T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FARKLI ÖN İŞLEM UYGULAMALARIYLA FISTIK (*Pistacia vera* L.) KABUĞU ATIKLARINDAN BİYOETANOL ELDESİ

Betül GÖNCÜ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2023

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FARKLI ÖN İŞLEM UYGULAMALARIYLA FISTIK (*Pistacia vera* L.) KABUĞU ATIKLARINDAN BİYOETANOL ELDESİ

Betül GÖNCÜ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. Şeker İçerikli Kaynaklardan Biyoetanol Üretimi 7
2.2. Nişasta İçerikli Kaynaklardan Biyoetanol Üretimi 8
2.3. Lignoselülozik Kaynaklardan Biyoetanol Üretimi 8
2.4. Biyoetanol Üretim Aşamaları 11
2.4.1. Ön işlemler 12
2.4.1.1. Mekanik parçalama (öğütme) 12
2.4.1.2. Buhar patlatması 13
2.4.1.3. Amonyak fiber patlaması (AFEX) 13
2.4.1.4. Sıcak su ön işlemi 14
2.4.1.5. Ultrasonik ön işlem 14
2.4.1.6. Ozon ön işlemi 15
2.4.1.7. Alkali ön işlemi 15
2.4.1.8. Asit ön işlemi 15
2.4.1.9. Organik çözücü ön işlemi 16
2.4.1.10. Islak hava oksidasyonu 16
2.4.2. Enzimatik hidroliz 17
2.4.3. Fermantasyon 18
2.4.3.1. Ayrı hidroliz ve fermantasyon (SHF) 19
2.4.3.2. Eşzamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon (SSCF) 20
2.4.3.3. Eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) 20
2.5. Farklı Hammaddeler ile Yapılmış Çalışmalar 22
2.6. Fıstık (*Pistacia vera* L.) 26
3. MATERYAL ve YÖNTEM 30
3.1. Materyal 30
3.2. Yöntem 30
3.2.1. Öğütme 31
3.2.2. Hammadde karakterizasyonu 31
3.2.2.1. Nem miktarının belirlenmesi 31
3.2.2.2. Kül miktarının belirlenmesi 32
3.2.2.3. Lignin tayini 32
3.2.3. Uygulanan ön işlemler 33
3.2.3.1. NaOH ön işlemi 33
3.2.3.2. NaOH+ H_2O_2 ön işlemi 33
3.2.3.3. Ozon ön işlemi 33
3.2.3.4. Ozon+Sıcak su ön işlemi 34
3.2.4. Enzimatik hidroliz 34
3.2.4.1. Enzim aktivitesinin belirlenmesi 34
3.2.4.2. İndirgen şeker miktarı tayini 35
3.2.5. Fermantasyon 36
3.2.6. Morfolojik yapı 37
3.2.6.1. SEM görüntüleri 37
3.2.6.2. Termogravimetrik analizler (TGA) 37
3.2.6.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi 37

3.2.6.4. Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi 38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 39
4.1. Ön İşlem Uygulamalarının Lignin Giderimine Etkisi 39
4.1.1. NaOH ön işleminin lignin giderimine etkisi 39
4.1.2. NaOH+ H_2O_2 ön işleminin lignin giderimine etkisi 42
4.1.3. Ozon ön işleminin lignin giderimine etkisi 44
4.1.4. Ozon+Sıcak su ön işleminin lignin giderimine etkisi 45
4.2. Enzimatik Hidroliz 46
4.2.1. NaOH ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarının enzimatik hidrolizi 46
4.2.2. Ozon ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarının enzimatik hidrolizi 47
4.2.3. Ozon+Sıcak su ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarının enzimatik hidrolizi 55
4.3. Fermantasyon 62
4.3.1. Ozon su ön işleminin ardından enzimatik hidroliz uygulanmış hidrolizatlardan etanol eldesi 62
4.3.2. Ozon+Sıcak su ön işleminin ardından enzimatik hidroliz uygulanmış hidrolizatlardan etanol eldesi 65
4.4. Morfolojik Yapı 67
4.4.1. SEM görüntüleri 67
4.4.2. Termogravimetrik analizler (TGA) 69
4.4.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi 71
4.4.4. Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi 72
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 74
KAYNAKLAR 77

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI ÖN İŞLEM UYGULAMALARIYLA FISTIK (*Pistacia vera* L.) KABUĞU ATIKLARINDAN BİYOETANOL ELDESİ

Betül GÖNCÜ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakki GÜLŞEN
Yıl: 2023, Sayfa: 92

Fıstık (*Pistacia vera* L.) kabuğu, lignoselülozik bir hammaddedir. Bu çalışmada bölgemizde ve şehrimizde üretimi bol miktarda olan fıstık kabuğu atıkları biyoetanol üretimi için kullanılmıştır. Fıstık atıklarından farklı ön işlem uygulamaları sonrası biyoetanol üretilerek hem çevre kirliliğinin azaltılacağı hem de öz kaynaklar kullanılarak enerji edileceği düşüncesi, çalışmanın esas amacını oluşturmaktadır. Fıstık kabuklarının ön işlemle delignifikasyonundan sonra fermente edilebilir şeker elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle sıcaklık, alkali çözeltiler ve uygulama süreleri gibi değişen çalışma koşullarında NaOH ve NaOH+H_2O_2 kullanılarak alkali ön arıtma uygulanmıştır. Ön işlemler sonucunda lignin giderimi %16.27 ile %40.64 arasında değişmiştir. En iyi lignin giderimi yapan NaOH ön işlem koşulu %2 NaOH, katı/sıvı oranı 1/10, ön işlem sıcaklığı 60°C ve uygulama süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca fıstık kabuklarına ozon ve kombine ön işlem uygulamaları da yapılmıştır. Kombine ön arıtma uygulanmasının sadece ozon ön arıtmaya göre daha iyi lignin giderimi sağladığı, ozon ön arıtmanın ise sıcak su ön arıtmaya göre daha iyi lignin giderimi sağladığı görülmüştür. Ön işlem görmüş ve işlem görmemiş fıstık kabuklarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri karşılaştırılmıştır. Enzim aktivitesi ölçülmüş olup ön işlem sonrası uygulanan enzimatik hidroliz işleminde 30-60 FPU enzim yüklemesi uygulanmıştır. Enzimatik hidroliz sonucunda ozon+sıcak su ön işlemiyle maksimum 8,24 g/L indirgen şeker, NaOH ön işlemiyle maksimum 6.98 g/L indirgen şeker elde edilmiştir. Fermantasyon sonunda ise 1.21–2.33 g/L etanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Fermantasyon verimi %42 ile %55 arasında hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Lignoselülozik biyokütle, fıstık (*Pistacia vera* L.) kabuğu, biyoetanol, ozon ön işlemi, NaOH ön işlemi

ABSTRACT

PhD Thesis

BIOETHANOL PRODUCTION FROM PISTACHIO (*Pistacia vera* L.) WASTE APPLIED DIFFERENT PRETREATMENT PROCESSES

Betül GÖNCÜ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Environmental Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakki GÜLŞEN
Year: 2023, Page: 92

Pistachio (*pistacia vera* L.) shell is a lignocellulosic raw material. In this study, pistachio waste, which is abundant in our region and city, will be used. Bioethanol production with the different pretreatment processes from pistachio wastes is the main reason for the emergence of this study with the idea that both environmental pollution will be reduced and energy will be obtained. In this study, it was aimed to obtain fermentable sugar after delignification of pistachio shells. Therefore, alkali pretreatment was applied using NaOH at changing operating conditions such as temperature, alkali solutions, and apply times. As a result of pretreatments, lignin was removed ranged from 16.27% to 40.64%. The best pretreatment condition was determined as 2% NaOH, solid to liquid ratio 1/10, pretreatment temperature of 60°C, and applying time of 60 min. Furthermore the ozone and combined pretreatments were applied to the pistachio shells. It has been observed that applying the combined pretreatment provides better lignin removal than only ozone pretreatment and on the other hand, the ozone pretreatment provides better lignin removal than the hot water pretreatment. Scanning electron microscopy (SEM) images of (NaOH and ozone+hot water) pretreated, and untreated pistachio shells were compared. Enzyme activity was measured, and 30–60 FPU enzyme loading was applied in an enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis was applied to obtain fermentable sugar from the pistachio shells after pretreatments. As a result of enzymatic hydrolysis, 6.98 g/L maximum reducing sugar was obtained at NaOH pretreatment and 8.24 g/L maximum reducing sugar was obtained at ozone+hot water pretreatment. On the other hand, 1.21–2.33 g/L ethanol concentration was obtained end of the fermentation process. Fermentation efficiency was calculated between 42% and 55%.

KEY WORDS: Lignocellulosic biomass, bioethanol, ozone pretreatment, NaOH pretreatment, pistachio (*Pistacia vera* L.) shell

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Hakki Gülşen'e,

Çalışmamın etanol analizi kısmının gerçekleştirilmesinde yardımcı olan, tez çalışmam boyunca bana yol gösteren ve destek olan Dr. Öğr. Üyesi Emir Zafer Hoşgün'e,

Tez çalışmamda her zaman yönlendirici ve olumlu katkı sağlayan Prof. Dr. Mutlu Buket Akın'a,

Çalışmanın indirgen şeker analizi kısmında deneyimlerini paylaşarak destek olan Doç. Dr. Yakup Aslan'a

Laboratuvar çalışmalarımın başlangıcında özverili çalışmasıyla desteğini esirgemeyen stajyer öğrencim Emrah Bakır'a,

Doktora eğitimim boyunca maddi manevi olarak yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Dünyada biyoetanol üretimi 4
Şekil 2.2. Türkiye'nin biyoetanol üretimi (Günlük Bin Varil Cinsinden) 5
Şekil 2.3. Bitki hücre duvarı bileşenleri 9
Şekil 2.4. Lignoselülozik biyorafineri akış şeması 10
Şekil 2.5. Fıstık kabuğu 26
Şekil 2.6. 2018/2019 fıstık üretimi (metrik ton cinsinden) 27
Şekil 2.7. Dünyada beş yıllık (2014-2019) ortalama fıstık üretimi 27
Şekil 2.8. 2019/2020 fıstık üretimi (metrik ton cinsinden) 28
Şekil 2.9. Dünyada beş yıllık (2015-2020) ortalama fıstık üretimi 28
Şekil 3.1. Uygulanan işlemler için akım şeması 31
Şekil 3.2. Ozonlama için kullanılan deney düzeneği 34
Şekil 4.1. Farklı sıcaklıklarda uygulanan alkali ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisinin karşılaştırılması (30 dk ön işlem süresi) 40
Şekil 4.2. Farklı sıcaklıklarda uygulanan alkali ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisinin karşılaştırılması (60 dk ön işlem süresi) 41
Şekil 4.3. %2 NaOH + %2 H_2O_2 ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi 43
Şekil 4.4. %2 NaOH + %4 H_2O_2 ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi 43
Şekil 4.5. Ozon ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi 44
Şekil 4.6. Ozon ve sıcak su ön işlemlerinin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi 45
Şekil 4.7. % 2 NaOH, 60 dakika, 1/10 S / L oranı, 60^{o}C alkali ön işlem enzimatik hidrolizi 47
Şekil 4.8. Ozon ön işlemi (5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 48
Şekil 4.9. Ozon ön işlemi (15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 49
Şekil 4.10. Ozon ön işlemi (30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 49
Şekil 4.11. Ozon ön işlemi (60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 50
Şekil 4.12. Ozon ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (30 FPU) 51
Şekil 4.13. Ozon ön işlemi (5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 52
Şekil 4.14. Ozon ön işlemi (15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 52
Şekil 4.15. Ozon ön işlemi (30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 53
Şekil 4.16. Ozon ön işlemi (60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 53
Şekil 4.17. Ozon ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (60 FPU) 54
Şekil 4.18. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (5 dk + 5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 56
Şekil 4.19. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (15 dk + 15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 56
Şekil 4.20. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (30 dk + 30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (30 FPU) 57
Şekil 4.21. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (60 dk + 60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 58
Şekil 4.22. Ozon ve sıcak su ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU) 58

Şekil 4.23. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (5 dk + 5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 59
Şekil 4.24. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (15 dk + 15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 60
Şekil 4.25. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (30 dk + 30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (60 FPU) 60
Şekil 4.26. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (60 dk + 60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 61
Şekil 4.27. Ozon ve sıcak su ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU) 62
Şekil 4.28. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından elde edilen etanol miktarı (60 FPU) 63
Şekil 4.29. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarının fermantasyon işlemindeki etanol verimliliği (60 FPU) 64
Şekil 4.30. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından etanol eldesinde fermantasyon etkisi (60 FPU) 64
Şekil 4.31. Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından elde edilen etanol miktarı (60 FPU) 65
Şekil 4.32. Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarının fermantasyon işlemindeki etanol verimliliği (60 FPU) 66
Şekil 4.33. Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından etanol eldesinde fermantasyon etkisi (60 FPU) 66
Şekil 4.34. SEM görüntüsü (ön işlem uygulanmamış) 68
Şekil 4.35. SEM görüntüsü (NaOH ön işlemi uygulanmış) 68
Şekil 4.36. SEM görüntüsü (ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış) 69
Şekil 4.37. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının TGA eğrileri 70
Şekil 4.38. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının DTA eğrileri 70
Şekil 4.39. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının XRD grafiği 71
Şekil 4.40. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının FTIR spektroskopisi 72

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Biyoetanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri 6
Çizelge 2.2. Biyoetanol ve benzinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması..... 6
Çizelge 2.3. Esnek taşıtlı yakıt ile benzinli araç emisyon değeri karşılaştırması 7
Çizelge 2.4. Lignoselülozik hammadde içerikleri..... 9
Çizelge 5.1. Benzin tüketiminde ihtiyaç duyulan biyoetanol miktarları 75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DİE	Devlet İstatistik Enstitüsü
EIA	U.S. Energy Information Administration (ABD Enerji Bilgi Yönetimi)
FAO	Food and Agricultural Organization of The United Nation (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
INC	International Nut and Dried Fruit Council (Uluslararası Kuruyemiş ve Kuru Meyve Konseyi)
NREL	National Renewable Energy Laboratory (ABD Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarı)
RFA	Renewable Fuels Association (Yenilenebilir Yakıtlar Birliği)

1. GİRİŞ

Fosil yakıtlar günümüzde küresel enerji sistemine hakimdir. Kömür, petrol ve doğalgaz ana enerji kaynaklarını oluşturmaktadır (WBA, 2016). Dünyanın enerji talebi her yıl %30 oranında artmaktadır ve yenilenebilir olmayan fosil yakıt rezervleri bu artan enerji talebini karşılamaya yetmemektedir. Ekonomik sorunlar, fosil yakıt kullanımından kaynaklanan sera gazları (GHG), kanserojen etkili egzoz emisyonlarının oluşturduğu çevresel tehlikeler ve benzeri olumsuzluklar enerji araştırmalarını fosil yakıtlar yerine kullanılabilecek yenilenebilir enerji kaynaklarına yönlendirmiştir (Rana ve ark., 2019; Guo ve ark., 2015; Nicoletti ve ark., 2015; Gu ve ark., 2015).

Biyoyakıtlar, günümüzde ve gelecekteki enerji talepleri için fosil yakıtlara yenilenebilir, çevreci ve güvenilir bir alternatif sunmaktadır. Ayrıca biyoyakıtlar bölgesel kalkınma için de çeşitli fırsatlar oluşturmaktadır (Subhedar ve ark., 2018; Ling ve Silveira, 2005; Singh ve ark., 2014). Bitkisel ve hayvansal hammaddelerin dönüştürülmesiyle oluşan yakıt türü biyoyakıt olarak adlandırılmaktadır. Biyogaz, biyometanol, biyoetanol ve biyodizel gibi sıvı ve gaz yakıtlar en yaygın biyoyakıtlar olarak bilinmektedir (Renewable Fuels Association, 2016).

Bugüne kadar dünya biyoyakıt üretiminin ~%65'ini oluşturan biyoetanol, en önemli biyoyakıt konumundadır (Sadhukhan ve ark., 2019). Biyoetanol yüksek oktanlıdır. Yakıtlarda oktan arttırıcı olarak kullanılan kurşunun çevreye zarar vermesinden dolayı çevreci bir biyoyakıt olan biyoetanol kurşuna alternatif olmuştur (Thomas ve Kwong, 2001). Araçlarda tek başına veya benzine harmanlanarak kullanılabilmektedir. Ancak biyoetanolün korozyon yapıcı etkisi benzinden daha yüksektir. Bu sebeple araçlarda tek başına kullanımı araçların yakıt sistemlerindeki bazı elemanlara zarar verebilmektedir. Yakıt sistemlerinde teflon veya paslanmaz çelik gibi malzemelerin kullanılmasıyla bu zarar giderilebilir (IEA, 2004). Biyoetanol, benzinli araçlarda modifikasyona ihtiyaç olmadan %10 oranına kadar benzine ilave edilerek kullanılabilir. %10 oranında biyoetanol içeren yakıtlar E10 olarak adlandırılmaktadır (Turov, 1965).

Biyoetanol üretiminde şeker, nişasta ve lignoselülozik içerikli hammaddeler kullanılır (Sequeira ve ark., 2007). Basit şekerler, bitkiler ve tahıllarda nişasta veya selüloz formunda saklanır (Jarvis ve Brian, 2003). Nişasta ve selülozdan biyoetanol üretimi için bu malzemelerin glikoza ayrıştırılması gerekir (Amutha ve ark., 2001). Biyoetanol, mikroorganizmaların monomer yapıdaki şekeri fermente etmesiyle elde edilir (Liu ve ark., 2008).

Şeker ve nişasta içerikli ürünlerden birinci nesil biyoetanol elde edilmektedir (Nagenderan ve ark., 2020). Birinci nesil biyoetanol yenilebilir tarım ürünlerinden elde edildiğinden sürdürülebilirlik açısından farklı sorunlara neden olmaktadır (Ferro ve ark., 2015). İkinci nesil biyoetanol ise genellikle lignoselülozik biyokütleden elde edilir, hammaddelerin düşük maliyeti ve gıda kaynaklarının kullanılmaması gibi avantajları vardır (Parachin ve ark., 2011).

Lignoselülozik biyoetanol, tarımsal atıklardan elde edilen yenilenebilir bir enerji kaynağıdır (OEERE, 2019). Ürün atıkları, orman artıkları, odunsu enerji bitkileri, kentsel odun atıkları ve gıda atıkları dahil olmak üzere farklı kaynaklardan bol miktarda üretilmektedir (Sandouqa ve ark., 2019). Bu malzemelerin hammadde olarak kullanımı büyük çevresel atık birikimini de önlemektedir (John ve ark., 2019).

Fıstık kabuğu, biyoetanol üretmek için kullanılabilecek sürdürülebilir bir hammaddedir (Subhedar ve ark., 2018). Bu çalışmada fıstık kabuğunun kullanılmasının ilk sebebi ülkemizde ve bölgemizde oluşan büyük miktarda fıstık atığı potansiyeli ve bu potansiyelden istifade etmektir. Ayrıca istatistiksel verilere dayanarak son beş yılda dünyanın en yüksek fıstık üretimine sahip üç ülkesinden birinin Türkiye olduğu ve Türkiye'de en çok fıstık üretimi yapılan ilinin Şanlıurfa olduğu görülmektedir (International Nut and Dried Fruit Council, 2020; BEPA, 2018).

Bu çalışmada Şanlıurfa'da yetiştirilen lignoselülozik atık türü olan fıstık (*Pistacia vera* L.) kabukları kullanılmıştır. Hammadde ise bireysel bir üreticiden temin edilmiştir. Fıstık, kabuklu yemiş olarak tüketiminin yanı sıra kabuksuz olarak da tatlı ve benzeri ürünlerde kullanılmaktadır ve bu amaçla ayrılan fıstık kabukları çoğunlukla

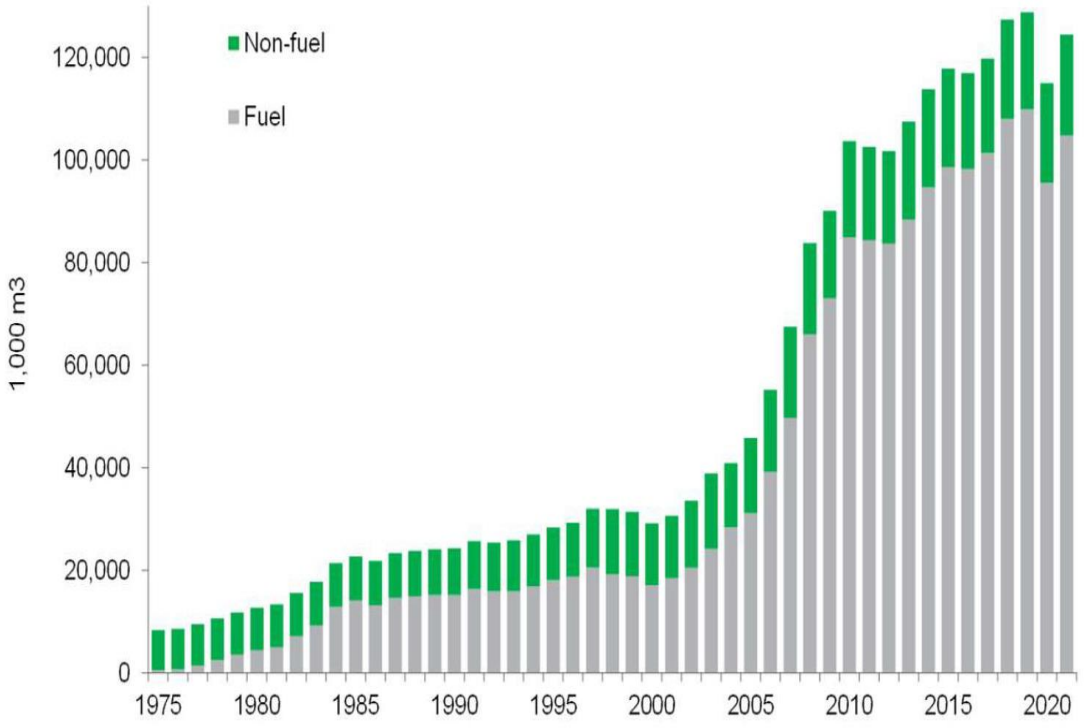
çöpe atılarak bertaraf edilmektedir. Bu sebeple, çalışmada kullanılan hammadde maliyeti ortaya çıkmamakta ve temini açısından sıkıntı oluşmamaktadır. Bunların yanı sıra bölgemizde çok sayıda fıstık kavlatma tesisleri, fıstık işleme tesisleri gibi tesislerin bulunması hammaddenin temin edilmesini kolaylaştırmaktadır. Özetle; fıstık kabuğunun atık olarak ücretsiz, bol ve sürekli mevcut olması, kolay erişim imkânı ve düşük nakliye maliyeti ve benzeri birçok avantajı bulunmasından dolayı bu çalışmada kullanılmıştır. Bu verileri göz önüne aldığımızda, fıstık kabuğunun enerji eldesinde değerlendirilmesi fikri böyle bir çalışmanın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Fıstığın bölgemizde yüksek oranda üretimi göz önüne alındığında bu çalışmanın hem organik atıkların kullanımıyla çevre kirliliğini azaltacağı hem de atıktan enerji eldesi gibi bir avantaj oluşturacağı düşünülmektedir. Ülkemizin enerji kullanımında dışa bağımlılığını azaltmak için yerli ve milli enerji kaynaklarının çeşitlendirilmesi kapsamında, bir biyoyakıt türü olan biyoetanolün ülkemiz enerji yelpazesinde kullanımını ve payını artırmak amacıyla teknik, bilimsel ve akademik altyapının oluşturulması da bu çalışmanın amaçlarından biridir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

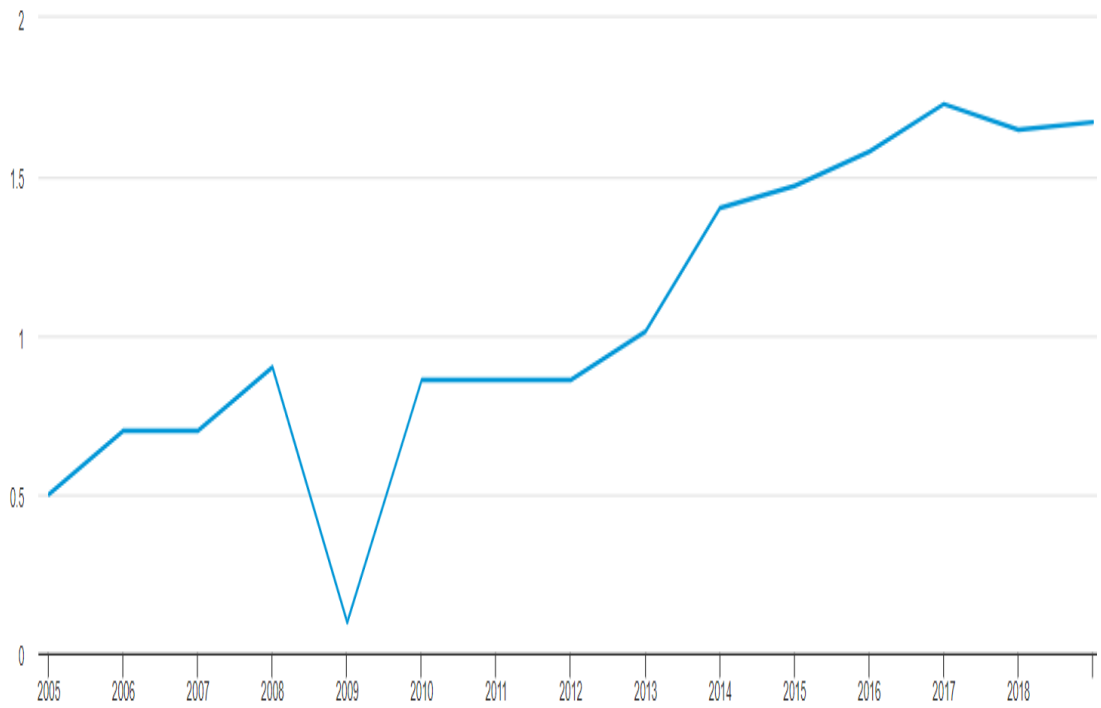
Biyoetanol elde edilen hammaddeleri üç gruba ayırabiliriz (Smith, 2008):

1. Sükroz içerikli hammaddeler (Şeker pancarı, şeker kamışı, tatlı sorgum ve meyveler vb.),
2. Nişasta içerikli hammaddeler (Mısır, buğday, çeltik, patates, casava, tatlı patates ve arpa vb.),
3. Lignoselülozik hammaddeler (orman artıkları, tarla ürünü artıkları vb.).

Dünyada mısır ve şeker kamışının ardından biyoetanol için en yaygın kullanılan hammadde buğdaydır (Easson ve ark., 2004). Dünyada en fazla biyoetanol üretimi yapan ülke konumundaki ABD, üretiminin neredeyse tamamını mısırdan tedarik etmektedir. Hammadde olarak Avrupa buğday ve şeker pancarını, Brezilya ise şeker kamışını biyoetanol üretiminde kullanmaktadır (Dağdelen, 2015). Dünyada biyoetanol üretimi Şekil 2.1.'de, Türkiye'deki biyoetanol üretimi ise Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Dünyada biyoetanol üretimi (Licht, 2021)



Şekil 2.2. Türkiye'nin biyoetanol üretimi (Günlük Bin Varil Cinsinden) (EIA, 2019)

Biyoyakıtlar iki ayrı grupta ele alınırken, "birinci nesil biyoyakıtlar" yenilebilir nitelikteki ve bitkisel ürünlerden üretilen biyoyakıtlardır. Ancak biyoyakıt elde etmek için gıda hammaddelerinin ve tarım arazilerinin kullanılması, gıda fiyatlarının artmasına neden olmuş ve gelişmekte olan ülkelerde çok daha büyük bir soruna, yani gıda krizine yol açmıştır (Rodionova ve ark., 2017). Bu nedenle araştırmalar yenilebilir hammadde olmayan lignoselülozik hammaddeden biyoetanol üretimine yönelmiştir.

Lignoselülozik hammadde kullanımı aynı zamanda çevresel atık birikimini de önlemektedir. Tarımsal, endüstriyel ve ormancılık artıklarından elde edilen lignoselülozik hammaddeler, yapısal bütünlüğü sağlayan selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır (Kataria ve Ghosh, 2014). Lignoselülozik hammaddeler basit şeker içerikli ve nişasta içerikli hammaddelere göre bol miktarda ve ucuzdur. Bu sebeple biyoetanol eldesi prosesleri sabitleştiğinde bu hammaddelerden biyoetanol eldesi çok daha fazla tercih edilecektir. Lignoselülozik hammaddelerden elde edilen biyoetanol "ikinci nesil biyoetanol" olarak adlandırılmaktadır (Melikoğlu ve Albostan, 2011). Biyoetanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Biyoetanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri (Acaroğlu ve ark., 2004)

Formül	**C_2H_5OH**
Özgül Ağırlık (20°C)	0.79 kg/dm^3
Buhar Basıncı (38°C)	50 mmHg
Kaynama Noktası	78.5°C
Moleküler Ağırlık	46.1
Karbon	%52.1
Hidrojen	%13.1
Oksijen	%34.8
C/H Oranı	4
Stokiyometrik Hava/Etanol (ağırlıkça)	9
Alt Isıl Değeri (kJ/kg)	26.784
Kendi Kendine Tutuşma Sıcaklığı (°C)	425
Özgül Isı (kJ/kg°C)	2.5
Donma Noktası (°C)	-115

Biyoetanolün buharlaşma ısısının benzinden yüksek olması yakıttan sağlanan motor gücünün daha fazla olduğunu göstermektedir. Hava/yakıt oranının biyoetanolde daha az olması havayla yanacak yakıt miktarının biyoetanolde daha fazla olduğunu göstermektedir. Fakat bu durum soğuk iklim koşullarında yakıt tutuşma ve buharlaşmayı zorlaştırdığından olumsuz etki oluşturmaktadır. Yanma sıcaklıkları kıyaslandığında biyoetanolün benzinden düşük sıcaklıkta yanabilmesinin motor verimine olumlu yönde etkisi olmaktadır (Wyman ve ark., 2005). Biyoetanol ve benzinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Biyoetanol ve benzinin bazı özelliklerinin karşılaştırılması (Wyman ve ark., 2005)

Yakıt Parametresi	**Biyoetanol**	**Benzin**
Kaynama Noktası	78.5°C	27°C- 225°C
Yoğunluk	0.79 kg/dm^3	0.72-0.78 kg/dm^3
Buharlaşma Isısı	842-930 kJ/kg	325-395 kJ/kg
Tutuşabilirlik Sınırı	%3.3-%19	%1-%8
Stokiyometrik Hava/Yakıt Oranı (ağırlıkça)	8.97-9	14.5-14.7
Yanma Sıcaklığı	1.930°C	1.977°C
Net Yanma Isısı	21.098-21.181 kJ/dm^3	30.378- 33.165 kJ/dm^3
Oktan Sayısı [(A+M)/2]*	96- 113	85- 96
Özgül Enerji (AID/HY*	3.000 kJ/kg	2.920/kg

* A: Araştırma oktan sayısı,
* M: Motor oktan sayısı.
* AID: Alt ısıl değeri, HY: Hava/yakıt oranı

Benzindeki yakıt enerjisinin %66'sı biyoetanolün sahip olduğu enerjinin tamamını oluşturmaktadır. Ayrıca %35'i oksijen içerikli biyoyakıt olan biyoetanolün oluşturduğu NOx emisyonunun benzinden düşük olarak tespit edilmiştir (Balat ve ark., 2009). Biyoetanolün içeriğindeki oksijen benzinden daha fazladır bu sebeple daha

kolay yanabilmektedir. Bu durum oluşan zararlı gazların oluşumunu azaltmaktadır (IEA, 2004). Niven (2004) yaptığı çalışmada E10 tipi yakıtın biyoetanol elde edilme süreci de dahil benzinle kıyaslama yapıldığında CO_2 emisyonunda %1-%5 arası azalma, E85 tipi yakıt karışımlarında ise %19- %70 arası azalma olduğunu belirlemiştir.

ABD'nin Ohio Eyaleti'nde yapılan bir çalışmaya göre 10 adet Esnek Yakıtlı Taşıt ve 3 adet benzinli araçlarda toplanan veriler değerlendirilmiştir. Yüksek oranda biyoetanol içerikli yakıtların tüketimi elde edilme süreçleri de dahil edildiğinde net emisyonları %40 oranına kadar düşürebildiği tespit edilmiştir (IEA, 2004). Esnek taşıtlı yakıt ile benzinli araç emisyon değeri karşılaştırması Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Esnek taşıtlı yakıt ile benzinli araç emisyon değeri karşılaştırması (IEA, 2004)

Emisyonlar	**Esnek Yakıtlı Taşıt**		**Benzinli Araç**
	E85 ile	**Benzin ile**	
NMHC	0.09	0.06	0.07
THC	0.12	0.07	0.08
CO	0.81	0.62	0.87
NO_x	0.06	0.05	0.14
Sera Gazları			
CO_2	242	255	252
Metan	0.03	0.01	0.01
Aldehitler			
Formaldehit	1.4×10^{-3}	0.6×10^{-3}	0.8×10^{-3}
Asetaldehit	8.1×10^{-3}	0.2×10^{-3}	0.2×10^{-3}
Yakıt Ekonomisi			
L/100 km	14.9	11.1	11

2.1. Şeker İçerikli Kaynaklardan Biyoetanol Üretimi

Basit formdaki şeker içerikli hammaddelerden biyoetanol eldesinde ilk işlem hammaddenin şeker içeriğinin belirlenmesi için ezme, ıslatma ve kimyasal işlem gibi işlemlere maruz bırakılır. Ortaya çıkarılan şeker maya veya bakteri yardımıyla fermantasyona uğratılır. Kullanılan en temel maya türü *Saccharomyces cerevisiae* dir. Son işlem olarak fermantasyon çözeltisi damıtıldıktan sonra dehidrasyon işlemi uygulanmaktadır. Dehidrasyon, susuzlaştırılması işlemidir (Balat, 2011).

Şeker pancarı, şeker kamışı vb. şeker içeriği fazla olan ürünler kullanılmaktadır. Atık ürün olarak değerlendirilen melas ise %45 ile %50 arasında fermantasyonda kullanılabilecek formda şeker içerir (Prasad ve ark., 2007). Şeker kamışını biyoetanol eldesinde en fazla kullanan ülkelerin başında Brezilya gelmektedir. Avrupa ülkeleri biyoetanol eldesinde sükroz içerikli hammaddeleri tercih etmektedir ve bu sebeple kullanılan hammaddelerin başında şeker pancarı melası gelmektedir (Balat, 2011).

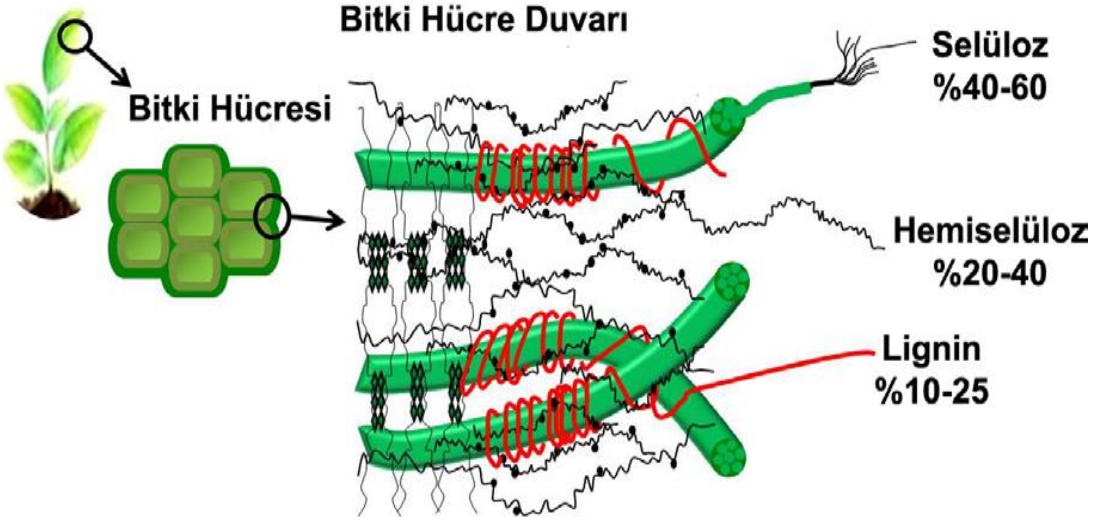
2.2. Nişasta İçerikli Kaynaklardan Biyoetanol Üretimi

Mısır, buğday, arpa ve benzeri nişasta içerikli hammaddeler bu gruptaki hammaddelerin en yaygın kullanılan türleridir (Meral ve Saydan Kanberoğlu, 2012). Nişastadan biyoetanol eldesinde ilk olarak nişasta mikroorganizmaların parçalayabileceği basit şeker formlarına dönüştürülmelidir. Bu parçalanma işlemi kolay bir işlemdir. Yapıdaki bağlar sıcaklık, enzim veya asit çözeltisiyle parçalanabilir. Nişasta bağlarının ön işlemle parçalanmasının ardından jelatinizasyon sağlanmış olur. Jelatinize nişasta α-amilaz enzimi sayesinde hidrolize olmaktadır.

