

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİGNOSELÜLOZİK İÇERİĞE SAHİP FARKLI TARIMSAL  
KAYNAKLARDAN ETANOL ÜRETİMİ**

**Fadime DEMİREL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**2017**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİGNOSELÜLOZİK İÇERİĞE SAHİP FARKLI TARIMSAL  
KAYNAKLARDAN ETANOL ÜRETİMİ**

**Fadime DEMİREL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
(BAP) tarafından FYL-2016-1774 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**2017**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİGNOSELÜLOZİK İÇERİĞE SAHİP FARKLI TARIMSAL  
KAYNAKLARDAN ETANOL ÜRETİMİ

Fadime DEMİREL

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 11/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN



Prof. Dr. Ayhan TOPUZ



Doç. Dr. Aslı İŞÇİ YAKAN



## ÖZET

### LİGNOSELÜLOZİK İÇERİĞE SAHİP FARKLI TARIMSAL KAYNAKLARDAN ETANOL ÜRETİMİ

Fadime DEMİREL

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN  
Nisan 2017, 91 sayfa

Son yıllarda artan nüfus ve teknoloji yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Biyoetanol fosil yakıt tabanlı enerjilere alternatif olarak kullanılabilir. Biyoetanol üretimi için mısır, şeker kamışı, şeker pancarı, buğday ve arpa dünyada en yaygın kullanılan tarımsal kaynaklardır. Etanol üretiminde kullanılabilen umut vadeden yeni alternatif karbon kaynaklarının çoğunu dünyada en bol bulunan lignoselülozik biyokütle oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı lignoselülozik materyaller olan arpa kavuzu (AK), yulaf kavuzu (YK), buğday kepeği (BK) ve çavdar kepeğinin (ÇK) seyreltik asit hidrolizini cevap yüzey metodu (response surface method, RSM) kullanılarak optimize etmek, elde edilen hidrolizatları aktif kömür ile detoksifiye etmek ve *Pichia stipitis* ATCC 58784 ve ATCC 58785 suşları ile etanol üretmektir. Çalışmada sıcaklık, katı: sıvı oranı (K:S), asit oranı (AO) ve hidroliz süresi bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bu amaçla, RSM için her bir parametrenin aralığını belirlemek üzere her-defada-tek-etken (one-factor-at-a-time, OFAT) metodu kullanıldı. Optimum hidroliz koşulları AK için 130 °C sıcaklık, 1:8 (w/v) K:S, %1.86 (v/v) AO, 30 dk hidroliz süresi; BK için 121°C sıcaklık, 1:8 (w/v) K:S, %2.66 (v/v) AO, 30 dk; ÇK için 130°C sıcaklık, 1:8 (w/v) K:S, %1.58 (v/v) AO, 16 dk hidroliz süresi ve YK için ise 130°C sıcaklık, 1:8 (w/v) K:S, %1 (v/v) AO ve 19 dk hidroliz süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda fermente edilebilir şeker konsantrasyonu ise AK, BK, ÇK ve YK için sırasıyla 76.28, 72.73, 89.42 ve 59.63 g/L'dir. Sonrasında elde edilen hidrolizatların aktif kömür detoksifikasyon koşulları (konsantrasyon, sıcaklık ve süre) RSM kullanılarak optimize edilmiştir. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatları kullanılarak etanol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyonların sonunda şeker tüketimi, etanol üretimi, etanol verimi, maksimum tüketim hızı, spesifik gelişim hızı, ikiye katlanma süresi ve şeker kullanım oranı gibi kinetik parametreler hesaplanmıştır. AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatlarından elde edilen en yüksek etanol konsantrasyonları sırasıyla 7,68, 7,33, 11,18 ve 4.49 g/L olarak belirlenmiştir. En yüksek sonuçlar *P. stipitis* ATCC 58784 kullanılan fermentasyonlar sonucunda ve maksimum aktif kömür kullanılan detoksifikasyon işlemiyle elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonunda, *P. stipitis* mayası kullanılarak AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatlarından etanol üretimleri gerçekleştirilmiştir. Aktif kömür

detoksifikasyonunun etanol verimini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca çalışma, bu materyallerin biyoteknolojik prosesler için alternatif bir karbon kaynağı olduğunu göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Aktif kömür, arpa ve yulaf kavuzu, buğday ve çavdar kepeği, cevap yüzey metodu(RSM), detoksifikasyon, etanol, her defada-tek-etken(OFAT), ön-işlem, *Pichia stipitis*

**JÜRİ:** Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)  
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ  
Doç. Dr. Aslı İŞÇİ YAKAN

## ABSTRACT

### ETHANOL PRODUCTION FROM DIFFERENT AGRICULTURAL RESOURCES WITH LIGNOCELLULOSIC CONTENT

Fadime DEMİREL

MSc Thesis in Food Engineering  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İrfan TURHAN  
April 2017, 91 pages

In recent years, increasing population and technology have made necessary the use of renewable energy resources. Bioethanol can be used as an alternative to fossil fuel-based energies. Corn, sugar cane, sugar beet, wheat and barley are the most widely used agricultural resources in the world for bioethanol production. Most of promising new alternative carbon sources that can be used in ethanol production is the most abundant available lignocellulosic biomass in the world.

The main objectives of this study were to optimize the dilute acid hydrolysis conditions of lignocellulosic materials such as barley hull (BH), oat hull (OH), wheat bran (WB) and rye bran (RB) using response surface method (RSM), to optimize the detoxification conditions with activated charcoal of the obtained hydrolysates, and to produce ethanol with the yeasts *Pichia stipitis* ATCC 58784 and ATCC 58785. Temperature (°C), solid-to-liquid ratio (w/v), dilute sulfuric acid ratio (% v/v), and hydrolysis time (min) were used as independent variables. For this purpose, the one-factor-at-a-time (OFAT) method was used to determine the range of each parameter for RSM. The optimized conditions of BH were 130°C, 1:8 (w/v), 1.86% (v/v), and 30 min; the optimized conditions of WB were 121°C, 1:8 (w/v), 2.66% (v/v), 30 min; the optimized conditions of RB were 130°C, 1:8 (w/v), 1.58% (v/v), 16 min; and the optimized conditions of OH were 130°C, 1:8 (w/v), 1% (v/v), 19 min (v/v), respectively. Under these conditions, fermentable sugar concentrations were 76.28, 72.73, 89.42 59.63 g/L, respectively. Following that, the activated charcoal detoxification conditions of the obtained hydrolysates under hydrolysis conditions were optimized in terms of activated charcoal concentration (%), temperature (°C), and application time (min) by using RSM. After determining the optimal detoxification conditions of hydrolysates, the non-detoxified (for control) and detoxified hydrolysates were used for ethanol production by using the yeasts *Pichia stipitis* ATCC 58784 and ATCC 58785.

At the end of the fermentations, kinetics parameters such as glucose consumption, ethanol production, ethanol production, maximum consumption rate, specific growth rate, doubling time, and sugar utilization were calculated. The highest ethanol concentrations which obtained from the BH, WB, RB, and OH hydrolysates were determined to be 7.68, 7.33, 11.18 ve 4.49 g/L, respectively. The highest results were achieved at the result of fermentations-performed using *Pichia stipitis* ATCC 58784 and with detoxification process in which the maximum activated charcoal was used.

At the end of the studies, ethanol productions were carried out from BH, WB, RB, and OH hydrolysates using the yeast *Pichia stipitis*. The ethanol yield was increased with the activated charcoal detoxification. This study also indicates that these materials are an alternative carbon source for biotechnological processes.

**KEYWORDS:** Activated charcoal, barley and oat hulls, wheat and rye brans, one-factor-at-a-time (OFAT), response surface method (RSM), pre-treatment, detoxification, *Pichia stipitis*, ethanol

**COMMITTEE:** Assoc. Prof. Dr.Irfan TURHAN (Supervisor)  
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ  
Assoc. Prof. Dr. Aslı ISCI YAKAN

## ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun sürekli bir artış içerisinde olması, ilerleyen teknoloji ve insanlığın daha kaliteli yaşam isteği enerjiye olan ihtiyacı artırmaktadır. Kaynak kıtlığı vb. etmenler biyokütle enerjisinin kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Karbon içeren her türlü bitkisel veya hayvansal atıklardan oluşan organik maddeler biyokütle olarak adlandırılmaktadır. Biyokütle güneş var olduğu sürece tükenmeyecek eşsiz bir karbon kaynağıdır.

Lignoselülozik materyaller, dünyada en bol bulunan karbon kaynaklarıdır. Lignoselülozik biyokütle bileşiminde selüloz, hemiselüloz ve lignin bulundurmaktadır. Ülkemizde tarımsal atık olarak yıllık yaklaşık 50-65 milyon ton biyokütle oluşmaktadır (Anonim 2011). Bu rakamı ise arpa, buğday ve çavdar samanları, arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, pirinç kavuzu, orman atıkları ve asma budama atıkları gibi bol selüloz içeriğine sahip materyaller oluşturmaktadır. Karbonhidrat açısından zengin olan bu lignoselülozik materyallerden katma değeri yüksek ürünler (biyoyakıtlar, organik asitler, sağlık-bakım ürünleri, enzimler vd.) elde edilebilmektedir.

Günümüzde lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak literatür, ülkemizde gıda endüstrisinin önemli lignoselülozik atıkları olan AK, BK, ÇK ve YK gibi materyallerin katma değeri yüksek ürün eldesinde değerlendirilmesi açısından yeterli olmadığını göstermektedir. Bu tez çalışması ile yukarıda ismi geçen lignoselülozik materyallerin seyreltik sülfürik asit ile hidroliz koşullarının maksimum ve minimum noktaları her-defada-tek-etken (one-factor-at-a-time, OFAT) ile belirlenmiş, cevap yüzey metodu (response surface method, RSM) kullanılarak materyallerin hidroliz koşullarının optimizasyonunu gerçekleştirilmiş ve aktif kömür ile detoksifiye edilen hidrolizattan hem pentozları hem de heksozları fermente edebilen *Pichia stipitis* suşları kullanılarak etanol üretilmiştir. Bununla beraber, materyallerin selüloz, hemiselüloz, lignin ve ekstraktif bileşenler açısından içeriği belirlenmiştir. Ayrıca, optimum koşullar kullanılarak elde edilen hidrolizatın toplam fermente edilebilir şeker konsantrasyonu (FŞK), glukoz, ksiloz, arabinoz, maltoz ve galaktoz içeriği ve toplam fenolik madde konsantrasyonu (FMK), asetik asit, HMF ve furfural gibi inhibitör konsantrasyonu belirlenmiş olup ve detoksifiye edilecek hidrolizatlara da uygulanmıştır. Çalışmanın bir diğer amacı da bu materyallerin farklı katma değeri yüksek ürün eldesinde de değerlendirilebileceğini ortaya koymaktır.

Bana bu konuyu çalışma fırsatı veren, çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), tez konumun belirlenmesinden yazılmasına kadar her türlü emek ve destekleri için Arş. Gör. Mustafa GERMEÇ'e (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), hem bilgi ve tecrübeleri hem de manevi destekleri için Öğr. Gör. Ercan YATMAZ'a (Akdeniz Üniversitesi Göynük Meslek Yüksekokulu) teşekkür ederim.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların teminini sağlayan Doç. Dr. Aslı İŞÇİ YAKAN'a (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve çalışmada kullanılan materyali temin eden Sağlık Tarım Ürünleri ve Gıda San. Ltd. Şti yetkililerine ve



projeye verdikleri destekten dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığımız ekip arkadaşlarım Merve ILGIN, Kübra TARHAN, Ercan KARAHALİL ve Nour Bean BADER'e teşekkür ederim. Yine her türlü destekleri için aynı odayı paylaştığımız lisansüstü öğrenci arkadaşlarım ve hocalarım ayrıca her türlü teknik sorunlarda yardımını esirgemeyen Emrah EROĞLU'na teşekkür ederim. Son olarak her zaman yanımda olan kıymetli arkadaşım Ayşe TORUN'a ve bana inanan, güvenen ve her koşulda bana destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Biyoetanol.....	3
2.2. Biyokütle ve Biyokütle Enerjisi.....	5
2.3. Lignoselülozik Biyokütle.....	6
2.3.1. Lignoselülozik materyallerin bileşimi.....	8
2.3.2. Lignoselülozik materyallerin ön işleme.....	12
2.3.3. Lignoselülozik hidrolizatların inhibitörleri.....	14
2.3.4. Lignoselülozik hidrolizatların detoksifikasyonu.....	16
2.4. Etanol Fermentasyonu.....	17
2.4.1. Etanol Üreten Mikroorganizmalar.....	17
2.4.2. Fermentasyonda kullanılan maya: <i>P. stipitis</i> .....	18
3. MATERYAL ve METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Etanol üretiminde kullanılan tarımsal kaynaklar.....	20
3.1.2. Mikroorganizmalar ve besiyerleri.....	20
3.1.3. Araştırmanın deneme deseni.....	21
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Materyallerin bileşen ve nem analizleri.....	21
3.2.2. Lignoselülozik materyallerin hidroliz koşullarının OFAT ile optimizasyonu.....	23
3.2.3. Lignoselülozik materyallerin hidroliz koşullarının RSM ile optimizasyonu.....	24
3.2.4. Lignoselülozik hidrolizatların detoksifikasyonu.....	25
3.2.5. Etanol fermentasyonu.....	27
3.2.6. Analiz yöntemleri.....	28
3.2.6.1. Toplam indirgen şeker.....	28
3.2.6.2. Şeker profili.....	28
3.2.6.3. Fenolik bileşikler.....	29
3.2.6.4. Furfural ve HMF.....	29
3.2.6.5. Organik asitler.....	29
3.2.6.6. Etanol analizi.....	30
3.2.6.7. Biyokütle analizi.....	30
3.2.7. İstatistiksel analiz.....	30
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	31
4.1. Lignoselülozik Materyallerin Bileşen ve Nem Analizleri.....	31
4.2. Lignoselülozik Materyallerin Hidroliz Koşullarının OFAT ile Belirlenmesi ...	31
4.2.1. AK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi.....	31

4.2.2. BK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi .....	34
4.2.3. ÇK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi .....	36
4.2.4. YK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi .....	39
4.3. Lignoselülozik materyallerin hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi .....	41
4.3.1. AK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi .....	42
4.3.2. BK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi .....	44
4.3.3. ÇK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi .....	48
4.3.4. YK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi .....	51
4.4. Lignoselülozik Hidrolizatların Aktif Kömür Detoksifikasyon Optimizasyonu	54
4.4.1. AK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu .....	56
4.4.2. BK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu .....	56
4.4.3. ÇK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu .....	57
4.4.4. YK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu .....	58
4.5. Etanol Fermentasyonları.....	59
4.5.1. Saf karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlar .....	59
4.5.2. Optimum koşullarda elde edilen AK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar .....	62
4.5.3. Optimum koşullarda elde edilen BK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar .....	63
4.5.4. Optimum koşullarda elde edilen ÇK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar .....	65
4.5.5. Optimum koşullarda elde edilen YK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar .....	67
4.6. Detoksifiye Edilmemiş/edilmiş Hidrolizatların İçerik Analizleri .....	70
5. SONUÇ .....	73
6. KAYNAKLAR .....	75
7. EKLER.....	83
EK-1: DNSA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen şeker analizlerinin spektrofotometreden alınmış değerlerle oluşturulan standart şeker çözeltilerine ait eğri ve değerleri (a), şeker konsantrasyonunun belirlendiği formül (b) .....	83
EK-2: Materyallerin hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri .....	84
EK-3: Materyallerin fenolik madde parametrelerinin varyans sonuçları .....	88
EK-4: Farklı şeker standartları karışımlarına ait HPLC pik görüntüsü .....	90
EK-5: HMF ve Furfural standart karışımlarına ait HPLC pik görüntüsü.....	91
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

°C	Derece
dk	Dakika
g	Gram
sa	Saat
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
rpm	Devir/dakika
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
wt	Ağırlık

### Kısaltmalar

ACN	Acetonitril
AK	Arpa kavuzu
AO	Asit oranı
A.Ş	Anonim şirketi
BK	Buğday kepeği
ÇK	Çavdar kepeği
D	Deneme
DNSA	Dinitrosalisilik asit
EV	Ekstrakt verimi
F <sub>D</sub>	Doğrudan fermentasyon
F <sub>D1</sub>	D <sub>1</sub> metodu uygulanan hidrolizat fermentasyonu
F <sub>D2</sub>	D <sub>2</sub> metodu uygulanan hidrolizat fermentasyonu
FMK	Fenolik madde konsantrasyonu
FŞK	Fermente edilebilir şeker konsantrasyonu
HMF	Hidroksimetilfurfural
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
K:S	Katı:sıvı oranı
OFAT	One-factor-at-a-time (her-defada-tek-etken)
P	Etanol üretimi
RSM	Response surface method (cevap yüzey metodu)
S	Şeker tüketimi
ŞKO	Şeker Kullanım Oranı
YK	Yulaf kavuzu
Y <sub>P/S</sub>	Etanol verimi
Y <sub>X/S</sub>	Biyokütle verimi
Y <sub>P/X</sub>	Biyokütle başına ürün verimi
Q <sub>S</sub>	Maksimum tüketim hızı
Q <sub>P</sub>	Maksimum üretim hızı
Q <sub>X</sub>	Maksimum gelişim hızı
X	Biyokütle gelişimi

$\mu_s$	Spesifik tüketim hızı
$\mu_P$	Spesifik üretim hızı
$\mu_X$	Spesifik gelişim hızı
$t_d$	İkiye katlanma süresi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dünya etanol üretiminin yıllara göre değişimi .....	4
Şekil 2.2 Lignoselüloz bileşimi.....	9
Şekil 2.3 Selülozun kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.4. Hemiselülozun kimyasal yapısı .....	10
Şekil 2.5. Ligninin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.6. Derişik ve seyreltik asitlerle polisakkaritlerin hidrolizasyonu.....	14
Şekil 2.7. Lignoselozik hammaddelerin bileşenleri ve hidroliz sonucunda oluşan ürünler .....	16
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan materyaller .....	20
Şekil 3.2. Optimum koşullarda elde edilmiş hidrolizatlar .....	25
Şekil 3.3. Hidrolizatların aktif kömür detoksifikasyonuna ait resimler .....	27
Şekil 3.4. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatların fermentasyonu .....	27
Şekil 4.1. Saf karbon kaynakları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri.....	61
Şekil 4.2. AK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri.....	63
Şekil 4.3. BK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri.....	65
Şekil 4.4. ÇK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri.....	67
Şekil 4.5. YK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri.....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı lignoselülozik materyallerin kimyasal bileşimi (kuru madde %)	12
Çizelge 3.1. Suşlar için gerekli besiyeri bileşimi	20
Çizelge 3.2. OFAT metodu hidroliz parametreleri deneme deseni	24
Çizelge 3.3. RSM Aktif kömür detoksifikasyon parametreleri	25
Çizelge 3.4. RSM aktif kömür detoksifikasyon koşulları	26
Çizelge 3.5. YSI 2700 select cihazının çalışma koşulları	30
Çizelge 4.1. Materyallerin bileşen ve nem analizleri (wt.%, kuru madde)	31
Çizelge 4.2. AK hidrolizi OFAT deneme sonuçları	32
Çizelge 4.3. AK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları	33
Çizelge 4.4. BK hidrolizi OFAT deneme sonuçları	34
Çizelge 4.5. BK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları	35
Çizelge 4.6. ÇK hidrolizi OFAT deneme sonuçları	37
Çizelge 4.7. ÇK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları	38
Çizelge 4.8. YK hidrolizi OFAT deneme sonuçları	39
Çizelge 4.9. YK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları	40
Çizelge 4.10. RSM denemeleri için belirlenen minimum ve maksimum noktalar	42
Çizelge 4.11. AK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları	43
Çizelge 4.12. AK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları	44
Çizelge 4.13. Optimum koşullarda gerçekleştirilen AK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları	44
Çizelge 4.14. BK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları	46
Çizelge 4.15. BK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları	47
Çizelge 4.16. Optimum koşullarda gerçekleştirilen BK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları	48
Çizelge 4.17. ÇK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları	49
Çizelge 4.18. ÇK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları	50
Çizelge 4.19. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ÇK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları	51

Çizelge 4.20. YK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları .....	52
Çizelge 4.21. YK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları .....	53
Çizelge 4.22. Optimum koşulda gerçekleştirilen YK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları .....	53
Çizelge 4.23 Detoksifikasyon optimizasyonu RSM deneme sonuçları .....	55
Çizelge 4.24. AK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları .....	56
Çizelge 4.25. BK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları .....	57
Çizelge 4.26. ÇK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları .....	58
Çizelge 4.27. YK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları .....	59
Çizelge 4.28. Saf karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametreler.....	60
Çizelge 4.29. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen AK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler.....	62
Çizelge 4.30. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen BK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler.....	64
Çizelge 4.31. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen ÇK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler.....	66
Çizelge 4.32. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen YK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler.....	68
Çizelge 4.33. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatların içerik analizleri.....	71





## 1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında enerji tüketimi ülkelerin kalkınma seviyelerinin belirlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Bugün dünya, enerji tüketim talebinin %85'ini fosil yakıtlardan karşılamaktadır. Fosil tabanlı petrol, kömür ve doğal gaz gibi yakıt rezervlerinin yakın bir tarihte tükeneceği gerçeği ise çok açık bir şekilde ortadadır.

Ülkemizin enerji alanında dışa bağımlılığı her geçen gün artmaktadır. Enerji kaynaklarımız ise Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı tarafından yayınlanan Mavi Kitap Raporu'na göre; ülkemizin taşkömürü rezervi 1334.6 milyon ton, linyit rezervi 11444.9 milyon ton, petrol rezervi 44.3 milyon ton, doğal gaz rezervi 6.2 milyar m<sup>3</sup> olarak belirlenmiştir (ETKB 2013). Fosil kaynakların hızlı bir şekilde tüketimi ile oluşan karbondioksit, metan, diazotmonoksit gibi sera gazlarının miktarı artmakta ve yine bütün dünyayı yakından ilgilendiren iklim değişikliği ortaya çıkmaktadır. Bu kaynakların çevreye verdiği zararlar göz önüne alındığında bütün dünyanın yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynaklarına yönelmesi kaçınılmazdır. Yeşil enerji kaynakları olarak da adlandırılan bu enerjiler güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, biyokütle enerjisi, hidrojen enerjisi ve hidrolik enerji, jeotermal enerji, dalga enerjisinden oluşan su gücü enerjileri ile füzyon enerjisi olarak sınıflandırılmaktadır.

Bütün dünyada oluşan enerji talebini çevreye zarar vermeden sürdürülebilir ve yenilenebilir olarak üretmek için kullanılacak en önemli kaynaklardan birisi biyokütledir. Biyokütle kendi enerjisini güneşten sağladığı için güneş varolduğu sürece biyokütle enerjisi oluşumu devam edecektir. Biyokütle orman atıkları, endüstriyel organik atıklar (kağıt endüstrisindeki siyah likör, şeker sanayisinden küspe vb.), otlar, yosunlar, denizdeki algler, hayvan dışkıları, tarımsal atıklar (saman, mısır koçanları, pamuk atıkları, pirinç kavuzu v.b.), evlerden atılan tüm organik çöplerden (meyve ve sebze) meydana gelmektedir. Ülkemizde ise genellikle, hasat öncesi ve sonrası tarımsal kayıplar, tarımsal-endüstriyel kayıplar, gıda işleme atıkları ve ülkemizde daha yeni olan enerji bitkilerinden oluşmaktadır.

Biyokütleden çeşitli yöntemlerle kimyasal maddeler (organik asitler, çözücü maddeler, esterler, monomerler, polimerler gibi), değerli ürünler (gübre, lif, biyoplastikler, vd.) ve yenilenebilir enerji (biyogaz, biyodizel, hidrojen, etanol, vd.) üretilebilmektedir. Polimerik yapıya sahip olan biyokütle materyalleri depolimerizasyonla parçalanarak veya CO ve H<sub>2</sub> gibi indirgenlerle reaksiyona girerek yeni kimyasal ürünlere dönüştürülmeye elverişli hammadde kaynaklarıdır (Kurtuluş 2010).

Bir bitkinin yetişmesi için gereken maliyet, emek ve zaman ön plana çıkarıldığında A.B.D ve Kanada'nın "bitkinin bütünsel olarak değerlendirilmesi – Whole Crop Utilization" yaklaşımını ülkemizin de benimsemesi gerektiği ortaya çıkmaktadır. Ülkemiz tahıl ürünleri yetiştirmek için gerekli toprak, su ve iklim şartlarına sahiptir. Ülkemizde tarımsal atıkların çok büyük bir kısmı, özellikle kırsal kesimde, doğrudan yakıt olarak kullanılmaktadır. Tarımsal atıkların şu an Türkiye'nin toplam yenilenebilir enerji tüketiminin %10'nu karşılamasına rağmen, ilgili teknolojiler kullanıldığında, Türkiye'nin toplam enerji tüketiminin %22-27'sinin karşılanabileceği ifade edilmiştir (Kar ve Tekeli 2008). Biyokütle enerjisi, dünyanın enerji ihtiyacını

atmosferde sera gazı artışına neden olmadan ve sürdürülebilir şekilde sağlayabilecek potansiyel bir kaynaktır.

Biyokütleden modern anlamda yararlanılarak elde edilebilecek en önemli enerjiler katı (biyokömür, biyopelet), sıvı (biyodizel, biyoetanol, biyometanol ve biyo-oil) ve gaz (biyogaz, biyohidrojen ve biyosentez gazı) olarak sınıflandırılmaktadır (Sabancı vd 2013). Biyoyakıtlar içerisinde biyoetanolün, benzine eşdeğer yapıda olması, gelecekte ulaşım, taşımacılık gibi sektörlerdeki talebini arttıracak ön görülmektedir (Melikoğlu ve Albostan 2011).

