere olan ihtiyacı ortadan kaldırabilmesi nedeniyle bu yöntem daha çok kullanışlı hale gelmiştir (Hamelinck vd., 2005). Bu yöntem, seyreltik asit veya yüksek sıcaklıkta sıcak su ön işlemi ile birleştirildiğinde etkili olmaktadır (Balat vd., 2008). Bu yöntemde selülozlar ve ksilanazlar karbonhidrat polimerlerini fermente edilebilir şekerlere dönüştürmektedir. Ancak, bu enzimler, glukoz, ksiloz, sellobiyoz ve diğer oligosakkaritler gibi ürünler nedeniyle oluşan inhibisyona karşı çok hassastır (Jeffries ve Jin, 2000). Hidroliz inhibisyonlarının, fermentasyon prosesi ile çözülmesi nedeniyle, SSF'nin daha yüksek etanol verimi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. (Gupta ve Verma, 2015).

Yapılan bir çalışmada, enzimlerin daha az kullanılması dahil olmak üzere SSF yönteminin diğer yararları ortaya çıkarılmıştır; bu yöntemde üretim süreci daha hızlı olmakta, daha az sayıda ve hacimde reaktöre ihtiyaç duyulmakta, dolayısıyla hem şeker salınımı hem de fermentasyon işlemi aynı anda başlatıldığından maliyeti daha düşük olmaktadır (Sun ve Cheng, 2002). Diğer bir çalışmada, SSF yöntemiyle palmye yağından etanol elde edilmiş ve yaklaşık %62.75 teorik etanol verimi ile sonuçlanmıştır. Araştırmacılar ayrıca 745 kWh/ton palmye yaprağı yağı olarak hesaplanan genel üretim için gerekli olan toplam enerjiyi de analiz etmişlerdir (Srimachai vd., 2014). Bununla birlikte, enzimler ve mikroorganizmalar yalnızca tercih edilen sıcaklık ve pH içinde kullanılabilirliğinden, çözelti ortamını kontrol etmek bu yöntemin zorluklarından biridir. Çoğu enzim, hafif asit ortamında (pH<5) hala aktif olabilmekte ve bu koşullar mikroorganizmaların sürdürülebilirliğini tehdit etmesine rağmen 313 K'den yüksek sıcaklığa dirençli olabilmektedir (Huang vd., 2005).

SSF yöntemi ile bildirilen değerlerden daha yüksek biyoetanol verimi elde edilebilmekte ve bu yöntem daha düşük miktarlarda enzim gerektirmektedir, çünkü enzimatik hidroliz sırasında oluşan sellobiyoz ve glukozdan kaynaklanan son ürün inhibisyonu, maya fermentasyonu ile giderilebilmektedir (Dien vd., 2003; Chandel vd., 2007). Ürün oluşumunun verimliliği, a/a (w/w) bazında yaklaşık %5'e kadar çıkabilen biyoetanol konsantrasyonuna ulaşabilmektedir, bu nedenle yüksek sıcaklıklarda (>313 K) ve %5 veya üzerinde biyoetanolda fermentasyon bu teknolojinin ticarileştirilebilmesi için öncelik verilmesi gereken durumlardır (Jeffries ve Jin, 2000). SSF, lignin, pektin ve lignoselülozlar gibi karmaşık polimerler içeren doğal heterojen malzemeleri kullanan bir toplu işlemdir (Sabu vd., 2006). Yapılan bir çalışmada aerobik veya anaerobik koşullar altında *Saccharomyces cerevisiae* ve *Mucor indicus* ile önceden işlenmiş seyreltik asitli pirinç samanının SSF'si incelenmiştir. Ayrıca *M. indicus* ile ön işleme tabi tutulmuş pirinç samanının anaerobik SSF'sinde en yüksek biyoetanol ve gliserol verimlerinin elde edildiği iddia edilmiştir (Karimi vd., 2006).

SSF veya SHF dışında, mevcut alternatifler konsolide biyoişleme (CBP) ve eş zamanlı sakkarifikasyon ve birlikte fermentasyondur (SSCF) (Karimi vd., 2006). CBP esnasında; selüloz üretimi, biyokütle hidrolizi ve etanol fermentasyonu hep birlikte tek bir reaktörde gerçekleşmektedir (Bjerre vd., 1996). Bu süreç aynı zamanda doğrudan mikrobiyal dönüşüm olarak da bilinir. Bu işlemde, selülozu doğrudan etanole fermente etmek için yaygın olarak tek veya birleşik mikroorganizma konsorsiyumu kullanılır. CBP'nin uygulanması, enzimin satın alınması veya üretimi için herhangi bir kaynak yatırımı gerektirmemektedir (Hamelinck vd., 2005). *C. thermocellum* gibi mikroorganizmalar ve *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum* ve *Paecilomyces* sp. dahil olmak üzere bazı funguslar CBP'yi doğal olarak gerçekleştirebilme yeteneğine sahiptir. Ancak, düşük etanol verimleri ve uzun fermentasyon süreleri (3-12 gün) nedeniyle CBP verimli bir süreç değildir (Szczo drak ve Fiedurek, 1996). SSCF'de, birlikte fermentasyon yapan mikroorganizmaların, çalışma pH'ı ve sıcaklığı açısından uyumlu olması gerekmektedir (Das Neves vd., 2007). *C. shehatae* ve *S. cerevisiae*'nin bir kombinasyonu, SSCF işlemi için etkili suşlar olarak rapor edilmiştir (Das Neves vd., 2007). Fermentasyonda kullanılan bazı yerli veya yabancı tip mikroorganizmalar *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Z. mobilis*, *P. tannophilus*, *C. shehatae*, *P. stipitis*, *C. brassicae*, *M.*

*indicus* vb.dir (Nigam, 2001; Balat vd., 2008; Sanchez ve Cardona, 2008; Gírio vd., 2010; Sukumaran vd., 2010; Sarkar vd., 2012). *P. stipitis* BCC15191 (Buaban vd., 2010), *P. stipitis* NRRLY-7124 (Nigam, 2001), rekombinant *E. coli* KO11 (Takahashi vd., 2000), *C. shehatae* NCL-3501 (Abbi vd., 1996), *S. cerevisiae* ATCC 26603 (Moniruzzaman, 1995) gibi genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar, daha yüksek etanol verimi elde edilebilmesi amacıyla kullanılmıştır. *K. marxianus*, *Candida lusitanieae* ve *Z. mobilis*, *Clostridium* sp. ve *Thermoanaerobacter* sp. gibi diğer mikroorganizmalar, şekerin fermantasyon aracılığıyla etanole dönüştürülmesi için önerilmiştir (Bjerre vd., 1996; Pandey vd., 2000).

Bununla birlikte, SSF teknolojisinin, SSCF için avantajlı olduğu kanıtlanmıştır. SSCF'de, enzimatik hidroliz, pentoz şekerlerinin daha hızlı ve daha yüksek verimle fermente edilmesini sağlayacak şekilde glikoliz oranını artıran heksoz şekerleri sürekli olarak ortama salıverilmektedir (Hahn-Hägerdal vd., 2006). SSF ve SSCF, her iki ünite operasyonu da aynı tankta yapılabilmesi ve daha düşük maliyetli olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (Mosier vd., 2005).

## **2.8 Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Başlıca Mikroorganizmalar**

Etanol fermantasyonu, organik materyalin mikroorganizmalar tarafından şekerler gibi daha basit bileşiklere dönüştürüldüğü biyolojik bir süreçtir. Bu fermente edilebilir bileşikler daha sonra etanol ve CO<sub>2</sub> üretmek için mikroorganizmalar tarafından fermente edilmektedir. Etanol üretiminde bakteri, maya ve mantarların kullanıldığı bilinmektedir (Lin ve Tanaka, 2006).

### **2.8.1 *Saccharomyces cerevisiae***

Mayalar gibi mikroorganizmalar, çok çeşitli şekerleri etanole fermente ederek biyoetanol üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Etanol verimi (> %90.0 teorik verim), etanol toleransı (> 40.0 g/L), etanol üretkenliği (> 1.0 g/L/h), basit, ucuz

ortamda büyüme, inhibitörlere dirençli olma gibi değerli özelliklerinden dolayı endüstriyel tesislerde kullanılmaktadır (Dien vd., 2003).

Mayalar, tomurcuklanma veya fisyon yoluyla çoğalabilen ve sporlar oluşturabilen askomikota veya basidiyomikota mantarlar olarak tanımlanmaktadır (Boekhout ve Kurtzman, 1996). İlk önce üremelerine göre (Ascomycotina veya Basidiomycotina) veya yaşam döngüsünde seksüel fazın olmamasına (Deuteromycotina) göre sınıflandırılırlar. Alt taksonomik alt bölümler (aileler, alt aileler, cinsler, türler ve suş), seksüel üreme dahil olmak üzere morfolojik, fizyolojik ve genetik özellikleri ile belirlenmektedir (Kurtzman ve Fell, 1998). Mayalar karasal, sucul ve hava ortamından izole edilebilmektedir. Bitkiler, mayaların tercih ettiği yaşam alanlarından. Bazı maya türlerinin hayvanlarla kommensalizm veya parazitik ilişkileri olduğu bulunmuştur. Yüksek şeker veya tuz konsantrasyonu içeren ya da düşük sıcaklığa sahip olan ortamlarda da mayalar yaşayabilmektedir (Walker, 2009).

Etanol üretiminde uzun yıllardır mikroorganizmalar arasında en yaygın olarak kullanılanı mayalar olmuştur. Mayalar arasında, yüksek konsantrasyonda etanol üretebilen *Saccharomyces cerevisiae*, en çok tercih edilendir. Bu maya hem glukoz gibi basit şekerlerde hem de disakkarit sakkarozda büyüebilmektedir. *Saccharomyces* ayrıca insan tüketimi için bir gıda katkı maddesi olarak genellikle güvenli olarak kabul edilmektedir (Lin ve Tanaka, 2006).

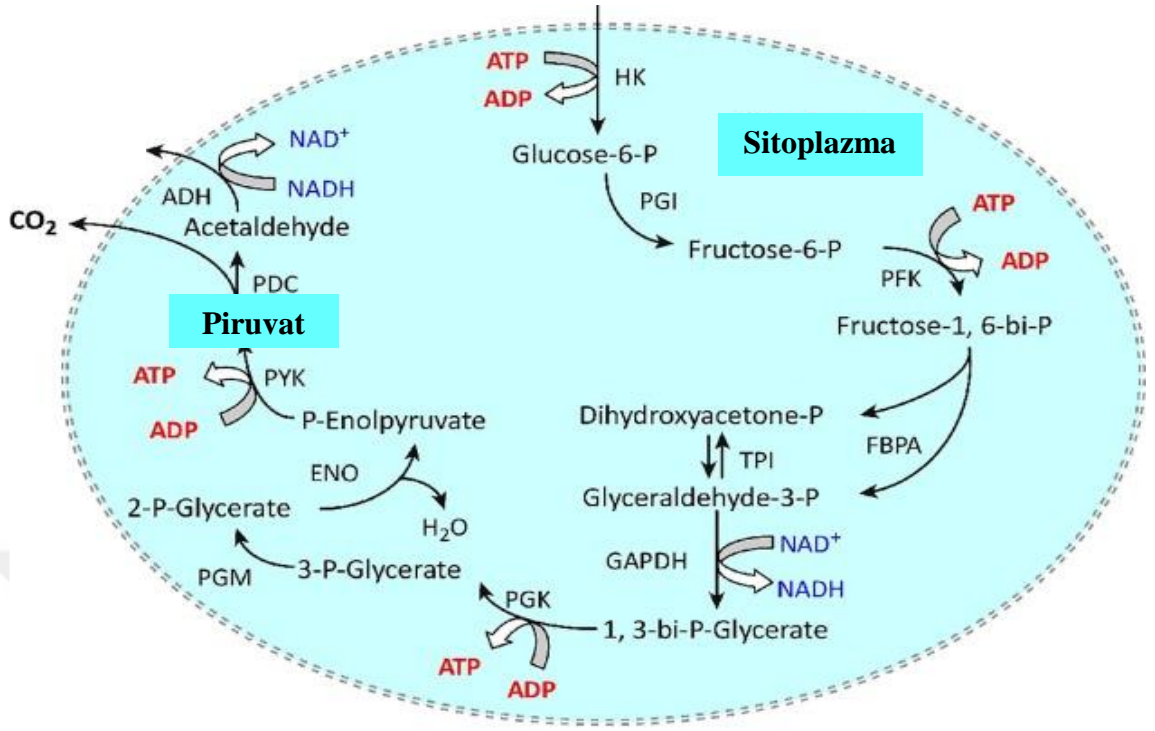
*S. cerevisiae* hücreleri yüksek sağlamlığa sahiptir, toksik inhibitörlere ve fermantasyon ürünlerine karşı oldukça dirençlidir ve şekerleri düşük pH değerlerinde fermente ederek kontaminasyon riskini en aza indirmekte başarılıdır (Weber vd., 2010).

Mayalar tarafından yapılan biyoetanol üretiminde, glukoz gibi altı karbonlu moleküller, CO<sub>2</sub> olan nihai oksidasyon ürününe geçmeden, etanol gibi iki karbon bileşenine katabolize edilmektedir. *S. cerevisiae* gibi Crabtree pozitif mayalar, oksijen varlığında etanol biriktirir, ancak Crabtree negatif bir maya olan *Candida albicans*, oksijen varlığında şekerleri CO<sub>2</sub>'e katabolize etmektedir (De Deken, 1966). Altı karbonlu karbonhidratların varlığı, Crabtree pozitif mayalarda oksidatif solunum yolunu

baskıladığından, büyüme için enerji glikoliz yoluyla üretilmektedir (Postma vd., 1989). Ortamda glukozun tükenmesi durumunda ise, ortam içinde halen mevcut olan fermente edilemeyen karbon kaynaklarını kullanmak için hücreler metabolizmalarını yeniden ayarlarlar. Böylece bu kaynakların CO<sub>2</sub>'e oksidasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum “Dioksik kayma” olarak adlandırılmaktadır (Gray vd., 2004) . Fermentatif metabolizma yoluyla biyoetanol üretim süreci ve dioksik kayma, *ADH1* lokusu üzerinde kodlanmış olan alkol dehidrojenaz enzimi ile yürütölmektedir. ADH1, glukozun fermantasyonu sırasında asetaldehitin etanole indirgenmesini katalize etmektedir (Bennetzen ve Hall, 1982; Raj vd., 2014).

*S. cerevisiae*, alkol dehidrojenazı kodlayan iki gen içermektedir. *ADH1* yapısal olarak eksprese edilirken, *ADH2* ekspresyonu, glukozun hücre içi konsantrasyonundaki azalma ile indüklenmektedir. ADH2 enziminin substratı etanoldür (Raj vd., 2014). Bu enzimler tarafından asetaldehitten etanol üretilebilmektedir. Bunun yanında, oksijen varlığında ise etanolden de asetaldehit üretimi yapabilmektedirler. Ancak, ikinci tepkime ilkinde göre daha düşük oranda meydana gelmektedir. Ayrıca, ADH1 enzimi sürekli olarak çalışırken ADH2 sadece şeker konsantrasyonunda düşüş olması durumunda çalışmaktadır (Pişkur vd., 2006).

Birçok mikroorganizmada olduğu gibi, *S. cerevisiae* glukoz metabolizmasında Embden-Meyerhof yolunu kullanmaktadır (Lin ve Tanaka, 2006). Glikoliz adı da verilen bu metabolik yolda, bir molekül glukoz metabolize edilerek, iki molekül piruvat üretilmektedir. Anaerobik koşullar altında, piruvat, CO<sub>2</sub> salınımı ile etanole indirgenir. Teorik olarak, glukozun kütle bazında verimi, etanol için 0.511 ve CO<sub>2</sub> için 0.489'dur. Glikolizde üretilen iki ATP, maya hücrelerinin, enerji gerektiren biyoreaksiyonları içeren işlemlerinin yürütölmesinde kullanılır. Bu nedenle, etanol üretimi, maya hücresinin büyümesi ile de bağlantılıdır. ATP'lerin hücre içinde birikmesi durumunda ise glikolizdeki en önemli düzenleyici enzimlerden biri olan fosfofruktokinaz inhibe olacağından glukozun glikolitik metabolizması da kesintiye uğrayacaktır (Bai vd., 2008).



Şekil 2.4 *Saccharomyces cerevisiae*'da Embden Meyerhoff Yolağı (Xia vd., 2019)

HK, heksokinaz, PGI, fosfoglukoizomeraz, PFK, fosfofruktokinaz, FBPA, fruktoz-1,6-bifosfat aldolaz, TPI, trioz fosfat izomeraz, GAPDH, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, PGK, fosfogliserat kinaz, PGM, fosfogliseromutaz, ENO, enolaz, PYK, piruvat kinaz, PDC, piruvat dekarboksilaz, ADH, alkol dehidrojenaz

Etanol konsantrasyonundaki artış, sıcaklık, ozmotik stres ve bakteriyel kontaminasyon gibi stresli koşullar, mayanın fermantasyon sırasında hayatta kalamamasının nedenleridir (Basso vd., 2008). Bunlar dışında fermantasyon esnasında oluşan gliserol gibi yan ürünler ya da daha düşük seviyelerde üretilen organik asitler ve diğer alkoller gibi ürünlerin üretimi, maya hücrelerinin büyümesi ve bazı glikolitik ara maddeleri, karşılık gelen metabolik yollara yönlendirilerek etanol verimini belirli oranda azaltmaktadır (Bai vd., 2008).

Glukozu etanole dönüştürebilen ve selülozik etanol üretiminde en yaygın olarak kullanılan maya olsa da *S. cerevisiae*, pentozları etanole dönüştürme yeteneğine sahip değildir (Karagoz vd., 2019). *S. cerevisiae* tarafından anaerobik ksiloz fermantasyonu ilk olarak, *Pichia stipitis*'ten alınan ksilozu sırasıyla ksilitol ve ksilüloza dönüştüren, ksiloz redüktaz ve ksilitol dehidrojenazı kodlayan XYL1 ve XYL2 genlerinin heterolog ekspresyonu ile gösterilmiştir (Kötter ve Ciriacy, 1993). Bu genler, ksilozu fermente

etme kabiliyetine sahip suş geliştirmek için *S. cerevisiae*'ye aktararak, genetik olarak modifiye edilmemiş maya türlerine kıyasla etanole daha hızlı dönüştürmesi amaçlanmıştır (Tanimura vd., 2012). Pentoz fermantasyonuna ilişkin sorunların, hibrit, genetik olarak tasarlanmış veya iki maya suşunun ortak kültürü kullanılarak çözülebileceği düşünülmektedir (Azhar vd., 2017). Genetiği değiştirilmiş *S. cerevisiae* ve iki suşun ortak kültürü ile ksilozdan yüksek verimle biyoetanol üretilmesi mümkün hale gelmiştir. Genetik mühendisliği, engelleyici durumların üstesinden gelmek ve stres tolerans genlerini up-regüle etmek için rekombinant DNA teknolojisini kullanmaktadır (Doğan vd., 2014). Bununla birlikte, Kuzey Amerika'da daha yüksek etanol verimi üretmek üzere tasarlanmış suşlar, üretilen etanolün yaklaşık %80'ini oluştururken; Güney Amerika'da, çoğunlukla (>%90) genetiği değiştirilmemiş suşlar fermantasyon sistemlerinde başlatıcılar olarak kullanılmaktadır (Jacobus vd., 2021).

### **2.8.2 *Pichia stipitis***

*Pichia stipitis*, çürüyen odun ve odunlarda yaşayan böcek larvalarından izole edilen bir grup maya türünden biridir. Yaşadığı ortamdan kaynaklı olarak bu maya, odunsu yapılarıdaki şekerlerden faydalanma yeteneğine sahiptir. Anaerobik koşullar altında glukoz, ksiloz, galaktoz ve sellobiyozu fermente edebilir. *Pichia stipitis*, bilinen mikroorganizmalar arasında en yüksek doğal ksiloz fermantasyon kapasitesine sahiptir. Ancak, glukoz, ksiloz taşınmasını inhibe etmektedir. Ek olarak, *P. stipitis*, *S. cerevisiae*'den daha az etanol direncine sahiptir ve çözülmüş oksijenin düşük seviyelerde olması, *P. stipitis* kullanılarak yüksek etanol verimi için büyük önem taşımaktadır. (Agbogbo ve Coward-Kelly, 2008). *S. cerevisiae*'nin aksine, *P. stipitis*, hemiselülozik şeker monomerlerini metabolize edebilir. Bu nedenle, hemiselülozun etanole dönüştürülmesi konusunda özel bir ilgi görmektedir. Ancak etanole ve lignoselülozik hammaddenin parçalanması sonucu oluşan inhibitörlere düşük direnç gösterebilmektedir. Yüksek osmotik basınç varlığından da etkilendiğinden, şeker konsantrasyonunun fazla olduğu ortamlarda etanol üretimi de etkilenmektedir (Girio vd., 2010).

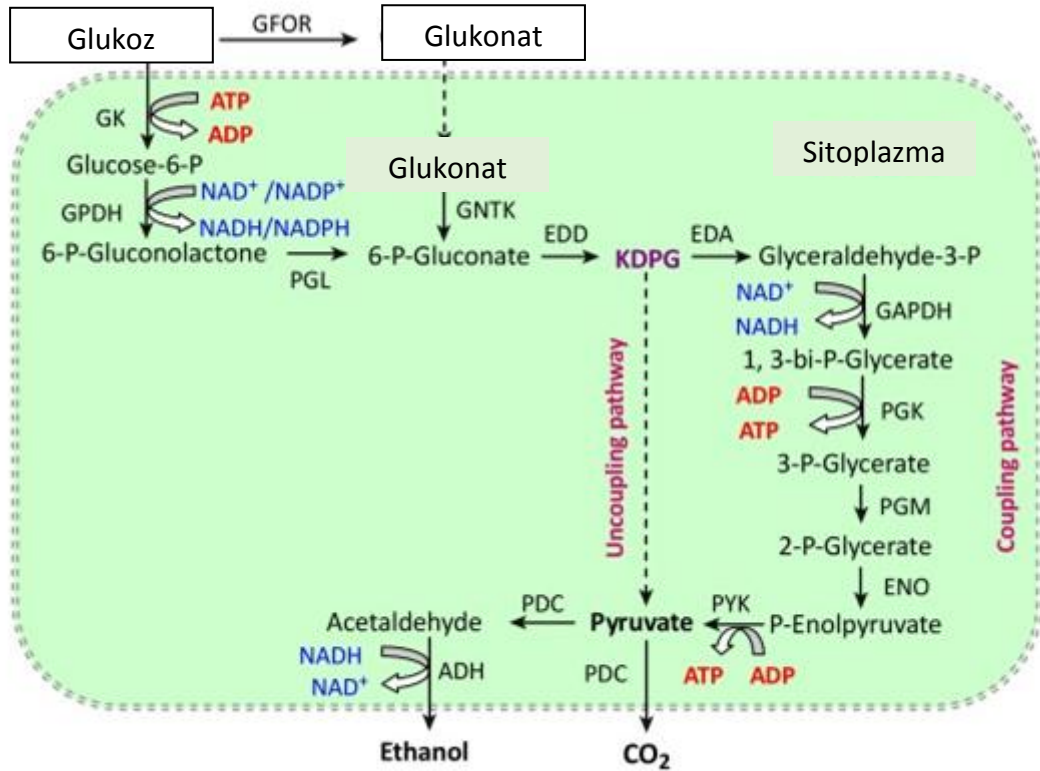
Yukarda sayılanların yanı sıra, *P. stipitis*, biyokütlenin monomerik şekerlere parçalanmasında rol oynayan çeşitli selülozlar ve hemiselülozlara sahiptir (Jeffries vd., 2007). Bu enzimlerden biri olan,  $\beta$ -glukozidaz sayesinde sellobiyozu glukoz monomerlerine parçalama yeteneğine sahiptir (Agbogbo ve Coward-Kelly, 2008). Ayrıca, bu suşun genomu ksilanaz ve mannazlar gibi ağaçta yaşayan böceklerin bağırsak ortamında büyümelerini ve hayatta kalmalarını sağlayan diğer parçalayıcı enzimleri kodlamaktadır (Nardi vd., 2006). Ek olarak, *P. stipitis*'in biyodönüşümle ilgili başka birçok özelliği vardır: çeşitli esterler ve aroma bileşenleri oluşturabilir, asiklik enonları karşılık gelen alkollere indirgeyebilir, düşük moleküler ağırlıklı lignin parçalarını modifiye edebilir ve yüksek verimlerde ksilitol veya laktik asit üretir (Kim vd., 2001; Ilmén vd., 2007; Selim vd., 2018).