Nişasta içerikli hammaddelerin biyoetanole dönüşümünde maliyeti belirleyen esas unsur kullanılan enzimlerdir. Bir diğer unsur ise ürün verimliliğini arttırmak için uygulanan yüksek sıcaklık (413-453^{o}K) sebebiyle enerji ihtiyacıdır (Aggarwal ve ark., 2001).

2.3. Lignoselülozik Kaynaklardan Biyoetanol Üretimi

Lignoselülozik hammaddeler yiyecek amaçlı kullanılmayan, orman artıkları, tarımsal atıklar, kentsel katı atıklar ve bitkiler gibi selüloz içerikli hammaddelerdir (Sluiter ve ark., 2010). Selülozik hammaddeler, bol miktarda, kolay ulaşılabilir ve ucuz temini sebebiyle biyoetanol eldesinde avantajlı konumdadır (Lynd, 1989). Lignoselülozik hammadde, lignin, hemiselüloz ve selülozdan oluşmaktadır (Hellen Sathya ve ark., 2017). Lignin, selüloz ve hemiselüloza erişim için bir engeldir (Hoşgün ve Bozan, 2020). Lignoselülozik bir hammaddenin bileşenleri Şekil 2.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Bitki hücre duvarı bileşenleri (Ratanakhanokchai ve ark., 2010).

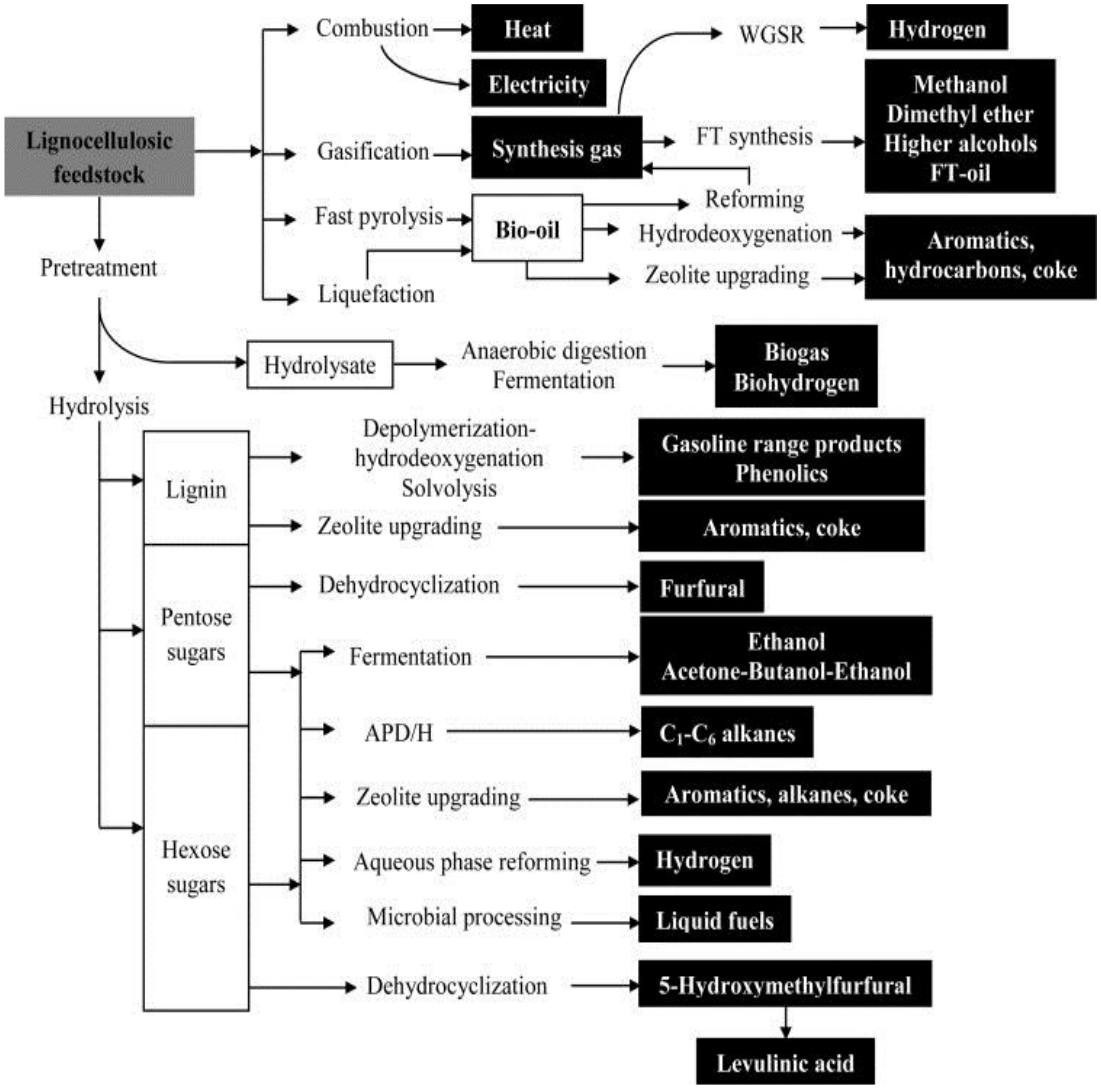
Yumuşak yapılı ve sert yapılı bitkilerde lignin yüzdesi %20 ile %40 arasında değişir. Küspe, mısır koçanı ve benzeri otsu bitkiler %10 ile %40 aralığında lignin içeriklidir (Yaman, 2004). Lignin, lignoselülozik hammaddenin yapısını dirençli hale getirdiğinden biyoetanol eldesini de zorlaştıran etmenlerden biridir (Taherzadeh ve Karimi, 2008). Lignoselülozik hammadde içerikleri Çizelge 2.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Lignoselülozik hammadde içerikleri (Sun ve Cheng, 2002)

Lignoselülozik materyaller	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Odunsular	40–55	24–40	18–25
Yumuşak ağaçlar	45–50	25–35	25–35
Fındık kabuğu	25–30	25–30	30–40
Mısır koçanı	45	35	15
Çim/çimen	25–40	35–50	10–30
Kağıt	85–99	0	0–15
Buğday samanı	30	50	15
Ayrılmış artıklar	60	20	20
Yapraklar	15–20	80–85	0
Pamuk kalıntıları	80–95	5–20	0
Gazete	40–55	25–40	18–30
Kağıt üretiminden arda kalan atık kağıtlar	60–70	10–20	5–10
Atık su içindeki kalıntılar	8–15	NA	24–29
Kerestecilik artıkları	6	28	NA
Bermuda çimeni	25	35.7	6.4
Dallı darı	45	31.4	12
Sert yapılı ağaç	45± 2	30± 5	20± 4
Sert yapılı ağaç kabuğu	22-40	20-38	30-55

Lignoselülozik hammaddeler iki aşamada biyoetanole dönüştürülür. İlk adım, lignoselülozik hammaddeye uygulanan ön işlemden sonra selülozun hidrolizle

fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesidir. İkinci adım, bu indirgeyici şekerlerin etanole fermantasyonudur. Ligninin uzaklaştırılması ve hammaddenin gözenekliliğinin arttırılması enzimatik hidrolizi de önemli ölçüde iyileştirebilir (McMillan, 1997). Lignoselülozik bir hammaddenin biyoetanole dönüşümü Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Lignoselülozik biyorafineri akış şeması (Maity, 2015)

Lignoselülozik hammaddelerin kompleks yapısını parçalayacak, hidroliz ve fermantasyon için selüloz liflerini serbest bırakacak bir ön işlem gereklidir (Tsegaye ve ark., 2019). Lignoselülozik malzemelerden biyoetanol üretmek için fiziksel, kimyasal, biyolojik ön işlem veya iki ya da daha fazla ön işlemin kombinasyonu kullanılabilir (Malik ve ark., 2020). Ancak kötü reaksiyon koşulları ve inhibitör

oluşum olasılığının ortadan kaldırılması ön işlemlerde yüksek maliyetlere yol açabilmektedir. Bu nedenle minimum miktarda enerji ve kimyasal kullanmak, proses sırasında bozunma ürünleri ve toksik maddelerin oluşumunu önlemek, ön işlem maliyetlerini azaltacaktır (Ethaib ve ark., 2020a). Ön işlem aşamasından sonra enzim veya kimyasal madde (asit) yardımıyla hidroliz işlemi gerçekleştirilir. Böylece basit formdaki şeker çözeltisi elde edilir (Kaparaju ve ark., 2009). Lignoselülozik hammaddenin hidroliz yoluyla monomerik şekere dönüştürülmesi şu anda biyoetanol üretiminde en zorlu aşamadır (Ethaib ve ark., 2020b). Ardından fermantasyon işlemi uygulanır. Fermantasyonda optimum sıcaklık 20°C ile 30°C arasındadır. Fermantasyon işleminde monomer şeker türleri maya yardımıyla etanol ve karbondioksite parçalanır (Demirbaş, 2008).

2.4. Biyoetanol Üretim Aşamaları

Biyokütleden biyoetanol üretimi sırayla şu işlem adımlarını içerir; ön işlem, hidroliz, fermantasyon (Carrillo-Nieves ve ark., 2020). İlk olarak fiziksel ön işlem uygulanır. Mekanik parçalama (öğütme) işlemi lignoselülozik biyokütlenin boyutunu ve selülozun kristalliğini azaltmak için uygulanmaktadır (Palmowski ve Muller, 1999). Parçalama ve öğütme işlemlerinin ardından hammadde büyüklüğü 0,2-2 mm aralığında olmaktadır (Cadoche ve Lopez, 1989). Nişasta veya sükroz içerikli bitkisel ürünler hammaddelerin biyoetanole dönüşümünde fiziksel ön işlemler yeterli olabilmektedir.

Lignoselülozik hammaddeler kullanıldığında ise fiziksel yöntemlere ilave olarak alkali ön işlem, asit ön işlem, ultrasonik ön işlem, sıcak su ön işlemi, mikrodalga ön işlemi gibi çeşitli ön işlemlerin tekli veya birlikte uygulanması gereklidir (Zheng ve ark., 2009). Minimum miktarda enerji ve kimyasal kullanmak, proses sırasında bozunma ürünleri ve toksik maddelerin oluşumunu önleyerek ön işlem maliyetlerini azaltacaktır (Ethaib ve ark., 2020b). Ön işlemlerin esas amacı hidroliz sonucu üretilen ürünün verimli olmasını sağlamaktır (Conde-Mejía ve ark., 2012). Fermantasyon ve hidroliz işlemleri çoğunlukla ayrı ayrı uygulanmaktadır. Ancak hidroliz ve fermantasyon birlikte de gerçekleştirilebilmektedir (Junchen ve ark., 2012).

2.4.1. Ön işlemler

Ön işlem, selüloz dönüştürme işlemleri ve enzimatik hidrolizin etkili bir şekilde gerçekleşmesi için önemli bir araçtır. Lignoselülozik hammaddeyi yapısal olarak değiştirmek, selülozu indirgen şekere dönüştürecek enzimlerin kolay erişmesi için ön işlem gereklidir. Ön işlemin amacı, ligninin yapısını parçalamak, hemiselülozu çözündürmek ve selülozun kristal yapısını bozmaktır (Taherzadeh ve Niklasson, 2004). Ön işlemler, biyokütle boyutunu küçültmek ve yapısını açmak için uygulanır, ayrıca hemiselülozu suda çözünür şekerlere (ksiloz, L-arabinoz ve diğerleri) hidrolize eder. Çeşitli ön işlem seçenekleri mevcuttur. Bunlar arasında buhar patlaması, seyreltik asit ön işlemi, konsantre asit işlemi, alkali ön işlemi, SO_2 ile ön işlem, hidrojen peroksit ile ön işlem, amonyak lifi patlaması ve organik çözücü ön işlemleri yer alır (Saha, 2003).

2.4.1.1. Mekanik parçalama (öğütme)

Mekanik parçalama (öğütme), işlenmesi zor hammaddelerin parçacık boyutunun küçültülmesini sağlayan bir yöntemdir (Schell ve Harwood, 1994). Biyokütlenin öğütme ile mekanik olarak toz haline getirilmesiyle selülozun kristalliği azaltılmış ince parçacıklar üretir ki bu durumun enzimatik hidrolizi iyileştirdiği görülmüştür. Hidroliz adımından önce, ısı ve kütle transferi sınırlamalarını azaltmak için önce biyokütlenin boyutu küçültülür. Çalışmalar, bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için partikül boyutunun 1-2 mm'ye düşürülmesi gerektiğini göstermiştir (Tillman ve ark., 1990). Ancak, boyut küçültme adımı büyük miktarda enerji tüketir (Hinman, ve ark., 1992).

Öğütme ön işlemleri genellikle yüksek enerji gerektiren teknikler olarak tanımlansa da son zamanlarda potansiyel uygulanabilir mekanik teknikler de geliştirilmiştir. Bu ön işlemde, furfural veya hidroksimetil furfural gibi hidroliz veya fermantasyon inhibitörleri üretilmez. Öğütme gibi çevre dostu ön işlemlerin geliştirilmesi çeşitli çalışmalarla incelenmiştir (Hideno ve ark., 2009; Inoue ve ark., 2008; Millett ve ark., 1979; Teramoto ve ark., 2008).

2.4.1.2. Buhar patlatması

Buhar patlatma ön işlemi lignoselülozik hammaddelerde uygulanan en yaygın ön işlemlerden biridir. Biyokütle yüksek basınçtaki buharla patlatılmasının ardından basınç bir anda düşürülerek hammadde bozunur. Böylece hemiselüloz içeriğinin hidrolizi ve lignin yapısının parçalanma işlemi gerçekleştirilmektedir. Hammaddeye buhar patlatma ön işlemi uygulanmasının temel sebebi hemiselüloz ve selülozun yapısını basit formdaki şekerlere dönüştürmektir (Cara ve ark., 2008).

Buhar ön işlemi, karbonhidratların fermente edilebilir şekerlere dönüşüm oranını etkili bir şekilde artırır (Varga ve ark., 2004). Ayrıca selüloza erişilebilirliği ve enzimatik hidroliz verimini artırır (Fernandez-Bolanos ve ark., 2001). Buhar patlamasından kalan kalıntı selüloz ve lignin içerir. Dezavantajı ise yıkama ve saflaştırma nedeniyle serbest şeker kaybıdır (Dien ve ark., 2004.).

Buhar patlatma prosedürünün optimum koşulları, besleme stoğu tipine göre değişir. Oldukça şiddetli reaksiyon koşulları, hemiselülozların tamamen çıkarılmasına ve selüloz yapısının kısmen çözünmesine neden olabilir. Bununla birlikte, şekerin bozulmasına da neden olabilir. Öte yandan çok ılıman koşullar, fermantasyondan önce daha fazla hidrolize ihtiyaç duyan hemiselüloz türevi şekerler ve hidrolize hala dirençli olan bir selüloz yapısını üretebilir (Esteghlalian ve ark., 2001). Hemiselülozun, buhar patlama ön işlemi sırasında salınan asetik ve diğer asitler tarafından hidrolize edildiği düşünülmektedir. Buhar, ortaya çıkan şekerlerin aşırı seyreltilmesi olmadan selülozu hedef sıcaklığa hızla ısıtmak için etkili bir araç sağlar. Ani basınç boşalması sıcaklığı hızla düşürür ve ön işlem sonunda reaksiyonu azaltır (Mosier ve ark., 2005).

2.4.1.3. Amonyak fiber patlaması (AFEX)

Amonyak fiber patlaması (AFEX) (Dale, 1986), lignoselülozik ultra ve makro yapıda fiziko-kimyasal bir değişikliği gerçekleştiren yeni bir alkalin ön işlem işlemidir. Amonyak fiber patlaması (AFEX), biyoyakıt üretiminde tarımsal materyalin ön işleme tabi tutulması için umut verici bir yöntemdir. Bu işlem sırasında, basıncı

hızla boşaltmadan önce orta basınç (100 ila 400 psi) ve sıcaklık (70 ila 200°C) altında biyokütleye sıvı amonyak eklenir. Ana işlem parametreleri, reaksiyonun sıcaklığı, reaksiyon süresi, amonyak yüklemesi ve su miktarıdır. Bu işlem selülozu dekristalize eder, hemiselülozu hidrolize eder, lignini uzaklaştırır, hücre duvarındaki mikro gözeneklerin boyutunu ve sayısını artırır, böylece enzimatik hidroliz verimini önemli ölçüde artırır (Mosier ve ark., 2005; Gollapalli ve ark., 2002; O'Conner, 1972; Turner ve ark., 1990).

AFEX ile işlenmiş lignoselülozik hammaddelerin yüzey bileşimi, enzimatik hidroliz ve mikrobiyal fermantasyon oranını etkileyen önemli bir faktör olabilir (Dorris ve Gray, 1978). Daha önceki çalışmalar, AFEX ön işleminin, farklı tarımsal kalıntı türleri (Teymouri ve ark., 2005) ve enerji mahsulleri (Murnen ve ark., 2007; Bradshaw ve ark., 2007) üzerinde denendiğinde teorik glikoz verimine yaklaşık bir verim elde edildiğini göstermiştir. Ayrıca, enzimatik sindirilebilirliği işlenmemiş lignoselülozik hammaddeye göre birkaç kat artırmaya yardımcı olduğunu göstermiştir.

2.4.1.4. Sıcak su ön işlemi

Sıcak su ön işleminde lignoselülozik biyokütle yaklaşık 100-230ºC sıcaklıkta kimyasal ilavesi olmadan işlem görmektedir. Genelde 250ºC üstünde ön işlem yapılmamaktadır (Zheng ve ark., 2014). Ayrıca ön işlem esnasında kullanılan suyun buharlaşmasını engellemek için basınca ihtiyaç duyar. Sıcak su ön işleminde buhar patlaması yönteminden farklı olarak ani basınç azaltılmasına ya da genleşmeye gerek yoktur. Burada basınç yalnızca suyun varlığının sürdürülmesi ve buharlaşmasının önlenmesi için önem arz eder (Mood ve ark., 2013). Hammaddeye yüksek basınç altında sıcak suyla işlem yapılır. Zararlı yan ürün oluşumu minimumda tutulur (Tomas-Pejo, 2008).

2.4.1.5. Ultrasonik ön işlem

Ultrasonik ön işlemde hammaddeye ultrasonik ses dalgalarıyla muamele yapılmaktadır. 20 kHz'den daha yüksek bir frekansa sahip bir sese ultrason denir.

Ultrasonik ön işlem, enerjinin lignoselülozik maddelere değişen frekans ve yoğunlukta, ses dalgaları şeklinde uygulandığı etkili bir yöntemdir (Ofori-Boateng ve Lee, 2014).

2.4.1.6. Ozon ön işlemi

Ozonun temel avantajı, güçlü bir oksidan olması ve suda kolayca çözünebilmesidir (Mood ve ark., 2013). Ozon ön işlemi, ozonun reaksiyon hızını artırarak yüksek miktarda lignin giderimine neden olur. Ayrıca toksik maddeler oluşturmaz ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir, bu da ön işlem maliyetini azalttığı için önemli bir avantajdır (Neely, 1984).

2.4.1.7. Alkali ön işlemi

Alkali ön işlem, en yaygın ve ucuz teknolojilerden biri olarak kabul edilir (Yang ve ark., 2019). Alkali ön işleminin ana etkisi, lignoselülozik biyokütlenin delignifikasyonu sonucu kalan karbonhidratların reaktivitesini arttırmasıdır. Bir diğer etkisi ise ksilan ve lignin arasındaki moleküller arası hidrojen bağının bozulmasıdır ve bunun sonucunda lignoselülozik biyokütlenin gözenekliliği artar (Xu ve Cheng, 2011). Bu ön işlemin yaygın kullanılmasının sebebi ise kullanılan kimyasalların hammaddeye yapısal zarar vermeden ligninin giderilebilmesidir (McMillan, 1997). Genellikle sodyum hidroksit (NaOH) uygulanmaktadır. NaOH, kireç veya amonyaktan daha güçlü bir baz olduğundan, uzun ön işlem süreleri ile çok daha düşük sıcaklıklarda en etkili alkali olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2016).

2.4.1.8. Asit ön işlemi

Asit ön işlemi, selüloz biyokütlesini etanole dönüştürmek için kullanılan en eski teknolojidir. Ana adım esas olarak hemiselüloz hidrolizidir. Basit bir ifadeyle asit, uzun hemiselüloz zincirlerinin parçalanmasını ve ardından asidin bozunabileceği şeker monomerlerini katalize eder. Bununla birlikte, hemiselüloz amorf olduğundan, hemiselüloz şekerlerini serbest bırakmak için daha az şiddetli koşullar gereklidir

(Wyman ve ark., 2005). Doğal lignoselülozun seyreltik asit ön işlemi (%0.2 – 3 sülfürik asit, >160ºC) de selülozik biyokütlenin dönüşüm oranını artırmak için kullanılabilir. Asit ön işlemleri, monomerik şekerlerden oluşan bir hidrolizat üretmek için hemiselüloz bileşenlerinin hidrolizi, enzimatik sindirim için selüloza maruz kalma (hemiselülozun ve ligninin bir kısmının uzaklaştırılması) yoluyla işlev görür (Ingram ve ark., 1997). Ancak şekerler fermantasyona geçmeden önce asit nötralize edilmelidir. Asit hidrolizi, oligomerleri ve monosakkaritleri serbest bırakır. Ayrıca asit hidrolizi, asidin selülozun glikoza parçalanmasını katalize ettiği, ardından HMF(Hidroksimetilfurfural) ve diğer bozunma ürünlerini oluşturmak için salınan glikozun parçalandığı homojen bir reaksiyon olarak modellenmiştir. (Mosier ve ark., 2005).

2.4.1.9. Organik çözücü ön işlemi

Organik çözücü ön işlemi, selülozun küçük bir bozunma ile ayrılmasını sağlar. Selüloz, katılar olarak geri kazanılırken lignin ve hemiselülozun çoğu organik çözücü içinde çözülür. Sonuç olarak, lignin ve hemiselülozun uzaklaştırılması, lignin direncinin azalmasına ve selülozun yüzey alanının artmasına neden olarak enzimatik hidroliz ve fermantasyonun biyoetanol verimini arttırır (Koo ve ark., 2011). Geleneksel işlemlerle karşılaştırıldığında hemiselüloz yapısı için verimli bir ön işlem olarak gösterilebilir. Organik solvent ön işleminde yüksek oranda dönüşümü sağlanan hemiselüloz, biyoetanol dışında hidroksimetilfurfural benzeri değerli kimyasal maddelere de dönüştürülebilmektedir (Zhao ve ark., 2009).

2.4.1.10. Islak hava oksidasyonu

Islak hava oksidasyonu (WAO), gaz halindeki bir oksijen kaynağı (genellikle hava) kullanılarak yüksek sıcaklıklarda (125–320ºC) ve basınçlarda (0.5–2 MPa) organiklerin veya oksitlenebilir inorganik bileşenlerin kritik altı oksidasyonunu içerir. Gerekli olan tek termal enerji, gelen ve giden akışlar arasındaki entalpi farkı olduğundan, yakıt gereksinimleri düşüktür. Sermaye maliyeti diğer ön işlem tekniklerinden daha yüksek olmasına rağmen, işletme maliyetleri neredeyse tamamen

havayı sıkıştırmak için kullanılan güç içindir (Mishra ve ark., 1995; McGinnis ve ark., 1983). Islak hava oksidasyonunun, lignoselülozik hammaddeyi çözünmüş hemiselüloza ve minimum inhibitör oluşumu ile katı selüloz açısından zengin bir yapıya ayırmak için etkili bir ön işlem tekniği olduğu rapor edilmiştir. Böylece minimum inhibitör oluşumuyla etanol fermantasyonu için önceden işlem görmüş malzemenin enzimatik hidrolizini kolaylaştırır (Schmidt ve Thomsen, 1998; Klinke ve ark., 2002). Bu ön işlem sırasında selülozun kristal yapısı açılır, hemiselüloz çözünür ve lignin ayrıştırılır. Hemiselüloz deasetilasyonu sonucunda karboksilik asitler oluşur (Bjerre ve ark., 1996).

2.4.2. Enzimatik hidroliz

Enzimatik hidroliz aşamasında, enzim ile lignoselülozik biyokütlenin anaerobik fermantasyona uygun hale getirilmesi esas amaçtır (Zhang ve ark., 2010). Enzimatik hidroliz, lignoselülozik malzemelerden biyoetanol üretiminde ikinci adımdır. Enzimler kullanılarak selüloz ve hemiselüloz polimerlerinin parçalanmasını içerir. Selüloz genellikle sadece glukanları içerirken, hemiselüloz mannan, ksilan, glukan, galaktan ve arabinan gibi çeşitli şekerlerin polimerlerini içerir. Sonuç olarak, selülozun ana hidroliz ürünü glikoz iken, hemiselüloz birkaç pentoz ve heksoz oluşturur (Taherzadeh ve Niklasson, 2004). Bununla birlikte, yüksek lignin içeriği enzim erişilebilirliğini engeller, son ürün inhibisyonuna neden olur ve hidroliz oranını ve verimini azaltır. Lignine ek olarak sellobiyoz ve glikoz da güçlü selülaz inhibitörleri olarak işlev görür (Knauf ve Moniruzzaman, 2004). Ksilanın yapısı selülozdan daha karmaşık olmasına ve tam hidroliz için birkaç farklı özgüllük gerektirmesine rağmen, polisakkarit selüloz gibi yakın paketlenmiş kristal yapılar oluşturmaz ve bu nedenle enzimatik hidrolize ulaşmak daha kolaydır (Saha, 2003). Maksimum selülaz ve β-glukosidaz aktiviteleri 40-60°C'de ve 4.0 ila 5.0 pH'ta gerçekleşir. Bununla birlikte, optimum koşullar hidroliz kalma süresi ile değişebilir. Enzimatik hidroliz, hafif koşullar ve uzun süreler gerektirir. Enzimatik hidrolizin diğer bir sorunu da salınan şekerlerin hidroliz sırasında enzim aktivitelerini engellemesidir (Taherzadeh ve Niklasson, 2004).

Palmarola ve ark. (2004), enzimatik hidroliz yöntemini kullanarak etanol üretmek için buğday nişastası atığını kullanmışlardır. Selülolitik ve hemiselülozik enzimlerin bir karışımıyla (Celluclast 1.5 L ve Ultraflo L) 50 ºC ve 200 rpm çalkalama koşullarında 48 saat uygulama yapılmıştır. Maksimum şeker verimi, teorik verimlerin sırasıyla %66, %71 ve %51'ine karşılık gelen 12.8 g glikoz, 13.9 g ksiloz ve 7.4 g arabinoz içeren 100 g nişastasız lif başına 34.1 g olmuştur.

Schimdt ve ark. (2004), bir biyokütle malzemesinin hemiselüloz bileşeninin seçici hidrolizi için bir yöntemin patentini almıştır. İşlem özellikle mısır, buğday, pirinç, yulaf veya arpadan elde edilen tahıl liflerinde etkilidir. Hemiselülozu asit kullanarak kısmen, hemiselülozu ise enzim kullanarak 40 ila 60ºC sıcaklık aralığında tamamen çözündürmüşlerdir.

Varga ve ark. (2004), ticari olarak temin edilebilen bir enzim solüsyonu (Celluclast 1.5 L ve Novozyme 188) kullanarak 50°C, 300 rpm hidroliz koşullarında ve bir buhar ön işleminden 24 saat sonra selüloz dönüşümünün etkisini incelemiştir. En yüksek toplam şeker verimi, 190 ºC'de 5 dakika süreyle %2 H_2SO_4 ile buhar ön işleminden sonra elde edilen teorik değerin %73'üne karşılık gelen, 100 g işlenmemiş malzemeden 56.1 g olmuştur.

2.4.3. Fermantasyon

Lignoselülozik hidrolizatların fermantasyonu, melas ve nişastadan etanol üretim proseslerinden daha zordur. Hidrolizatlar, hammadde kompozisyonunun ve konsantrasyonunun lignoselülozik malzemelerin tipine, kullanılan kimyasala ve ön işlemin çeşidine ve hidroliz sürecine bağlı olarak geniş bir inhibitör bileşikler yelpazesi içerir (Taherzadeh ve Niklasson, 2004). Lignoselülozik hammaddenin etanole dönüştürülmesi temel işlemleri şu şekilde sıralanabilir: ön işlem, hidroliz, fermantasyon ve ürün ayırma/saflaştırma. Selüloz, çeşitli enzimlerle enzimatik olarak veya sülfürik veya diğer asitlerle kimyasal olarak hidroliz yoluyla glikoza parçalanabilir. Hemiselülazlar veya asitler, bileşen şekerlerini serbest bırakmak için hemiselüloz polimerini hidrolize eder. Heksozlar, doğal olarak oluşan birçok

organizma tarafından kolayca etanole fermente edilir, ancak pentozlar yalnızca birkaç doğal suş tarafından ve genellikle nispeten düşük verimlerle etanole fermente edilir (Mosier ve ark., 2005).

Selülozu etanole enzimatik olarak dönüştürmeye yönelik ilk yaklaşım, biyokütlenin yapısının selülaz tarafından işlenmesi için biyokütlenin ön işlemine yönelik ayrı uygulamaları, glikozu serbest bırakmak için önceden işlenmiş biyokütleye selülazın eklenmesini ve etanol veya diğer ürünlere glikoz fermantasyonunu içeriyordu (Wyman ve ark., 2005). Lignoselülozik biyokütlenin fermantasyonu, kaynağa bağlı olarak ya bir mikroorganizma ya da glikoz, ksiloz, arabinoz, galaktoz, mannoz ve fruktoz içeren hemiselülozdan türetilen şeker karışımını fermente edebilen bir mikroorganizma gerektirir (Nichols ve ark., 2001). Geleneksel *S. cerevisiae* ve *Z. mobilis*, glikozu verimli olarak etanole fermente etse de ksiloz ve arabinoz gibi diğer şekerleri etanole fermente edemezler (Saha, 2003). Enzimatik hidroliz ve etanol fermantasyonundaki nispeten benzer işlem koşulları nedeniyle, bu iki adımı eşzamanlı bir sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF) işleminde birlikte gerçekleştirme seçeneği mevcuttur (Kadar ve ark., 2004).

Etanol fermantasyonu üç ana adımla gerçekleştirilebilir: eş zamanlı sakkarifikasyon ve ortak fermantasyon (SSCF), eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SCF) ve ayrı hidroliz ve fermantasyon (SHF) (Peterson, 2006). Etanol, damıtma veya adsorpsiyon ile birleştirilmiş damıtma yoluyla geri kazanılır (Lin ve Tanaka, 2006).

2.4.3.1. Ayrı hidroliz ve fermantasyon (SHF)

Ayrı hidroliz ve fermantasyonda (SHF), önce selüloz enzimatik olarak glikoza ve hemiselüloz pentoza hidrolize edilir ve ardından şekerler etanole fermente edilir. Birincil yararı, her adımı optimum sıcaklık aralığında gerçekleştirme yeteneğidir: enzimatik hidroliz için 45-50°C ve fermantasyon için yaklaşık 30°C. Böyle bir optimizasyonun her sürecin performansını iyileştirmesi beklenir. SHF'nin en büyük dezavantajı, makul etanol verimleri elde etmek için daha yüksek enzim

yüklemelerinde daha düşük katı konsantrasyonlarının kullanılmasını gerektiren hidroliz sırasında salınan şekerlerin selülaz ve β-glukosidaz'ı ciddi şekilde kısıtlamasıdır. Bununla birlikte, düşük katı konsantrasyonları, düşük etanol verimi ile sonuçlanacak, dolayısıyla fermantasyon maliyetini ve etanol geri kazanımını artıracaktır (Philippidis, 1996).

2.4.3.2. Eşzamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon (SSCF)

Eşzamanlı sakkarifikasyon ve ortak fermantasyon şeması, karışık şekerleri etanole dönüştürebilen bir ortak kültürün varlığını içerir. Besleme stoğundaki glikoz seviyesi ksilozdan çok daha yüksek olduğunda, ayrı proseslerin maliyeti yüksek olacağından birlikte fermantasyonun daha verimli bir yaklaşım olabileceği bilinmektedir. En yaygın heksoz ve pentoz fermente eden mayalar arasında, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia stipitis* açık ara en çok kullanılanlardır (Bari ve ark., 2004).

Grootjen ve ark. (1991), heksoz ve pentoz şekerlerinin sıralı kullanımı için seri reaktörlü bir sistem geliştirmiştir. Pentoz şekerleri yalnızca heksoz konsantrasyonu çok düşük olduğunda dönüştürüldüğünden, büyümenin ve glikoz dönüşümünün meydana geldiği bölmenin, diğer bölmelerdeki glikoz konsantrasyonunun ksiloz dönüşümüne izin verecek kadar düşük olmasına izin verecek şekilde tasarlanması gerekiyordu. Bu, substratın iki reaktör ve iki maya ile ardışık kullanımının bir sonucudur; ancak ksilozun yalnızca %20'si dönüştürülmüştür. Wyman ve ark. (2005), uygulanan ön işleme bağlı olarak teorik verimin % 85 ila 95'ini elde eden mısır koçanının eşzamanlı sakkarifikasyon ve ko-fermentasyonu (SSCF) için rekombinant *E. coli* ATCC 55124'ü (KO11) kullandı.

2.4.3.3. Eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF)

Eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (SSF), selüloz ve hemiselülozun şekerlere enzimatik hidrolizini ve aynı kapta fermente edilebilir şekerlerin etanole dönüştürülmesini içerir. SSF tekniği, enzimatik hidrolizin ana zorluğunun üstesinden

gelme, yani enzim yüklemesini ve dolayısıyla üretim maliyetini düşürme, lignoselülozik maddenin etanole dönüştürülmesi için SSF uygulamasını daha uygun maliyetli bir süreç haline getirme imkânı sağlar. Bu tekniğin temel sorunu, selülozun enzimatik hidrolizi için kullanılan optimum sıcaklıklar ile etanol fermantasyonunda kullanılan optimum sıcaklıklar arasındaki farktır (Eklund ve Zacchi, 1995).

Selüloz ve hemiselülozun eşzamanlı sakkarifikasyonu (hidrolizi) ve şekerlerin etanole fermantasyonu, enzimleri inhibe eden hidroliz ürünlerinin birikimini, etanolün varlığından kaynaklanan kontaminasyon riskini ve sermaye ekipmanı yatırımını azaltarak biyokütle dönüşümünün kinetiğini ve ekonomisini geliştirir (Saha, 2003). SSF'nin önemli bir dezavantajı, reaksiyonun enzim optimum sıcaklığı olan 45-50 °C yerine 30 °C civarında uygun bir sıcaklıkta çalışması gerektiğidir (Saha, 2003).

Eklund ve Zacchi (1995), hidroliz için ticari selülazlar (Celluclast 2 L ve Novozyme 188) ve heksozun fermantasyonu için hem *S. cerevisiae* hem de *Z. mobilis* kullanarak söğüt SSF'si için optimum koşullar üzerinde çalışmıştır. Optimum fermantasyon koşulları, 72 saat boyunca 37°C ve pH 5.0 idi. *S. cerevisiae*, 72 saat sonra etanol verimi açısından *Z. mobilis*'ten üstün olmuştur; ancak *Z. mobilis* kullanıldığında daha az yan ürün oluşumu gözlenmiştir. Sonuçlar, ham maddede bulunan glukan bazında teorik etanol veriminin %85'inden fazlasına üç günde ulaşmanın mümkün olduğunu göstermiştir.