Biyoeetanol, içerisinde glukoz, ksiloz gibi şekerlerin bulunduğu kaynaklardan çeşitli fermentasyon stratejileri yardımıyla mikroorganizmalar tarafından kolayca üretilmektedir. Biyoetanol üretiminde kullanılan kaynaklar sukroz ve nişasta içeren hammaddeler ve lignoselülozik ham maddeler olarak sınıflandırılmaktadır (Adıgüzel 2013). Lignoselülozik hammadde içeriğinde temel polisakkarit olarak selüloz, hemiselüloz, fenolik bir polimer olan ve aynı zamanda bitkiye yapısal sağlamlık kazandıran ligninin olduğu bilinmektedir (Adıgüzel 2013, Bengisu 2014, Merino-Pérez vd 2015). Lignoselülozik materyallerin bu yapısından dolayı fermente edilebilir şekerlere indirgenmesi gerekmektedir. Bu yüzden lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretiminde en önemli basamağı ön-işlem prosesi ve bu işleme bağlı olarak oluşan inhibitör bileşiklerin uzaklaştırılması oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında arpa ve yulafın kavuz, buğday ve çavdarın ise kepek kısımları, katma değeri yüksek bir ürün olan biyoetanol üretiminde kullanılmıştır. Bu amaçla sırasıyla, OFAT ve RSM kullanılarak fermente edilebilir şeker içeriğine bağlı olarak lignoselülozik materyallerin seyreltik sülfürik asit ile hidroliz koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiş, açığa çıkan hidrolizatın aktif kömür ile detoksifikasyon şartları belirlenmiş ve detoksifiye hidrolizattan *P. stipitis* suşları kullanılarak etanol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar kullanılarak elde edilen hidrolizatın toplam indirgen şeker, glukoz, ksiloz, arabinoz, maltoz ve galaktoz açısından şeker profili, ayrıca mikroorganizma gelişimi için önemli olan fenolik madde, HMF, furfural, formik asit ve asetik asit gibi inhibitör bileşikler açısından da hidrolizatların içeriği belirlenmiştir. Buna ek olarak, *P. stipitis* mayaları kullanılarak saf karbon kaynaklarından (glukoz ve ksiloz) ve detoksifiye edilmemiş/edilmiş arpa ve yulaf kavuzu ve buğday ve çavdar kepeği hidrolizatlarından etanol üretimleri gerçekleştirilmiştir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

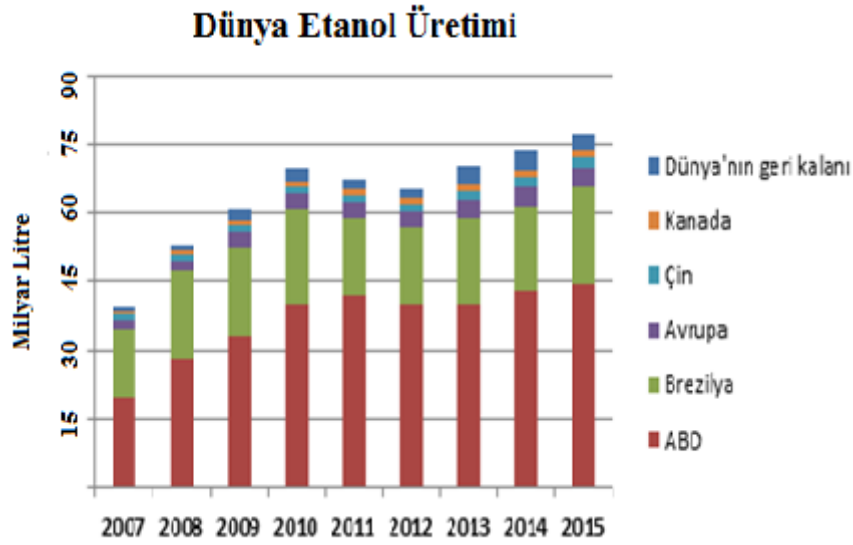
### 2.1. Biyoetanol

Farmakoloji ve endüstriyel uygulamalarda kullanılmak için yıllardır üretilen etanol; sentetik etil alkol, ham petrol, doğal gaz veya kömürden petrokimyasal olarak etilenin hidrasyonu yoluyla elde edilmektedir (Yiğitoğlu vd 2012). Biyoetanol ise içerisinde yeterince glukoz ihtiva eden veya glukozla dönüştürülebilen şekerlerin bulunduğu (sukroz, nişasta, selüloz gibi) hammaddelerden fermentasyon teknikleriyle üretilmektedir. Biyokütleden elde edilen yakıtlar katı biyoyakıtlar; peletler, sıvı biyoyakıtlar; biyodizel, biyoetanol ve gaz biyoyakıtlar; biyogaz, biyosentez ve biyohidrojen olarak sınıflandırılmaktadır. Biyoetanol, şeker kamışı, şeker pancarı, mısır, mısır koçanı, dallı darı, arpa, patates, ayçiçeği, melas, kesik süt, buğday, çavdar, yulaf, tahta, kağıt, saman, pamuk, diğer çeşitli selüloz atıkları gibi pek çok farklı karbon kaynağından elde edilebilmektedir.

Biyoetanol farklı fermentasyon teknolojileri yardımıyla üretilen sıvı bir biyoyakıttır. Biyoetanol; yüksek oktan sayısına, geniş yanabilme sınırına, yüksek yanma hızına ve benzinden daha yüksek buharlaşma öz ısısına sahiptir. Biyoetanol %35 oranında oksijen içeren bir yakıttır ve yanmadan kaynaklanan azot oksit (NO<sub>x</sub>) emisyonu düşüktür (Adıgüzel 2013). Oksijen içeriğinin fazla olmasından dolayı da yanmasıyla açığa çıkan zararlı gazların miktarı çok azdır.

Etanolün ulaşım için kullanımı 20. yy'ın başlarında ortaya çıkmıştır. Ancak İkinci Dünya Savaşı'nın patlak vermesiyle etanol üretimleri yeterince geliştirilememiştir. 1975 yılında çalışmalarına kaldığı yerden devam eden Brezilya hükümeti ise şeker kamışından etanol üretimlerine başlamıştır. Bu sayede bugün Brezilya biyoetanol üretimlerinde başı çekmektedir. Dünya genelindeki etanolün %46'sı Brezilya'da üretilmektedir (Adıgüzel 2012). Dünya etanol üretiminde ikinci dev olan ABD ise 1978 yılında biyoetanol üretim tesislerini kurmuştur. ABD ise etanol üretimlerinde mısır kullanmıştır. Daha sonraki yıllarda bu iki ülkeyi Kanada, İsveç, Avustralya, Fransa, Çin ve de İspanya takip ederek biyoetanol üretimine başlamıştır.

Günümüzde ABD, son iki seneye kadar biyoetanol üretiminde lider olan Brezilya'yı geride bırakarak, yıllık ortalama 45 milyar litre ile birinci sırada yer almaktadır (Anonim 2016a). Dünya etanol üretimlerinin yıllara göre değişimi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Dünya etanol üretiminin yıllara göre değişimi (Anonim 2016a)

Türkiye’de biyoetanol üretimi ve tüketimi çok yeni olup, benzine belirli oranlarda karıştırılarak kullanılmaktadır. Yasal ve maddi sorunlar üreticinin girişimlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Ülkemizde biyoetanol üretimi 3 farklı firma tarafından sağlanmaktadır. Bunlar; Tarımsal Kimya Teknolojileri Sanayi ve Ticaret A.Ş. (TARKİM), Tezkim Tarımsal Kimya İnşaat Sanayi Ve Ticaret A.Ş. (TEZKİM) ve Konya Şeker Sanayi ve Ticaret A.Ş.’dir. Bu şirketlerin biyoetanol üretim kapasiteleri toplamda 149.5 milyon litredir. Fakat net ticareti yapılabilen miktar 70 milyon litredir. Konya Şeker fabrikasında hammadde kaynağı olarak melas kullanılırken diğerlerinde mısır ve buğday kullanılmaktadır. Ülkemizin biyoetanol kurulu kapasitesi benzin tüketimimizin yaklaşık %7’sini karşılar durumdadır. Ancak pazarda yer alan biyoetanol benzin tüketimimizin %1’inin çok altındadır (Adıgüzel 2012, Anonim 2012, Kapluhan 2014). Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu (EPDK) kararına göre yerli tarım ürünlerinden üretilen biyoetanol 1 Ocak 2013’den itibaren en az %2, 1 Ocak 2014’den itibaren ise %3 oranında ilave edilmek zorundadır ve üretilen biyoetanolün %2’lik kısmı özel tüketim vergisinden (ÖTV) muaftır.

Biyoetanol E10 ve E85 olarak adlandırılan sırasıyla benzinle % 10 ve % 85 olacak şekilde karıştırılarak kullanılan biyoyakıtlardır. Türkiye’ de biyoetanolu kullanan ilk firma Petrol Ofisi’dir ve % 2’lik biyoetanolu benzinle karıştırarak araçlara aktarmaktadır (Koçtürk 2011).

Biyoetanol kullanımının avantajları ise yerli ve yenilenebilir bir biyoyakıt olmasıyla petrol için dışa bağımlılığı azaltmaktadır. Basit fermentasyon teknolojileriyle üretilebilir ve depolanması sırasında herhangi bir sorun oluşturmaz. Fosil yakıtlardan daha az miktarda sera gazı yaymaktadır. Böylece çevreye zarar vermeden düşük maliyetli ulaşım sağlanabilmektedir.

## 2.2. Biyokütle ve Biyokütle Enerjisi

Ülkemizde üretilen enerji kaynakları oransal olarak incelendiğinde; kömür % 48, hidrolik-jeotermal enerji % 34, odun % 10, hayvan ve bitkisel atıkların % 4 ve petrol, doğal gaz, jeotermal enerji, güneş, rüzgar enerjisi gibi diğer enerji kaynakları toplamının yaklaşık olarak % 4 oranında pay aldığı görülmektedir (Sabancı vd 2013). Bu sonuçlar dikkate alındığında petrol, doğal gaz gibi önemli enerjiler bakımından dışa bağımlı bir ülke olduğumuz açıkça ortadadır.

Türkiye'nin toplam 77.9 milyon hektarlık yüzölçümünün yaklaşık olarak yarısını (%53) ekim ve hayvancılık faaliyetleri için kullanılmaktadır. Yaklaşık olarak 26.6 milyon hektar ekilebilir alan tarla bitkileri (hububat, baklagiller, endüstri bitkileri); hayvancılık için yem bitkileri, meyve ve sebze, bağ ve nadas için kullanılmaktadır (Redman ve Hemmami 2008). Ülkemiz yenilenebilir enerji kaynaklarının birçoğunun üretimi için gerekli alt yapıya sahiptir. Matematiksel konum olarak ekvatora yakınlığıyla güneş enerjisinden, güneşin yeryüzünü farklı ısıtması sayesinde rüzgar enerjisinden tarım ülkesi olmasıyla da biyokütleden ayrıca hidrolik ve jeotermal enerjilerden kolay bir şekilde enerji üretimi yapılabilir. 2009 yılında yayınlanan Elektrik Enerjisi Piyasası ve Arz Güvenliği Strateji Belgesi'ne göre 2023 yılında yenilenebilir enerjinin toplam üretimdeki payının %30'a çıkarılması hedeflenmektedir (Anonim 2014).

Biyokütle 100 yıllık periyottan daha kısa sürede yenilenebilen, karada ve suda yetişen bitkiler, hayvan artıkları, besin endüstrisi ve orman ürünleri ile kentsel atıkları içeren tüm organik maddeler olarak tanımlanmaktadır (Acaroğlu 2008). 5346 sayılı Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Elektrik Enerjisi Üretimi Amaçlı Kullanımına İlişkin Kanun'da ise biyokütle: 'organik atıkların yanı sıra bitkisel yağ atıkları, tarımsal hasat atıkları dahil olmak üzere, tarım ve orman ürünlerinden ve bu ürünlerin işlenmesi sonucu ortaya çıkan yan ürünlerden elde edilen kaynaklar' olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2016b).

Biyokütle enerjisi ise biyokütleden farklı yollarda elde edilen enerji olarak bilinmektedir. Genel olarak biyokütle enerjisi; doğada yaygın olarak mevcut tarımsal kökenli ürünlerden değişik fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle üretilen, ticari özelliğe sahip, temel ve belirli özellikleri standartlaştırılmış olan katı, sıvı ve gaz haldeki bitkisel enerji kaynaklarıdır (Sabancı vd 2013). Biyokütleden fiziksel prosesler (kurutma, öğütme, pelletleme), biyolojik ve kimyasal prosesler (biyogaz, biyoetanol, biyodizel) ve termokimyasal prosesler (piroliz, gazlaştırma) gibi oldukça farklı uygulamalar ile enerji üretilmektedir.

Dünya fosil tabanlı enerji kaynaklarının hızla tükendiği ve tüketimin de aynı oranda arttığı şu günlerde biyokütle enerjisinin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Fosil yakıtların yakılması ile ortaya çıkan CO<sub>2</sub>, CO, kükürt, nitrit oksitler, kurşun, formaldehit, metan gibi gazlar güneşten gelen kızıl ötesi ışınları tutarak küresel ısınmaya ve iklim değişikliklerine sebep olmaktadır. Bu gazların, özellikle karbondioksit gazının atmosferde artışının en büyük sebebi fosil yakıtlar (kömür, petrol ve doğalgaz) olduğu belirlenmiştir (Kaplan vd 2009). Bu durumun farkında olan ve ülke enerji planlaması konusunda hassas olan birçok ülke yenilenebilir enerji kaynaklarına

büyük yatırımlar yapmaktadırlar. Dünya toplam enerji tüketiminin yaklaşık %15'i, gelişmekte olan ülkelerde ise enerji tüketiminin yaklaşık % 43'ü biyokütleden sağlanmaktadır (Kaplunan 2014).

Biyokütle enerjisinin en önemli avantajlarından biri biyokütlenin kolayca yetiştirilebilmesi ve güneş var olduğu sürece devam etmesidir. Ayrıca NO (azot monoksit) ve SO<sub>2</sub> (kükürtdioksit) salınımlarının çok düşük olması ile de çevreyi olumsuz yönde etkilememektedir. Biyokütle enerjisi elde edilirken açığa çıkan CO<sub>2</sub> gazının yeniden fotosentez yoluyla bitkiler tarafından kullanılmasıyla da atmosferdeki CO<sub>2</sub> dengesi bozulmamaktadır. Selülozik biyoetanolun CO<sub>2</sub> emisyonu benzinden %85 daha az iken mısırdan üretilmiş biyoetanolun CO<sub>2</sub> emisyonu %30 daha azdır. Bitkilerin yaydığından daha fazla karbonu tükettiği bilindiğinden yakıt amaçlı kullanıldığında negatif emisyonu olduğu kesinleşmiştir (Koçtürk 2011). ETKB 2015-2019 stratejik planına göre enerjide dışa bağımlılığın azaltılması amacıyla, yenilenebilir enerji kaynaklarının birincil enerji ve elektrik enerjisi arzı içindeki payının artırılması planlanmaktadır (ETKB 2015).

### 2.3. Lignoselülozik Biyokütle

Lignoselüloz, bitki hücre duvarlarının içinde selüloz mikrofibrilleri, lignin, hemiselüloz ve pektinden oluşan bir yapıdır (Yiğitoğlu vd 2012). Dünyada, tarımsal olarak her yıl yaklaşık  $1.5 \times 10^{11}$  ton lignoselülozik biyokütle oluşmaktadır (Gupta vd 2009) Lignoselülozik biyokütleyi genel olarak orman atıkları, tarımsal atıklar, endüstriyel atıklar, kentsel katı atıklar, tarımsal işleme atıkları ve atık kağıtlar oluşturmaktadır.

Buğday, pirinç, arpa, mısır, yulaf gibi tahıllardan ve diğer bitkilerden sap, saman, kavuz, kepek, kabuk, küspe gibi atıklar ise tarımsal atıkları oluşturmaktadır. Bu ürünler, biyokütle atıklarının toplam yıllık üretimini önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar (Usal 2014). Ülkemizde tarımsal atıkları oluşturan buğday, arpa, çavdar, yulaf ve pirinç sapsarı, fındık kabukları gibi atıklardan yıllık toplam 54.4 milyon ton atık açığa çıkmaktadır (Saraçoğlu 2006). Tarımsal atıkların şu an Türkiye'nin toplam yenilenebilir enerji tüketiminin %10'unu karşılamasına rağmen, ilgili teknolojiler kullanıldığında, Türkiye'nin toplam enerji tüketiminin %22-27'sinin karşılanabileceği ifade edilmektedir (Kar ve Tekeli 2008). Aşağıda bu tez çalışmasında kullanılacak olan lignoselülozik materyallere ait genel bilgiler verilmiştir.

#### *Arpa Kavuzu*

Arpa (*Hordeum vulgare L.*) buğdaygillerden taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisidir. Dünyada, tahıllar arasında üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer alan arpa, Türkiye'de ise buğdaydan sonra ikinci sıradadır. Dünya arpa üretiminde başı çeken ülkeler sırasıyla Rusya, Ukrayna, Fransa, Almanya, Kanada ve İspanya'dır. Arpa çok eski yıllarda buğdaydan önce insan beslenmesinde büyük bir paya sahip olmakla birlikte günümüzde yerini buğday mısır gibi diğer tahıllara bırakmıştır.

2013 yılı FAO verilerine göre bugün dünyada yaklaşık 150 milyon ton, ülkemizde ise 3.6 milyon hektar ekim alanı kullanılarak 7.9 milyon ton arpa üretimi yapılmaktadır (Anonim 2015b). Arpa Türkiye'nin tüm bölgelerinde yetiştirilmekle birlikte Trakya'da arpa tarımı, Türkiye ekim alanının yaklaşık %16'sı ( 59.607 ha) kadar bir alanda yapılmakta ve üretimin %34'ü (626.305 ton) yine bu bölgeden karşılanmaktadır (Avcı ve Azabağaoğlu 2007).

Ülkemizde arpa üretiminin atık miktarı 1.344 bin ton saman olarak oluşmaktadır (Anonim 2011). Dünyada ekimi yapılan arpanın %65'i hayvan yemi olarak, %33'ü maltlık olarak bira ve viski yapımı ile biyodizel üretiminde, %2'si de insan besini olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Türkiye'de ise tüketimin %90'ı hayvan yemi olarak, kalan kısmı maltlık olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Köten vd 2013).

Arpa genotipleri yapılarına göre kavuzlu ve kavuzsuz arpa olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Arpa dane yapısında % 9-13 ham protein ve % 67 karbonhidrat bulunmaktadır. Danenin ortalama % 10 – 13 kadarı ise kavuzdur (Karaduman 1999). Kavuz, arpanın herhangi bir gıdaya işlenmesini sınırlayan bir etkidir. Arpa tanesinin buğday tanesinden farkı iç kavuz olarak bilinen tabakanın taneye sımsıkı yapışık olmasıdır. Bu yüzden arpa tanesi kavuzlu tane olarak bilinmektedir (Karaduman 1999). Kültürü yapılan ticari önemi olan arpa çeşitlerinde tane kavuzludur. İç kavuz ve kapçık tanede meyve kabuğuna yapışiktir (Anonim 2016c).

### **Buğday Kepeği**

Buğday (*Triticum aestivum L.*), buğdaygiller familyasından bütün dünyada ıslahı yapılmış tek yıllık otsu bir bitkidir. Kabuk taneyi dıştan saran koruyucu tabakadır. Bu kısım dıştan içe doğru üç tabaka halindedir. Bunların altında Alöron tabakası vardır. Alöron tabakası ile kabuk kısmı öğütmede kepek olarak ayrılır. Tanenin %15'ini kepek kısmı oluşturmaktadır (Ertugay ve Elgün 1992).

Un ve yem üretiminde temel besin olarak kullanılan buğday, ekim alanı ve üretimi bakımından dünyada ve ülkemizde ilk sırada yer almaktadır (Yağdı 2004). 2013 yılı FAO verilerine göre ülkemizde yılda 22.050 bin ton buğday üretimi yapılmaktadır (Anonim 2015a). Bu üretimin 3.514 bin tonu ise saman atığı olarak çıkmaktadır (Anonim 2010).

Buğday kepeğinin lifli yapısı, içerdiği B grubu vitaminleri, folik asit, demir ve çinko mineralleri açısından insan beslenmesinde önemi artmaktadır. Günümüzde tüketimi yaygınlaşan kepekli ekmek ise kepeği ayrılmış buğday ununa çok az miktarda kepek ilave edilmesiyle yapılmaktadır. Türk Gıda Kodeksi Ekmek ve Ekmek Çeşitleri Tebliği'nde yapılan değişikliğe göre normal ekmekteki kepek oranı en az % 7,02 en çok % 8,71 olarak belirlenmiştir. Bu durum buğday tanesindeki kepeğin hala tam olarak değerlendirilemediğini göstermektedir. Ülkemizde kepeğin büyük bir kısmı hala hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir.



### ***Yulaf Kavuzu***

Yulaf (*Avena sativa*), bir yıllık otsu tahıl bitkisidir. Buğday ve arpaya göre oldukça yeni bir kültür bitkisidir. Tarla kültürü olarak M.S.1. yüzyılda başladığı kabul edilmektedir. Daha çok sahil bölgelerde ve dağ eteklerinde yetişmektedir (Anonim 2016c).

2013 yılı FAO verilerine göre yılda 235 bin ton yulaf üretimi yapılmaktadır ve üretimin 48 bin tonu atık olarak oluşmaktadır (Anonim 2011, Anonim 2015c). Yulaf, Türkiye serin iklim tahılları ekim ve üretiminde buğday, arpa ve çavdardan sonra dördüncü, üretimde buğday ve arpadan sonra üçüncü sırada yer alan bir üründür. Yulaf danesinin %20-30 kadarını kavuz oluşturmaktadır (Sarı 2012). Daha çok hayvan yemi olarak kullanılan yulaf bol miktarda nişasta ile protein, vitamin ve mineraller içermesinden dolayı da insan beslenmesinde kullanılmaktadır.

### ***Çavdar Kepeği***

Çavdar (*Secale cereale*), soğuğa en dayanıklı tahıldır ve yüksek yerleri, kumlu ve gevşek toprakları sever. Genellikle 1-2 metre yüksekliğe ulaşan çavdarın görünümü arpaya çok benzemektedir. Çavdar buğday (*Triticeae*) kabilesinin bir üyesidir ve çavdar unu, çavdar ekmeği, bira, viski, vodka ve hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Çavdar tahılının yaklaşık % 15-20'lik kısmı gıda olarak tüketilemeyen atık olarak oluşmaktadır (Bledzki vd 2010). Çavdar ekim alanı bakımından Türkiye tahılları içerisinde buğday, arpa ve mısırdan sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Çavdar da yulaf gibi yeni bir kültür bitkisidir ve gen merkezinin Anadolu olduğuna birçok araştırmacı hemfikirdir (Anonim 2016c)

Daha çok ekmeklik un ve hayvan yemi olarak değerlendirilen çavdarın bileşiminde karbonhidrat, protein, potasyum ve B vitamini bulunur. Yılda 30 milyon ton dolayında olan dünya çavdar üretiminin üçte birinden fazlasını Rusya sağlar. Ülkemizde ise yılda yaklaşık 365 bin ton çavdar üretimi yapılmaktadır ve bu üretimin 54 bin tonu atık olarak oluşmaktadır (Anonim 2011, Anonim 2015b).

#### **2.3.1. Lignoselülozik materyallerin bileşimi**

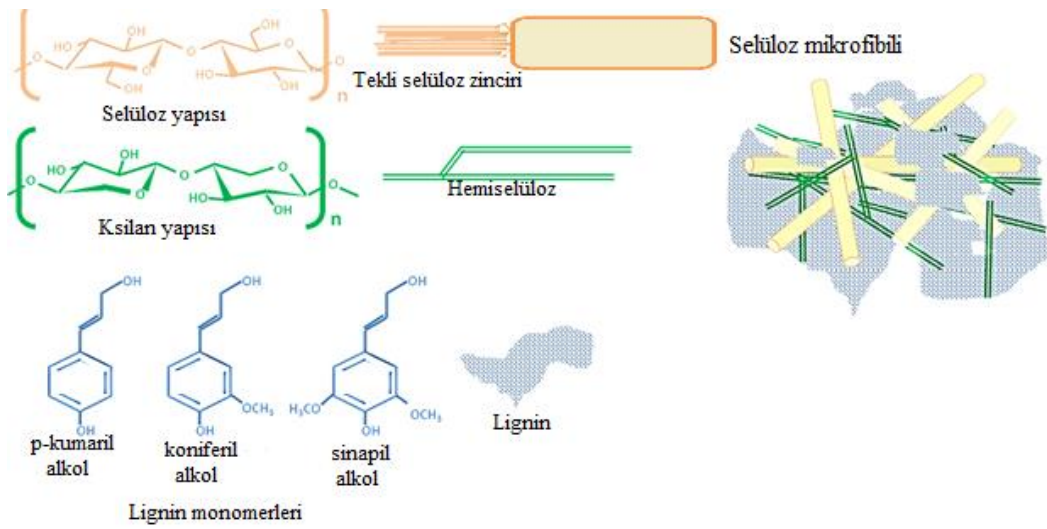
Lignoselülozik materyaller; hemiselüloz, selüloz ve ligninden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Bu nedenle fermente edilebilir şekerlere dönüşmesi için kesinlikle bir ön işlem gereklidir (Gomez-Tovar vd 2012). Ayrıca lignoselülozik maddeler kimyasal yapılarında içerdikleri aromatik bileşikler ve birçok fonksiyonel grup sayesinde çeşitli kimyasalların ve ürünlerin üretimine olanak tanımaktadırlar (Anonim 2011). Genel olarak bu maddeler %30-60 selüloz, %10-30 hemiselüloz ve %10-20 ligninden oluşmaktadır (Brethauer ve Studer 2015, Gupta ve Verma 2015, Haghghi vd 2013).

Kim vd (2008) AK'nin içeriğini belirleyen bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. AK'nin %33.6 gluklan, % 30.5 ksilan, % 0.6 galaktan, % 6.1 arabinan, % 19.3 lignin ve %3.6 külden oluştuğunu belirlemişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise AK'nın şeker profili tesbit edilmiştir. Materyalin kimyasal bileşimi % 74.9 karbonhidrat, % 10.3 nişasta, % 5.3 protein, % 4.6 kül ve % 4.2 nem olarak belirlenmiştir (Yadav ve Hicks 2015).