Literatürde çeşitli çalışmalarla *P. stipitis*'in etanol üretim kapasitesi araştırılmaya devam etmektedir. Ksilozun etanole fermantasyonu dahil olmak üzere altı ve beş karbonlu şekerlerin fermentasyonunda kullanımı açısından araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia stipitis* yoluyla glukoz ve ksilozun ardışık fermantasyonunun, tek başına glukoz ile kullanılan geleneksel fermantasyona göre etanol üretimini yaklaşık %12 oranında artırmıştır. Sonuçlar, ardışık fermantasyonun ağaç biyokütlesinden biyoetanol üretimini artırabileceğini göstermektedir (Song vd., 2019). *P. stipitis*'in ksilozdan yüksek verimde (0.108 - 0.122 g/g) etanol üretebildiği bulunmuştur (Yücel ve Aksu, 2015). Ayrıca, endüstriyel suşların üretkenliğini artırmak için *P. stipitis*'e ilişkin genom çalışmaları devam etmektedir.

### **2.8.3 *Zymomonas mobilis***

*Zymomonas mobilis*, etanol üretme özelliğine sahip bir Gram-negatif mikroorganizmadır (Lin ve Tanaka, 2006). Bu bakteri, 25-31°C'de ve pH 6-7 arasında optimal gelişim gösterir. *Z. mobilis*, glukozu Entner–Doudoroff yolunu kullanarak anaerobik olarak metabolize eden bir mikroorganizmadır (Bai vd., 2008). Entner–Doudoroff yolu, Embden–Meyerhof yoluna göre glukoz molü başına sadece yarısı kadar ATP vermektedir. Sonuç olarak, *Zymomonas* mayadan daha az biyokütle üretmekte ve fermantasyon ürünlerine daha fazla karbon aktarılmaktadır (Lin ve

Tanaka, 2006). *Z. mobilis*, Entner–Doudoroff yolunda 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonatı 2-keto-3-deoksi-6-glukonat aldolaz enzimi ile piruvata dönüştürülür. Bu durumda ise bir glukoz için bir ATP harcanmaktadır. Böylece *Z. mobilis*'in etanol üretkenliği ve teorik etanol verimi daha yüksek olmaktadır (Bai vd., 2008). Ayrıca, düşük ATP veriminin bir sonucu olarak, *Zymomonas*, Entner–Doudoroff yolu boyunca yüksek bir glukoz akışı sağlamaktadır (Lin ve Tanaka, 2006).



Şekil 2.5 *Zymomonas mobilis*'te Entner-Doudoroff Yolağı (Xia vd., 2019)

GFOR, glukoz-fruktoz oksidoredüktaz; GK, glukokinaz; GNTK, glukonat kinaz; GPDH, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz; PGL, fosfoglukonolaktonaz; EDD, 6-fosfoglukonat dehidrataz; EDA, 2-keto-3-deoksi-glukonat aldolaz, GAPDH, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz; PGK, fosfogliserat kinaz; PGM, fosfogliseromutaz; ENO, enolaz; PDC, piruvat dekarboksilaz; PYK, piruvat kinaz; ADH, alkol dehidrojenaz

Ayrıca, *Z. mobilis* insan sağlığı açısından genel olarak güvenli olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte 1970 ve 1980'lerde bazı araştırmacılar etanol üretimi açısından bu bakterinin *S. cerevisiae*'den üstün olduğunu savunmuştur. Ancak, avantajlarına rağmen, *Z. mobilis*, yalnızca glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente ettiği için tüm biyokütle kaynaklarının yakıt dönüşümünde uygun değildir. Ayrıca, glukoz,

fruktoz veya sakkaroz içeren ortamda şeker alımı ve etanol üretimi glukoz kullanıldığında maksimuma ulaşmaktadır (Lin ve Tanaka, 2006). Ayrıca, *Z. mobilis*'in dar substrat spektrumu, nişasta dekstrininin glucoamilazlar tarafından hidrolizi sırasında birçok başka şeker salındığından, nişasta bazlı hammaddeden etanol fermantasyonu için uygun değildir. Yine, substrat olarak sakkaroz kullanıldığında, büyük miktarda levan oluşumu nedeniyle etanol verimi büyük ölçüde tehlikeye girer, bu da *Z. mobilis*'i şeker kamışı suyu veya melas gibi şeker bazlı hammaddelerden etanol üretiminde kullanılamaması ile sonuçlanmaktadır (Liu vd., 2019). Fermantasyon sırasında önemli düzeyde sorbitol biriktiğinden, fruktozdan etanol verimi de düşük olmaktadır (Sprenger, 1996). Ayrıca, *Z. mobilis*, ksiloz ve arabinoz gibi diğer şekerleri fermente etmek için gerekli olan bazı glikolitik ve pentoz fosfat yolu enzimlerinden yoksundur. Sınırlı substrat aralığını genişletmek için çeşitli katabolik genler *Z. mobilis*'e transfer edilmiştir (Weber vd., 2010).

*Z. mobilis*'in, yaklaşık 200 g/L glukoz içeren ortamda, 90 g/L'den fazla etanol üreterek fermente edebileceği belirlenmiştir (Zhao vd., 2014). Bu miktarlar da selülozik etanol üretimi için yeterlidir. Bununla birlikte, *Z. mobilis* ile etanol üretiminin bir diğer dezavantajı da nispeten küçük genomu nedeniyle lignoselülozik biyokütlenin ön işleme sırasında salınan inhibitörlere daha az toleranslı olmasıdır (Seo vd., 2005). Etanol üretiminin artırılması için mühendislik çalışmaları ile *Z. mobilis* suşlarının inhibitörlere karşı fizyolojik ve metabolik tepkisinin tam olarak anlaşılması gerekmektedir (Liu vd., 2019).

#### **2.8.4 *Candida boidinii***

*Candida boidinii*, fungi âleminin *Ascomycota* filumuna, *Saccharomycetes* sınıfına, *Saccharomycetales* takımına ait bir mayadır. Genom büyüklüğü 5900 protein kodlayan gen ile 19.000.000 bp civarındadır. (Camiolo vd., 2017). Bu maya, şarap fermantasyonu, toprak, deniz suyu veya şeker içeren ürünler gibi çeşitli ortamlardan izole edilebilmektedir. Türlerin morfolojisi, 2–4 × 4–20 µm ile uzun oval ile silindirik şekillerdir. Hücreler tek, çiftler veya zincirler halinde bulunabilmektedir (Kurtzman vd., 2011).

*Candida boidinii* metilotrofik bir maya olup, metanol metabolizmasına ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır.

### 2.8.5 Etanol üretiminde kullanılan diğer mikroorganizmalar

Literatürde *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124), *S. cerevisiae* (RL-11) ve *Kluyveromyces fragilis* (Kf1) gibi belirli maya suşları, farklı şeker türlerinden iyi etanol üreticileri olarak rapor edilmiştir (Mussatto vd., 2012). Bunlar dışında, *Candida*, *Schizosaccharomyces* ve *Pachysolen* cinslerinden bazı mayalar pentozları etanole fermente etme yeteneğine sahiptir (Mussatto vd., 2012).

Literatürde etanol üretimi çalışılan mayalardan biri olan, *Kluyveromyces marxianus* ilk olarak 1888 yılında E.C. Hansen tarafından tanımlanmış olup, ilk olarak, *Saccharomyces marxianus* olarak adlandırılmıştır. Ancak sonrasında ise, spor ve askus morfolojisinin farklılığı nedeniyle, *Kluyveromyces* cinsine dahil edilerek *Kluyveromyces marxianus* olarak adlandırılmıştır (Fonseca vd., 2008). Literatürde aynı mikroorganizma için taksonomik farklılıklar bulunduğundan, *K. marxianus* olarak değerlendirilen bazı türler listelenmiştir: *Candida kefir* (eşeysiz form); *Candida pseudotropicalis* var *pseudotropicalis*; *Guilliermondella fragilis*; *Guilliermondella marxiana*; *K. bulgaricus*; *K. cicerisporus*; *K. fragilis*; *Saccharomyces fragilis*; *S. makedoniensis*; *S. marxianus* (Barnett vd., 1990; Hensing vd., 1994). Ayrıca, *Kluyveromyces* cinsinin mayaları, "Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan" grubuna ait olup, farmasötik ve gıda kullanımları için uygun olarak kabul edilmektedir (Rouwenhorst, 1992).

Etanol üretiminde inhibitörlere toleranslı mayalar kullanılarak endüstriyel ölçekte etanol üretiminin etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Etanol toleranslı ve ısıya dayanıklı suşlar, toprak, su, bitki ve hayvanlar gibi doğal kaynaklardan izole edilmekte olup, çeşitli streslere dayanıklılık gösterebilmektedir (Weber vd., 2010). Bunun, hücrelerin doğal seleksiyonla çevrelerine uyum sağlamasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Yüksek sıcaklıkta etanol fermantasyonu, ısıya dayanıklı mikroorganizmaları seçtiği ve soğutma maliyetleri gerektirmediği için önemli bir süreçtir (Fonseca vd., 2008). *K.*

*marxianus*, hem heksoz hem de pentoz şekerlerini birlikte fermente edebilen ve 42–45 °C sıcaklıkta hayatta kalabilen termotolerant mayadır (Yanase vd., 2010). Bu mayanın bir diğer önemli özelliği de *Saccharomyces cerevisiae*'den çok daha yüksek bir büyüme hızı sergilemesidir (Varela vd., 2017).

Yüksek termotolerans nedeniyle, *K. marxianus*, çeşitli lignoselülozik biyokütle kaynaklarından lignoselülozik etanol üretiminde kullanılabilir. Bu mikroorganizma, hem sakkarifikasyon hem de fermentasyon işlemlerinin aynı anda gerçekleştiği eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon (SSF) işleminde kullanılmaktadır (Öhgren vd., 2007; Olofsson vd., 2008; Fan vd., 2018). *K. marxianus* CECT 1123 ile yapılan bir çalışmada gram laktoz başına 0,51 ug/g etanol verimi elde edilmiştir (Parrondo vd., 2009). Başka bir çalışmada, *K. marxianus* ve *S. cerevisiae* kokültürü kullanılarak, peynir altı suyundan etanol üretimi denenmiştir. *S. cerevisiae* laktoz metabolizmasında gerekli olan hem  $\beta$ -galaktosidaz hem de laktoz permeazdan yoksun olduğundan, *K. marxianus* laktozu fermente edilebilir şekerlere hidrolize ederek onları *S. cerevisiae* için kullanılabilir hale getirmiştir (Magalhães-Guedes vd., 2013).

Başka bir maya olan *Kluyveromyces fragilis*'te etanol üretim çalışmalarında kullanılmaktadır. *Kluyveromyces fragilis* NCIM 3358'in yeteneği, *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-132 ile karşılaştırılmıştır. *K. fragilis*'in SSF işleminde daha iyi performans gösterdiği ve *S. cerevisiae*'ye (%2,0-2,5 w/v) kıyasla yüksek etanol verimiyle (%2.5-3.5 a/h) sonuçlandırıldığı bulunmuştur (Krishna vd., 2001).

*Escherichia coli*, etanol üretiminde kullanılan bir bakteridir. *E. coli*, etanol üretimi için bir biyokatalizör olarak, geniş bir şeker yelpazesini fermente etme yeteneği, karmaşık büyüme faktörlerine gerek duymama ve endüstriyel kullanım (örneğin, rekombinant protein üretimi) dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Bununla birlikte dezavantajları, dar ve nötr bir pH büyüme aralığı (6.0-8.0), mayaya kıyasla daha az dayanıklı kültürler olması ve *E. coli* suşlarının insanlar üzerindeki tehlikesidir (Lin ve Tanaka, 2006).

D-ksiloz ve L-arabinoz gibi pentozlar hemiselülozlarda en bol bulunan şekerlerdir ve bitki biyokütlesinin %30'dan fazlasını oluşturmaktadır. Lignoselülozik biyokütleden biyoyakıtların üretilmesinde pentozların da kullanımı gereklidir. *E. coli*'nin, *Zymomonas mobilis*'in piruvat dekarboksilaz ve alkol dehidrojenaz genlerini eksprese ederek homoetanol fermentasyonları için kullanılması, metabolik mühendisliğin önemli uygulamalarından biri olarak görülmektedir (Ingram vd., 1987; Ingram vd., 1998; Weber vd., 2010). Bu çalışmadan sonra, pentoz ve heksoz kullanan, kendiliğinden etanol üreten *E. coli* suşları tasarlamak için çaba sarf edilmiştir (Orencio-Trejo vd., 2010; Fernández-Sandoval vd., 2012). 2012 yılında, *E. coli* MS04, ksilozu anaerobik olarak sindirmek ve yüksek asetat konsantrasyonunda gelişmesi için modifiye edilmiştir. *E. coli* MS04, yüksek konsantrasyonda asetat (40 g/L'ye kadar sodyum asetat) içeren hemiselülozik hidrolizatları etanole dönüştürmek için umut verici bir etanolojen haline gelmiştir (Fernández-Sandoval vd., 2012). Başka bir çalışmada, bu tasarlanmış suşun lignoselülozik etanol üretim kapasitesi, enzimatik sakkarifikasyon (selülazlar kullanılarak) ve fermentasyon prosesinde belirlenmiştir. İyonik sıvı ya da organosolv ile ön işleme tabi tutulmuş agave küspesi (100 kg ham biyokütle), 48 saat içinde sırasıyla 12.1 ve 12.7 kg etanole dönüştürülmüştür (Pérez-Pimienta vd., 2017). Rekombinant *E. coli* MS04 suşu kullanılarak etanol üretmek için hammadde olarak bira fabrikasından elde edilen artık tahılın kullanıldığı bir çalışmada 30 saat sonra  $29.5 \pm 0.41$  g/L etanol üretilmiştir (Wagner vd., 2022).

*Clostridium phytofermentans*, orman toprağından izole edilmiş, Gram pozitif, anaerobik ve spor oluşturan bir prokaryottur. Optimum büyüme sıcaklığı, 6.0 ila 9.0 arasında değişen pH değerlerinde  $35-37^{\circ}\text{C}$ 'dir (Warnick vd., 2002). Diğer birçok Clostridia gibi, bu bakteri de çeşitli polisakkaritleri (ör. selüloz, pektin, poligalakturonik asit, nişasta, ksilan), oligosakkaritleri (ör. sellobiyoz, gentiobiyoz, laktoz, maltoz) ve heksozları (ör. Glukoz, fruktoz, galaktoz, mannoz) ve pentozları (örn. arabinoz ve ksiloz) fermente edebilmektedir (Weber vd., 2010). *Clostridium thermocellum*'da lignoselülozik biyokütleyi etanole hidrolize edebilen başka bir termofilik bakteridir (Scully ve Orlygsson, 2014). Bu tür, selülozu önemli bir oranda hidrolize edebilmektedir ancak, konsolide bir biyoişleme prosesinde etanol üretimi için *C. thermocellum*'un endüstriyel kullanımını, düşük etanol toleransı ve üretim titresini kısıtlamaktadır (Panahi vd., 2022).

*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, etanol ve CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, laktat ve asetat dahil olmak üzere diğer yan ürünleri doğal olarak sentezleyebilen bir bakteridir. Bu suş, *ldh* geninin silinmesiyle etanol verimini artırmak amacıyla metabolik olarak tasarlanmıştır (Desai vd., 2004). Daha sonra da çeşitli genler silinmiş ve 38 g/L etanol elde edilmiştir (Argyros vd., 2011). *Thermoanaerobacterium* spp. için sınırlayıcı faktörlerden biri pH kontrolünden kaynaklanan tuz birikimidir ancak, pH kontrolü mühendislik çalışmalarıyla minimize edilmeye çalışılmaktadır (Panahi vd., 2022).

*Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Caldicellulosiruptor bescii*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Moorella thermoacetica* etanol üretiminde metabolik olarak modifiye edilen diğer termofilik bakterilerdir (Panahi vd., 2022). Yine etanol üretim kapasitesi araştırılan *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter asburiae* gibi bakteriler de bulunmaktadır (Weber vd., 2010).

Siyanobakterilerin oksijenli ototrofik doğası, onları biyoyakıt üretimi için umut verici mikroorganizmalardan biri yapar. CO<sub>2</sub> azaltımının yanı sıra, siyanobakteriler, NO<sub>x</sub> ve SO<sub>x</sub> remediasyonunda da kullanılabilir (Panahi vd., 2019). *Synechocystis* sp. gibi siyanobakteriler, belirli bir besin talebi olmaksızın fotofermentatif biyoalkol üretimi için aday olarak görülmektedir (Weber vd., 2010). *Synechocystis* sp. PCC6803 suşunda asetaldehitten etanol üretilmiştir ancak bu üretim çok sınırlı olmuştur. Bu nedenle *Z. mobilis*'ten piruvat dekarboksilaz enziminin bu suşa aktarılmasına ilişkin çalışma yürütülmüştür (Gao vd., 2012). Bununla birlikte, bu cinsten biyoyakıt üretimini, düşük biyoyakıt üretimi, düşük karbon asimilasyonu ve nispeten yavaş büyüme oranları kısıtlamaktadır (Panahi vd., 2019; Roussou vd., 2021).

*Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Neurospora* ve *Monilia* gibi fungus cinsleri de etanol üretiminde kullanılmaktadır (Rastogi ve Shrivastava, 2017). Bunların yanı sıra, Xu vd. *Trichoderma reesei*'nin aerobik büyüme fazı sırasında selüloz üretimi ve selüloz bozunması yoluyla selülozdan etanol üretebildiğini ve ardından anaerobik büyüme koşulları oluşturulduğunda oluşan şekerlerin etanole fermente edildiğini bildirmiştir. Ayrıca *Trichoderma reesei*'nin anaerobik koşullar altında 13 güne kadar hayatta kalabildiği de tespit edilmiştir (Xu vd., 2009). *Aspergillus* türlerinin çoğunun glukozdan

etanol üretebildiği gösterilmiştir. *Aspergillus terreus*'un glukozu, diğer bazı heksozları, pentozları ve disakkaritleri etanole fermente edebildiği gösterilmiştir (Pushalkar ve Rao, 1997). Örneğin substrat olarak D-glukoz kullanıldığında, 5 günde maksimum etanol verimi %2.46 (w/v) olmuştur (Amore ve Faraco, 2012).



### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmalar**

Tez çalışmasında fermentasyon basamağında Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia stipitis* mayaları kullanılmıştır.

Ayrıca Ankara Şeker Fabrikası'ndan alınan atık sudan da maya izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmaların etanol üretimleri araştırılmıştır. İzolasyon sonrasında yapılan deneyler, etanol ürettiği belirlenen dört izolatla yürütülmüştür. Daha sonrasında yapılan mikrobiyal tanılama sonucu, çalışılan izolatların *Candida boidinii* olduğu belirlenmiştir.

##### **3.1.2 Tez çalışmasında kullanılan hammadde**

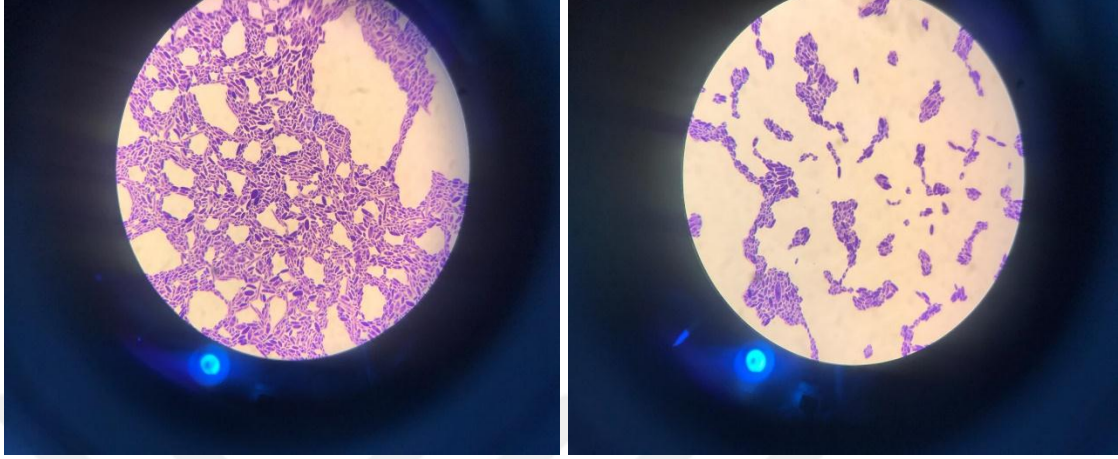
Tez kapsamında kullanılan havuç posaları Belso AŞ.'den sağlanmıştır. Deneylere başlanmadan önce havuç posaları 80°C sıcaklıkta etüvde kurutulmuştur. Etüvde kurutulan havuç posaları oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### **3.2 Yöntem**

##### **3.2.1 Maya izolasyonu, saflaştırılması ve tanınması**

Maya izolasyonu için Ankara Şeker Fabrikası'ndan alınan atık su kullanılmıştır. Bu suların alınan örnekler santrifüjlenmiş ve 0.1 ml örnek, patates dekstrozu agar (PDA, Merck-Germany) içeren besiyerine aktarılmıştır. Bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi amacıyla 600.000 IU penisilin eklenmiş olup, inkübasyon sıcaklığı 30°Cye

ayarlanmıştır. Saf kültürler her 3 ayda bir yatık PDA ortamına aktarılmış ve +4 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Mayaların izolasyon aşamasında kaydedilen mikroskop görüntüsü

ITS bölgelerini amplifiye etmek için ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları (PCR), her bir primerden 0.3 µM, her dNTP'den 0.2 mM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 3 µl şablon DNA ile 50 µL reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için 2U Taq DNA polimeraz kullanılmıştır. PCR koşulları şu şekildedir (her basamak 40 döngü): başlangıç denatürasyon aşaması, 95 °C 5 dk, denatürasyon 95 °C 45 sn, annealing 57 °C 45 sn, uzama (extension) 72 °C 60 sn, son uzama (final extension) 72 °C 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık 4°C’ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır. Amplifiye edilen ürün 1x TAE tamponu ile hazırlanan %1.5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika analiz edilmiş ve etidyum bromür boya kullanılarak UV ışığında görüntüleri alınmıştır. ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) DNA'nın dizilenmesi için harici bir laboratuvarında kullanılmıştır (BM Lab.).

### 3.2.2 Tez çalışmasında kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılacak mayalar patates dekstroza agar (PDA, Merck-Germany) yatık besiyerinde stok kültürler halinde 4°C’de buzdolabında deneyler başlatılincaya kadar saklanmıştır.

Deney öncesinde ise mayalar, glukoz (Merck), pepton (Merck), maya özütü (Scharlau) içeren GPY besiyerinde, ortam koşulları; sıcaklık 30 °C, çalkalama hızı 100 rpm olacak şekilde 24 saat boyunca geliştirilmiştir. Mayalar GPY besiyerine aseptik koşullar altında öze yardımıyla inoküle edilmiş olup, inkübasyon 100 mL Erlenmeyerlerde 50 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası mayalar deney ortamına transfer edilmiştir.

