ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZGEN ÖN İŞLEMİNİN BUĞDAY SAMANINDAN BİYOETANOL ÜRETİMİNE ETKİSİ

Gizem Melissa ERDEM

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Gizem Melissa ERDEM tarafından hazırlanan "**Derin Ötektik Çözgen Ön İşleminin Buğday Samanından Biyoetanol Üretimine Etkisi**" adlı tez çalışması 02/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Aslı İŞCİ YAKAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Mecit ÖZTOP
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Özge ŞAKIYAN DEMİRKOL
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Aslı İŞCİ YAKAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

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

02.01.2020



Gizem Melissa ERDEM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DERİN ÖTEKTİK ÇÖZGEN ÖN İŞLEMİNİN BUĞDAY SAMANINDAN BİYOETANOL ÜRETİMİNE ETKİSİ

Gizem Melissa ERDEM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aslı İŞCİ YAKAN

Bu çalışmada; lignoselülozik bir madde olan buğday samanından fosil yakıtlara alternatif yenilenebilir bir biyoyakıt olan biyoetanol eldesi için mikrodalga destekli-derin ötektik çözgen (Kolin klorür:Formik asit) ile ön işlem gerçekleştirilmiştir. Saman örnekleri, üç farklı mol oranı (Kolin klorür:Formik asit 1:2, 1:3, 1:4), mikrodalga gücü (270, 360, 450 W) ve ön işlem süresinde (2, 5, 8 dakika) işlenmiş ve bu parametrelerin samanın kompozisyonu ve enzimatik hidrolizi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Örneklerdeki ksilanın ön-işlem boyunca sıvı fazda çözündüğü ve bu durumun örneklerdeki selüloz ve lignin içeriğinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Tüm mol oranlarında mikrodalga gücü ve ön işlem süresiyle enzimatik hidroliz sırasındaki şeker konsantrasyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Toplam şeker miktarının en yüksek olduğu (619 mg/g işlenmiş saman) proses koşulları; 1:3 mol oranı, 360 W mikrodalga gücü ve 8 dakika işlem süresidir. Optimum noktada; enzimatik hidroliz sırasındaki glikoz veriminin % 99.9 ve ksiloz veriminin ise % 85.6 olduğu belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda işlenmiş saman örnekleriyle *Escherichia coli KO11* kullanılarak eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) deneyleri gerçekleştirmiş ve etanol verimi % 74.9 bulunmuştur. Sonuç olarak; mikrodalga destekli-derin ötektik çözgen ön işlem yönteminin enzimatik sindirilebilirliği arttırarak kısa sürede yüksek şeker verimi sağladığı gözlemlenmiştir.

Ocak 2020, 64 sayfa

Anahtar Kelimeler: Derin ötektik çözgen, mikrodalga. buğday samanı, eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon, *Escherichia coli KO11*

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT OF DEEP EUTECTIC SOLVENT PRETREATMENT FOR BIOETHANOL PRODUCTION FROM WHEAT STRAW

Gizem Melissa ERDEM

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

Supervisor: Assoc. Prof. Aslı İŞCİ YAKAN

In this study; microwave-assisted-deep eutectic solvent (Choline chloride: Formic acid) pretreatment was employed for the production of bioethanol, which is a renewable biofuel, from a lignocellulosic material such as wheat straw. Straw samples were processed in three different molar ratios (Choline chloride: Formic acid 1: 2, 1: 3, 1: 4), microwave power (270, 360, 450 W) and pretreatment time (2, 5, 8 minutes). The effects of these parameters on the composition and enzymatic hydrolysis of wheat straw were investigated. The xylan in the samples was observed to dissolve in the liquid phase during the pretreatment, leading to an increase in the cellulose and lignin content in the samples. In addition, it was determined that sugar concentrations during enzymatic hydrolysis increased with an increase in microwave power and pretreatment time. The highest total sugar content (619 mg / g processed straw) was observed at 1: 3 molar ratio, 360 W microwave power and 8 minutes processing time. The glucose and xylose yields at the optimal conditions were 99.9 and 85.6 %, respectively. The wheat straw samples treated at the optimal conditions were also fermented using *Escherichia coli KO11* and the ethanol yield was found as 74.9 %. As a conclusion, it has been observed that microwave assisted-deep eutectic solvent pretreatment method increases enzymatic digestibility and provides high sugar yield in a short period of time.

January 2020, 64 pages

Key Words: Deep eutectic solvents, microwave, wheat straw, simultaneous saccharification and fermantation, *Escherichia coli KO11*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aslı İŞCİ YAKAN' a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi), tez çalışmalarımda önerilerini ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam Doç.Dr. Özge ŞAKIYAN DEMİRKOL'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi), laboratuar aşamasında ki yardımlarından dolayı sayın hocam Arş. Grv. Dr.Simel BAĞDER ELMACI'ya (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) ve çalışmalarım boyunca desteklerini her zaman gördüğüm Arş. Grv. Dr. Naciye KUTLU KANTAR(Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Arş. Grv.Merve Sılanur YILMAZ'a (Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) , desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma özellikle Tuğçe ÖZ, Tuğba AÇIKSÖZ, Sevcan TURAN ve Kübra EMEKTAR'a ve ideallerimi gerçekleştirmem için benim her zaman yanımda olan ve desteklerini her zaman hissettiren annem Neriman ERDEM, babam Erdal ERDEM ve canım kardeşim Ezgi Su ERDEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi "DERİN ÖTEKTİK ÇÖZGEN İLE ÖN-İŞLEMİN BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN OPTİMİZASYONU" konulu ve 18B0443004 proje numaralı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nce desteklenen bağımsız proje kapsamında yürütülmüştür.

Gizem Melissa ERDEM
Ankara, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER ve/veya KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 Hammadde ve Bileşenleri **3**
2.1.1 Selüloz **3**
2.1.2 Hemiselüloz **4**
2.1.3 Lignin **5**
2.2 Alternatif Biyoyakıt: Biyoetanol **6**
2.3 Lignoselülozik Biyokütlenin Dönüşümü **7**
2.3.1 Hidroliz **7**
2.3.2 Fermantasyon **9**
2.3.3 Lignoselülozik biyokütlede ön işlem **10**
2.4 Derin Ötektik Çözgen **13**
2.5 Mikrodalga ön işlemi **17**
2.6 Kaynak Özetleri **17**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **22**
3.1 Materyal **22**
3.2 Yöntemler **22**
3.2.1 Derin ötektik çözgenin hazırlanması **22**
3.2.2 Geleneksel ön işlem **23**
3.2.3 Mikrodalga destekli ön işlem **23**
3.2.4 Enzimatik Hidroliz **24**
3.2.5 Fermantasyon **25**
3.2.6 Analizler **26**
3.2.6.1 Kompozisyon analizi **26**
3.2.6.2 HPLC analizleri **27**
3.2.6.3 İstatistik analizler **27**
4. BULGULAR ve TARTIŞMALAR **28**
4.1 Mikrodalga Destekli Derin Ötektik Çözgen Ön İşlemi **29**
4.1.1 Ön işlem sonrası biyokütlenin geri kazanımı **29**
4.1.2 Ön işlemin biyokütlenin kompozisyonu üzerine etkisi **30**
4.1.3 Derin ötektik çözgen ön işleminin hidroliz üzerine etkisi **34**
4.1.4 Derin ötektik çözgen ön işleminin toplam şeker üzerine etkisi **37**
4.1.5 Derin ötektik çözgen ön işleminin verim üzerine etkisi **41**
4.1.6 Geleneksel Ön İşlem **43**
4.1.7 Derin ötektik çözgen ön işleminin fermantasyon üzerine etkisi **45**
5. SONUÇLAR **46**
KAYNAKLAR **48**

EKLER **53**
EK 1 GLİKOZ VE KSİLOZ STANDART KURVELERİ **54**
EK 2 ETANOL STANDART KURVESİ **55**
EK 3 KATININ GERİ KAZANIMI **56**
EK 4 ENZİMATİK HİDROLİZ MİKTARLARI **57**
EK 5 KOMPOZİSYON SONUÇLARI **58**
EK 6 GLİKOZ MİKTARI ANOVA TABLOSU **59**
EK 7 KSİLOZ MİKTARI ANOVA TABLOSU **60**
EK 8 TOPLAM ŞEKER MİKTARI ANOVA TABLOSU **61**
EK 9 GLİKOZ VERİM ANOVA TABLOSU **62**
EK 10 KSİLOZ VERİM ANOVA TABLOSU **63**
ÖZGEÇMİŞ **63**

SİMGELER DİZİNİ

w/w	Ağırlıkça
α	Alfa
β	Beta
G	Gram
v/v	Hacimce
Kg	Kilogram
L	Litre
µL	Mikrolittre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
°C	Santigrat
%	Yüzde

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
NaOH	Sodyum hidroksit
SHF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon
SSF	Ayrı hidroliz ve fermantasyon
AFE	Amonyak Lif atlaması
DES	Derin ötektik çözgen
ChCl	Kolin klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Tek selüloz molekülünün yapısı 4
Şekil 2. 2 Hemiselülozun yapısı ve içerdiği bileşikler 5
Şekil 2. 3 Selülozun enzimatik hidrolizi 9
Şekil 2. 4 Ön işlemin lignoselülozik biyokütle üzerinde etkisi 11
Şekil 2.5 DES sentezinde sıklıkla kullanılan halojen tuzları ve hidrojen bağ donörleri……..15
Şekil 3.1 Mikrodalga destekli derin ötektik çözgen ön işlemi sonrası saman örneği…… 24
Şekil 4.1 Farklı ön işlem koşullarında(1:4 mol oranında) DES ile işlenmiş saman örneklerinin kompozisyonu (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)…….....32
Şekil 4.2 Farklı ön işlem koşullarında (1:3 mol oranında) DES ile işlenmiş saman örneklerinin kompozisyonu (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 32
Şekil 4.3 Farklı ön işlem koşullarında (1:2 mol oranında) DES ile işlenmiş saman örneklerinin kompozisyonu (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 33
Şekil 4.4 Farklı ön işlem koşullarında DES ile işlenmiş saman örneklerinin glukan ve lignin içeriklerinin (%) ve örnekteki ksilan miktarı (%) ile değişimi.....33
Şekil 4.5 Farklı ön işlem koşullarının (1:4 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 36
Şekil 4.6 Farklı ön işlem koşullarının (1:3 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 37
Şekil 4.7 Farklı ön işlem koşullarının (1:2 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 37
Şekil 4.8 Farklı ön işlem koşullarının (1:4 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir).....39
Şekil 4.9 Farklı ön işlem koşullarının (1:3 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir).....39
Şekil 4.10 Farklı ön işlem koşullarının (1:2 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 40

Şekil 4.11 Proses parametrelerinin enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi 40

Şekil 4.12 Geleneksel yöntem ile işlenmiş samanın enzimatik hidroliz süresince glikoz ve ksiloz miktarlarındaki değişim (Ön işlem koşulları: 80 °C su banyosunda 24 saat, 1:3 mol oranı).....44

Şekil 4.13 Optimum koşullarda (1:3 mol oranı, 360W mikrodalga gücü, 8 dakika ön işlem süresi) MW-DES yöntemiyle işlenmiş samandan üretilen etanol miktarının (mg/mL) fermantasyon süresi boyunca değişimi 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Farklı lignoselülozik materyallerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri. 3

Çizelge 2. 2 Asit ve enzimatik hidrolizin özellikleri 8

Çizelge 2.3 Biyoetanol üretiminde kullanılan ve pentozları da fermente edebilen bazı mikroorganizmalar ve özellikleri 10

Çizelge 2. 4 Bazı ön işlem metotlarının özellikleri.....12

Çizelge 2. 5 DES sınıflandırılması 16

Çizelge 4. 1 Proses koşullarının isimlendirilmesi……...28

Çizelge 4.2 Mikrodalga destekli derin ötektik çözgen ön işlemi sonrası biyokütlenin geri kazanımı sonuçları (farklı proses koşulları çizelge 4.1'de belirtilmiştir).....30

Çizelge 4.3 Farklı proses parametrelerinde glikoz ve ksiloz verimleri (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir) 43

1. GİRİŞ

Küresel petrol rezervlerinin tükenmesi ve fosil yakıtlarla ilgili çevresel sorunlar, yenilenebilen enerjiye gerekliliği arttırmaktadır. Lignoselülozik materyellerin bol miktarda bulunabilirliği ve yakıt dönüşümüne elverişliliği sebebi ile enerji üretiminde uygun kaynaklardan biri olarak nitelendirilmektedir. Lignoselülozdan yenilenebilen enerji üretimi; kırsal ekonomiyi ve tarımsal atık yönetimini geliştirmektedir ve hem teknolojik hem de ekonomik ilerlemeyi sağlamaktadır (Gunny vd.2015).

Lignoselülozik biyokütle; ısı ve elektrik enerjisi üretiminde birincil yakıt olarak kullanılabilmektedir. Aynı zamanda; biyoetanol, biyogaz, biyohidrojen ve biyodizel gibi farklı biyoyakıtları da üretebilmektedir. Lignoselülozik biyokütle; bitkiler (enerji bitkileri, çok yıllık bitkiler ve su bitkileri), tarımsal atıklar (yaprak, sap, saman, küspe vb.), orman biyokütlesi (yumuşak ağaç ve sert ağaç) ve endüstriyel atıklar olarak farklı sınıflarda incelenebilmektedir (Zabed vd.2017).

En fazla üretilen tarımsal atıklardan biri dünyada üretimi en çok yapılan buğdayın samanıdır. Avrupa, Çin, Hindistan, ABD ve Kanada'da üretim potansiyeli oldukça fazladır (Anonymous 2019a). Tarımsal atıkların biyoenerjide değerlendirilmesi literatürde birçok çalışmanın odak noktası haline gelmiştir. Bitkisel biyokütlenin dünyada ki yıllık üretimi 200×10^9 tondur ve bunun $8\text{-}20\times10^9$ tonluk kısmının biyoyakıt üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir (Zabed vd. 2017). Türkiye'nin büyük bir tarım ülkesi olarak potansiyeli fazla olup yıllık tarımsal atık miktarının yaklaşık 21 milyon ton (kuru ağırlıkta) olduğu ifade edilmektedir (Isci vd. 2012).

Günümüzde derin ötektik çözgenlerin birçok alanda kullanılabilir oldukları belirtilmiştir. İki farklı bileşiğin erime noktasından daha düşük organik bileşenlerin karışımı olarak ifade edilen derin ötektik çözgenler; ekstraksiyon ve biyokütleninin ön işlemi gibi alanlarda kolaylıkla kullanılabilmektedir. Derin ötektik çözgen ile yapılan ön işlemler; DES'lerin kolay sentezlenmesi, biyolojik olarak parçalanabilir oluşu ve çevre dostu olması nedeni ile ilgi çekmektedir (Zhang vd. 2012).

Bu tez çalışmasının amacı, buğday samanının yeni bir ön işlem metodu ile (mikrodalga destekli derin ötektik çözgen) proses edilmesi ve ön işlem parametrelerinin, kompozisyon enzimatik hidroliz ve enzimatik verim sonuçlarına etkisinin incelenmesidir. Ayrıca, enzimatik hidroliz sırasında açığa çıkan toplam şeker miktarının en yüksek olduğu proses koşulları belirlenerek bu koşullarda işlenmiş samandan biyoetanol üretimi de hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve/veya KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Hammadde ve Bileşenleri

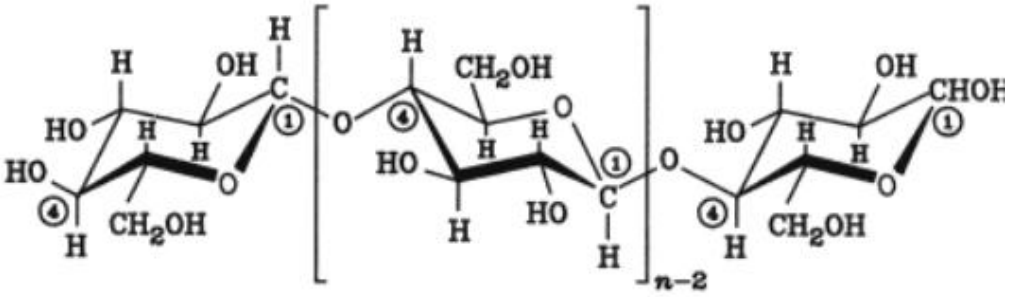
Lignoselülozik materyal; 3 ana polimerden (selüloz (%40-60), hemiselüloz (%20-40), ve lignin (%10-25)) oluşmaktadır. Farklı lignoselülozik materyallerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri çizelge 2.1' de belirtilmiştir (Saini vd. 2015).

Çizelge 2. 1 Farklı lignoselülozik materyallerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri (McMillan 1994, Saini vd. 2015)

Materyal	**(%)Selüloz**	**(%)Hemiselüloz**	**(%)Lignin**	**(%)Kül**
Sert ağaç	45 ± 2	30 ± 5	20 ± 4	0.6 ± 0.2
Yumuşak ağaç	42 ± 2	27 ± 2	28 ± 3	0.5 ± 0.1
Mısır koçanı	39–47	26–31	3–5	12–16
Sorgum sapları	27	25	11	–
Küspe	32–48	19–24	23–32	1.5–5
Pirinç samanı	28–36	23–28	12–14	14–20
Buğday samanı	33–38	26–32	17–19	6–8
Arpa samanı	31–45	27–38	14–19	2–7
Sorgum samanı	32	24	13	12
Tatlı sorgum küspesi	34–45	18–28	14–22	–

2.1.1 Selüloz

Selüloz; sellobiyoz β-1,4-poliasetalidir. Sellobiyoz iki molekül glikoz içerdiğinden, selüloz genellikle glikoz polimeri olarak kabul edilmektedir. Selülozun kimyasal formülü $(C6H5O5)_n$ ve polimerin tek zincirdeki yapısı şekil 2.1'de gösterilmiştir. Selülozun birçok özelliği glikoz ünitesi sayısı yani polimerizasyon derecesi (DP) ile açıklanmakta olup; bu değer genellikle 800-10000 ünite arasında değişmektedir (Harmsen vd. 2010). Glikoz molekülleri arasındaki β-1,4 glikozit bağının niteliği, polimerin uzun düz zincirler oluşturmasına izin vermektedir (Foulon vd. 1994).



Şekil 2.1 Tek selüloz molekülünün yapısı (Harmsen vd. 2010)

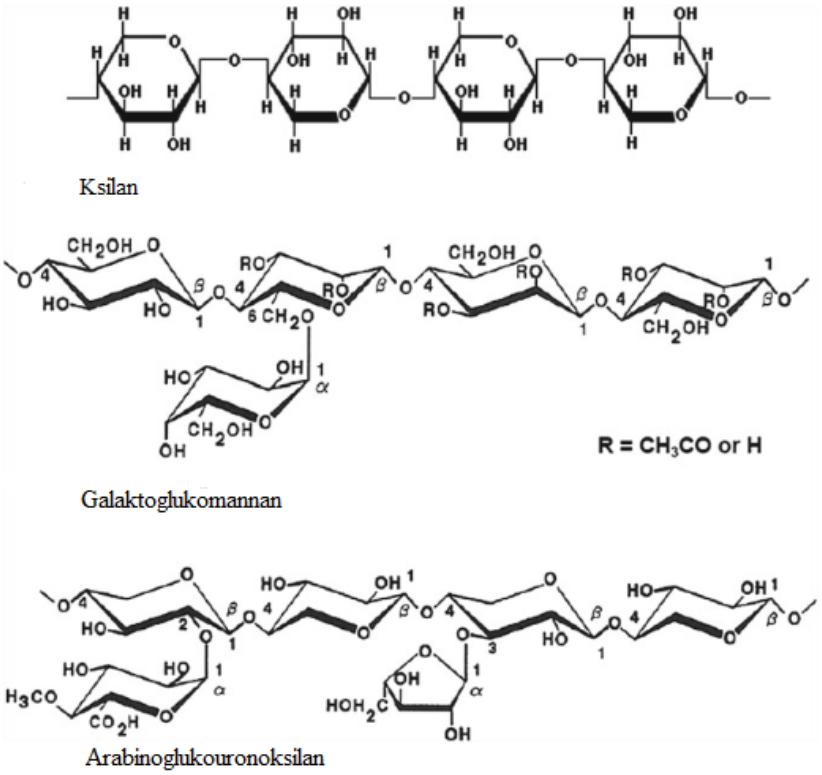
Selüloz higroskopik yapıya sahip olsa da; kimyasal olarak kararlı ve mekanik olarak sağlam oluşu suda veya düşük sıcaklıkta ki seyreltik asit çözeltilerinde çözünmesini zorlaştırmaktadır. Polimerin çözünebilirliği; hidrolizi etkileyen faktörlere bağlıdır. Konsantre asitlerde selüloz çözünebilmektedir, ancak konsantre asitler polimerin bozunmasına da sebep olmaktadır. Alkali çözeltiler; polimerin, düşük DP değerlerinde parçalanmasının yanı sıra; selülozun şişmesine de neden olmaktadır (Krassig ve Schurz 2002).