Kadar ve ark. (2004) tarafından daha yüksek işleme sıcaklıklarına ve dolayısıyla artan hidroliz oranlarına izin verecek, ısıya dayanıklı maya suşlarının kullanılması düşünülmüştür. Farklı sıcaklık profilleri ile bir SSF ve izotermal olmayan eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyon (NSSF) sürecini incelemişlerdir. Isıya dayanıklı maya (*Kluyveromyces marxianus*) ve sıradan ekmek mayası kullanılarak etanol üretimi de farklı selüloz atık malzemeleri üzerinde araştırıldı. SSF, 96 saat boyunca 40 ºC'de gerçekleştirildi. Sonuçlar, *S. cerevisiae*'nin 40º C'de eşzamanlı sakkarifikasyon ve fermantasyonda *K. marxianus* kadar iyi olduğunu göstermiştir. Son olarak, Wyman ve ark. (2005), mısır koçanının SSF'si için S. cerevisiae ATCC 200062 ile Spezyme CP ve Novozyme 188 kullanmış ve teorik verimin %95'ine varan verim elde etmiştir.

2.5. Farklı Hammaddeler ile Yapılmış Çalışmalar

Literatürde farklı hammaddeler ile ilgili yapılan birçok çalışma bulunmaktadır.

Mısır atıklarına 1/10 katı/sıvı oranı, 200^{o}C de, 5 dakika sıcak su ön işlemi uygulanmıştır. Sonrasında enzim hidrolizi (β-glukosidaz) ve *E. coli* bakterisiyle uygulanan fermantasyonun ardından (pH 5.5, 37^{o}C, 74 saat) 1 g mısır atığından 0.27 g etanol elde edildiği belirlenmiştir (Saha ve ark., 2013).

Pye (2005) yaptığı çalışmada organik solvent ön işleminin asit katalizli hidrolize kıyasla selüloz hidrolizinin verimlerini ve dönüşüm oranlarını artırdığını göstermiştir. Ek olarak Kim ve Pan (2010), tarafından yapılan çalışmada hafif ön işlem sıcaklığı ve basıncı ve nötr bir pH koşulu, karbonhidratın istenmeyen furfural ve HMF'ye dönüşümünü azalttığı belirlenmiştir.

Dallı darı ile yapılan bir çalışmada hammaddeye 140^{o}C de 60 dakika boyunca sülfürik asit ön işlemi uygulanmıştır. % 0,0785'lik sülfürik asit çözeltisinin hemiselülozu tamamen giderdiği görülmüştür (Esteghlalian ve ark., 1997).

Tan ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, kolza tohumu atıklarına seyreltik asit ön işlemi (%1 H_2SO_4, 160^{o}C, 10 dakika) uygulanmıştır. Ardından hidroliz ve fermantasyon işleminin birlikte uygulanmasıyla %72.4 etanol verimi ve 53.1 g/L etanol elde edilmiştir.

Mısır koçanlarıyla yapılan bir çalışmada hammaddeye öncelikle %4 NaOH çözeltisiyle 80^{o}C de 120 dakika, sonrasında %2 H_2SO_4 çözeltisiyle 45^{o}C de 60 dakika ön işlem uygulanmıştır. Ardından enzimatik hidroliz (48^{o}C 150 rpm) işlemi gerçekleştirilmiştir. Maya zenginleştirmek için 0.5 g/L maya ekstraktı ve 1 g/L KH_2PO_4 kullanmışlardır. İşlemler sonucunda maksimum 69 g/L biyoetanol üretilmiştir (Schell ve ark., 2016).

Guerrero ve ark. (2018), muz atıklarından yaptıkları çalışmada asit katalizli buhar patlatma ön işlemi ile kök kısmına 177°C, 5 dakika, %2.2 H_2SO_4 (v/v), sap

kısmına ise 198°C, 5 dakika, %1.5 H_2SO_4(v/v) olarak uygulamıştır. Farklı enzim oranları (7.5-15-22.5) ve farklı katı yükleme oranlarında (%10-15-20) uygulanan enzimatik hidroliz işlemi sonrası *Saccharomyces cerevisiae* ile fermantasyon işlemi yapılmıştır. Muz bitkisinin sapından 103 L etanol, kök kısmından ise 112 L etanol elde edilmiştir.

Göycincik ve Yücel (2015), defne yaprağı atığına enzimatik hidroliz işlemi (katı/sıvı oranı 1/20, pH 4.8, 75 IU/g β-glukozidaz, 16 IU/g selülaz enzimleriyle 60ºC, 150 rpm, 48 saat) uygulamıştır. Ardından uygulanan fermantasyon işlemi sonucunda maksimum 4.88 g/L etanol derişimine ulaşılmıştır.

Jin ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, pirinç samanına %1 lik NaOH ön işlemi ve enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Ardından *Saccharomyces tanninophilus* ile uygulanan fermantasyon sonucu etanol eldesinin 9.45 g/L ve etanol veriminin %83.5 olduğu belirtilmiştir.

Corbin ve ark. (2015) üzüm posasının kullanılarak yaptıkları bir çalışmada 0.5 M asit ön işlem ve ardından enzimatik sakkarifikasyonun uygulanmasıyla indirgen şeker oranında % 10'luk bir artış sağlanmıştır. Üzüm posasından elde edilecek biyoetanol miktarı 400 L/ton olarak belirlenmiştir.

Martinez-Patino ve ark. (2018), zeytin ağacı atıklarıyla yaptıkları bir çalışmada farklı asit oranlarında uygulanan ön işlemlerde optimal koşul %15 katı, %0.89 H_2SO_4, 164ºC olarak belirlenmiştir. *Escherichia coli* ile uygulanan fermantasyon sonucu zeytin ağacı biyokütlesinden 14.4 g etanol/ (100 g hammadde) elde edilmiştir ve etanol verimi %88 olarak belirlenmiştir.

Casabar ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, ananas kabuğu atıklarına uygulanan farklı konsantrasyonlarda NaOH (%1-%3-%5) ön işleminin ardından *Trichoderma harzianum* ile enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir ve maksimum indirgen şeker eldesi 279.67 g/L olarak bulunmuştur. Şeker eldesinden sonra uygulanan fermantasyon ile 48 saat sonunda 5.98 g/L etanol elde edilmiştir.

Omar ve Amin (2016) tarafından yapılan bir çalışmada palm yaprağına oda sıcaklığında, ozon gaz akışı 60-120 ml/dk ve farklı ozonlama süresinde (30-90 dk) ön işlem uygulanmıştır. Çalışma sonucunda maksimum lignin giderimi %84.7 ve maksimum şeker verimi %99.9 olarak belirlenmiştir.

Baig ve ark. (2015), buğday samanına yaptıkları çalışmada oda sıcaklığında, %2 ozon konsantrasyonu, ozon gaz akışı 1700 ml/dk ve farklı ozonlama süresinde (0-180 dk) ön işlem uygulanmıştır. Çalışma sonucunda maksimum lignin giderimi %85 olarak belirlenmiştir.

Lavarack ve ark. (2002), ksiloz, arabinoz, glikoz, asitte çözünür lignin ve furfural üretmek için hemiselülozların seyreltik asit hidrolizini inceledi. H_2SO_4 ile hidrolizin yüksek sıcaklıklarda (80-200 ºC) 2 – 60 dakika gerçekleştirilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca H_2SO_4'ün ksilozun bozunması için bir katalizör olarak hidroklorik asitten (HCl) daha verimli olduğunu bulmuşlardır.

Saha ve ark. (2005), pirinç kabuğu selülozu ve hemiselülozun hidrolizi ve monomerik şekerlere dönüştürülmesi için bir proses tanımlamıştır. Çeşitli sıcaklıklarda seyreltik asit H_2SO_4 ön işlemi ve enzimatik sakkarifikasyon kullanmışlardır. Seyreltik asit ön işlemi ardından ticari selülazlar kullanılarak enzimatik sakkarifikasyon yoluyla elde edilen maksimum monomerik şeker verimini, toplam karbonhidrat içeriğine dayalı olarak %60 olarak belirlemişlerdir.

Chung ve ark. (2005), optimum ksiloz verimi için tasarlanmış seyreltik sülfürik asit ön işlemlerini kullanarak iki lignoselülozik hammaddenin, dallı otu ve kavağın selüloz reaktivitesini değerlendirmiştir. Verimler (selülozun yüzde dönüşümü), ön işlem görmüş dallı çimen ve kavak için teorik verimin sırasıyla %90'ı ve %73'ü olarak bulunmuştur.

Saha ve Boast (1999), mısır lifinin fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesi için seyreltik asit ve enzimatik sakkarifikasyon prosedürlerini kullanmışlardır. 121ºC'de 1 saat %0,5 H_2SO_4 ile ön işleme tabi tutulan mısır lifinin, ticari enzimlerin,

genellikle fermentatif mikroorganizmalar için inhibitör olarak kabul edilen furfural ve hidroksimetil furfural (HMF) gibi inhibitörler oluşturmadan kalan nişasta ve hemiselüloz bileşenlerini yüksek oranda hidrolize etmesini kolaylaştırdığını bulmuşlardır.

Buğday samanı ile yapılan bir başka çalışmada ise hammaddeye oda sıcaklığında, %5.3 ozon konsantrasyonu ve farklı ozonlama süresinde (0-60 dk) ön işlem uygulanmıştır. Çalışma sonucunda maksimum lignin giderimi %57 ve maksimum şeker verimi %73.3 olarak elde edilmiştir (Bhattarai ve ark., 2015).

Andersen ve ark. (2019), okaliptüs dallarına oda sıcaklığında, farklı ozon konsantrasyonunda (0.1-0.75 g O_3/g okaliptüs) ve farklı ozonlama süresinde (30-240 dk) ön işlem uygulamışlardır. Çalışma sonucunda maksimum lignin giderimi % 64.21 ve maksimum şeker verimi %68 olarak belirlenmiştir.

Li ve ark. (2015) çalışmalarında mısır koçanlarına oda sıcaklığında, ozon gaz akışı 1000 ml/dk ve 1 saat ozonlama süresinde ön işlem uygulamıştır. Çalışma sonucunda maksimum lignin giderimi %75 ve maksimum şeker verimi %80 olarak elde edilmiştir.

Rosen ve ark. (2019) lignoselülozik atıklarla yaptığı çalışmayı oda sıcaklığında, farklı ozonlama süresi (0-90 dk) ve farklı ozon konsantrasyonunda (0.3-1.2 g O_3/l) yürütmüştür. Ozon ön işlemleri sonucunda elde edilen maksimum lignin giderim oranı %51 olurken elde edilen maksimum şeker verimi %42 olarak hesaplanmıştır.

Şeker kamışı artığına uygulanan ozon ön işlemi oda sıcaklığında, farklı ozon konsantrasyonu (%0.24-%1.3) ve 1 saat ozonlama süresinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre %47 maksimum lignin giderimi ve %71 maksimum şeker verimi hesaplanmıştır (Ortega ve ark., 2020).

Mikulski ve Kłosowski (2020) tarafından yapılan bir çalışmada buğday ve çavdar atıklarına mikrodalga destekli seyreltik asit ön işlemi uygulanmıştır. En yüksek

glikoz eldesi 156 mg/ (g kuru hammadde) olarak belirlenmiştir. Fermantasyon işleminden sonra 20 g/L etanol elde edilmiştir. Ayrıca çok yoğun mikrodalga işleminin maya fermantasyonunu engelleyen şeker dehidrasyon ürünlerinin konsantrasyonunu arttırdığı ve daha düşük etanol verimine yol açtığı tespit edilmiştir.

2.6. Fıstık (Pistacia vera L.)

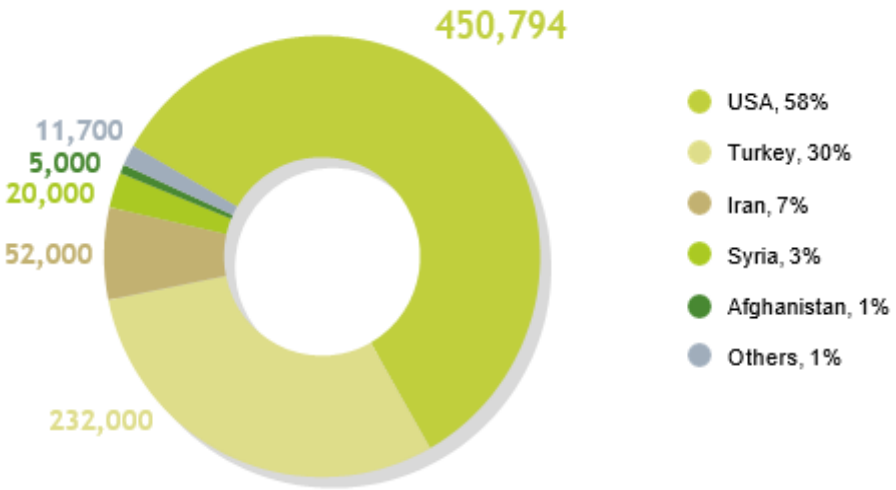
Fıstık, Pistacia cinsinden olup *Pistacia vera* L. olarak adlandırılır ve ticari değeri olan bir üründür. Ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde ciddi ekonomik değere sahip olan bir üründür (DİE, 2004). Fıstık kabuğunun içeriği iklim, coğrafi koşullar, numune hazırlama ve analiz yöntemi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir (Cher ve ark., 2013). Fıstık kabuğu Şekil 2.5.'te gösterilmiştir.



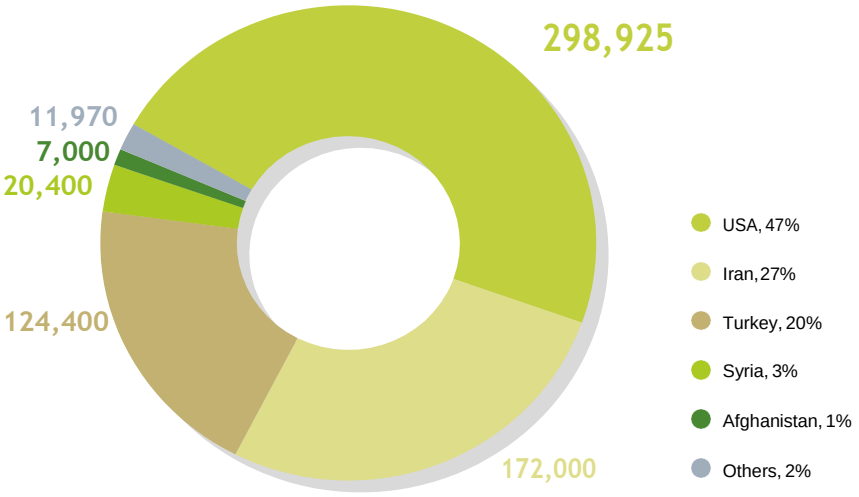
Şekil 2.5. Fıstık kabuğu

2018/2019 sezonunda, dünya fıstık üretiminin önceki sezona göre yaklaşık %31 oranında arttığı belirlenmiştir. 771450 metrik ton (kabuk içi bazında) Dünya mahsulünün %95'i ABD (%58), Türkiye (%30) ve İran (%7) tarafından üretilmiştir

(Şekil 2.6). ABD mahsulünün 2017/18 sezonuna göre %64 yükselerek 450800 metrik ton olmuştur. Türkiye, 2018/19 döneminde 232000 metrik ton ile rekor bir mahsul elde etmiştir. İran mahsulü, olumsuz hava olayları nedeniyle 2018/2019 sezonunda son derece düşük olmuştur, ancak ortalama olarak, son 5 yılda dünya payının %27'sini oluşturmuştur (Şekil 2.7) (INC, 2019).



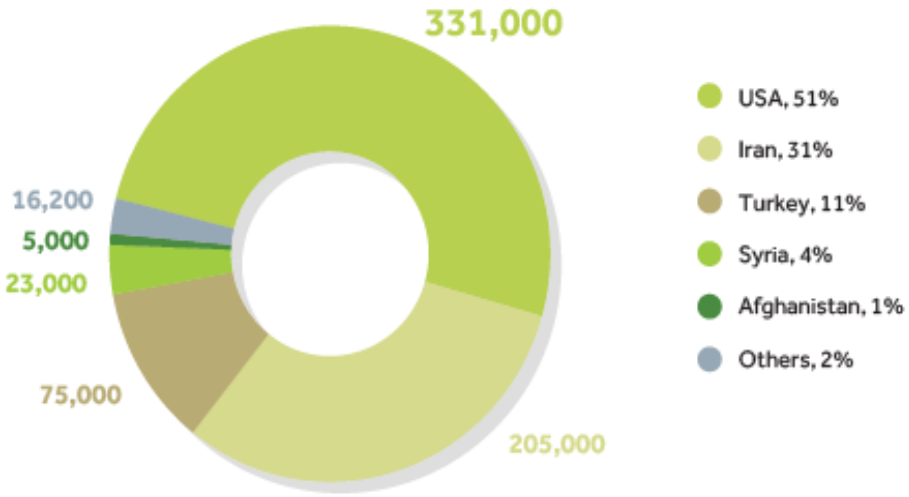
Şekil 2.6. 2018/2019 fıstık üretimi (metrik ton cinsinden) (INC, 2019)



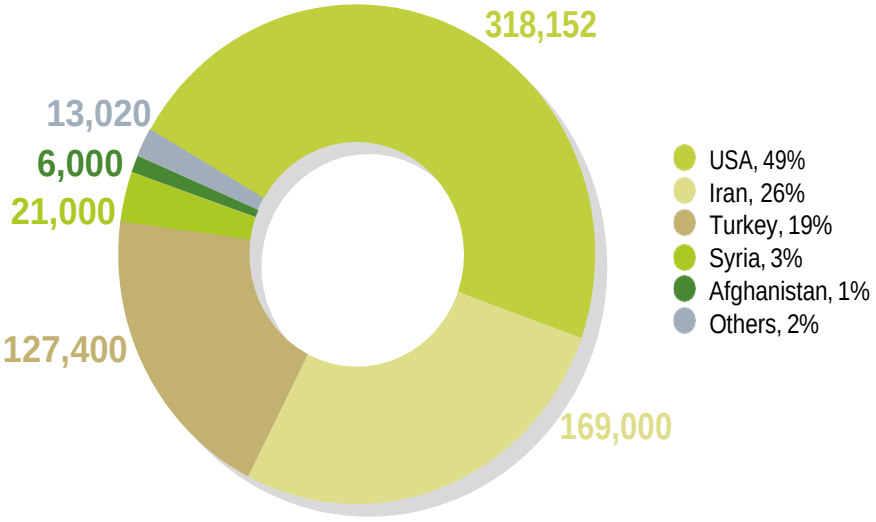
Şekil 2.7. Dünyada beş yıllık (2014-2019) ortalama fıstık üretimi (INC, 2019)

2019/2020 Sezonu ABD ve Türk fıstığı için "kapalı bir yıl" olarak değerlendirirken, İran önceki sezonun kısa mahsulünün üstesinden geldikten sonra verimli bir yıl yaşamıştır (Şekil 2.8). Sonuç olarak, dünya üretimi, önceki yıla göre %15 düşüşle 655.200 metrik tona (kabuk bazında) ulaşmıştır, ancak ağırlıklı olarak

son sezon olan 2017/18 sezonunun %12 üzerinde gerçekleşmiştir (Şekil 2.9). ABD ve İran, dünya payının sırasıyla %51 ve %31'ini alarak küresel üretime öncülük etmiştir ve Türkiye ile birlikte dünya fıstık arzının %93'ünü temsil etmektedirler (International Nut and Dried Fruit Council, 2020).



Şekil 2.8. 2019/2020 fıstık üretimi (metrik ton cinsinden) (INC, 2020)



Şekil 2.9. Dünyada beş yıllık (2015-2020) ortalama fıstık üretimi (INC, 2020)

Türkiye'de yayınlanan son verilere göre 2018 yılında 240000 ton fıstık üretilmiştir ve bu üretimin 100107 tonluk kısmı Şanlıurfa'da gerçekleştirilmiştir. Bu miktar Türkiye'deki fıstık üretiminin %42'sine tekabül etmekte ve Türkiye'de en fazla

fıstık üretiminin yapıldığı şehrin Şanlıurfa olduğunu göstermektedir. Üretim sonucu sadece Şanlıurfa'da 55686 ton atık fıstık kabuğu oluştuğu görülmüştür (FAO, 2018; BEPA, 2018).

Literatürde fıstık kabuğuyla yapılmış biyoetanol çalışmalarına baktığımızda; Subhedar ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada 80^{o}C'de, 1-7 saat uygulama süresinde1.75 N NaOH ile alkali ön işlem uygulanmış olup %38 oranında lignin giderimi ve 8.1 g/L şeker eldesi, 7 saat alkali ön işlem sonrası 1 saat, 80 W güç ve 20 kHz frekansta ultrasonik ön işlem uygulanmış olup %78.8 oranında lignin giderimi ve 18.4 g/L şeker eldesi sağlanmıştır.

Yapılan bu çalışmaya bakıldığında tek alkali oranında ve uzun süreli ön işlem uygulanmıştır. Sonrasında ikili ön işlemde sırasıyla alkali ve ultrasonik ön işlem uygulaması yapıldığı görülmektedir. Bu tez kapsamında alkali ön işleminin daha kısa süreli ve farklı alkali konsantrasyonunda uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmaya benzer sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmayla kıyaslama yapıldığında, çok uzun süreli ön işlem uygulamalarının verimi ciddi oranda arttırmadığı, bunun yanında ikili ön işlem uygulamalarının daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Tez çalışması kapsamında alkali ön işlemlerin dışında ozon ve ozon+sıcak su ön işlemleri gibi kimyasal kullanılmayan ön işlem uygulamaları da yapılmıştır. Farklı ön işlemlerin kullanılarak fıstık kabuklarından biyoetanol eldesindeki etkisi gözlemlenmiştir.

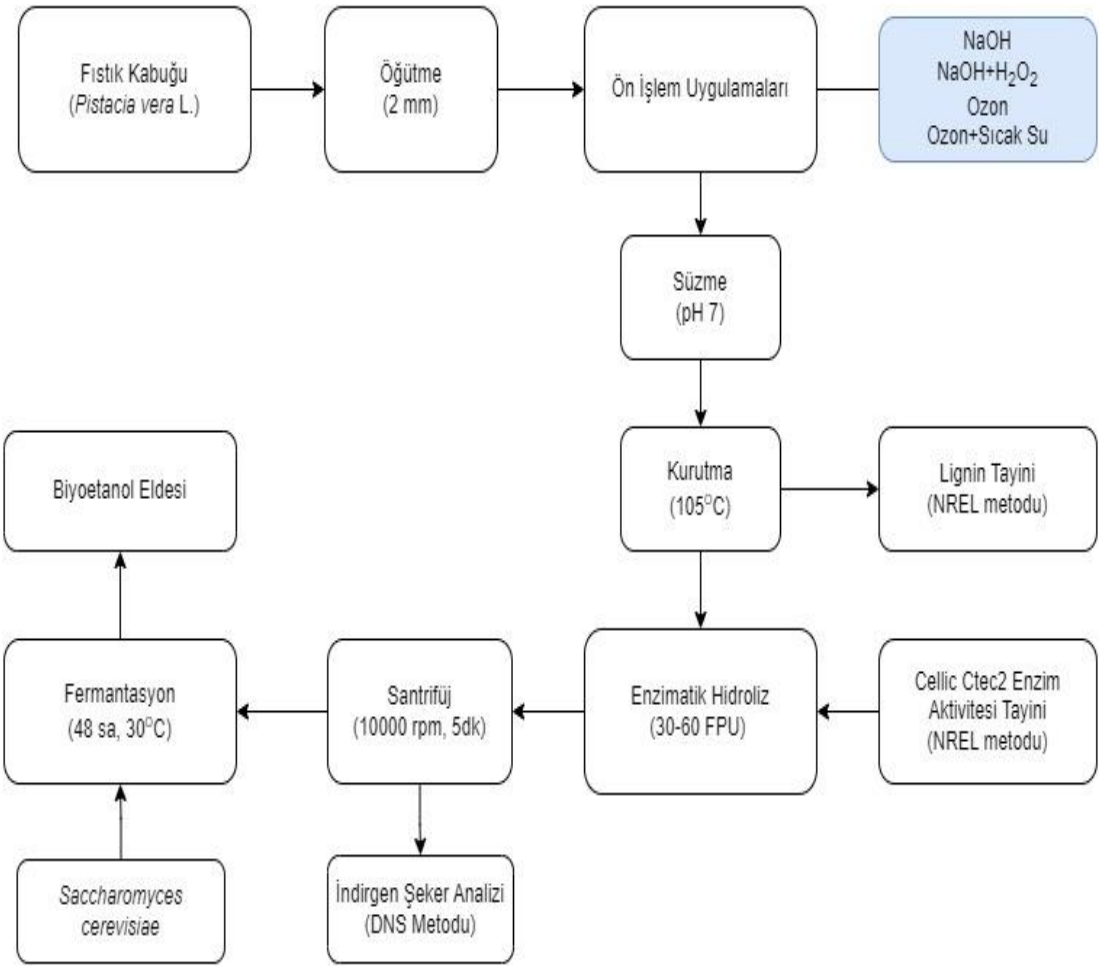
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Şanlıurfa ilinden temin edilen fıstık kabukları kullanılmıştır. Ön işlemler ve analizlerde kullanılan, sülfürik asit(H_2SO_4), sodyum hidroksit (NaOH), hidrojen peroksit, Cellic CTec2 enzimi, 3-5 dinitrosalisilik asit, sodyum metabisülfit, Rochelle tuzları (Na-K tartarat), fenol, Whatman No. 1 filtre kâğıdı, asetik asit, sodyum asetat, glikoz monohidrat, maya ekstraktı, pepton, amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), kalsiyum klorür ($CaCl_2$), potasyum fosfat (KH_2PO_4), magnezyum sülfat tetrahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) Sigma Aldrich'ten, *Saccharomyces cerevisiae* mayası ise marketten temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada kullanılan fıstık kabukları öncelikle öğütme işleminden geçirilmiştir. Ardından fıstık kabuklarına farklı ön işlemler (NaOH, NaOH+H_2O_2, Ozon, Ozon+Sıcak su) uygulanmıştır. Ön işlemler uygulamalarının ardından lignin tayini yapılarak fıstık kabuklarına uygulanan ön işlemlerin etkisi lignin tayiniyle belirlenmiştir. Daha sonra NaOH, Ozon ve Ozon+Sıcak su ön işlemleri uygulanan fıstık kabuklarına Cellic Ctec2 enzimi ile enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrasında santrfüjlemeyle toplanan hidrolizatlardan bir miktar alınarak indirgen şeker tayini yapılmış ve hidroliz sonucu elde edilen indirgen şeker miktarı belirlenmiştir. Daha sonra ozon ve ozon+sıcak su ön işleminin ardından enzimatik hidroliz uygulanmış fıstık kabuklarından santrifüjle toplanan hidrolizatlara fermantasyon uygulanmıştır. Fermantasyon sonucu elde edilen örneklere etanol analizi yapılarak çalışma sonucunda elde edilen etanol miktarı belirlenmiştir. Yapılan işlemlerde elde edilen her örnek iki tekerrürlü olarak analiz edilmiştir. Çok farklı sonuçlar elde edildiğinde analiz tekrarı yapılmıştır. Uygulanan işlemler için akım şeması Şekil 3.1.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Uygulanan işlemler için akım şeması

3.2.1. Öğütme

Uygulanan ön işlemlerin fıstık kabuğunun her noktasına aynı oranda etki etmesini sağlamak ve ön işlem verimini arttırmak için öğütme işlemi uygulanmıştır. Kurutmuş fıstık kabuğu öğütücüde öğütülüp elekten geçirilmiştir.

3.2.2. Hammadde karakterizasyonu

3.2.2.1. Nem miktarının belirlenmesi

Hammaddenin nem içeriğinin belirlenmesi amacıyla 0.5 g fıstık kabuğu Mettler Toledo (Liebestrasse, İsviçre) nem tayin cihazına konulmuştur. 105^{o}C kurutma sıcaklığına programlanan cihazın dijital göstergesinden nem içeriği belirlenmiştir.

3.2.2.2. Kül miktarının belirlenmesi

Kül tayini için NREL (National Renewable Energy Laboratory) yöntemi kullanılmıştır. 2 g kuru fıstık kabuklarının 105°C de kurutulmuş darası alınmış porselen krozelerde tartımı yapılmıştır. Daha sonra bu krozeler 600°C ye getirilmiş kül fırınında 2 saat yakılmıştır. Ardından krozeler desikatörde soğuduktan sonra tartılmıştır. Kül miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Slutier ve ark., 2008a).

$$Kül\ miktarı\ (\%) = \frac{Kül\ ağırlığı\ (g)}{Örnek\ ağırlığı\ (g)} x100 \qquad (3.1)$$

3.2.2.3. Lignin tayini

Lignin tayini için NREL metodu kullanılacaktır. 300 mg(c1) fıstık kabuğu tartıldıktan sonra üzerine 3 ml %72 H_2SO_4 ilave edilmiş ve bir dakika veya numune iyice karışana kadar karıştırılmıştır. Şişeler 30°C ye ayarlanmış inkübatöre konularak 60 dakika inkübe edilmiştir. Şişeler inkübatörden çıkarılmadan her 5 dakikada bir karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler 84 ml saf su ile H_2S0_4 konsantrasyonu %4 oluncaya kadar seyreltildikten sonra 121°C de 60 dakika otoklavlanmıştır. Reaksiyon karışımları, daha önce daraları alınmış gooch krozeleri kullanılarak süzülmüş ve 105°C de minimum 6 saat etüvde kurutulmuştur. Etüvden çıkarıldıktan sonra desikatörde soğutulmuş ve tekrar krozelerin tartımı yapılmıştır(c2). Kurutulmuş örnekler daha sonra 575°C kül fırınında 24 saat yakılmıştır(c3). Lignin miktarı kuru baz üzerinden hesaplanmıştır (Sluiter ve ark., 2008b).

$$\text{Lignin}(\%) = \left(\frac{c2 - c3}{c1}\right) * 100 \qquad (3.2)$$

Lignin giderimi (delignifikasyon) aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir (Sluiter ve ark., 2008b).

$$\text{Lignin giderimi}(\%) = \left(\frac{\text{fıstık kabuğu lignini} - \text{ön işlem görmüş fıstık kabuğu lignini}}{\text{fıstık kabuğu lignini}}\right) * 100 \quad (3.3)$$

3.2.3. Uygulanan ön işlemler

3.2.3.1. NaOH ön işlemi

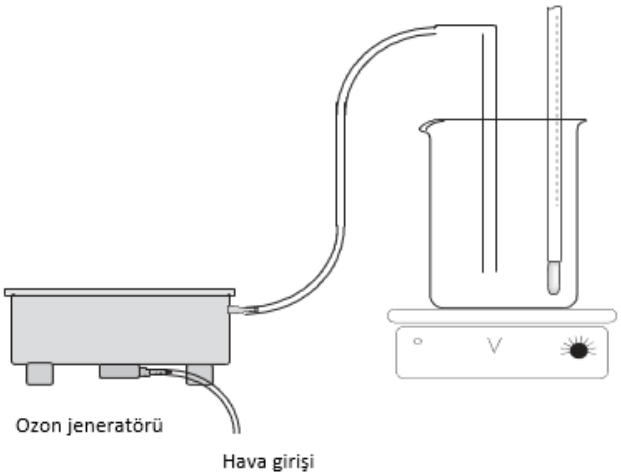
NaOH ön işlem uygulamaları 100 ml'lik cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Fıstık kabuklarına %2, %4, %6 ve %8 NaOH çözeltileri (w/v) uygulanmıştır. İki farklı uygulama süresi (30 ve 60 dakika) ve katı/sıvı (S/L) oranı (w/v) 1/10 olarak belirlenmiştir. Uygulama sıcaklığı 30°C, 45°C ve 60°C olarak seçilmiştir. Bu solüsyonlar işlemin sonunda distile su ile yıkanarak süzülmüştür. Katı faz, lignin analizi için kullanılmak üzere kurutulmuştur.

3.2.3.2. NaOH+ H_2O_2 ön işlemi

NaOH+H_2O_2 ön işlemi 100 ml cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Fıstık kabuklarına %2 NaOH + %2 H_2O_2 ve %2 NaOH + %4 H_2O_2 çözeltileri (w/v) uygulanmıştır. İki farklı uygulama süresi (2 ve 12 saat) ve katı/sıvı (S/L) oranı (w/v) 1/10 olarak belirlenmiştir. Uygulama sıcaklığı 30°C ve 45°C olarak seçilmiştir. Bu solüsyonlar işlemin sonunda distile su ile yıkanarak süzülmüştür. Katı kısım, lignin analizi için kullanılmak üzere kurutulmuştur.

3.2.3.3. Ozon ön işlemi

Öğütülmüş fıstık kabukları havadaki oksijeni kullanarak ozon üreten bir ozon jeneratörü (Ozoneks marka, TR) kullanılarak ön işlemden geçirilmiştir. Oda sıcaklığında, farklı ön işlem sürelerinde (5, 15, 30 ve 60 dakika), 8 mg/dk ozon dozaj konsantrasyonunda ve 1/10 katı/sıvı oranında (S/L) ön işlem uygulaması yapılmıştır. Ön işlem süresi boyunca ozon gazının suyun içinde kabarcıklar oluşturarak kendiliğinden karışım sağlayacağından ekstradan karıştırma ihtiyacı oluşmamıştır. İşlemlerden sonra numuneler pH 7.0 civarına gelene kadar saf suyla yıkanarak süzülmüştür. Katı kısım lignin ve enzimatik hidroliz aşaması için ayrılarak kurutulmuştur.



Şekil 3.2. Ozonlama için kullanılan deney düzeneği

3.2.3.4. Ozon+Sıcak su ön işlemi

Ozon ve sıcak su ön işlemleri sırasıyla bir ozon jeneratörü yardımıyla uygulanan ozon ön işleminin ardından otoklavda uygulanan sıcak su ön işlemiyle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, vidalı borosilikat cam şişede fıstık kabukları, oda sıcaklığında ve 1/10 S/L oranında sırasıyla 5, 15, 30 ve 60 dakika süreyle 8 mg/dk ozon konsantrasyonu ile işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra şişeler kapatılarak 100°C'de otoklavda aynı sırayla 5, 15, 30 ve 60 dakika süreyle sıcak su ön işlemine tabi tutulmuştur. Bu iki farklı kombine ön işlemin sadece ozon ön işlemine kıyasla lignin giderimi, şeker eldesine etkisi ve biyoetanol üretimi üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir. İşlemlerden sonra numuneler pH 7.0 civarına gelene kadar saf suyla yıkanarak süzülmüştür. Katı kısım lignin ve enzimatik hidroliz aşaması için ayrılarak kurutulmuştur.

3.2.4. Enzimatik hidroliz

3.2.4.1. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Selülaz aktivitesinin (NREL/TP-510-42628) ölçümü, selülaz aktivitesini "filtre kağıdı birimleri" (FPU) açısından ölçmek için tasarlanmıştır. 60 dakika içinde 50 mg filtre kağıdından 2 mg indirgeyici şekerin glikoz olarak değeri hesaplanacak şekilde

belirlenmiştir. Cellic CTec2 enzimi Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. DNS reaktifi, 10.6 g dinitrosalisilik asit, 1416 ml saf su, 19.8 g NaOH, 8.3 g sodyum metabisülfit, 306 g Rochelle tuzları (Na-K tartarat) ve 7.6 ml fenol kullanılarak hazırlanmıştır. Ölçüm sırasında enzim tayin tüpleri, kontrol tüpleri ve glikoz standart tüpleri kullanılmıştır. Her test tüpüne 50 mg Whatman No. 1 filtre kâğıdı yerleştirilmiştir. 1 ml pH 4.8 0.05 M sitrat tamponu tüplere ilave edilmiştir ve farklı konsantrasyonlarda 0.5 ml enzim çözeltileri eklenmiştir. Blank tüpüne sadece 1.5 ml sitrat tamponu eklenmiştir. 50°C de inkübatörde 1 saat bekletilmiştir. Filtre kağıdı eklenmemiş blank tüpüne 1.5 ml sitrat tamponu, kontrol tüplerine ise 1 ml sitrat tamponu ve 0.5 ml enzim seyreltme çözeltileri ilave edilmiştir.