### **3.2.3 Optimum başlangıç hammadde konsantrasyonunun belirlenmesi**

Optimum başlangıç havuç konsantrasyonunun belirlenmesi için daha önceden kurutulmuş olan hammaddelerin farklı oranlarda (50 g/L,100 g/L,150 g/L,200 g/L) sulu karışımları hazırlanmış ve ön muamele için uygun hale getirilmiştir.

### **3.2.4 Hammaddeye ön-işlem uygulaması**

50 g/L,100 g/L,150 g/L,200 g/L oranlarında hazırlanmış havuç posalarına %1 (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile muamele edilmiştir. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile muamale edilen havuç posaları otoklavda (ALP) 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmış, daha sonra süzölmüş ve süzölen sıvı kısmın pH'ı sodyum hidroksit (NaOH/Merck) kullanılarak 5'e ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan hidrolizat fermentasyon deneylerinde kullanılmak üzere sterilizasyon için tekrar otoklavlanarak hazır hale getirilmiştir.

### **3.2.5 Enzimatik hidrolizin indirgen şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisinin belirlenmesi**

Enzimatik hidrolizin indirgen şeker konsantrasyonuna ve etanol üretimine etkilerini araştırmak için 15 FPU/g selülaz ve 15 U/mL hemiselülaz enzimi içeren deney ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L ve 200 g/L hammadde içeren hidrolizata %1 (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ön işlem uygulandıktan sonra ortamın pH'ı 50 mM sitrat tamponu ile 4.8'e ayarlanmıştır. Daha sonrasında ortama 15 FPU/g substrat CellicCTec 2 (Novozymes/Danimarka) selülaz ve 15 U/mL hemiselülaz (Sigma Aldrich/USA, CAS: 9025-56-3) eklenmiştir.

Enzimatik hidroliz deneyleri 72 saat boyunca, 100 rpm karıştırma hızında ve 50 °C'de, 100 mL çalışma hacminde 250 mL'lik Erlenmeyer şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz deneylerinde tepkimeyi durdurmak için Erlenmeyerler 100 °C su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Daha sonra Erlenmeyerler 6000 rpm.de 10 dakika santrifüjlenmiştir.

### **3.2.6 Besiyeri zenginleştirmesinin biyoetanol üretimine etkisi belirlenmesi**

Etanol üretimini arttırmak için deney ortamına organik nitrojen kaynağı (maya özütü) ve mineral tuzlar eklenmiştir. Bunun için farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak, sülfirik asitle ön işlem uygulanmıştır. pH'ı 5'e ayarlanan bu besiyerlerine, selüla ve hemiselüla da eklenerek deney ortamları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerleri, 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub> ve 0.05 g/L ZnSO<sub>4</sub> ile zenginleştirilmiştir.

### **3.2.7 Fermentasyon deneyleri**

Fermentasyon deneyleri 50 mL çalışma hacminde 100 mL Erlenmeyerlerde yürütülmüştür. Deney ortamı sıcaklık 30 °C ve çalkalama hızı 100 rpm olarak ayarlanmıştır. Fermentasyon deneylerinde tüm besiyerlerinin pH değeri 5'e ayarlanmıştır. GPY besiyerinde 24 saat boyunca kültüre alınan hücreler fermentasyon deneyinin gerçekleşeceği ortama %5 (v/v) olacak şekilde inoküle edilmiştir. Sonrasında ise, bu ortamlardan belirli aralıklarla etanol, indirgen şeker ve mikrobiyal gelişimin tespiti için 15 mL hacmindeki Falcon tüplere 3 mL örnek alınmıştır. Bu örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları şeker ve etanol ölçümlerinde, pellet kısımları ise mikrobiyal gelişme ölçümlerinde kullanılmıştır.

### **3.3 Analitik Yöntemler**

#### **3.3.1 Biyoetanol konsantrasyonlarının belirlenmesi**

Etanol konsantrasyonu, Gaz Kromatografisi (GC-2010/Shimadzu) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. GC cihazında alev iyonlaştırıcı dedektör (FID), 0.25 mm. çap ve 60 metre uzunluğunda RTX-Wax (RESTEK) kolonu ve taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmıştır. FID dedektöründe ise kuru hava ve hidrojen kullanılmıştır. Etanol ölçümü için 1 µL örnek 140 °C sıcaklıktaki enjeksiyon bloğuna enjekte edilmiştir. FID dedektörünün sıcaklığı 160 °C'ye ayarlanmıştır. Kolonun başlangıç sıcaklığı ise 50 °C'ye getirilmiş ve 19 dakika içerisinde 150 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Kolon basıncı 200 kPa'ya getirilerek kolon akışı 1.86 mL/dakika, toplam akış ise 190.4 mL/dakikaya ayarlanmıştır (Wistara vd., 2016). Etanol konsantrasyonunun belirlenebilmesi için öncesinde etanol standardı hazırlanmış ve GC cihazında gözlenen pikler, yazılım tarafından hesaplanmıştır. Örnekler de etanol standardının verdiği piklere göre GC cihazında bulunan yazılım tarafından hesaplanarak etanol konsantrasyonları g/L cinsinden elde edilmiştir.

#### **3.3.2 Şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi**

Toplam indirgen şeker konsantrasyonunun belirlenmesinde dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi (Miller, 1959) kullanılmıştır. Bu yöntemle indirgen şeker konsantrasyonu, spektrofotometrede (Shimadzu) 540 nm. dalga boyunda belirlenmiştir.

#### **3.3.3 Mikrobiyal gelişmenin belirlenmesi**

Mikrobiyal gelişmenin belirlenebilmesi için besiyerlerinden 3 mL örnek alınmış ve 6000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Mikrobiyal gelişmenin hesaplanması kuru ağırlık cinsinden yapılmıştır. Belirli aralıklarla örnek alınarak, 600 nm.'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Alınan örnekler etüvde kurutulularak

kuru ağırlıkları saptanmış ve standart eğri oluşturulmuştur. Alınan örneklerin optik yoğunlukları standart eğriye göre kuru ağırlığa çevrilmiştir.

### 3.3.4 Kinetik parametrelerin değerlendirilmesinde kullanılan denklemler

Maksimum teorik verim belirlenirken aşağıdaki denklem kullanılmıştır (Kim ve Lee, 2005).

$$\text{Maksimum Teorik Verim(\%)} = \frac{\text{Etanol (g/L}^{-1}\text{)}}{\text{Başlangıç şekeri (g/L}^{-1}\text{)} \times 0.511} \times 100$$

Bu denklemde “Etanol (g/L)” en yüksek etanol üretim zamanının gözlemlendiği süre zarfındaki etanol konsantrasyonunu, “Başlangıç şekeri (g/L)”, fermentasyon öncesinde ortamda bulunan indirgen şeker konsantrasyonunu göstermektedir. “0.511” ise sabit değerdir.

Etanol verimliliği (Qp) Roca ve Olsson (2013)’e göre aşağıdaki denklem yardımı ile hesaplanmıştır (Roca ve Olsson, 2003).

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

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

Etanol verimi ( $Y_{P/S}$ ) ise aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir (Wang vd., 2004).

$$\text{Etanol verimi (} Y_{P/S}\text{)} = \frac{\text{Maksimum Etanol (g/L)}}{\text{Kullanılan indirgen şeker (g/L)}}$$

Bu denklemde “Maksimum Etanol (g/L)” ifadesi belirli bir zamanda elde edilen maksimum etanol miktarını, “Kullanılan indirgen şeker (g/L)” ise en yüksek etanol miktarının saptandığı zaman dilimindeki kullanılan şeker konsantrasyonunu belirtmektedir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Başlangıç Havuç Konsantrasyonunun Şeker konsantrasyonu ve Etanol Üretimine Etkisi

Optimum hammadde konsantrasyonunun belirlenmesi etanol üretimi için önemli bir basamaktır. Bu nedenle tez çalışmasında etanol üretimi için en uygun başlangıç hammadde konsantrasyonu araştırılmıştır. Bu kapsamda artan konsantrasyonlarda hammadde ile çalışmalar yapılmıştır. Havuç posaları %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v) 121 °C sıcaklıkta 15 dakika otoklavlama ön işlemine tabi tutulmuştur. *S. cerevisiae* bulunan besiyerinde, 50 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunda ortamdaki başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 39.91 g/L olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik fermentasyon sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 9.88 g/L olarak tespit edilmiştir. 100 g/L başlangıç biyokütle konsantrasyonunda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 47.30 g/L iken 24 saat sonunda ortamda indirgen şeker konsantrasyonu 18.21 g/L bulunmuştur. 150 g/L başlangıç biyokütle içeren ortamda başlangıçtaki indirgen şeker konsantrasyonu 73.65 g/L, 24 saat sonunda ise indirgen şeker konsantrasyonu 25.91 g/L olarak saptanmıştır. 200 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıçtaki indirgen şeker konsantrasyonu 102.26 g/L, 24 saat sonunda ise indirgen şeker konsantrasyonunun 36.86 g/L olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1a, Çizelge 4.1).

Aynı koşullarda, *P. stipitis* ve 50 g/L başlangıç biyokütle bulunan ortamda, başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 39.91 g/L, 24 saat sonunda ise indirgen şeker konsantrasyonu 15.28 g/L olarak belirlenmiştir. 100 g/L başlangıç biyokütlerde başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 47.30 g/L, 24 saat sonunda indirgen şeker konsantrasyonu 30.91 g/L olarak tespit edilmiştir. 150 g/L başlangıç biyokütle içeren ortamda başlangıç şeker konsantrasyonu 73.65 g/L iken 24 saat sonunda ortamda 54.86 g/L indirgen şeker tespit edilmiştir. 200 g/L başlangıç biyokütle içeren ortamda başlangıç şeker konsantrasyonu 102.26 g/L iken 24 saat sonunda indirgen şeker konsantrasyonu 61.56 g/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1b, Çizelge 4.1).

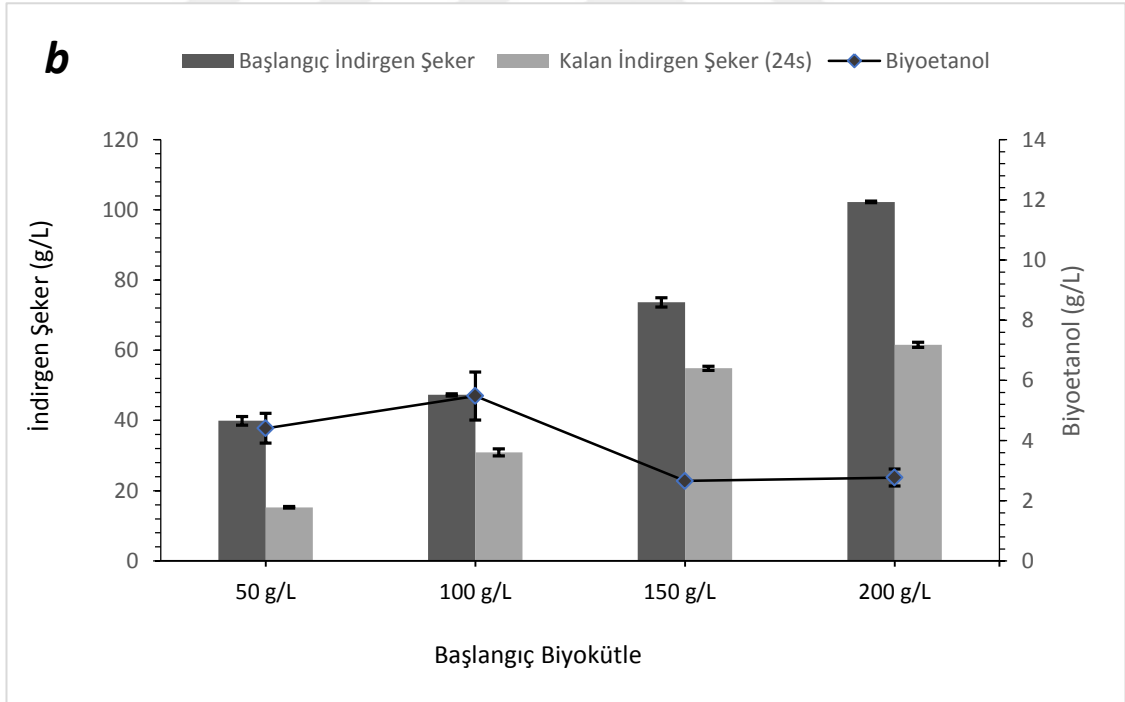
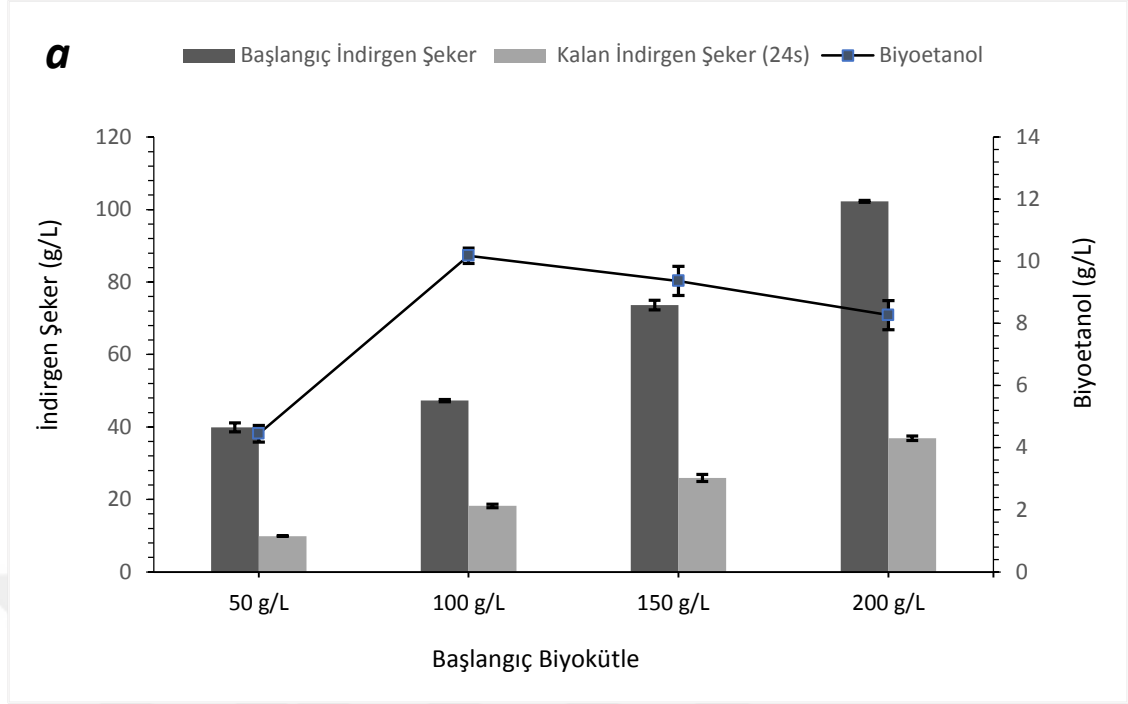
*Candida boidinii*-1 için, 50 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 39.91 g/L olarak, 24 saat sonunda ise indirgen şeker konsantrasyonu 8.76 g/L olarak tespit edilmiştir. 100 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu, 47.30 g/L iken 24 saat sonunda indirgen şeker konsantrasyonu 13.00 g/L olarak belirlenmiştir. 150 g/L başlangıç biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 73.65 g/L iken, 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 23.00 g/L'dir. 200 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 102.26 g/L iken 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 68.95 g/L olarak hesaplanmıştır (**Şekil 4.1c, Çizelge 4.1**).

*C. boidinii*-2 için 50 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 39.91 g/L olarak, 24 saat sonunda ortamda bulunan indirgen şeker konsantrasyonu 9.95 g/L olarak belirlenmiştir. 100 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 47.30 g/L iken 24 saat sonunda ortamda indirgen şeker konsantrasyonu 13.30 g/L olarak saptanmıştır. 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 73.65 g/L iken 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 18.65 g/L'dir. 200 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 102.26 g/L iken 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonunun 61.13 g/L olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.1d, Çizelge 4.1**).

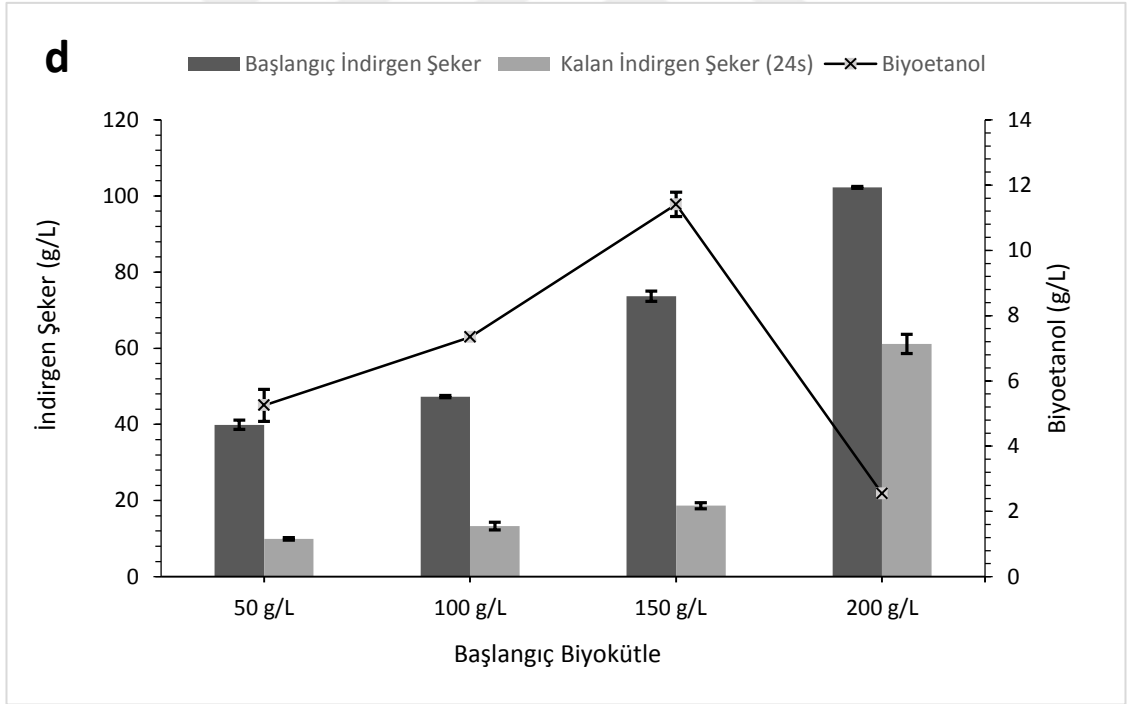
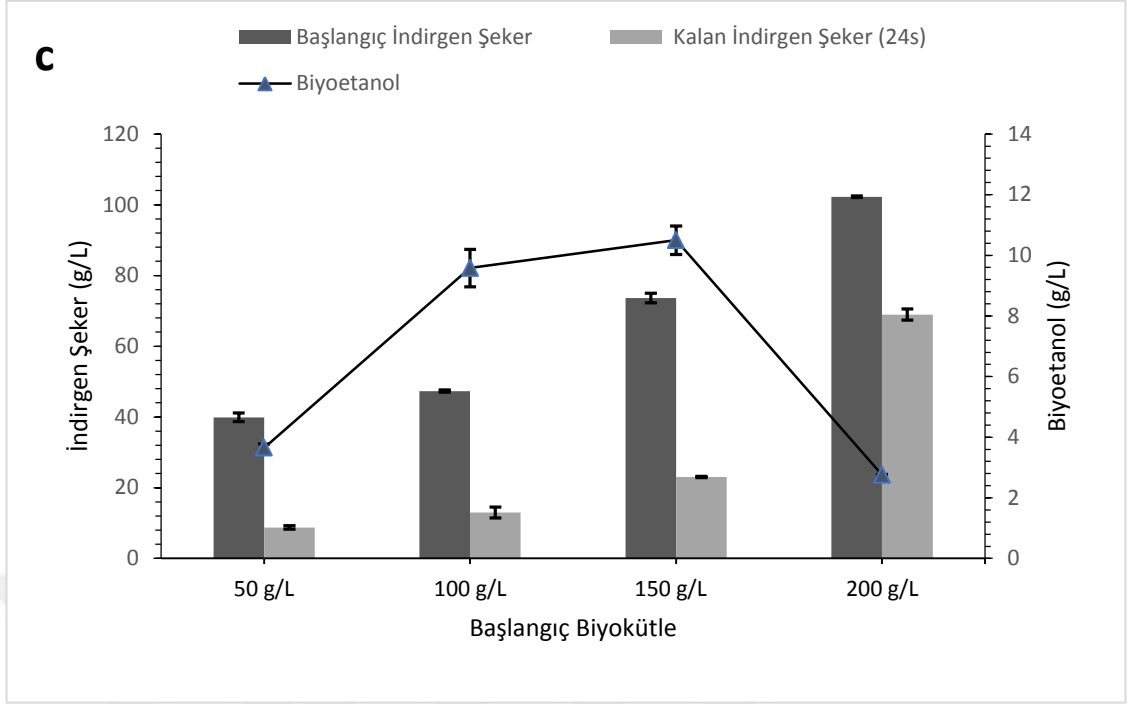
*C. boidinii* -3 için hazırlanan besiyerinde ise 50 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 39.91 g/L olarak, 24 saat sonunda ortamda bulunan indirgen şeker konsantrasyonu 9.13 g/L'dir. 100 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 47.30 g/L iken 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 14.04. g/L'dir. 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 73.65 g/L 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 23.43 g/L'dir. 200 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 102.26 g/L iken 24 saat sonunda ortamda 65.30 g/L indirgen şeker tespit edilmiştir(**Şekil 4.1e, Çizelge 4.1**).

*C. boidinii*-4 için ise 50 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 39.91 g/L olarak, 24 saat sonunda ortamda bulunan indirgen şeker konsantrasyonu 8.97 g/L'dir. 100 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 47.30 g/L iken 24 saat sonunda indirgen şeker konsantrasyonu 13.26 g/L'dir. 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 73.65 g/L 24 saat sonunda ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu 23.00 g/L'dir. 200 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 102.26 g/L iken 24 saat sonunda ortamda 64.60 g/L indirgen şeker tespit edilmiştir (**Şekil 4.1f**, **Çizelge 4.1**).