Falck vd (2014) yaptıkları bir çalışmada ÇK'nin kimyasal kompozisyonunu %62 arabinoksilan, %10 lignin, %6 protein, %2 monosakkarit, %4 polimerik glukoz, %4 su, %10 kül ve %2 diğer bileşenler olarak belirlemişlerdir. Karbonhidrat yapısını ise %14 ksiloz, %26 glukoz, %7 arabinoz ve %1 galaktoz olarak tespit etmişlerdir.

Oliveira vd (2006) ksilanolitik enzimler üretmek için bazı tarımsal atıkların karbonhidrat içeriğini araştırmışlardır. Böylece YK kompozisyonu % 31-38.4 hemiselüloz, % 27.4-37.3 selüloz, % 2.3-9.8 lignin, % 1.6-5.8 protein ve % 2.4-9.3 kül olarak belirlenmiştir.

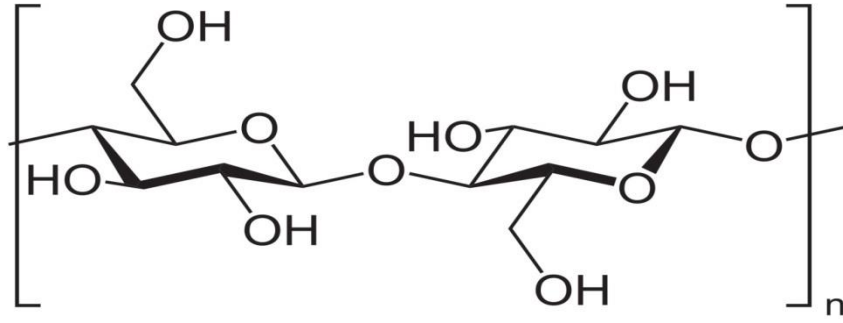


Şekil 2.2 Lignoselüloz bileşimi (Stoutenburg 2013)

### Selüloz

Selüloz bitki hücrelerinin temel bileşenini oluşturan ve doğada en bol bulunan karbonhidrat polimeridir. Şekil 2.3'de selülozun kimyasal yapısı verilmiştir. Binlerce  $\beta$ -1,4- glikozidik bağları ile bağlanan D- glukoz moleküllerinden oluşmaktadır. Selüloz; proteinler, lignin, hemiselüloz ve mineral maddeler ile sıkıca bağlı olduğundan hidrolize karşı oldukça dirençlidirler (Ibraheem ve Ndimba 2013).

Doğada saf halde bulunmayan selüloz; çeşitli nişasta, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Selülozun hidroksil grupları; kimyasal stabilitesi, yapısı, sertliği ve çekme mukavemeti olan moleküller arası hidrojen bağlarından oluşur (Belgacem ve Gandini 2008). Bitkilerdeki karbonun yaklaşık %40'ı selülozdan gelmektedir. Bu bakımdan, selüloz, yeryüzünde en fazla bulunan doğal polimerdir ve ilkel bitkilerden (Algler, yosun, eğrelti otu vb.) yüksek organizasyonlu bitkilere (odunlar) ve bazı bakterilere kadar çok geniş bir yayılım göstermektedir (Şahin vd 2007).

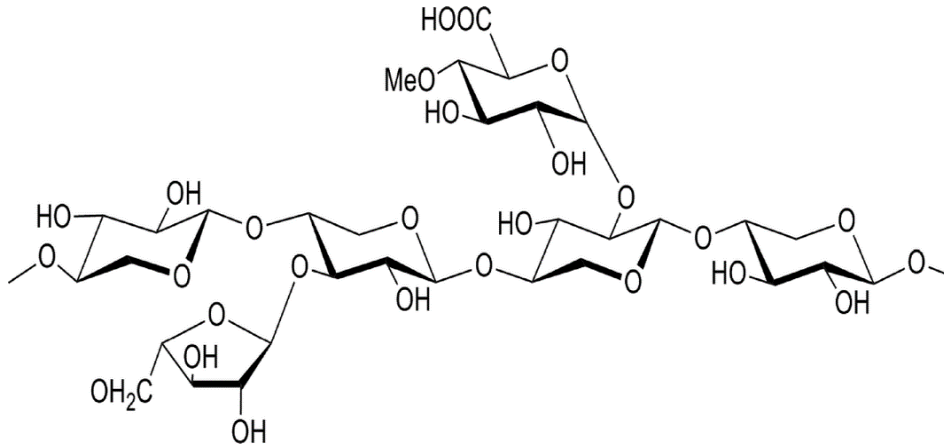


Şekil 2.3 Selülozun kimyasal yapısı

### *Hemiselüloz*

Hemiselülozlar, çeşitli pentoz ve heksozların polimerleridir ve selülozdan farklı olarak, bir amorf yapıya sahip olan ve heterojen polisakaritlerden oluşur (Şekil 2.4). Hemiselülozlar galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve diğer şekerlerle; üronik asitlerin polimerleri ve heteropolimerlerini içerirler (Kurtuluş 2010). Polimerik yapıları, selüloza göre oldukça açık (amorf) ve düzensiz (dallanma) olmasından dolayı, düz zincirler şeklinde düzenlenmiş selüloza göre reaksiyonlara daha duyarlıdır (Şahin vd 2007).

Selülozdan sonra doğada en bol bulunan polisakaritlerdir. Hemiselülozlar (yıllık ve çok yıllık) bitkilerdeki toplam kütlede yaklaşık % 20-30'unu oluşturmaktadır ve bitki ve ekstraksiyon işleminin türüne bağlı olarak, çeşitli şeker birimlerinin heterojen bileşimine sahiptir (Sipponen vd 2014). Ayrıca hemiselülozlar asitlerle kolayca monomerlerine hidrolize edilebilirler (Balat 2011, Evcan 2012)



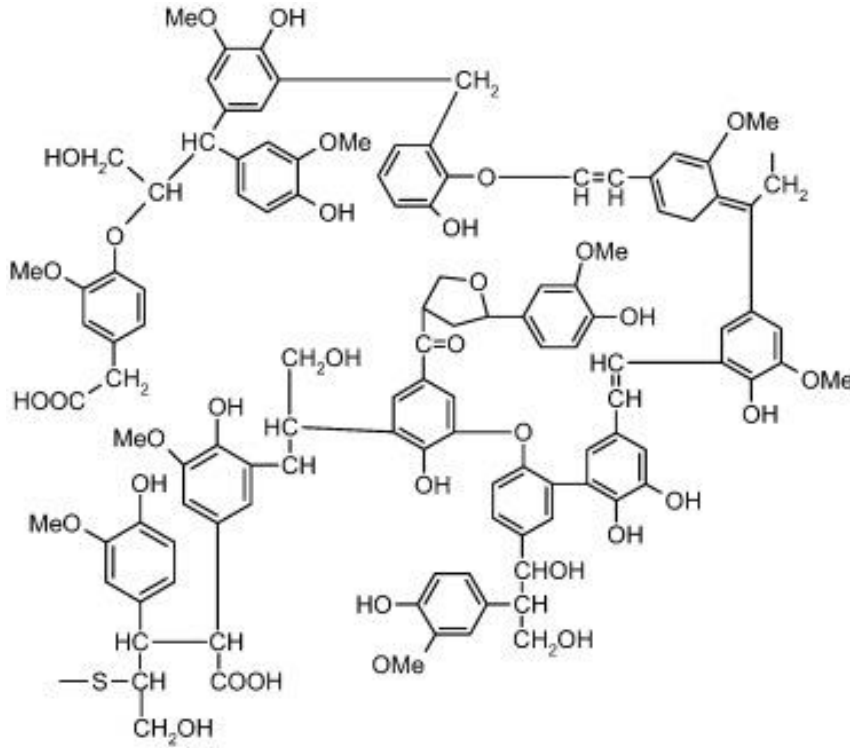
Şekil 2.4. Hemiselülozun kimyasal yapısı

### *Lignin*

Lignin, bitki hücre duvarının sekonder bir parçasını teşkil eden karmaşık ve aromatik bir makromoleküldür (İbraheem ve Ndimba 2013). Ligninin kimyasal yapısı Şekil 2.5'de gösterilmektedir. Bitki türleri arasında değişen oranlarda monolignol olarak adlandırılan üç fenolik monomerlerden ağırlıklı sentezlenen aromatik polimerlerdir (Sipponen vd 2014). Bu monolignollerin ( p-kumaril, koniferil ve sinapil alkoller)

fenilpropanların (p-hidroksifenil, guaiasil ve syringly polimerizasyonu ve dehidrasyonu sonucu oluşmaktadır (Gupta ve Verma 2015). Bu fenilpropan birimleri çeşitli kovalent bağlar ile polisakaritlere bağlıdırlar (Ibraheem ve Ndimba 2013, Irmak vd 2013). Ligninin hücre çeperindeki esas görevi, yapıstırıcı özelliğinden dolayı, selüloz liflerini bir arada tutmak olarak özetlenebilir.

Lignin üretimi de birçok sektörde kullanılmasından dolayı oldukça önemlidir. İnşaat sektöründe lignin çözeltisi şeklinde hazırlanıp beton katkı maddesi olarak ve evsel ve endüstriyel atık suların tedavisi için bir sorbent olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tuğla ve seramik ürünler üretimi, aktif karbon üretimi, plastik üretimi, biyobazlı ambalaj filmleri üretimi ve biyobozunur petrol bazlı polyesterlerle kampaund üretimi gibi birçok uygulaması bulunmaktadır. Fakat, polimerik yapıyı oluşturan yapıtaşları, fonksiyonel gruplar ve bağlanma şekilleri büyük ölçüde açıklanabilmiş olmasına rağmen, ligninin kimyasal formülü hala tam olarak yazılamamaktadır (Şahin vd 2007).



Şekil 2.5. Ligninin kimyasal yapısı

Lignoselülozik materyallerin biyoteknolojik olarak veya farklı proseslerde değerlendirmek için kimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Birçok araştırmacı bu materyallerin lignoselülozik içeriğini ortaya koymuşlardır. Literatür araştırmaları sonucu elde edilen bazı lignoselülozik materyallere ait kimyasal bileşim oranları çizelge 2.1’de belirtilmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı lignoselülozik materyallerin kimyasal bileşimi (kuru madde %)

Lignoselülozik Biyokütle	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin	Referans
Çavdar kavuzu	26	16	13	(Bledzki vd 2010)
Buğday kavuzu	36	18	16	
Pirinç kavuzu	37.07	31.15	22.7	(Germec vd 2016)
Arpa samanı	33.8	21.9	13.8	(Haghighi vd 2013)
Buğday samanı	30.2	22.3	17	
Çavdar samanı	30.9	21.5	22.1	
Yulaf samanı	39.4	27.1	17.5	
Pirinç samanı	31.1	22.3	13.3	

### 2.3.2. Lignoselülozik materyallerin ön işlemleri

Lignoselülozik materyallerin fermentasyon teknolojisinde değerlendirilebilmesi için öncelikle materyaller bir ön-işleme tabi tutulmalıdır. Lignoselülozik materyallerden katma değeri yüksek ürün üretimlerinde en önemli basamak seçilen ön işlemin etkinliğidir. Çünkü lignoselülozik materyallerden elde edilen fermente edilebilir şeker miktarı ön işleme bağlıdır.

Ön muamele işlemindeki temel amaç biyokütlenin gözenekli yapısını artırmak, bitki hücre duvarı matrisini bozmak, lignin ve selülozu uzaklaştırmak, selülozun kristalitesini azaltmak ve kristalleşmiş selülozun yapısını bozmaktır (Adıgüzel 2013; (Merino-Pérez vd 2015). Lignoselülozik biyokütledeki selüloz ve hemiselülozları fermente edilebilir şekerlere indirgemek için birçok ön-işlem metodu vardır. Bu metotlar fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik ön-işlemler olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca gelişen teknolojiyle beraber yöntemler de farklılaşmıştır.

Seçilen ön-işlem karbonhidrat kaybı ve/veya bozulması, fermentasyonu önleyecek inhibitör oluşumu ve aşırı maliyet gibi sorunlar oluşturabilir. Bu nedenle uygun ön-işlem metodunu belirlemek için biyokütle oranı, sıcaklık, süre, katalizör konsantrasyonu gibi parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Lignoselülozik biyokütleden fermente edilebilir şeker eldesi için genellikle bir kimyasal ön-işlem olan asit ve bazla muamele metotları kullanılır (Melo vd 2016).

Lignoselülozik materyallerdeki selüloz moleküllerini ayırmak için seyreltik ve derişik asit hidroliz yöntemleri kullanılabilir. Seyreltik asit hidrolizi lignoselülozik materyallerin ön işleminde kısa reaksiyon sürelerinde yüksek sıcaklıklarda kullanılan ucuz ve etkili bir ön işlemdir. Seyreltik asit hidrolizi başarılı bir metot olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu işlemlerde genellikle H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> ve HCl asit gibi kuvvetli inorganik asitler tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonunda %81'lik fosforik asitin de ideal selüloz çözücülerinden olduğu bulunmuştur (Adıgüzel 2013).

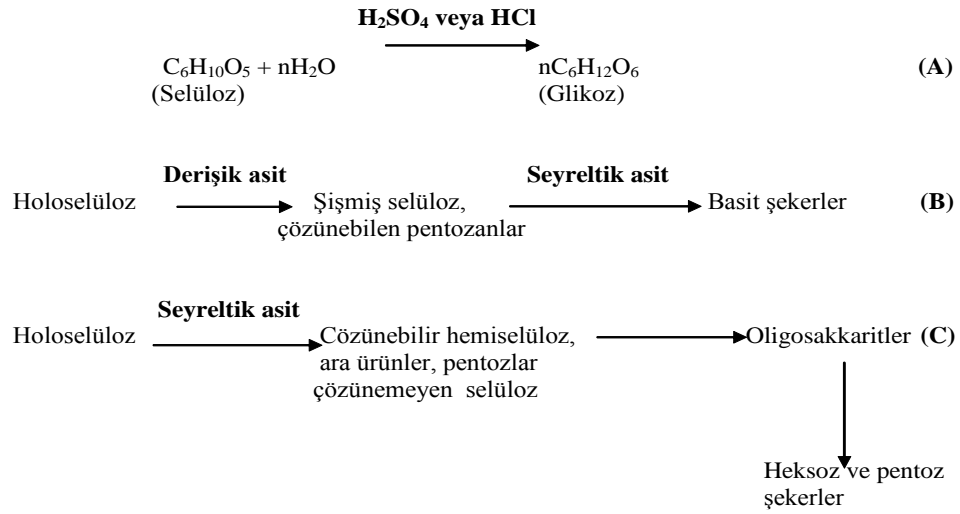
Seyreltik asit hidrolizi yüksek sıcaklık uygulamalarında selülozu iyi bir şekilde hidrolize edebilmektedir. Seyreltik asit hidrolizi selülozu parçalamak için etkili bir işlemdir ancak konsantre asitler; toksik, korozyif ve tehlikelidirler (Sun ve Cheng 2002).

Ayrıca yüksek asit konsantrasyonu ve yüksek sıcaklık mikroorganizma gelişimini engelleyen inhibitör bileşiklerin miktarını artırmaktadır (Harish vd 2015).

Selülozun asitlerle hidrolize edilmesinde en büyük sorun, yoğun hidrojen bağları ile sıkışık haldeki kristal bölgelerin asitlere reaksiyonunun, amorf bölgelere ve hemiselülozlara göre daha zor olması olarak ifade edilmektedir. Bu nedenle, asitlerle selülozun hidrolize edilmesi, kristallik derecesi ile yakından ilgili olmaktadır. Bu yöntem ile mannoz için % 89, galaktoz için % 82 ve glukoz için % 50 verim elde edildiği kanıtlanmıştır (Ertaş vd 2007). Martin vd. (2007), pirinç kavuzunu 122°C'de, %2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1: 10 katı: sıvı oranında ve 20, 40 ve 60 dakika boyunca hidrolizini gerçekleştirmişler ve elde edilen fermente edilebilir şeker konsantrasyonlarını ise farklı süreler için sırasıyla 26, 29 ve 33,5 g/L olarak belirlemişlerdir.

Şahin vd (2007) polisakkaritlerin asit hidrolizini şu şekilde açıklamaktadır:

“Asitlerin selülozu parçalaması (hidrolize etmesi) konsantrasyona bağlı olarak genellikle iki aşamada olur. İlk aşamada asitler, kolayca ulaşabildiği amorf bölgeleri parçalarlar ve uzaklaştırır. Amorf bölgesi uzaklaşan selüloz hidroselüloz olarak isimlendirilir. Bu nedenle bozulmadan kalan selülozun kristallik derecesi artmaktadır. Derişik asitlerin kullanılması ve reaksiyon süresinin uzatılması sonucu selüloz monomerik yapı taşı olan glukozla dönüşebilir. Tipik olarak, odunların asitlerle hidrolizasyona uğratılmasıyla aşağıda kısaca özetlenen reaksiyon ile selülozdan %90 saflıkta glukoz elde edilebilir (Şekil 2.6). Kuvvetli asitlerle odunların hidrolizasyon işleminde genellikle sülfürik asit veya hidroklorik asit kullanılmaktadır. Endüstriyel düzeyde, derişik hidroklorik asitin kullanılmasına bağlı olarak geliştirilen Bergius-Rheinau prosesi ile odunlardan yaklaşık %65 verimle şeker elde edilebilir. Seyreltik asitlerle biyokütlenin hidrolizasyonu, reaksiyonların zayıf ve basamaklı oluşmasından dolayı hetorejen ve karmaşık durum gösterir. Bu proseste, derişik asitlerle hidrolizasyondaki gibi, ara ürün olarak selülozun şişmesi olmaz. Fakat selülozun parçalanmasıyla, molekül ağırlığı düşük bazı ara ürünler oluşur (Oligosakkaritler) ve bunların hızlı bir şekilde reaksiyona girmesiyle de basit şekerler oluşur. Derişik ve seyreltik asitlerle polisakkaritlerin hidrolizasyonu (B ve C) özet olarak gösterilmiştir”.



Şekil 2.6. Derişik ve seyreltik asitlerle polisakkaritlerin hidrolizasyonu

Martin vd (2007) pirinç kavuzunu 122°C’de, %2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1: 10 K:S’de ve 20, 40 ve 60 dk boyunca hidrolizini gerçekleştirmişler ve elde edilen FŞK’yi ise farklı süreler için sırasıyla 26, 29 ve 33.5 g/L olarak belirlemişlerdir.

Nigam (2001) karbon kaynağı olarak buğday samanı kullandığı bir çalışmada lignoselülozik materyali önce hidroliz sonra detoksifiye işlemi uygulamıştır. Hidroliz işlemini (90°C, 1:20 K:S, 18 h, %1.85 (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) paslanmaz çelik yapıya sahip bir reaktörde gerçekleştirmiştir. Vakum altında konsantre edilen buğday samanının içeriği 45 g/L ksiloz, 6.40 g/L glukoz, 9 g/L arabinoz, 0.27 g/L furfural ve 6.90 g/L asetik asit olarak belirlenmiştir. Detoksifikasyon yönteminde ise 100°C de 15 dk kaynatılan hidrolizata Ca(OH)<sub>2</sub> ilave edilerek pH 10’a ayarlanmıştır. Bu işlem sonrasında elde edilen hidrolizat kullanılarak *Pichia stipitis* (NRRL Y-7124) ile fermentasyon sonunda 19.10 g/L etanol elde edilmiştir. Bu yöntemle etanol miktarını sadece nötrale işlemi uygulanan hidrolizatlardan elde edilen etanol miktarına göre 2.4 kat arttırmışlardır.

### 2.3.3. Lignoselülozik hidrolizatların inhibitörleri

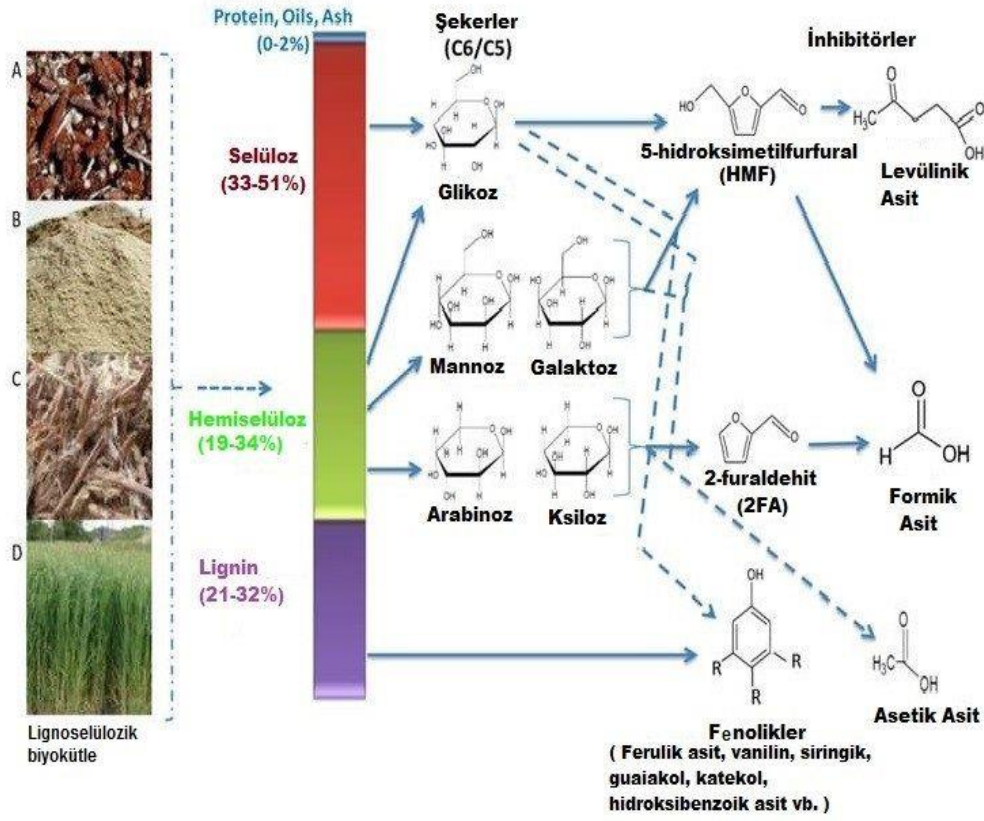
Lignoselülozik materyallerden katma değeri yüksek ürün üretebilmek için uygulanan ön-işlemler bir takım sorunları da beraberinde getirmektedir. Lignoselülozik yapının bozunması sırasında hidrolizat sadece fermente edilebilir şekerleri içermez, bu arada geniş bir aralıkta mikroorganizmayı inhibe edici toksik bileşikler de oluşur (Şekil 2.7). Bu bileşikler fermentatif mikroorganizmaları baskılayarak şeker kullanımını düşürmekte ve böylece ürün oluşumunu da azaltmaktadır.

Asetik asit ve levunilik asit gibi zayıf asitler, furan aldehitleri, inorganik iyonlar, aromatikler ve fenolik bileşikler inhibitör bileşiklerdir (Chandel vd 2007a). Asetik asit, lignin ayrışmasında hemiselüloz serbest duruma geçerken oluşan fermentasyon inhibitörü olarak bilinmektedir (Brethauer ve Studer 2015). Yapılarına göre inhibitör bileşikler furan türevleri, zayıf asitler ve fenolik bileşikler olarak sınıflandırılabilir. En yaygın olarak bilinen furan türevleri heksozların degradasyonu sırasında oluşan HMF ve pentozların degradasyonu sırasında oluşan furfural olarak bilinmektedir. HMF ve

furfuralın degradasyonu sonucu ise yine inhibitör bir bileşik olan formik asit oluşmaktadır. Levunilik asit HMF'nin degradasyonu sonucu oluşan inhibitör bileşiklerden bir diğeridir. Zayıf asit olan asetik asit ise hemiselülozun asetil gruplarından gelmektedir. Çeşitli fenolik bileşiklerin de ligninden kaynaklandığı düşünülmektedir (Moreno vd 2015, Mussatto ve Roberto 2004). Fenolik bileşiklerin fermentasyon üzerine önemli etkisi vardır ve bu bileşiklerin bazıları (ferulik asit, vanilik asit, hidroksibenzoik asit ve syringaldehit) mikroorganizmalar için toksiktir (Baral ve Shah 2014, Zha vd 2012). Ligninden kaynaklanan degradasyon ürünleri az konsantrasyonlarda bile mikroorganizmalar için furfural ve HMF'den daha toksik bir etkiye sahiptir (Mussatto ve Roberto 2004).

İnhibitörlerin türü ve konsantrasyonları hem kullanılacak olan materyale hem de seçilen ön-işlem metoduna göre değişiklik gösterebilmektedir (Baral ve Shah 2014, Jönsson vd 2015, Mussatto ve Roberto 2004). İnhibitör bileşikler, fermentatif organizmaların mikrobiyal gelişimini, ürün oluşturmasını ve de şeker kullanımını etkilemektedir (Zha vd 2012). Ayrıca çözünmüş oksijen miktarı, ortam pH'sı gibi fermentasyon koşullarını da etkileyerek fermentasyonun sonlandırılmasına neden olmaktadır (Mussatto ve Roberto 2004). Ancak en önemli sorun bu inhibitörlerin toksisite mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmiş olmasıdır.





Şekil 2.7. Lignoselülozik hammaddelerin bileşenleri ve hidroliz sonucunda oluşan ürünler

(Baral ve Shah 2014)

### 2.3.4. Lignoselülozik hidrolizatların detoksifikasyonu

Detoksifikasyon işlemi, lignoselülozik hidrolizatlardan etanol üretiminde uygulanması gereken önemli basamaklardan biridir. Detoksifikasyon, lignoselülozik materyallerin hidrolizi aşamasında açığa çıkan inhibitör bileşiklerin giderilmesinde ve/veya miktarının azaltılmasında rol almaktadır.

Detoksifikasyon metotlarının fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak birçok farklı uygulamaları vardır. Biyolojik uygulamalar enzim ve mikroorganizma kullanılan metotları içermektedir. Kimyasal uygulamalar toksik bileşiklerin çökmesini ve belirli pH değerleri altında bazı inhibitörlerin iyonizasyonunu içermektedir. İyon değişimi, adsorpsiyon, overliming ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), aktif kömür uygulaması, evaporasyon, alkali uygulamaları ve moleküler eleklerle muamele bunlardan bazılarıdır. Ayrıca bu yöntemlerin kombine olarak da uygulanabilmesi de çeşitliliği ve etkinliği de arttırmıştır.