Dört farklı glikoz seyreltme çözeltisi hazırlamak için 10 mg/ml glikoz stok çözeltisi ve sitrat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Daha sonra her bir glikoz standart tüpüne 0.5 ml glikoz seyreltme çözeltileri ve 1 ml sitrat tamponu ilave edilmiştir. Blankler, kontroller, glikoz standartları ve enzim tayin tüpleri 50°C de inkübe edilmiştir. 60 dakika sonunda 3 ml DNS reaktifi ilave edilmiştir. Tüm tüpler tam olarak 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra soğuk buz banyosunda soğutulmuştur. UV-Vis Spektrofotometrede absorbans 540 nm ye ayarlanarak ölçüm yapılmıştır. Enzimatik hidroliz ile elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu, bu absorbans değerleri tarafından üretilen kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Ghose, 1987).

3.2.4.2. İndirgen şeker miktarı tayini

İndirgen şeker konsantrasyonunun belirlenmesinde Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi uygulanmıştır. Fıstık kabuklarından indirgeyici şeker elde etmek için Cellic Ctec2 enzimi kullanılmıştır. Enzimatik hidroliz boyunlu cam reaktörlerde (100 ml) gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesi tayininde belirlenen FPU birimine göre enzim miktarları reaktörlere ilave edilmiştir. 0.05 M sitrat tampon çözeltisi ile pH 4.8 olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon karışımının sıcaklığı, orbital çalkalayıcılı inkübatör kullanılarak 50°C ye ayarlanmıştır. Reaksiyon 72 saat sürdürülerek, periyodik olarak numuneler alınmıştır. Numuneler 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda kaynatılmış ve soğuk su banyosunda soğutulmuştur. Numuneler cihaza konulmadan önce filtreden

geçirilmiş ve UV Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunan absorbansa göre şeker miktarı belirlenmiştir (Miller, 1959; Adney ve Baker, 2008; Ghose, 1987).

3.2.5. Fermantasyon

Enzimatik hidrolizin sonunda elde edilen hidrolizatlar süzülmüş ve hidrolize olmamış tortuyu çıkarmak için santrifüjlenmiştir (10000 rpm, 5 dakika). Toplanan sıvı örnekler tüplerde biriktirilmiştir. Mikroorganizma olarak en yaygın kullanılan ve düşük maliyetli olan kültür mayası *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Fermantasyon öncesinde maya çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Mayaların çoğalması için 3 g/L maya ekstraktı, 3.5 g/L pepton, 1 g/L amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), 0.5 g/L kalsiyum klorür ($CaCl_2$), 2 g/L potasyum fosfat (KH_2PO_4), 1 g/L magnezyum sülfat tetrahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) ve bazı iz elementler kullanılmıştır. Fermantasyon işleminde kullanılan çözeltiler ve cam malzemeler 121^oC de otoklavda 15 dakika sterilize edilmiştir. 24 saat 30°C de 100 rpm'de maya zenginleştirme işlemi yapılmıştır. Fermantasyon kesikli olarak 100 ml'lik cam reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatlara %10 (h/h) *S. cerevisiae* eklenerek 48 saat boyunca pH 4.8 de fermantasyon gerçekleştirilmiştir (Arapoglou ve ark., 2010). pH ayarlaması için sitrat tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Etanol konsantrasyonunu belirlemek için HPLC (Agilent 1100, Almanya) kullanılmıştır. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) sisteminde Refractive indeks dedektörü (RID) ve Bio-Rad Aminex HPX-87H (ABD) kolonu (300 mm x 7.8 mm) kullanılmıştır. Kolon 60^oC'de çalıştırılmıştır, mobil faz olarak 0.005 M H_2SO_4 çözeltisi 0.6 ml/dk akış hızında kullanılmıştır. Fermantasyon etkisi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Bhattarai ve ark., 2015):

$$\text{Fermantasyon etkisi } (\%) = \left(\frac{\text{Üretilen Etanol}}{\text{Teorik etanol}}\right) * 100 \qquad (3.4)$$

Teorik etanol, fermantasyon sırasında başlangıçtaki tüm glikozun etanole dönüştürüldüğünü ve bu dönüşümün 0.51 g etanol/g glikoz ile sonuçlandığını

varsayar. Etanolün verimliliği aşağıdaki denklem kullanılarak belirlemiştir (Bhattarai ve ark., 2015):

$$\text{Etanol verimliliği} \quad \left(\frac{\text{g}}{\text{L}*\text{h}}\right) = \left(\frac{\text{Etanol üretimi } (\frac{\text{g}}{\text{L}})}{\text{Süre (h)}}\right) \qquad (3.5)$$

3.2.6. Morfolojik yapı

3.2.6.1. SEM görüntüleri

Ön işlemden geçirilmiş ve ham fıstık kabuklarının yüzey morfolojisi, 20 kV'da çalışan EDX spektrometresi içeren Zeiss Evo 50 sistem taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir.

3.2.6.2. Termogravimetrik analizler (TGA)

Fıstık kabuklarının termal karakterizasyonu DTG-60H Shimadzu kullanılarak belirlenmiştir. Dinamik nitrojen atmosferinde (10 ml/dak) dakikada 10°C artan ısıtma hızı uygulanarak 1000°C sıcaklığa kadar ön işlem görmüş fıstık kabuklarının termal davranışını belirlemek için TGA uygulanmıştır. Sıcaklık nedeniyle oluşan fıstık kabuklarının kütlesindeki değişim termogramların çizilmesini sağlamıştır.

3.2.6.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi

Selülozik malzemelerin kristalliği, hidroliz hızından etkilenen parametrelerden biridir (Fang ve ark., 2014). Bu sebeple NaOH ön işlemi uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının XRD analizi yapılmıştır. X-ışını kırınımları Rigaku Ultima III ile monokromatik CuKα Radyasyonu ile analiz edilmiş ve çalışma koşulları 30 mA ve 40 kV olarak belirlenmiştir. X-ışını desenleri 2θ =5–30^{o}C tarama aralığında kaydedilmiştir (Segal ve ark., 1959).

3.2.6.4. Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi

Kızılötesi spektrumları elde etmek ve fonksiyonel gruplardaki değişiklikleri incelemek için FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Biyokütlelerin spektrumu, 500 ila 4000 cm-1 dalga boyu aralığında bir fourier dönüşüm spektrofotometresi (IRTracer-100, Shimadzu) kullanılarak 2 mg fıstık kabuğu tozu ile 200 mg KBr karıştırılarak elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada öğütme işlemi sonrası 2 mm boyutundan küçük fıstık kabukları, cam kavanozlara ayrılıp saklanmıştır. Fıstık kabuklarının nem içeriği % 7.4, lignin içeriği %32.34, holoselüloz yapısı da %36.92 selüloz ve %20.74 hemiselüloz olarak belirlenmiştir.

4.1. Ön İşlem Uygulamalarının Lignin Giderimine Etkisi

4.1.1. NaOH ön işleminin lignin giderimine etkisi

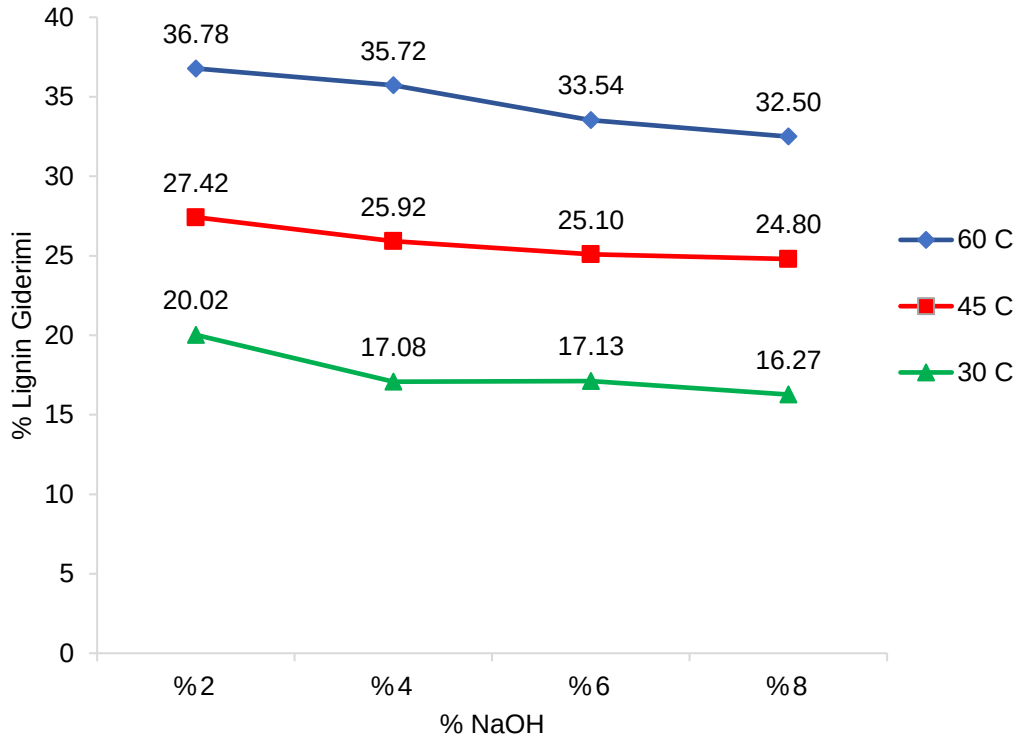
Alkali ön işlemi, %2, %4, %6 ve %8 NaOH çözeltilerinin 1/10 (w/v) katı/sıvı oranında 30-45-60^{o}C sıcaklıklarda ve 30-60 dakikalık işlem sürelerinde uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Fıstık kabuklarına 30^{o}C, 1/10 katı/sıvı oranı, 30 dakika ve farklı NaOH oranlarında alkali ön işlem uygulandığında %20.02 ile %16.27 arasında lignin gideriminin sağlandığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre sıcaklık, uygulama süresi ve katı/sıvı oranı sabit tutulduğunda alkali derişiminin arttırılmasının lignin giderimini arttırmadığı görülmektedir. Bu durum NaOH ön işleminde düşük pH'ta lignin gideriminin daha iyi olduğu sonucunu göstermektedir.

Fıstık kabuklarına uygulanan alkali ön işlemin sıcaklığı 45^{o}C olarak değiştirildiğinde ise % 27.42 ile % 24.79 arasında lignin gideriminin sağlandığı görülmektedir.

Son olarak alkali ön işlemde fıstık kabuklarına 60^{o}C sıcaklık uygulandığında ise % 36.78 ile % 32.49 arasında lignin gideriminin sağlandığı Şekil 4.3.'de görülmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında görüldüğü üzere uygulama süresi ve katı/sıvı oranı sabit tutulan alkali ön işlemde, sıcaklığın arttırılmasının lignin giderimini arttırıcı etki yaptığı görülmüştür.

Fıstık kabuklarına %2 NaOH çözeltisi 1/10 katı/sıvı oranında ve 30 dakika süresince uygulandığında lignin gideriminin %20.02 ile %36.78 arasında, %4 NaOH uygulandığında %17.07 ile %35.72 arasında, %6 NaOH uygulandığında %17.12 ile %33.54 arasında ve %8 NaOH uygulandığında ise %16.27 ile %32.49 arasında değiştiği Şekil 4.1.'de görülmektedir. Bu verilere bakıldığında 30 dakika ön işlem süresinde ve 1/10 katı/sıvı oranında en iyi lignin gideriminin 60^{O}C ve %2 NaOH oranında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. Farklı sıcaklıklarda uygulanan alkali ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisinin karşılaştırılması (30 dk ön işlem süresi)

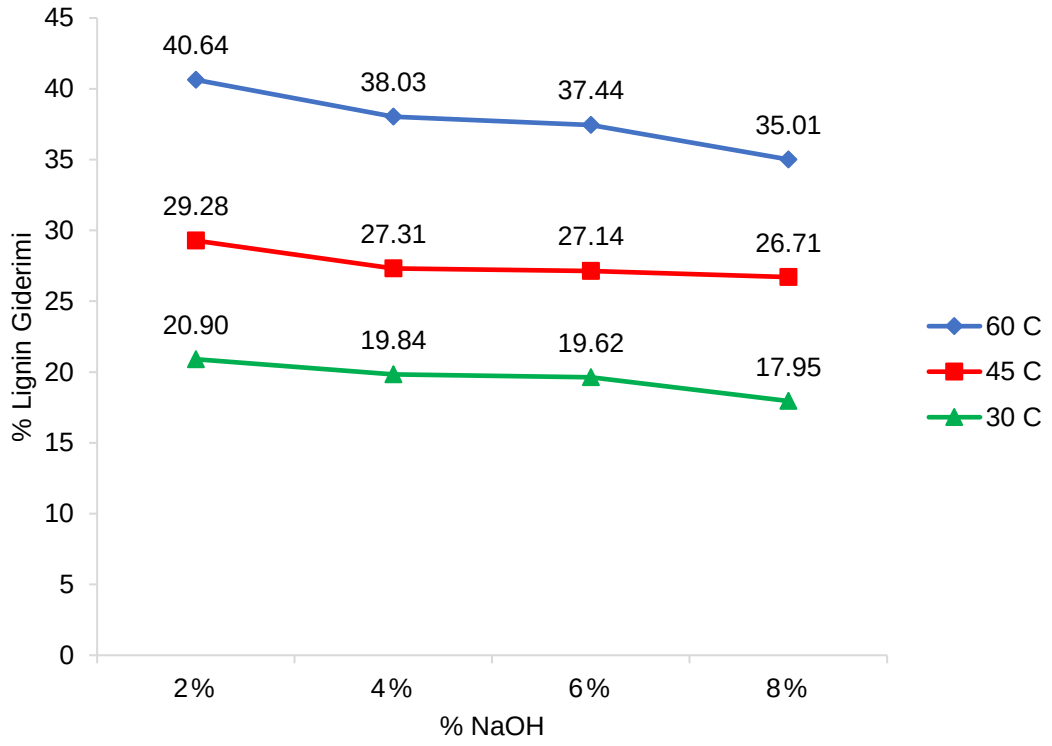
Göncü ve ark. (2021) tarafından fıstık kabuğuyla yapılan çalışmada 30 dakika boyunca ozon ön işlemi uygulanmış ve %29.21 oranında lignin giderimi elde edilmiştir. Bu sonuç aynı sürede uygulanan ön işlem kıyaslamasında %2 NaOH ön işleminin daha etkili olduğunu göstermektedir.

Fıstık kabuklarına uygulanan alkali ön işlem süresi 60 dakika olarak değiştirildiğinde ise 30^{o}C de, 1/10 katı/sıvı oranında ve farklı NaOH oranında lignin giderimi % 20.9 ile % 17.95 arasında değişmiştir. Uygulama süreleri kıyaslandığında

aynı sıcaklıkta ve aynı katı/sıvı oranında uygulanan alkali ön işlemlerde ön işlem süresinin lignin gideriminde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Ön işlem sıcaklığı 45ºC olarak değiştirildiğinde ise lignin giderimi aralığının %29.28 ile % 26.71 arasında değiştiği görülmüştür. Son olarak 60ºC sıcaklık uygulandığında ise lignin giderimi aralığının % 40.64 ile % 35.01 arasında değiştiği görülmüştür. Bu grafiklere bakıldığında da görüldüğü üzere ön işlem sıcaklığının arttırılmasının lignin giderimini arttırdığı sonucu elde edilmiştir.

Fıstık kabuklarına %2 NaOH çözeltisi 1/10 katı/sıvı oranında ve 60 dakika süresince uygulandığında lignin giderimi % 20.9 ile % 40.63 arasında, %4 NaOH uygulandığında 19.83 ile % 38.03 arasında, %6 NaOH uygulandığında %19.62 ile %37.44 arasında ve %8 NaOH uygulandığında %17.95 ile %35.01 arasında değiştiği Şekil 4.2.'de görülmektedir.



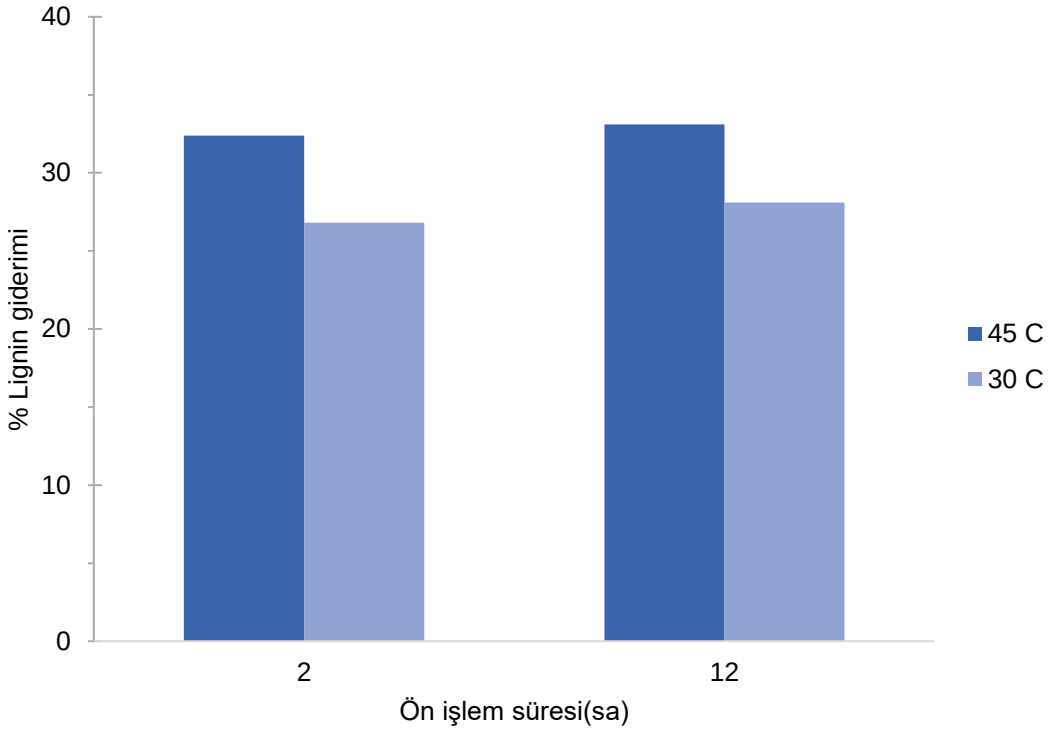
Şekil 4.2. Farklı sıcaklıklarda uygulanan alkali ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisinin karşılaştırılması (60 dk ön işlem süresi)

Yapılan bu çalışmada NaOH ile fıstık kabuklarına uygulanan alkali ön işlemde %2 NaOH, 1/10 S/L oranı, 60ºC ve 60 dakika en yüksek lignin giderimi (%40.64) koşulları olarak belirlenmiştir. Fıstık kabuklarına uygulanan NaOH ön işlem sonuçlarına bakıldığında ön işlem uygulamasındaki sıcaklık artışının lignin giderimini arttırdığı, uygulanan alkali derişiminin yoğunluğunun arttırılmasının ise lignin gideriminde olumlu etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca ön işlemlerde pH etkisinin önemli olduğu ve düşük pH'ta uygulanan ön işlemin lignin giderimini arttığı sonucuna varılmıştır.

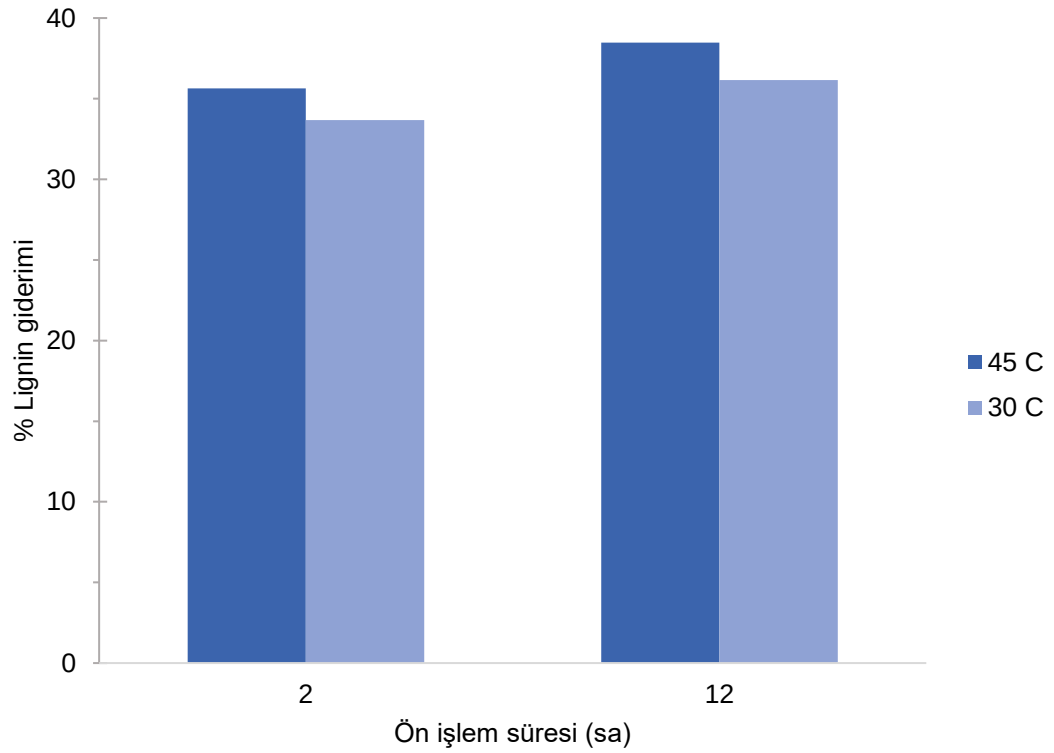
Benzer şekilde Nlewem ve Trash (2010) tarafından yapılan çalışmada alkali ön işlem için %0.5, %2, %5 ve %10 NaOH çözeltisi uygulanmıştır. Maksimum lignin gideriminin % 0.5 NaOH çözeltisi kullanılarak yapılan ön işlem ile elde edildiği bildirilmiştir. Alkali ön işlem uygulanarak yapılan bir başka çalışmada ise Rawat ve ark. (2012), hammaddeye % 0.5, % 1.5, % 2.5, % 3.5 ve %4.5 NaOH çözeltisi uygulamıştır. Maksimum lignin gideriminin % 2.8 NaOH çözeltisi kullanılarak yapılan ön işlem ile elde edildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar yaptığımız çalışmaya benzer şekilde lignin gideriminin alkali konsantrasyonu ile artmadığını göstermektedir.

4.1.2. NaOH+ H_2O_2 ön işleminin lignin giderimine etkisi

%2 NaOH + %2 H_2O_2 çözeltileriyle ön işlem uygulandığında, 1/10 S/L oranı ve 2 saat için lignin giderim miktarı sırasıyla %26.82 ile %32.39 arasında, 12 saat için ise %28.1 ile %33.11 arasında değiştiği Şekil 4.3.'te görülmektedir. %2 NaOH + %4 H_2O_2 çözeltileriyle ön işlem uygulaması yapıldığında ise 1/10 S/L oranı ve 2 saat için lignin giderim miktarı sırasıyla %33.67 ile %35.63 arasında, 12 saat için ise %36.15 ile %38.47 arasında değiştiği Şekil 4.4.'te görülmektedir. Belirtilen koşullarda hidrojen peroksit ve sodyum hidroksitin birlikte uygulandığı ön işlemler kıyaslandığında maksimum lignin giderimi koşulları %2 NaOH + %4 H_2O_2 karışımı 1/10 S/L oranı ve 45ºC'de 12 saat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında ön işlem süresinin arttırılması lignin giderimini arttırmada olumlu etki yapmaktadır. Ayrıca NaOH oranı sabit tutulduğunda H_2O_2 oranının arttırılmasıyla lignin giderimi artmıştır.



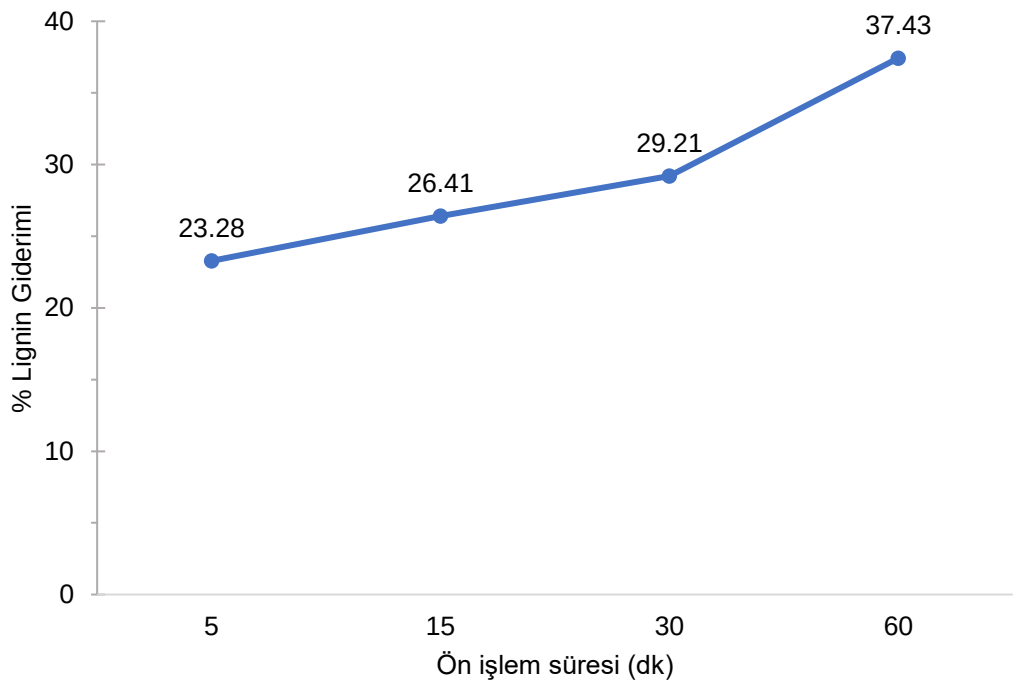
Şekil 4.3. %2 NaOH + %2 H_2O_2 ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi



Şekil 4.4. %2 NaOH + %4 H_2O_2 ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi

4.1.3. Ozon ön işleminin lignin giderimine etkisi

Fıstık kabuklarına oda sıcaklığında, 5 dakika, 8 mg/dk ozon dozaj konsantrasyonunda ve 1/10 katı/sıvı oranında (S/L) ozon ön işlemi uygulandığında %23.28 oranında lignin giderimi sağlandığı, aynı koşullarda ön işlem süresinin 15 dakika olarak uygulanmasıyla lignin gideriminin %26.41 olduğu, ön işlem süresinin arttırılarak 30 dakika boyunca uygulanmasıyla lignin gideriminin %29.21 olarak arttığı ve son olarak 60 dakika boyunca uygulanan ozon ön işlemiyle %37.43'lük lignin giderimi elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bu sonuçlara göre sabit sıcaklıkta ve katı/sıvı oranında ozon ön işlem süresinin arttırılmasının lignin giderimini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca daha uzun süreli ozon uygulamalarının lignin giderimine olumlu etki yapacağı öngörülmektedir.



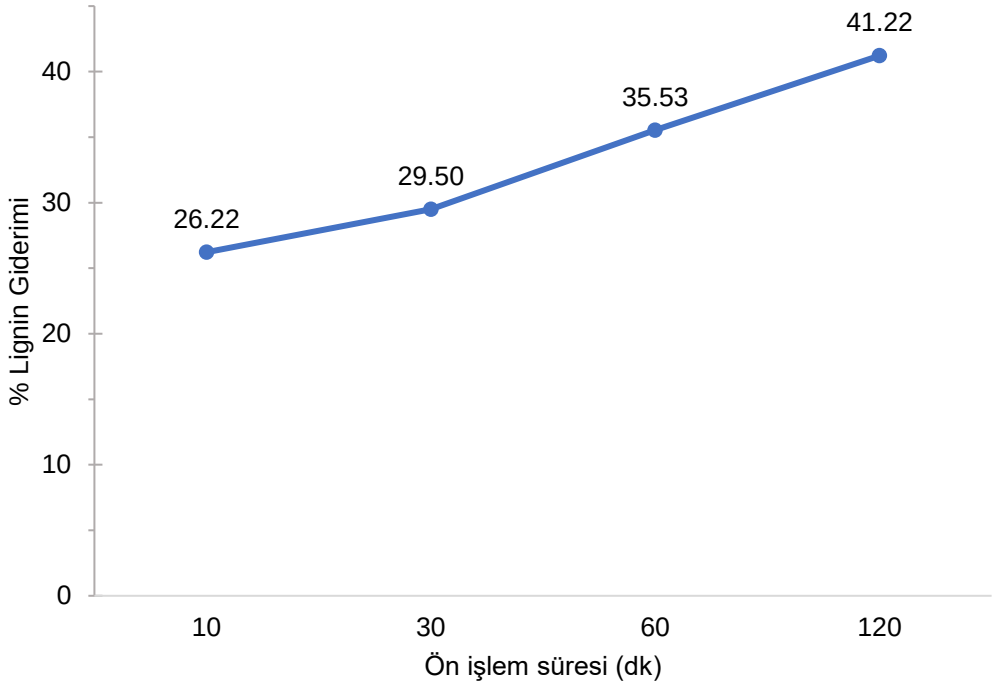
Şekil 4.5. Ozon ön işleminin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi

Garcia-Cubero ve ark. (2010), 150 dakikalık ozonlama süresinde ozon ön işlemini incelemiş ve tahıl samanı için maksimum lignin gideriminin %44 olduğunu bildirmiştir. Ortega ve arkadaşları 60 dakikalık ozonlama süresinde ozon ön işlemini

incelemiş ve şeker kamışı samanı için maksimum lignin gideriminin %47 olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalar, ozon ön işlemi ile lignin gideriminin, hammaddenin lignin içeriğine ve ön işlem süresine bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir.

4.1.4. Ozon+Sıcak su ön işleminin lignin giderimine etkisi

Fıstık kabuklarına uygulanan ozon ön işleminin oda sıcaklığında, 1/10 katı/sıvı oranında, 5 dakika, 8 mg/dk ozon konsantrasyonunda ve sonrasında sıcak su ön işleminin 100°C'de otoklavda, 5 dakika uygulanmasıyla %26.22 oranında lignin giderimi sağlandığı, aynı koşullarda ozon ön işlem süresinin 15 dakika ve sıcak su ön işlem süresinin 15 dakika olarak uygulanmasıyla lignin gideriminin %29.5 olduğu, ön işlem sürelerinin arttırılarak 30 dakika+30 dakika uygulanmasıyla lignin gideriminin %35.53 olarak arttığı ve son olarak 60 dakika+60 dakika boyunca uygulanan ozon+sıcak su ön işlemiyle %41.22'lük lignin giderimi elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Ozon ve sıcak su ön işlemlerinin fıstık kabuklarından lignin giderimine etkisi

Awedem Wobiwo ve ark. (2019), 100°C ile 120°C arasında sıcak su ön arıtımını incelemiş ve muz soğanı için maksimum lignin gideriminin %16 olduğunu bildirmiştir. Xia ve ark. (2020), 130°C ile 170°C arasında sıcak su ön işlemini incelemiş ve kamış için maksimum lignin gideriminin %10 olduğunu bildirmiştir.

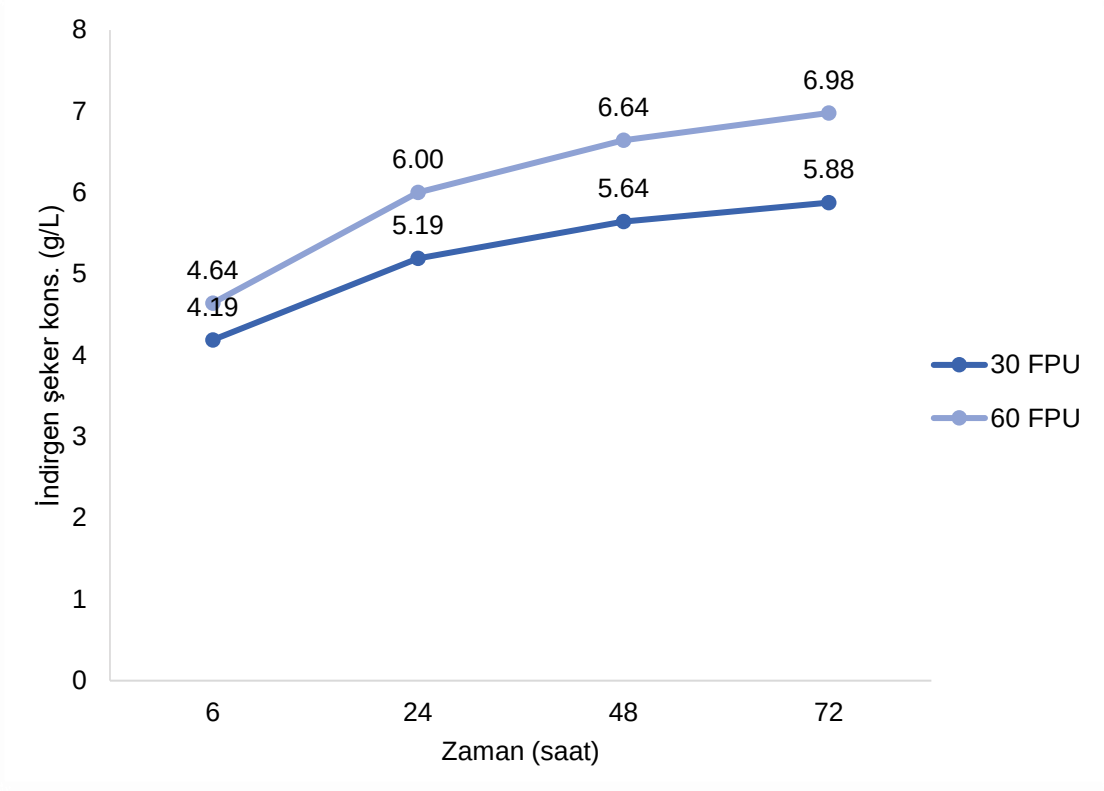
Bu sonuçlara göre ozon ön işlemiyle sıcak su ön işlemi kıyaslandığında, sıcak su ön işleminin lignin giderimini yaklaşık %4 oranında arttırabildiği belirlenmiştir. Bu durum sıcak su ön işleminin tek başına lignin giderimine ciddi oranda etki etmediğini göstermiştir. Ayrıca düşük lignin giderimi artışı sağlamasından dolayı sıcak su ön işlemi uygulamasının ekonomik olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca ozon ön işlemi, sıcak su ön işlemine göre daha iyi lignin giderimi sağlamaktadır.

4.2. Enzimatik Hidroliz

Biyoetanol üretiminde lignoselülozik malzemenin indirgen şekere dönüştürülmesi önemli bir aşamadır. Bu çalışmada fıstık kabuklarının indirgen şekere dönüştürülmesi enzimatik hidroliz ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Cellic Ctec2 enzimi kullanılmıştır. Enzimatik hidroliz uygulanmadan önce enzim aktivitesi tayini yapılmış olup Cellic Ctec2 enziminin enzim aktivitesi 308 FPU/ml olarak ölçülmüştür.

4.2.1. NaOH ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarının enzimatik hidrolizi

Alkali ön işlemde %2 NaOH, 1/10 S/L oranı, 60ºC ve 60 dakikada en yüksek lignin giderimi (%40.64) elde edildiği belirlenmiştir. Bu sebeple en yüksek şeker verimi elde etmek için en iyi lignin giderimi sağlayan çalışma koşullarında fıstık kabuklarına enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Enzimatik hidrolizde 30 ve 60 FPU enzim yüklemesi, %5 (w/v) substrat yüklemesi, 50ºC sıcaklıkta uygulanmıştır. Şekil 4.7.'de enzimatik hidroliz sonucu elde edilen şeker miktarları gösterilmiştir.