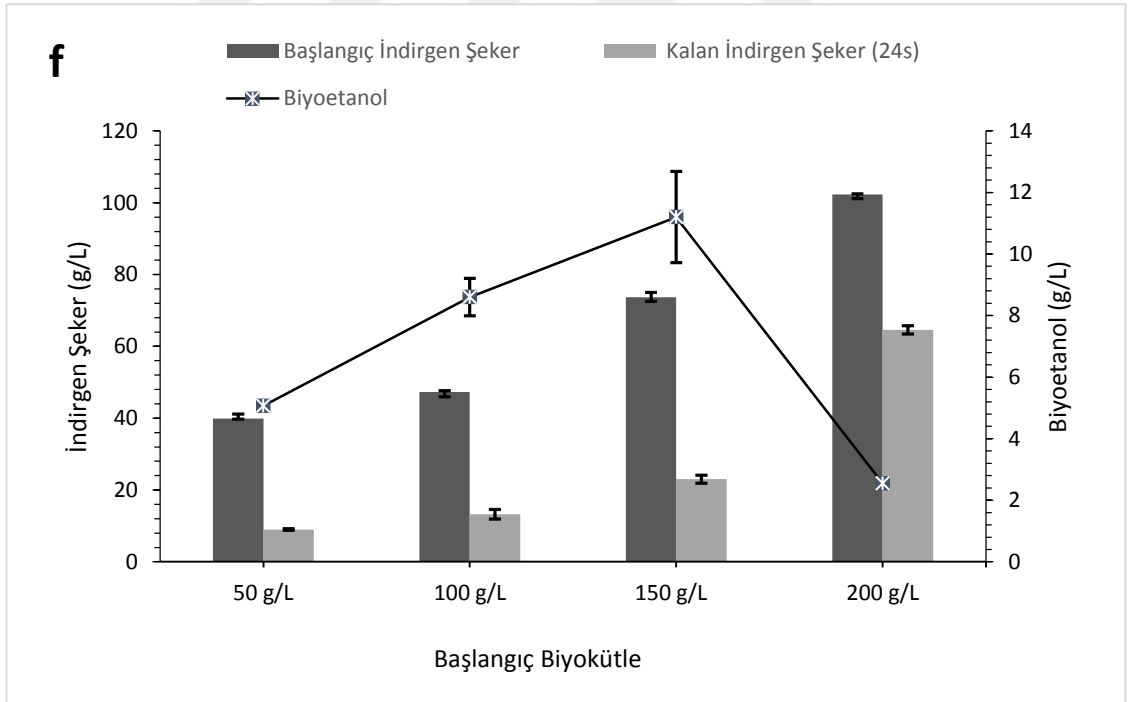
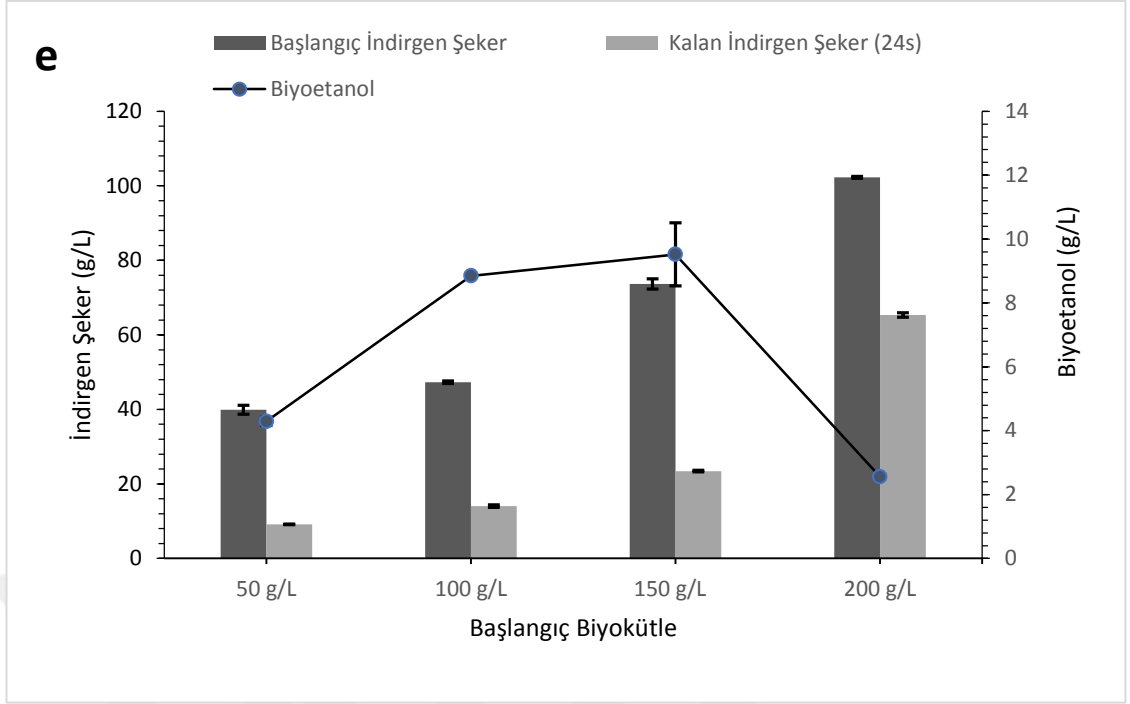




Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlardaki havuç posası miktarlarında başlangıç şeker konsantrasyonu, ortamda kalan şeker konsantrasyonu ve biyoetanol miktarı (Ön işlem: % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 C, 15 dk otoklavlama, pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C). a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitidis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlardaki havuç posası miktarlarında başlangıç şeker konsantrasyonu, ortamda kalan şeker konsantrasyonu ve biyoeetanol miktarı (Ön işlem: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 C, 15 dk otoklavlama pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C). a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4 (devam)



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlardaki havuç posası miktarlarında başlangıç şeker konsantrasyonu, ortamda kalan şeker konsantrasyonu ve biyoetanol miktarı (Ön işlem: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 C, 15 dk otoklavlama pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C). a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitidis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4 (devam)

Çizelge 4.1 Başlangıç havuç posası miktarının ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisi (Ön işlem: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

Başlangıç Biyokütle (g/L)	<i>S. cerevisiae</i>			<i>P. stipitis</i>			<i>Candida boidinii-1</i>			<i>Candida boidinii-2</i>			<i>Candida boidinii-3</i>			<i>Candida boidinii-4</i>		
	Başlan gıç şeker konsan trasyonu	Ortamda ki şeker konsantra syonu	Etanol	Başlangıç şeker konsan trasyonu	Ortamda kalan şeker konsan trasyonu	Etanol	Başlan gıç şeker konsan trasyon u	Ortamda kalan şeker konsan trasyonu	Etanol	Başlan gıç şeker konsan trasyonu	Ortamda kalan şeker konsan trasyonu	Etanol	Başlan gıç şeker konsan trasyonu	Ortamda kalan şeker konsantra syonu	Etanol	Başlan gıç şeker konsan trasyonu	Ortamda kalan şeker konsan trasyonu	Etanol
<b>50</b> (g/L)	39.91 ±1.23	9.88 ±0.06	4.45 ±0.27	39.91 ±1.23	15.28 ±0.21	4.41 ±0.49	39.91 ±1.23	8.76 ±0.52	3.65 ±0.12	39.91 ±1.23	9.95 ±0.35	5.25 ±0.49	39.91 ±1.23	9.13 ±0.11	4.29 ±0.13	39.91 ±1.23	8.97 ±0.23	5.07 ±0.06
<b>100</b> (g/L)	47.30 ±0.31	18.21 ±0.49	10.18 ±0.25	47.30 ±0.31	30.91 ±0.98	5.48 ±0.80	47.30 ±0.31	13.00 ±1.53	9.58 ±0.62	47.30 ±0.31	13.30 ±0.98	7.34 ±0.10	47.30 ±0.31	14.04 ±0.37	8.85 ±0.03	47.30 ±0.31	13.26 ±1.35	8.6 ±0.61
<b>150</b> (g/L)	73.65 ±1.35	25.91 ±0.98	9.37 ±0.47	73.65 ±1.35	54.86 ±0.61	2.66 ±0.02	73.65 ±1.35	23.00 ±0.18	10.50 ±0.47	73.65 ±1.35	18.65 ±0.79	11.41 ±0.37	73.65 ±1.35	23.43 ±0.21	9.52 ±0.99	73.65 ±1.35	23.00 ±1.13	11.2 ±1.48
<b>200</b> (g/L)	102.26 ±0.24	36.86 ±0.61	8.27 ±0.47	102.26 ±0.61	61.56 ±0.73	2.77 ±0.28	102.26 ±0.24	68.95 ±1.59	2.76 ±0.01	102.26 ±0.24	61.13 ±2.52	2.55 ±0.02	102.26 ±0.24	65.30 ±0.61	2.56 ±0.08	102.26 ±0.24	64.60 ±1.16	2.55 ±0.02

121 C, 15 dk otoklavlama pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C)

Havuç posalarının %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 121  C sıcaklıkta 15 dakika ön işleme tabi tutulmaları sonucu, *S. cerevisiae* için 24. saat sonunda ve 50 g/L baŐlangi biyokütle konsantrasyonunda 4.45±0.27 g/L, 100 g/L havuç posası kullanıldığında 10.18±0.25g/L etanol elde edilmiştir. 150 g/L ve 200 g/L havuç posası kullanıldığında ise sırasıyla 9.37 ±0.47g/L ve 8.27±0.47g/L etanol elde edilmiştir (**Şekil 4.1a, izelge 4.1**).

*Pichia stipitis* için ise 50 g/L havuç posası kullanıldığında 4.41±0.49g/L, 100 g/L havuç posası kullanıldığında 5.48±0.80g/L, 150 g/L ve 200 g/L havuç posası kullanıldığında ise 2.66±0.02g/L ve 2.77±0.28 g/L etanol elde edilmiştir (**Şekil 4.1b, izelge 4.1**).

*Candida boidinii*-1 için 50 g/L havuç posası kullanıldığında 3.65±0.12 g/L, 100 g/L havuç posası kullanıldığında 9.58±0.62 g/L, 150 g/L ve 200 g/L havuç posası kullanıldığında ise 10.50±0.47g/L ve 2.76±0.01 g/L etanol elde edilmiştir (**Şekil 4.1c, izelge 4.1**).

*Candida boidinii* -2 için 50 g/L havuç posası kullanıldığında 5.25±0.49 g/L, 100 g/L havuç posası kullanıldığında 7.34±0.10 g/L, 150 g/L ve 200 g/L havuç posası kullanıldığında ise 11.41±0.37 g/L ve 2.55±0.02 g/L etanol elde edilmiştir (**Şekil 4.1d, izelge 4.1**).

*Candida boidinii*-3 için 50 g/L havuç posası kullanıldığında 4.29±0.13 g/L, 100 g/L havuç posası kullanıldığında 8.85±0.03 g/L, 150 g/L ve 200 g/L havuç posası kullanıldığında ise 9.52±0.99 g/L ve 2.56±0.08 g/L etanol elde edilmiştir (**Şekil 4.1e, izelge 4.1**).

*Candida boidinii*-4 olarak kodlanan izolat için 50 g/L havuç posası kullanıldığında 5.07±0.06 g/L, 100 g/L havuç posası kullanıldığında 8.60±0.61 g/L, 150 g/L ve 200 g/L havuç posası kullanıldığında ise 11.20±1.48 g/L ve 2.55±0.02 g/L etanol elde edilmiştir (**Şekil 4.1f, izelge 4.1**).

Çalışmalar sonucunda *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia stipitis* için optimum hammadde konsantrasyonu, 100 g/L, yeni izolatlar için ise 150 g/L olarak tespit edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda deney ortamları bu şekilde hazırlanmıştır.

#### 4.2 Enzimatik Hidrolizin Biyoetanol Üretimine Etkisi

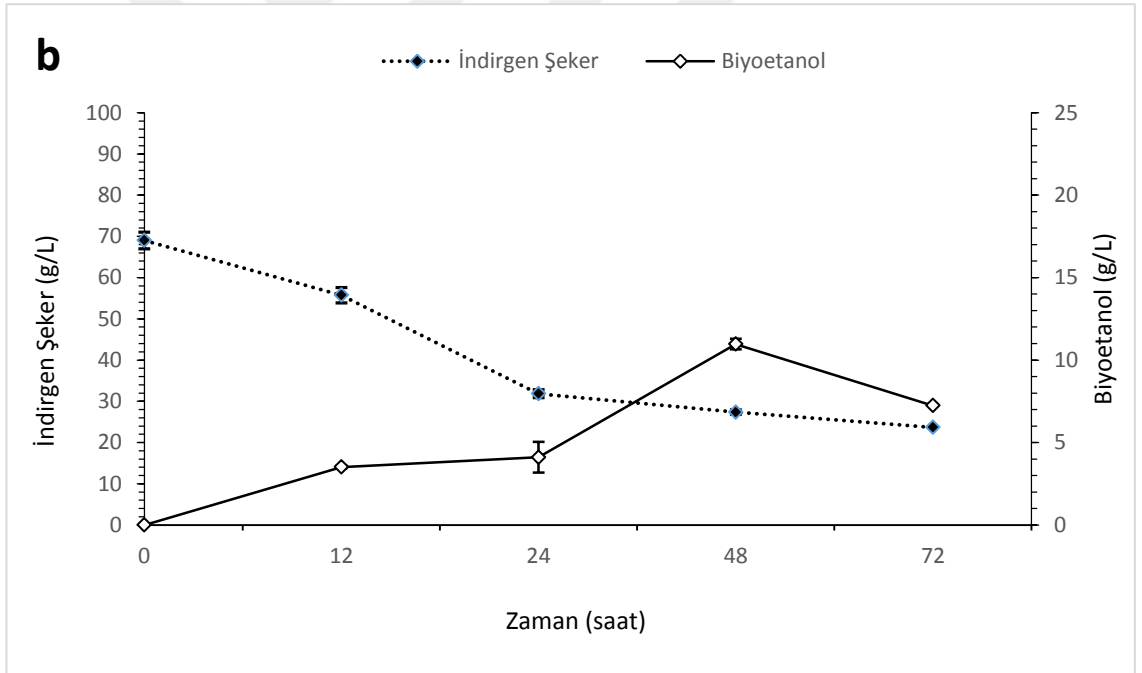
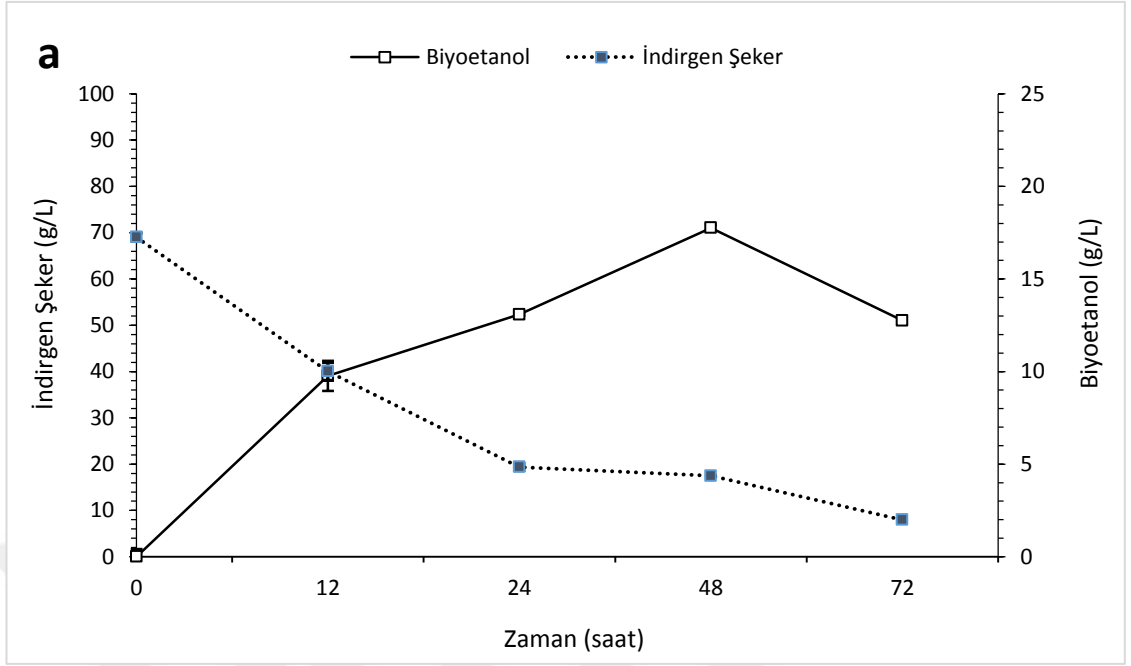
Selüloz, bitki hücre duvarlarının ana bileşenidir ve doğada biyolojik bozulmaya karşı dirençlidir (Wang vd., 2012). Bu nedenle, enzimatik hidroliz, lignoselülozik biyokütlenin etanole dönüştürülmesi için çok önemli bir süreçtir (Fan, 2014). Enzimatik hidroliz deneyleri, 15 U/mL hemiselülaz (Sigma Aldrich/USA, CAS: 9025-56-3) ile 15 FPU/g substrat selülaz (CellicCTec 2, Novozymes/Danimarka) ilave edilen 100 g/L ve 150 g/L havuç posası içeren deney ortamında gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon deneyleri başlatılmadan önce enzimlerin biyokütleyle olan etkilerinin tespit edilmesi amacıyla farklı başlangıç biyokütlelerin şeker konsantrasyonlarının tayini yapılmıştır (Çizelge 4.2).

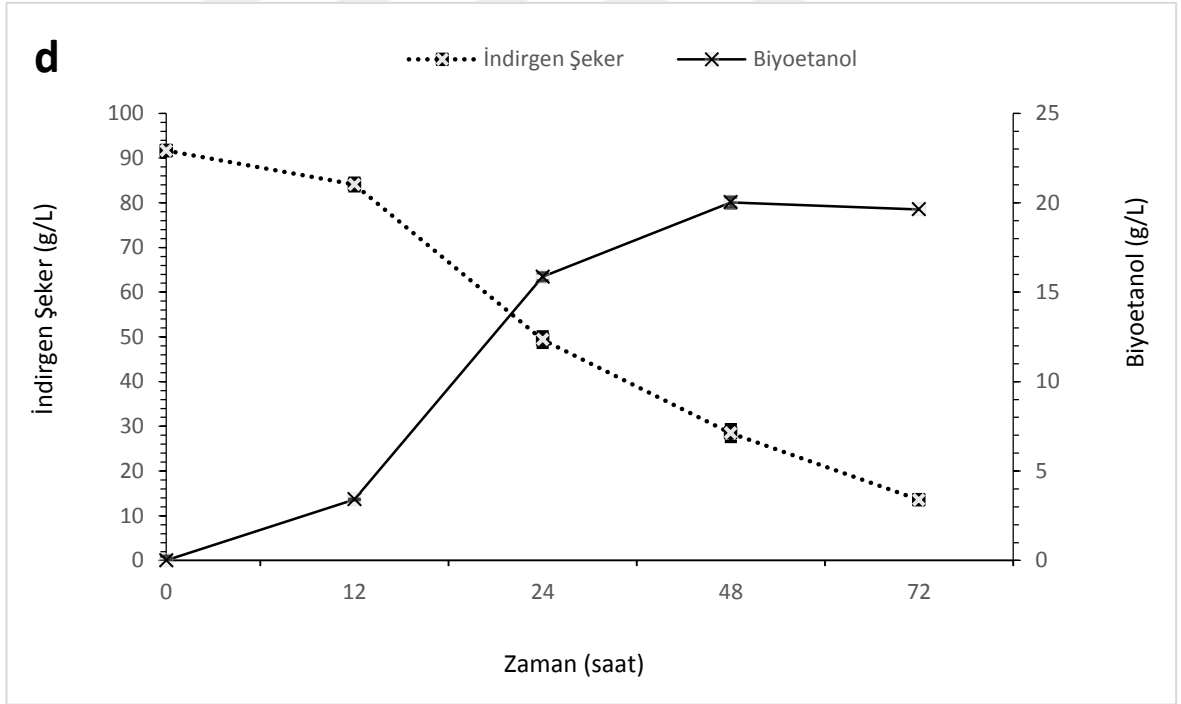
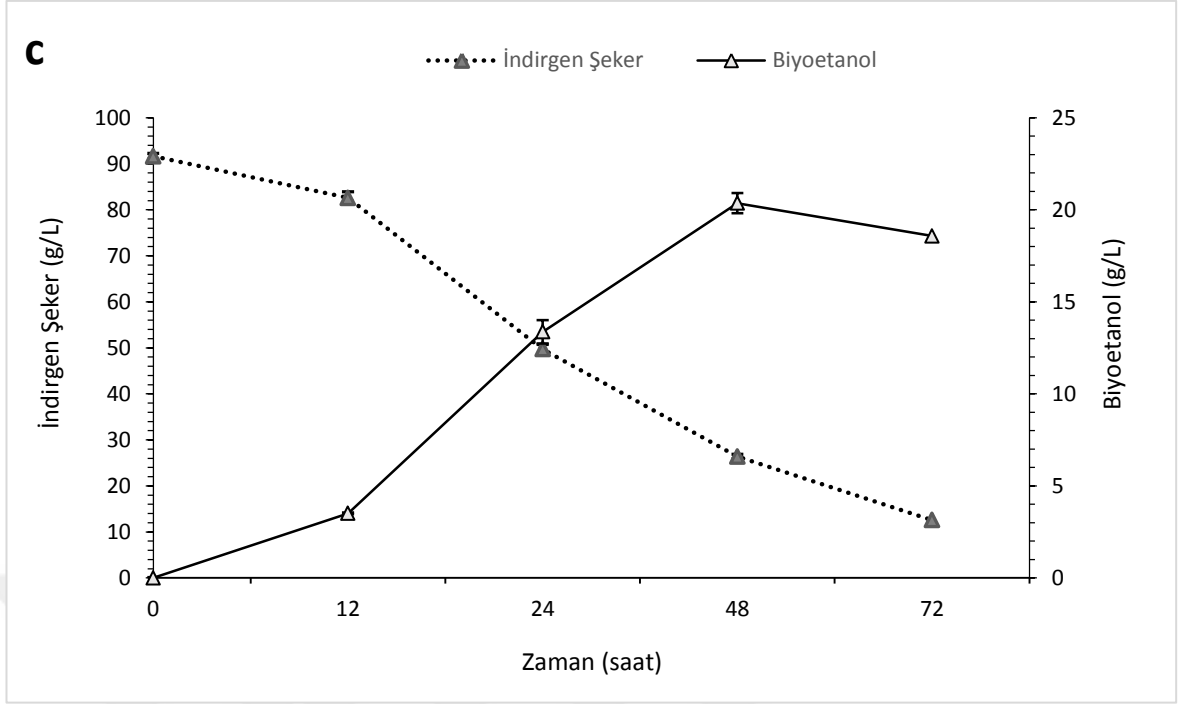
Çizelge 4.2 Farklı başlangıç biyokütle konsantrasyonlarında enzimatik hidroliz öncesi ve sonrası şeker konsantrasyonu (Ön işlem koşulları: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selülaz, 15 U/mL hemiselülaz, pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm)

Başlangıç Biyokütle (g/L)	Enzimatik Hidroliz Öncesi (g/L)	Enzimatik Hidroliz Sonrası (g/L)
100 (g/L)	47.30	69.04
150 (g/L)	73.65	91.65

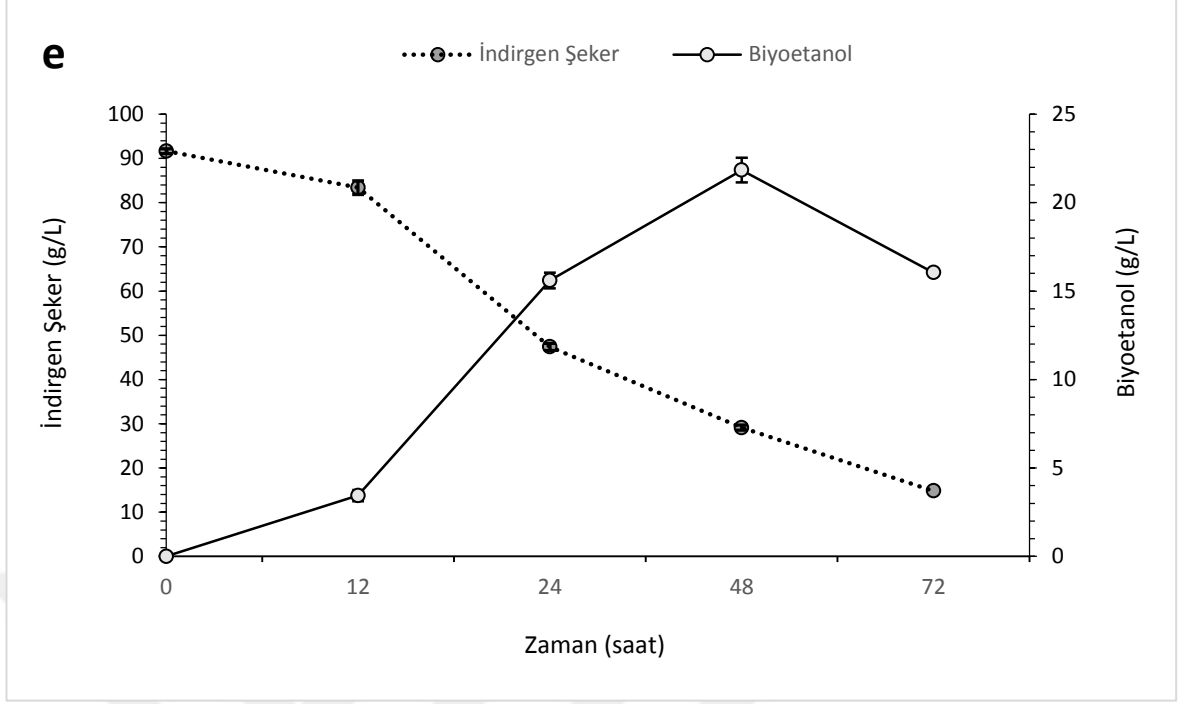
İndirgen şeker konsantrasyonu, fermentasyon ve enzimatik hidrolizden önce sırasıyla 100 g/L ve 150 g/L biyokütle içeren ortamda, 47.30 g/L ve 73.65 g/L olarak tespit edilmiştir. Ancak enzimatik hidroliz sonrasında bu miktar 100 g/L ve 150 g/L biyokütle içeren ortamda sırasıyla 69.04 g/L ve 91.65 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan selülaz ve hemiselülaz enzimleri biyokütlenin parçalanmasını sağladığından ortamdaki şeker ve biyoetanol konsantrasyonları artmış olup, sonuçlar Şekil 4.2 ve Çizelge 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.2 Enzimatik hidrolizin etanol üretimine ve indirgen şeker konsantrasyonuna etkisi (Ön işlem koşulları: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselüloz fermentasyon koşulu: pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm) a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4