Aktif kömür uygulamaları lignoselülozik hidrolizatlar için etkili yöntemlerden biridir. Hidrofobik olan aktif kömür furan ve fenolik bileşiklerin inhibitör etkisini daha etkili bir şekilde önlemektedir (Gupta vd 2009). Sıcaklık, aktif kömür konsantrasyonu, pH, işlem süresi gibi parametreler detoksifikasyon metodunun etkinliğini değiştirmektedir (Stoutenburg 2013).

Detoksifikasyon metodunun etkinliği hidrolizata ve fermentasyonda kullanılan mikroorganizmanın adaptasyonuna bağlıdır. Bu metodunun dezavantajı ise lignosellülozik hidrolizattaki şeker miktarını azaltmasıdır. Fermentasyonda inhibitör toleransı olan bir mikroorganizma kullanılması detoksifikasyon metoduna ihtiyaç duyulmadan fermentasyonun iyi bir şekilde sonuçlanmasını sağlayabilmektedir (Stoutenburg 2013).

Carvalho vd (2005) ksilitol üretmek amacıyla bira yapımında oluşan tahıl atıklarını kullanmışlardır. Elde ettikleri hidrolizatları farklı pH noktalarında iyon değişimi, aktif kömür uygulaması ve overliming ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pH 10) yöntemleriyle detoksifiye etmişlerdir. En yüksek ksilitol üretimini aktif kömür detoksifikasyonu sonucu elde ettikleri hidrolizatla elde etmişlerdir. Hidrolizat 1:10 (w/v) aktif kömür kullanılarak oda sıcaklığında pH 5.5 noktasında ve 1 saat karıştırarak detoksifiye edilmiştir. Detoksifikasyon sonunda furfural ve HMF konsantrasyonları sırasıyla %92 ve %68 oranında azaltmıştır. 1.25 g/L olan FMK ise aktif kömür detoksifikasyonu sonucu 0.5'e düşürülmüştür.

Chandel vd (2007b) şeker kamışı küspesinden *Candida shehatae* ile etanol üretimini araştırmışlardır. Şeker kamışı küspesini %2.5 HCl ile hidrolize edip toplam FŞK, furanlar, toplam FMK ve asetik asit konsantrasyonu sırasıyla 30.29 g/L, 1.89 g/L, 2.75 g/L ve 5.45 g/L olarak belirlemişlerdir. Hidrolizatın aktif karbon ile detoksifikasyonu sonucunda furanlarda, asetik asit konsantrasyonunda ve toplam fenolik madde içeriğinde sırasıyla %38.7, %46.8 ve %57.5 azalma tespit edilmiştir. Hidrolizatın CaO ile detoksifikasyonu sonucunda ise furanlardaki ve fenolik maddelerdeki azalmalar sırasıyla %45.8 ve %35.9 olarak tespit edilmiştir, ancak asetik asit konsantrasyonunda herhangi bir azalma belirlenmemiştir. Aktif karbon ve kireçleme yöntemleri ile detoksifiye edilmiş hidrolizatların etanol fermentasyonları sonucunda, maksimum etanol verimleri sırasıyla 0.42 g/g ve 0.30 g/g olarak tespit edilmiştir.

## 2.4. Etanol Fermentasyonu

Alkol fermentasyonu olarak da adlandırılan etanol fermentasyonu, başta glukoz olmak üzere değişik karbonhidratlardan mikroorganizmaların enerji üretmek amacıyla çeşitli metabolik adımlardan geçerek ürün olarak etanol ve karbondioksit oluşturdukları biyolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Yığıtoğu vd 2012). Mikroorganizmalar ile şekerlerin fermentasyonunda en yaygın oluşan ürün etanoldür.

### 2.4.1. Etanol Üreten Mikroorganizmalar

Etanol üretiminde en çok kullanılan mikroorganizmalar mayalardır ve bunların başında *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalar gelmektedir. *Mucor*, *Rhizopus* ve *Aspergillus* cinslerine ait küf mantarı türlerinin de etanol fermentasyonu yapabildikleri, amacibunların endüstriyel etanol üretimi için uygun olmadıkları, ayrıca etanol üretimleri üzerinde fazla çalışma yapılmadığı bildirilmiştir (Anonim 2014b).

Etanol fermentasyonu için incelenen mikroorganizmalar arasında *S. cerevisiae* ve *Zymomonas mobilis* glukozu etanole hızlı ve verimli bir şekilde dönüştürür. Ancak bu mikroorganizmalar pentozları etanole fermente edebilme yeteneğine sahip değildirler

(Balat 2011, Chen ve Fu 2016, Mohagheghi vd 2002). *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* ve *Pachysolan tannophilus* hem heksozları hem de pentozları oldukça kısa bir sürede fermente edebilen mayalardır (Chandel vd 2007a). Özellikle ksilozu fermente edebilme yeteneğinde olan *Pichia stipitis*, son zamanlarda etanol üretmek amacıyla kullanılmaktadır (Gupta ve Verma 2015).

Etanol fermentasyonunda yakın gelecekte çok daha fazla öneme sahip olacağı düşünülen etanolojenik bakteriler ise *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis* türleridir (Çöpür vd 2011). Mohagheghi vd (2002) yaptıkları bir çalışmada *Z. mobilis* bakteri türlerinin glukoz içeren lignoselülozik biyokütleden hızlı ve etkin bir şekilde biyoetanol üretme kapasitesine sahip olduğunu tespit ederek mayalara göre %5 daha yüksek verim ve beş katından daha fazla hacimsel verimlilik elde etmişlerdir. *Z. mobilis* ile glukoz fermentasyonunda %97'den fazla biyoetanol verimi elde etmişlerdir.

Etanol fermantasyonunda kullanılan diğer mikroorganizmalar bütün metabolik şekerleri fermente edebilecek rekombinant mayalardır. Rekombinant maya üretiminde iki yaklaşım söz konusudur. Birincisi; mayalardaki doğal etanol üreten genleri modifiye ederek pentozları metabolik olarak dönüştürmektir. İkinci yaklaşım ise hem pentozları hem de heksozları kullanabilen suşlar elde edip etanol verimliliğini arttırmaktır (Chandel vd 2007a).

*Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum* *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobium brockii* gibi termofilik anaerobik bakterilerde biyoetanol üreticileri olarak incelenen diğer mikroorganizmalardır. Mayalara göre ucuz hammaddeleri daha kolay bir şekilde kullanmakta ve yüksek sıcaklıklara dayanabilmektedirler (Balat 2011).

#### 2.4.2. Fermentasyonda kullanılan maya: *P. stipitis*

Mayalar çok hücreli küflerin aksine tek hücreli olarak bulunan ökaryotik yapıli mantarlardır. Bakterilerden daha büyük (5-8 µm), oval, uzun, eliptik veya yuvarlak hücre şekilleri ile ayrılırlar (Webster ve Weber 2007).

*P. stipitis*, yeni adlandırma ile *Scheffersomyces stipitis*, mantarlar aleminin *Saccharomycetaceae* familyasına ait bir mayadır. Hücre çapları 3-5 µm arasında değişmektedir. *P. stipitis* ilk olarak odunsu yapılarla endosimbioz ilişki kuran Passalid böceklerinin larvalarından izole edilmiştir (Jeffries ve Van Vleet 2009).

*P. stipitis*'in genom yapısı glikoliz, trikarboksi asit döngüsü ve oksidatif pentoz fosfat yolu için gerekli olan bütün genleri içermektedir (Anonim 2016d). Ksilozu fermente edebilme yeteneğinde olan *P. stipitis*, lignoselülozik materyallerin etanol fermentasyonunda değerlendirilmesinde büyük rol oynamaktadır. Lignoselülozik materyallerden etanol üretimlerinde *P. stipitis* suşlarının tercih edilmesinin bir diğer nedeni de lignoselülozik yapının hidrolizi sırasında açığa çıkan furfural ve HMF'ye karşı tolerans göstermesidir (Liu vd 2005). Ksilozu hızlı bir şekilde fermente edebilmesinden dolayı da endüstriyel etanol üretimlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Isci vd (2008) yaptıkları bir çalışmada dallı darı hidrolizatını sulu amonyum kullanarak elde etmişlerdir. Eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon yöntemi ile *S.cerevisia* kullanarak 22.16 g/L etanol elde etmişlerdir. Farklı amonyum konsantrasyonu ve sürede elde ettikleri hidrolizatlardan en yüksek etanol konsantrasyonunu 10 ml/g amonyum, %6 selüloz enzimi kullanarak 10 gün sonunda belirlemişlerdir.

Gupta vd (2009) mesquite (küçük ağaçların birkaç türü için ortak adı) talaşlarına seyreltik asit ve enzim hidrolizi uygulamışlar ve sonrasında  $\text{Ca(OH)}_2$  ile detoksifikasyon,  $\text{NaSO}_3$ ,  $\text{NaSO}_3$  ve  $\text{NaClO}_2$  karışımlarıyla ise delignifikasyon yapmışlardır. Glukoz konsantrasyonunun 18.24 g/L olduğu bir fermentör ortamında *P. stipitis-NCIM 3498* ile 7.13g/L, glukoz konsantrasyonunun 37.47 g/L olduğu bir ortamda da *Saccharomyces cerevisiae* ile 18.52 g/L etanol üretmişlerdir.

Fonseca vd (2013) pirinç samanından *P. Stipitis* mayası ile etanol üretimi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Materyalin hidroliz işlemini 120 °C sıcaklık, 1:10 K:S, %1 ve %2  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ve 90 dk hidroliz koşullarında otoklav kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu koşullarda toplam 18.9 g/L şeker elde etmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri hidrolizatları NaOH ile detoksifiye etmişlerdir. Hidrolizatlarda başlangıçta yaklaşık 1 g/L olan furan miktarını detoksifikasyon sonrasında 0.5'in altına düşürmüşlerdir. Detoksifiye edilmemiş hidrolizatlara oranla %33 daha fazla etanol verimi elde etmişlerdir.

Turhan vd (2015) buğday samanı hidrolizatlarının microfluidizer ile ön işleminin optimizasyonunu çalışmışlar ve hidrolizatlardan etanol üretimleri gerçekleştirmişlerdir. Optimum koşulu %1 enzim kullanarak 1500 bar basınç, 15 FPU/g buğday samanı olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda %82 glukoz, %94 ksiloz ve %65 etanol verimleri elde etmişlerdir.

Barisik vd (2016) tarafından yapılan bir çalışmada buğday samanı hidrolizatından *S.cerevisia* ATCC 20618 ile etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Buğday samanının ön işlemini farklı organik asitlerle gerçekleştirmişler ve ön işlem parametrelerini (sıcaklık, asit konsantrasyonu ve süre) RSM kullanarak optimize etmişlerdir. Gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda maleik asit kullanılarak elde edilen hirolizattan %80, oksalik asit %79 ve süksinik asit ile %59 etanol verimi elde etmişlerdir.

Bu çalışmada lignoselülozik içeriğe sahip tarımsal atıklardan alternatif bir enerji kaynağı olan biyoetanol üretilmiştir. AK, BK, ÇK ve YK'nin seyreltik sülfürik asit hidroliz koşulları OFAT ve RSM yardımıyla optimize edilip, daha sonra elde edilen hidrolizatlara aktif kömür ile detoksifikasyon işlemi uygulanmıştır. Detoksifikasyon işlem parametreleri de RSM yardımıyla optimize edilmiştir. Daha sonra detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatlardan etanol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Etanol üretiminde kullanılan tarımsal kaynaklar

Çalışma süresince kullanılan materyaller 2015 yılında hasat edilen AK, ÇK ve YK Konya’da bulunan Sağlık Tarım Ürünleri ve Gıda San. Ltd. Şti tarafından BK ise Çorum ilinin Osmancık ilçesindeki bir yerel üreticiden temin edilmiştir. Materyaller analiz anına kadar +4°C’de depolanmıştır. Arpa ve yulaf kavuzları BOSCH MKM6000 kahve öğütme makinası kullanılarak öğütülmüştür. Elde edilen materyallerin homojen olmasını sağlamak için öğütme işlemi belirli bir süre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Buğday ve çavdar kepeği ise doğrudan kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan materyaller

##### 3.1.2. Mikroorganizmalar ve besiyerleri

Etanol üretmek amacıyla kullanılan mayalar, *Pichia stipitis*; ATCC 58784 ve ATCC 58785’tir. Suşlar Doç. Dr. Aslı İŞÇİ YAKAN’dan (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Suşlar için gerekli besiyeri bileşimi

Medya İçeriği	Miktar (g/L)	
	<i>Pichia stipitis</i> ATCC 58784	<i>Pichia stipitis</i> ATCC 58785
Glukoz	10	20
Maya Ekstraktı	3	10
Malt Ekstraktı	3	-
Pepton	5	20

Sular için gerekli besiyeri bileşimi izelge 3.1’de belirtilmiştir. *Pichia stipitis* (ATCC 58784), 10 g/L glukoz, 3 g/L maya ekstraktı, 3 g/L malt ekstraktı ve 5 g/L pepton içeren besiyerinde (YM) 48 saat boyunca 30°C’de geliştirilmiştir. Besiyerinin pH’ı, 4 N NaOH ve 4 N HCl kullanılarak 6.2’ye ayarlanmıştır. *Pichia stipitis* (ATCC 58785) ise 20 g/L glukoz, 10 g/L maya ekstraktı ve 20 g/L pepton içeren besiyerinde (YPD) 48 saat boyunca 30°C’de geliştirilmiştir. YPD’nin pH’sı ise 4 N NaOH ve 4 N HCl kullanılarak 5.6’ya ayarlanmıştır. n kültür için ise; *Pichia stipitis* suları 100 ml YM ve YPD içeren 250 ml’lik flasklarda 24 saat boyunca 30°C ve 150 devir/dk da geliştirilmiştir (Lee vd 2011, Zhu vd 2011).

Kültürler, +4°C’de depolanmış ve canlılığı korumak amacıyla her ay yenilenmiştir. Uzun süreli muhafaza için stok kültürler, %20’lik gliserol içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.1.3. Araştırmanın deneme deseni

- AK, BK, K ve YK’nin hemiselüloz, selüloz ve lignin içeriğinin belirlenmesi
- OFAT kullanılarak maksimum ve minimum hidroliz koşullarının belirlenmesi
- OFAT’tan elde edilen verilerle RSM kullanılarak optimum seyreltik sülfürik asit hidroliz koşullarının belirlenmesi
- Optimum koşullarda elde edilen hidrolizatların RSM ile aktif kömür detoksifikasyon şartlarının optimize edilmesi
- Ksiloz ve glukoz gibi saf karbon kaynaklarından (kontrol örnekleri) ve optimum koşullar kullanılarak detoksifiye edilen/edilmeyen hidrolizatlardan *Pichia stipitis* ATCC 58784 ve ATCC 58785 suları kullanılarak etanol retimi
- Optimum koşullar kullanılarak detoksifiye edilmiş/edilmemiş hidrolizatların indirgen eker (glukoz, ksiloz, mannoz vd.) ve inhibitör (HMF, furfural, asetik asit vd.) konsantrasyonlarının belirlenmesi

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Materyallerin bileşen ve nem analizleri

Lignoselülozik materyallerin selüloz, hemiselüloz, lignin ve ekstraktif madde bileşen analizi Li vd (2004) göre gerçekleştirilmiştir. Materyallerin nem içeriği ise Sluiter vd (2008)’e göre gerçekleştirilmiştir.

#### *Ekstraktif analizi*

5.00 g biyoktle atığı 80°C geri soğutucu altında benzen/etanol (2:1) karışımı ile 3 saat süre ile karıtırılmıtır. Kalıntı bir süre oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 105-110 °C’de tutulan etüvde sabit tartıma kadar kurutulmuştur. Daha sonra oda sıcaklığına gelene kadar desikatörde soğutulduktan sonraki tartım alınarak ekstrakte edilen madde miktarı hesaplanmıştır. Ekstrakte edilen madde miktarı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$W_1 (wt. \%) = \frac{G_0 - G_1}{G_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada;

$W_1$  = Ekstrakte edilen madde miktarı

$G_0$  = Başlangıç deney numunesi, g

$G_1$  = Ekstraksiyon işleminden sonra kalan kalıntıdır, g.

### ***Hemiselüloz analizi***

Ekstraksiyon sonucunda kalan kalıntı balona konmuş ve üstüne 150 ml NaOH çözeltisi (20 g/L) ilave edilmiştir. Karışım geri soğutucu altında 3.5 saat boyunca karıştırılmıştır. Atık süzülükten sonra su ile yıkanarak nötrleştirilmiştir. Sabit tartıma gelene kadar etüvde kurutulmuş, daha sonra oda sıcaklığına kadar desikatörde soğutulup tartılmıştır. Hemiselüloz miktarı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$W_2 (wt. \%) = \frac{G_1 - G_2}{G_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada;

$W_2$  = Hemiselüloz miktarı

$G_0$  = Başlangıç deney numunesi, g

$G_1$  = Ekstraksiyon işleminden sonra kalan kalıntı, g

$G_2$  = Sabit tartımdan sonra kalan kalıntıdır, g.

### ***Lignin analizi***

Ekstraksiyon analizi sonucunda kalan kalıntıdan 1.00 g alınarak bir balona alınmış ve sabit tartıma kadar kurutulmuştur. Daha sonra örnek desikatörde soğutularak tartılacaktır. Örnek üzerine daha sonra yavaşça %72'lik 30 ml  $H_2SO_4$  çözeltisi eklenmiş ve bu karışım 8-15 °C sıcaklıkta 24 saat süre ile bekletilmiştir. Daha sonra 300 ml saf su ilave edilip geri soğutucu altında 1 saat kaynatılmıştır. Karışım soğuduktan sonra pH metre ile kontrol edilerek, sülfat iyonu kalmayınca kadar yıkanmıştır. Daha sonra kalıntı etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulduktan sonra desikatörde soğutulmuş ve tartılmıştır. Lignin miktarı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$W_3 (wt. \%) = \frac{G_4 \times (1 - W_1)}{G_3} \times 100 \quad (3.3)$$

Burada;

$W_3$  = Lignin miktarı

$W_1$  = Ekstrakte edilen madde miktarı

$G_3$  = Ekstraksiyon analizi sonucunda kalan kalıntı(1.00), g

$G_4$  = lignin analizi sonucu sabit tartımdan sonra kalan kalıntıdır, g.

### ***Selüloz analizi***

Selüloz miktarı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$W_4 (wt. \%) = 100 - (W_1 + W_2 + W_3) \quad (3.4)$$

Burada;

$W_4$  = % Selüloz miktarı

$W_1$  = % Ekstrakte edilen madde miktarı

$W_2$  = % Hemiselüloz miktarı

$W_3$  = % Lignin miktarı

### *Nem Analizi*

Kurutma kabı 105°C'ye ayarlanmış etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Desikatöre alınan kurutma kabı oda sıcaklığına geldikten sonra darası alınır ve kaba 5.00 g örnek tartılır ( $M_0$ ). 105°C'de sabit tartıma gelene kadar etüvde kurutma işlemi tamamlanır. Daha sonra desikatöre alınan örnek oda sıcaklığına geldikten sonra tekrar tartılır ( $M_1$ ). Materyallerin nem içeriği denklem 3.5'e göre hesaplanmıştır.

$$Nem (\%) = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (3.5)$$

### **3.2.2. Lignoselülozik materyallerin hidroliz koşullarının OFAT ile optimizasyonu**

Lignoselülozik AK, BK, ÇK ve YK materyallerinin seyreltik sülfürik asit ile hidroliz koşullarının optimizasyonu için öncelikle OFAT kullanılmıştır. OFAT için hidroliz parametreleri sıcaklık (110–130°C), katı: sıvı oranı (1:8–1:16 w/v), seyreltik sülfürik asit oranı (%1-5, v/v) ve süre (30-90 dk) olarak belirlenmiştir. Hidroliz koşulları maksimum şeker konsantrasyonu, maksimum ekstrakt verimi ve minimum fenolik madde konsantrasyonu olacak şekilde Design Expert V.7 kullanılarak tasarlanmıştır.

Çizelge 3.2'de AK, BK, ÇK ve YK materyallerinden fermente edilebilir şekerlerin elde edilmesi için belirtilen parametrelere göre OFAT tarafından belirlenen koşullar verilmiştir. Hidroliz denemelerinde arpa ve yulaf kavuzları BOSCH MKM6000 kahve öğütme makinası yardımıyla partikül büyüklüğü yaklaşık 2 mm olacak şekilde öğütülmüştür. Buğday ve çavdar kepeği ise herhangi bir işlem uygulanmadan doğrudan hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminde materyaller 5 g olarak erlenmayerlere tartılmıştır. v/v olarak hazırlanan seyreltik sülfürik asit konsantrasyonları w/v oranına göre materyallere ilave edilmiştir. Hidroliz işlemi otoklav ortamında belirlenen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bütün hidrolizatlar öncelikle kaba filtre kağıdı yardımıyla filtrelenmiştir. Daha sonra ise hidrolizatlar 20°C, 4000 rpm de ve 20 dakika boyunca santrifüj edilmiş (Thermo VWR Mega Star 3.0R, Am Kalkberg, Germany) ve örnek üzerindeki berrak kısım, analiz için alınmıştır. Verilen deneme desenine göre bu hidroliz koşullarının tamamı gerçekleştirilmiş, hidrolizatların toplam indirgen şeker miktarları belirlenmiş ve sonuçların varyans ve regresyon analizleri yapılmıştır.



Çizelge 3.2. OFAT metodu hidroliz parametreleri deneme deseni

Uygulama	Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (% v/v)	Süre (dk)
Adım-1	110	1/8 (Sabit)	1 (Sabit)	30 (Sabit)
	110			
	115			
	120			
	120			
	125			
	130			
Adım-2	A (Sabit)	1:8	1 (Sabit)	30 (Sabit)
		1:8		
		1:10		
		1:12		
		1:12		
		1:14		
		1:16		
Adım-3	A (Sabit)	B (Sabit)	1	30 (Sabit)
			1	
			2	
			3	
			3	
			4	
			5	
Adım-4	A (Sabit)	B (Sabit)	C (Sabit)	30
				30
				45
				60
				60
				75
				90
90				

### *Ekstrakt verimi*

Hidroliz işlemi sonucu elde edilen ekstrakt miktarı mezur yardımı ile ölçülmüştür. Ekstrakt verimi aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$EV (\%) = \frac{V}{V_0} \times 100 \quad (3.6)$$

Burada;

EV = Ekstrakt verimi

V = Hidroliz sonucu elde edilen ekstrakt miktarı, ml

V<sub>0</sub> = K:S'ye göre belirlenmiş asit çözelti miktarı, ml

### **3.2.3. Lignoselülozik materyallerin hidroliz koşullarının RSM ile optimizasyonu**

Ham materyallerin hidroliz koşullarının RSM ile optimizasyonu için OFAT ile elde edilen sonuçların ışığında seyreltik sülfürik asit hidroliz parametrelerinin minimum

ve maksimum noktaları tespit edilmiştir. Bu noktalara göre RSM’de deneme deseni oluşturulmuş ve bu deneme desenine göre çalışmada kullanılacak lignoselülozik materyallerin seyreltik asit hidrolizleri 3.2.2’den elde edilen verilere göre gerçekleştirilmiştir.

OFAT’ın sonucunda elde edilen varyans ve regresyon sonuçlarına göre AK hidrolizatları için süre ve YK hidrolizatları için asit konsantrasyonu parametrelerinin önemsiz ( $P>0.01$ ) çıkmasından dolayı OFAT ile belirlenen değerler optimum nokta olarak belirlenmiştir. Hidroliz işlemi sonucu elde edilen hidrolizatlara ait resim Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Tüm denemeler gerçekleştirildikten sonra optimum koşullar, tahmin edilen ve gerçekleşen değerlere göre Design Expert V.7 istatistik programı kullanılarak doğrulanmıştır.



Şekil 3.2. Optimum koşullarda elde edilmiş hidrolizatlar

### 3.2.4. Lignoselülozik hidrolizatların detoksifikasyonu

RSM ile belirlenen optimum hidroliz koşulları kullanılarak elde edilen hidrolizatlar (100 ml) detoksifikasyon için aktif kömür ile muamele edilmiştir. Detoksifikasyon işlemi; aktif kömür konsantrasyonu, sıcaklık ve süre parametreleri RSM kullanılarak optimize edilmiştir. Minimum fenolik madde ve maksimum indirgen şeker miktarları metotta cevap olarak kullanılmıştır. RSM için belirlenen minimum ve maksimum noktalar Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. RSM Aktif kömür detoksifikasyon parametreleri

Değişken	Minimum	Maksimum
Sıcaklık (°C)	25	35
Aktif kömür oranı (%)	1	3
Süre (dk)	30	40

Detoksifikasyon işlemi sonunda hidrolizatlardaki aktif kömür santrifüj (4000 rpm, 20 dk, 20°C) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra ise berrak kısım kaba filtre

kağıdı yardımıyla filtrelenmiştir. Çizelge 3.4’de aktif kömür detoksifikasyon optimizasyonu için RSM tarafından belirlenen deneme koşulları verilmiştir. Hidrolizatların aktif kömür detoksifikasyonuna ait örnek resimler Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. RSM aktif kömür detoksifikasyon koşulları

Aktif Kömür Konsantrasyonu (% w/v)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
3	30	25
3	40	30
2	30	30
2	40	25
1	30	35
2	40	35
2	20	25
2	30	30
1	20	30
2	20	35
2	30	30
1	40	30
1	30	25
3	30	35
3	20	30



Şekil 3.3. Hidrolizatların aktif kömür detoksifikasyonuna ait resimler

### 3.2.5. Etanol fermentasyonu

Etanol fermentasyonları, optimum hidroliz koşullarında üretilen detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatları ve YM ve YPD besiyerlerinin 100 ml'sini içeren 250 ml'lik flasklar ile bir çalkalamalı inkübatörde (CERTOMAT® IS, Goettingen, Germany) gerçekleştirilmiştir. Detoksifiye edilmemiş ve edilmiş hidrolizatlar, glukoz ve ksilozun yerine karbon kaynağı olarak kullanılmış, ayrıca besiyerine diğer besiyeri bileşenleri de ilave edilmiştir. Kontrol fermentasyonlarında ise karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanılmıştır. Fermentasyon için, sıcaklık 30°C, karıştırma hızı 150 rpm ve inokülasyon oranı %3 olarak belirlenmiştir. Fermentasyon ortamının pH'ı, *Pichia stipitis* ATCC 58784 ve ATCC 58785 suşları için sterilizasyondan önce sırasıyla 6.2 ve 5.6'ya ayarlanmıştır ve besiyeri 121°C'de 20 dakika steril edilmiştir. Etanol, şeker ve biyokütle analizleri için başlangıç, sıfır zamanı ve 2, 4, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72, 84 ve 90. saat örnekleri alınmıştır. Örnekler analiz anına kadar +4°C'de saklanmıştır. Her fermentasyon mikroorganizmaların ölüm fazına geçme süresine bağlı olarak sonlandırılmıştır. Çalışmadaki fermentasyonlara ait resim Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatların fermentasyonu

#### ***Kinetik parametrelerin belirlenmesi***

Çalkalamalı inkübatörden alınan örneklerde şeker, biyokütle miktarı ve etanol analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- Şeker tüketimi ( $S$ , g/L) =  $S_f - S_i$
- Etanol üretimi ( $P$ , g/L) =  $P_f - P_i$
- Etanol verimi ( $Y_{P/S}$ , %) =  $(P/S) \times 100$
- Biyokütle verimi ( $Y_{X/S}$ , %) =  $(X/S) \times 100$

- Biyokütle başına ürün verimi ( $Y_{P/X}$ , g/g) =  $P/X$
  - Maksimum tüketim hızı ( $Q_S$ , g/L/h) =  $(-ds/dt)_{max}$
  - Maksimum üretim hızı ( $Q_P$ , g/L/h) =  $(dp/dt)_{max}$
  - Maksimum gelişim hızı ( $Q_X$ , g/L/h) =  $(dx/dt)_{max}$
  - Canlı hücrelerin iki katına çıkma süresi ( $t_d$ , h) =  $\ln 2/\mu$
  - Şeker kullanım oranı ( $SUY$ , %) =  $S/(S_m) \times 100$
  - Teorik etanol verimi ( $TY$ , %) =  $(Y_{P/S}/51.1) \times 100$
- gibi kinetik parametreler hesaplanmıştır (Michael ve Fikret 2002).