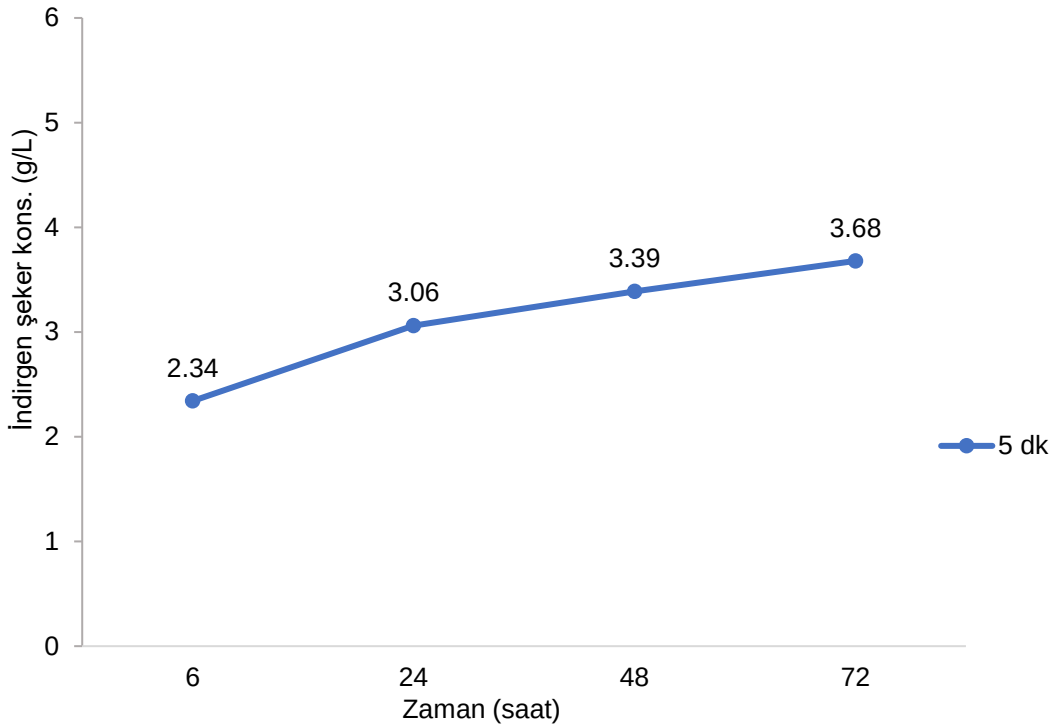
Şekil 4.7. % 2 NaOH, 60 dakika, 1/10 S / L oranı, 60ºC alkali ön işlem enzimatik hidrolizi

30 FPU için 72 saatin sonunda elde edilen indirgen şeker miktarı sırasıyla 4.18 g/L ile 5.87 g/L arasında, 60 FPU için sırasıyla 4.64 g/L ile 6.98 g/L arasında değişmektedir. Sonuç olarak elde edilen maksimum indirgeyici şeker 60 FPU uygulanmasıyla 6.98 g/L olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre uygulanan enzim miktarının artmasıyla elde edilen şeker miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Subhedar ve ark. (2014), fıstık kabuğuna NaOH ile alkali ön işlemi uygulayarak yaptığı çalışmada 8.1 g/L şeker elde etmiştir.

4.2.2. Ozon ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarının enzimatik hidrolizi

Ozon ön işlemi görmüş fıstık kabuklarından indirgen şeker elde etmek amacıyla Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak enzimatik hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlemler için %5 (w/v) substrat yüklemesinde sitrat tamponu kullanılarak 1 g substrat başına 30 FPU ve 60 FPU enzim yüklemesi uygulanmıştır.

Hidroliz işlemi 72 saat boyunca 50ºC'de orbital çalkalayıcı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

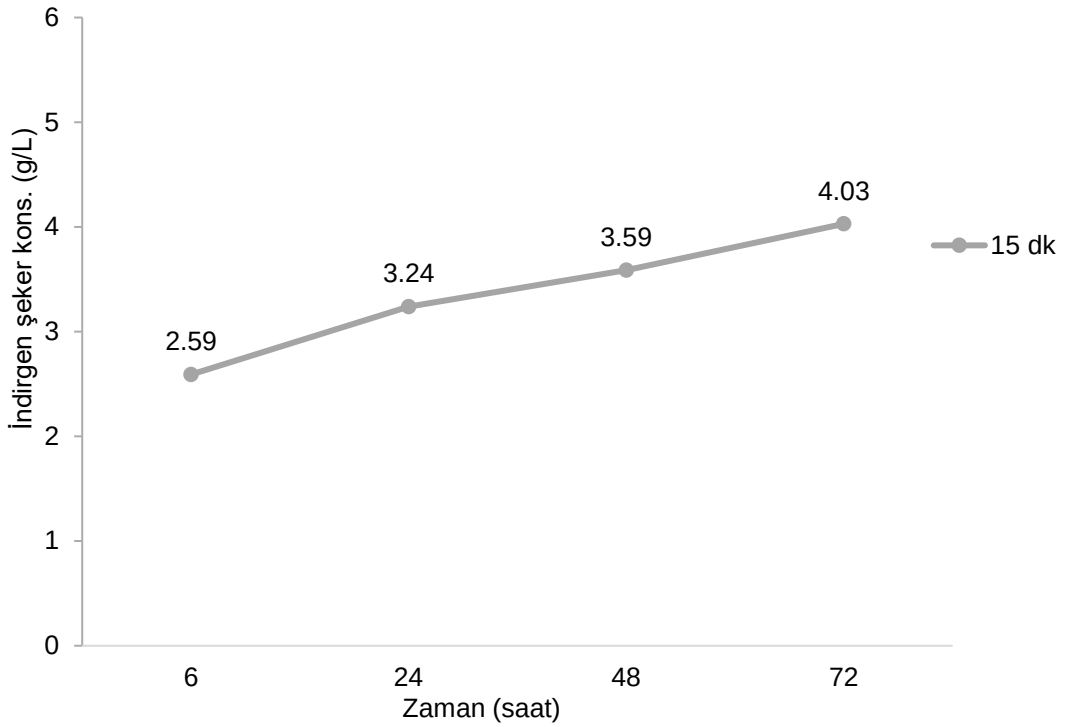


Şekil 4.8. Ozon ön işlemi (5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)

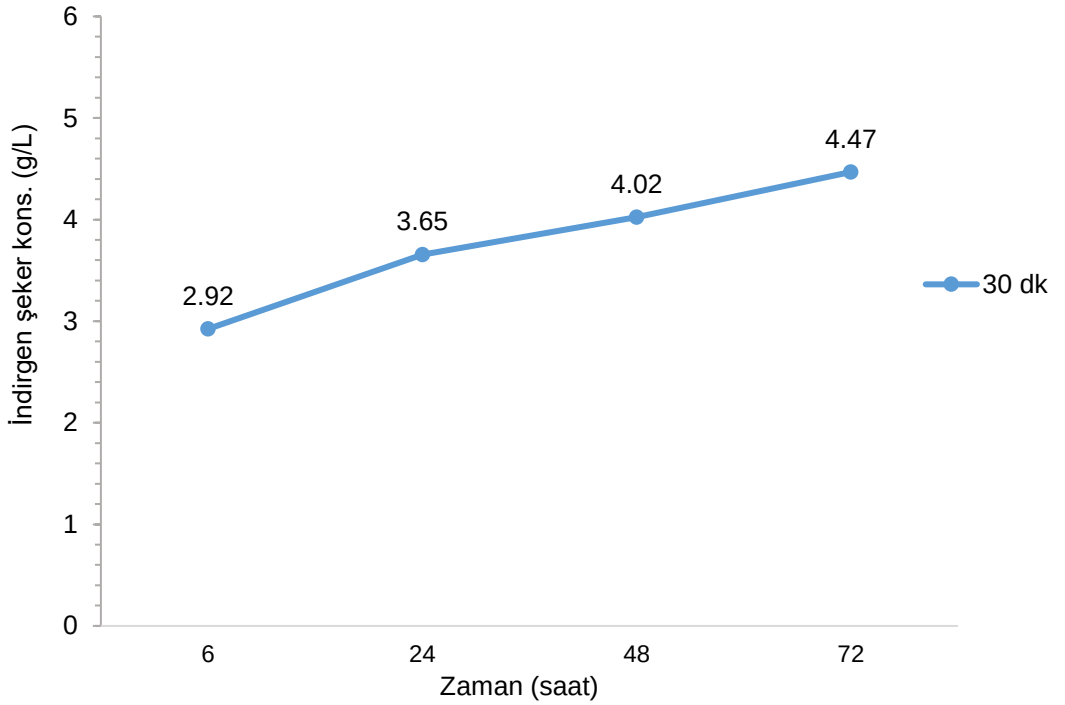
Farklı sürelerde ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarına 30 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarları belirlenmiştir. Buna göre 5 dakika ozon ön işlemi sonrası enzimatik hidrolizle 6 saatin sonunda elde edilen indirgen şeker miktarının 2.34 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 3.68 g/L ye çıktığı Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

Ozon ön işlemi uygulama süresi 15 dakikaya arttırıldığında enzimatik hidroliz hidroliz sonucu elde edilen miktarın 6 saat sonunda 2.59 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 4.03 g/L ye çıktığı Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.

Ozon ön işlemi uygulama süresi 30 dakikaya arttırıldığında ise enzimatik hidroliz sonucu elde edilen miktarın 6 saat sonunda 2.92 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 4.47 g/L ye arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).

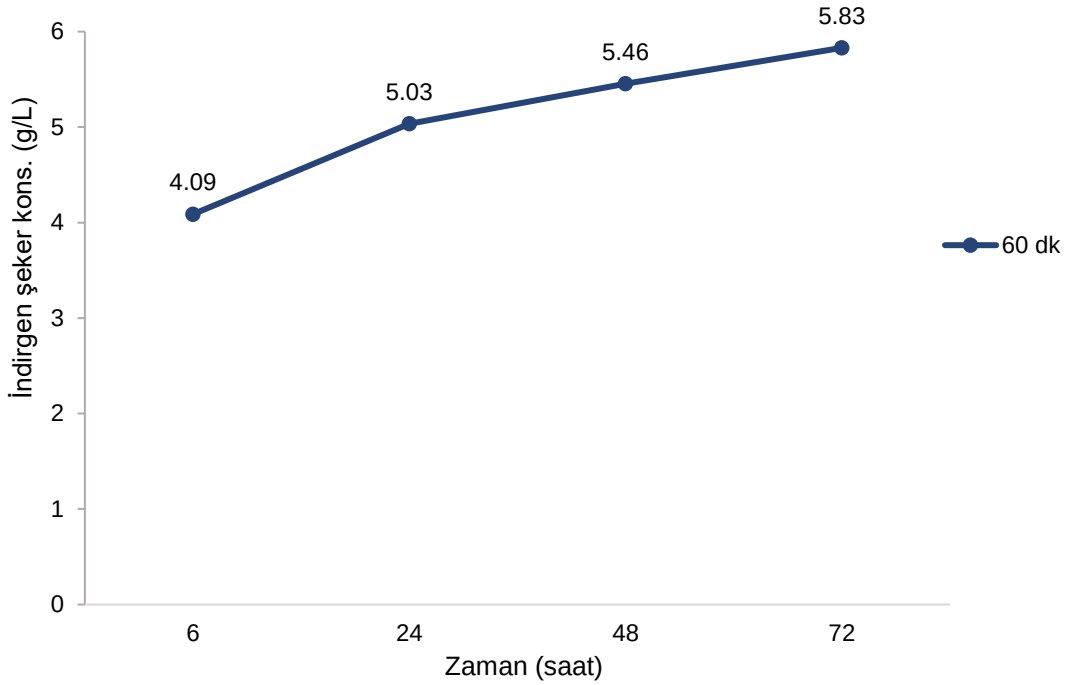


Şekil 4.9. Ozon ön işlemi (15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)



Şekil 4.10. Ozon ön işlemi (30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)

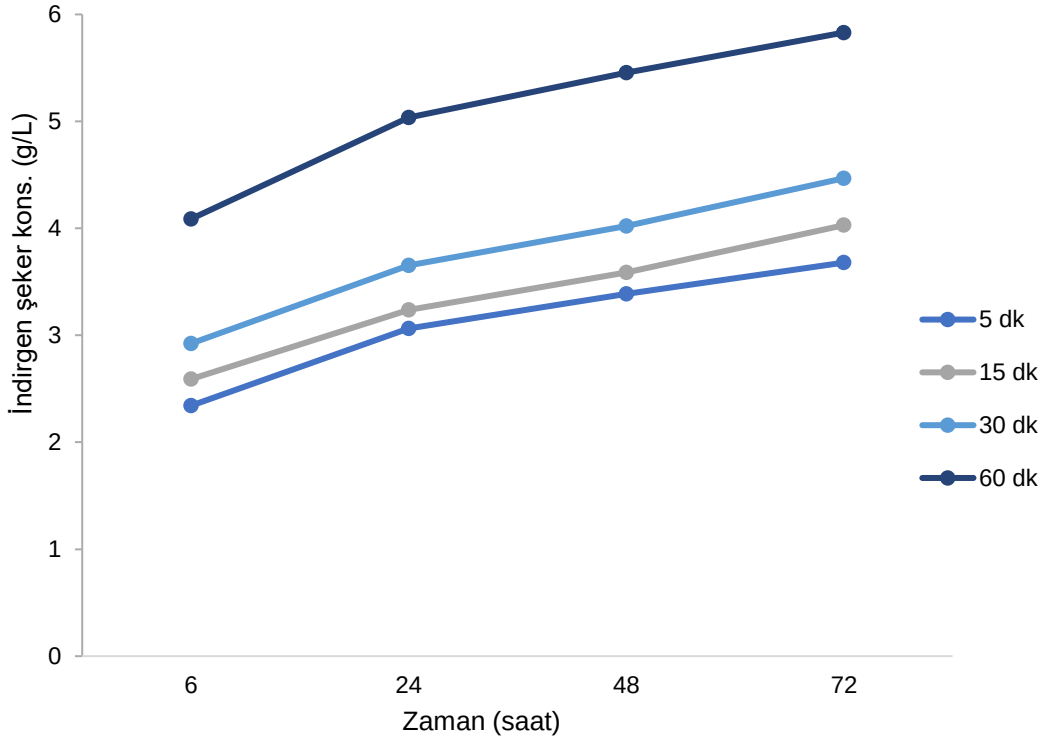
Son olarak ozon ön işlemi 60 dakika uygulamasının ardından enzimatik hidroliz uygulanmasıyla elde edilen miktarın 6 saat sonunda 4.09 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 5.83 g/L ye arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Ozon ön işlemi (60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)

Fıstık kabuklarına 5, 15, 30 ve 60 dakika ozon ön işleminin ardından 30 FPU enzim ile 72 saat boyunca enzimatik hidroliz uygulanmasıyla elde edilen indirgen şeker miktarları 6 saatin sonunda 2.34 g/L ile 4.09 g/L, 24 saatin sonunda 3.06 g/L ile 5.04 g/L, 48 saatin sonunda 3.39 g/L ile 5.46 g/L ve 72 saatin sonunda 3.68 g/L ile 5.83 g/L arasında değiştiği Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.

Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuğunun 30 FPU enzim yüklemesiyle enzimatik hidrolizinden elde edilen maksimum indirgen şeker 5.83 g/L olmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında enzimatik hidroliz süresinin arttırılmasının, elde edilen şeker miktarını arttırdığı görülmektedir.



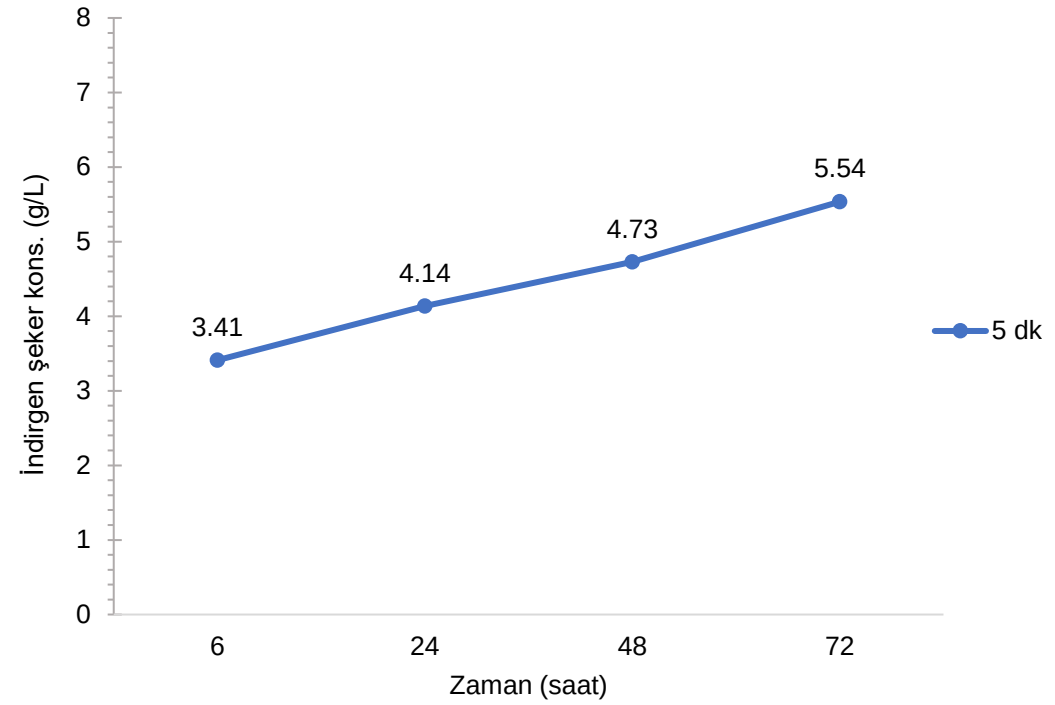
Şekil 4.12. Ozon ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (30 FPU)

Fıstık kabuklarına 5 dakika uygulanan ozon ön işleminin ardından 60 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarının 6 saatin sonunda 3.41 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 5.54 g/L'ye çıktığı Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.

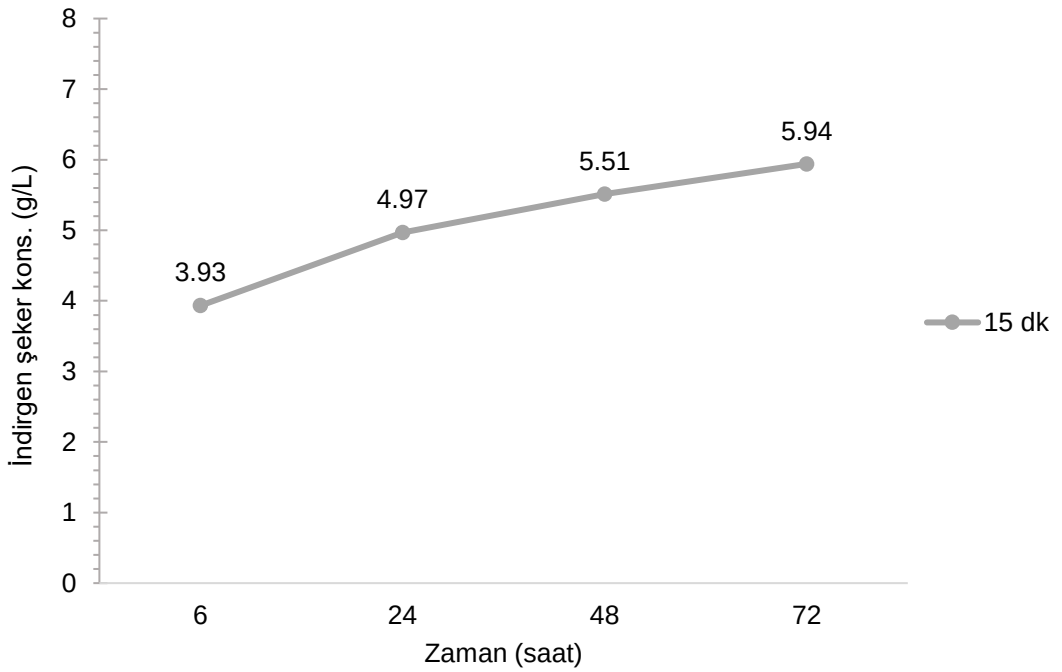
Ozon ön işlemi uygulama süresi 15 dakikaya arttırıldığında enzimatik hidroliz sonucu elde edilen miktarın 6 saat sonunda 3.93 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 5.94 g/L ye çıktığı Şekil 4.14.'te gösterilmiştir.

Ozon ön işlemi uygulama süresi 30 dakikaya arttırıldığında ise enzimatik hidroliz sonucu elde edilen miktarın 6 saat sonunda 4.7 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 6.44 g/L ye arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.15).

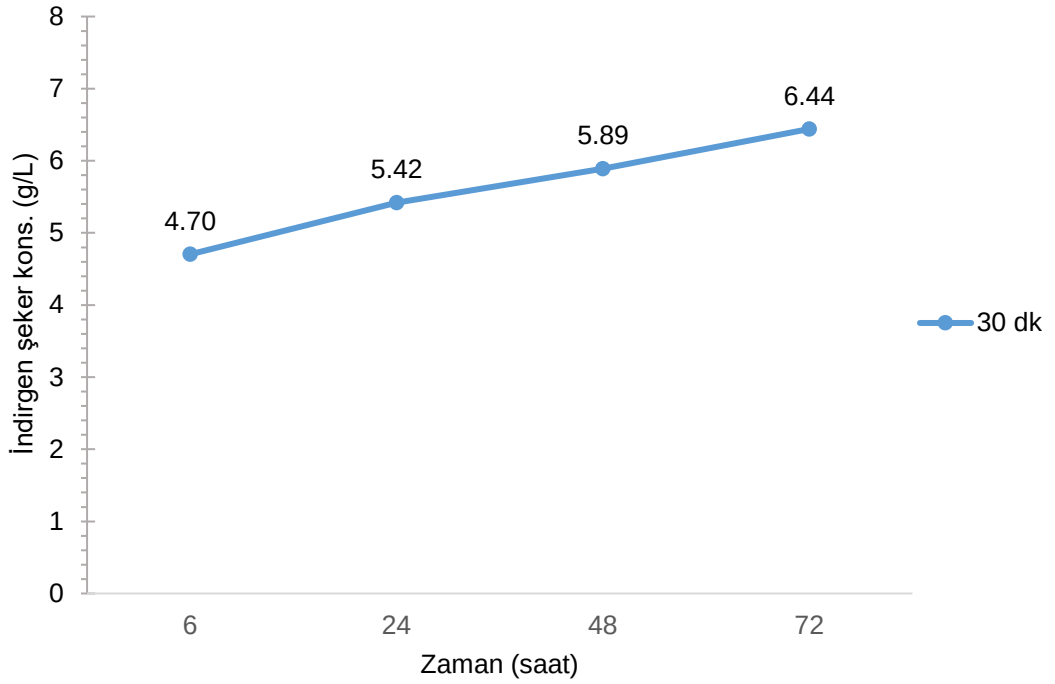
Son olarak ozon ön işleminin 60 dakika boyunca uygulanmasının ardından enzimatik hidroliz ile elde edilen indirgen şeker miktarının 6 saat sonunda 5.89 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 7.71 g/L ye arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.16).



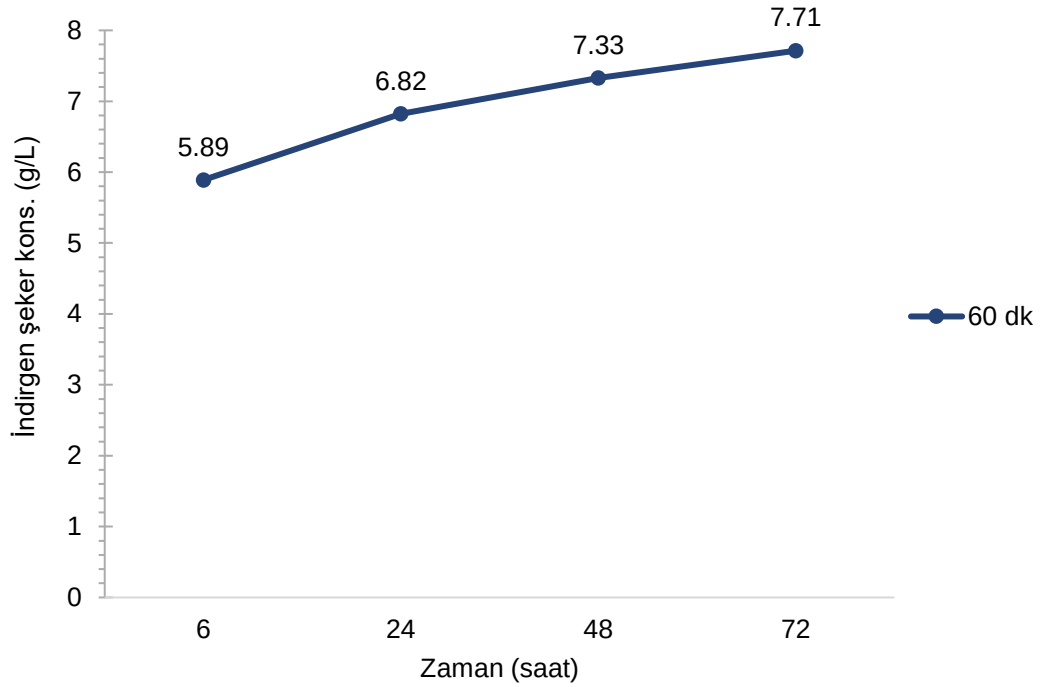
Şekil 4.13. Ozon ön işlemi (5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)



Şekil 4.14. Ozon ön işlemi (15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)

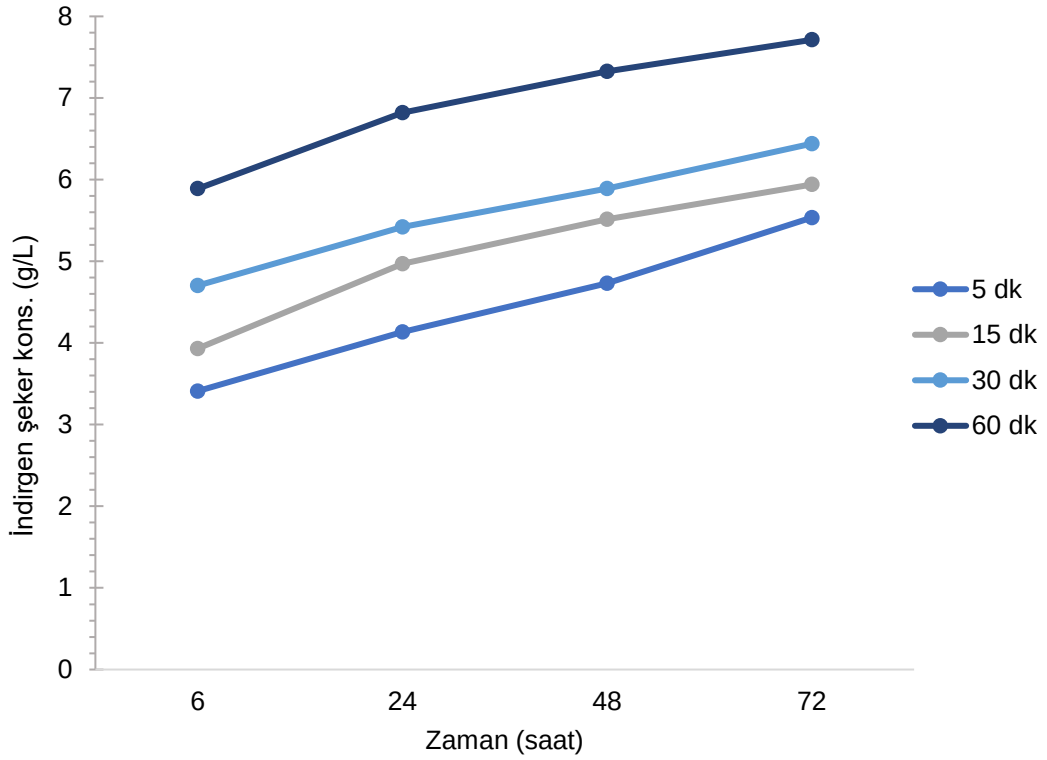


Şekil 4.15. Ozon ön işlemi (30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)



Şekil 4.16. Ozon ön işlemi (60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)

Fıstık kabuklarına 5, 15, 30 ve 60 dakika ozon ön işleminin ardından 60 FPU enzim ile 72 saat boyunca enzimatik hidroliz uygulanmasıyla elde edilen indirgen şeker miktarları 6 saatin sonunda 3.41 g/L ile 5.89 g/L, 24 saatin sonunda 4.14 g/L ile 6.82 g/L, 48 saatin sonunda 4.73 g/L ile 7.33 g/L ve 72 saatin sonunda 5.54 g/L ile 7.71 g/L arasında değiştiği Şekil 4.24.'te gösterilmiştir. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuğunun 60 FPU enzim yüklemesiyle enzimatik hidrolizinden elde edilen maksimum indirgen şeker 7.71 g/L olmuştur.



Şekil 4.17. Ozon ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (60 FPU)

Subhedar ve Gogate (2014) fıstık kabuğuna alkali ve ultrasonik destekli alkali ön işlemi uygulanmış ve sırasıyla 8.1 g/L, 18.4 g/L indirgeyici şeker elde edilmiştir. Başka bir çalışmada Göncü ve Gülşen (2021) fıstık kabuğuna alkali ön işlemi uygulanmış ve 6.98 g/L indirgen şeker elde edilmiştir.

Ozon ön işleminin NaOH ön işlemine göre daha düşük oranda lignin giderimi sağlamasına rağmen ozon ön işlemi sonrası uygulanan enzimatik hidrolizle NaOH ön

işlemi sonrası uygulanan enzimatik hidrolize göre daha fazla indirgen şeker eldesi sağlandığı tespit edilmiştir. Bu durum ozon ön işleminin sadece lignin giderimine değil selüloz ve hemiselülozun indirgen şekere dönüşümünde de fayda sağladığı bu sebeple etkili bir ön işlem olduğu görülmüştür.

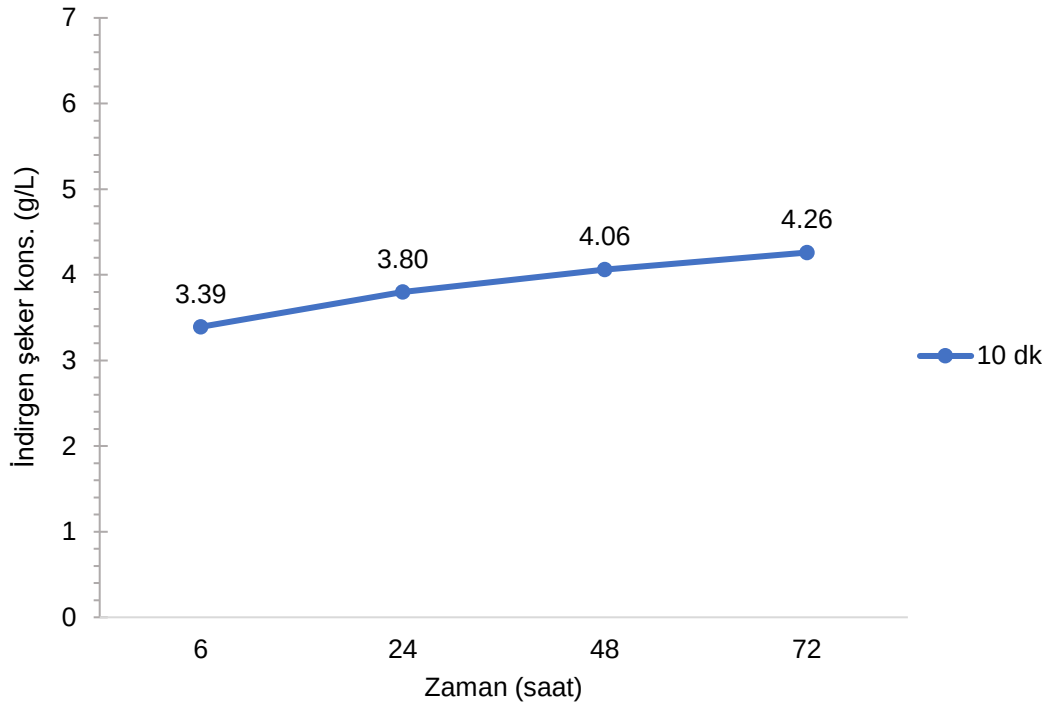
Ozon ön işlemi sonrasında 30 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidroliz ve 60 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidroliz sonuçları karşılaştırıldığında enzim miktarının 30 FPU arttırılmasıyla elde edilen indirgen şeker miktarında yaklaşık %32'lik bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, enzimatik hidroliz süresinin ve enzim yükleme miktarının arttırılmasının elde edilen şeker miktarını arttırmakta olduğu belirlenmiştir.

4.2.3. Ozon+Sıcak su ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarının enzimatik hidrolizi

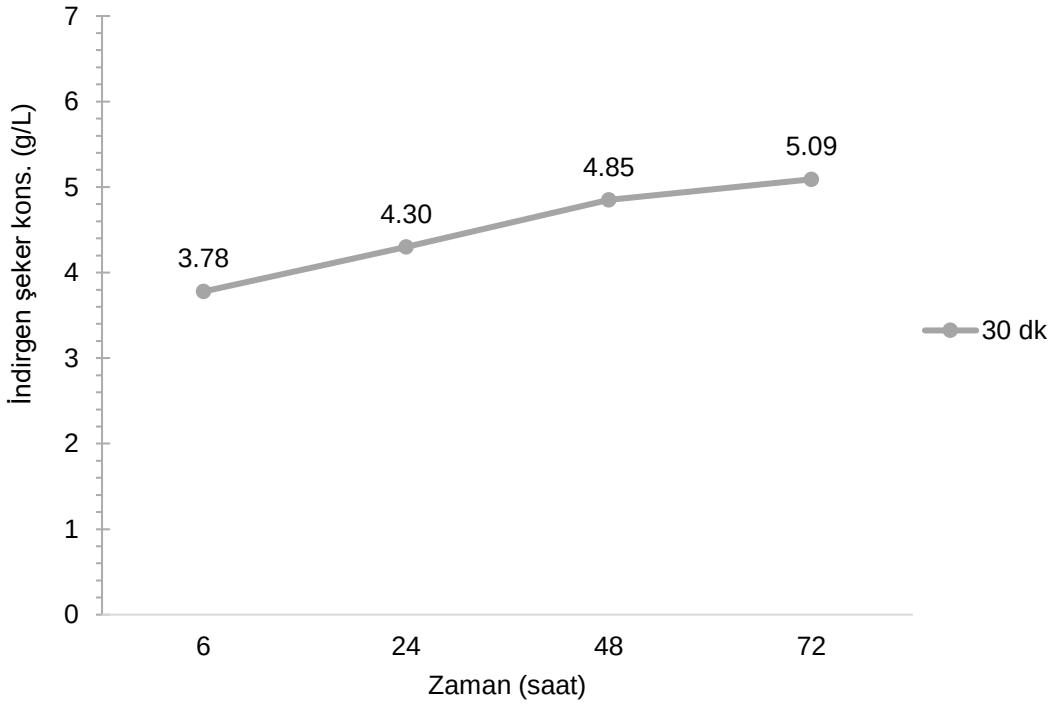
Ozon ve sıcak su ön işlemi görmüş fıstık kabuklarından indirgen şeker elde etmek amacıyla Cellic Ctec2 enzimi kullanılarak enzimatik hidroliz uygulanmıştır. İşlemler için %5 (w/v) substrat yüklemesinde sitrat tamponu kullanılarak 1 g substrat başına 30 FPU ve 60 FPU enzim yüklemesi uygulanmıştır. Hidroliz işlemi 72 saat boyunca 50ºC'de orbital çalkalayıcı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Farklı sürelerde ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarına 30 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarları belirlenmiştir. Buna göre 5 dakika ozon ve 5 dakika sıcak su ön işlemi sonrası enzimatik hidrolizle 6 saatin sonunda elde edilen indirgen şeker miktarının 3.39 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 4.26 g/L ye arttığı Şekil 4.18.'de gösterilmiştir.

Ozon ve sıcak su ön işleminin 15 dakika + 15 dakika şeklinde sırayla uygulanması sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen miktarın ise 6 saat sonunda 3.78 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 5.09 g/L ye arttığı Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.