Şekil 4.2 Enzimatik hidrolizin etanol üretimine ve indirgen şeker konsantrasyonuna etkisi (devam) (Ön işlem koşulları: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selülaz, 15 U/mL hemiselülaz fermentasyon koşulu: pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm) a) *S. cerevisiae* b) *P.stipitis* c) *C. boidinii-1* d) *C. boidinii-2* e) *C. boidinii-3* f) *C. boidinii-4* (devam)



Şekil 4.2 Enzimatik hidrolizin etanol üretimine ve indirgen şeker konsantrasyonuna etkisi (devam)(Ön işlem koşulları: 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selülaz, 15 U/mL hemiselülaz fermentasyon koşulu: pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm) a) *S. cerevisiae* b) *P.stipitis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C.boidinii*-3 f) *C.boidinii*-4 (devam)

Çizelge 4.3 Enzimatik hidrolizin, farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında etanol üretimine etkisi (Ön işlem koşulları: 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselüloz, fermentasyon koşulu:

Mikroorganizma	Başlangıç Biyokütle (g/L)	Zaman (saat)			
		12	24	48	72
<i>S.cerevisiae</i>	100 (g/L)	9.77 ±0.41	13.08 ±0.81	17.76 ±0.07	12.75 ±0.16
<i>P.stipitis</i>	100 (g/L)	3.51 ±0.04	4.10 ±0.09	10.97 ±0.93	7.24 ±0.32
<i>C.boydini-1</i>	150 (g/L)	3.51 ±0.04	13.37 ±0.05	20.36 ±0.64	18.58 ±0.55
<i>C.boydini-2</i>	150 (g/L)	3.41 ±0.24	15.86 ±0.02	20.02 ±0.23	19.63 ±0.31
<i>C.boydini-3</i>	150 (g/L)	3.44 ±0.06	15.60 ±0.32	21.84 ±0.44	16.05 ±0.69
<i>C.boydini-4</i>	150 (g/L)	4.09 ±0.40	17.19 ±0.17	19.97 ±0.75	18.57 ±0.67

pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm)

Buna göre, *S. cerevisiae* 12. saatte 9.77±0.41 g/L etanol üretmiştir. 24. saatte ise etanol miktarı 13.08±0.81 g/L iken, 48. saatte etanol miktarı en yüksek seviyeye çıkmış ve 17.76±0.07 g/L olarak bulunmuştur. 72. saatte ise etanol üretiminde düşüş yaşanmış olup, 12.75±0.16 g/L etanol tespit edilmiştir (Şekil 4.2a, Çizelge 4.3).

*P.stipitis*'in ürettiği etanol miktarı 12. saatte  $3.51\pm 0.04$  g/L olarak belirlenmiştir. 24. saatte ise etanol miktarı  $4.10\pm 0.09$  g/L olmuştur. 48. saatte  $10.97\pm 0.93$  g/L etanol üretilmiş olup 72. saatte ise düşüş yaşanmış ve  $7.24\pm 0.32$  g/L etanol üretilmiştir (**Şekil 4.2b, Çizelge 4.3**).

*C. boidinii-1* ise 12. saatte  $3.51\pm 0.04$  g/L etanol üretirken 24. saatte ürettiği etanol miktarı  $13.37\pm 0.05$  g/L'dir. 48. saatte etanol miktarı  $20.36\pm 0.64$  g/L ile en yüksek konsantrasyona ulaşmıştır. 72. saatte ise etanol konsantrasyonu  $18.58\pm 0.55$  g/L'ye gerilemiştir (**Şekil 4.2c, Çizelge 4.3**).

İzole edilen bir diğer maya *C. boidinii-2*, 12. saatte  $3.41\pm 0.24$  g/L etanol üretmiştir. 24. saatte ise etanol miktarı  $15.86\pm 0.02$  g/L olarak tespit edilmiştir. 48. saatte etanol miktarı en yüksek seviyeye çıkmış ve  $20.02\pm 0.23$  g/L olarak bulunmuştur. 72. saatte ise etanol üretiminde düşüş yaşanmış olup,  $19.63\pm 0.31$  g/L etanol tespit edilmiştir (**Şekil 4.2d, Çizelge 4.3**).

*C. boidinii-3*'ün 12. saatte ürettiği etanol miktarı  $3.44\pm 0.06$  g/L olarak belirlenmiştir. 24. saatte ortamdaki etanol miktarı  $15.60\pm 0.32$  g/L olarak ölçülmüştür. Diğer mayalar gibi en yüksek etanol üretilen zaman 48. saat olup,  $21.84\pm 0.44$  g/L etanol tespit edilmiştir. 72. Saatte üretilen etanol miktarı  $16.05\pm 0.69$  g/L olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.2e, Çizelge 4.3**).

*C. boidinii-4* ise 12. saatte  $4.09\pm 0.40$  g/L etanol üretirken, 24. saatte ürettiği etanol miktarı ise  $17.19\pm 0.17$  g/L olup, diğer mayalar gibi 48. saatte etanol miktarı  $19.97\pm 0.75$  g/L ile en yüksek konsantrasyona ulaşmıştır. 72. saatte ise etanol konsantrasyonu  $18.57\pm 0.67$  g/L olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.2f, Çizelge 4.3**).

Enzimatik hidrolizin ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonuna etkisine ilişkin sonuçlar **Çizelge 4.4**'te sunulmaktadır.

Çizelge 4.4 Farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında enzimatik hidrolizin ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonuna (g/L) etkisi Ön işlem: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 C, 15 dk otoklavlama pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C)

Mikroorganizma	Başlangıç Biyokütle (g/L)	Zaman (saat)/ İndirgen şeker konsantrasyonu (g/L)				
		C <sub>0</sub>	12	24	48	72
<i>S.cerevisiae</i>	100 (g/L)	69.04 ±0.36	40.04 ±0.89	19.39 ±1.93	17.47 ±0.71	7.97 ±0.03
<i>P.stipitis</i>	100 (g/L)	69.04 ±0.36	55.74 ±2.02	31.82 ±1.87	27.35 ±0.98	23.69 ±0.55
<i>C.boydinii-1</i>	150 (g/L)	91.65 ±0.36	82.60 ±0.61	49.73 ±1.35	26.39 ±1.04	12.58 ±0.49
<i>C.boydinii-2</i>	150 (g/L)	91.65 ±0.36	84.08 ±1.11	49.39 ±1.41	28.47 ±1.75	13.56 ±1.90
<i>C.boydinii-3</i>	150 (g/L)	91.65 ±0.36	83.39 ±0.55	47.39 ±1.54	29.13 ±0.79	14.82 ±0.57
<i>C.boydinii-4</i>	150 (g/L)	91.65 ±0.36	85.73 ±2.15	35.39 ±1.50	28.47 ±0.31	12.95 ±1.44

Çizelge 4.4'e göre *S.cerevisiae* için 100 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 69.04 g/L iken 12. saatte ortamdaki şeker konsantrasyonu 40.04 g/L, 24. Saatte 19.39 g/L, 72. Saatte 17.47 g/L ve 96. Saatte 7.97 g/L'ye düşmüştür.

*P.stipitis* için 100 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 69.04 g/L iken, 12. saatte bu konsantrasyon 55.74 g/L olmuştur. 24. saatte ise düşüş gözlenmiş ve 31.82 g/L olarak belirlenmiştir. 48. Saatte 27.35 g/L ve 72. saatte ise 23.69 g/L indirgen şeker ortamda kalmıştır.

*C.boydinii*-1 için ise 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 91.65 g/L olarak belirlenmiştir. İndirgen şeker konsantrasyonu zamana bağlı olarak değişim göstermiştir. 12. saatte ortamda 82.60 g/L indirgen şeker bulunurken, 24. saatte 49.73 g/L, 48. saatte 26.39 g/L ve 72. saatte 12.58 g/L indirgen şeker deney ortamında tespit edilmiştir.

*C.boydinii*-2 için 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 91.65 g/L'dir. 12. saatte ortamda 84.08 g/L, 24. saatte 49.39 g/L, 48. saatte 28.47 g/L indirgen şeker bulunurken, 72. saatte 13.56 g/L indirgen şeker tespit edilmiştir.

*C.boydinii*-3 için de 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 91.65 g/L olarak belirlenmiştir. 12. saatte ortamda 83.39 g/L indirgen şeker bulunurken, 24. saatte bu miktarda düşüş gözlenmiş ve 47.39 g/L olarak belirlenmiştir. 48. saatte ise ortamda 29.13 g/L ve 72. saatte 14.82 g/L indirgen şeker tespit edilmiştir.

*C.boydinii*-4 için de 150 g/L biyokütle içeren ortamda başlangıç indirgen şeker konsantrasyonu 91.65 g/L'dir. 12. saatte ortamda 85.73 g/L, 24. saatte 35.39 g/L, 48. saatte 28.47 g/L ve 72. saatte 12.95 g/L indirgen şeker tespit edilmiştir.

### **4.3 Enzimatik Hidrolizin Mikrobiyal Gelişime Etkisi**

Tez çalışmasında enzimatik hidrolizin mikrobiyal gelişime etkisi de incelenmiştir. *S. cerevisiae* 96. saatte 3.73 g/L kuru ağırlığa ulaşmıştır. *P. stipitis*'in kuru ağırlığı 96. saatte 2.20 g/L'ye ulaşmıştır. *Candida boydinii*-1, 96. Saatte 2.88 g /L, *Candida boydinii*-2, 2.73 g/L, *Candida boydinii*-3, 2.52 g /L, *Candida boydinii*-4'ün ise 2.88 g /L kuru ağırlığa ulaştığı hesaplanmıştır (**Çizelge 4.5**).

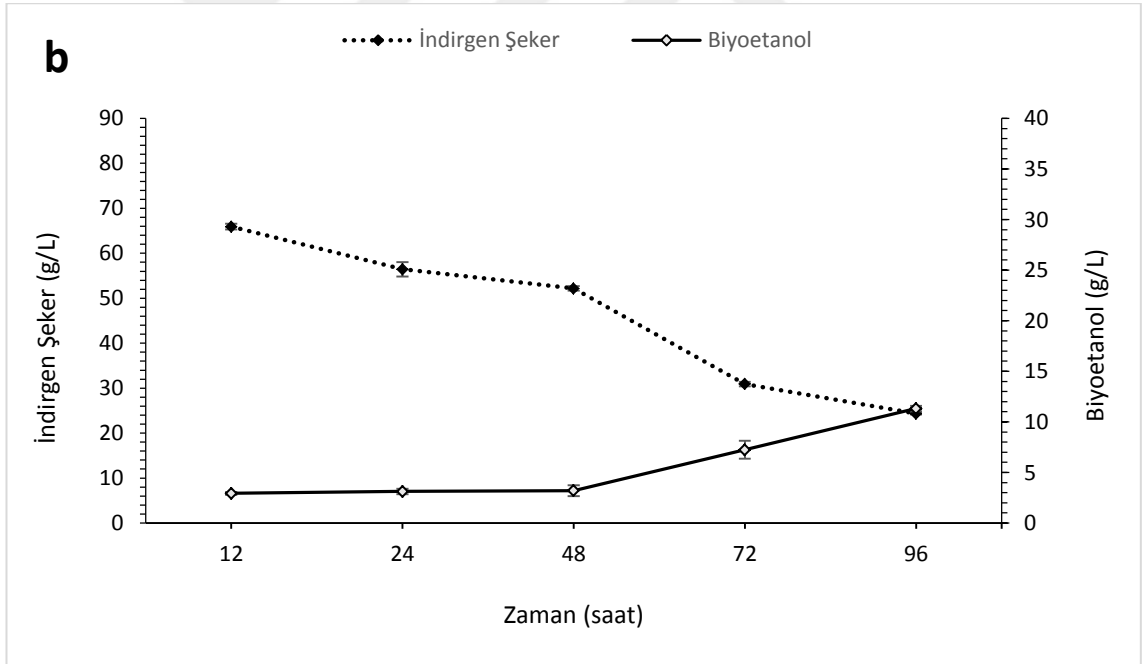
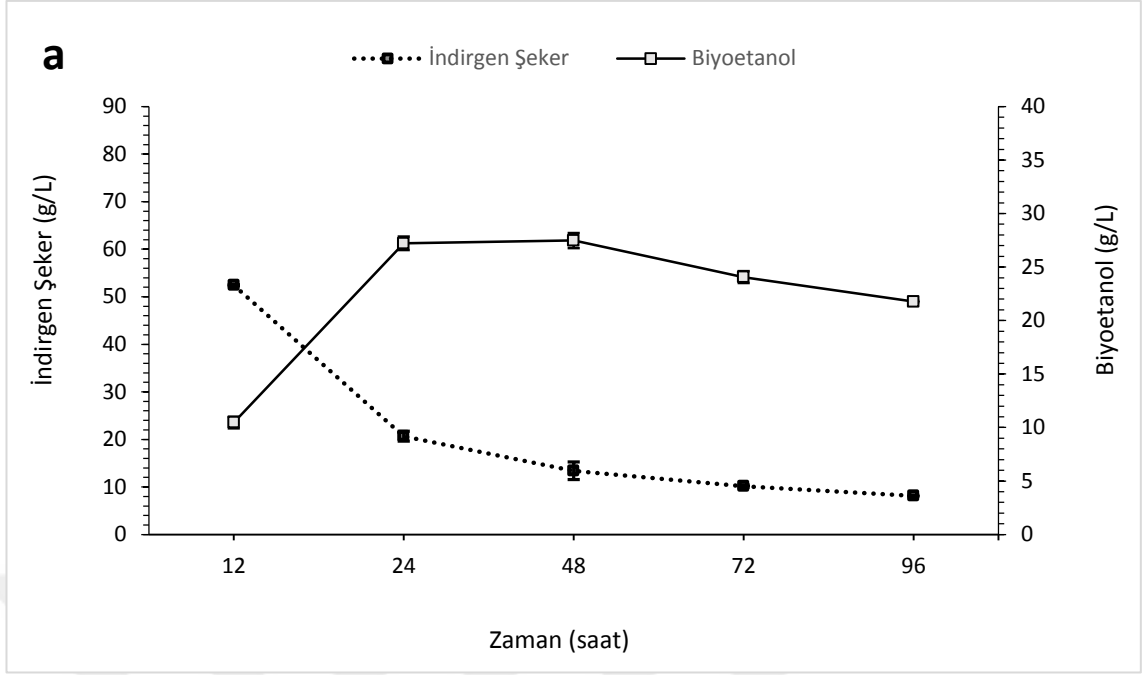
Çizelge 4.5 Enzimatik hidrolizin mikrobiyal gelişime etkisi (g/L) (Ön işlem: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 C, 15 dk otoklavlama pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C)

Mikroorganizma	Başlangıç Biyokütle (g/L)	Mikrobiyal gelişim (g/L)				
		Zaman (saat)				
		12	24	48	72	96
<i>S.cerevisiae</i>	100 (g/L)	1.77	3.46	3.65	3.71	3.73
<i>P.stipitis</i>	100 (g/L)	0.13	1.64	1.91	1.94	2.20
<i>C.boydini-1</i>	150 (g/L)	1.04	1.95	2.33	2.41	2.88
<i>C.boydini-2</i>	150 (g/L)	1.02	2.03	2.38	2.43	2.73
<i>C.boydini-3</i>	150 (g/L)	1.10	1.84	2.06	2.28	2.52
<i>C.boydini-4</i>	150 (g/L)	1.26	2.30	2.59	2.84	2.88

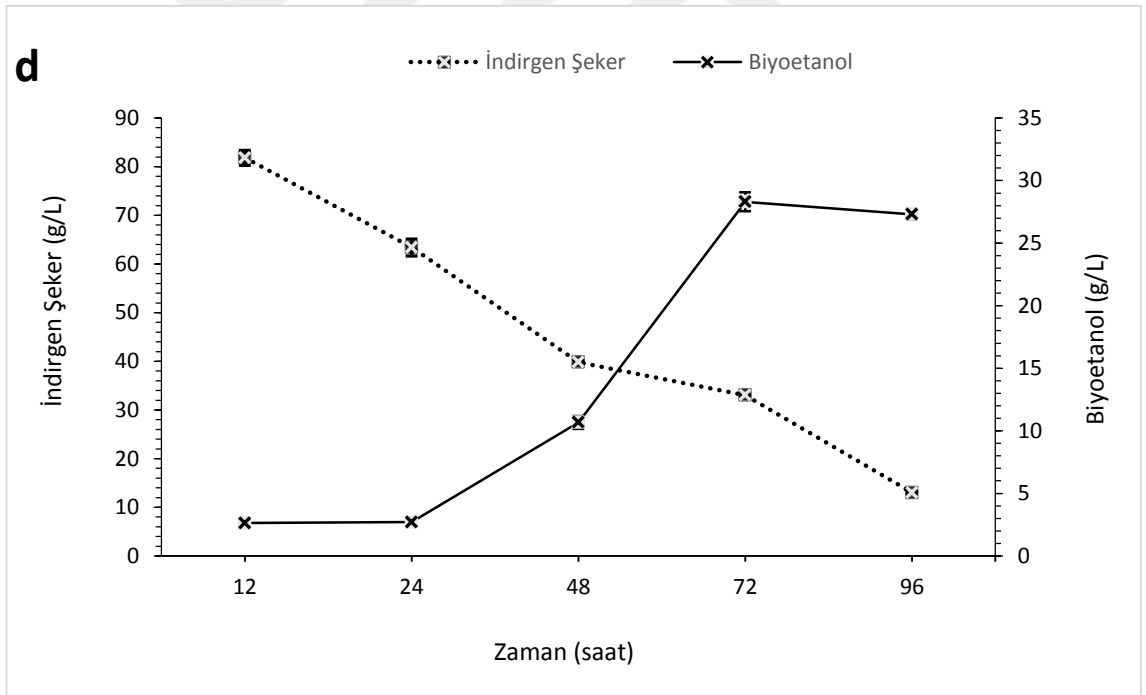
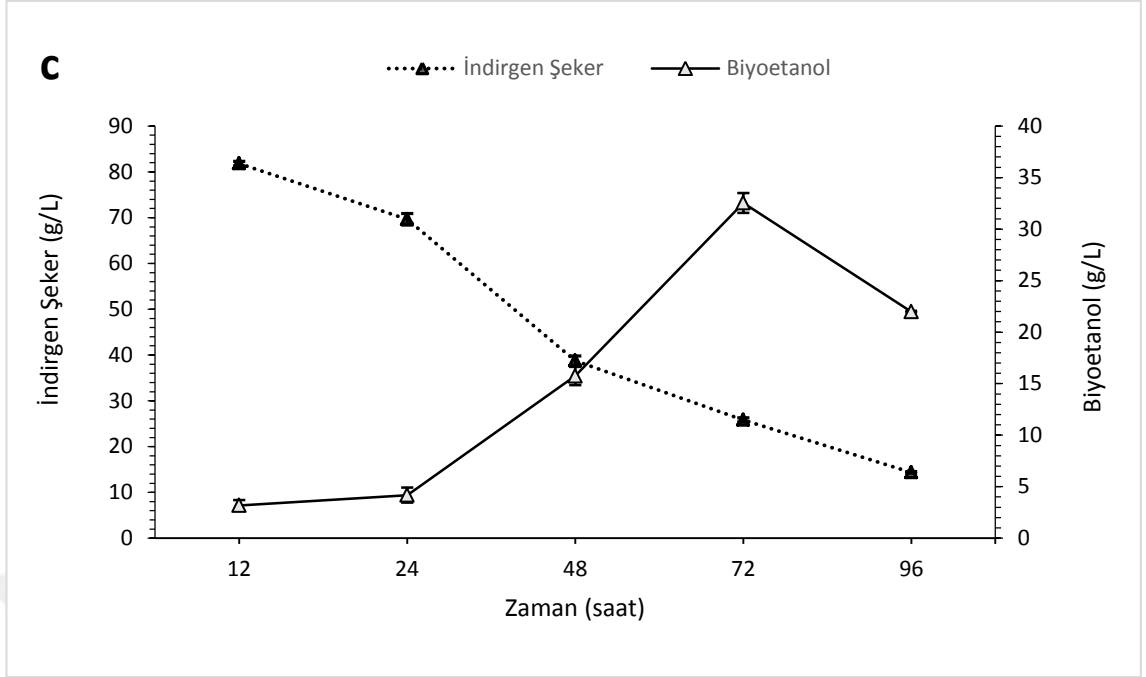
#### 4.4 Besiyeri Katkılamaının Biyoetanol Üretimine Etkisi

Maya hücreleri, büyüme ortamında milimolar düzeyde makro besinlere (karbon, nitrojen, oksijen, kükürt, fosfor, potasyum ve magnezyum kaynakları) ve mikromolar seviyede ise eser elementlere (örn.,  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ) ihtiyaç duymaktadır (Walker, 2009). Bu nedenle besiyeri katkılması, fermantasyon ve etanol üretimini artırmak için çok önemlidir. Örneğin ortama azot kaynaklarının eklenmesi ürün oluşumunu değiştirebilir. Ortama amino asitler eklendiğinde etanol artarken gliserol verimi azalmaktadır (Albers vd., 1996). Mineral tuzlar ise, fermantasyon sırasında çeşitli işlemlerde bir yardımcı faktör olarak katkıda bulunmaktadır (Rees ve Stewart, 1997). Ayrıca,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ve maya ekstraktının etanol üretimi üzerindeki olumlu etkileri de literatürde bildirilmiştir (Kaewkrajay vd., 2014). Tatlı sorgum suyuna azot kaynağı olarak 3.0 g/L maya özütü ve 5.0 g/L pepton eklenen bir çalışmada etanol konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Laopaiboon vd., 2009).