### 3.2.6. Analiz yöntemleri

#### 3.2.6.1. Toplam indirgen şeker

Detoksifikasyon öncesi/sonrası hidrolizat örneklerindeki ve fermentasyondan alınan tüm örneklerdeki şeker miktarı 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir (Miller 1959). Kalıntı şeker analizinde, 0.1 ml örnek üzerine 3.9 ml saf su eklenmiş ve 0.08 ml 12M HCl eklenerek karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilmiş ve hidroliz edilmiştir. Bu noktada tüp içerisindeki örneklerin hidroliz sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir. Bu amaçla içerisinde saf su bulunan boş bir tüp ve termometre kullanılarak tüp içi sıcaklığın 90°C'ye kadar gelmesi beklenmiş ve 5 dakikalık süre başlatılmıştır. Daha sonra hidrolizat üzerine 0.2 ml 5N KOH eklenerek karıştırıldıktan sonra yeni bir tüpe 3 ml aktarılmış ve üzerine 3 ml DNSA solüsyonu eklenmiştir. Bu aşamada 3 ml saf su üzerine 3 ml DNSA eklenerek kör olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Solüsyon karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilip üzerine renk stabilizasyonunu sağlamak için 1 ml %40'luk potasyum sodyum tartarat eklenerek soğutulmuş ve 575 nm dalga boyunda okutularak standart glukoz ve ksiloz çözeltiliseleri ile hazırlanmış kurveden toplam şeker miktarı hesaplanmıştır (Ek 1).

#### 3.2.6.2. Şeker profili

Hidrolizat örneklerinin şeker profil (glukoz, ksiloz, maltoz, mannoz, arabinoz, galaktoz) analizi HPLC (ThermoScientific™, Waltham, Massachusetts, ABD) ile yapılmıştır. Asidik formda olan hidrolizat örnekleri önce Na-Asetat tamponu (pH=7) ile tamponlanarak 10 kat seyreltilmiştir. Örneklerden 1.5 ml alınarak 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra berrak kısımdan alınan örnek 0.22 µm membran filtre (Macharey-Nagel, Düren, Almanya) ile filtrelenmiş ve viallere alınan örnekler analiz anına kadar -18°C'de saklanmıştır.

#### *Kromatografi koşulları*

- Kolon: Transgenomic COREGel 87P column (300x7.8 mm<sup>2</sup>) (guard kolon ile kombine)
- Kolon sıcaklığı: 70°C
- Mobil faz: ultra saf su

- Hareketli faz akışı: 0.6 ml/dk
- Dedektör: Refraktif indeks
- Enjeksiyon: 20 µL

### 3.2.6.3. Fenolik bileşikler

Fenolik bileşiklerin analizi, Folin-Ciocalteu metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Orthofer & Lamuela-Raventos,1999). Analiz yapılacak olan tüplere uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra 0.5 ml örnek alınır. Üzerine 2.5 mL Folin-Cocalteu çözeltisi ilave edilir. Bu sırada Folin-Cocalteu çözelti ilavesi 0.5-2 dakikayı geçmemelidir. Daha sonra tüpe 2 mL % 7.5'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi de ilave edilerek tüpler vortekslenir. 50 °C'lik su banyosunda 5 dk ve karanlık bir bölmede 10 dk bekletildikten sonra UV spektrofotometrede 760 nm'de okuma yapılır. Kör deiyonize su ile hazırlanır. Absorbans değerinin 0.4-0.6 arasında olması istenir. Bunun için uygun oranlarda seyreltme yapılır.

### 3.2.6.4. Furfural ve HMF

Hidrolizat örneklerinin furfural ve HMF içeriği HPLC ile (ThermoScientific™, Waltham, Massachusetts, ABD) yardımıyla belirlenmiştir. Analizden önce hidrolizat örnekleri Na-Asetat tamponu (pH=7) ile tamponlanarak 200 kat seyreltilmiştir. Örneklerden 1.5 ml alınarak 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra berrak kısımdan alınan örnek 0.45 µm membran filtre (Macharey-Nagel, Düren, Almanya) ile filtrelenmiş ve viallere aaktarılan örnekler analiz anına kadar -18°C'de saklanmıştır.

#### *Kromatografi koşulları*

- Kolon: ODS-2 HYPERSIL (250x4.6 mm<sup>2</sup>)
- Kolon sıcaklığı: 50°C
- Mobil faz: 60/40 ACN/H<sub>2</sub>O
- Hareketli faz akışı: 0.4 ml/dk
- Dedektör: UV
- Enjeksiyon: 20 µL

### 3.2.6.5. Organik asitler

Hidrolizatların organik asit profili (asetik asit, formik asit) HPLC sistemi (ThermoScientific™, Waltham, Massachusetts, ABD) ile belirlenmiştir. Analizden önce hidrolizat örnekleri potasyum buffer (pH 7) ile 100 kat seyreltilmiştir. Örneklerden 1.5 ml alınarak 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra berrak kısımdan alınan örnek 0.45 µm membran filtre (Macharey-Nagel, Düren, Almanya) ile filtrelenmiş ve viallere aaktarılan örnekler analiz anına kadar -18°C'de saklanmıştır.

#### *Kromatografi koşulları*

- Kolon: Transgenomic IC Sep ICE-ORH-801 (guard kolon ile kombine)
- Kolon sıcaklığı: 65°C
- Mobil faz: 0.0025 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

- Hareketli faz akışı: 0.6 ml/dk
- Dedektör: Refraktif indeks
- Enjeksiyon: 20 µL

### 3.2.6.6. Etanol analizi

Fermentasyon ortamından alınan örneklerde etanol miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (Yellow Springs, Ohio, USA) kullanılmıştır. Bu sistemin ana prensibi, örnek alındığında cihazdaki (analiz edilecek örneğe uygun seçilen) enzim, örnekle reaksiyona girerek elektrokimyasal probun platinyum anodunu okside eder. Bunun sonucunda hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) açığa çıkar ve oluşan sinyale göre etanol konsantrasyonu belirlenir. Analiz kapsamında fermentasyondan alınan örnekler cihazın okuma aralığına göre seyreltikten sonra kalibre edilmiş cihazda okumalar gerçekleştirilmiştir. Cihazın çalışma koşulları Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.5. YSI 2700 select cihazının çalışma koşulları

Enjeksiyon miktarı	25 µL
Kalibrasyon metodu	Tekli kalibrasyon
Kalibrasyon standardı konsantrasyonu	2.00 g/L
Analiz süresi	60 sn
Oto kalibrasyon süresi	20 örnek
Kalibrasyon istasyonu	2

### 3.2.6.7. Biyokütle analizi

Çalkalamalı inkübatördeki flasklardan belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek amacıyla canlı hücre miktarı analiz edilmiştir. Bu amaçla örnekler, spektrofotometrenin okuma aralığına (0.5-0.6 nm) göre seyreltikten sonra kör olarak inoküle edilmemiş örnek (başlangıç örneği) kullanılarak ölçülmüştür. Canlı miktarları, 600 nm dalga boyuna ayarlanan spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer; Şangay, Çin) ölçülen absorbansların *P. Stipitis*; ATCC 58784 ve ATCC 58785 suşlarının sırasıyla  $y = 0,3135x - 0,3678$   $R^2 = 0,9991$ ;  $y = 0,2969x - 0,4474$   $R^2 = 0,9982$  denklemlerine göre hesaplanmıştır (Lee vd 2011, Zhu vd 2011).

### 3.2.7. İstatistiksel analiz

Optimizasyonda kullanılan deneme deseni ve istatistiksel analizinde Design Expert İstatistiksel Yazılımı (Version 7.0.0; Minneapolis, MN) kullanılmıştır. Program tarafından oluşturulan modelin deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı varyans analizi ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, quadratik ve interaksiyon etkilerinin cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güvenlik seviyesinde tespit edilmiştir. Bununla beraber, etanol fermentasyonlarının verim ve maksimum üretim hızı değerleri SAS istatistiksel programı (SAS Institute, Carry, NC) kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven seviyesinde analiz edilmiştir. Tüm parametrelerin değerleri, iki tekrarlamının ortalaması olarak verilmiştir ve tablolarda ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Lignoselülozik Materyallerin Bileşen ve Nem Analizleri

AK, BK, ÇK ve YK materyallerin selüloz, hemiseloz, lignin ve ekstraktif miktarlarını belirlemek için Liv vd. (2004)'e göre gerçekleştirilen bileşen analizlerine ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ayrıca Sluiter vd (2008)'e göre gerçekleştirilen nem içeriği analiz sonuçları da Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Materyallerin bileşen ve nem analizleri (wt.%, kuru madde)

Bileşenler	AK	BK	ÇK	YK
Selüloz	3.56±1.25	31.46±2.33	31.31±0.31	19.40±5.10
Hemiselüloz	66.02±0.13	28.00±3.23	39.64±1.48	50.41±4.59
Lignin	21.83±0.46	23.61±0.14	14.42±0.51	22.66±1.51
Ekstraktif madde	8.59±0.67	16.93±1.04	14.63±0.65	7.53±1.00
<b>Nem</b>	<b>9.31±0.05</b>	<b>9.92±0.08</b>	<b>11.59±0.02</b>	<b>8.22±0.11</b>

Çalışmaya benzer şekilde Favaro vd (2013) BK'nin lignoselülozik profilini belirlemeye çalışmışlardır. Selüloz miktarını %14.8, hemiselüloz miktarını %33.5 ve lignini ise %2 olarak belirlemişlerdir. AK için belirlenen lignoselüloz içeriğinden farklı olarak Kim vd (2008) gerçekleştirdikleri bir çalışmada AK'nin selüloz miktarını %33.6, hemiselüloz miktarını %37.2 ve lignin içeriğini %19.3 olarak tespit etmişlerdir.

Yine çalışmaya benzer şekilde (Sárossy vd (2013)) ÇK'nin kimyasal içeriğini belirledikleri bir çalışmada %60.2 selüloz, %12.6 hemiselüloz ve %4.6 lignin elde etmişlerdir. YK hidrolizatlarından ksilitol üretimi üzerine yapılan bir çalışmada ise YK'nin kimyasal içeriğini %29.26 selüloz, %28.35 hemiselüloz ve %22 lignin olarak belirlemişlerdir (Tamanini vd 2004).

### 4.2. Lignoselülozik Materyallerin Hidroliz Koşullarının OFAT ile Belirlenmesi

Materyallerin hidrolizinde her bir parametrenin etkisini araştırmak amacıyla OFAT kullanılmıştır. Sıcaklık, katı: sıvı oranı, asit konsantrasyonu ve süre OFAT'ın değişken parametreleri olarak belirlenmiştir. Metotta maksimum şeker konsantrasyonu ve ekstrakt verimi ve minimum asit konsantrasyonu ve fenolik madde cevap olarak kullanılmıştır. İlk olarak sıcaklığın etkisi, daha sonra en iyi sıcaklıkta katı: sıvı oranının etkisi, en iyi sıcaklıkta ve katı: sıvı oranında asit konsantrasyonunun etkisi ve son olarak da en iyi sıcaklık, katı: sıvı oranı ve asit konsantrasyonunda sürenin etkisi araştırılmıştır. Doğrulama denemeleri de gerçekleştirildikten sonra OFAT'a göre optimum sıcaklık, optimum katı: sıvı oranı, optimum asit konsantrasyonu ve optimum süre belirlenmiştir.

#### 4.2.1. AK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi

OFAT deneme desenine göre yapılan hidrolizler sonucunda elde edilen hidrolizatların toplam indirgen şeker miktarları, fenolik madde miktarları ve ekstrakt verimleri belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Yapılan deneme sonuçlarına göre sıcaklığın, katı: sıvı oranının ve asit konsantrasyonunun artmasıyla indirgen şeker konsantrasyonu ve fenolik madde miktarındaki artış istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ( $P<0.01$ ). Ancak



sürenin artması ile şeker konsantrasyonundaki düşüş ve fenolik madde miktarındaki artış ise istatistiksel olarak önemli ( $P>0.05$ ) bulunmamıştır.

Çizelge 4.2. AK hidrolizi OFAT deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K/S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
110				57.27±0.38	0.970±0.005	50.00±0.25
110				57.27±0.38	0.970±0.005	50.00±1.25
115				60.34±0.02	1.110±0.001	62.50±0.31
120	1: 8	1	30	65.32±0.32	1.090±0.005	60.00±1.88
120				64.49±0.67	1.100±0.008	60.00±1.25
125				69.60±0.03	1.260±0.020	62.50±0.31
130				69.98±0.22	1.330±0.002	60.00±0.25
130				70.62±0.73	1.340±0.002	61.20±1.25
	1: 8			64.46±0.34	1.170±0.004	67.50±0.63
	1: 8			65.19±0.45	1.170±0.003	65.00±0.63
	1: 10			53.10±0.44	1.000±0.005	72.00±1.00
118	1: 12	1	30	47.43±0.77	0.890±0.002	73.33±0.84
	1: 12			47.73±0.21	0.880±0.010	72.50±0.41
	1: 14			37.00±0.31	0.790±0.010	77.14±0.35
	1: 16			30.58±0.64	0.700±0.007	80.00±0.63
	1: 16			30.89±0.29	0.710±0.008	80.00±0.31
		1		40.19±0.27	0.800±0.010	79.18±1.10
		1		39.13±0.32	0.790±0.004	80.65±0.73
		2		41.26±0.47	0.810±0.007	79.91±1.10
118	1:13.64	3	30	41.56±0.32	0.780±0.010	80.65±0.73
		3		42.24±0.04	0.790±0.008	79.18±0.73
		4		40.35±0.10	0.800±0.005	82.11±0.73
		5		38.91±0.02	0.760±0.002	82.84±1.10
		5		38.75±0.93	0.770±0.002	83.58±0.73
			30	44.72±0.02	0.830±0.008	68.18±1.10
				44.71±0.75	0.870±0.003	67.45±0.73
			45	40.55±0.25	0.870±0.008	73.31±0.37
118	1:13.64	1.31	60	42.03±0.94	0.920±0.015	71.85±0.73
				41.86±0.23	0.920±0.012	73.31±0.73
			75	42.88±0.78	0.930±0.007	68.91±0.73
			90	41.52±0.79	0.880±0.009	69.65±0.63
				41.82±1.60	0.870±0.022	68.91±0.36

Program yardımıyla sonuçların varyans ve regresyon analizleri de gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3). AK hidrolizi için sıcaklık, katı: sıvı oranı ve seyreltik asit oranı  $P<0.01$  seviyesinde önemli çıkmıştır. Ancak sürenin, AK hidrolizi için önemli

olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle OFAT denemeleri sonucu maksimum şeker konsantrasyonunun elde edildiği hidroliz süresi (30 dk) AK hidrolizi için optimum hidroliz süresi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. AK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları

<b>A. Sıcaklık için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	228.60	65.10±0.51	0.0001**
Sıcaklık (A)	224.72	7.07±0.43	0.0001**
A <sup>2</sup>	3.88	-1.56±0.72	0.0813
Kalan	4.09		
Uyum eksikliği	2.92		0.1523
Saf hata	1.17		
Cor Toplam	232.69		
$R^2 = 0.9552$ ve $**P < 0.01$			
<b>B. Katı: sıvı oranı için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	1293.68	46.37	0.0001**
Katı: sıvı oranı (B)	1291.34	-16.94	0.0001**
B <sup>2</sup>	2.34	1.21	0.3085
Kalan	9.11		
Uyum eksikliği	8.75		0.0378
Saf hata	0.36		
Cor Toplam	1302.79		
$R^2 = 0.9930$ ve $**P < 0.01$ $*P < 0.05$			
<b>C. Seyreltik asit için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	10.84	41.70	0.0028**
Seyreltik asit oranı (C)	0.99	-0.47	0.0920
C <sup>2</sup>	9.85	-2.49	0.0012**
Kalan	1.15		
Uyum eksikliği	0.34		0.5580
Saf hata	0.81		
Cor Toplam	11.99		
$R^2 = 0.9043$ ve $P < 0.01$			
<b>D. Süre için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	8.79	41.69	0.1315
Süre (D)	5.39	-1.09	0.1075
D <sup>2</sup>	3.40	1.46	0.1807
Kalan	7.02		
Uyum eksikliği	6.6		0.0008
Saf hata	0.059		
Cor Toplam	15.81		
$R^2 = 0.5558$			

Katı: sıvı oranı için varyans ve regresyon sonuçlarında uyum eksikliği önemli çıkmaktadır. Ancak model için tahmini  $R^2$  ile biçimsel  $R^2$  değerleri uyum içerisindedir. Yeterli hassasiyet değerinin 4 olması gerekmektedir. Modelde bu değer 40.99 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu model tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir. (Biçimsel  $R^2= 0.9902$ , Tahmini  $R^2=0.9861$ ).

#### 4.2.2. BK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi

Çizelge 4.4’de BK hidrolizi OFAT deneme deseni ve fermente edilebilir şeker miktarı, fenolik madde ve ekstrakt verimi sonuçları gösterilmiştir. Sonuçların varyans ve regresyon değerleri ise Çizelge 4.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. BK hidrolizi OFAT deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K/S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
110				57.14±0.32	1.130±0.010	45.00±1.25
110				57.78±0.96	1.150±0.015	46.25±1.88
115				58.95±0.12	1.170±0.010	49.50±0.38
120	1: 8	1	30	63.78±0.32	1.190±0.010	50.00±1.25
120				64.17±0.96	1.190±0.015	50.00±0.63
125				65.97±0.07	1.350±0.005	48.75±1.25
130				72.98±0.45	1.440±0.010	46.25±1.25
130				70.55±0.026	1.480±0.015	45.00±1.25
	1: 8			67.62±0.05	1.290±0.005	42.50±1.25
	1: 8			66.42±0.09	1.260±0.015	45.00±1.25
	1: 10			61.10±0.11	1.080±0.010	50.00±1.00
120	1: 12	1	30	50.03±0.43	0.980±0.005	56.67±0.42
	1: 12			49.78±0.49	0.980±0.004	57.50±0.41
	1: 14			42.35±0.14	0.870±0.005	62.86±0.72
	1: 16			35.62±0.61	0.770±0.005	67.50±0.63
	1: 16			36.07±0.06	0.770±0.005	67.50±0.31
		1		38.08±0.34	0.830±0.015	68.76±0.73
		1		38.69±0.19	0.830±0.005	68.76±1.10
		2		38.30±0.05	0.820±0.002	72.42±0.73
120	1: 13.67	3	30	39.56±1.11	0.850±0.002	70.23±0.36
		3		39.13±0.10	0.840±0.020	71.69±0.73
		4		39.37±0.46	0.830±0.005	71.69±0.36
		5		35.90±0.43	0.810±0.005	71.69±0.73
		5		35.85±0.85	0.810±0.002	71.69±0.73

(Devamı arkada)

Çizelge 4.4'ün Devamı

120	1:13.67	1.77	30	43.22±0.06	0.990±0.020	61.45±0.73
				43.01±0.09	0.970±0.005	62.18±0.73
			45	39.80±0.37	1.030±0.030	61.45±0.73
			60	37.98±0.67	0.980±0.005	61.45±0.73
				37.34±1.05	0.900±0.005	62.91±0.73
			75	38.59±0.08	1.030±0.010	65.11±0.73
			90	37.60±0.54	1.020±0.005	69.50±1.10
				37.81±0.20	1.040±0.002	68.76±0.73

Elde edilen deneme sonuçlarına göre sıcaklık değişkeninin BK hidrolizi üzerine etkisine bakıldığında sıcaklık artışının indirgen şeker miktarını arttırmasının istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.01$ ). Fenolik madde miktarını ise 120 °C nin üzerindeki sıcaklıklarda istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ) seviyede arttığı görülmektedir. Ayrıca sıcaklığın ekstrakt verimini önemli seviyede etkilemediği de bulunmuştur. Katı: sıvı oranının azalmasıyla şeker ve fenolik madde miktarlarındaki düşme ve ekstrakt verimindeki artış istatistiksel olarak önemli seviyededir ( $P<0.01$ ). Minimum ve maksimum asit konsantrasyonu noktalarındaki indirgen şeker miktarlarının ortalama bir asit konsantrasyonundaki indirgen şeker miktarlarına göre daha düşük olduğu görülmektedir. Asit konsantrasyonunun indirgen şeker miktarındaki değişimi istatistiksel olarak önem bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

BK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon analizleri model tarafından gerçekleştirilmiştir. BK hidrolizi için sıcaklık, katı: sıvı oranı, seyreltik asit konsantrasyonunun  $P<0.01$  seviyesinde ve sürenin ise  $P<0.05$  seviyesinde önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. BK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları

A. Sıcaklık için varyans ve regresyon sonuçları				
Koşullar	Kareler toplamı	Katsayılar	P değerleri	
Model	231.93	63.19±0.66	0.0001**	
Sıcaklık (A)	229.27	7.14±0.55	<0.0001**	
A <sup>2</sup>	2.67	1.29±0.92	0.3774	
Kalan	6.76			
Uyum eksikliği	3.53		0.3308	
Saf hata	3.23			
Cor Toplam	238.69			
$R^2 = 0.9043$ ve $P<0.01$ , $P<0.05$				

B. Katı: sıvı oranı için varyans ve regresyon sonuçları

Koşullar	Kareler toplamı	Katsayılar	P değerleri	
Model	1144.70	50.58±0.71	<0.0001**	
Katı: sıvı oranı (B)	1143.22	-15.94±0.59	<0.0001**	
B <sup>2</sup>	1.48	0.96±1.00	0.0355*	
Kalan	7.89			
Uyum eksikliği	7.04		0.035	

(Devamı arkada)

Çizelge 4.5'nin Devamı

Saf hata	0.85
Cor Toplam	1152.59
$R^2 = 0.9932$ ve $** P < 0.01$ , $* P < 0.05$	

### C. Seyreltik asit için varyans ve regresyon sonuçları

Koşullar	Kareler toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	14.14	39.53±0.33	0.0035*
Seyreltik asit oranı (C)	5.20	-1.07±0.27	0.0106*
C <sup>2</sup>	8.95	-2.37±0.45	0.0121*
Kalan	1.65		
Uyum eksikliği	1.37		0.069
Saf hata	0.28		
Cor Toplam	15.79		
$R^2 = 0.8222$ ve $P < 0.01$			

### D. Süre için varyans ve regresyon sonuçları

Koşullar	Kareler toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	45.06	37.68±0.13	0.0001**
Süre (D)	33.18	-2.72±0.11	0.0001**
D <sup>2</sup>	11.87	2.73±0.18	0.0001**
Kalan	0.26		
Uyum eksikliği	0.007		0.9566
Saf hata	0.25		
Cor Toplam	45.31		
$R^2 = 0.9943$ ve $P < 0.01$ , $P < 0.05$			

Katı: sıvı oranı için varyans ve regresyon sonuçlarında uyum eksikliği önemli çıkmaktadır. Ancak model için tahmini  $R^2$  ile biçimsel  $R^2$  değerleri uyum içerisindedir. Yeterli hassasiyet değerinin 4 olması gerekmektedir. Modelde bu değer 41.43 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu model tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir. (Biçimsel  $R^2 = 0.9904$ , Tahmini  $R^2 = 0.9856$ ).