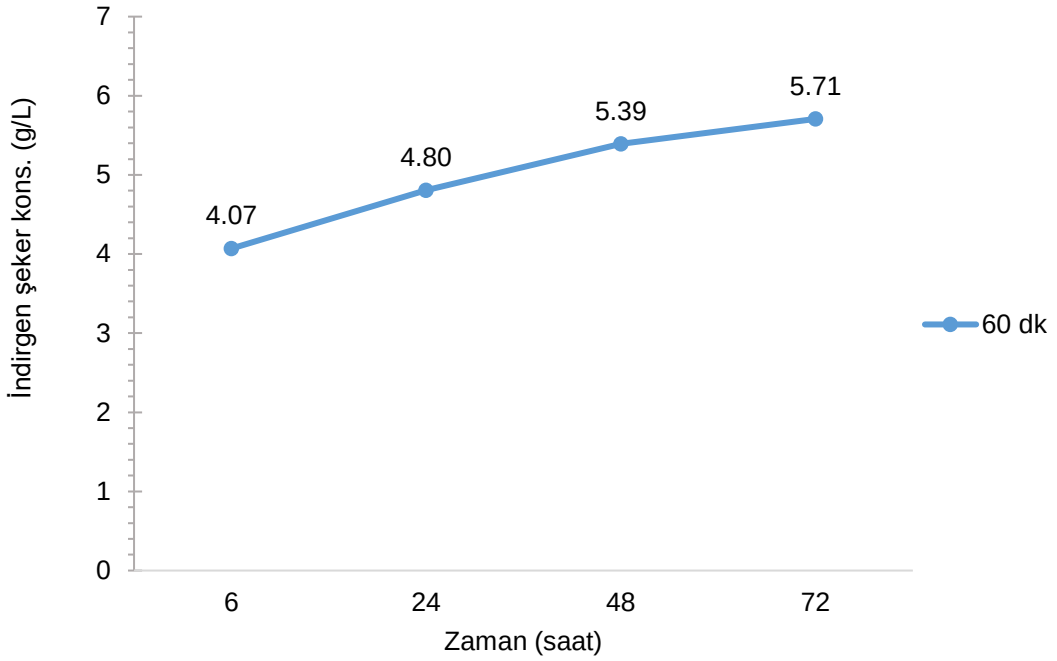


Şekil 4.18. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (5 dk + 5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)



Şekil 4.19. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (15 dk + 15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)

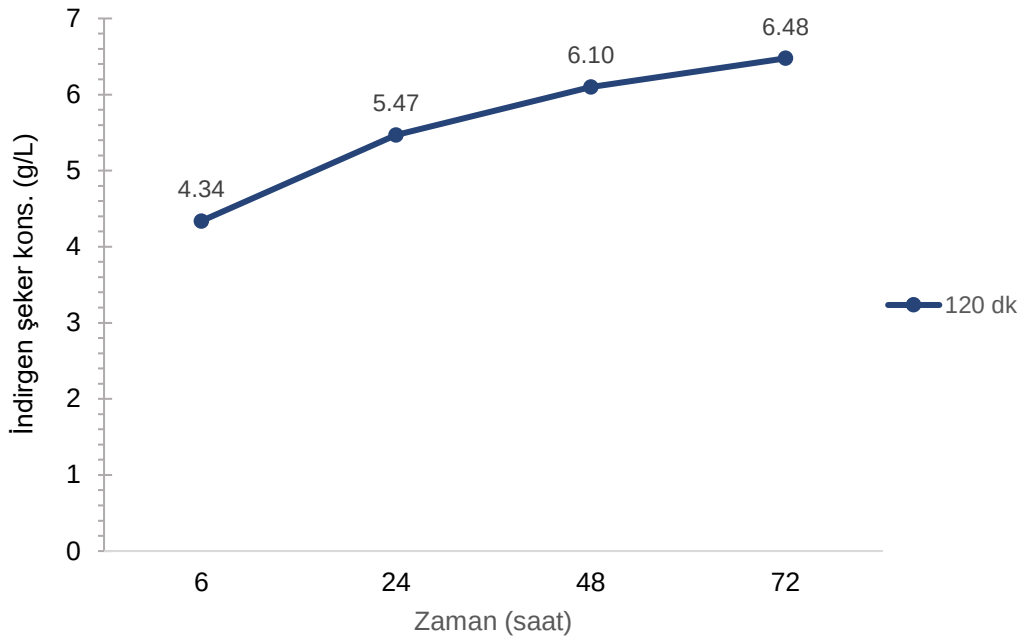
Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulama sürelerinin 30 dakika + 30 dakika olarak arttırılması sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen miktarın 6 saat sonunda 4.07 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 5.71 g/L ye arttığı Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



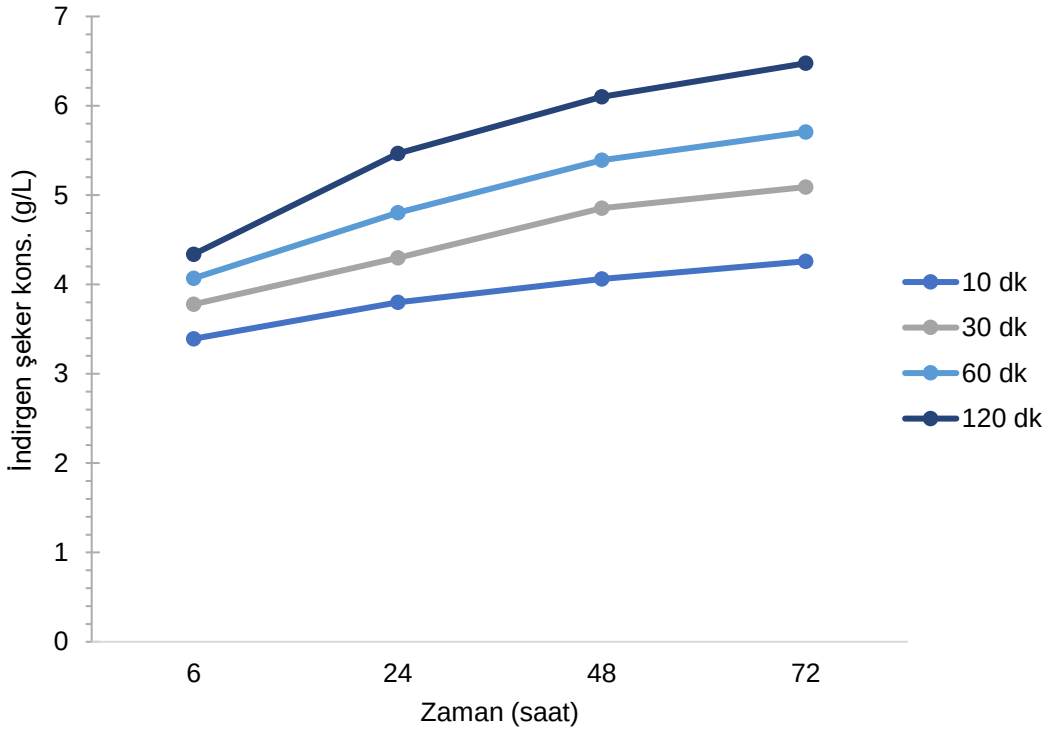
Şekil 4.20. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (30 dk + 30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (30 FPU)

Son olarak ozon ve sıcak su ön işlemlerinin 60 dakika + 60 dakika olarak uygulamasının ardından enzimatik hidroliz ile elde edilen miktarın 6 saat sonunda 4.34 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 6.48 g/L ye arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.21).

Fıstık kabuklarına 5 + 5, 15 + 15, 30 + 30 ve 60 + 60 dakika ozon + sıcak su ön işlemlerinin ardından 30 FPU enzim ile 72 saat boyunca enzimatik hidroliz uygulanmasıyla elde edilen indirgen şeker miktarlarının 6 saatin sonunda 4.34 g/L, 24 saatin sonunda 5.47 g/L, 48 saatin sonunda 6.1 g/L ve 72 saatin sonunda 6.48 g/L olduğu Şekil 4.22.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuğunun 30 FPU enzim yüklemesiyle enzimatik hidrolizinden elde edilen maksimum indirgen şeker 6.48 g/L olmuştur.

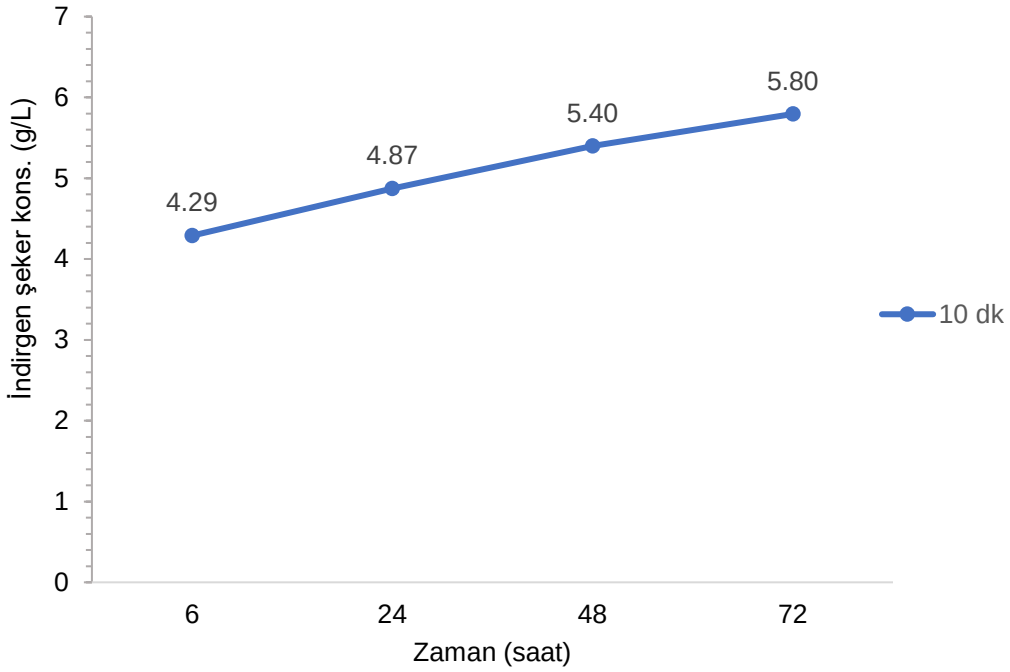


Şekil 4.21. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (60 dk + 60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)



Şekil 4.22. Ozon ve sıcak su ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (30 FPU)

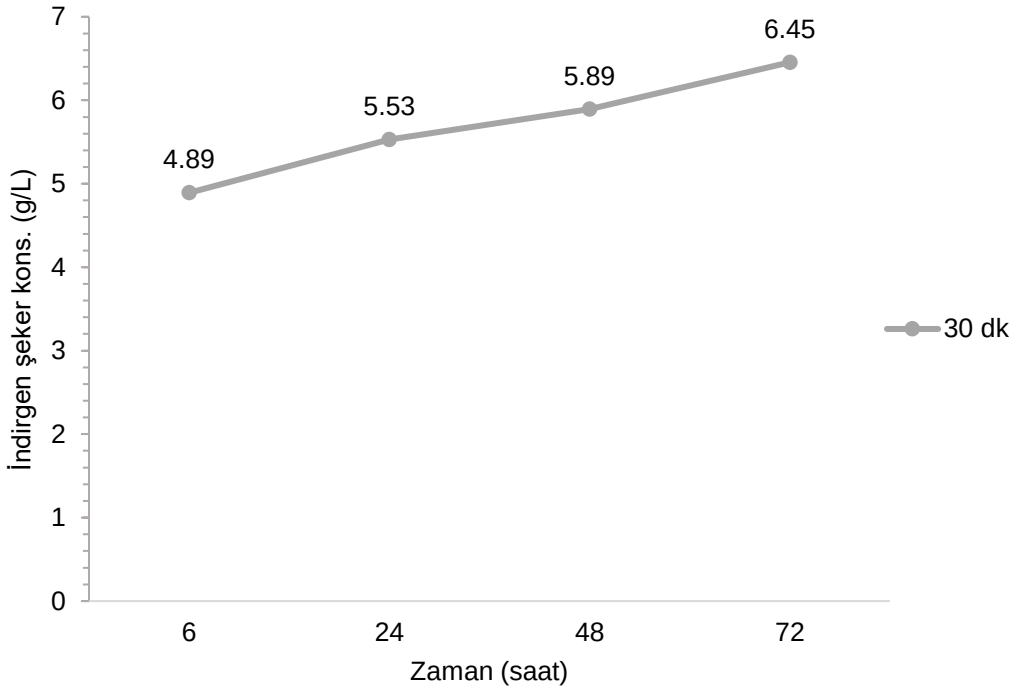
Farklı sürelerde ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarına 60 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarları belirlenmiştir. Buna göre 5 dakika ozon ve 5 dakika sıcak su ön işlemi sonrası enzimatik hidrolizle (60 FPU) 6 saatin sonunda elde edilen indirgen şeker miktarının 4.29 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 5.8 g/L ye çıktığı Şekil 4.23.'te gösterilmiştir.



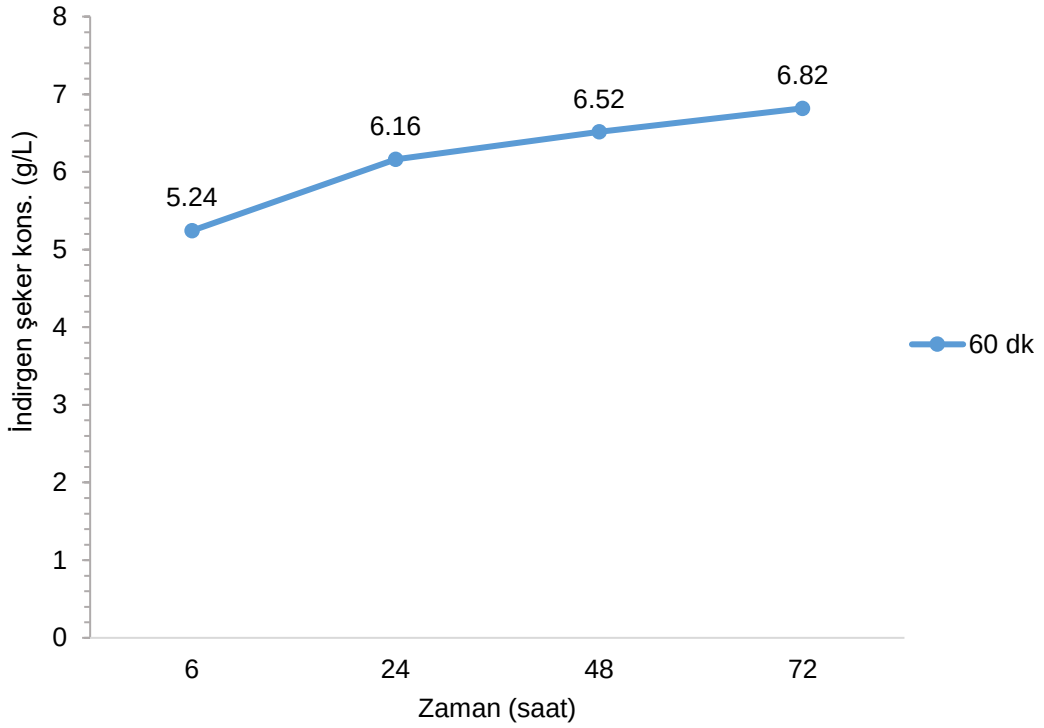
Şekil 4.23. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (5 dk + 5 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)

Ozon ve sıcak su ön işleminin 15 dakika + 15 dakika şeklinde sırayla uygulanması sonrası enzimatik hidroliz (60 FPU) ile elde edilen miktarın 6 saat sonunda 4.89 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 6.46 g/L ye çıktığı Şekil 4.24.'te gösterilmiştir.

Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulama sürelerinin 30 dakika + 30 dakika şeklinde arttırılması sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen miktarın 6 saat sonunda 5.24 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 6.82 g/L ye çıktığı Şekil 4.25.'te gösterilmiştir.

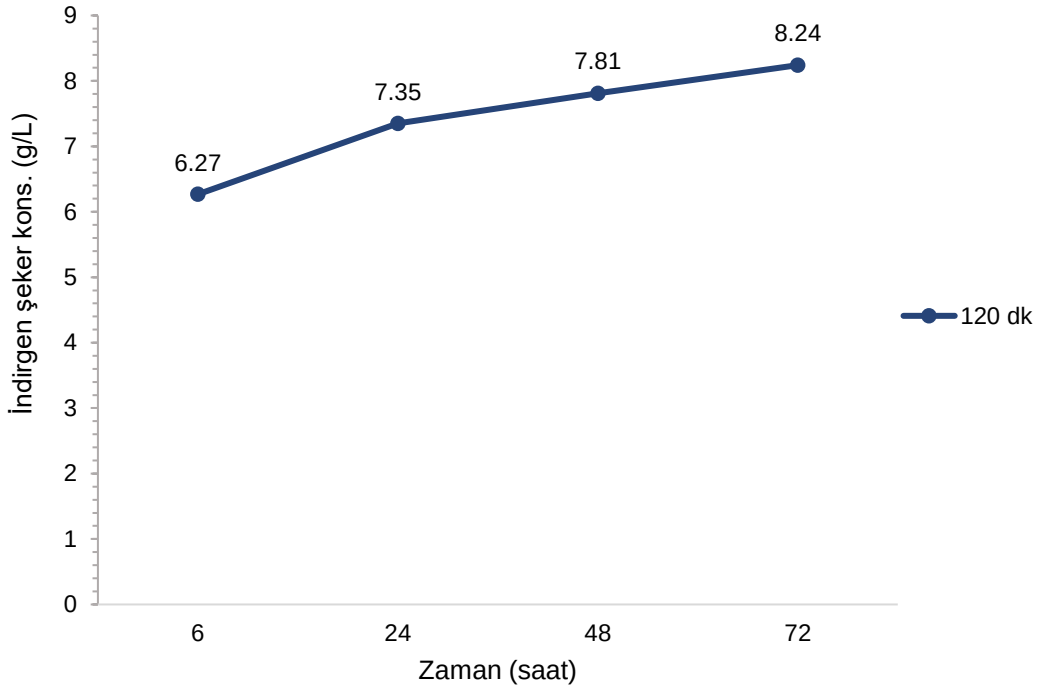


Şekil 4.24. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (15 dk + 15 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)



Şekil 4.25. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (30 dk + 30 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarları (60 FPU)

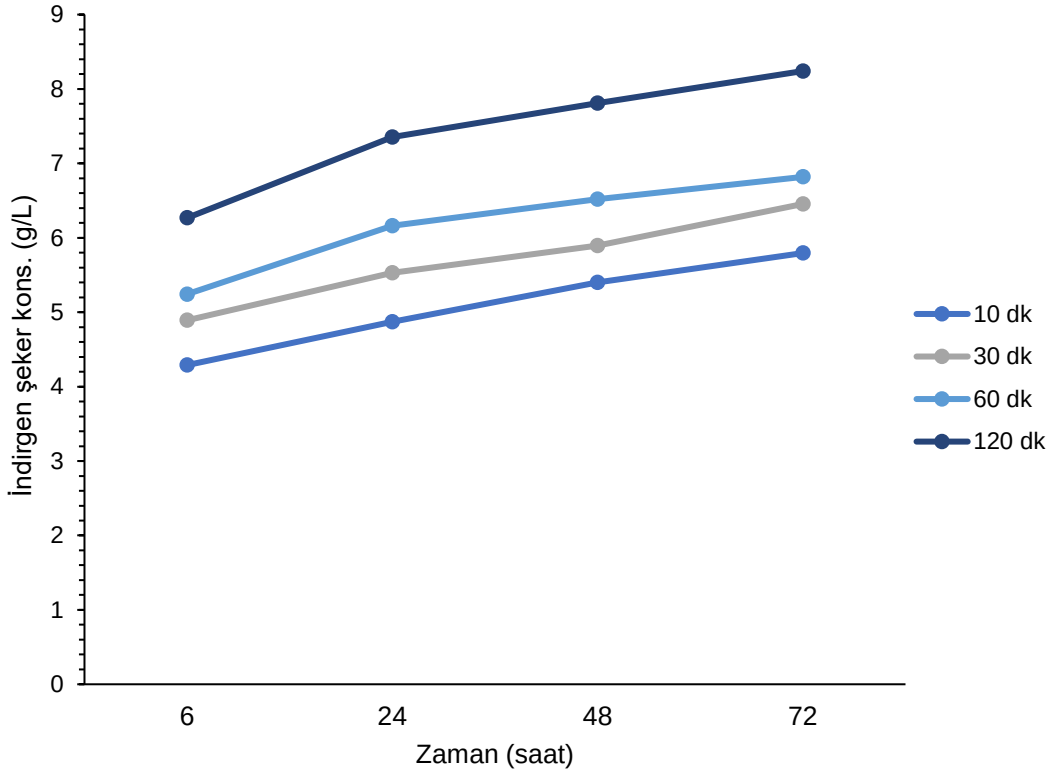
Son olarak ozon ve sıcak su ön işlemlerinin 60 dakika + 60 dakika olarak uygulamasının ardından enzimatik hidroliz ile elde edilen miktarın 6 saat sonunda 6.27 g/L olduğu ve bu miktarın 72 saat sonunda 8.24 g/L ye arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Ozon ve sıcak su ön işlemleri (60 dk + 60 dk) sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)

Fıstık kabuklarına sırayla 5 + 5, 15 + 15, 30 + 30 ve 60 + 60 dakika ozon + sıcak su ön işlemlerinin ardından 60 FPU enzim ile 72 saat boyunca enzimatik hidroliz uygulanmasıyla elde edilen indirgen şeker miktarları 6 saatin sonunda 4.29 g/L ile 6.27 g/L, 24 saatin sonunda 4.87 g/L ile 7.35 g/L, 48 saatin sonunda 5.4 g/L ile 7.81 g/L ve 72 saatin sonunda 5.8 g/L ile 8.24 g/L arasında değiştiği Şekil 4.27.'de gösterilmiştir.

Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuğunun 60 FPU enzim yüklemesiyle enzimatik hidrolizinden elde edilen maksimum indirgen şeker 8.24 g/L olmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında, sıcak su ön işleminin şeker eldesinde de etkili bir ön işlem olmadığı ancak kombine ön işlemlerin tekli ön işlemlere kıyasla daha fazla şeker eldesi sağladığı görülmüştür.



Şekil 4.27. Ozon ve sıcak su ön işlemleri sonrası enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarı (60 FPU)

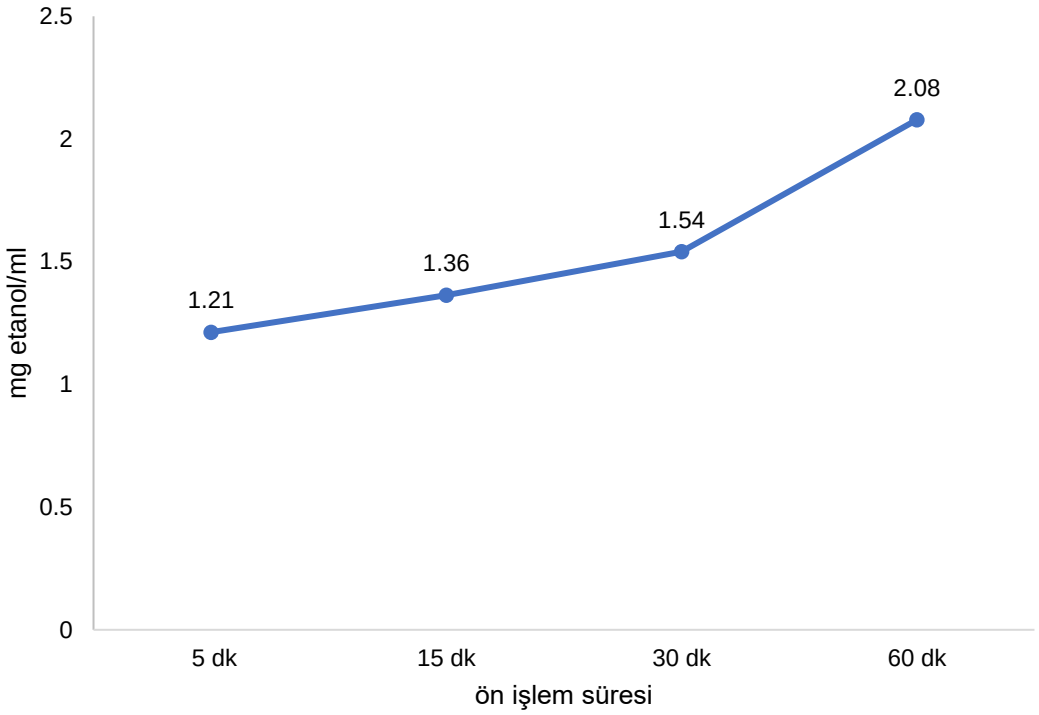
Bu sonuçlara göre 60+60 dakika uygulanan ozon+sıcak su ön işleminin 5+5 dakika uygulanan ozon+sıcak su ön işlemi sonrası 60 FPU enzim ile uygulanan enzimatik hidrolizle elde edilen indirgen şeker miktarını yaklaşık %42'lik oranda arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, enzimatik hidroliz öncesi uygulanan ön işlem süresinin elde edilen şeker miktarını arttırmakta çok etkili olduğu belirlenmiştir.

4.3. Fermantasyon

4.3.1. Ozon su ön işleminin ardından enzimatik hidroliz uygulanmış hidrolizatlardan etanol eldesi

Fıstık kabuklarına sırasıyla 5, 15, 30 ve 60 dakika uygulanmış ozon ön işleminden sonra 60 FPU enzim ile 72 saat boyunca enzimatik hidroliz işlemi uygulanmıştır. Bu işlemler sonunda fermantasyonda kullanılmak üzere hidrolizatlar

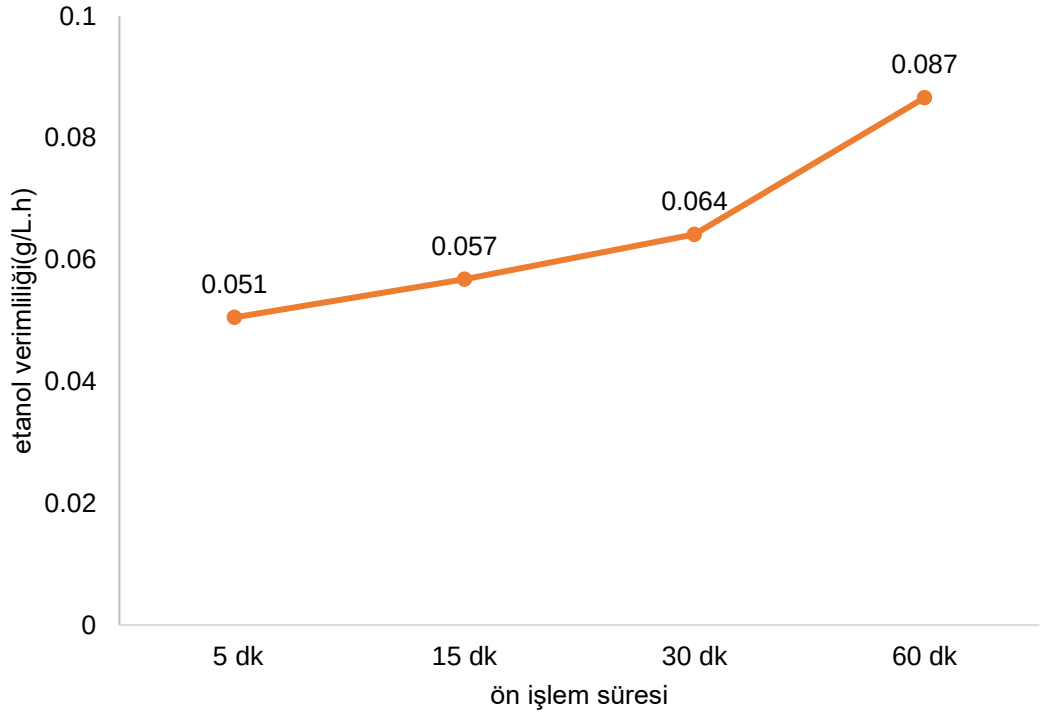
elde edilmiştir. Hidrolizatlardan biyoetanol elde etmek için *S. cerevisiae* mayası kullanılarak 30°C'de 48 saat fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen etanol miktarı Şekil 4.28.'de gösterilmiştir. Hidrolizatlardan elde edilen etanol konsantrasyonu sırasıyla 1.21, 1.36, 1.54, 2.08 g/L olarak belirlenmiştir.



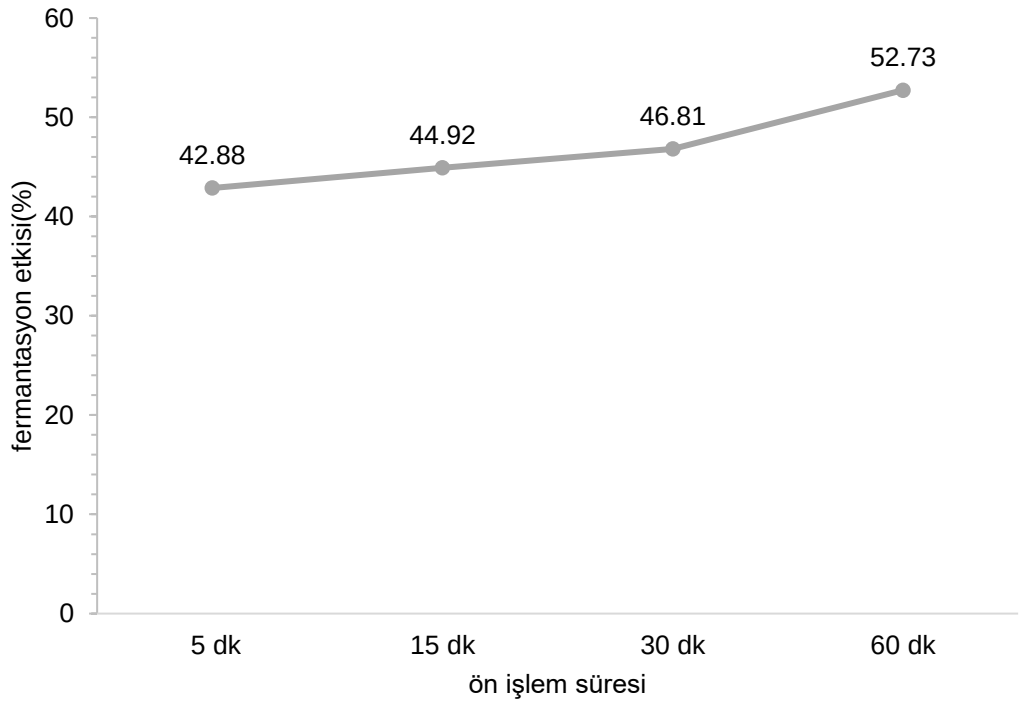
Şekil 4.28. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından elde edilen etanol miktarı (60 FPU)

Enzimatik hidroliz sonrası elde edilen hidrolizatların etanol verimliliği ise 0,05, 0,057, 0,064, 0,086 g/L.h olarak hesaplanmıştır. Etanol verimliliği Şekil 4.29.'da gösterilmiştir.

Ozonla ön işleme tabi tutulmuş hidrolizatların fermantasyon verimi %42 ile %52 arasında hesaplanmıştır. Fermantasyon verimleri Şekil 4.30.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarının fermantasyon işlemindeki etanol verimliliği (60 FPU)

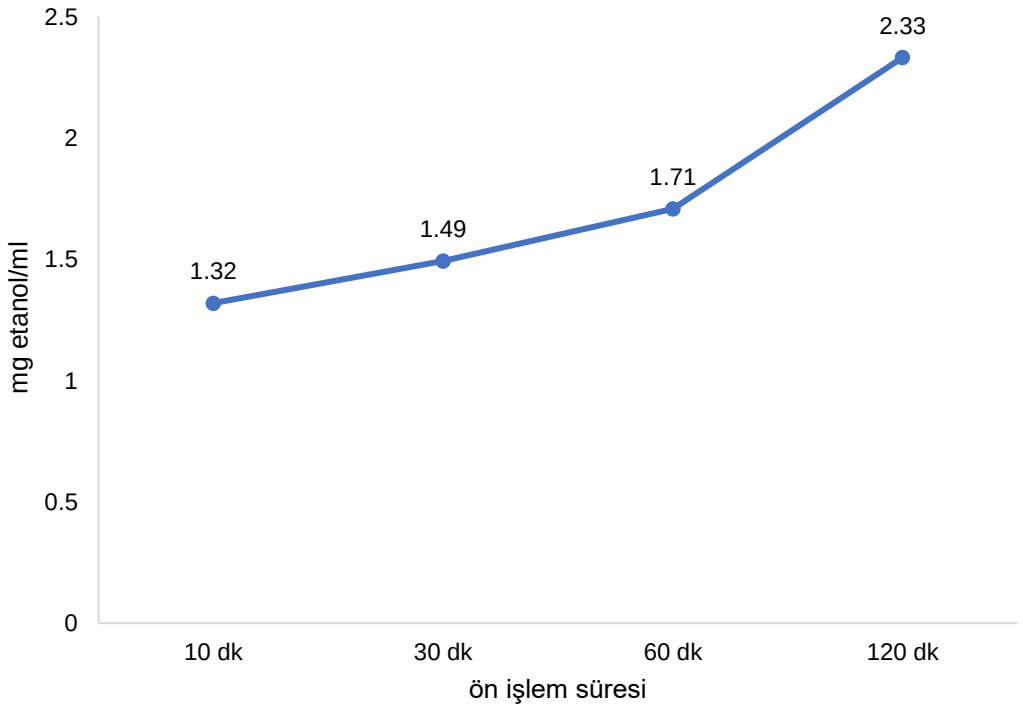


Şekil 4.30. Ozon ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından etanol eldesinde fermantasyon etkisi (60 FPU)

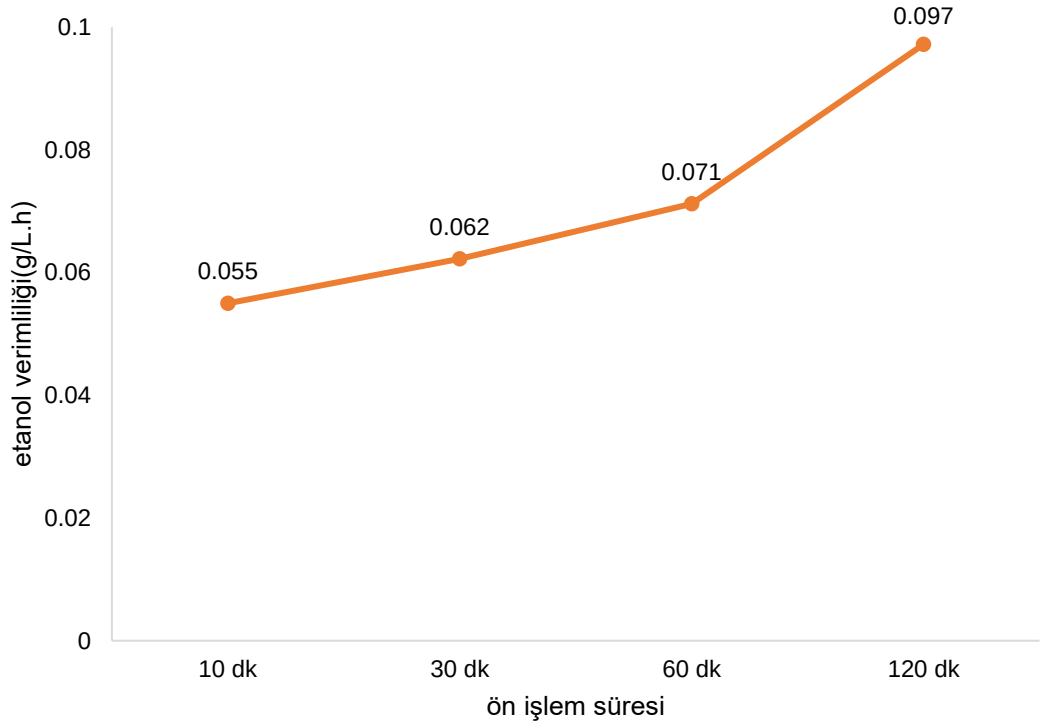
4.3.2. Ozon+Sıcak su ön işleminin ardından enzimatik hidroliz uygulanmış hidrolizatlardan etanol eldesi

Fıstık kabuklarına sırasıyla 5 + 5, 15 + 15, 30 + 30 ve 60 + 60 dakika ozon ve sıcak su ön işlemlerinin ardından 60 FPU enzim ile 72 saat boyunca enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Bu işlemler sonunda fermantasyonda kullanılmak üzere hidrolizatlar elde edilmiştir. Hidrolizatlardan biyoetanol elde etmek için *S. cerevisiae* mayası kullanılarak 30ºC'de 48 saat fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen etanol miktarı Şekil 4.30.'da gösterilmiştir. Hidrolizatlardan elde edilen etanol konsantrasyonunun sırasıyla 1.32, 1.49, 1.71 ve 2.33 g/L olduğu saptanmıştır. Etanol verimliliği ise 0,055, 0,062, 0,071 ve 0,097 g/L.h olarak hesaplanmıştır. Etanol verimliliği Şekil 4.31.'de gösterilmiştir.