2.1.2 Hemiselüloz

Hemiselüloz ($C_5H_8O_4$); kısa, doğrusal ve çok dallı zincirlerden oluşan birçok monomeri içeren heteropolimer bir yapıdadır. Polimer; heksozların (β-D-glukoz, α-D-galaktoz ve β-D-mannoz) ve pentozların (β-D-ksiloz ve α-L-arabinoz) yanı sıra α-D-glukuronik, α-D-galakturonik ve α-D-4-O-metilgalakturonik asit gibi üronik asitleri de az miktarda içermektedir. Hemiselülozun en önemli özelliği; polimer zincire bağlı asetil grupların varlığı ve dallanmış yapısı nedeni ile kristal yapıda olmamasıdır (Harmsen vd. 2010, McMillan 1994).

Hemiselüloz; selüloza göre daha düşük molekül ağırlığa sahiptir ve kolayca hidrolize edilebilen kısa zincirli yan dallara sahiptir. Saman ve ot gibi tarımsal biyokütlede hemiselülozun ana zinciri ksilandan oluşurken; yumuşak ağaçta çoğunlukla glukomannan bulunmaktadır. Hemiselülozun genel yapısı şekil 2.2'de gösterilmiştir. Birçok bitkide ksilan; 1,4 bağlı β-D-ksilopiranoz ünitelerinden oluşan bir

heteropolisakkarittir. Ksiloza ek olarak, arabinoz, glukuronik asit veya bunun 4-O-metil eteri, asetik asit, ferulik ve p-kumarik asitleri de içerebilmektedir (Fengel ve Wegener 1984).



Şekil 2.2 Hemiselülozun yapısı ve içerdiği bileşikler (Fengel ve Wegener 1984)

2.1.3 Lignin

Lignin; hemiselüloz ve selülozdan sonra doğada en çok bulunan polimerlerden biridir ve hücre duvarında bulunur. Üç farklı fenilpropan ünitesinin (p-kumaril, koniferil ve sinapil alkol) birbirine farklı bağlar ile bağlanmasıyla oluşan amorf bir heteropolimerdir. Ligninin ana amacı bitkiye yapısal destek oluşturmak, mikrobiyel saldırı ve oksidatif strese karşı direnç göstermektir. Suda çözünmez ve optik olarak inaktiftir ki bu da ligninin parçalanmasını zorlaştırmaktadır (Fengel ve Wegener 1984).

Lignin; özellikle odunsu türlerin hücre duvarlarında, çok dallanmış ve aromatik polimer bileşenlerden oluşan bir yapıdadır. Yumuşak ağaç ve sert ağaçlarda; kuru madde bazında lignin içeriği genellikle ağırlıkça %20-40; küspe, mısır koçanı, yer fıstığı

kabuğu, pirinç samanı gibi otsu bitkilerde ise ağırlıkça %10-40 arasında değişmektedir (Yaman 2004).

Biyokütlenin parçalanabilmesi ve içerisinde bulunan polimerik şekerlerin hidrolize olabilmesi; yapısındaki ligninin parçalanmasına ve uzaklaştırılmasına doğrudan bağlıdır. Delignifikasyon (ligninin yapıdan uzaklaştırılması); biyokütlenin şişmesine, ligninin yapısının bozulmasına, iç yüzey alanının artmasına ve selüloz liflerine selulotik enzimlerin ulaşılabilirliğinin artmasına neden olmaktadır (Agbor vd. 2011).

2.2 Alternatif Biyoyakıt: Biyoetanol

Dünyada ki enerji kaynaklarının büyük bir bölümü; başta petrol olmak üzere doğal gaz ve kömür gibi fosil yakıtlara dayanmaktadır. Dünya genelinde hızlı nüfus artışı ve ekonomik gelişmeler ile enerji tüketiminin artması; bu kaynakların yenilenememesinden dolayı yakın gelecekte tükenmesine sebep olacaktır. Bu durum; yenilenebilen, temiz, güvenilir ve ekonomik yeni bir enerji kaynağı arayışına neden olmuştur (Gui vd. 2008). Biyoenerji de bu özelliklere sahip enerjilerden biridir.

Biyoenerji; biyokütleden (biyolojik ham maddeler) elde edilen katı, sıvı ve gaz enerji içeriğini ifade etmektedir. Bu; taşımacılık için kullanılan biyoyakıtları (biyoetanol ve biyodizel), elektik ve ısı üretmek için kullanılan ürünleri ve endüstriyel atıklardan biyolojik maddelerin işlenmesi ile üretilen biyogazı (biyometan ve biyohidrojen) kapsamaktadır (Anonymous 2019b). Günümüzde; biyokütle toplam küresel enerjinin %10'unu oluşturmaktadır (Anonymous 2019b). Biyoenerjinin; 2035 yılına kadar toplam enerjinin %20-30'unu sağlayacağı düşünülmektedir (Anonymous 2013).

Yenilenebilir enerji kaynağı olan biyoyakıtlar (özellikle sıvı biyoyakıtlar); taşınabilen ve depolanabilen enerji kaynağı olmaları, fosil yakıtlara kıyasla karbondioksit, mikro kirletici ve partikül madde emisyonlarını büyük ölçüde azaltmaları, enerji güvenliğinin arttırılmasını ve enerji piyasasının stabilizasyonunu sağlamaları ve atık biyokütlenin kazanımından yeni bir ekonomik döngünün geliştirilebilmesine olanak tanımaları gibi bazı olumlu özelliklere sahiptir (Callegari vd. 2019).

Üretilme teknolojilerine ve kökenlerine bağlı olarak biyoyakıtlar genel olarak birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılır. Birinci nesil yakıtlar; basit şekerler, yağlar ve nişasta gibi enerji içeriği yüksek moleküllerden elde edilen yakıtları içermektedir. İkinci nesil biyoyakıtlar; lignoselülozik hammaddeden (saman, küspe, orman atıkları gibi gıda dışındaki materyaller, enerji bitkileri vb. gibi) üretilen yakıtları kapsamaktadır. Üçüncü nesil biyoyakıtlar ise alglerden üretilen yakıtları içermektedir (Anonymous 2013).

2.3 Lignoselülozik Biyokütlenin Dönüşümü

Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretim aşamaları 4 başlık altında incelenebilir; (1) ön işlem, (2) hidroliz, (3) fermantasyon (hidroliz sonrasında veya eşzamanlı olarak) (4) üretilmiş etanolün ayrılması (Ayoub ve Lucia 2018).

Lignoselülozik materyalin yapısı sebebiyle, biyolojik olarak dönüşümü çok zor gerçekleşir. Öncelikli olarak, bağlarla korunmuş yapının, ön işlemle parçalanması ve hidroliz ve fermantasyon aşamasına hazırlanması gerekmektedir. Ön işlem ile ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir (2.3.3). Ön işlem sonrasında, materyaldeki polimerik şekerlerin hidroliz ile fermente edilebilir şekerlere dönüşmesi ve fermentasyon ile etanol üretimi sağlanmaktadır.

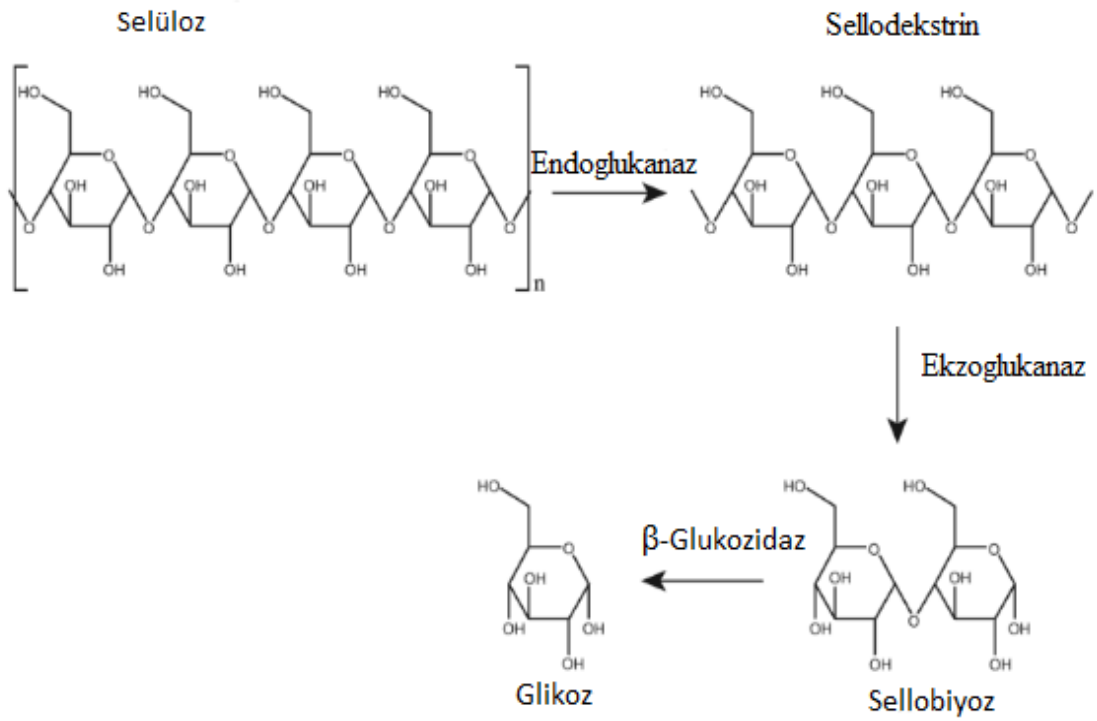
2.3.1 Hidroliz

Hidroliz; kimyasallarla (asit) hidroliz ve enzimatik hidroliz olarak iki şekilde yapılabilmektedir (Çizelge 2.2). Sülfirik asit, asit hidrolizi sırasında en çok tercih edilen kimyasaldır. Ancak, korozif olması ve şekerlerin degredasyonuna sebep olması nedeniyle günümüzde enzimatik hidroliz daha yaygın olarak uygulanmaktadır (Haq vd.2016).

Çizelge 2.2 Asit ve enzimatik hidrolizin özellikleri (Haq vd.2016)

Hidroliz metodu	**Olumlu özellikleri**	**Olumsuz özellikleri**
Konsantre asit prosesi	• Düşük sıcaklıkta gerçekleşebilmesi • Yüksek şeker verimi	• Yüksek asit tüketimi (ekipman korozyonu) • Asidin tekrar kullanımı için yüksek enerji tüketimi • Yavaş proses
Seyreltik asit prosesi	• Düşük asit tüketimi • Hızlı proses	• Yüksek sıcaklıkta işlem • Düşük şeker verimi • Ekipman korozyonu • İstenmeyen bileşik oluşumu
Enzimatik proses	• Düşük korozyon • Yüksek ürün verimi • Düşük toksisite • İnhibitör oluşturmaması	• Yavaş proses • Enzim pahalılığı

Enzimatik hidroliz; substrata özgü ve oldukça pahalı olan selülaz ve hemiselülaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Başlıca selülaz enzimleri; endo-1,4-β-glukanaz, ekzoglukanaz (sellobiyohidrolaz) ve β-glikozidaz olarak üç sınıf altında toplanmaktadır (Şekil 2.3). Endoglukanaz; polimerin amorf bölgesine saldırarak selüloz yapısının bozulmasına ve bu sayede moleküler ağırlığı düşük yeni zincir oluşumunu sağlamaktadır. Sellobiyohidrolaz; zincir sonundaki β-1,4-glikozidik bağını kırarak sellobiyoz oluşumuna neden olmaktadır. β-glikozidaz; sellobiyozu hidroliz ile glikoza parçalamaktadır (Sun ve Cheng 2002, Sarkar vd. 2012). *Trichoderma, Penicillum, Fusarium* ve *Aspergillus* küfleri selülaz enzimi üretiminde sıklıkla tercih edilir. Selülozik etanol üretimi sırasında selülazın yanında hemiselülozu hidrolize eden ilave enzimler (glukuronidaz, asetilesteraz, ksilanaz, b-ksilosidaz, galaktomannanaz ve glukoanzanaz) de kullanılabilmektedir (McMillan 1994, Sun ve Cheng 2002, Mosier 2005). Selüloz hidrolizini etkileyen faktörler; hammaddenin gözenekliliği (erişilebilir yüzey alanı), selüloz lifinin kristalliği, hammaddenin lignin ve hemiselüloz içeriği olarak tanımlanmıştır. Lignin ve hemiselülozun varlığı selülaz enziminin selüloza ulaşılabilirliğini zorlaştırmaktadır.



Şekil 2.3 Selülozun enzimatik hidrolizi (Sarkar vd. 2012)

2.3.2 Fermantasyon

Fermantasyon prosesi; monomer şeker ünitelerinin etanole dönüşümüdür. Hidrolize şeker ünitelerinin etanole dönüşümü eşitlik 2.1'de gösterilmiştir (Mohapatra vd. 2017).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad (2.1)$$

Fermantasyon işlemi mayalar veya bakteriler ile gerçekleştirilir. Heksozların (6 karbonlu şekerler) etanole dönüşümü kolay bir şekilde gerçekleşirken; pentozlar (5 karbonlu şekerler) sadece bazı mikroorganizmalar tarafından fermente edilerek etanole dönüştürülebilmektedir. Fermantasyon işlemi, eş zamanlı hidroliz ve fermentasyon (SSF) veya ayrı hidroliz ve fermentasyon (SHF) şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. SSF; düşük enzim dozu gerektirmesi, işletme maliyetinde tasarruf sağlaması, kontaminasyon problemini azaltması, proses süresini kısaltması ve hidroliz verimini arttırması sebebiyle (Sun and Cheng 2002) günümüzde selülozik etanol üretiminde en çok tercih edilen fermantasyon metodu olmuştur.

Etanol üretiminde en çok bilinen ve ticari olarak da en çok tercih edilen mikroroganizma *Saccharomyces cerevisiae*'dır. *S. cerevisiae*'nin heksozdan yüksek verimde etanol üretebildiği, etanole ve inibitör bileşiklere yüksek direnç gösterebildiği bilinmektedir. Ancak, biyotkütlenin hidrolizi aşamasında açığa çıkan ksiloz gibi 5 karbonlu pentozları fermente edememektedir. Ekonomik bir biyoetanol üretim yöntemi için biyokütlenin içerisindeki tüm şekerlerin fermente edilebilmesi büyük önem taşımaktadır (Basile ve Dalene 2019). Bu bağlamda, pentozları da fermente edebilen bazı diğer mikroorganizmaların kullanımı literatürde farklı çalışmalara konu olmuştur (Çizelge 2.3). Çizelgede belirtilen mikroorganizmalar dışında; *Klebsiella oxytoca, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis, Candida shehatae, Pachysolan tannophilus, Kluyveromyces mariianus* gibi türlerde ksiloz ve sellobiyozu fermente edebilmektedir (Basile ve Dalene vd. 2019).

Çizelge 2.3 Biyoetanol üretiminde kullanılan ve pentozları da fermente edebilen bazı mikroorganizmalar ve özellikleri (Basile ve Dalene 2019)

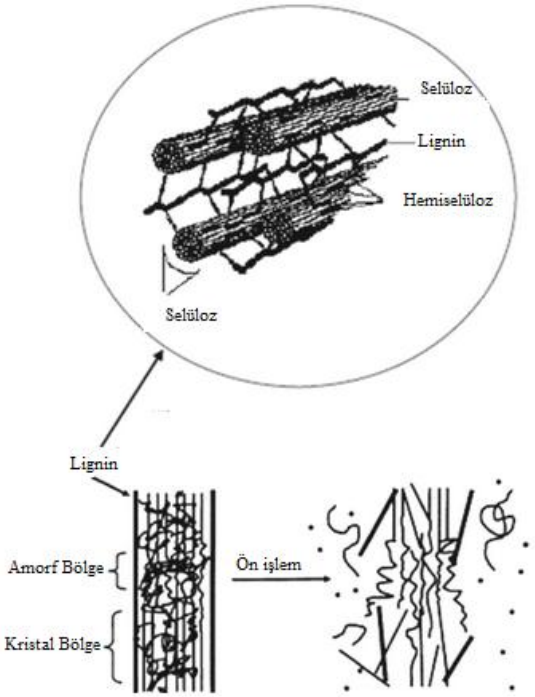
Mikroorganizma	**Özelliği**	**Kaynakça**
Escherichia coli	Doğal suşları ksiloz ve sellolobiyozu fermente edebilir, ancak etanole karşı toleransı düşüktür.	Lau vd. (2010) Yasuda vd.(2014).
Clostridium acetobutylicum	Farklı şekerleri tamamen tüketebildiği belirtilmiştir.	Procentese vd.(2017)
Clostridium sacccharobutylicum	Farklı şekerleri tamamen tüketebildiği belirtilmiştir.	Xu vd.(2016). Xing vd.(2018)

2.3.3 Lignoselülozik biyokütlede ön işlem

Ön işlemin birincil amacı, lignoselülozik yapının parçalanmasını (Şekil 2.4) ve böylelikle enzimatik hidroliz ve fermantasyona uygun hale getirilmesini sağlamaktır (Mosier vd 2005). Ön işlem sırasında biyokütlede meydana gelen değişimler (porozite ve yüzey alanının artması, ligninin modifiye olması ve yapıdan ayrışması, hemiselülozun kısmen depolimerizasyonu, selüloz kristalitesinin değişimi vb. gibi) enzimatik hidrolize olumlu şekilde etki etmektedir (Ayoub ve Lucia 2018). Bir ön işlemde beklenilen özellikler arasında, yüksek enzimatik hidroliz verimi sağlaması,

şeker degredasyonunu minimumda tutması, mikroorganizmaların inhibisyonuna sebep olabilecek toksik maddelerin oluşumuna neden olmaması, çevreci kimyasallar kullanılması, düşük enerji gereksinimi ve düşük maliyetli olması sayılabilir (Ayoub ve Lucia 2018).

Ön işlem; (a) mekanik ön işlem (doğrama, öğütme gibi parçaçık boyutu küçültme ve), (b) fiziksel ön işlem ((ışınlama ve mikrodalga, ultrason, infrared) ve termal ön işlem (buhar ile patlatma), (c) kimyasal ön işlem (alkali, asit ve organik çözgenler), (d) fizikokimyasal ön işlem (hidrotermal proses), (e) biyolojik ön işlem (çürükçül mantarlar) gibi farklı başlıklar altında incelenebilmektedir (Ayoub ve Lucia 2018).