### 4.2.3. ÇK hidroliz koşullarının OFAT ile belirlenmesi

Çizelge 4.6'deki ÇK hidroliz deneme sonuçları incelendiğinde sıcaklığın artmasıyla indirgen şeker ve fenolik madde miktarının artması istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Ekstrakt veriminde ise istatistiksel olarak önemli ölçüde bir değişme olmadığı görülmüştür. Katı: sıvı oranının azalmasıyla indirgen şeker ve fenolik madde miktarlarındaki azalma istatistiksel olarak önemlidir ( $P < 0.01$ ). Asit konsantrasyonunun artmasıyla indirgen şeker miktarı önce artmakta ancak daha sonra tekrar düşmektedir. Ancak asit konsantrasyonunun artmasıyla fenolik madde ve ekstrakt verimindeki artış istatistiksel olarak önem seviyesindedir ( $P < 0.01$ ). Sürenin etkisine bakıldığında ise artan hidroliz süresi ÇK hidrolizatlarının şeker içeriğinin düşmesi ve fenolik madde miktarı ve ekstrakt veriminin ise artışı istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ( $P < 0.05$ ) (Çizelge 4.7). K:S'nin artışı ile kullanılan asit çözelti miktarı arttığından dolayı elde edilen ekstrakt miktarı artmaktadır. Ancak materyal miktarı sabit kaldığı için şeker konsantrasyonu azalmaktadır. Diğer bir değişle şeker konsantrasyonunun azalması seyrelmeden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.6. ÇK hidrolizi OFAT deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K/S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
110				68.21±0.21	0.720±0.009	61.00±0.63
110				68.98±0.47	0.730±0.007	61.25±1.88
115				67.40±0.12	0.850±0.011	64.38±0.94
120	1: 8	1	30	77.19±0.02	0.880±0.003	65.00±1.25
120				75.45±0.21	0.870±0.007	65.00±0.63
125				81.45±0.66	1.040±0.015	67.50±1.25
130				84.77±0.30	1.150±0.011	66.25±0.63
130				84.48±0.57	1.160±0.003	66.25±1.25
	1: 8			76.43±0.89	0.890±0.004	70.00±1.25
				75.92±1.60	0.890±0.005	70.00±0.63
	1: 10			64.01±0.80	0.740±0.004	74.00±1.00
118	1: 12	1	30	53.23±0.49	0.660±0.007	73.33±1.25
				53.44±0.26	0.660±0.007	74.17±0.20
	1: 14			43.40±0.36	0.560±0.001	78.57±1.43
	1: 16			38.24±0.64	0.510±0.001	79.38±1.25
				38.62±0.26	0.510±0.007	78.75±0.63
		1		46.71±0.02	0.570±0.003	78.29±0.74
				46.46±0.12	0.570±0.015	78.29±1.48
		2		48.06±0.46	0.650±0.002	79.03±1.11
118	1: 13.54	3	30	48.07±0.13	0.690±0.005	81.24±0.74
				48.20±0.38	0.690±0.004	81.24±0.37
		4		47.07±0.44	0.710±0.005	82.72±0.74
		5		46.29±0.10	0.710±0.010	82.72±0.73
				46.20±0.11	0.720±0.010	82.72±0.37
			30	51.65±0.38	0.750±0.050	76.07±1.11
				51.10±0.34	0.770±0.050	76.07±0.37
			45	49.19±0.30	0.770±0.040	76.07±1.85
118	1: 13.54	2.13	60	48.16±1.30	0.770±0.050	76.07±0.47
				48.88±0.36	0.780±0.050	76.07±0.37
			75	46.91±0.23	0.870±0.020	76.81±1.11
			90	48.71±0.57	0.940±0.021	79.03±0.37
				48.36±0.78	0.940±0.005	79.76±0.37

ÇK OFAT hidroliz denemelerinden elde edilen sonuçlardan yola çıkarak oluşturulan varyans ve regresyon sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Önem seviyeleri değerlendirildiğinde sıcaklık ve katı: sıvı oranının  $P<0.01$  seviyesinde, asit konsantrasyonu ve sürenin ise  $P<0.05$  seviyesinde önemli çıktığı görülmektedir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. ÇK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları

<b>A. Sıcaklık için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	324.4	75.81±0.88	0.0002**
Sıcaklık (A)	324.2	8.49±0.73	0.0001**
A <sup>2</sup>	0.20	0.35±1.23	0.7874
Kalan	12.05		
Uyum eksikliği	10.29		0.055
Saf hata	1.76		
Cor Toplam	336.40		
<i>R<sup>2</sup>=0.9642 P&lt;0.01</i>			
<b>B. Katı sıvı oranı için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	1664.00	53.04±0,36	<0.0001**
Katı: sıvı oranı (B)	1635.73	-19.07±0,30	<0.0001**
B <sup>2</sup>	28.27	4.21±0,51	0.0004**
Kalan	2.05		
Uyum eksikliği	1.83		0.0362
Saf hata	0.22		
Cor Toplam	1666.05		
<i>R<sup>2</sup>=0.9988 ve ** P&lt;0.01</i>			
<b>C. Seyreltik asit için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	4.73	48.07±0.15	0.0014*
Seyreltik asit oranı (C)	0.31	-0.26±0.13	0.0964
C <sup>2</sup>	4.42	1.67±0.21	0.0006**
Kalan	0.37		
Uyum eksikliği	0.32		0.0411
Saf hata	0.044		
Cor Toplam	5.09		
<i>R<sup>2</sup>=0.9279 ve **P&lt;0.01, *P&lt;0.05</i>			
<b>D. Süre için varyans ve regresyon sonuçları</b>			
<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	16.01	48.01±0.28	0.0013*
Süre (D)	10.34	-1.52±0.23	0.0013*
D <sup>2</sup>	5.68	1.89±0.39	0.0047*
Kalan	1.21		
Uyum eksikliği	0.93		0.1097
Saf hata	0.28		
Cor Toplam	17.22		
<i>R<sup>2</sup> = 0.9297 ve P&lt;0.05</i>			

Katı: sıvı oranı ve asit konsantrasyonu için varyans ve regresyon sonuçlarında uyum eksiklikleri önemli çıkmaktadır. Ancak model için tahmini  $R^2$  ile biçimsel  $R^2$

değerleri uyum içerisindedir. Yeterli hassasiyet değerinin 4 olması gerekmektedir. Modelde K:S için bu değer 97.21, asit konsantrasyonu için ise 11.61 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu model tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir. (Sırasıyla Biçimsel  $R^2=0.9983, 0.8991$ , Tahmini  $R^2=0.9974, 0.8489$ ).

#### 4.2.4. YK hidrolizi koşullarının OFAT ile belirlenmesi

Çizelge 4.8’de YK hidrolizi OFAT deneme deseni ve fermente edilebilir şeker , fenolik madde ve ekstrakt verimi sonuçları belirtilmiştir. Sonuçların varyans ve regresyon değerleri ise Çizelge 4.9’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.8. YK hidrolizi OFAT deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K/S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
110				63.41±2.16	1.35±0.021	55.00±1.25
110				62.38±2.74	1.33±0.001	56.25±1.88
115				62.00±2.59	1.46±0.011	59.38±1.56
120	1: 8	1	30	69.67±3.01	1.15±0.003	58.75±0.63
120				68.30±2.58	1.20±0.012	55.00±1.25
125				71.89±2.17	1.22±0.012	52.50±1.25
130				71.37±3.09	1.24±0.011	53.75±1.88
130				72.13±2.41	1.20±0.011	58.75±0.63
	1: 8			67.58±2.73	1.45±0.004	57.50±1.25
				66.03±5.28	1.47±0.010	57.50±1.88
	1: 10			49.59±2.10	1.18±0.012	63.00±1.50
115	1: 12	1	30	41.59±0.21	1.16±0.016	70.00±0.84
				41.18±0.64	1.16±0.007	69.17±1.25
	1: 14			36.79±1.59	1.02±0.004	76.43±1.07
	1: 16			31.38±1.49	0.91±0.013	77.50±0.63
				31.29±0.090	0.90±0.025	77.50±0.63
		1		37.62±0.65	1.06±0.014	73.21±0.78
				38.17±0.86	1.05±0.013	73.21±0.39
		2		36.89±1.61	1.00±0.006	77.10±1.77
115	1:12.84	3	30	36.87±0.04	0.93±0.008	74.77±0.77
				35.85±0.40	0.93±0.013	74.77±0.78
		4		38.88±1.63	0.86±0.006	75.55±1.17
		5		35.07±1.03	0.85±0.010	77.88±0.78
				35.85±1.23	0.82±0.002	77.88±1.56

(Devamı arkada)



Çizelge 4.8'in Devamı

			30	35.88±1.06	1.02±0.008	73.99±1.17
				35.85±1.49	1.01±0.002	73.99±1.17
			45	35.37±1.01	1.03±0.006	73.21±0.78
			60	34.20±1.75	1.04±0.016	73.21±1.56
				34.65±1.53	1.05±0.019	74.77±0.78
115	1:12.84	3.19	75	34.36±1.09	1.03±0.013	77.10±0.39
			90	30.58±0.32	1.03±0.006	73.21±0.78
				30.78±1.06	1.03±0.021	74.77±0.78

Bütün materyallerde olduğu gibi YK hidrolizinde de sıcaklık ve katı: sıvı oranındaki artış ile elde edilen indirgen şeker miktarlarının artması istatistiksel olarak önem seviyesindedir ( $P<0.01$ ). Farklı olarak sıcaklık artışıyla artan fenolik madde miktarlarının YK hidrolizinde azalması istatistiksel olarak önem seviyesinde tespit edilmiştir ( $P<0.01$ ). Asit konsantrasyonunun artması indirgen şeker miktarını istatistiksel olarak etkilememiştir ( $P>0.05$ ). Artan süre ile indirgen şeker miktarının azalması istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ), fenolik madde miktarındaki değişim ise önemsiz çıkmıştır ( $P>0.05$ ).

YK OFAT hidroliz denemeleri gerçekleştirildikten sonra fermente edilebilir şeker miktarlarının varyans ve regresyon analizleri sonucunda sıcaklığın  $P<0.05$  seviyesinde, katı: sıvı oranı ve sürenin ise  $P<0.01$  seviyesinde önemli olduğu bulunmuştur. Ancak seyreltik asit konsantrasyonunun YK hidrolizinde istatistiksel olarak önemli ( $P>0.05$ ) olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Bu nedenle OFAT denemeleri sonucu asit konsantrasyonu minimum konsantrasyon olan %1 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. YK hidroliz parametrelerinin varyans ve regresyon sonuçları

A. Sıcaklık için varyans ve regresyon sonuçları				
Koşullar	Kareler toplamı	Katsayılar	P değerleri	
Model	65.55	63.76±1.41	0.0578	
Sıcaklık (A)	56.89	3.56±1.17	0.0288*	
A <sup>2</sup>	8.66	-2.33±1.97	0.2890	
Kalan	30.79			
Uyum eksikliği	20.01		0.2073	
Saf hata	10.78			
Cor Toplam	96.34			
$R^2=0.6804$ ve $*P<0.05$				
B. Katı: sıvı oranı için varyans ve regresyon sonuçları				
Koşullar	Kareler toplamı	Katsayılar	P değerleri	
Model	1242.38	38.51±0.83	< 0.0001**	
Katı: sıvı oranı (B)	1159.37	-16.05±0.68	< 0.0001**	
B <sup>2</sup>	83.01	7.22±1.15	0.0015*	
Kalan	10.56			
Uyum eksikliği	9.43		0.0349	
Saf hata	1.13			
Cor Toplam	1252.94			
$R^2=0.9916$ ve ** $P<0.01$ , * $P<0.05$				

(Devamı arkada)

Çizelge 4.9'un Devamı

**C. Seyreltik asit için varyans ve regresyon sonuçları**

<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Sabit	10.66	34.71±0.61	0.07308
Seyreltik asit oranı (C)	2.86	0.79±0.51	0.04830
C <sup>2</sup>	7.80	-2.21±0.85	0.1759
Kalan	5.77		
Uyum eksikliği	4.71		0.07901
Saf hata	1.06		
Cor Toplam	16.43		
$R^2=0.6488$			

**D. Süre için varyans ve regresyon sonuçları**

<b>Koşullar</b>	<b>Kareler toplamı</b>	<b>Katsayılar</b>	<b>P değerleri</b>
Model	25.76	32.38±0.33	0.0009**
Süre (D)	22.89	-2.26±0.27	0.0004**
D <sup>2</sup>	2.87	-1.34±0.46	0.0323*
Kalan	1.66		
Uyum eksikliği	1.55		0.0163
Saf hata	0.11		
Cor Toplam	27.42		
$R^2 = 0.9395$ ve ** $P<0.01$ , * $P<0.05$			

Materyallerin OFAT denemeleri sonucu elde edilen sonuçlara göre sıcaklık artışı ile FŞK artmakta ancak; oluşan FMK da sıcaklığa bağlı olarak artmaktadır. K:S oranı arttıkça elde edilen EV artmakta, K:S'de kullanılan materyal azaldığı için ise FŞK azalmaktadır. Seyrelmeden dolayı aynı şekilde FMK da azalmaktadır. Hidroliz süresindeki artış ise FŞK'yı azaltmaktadır. Hidroliz sıcaklığının 120°C ve üzerindeki denemelerde oldukça yüksek miktarda fermente edilebilir şeker elde edilmiştir. Ancak K:S'nin 1:12 ve üzerindeki denemelerde ise hidrolizatların şeker konsantrasyonları azalmaktadır. AO'nun %3, 4 ve 5 olduğu denemelerde ise oluşan FMK artmaktadır. Aynı şekilde hidroliz süresinin 30 dk'yı geçtiği hidrolizler sonucunda elde edilen şeker konsantrasyonu düşmektedir. RSM denemeleri için minimum ve maksimum noktalar bu sonuçlar değerlendirilerek belirlenmiştir.

Katı: sıvı oranı ve süre için varyans ve regresyon sonuçlarında uyum eksikliği önemli çıkmaktadır. Ancak model için tahmini  $R^2$  ile biçimsel  $R^2$  değerleri uyum içerisinde. Yeterli hassasiyet değerinin 4 olması gerekmektedir. Modelde bu değerler sırası ile 36.08 ve 12.79 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu model tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir. (Biçimsel  $R^2= 0.9882$ , 0.9153 Tahmini  $R^2=0.9823$ , 0.8811).

**4.3. Lignoselülozik materyallerin hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi**

Materyallerin OFAT deneme sonuçları ve varyans ve regresyon analizleri birlikte değerlendirildiğinde BK ve ÇK için tüm parametrelerin, AK için; katı: sıvı oranı, sıcaklık ve asit konsantrasyonun, YK için ise sıcaklık, katı:sıvı oranı ve sürenin

önemli olduğu tespit edilmiştir. Fenolik maddelerin miktarını azaltmak için çalışmada detoksifikasyon işlemi yapılacaktır. Bu nedenle parametrelerin aralıkları maksimum indirgen şeker konsantrasyonu elde edilecek şekilde belirlenmiştir.

Materyallerin optimum hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesinde 4 faktörlü (AK ve YK hariç) üç seviyeli bir deneme planlanmıştır. Hidroliz parametrelerinin minimum ve maksimum noktaları Çizelge 4.10'da belirtilmiştir. Ayrıca materyallerin hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri de Ek-2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. RSM denemeleri için belirlenen minimum ve maksimum noktalar

Değişken	Minimum	Maksimum
Sıcaklık (°C)	120	130
K:S (w/v)	1:8	1:12
AO (% , v/v)	1	3
Süre (dk)	10	30

#### 4.3.1. AK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi

AK hidroliz koşulları ve sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Hidroliz parametreleri teker teker analiz edilecek olursa hidroliz sıcaklığının 120 °C olduğu denemeler sonucunda minimum ve maksimum FŞK 48.07 ve 70.43 g/L olarak ölçülmüştür (D8-D1). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 0.99 g/L, % 64.17 ve 1.36 g/L, % 50.00 olarak elde edilmiştir. Hidroliz için sıcaklık 125 °C'de olduğunda FŞK minimum ve maksimum noktaları 49.22 g/L ve 74.30 g/L olarak tespit edilmiştir (D14-D10). Aynı sıcaklık noktasında FMK ve EV ise sırasıyla 0.98 g/L, % 53.33 ve 1.30 g/L, % 55.00 olarak elde edilmiştir. Sıcaklık 130 °C'ye geldiğinde ise FŞK minimum 49.99 g/L ve maksimum 77.67 g/L olarak belirlenmiştir (D9-D4). Bu sıcaklıkta FMK ve EV ise sırasıyla 0.96, % 68.33 ve 1.34 g/L, % 55.00 olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın artması ile birlikte FŞK ve EV artmakta ve FMK herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Sıcaklık istatistiksel olarak önem ( $P>0.05$ ) seviyesinde bir etki oluşturmamıştır (Çizelge 4.12).

Hidroliz parametrelerinden bir diğeri olan K:S'nin 1:8 olduğu hidrolizler sonucunda FŞK minimum 70.43 g/L ve maksimum 77.67 g/L olarak elde edilmiştir (D1-D4). Bu oranda FMK ve EV ise sırasıyla 1.36 g/L, %50.00 ve 1.34 g/L, %55 olarak tespit edilmiştir. K:S'nin 1:10 olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 56.38 g/L ve 59.70 g/L olarak belirlenmiştir (D15-D3). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.13 g/L, % 63.00 ve 1.17 g/L, % 63.00 olarak elde edilmiştir. 1:12 K:S ise minimum 48.07 g/L ve maksimum 49.99 g/L FŞK elde edilmiştir (D8-D9). Aynı koşullarda sırasıyla 0.99 g/L, % 64.17 ve 0.96 g/L, % 68.33 FMK ve EV tespit edilmiştir. Sonuç olarak K:S azalmasıyla FŞK ve FMK azalması EV ise artması istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.12).

Hidroliz için AO'nun % 1 olduğu denemeler sonucunda en düşük 49.22 g/L ve en yüksek 74.30 g/L FŞK elde edilmiştir (D14-D10). Aynı hidroliz koşullarında FMK ve EV ise sırasıyla 0.98 g/L, % 53.33 ve 1.30 g/L, % 55.00 olarak elde edilmiştir. AO'nun % 2 olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 48.07 g/L ve 77.67 g/L olarak belirlenmiştir (D8-D4). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 0.99

g/L, % 64.17 ve 1.34 g/L, % 55.00 olarak elde edilmiştir. AO %3 olduğunda ise FŞK minimum 49.70 g/L ve maksimum 73.14 g/L olarak belirlenmiştir (D2-D5). Bu koşullarda FMK ve EV ise sırasıyla 0.95, % 73.33 ve 1.32 g/L, % 60.00 olarak belirlenmiştir. Ancak AO'nun artmasıyla FŞK ve EV artış istatistiksel olarak önem seviyesinde çıkmamıştır ( $P>0.05$ ). Ancak en yüksek FŞK % 2 AO'nda elde edilmiştir. FMK da aynı sonuçları vermiş en yüksek FMK hidroliz AO'nun % 2 olduğu denemelerde ölçülmüştür.

Çizelge 4.11. AK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları

D	Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
1	120	1:8	2		70.43±0.11	1.36±0.01	50.00±1.25
2	125	1:12	3		49.70±0.39	0.95±0.01	73.33±0.83
3	125	1:10	2		59.70±0.60	1.17±0.01	63.00±0.50
4	130	1:8	2		77.67±0.43	1.34±0.01	55.00±1.25
5	125	1:8	3		73.14±0.13	1.32±0.01	60.00±2.50
6	125	1:10	2		58.45±0.48	1.12±0.01	62.00±0.50
7	125	1:10	2		59.82±0.13	1.17±0.01	64.00±1.00
8	120	1:12	2	30	48.07±1.19	0.99±0.01	64.17±0.42
9	130	1:12	2		49.99±0.28	0.96±0.01	68.33±0.83
10	125	1:8	1		74.30±1.00	1.30±0.01	55.00±0.63
11	130	1:10	1		57.23±0.05	1.07±0.01	61.00±1.50
12	120	1:10	3		58.12±0.19	1.15±0.01	60.00±1.00
13	120	1:10	1		57.46±0.54	1.01±0.01	60.00±1.00
14	125	1:12	1		49.22±0.46	0.98±0.01	53.33±0.83
15	130	1:10	3		56.38±0.30	1.13±0.01	63.00±1.00

AK hidrolizi RSM denemelerinin model tarafından belirlenen regresyon eşitliği incelenmiştir. Fermente edilebilir şeker miktarları için model denklem ve regresyon eşitlikleri aşağıdaki gibidir.

$$\text{Fermente edilebilir şeker} = +59.32 + 0.81A - 11.98B + 0.050C - 1.43AB - 0.49AC - 0.087BC - 0.79A^2 + 3.30B^2 - 1.23C^2$$

Burada;

A: Sıcaklık

B: Katı: sıvı oranı

C: Seyreltik asit konsantrasyonu

AK'nin hidroliz koşullarının optimizasyonunda fermente edilebilir şeker miktarına ait  $R^2$  değeri 0.9893 olarak belirlenirken uyumsuzluk değeri de 0.3119 olarak model tarafından hesaplanmıştır. Bu sonuca göre fermente edilebilir şeker miktarı için elde edilen model, hidroliz sonuçlarının %98.93'nü tam temsil etmekte ve modelin uyumsuzluk değeri %5'ten büyük çıktığı için önemsiz ( $P>0.05$ ) olmaktadır (Çizelge 4.12). Ayrıca FŞK üzerine sıcaklık, K:S ve AO'nun etkisini gösteren kontur plot grafikleri Ek 2a 'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. AK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	1213.20	59.32±0.94	< 0.0002**
Sıcaklık (A)	5.22	0.81±0.57	0.2186
K:S (B)	1147.21	-11.98±0.57	< 0.0001**
AO (C)	0.020	0.05±0.57	0.9340
AB	8.15	-1.43±0.81	0.1390
AC	0.97	-0.49±0.81	0.5706
BC	0.031	-0.09±0.81	0.9184
A <sup>2</sup>	2.31	-0.79±0.85	0.3921
B <sup>2</sup>	40.18	3.30±0.85	0.0114*
C <sup>2</sup>	5.55	-1.23±0.85	0.2065
Kalan	13.18		
Uyum eksikliği	10.28		0.3119
Kuramsal hata	2.91		
Toplam	1.226.39		

$$R^2 = 0.9893 \quad **P < 0.01 \text{ ve } *P < 0.05$$

Model maksimum şeker konsantrasyonu ve diğer değişkenlerin ortalama değerleri olacak şekilde ayarlamalar yapılarak hidroliz parametrelerinin tahmin edilen değerleri belirlenmiştir. Program bu şekilde olasılık değeri en yüksekten en aza olacak şekilde 23 farklı noktayı sıralamıştır. AK hidrolizi için denemelerden elde edilen sonuçlar yardımıyla program tarafından belirlenen değerler arasından noktalar seçilmiş ve doğrulama denemeleri yapılmıştır. Seçilen noktalarla birlikte beklenen değerler ve doğrulama deneme sonuçları Çizelge 4.13’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.13. Optimum koşullarda gerçekleştirilen AK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (% v/v)	Süre (dk)	Öngörülen FŞK (g/L)	Elde edilen FŞK (g/L)
130		1.86		76.06	76.28
125	1:8	3.00	30	73.62	71.92
122		1.00		70.98	70.27

Optimum hidroliz koşulu öngörülen ve gerçekleşen sonuçlar karşılaştırılarak belirlenmiştir. Ayrıca maksimum şeker konsantrasyonunun elde edildiği hidroliz noktası da seçilmeye çalışılmıştır. AK hidroliz süresi OFAT yardımıyla daha önceden 30 dk olarak belirlenmişti. Böylece AK hidroliz parametreleri sıcaklık 130 °C, K:S 1:8, AO % 1.86 ve hidroliz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2. BK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi

BK RSM deneme koşulları ve sonuçları Çizelge 4.14’de verilmiştir. BK RSM deneme sonuçlarına göre hidroliz parametrelerinin FŞK, FMK ve EV üzerine etkileri belirlenmiştir. Hidroliz sıcaklığının 120°C olduğu denemeler sonucunda minimum ve

maksimum FŞK 47.32 g/L ve 68.42 g/L olarak ölçülmüştür (D2-D8). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.00 g/L, % 62.08 ve 1.35 g/L, % 51.25 olarak elde edilmiştir. Hidroliz için sıcaklık 125 °C'ye çıkarıldığında FŞK minimum ve maksimum noktaları 46.42 g/L ve 74.53 g/L olarak tespit edilmiştir (D24-D14). Aynı sıcaklık noktasında FMK ve EV ise sırasıyla 1.04 g/L, % 60.83 ve 1.31 g/L, % 46.88 olarak elde edilmiştir. Sıcaklık 130 °C'ye geldiğinde ise FŞK minimum 50.28 g/L ve maksimum 72.56 g/L olarak belirlenmiştir (D15-D7). Bu koşullar altında FMK ve EV ise sırasıyla 1.03, % 60.83 ve 1.40 g/L, % 47.50 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık artışı FŞK'yi arttırmaktadır ancak bu değişim istatistiksel olarak önem seviyesinde tespit edilmemiştir ( $P>0.05$ ) (Çizelge 4.15). Hidroliz sonucu hesaplanan FMK ve EV'de ise istatistiksel olarak ( $P>0.05$ ) önemli seviyede bir değişiklik olmamaktadır.

K:S'nin 1:8 olduğu hidrolizler sonucunda FŞK minimum 63.98 g/L ve maksimum 74.53 g/L olarak elde edilmiştir (D16-D14). Bu oranda FMK ve EV ise sırasıyla 1.41 g/L, % 46.25 ve 1.31 g/L, % 46.88 olarak tespit edilmiştir. K:S'nin 1:10 olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 51.52 g/L ve 61.45 g/L olarak belirlenmiştir (D21-D17). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.16 g/L, % 62.50 ve 1.29 g/L, % 51.00 olarak elde edilmiştir. 1:12 K:S'ndeki çalışmalarda ise minimum 46.42 g/L ve maksimum 50.28 g/L FŞK elde edilmiştir (D24-D15). Aynı koşullarda sırasıyla 1.04 g/L, % 60.83 ve 1.03 g/L, % 60.83 FMK ve EV tespit edilmiştir. Sonuç olarak K:S azalmasıyla FŞK ve FMK azalması ve EV ise artması istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Hidroliz için AO'nun % 1 olduğu denemeler sonucunda en düşük 48.28 g/L ve en yüksek 64.34 g/L FŞK elde edilmiştir (D3-D18). Aynı hidroliz koşullarında FMK ve EV ise sırasıyla 0.98 g/L, % 60.00 ve 1.33 g/L, % 42.50 olarak elde edilmiştir. AO'nun % 2 olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 46.42 g/L ve 74.53 g/L olarak belirlenmiştir (D24-D14). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.04 g/L, % 60.83 ve 1.31 g/L, % 46.88 olarak elde edilmiştir. AO % 3 olduğunda ise FŞK minimum 47.87 g/L ve 63.98 g/L olarak belirlenmiştir (D9-D16). Bu koşullarda FMK ve EV ise sırasıyla 1.04, % 57.92 ve 1.41 g/L, % 46.25 olarak belirlenmiştir. Ancak AO'nun artmasıyla FŞK azalması ve FMK artması istatistiksel olarak önem seviyesinde tespit edilmemiştir ( $P>0.05$ ). EV ise AO'nı değişiminden yine istatistiksel olarak önem seviyesinde çıkmamıştır (Çizelge 4.15).