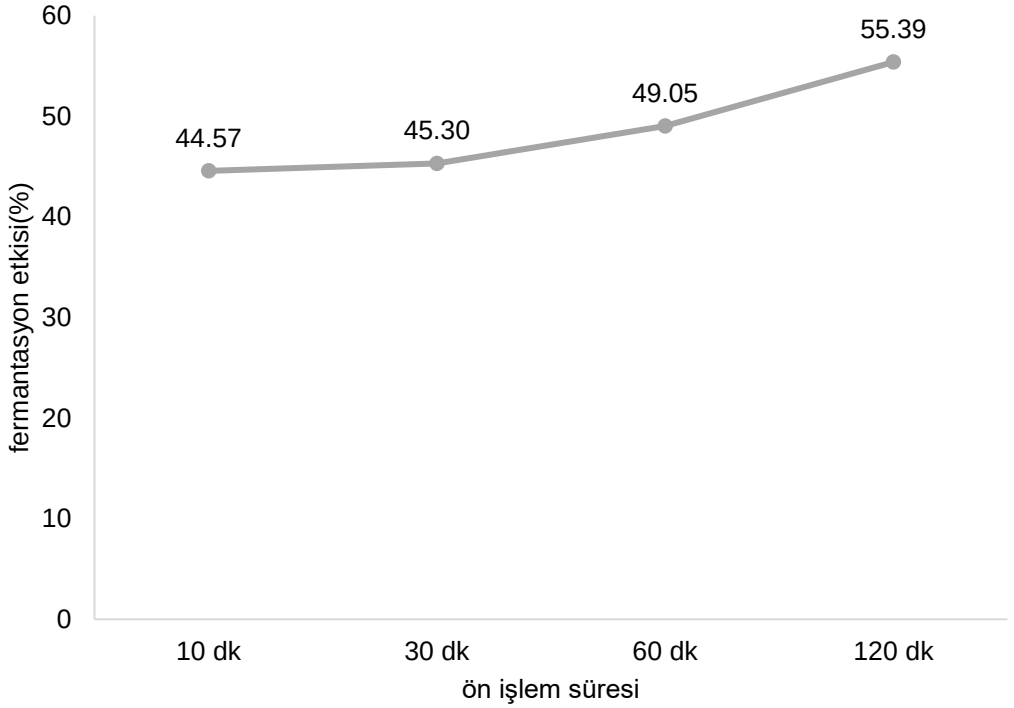
Ozon ve sıcak su ön işlemlerine tabi tutulmuş hidrolizatın fermantasyon verimi %44 ile %55 arasında hesaplanmıştır. Fermantasyon verimleri Şekil 4.32.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından elde edilen etanol miktarı (60 FPU)



Şekil 4.32. Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarının fermantasyon işlemindeki etanol verimliliği (60 FPU)



Şekil 4.33. Ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından etanol eldesinde fermantasyon etkisi (60 FPU)

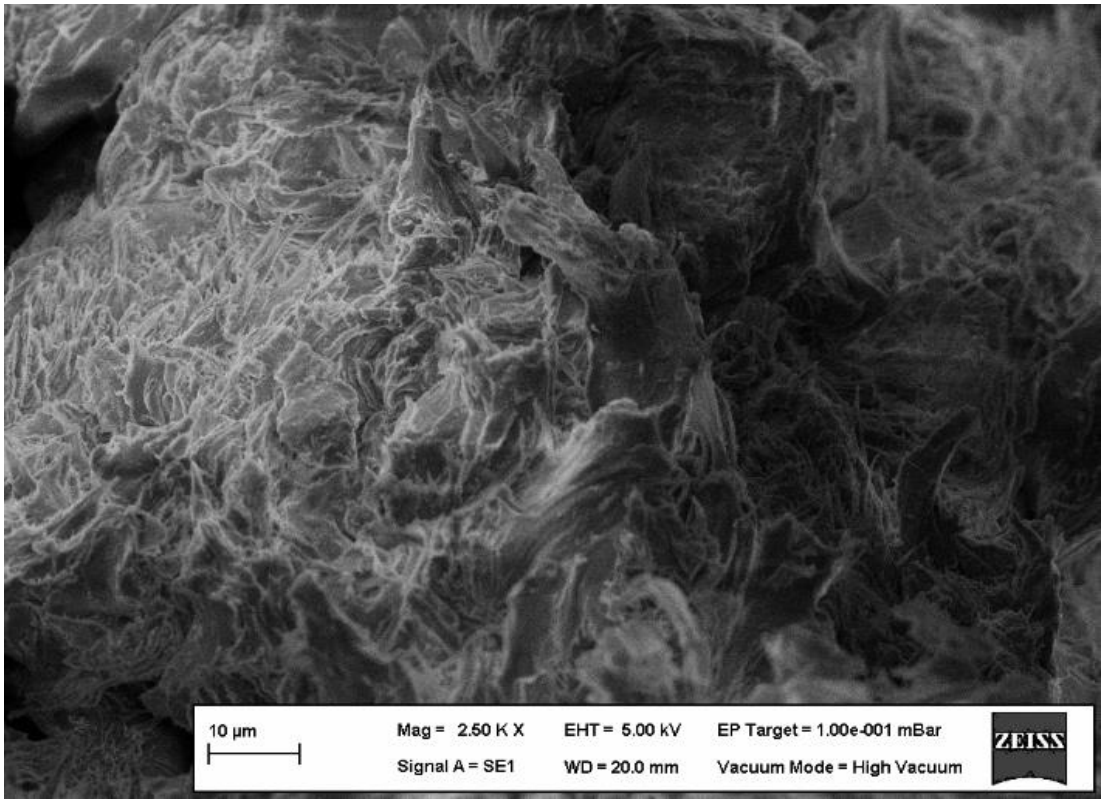
4.4. Morfolojik Yapı

Yapılan çalışmada alkali ön işlem uygulanmış fıstık kabuklarından en iyi lignin giderimi sağlayan koşullar %2 NaOH, 1/10 S/L oranı, 60ºC ve 60 dakika olarak belirlenmiştir. Bu sebeple en iyi karşılaştırma yapılması açısından bu koşullarda NaOH ön işlemi uygulanmış ve ön işlem uygulanmamış fıstık kabukları, SEM görüntülemesinde, termogravimetrik analizlerde, x-ışını kırınımı (XRD) analizinde ve fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi analizinde kullanılmıştır.

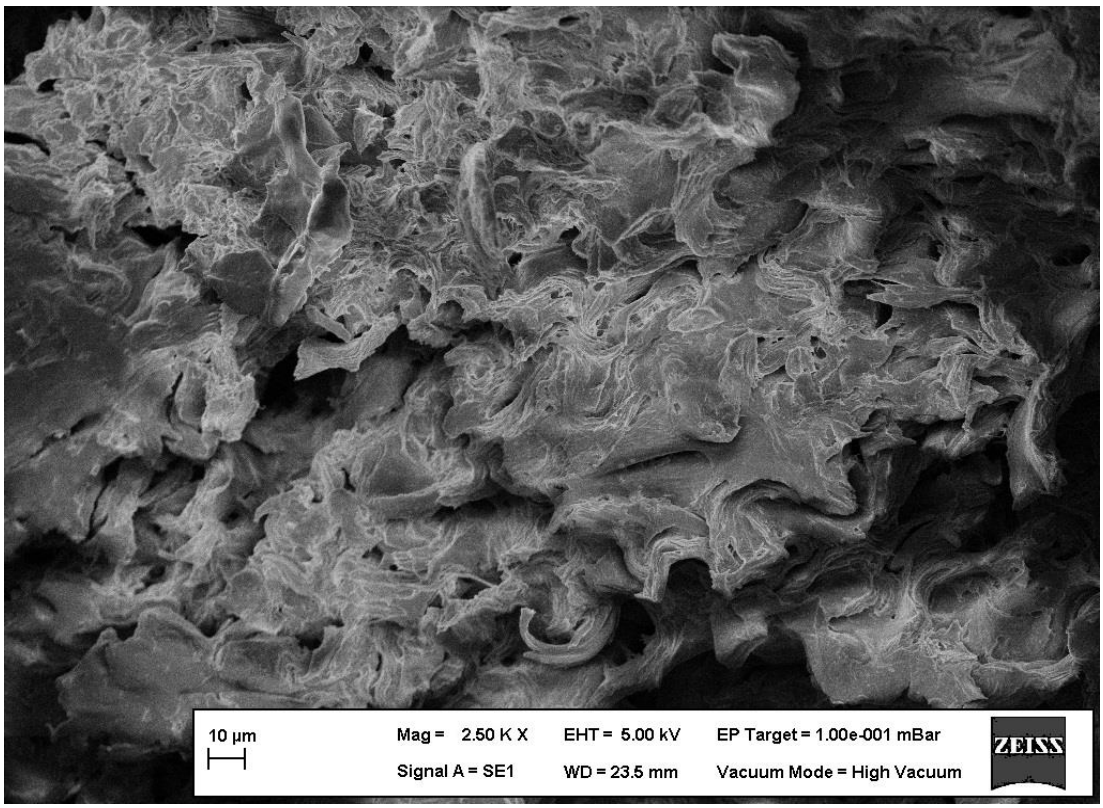
4.4.1. SEM görüntüleri

İnsan gözü çok küçük nesneleri göremediği için yüksek büyütmeli yeni sistem cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) bu cihazlardan biridir (Bhattarai ve ark., 2015). Taramalı elektron mikroskobu (SEM), hammaddedeki morfolojik ve yapısal değişiklikleri anlamak için kullanılan önemli bir tekniktir (Sant'Anna ve De Souza, 2012). Daha önce belirtildiği gibi, işlenmemiş ve işlenmiş hammaddenin yüzey morfolojisi SEM görüntülemesi kullanılarak belirlenebilir. Ayrıca lignin gideriminin ve lignoselülozik hammaddede alkali ön işleme bağlı fiziksel değişimlerin incelenmesi önemlidir. Bu görüntülemelerde fıstık kabuğu üzerine yapılan diğer çalışmalara benzer görüntüler elde edilmiştir (Kasiri ve Fathi, 2018; Subhedar ve ark., 2018).

Ön işlem görmemiş, NaOH ön işlemi uygulanmış ve ozon+sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarının morfolojik farklılıkları taramalı elektron mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir. Fıstık kabuklarının SEM görüntüleri Şekil 4.33., Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.'te gösterilmektedir.



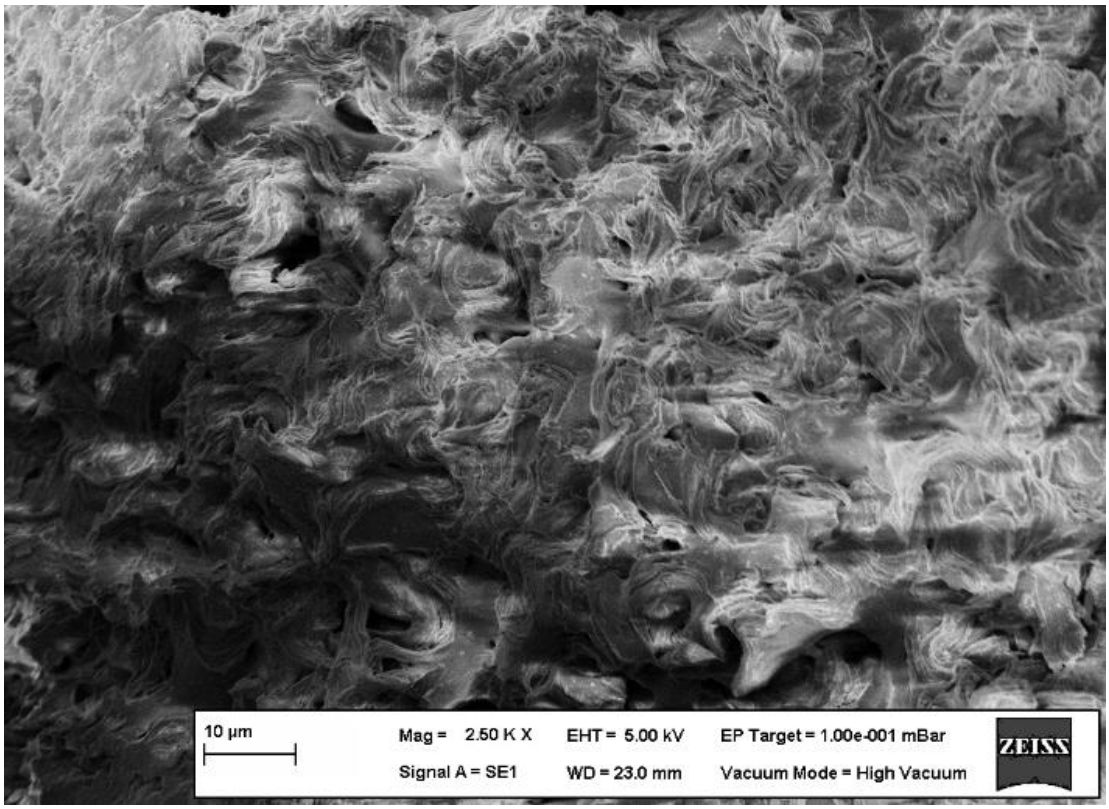
Şekil 4.34. SEM görüntüsü (ön işlem uygulanmamış)



Şekil 4.35. SEM görüntüsü (NaOH ön işlemi uygulanmış)

Yapılan çalışmada ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabuklarından en iyi lignin giderimi sağlayan koşullar 1/10 S/L oranı, 60+60 dakika ön işlem olarak belirlenmiştir. Bu sebeple en iyi karşılaştırma yapılması açısından ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış fıstık kabukları SEM görüntülemesinde kullanılmıştır.

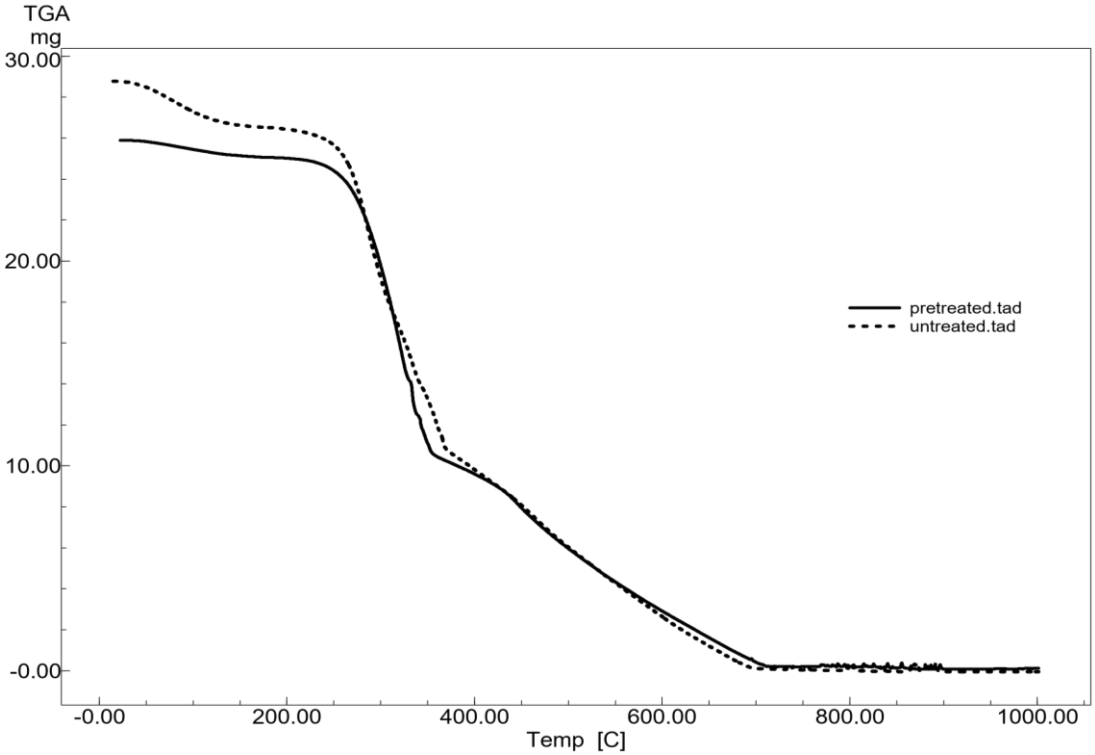
Ozon+sıcak su ön işleminden sonra fıstık kabuğunun yapısal olarak önemli ölçüde parçalandığı belirlenmiştir. Ayrıca ön işlem sonrası ligninin yapısal değişikliği, uzun yapılı liflerin kısa ve kapalı ayrı liflere dönüşmesiyle gözlemlenmiştir.



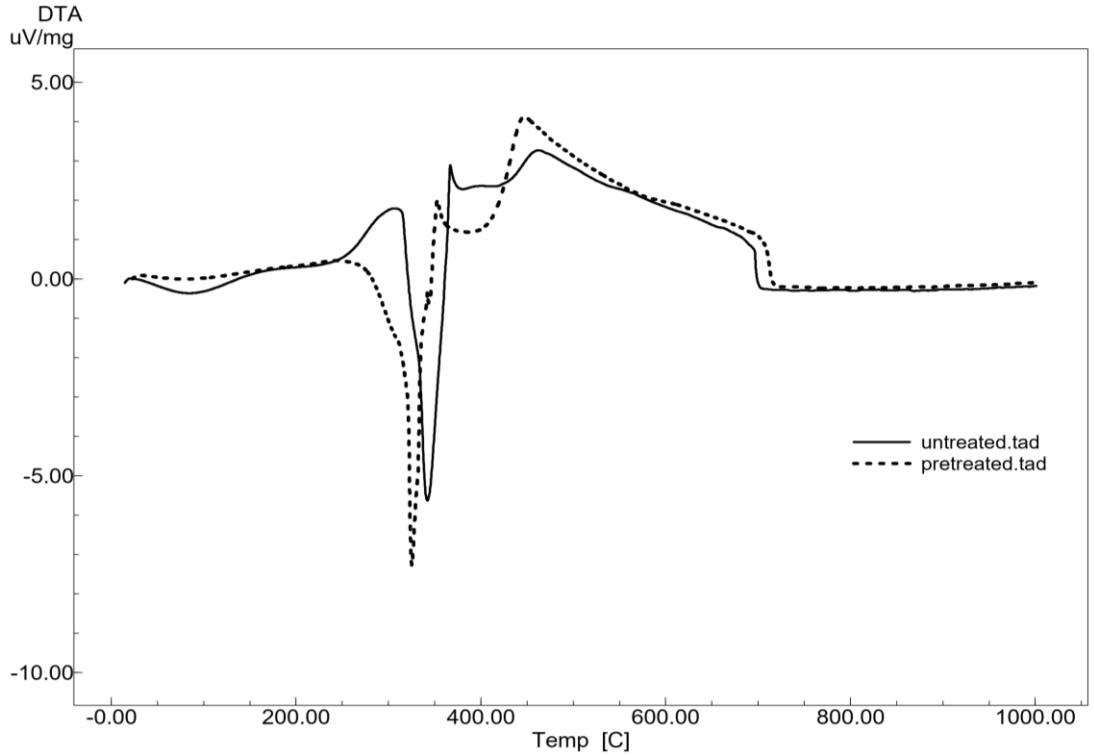
Şekil 4.36. SEM görüntüsü (ozon ve sıcak su ön işlemi uygulanmış)

4.4.2. Termogravimetrik analizler (TGA)

Ön işlem uygulanmamış ve ön işlem uygulanmış fıstık kabuklarının termal özelliklerini belirlemek için termogravimetrik analiz (TGA) uygulanmıştır. Bu biyokütlelerin ısıya göre ağırlık değişimleri izlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Ön işlem uygulanmamış ve ön işlem uygulanmış fıstık kabuklarının TGA ve türev termogravimetrik (DTA) eğrileri sırasıyla Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının TGA eğrileri

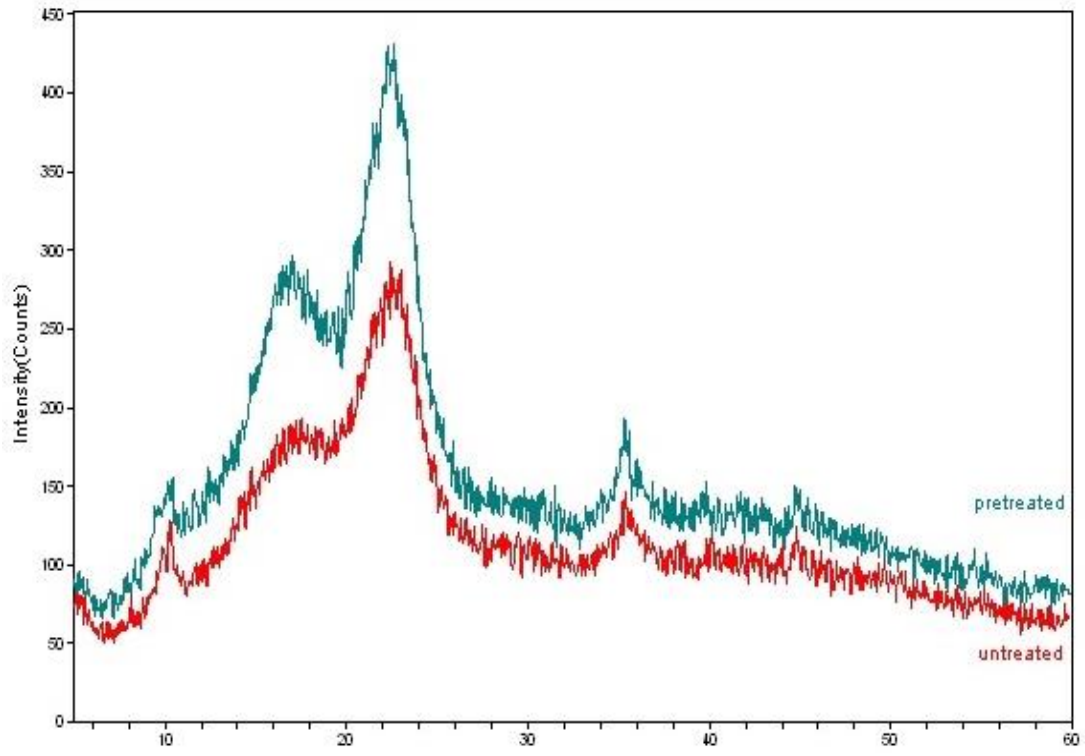


Şekil 4.38. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının DTA eğrileri

Analiz sonuçlarına göre ön işlem uygulanmamış hammadde ön işlem uygulanmış hammaddeye kıyasla daha düşük stabilite göstermiştir. Adsorban yüzeye bağlı nemin buharlaşmasının neden olduğu ilk kütle kaybı, fiziksel olarak 30°C'de başlamış ve bunu indirgeme izlemiştir. Ön işlem uygulanmamış hammaddede 260°C'de başlayan kütle kaybı ön işlem uygulanmış hammaddede 220°C olarak belirlenmiş ve ham fıstık kabuğunda kütle kaybının daha düşük sıcaklıklarda başladığı gözlemlenmiştir. 250-370^{o}C arasındaki kütle kaybı, hammaddenin yapısında selüloz ve hemiselülozun bozunduğunu gösterir. 400-550^{o}C arasındaki kütle kaybı ise ligninin parçalandığını gösterir. Piklerin sayısının aynı kaldığı ancak farklı sıcaklıklarda ortaya çıktığı görülmüştür. Bunun nedeni kısmen C/H'deki farklılıklar olabilir. Bu sonuçlar ön işlemin etkisini göstermektedir.

4.4.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi

Ön işlem görmemiş ve ön işlem görmüş fıstık kabuklarının kristalliği incelenmiştir. İşlem görmemiş ve alkali ön işlemden geçirilmiş fıstık kabuklarının XRD desenleri Şekil 4.38.'de gösterilmiştir.

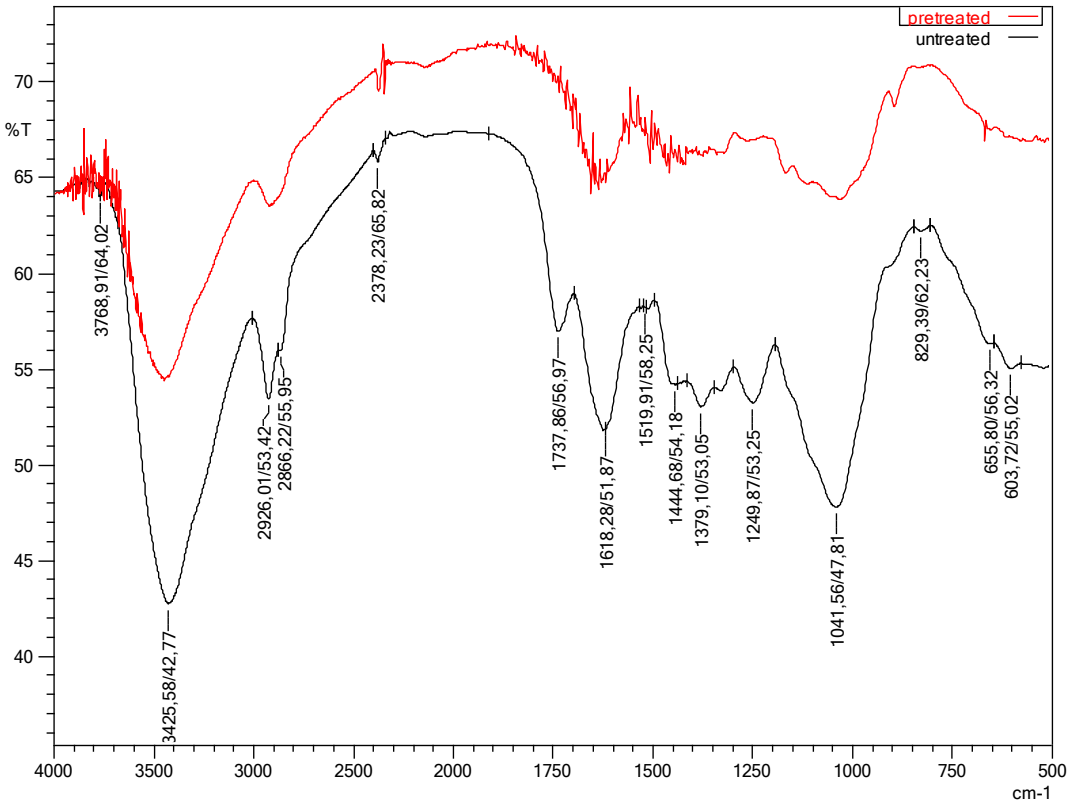


Şekil 4.39. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının XRD grafiği

Kristal için (002) düzleminin maksimum yoğunluk kırınım tepe noktası 2h=22°'de elde edilirken amorf bölge yaklaşık 19°'de elde edilmiştir. Alkali ön işlemi uygulandıktan sonra yukarı kayan yoğunluk pikleri gözlemlenmiştir. İşlem görmemiş fıstık kabuğu piki 280 cps'de görüntülenirken, ön işlem görmüş fıstık kabuğu 430 cps'de görüntülenmiştir. Ön işlemden sonra hemiselüloz ve lignin çözülür ve kristallik indeksi daha yoğun olur (Kasiri ve Fathi 2018). Bu nedenle, analiz edilen sonuçlardan ön işleme tabi tutulmuş fıstık kabukları için daha yüksek kristallik indeksi, amorf ligninin fıstık kabuklarının alkali ön işlemiyle verimli bir şekilde çözüldüğünü doğrulamaktadır.

4.4.4. Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi

NaOH ön işlemi uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının FTIR spektrumu Şekil 4.39.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.40. Alkali ön işlem uygulanmış ve uygulanmamış fıstık kabuklarının FTIR spektroskopisi

3768 cm-1'deki hidroksil tepe noktası O-H gerilmesiyle ilgilidir ve selülozik yapıya aittir. Bu tepe, şekilde 3790 cm^{-1}'de görülebilir. Bu pikler malzemeler üzerindeki nem miktarından kaynaklanabileceği gibi, işlem görmemiş ve ön işlem görmüş fıstık kabuklarında selülozik yapının hidroksil gruplarına ait 3650-3220 cm^{-1} aralığında alkol ve fenollerden esneyen OH pikleri verir. 3000-2866 cm^{-1}'de görünen tepe noktaları, alifatik C-H gerilmesine aittir. Ayrıca 1370 cm^{-1}'de gözlemlenen pik, simetrik C-H bükülmesi ile oluşan piklerdir ki bu metil ve metilen gruplarının varlığını gösterir. 1737 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen pik, karbonil gruplarındaki C=O gerilmesinden kaynaklanır ve asetil türevleri ve aldehit grupları gibi grupların varlığını gösterir. 1100-950 cm^{-1} aralığındaki bölge genellikle C-O gerilimine ve inorganik M-O-M yapılarına aittir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Fıstık (*Pistacia vera* L.) kabuğu, lignoselülozik yapıda olan atık bir hammaddedir. Dünyada en çok fıstık üretilen üç ülkeden biri Türkiye'dir ve Şanlıurfa Türkiye'de en çok fıstık üretimi yapılan şehirdir. Bu üretim sonucunda büyük miktarda fıstık atığı oluşmaktadır. Bu nedenle, bu çalışma fıstık atığının bolluğu dikkate alınarak yapılmış ve ayrıca fıstık kabuklarından biyoetanol üretimi için farklı ön işlemlerinin etkileri araştırılmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda fıstık kabuklarına alkali ön işlemi uygulamasında en iyi lignin giderimi koşulu %2 NaOH, katı/sıvı oranı 1/10, 60°C ve 60 dakika ve max lignin giderimi %40.64 olarak belirlenmiştir. Ayrıca optimum enzimatik hidroliz koşulları 60 FPU enzim, %5 substrat, 72 saat, 50°C ve elde edilen maksimum indirgen şeker miktarı 6.98 g/L olmuştur.

Fıstık kabuklarına NaOH+ H_2O_2 ön işlemi uygulamasında ise en iyi lignin giderimi koşulu %2 NaOH + %4 H_2O_2, katı/sıvı oranı 1/10, 45°C ve 12 saat ve maksimum lignin giderimi %38.47 olarak belirlenmiştir.

Ozon ön işlemi uygulanan fıstık kabuklarından elde edilen sonuçlara göre, en iyi lignin giderimi koşulu 60 dk, katı/sıvı oranı 1/10, ozon dozajı 8 mg/dk ve maksimum lignin giderimi %37.43 olarak belirlenmiştir. Ayrıca optimum enzimatik hidroliz koşulları 60 FPU enzim, %5 substrat, 72 saat, 50°C ve elde edilen maksimum indirgen şeker miktarı 7.71 g/l olmuştur. Ek olarak 30°C, 48 saat, %10 maya oranında uygulanan fermantasyon sonucu elde edilen maksimum etanol miktarı 2.08 mg/ml, fermantasyon verimi %52.73 olmuştur.

Fıstık kabuklarına ozon+sıcak su ön işlemi uygulandığında ise en iyi lignin giderimi koşulu 60+60 dk, katı/sıvı oranı 1/10, ozon dozajı 8 mg/dk ve maksimum lignin giderimi %41.22 olarak belirlenmiştir. Bunun yanında optimum enzimatik hidroliz koşulları 60 FPU enzim, %5 substrat, 72 saat, 50°C ve elde edilen max

indirgen şeker miktarı 8.24 g/l olmuştur. Son olarak 30°C, 48 saat, %10 maya oranında uygulanan fermantasyon sonucu elde edilen maksimum etanol miktarı 2.33 mg/ml ve fermantasyon verimi %55.39 olmuştur.

16.06.2017 tarihli T.C. Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu (EPDK) kararına göre "*Rafinericiden temin edilen ve ithal edilen benzin türlerinin toplamına en az %3 (v/v), oranında yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanolün harmanlanmış olması zorunludur*" (Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu, 2017). Bu kararın sonuçlarına baktığımızda her geçen gün artmakta olan benzin tüketimi ile birlikte biyoetanol ihtiyacı da artmaktadır. Benzin tüketimi ve ihtiyaç duyulan biyoetanol miktarı ilişkisi Çizelge 5.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Benzin tüketiminde ihtiyaç duyulan biyoetanol miktarları (Petrol Sanayi Derneği, 2021)

	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Benzin Tüketimi (m^3)*	2990690	3083339	3119036	3211969	3131926	4044882	4255721 (tahmin)	44665589(tahmin)	4677397 (tahmin)
İhtiyaç Duyulan Biyoetanol Miktarı (m^3)	89721	92500	93571	96359	92755	93958	127672	133997	140322

Yukarıdaki tabloya bakıldığında Türkiye'de son 5 yılda tüketilen benzin miktarı (Petrol Sanayi Derneği, 2021) ve buna karşılık yasal zorunluluk olarak üretilmesi gereken %3 oranındaki biyoetanol karşılığı hesaplanmıştır. Verilerden de görüldüğü üzere, 2022 yılında tüketilmesi öngörülen 4.26 milyon m^3 benzine karşılık 127672 m^3 (127.672 milyon litre), 2023 yılında tüketilmesi öngörülen 4.47 milyon m^3 benzine karşılık 133997 m^3 (133.997 milyon litre), 2024 yılında tüketilmesi öngörülen 4.68 milyon m^3 benzine karşılık 140322 m^3 (140.322 milyon litre) biyoetanole ihtiyaç duyulacağı tahmin edilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında fıstık kabuğuna uygulanan ozon ön işlemi sonucunda maksimum şeker miktarı 7.31 g/L, maksimum etanol miktarı 2.08 g/L ve etanol verimliliği %52 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 1 g fıstık kabuğundan 146 mg şeker elde edildiği buna göre sadece Şanlıurfa'da oluşan $55586*10^6$ g fıstık

kabuğundan $8116*10^6$ g şeker ve bu şekerden $2110*10^3$ L = 2.11 milyon litre =2110 m^3 etanol elde edilebileceği hesaplanmıştır.

Ozon + sıcak su ön işlemi sonucunu değerlendirdiğimizde ise maksimum şeker miktarı 8.24 g/L, maksimum etanol miktarı 2.33 g/L ve etanol verimliliği %55.39 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre 1 g fıstık kabuğundan 164.8 mg şeker elde edildiği buna göre sadece Şanlıurfa'da oluşan $55586*10^6$ g kabuktan $9160*10^6$ g şeker ve bu şekerden $9160*10^6$ g şekerden $2.519*10^6$ L = 2.386 milyon litre = 2386 m^3 etanol elde edilebileceği hesaplanmıştır.

Bu verilere göre kıyaslama yapıldığında sadece Şanlıurfa'da üretilen fıstık kabuğu atıklarından elde edilen biyoetanolden, Türkiye'deki ihtiyacın yaklaşık %2'lik kısmının karşılanabileceği görülmektedir. Yapılacak çalışmalarla lignin giderimi ve elde edilen indirgen şeker miktarı arttırılarak bu oran daha da arttırılabilir. Enzimatik hidroliz aşamasında kullanılan enzimin ithal olması, üretilen biyoetanolün maliyetini arttıran bir etken olmasına karşın lignoselülozik hammaddelerle yapılan çalışmaların her geçen gün artmasıyla ortaya çıkacak yeni yöntemlerle bu maliyetin azalarak lignoselülozik hammaddelerin biyoetanol üretiminde kullanımı yaygınlaşacaktır. Bu durum fosil yakıtların çoğunu ithal kaynaklardan sağlayan ülkemizde dışa bağımlılığı azaltmamızı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

ACAROĞLU, M., OĞUZ, H., ve ÜNALDI, M., 2004. Türkiye İçin Alternatif Bir Yakıt: Biyoetanol, Yakıt Olarak Kullanımı ve Emisyon Değerleri, Biyoenerji 2004 Sempozyumu, Ekim 2004, İzmir.

AGGARWAL, N.K., NIGAM, P., SINGH, D., and YADAV, B.S., 2001. Process Optimization For The Production Of Sugar For The Bioethanol İndustry From Sorghum, A Non-Conventional Source Of Starch. World Journal of Microbiology & Biotechnology.

AMUTHA, R., and GUNASEKARAN, P., 2001. Production Of Ethanol From Liquefied Cassava Starch Using Co-İmmobilized Cells Of *Zymomonas Mobilis* And *Saccharomyces Diastaticus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 92(6):560-564.

ANDERSEN, S. L. F., CASTOLDİ, R., GARCİA, J. A., BRACHT, A., PERALTA, R. A., DE LİMA, E. A., HELM, C. V., MOREİRA R. F. P. M., and PERALTA, R. M., 2019. Improving Enzymatic Saccharification Of Eucalyptus Grandis Branches By Ozone Pretreatment. Wood Science and Technology, 53(1):49-69.