Şekil 2.4 Ön işlemin lignoselülozik biyokütle üzerinde etkisi (Ayoub ve Lucia 2018)

Çizelge 2.4 Bazı ön işlem metotlarının özellikleri (Mosier 2005, Alvira vd. 2010, Ayoub ve Lucia 2018)

Ön İşlem Metodu	Olumlu özellikleri	Olumsuz özellikleri
Biyolojik	• Hemiselüloz ve lignini parçalaması, • Düşük enerji tüketimi	• Ön işlem hızının düşük olması
Doğrama	• Selüloz kristalitesini azaltması	• Yüksek enerji ve güç isteği
Buhar ile patlatma	• Ligninin parçalanması ve hemiselülozun çözünmesine neden olması, • Fiyat uygunluğu • Glikoz ve hemiselüloz veriminin yüksekliği	• Hemiselülozun kısmen bozunması • Toksik bileşiklerin oluşumu
AFEX (Amonyak Lif Patlaması)	• Ulaşılabilir yüzey alanının artması, • İnhibitör oluşumunun düşüklüğü	• Yüksek lignin içeren hammaddelerde etkili olmaması, • Maliyetinin yüksekliği
CO_2 ile patlatma	• Ulaşılabilir yüzey alanının artması, • Fiyat uygunluğu • Toksik bileşik oluşumunu içermemesi	• Lignin ve hemiselülozu etkilememesi • Yüksek basınç gerekliliği
Islak oksidasyon	• Ligninin ayrılmasında etkili olması, • İnhibitör oluşumunun düşüklüğü, • Enerji gereksiniminin düşük olması (ekzotermik)	• Oksijen ve alkali katalistin maliyetinin fazla olması
Ozon ile ön işlem	• Lignin içeriğini azaltması, • Toksik bileşik oluşmaması	• Pahalı olması
Organik çözgen	• Lignin ve hemiselüloz parçalanmasına neden olması	• Yüksek maliyet • Çözgenin geri dönüşümlü olması gerekliliği
Konsantre asit	• Yüksek glikoz verimi, • Sıcaklığın ideal olması	• Asit maliyeti • Korozyon sorunu • İnhibitör oluşumu
Seyreltik asit	• Konsantre aside göre korozyana daha az neden olması, • İnhibitör oluşumunun düşüklüğü,	• Şeker degredasyonu • Düşük şeker verimi eldesi

Farklı ön işlem metotları ve bu metotların bazı özellikleri çizelge 2.4' de özetlenmiştir (Mosier 2005, Alvira vd. 2010, Ayoub ve Lucia 2018). Lignoselülozik biyokütlenin ön-işlemesi ile ilgili yapılmış araştırılmalar göz önünde bulundurulduğunda günümüzde halen altın standart olarak belirlenmiş bir proses yoktur. Bazı yöntemler etanol verimliliğini arttırmasına rağmen, şeker degredasyonuna sebep olmuş, bazıları toksik yan ürünlerin oluşmasını engellemesine rağmen çok pahalı bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir. Bazıları ise maliyeti düşürmesine rağmen diğer yöntemlere oranla etkinliğinin daha az olduğu anlaşılmıştır (Rabemanolontsoa ve Saka, 2016). Bu tez kapsamında ön-işlem metodu olarak yeşil çözücü tercih edilmiştir.

Yeşil çözücüler süperkritik akışkanlar, iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücüler (DES) olarak sınıflandırılabilir. Son yıllarda büyük ilgi gören yeşil çözücüler ise iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücülerdir. İyonik sıvılar anyon ve katyon olmak üzere en az iki bileşenden oluşan, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan çözücülerdir. İyonik sıvıların toksik ve fiyatlarının yüksek olması araştırmacıları yeni nesil derin ötektik çözücülere yönlendirmiştir (Zhang vd. 2012). Derin ötektik çözücüler, organik tuzlar ile alkol, asit veya amit gibi hidrojen bağı donörü (HBD) arasındaki bağ ile oluşurlar. DES'lerin erime noktası başlangıç kimyasallarına göre çok daha düşüktür (genellikle 70^0 C'nin altında sıvı formdadırlar) ve bu özellik karışımın oda sıcaklığında kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca bileşenler arasındaki güçlü bağ bileşiklerin reaktifliğini azaltarak onları birçok durum için inert hale getirmektedir. İyonik sıvılar gibi DES'ler de düşük buhar basıncına ve yüksek ısıl kararlılığa sahiptir. Ancak, iyonik sıvıların aksine ucuz, hazırlanmaları kolay ve biyolojik olarak parçalanabilmektedirler. Sentezlerinin çok kolaylıkla yapılabiliyor olması (iki kimyasalın direkt karıştırılmasıyla) ve sentez aşamasından sonra ekstra saflaştırma aşaması gerektirmemesi, yanıcı olmamaları da pilot ve endüstriyel ölçekte de rahatlıkla kullanılabilmelerini sağlamaktadır (Zhang vd. 2012).

2.4 Derin Ötektik Çözgen

Abbott vd (2004) tarafından, başlangıç bileşenlerine göre çok daha düşük erime noktasına sahip, iki veya daha fazla Lewis asidi ve bazı ya da Bronsted-Lory asidi ve

bazlarının karışımından oluşan sistem, derin ötektik çözgen olarak tanımlanmıştır. İyonik sıvılara benzer fiziksek özelliklere sahip olduğu düşünülmüştür, ancak başlangıç bileşenlerinin kaynağı ve kimyasal oluşum prosesi açısından farklılık göstermektedir.

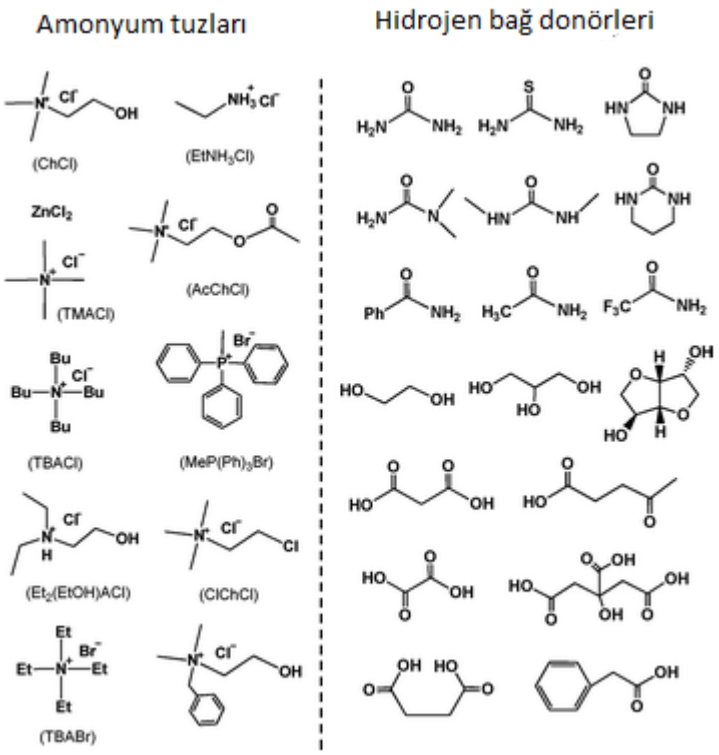
DES; hidrojen bağ alıcısı olarak hareket eden bir halojen tuzu ve hidrojen bağı donörünün (HBD) birleşmesinden oluşmaktadır (Şekil 2.5). Hidrojen bağ donörleri; amid, amin, karboksilik asit, alkol ve metal tuzları gibi birçok seçenekten oluşabilmektedir. Derin ötektik çözgenler (Çizelge 2.5**)** genel olarak 4 grupta incelenebilmektedir (Zhou ve Baker 2013, Smith vd. 2014).

Derin ötektik çözgenler $Cat^{+}X^{-}zY$ genel formülü ile ifade edilmektedir. Cat+ amonyum, fosfonyum ve sülfonyum katyonlarını, X ise halojenür anyon olan Lewis bazını göstermektedir. Kompleks anyonik türlerde; bir Lewis veya Brønsted asit Y ve X arasında oluşmaktadır. Denklemde; 'z' olarak belirtilen ifade, anyon ile etkileşime giren Y molekülü sayısıdır. Yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu; kuarterner amonyum ve imidazolium katyonları (örn. kolin klorür) üzerinde yoğunlaşmıştır (Smith vd. 2014).

Tip 1 olarak tanımlanan derin ötektik çözgenler, MCl_x ve kuarterner amonyum tuzlarından oluşmuş olup; kloroalüminat/imidozolium tuzları ve $FeCl_2$, AgCl, CuCl, LiCl, $CuCl_2$, $SnCl_2$, $ZnCl_2$ gibi çeşitli metal halojenlerin birleşiminden oluşmaktadır. Tip 1 oluşturmak için düşük erime noktasına sahip hidrat olmayan metal halojen tuzları gerekmektedir. Fakat bu tuzların sınırlı olması; Tip 2'nin (hidrat metal halojenleri: kolin klorürün) kullanımının artmasına neden olmuştur. Tip 2 ötektikleri; Kolin klorür ve kobalt, nikel gibi birçok geçiş metal türleri ile oluşmaktadır. Tip 4; metal klorür ($ZnCl_2$) ve üre, asetamid, hekzandiol gibi hidrojen bağ donörlerinden oluşmaktadır. Kolin klorür ve hidrojen bağı donörlerinin (amid, karboksilik asit, alkol) karışımı (şekil 2.5) en yaygın kullanılan çözgen sınıfını (Tip 3) oluşturmaktadır (Smith 2014).

En yaygın DES oluşturabilen bileşiklerden birisi olan kolin klorür(ChCl); fosil rezervlerinden kolaylıkla üretilen veya biyokütleden ekstrakte edilebilen, ucuz ve toksik etkisi olmayan kuaterner amonyum tuzudur. Bu tuz; üre, karboksilik asit (okzalik asit, süksinik asit, formik asit, sitrik asit ve amino asit) ve poliol (gliserol,karbonhidrat) gibi

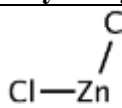
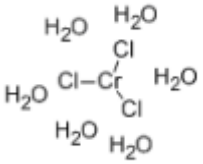
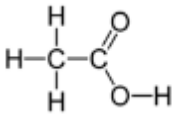
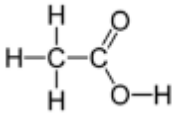
hidrojen bağ donörleri ile hızlı şekilde derin ötektik çözgen oluşturabilmektedir (Şekil 2.5). İyonik sıvılar ile benzerlik göstermesine rağmen; iyonik olmayan bileşenler ile de DES oluşturabilmesi bu bileşiği farklı kılmaktadır (Zhang vd. 2012).



Şekil 2.5 DES sentezinde sıklıkla kullanılan halojen tuzları ve hidrojen bağ donörleri (Zhang vd.2012, Smith vd. 2014)

DES'lerin içerisindeki hidrojen bağ dönörünün oranı, DES'lerin erime noktasını belirlediğine inanılmaktadır. Hidrojen bağ donörü çeşidi, tuz çeşidi ve mol oranları; yoğunluğu, yüzey gerilimi ve viskoziteyi etkileyen başlıca faktörlerdir. DES; genel olarak diğer moleküler çözgenlere göre daha yüksek viskozite ve daha düşük ısıl iletkenliğe sahiptir. Wonder waals ve elektrostatik etkiler yüksek viskoziteye katkı sağlamaktadır (Smith vd 2014).

Çizelge 2.5 DES sınıflandırılması (Zhou ve Baker 2013, Smith vd. 2014).

Tip	Kimyasal yapı	Formül
I)Kuarterner amonyak tuzu+metal klorür[a]		$Cat^+X^-zMCl_x$ (M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In)
II)Kuarterner amonyak tuzu+metal klorür hidrat[b]		$Cat^+X^-zMCl_x \cdot yH_2O$ (M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe)
III)Kuarterner amonyak tuzu+hidrojen bağı donörü[c]		Cat^+X^-zRZ (Z= $CONH_2$, COOH, OH)
IV)Metal klorür hidrat+hidrojen bağ donörü[c]		$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x+1}^-$ (M = Al, ZnZ = $CONH_2$, OH)

[1]Metal klorür (a), metal klorür hidrat (b) ve hidrojen bağ donörünün(c) kimyasal yapısı çizelgede gösterilmiştir.

Metallerin işlenmesi, polimer sentezi, nanotüp kompozit hazırlanması, biyodizel saflaştırılması, ilaçların çözündürülmesi, biyolojik tranformasyonlar ve CO_2 absorpsiyonu gibi çok farklı alanlarda derin ötektik çözgenlerin kullanıldığı belirtilmiştir (Degam 2017). Bu kullanım alanlarına ek olarak, DES'ler son yıllarda, selülozik biyokütle ön-işlem aşamasında da iyonik sıvıların yerine tercih edilmeye başlanmıştır.

Literatürde birçok farklı derin ötektik çözgen, pirinç sapları (Kumar vd. 2016), palmiye ağacı yaprakları (Loow vd. 2018), mısır koçanı (Procentese vd. 2015), söğüt ağacı (Li vd. 2017) ve gıda endüstrisi atıkları (Procentese vd. 2018) gibi farklı biyokütle kaynakları üzerinde denenmiş ve lignoselülozik yapıyı etkin bir şekilde parçaladığı tespit edilmiştir. Ancak literatür ayrıntılı olarak incelendiğinde DES ile yapılan ön-işlemlerin süresinin uzun olduğu (2-24 saat) gözlemlenmektedir (Loow vd. 2017). İşlem süresinin kısaltılması amacıyla, DES ön işleminin mikrodalga ile birleştirilmesi yenilikçi bir yaklaşım olarak düşünülmektedir.

2.5 Mikrodalga ön işlemi

Mikrodalga; dalga boyları 1m-1mm ve frekansları 0,3-300 Ghz arasında değişen elektromanyetik dalgalardır (Haque 1999). Endüstriyel ölçekli kullanılan mikrodalgalar, genellikle 915 MHz frekansta, ev tipi kullanılanlar ise 2450 MHz frekanstadır. Mikrodalga, elektromanyetik spektrumda, radyo frekans dalgalar ile kızılötesi dalgalar arasında yer almaktadır (Datta ve Anantheswaran 2001). Geleneksel ısıtmaya göre; mikrodalga yöntemi çok daha farklı bir prensipte çalışmaktadır. Geleneksel yöntemde dıştan içe doğru bir ısıtma izlenirken, mikrodalgada hacimsel ısıtma olmaktadır. Mikrodalgalar, dipolar parçacıkların rotasyonu ya da iyonik parçacıkların göçü ile moleküler bir harekete sebep olurlar. İyonik iletim, uygulanan elektromanyetik alandaki çözünen veya titreşen iyonların göç etmesini, dipol rotasyon ise polarize olmuş moleküllerin, bir hizaya sokulması anlamına gelmektedir (Sumnu 2001). Bu şekilde ısınma; biyokütlenin şişmesine, hemiselüloz ve ligninin parçalanarak yapıdan ayrılmasına sebep olmaktadır. Mikrodalga ile ön işlem, AFEX ve buhar ile patlatma ön işlemleri gibi benzer patlama etkisi yaratmaktadır (Zhu vd. 2015; Puligundla vd. 2016).

2.6 Kaynak Özetleri

Bu bölümde, son yıllarda DES'ler kullanılarak yapılan ön işlem çalışmaları detaylı olarak incelenmiştir.

Procentese vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada; mısır sapı üç çeşit çözgen (Kolin klorür:Gliserol (1:2), Kolin klorür:Üre (2:1), Kolin klorür: İmidazol (3:7)) kullanılarak farklı sıcaklıklarda 15 saat boyunca su banyosunda ön işleme tabi tutulmuştur. Hidroliz sonrası toplam şeker miktarı ChCl:Gliserol ile 150 °C sıcaklıkta işlenen örneklerde 37.8 g/g, ChCl:Üre ile 115 °C'de işlenen örneklerde 20.9 g/g ve ChCl:İmidazol ile 115 °C sıcaklıkta işlenen örneklerde 35.9 g/g olarak bulunmuştur. En yüksek glikoz verimi 150 °C sıcaklıkta (%94.6) ChCl:İmidazol ile işlenen örneklerden, en yüksek ksiloz verimi ise (%95.5) aynı sıcaklıkta ChCl:Gliserol ile işlenen biyokütleden elde edildiği belirtilmiştir. Mısır sapında; ChCl:İmidazol'ün (3:7 mol oranında) sıcaklık 80°C iken % 40 olan delignifikasyon oranının 150 °C' de % 88 olduğu belirtilmiştir.

Zhang vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada; mısır koçanına farklı (90 °C sıcaklık ve 24 saat süre ile) derin ötektik çözgenlerle ön işlem uygulanmıştır. Monokarboksilik asit: ChCl, Dikarboksilik asit:ChCl ve Polialkol:ChCl üç farklı şekilde oluşturulmuş ve işlenen biyokütlenin hidrolizi sonrasında elde edilen glikoz verimlilikleri değerlendirilmiştir. Monokarboksilik asit: ChCl türlerinden 1:5 oranında ki ChCl:Laktik asit'in % 83.5 ile en yüksek glikoz verimi verdiği tespit edilmiş. Dikarboksilik asit: ChCl'de ise en yüksek glikoz verimi Malonik asit:ChCl (%61.5) ile bulunmuştur. 2:1 mol oranında oluşturulmuş Polialkol:ChCl çözeltileri içinde en yüksek verimin %96.4 ile Gliserol:ChCl'de gözlendiği belirtilmiştir. Ayrıca, Gliserol:ChCl'nin lignini maksimum seviyede ayrıştırdığı, katı materyalin kazanımında ve yüksek glikoz verimi elde etmekte çok etkili olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada; pirinç samanı farklı DES'ler ile işlenmiştir. Kolin klorür ile birlikte malonik asit, malik asit, 1,2-propanediol, sitrik asit, tartarik asit, gliserol, etilen glikol, laktik asit, üre ve oksalik asit gibi farklı hidrojen bağ donörleri kullanılarak ötektik çözgenler hazırlanmıştır. Pirinç samanı; farklı mol oranları kullanılarak hazırlanmış çözgenlerle; %5 ve %10 katı oranlarında, farklı sıcaklık (60-121°C) ve sürelerde (30 dakika-12 saat) ön işleme maruz bırakılmıştır. Maksimum indirgen şeker miktarının (226.7 g/L) ChCl:Gliserol ile işlenmiş saman örneklerinin enzimatik hidrolizinden elde edildiği tespit edilmiş ve sakkarifikasyon verimi %87.1 olarak rapor edilmiştir (Kumar vd. 2016).

Xu vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada; ChCl:Üre (1:2), ChCl: Gliserol (1:2), ChCl:Formik asit (1:2), ChCl:Asetik asit (1:2), ChCl:Oksalik asit (1:1), ChCl:Malonik asit (1:1) ve ChCl:Oksalik asit (1:1) kullanılarak mısır atıklarına ön işlem (130°C, 100 rpm'de 2 saat) uygulanmıştır. ChCl: Formik asit ön işlemi sonunda elde edilen glikoz verimi optimizasyonla maksimize edilmeye çalışılmıştır. Optimizasyon sonunda; 3 saat boyunca uygulanmış ön işlem ile 17.0 g/L glikoz elde edilmiş ve glikoz verimi %99 olarak bulunmuştur. *Clostridium saccharobutylicum* mikroorganizması kullanıldığında; bütanol konsantrasyonu 5.63 g/L ve bütanol verimi 0.17 g/g toplam şeker olarak belirtilmiştir.

Lynam vd. (2017); çam örnekleri üzerinde Kolin klorür:Formik asit (1:2), Kolin klorür:Laktik asit (1:10), Kolin klorür:Asetik asit (1:2), Betaine:Laktik asit(1:2) gibi farklı derin ötektik çözgenler kullanarak ön işlem yapmıştır. Katı/sıvı oranı 1:10 (g/g) olarak hazırlanan örneklere 155 °C'de 2 saat ön işlem uygulanmıştır. Kolin klorür:Formik asidin;en yüksek lignin çözünülebilirliğine (%14), en düşük ksilan (<%1) ve selüloz çözünülürlüğüne (<%1) neden olduğu belirlenmiştir. Çam örneklerinde ön işlem sonunda; glikoz veriminin Kolin klorür:Formik asitle (%70) Kolin klorür:Gliserol'e göre 7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Procentese vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada marul yapraklarına Kolin klorür:Gliserol (1:2) ile farklı sıcaklık (80-150°C) ve sürelerde (3-16 saat) su banyosunda ön işlem uygulanmıştır ve işlenmiş örneklerden *Clostridium acetobutylicum* kullanılarak bütanol üretilmiştir. Ön işlemin 150 °C' de 6 saat boyunca sürdüğü koşulda glikoz verimi %94.9 ve ksiloz verimi %75 bulunmuştur. Bu koşulda elde edilen bütanol verimi 0.04 g/g, fermentasyon sonundaki bütanol konsantrasyonu ise 0.5 g/L olarak bulunmuştur.

Chen ve Wan vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; 3 farklı hammaddede (mısır koçanı, dallı darı otu (switchgrass) ve fil otu (miscanthus)) Kolin klorür: Laktik asit (1:2) ile mikrodalgada-DES (800 W ve 45 saniye) ön işlemi uygulanmıştır. İşlenen biyokütlenin geri kazanım oranları mısır koçanı, dallı darı otu ve fil otu için sırasıyla % 36.64, 50.46 ve 53.21 olarak bildirilmiştir. Glikoz verimleri mısır koçanı, dallı darı otu ve fil otu için sırası ile %78.5, %75 ve <%40 olarak rapor edilmiştir. Uygulanan ön işlemin biyokütle sindirilebilirliğini arttırdığı ifade edilmiştir.