BK hidrolizi için son parametreyi hidroliz süresi oluşturmaktadır. Hidroliz süresinin 10 dk olduğu denemeler sonucunda en düşük 48.29 g/L ve en yüksek 74.53 g/L FŞK elde edilmiştir (D25-D14). Aynı hidroliz koşullarında FMK ve EV ise sırasıyla 0.99 g/L, % 61.67 ve 1.31 g/L, % 46.88 olarak elde edilmiştir. Sürenin 20 dk olmasıyla ise FŞK'nin minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 47.32 g/L ve 68.42 g/L olarak belirlenmiştir (D2-D8). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.00 g/L, % 62.08 ve 1.35 g/L, % 51.25 olarak elde edilmiştir. Süre 30 dk'ya çıkarıldığında ise FŞK minimum 46.42 g/L ve 69.86 g/L olarak belirlenmiştir (D24-D22). Bu koşullarda FMK ve EV ise sırasıyla 1.04, % 60.83 ve 1.40 g/L, % 44.38 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak hidroliz süresinin artmasıyla FŞK azalmaktadır. FMK ise hidroliz süresinin 10 dk ve 20 dk olduğu denemelerde değişmezken hidroliz süresinin 30 dk olmasıyla beraber artış göstermektedir. Ancak hidroliz süresinin artmasıyla FMK artış EV'deki değişim istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P>0.05$ ) tespit edilmemiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14. BK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları

D	Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
1	125	1: 10	2	20	59.92±0.73	1.230±0.002	49.50±0.50
2	120	1: 12	2	20	47.32±0.46	1.000±0.009	62.08±0.42
3	125	1: 12	1	20	48.25±0.05	0.980±0.001	60.00±0.50
4	125	1: 10	3	30	57.44±0.34	1.140±0.028	52.50±0.50
5	130	1: 10	2	30	58.11±0.37	1.230±0.003	50.50±0.50
6	125	1: 10	2	20	59.03±1.25	1.210±0.005	52.00±0.50
7	130	1: 8	2	20	72.56±0.13	1.400±0.028	47.50±0.25
8	120	1: 8	2	20	68.42±0.55	1.350±0.016	51.25±1.25
9	125	1: 12	3	20	47.87±0.27	1.040±0.002	57.92±0.42
10	130	1: 10	1	20	60.46±0.51	1.150±0.001	53.50±0.50
11	125	1: 10	2	20	57.27±0.13	1.220±0.009	52.50±0.50
12	125	1: 10	1	30	58.89±0.09	1.110±0.002	50.50±0.50
13	120	1: 10	3	20	54.82±0.75	1.260±0.004	62.50±0.50
14	125	1: 8	2	10	74.53±0.40	1.310±0.002	46.88±0.63
15	130	1: 12	2	20	50.28±0.10	1.030±0.001	60.83±0.42
16	125	1: 8	3	20	63.98±0.06	1.410±0.010	46.25±0.25
17	120	1: 10	2	30	61.45±0.22	1.290±0.003	51.00±1.00
18	125	1: 8	1	20	64.34±0.37	1.330±0.020	42.50±0.25
19	125	1: 10	1	10	57.11±2.20	1.160±0.001	54.00±0.50
20	125	1: 10	3	10	56.09±0.67	1.180±0.002	55.50±0.50
21	120	1: 10	1	20	51.52±0.13	1.160±0.027	62.50±0.50
22	125	1: 8	2	30	69.86±0.50	1.400±0.016	44.38±0.63
23	130	1: 10	3	20	55.29±0.10	1.150±0.001	54.00±0.50
24	125	1: 12	2	30	46.42±0.09	1.040±0.005	60.83±0.83
25	125	1: 12	2	10	48.29±0.68	0.990±0.006	61.67±0.50
26	130	1: 10	2	10	56.57±0.10	1.300±0.005	44.00±0.50
27	120	1: 10	2	10	54.76±0.27	1.100±0.001	52.50±0.50

BK hidrolizi RSM denemelerinin model tarafından belirlenen regresyon eşitliği incelenmiştir. Fermente edilebilir şeker miktarları için model denklem ve regresyon eşitlikleri aşağıdaki gibidir.

$$F\text{ŞK} = +58.74 + 1.25A - 10.44B - 0.42C + 0.40D - 0.30AB - 2.12AC - 1.23AD - 0.01BC + 0.70BD - 0.11CD - 0.62A^2 + 0.70B^2 - 2.56C^2 + 0.38D^2$$

Burada;

A: Sıcaklık

B: Katı: sıvı oranı

C: Seyreltik asit konsantrasyonu

D: Süre

BK'nin hidroliz koşullarının optimizasyonunda fermente edilebilir şeker miktarına ait  $R^2$  değeri 0.9935 olarak belirlenirken uyumsuzluk değeri de 0.1720 olarak model tarafından hesaplanmıştır. Bu sonuca göre fermente edilebilir şeker miktarı için elde edilen model, hidroliz sonuçlarının %99.35'ni tam temsil etmekte ve modelin uyumsuzluk değeri %5'ten büyük çıktığı için önemsiz ( $P > 0.05$ ) olmaktadır (Çizelge 4.19). Ayrıca FŞK üzerine sıcaklık, K:S, AO ve sürenin etkisini gösteren kontur plot grafikleri Ek 2b 'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. BK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	1411.74	58.74±1.65	< 0.0001**
Sıcaklık (A)	18.70	1.24±0.83	0.156507
K:S (B)	1307.51	-10.44±0.83	< 0.0001**
AO (C)	2.15	-0.42±0.83	0.617520
Süre (D)	1.94	0.40±0.83	0.635455
AB	0.35	-0.30±1.43	0.840060
AC	17.94	-2.12±1.43	0.164539
AD	6.63	-1.30±1.43	0.385763
BC	0.00010	-0.005±1.43	0.997268
BD	1.96	0.70±1.43	0.633391
CD	0.046	-0.11±1.43	0.941329
A <sup>2</sup>	2.04	-0.62±1.43	0.626916
B <sup>2</sup>	2.63	0.70±1.43	0.581312
C <sup>2</sup>	34.83	-2.56±1.43	0.0614512
D <sup>2</sup>	0.76	0.38±1.24	0.766029
Kalan	98.20		
Uyum eksikliği	94.57		0.1720
Kuramsal hata	3.64		
Toplam	1509.95		

$R^2 = 0.9935$  \*\* $P < 0.01$

RSM model sonuçlarının varyans sonuçlarına bakıldığında da K:S'nin  $P < 0.01$  seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. Metot maksimum indirgen şeker için sıcaklık,



K:S, asit konsantrasyonu ve süre parametrelerinin ortalama değerlerini gösterecek şekilde tahminleri sıralamıştır. Bu tahminlerden üç farklı hidroliz koşulu seçilip, doğrulama analizleri yapılmıştır. Optimum koşullarda gerçekleştirilen BK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları Çizelge 4.16'da belirtilmiştir.

Çizelge 4.16. Optimum koşullarda gerçekleştirilen BK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	Öngörülen FŞK (g/L)	Elde edilen FŞK (g/L)
130		1.53	10	73.00	72.26
125	1: 8	1.66	10	70.28	70.26
121		2.66	30	69.47	72.73

RSM deneme sonuçları değerlendirildiğinde sıcaklığın 120 °C noktasına yakın olabileceği öngörülmüştü. 121 °C'de gerçekleştirilen hidroliz sonucunda gerçek indirgen şeker miktarının öngörülenden yüksek olması da BK hidrolizi için optimum nokta olduğunun bir diğer göstergesidir. Hidroliz işlemi ekonomik olarak değerlendirildiğinde de 125 °C'de 10 dk yerine 121 °C'de 30 dk hidrolizinin daha uygun olacağı düşünülmüştür. Dolayısıyla BK hidrolizinde optimum parametreler 121 °C sıcaklık, 1:8 K:S, % 2.66 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oranı ve 30 dk süre olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.3. ÇK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi

ÇK hidroliz koşulları ve sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir. ÇK hidroliz sonuçları incelendiğinde BK ve AK'na benzer şekilde katı: sıvı oranının indirgen şeker miktarını doğrudan etkilediği görülmektedir. Hidroliz koşullarının sıcaklığın 125 °C, katı: sıvı oranının 1:8, asit konsantrasyonunun %2 olduğu ve hidroliz sürelerinin 10 ve 30 dk olduğu iki deneme (D3-D4) karşılaştırıldığında elde edilen indirgen şeker miktarının sırasıyla 85.53 ve 87.84 olduğu görülmüştür. Bu nedenle ÇK hidrolizinde 30 dk'lık hidroliz süresinin gereksiz olduğu düşünülmektedir. Katı: sıvı oranı ise beklenen şekilde  $P < 0.01$  seviyesinde önemli çıkmaktadır (Çizelge 4.18).

Her bir parametrenin ayrı ayrı ÇK hidrolizine etkisini inceleyecek olursak, sıcaklığın 120°C olduğu denemelerde minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 56.38 g/L ve 89.07 g/L olarak ölçülmüştür (D23-D12). Aynı koşullarda FMK ve EV sırasıyla 0.82 g/L, % 70.42 ve 1.06 g/L, % 61.25 olarak elde edilmiştir. Hidroliz sıcaklığı 125 °C'ye çıkarıldığında FŞK minimum ve maksimum noktaları 56.55 g/L ve 87.84 g/L olarak tespit edilmiştir (D27-D4). Aynı koşullar altında FMK ve EV ise sırasıyla 0.88 g/L, % 73.75 ve 1.17 g/L, % 64.38 olarak elde edilmiştir. Sıcaklık 130 °C'ye çıkarıldığında ise FŞK minimum 62.42 g/L ve maksimum 88.72 g/L olarak belirlenmiştir (D21-D17). Bu koşullar altında FMK ve EV ise sırasıyla 0.90, % 76.25 ve 1.24 g/L, % 65.00 olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın artması ile birlikte FŞK, FMK ve EV'nin artması istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P > 0.05$ ) bulunmamıştır (Çizelge 4.18).

Hidrolizin K:S'i 1:8 olduğu denemelerde FŞK minimum 81.72 g/L ve maksimum 89.07 g/L olarak elde edilmiştir (D22-D12). Aynı durumda FMK ve EV ise sırasıyla 1.17 g/L, % 68.75 ve 1.06 g/L, % 61.25 olarak tespit edilmiştir. K:S'nin 1:10

olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 63.53 g/L ve 74.82 g/L olarak belirlenmiştir (D11-D2). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 0.76 g/L, % 67.00 ve 0.81 g/L, % 70.00 olarak elde edilmiştir. K:S'nin 1:12 olduğu hidrolizlerde ise minimum 56.38 g/L ve maksimum 61.58 g/L FŞK elde edilmiştir (D23-D7). Aynı koşullarda sırasıyla 0.82 g/L, % 70.42 ve 0.82 g/L, % 75.42 FMK ve EV tespit edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde K:S azalmasıyla FŞK ve FMK azalması EV ise artması önem ( $P<0.01$ ) seviyesindedir (Çizelge 4.18).

AO'nun % 1 olduğu hidrolizler sonucunda en düşük 57.91 g/L ve en yüksek 85.47 g/L FŞK elde edilmiştir (D19-D8). Aynı koşullarında FMK ve EV ise sırasıyla 0.70 g/L, % 72.92 ve 0.96 g/L, % 65.00 olarak elde edilmiştir. AO'nun % 2 olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 60.29 g/L ve 88.72 g/L olarak belirlenmiştir (D18-D17). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 0.74 g/L, % 73.33 ve 1.24 g/L, % 65.00 olarak elde edilmiştir. AO % 3 olduğunda ise FŞK minimum 56.55 g/L ve 81.72 g/L olarak belirlenmiştir (D27-D22). Bu koşullarda FMK ve EV ise sırasıyla 0.88, % 73.75 ve 1.17 g/L, % 68.75 olarak belirlenmiştir. AO'nun artmasıyla FMK ve EV de artması istatistiksel olarak önem ( $P<0.01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.18).

ÇK hidroliz süresinin 10 dk olduğu denemeler sonucunda en düşük 60.29 g/L ve en yüksek 85.53 g/L FŞK elde edilmiştir (D18-D3). Aynı hidroliz koşullarında FMK ve EV ise sırasıyla 0.74 g/L, % 73.33 ve 1.03 g/L, % 63.13 olarak elde edilmiştir. Sürenin 20 dk olmasıyla ise FŞK'nin minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 56.38 g/L ve 89.07 g/L olarak belirlenmiştir (D23-D12). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 0.82 g/L, % 70.42 ve 1.06 g/L, % 61.25 olarak elde edilmiştir. Sürenin 30 dk'ya çıkarılmasıyla FŞK minimum 61.58 g/L ve 87.84 g/L olarak belirlenmiştir (D7-D4). Aynı koşullarda FMK ve EV ise sırasıyla 0.82, % 75.42 ve 1.17 g/L, % 64.38 olarak belirlenmiştir. Hidroliz süresinin artmasıyla FŞK, FMK ve EV'deki artış istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.17. ÇK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları

D	Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
1	130	1: 10	1	20	73.26±0.91	0.920±0.006	67.00±1.00
2	125	1: 10	1	30	74.82±0.81	0.810±0.001	70.00±0.50
3	125	1: 8	2	10	85.53±1.03	1.030±0.010	63.13±0.63
4	125	1: 8	2	30	87.84±1.15	1.170±0.009	64.38±0.63
5	125	1: 8	1	20	85.47±0.96	0.960±0.001	65.00±0.25
6	120	1: 10	1	20	70.24±0.75	0.750±0.003	66.00±0.25
7	125	1: 12	2	30	61.58±0.82	0.820±0.001	75.42±0.42
8	130	1: 10	3	20	67.48±1.04	1.040±0.002	72.50±0.50
9	125	1: 10	2	20	73.36±0.94	0.940±0.001	67.50±0.50
10	125	1: 10	2	20	71.02±0.98	0.980±0.002	68.50±0.50
11	125	1: 10	1	10	63.53±0.76	0.760±0.006	67.00±1.00
12	120	1: 8	2	20	89.07±1.04	1.060±0.012	61.25±1.25
13	130	1: 10	2	30	72.54±1.05	1.050±0.002	69.00±1.00

(Devamı arkada)

Çizelge 4.17'in Devamı

14	125	1: 10	2	20	74.80±0.98	0.980±0.003	69.50±1.25
15	120	1: 10	3	20	70.74±0.95	0.950±0.003	68.00±1.00
16	125	1: 10	3	30	71.51±0.99	0.990±0.007	73.00±0.50
17	130	1: 8	2	20	88.72±1.24	1.240±0.006	65.00±0.50
18	125	1: 12	2	10	60.29±0.74	0.740±0.003	73.33±1.00
19	125	1: 12	1	20	57.91±0.70	0.700±0.002	72.92±0.50
20	130	1: 10	2	10	73.31±1.01	1.010±0.008	61.50±1.50
21	130	1: 12	2	20	62.42±0.90	0.900±0.006	76.25±0.42
22	125	1: 8	3	20	81.72±1.17	1.170±0.003	68.75±1.25
23	120	1: 12	2	20	56.38±0.82	0.820±0.005	70.42±0.42
24	120	1: 10	2	30	71.58±0.98	0.980±0.002	63.50±0.50
25	120	1: 10	2	10	66.57±0.78	0.780±0.002	63.50±1.50
26	125	1: 10	3	10	65.84±0.90	0.900±0.004	73.50±0.50
27	125	1: 12	3	20	56.55±0.89	0.880±0.004	73.75±0.42

$$F\text{ŞK} = +73.06 + 1.10A - 13.60B - 0.95C + 2.07D + 1.60AB - 1.57AC - 1.45AD + 0.60BC - 0.26BD - 1.41CD - 0.20A^2 + 1.2B^2 - 3.10C^2 - 1.12D^2$$

Burada;

A: Sıcaklık

B: Katı: sıvı oranı

C: Seyreltik asit konsantrasyonu

D: Süre

ÇK'nun hidroliz koşullarının optimizasyonunda fermente edilebilir şeker miktarına ait  $R^2$  değeri 0.9745 olarak belirlenirken uyumsuzluk değeri de 0.4573 olarak model tarafından hesaplanmıştır. Bu sonuca göre fermente edilebilir şeker miktarı için elde edilen model, hidroliz sonuçlarının %97.45'ni tam temsil etmekte ve modelin uyumsuzluk değeri %5'ten büyük çıktığı için önemsiz ( $P > 0.05$ ) olmaktadır (Çizelge 4.18). Ayrıca FŞK üzerine sıcaklık K:S, AO ve sürenin etkisini gösteren kontur plot grafikleri Ek 2c 'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. ÇK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	2419.51	73.06±1.33	< 0.0001**
Sıcaklık (A)	14.41	1.11±0.66	0.1242
K:S (B)	2220.06	-13.60±0.66	< 0.0001**
AO (C)	10.81	-0.95±0.66	0.1777
Süre (D)	51.25	2.07±1.15	0.0089**
AB	10.21	1.61±1.15	0.1894
AC	9.86	-1.57±1.15	0.1965
AD	8.35	-1.51±1.15	0.2321
BC	1.43	0.61±1.15	0.6122
BD	0.26	-0.26±1.15	0.8280
CD	7.90	-1.41±0.99	0.2445

(Devamı arkada)

Çizelge 4.18'in Devamı

A <sup>2</sup>		0.20	-0.20±0.99	0.8475
B <sup>2</sup>		7.69	1.20±0.99	0.2504
C <sup>2</sup>		51.27	-3.10±0.99	0.0089**
D <sup>2</sup>		6.65	-1.11±0.99	0.2834
Kalan		63.27		
	Uyum eksikliği	55.99		0.4573
	Kuramsal hata	7.28		
Toplam		2482.78		

$R^2 = 0.9745$  \*\* $P < 0.01$

Çizelge 4.19. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ÇK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	Öngörülen FŞK (g/L)	Elde edilen FŞK (g/L)
130	1: 8.00	1.58	16	87.10	89.42
125	1: 8.01	1.93	28	89.08	87.16
121	1: 8.06	1.90	25	89.09	84.25

Optimum koşullarda gerçekleştirilen ÇK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları Çizelge 4.19'da belirtilmiştir. ÇK optimum hidroliz noktası belirlenirken model tarafından belirlenen optimum koşullar arasından indirgen şeker miktarının gerçekleşen değerlerin öngörülenlerden yüksek olduğu nokta seçilmeye çalışılmıştır. Böylece ÇK hidrolizi için optimum koşullar 130°C sıcaklık, 1:8 K:S, %1.58 asit konsantrasyonu ve 16 dk hidroliz süresi olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.4. YK hidroliz koşullarının RSM ile belirlenmesi

YK hidroliz koşulları ve deneme sonuçları Çizelge 4.20'de verilmiştir. YK RSM deneme sonuçlarına göre hidroliz parametrelerinin FŞK, FMK ve EV üzerine etkileri belirlenmiştir. Hidroliz sıcaklığının 120°C olduğu denemeler sonucunda minimum ve maksimum FŞK 33.32 g/L ve 54.63 g/L olarak ölçülmüştür (D8-D3). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.23 g/L, % 71.67 ve 1.55 g/L, % 60.00 olarak elde edilmiştir. Hidroliz için sıcaklık 125 °C'ye çıkarıldığında FŞK minimum ve maksimum noktaları 34.57 g/L ve 52.75 g/L olarak tespit edilmiştir (D5-D13). Aynı sıcaklık noktasında FMK ve EV ise sırasıyla 1.18 g/L, % 70.00 ve 1.52 g/L, % 58.13 olarak elde edilmiştir. Sıcaklık 130 °C'ye geldiğinde ise FŞK minimum 41.46 g/L ve maksimum 62.47 g/L olarak belirlenmiştir (D14-D7). Bu koşullar altında FMK ve EV ise sırasıyla 1.22, % 65.83 ve 1.57 g/L, % 56.25 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık artışı ile FŞK artması, FMK değişmemesi ve EV'nin azalması istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P < 0.01$ ) tespit edilmiştir (Çizelge 4.21).

K:S'nin 1:8 olduğu hidrolizler sonucunda FŞK minimum 51.43 g/L ve maksimum 62.47 g/L olarak elde edilmiştir (D4-D7). Bu oranda FMK ve EV ise sırasıyla 1.45 g/L, % 52.50 ve 1.57 g/L, % 56.25 olarak tespit edilmiştir. K:S'nin 1:10 olduğu hidrolizlerde ise minimum ve maksimum FŞK sırasıyla 39.73 g/L ve 48.42 g/L olarak belirlenmiştir (D1-D15). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.30 g/L, % 61.00 ve 1.28 g/L, % 61.00 olarak elde edilmiştir. 1:12 K:S'ndeki çalışmalarda ise minimum

33.32 g/L ve maksimum 41.82 g/L FŞK elde edilmiştir (D8-D9). Aynı koşullarda sırasıyla 1.23 g/L, % 71.67 ve 1.20 g/L, % 69.58 FMK ve EV tespit edilmiştir. Sonuç olarak K:S azalmasıyla FŞK ve FMK azalması ve EV ise artması istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P<0.01$ ) çıkmıştır (Çizelge 4.21).

YK hidrolizi için son parametreyi hidroliz süresi oluşturmaktadır. Hidroliz süresinin 10 dk olduğu denemeler sonucunda en düşük 34.57 g/L ve en yüksek 52.75 g/L FŞK elde edilmiştir (D5-D13). Aynı hidroliz koşullarında FMK ve EV ise sırasıyla 1.18 g/L, % 70.00 ve 1.52 g/L, % 58.13 olarak elde edilmiştir. Sürenin 20 dk olmasıyla ise FŞK'nin minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 33.32 g/L ve 62.47 g/L olarak belirlenmiştir (D8-D7). Bu koşullarda FMK ve EV sırasıyla 1.23 g/L, % 71.67 ve 1.57 g/L, % 56.25 olarak elde edilmiştir. Süre 30 dk'ya çıkarıldığında ise FŞK minimum 41.82 g/L ve 51.43 g/L olarak belirlenmiştir (D9-D4). Bu koşullarda FMK ve EV ise sırasıyla 1.20, % 69.58 ve 1.45 g/L, % 52.50 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak hidroliz süresinin artmasıyla FŞK artması, FMK azalması ve EV'nin sabit kalması istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P<0.01$ ) bulunmuştur.

Çizelge 4.20. YK hidrolizi RSM deneme deseni sonuçları

D	Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	EV (%)
1	120	1: 10		10	39.73±0.68	1.300±0.010	61.00±1.00
2	120	1: 10		30	43.08±0.84	1.410±0.001	66.00±0.01
3	120	1: 8		20	54.63±0.21	1.550±0.001	60.00±2.50
4	125	1: 8		30	51.43±0.32	1.450±0.004	52.50±0.01
5	125	1: 12		10	34.57±0.16	1.180±0.010	70.00±0.01
6	130	1: 10		30	48.39±0.28	1.270±0.007	63.00±1.00
7	130	1: 8		20	62.47±0.19	1.570±0.002	56.25±1.25
8	120	1: 12	1	20	33.32±0.26	1.230±0.010	71.67±0.01
9	125	1: 12		30	41.82±0.13	1.200±0.015	69.58±0.42
10	125	1: 10		20	48.20±0.25	1.280±0.008	59.00±1.00
11	130	1: 10		10	45.97±0.70	1.570±0.001	63.00±1.00
12	125	1: 10		20	48.39±0.19	1.270±0.002	58.00±0.01
13	125	1: 8		10	52.75±0.21	1.520±0.004	58.13±0.63
14	130	1: 12		20	41.46±0.32	1.220±0.001	65.83±0.83
15	125	1:10		20	48.42±0.10	1.280±0.006	61.00±1.00

$$\text{FŞK} = +48.34 + 3.44A - 8.76B + 1.46C + 0.08AB - 0.23AC + 2.14BC - 0.61A^2 + 2.24B^2 - 3.44C^2$$

Burada;

A: Sıcaklık

B: Katı: sıvı oranı

C: Süre

YK'nin hidroliz koşullarının optimizasyonunda fermente edilebilir şeker miktarına ait  $R^2$  değeri 0.9647 olarak belirlenirken uyumsuzluk değeri de 0.0015 olarak

model tarafından hesaplanmıştır. Bu sonuca göre fermente edilebilir şeker miktarı için elde edilen model, hidroliz sonuçlarının %96.47'sini tam temsil etmekte ve modelin uyumsuzluk değeri %5'ten büyük çıktığı için istatistiksel olarak önemsiz ( $P>0.05$ ) olmaktadır (Çizelge 4.21). Ayrıca FŞK üzerine sıcaklık, K:S ve sürenin etkisini gösteren kontur plot grafikleri Ek 2d 'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. YK indirgen şeker parametresinin varyans sonuçları

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	789.95	48.34±1.39	0.0040**
Sıcaklık (A)	94.74	3.44±0.85	0.0098**
K:S (B)	614.43	-8.76±0.85	0.0001**
Süre (C)	17.11	1.46±0.85	0.1458
AB	0.022	0.075±1.20	0.9526
AC	0.22	-0.23±1.20	0.8542
BC	18.36	2.14±1.20	0.1347
A <sup>2</sup>	1.37	-0.60±1.25	0.6472
B <sup>2</sup>	0.22	0.24±1.25	0.8544
C <sup>2</sup>	43.59	-3.44±1.25	0.0404*
Kalan	28.87		
Uyum eksikliği	28.85		0.0015
Kuramsal hata	0.028		
Toplam	818.83		

$$R^2 = 0.9647 \quad **P<0.01, P<0.05$$

OFAT ile elde edilen deneme sonuçlarına ve varyans ve regresyon analizlerine göre AO %1 olarak belirlenmişti. RSM modelinin varyans sonuçlarına göre ise K:S ve sıcaklığın önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.21). Modelde uyum eksikliği önemli bulunmuştur. Ancak model için tahmini  $R^2$  değeri biçimsel  $R^2$  değerinin çok üzerindedir. Ayrıca yeterli hassasiyet değerinin 4 olması gerekmektedir. Modelde bu değer 13.93 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu model tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir. (Biçimsel  $R^2=0.9013$ , Tahmini  $R^2=0.4363$ ).