ARAPOGLOU, D., VARZAKAS, T., VLYSSİDES, A., and ISRAİLİDES, C. J. W. M., 2010. Ethanol Production From Potato Peel Waste (PPW). Waste Management, 30(10):1898-1902.

AWEDEM WOBİWO, F., CHATURVEDİ, T., BODA, M., FOKOU, E., EMAGA, T. H., CYBULSKA, I., DELEU, M., GERİN, P. A., and THOMSEN, M. H., 2019. Bioethanol Potential Of Raw And Hydrothermally Pretreated Banana Bulbs Biomass İn Simultaneous Saccharification And Fermentation Process With *Saccharomyces Cerevisiae*. Biomass Conversion and Biorefinery, 9(3):553-563.

BAIG, K. S., WU, J., TURCOTTE, G., and DOAN, H. D., 2015. Novel Ozonation Technique To Delignify Wheat Straw For Biofuel Production. Energy & Environment, 26(3):303-318.

BALAT, M., 2009. Gasification Of Biomass To Produce Gaseous Products. Energy Sources, Part A, 31(6):516-526.

BALAT, M., 2011. Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials via the Biochemical Pathway: A Review. Energy Conversion and Management, 52 (2): 858-875.

BARI, I. D., CUNA, D., NANNA, F., and BRACCIO, G., 2004. Ethanol Production in İmmobilized-Cell Bioreactors From Mixed Sugar Syrups and Enzymatic Hydrolysates of Steam-Exploded Biomass. Appl. Biochem. Biotechnol., 113-116:539-557.

BEPA 2018. T.C. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Enerji İşleri Genel Müdürlüğü, Türkiye Biyokütle Enerjisi Potansiyeli Atlası. https://bepa.enerji.gov.tr/. Son erişim tarihi 01.02.2023.

BHATTARAİ, S., BOTTENUS, D., IVORY, C. F., GAO, A. H., BULE, M., GARCİA-PEREZ, M., and CHEN, S., 2015. Simulation Of The Ozone Pretreatment Of Wheat Straw. Bioresource Technology, 196:78-87.

BJERRE, A. B., OLESEN, A. B., FERNQVİST, T., PLÖGER, A., and SCHMİDT, A. S., 1996. Pretreatment Of Wheat Straw Using Combined Wet Oxidation And Alkaline Hydrolysis Resulting İn Convertible Cellulose And Hemicellulose. Biotechnology and bioengineering, 49(5):568-577.

BRADSHAW, T. C., ALİZADEH, H., TEYMOURİ, F., BALAN, V., and DALE, B. E., 2007. Ammonia Fiber Expansion Pretreatment And Enzymatic Hydrolysis On Two Different Growth Stages Of Reed Canarygrass. In Applied Biochemistry and Biotecnology (395-405). Humana Press.

CADOCHE, L., and LOPEZ, G.D., 1989. Assesment Of Size Reductionas A Preliminary Step İn The Production Of Ethanol From Lignocellulosic Wastes. Biological Wastes, 30: 153-157.

CARA, C., RUIZ, E., BALLESTEROS, M., MANZANARES, P., NEGRO, J., and CASTRO, E., 2008. Production Of Fuel Ethanol From Steam-Explosion Pretreated Olive Tree Pruning, Fuel, 87(6):692–700.

CARRİLLO-NİEVES, D., SALDARRİAGA-HERNANDEZ, S., GUTİÉRREZ-SOTO, G., ROSTRO-ALANİS, M., HERNÁNDEZ-LUNA, C., ALVAREZ, A. J., IQBAL, H. M. N., and PARRA-SALDÍVAR, R., 2020. Biotransformation Of Agro-İndustrial Waste To Produce Lignocellulolytic Enzymes And Bioethanol With A Zero Waste. Biomass Conversion and Biorefinery, 1-12.

CASABAR, J. T., UNPAPROM, Y., and RAMARAJ, R., 2019. Fermentation Of Pineapple Fruit Peel Wastes For Bioethanol Production. Biomass Conversion And Biorefinery, 9(4):761-765.

CHER, Y., STEVENS, M. A., ZHU, Y., HOLMES, J., and XU, H., 2013. Understanding The Alkaline Pretreatments Parameters Of Corn Stover Enzymatic Saccarification. Biotechnology Biofuels, 6(8).

CHUNG, Y.C., BAKALINSKY, A., and PENNER, M.H., 2005. Enzymatic Saccharification and Fermentation of Xylose-Optimzed Dilute Acid-Treated Lignocellulosics. Appl. Biochem. Biotechnol. 124: 947-961.

CONDE-MEJIA, C., JIMENEZ-GUTIERREZ, A., and EL-HALWAGI, M., 2012. A Comparison of Pretreatment Methods for Bioethanol Production From Lignocellulosic Materials, Process Safety and Environmental Protection, 90(3):189-202.

CORBİN, K. R., HSİEH, Y. S., BETTS, N. S., BYRT, C. S., HENDERSON, M., STORK, J., DEBOLT, S., FİNCHER, G. B. and BURTON, R. A., 2015. Grape Marc As A Source Of Carbohydrates For Bioethanol: Chemical Composition, Pre-Treatment And Saccharification. Bioresource Technology, 193:76-83.

DAĞDELEN, D., 2015. Küresel Biyoyakıt Politikalarının AB ve Türkiye Açısından Değerlendirilmesi, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü, AB Uzmanlık Tezi. http://www.tarim.gov.tr/ABDGM/Belgeler/İDARİ%20İŞLER/Uzmanlik%20Tez%20mayıs%202015/Derya%20Dagdelen.pdf. Son erişim tarihi 01.02.2023.

DALE, B. E., 1986. U.S. Patent No. 4,600,590. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

DEMİRBAŞ, A., 2008. Biofuels Sources, Biofuel Policy, Biofuel Economy And Global Biofuel Projections. Energy Conversion and Management, 49:2106-2116.

DEVLET İSTATİSTİK ENSTİTÜSÜ(DİE), 2004. Tarımsal Yapı ve Üretim 2002. T.C. Başbakanlık DİE Matbaası, Ankara.

DIEN, B.S., NAGLE, N., HICKS, K.B., SINGH, V., MOREAU, R.A., TUCKER, M.P., NICHOLS, N.N., JOHNSTON, D.B., COTTA, M.A., NGUYEN, Q., and BOTHAST, R.J., 2004. Fermentation of "Quick Fiber" Produced from a Modified Corn-Milling Process into Ethanol and Recovery of Corn Fiber Oil. Applied Biochemistry and Biotechnology, 115(1):937-949.

DORRİS, G. M., and GRAY, D. G., 1978. The Surface Analysis Of Paper And Wood Fibers By ESCA, II. Surface Composition Of Mechanical Pulps. Cellul. Chem. Technol., 12:721–734.

EASSON, D.L., WOODS, V.B., and FORBES, E.G.A., 2004. Potential of Cropping for Liquid Biofuels in Northern Ireland, Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, The Agricultural Research Institute of Northern Ireland, Haziran 2004.

EIA (U.S. Energy Information Administration), 2019. http://www.eia.gov/beta/international/data/browser/#/?pa=000000000000000000000000001im&tl_id=2-A&vs=INTL.29-12-FRCBKWH.A&vo=0&v=H&start=1980&end=2014. Son erişim tarihi 01.02.2023.

EKLUND, R., and ZACCHI, G., 1995. Simultaneous Saccharification And Fermentation Of Steam-Pretreated Willow. Enzyme and Microbial Technology, 17(3): 255-259.

ENERJİ PİYASASI DÜZENLEME KURUMU, 2017. Benzin Türlerine Etanol Harmanlanmasi Hakkinda Tebliğ. http://www.epdk.org.tr/Detay/Icerik/3-3098/benzin-turlerine-etanol-harmanlanmasi-hakkinda-teblig. Son erişim tarihi 01.02.2023.

ESTEGHLALIAN, A., HASHIMOTO, A., FENSKE, J.J., and PENNER, M.H., 1997. Modeling and Optimization of the Dilute-Sulfuric-Acid Pretreatment of Corn Stover, Poplar and Switchgrass. Bioresource Technology, 59(2-3): 129-136.

ESTEGHLALIAN, A. R., SRIVASTAVA, V., GILKES, N., GREGG, D. J., and SADDLER, J. N., 2001. An Overview of Factors Influencing the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Feedstocks. ACS Symp. Ser., 769: 100-111.

ETHAIB, S., OMAR, R., MUSTAPA KAMAL, S. M., and AWANG BIAK, D. R., 2020a. Comparison of Sodium Hydroxide and Sodium Bicarbonate Pretreatment Methods For Characteristic and Enzymatic Hydrolysis of Sago Palm Bark. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 1-11.

ETHAIB, S., OMAR, R., MAZLINA, M. S., RADIAH, A. D., and ZUBAIDI, S. L., 2020b. Toward Sustainable Processes of Pretreatment Technologies of Lignocellulosic Biomass For Enzymatic Production of Biofuels and Chemicals: A Review. BioResources, 15(4): 10063.

FANG, Z. F., LİU, K. L., CHEN, F. S., ZHANG, L. F., and GUO, Z., 2014. Cationic Surfactant-Assisted Microwave-Naoh Pretreatment For Enhancing Enzymatic Hydrolysis And Fermentable Sugar Yield From Peanut Shells. Bioresources, 9(1):1290-1302.

FAO (Food and Agricultural Organization of The United Nation), 2018. https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL. Son erişim tarihi 01.02.2023.

FERNANDEZ-BOLAÑOS, J., FELIZON, B., HEREDIA, A., RODRIGUEZ, R., GUILLEN, R., and JIMENEZ, A., 2001. Steam-Explosion of Olive Stones: Hemicellulose Solubilization and Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Bioresource Technology, 79: 53-61.

FERRO, M. D., FERNANDES, M. C., PAULİNO, A. F., PROZİL, S. O., GRAVİTİS, J., EVTUGUİN, D. V., and Xavier, A. M., 2015. Bioethanol Production From Steam Explosion Pretreated And Alkali Extracted Cistus Ladanifer (Rockrose). Biochemical Engineering Journal, 104:98-105.

GARCÍA-CUBERO, M. T., COCA, M., BOLADO, S., and GONZÁLEZ-BENİTO, G., 2010. Chemical Oxidation With Ozone As Pre-Treatment Of Lignocellulosic Materials for Bioethanol Production. Chemical Engineering Transactions, 21.

GOLLAPALLİ, L. E., DALE, B. E., and RİVERS, D. M., 2002. Predicting Digestibility Of Ammonia Fiber Explosion (AFEX)-Treated Rice Straw. Applied Biochemistry And Biotechnology, 98(1):23-35.

GÖNCÜ, B., ve GÜLŞEN, H., 2021. Enzymatic Conversion Of Pistachio (P*istacia vera* L.) Shells For Fermentable Sugar Production. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 43(12):1444-1455.

GÖNCÜ, B., GÜLŞEN, H., ve HOŞGÜN, E. Z., 2021. Bioethanol Production from Pistachio (*Pistacia vera* L.) Shells Applying Ozone Pretreatment and Subsequent Enzymatic Hydrolysis. Environmental Technology, 42(15):2438-2446.

GÖYCİNCİK, S., ve YÜCEL, Y., 2015. Defne Yaprağı Artığının Biyoetanol Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 29(1):87-96.

GROOTJEN, D. R. J., JANSEN, M. L., VAN DER LANS, R. G. J. M., and LUYBEN, K. C. A., 1991. Reactors in Series for the Complete Conversion of Glucose/Xylose Mixtures By *Pichia Stipitis* and *Saccharomyces Cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 13(10):828-833.

GU, T., HELD, M. A., and FAİK, A., 2013. Supercritical CO_2 And İonic Liquids For The Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass İn Bioethanol Production. Environmental Technology, 34(13-14):1735-1749.

GUERRERO, A. B., BALLESTEROS, I., and BALLESTEROS, M., 2018. The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. Fuel, 213:176-185.

GUO, M., SONG, W., and BUHAİN, J., 2015. Bioenergy And Biofuels: History, Status, And Perspective. Renewable And Sustainable Energy Reviews, 42:712-725.

HELLEN SATHYA, D. J., TURAKHİA, A. M., KUMAR, M. A., BALAJİ, N., SELVANAVEEN, S., VİNODHİNİ, G., and SEENUVASAN, M., 2017.

Bioethanol From Saccharificed Lignocellulosic Rich Aloe Vera Rinds Using *Saccharomyces Cerevisiae* MTCC 4779. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, And Environmental Effects, 39(13):1347-1352.

HIDENO, A., INOUE, H., TSUKAHARA, K., FUJİMOTO, S., MİNOWA, T., INOUE, S., ENDO, T., and SAWAYAMA, S., 2009. Wet Disk Milling Pretreatment Without Sulfuric Acid For Enzymatic Hydrolysis Of Rice Straw. Bioresource Technology, 100(10):2706-2711.

HINMAN, N. D., SCHELL, D. J., RİLEY, J., BERGERON, P. W., and WALTER, P. J., 1992. Preliminary Estimate Of The Cost Of Ethanol Production For SSF Technology. Applied Biochemistry And Biotechnology, 34(1):639-649.

HOŞGÜN, E. Z., and BOZAN, B. 2020. Effect Of Different Types Of Thermochemical Pretreatment On The Enzymatic Hydrolysis And The Composition Of Hazelnut Shells. Waste And Biomass Valorization, 11(7):3739-3748.

IEA, 2004. Biofuels for Transport: An International Perspective, International Energy Agency, Nisan 2004.

INC (International Nut& Dried Fruit), 2018/2019. The INC Launches The Statistical Yearbook. https://inc.nutfruit.org/the-inc-launches-the-statistical-yearbook-2018-2019-2/. Son erişim tarihi 01.02.2023.

INC (International Nut& Dried Fruit), 2019/2020. The INC Launches The Statistical Yearbook. https://inc.nutfruit.org/wp-content/uploads/2021/09/1594640174INCStatisticalYearbook2019-2020.pdf. Son erişim tarihi 01.02.2023.

INGRAM, L.O., LAI, X., MONIRUZZAMAN, M., WOOD, B.E., and YORK, S.W., 1997. Fuel Ethanol Production from Lignocellulose Using Genetically Engineered Bacteria. ACS Symp. Ser. 666:57-73.

INOUE, H., YANO, S., ENDO, T., SAKAKİ, T., and SAWAYAMA, S., 2008. Combining Hot-Compressed Water And Ball Milling Pretreatments To İmprove The Efficiency Of The Enzymatic Hydrolysis Of Eucalyptus. Biotechnology For Biofuels, 1(1):1-9.

JARVIS, M.C., and BRIAN, T., 2003. Prımary Products | Cellulose, Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Elsevier, Oxford, 865-871.

JIN, X., SONG, J., and LİU, G. Q., 2020. Bioethanol Production From Rice Straw Through An Enzymatic Route Mediated By Enzymes Developed İn-House From Aspergillus Fumigatus. Energy, 190, 116395.

JOHN, I., POLA, J., MUTHUKUMAR, K., THANABALAN, M., and APPUSAMY, A., 2022. Production Of Bioethanol From Sweet Lime Peel Via A Statistically Optimized Simultaneous Saccharification And Fermentation Process Using İsolated Enzymes. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, And Environmental Effects, 44(1):1327-1335.

JUNCHEN, L., IRFAN, M., and LIN, F., 2012. Bioconversion of Agricultural Waste to ethanol: A potential source of energy, Archives Des Sciences, 65(12):626-642.

KADAR, Z., SZENGYEL, Z., and RÉCZEY, K., 2004. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Of Industrial Wastes For The Production Of Ethanol. Industrial Crops and Products, 20(1):103-110.

KAPARAJU, P., SERRANO, M., THOMSEN, A.B., KONGJAN, P., and ANGELIDAKI, I., 2009. Bioethanol, Biohydrogen and Biogas Production From Wheat Straw in A Biorefinery Concept. Bioresource Technology, 100: 2562-2568.

KASİRİ, N., and FATHİ, M., 2018. Production Of Cellulose Nanocrystals From Pistachio Shells And Their Application For Stabilizing Pickering Emulsions. International Journal Of Biological Macromolecules, 106:1023–31.

KATARİA, R., and GHOSH, S., 2014. NaOH Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Saccharum Spontaneum For Reducing Sugars Production, Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 36:1028-1035.

KIM, D. E., and PAN, X., 2010. Preliminary Study On Converting Hybrid Poplar To High-Value Chemicals And Lignin Using Organosolv Ethanol Process. Industrial & Engineering Chemistry Research, 49(23):12156-12163.

KIM, J. S., LEE, Y. Y., and KIM, T. H., 2016. A Review On Alkaline Pretreatment Technology For Bioconversion Of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology, 199: 42-48.

KLİNKE, H. B., AHRİNG, B. K., SCHMİDT, A. S., and THOMSEN, A. B., 2002. Characterization Of Degradation Products From Alkaline Wet Oxidation Of Wheat Straw. Bioresource Technology, 82(1):15-26.

KNAUF, M. and MONIRUZZAMAN, M., 2004. Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective. Int. Sugar J., 106:147-150.

KOO, B. W., KİM, H. Y., PARK, N., LEE, S. M., YEO, H., and CHOİ, I. G., 2011. Organosolv Pretreatment Of Liriodendron Tulipifera And Simultaneous Saccharification And Fermentation For Bioethanol Production. Biomass and Bioenergy, 35(5):1833-1840.

LAVARACK, B.P., GRIFFIN, G.J. and RODMAN, D., 2002. The Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose to Produce Xylose, Arabinose, Glucose and Other Products. Biomass Bioenergy, 23:367-380.

LI, C., WANG, L., CHEN, Z., Lİ, Y., WANG, R., LUO, X., CAİ, G., Lİ, Y., YU, Q., and LU, J., 2015. Ozonolysis Pretreatment Of Maize Stover: The İnteractive Effect Of Sample Particle Size And Moisture On Ozonolysis Process. Bioresource Technology, 183:240-247.

LICHT, F. O., 2020. World Ethanol And Biofuels Report, Licht İnteractive Data 2020.

LIN, Y., and TANAKA, S., 2006. Etanol Fermentation from Biomass Resource: Current State and Prospect. Applied Microbiology and Biotechnology, 69(6):627-642.

LING, E., and SİLVEİRA, S., 2005. New Challenges For Bioenergy İn Sweden. In Bioenergy-Realizing The Potential, 31-46. Elsevier.

LIU, R., LI, J., and SHEN, F., 2008. Refining Bioethanol From Stalk Juice Of Sweet Sorghum By İmmobilized Yeast Fermentation. Renewable Energy, 33:1130-1135.

LYND, L.R., 1989. Production of Ethanol from Lignocellulosic Materials Using Thermophilic Bacteria: Critical Evaluation of Potential and Review, Advences in Biochemical Engineering/Biotechnology.

MAITY, S.K., 2015. Opportunities, Recent Trends And Challenges Of İntegrated Biorefinery: Part I. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 43:1427–1445.

MALIK, K., SALAMA, E. S., KIM, T. H., and LI, X., 2020. Enhanced Ethanol Production By *Saccharomyces Cerevisiae* Fermentation Post Acidic and Alkali Chemical Pretreatments Of Cotton Stalk Lignocellulose. International Biodeterioration & Biodegradation, 147, 104869.

MARTÍNEZ-PATİÑO, J. C., LU-CHAU, T. A., GULLON, B., RUİZ, E., ROMERO, I., CASTRO, E., and LEMA, J. M., 2018. Application Of A Combined Fungal And Diluted Acid Pretreatment On Olive Tree Biomass. Industrial Crops And Products, 121:10-17.

MCGİNNİS, G. D., WİLSON, W. W., PRİNCE, S. E., and CHEN, C. C., 1983. Conversion of Biomass İnto Chemicals With High-Temperature Wet Oxidation. Industrial & Engineering Chemistry Product Research And Development, 22(4):633-636.

MCMILLAN, J.D., 1997. Bioethanol Production: Status And Prospects. Renew Energy, (10):295–302.

MELİKOĞLU, M., ve ALBOSTAN, A., 2011. Türkiye'de Biyoetanol Üretimi ve Potansiyeli, Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 26(1):151-160.

MERAL, R., ve SAYDAN KAMBEROĞLU, G., 2012. Tahıllardan Etanol Üretimi, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(3):61-68.

MIKULSKI, D., and KŁOSOWSKİ, G., 2020. Microwave-Assisted Dilute Acid Pretreatment İn Bioethanol Production From Wheat And Rye Stillages. Biomass And Bioenergy, 136, 105528.

MILLET, M. A., EFFLAND, M. J., AND CAULFİELD, D. F., 1979. Influence Of Fine Grinding On The Hydrolysis Of Cellulosic Materials-Acid Vs Enzymic. Adv. Chem. Ser. (United States), 181.

MISHRA, V. S., MAHAJANİ, V. V., and JOSHİ, J. B., 1995. Wet Air Oxidation. Industrial & Engineering Chemistry Research, 34(1):2-48.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., and ARDJMAND, M., 2013. Lignocellulosic Biomass To Bioethanol, A Comprehensive Review With A Focus On Pretreatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27:77-93.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., HOLTZAPPLE, Y.Y.L.M., and LADISCH, M., 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology, 96:673–686.

MURNEN, H. K., BALAN, V., CHUNDAWAT, S. P., BALS, B., SOUSA, L. D. C., AND DALE, B. E., 2007. Optimization Of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment And Enzymatic Hydrolysis Of Miscanthus X Giganteus To Fermentable Sugars. Biotechnology Progress, 23(4):846-850.

NAGENDERAN, S., RAJAMAMUNDİ, P., CHANDRAN, M., AND GOPİNATH, K. P., 2020. Bioethanol From Moringa Olefira And Pithecellobium Dulce Leafs:

Production And Characterization. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 42(1):66-72.
NEELY, W. C. 1984. Factors Affecting The Pretreatment of Biomass With Gaseous Ozone. Biotechnology and Bioengineering, 26(1): 59-65.
NICHOLS, N.N., DIEN, B.S., and BOTHAST, R.J., 2001. Use of Catabolic Repression Mutants for fermentation of Sugar Mixtures to Ethanol, Appl Microbiol Biotechnol., 120–125.
NICOLETTİ, G., ARCURİ, N., NİCOLETTİ, G., AND BRUNO, R., 2015. A technical and environmental comparison between hydrogen and some fossil fuels. Energy Conversion and Management, 89, 205-213.
NIVEN, R.K., 2004. Ethanol in Gasoline: Environmental Impacts and Sustainability Review Article, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 9:535-555.
NLEWEM, K. C., and THRASH JR, E. T., 2010. Comparison Of Different Pretreatment Methods Based On Residual Lignin Effect On The Enzymatic Hydrolysis Of Switchgrass. Bioresource Technology, 101(14):5426–30.
O'CONNER, J. J. (1972). Ammonia Explosion Pulping-New Fiber Separation Process. Tappi, 55, 353-358.
OEERE (Office of Energy Efficiency & Renewable Energy), 2019. Bioenergy Basics. https://www.energy.gov/eere/bioenergy/bioenergy-basics. Son erişim tarihi: 23.12.2022.
OFORİ-BOATENG, C., and LEE, K. T., 2014. Ultrasonic-Assisted Simultaneous Saccharification And Fermentation Of Pretreated Oil Palm Fronds For Sustainable Bioethanol Production. Fuel, 119:285-291.
OMAR, W. N. N. W., and AMİN, N. A. S., 2016. Multi Response Optimization Of Oil Palm Frond Pretreatment By Ozonolysis. Industrial Crops and Products, 85:389-402.
ORTEGA, J. O., VARGAS, J. A. M., PERRONE, O. M., METZKER, G., GOMES, E., DA SİLVA, R., and BOSCOLO, M., 2020. Soaking And Ozonolysis Pretreatment Of Sugarcane Straw For The Production Of Fermentable Sugars. Industrial Crops And Products, 145, 111959.
PALMAROLA, B., JUHASZ, T., GALBE, M., and ZACCHI, G., 2004. Hydrolysis of Non-Starch Carbohydrates of Wheat-Starch Effluent for Ethanol Production. Biotechnology Progress, 20:474-479.
PALMOWSKI, L., and MULLER, J., 1999. Influence Of The Size Reduction Of Organic Waste On Their Anaerobic Digestion. In: II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. Barcelona, 137–144.
PARACHİN, N. S., HAHN-HÄGERDAL, B., and BETTİGA, M. A., 2011. Microbial perspective on ethanolic lignocellulose fermentation, 605–14. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
PETERSON, J. B. D., 2006. Ethanol Production from Agricultural Residues. International Sugar Journal, 108(1287):177-180.
PETROL SANAYİ DERNEĞİ, 2021. Sektör Verileri, 2021. https://www.petder.org.tr/Uploads/Document/b3770657-8cd4-4373-bf8b-501623f955d5.pdf?v-638052283434213217. Son erişim tarihi: 15.12.2022.

PHILIPPIDIS, G. P., 1996. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Washington, DC, Taylor and Francis, 253-285.

PRASAD, S., SINGH, A., and JOSHI, H.C., 2007. Ethanol As An Alternative Fuel From Agricultural, İndustrial And Urban Residues. Resour. Conserv. Recy., 50: 1–39.

PYE, E. K., 2005. Industrial Lignin Production And Applications. Biorefineries-Industrial Processes And Products: Status Quo And Future Directions, 165-200.

RANA, Q., REHMAN, M. L. U., IRFAN, M., AHMED, S., HASAN, F., SHAH, A. A., KHAN, S. and BADSHAH, M., 2019. Lipolytic Bacterial Strains Mediated Transesterification Of Non-Edible Plant Oils For Generation Of High Quality Biodiesel. Journal Of Bioscience And Bioengineering, 127(5):609-617.

RATANAKHANOKCHAI, K., WAEONUKUL, R., PASON P., TACHAAPAIKOON, C., KYU K.L., SAKKA K., KOSUGI, A., and MORI Y., 2010. Paenibacillus Curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System For Biomass Utilization, Biomass Now- Cultivation And Utilization. IntechOpen.

RAWAT, R., KUMBHAR, B. K. and TEWARİ, L., 2013. Optimization Of Alkali Pretreatment For Bioconversion Of Poplar (Populus Deltoides) Biomass İnto Fermentable Sugars Using Response Surface Methodology. Industrial Crops And Products, 44:220–26.

RFA (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION), 2016. Fueling High Octane Future, 2016. https://d35t1syewk4d42.cloudfront.net/file/31/RFA_2016_full_final.pdf. Son erişim tarihi 01.02.2023.

RODIONOVA, M. V., POUDYAL, R. S., TİWARİ, I., VOLOSHİN, R. A., ZHARMUKHAMEDOV, S. K., NAM, H. G., ZAYADAN, B. K., BRUCE, B. D., HOU, H. J. M., and ALLAKHVERDİEV, S. I., 2017. Biofuel Production: Challenges and Opportunities. International Journal of Hydrogen Energy, 42:8450-8461.

ROSEN, Y., MAMANE, H., and GERCHMAN, Y., 2019. Short Ozonation Of Lignocellulosic Waste As Energetically Favorable Pretreatment. Bioenergy Research, 12(2):292-301.

SADHUKHAN, J., MARTİNEZ-HERNANDEZ, E., AMEZCUA-ALLİERİ, M. A., and ABURTO, J., 2019. Economic And Environmental İmpact Evaluation Of Various Biomass Feedstock For Bioethanol Production And Correlations To Lignocellulosic Composition. Bioresource Technology Reports, 7, 100230.

SAHA, B.C., and BOTHAST, R.J., 1999. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corn Fiber. Applied Biochemistry and Biotechnology, 76 (2):65–77.

SAHA, B.C., 2003. Hemicellulose Bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnology, 30:279-291.

SAHA, B. C., ITEN, L. B., COTTA, M. A., and WU, Y. V., 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. Biotechnol. Prog., 21: 816-822.

SAHA, B. C., YOSHIDA, T., COTTA, M. A., and SONOMOTO, K., 2013. Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corn Stover for Efficient Ethanol Production. Industrial Crops and Products, 44:367-372.

SANDOUQA, A., AL-HAMAMRE, Z., and ASFAR, J., 2019. Structural Characteristics Of Lignin Extracted From Jordanian Olive Cake Using Different Fractionation Conditions. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 1-12.

SANT'ANNA, C., and DE SOUZA, W., 2012. Microscopy As A Tool To Follow Deconstruction Of Lignocellulosic Biomass, 639–45. Spain: Formatex Research Center.

SCHELL, D. J., and HARWOOD, C., 1994. Milling Of Lignocellulosic Biomass. Applied Biochemistry And Biotechnology, 45(1):159-168.

SCHELL, D. J., DOWE, N., CHAPEAUX, A., NELSON, R. S., and JENNİNGS, E. W., 2016. Accounting For All Sugars Produced During İntegrated Production Of Ethanol From Lignocellulosic Biomass. Bioresource Technology, 205, 153-158.

SCHMIDT, A.J., ORTH R.J., FRANZ J.A., and ALNAJJAR M., 2004. Hydrolysis of Biomass Material (No. 6,692,578). Pacific Northwest National Lab. (PNNL), Richland, WA (United States).

SCHMIDT, A. S., and THOMSEN, A. B., 1998. Optimization Of Wet Oxidation Pretreatment Of Wheat Straw. Bioresource Technology, 64(2):139-151.

SEGAL, L., J. J. CREELY, A. E. MARTİN JR, and C. M. CONRAD. 1959. An Empirical Method For Estimating The Degree Of Crystallinity Of Native Cellulose Using The X-Ray Diffractometer. Textile Research Journal 29 (10):786–94.

SEQUEİRA, C. A. C., BRİTO, P. S. D., MOTA, A. F., CARVALHO, J. L., RODRİGUES, L. F. F. T. T. G., SANTOS, D. M. F., BARRİO, D. B., and JUSTO, D. M., 2007. Fermentation, Gasification And Pyrolysis Of Carbonaceous Residues Towards Usage İn Fuel Cells. Energy Conversion and Management, 48(7):2203-2220.

SINGH, N. B., KUMAR, A., and RAİ, S., 2014. Potential Production Of Bioenergy From Biomass İn An Indian Perspective. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 39:65-78.

SLUITER, A., HAMES, B., RUİZ, R., SCARLATA C., SLUİTER, J., and TEMPLETON, D., 2008a. Determination of Ash in Biomass, https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf. Son erişim tarihi: 29.09.2022.

SLUITER, A., HAMES, B., RUİZ, R., SCARLATA, C., SLUİTER, J., TEMPLETON, D., and CROCKER, D., 2008b. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf. Son erişim tarihi: 29.09.2022.

SLUITER, J.B., RUIZ, R.O., SCARLATA, C.J., SLUITER, A.D., and TEMPLETON, D.V., 2010. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods, J Agric Food Chem, 58:9043-9053.

SMITH, A.M., 2008. Prospects For İncreasing Starch And Sucrose Yields For Bioethanol Production. Plant J. 54:546–58.

SUBHEDAR, P. B., and GOGATE, P. R., 2014. Alkaline And Ultrasound Assisted Alkaline Pretreatment For İntensification Of Delignification Process From Sustainable Raw-Material. Ultrasonics Sonochemistry, 21(1):216-225.

SUBHEDAR, P. B., RAY, P., and GOGATE, P. R., 2018. Intensification Of Delignification And Subsequent Hydrolysis For The Fermentable Sugar Production From Lignocellulosic Biomass Using Ultrasonic İrradiation. Ultrasonics Sonochemistry, 40:140-150.

SUN, Y., and CHENG, J., 2002. Hydrolysis Of Lignocellulosic Materials For Ethanol Production: A Review. Bioresource Technology, 83:1.

TAHERZADEH, M. J., and NIKLASSON, C., 2004. Ethanol from Lignocellulosic Materials: Pretreatment, Acid and Enzymatic Hydrolyses, and Fermentation. ACS Symp. Ser. 889: 49-68.

TAN, L., ZHONG, J., JİN, Y. L., SUN, Z. Y., TANG, Y. Q., and KİDA, K., 2020. Production Of Bioethanol From Unwashed-Pretreated Rapeseed Straw At High Solid Loading. Bioresource Technology, 303, 122949.

TERAMOTO, Y., TANAKA, N., LEE, S. H., and ENDO, T., 2008. Pretreatment Of Eucalyptus Wood Chips For Enzymatic Saccharification Using Combined Sulfuric Acid-Free Ethanol Cooking And Ball Milling. Biotechnology And Bioengineering, 99(1):75-85.

TEYMOURİ, F., LAUREANO-PEREZ, L., ALİZADEH, H., and DALE, B. E., 2005. Optimization Of The Ammonia Fiber Explosion (AFEX) Treatment Parameters For Enzymatic Hydrolysis Of Corn Stover. Bioresource Technology, 96(18):2014-2018.

THOMAS, V., and KWONG, A., 2001. Ethanol As A Lead Replacement: Phasing Out Leaded Gasoline İn Africa, Energy Policy, 29:1133-1143.

TILLMAN, L. M., LEE, Y. Y., and TORGET, R., 1990. Effect Of Transient Acid Diffusion On Pretreatment/Hydrolysis Of Hardwood Hemicellulose. Applied Biochemistry And Biotechnology, 24(1):103-113.

TOMAS-PEJO, E., OLIVA, J. M., BALLESTEROS, M., and OLSSON, L., 2008. Comparison Of SHF And SSF Processes From Steam-Exploded Wheat Straw For Ethanol Production By Xylose-Fermenting And Robust Glucose-Fermenting *Saccharomyces Cerevisiae* Strains. Biotechnology And Bioengineering, 100(6):1122-1131.

TSEGAYE, B., BALOMAJUMDER, C., and ROY, P., 2019. Alkali Pretreatment Of Wheat Straw Followed By Microbial Hydrolysis For Bioethanol Production. Environmental Technology, 40(9):1203-1211.

TURNER, N. D., MCDONOUGH, C. M., BYERS, F. M., HOLTZAPPLE, M. T., DALE, B. E., JUN, J. H., and GREENE, L. W., 1990. Disruption Of Forage Structure With An Ammonia Fiber Explosion Process. Proceedings, Western Section, American Society Of Animal Sciences. J Anim Sci, 68, 194.

TUROV, Y.Y., 1965. Petrochemical Production of Japan, Chemistry and Technology of Fuels and Oils.

VARGA, E., RECZEY, K., and ZACCHI, G., 2004. Optimization of Steam Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzymatic Digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology, 113-116:509-523.

WBA (World Bioenergy Association), 2016. WBA Global Bioenergy Statistics. https://seors.unfccc.int/applications/seors/attachments/get_attachment?code=NZCFDXN3HX6YLK3N9HTAXQVOD4276UWD. Son erişim tarihi: 23.12.2022.

WYMAN, C. E., DALE, B. E., ELANDER, R. T., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. R., and LEE, Y. Y., 2005. Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies. Bioresource Technology, 96(18):1959-1966.

XIA, F., GONG, J., LU, J., CHENG, Y., ZHAİ, S., AN, Q., and WANG, H., 2020. Combined Liquid Hot Water With Sodium Carbonate-Oxygen Pretreatment To İmprove Enzymatic Saccharification Of Reed. Bioresource Technology, 297, 122498.

XU, J., and CHENG, J. J., 2011. Pretreatment of Switchgrass For Sugar Production With The Combination Of Sodium Hydroxide And Lime. Bioresource Technology, 102(4):3861-3868.

YAMAN, S., 2004. Pyrolysis of Biomass to Produce Fuels and Chemical Feedstocks. Energy Convers. Management, 45:651–671.

YANG, M., LAN, M., GAO, X., DOU, Y., and ZHANG, X., 2021. Sequential Dilute Acid/Alkali Pretreatment Of Corncobs For Ethanol Production. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, And Environmental Effects, 43(14):1769-1778.

ZHANG, M.J., WANG, F., SU, R.X., QI, W., and HE, Z.M., 2010. Ethanol Production From High Dry Matter Corncob Using Fed-Batch Simultaneous Saccharification And Fermentation After Combined Pretreatment. Bioresource Technology, 101:4959–4964.

ZHAO, X., CHENG, K., and LİU, D., 2009. Organosolv Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass For Enzymatic Hydrolysis. Applied Microbiology And Biotechnology, 82(5):815-827.

ZHENG, Y., ZHONGLI, P., and ZHANG, R., 2009. Overview Of Biomass Pretreatment For Cellulosic Ethanol Production. Int J Agric & Biol Eng, 2(3):51-68.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., and Lİ, Y., 2014. Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass For Enhanced Biogas Production. Progress İn Energy And Combustion Science, 42:35-53.