Li vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; pirinç samanı farklı mol oranlarında (1:1,1:3,1:5) hazırlanmış Kolin klorür: Laktik asit çözeltisiyle 90-120°C sıcaklıkta 3-6 saat süresince ön işleme tabi tutulmuştur. En ekstrem koşul olan; 1:5 mol oranında, 120°C sıcaklıkta 3 saat süreyle işlenmiş örneklerde; selüloz, ksilan ve lignin miktarları sırasıyla %59.2, 8.3 ve 11.3 olarak tespit edilmiştir. Bu işlem sonunda gerçekleştirilen enzimatik hidroliz deneylerinden elde edilen örneklerde glikoz veriminin %60-70 arasında değiştiği belirtilmiştir.

Loow vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; palmiye ağacı yaprakları, Kolin klorür:Üre (1:2) ile (1:10 (w/v) katı/sıvı oranında) farklı sıcaklık (60-140 °C) ve sürelerde (2-10 saat) yağ banyosunda ön işleme tabi tutulmuş ve ardından inorganik tuz ile işlenmiştir. Dört saat boyunca 120 °C'de uygulanan ön işlemin 14.76 g/L ksiloz verimi sağladığı belirtilmiştir.

Procentese vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; gıda endüstrisi atıkları (patates kabuğu, elma atıkları ve kahve atıkları) üzerinde iki farklı derin ötektik çözgenin (Kolin klorür:Gliserol ve Kolin klorür:Etilen glikol) etkisi incelenmiştir. Ön işlem, farklı katı/çözgen oranlarında (1:8-1:32) ve farklı sıcaklıklarda (60-150 °C) 3 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Kolin klorür:Gliserol'ün (1:32 katı/çözgen oranında) 150 °C sıcaklıkta örneklerden maksimum glikoz elde etmeyi sağladığı bildirilmiştir. Patates kabuğu, elma atıkları ve kahve atıklarından elde edilen maksimum glikoz miktarları sırasıyla 0.80, 0.95 ve 0.88 g glikoz/g biyokütle olarak rapor edilmiştir.

Sert vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; ayçiçeği sapında Kolin klorür:Sitrik asit (0.7:0.3), Kolin kloür:Tartarik asit (0.7:0.3), Kolin klorür:Okzalik(1:1) asit kullanılarak mikrodalgada ön işlem uygulanmıştır. Ön işlem; farklı sıcaklık (130-180 °C) ve sürelerde (1-10 dakika) gerçekleştirilmiştir. Mikrodalgada Kolin klorür:Oksalik asit kullanıldığında, 180°C sıcaklıkta 1 dakika boyunca işlem gören örneklerde en yüksek geri kazanım verimi (%99.07) elde edilmiştir.

Guo vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; ksiloz yan ürünü olan endüstriyel ksiloz kalıntılarına, Kolin klorür:Formik asit (1:1,5), Kolin klorür:1,4-Bütandiol (1:2) ve Betain:Laktik asit (1:2) kullanılarak farklı sıcaklıklarda (80, 100, 120°C) 2 saat süreyle ön işlem uygulanmıştır. Sıcaklık arttıkça örneklerdeki selüloz miktarının da arttığı belirtilmiştir. Enzimatik hidroliz sırasında elde edilen en yüksek glikoz verimine (%96.8) 120 °C sıcaklıkta Betain:Laktik asidin uygulandığı ön işlemle erişildiği belirtilmiştir.

Xing vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada; pirinç samanı üzerine farklı DES'lerin (Kolin klorür:Formik asit (1:2), Kolin klorür:Asetik asit (1:2), Kolin klorür:Gliserol

(1:2), Kolin klorür:Üre (1:2), Kolin klorür:Formik asit:Gliserol (1:1:1), Kolin klorür:Formik asit:Üre (1:1:1), Kolin klorür:Asetik asit:Gliserol (1:1:1) ve Kolin klorür:Asetik asit:Üre (1:1:1)) etkisi araştırılmıştır. Örnekler çözgen ile beraber yağ banyosunda 130 °C' de 2 saat boyunca bekletilmiştir. Kolin klorür:Formik asit:Asetik asit ön işleminde en yüksek toplam şeker 42.46 g/L elde edilmiştir. *Clostridium sacccharobutylicum* kullanılarak yapılan fermentasyon sonunda bütanol verimi 0.25g/g toplam şeker olarak bulunmuştur.

Bu çalışmanın genel amacı, lignoselülozik bir biyokütle olan ve aynı zamanda Türkiye'de ki en önemli tarımsal atıklardan biri olan buğday samanının yapısını, mikrodalga eşliğinde derin ötektik çözgen ile hızlı ve efektif bir şekilde parçalamak, devamında eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon ile enerji ihtiyacında fosil yakıtlara alternatif olan biyoetanol üretmektir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu çalışmada; kullanılmış olan buğday samanı, Ankara Üniversitesi Kenan Evren Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nden tedarik edilmiştir. Buğday samanı; değirmende (Apex mill, Apex Construction LTD, İngiltere) öğütülmüştür. Öğütülmüş saman gözenek büyüklüğü 950 mm olan elekten geçirilmiştir. Samanın kompozisyon analizi NREL Laboratuvar Prosedürü NREL/TP-510-42618'e (Sluiter vd. 2008) göre belirlenmiş ve çizelge 3.1' de verilmiştir. Samandaki kuru madde miktarı 105 ˚C'de 1 gün bekletilerek %92.5 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1 Samanın kompozisyonu (kuru madde bazında)

	Bileşen miktarı (%)
Selüloz	34.70±0.90
Hemiselüloz	22.45±0,30
Klason Lignin	19.82±0.15

3.2 Yöntemler

3.2.1 Derin ötektik çözgenin hazırlanması

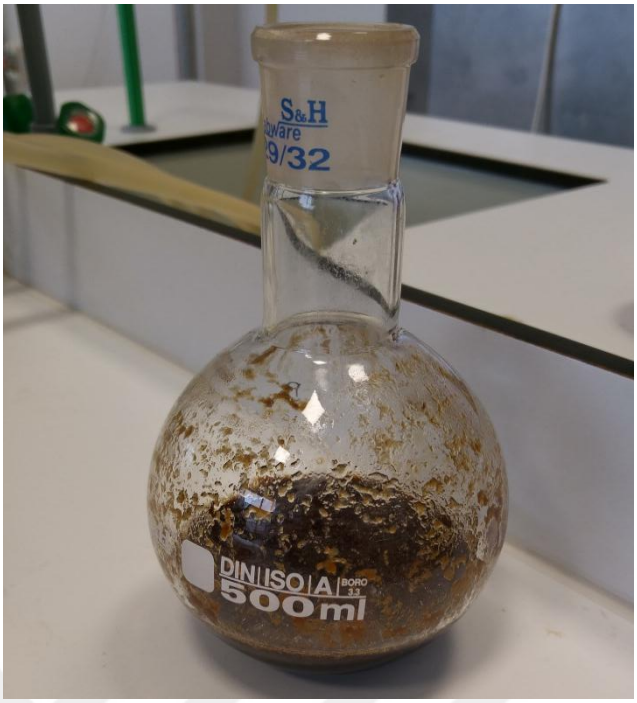
Ön işlemde kullanılacak olan derin ötektik çözgen; Sigmadan temin edilmiş olan Kolin klorür (≥98% saflıkta) ve ISOLAB'dan temin edilmiş (98-100% saflıkta) olan formik asit kullanılarak hazırlanmıştır. Farklı mol oranlarında (1:2,1:3 ve 1:4) karıştırılan Kolin klorür ve Formik asit, 30 °C sıcaklıkta 180 rpm karıştırma hızında 2 saat süresince karıştırılmıştır. Süre sonunda; 80 °C sıcaklıkta 16 saat bekletilmiştir. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Xu vd. 2016).

3.2.2 Geleneksel ön işlem

Öğütülen buğday samanları, Kolin klorür: Formik asit (1:3) ile katı sıvı oranı 1:10 (g/mL) olacak şekilde karıştırılmış ve 80 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilmiştir (Jablonsky vd. 2015). Geleneksel ön işlemdeki mol oranı (1:3) belirlenirken mikrodalga sonuçları göz önünde bulundurmuş ve enzimatik hidroliz sırasında en çok şeker elde edilmesini sağlayan mol oranı seçilmiştir. Ön işlem sonunda DES-saman karışımına 200 mL su ilavesi yapılarak soğumaya bırakılmış ve sonrasında örnek vakumlu filtrasyon düzeneği ile çözgenden ayrıştırılmıştır. Ayrıştırma sonrasında işlenmiş saman örnekleri 250 mL saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan katı örnekler 60 °C etüvde 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. Örneklerdeki kuru madde miktarı %89.2 olarak belirlenmiştir.

3.2.3 Mikrodalga destekli ön işlem

Saman örnekleri; üç farklı mol oranında (1:2, 1:3, ve 1:4), farklı sürelerde (2, 5 ve 8 dakika) ve farklı mikrodalga güçlerinde (270, 360, ve 450 W) Kolin klorür: Formik asit ile ön işleme tabi tutulmuştur (Şekil 3.1). Tüm deneylerde katı/sıvı oranı (kuru saman/DES) 1:10 (g/mL) olacak şekilde ayarlanmıştır. Ön işlem sonunda, DES-saman karışımına 200 mL su ilavesi yapılarak soğuması beklenmiş ve ardından vakumlu filtrasyon ile geleneksel ön işlemde olduğu gibi süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler, sonrasında 250 mL saf su ile kademeli olarak yıkanmış ve 60 °C etüvde 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. 1:4 mol oranında kuru madde miktarları % 89.6-93.2, 1:3 mol oranında % 91.3-93.2, 1:2 mol oranında ise % 90.2-94.6 arasında bulunmuştur. Ön işlem sonrasında işlenmiş samanda kompozisyon analizleri yapılmıştır (Sluiter vd. 2008) ve işlenmiş saman örnekleri enzimatik hidroliz ve toplam şeker miktarının optimum olduğu durumda fermentasyon deneylerine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1 Mikrodalga destekli derin ötektik çözgen ön işlemi sonrası saman örneği

3.2.4 Enzimatik Hidroliz

Ön işlem uygulanmış buğday samanı örnekleri; enzimatik olarak hidrolize edilmiştir. Enzimatik hidroliz deneyleri NREL laboratuvar prosedürleri temel alınarak yapılmıştır (Selig vd. 2008). Ön işlemden geçirilmiş örneklerde nem; infrared nem tayin cihazı (HHB43-S, Metter Toledo, Amerika) ile gerçekleştirilmiştir. Deneylerde dozu 50 FPU/g kuru madde olacak şekilde Cellic Ctec 2 (Novazymes, Danimarka) enzimi kullanılmıştır. Cellic Ctec 2; selülaz, hemiselülaz ve yüksek seviyede β-glukozidaz içeren enzim karışımıdır. Nem miktarları göz önünde bulundurularak tartılan örneklerde; %5 kuru madde i

çeren karışım, sıcaklık 50 °C ve karıştırma hızı 150 rpm olacak şekilde çalkalamalı inkübatörde (Nükleon, NCI-120, Türkiye) 72 saat süresince hidroliz gerçekleştirilmiştir. Örneklerden 6, 24, 48, 72. saatlerde alınan numuneler; 6000 devirde 10 dakika süresince santrifüj (Hermle, Z206 A, Almanya) edilmiştir. Santrifüj sonrası örnekler, 0.45 µm filtrelerden geçirilip HPLC analizleri için -18 °C dondurucuda depolanmıştır. Hidroliz deneyleri iki tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.

Hidroliz verimliği aşağıdaki Eşitlik 3.1 ve 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Glikoz\ verimi(\%) = \left(\frac{Enzimatik\ hidrolizden\ elde\ edilen\ glikoz\ miktarı(g) * 0{,}9}{Biyokütledeki\ glukan\ miktarı(g)}\right) * 100 \quad (3.1)$$

$$Ksiloz\ verimi(\%) = \left(\frac{Enzimatik\ hidrolizden\ elde\ edilen\ ksiloz\ miktarı(g) * 0{,}88}{Biyokütledeki\ ksilan\ miktarı(g)}\right) * 100 \quad (3.2)$$

(Not: Formüllerdeki 0.9 ve 0.88, glikoz ve ksilozu, glukan ve ksilan eşdeğeri olarak yazabilmek için gerekli olan dönüşüm çarpanlarıdır.)

3.2.5 Fermantasyon

Enzimatik hidroliz sonuçlarına göre maksimum toplam şeker (mg/g işlenmiş saman) elde etmeyi sağlayan koşullar optimum proses koşulları olarak belirlenmiş ve bu koşullarda işlenmiş saman örnekleri eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon deneylerine tabi tutulmuştur.

Simultane sakkarifikasyon ve fermantasyon denemeleri NREL laboratuar prosedürü modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Dowe ve McMillan 2001). Mikroorganizma olarak *Escherichia coli KO11* (ATCC 55124) kullanılmıştır. Bu bakteri glikozun yanı sıra, ksilozu da fermente ederek etanole çevirebilen mutant bir bakteridir.

Luria-Bertani besi yeri (LB broth) (pH 7.0) ve %5 (w/w)'lik glikoz çözeltisi 1:1 (v/v) olacak şekilde karıştırılmış ve sterilize edilmiştir. *Escherichia coli KO11* bu karışıma 1:50 (v/v) olacak şekilde inoküle edilmiş ve karışım 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir (Lee vd. 2015). Süre sonunda hücreler santrifüjlenerek fermentasyonda kullanılmıştır.

Fermentasyonda, 3 mL Luria-Bertani besi yeri (LB broth fermentasyon için 10 kat konsantre hazırlanmıştır), 1.5 g işlenmiş kuru saman, 1.5 mL sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH 7) ve saf su (son hacim 30 mL) ile karıştırılmış ve karışım 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası, otoklav sırasında kaybedilen su

miktarı, dozu 50 FPU/g kuru madde olacak şekilde 10 kat LB broth ile seyreltilmiş Cellic Ctec 2 (Novazymes, Danimarka) enzimi (2,475 mL) ve 1.5 mL *E. coli KO11* eklenmiş ve fermantasyon başlatılmıştır (Lee vd. 2015). Fermantasyon deneyleri; 37 °C'de 96 saat boyunca 150 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon boyunca (6, 24, 48, 72 ve 96.saatlerde) örnekler alınmış ve 1000 devirde 10 dakika süresince 4°C' de santrifüj edilmiştir. Süpernantlar HPLC analizi için 0.45 µm filtrelerden geçirilmiş ve -18°C' de depolanmıştır.

3.2.6 Analizler

3.2.6.1 Kompozisyon analizi

Ön işlem öncesinde ve sonrasında örneklerde kompozisyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Kuru madde miktarı 300 ± 10 mg olacak şekilde tartılan örneklere; 3 ± 0.01 mL % 72'lik sülfürik asit ilave edildikten sonra 30°C su banyosunda 60 dakika süresince her 10 dakikada bir karıştırılmıştır. Sürenin sonunda üzerlerine 84.00±0.04 g saf su ilave edilerek asit konsantrasyonu %4'e seyreltilmiştir. Örnekler, otoklavda 121 °C'de 1 saat süresince bekletilmiş ve sonrasında sıvı kısım krozelerden süzdürülerek -18 °C'de depolanmıştır. Katı kısım asitte çözünmeyen lignin miktarını belirlemekte kullanılmıştır. Lignin miktarı aşağıdaki Eşitlik 3.3'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır:

$$Lignin\ miktarı(\%) = \left(\frac{(Etüv\ sonu\ örnekli\ kroze\ ağırlığı(g)) - kroze\ dara\ ağırlığı(g)}{Tartılan\ örnek\ miktarı(g)}\right) * 100 \qquad (3.3)$$

İlk süzülen sıvı kısımdan örnekler alınarak içerisindeki glikoz, ksiloz miktarları HPLC ile belirlenmiş ve NREL prosedüründe (Sluiter vd. 2008) anlatıldığı şekilde, saman örneklerindeki selüloz ve ksilan miktarları hesaplanmıştır. Ayrıca, sıvı kısımda asitte çözünen lignin miktarları, spektrofotometrik olarak 320 nm'de okuma yapılarak, eşitlik 3.4 yardımıyla hesaplanmıştır (Sluiter vd. 2008).

$$\text{Lignin miktarı } (\%) = \left(\frac{\text{Absorbans(UV)} * \text{Hacim} * \text{Seyreltme faktörü}}{\text{Absorbtivite} * \text{örneğin kuru ağırlığı(mg)} * \text{uzunluk}}\right) * 100 \qquad (3.4)$$

3.2.6.2 HPLC analizleri

Tüm örneklerdeki glikoz, ksiloz ve etanol konsantrasyonlarının belirlenmesinde Agilent 1260 Infinity HPLC sistemi kullanılmıştır. HPLC dedektörü RID dedektör olup sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. Analizler sırasında, Bio-Rad Aminex HPX-87H kolonu kullanılmıştır ve kolon sıcaklığı 60 °C'de sabit tutulmuştur. Mobil faz olarak 0.005 M sülfürik asidin kullanıldığı sistemde akış hızı 0.6 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µl'dir. HPLC analizinde kullanılan standart kurveler EK1 ve EK2'de gösterilmiştir.

Etanol verimliliği, işlenmiş örneklerdeki toplam şeker miktarı göz önünde bulundurularak aşağıdaki Eşitlik 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Etanol verimi (\%)} = \frac{\text{Üretilen etanol miktarı (g)}}{\text{Fermentasyondaki toplam şeker miktarı (g)} \times 0{,}511} \times 100 \qquad (3.5)$$

(Not: Fermentasyona giren toplam şeker miktarında, işlenmiş biyokütledeki glikoz ve ksiloz miktarları (kullanılan mikroorganizma her ikisini de fermente edebildiği için) göz önüne alınmıştır. Formüldeki 0.511 değeri, bakterinin stokiyometrik biyokimyasına bağlı olan şekerden etanole dönüşüm faktörüdür.)

3.2.6.3 İstatistik analizler

Bulgularla yönelik istatistiksel analizler MİNİTAB statistic software 16.1.1.1" (Minitab Inc., Amerika) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bağımlı değişkenler arasındaki farklılık, ANOVA testi ile % 95 güven aralığında belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

Bu çalışmada saman örnekleri; geleneksel ve mikrodalga destekli-DES (Kolin klorür: Formik asit) ön işlemine tabi tutulmuştur. Mikrodalga destekli ön işlem; üç farklı mol oranı (1:2, 1:3, 1:4), mikrodalga gücü (270, 360 ve 450 W) ve ön işlem süresinde (2, 5 ve 8 dakika) gerçekleştirilmiştir. Proses koşulları her bir mol oranı için çizelge 4.1' de gösterildiği şekilde numaralandırılmıştır. Ön işlem sonrasında proses parametrelerinin samanın kompozisyonuna, enzimatik hidroliz sonuçlarına etkileri incelenmiştir. Daha sonra, maksimum toplam şeker hidrolizini sağlayan proses koşulları belirlenmiştir. Optimum koşullarda işlenmiş saman örneklerinde fermantasyon deneyleri gerçekleştirilerek etanol verimi belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Proses koşullarının isimlendirilmesi

Proses Koşulu	**Mikrodalga Gücü(W)**	**Ön işlem süresi(dakika)**
1	450	8
2	450	5
3	450	2
4	360	8
5	360	5
6	360	2
7	270	8
8	270	5
9	270	2

4.1 Mikrodalga Destekli Derin Ötektik Çözgen Ön İşlemi

4.1.1 Ön işlem sonrası biyokütlenin geri kazanımı

Ön işlem sırasında biyokütlenin içerisindeki bazı bileşenlerin çözünerek sıvı faza geçtiği bilinen bir olgudur. Bu sebeple katı haldeki biyokütlenin tamamını geri kazanmak mümkün olmamaktadır. Ön işlem sırasındaki kayıpları belirleyebilmek için ön işlem sonrası biyokütle tartılmış ve ön işlem öncesi ağırlığına oranlanarak biyokütlenin geri kazanım yüzdesi belirlenmiştir. Geri kazanım sonuçları çizelge 4.2' de gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; mol oranlarındaki asitlik oranı, mikrodalga gücü ve ön işlem süresi arttıkça katının geri kazanım yüzdesinin azaldığı görülmüştür. Bu azalmanın istatiksel olarak önemli ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur (EK 3). Mikrodalga gücünün ve süresinin artması ile lignoselülozik yapının daha çok parçalandığı ve buna bağlı olarak da geri kazanımın azaldığı düşünülmektedir. En fazla geri kazanım (en az katı kaybı) %93.8 ile 1:2 mol oranında 270 W mikrodalga gücünde, 2 dakika işlem gören örneklerde olmuştur. En az geri kazanım ise (% 62.3) 1:4 mol oranında 450 W mikrodalga gücünde, 8 dakika işlem gören örneklerde tespit edilmiştir.