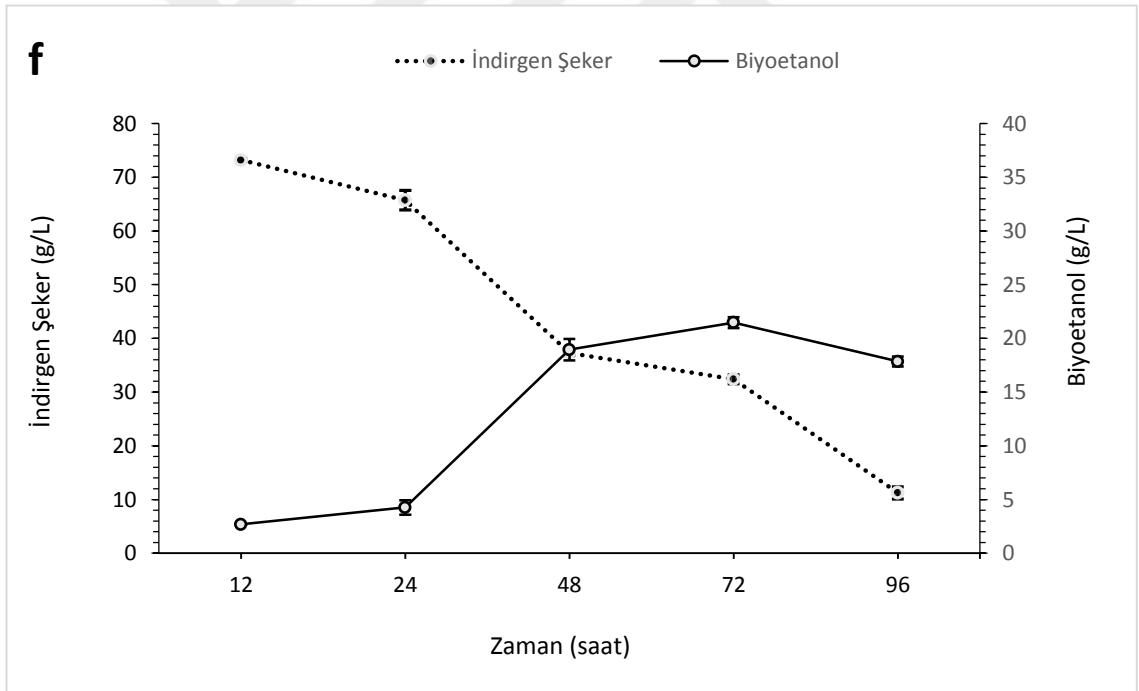
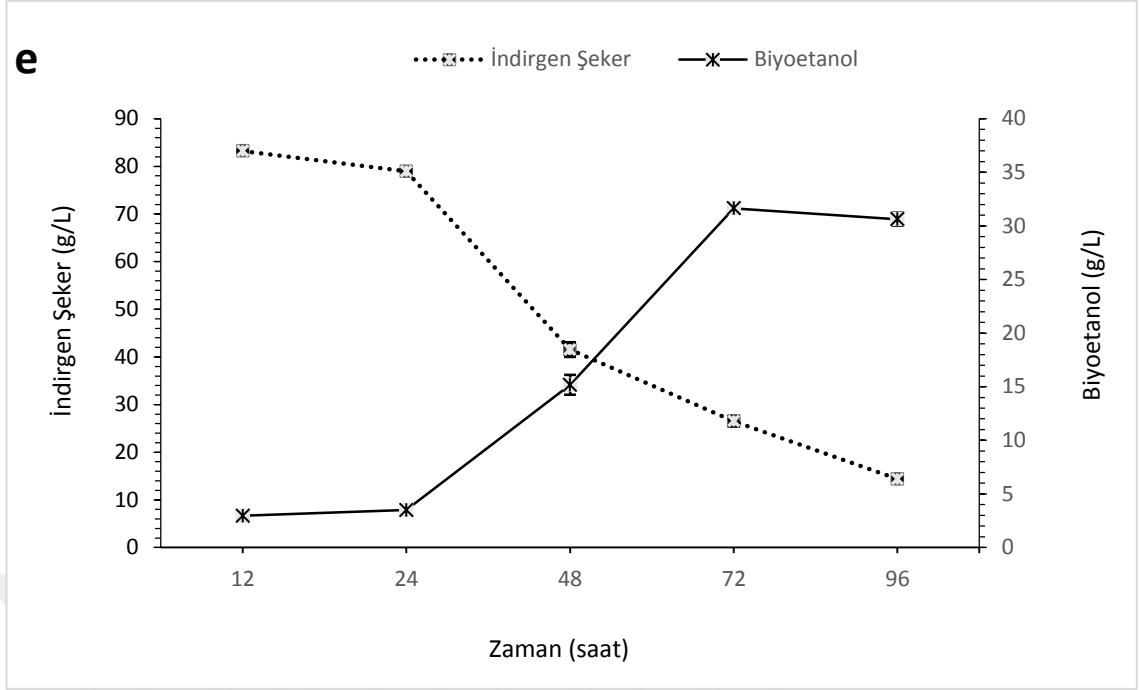
Bu nedenlerle tez çalışması kapsamında, mineral ve azot kaynağı olarak 5.0 g/L pepton, 3.0 g/L maya özütü, 0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.0 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.1 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ve 0.05 g/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , deney ortamına ilave edilmiştir. **Şekil 4.3** ve **Çizelge 4.6**, enzimatik olarak hidrolize edilmiş ve farklı katkı maddeleri ile takviye edilmiş havuç posasından etanol üretimini göstermektedir.



Şekil 4.3 Besiyeri katkılmasının farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında kullanılan şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisi Ön işlem: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121 C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselüloz, Katkılama; pepton (5 g/L), maya özütü (3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.1 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.05 g/L), pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C). a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4



Şekil 4.3 Besiyeri katkılamaasının farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında kullanılan şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisi (devam) (%1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 dk otoklavlama 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselüloz, Katkılama; pepton (5 g/L), maya özütü (3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.1 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.05 g/L), pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C). a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4 (devam)



Şekil 4.3 Besiyeri katkılamaasının farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında kullanılan şeker konsantrasyonu ve etanol üretimine etkisi (devam) (%1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselülaz, Katkılama; pepton (5 g/L), maya özütü (3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.1 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.05 g/L), pH:5, çalkalama hızı: 100 rpm, T: 30 °C). a) *S. cerevisiae* b) *P. stipitis* c) *C. boidinii*-1 d) *C. boidinii*-2 e) *C. boidinii*-3 f) *C. boidinii*-4 (devam)

Çizelge 4.6 Besiyeri katkılması ile enzimatik hidrolizin etanol üretimine etkisi (Ön işlem koşulları: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selülaz, 15 U/mL hemiselülaz, Katkılama; pepton (5 g/L), maya özütü (3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.1 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.05 g/L), pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm)

Mikroorganizma	Başlangıç biyokütle (g/L)	Biyoeanol (g/L)				
		Zaman (saat)				
		12	24	48	72	96
<i>S. cerevisiae</i>	100 (g/L)	10.47 ±0.54	27.21 ±0.63	27.48 ±0.71	24.06 ±0.56	21.77 ±0.07
<i>P. stipitis</i>	100 (g/L)	2.93 ±0.14	3.13 ±0.27	3.20 ±0.54	7.24 ±0.32	11.32 ±0.39
<i>Candida boidinii-1</i>	150 (g/L)	3.19 ±0.52	4.18 ±0.73	15.75 ±0.88	32.55 ±0.96	21.99 ±0.07
<i>Candida boidinii-2</i>	150 (g/L)	2.63 ±0.18	2.71 ±0.1	10.67 ±0.52	28.31 ±0.75	27.31 ±0.39
<i>Candida boidinii-3</i>	150 (g/L)	2.96 ±0.12	3.50 ±0.11	15.17 ±0.93	31.64 ±0.19	30.63 ±0.61
<i>Candida boidinii-4</i>	150 (g/L)	2.68 ±0.02	4.26 ±0.68	18.95 ±0.99	21.47 ±0.51	17.85 ±0.47

Bu sonuçlara göre, *S. cerevisiae* 12. Saatte 10.47±0.54 g/L etanol üretmişken bu miktar 24. saatte 27.21±0.63 g/L ve 48. saatte 27.48±0.71 g/L olmuştur. Etanol miktarı 72. Saatte ise 24.06±0.56 g/L'ye, 96. saatte ise 21.77±0,07 g/L'ye düşmüştür (Şekil 4.3a, Çizelge 4.6).

*P. stipitis* ise diğer mayalara göre daha uzun sürede yüksek miktarda etanol üretmiştir. En yüksek etanol üretimi 96. saatte  $11.32 \pm 0.39$  g/L olmuştur (**Şekil 4.3b, Çizelge 4.6**).

Besiyeri katkılanması yeni izole edilmiş mayaların etanol üretimine de olumlu katkıda bulunmuştur. *Candida boidinii-1* 12. Saatte  $3.19 \pm 0.52$  g/L etanol 24. Saatte  $4.18 \pm 0.73$  g/L 48. ve 72. saatlerde sırasıyla  $15.75 \pm 0.88$  g/L ve  $32.55 \pm 0.96$  g/L etanol üretmiştir. 96. Saatte ise düşüş gerçekleşmiş ve  $21.99 \pm 0.07$  g/L etanol üretmiştir (**Şekil 4.3c, Çizelge 4.6**).

*Candida boidinii-2* 12, 24, 48. saatlerde sırasıyla  $2.63 \pm 0.18$  g/L,  $2.71 \pm 0.1$  g/L ve  $10.67 \pm 0.52$  g/L etanol üretmişken 72. Saatte  $28.31 \pm 0.75$  g/L ile en yüksek etanol konsantrasyonuna ulaşmıştır. 96. Saatte ise  $27.31 \pm 0.39$  g/L etanol üretilmiştir (**Şekil 4.3d, Çizelge 4.6**).

*Candida boidinii-3*, 12. ve 24. saatlerde sırasıyla  $2.96 \pm 0.12$  g/L,  $3.50 \pm 0.11$  g/L, 48. Saatte  $15.17 \pm 0.93$  g/L etanol üretmişken bu miktar 72. saatte  $31.64 \pm 0.19$  g/L olmuştur. 96. Saatte ise üretim azalmış ve  $30.63 \pm 0.61$  g/L olarak belirlenmiştir (**Şekil 4.3e, Çizelge 4.6**).

*C. boidinii-4* ise 12, 24, 48. saatlerde sırasıyla  $2.68 \pm 0.02$  g/L,  $4.26 \pm 0.68$  g/L,  $18.95 \pm 0.99$  g/L etanol üretmiştir. 72 ve 96. Saatlerde ise sırasıyla  $21.47 \pm 0.51$  g/L ve  $17.85 \pm 0.47$  g/L üretim gerçekleşmiştir (**Şekil 4.3f, Çizelge 4.6**).

Ortama yapılan katkılama sonucu fermentasyon sırasında çalışma ortamında kalan şeker konsantrasyonları da hesaplanmıştır (**Çizelge 4.7**)

Çizelge 4.7 Besiyeri katkılamaının farklı başlangıç havuç konsantrasyonlarında ortamdaki şeker konsantrasyonuna (g/L) etkisi (Ön işlem koşulları: 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 121°C, 15 dk otoklavlama, 15 FPU selüloz, 15 U/mL hemiselüloz, Katkılama; pepton (5 g/L), maya özütü (3 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.1 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.05 g/L), pH 5, T 30 °C, Çalkalama Hızı: 100 rpm)

Mikroorganizma	Başlangıç Biyokütle (g/L)	Zaman (saat) / İndirgen şeker konsantrasyonu (g/L)				
		12	24	48	72	96
<i>S. cerevisiae</i>	100 (g/L)	52.43 ±0.12	20.65 ±1.04	13.39 ±1.84	10.17 ±0.24	8.13 ±0.12
<i>P. stipitis</i>	100 (g/L)	65.91 ±0.64	56.43 ±1.59	52.17 ±0.49	30.91 ±0.49	24.34 ±0.21
<i>Candida boidinii-1</i>	150 (g/L)	81.82 ±0.49	69.65 ±1.23	38.78 ±1.01	25.82 ±0.46	14.36 ±0.18
<i>Candida boidinii-2</i>	150 (g/L)	81.82 ±1.53	63.39 ±1.72	39.82 ±0.43	33.04 ±0.06	13.02 ±0.18
<i>Candida boidinii-3</i>	150 (g/L)	83.21 ±0.31	78.95 ±0.30	41.52 ±0.52	26.52 ±1.20	14.39 ±1.13
<i>Candida boidinii-4</i>	150 (g/L)	73.21 ±0.12	65.73 ±0.29	37.30 ±1.47	32.39 ±1.01	11.23 ±0.29

**Çizelge 4.7'**ye göre, 100 g/L başlangıç biyokütle içeren ve *S. cerevisiae* bulunan ortamda 12. Saatte 52.43 g/L indirgen şeker bulunurken, şeker konsantrasyonu zamana bağlı olarak azalmıştır. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla ortamda 20.65 g/L, 13.39 g/L, 10.17 g/L ve 8.13 g/L şekerin ortamda kaldığı tespit edilmiştir.

*P. stipitis* içeren ortamda ise ilk 72 saatte ortamdaki indirgen şeker konsantrasyonunda fazla bir değişim gözlenmemiştir. Ancak 96. saatte ortamdaki şeker 30.91 g/L'den 24.34 g/L'ye düşmüştür.

150 g/L başlangıç biyokütle içeren ve *Candida boidinii-1*'in fermentasyonda kullanıldığı deney ortamında 12. saatte 81.82 g/L olan indirgen şeker konsantrasyonu zamanla azalmıştır. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla 69.65 g/L, 38.78 g/L, 25.82 g/L ve 14.36 g/L şeker olduğu belirlenmiştir.

*Candida boidinii-2* içeren ortamda 12. saatte 81.82 g/L, 24. saatte 63.39 g/L, 48. saatte 39.82 g/L, 72. saatte 33.04 g/L ve 96. saatte 13.02 g/L indirgen şeker olduğu belirlenmiştir.

*Candida boidinii-3* içeren ortamda 12. saatte 83.21 g/L, 24. saatte 78.95 g/L, 48. saatte 41.52 g/L, 72. Saatte 26.52 g/L ve 96. saatte 14.39 g/L indirgen şeker olduğu tespit edilmiştir.

*Candida boidinii-4*'ün bulunduğu ortamda 12. saatte 73.21 g/L, 24. saatte 65.73 g/L, 48. saatte 37.30 g/L, 72. saatte 32.39 g/L ve 96. saatte 11.23 g/L indirgen şekerin ortamda bulunduğu belirlenmiştir.

Mikrobiyal gelişim incelendiğinde 96. saatte ve 100 g/L havuç posası varlığında, *S. cerevisiae*, 3.80 g/L, *P. stipitis* 2.82 g/L kuru ağırlığa ulaşmıştır. Yeni izole edilen mayalar ise 96. Saatte, *C. boidinii-1*, 3.38 g/L, *C. boidinii-2*, 3.36 g/L, *C. boidinii-3*, 3.37 g/L ve *C. boidinii-4*, 3.60 g/L kuru ağırlığa ulaşmıştır. Bu sonuçlar incelendiğinde

*C. boidinii* suşlarının besiyeri katkılmasıyla hem etanol üretimini hem de biyokütlelerini artırabildikleri saptanmıştır.

#### 4.5 Kinetik Parametrelere İlişkin Sonuçlar

Çalışmada tüm mayalar için kinetik parametreler hesaplanmıştır. *S. cerevisiae* mayası için 48. Saatte, 15 FPU selüloz ve 15 U/mL hemiselüloz konsantrasyonunda teorik etanol verimi %77.89 olarak tespit edilmiştir.  $Q_p$  değeri ise 0.57 g/L.h olarak hesaplanırken,  $Y_{P/S}$  değeri ise 0.49 g/g olarak belirlenmiştir.

Hesaplamalar aynı koşullar geçerli olmak üzere *P. stipitis* için 120. saatte yapılmıştır. Buna göre teorik etanol verimi % 32.08 olarak bulunmuştur.  $Q_p$  değeri 0.12 g/L.h olarak tespit edilmiştir.  $Y_{P/S}$  değeri ise 0.25 olarak hesaplanmıştır.

Aynı koşullarda *Candida boidinii*-1 için 72. Saatte hesaplanan kinetik parametreler ise; teorik etanol verimi % 69.51,  $Q_p$  değeri 0.45 g/L.h,  $Y_{P/S}$  değeri ise 0.49 g/g olarak belirlenmiştir.

*Candida boidinii*-2 için 72. Saatte hesaplanan teorik etanol verimi %60.45 olarak bulunmuştur.  $Q_p$  değeri 0.39 g/L.h olarak,  $Y_{P/S}$  değeri de 0.48 g/g olarak belirlenmiştir.

*Candida boidinii*-3 için 72. Saatte hesaplanan teorik etanol verimi %67.56,  $Q_p$  değeri 0.44 g/L.h ve  $Y_{P/S}$  ise 0.48 g/g'dır.

*C. boidinii*-4 için de teorik etanol verimi %45.85,  $Q_p$  değeri 0.29 g/L.h ve  $Y_{P/S}$  ise 0.36 g/g olarak tespit edilmiştir (**Çizelge 4.8**).

Çizelge 4.8 Farklı havuç posası konsantrasyonlarında mayalara ait bazı kinetik parametreler (*S.cerevisiae* için 48 saat, *P. stipitis* için 120 saat ve *C. boidinii* 1-3 ve *C. boidinii-4* için 72 saat) Ön işlem koşulu: %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 120°C’de 15 dakika, Fermantasyon koşulu: pH:5, 15 FPU selülaz ve 15 U/mL hemiselülaz, 30°C’de 100 rpm çalkalama hız

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>C. boidinii-1</i>	<i>C. boidinii-2</i>	<i>C. boidinii-3</i>	<i>C. boidinii-4</i>
<b>Teorik Etanol Verimi</b> (%)	77.89	32.08	69.51	60.45	67.56	45.85
<b>Q<sub>p</sub></b> (g/L.h)	0.57	0.12	0.45	0.39	0.44	0.29
<b>Y<sub>P/S</sub></b> (g/g)	0.49	0.25	0.49	0.48	0.48	0.36

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1 Başlangıç Havuç Konsantrasyonunun Şeker konsantrasyonu ve Etanol Üretimine Etkisi

Başlangıç biyokütle konsantrasyonunun belirlenmesi, biyoetanol üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Biyokütle konsantrasyonunun artmasıyla etanol veriminin de artacağı düşünülmekle beraber, artan konsantrasyonlarda glukoz veriminin azaldığı ve selüloz dönüşümünün %30 (w/w) biyokütle içeren ortamda yaklaşık %40'a düştüğü bildirilmiştir. Ayrıca, kullanılan biyokütlenin parçalanması sonucu ortaya çıkan çeşitli inhibitörler de toksik etkileri nedeniyle fermentasyonu olumsuz etkilemektedir (Lu vd., 2010).

Tez çalışmasında da dört farklı başlangıç biyokütle konsantrasyonunun (50 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L) biyoetanol üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu deney için havuç posası %1 (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile ön işleme tabi tutulmuş, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve fermantasyon deneyleri için kullanılmıştır. *S. cerevisiae* ve *P.stipitis* için optimum biyokütle 100 g/L havuç posası içeren ortam olarak belirlenmiştir. *C. boidinii* izolatları için ise 150 g/L havuç posası konsantrasyonunda en yüksek etanol üretimi gerçekleşmiştir. Yüksek biyokütle miktarı daha çok etanol konsantrasyonuna yol açsa da, katı içerik ve viskozite arttıkça çalkalama işlemi de zorlaşmaktadır. Ayrıca, enzimatik hidroliz için kullanılan enzim, hidroliz sırasında açığa çıkan glukoz tarafından ürün inhibisyonuna maruz kalabilmektedir (Han vd., 2011). Bu nedenle optimum biyokütle konsantrasyonları seçilmiştir.

Literatürde, başlangıç biyokütle ve başlangıç şeker konsantrasyonlarının etanol üretimine etkisi araştırılmıştır. Yüksek nişasta içeriği nedeniyle etanol üretim potansiyeline sahip olan kassavanın kullanıldığı bir çalışmada %10 (w/v) başlangıç biyokütlerde etanol veriminin diğer oranlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Shanavas vd., 2011). Su sümbülü biyokütlesinden etanol üretilen bir çalışmada da %10 (w/v) başlangıç biyokütlerde en yüksek etanol miktarının üretildiği tespit edilmiştir (Aswathy vd., 2010). Başka bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 suşu

tarafından etanol üretiminin 20-300 kg m<sup>-3</sup> substrat konsantrasyonundan etkilendiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, 300 kg m<sup>-3</sup>'ün üzerindeki glukoz konsantrasyonlarında etanol dönüşüm verimindeki azalmanın, yüksek miktarda substrat ve etanol fermantasyonunu engelleyen üretimden kaynaklandığı öne sürülmüştür. 72 saatlik inkübasyondan sonra şeker dönüşümü 20, 40, 80, 160 ve 300 kg m<sup>-3</sup> glukoz için sırasıyla %48.0, %59.9, %28.3, %13.7 ve %3.7 olarak bulunmuştur (Lin vd., 2012). Şeker pancarı melasının hammadde olarak kullanıldığı ve etanol üretiminin araştırıldığı başka bir çalışmada ise başlangıç şeker pancarı melası miktarının 109 g/L olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen en yüksek etanol konsantrasyonu ise %4.62 olarak belirtilmiştir (Göksungur ve Zorlu, 2001).

Bir diğer çalışmada, tatlı sorgum sapı suyunun *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak kesikli etanol fermantasyonu incelenmiştir. Araştırmacılar, 85, 113 ve 156 g/L olmak üzere üç farklı başlangıç şeker konsantrasyonunda kesikli fermantasyon deneylerini gerçekleştirmiş olup, 156 g/L'lik başlangıç toplam şeker konsantrasyonunda maksimum etanolün 58.01 g/L olduğunu bulmuşlardır (Jin vd., 2015).

Havuç atığının hammadde olarak kullanıldığı ve pancar melası eklenerek, *Saccharomyces cerevisiae* ile biyoetanol üretilen başka bir çalışmada ise sonuçlar, 150 ml distile su içeren ortama 10 g havuç atığı eklenmesiyle 10.3 ml etanol üretildiği gösterilmiştir (Khoshkho vd., 2022).

Araştırmacılar, *Pichia stipitis*'in fındık kabuğu hidrolizatında büyüebildiği ve şekerleri etanole fermente edebildiğini göstermiştir. 50 g/L toplam indirgen şeker varlığında *Pichia stipitis*'in etanol üretebildiği bulunmuştur (Arslan ve Eken-Saraçoğlu, 2010). Bir diğer çalışmada etanol üretimi için gazete atıkları kullanılmış ve enzimatik hidrolizle *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* ve her ikisini içeren ko-kültürle fermantasyona uğratılmıştır. Atık gazete konsantrasyonunun artmasıyla indirgen şeker konsantrasyonu artmıştır ancak, biyokütle konsantrasyonu %15 (w/w) olduğunda bir platoya ulaşmıştır. Biyokütlenin daha fazla artışının, şeker konsantrasyonunda herhangi bir artışa neden olmadığı, yüksek substrat konsantrasyonunun son ürünlerin (glukoz ve sellobiyoz) inhibisyonuna neden olabileceği belirtilmiştir (Xin vd., 2010).

## 5.2 Enzimatik Hidrolizin Biyoetanol Üretimine Etkileri

Enzimatik bazlı selülozik etanol üretim teknolojisi, 1980'lerde biyokütle teknolojisinin geliştirilmesinde önemli bir alan haline gelmiştir. İkinci Dünya Savaşı sırasında keşfedilen *Trichoderma reesei* tarafından üretilen selülaz ve seyreltik asit ön işleme uygulamasındaki gelişmeler, 1980'lerde selülozik etanol maliyetindeki düşüşlerinin önünü açmıştır. Selülozik maddelerden şekerlerin açığa çıkarılması kolay bir işlem olmadığından, ekonomik olarak uygun şeker verimleri elde etmek için yaklaşık 15 FPU/g substrat selülaz kullanılmasına ihtiyaç bulunmaktadır (Yang vd., 2011).