Ön işlem şiddetinin artmasıyla geri kazanımdaki düşüş literatürde de rapor edilmiştir ve sonuçlar çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Procentese vd. (2015) tarafından mısır sapları üzerine yapılan çalışmada; biyokütlenin geri kazanımının sıcaklık arttıkça azaldığı tespit edilmiştir. ChCl:gliserol ön işleminde 80 °C'de geri kazanım %85 iken 150°C'de bu değerin % 55'e düştüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2 Mikrodalga destekli derin ötektik çözgen ön işlemi sonrası biyokütlenin geri kazanımı sonuçları (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)

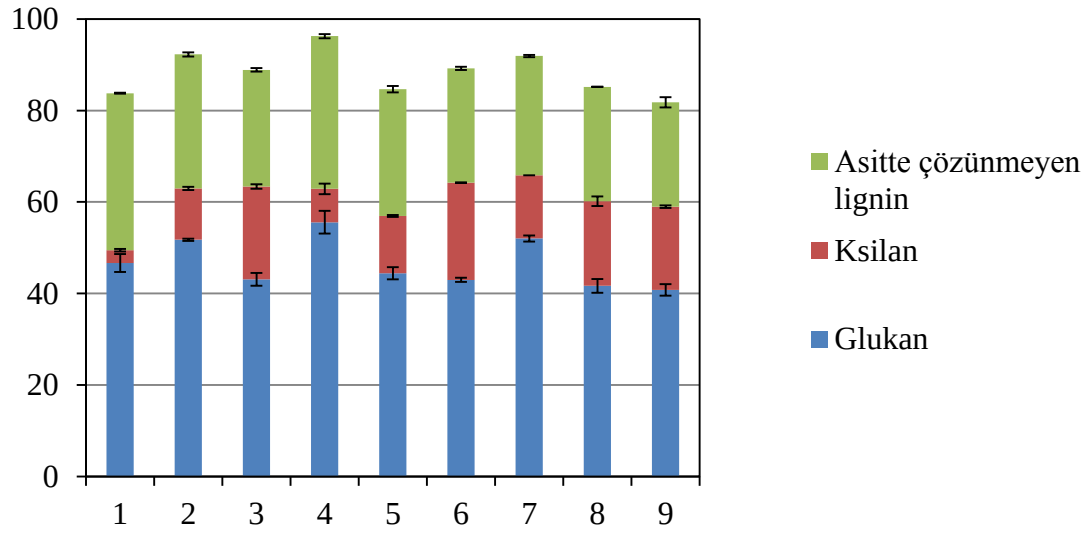
	Geri kazanım (%)		
	Mol oranları		
Proses Koşulu	1:4	1:3	1:2
1	62.3	63.0	67.3
2	67.1	67.7	70.4
3	82.0	82.9	86.6
4	63.9	67.6	69.8
5	76.0	76.8	76.8
6	87.2	89.3	89.5
7	72.0	72.0	85.5
8	84.6	86.2	87.5
9	90.3	92.4	93.8

4.1.2 Ön işlemin biyokütlenin kompozisyonu üzerine etkisi

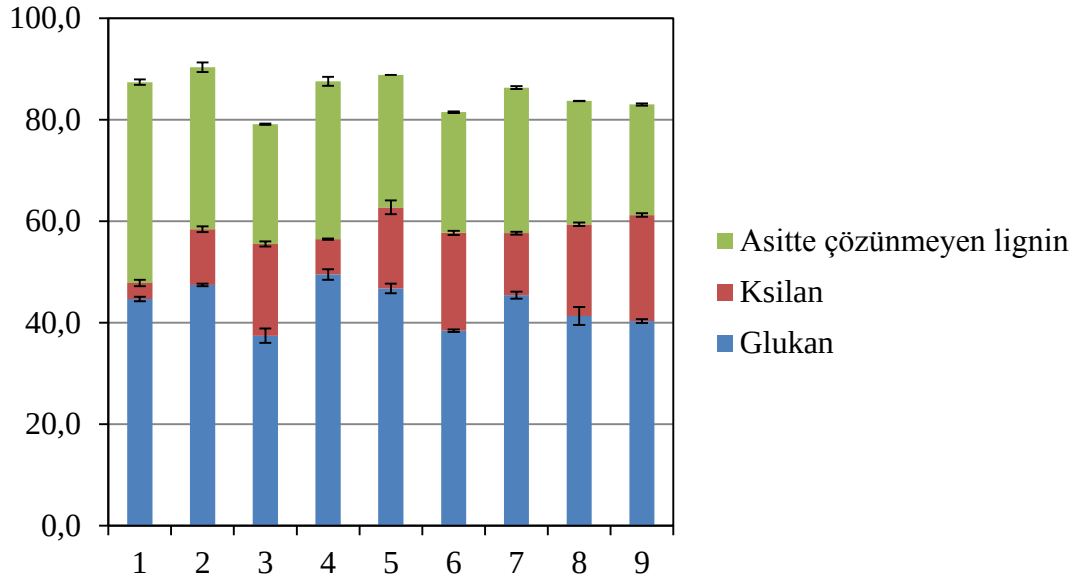
İşlem görmemiş samanda (Çizelge 3.1) %33.20 glukan, % 22.45 ksilan ve %19.82 klason lignin olduğu bulunmuştur. Mikrodalga destekli ön işlem sonuçları incelendiğinde 1:4 mol oranında; glukanın %40.8-55.6, ksilanın %2.8-21.3 ve asitte çözünmeyen ligninin %22.8-34.3, 1:3 mol oranında; glukanın %37.4-49.5, ksilanın %3.1-19.4 ve asitte çözünmeyen ligninin %21.8-39.6, 1:2 mol oranında glukanın %32.7-54, ksilanın %1.8-19.6 ve asitte çözünmeyen ligninin %21.9-38 arasında değişim gösterdiği gözlemlenmiştir (EK 5).

İşlem görmemiş saman örneklerinin sonuçları ile kıyaslandığında; ön işlem sonrası glukan ve lignin miktarının arttığı, ksilan miktarının ise azaldığı görülmektedir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3). Bu sonuçlar, ksiloz gibi pentoz yapıdaki şekerlerin sıcaklık ve asit ile kolaylıkla hidrolize olabildiğini göstermektedir (Palmqvist ve Hahn-Hagerdal 2000). Örneklerdeki ksilan miktarı genel olarak ön işlem süresinin artmasıyla azalmıştır. Ksilan miktarındaki azalmanın, yüksek mikrodalga güçlerinde (450 W) daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

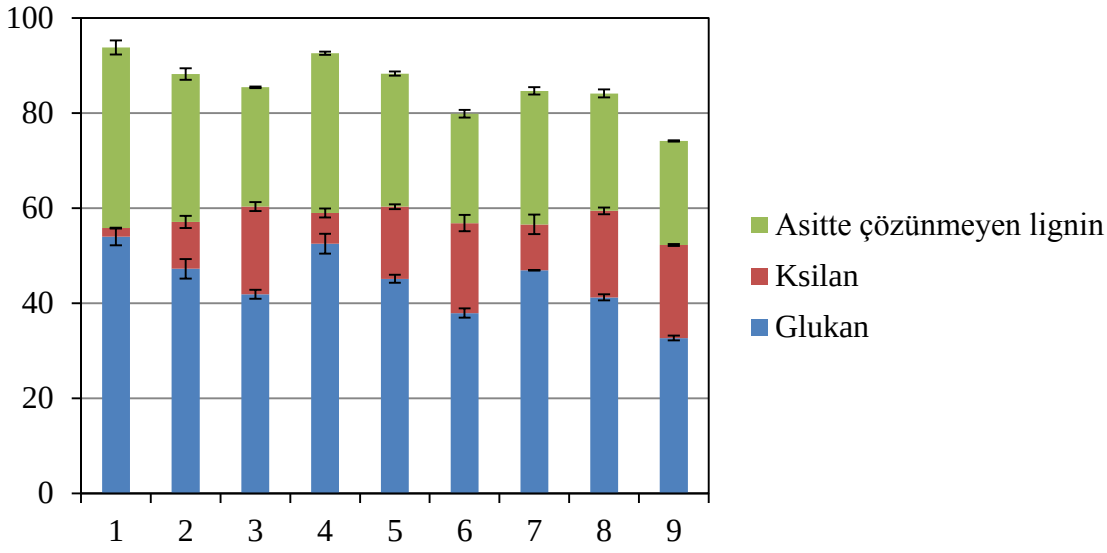
Ön işleme tabi tutulmuş saman örneklerinin lignin içeriğinin ise % 21,8- 39,6 arasında olduğu bulunmuştur. Hammaddeye oranla lignin içeriğindeki bu artış, örneklerden ksilanın ayrıştırılmasından kaynaklanmaktadır. Bir diğer deyişle, ksilan biyokütleden uzaklaştırıldığı için (hidrolize olarak sıvı faza geçtiği için) lignin miktarı artmış gibi gözükmektedir. Ön işleme tabi tutulmuş örneklerdeki ksilan miktarındaki azalışın, selüloz (glukan) ve lignin miktarında artışa sebep olduğu Şekil 4.4'de daha net gözükmektedir. Benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, yumuşak ağaç örneği organik asitler ile farklı koşullarda ön işleme tabi tutulmuş ve kompozisyondaki değişim gözlemlenmiştir. Lignin içeriğinin % 32,36'dan % 46,61'e kadar arttığı ve bunun karbonhidrat degradasyonuyla bağlantılı şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir (Lim ve Lee 2013). Benzer şekilde Barışık vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada; buğday samanı farklı sıcaklık (170, 190, 210°C), asit konsantrasyonu (%1, 3, 5) ve sürelerde (10, 20, 30 dakika) ön işleme tabi tutulmuş ve ksilanın biyokütleden ayrılarak sıvı faza geçtiği ifade etmiştir. Kumar vd. (2016) tarafından pirinç samanı üzerinde farklı DES'ler (ChCl:Gliserol, ChCl:Malik asit, ChCl:Laktik asit) kullanılarak yapılan çalışmada ön işlemle birlikte örneklerin glukan oranlarında artış olduğu rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada, (Procentese vd. 2015) mısır koçanı farklı DES'ler (ChCl:gliserol, ChCl:İmidazol) kullanılarak farklı sıcaklıklarda (80, 115 ve 150°C) ön işleme tabi tutulmuştur. ChCl:gliserol kullanılarak yapılan ön işlemde, sıcaklığın 80 °C'den 150 °C'ye çıkarılması, ksilan miktarının %25.3'den %21.1'e azalmasına sebep olurken, glukan miktarının %32.5'den %52.7'ye artmasına sebep olmuştur. Benzer sonuç ChCl:İmidazol ile yapılan deneyler sonunda da tespit edilmiştir (glukan miktarı %38.4'den %41.1'e artarken, ksilan miktarı %30.0'dan %5.6'ya düşmüştür).



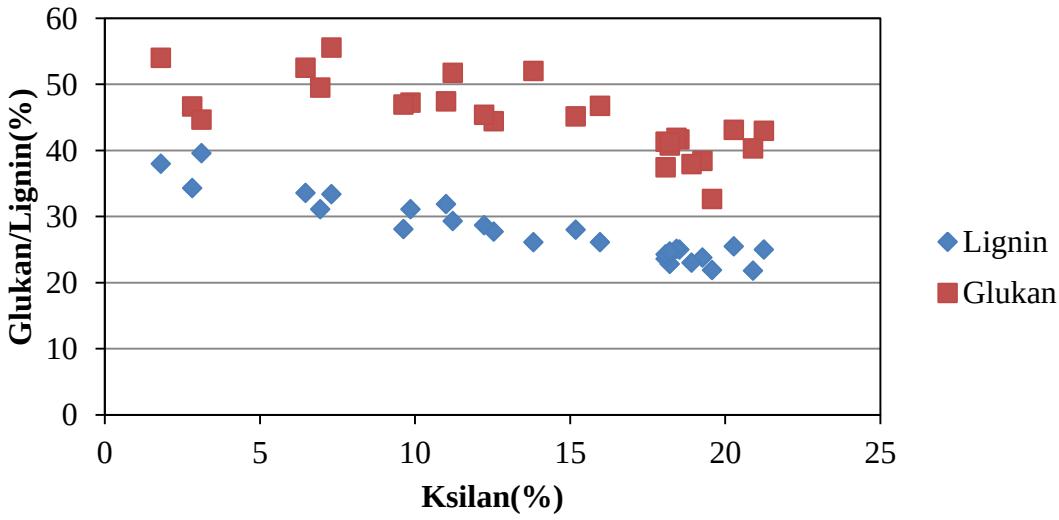
Şekil 4.1 Farklı ön işlem koşullarında(1:4 mol oranında) DES ile işlenmiş saman örneklerinin kompozisyonu (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.2 Farklı ön işlem koşullarında (1:3 mol oranında) DES ile işlenmiş saman örneklerinin kompozisyonu (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.3 Farklı ön işlem koşullarında (1:2 mol oranında) DES ile işlenmiş saman örneklerinin kompozisyonu (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.4 Farklı ön işlem koşullarında DES ile işlenmiş saman örneklerinin glukan ve lignin içeriklerinin (%) ve örnekteki ksilan miktarı (%) ile değişimi

4.1.3 Derin ötektik çözgen ön işleminin hidroliz üzerine etkisi

Farklı koşullardaki ön işlemden sonra; buğday samanında enzimatik hidroliz deneyleri gerçekleştirilmiştir ve bu koşullarda elde edilen glikoz (mg/mL), ksiloz (mg/mL) ve toplam şeker miktarları (mg/g işlenmiş saman) belirlenmiştir.

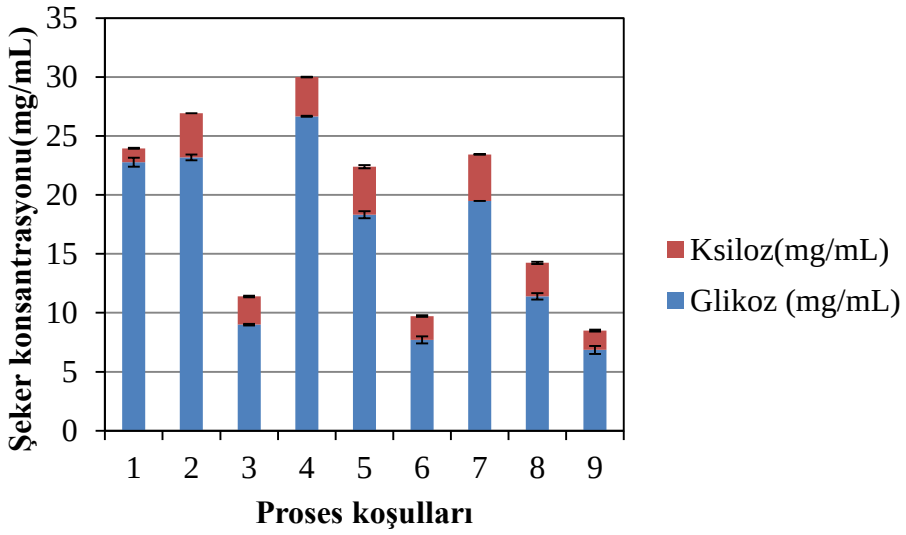
Sonuçlar genel olarak incelendiğinde; tüm proses koşullarının glikoz konsantrasyonu ve ksiloz konsantrasyonu üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (EK 6-7). Bir başka ifade ile DES'in mol oranında, mikrodalga gücünde ve ön işlem süresindeki değişimler, enzimatik hidroliz sırasında açığa çıkan glikoz ve ksiloz miktarında etki yaratmaktadır. Sabit mol oranında ve sabit ön işlem süresinde (1:2 mol oranı ve 2 dakika ön işlem süresi), mikrodalga gücünde ki artışın istatiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Tüm mol oranlarında, mikrodalga gücü ve ön işlem süresinin artmasıyla, enzimatik hidroliz sırasında elde edilen şeker konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür. Glikoz ve ksiloz miktarlarının (mg/mL) ön işlem süresinden çok büyük oranda etkilendiği söylenebilir. Tüm mol oranlarında 2 dakika süreyle yapılan ön işlemin (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 - Proses Koşulları 3, 6, 9) şekerleri yeterince hidrolize etmekte çok etkili olmadığı tespit edilmiştir (EK 4). Glikoz miktarının en düşük değeri (6.85 mg/mL) 1:4 mol oranında 270 W mikrodalga gücünde 2 dakika süreyle işlenmiş samanda gözlemlenmiştir. Bu sonuç, düşük mikrodalga gücü ve süresinde, formik asit miktarı fazla olsa dahi yeterince glikoz hidrolize edilemediğini göstermektedir. Ksiloz miktarı ise en düşük değerini (1.18 mg/mL) en ekstrem proses koşullarında (1:4 mol oranı, 450 W mikrodalga gücü, 8 dakika ön işlem süresi) almıştır. Bunun sebebi ise, daha önceden de belirtildiği gibi hemiselülozun sıcaklık ve kimyasallara karşı duyarlı olması ve ön işlem süresince çözünerek sıvı faza geçmesidir. Bir başka ifade ile bu sonuç, ekstrem ön işlem koşullarında hemiselüloz kayıplarının yüksek olduğunu göstermektedir. Glikoz miktarı en yüksek (29.20 mg/mL), 1:2 mol oranında 450 W mikrodalga gücünde 8 dakika süreyle işlenmiş samanda gözlemlenmiştir. Mikrodalga gücü ve sürenin artması ile lignoselülozik yapı daha iyi parçalanmış ve böylelikle selülaz enzimi yapı içerisinde daha iyi nüfuz ederek daha yüksek miktarlarda glikoz elde edilmiştir. Ksiloz miktarının en yüksek değeri ise (4.09 mg/mL) 1:4 mol oranında 360 W mikrodalga gücünde 5 dakika süreyle işlenmiş samanda gözlemlenmiştir.

Literatürde, mısır atıklarının 130 °C'de 3 saat boyunca Kolin klorür:Formik asit (1:2) ile işlendiği bir çalışmada enzimatik hidroliz sırasında elde edilen maksimum glikoz konsantrasyonunun 17.0 g/L olduğu rapor edilmiştir (Xu vd. 2016). Bir diğer çalışmada; palmiye ağacı yapraklarında, Kolin klorür:Üre kullanılarak 4 saat boyunca 120 °C'de uygulanan ön işlemin 14.76 g/L ksiloz elde etmeyi sağladığı belirtilmiştir (Loow vd. 2018). Enzimatik hidroliz aşamasında elde edilen şeker konsantrasyonlarının farklılığı hammadde, ön işlem ve enzimatik hidroliz parametrelerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bunlara ek olarak, bizim çalışmamıza benzer şekilde Liu vd. (2019) tarafından ön işlem sıcaklığının artmasıyla enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz konsantrasyonlarında artış olduğunu rapor etmişlerdir. Trietilbenzil amonyak klorür:Laktik asit ile sabit mol oranında (1:9) ve sabit ön işlem süresinde (10 saat) yapılan ön işlemde sıcaklığın 80°C'den 110 °C'e çıkarılması ile glikoz veriminin %55.48'den 66.32'a, ksiloz veriminin ise %14.25'den 20.09'a arttığı gözlemlenmiştir. Ön işlem süresinin kıyaslandığı bir diğer çalışmada, Wan ve Mun (2018) tarafından sago palmiyesi atıklarına, Kolin Klorür:Üre (1:2), Kolin klorür:Sitrik asit (1:2) ve Kolin klorür:Gliserol (1:1) çözgenleri uygulanmıştır. Ön işlem süresinin 1 saatten 3 saate çıkardığında glikoz veriminin arttığı (en yüksek 3.saat 5 mg/mL) sonrasında ise 5.saatte 3,4 mg/mL'e düştüğü bildirilmiştir. Çok uzun ön işlem sürelerinin de şeker degredasyonuna sebep olduğu anlaşılmaktadır.