Etanol üretiminde enzimatik hidroliz, hammaddeleri fermente edilebilir şekerlere hidrolize etmek için gerekli bir basamaktır. Bitki hücre duvarındaki heterojen yapıları tamamen bozmak için selülazlar ve hemiselülazlar gibi enzimlerin sinerjik reaksiyonları gerekmektedir. Ayrıca enzimatik hidroliz, diğer işlemlere göre daha yüksek verim sağlaması nedeniyle tercih edilen bir sakkarifikasyon yöntemidir (Yang vd., 2011). Tez çalışmasında enzimatik hidroliz deneyleri, 15 U/mL hemiselülaz ile 15 FPU/g substrat selülaz ilave edilen 100 g/L ve 150 g/L havuç posası içeren deney ortamında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon deneyleri başlatılmadan önce enzimlerin biyokütleyle olan etkilerinin tespit edilmesi amacıyla farklı başlangıç biyokütellerin içerdiği indirgen şeker konsantrasyonlarının tayini yapılmıştır. İndirgen şeker konsantrasyonu, fermentasyon ve enzimatik hidrolizden önce sırasıyla 100 g/L ve 150 g/L biyokütle içeren ortamda, 47.30 g/L ve 73.65 g/L olarak tespit edilmiştir. Ancak enzimatik hidroliz ile bu miktar 100 g/L ve 150 g/L biyokütle içeren ortamda sırasıyla 69.04 g/L ve 91.65 g/L olarak belirlenmiştir.

Literatürde *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* ve her ikisini içeren ko-kültürle yapılan ve 15 FPU/g substrat selülaz kullanılan çalışmada *Pichia stipitis* 0.41 g/g verimle etanol üretmiştir (Xin vd., 2010). Başka bir çalışmada *S. cerevisiae*'nin %10 (w/v) su sümbülü biyokütlesinden enzimatik hidroliz ile 4.25 g/L etanol ürettiği bildirilmiştir (Aswathy vd., 2010).

Başka bir çalışmada, *P. stipitis* NCIM 3498 ile beş pirinç çeşidinin etanol üretim potansiyeli değerlendirilmiştir. *P. stipitis* NCIM 3498, selüloz ve  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile ön işleme tabi tutulan biyokütleden  $0.44 \text{ gg}^{-1}$  etanol üretmiştir (Sheetal vd., 2019).

Lignoselülozik biyokütleyi oligosakkarite ayrıştırmak için sorgum sapı ile şeker kamışı yaprağının kullanıldığı başka bir çalışmada, biyokütle, selüloz enzimi kullanılarak *S. cerevisiae* TISTR5020 tarafından etanol üretimi için fermentasyona uğratılmıştır.  $8.374 \pm 1.813 \text{ g/L}$ 'lik maksimum biyoetanol verimi, 2 günlük fermentasyon süresinde elde edilmiştir (Manmai vd., 2020).

Başka bir çalışmada akasya ağacına enzimatik hidrolize duyarlı hale getirilmek için seyreltik sülfürik asit ön işleme uygulanmıştır. *S. cerevisiae* tarafından fermentasyonun gerçekleştirildiği çalışmada deney ortamına 5, 10, 15 ve 20 FPU (Cellic® CTec3) /g glukoz enzim eklenmiştir. Çalışma sonunda etanole maksimum dönüşüm verimine (%94,9) 5 FPU'da ulaşılmıştır (Lee ve Yu, 2020).

Tez çalışmasında ise, *S. cerevisiae* 48 saat sonunda  $17.76 \pm 0.07 \text{ g/L}$  etanol üretmiştir. *P. stipitis*  $10.97 \pm 0.93 \text{ g/L}$ , *C. boidinii* -1 48 saatte  $20.36 \pm 0.64 \text{ g/L}$  etanol üretmiştir. *C. boidinii*-2,  $20.02 \pm 0.23 \text{ g/L}$  etanol üretmiştir. *C. boidinii*-3  $21.84 \pm 0.44 \text{ g/L}$ , *C. boidinii*-4  $19.97 \pm 0.75 \text{ g/L}$  etanol üretmiştir.

### 5.3 Besiyeri Katkılamaasının Biyoetanol Üretimine Etkisi

Besiyeri katkılaması literatürde birçok yazar tarafından incelenmiştir. Kudüs enginar yumrusunun hammadde olarak kullanıldığı ve katkılama yapılan ortamda *S. cerevisiae* JZ1C ile fermentasyon sonucu  $65.2 \text{ g/L}$  etanol ürettiğini bildirmiştir (Hu vd., 2012). *Saccharomyces cerevisiae* NP01 tarafından tatlı sorgum suyundan etanol üretiminin araştırıldığı bir çalışmada, çeşitli karbon ve azot kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar azot kaynağının etanol üretimi üzerindeki etkilerini karşılaştırmak için,  $3.0 \text{ g/L}$  maya özütü ve  $5.0 \text{ g/L}$  pepton içeren ortam ve ayrıca  $1.3 \text{ g/L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren ortam hazırlamıştır (Laopaiboon vd., 2009).

Sudhakar vd.(2021) *S. cerevisiae* kullanarak etanol üretmek için mantar artıklarını substrat olarak kullanmışlardır. Deney ortamına üre (1 g/L), sodyum hidrojen fosfat (0,5 g/L), potasyum dihidrojen fosfat (2,5 g/L), magnezyum sülfat (1 g/L), amonyum sülfat (1 g/L), demir sülfat (0.001 g/L) ve maya özütünün (0.5 g/L) eklenmesiyle maksimum etanol verimi  $1.57 \pm 0.12$  g/L olarak hesaplanmıştır (Sudhakar vd., 2021).

*S. cerevisiae* kullanılarak atık patates püresinden biyoetanol üretiminin araştırıldığı bir diğer çalışmada maya ekstraktı azot kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 30.8 g/L etanol üretildiği tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak kullanılan diğer azot kaynaklarıyla karşılaştırıldığında, hiçbir azot kaynağının maya ekstraktından daha anlamlı ölçüde etanol üretmediği sonucuna varılmıştır. (Izmirlioglu ve Demirci, 2012).

Mango kabuğuyla yapılan ve *S. cerevisiae* CFTRI 101'in kullanıldığı bir çalışmada besiyeri takviyesi için maya özütü, pepton ve buğday kepeği özütü test edilmiş ve bu takviyenin etanol üretimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre maya ekstraktı eklenen ortamda 24. Saatte 33.2 g/L etanol, pepton ve maya ekstraktı eklenen ortamda ise 34.5 g/L etanol üretilmiştir (Reddy vd., 2011).

Topraktan izole edilen *Saccharomyces cerevisiae* KL17 suşunun galaktozdan etanol üretme performansının incelendiği çalışmada ise, çeşitli kombinasyon ve konsantrasyonlarda galaktoz ve glukoz içeren ortamlarda deneyler yürütülmüştür. Fermentasyon ortamına 7.5 g/L maya özütü, 7.5 g/L pepton, 6.0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.0 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  eklenmiştir. Yapılan çalışma sonucu *Saccharomyces cerevisiae* KL17'nin 95 g/L'ye kadar etanol üretebildiği belirlenmiştir (Kim vd., 2014).

Akasya ağacının etanol üretiminde hammadde olarak kullanıldığı çalışmada enzim aktivitesini artırmak amacıyla soya proteini eklenmiştir. Soya proteini dozajı arttıkça toplam glukoz veriminin arttığı saptanmıştır. Çalışma sonunda soya proteini içeren deney ortamından  $4.38 \pm 0.23$  g/L etanol üretildiği belirlenmiştir (Lee ve Yu, 2020).

Mısır sapının *S. cerevisiae* ile fermentasyona uğratıldığı başka bir çalışmada, mısır sapı %1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'le muamele edildiği ve besiyeri 0.75 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub> ve 9.0 g/L maya özütünden oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda 48. Saatte 18.72 g/L etanol elde edilmiştir (Jehadin vd., 2021).

Literatüre göre standart etanol üretim ortamı 3.0 g/L maya özütü ve 5.0 g/L pepton içermelidir. Böylelikle belirtilen bu azot kaynaklarında fermente edilebilir toplam azot miktarı 1129 mg/L'ye denk gelmektedir (Melzoch vd., 1994). Çalışma sonuçlarına göre *S. cerevisiae* 48. saatte 27.48±0.71 g/L etanol üretmiştir. *P. stipitis* ise 96. Saatte 11.32±0.39 g/L etanol üretmiştir. Yeni izole edilmiş mayaların etanol üretimi de katkılardan olumlu etkilenmiştir. *Candida boidinii-1*, 72. saatte 32.55±0.96 g/L etanol üretmiştir. *Candida boidinii-2* 72. saatte en yüksek 28.31±0.75 g/L etanol konsantrasyonuna ulaşmıştır. *Candida boidinii-3* ise 72. saatte 31.64±0.19 g/L ile en yüksek etanol üretimine ulaşmıştır. *C. boidinii-4* ise 72 saatte 21.47±0.51 g/L ile etanol konsantrasyonuna ulaşmıştır.

#### 5.4 Sonuç ve Öneriler

Dünya nüfusundaki yaşanan artış birçok ülkenin endüstriyel faaliyetlerinde de artışa neden olmuştur. Bu durumun geri yansması ise fosil yakıtların kullanımının artmasıdır. Ancak, fosil yakıt kaynakları sonsuz olmayıp, gelecekte tükeneceği tahmin edilmektedir. Dünya çapında enerji tüketiminin yüksek boyutlara ulaşması alternatif çözüm yollarını da beraberinde getirmektedir. Bununla beraber, fosil yakıt kaynaklı çevresel sorunlar, sera gazı salımları ve küresel ısınma, tüm dünya ülkelerini ilgilendiren ve acil çözüm üretilmesi gereken bir konu haline gelmiştir. Biyoyakıt teknolojileri ve bu yakıtın kullanımı bu çözüm yollarından biridir.

Yukarıda bahsi geçtiği üzere dünyada ve ülkemizde yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynakları üzerine yoğun çalışmalar sürdürülmekte ve yeni enerji yolları aranmaktadır.

Alternatif yakıtlardan biri olan biyoetanol sürdürülebilirlik ve yenilenebilirlik kriterlerine sahip olması nedeniyle önemli ekoyakıtlardan biri olarak kabul edilmektedir. Tüm biyoyakıtlar arasında etanol göze çarpmakta olup, dünya çapında birçok ülkede büyük ölçüde üretilmektedir.

Bu tez çalışmasında biyoetanol üretimi için hammadde olarak Türkiye’de büyük miktarlarda üretilen havuçların posası kullanılmıştır. Fermantasyon deneyleri için yerel şeker fabrikasından temin edilen atık sudan izole edilen mayalar kullanılmıştır. Şeker ve etanol konsantrasyonunu artırmak amacıyla havuç posaları seyreltik asitle parçalanmıştır. Ayrıca enzimatik hidrolize uğratılmıştır. Etanol üretiminin artırılması amacıyla besiyeri katkılaması parametreleri de araştırılmıştır. Bu bağlamda, tez çalışması sonucunda elde edilen veriler yeni izole edilen ve metilotrofik özelliği bilinen *C. boidinii* mayasının etanol üretiminde de etkin olduğunun gösterilmesi bakımından literatüre katkı sağlamaktadır. Ayrıca, havuç atıklarının etanol üretiminde hammadde olarak kullanılabilirliğinin ve geridönüşüme katkı sağlayabilirliğinin gösterilmesi açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abbi, M., Kuhad, R., Singh, A. 1996. Fermentation of xylose and rice straw hydrolysate to ethanol by *Candida shehatae* NCL-3501. *Journal of industrial microbiology*, 17(1), 20-23.
- Abdullah, B., Muhammad, S. A. F. a. S., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K. A., Mahmood, A. N., Aziz, M. M. A. 2019. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 37-50.
- Acaroğlu, M., Aydoğan, H. 2012. Biofuels energy sources and future of biofuels energy in Turkey. *Biomass and bioenergy*, 36, 69-76.
- Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., Lukas, J. 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. National Renewable Energy Lab., Golden, CO.(US).
- Adıgüzel, A. O. 2013. Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.
- Aditiya, H., Mahlia, T., Chong, W., Nur, H., Sebayang, A. 2016. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66, 631-653.
- Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology letters*, 30(9), 1515-1524.
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology advances*, 29(6), 675-685.
- Aimaretti, N. R., Ybalo, C. V., Rojas, M. L., Plou, F. J., Yori, J. C. 2012. Production of bioethanol from carrot discards. *Bioresource technology*, 123, 727-732.
- Albers, E., Larsson, C., Lid n, G., Niklasson, C., Gustafsson, L. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3187-3195.
- Alriols, M. G., Tejado, A., Blanco, M. a., Mondragon, I., Labidi, J. 2009. Agricultural palm oil tree residues as raw material for cellulose, lignin and hemicelluloses production by ethylene glycol pulping process. *Chemical Engineering Journal*, 148(1), 106-114.

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Amore, A., Faraco, V. 2012. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. *Renewable and sustainable energy reviews*, 16(5), 3286-3301.
- Anonim.2007. Türkiye'de Enerji ve Geleceği. Web Sitesi: <https://www.emo.org.tr/> Erişim tarihi 01.06.2022
- Anonymous. 2008. 2030 yılına kadar OECD Çevre Tahmin Raporu.
- Anonim. 2019. OECD Türkiye Çevresel Performans İncelemesi.
- Anonymous. 2021. Annual Ethanol Production U.S. and World Ethanol Production. Web sitesi:<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production> Erişim Tarihi: 01.06.2022
- Anonymous.(2022).Ethanol Fuel Basics. Web sitesi: [https://afdc.energy.gov/fuels/ethanol\\_fuel\\_basics.html](https://afdc.energy.gov/fuels/ethanol_fuel_basics.html) Erişim Tarihi: 01.06.2022
- Argyros, D. A., Tripathi, S. A., Barrett, T. F., Rogers, S. R., Feinberg, L. F., Olson, D. G., Hogsett, D. A. 2011. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. *Applied and environmental microbiology*, 77(23), 8288-8294.
- Arslan, Y., Eken-Saraçoğlu, N. 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. *Bioresource technology*, 101(22), 8664-8670.
- Aswathy, U., Sukumaran, R. K., Devi, G. L., Rajasree, K., Singhanian, R. R., Pandey, A. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource technology*, 101(3), 925-930.
- Ayas, N. 2018. Solvent Materials. In I. Dincer (Ed.), *Comprehensive Energy Systems* (pp. 368-395). Elsevier.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.
- Bai, F., Anderson, W., Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26(1), 89-105.
- Bajpai, P. 2013. *Advances in Bioethanol*. Springer Science & Business Media, 1-19
- Bajpai, P. 2016. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Pretreatment of lignocellulosic biomass for Biofuel Production* (pp. 17-70): Springer.

- Balat, M. 2009. New biofuel production technologies. *Energy Educ Sci Technol Part A*, 22(2), 147-161.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in energy and combustion science*, 34(5), 551-573.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. 1990. *Yeasts: characteristics and identification*.
- Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J., Lopes, M. L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, 8(7), 1155-1163.
- Bennetzen, J., Hall, B. 1982. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 3018-3025.
- Bjerre, A. B., Olesen, A. B., Fernqvist, T., Plöger, A., Schmidt, A. S. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 49(5), 568-577.
- Boekhout, T., Kurtzman, C. P. 1996. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. *Nonconventional yeasts in biotechnology*, 1-81.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54(1), 519-546.
- Brandberg, T., Karimi, K., Taherzadeh, M. J., Franzén, C. J., Gustafsson, L. 2007. Continuous fermentation of wheat-supplemented lignocellulose hydrolysate with different types of cell retention. *Biotechnology and bioengineering*, 98(1), 80-90.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Eurwilaichitr, L. 2010. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(1), 18-25.
- Bušić, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Šantek, B. 2018. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food technology and biotechnology*, 56(3), 289-311.
- Cabral, M. M. S., Abud, A. K. d. S., Silva, C. E. d. F., Almeida, R. M. R. G. 2016. Bioethanol production from coconut husk fiber. *Ciência Rural*, 46, 1872-1877.
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., Arroyo-López, F. N. 2017. Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Standards in genomic sciences*, 12(1), 1-14.

- Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., da Silva, S. S. 2012. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Capodaglio, A. G., Bolognesi, S. 2019. Ecofuel feedstocks and their prospects. In *Advances in eco-fuels for a sustainable environment* (pp. 15-51): Elsevier.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., Castro, E. 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87(6), 692-700.
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Gírio, F. M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments.
- Casey, E., Mosier, N. S., Adamec, J., Stockdale, Z., Ho, N., Sedlak, M. 2013. Effect of salts on the co-fermentation of glucose and xylose by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1-10.
- Cha, Y.-L., Yang, J., Ahn, J.-W., Moon, Y.-H., Yoon, Y.-M., Yu, G.-D., Choi, I.-H. 2014. The optimized CO<sub>2</sub>-added ammonia explosion pretreatment for bioethanol production from rice straw. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(9), 1907-1915.
- Chandel, A. K., Chan, E., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, L. V., Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and molecular biology review*, 2(1), 14-32.
- Chauhan, N. M., Hajare, S. T., Mamo, B., Madebo, A. A. 2021. Bioethanol Production from Stalk Residues of Chiquere and Gebabe Varieties of Sweet Sorghum. *International Journal of Microbiology*, 2021.
- Chen, J., Wang, X., Zhang, B., Yang, Y., Song, Y., Zhang, F., Shan, Y. 2021. Integrating enzymatic hydrolysis into subcritical water pretreatment optimization for bioethanol production from wheat straw. *Science of the Total Environment*, 770, 145321.
- Chen, S., Zhang, X., Singh, D., Yu, H., Yang, X. 2010. Biological pretreatment of lignocellulosics: potential, progress and challenges. *Biofuels*, 1(1), 177-199.
- Choi, I. S., Lee, Y. G., Khanal, S. K., Park, B. J., Bae, H.-J. 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*, 140, 65-74.
- Criddle, W. 2005. Ethanol. *Encyclopedia of Analytical Science* (Third Edition) 2019, Pages 39-46

- Dahnum, D., Tasum, S. O., Triwahyuni, E., Nurdin, M., Abimanyu, H. 2015. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia*, 68, 107-116.
- Das Neves, M. A., Kimura, T., Shimizu, N., Nakajima, M. 2007. State of the art and future trends of bioethanol production. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol*, 1(1), 1-14.
- De Deken, R. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, 44(2), 149-156.
- Deenanath, E. D., Rumbold, K., Iyuke, S. 2013. The production of bioethanol from cashew apple juice by batch fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* Y2084 and Vin13. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Demirbaş, A. 2010. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 2738-2749.
- Desai, S., Guerinot, M., Lynd, L. 2004. Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 600-605.
- Dien, B., Cotta, M., Jeffries, T. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 258-266.
- Dimos, K., Paschos, T., Louloudi, A., Kalogiannis, K. G., Lappas, A. A., Papayannakos, N., Mamma, D. 2019. Effect of various pretreatment methods on bioethanol production from cotton stalks. *Fermentation*, 5(1), 5.
- Djiroleu, A., Carrier, D. J. 2016. Effects of dilute acid pretreatment parameters on sugar production during biochemical conversion of switchgrass using a full factorial design. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(8), 4124-4130.
- Doğan, A., Demirci, S., Aytekin, A. Ö., Şahin, F. 2014. Improvements of tolerance to stress conditions by genetic engineering in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), 28-42.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. 2010. Third generation biofuels from microalgae.
- Duque, A., Manzanares, P., González, A., Ballesteros, M. 2018. Study of the application of alkaline extrusion to the pretreatment of *Eucalyptus* biomass as first step in a bioethanol production process. *Energies*, 11(11), 2961.
- Dutta, K., Daverey, A., Lin, J.-G. 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114-122.

- Dziekońska-Kubczak, U., Berłowska, J., Dziugan, P., Patelski, P., Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M. 2018. Nitric acid pretreatment of Jerusalem artichoke stalks for enzymatic saccharification and bioethanol production. *Energies*, 11(8), 2153.
- Esmaeili, S. A. H., Sobhani, A., Szmerekovsky, J., Dybing, A., Pourhashem, G. 2020. First-generation vs. second-generation: a market incentives analysis for bioethanol supply chains with carbon policies. *Applied Energy*, 277, 115606.
- Esteghlalian, A. R., Srivastava, V., Gilkes, N., Gregg, D. J., Saddler, J. N. 2001. An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks.
- Fan, M., Zhang, S., Ye, G., Zhang, H., Xie, J. 2018. Integrating sugarcane molasses into sequential cellulosic biofuel production based on SSF process of high solid loading. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1-9.
- Fan, Z. 2014. Consolidated bioprocessing for ethanol production. In *Biorefineries* (pp. 141-160): Elsevier.
- Fernandes, M. C., Torrado, I., Carvalheiro, F., Dores, V., Guerra, V., Lourenço, P. M., Duarte, L. C. 2016. Bioethanol production from extracted olive pomace: dilute acid hydrolysis. *Bioethanol*, 2(1).
- Fernández-Sandoval, M., Huerta-Beristain, G., Trujillo-Martinez, B., Bustos, P., González, V., Bolivar, F., Martinez, A. 2012. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(5), 1291-1300.
- Ferreira, S., Duarte, A. P., Ribeiro, M. H., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 192-200.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A. K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 339-354.
- Fujii, T., Murakami, K., Endo, T., Fujimoto, S., Minowa, T., Matsushika, A., Sawayama, S. 2014. Bench-scale bioethanol production from eucalyptus by high solid saccharification and glucose/xylose fermentation method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(4), 749-754.
- Gabhane, J., William, S. P., Gadhe, A., Rath, R., Vaidya, A. N., Wate, S. 2014. Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste management*, 34(2), 498-503.

- Gao, Z., Zhao, H., Li, Z., Tan, X., Lu, X. 2012. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy & Environmental Science*, 5(12), 9857-9865.
- Ge, X., Burner, D. M., Xu, J., Phillips, G. C., Sivakumar, G. 2011. Bioethanol production from dedicated energy crops and residues in Arkansas, USA. *Biotechnology journal*, 6(1), 66-73.
- Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800.
- Gnansounou, E., Dauriat, A. 2005. Ethanol fuel from biomass: A review.
- Göksungur, Y., Zorlu, N. 2001. Production of ethanol from beet molasses by *Ca*-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turkish Journal of Biology*, 25(3), 265-275.
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., Werner-Washburne, M. 2004. "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(2), 187-206.
- Guo, M., Song, W., Buhain, J. 2015. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and sustainable energy reviews*, 42, 712-725.
- Gupta, A., Verma, J. P. 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 41, 550-567.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.-F., Lidén, G., Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology*, 24(12), 549-556.
- Haldar, D., Purkait, M. K. 2021. A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, 264, 128523.
- Halder, P., Azad, K., Shah, S., Sarker, E. 2019. Prospects and technological advancement of cellulosic bioethanol ecofuel production. In *Advances in eco-fuels for a sustainable environment* (pp. 211-236): Elsevier.
- Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., Faaij, A. P. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and bioenergy*, 28(4), 384-410.
- Han, M., Kim, Y., Koo, B.-c., Choi, G.-W. 2011. Bioethanol production by *Miscanthus* as a lignocellulosic biomass: Focus on high efficiency conversion to glucose and ethanol. *Bioresources*, 6(2), 1939-1953.