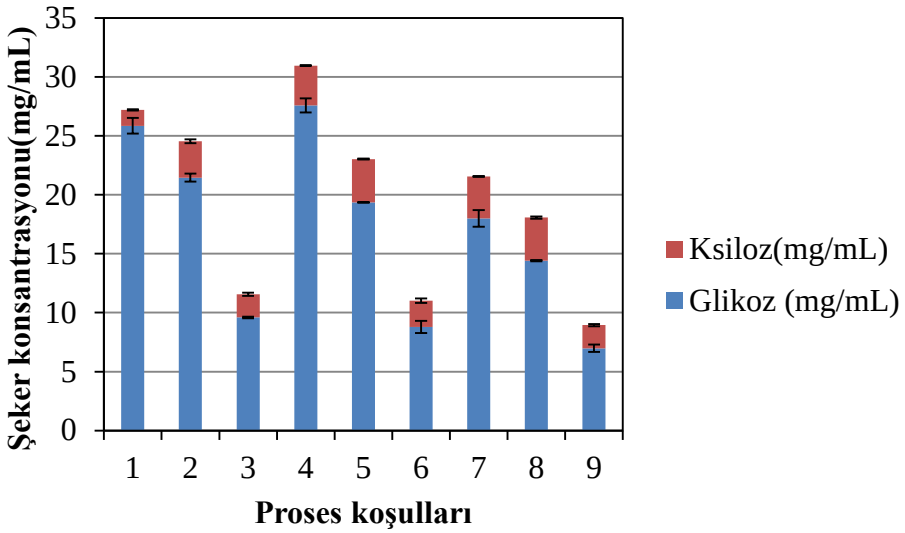
Mol oranındaki değişimlerin, glikoz ve ksiloz konsantrasyonuna istatiksel olarak önemli bir etkiye neden olduğu yukarıda belirtilmiştir. Düşük mikrodalga gücünde ve kısa ön işlem süresinde (360 W, 2 dk) çözgendeki asit konsantrasyonu 2 kat arttırıldığında (1:2 mol oranından 1:4 mol oranına), glikoz miktarı %7 oranında bir azalış göstermiştir. Ancak bu azalma aynı koşullarda 450W mikrodalga gücünde sırasıyla %26.6 olmuştur. Bu sonuç, çözgendeki asit konsantrasyonundaki artışın, mikrodalga gücünün artmasıyla glikoz degredasyonuna sebep olduğunu göstermektedir. Ekstrem proses koşulu (450W mikrodalga gücü ve 8 dakika ön işlem süresi) sabit tutulduğunda, mol oranında ki asit konsantrasyonundaki artışın istatiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur *($p<0.05$).* Benzer sonuçlar literatürde de rapor edilmiştir. Mısır koçanı sabit sıcaklıkta (90 °C), 24 saat süreyle Kolin klorür:Laktik asit ile farklı mol oranlarında (1:10-1:15) ön işleme tabi tutulmuştur. Çözgendeki asit konsantrasyonunun artması ile glikoz veriminin

%83,2'den %79,1'e düştüğü belirtilmiştir (Zhang vd. 2016). Enzimatik hidroliz verimlerinin çözgendeki asit miktarı ve asitin kuvveti ile bağıntılı olduğu açıklanmıştır.

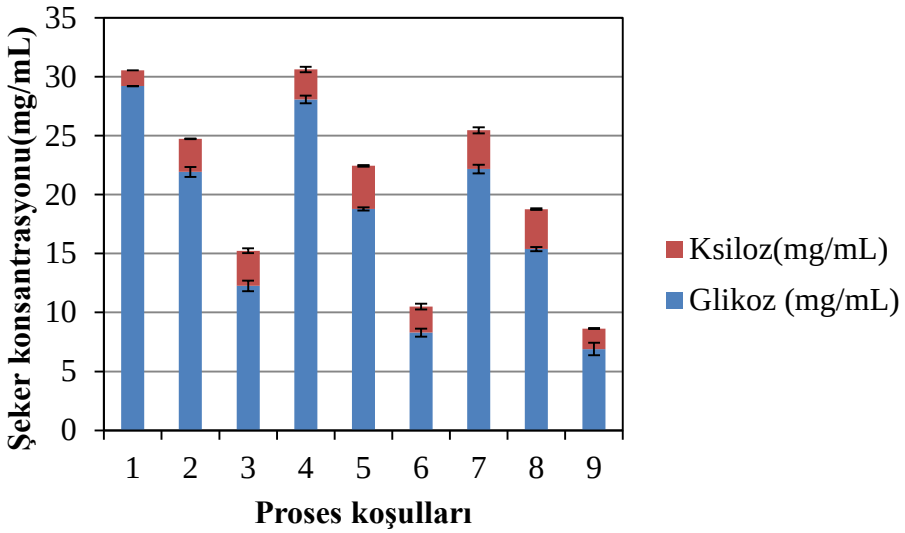
Mol oranının, ksiloz konsantrasyonu üzerine etkisinin belirli bir trendi izlemediği gözlemlenmektedir. Bu da mikrodalga gücü, ön işlem süresi ve mol oranı arasında interaksiyonların olduğunu ve değişik proses koşullarında mol oranının etkisinin de değişebildiğini düşündürmektedir**.** Benzer şekilde, literatürde mol oranının etkisinin incelendiği bir çalışmada, çözgendeki asit konsantrasyonunun artması ile ksiloz değerlerinin belirli bir trend izlemediği rapor edilmiştir. Liu vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada; buğday samanına Trietilbenzil amonyak klorür:Laktik asit kullanılarak ön işlem uygulanmıştır. Sabit sıcaklık (100 °C) ve ön işlem süresinde (10 saat) farklı mol oranlarının ksiloz verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Mol oranının 1:5' den 1:9'a arttırılması (laktik asit konsantrasyonunun artması) ksiloz veriminin %75.3'den 71.0'a azalmasına, 1:11'e arttırıldığında %77.9'e yükselmesine ve 1:13'de bu değerin % 74.3'e düşmesine sebep olmuştur.



Şekil 4.5 Farklı ön işlem koşullarının (1:4 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.6 Farklı ön işlem koşullarının (1:3 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.7 Farklı ön işlem koşullarının (1:2 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)

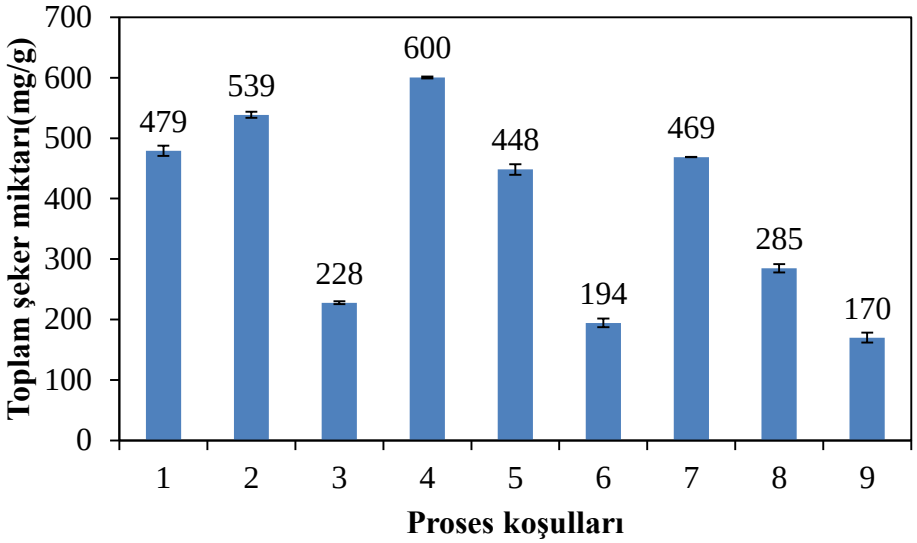
4.1.4 Derin ötektik çözgen ön işleminin toplam şeker üzerine etkisi

Bir gram işlenmiş samandan elde edilen toplam şeker miktarları (mg/g) Şekil 4.8-4.10'da gösterilmiştir. En düşük toplam şeker miktarı (170 mg/g) 1:4 mol oranında 270 W mikrodalga gücünde 2 dakika süreyle işlenmiş samanda bulunmuştur. Bu miktar

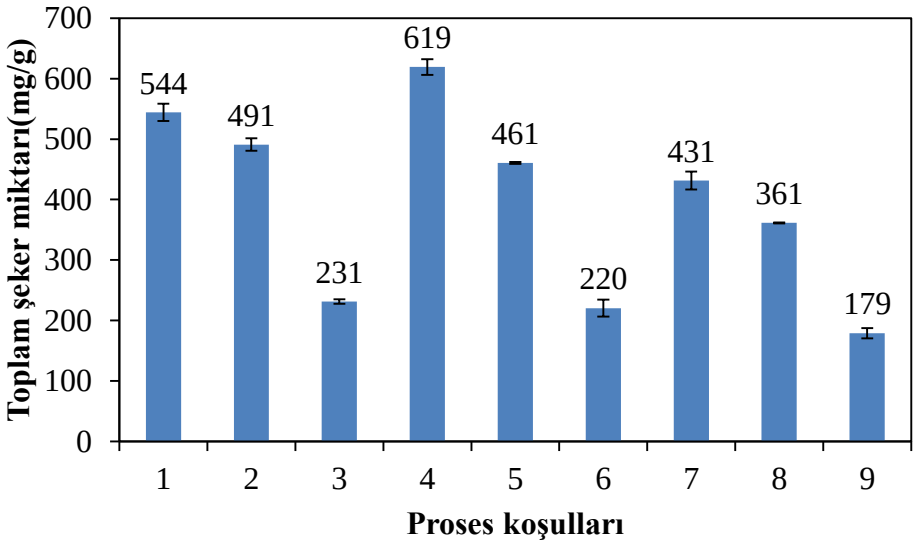
mikrodalga gücünün ve ön işlem süresinin artması ile yaklaşık 3.7 kat artarak 619 mg/g ile maksimum değerini (1:3 mol oranı, 360 W mikrodalga gücü, 8 dakika ön işlem süresi) almıştır. Literatürde DES ön işlemi ile farklı hammaddelerden farklı miktarlarda şeker elde edildiği gözlenmektedir. Kumar vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada; pirinç samanı Kolin klorür:Laktik asit (1:5) ile işlenmiş ve enzimatik hidroliz aşamasında elde edilen toplam indirgen şeker miktarını 333 mg/g olarak tespit edilmiştir. Kumar vd. (2016) pirinç samanı ile yaptıkları diğer bir çalışmalarında ChCl:Gliserol ile ön işlemin 226.7 g/L indirgen şeker elde etmeyi sağladığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmalarda elde edilen şeker miktarının bizim çalışmamıza kıyasla az olmasının sebebi hammadde, çözgen ve proses parametrelerindeki farklılıklardır.

Proses parametrelerinin enzimatik hidroliz sırasında açığa çıkan toplam şeker miktarı (mg şeker/g işlenmiş saman) üzerine etkisi Şekil 4.11'de daha net görülebilmektedir. Toplam şeker miktarı glikoz konsantrasyon sonuçları ile paralellik göstermiş. Uygulanan ön işlem süresinin artması lignoselülozik yapıda daha çok parçalanmaya neden olduğu için toplam şeker miktarının da ön işlem süresiyle önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Elde edilen toplam şeker miktarı mikrodalga gücünün 270 W'dan 360 W'a artmasıyla yaklaşık 1.3 kat artmış, ancak sonrasında 450 W'da göreceli olarak sabit kalmıştır. DES içerisindeki formik asitin mol miktarındaki artış ile toplam şeker miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Bu da, asit konsantrasyonunun artması ile yaşanan şeker kayıplarıyla açıklanabilmektedir.

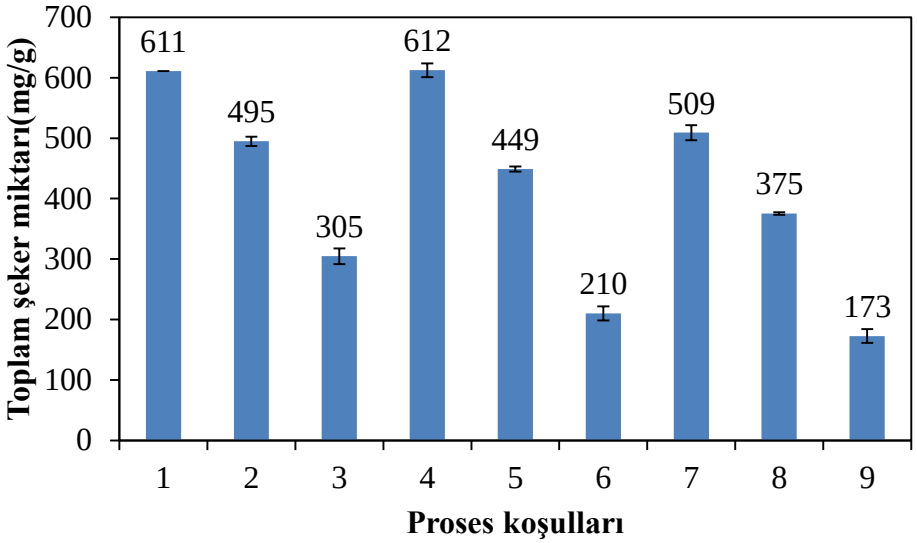
Projede fermentasyon aşamasında kullanılan mutant bakteri (*E. coli KO11*) 5 ve 6 karbonlu şekerleri fermente ederek etanol üretebilen bir mikroorganizmadır. Bu sebeple glikoz veya ksiloz konsantrasyonlarından daha çok ortamdaki toplam şekeri maksimize etmek önem kazanmaktadır. Dolayısıyla, parametrelerin optimizasyonunda 1 gram işlenmiş samandan en çok toplam şeker elde etmeyi sağlayan koşul göz önünde bulundurulmuştur. Maksimum toplam şekerin (619 mg/g) elde edilmesini sağlayan optimum noktalar 1:3 mol oranı, 360 W mikrodalga gücü ve 8 dakika ön-işlem süresi olarak tespit edilmiştir.



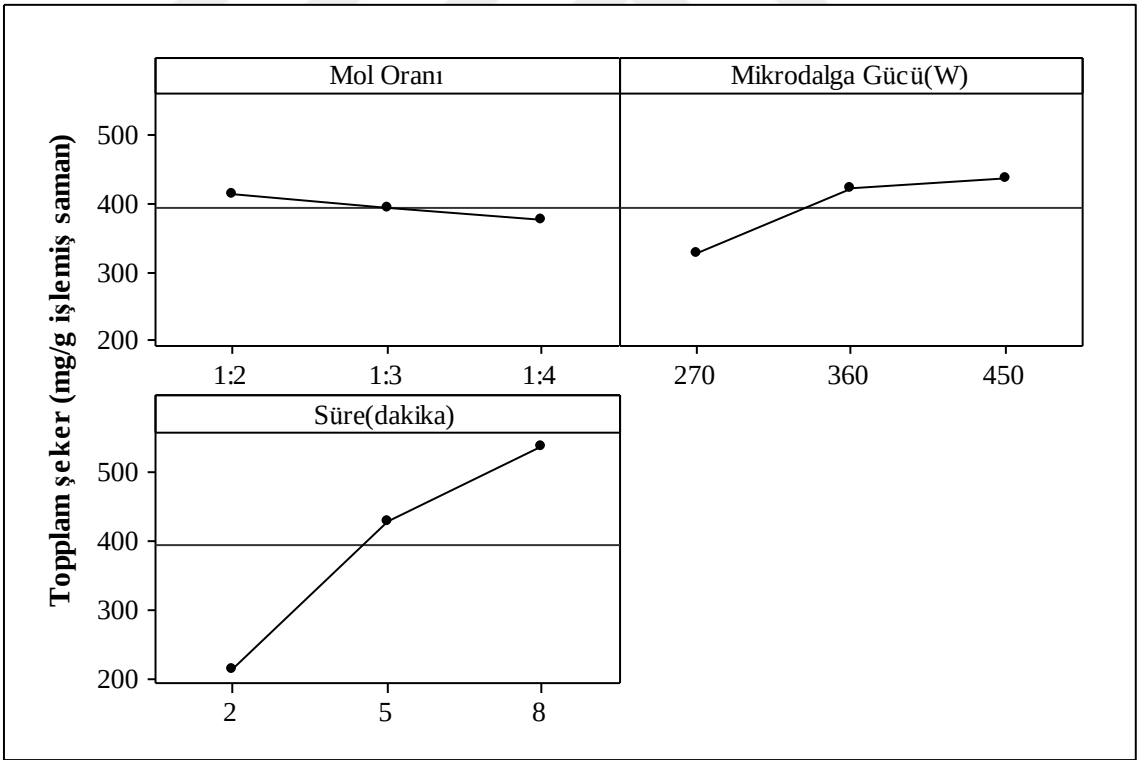
Şekil 4.8 Farklı ön işlem koşullarının (1:4 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.9 Farklı ön işlem koşullarının (1:3 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.10 Farklı ön işlem koşullarının (1:2 mol oranında) enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi (farklı proses koşulları çizelge 4.1' de belirtilmiştir)



Şekil 4.11 Proses parametrelerinin enzimatik hidroliz sırasında elde edilen toplam şeker miktarı (mg şeker/ g işlenmiş saman) üzerine etkisi

4.1.5 Derin ötektik çözgen ön işleminin verim üzerine etkisi

Enzimatik hidroliz sırasında açığa çıkan glikoz ve ksiloz miktarları, materyal ve metot kısmında belirtilen denklemlerde kullanılarak glikoz ve ksiloz verimleri hesaplanmış ve çizelge 4.3'de verilmiştir. Bu çizelgedeki verim, işlenmiş samandaki glukanın yüzde olarak glikoza hidrolize olma oranı ve aynı şekilde ksilanın yüzde olarak ksiloza hidrolize olma oranıdır. Toplam şeker miktarına benzer şekilde tüm mol oranlarında ve mikrodalga güçlerinde, ön işlem süresinin artması ile verimler artmış ($p<0.05$) ve 8. dakikalarda (özellikle yüksek mikrodalga güçlerinde) %99'lara varan verimler tespit edilmiştir (EK9-10). Bu da, işlenmiş saman içerisinde bulunan polimerik şekerlerin tamamının enzimatik olarak hidrolize edilebildiğini göstermektedir.

Literatürde rapor edilen verim sonuçları çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Mısır atıklarına ChCl:Formik asit (1:2) kullanılarak ön işlem (130°C, 100 rpm'de 2 saat) uygulanmıştır. ChCl: Formik asit ön işlemi sonunda elde edilen glikoz verimi (%91) optimizasyonla maksimize edilmeye çalışılmıştır. Optimizasyon sonunda; uygulanan ön işlem ile 17.0 g/L glikoz elde edilmiş ve glikoz verimi %99 olarak bulunmuştur (Xu vd.2016).

Mikrodalga destekli DES ön işleminin kullanıldığı bir diğer çalışmada, mısır atıkları, dallı darı otu ve fil otu Kolin klorür: Laktik asit (1:2) çözgeni ile 800 W mikrodalga gücünde 45 saniye boyunca proses edilmiş ve ardından enzimatik hidrolize tabi tutulmuştur. İşlenmiş mısır atıklarından, dallı darı otundan ve fil otundan sırasıyla %78,5, %75 ve %40 glikoz verimi elde edilmiştir. Ön işlemin selüloz sindirilebilirliğini 2-5 kat arttırdığı ifade edilmiştir (Chen ve Wan vd. 2018). Kullanılan çözgenin ve biyokütlenin farklı olması ayrıca ön-işlem koşullarındaki farklılıklar çalışmamızdaki verimin daha yüksek olmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak, ön işlem süresinin pozitif etkisini rapor eden araştırmalar da literatürde mevcuttur. Mısır koçanında sabit sıcaklıkta (90 °C) ve mol oranında (1:2) Kolin klorür:Laktik asit ile yapılan ön işlemde süre 1.5

saatten 36 saate çıkarılmıştır. Glikoz veriminin %25,9'dan %80,7'e süre ile kademeli olarak arttığı görülmüştür (Zhang vd. 2016).

Mikrodalga gücünün şeker verimlerine etkisi incelendiğinde, (sabit mol oranı ve ön işlem süresinde) mikrodalga gücünün 270 W'dan 450 W'a çıkarılması toplam şeker sonuçlarında olduğu gibi şeker verimlerinin artmasına sebep olmuştur ($p<0.05$). Her ne kadar literatürde mikrodalga gücünün etkisi daha önce çalışılmamış olsada ön işlem sıcaklığının enzimatik hidroliz verimine etkisini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu bağlamda, mısır koçanı Kolin klorür:Gliserol ile işlendiğinde sıcaklığın 80 °C'den 150 °C'ye arttırılması glikoz veriminin %40'dan % 92'ye, ksiloz veriminin ise %18'den %96'ya yükselmesini sağlamıştır (Procentese vd. 2015). Sıcaklığın etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada; mısır koçanı Kolin klorür:Laktik asit (1:2) ile 24 saat boyunca işlenmiştir. Sıcaklığın 70 °C'den 90°C'e çıkarılması glikoz veriminin %44,9'dan %79,7'e yükselmesini sağlamıştır (Zhang vd. 2016).

Mol oranındaki değişimlerin, glikoz verimine etkisi istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunurken ksiloz verimi üzerine etkisinin önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Düşük mikrodalga gücünde ve kısa ön işlem süresinde (270 W, 2 dk) çözgendeki asit konsantrasyonu 2 kat arttırıldığında (1:2 mol oranından 1:4 mol oranına), glikoz verimi %20.0 oranında bir azalış göstermiştir. Ancak bu azalma aynı koşullarda 450W mikrodalga gücünde %28.5' ya yükselmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı proses parametrelerinde glikoz ve ksiloz verimleri (farklı proses koşulları çizelge 4.1'de belirtilmiştir)

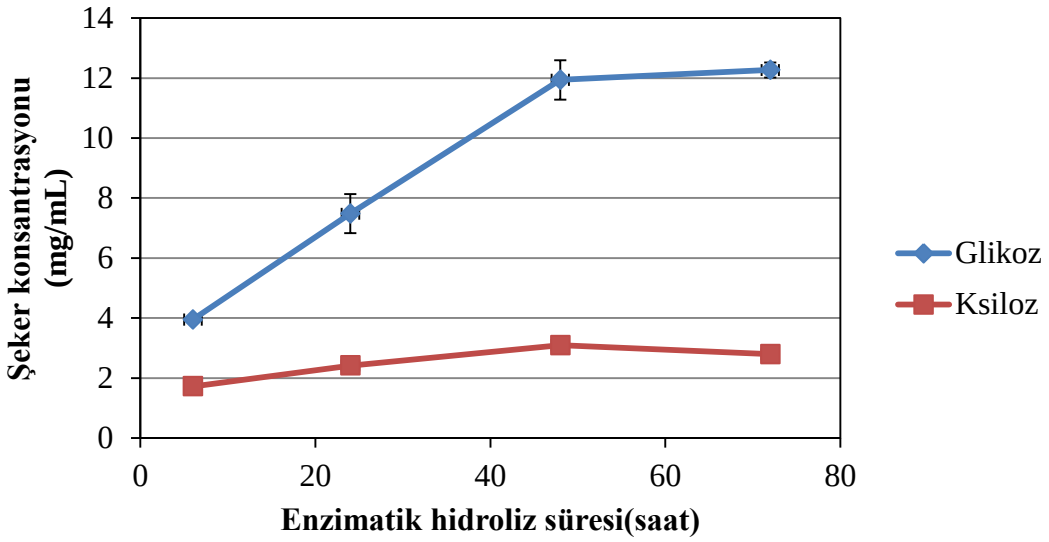
	1:4 mol		1:3 mol		1:2 mol	
No	**Glikoz (%)**	**Ksiloz (%)**	**Glikoz (%)**	**Ksiloz (%)**	**Glikoz (%)**	**Ksiloz (%)**
1	87.9±0.05^{aA}	73.9±0.10^{aA}	99.9±0.02^{aA}	76.8±0.10^{aA}	97.4±0.03^{aA}	99.9±0.02^{aA}
2	80.6±0.00^{aA}	58.9±0.01^{aA}	81.4±0.01^{aA}	49.4±0.05^{aA}	83.7±0.05^{aA}	50.6±0.05^{aA}
3	37.6±0.01^{cA}	20,8±0.00^{bA}	46.2±0.02^{bA}	19.2±0.02^{bA}	52.6±0.01^{aA}	28.5±0.01^{aA}
4	86.4±0.04^{bA}	80.9±0.10^{aA}	99.9±0.04^{aA}	85.6±0.01^{aA}	96.3±0.03^{abA}	69.2±0.03^{aB}
5	74.3±0.03^{aA}	57.5±0.03^{aA}	74.5±0.02^{aA}	40.8±0.04^{bA}	75.0±0.01^{aAB}	42.4±0.01^{bAB}
6	32.3±0.02^{bA}	16.6±0.00^{bB}	41.2±0.03^{aA}	20.3±0.01^{abA}	39.3±0.01^{abB}	20.5±0.01^{aB}
7	67.4±0.01^{bB}	50.2±0.00^{aA}	71.3±0.02^{bB}	51.3±0.01^{aB}	85.0±0.01^{aB}	60.7±0.07^{aB}
8	49.3±0.03^{bB}	27.0±0.02^{bB}	62.9±0.03^{aB}	35.6±0.00^{aA}	67.2±0.02^{aB}	32.8±0.00^{aB}
9	30.3±0.02^{aA}	16.0±0.01^{aB}	31.2±0.02^{aB}	16.5±0.01^{aA}	37.9±0.02^{aB}	15.6±0.01^{aC}

a,b,c sabit mikrodalga gücü ve sabit ön işlem süresinde, mol oranlarında farklı harfler taşıyan değerler arasında fark istatiksel olarak anlamlıdır *($p<0.05$)*

A,B,C sabit mol oranı ve sabit ön işlem süresinde, mikrodalga gücünde farklı harf taşıyan değerler arasında fark istatiksel olarak anlamlıdır *($p<0.05$)*

4.1.6 Geleneksel Ön İşlem

Buğday samanı; literatürde DES ön işlemlerinde geleneksel olarak kullanılan yöntemle (80 °C su banyosunda 24 saat) proses edilmiştir (Jablonsky vd 2015). Mol oranı (1:3) belirlenirken mikrodalga sonuçları göz önünde bulundurulmuş ve maksimum toplam şeker elde etmeyi sağlayan mol oranı seçilmiştir.



Şekil 4.12 Geleneksel yöntem ile işlenmiş samanın enzimatik hidroliz süresince glikoz ve ksiloz miktarlarındaki değişim (Ön işlem koşulları: 80 °C su banyosunda 24 saat, 1:3 mol oranı)

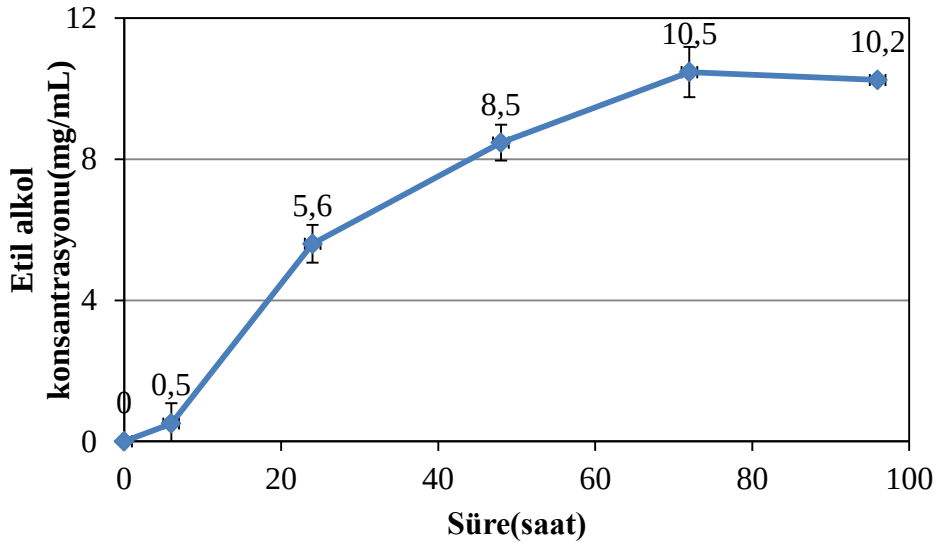
Geleneksel yöntemle işlenmiş samanın enzimatik hidrolizi süresince şeker miktarlarındaki değişimi şekil 4.12' de gösterilmiştir. Beklendiği üzere şeker miktarları enzimatik hidrolizin ilk 48 saatinde hızlıca artmış ve sonrasında sabit kalmıştır. Glikoz ve ksiloz konsantrasyonları 72 saatin sonunda sırasıyla 12.27±0.25 ve 2.80±0.05 mg/mL değerlerine ulaşmıştır. Bu sonuçlar, mikrodalga destekli-DES ön işleminden elde edilen şeker sonuçlarına (sırasıyla 27.59 ve 3.37 mg/mL) kıyasla oldukça düşüktür. Geleneksel yöntemle elde edilen toplam şeker miktarı ise 301 mg/g işlenmiş saman olarak hesaplanmıştır. Önerilen mikrodalga-DES ön işlem yöntemi, hidrolize edilebilen toplam şeker miktarını 2 katına çıkarmakla kalmamış gerekli olan süreyi 1 günden 8 dakikaya indirmiştir.

Geleneksel olarak işlenmiş samanda glikoz verimi %45.7±0.03 ve ksiloz verimi %55.1±0.05 bulunmuştur. Bu sonuçlar; geleneksel yöntemin daha uzun sürmesine rağmen verimnin mikrodalga destekli-DES yöntemine kıyasla çok daha düşük olduğunu göstermektedir.

4.1.7 Derin ötektik çözgen ön işleminin fermantasyon üzerine etkisi

Maksimum toplam şekerin (619 mg/g) elde edilmesini sağlayan optimum noktalar 1:3 mol oranı, 360 W mikrodalga gücü ve 8 dakika ön-işlem süresi olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda işlenmiş saman, *Escherichia coli KO11* kullanılarak 96 saat boyunca fermente edilmiş ve fermentasyon esnasında etanol konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi etanol konsantrasyonu, fermentasyon aşamasının ilk 72 saat boyunca artmış ve sonrasında yaklaşık 10,2 mg/mL'de sabitlenmiştir. Etanol verimi % 74.9 olarak hesaplanmıştır.

Benzer sonuçlar literatürde de rapor edilmiştir. Lau vd. (2010) mısır saplarına AFEX ön işlemi uygulamış ve sonrasında *E.coli KO11* kullanarak işlenmiş biyokütleyi fermente etmiştir. Çalışmada etanol veriminin % 85 olduğu bildirilmiştir. Yasuda vd. (2014) tarafından, *Pennisetum purpureum Schumach* bitkisi üzerinde yapılan çalışmada, *E.coli KO11* kullanılarak yapılan fermentasyon deneylerinin sonunda %74 etanol verimi elde edildiği belirtilmiştir. Ön-işlem metotlarındaki farklılıkların ve biyokütleden kaynaklı farklılıkların etanol veriminde etkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.13 Optimum koşullarda (1:3 mol oranı, 360W mikrodalga gücü, 8 dakika ön işlem süresi) MW-DES yöntemiyle işlenmiş samandan üretilen etanol miktarının (mg/mL) fermantasyon süresi boyunca değişimi

5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmada; mikrodalga destekli derin ötektik çözgen ön işleminin buğday samanından biyoetanol üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Mikrodalga destekli ön işlem; farklı mol oranları (1:2, 1:3, 1:4), mikrodalga gücü (270, 360, 450 W) ve ön işlem sürelerinde (2, 5, 8 dakika) gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak;

- Mikrodalga gücü ve ön işlem süresi arttıkça katının geri kazanım yüzdesinin azaldığı görülmüştür. En fazla geri kazanım (%93.8) 1:2 mol oranında 270 W mikrodalga gücünde, 2 dakika işlem gören örneklerde, en az ise (%62.3) 1:4 mol oranında 450 W mikrodalga gücünde, 8 dakika işlem gören örneklerde tespit edilmiştir.
- Ön işlem sonrası samandaki glukan ve lignin miktarının arttığı, ksilan miktarının ise azaldığı tespit edilmiştir. Ksilanın mikrodalga destekli DES ön işlemiyle selülozik yapıdan ayrılarak sıvı fazda çözündüğü belirlenmiştir.
- Tüm mol oranlarında, mikrodalga gücü ve ön işlem süresinin artmasıyla, enzimatik hidroliz sırasında elde edilen şeker konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür.
- Ön işlem süresi ve mikrodalga gücünün artması lignoselülozik yapıda daha çok parçalanmaya neden olduğu ve enzimatik hidrolizi kolaylaştırdığı için toplam şeker miktarının da ön işlem süresi ve mikrodalga gücüyle arttığı görülmektedir. Buna karşın, formik asitin mol miktarındaki artış şeker degredasyonuna sebep olduğu için toplam şeker miktarının azaldığı belirlenmiştir.
- Maksimum toplam şekerin (619 mg/g) elde edilmesini sağlayan optimum noktalar 1:3 mol oranı, 360 W mikrodalga gücü ve 8 dakika ön-işlem süresi olarak tespit edilmiştir.
- Optimum koşulda; enzimatik hidroliz sırasında elde edilen glikoz veriminin % 99.9 ve ksiloz veriminin %85.6 olduğu bulunmuştur.
- Mikrodalga ön işlemin geleneksel ön işleme göre; şeker miktarını 2 kat arttırdığı ve aynı zamanda süreyi 1 günden 8 dakikaya kısalttığı gözlemlenmiştir.

- Optimum koşulda işlenmiş saman örnekleri eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) deneylerine (*Escherichia coli* KO11 kullanılarak) tabi tutulmuş ve etanol verimi %74.9 olarak tespit edilmiştir.

Bu bulgular, mikrodalga destekli derin ötektik ön işleminin buğday samanının yapısını parçalamakta ve etanol eldesinde etkili olduğunu göstermektedir. Konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı ve çevreci bir yöntem olması sebebiyle gelecekte kullanımının artacağı düşünülmektedir. Gelecek çalışmalarda, etanol verimliliğinin artması için farklı mikroorganizmalar ve farklı fermantasyon metotlarının denenmesi öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Abbott, A.P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L. and Rasheed, R. K. 2004. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, J. Am. Chem. Soc., 126 , 9142-9147.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. Biotechnology Advances, 29 (6), 675-685.

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review,Bioresource Technology, 101(13), 4581-4561.

Anonymous 2013. EASAC. The current status of biofuels in the European Union, their environmental impacts and future prospects. *EASAC Policy Report* 19.Web Sitesi: http://www.easac.eu. Erişim Tarihi: 01.10.2019.

Anonymous 2019a.World Bioenergy Association. WBA Global Bioenergy Statistics; 2017. Web Sitesi: www.worldbioenergy.org/global-bioenergy-statistics. Erişim Tarihi: 02.10.2019.

Anonymous 2019b. World Energy Outlook. International Energy Agency. Paris, France. Web sitesi: https://www.iea.org/statistics/. Erişim Tarihi: 04.10.2019.

Ayoub, A.S. and Lucia, L. A. 2018. Introduction to Renewable Biomaterials:First Principles and Concepts. North Carolina State University.

Barisik,G., Kutlu, N., Elmaci, S.B. and Akay, B. 2016. Optimization of organic acid retreatment of wheat straw, Biotechnology Progress, 32(6), 1487-1493.

Basile, A. and Dalena, F. 2019. Second and Third Generation of Feedstocks: The Evolution of Biofuels, Elsevier, England.

Callegari, A., Bolognesi, S., Cecconet, D. and Capodaglio, A. G. 2019. Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. Journal of Critical Rewiews in Environmental Science and Technology**.**

Chen, Z. and Wan, C. 2018.Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. Bioresource Technology, 250, 532-537.

Datta, A.K and Anantheswwaran, R.C.C. 2001. Handbook Of Microwave Technology for Food Applications, Marcel Dekker, New York.

Degam, G. 2017. Deep Eutectic Solvents Synthesis, Characterization and Applications in Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, Electronic Thesis and Dissertations.

Dowe, N. and McMillan, J. 2001. SSF experimental protocols – Lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. National Renewable Energy Laboratory (NREL) Laboratory Analytical Procedures. Web sitesi:http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42630.pdf. Erişim Tarihi: 01.05.2019.

Faulon, J. and Carlson, G.A. 1994. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. Organic Geochemistry, 21, 1169-1179.

Fengel, D. and Wegener, G. 1984. Wood chemistry, ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter, Berlin

Gui, M. M., Lee, K. T. and Bhatia, S. 2008. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. Energy, 33(11), 1646-1653.

Guo, Z., Ling, Z., Wang, C., Zhang, X, and Xu, F. 2018. Integration of facile deep eutectic solvents pretreatment for enhanced enzymatic hydrolysis and lignin valorization from industrial xylose residue, Bioresource Technology, 334-339.

Gunny, A.A., Arbain, D., Nashef, E.M. and Jamal, P. 2015.Applicability evaluation of Deep Eutectic Solvents–Cellulase system for lignocellulose hydrolysis.Bioresource Technology, 181, 297-302.

Haq, F., Ali, H.,Shuaib, M., Badshah, M., Hassan, S.W., Munnis, M.F.H.and Chaudhary, H.J. 2016. Recent progress in bioethanol production from lignocellulosic materials: A review.International Journal of Green Energy, 13(14), 1413-1441.

Haque, K.E. 1999. Microwave energy for mineral treatment processes—a brief review.Int J Miner Process, 57, 1-24,

Harmsen, P.F.H., Huijgen, W.J.J., Bermúdez Lópezm, L.M. and Bakker, R.R.C. 2010. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass Wageningen UR, Food & Biobased Research, 49.

Isci, A. 2012. Second generation Bioethanol Potential of Turkey. Journal of Renewable and Sustainable Energy, 4(5), 052702.

Jablonsky, M., Skulcova, A., Kamenska, L., Vrska, M. and Sima, J. 2015. Deep Eutectic Solvents: Fractionation of Wheat Straw.BioResources, 10(4); 8039-8047.

Krassig, H. ve J. Schurz. 2002. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth edition, Weinheim, Germany, Wiley-VCH.

Kumar, A.K., Parikh, B.S. and Pravakar, M. 2015. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue, Pollution control technologies and alternate energy options, 23, 9265-9275.

Kumar, A.K., Parikh, B.S.,Shah, E., Liu, L.Z and Cotta, M.A. 2016. Cellulosic ethanol production from green solvent-pretreated rice straw. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 7; 14-23.

Lau, M.W., Gunawan, C., Balan, V. and Dale, B.E. 2010. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production.Biotechnology Biofuels, 3, 11.

Lee, C., Zheng, Y. and VanderGheynst, J. S. 2015. Effects of pretreatment conditions and post–pretreatment washing on ethanol production from dilute acid pretreated rice straw, Biosystems Engineering, 137, 36-42.

Li, T., Lyu, G., Liu, Y., Lou, R., Lucia, L.A., Yang, G., Chen, J. and Saeed, H.A.M. 2017. Deep Eutectic Solvents (DESs) for the Isolation of Willow Lignin (Salix matsudana cv. Zhuliu), International Journal of Molecular Science, 18, 2266.

Li, A. L., Hou, X.D., Lin, K.P., Zhang, X. and Fu, M.H. 2018. Rice straw pretreatment using deep eutectic solvents with different constituents molar ratios : Biomass fractionation , polysaccharides enzymatic digestion and solvent reuse. Journal of Bioscience and Bioengineering; 126 (2); 139-272.

Liu, Y., Xiao, J., He, X., Zhang, K., Yuan, S., Peng, Z., Chen, Z. and Lin, X. 2019. Enhanced Enzymatic Hydrolysis and Lignin Extraction of Wheat Straw by Triethylbenzyl Ammonium Chloride/Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvent Pretreatment,ACS Omega, 4(22); 19829-19839**.**

Loow, Y.L., New, E.K., Yang, G.H., Ang, L. Foo, L.Y.W. and Wu, T.Y. 2017. Potential use of deep eutectic solvents to facilitate lignocellulosic biomass utilization and conversion, Cellulose, 24, 3591–3618.

Loow, Y.L., Wu, T.Y., Yang, G. H., Ang, L.Y., New, E.K., Siow, L.F., Jahim, J.M., Mohammad, A.W. and Teoh,W.H. 2018. Deep eutectic solvent and inorganic salt pretreatment of lignocellulosic biomass for improving xylose recovery, Bioresource Technology, 249, 818-825.