- Harmsen, P. F., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass: Wageningen UR-Food & Biobased Research.
- Harun, R., Danquah, M. K. 2011. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 46(1), 304-309.
- Hassan, S. S., Williams, G. A., Jaiswal, A. K. 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 262, 310-318.
- Hebbale, D., Ramachandra, T. 2022. Third-generation bioethanol: status, scope, and challenges. In *Handbook of Biofuels* (pp. 295-312): Elsevier.
- Hendriks, A., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(1), 10-18.
- Hensing, M., Vrouwenvelder, H., Hellinga, C., Baartmans, R., Van Dijken, H. 1994. Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 42(4), 516-521.
- Hilaires, R. T., Kamoei, D. V., Ahmed, M. A., da Silva, S. S., Han, J.-I., Dos Santos, J. C. 2018. A new approach for bioethanol production from sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation assisted-pretreatment and column reactors. *Ultrasonics sonochemistry*, 43, 219-226.
- Hossain, M. N. B., Basu, J. K., Mamun, M. 2015. The production of ethanol from micro-algae *Spirulina*. *Procedia Engineering*, 105, 733-738.
- Hu, N., Yuan, B., Sun, J., Wang, S.-A., Li, F.-L. 2012. Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(5), 1359-1368.
- Huang, L. P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*, 23(3), 265-276.
- Ilmén, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., Penttilä, M. 2007. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 117-123.
- Ingram, L., Conway, T., Clark, D., Sewell, G., Preston, J. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 53(10), 2420-2425.
- Ingram, L., Gomez, P., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B., Yomano, L., York, S. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and bioengineering*, 58(2- 3), 204-214.

- Izmirlioglu, G., Demirci, A. 2012. Ethanol production from waste potato mash by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Sciences*, 2(4), 738-753.
- Jacobus, A. P., Gross, J., Evans, J. H., Ceccato-Antonini, S. R., Gombert, A. K. 2021. *Saccharomyces cerevisiae* strains used industrially for bioethanol production. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 147-161.
- Jafari, F., Khodaiyan, F., Kiani, H., Hosseini, S. S. 2017. Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and physicochemical properties. *Carbohydrate polymers*, 157, 1315-1322.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., Ravindra, P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, 65, 756-769.
- Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Shapiro, H. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature biotechnology*, 25(3), 319-326.
- Jeffries, T. W., Jin, Y.-S. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts.
- Jehadin, F., Rabeya, T., Asad, M. A., Ayodele, O. O., Adekunle, A. E., Islam, M. S. 2021. Efficient conversion of cornstalk to bioethanol using dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreatment. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 12(2), 203-211.
- Jin, H., Liu, R., He, Y. 2015. Kinetic models and effects of initial total soluble sugar concentrations on batch ethanol fermentation of sweet sorghum stalk juice by *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 37(12), 1282-1290.
- Kaewkrajay, C., Dethoup, T., Limtong, S. 2014. Ethanol production from cassava using a newly isolated thermotolerant yeast strain. *ScienceAsia*, 40(4), 268-277.
- Karagoz, P., Bill, R. M., Ozkan, M. 2019. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. *Renewable Energy*, 143, 741-752.
- 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.
- Keshwani, D. R. 2009. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production: North Carolina State University.
- Khoshkho, S. M., Mahdavian, M., Karimi, F., Karimi-Maleh, H., Razaghi, P. 2022. Production of bioethanol from carrot pulp in the presence of *Saccharomyces*

- cerevisiae and beet molasses inoculum; A biomass based investigation. *Chemosphere*, 286, 131688.
- Kim, J. H., Ryu, J., Huh, I. Y., Hong, S.-K., Kang, H. A., Chang, Y. K. 2014. Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(9), 1871-1878.
- Kim, M.-S., Chung, Y.-S., Seo, J.-H., Jo, D.-H., Park, Y.-H., Ryu, Y.-W. 2001. High-yield production of xylitol from xylose by a xylitol dehydrogenase defective mutant of *Pichia stipitis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 11(4), 564-569.
- Kim, S., Dale, B. E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and bioenergy*, 26(4), 361-375.
- Kim, S. B., Lee, S. J., Jang, E. J., Han, S. O., Park, C., Kim, S. W. 2012. Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(1), 183-187.
- Kim, T. H., Lee, Y. (2005). Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. Paper presented at the Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for fuels and chemicals.
- Klass, D. L. 1998. *Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals*: Elsevier.
- Klein, K. (2005). Economic and social implications of bio-fuel use and production in Canada. Paper presented at the BIOCAP Canada Foundation, F1 annual conference.
- Knothe, G. 2012. Historical perspectives on biofuels. *Comprehensive renewable energy*, 5, 11-14.
- Kootstra, A. M. J., Beftink, H. H., Scott, E. L., Sanders, J. P. 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 126-131.
- Kötter, P., Ciriacy, M. 1993. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(6), 776-783.
- Krishna, S. H., Reddy, T. J., Chowdary, G. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology*, 77(2), 193-196.
- Krishnan, S., Ahmad, M. F., Zainuddin, N. A., Din, M. F. M., Rezaia, S., Chelliapan, S., . . . Wahid, Z. A. 2020. Bioethanol production from lignocellulosic biomass (water hyacinth): a biofuel alternative. In *Bioreactors* (pp. 123-143): Elsevier.
- Kruczek, M., Drygaś, B., Habryka, C. 2016. Pomace in fruit industry and their contemporary potential application. *World Scientific News*, 48, 259-265.

- Kumar, A. K., Sharma, S. 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and bioprocessing*, 4(1), 1-19.
- Kumar, M., Campbell, L., Turner, S. 2016. Secondary cell walls: biosynthesis and manipulation. *Journal of experimental botany*, 67(2), 515-531.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, 48(8), 3713-3729.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. 1998. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In *The yeasts* (pp. 3-5): Elsevier.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. 2011. *The yeasts: a taxonomic study*: Elsevier.
- Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., Laopaiboon, P. 2009. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource technology*, 100(18), 4176-4182.
- Lareo, C., Ferrari, M. D., Guigou, M., Fajardo, L., Larnaudie, V., Ramírez, M. B., Martínez-Garreiro, J. 2013. Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. *SpringerPlus*, 2(1), 1-11.
- Lee, I., Yu, J.-H. 2020. The production of fermentable sugar and bioethanol from acacia wood by optimizing dilute sulfuric acid pretreatment and post treatment. *Fuel*, 275, 117943.
- Lee, J.-W., Houtman, C. J., Kim, H.-Y., Choi, I.-G., Jeffries, T. W. 2011. Scale-up study of oxalic acid pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for the production of bioethanol. *Bioresource technology*, 102(16), 7451-7456.
- Lee, S., Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C., Lee, J. 2011. Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(6), 878-888.
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., Singh, S. 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, 101(13), 4900-4906.
- Limayem, A., Ricke, S. C. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 449-467.
- Lin, Y.-L., Zheng, N.-Y., Hsu, C.-H. 2021. Torrefaction of fruit peel waste to produce environmentally friendly biofuel. *Journal of Cleaner Production*, 284, 124676.

- Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(6), 627-642.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., Kong, H. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and bioenergy*, 47, 395-401.
- Linoj, K., Prabha, D., Anandajit, G., Sameer, M. 2006. Liquid biofuels in South Asia: Resources and technologies. *Asian Biotechnology and Development Review*, 8(2), 31-49.
- Liu, C.-G., Xiao, Y., Xia, X.-X., Zhao, X.-Q., Peng, L., Srinophakun, P., Bai, F.-W. 2019. Cellulosic ethanol production: progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnology advances*, 37(3), 491-504.
- Lu, X., Zhang, Y., Yang, J., Liang, Y. 2007. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry- Plant Equipment- Process Engineering- Biotechnology*, 30(7), 938-944.
- Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S. 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(2), 360-369.
- Luo, J., Fang, Z., Smith Jr, R. L. 2014. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 41, 56-93.
- Ma, H., Liu, W.-W., Chen, X., Wu, Y.-J., Yu, Z.-L. 2009. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource technology*, 100(3), 1279-1284.
- Magalhães-Guedes, K., Rodrigues, A., Gervasio, I., Gervasio, I. 2013. Peraro Do Nascimento, A., Schwan, RF, 2013. Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Afr. J. Microbiol. Res*, 7(13), 1121-1127.
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., Guimarães, V. M. 2015. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1, 44-49.
- Manmai, N., Unpaprom, Y., Ponnusamy, V. K., Ramaraj, R. 2020. Bioethanol production from the comparison between optimization of sorghum stalk and sugarcane leaf for sugar production by chemical pretreatment and enzymatic degradation. *Fuel*, 278, 118262.
- Martínez-Patiño, J. C., Ruiz, E., Cara, C., Romero, I., Castro, E. 2018. Advanced bioethanol production from olive tree biomass using different bioconversion schemes. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 172-181.

- Meena, M., Zehra, A., Dubey, M. K., Aamir, M., Upadhyay, R. S. 2018. Penicillium enzymes for the food industries. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 167-186): Elsevier.
- Melikoğlu, M., Albostan, A. 2011. Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26(1).
- Melzoch, K., Rychtera, M., Hábová, V. 1994. Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology*, 32(1), 59-65.
- Mikulski, D., Kłosowski, G. 2020. Microwave-assisted dilute acid pretreatment in bioethanol production from wheat and rye stillages. *Biomass and bioenergy*, 136, 105528.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miranda, J., Passarinho, P. C., Gouveia, L. 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource technology*, 104, 342-348.
- Mohapatra, S., Ray, R. C., Ramachandran, S. 2019. Bioethanol from biorenewable feedstocks: technology, economics, and challenges. In *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 3-27): Elsevier.
- Mojović, L., Nikolić, S., Rakin, M., Vukasinović, M. 2006. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*, 85(12-13), 1750-1755.
- Moniruzzaman, M. 1995. Alcohol fermentation of enzymatic hydrolysate of exploded rice straw by *Pichia stipitis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(6), 646-648.
- Moravvej, Z., Makarem, M. A., Rahimpour, M. R. 2019. The fourth generation of biofuel. In *Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 557-597): Elsevier.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.
- Mosier, N. S., Ladisch, C. M., Ladisch, M. R. 2002. Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. *Biotechnology and bioengineering*, 79(6), 610-618.
- Mussatto, S. I., Machado, E. M., Carneiro, L. M., Teixeira, J. A. 2012. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, 92, 763-768.
- Nahak, S., Nahak, G., Pradhan, I., Sahu, R. 2011. Bioethanol from marine algae: a solution to global warming problem. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*, 1(4), 74-80.

- Nardi, J. B., Bee, C. M., Miller, L. A., Nguyen, N. H., Suh, S.-O., Blackwell, M. 2006. Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. *Arthropod structure & development*, 35(1), 57-68.
- Nigam, J. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 87(1), 17-27.
- Nitsos, C., Matsakas, L., Triantafyllidis, K., Rova, U., Christakopoulos, P. 2018. Investigation of different pretreatment methods of Mediterranean-type ecosystem agricultural residues: characterisation of pretreatment products, high-solids enzymatic hydrolysis and bioethanol production. *Biofuels*, 9(5), 545-558.
- Njoku, S. I., Ahring, B. K., Uellendahl, H. 2012. Pretreatment as the crucial step for a cellulosic ethanol biorefinery: testing the efficiency of wet explosion on different types of biomass. *Bioresource technology*, 124, 105-110.
- Nosratpour, M. J., Karimi, K., Sadeghi, M. 2018. Improvement of ethanol and biogas production from sugarcane bagasse using sodium alkaline pretreatments. *Journal of environmental management*, 226, 329-339.
- Obara, N., Ishida, M., Hamada-Sato, N., Urano, N. 2012. Efficient bioethanol production from paper shredder scrap by a marine derived *Saccharomyces cerevisiae* C-19. *Studies in Science and Technology*, 1(2), 127-132.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. 2008. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 1-14.
- Orencio-Trejo, M., Utrilla, J., Fernández-Sandoval, M., Huerta-Beristain, G., Gosset, G., Martinez, A. 2010. Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Biosystems Engineering II*, 71-107.
- Ozdingis, A. G. B., Kocar, G. 2018. Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and sustainable energy reviews*, 81, 2196-2203.
- Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J., Zacchi, G. 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, 42(5), 834-839.
- Özçimen, D., İnan, B., Biernat, K. 2015. An overview of bioethanol production from algae. *Biofuels-Status and Perspective*, 141-162.
- Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D. J., Saddler, J. N. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. Paper presented at the Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals.

- Panahi, H. K. S., Dehghani, M., Dehghani, S., Guillemin, G. J., Lam, S. S., Aghbashlo, M., Tabatabaei, M. 2022. Engineered bacteria for valorizing lignocellulosic biomass into bioethanol. *Bioresource technology*, 344, 126212.
- Panahi, H. K. S., Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Dehghani, M., Rehan, M., Nizami, A.-S. 2019. Recent updates on the production and upgrading of bio-crude oil from microalgae. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100216.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 74(1), 69-80.
- Parrondo, J., García, L., Díaz, M. 2009. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26, 445-456.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R.-C. 2012. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology advances*, 30(4), 879-903.
- Pérez-Pimienta, J. A., Vargas-Tah, A., López-Ortega, K. M., Medina-López, Y. N., Mendoza-Pérez, J. A., Avila, S., Martinez, A. 2017. Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresource technology*, 225, 191-198.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T., Martinez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology*, 5(2), 53-63.
- Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics*, 22(4), 183-186.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P. 1989. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 55(2), 468-477.
- Pushalkar, S., Rao, K. 1997. Ethanol fermentation by a cellulolytic fungus *Aspergillus terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 289-291.
- Raj, S. B., Ramaswamy, S., Plapp, B. V. 2014. Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *Biochemistry*, 53(36), 5791-5803.
- Ramos-Andrés, M., Aguilera-Torre, B., García-Serna, J. 2021. Hydrothermal production of high-molecular weight hemicellulose-pectin, free sugars and residual cellulose pulp from discarded carrots. *Journal of Cleaner Production*, 290, 125179.
- Rastogi, M., Shrivastava, S. 2017. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and sustainable energy reviews*, 80, 330-340.

- Reddy, L. V., Reddy, O. V. S., Wee, Y.-J. 2011. Production of ethanol from mango (*Mangifera indica* L.) peel by *Saccharomyces cerevisiae* CFTRI101. *African Journal of Biotechnology*, 10(20), 4183-4189.
- Rees, E. M., Stewart, G. G. 1997. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *Journal of the Institute of Brewing*, 103(5), 287-291.
- Richana, N., Winarti, C., Hidayat, T., Prastowo, B. 2015. Hydrolysis of empty fruit bunches of palm oil (*Elaeis Guineensis* Jacq.) by chemical, physical, and enzymatic methods for bioethanol production. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 6(6), 422.
- Robak, K., Balcerek, M. 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 174.
- Roca, C., Olsson, L. 2003. Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 560-563.
- Roddy, D. 2012. Biomass and Biofuels-Introduction. *Comprehensive renewable energy*, 5, 1.
- Roussou, S., Albergati, A., Liang, F., Lindblad, P. 2021. Engineered cyanobacteria with additional overexpression of selected Calvin-Benson-Bassham enzymes show further increased ethanol production. *Metabolic Engineering Communications*, 12, e00161.
- Rouwenhorst, R. J. 1992. Production and localization of inulinases in *Kluyveromyces* yeasts.
- Sabu, A., Augur, C., Swati, C., Pandey, A. 2006. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(3), 575-580.
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology progress*, 21(3), 816-822.
- Sanchez, O. J., Cardona, C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, 99(13), 5270-5295.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19-27.
- Scully, S. M., Orlygsson, J. 2014. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Energies*, 8(1), 1-30.

- Selim, K. A., El-Ghwas, D. E., Easa, S. M., Abdelwahab Hassan, M. I. 2018. Bioethanol a microbial biofuel metabolite; new insights of yeasts metabolic engineering. *Fermentation*, 4(1), 16.
- Seo, J.-S., Chong, H., Park, H. S., Yoon, K.-O., Jung, C., Kim, J. J., Kil, J.-I. 2005. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature biotechnology*, 23(1), 63-68.
- Shanavas, S., Padmaja, G., Moorthy, S., Sajeey, M., Sheriff, J. 2011. Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. *Biomass and bioenergy*, 35(2), 901-909.
- Sharma, H. K., Xu, C., Qin, W. 2019. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and biomass valorization*, 10(2), 235-251.
- Sheetal, K., Prasad, S., Renjith, P. 2019. Effect of cultivar variation and *Pichia stipitis* NCIM 3498 on cellulosic ethanol production from rice straw. *Biomass and bioenergy*, 127, 105253.
- Sheikh, R. A., Al-Bar, O. A., Soliman, Y. M. A. 2016. Biochemical studies on the production of biofuel (bioethanol) from potato peels wastes by *Saccharomyces cerevisiae*: effects of fermentation periods and nitrogen source concentration. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(3), 497-505.
- Shi, J., Chinn, M. S., Sharma-Shivappa, R. R. 2008. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource technology*, 99(14), 6556-6564.
- Shuba, E. S., Kifle, D. 2018. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 81, 743-755.
- Sievers, D. A., Kuhn, E. M., Tucker, M. P., McMillan, J. D. 2017. Effects of dilute-acid pretreatment conditions on filtration performance of corn stover hydrolyzate. *Bioresource technology*, 243, 474-480.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—an overview. *Bioresource technology*, 199, 76-82.
- Solomon, B. D., Barnes, J. R., Halvorsen, K. E. 2007. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and bioenergy*, 31(6), 416-425.
- Song, Y., Cho, E. J., Park, C. S., Oh, C. H., Park, B.-J., Bae, H.-J. 2019. A strategy for sequential fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* in bioethanol production from hardwoods. *Renewable Energy*, 139, 1281-1289.
- Speight, J. G. 2011. Feedstocks. In *The Refinery of the Future* (pp. 1-37).

- Sprenger, G. A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology letters*, 145(3), 301-307.
- Srimachai, T., Thonglimp, V., Sompong, O. 2014. Ethanol and methane production from oil palm frond by two stage SSF. *Energy Procedia*, 52, 352-361.
- Anonymous. 2020. Statistical Review of World Energy
- Streffer, F. 2014. Lignocellulose to Biogas and other Products. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, 2(1), 1-8.
- Sudhakar, M., Ravel, M., Perumal, K. 2021. Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*. *Fuel*, 306, 121680.
- Sukumaran, R. K., Surender, V. J., Sindhu, R., Binod, P., Janu, K. U., Sajna, K. V., . . . Pandey, A. 2010. Lignocellulosic ethanol in India: prospects, challenges and feedstock availability. *Bioresource technology*, 101(13), 4826-4833.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Sun, Y., Cheng, J. J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource technology*, 96(14), 1599-1606.
- Szczodrak, J., Fiedurek, J. 1996. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and bioenergy*, 10(5-6), 367-375.
- Taherzadeh, M. J., Karimi, K. 2007. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources*, 2(4), 707-738.
- Taherzadeh, M. J., Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9(9), 1621-1651.
- Takahashi, C. M., de Carvalho Lima, K. G., Takahashi, D. F., Alterthum, F. 2000. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(8), 829-834.
- Tampier, M., Smith, D., Bibeau, E., Beauchemin, P. 2004. Identifying environmentally preferable uses for biomass resources. Vancouver, Canada: Environmental Services Inc, 132.
- Tan, I. S., Lam, M. K., Foo, H. C. Y., Lim, S., Lee, K. T. 2020. Advances of macroalgae biomass for the third generation of bioethanol production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 502-517.

- Tang, J., Chen, K., Huang, F., Li, J. 2013. Characterization of the pretreatment liquor of biomass from the perennial grass, *Eulaliopsis binata*, for the production of dissolving pulp. *Bioresource technology*, 129, 548-552.
- Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., Ogawa, J., Shima, J. 2012. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus*, 1(1), 1-7.
- Tinôco, D., Genier, H. L. A., da Silveira, W. B. 2021. Technology valuation of cellulosic ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 from sweet sorghum bagasse at elevated temperatures. *Renewable Energy*, 173, 188-196.
- Tizazu, B. Z., Moholkar, V. S. 2018. Kinetic and thermodynamic analysis of dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 250, 197-203.
- Travaini, R., Martín-Juárez, J., Lorenzo-Hernando, A., Bolado-Rodríguez, S. 2016. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource technology*, 199, 2-12.
- Varela, J. A., Gethins, L., Stanton, C., Ross, P., Morrissey, J. P. 2017. Applications of *Kluyveromyces marxianus* in biotechnology. In *Yeast diversity in human welfare* (pp. 439-453): Springer.
- Verbančič, J., Lunn, J. E., Stitt, M., Persson, S. 2018. Carbon supply and the regulation of cell wall synthesis. *Molecular Plant*, 11(1), 75-94.
- Wagner, E., Sierra-Ibarra, E., Rojas, N. L., Martinez, A. 2022. One-pot bioethanol production from brewery spent grain using the ethanologenic *Escherichia coli* MS04. *Renewable Energy*, 189, 717-725.
- Walker, G. M. 2009. Yeasts. In *Desk encyclopedia of microbiology*. Academic Press/Elsevier, 1174-1187.
- Walker, G. M. 2011. 125th anniversary review: fuel alcohol: current production and future challenges. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(1), 3-22.
- Wang, D., Xu, Y., Hu, J., Zhao, G. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(4), 340-346.
- Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., Qu, Y. 2012. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. In *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy* (pp. 1-24).
- Warnick, T. A., Methe, B. A., Leschine, S. B. 2002. *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4), 1155-1160.

- Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T., Boles, E. 2010. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(4), 1303-1315.
- Wistara, N. J., Pelawi, R., Fatriasari, W. 2016. The effect of lignin content and freeness of pulp on the bioethanol productivity of jabon wood. *Waste and biomass valorization*, 7(5), 1141-1146.
- Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., Lee, Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource technology*, 96(18), 1959-1966.
- Xia, J., Yang, Y., Liu, C.-G., Yang, S., Bai, F.-W. 2019. Engineering *Zymomonas mobilis* for robust cellulosic ethanol production. *Trends in biotechnology*, 37(9), 960-972.
- Xin, F., Geng, A., Chen, M. L., Gum, M. J. M. 2010. Enzymatic hydrolysis of sodium dodecyl sulphate (SDS)—pretreated newspaper for cellulosic ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1052-1064.
- Xu, Q., Singh, A., Himmel, M. E. 2009. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current opinion in biotechnology*, 20(3), 364-371.
- Xu, Z., Huang, F. 2014. Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), 43-62.
- Yan, X., Cheng, J.-R., Wang, Y.-T., Zhu, M.-J. 2020. Enhanced lignin removal and enzymolysis efficiency of grass waste by hydrogen peroxide synergized dilute alkali pretreatment. *Bioresource technology*, 301, 122756.
- Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. 2010. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(1), 381-388.
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.-Y., Wyman, C. E. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), 421-449.
- Yang, B., Wyman, C. E. 2006. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and bioengineering*, 94(4), 611-617.
- Yu, H., Guo, J., Chen, Y., Fu, G., Li, B., Guo, X., Xiao, D. 2017. Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *Spathaspora passalidarum* U1-58. *Bioresource technology*, 232, 168-175.

- Yücel, H. G., Aksu, Z. 2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. *Fuel*, 158, 793-799.
- Zabed, H., Sahu, J., Boyce, A. N., Faruq, G. 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and sustainable energy reviews*, 66, 751-774.
- Zeng, M., Mosier, N. S., Huang, C. P., Sherman, D. M., Ladisch, M. R. 2007. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 97(2), 265-278.
- Zhan, X., Wang, D., Bean, S., Mo, X., Sun, X., Boyle, D. 2006. Ethanol production from supercritical-fluid-extrusion cooked sorghum. *Industrial Crops and Products*, 23(3), 304-310.
- Zhang, L., Zhao, H., Gan, M., Jin, Y., Gao, X., Chen, Q., . . . Wang, Z. 2011. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource technology*, 102(6), 4573-4579.
- Zhao, N., Bai, Y., Liu, C. G., Zhao, X. Q., Xu, J. F., Bai, F. W. 2014. Flocculating *Zymomonas mobilis* is a promising host to be engineered for fuel ethanol production from lignocellulosic biomass. *Biotechnology journal*, 9(3), 362-371.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(5), 815-827.
- Zhao, X., Zhang, L., Liu, D. 2012. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(4), 465-482.
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y.-S., Zhang, R., Jenkins, B. M., VanderGheynst, J. S. 2013. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied Energy*, 105, 1-7.
- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International journal of agricultural and biological engineering*, 2(3), 51-68.