Lynam, J.G., Kumar, N. and Wong, M. J. 2017. Deep eutectic solvents' ability to solubilize lignin, cellulose, and hemicellulose; thermal stability; and density.Bioresource Technology, 238, 684-689.

McMillan, J. D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, American Chemical Society, Washington, DC , 292-324.

Mohapatra, S., Mishra, C., Beherra, S.,S. and Thatoi, H. 2017. Application of pretreatment, fermentation and molecular tecchniques for enhancing bioetanol production from grass biomass-a review. Renewable Sustainable Energy Reviews, 78, 1007-1032.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. 2005. Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Tecnology, 96, 673-686.

Procentese, A., Johnson, E., Orr, V., Campanile, A.G., Wood, J.A., Morzocchella, A. and Rehmann, L. 2015. Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. Bioresource Technology, 192; 31-36.

Procentese,A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M.E. Rehmann, L. and Marzocchella, A. 2017. Low-energy biomass pretreatment with deep eutectic solvents for bio-butanol production, Bioresource Technology, 243,. 464-473.

Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Rehmann, L. and Morzochello, A. 2018. Deep Eutectic Solvents pretreatment of agro‐industrial food waste, Biotechnology of Biofuels, 11(37).

Puligundla, P., Oh, S.E. and Mok, C.K. 2016. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: a review.Carbon letters, 17(1), 1-10.

Rabemanolontsoa, H. and Saka, S. 2016. Various pretreatments of lignocellulosics, Bioresource Technology, 199, 83-91

Saini, J.K., Saini, R. and Tewari, L. 2015. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. 3 Biotech5 (4), 337–353.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S. and Aikat, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview,Renewable Energy, 37(1), 19-27.

Selig, M., Weiss, N., and Ji, Y. 2008. Enzymatic saccharification of lignocelllulosic biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL) Laboratory Analytical Procedures, NREL/TP-510-42623.

Sert, M., Arslanoğlu, A. and Ballica, L. 2018. Conversion of sunflower stalk based cellulose to the valuable products using cholne chloride based deep eutectic solvents,Renewable Energy, 118, 993-1000.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., and Crocker, D. 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL) Laboratory Analytical Procedures,NREL/TP-510-42618. Web Sitesi: https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf.

Smith, E. L., Abbott, A.P., and Ryder, K.S. 2014. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. Chem. Rev., 114, 11060-11082.

Sumnu, G. 2001. A review on microwave baking of foods. International Journal of Food Science and Tecnology, 36(2), 117-127.

Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, 83(1),1-11.

Tang, X., Zuo, M., Li,Z., Liu, H., Xiong,C., Zeng, X. Sun,Y., Hu, L., Liu, S., Lei, T. and Lin, L. 2017. Green Processing of Lignocellulosic Biomass and Its Derivatives in Deep Eutectic Solvents. ChemSusChem, 10(13)

Wan, Y.L. and Mun, Y.J. 2018. Assesment of Natural Deep Eutectic Solvent Pretreatment on Sugar Production from Lignocellulosic Biomass. MATEC Web of Conferences, 152.

Xing, W., Xu, G., Dong, J., Han, R., Ni, Y. 2018. Novel dihydrogen-bonding deep eutectic solvents: Pretreatment of rice straw for butanol fermentation featuring enzyme recycling and high solvent yield, Chemical Engineering Journal, 333, 712-720.

Xu, G.C., Ding, J.C., Han, R.Z. Dong, J.J. and Ni, Y. 2016. Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. Bioresource technology, 203, 364-369.

Yaman, S. 2004. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks Energy Convers Manage, 45, 651-671.

Yasuda, M., Nagai, H., Takeo, K., Ishii, Y. and Ohta, K. 2014. Bio-ethanol production through simultaneoussaccharification and co-fermentation (SSCF)of a low-moisture anhydrous ammonia(LMAA)-pretreated napiegrass(PennisetumpurpureumSchumach), SpringerPlus, 3, 333.

Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N. and Faruq, G. 2017. Bioethanol production form renewable sources:current persectives and technology progress. Renewable Sustainable Energy Reviews, 71, 475-501.

Zhao, H. and Baker, G.A 2013. Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88(1): 3-12.

Zhang,Q ., De Oliveira Vigier. K, Royer, S. and Jerome, F. 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications Chemical Society Reviews, 41, 7108-7146.

Zhang, C.W., Xia, S.Q. and Ma, P.S. 2016. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents. Bioresource Techhnology, 219; 1-5.

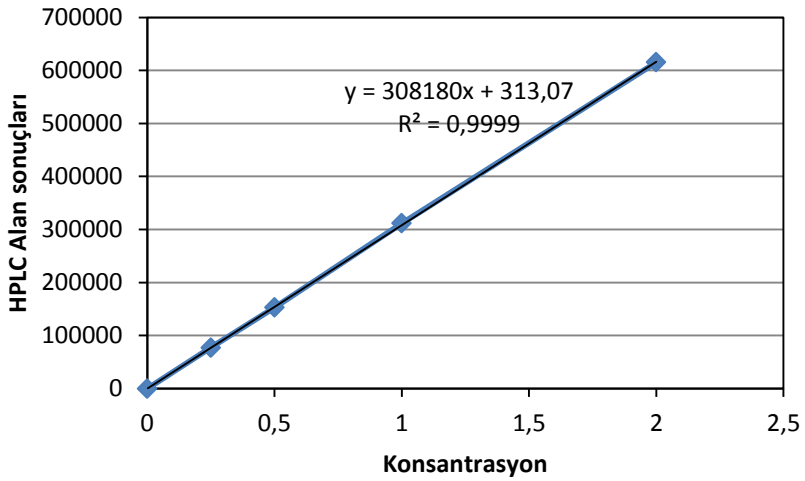
Zhu, Z., Macquarrie, D.J., Simister, R., Gomez, L.D. and McQueen-Mason, S.J. 2015. Microwave assisted chemical pretreatment of Miscanthus under different temperature regimes. Sustain. Chem. Process, 3.

EKLER

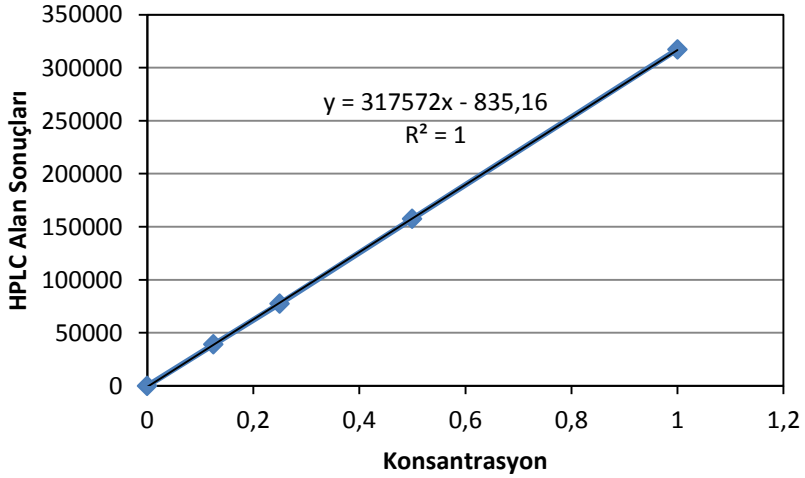
EK 1 GLİKOZ VE KSİLOZ STANDART KURVELERİ
EK 2 ETANOL STANDART KURVESİ
EK 3 KATININ GERİ KAZANIMI
EK 4 ENZİMATİK HİDROLİZ MİKTARLARI
EK 5 KOMPOZİSYON SONUÇLARI
EK 6 GLİKOZ MİKTARI ANOVA TABLOSU
EK 7 KSİLOZ MİKTARI ANOVA TABLOSU
EK 8 TOPLAM ŞEKER MİKTARI ANOVA TABLOSU
EK 9 GLİKOZ VERİM ANOVA TABLOSU
EK 10 KSİLOZ VERİM ANOVA TABLOSU

EK 1 GLİKOZ VE KSİLOZ STANDART KURVELERİ

Kalibrasyon eğrisi olarak; 4 farklı konsantrasyonda (2 g/L glikoz+1g/L ksiloz),(1 g/L glikoz+0,5 g/L ksiloz), (0,5 g/L glikoz+0,25g/L ksiloz), (0,25 g/L glikoz+0,125 g/L ksiloz) olarak hazırlanmış şeker standartları kullanılmıştır. Glikoz ve ksilozun standart eğrileri Ek 1.1 ve Ek 1.2'de verilmiştir.



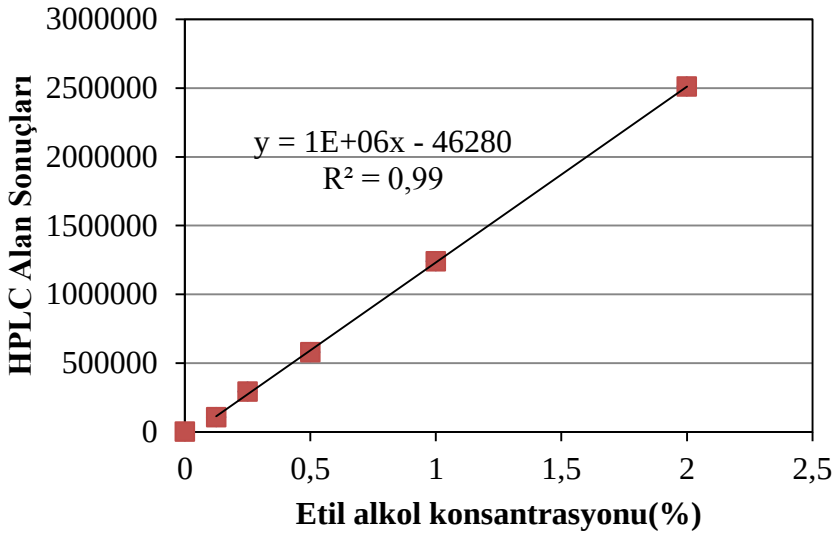
Ek 1.1 Glikoz standart kurvesi



Ek 1.2 Ksiloz standart kurvesi

EK 2 ETANOL STANDART KURVESİ

Etil alkol kalibrasyon eğrisi için; 5 farklı konsantasyonda (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 g/100 mL) etil alkol standardı kullanılmıştır. Etil alkol standart eğrisi ek 2.1' de gösterilmiştir.



Ek 2.1 Etanol standart kurvesi

EK 3 KATININ GERİ KAZANIMI

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Mol oranları	2	102.30	102.30	51.15	6.17	0.008
Güç	2	741.98	741.98	370.99	44.72	0.000
Süre	2	1634.94	1634.94	817.47	98.55	0.000
Hata	20	165.91	165.91	8.30		
Toplam	26	2645.12				

S	R-sq	R-sq(adj)
2,88016	%93.73	%91.85

EK 4 ENZİMATİK HİDROLİZ MİKTARLARI

Ek 4.1 Farklı ön işlem koşullarının enzimatik hidroliz sırasında açığa çıkan glikoz ve ksiloz miktarları (mg/mL) üzerine etkisi

	Mol oranı					
	1:4 mol		**1:3 mol**		**1:2 mol**	
No	**Glikoz (mg/mL)**	**Ksiloz (mg/mL)**	**Glikoz (mg/mL)**	**Ksiloz (mg/mL)**	**Glikoz (mg/mL)**	**Ksiloz (mg/mL)**
1	22.78±0.38^{cB}	1.18±0.05^{aC}	25.86±0.65^{bA}	1.35±0.06^{aA}	29,20±0.00^{aA}	1.35±0.00^{aB}
2	23.19±0.23^{aA}	3.75±0.01^{aA}	21.46±0.34^{aA}	3.09±0.17^{bB}	21,92±0.41^{abA}	2.81±0.03^{bC}
3	9.00±0.06^{bA}	2.39±0.06^{abA}	9.59±0.06^{bA}	1.97±0.13^{bA}	12,26±0.46^{aA}	2.98±0.20^{aA}
4	26.67±0.05^{aA}	3.35±0.03^{aB}	27.59±0.61^{aA}	3.37±0.03^{aA}	28.08±0.33^{aA}	2.54±0.23^{bA}
5	18.32±0.3^{bB}	4.09±0.14^{aA}	19.35±0.03^{aB}	3.69±0.05^{bA}	18.79±0.14^{abB}	3.66±0.07^{bA}
6	7.71±0.3^{aB}	2.01±0.06^{aB}	8.79±0.52^{aA}	2.23±0.19^{aA}	8.29±0.34^{aB}	2.21±0.24^{aB}
7	19.49±0.0^{bC}	3.94±0.01^{aA}	18.00±0.71^{bB}	3.56±0.03^{abB}	22.17±0.36^{aB}	3.29±0.26^{bA}
8	11.40±0.26^{cC}	2.84±0.09^{bB}	14.42±0.06^{bC}	3.65±0.09^{aA}	15.38±0.18^{aC}	3.39±0.07^{aB}
9	6.85±0.33^{aB}	1.65±0.08^{aC}	6.98±0.32^{aB}	1.96±0.10^{aA}	6.90±0.54^{aCC}	1.74±0.04^{aC}

a,b,c sabit mikrodalga gücü ve sabit ön işlem süresinde, mol oranlarında farklı harfler taşıyan değerler arasında fark istatiksel olarak anlamlıdır *(p<0.05)*

A,B,C sabit mol oranı ve sabit ön işlem süresinde, mikrodalga gücünde farklı harf taşıyan değerler arasında fark istatiksel olarak anlamlıdır *(p<0.05)*

EK 5 KOMPOZİSYON SONUÇLARI

Ek 5.1. Farklı mikrodalga destekli derin ötektik çözgen ön işlem koşullarında işlenmiş saman örneklerinin kompozisyon sonuçları

	Kompozisyon bileşimi (%)*											
	1:4 mol oranı				**1:3 mol oranı**				**1:2 mol oranı**			
No	**Glu**	**Ksi**	**AIR**	**ASR**	**Glu**	**Ksi**	**AIR**	**ASR**	**Glu**	**Ksi**	**AIR**	**ASR**
1	46.7	2.8	34.3	1.44	44.7	3.1	39.6	3.68	54.0	1.8	38.0	4.48
2	51.8	11.2	29.3	2.91	47.4	11.0	31.9	2.64	47.3	9.9	31.1	2.89
3	43.1	20.3	25.5	2.81	37.4	18.1	23.6	2.89	41.9	18.4	25.1	3.02
4	55.6	7.3	33.4	2.79	49.5	7.0	31.1	2.72	52.5	6.5	33.6	2.97
5	44.4	12.5	27.7	2.79	46.8	16.0	26.1	2.59	45.1	15.2	28.0	2.82
6	43.0	21.3	25.0	2.94	38.4	19.3	23.8	2.92	37.9	18.9	23.0	2.96
7	52.0	13.8	26.1	2.69	45.4	12.2	28.7	2.85	46.9	9.6	28.1	2.66
8	41.7	18.5	25.0	2.92	41.3	18.1	24.3	2.94	41.2	18.2	24.7	2.67
9	40.8	18.2	22.8	2.97	40.3	19.4	21.8	2.96	32.7	19.6	21.9	2.98

*Glu: glukan, Ksi: ksilan, AIR: asitte çözünmeyen lignin (klason lignin) ASR:asitte çözünen lignin (Çizelgede belirtilen numaralandırma çizelge 4.1' de belirtilen proses koşullarını ifade etmektedir)

EK 6 GLİKOZ MİKTARI ANOVA TABLOSU

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Mol Oranı	2	35.07	35.07	17.54	137.79	0.000
Güç	2	354.04	354.04	177.02	1391.01	0.000
Süre	2	2325.43	2325.43	1162.71	9136.47	0.000
İki yönlü interaksiyon						
Mol oranı*Güç	4	10.57	10.57	2.64	20.76	0.000
Mol oranı*Süre	4	13.79	13.79	3.45	27.09	0.000
Güç*Süre	4	90.16	90.16	22.54	177.11	0.000
Üç yönlü interaksiyon						
Mol Oranı*Güç*Süre	8	36.55	36.55	4.57	35.91	0.000
Hata	27	3.44	3.44	0.13		
Toplam	53	2869.05				

S	R-sq	R-sq(adj)
0.356736	%99.88	%99.76

EK 7 KSİLOZ MİKTARI ANOVA TABLOSU

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Mol Oranı	2	0.1859	0.1859	0.0930	6.51	0.005
Güç	2	4.9574	4.9574	2.4787	173.71	0.000
Süre	2	15.7240	15.7240	7.8620	550.97	0.000
İki yönlü interaksiyon						
Mol oranı*Güç	4	0.8015	0.8015	0.2004	14.04	0.000
Mol oranı*Süre	4	1.0098	1.0098	0.2525	17.69	0.000
Güç*Süre	4	15.2172	15.2172	3.8043	266.61	0.000
Üç yönlü interaksiyon						
Mol Oranı*Güç*Süre	8	2.4053	2.4053	0.3007	21.07	0.000
Hata	27	0.3853	0.3853	0.0143		
Toplam	53	40.6865				

S	R-sq	R-sq(adj)
0.119454	%99.05	%98.14

EK 8 TOPLAM ŞEKER MİKTARI ANOVA TABLOSU

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Mol Oranı	2	12075	12075	6038	76.35	0.000
Güç	2	125680	125680	62840	794.61	0.000
Süre	2	1015655	1015655	507828	6421.49	0.000
İki yönlü interaksiyon						
Mol oranı*Güç	4	5888	5888	1472	18.61	0.000
Mol oranı*Süre	4	4114	4114	1028	13.00	0.000
Güç*Süre	4	41153	41153	10288	130.10	0.000
Üç yönlü interaksiyon						
Mol Oranı*Güç*Süre	8	22583	22583	2823	35.70	0.000
Hata	27	2135	2135	79		
Toplam	53	1229283				

S	R-sq	R-sq(adj)
8.89284	%99.83	%99.66

EK 9 GLİKOZ VERİM ANOVA TABLOSU

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Mol Oranı	2	906.2	906.2	453.1	77.46	0.000
Güç	2	3174.0	3174.0	1587.0	271.33	0.000
Süre	2	22549.6	22549.6	11274.8	1927.63	0.000
İki yönlü interaksiyon						
Mol oranı*Güç	4	164.9	164.9	41.2	7.05	0.001
Mol oranı*Süre	4	47.9	47.9	12.0	2.05	0.116
Güç*Süre	4	386.3	386.3	96.6	16.51	0.000
Üç yönlü interaksiyon						
Mol Oranı*Güç*Süre	8	285.0	285.0	35.6	6.09	0.000
Hata	27	157.9	157.9	5.8		
Toplam	53	27671.8				

S	R-sq	R-sq(adj)
2.41849	%99.43	%98.88

EK 10 KSİLOZ VERİM ANOVA TABLOSU

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Mol Oranı	2	71.7	71.7	35.8	2.16	0.135
Güç	2	3563.4	3563.4	1781.7	107.25	0.000
Süre	2	25071.5	25071.5	12535.8	754.58	0.000
İki yönlü interaksiyon						
Mol oranı*Güç	4	600.9	600.9	150.2	9.04	0.000
Güç*Süre	4	317.8	317.8	79.5	4.78	0.005
Mol oranı*Süre	4	992.1	992.1	248.0	14.93	0.000
Üç yönlü interaksiyon						
Mol Oranı*Güç*Süre	8	877.0	877.0	109.6	6.60	0.000
Hata	27	448.6	448.6	16.6		
Toplam	53	31943.0				

S	R-sq	R-sq(adj)
4.07590	%98.60	%97.24

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gizem Melissa ERDEM

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 02/10/1994

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu(Kurum ve Yılı)

Lise: Ersin Bacaksız Anadolu Lisesi(2008-2012)

Lisans: Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü(2012-2017)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü(2017-Ocak 2020)

Çalıştığı Kurum ve Yılı

Türk Standartları Enstitüsü,2016(Staj-Enstümental Analiz ve Gıda Analizleri Laboratuvar)

Uluslarası Kongre Bildirisi

- ERDEM GİZEM MELİSSA, İŞCİ YAKAN ASLI, ŞAKIYAN DEMİRKOL ÖZGE (2018). Pectin Production From Food Wastes: Current Status And Future Perspectives. 3rd International Congress on Food Technology (Özet Bildiri/Poster)(Sayı/No: GD ICFT3 147)