Model maksimum şeker konsantrasyonu olacak şekilde koşullandırılmış ve bütün denemeler olasılık değerine göre model tarafından büyükten küçüğe göre sıralanmıştır. Bütün değişkenlerin önemli çıkmasından dolayı ilk verilen deneme seçilmiş ve doğrulama analizi yapılmıştır. Optimum koşullarda gerçekleştirilen YK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları Çizelge 4.22'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.22. Optimum koşulda gerçekleştirilen YK hidrolizi doğrulama deneme sonuçları

Sıcaklık (°C)	K:S (w/v)	AO (%)	Süre (dk)	Öngörülen FŞK (g/L)	Elde edilen FŞK (g/L)
130	1:8	1	19	59.63	60.16

Lignoselülozik materyallerden elde edilen şeker konsantrasyonları kullanılan materyallerin yetiştirildiği bölge, hasat yılı ve türü gibi özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Ancak elde edilen sonuçlar lignoselülozik materyallerin asidik hidrolizi üzerine yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, genel olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir (Germec vd 2016). Benzer şekilde BK ve pirinç samanı hidrolizatlarından aminoasit üretimi üzerine bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Öncelikle materyalleri H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, and NaOH ile hidroliz etmişler ve optimum hidroliz koşulunu %4 (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 134 °C sıcaklık, %35 materyal ve 35 dakika olarak belirlemişlerdir. Hidroliz sonunda BK ve pirinç samanının karbonhidrat içeriklerini sırasıyla 41 g/L (22.5 glukoz, 9.30 ksiloz ve 9.60 arabinoz) ve 42 g/L (7.2 glukoz, 25 ksiloz ve 10.1 arabinoz) olarak belirlemişlerdir (Gopinath vd 2011).

#### 4.4. Lignoselülozik Hidrolizatların Aktif Kömür Detoksifikasyon Optimizasyonu

Aktif kömür detoksifikasyon optimizasyonu için RSM denemeleri gerçekleştirilmiştir. Metotta cevap olarak kullanılan FŞK ve FMK değişimleri Çizelge 4.23'de belirtilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde aktif kömür detoksifikasyonunun bütün materyallerin indirgen şeker içeriğini önemli seviyede değiştirmedeği görülmüştür. Ancak aktif kömür detoksifikasyonu ile fenolik madde miktarları önemli oranlarda azalmıştır. Elde edilen varyans analizleri değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak model ve aktif kömür konsantrasyonu AK, ÇK ve YK için önemli ( $P < 0.01$ ) BK için ise önemsiz ( $P > 0.05$ ) çıkmıştır. Parametrelerin varyans sonuçları EK-3'de verilmiştir.

Materyallerin optimum detoksifikasyon koşullarını belirlemek için model tarafından aktif kömür, süre ve sıcaklık parametrelerinin ortalama değerleri ve fenolik madde için ortalama ve minimum konsantrasyonları olacak şekilde belirlenen denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu durumda fenolik madde miktarlarının ortalama ve minimum konsantrasyonları olacak şekilde her materyal için iki ayrı optimum koşul belirlenmiştir. Bu koşullar maksimum aktif kömür konsantrasyonu; D<sub>1</sub> ve minimum aktif kömür konsantrasyonunun D<sub>2</sub> olmak üzere adlandırılmıştır. Model tarafından belirlenen detoksifikasyon koşulları arasından en düşük FMK'ye sahip koşullar optimum koşul olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.23 Detoksifikasyon optimizasyonu RSM deneme sonuçları

Bağımsız değişken parametreler			AK		BK		ÇK		YK	
Aktif Kömür Konsantrasyonu (%)	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)	FŞK (g/L)	FMK (g/L)
3	30	25	66.02±0.06	0.110±0.007	55.32±0.46	0.330±0.010	74.07±1.72	0.240±0.005	50.18±1.34	0.240±0.005
3	40	30	62.22±2.08	0.080±0.002	57.91±0.45	0.320±0.008	79.94±1.21	0.210±0.003	49.61±1.35	0.210±0.003
2	30	30	65.30±0.22	0.230±0.017	55.74±1.09	0.440±0.010	81.09±1.98	0.310±0.007	49.93±0.70	0.310±0.007
2	40	25	62.83±4.15	0.300±0.007	57.78±0.35	0.440±0.006	76.17±1.66	0.310±0.010	47.72±2.14	0.310±0.010
1	30	35	60.91±0.38	0.520±0.008	57.46±1.50	0.650±0.006	72.09±0.51	0.460±0.003	47.91±0.99	0.460±0.003
2	40	35	63.98±1.47	0.230±0.007	54.27±0.89	0.450±0.020	72.95±2.59	0.320±0.007	48.07±1.28	0.320±0.007
2	20	25	62.99±0.48	0.230±0.003	56.44±0.13	0.450±0.009	71.54±0.80	0.320±0.004	48.65±0.13	0.320±0.004
2	30	30	65.06±0.51	0.170±0.007	56.50±0.18	0.460±0.007	80.00±0.51	0.310±0.005	50.37±1.34	0.310±0.005
1	20	30	69.02±1.02	0.420±0.052	56.95±1.21	0.630±0.018	76.94±1.66	0.450±0.001	53.05±1.28	0.450±0.001
2	20	35	65.44±0.19	0.230±0.003	54.27±2.30	0.490±0.006	73.68±1.66	0.310±0.001	45.90±1.19	0.310±0.001
2	30	30	66.08±0.57	0.190±0.013	60.65±0.08	0.440±0.005	76.17±1.66	0.310±0.001	48.20±0.38	0.310±0.001
1	40	30	62.83±1.21	0.470±0.017	58.67±0.99	0.320±0.013	79.37±0.51	0.440±0.003	51.46±1.72	0.440±0.003
1	30	25	59.66±0.03	0.510±0.010	56.60±0.26	0.670±0.009	72.88±0.54	0.470±0.004	48.30±0.86	0.470±0.004
3	30	35	63.85±0.38	0.090±0.010	57.05±0.86	0.340±0.012	70.46±0.93	0.250±0.010	44.02±0.80	0.250±0.010
3	20	30	65.86±0.99	0.100±0.003	52.22±0.35	0.660±0.009	81.12±1.50	0.220±0.014	48.36±0.48	0.220±0.014
Kontrol örnekleri			66.66	1.12	60.88	1.2	74.07	0.83	49.38	1.63



#### 4.4.1. AK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu

AK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyon deneme deseni ve sonuçları Çizelge 4.23’de belirtilmiştir. Başlangıç fenolik madde içeriği 1.12 g/L olan AK hidrolizatının detoksifikasyon işlemiyle fenolik madde miktarları azaltılmaya çalışılmıştır. Detoksifikasyon işleminde aktif kömür konsantrasyonu %1 olduğunda minimum ve maksimum fenolik madde miktarları sırasıyla 0.42 g/L ve 0.52 g/L olarak ölçülmüştür. Aktif kömür konsantrasyonunun % 2 olduğu detoksifikasyon işlemlerinde minimum 0.17 g/L ve maksimum 0.30 g/L fenolik madde belirlenmiştir. %3 aktif kömür konsantrasyonu kullanılarak yapılan detoksifikasyon işlemlerinde de minimum fenolik madde içeriği 0.08 g/L iken maksimum fenolik madde içeriği 0.11 g/L olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla aktif kömür konsantrasyonunun artmasıyla AK hidrolizatının fenolik madde içeriğinin azalması istatistiksel olarak önem ( $P>0.01$ ), seviyesinde tespit edilmiştir (EK-3a). Detoksifikasyon işleminde sürenin etkisi araştırılırsa detoksifikasyon süresinin 20 dk olduğu uygulamalarda minimum ve maksimum fenolik madde miktarlarının sırasıyla 0.10 g/L ve 0.42 g/L olduğu görülmektedir. Sürenin 30 dk olduğu detoksifikasyon uygulamalarında ise minimum fenolik madde içeriği 0.09 g/L ölçülürken, maksimum fenolik madde içeriği de 0.52 g/L olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak sürenin artmasıyla AK hidrolizatının fenolik madde içeriğinin azalması istatistiksel olarak önemsizdir ( $P>0.05$ ). Detoksifikasyon işlemindeki son parametre olan sıcaklığın etkisine bakılacak olursa 25°C’deki uygulamalar sonucunda minimum fenolik madde içeriği 0.11 g/L ve maksimum fenolik madde içeriği de 0.51 g/L olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın 30°C olduğu denemelerde ise fenolik madde içeriği minimum 0.08 g/L maksimum 0.47 g/L olarak ölçülmüştür. 35°C’de gerçekleşen detoksifikasyon işlemlerinde de minimum ve maksimum fenolik madde miktarları sırasıyla 0.09 g/L ve 0.52 g/L olarak ölçülmüştür. Aktif kömür konsantrasyonu ve sürenin sabit olduğu denemelerde sıcaklık artışı ile FMK artmaktadır. AK hidrolizatının fenolik madde içeriği varyans sonuçlarına göre sıcaklık ( $P<0.05$ ) ve aktif kömür konsantrasyonu ( $P<0.01$ ) istatistiksel olarak önem seviyesinde olduğu görülmüştür (EK-3a).

Çizelge 4.24. AK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları

	Aktif kömür konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
D <sub>1</sub>	2.9	30.9	26.8
D <sub>2</sub>	1.1	34.2	34.4

#### 4.4.2. BK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu

BK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyon deneme deseni ve sonuçları Çizelge 4.23’de verilmiştir. Detoksifikasyon işlemi uygulanmayan BK hidrolizatının fenolik madde içeriği 1.20 g/L olarak belirlenmiştir. Detoksifikasyonda kullanılan aktif kömür konsantrasyonunun %1 olduğu uygulamalarda minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri sırasıyla 0.32 g/L ve 0.67 g/L’dir. %2 aktif kömür konsantrasyonunda ise minimum 0.44 g/L ve maksimum 0.49 g/L fenolik madde miktarı hesaplanmıştır. Son olarak %3 aktif kömür konsantrasyonunda ise 0.32 g/L minimum, 0.66 g/L maksimum nokta olmak üzere fenolik madde içerikleri belirlenmiştir. Aktif kömür konsantrasyonunun en düşük ve en yüksek olduğu noktaların her ikisinde de fenolik

madde içeriği minimum seviyede kalmaktadır. Ancak BK hidrolizatlarının detoksifikasyonunda aktif kömür konsantrasyonu istatistiksel olarak önemsiz ( $P>0.05$ ) çıkmıştır (EK-3b). Bunun nedeni detoksifikasyon için kullanılan bağımsız değişkenlerin minimum ve maksimum noktalarının birbirine yakın olmasından kaynaklanmıştır. Sürenin 20 dk olduğu uygulamalarda minimum 0.45 g/L, maksimum 0.66 g/L fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Detoksifikasyon işleminin 30 dk olduğu koşullarda ise fenolik madde içerikleri minimum 0.33 g/L ve maksimum 0.67 g/L olarak hesaplanmıştır. Sürenin 40 dk olduğu uygulamalarda ise minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri sırasıyla 0.45 g/L ve 0.32 g/L olarak belirlenmiştir. BK hidrolizatının detoksifikasyon işleminde sürenin etkisi incelendiğinde sürenin artmasıyla fenolik madde içeriğinin azalmakta olduğu görülmüş. Ancak azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Sıcaklık 25°C’de olduğunda ise minimum 0.33 g/L ve maksimum 0.67 g/L fenolik madde içeriği ölçülmüştür. 30°C olan uygulamalarda ise fenolik madde içeriklerinin minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 0.32 g/L ve 0.66 g/L olarak belirlenmiştir. Maksimum sıcaklık noktasında ise minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri yine sırasıyla 0.32 g/L ve 0.65 g/L olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak BK hidrolizatının detoksifikasyonunda sıcaklık değişiminin fenolik madde içeriğini etkilemediği görülmüş ve sıcaklığın istatistiksel olarak önem seviyesinde olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir (EK-3b).

Çizelge 4.25. BK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları

	Aktif kömür konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
D <sub>1</sub>	2.9	31.4	39.9
D <sub>2</sub>	1.1	34.1	30.9

#### 4.4.3. ÇK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu

AK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyon deneme deseni ve sonuçları Çizelge 4.23’de belirtilmiştir. Detoksifiye edilmemiş ÇK hidrolizatının fenolik madde içeriği 0.83 g/L olarak belirlenmiştir. Aktif kömür konsantrasyonunun %1 olduğu detoksifikasyon işlemlerinde minimum fenolik madde içeriği 0.44 g/L iken maksimum nokta 0.47 g/L olarak belirlenmiştir. %2 aktif kömür konsantrasyonlarında ise minimum ve maksimum noktalar sırasıyla 0.32 g/L ve 0.31 g/L’dir. %3 aktif kömür konsantrasyonlarında ölçülen fenolik madde miktarları ise minimum 0.21 g/L ve maksimum 0.25 g/L olarak ölçülmüştür. Artan aktif kömür konsantrasyonu ile ÇK hidrolizatının fenolik madde içeriğinin azalması istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ) çıkmıştır (EK-3c). Sürenin 20 dk olduğu detoksifikasyon uygulamalarında fenolik madde içerikleri minimum 0.22 g/L maksimum 0.45 g/L ve sürenin 30 dk olduğu uygulamalarda minimum 0.24 g/L maksimum 0.47 g/L olarak belirlenmiştir. Sürenin 40 dk olduğu uygulamalarda ise fenolik madde içeriklerinin minimum ve maksimum noktaları 0.21g/L ve 0.44 g/L olarak ölçülmüştür. Böylece sürenin minimum ve maksimum noktalarında en düşük fenolik madde içeriğine sahip ÇK hidrolizatları elde edilmiş ve süre istatistiksel olarak ( $P<0.05$ ) önem seviyesinde tespit edilmiştir (EK-3c). Sıcaklığın 25 °C olduğu detoksifikasyon işlemlerinde minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri sırasıyla 0.24 g/L ve 0.47 g/L olarak belirlenmiştir. Sıcaklık 30 °C

olduğunda minimum 0.21 g/L ve maksimum 0.45 g/L fenolik madde içeriği tespit edilmiştir. Detoksifikasyon sıcaklığının 40 °C olduğu uygulamalarda ise minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri sırasıyla 0.25 ve 0.46 g/L olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla minimum ve maksimum sıcaklık noktalarında yüksek çıkan fenolik madde içeriği orta nokta olan 30 °C de en düşük seviyede tespit edilmiş ve sıcaklık parametresi ÇK hidrolizatlarının detoksifikasyonunda istatistiksel olarak önemli ( $P<0.01$ ) bulunmuştur (EK-3c).

Çizelge 4.26. ÇK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları

	Aktif kömür konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
D <sub>1</sub>	3.0	28.0	40.0
D <sub>2</sub>	1.1	27.7	27.7

#### 4.4.4. YK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyonu

YK hidrolizatlarının detoksifikasyon optimizasyon deneme deseni ve sonuçları Çizelge 4.23’de belirtilmiştir. Detoksifikasyon işlemi uygulanmayan YK hidrolizatının fenolik madde içeriği 1.63 g/L olarak belirlenmiştir. Detoksifikasyonda kullanılan aktif kömür konsantrasyonunun %1 olduğu uygulamalarda minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri sırasıyla 0.44 g/L ve 0.47 g/L’dir. %2 aktif kömür konsantrasyonunda ise minimum 0.31 g/L ve maksimum 0.32 g/L fenolik madde miktarı hesaplanmıştır. Son olarak %3 aktif kömür konsantrasyonunda ise 0.21 g/L minimum, 0.25 g/L maksimum nokta olmak üzere fenolik madde içerikleri belirlenmiştir. Dolayısıyla aktif kömür konsantrasyonunun artmasıyla FMK’nın azalması istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P<0.01$ ) tespit edilmiştir (EK-3d). Sürenin 20 dk olduğu uygulamalarda minimum 0.22 g/L, maksimum 0.45 g/L fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Detoksifikasyon işleminin 30 dk olduğu koşullarda ise fenolik madde içerikleri minimum 0.24 g/L ve maksimum 0.47 g/L olarak hesaplanmıştır. Sürenin 40 dk olduğu uygulamalarda ise minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri sırasıyla 0.21 g/L ve 0.44 g/L olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla YK hidrolizatının detoksifikasyon işleminde sürenin etkisi incelendiğinde sürenin minimum ve maksimum olduğu noktalarda en düşük fenolik madde içerikleri elde edildiği görülmüştür. Aktif kömür konsantrasyonu ve süre korelasyonunun istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) olduğu belirlenmiştir (EK-3d). Sıcaklık 25°C’de olduğunda ise minimum 0.24 g/L ve maksimum 0.47 g/L fenolik madde içeriği ölçülmüştür. 30°C olan uygulamalarda ise fenolik madde içeriklerinin minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 0.21 g/L ve 0.45 g/L olarak belirlenmiştir. Maksimum sıcaklık noktasında ise minimum ve maksimum fenolik madde içerikleri yine sırasıyla 0.25 g/L ve 0.46 g/L olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak YK hidrolizatının detoksifikasyonunda sıcaklık ve aktif kömür konsantrasyonu korelasyonunun FMK azaltması istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir (EK-3d).

Çizelge 4.27. YK hidrolizatının detoksifikasyon optimizasyonu sonucu belirlenen optimum koşulları

	Aktif kömür konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
D <sub>1</sub>	2.9	34.3	33.3
D <sub>2</sub>	1.1	27.6	24.2

Yapılan çalışmalar sonucunda aktif kömür detoksifikasyon uygulamasının aktif kömür konsantrasyonu, sıcaklık ve süre parametreleri optimize edilmiştir. AK, BK ve ÇK için D<sub>1</sub> ve D<sub>2</sub>, YK için ise D<sub>1</sub> metotları optimum koşullar olarak belirlenmiştir. D<sub>2</sub> metodunda %1 aktif kömür konsantrasyonu kullanımının materyallerdeki inhibitör bileşikler için yeterli olabileceği ve D<sub>1</sub> metodunda %3 aktif kömür konsantrasyonunun mikroorganizma gelişimini sınırlandırabileceği düşünülerek iki farklı nokta optimum koşul olarak belirlenmiştir. Materyallerin aktif kömür ile detoksifikasyon koşullarının optimizasyonu için her iki noktada fermentasyonlar (F<sub>D1</sub> ve F<sub>D2</sub>) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya benzer şekilde YK ile çalışan Chaud vd (2012) aktif kömür detoksifikasyon metodu ile inhibitör bileşiklerin konsantrasyonlarını azaltmışlardır. Öncelikle YK hidroliz işlemini 156 °C'de, 1:4.5 K:S, %0.35 (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 27 dk hidroliz süresinde gerçekleştirmişlerdir. Bu hidroliz koşullarında 58.56 g/L ksiloz, 11.48 g/L glukoz ve 8 g/L arabinoz elde etmişlerdir. Detoksifikasyon işlemini %1 aktif kömür konsantrasyonunda, 200 rpm çalkalama hızında, 60°C sıcaklıkta 30 dk'da gerçekleştirmişlerdir. Detoksifikasyon öncesi 5.10 asetik asit, 2.50 g/L FMK, 0.92 g/L furfural ve 0.26 g/L HMF olan hidrolizat içeriğini detoksifikasyon sonrası sırasıyla 5.40, 1.19 g/L, 0.48 g/L, 0.20 g/L olarak belirlemişlerdir. Daha sonra *P. stipitis* NRRL Y-7124 suşunu kullanarak YK hidrolizatından 72 h sonunda yaklaşık 4 g/L etanol üretmişlerdir.

#### 4.5. Etanol Fermentasyonları

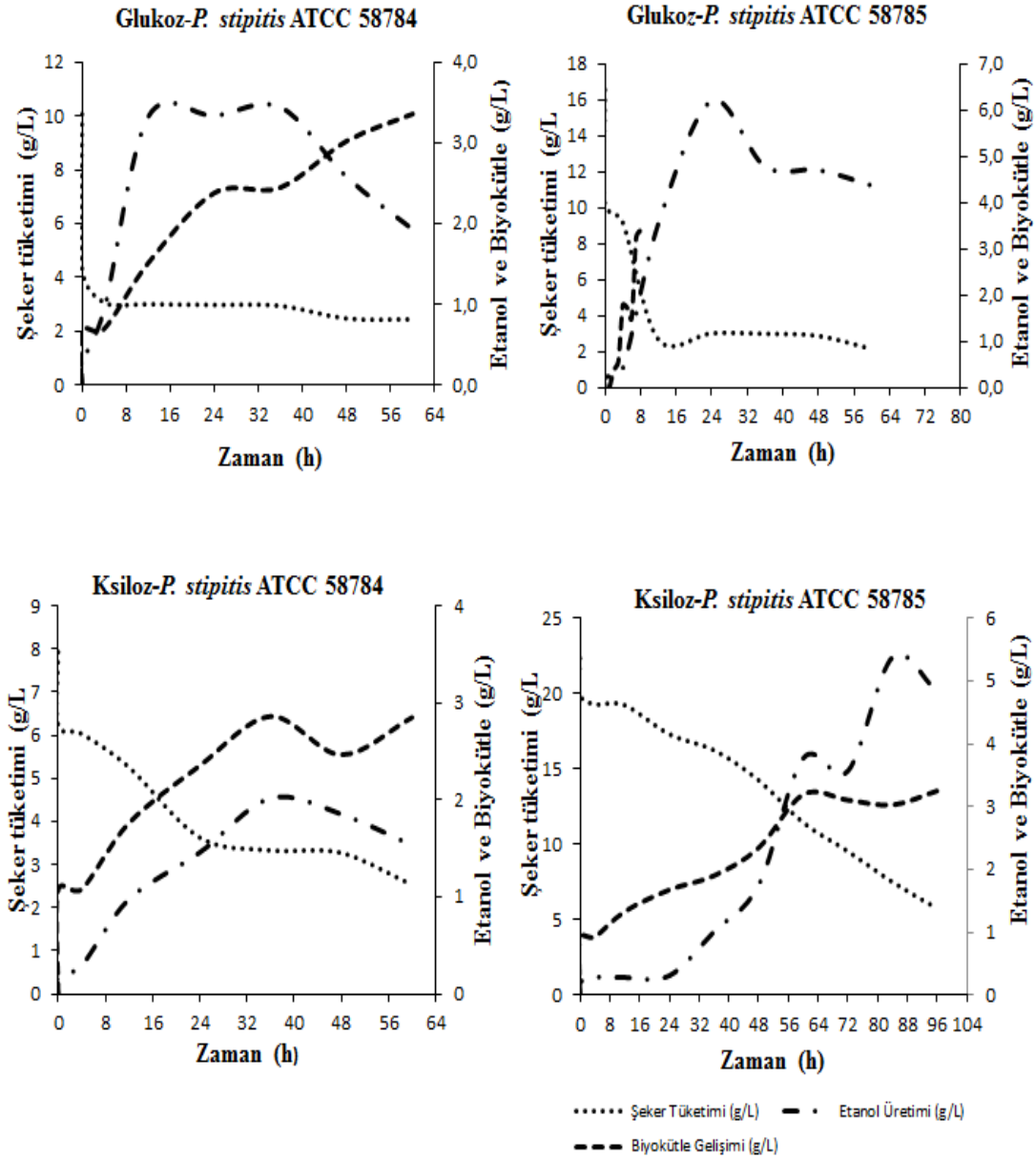
##### 4.5.1. Saf karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlar

Çalışmanın kontrol fermentasyonları saf karbon kaynakları olan glukoz ve ksiloz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sonunda hesaplanan kinetik parametreler Çizelgede 4.28'de gösterilmiştir. Glukoz ve ksiloz kullanılarak *P. stipitis* ATCC 58784 ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda etanol verimleri sırasıyla % 40.53 ve % 36.15 olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde *P. stipitis* ATCC 58785 ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ise etanol verimi % 40.25 glukozdan ve % 33.81 ksilozdan elde edilmiştir. Suşların etanol verimleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Glukoz kullanım hızları ise ksiloza göre istatistiksel olarak önem seviyesindedir ( $P < 0.05$ ). *P. stipitis* ATCC 58785 suşu ksilozu daha yavaş kullanmaktadır. Saf karbon kaynakları ile gerçekleştirilen etanol fermentasyonu süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim grafikleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.28. Saf karbon kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	<i>P. stipitis</i> ATCC 58784		<i>P. stipitis</i> ATCC 58785	
	Glukoz	Ksiloz	Glukoz	Ksiloz
<b>S (g/L)</b>	6.60±0.52	5.65±0.25	14.03±0.42	14.71±0.15
<b>P (g/L)</b>	2.70±0.47	2.05±0.20	5.65±0.33	4.98±0.21
<b>X (g/L)</b>	2.70±0.03	1.86±0.08	2.94±0.08	2.35±0.01
<b>Y<sub>P/S</sub> (%)</b>	40.53±3.89 <sup>a</sup>	36.15±1.95 <sup>a</sup>	40.25±1.15 <sup>a</sup>	33.81±1.06 <sup>a</sup>
<b>Y<sub>X/S</sub> (%)</b>	41.26±3.67	32.96±0.01	20.99±0.07	15.94±0.10
<b>Y<sub>P/X</sub> (g/g)</b>	1.00±0.18	1.10±0.06	1.92±0.06	2.12±0.08
<b>Q<sub>S</sub> (g/L/h)</b>	0.95±0.08	0.16±0.03	0.95±0.14	0.19±0.03
<b>Q<sub>P</sub> (g/L/h)</b>	0.24±0.05 <sup>b</sup>	0.07±0.03 <sup>c</sup>	0.44±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.001 <sup>bc</sup>
<b>Q<sub>X</sub> (g/L/h)</b>	0.08±0.01	0.05±0.04	0.08±0.07	0.10±0.02
<b>μ<sub>S</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	0.13±0.04	0.04±0.01	0.12±0.03	0.03±0.01
<b>μ<sub>P</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	0.16±0.01	0.08±0.06	0.26±0.01	0.10±0.001
<b>μ<sub>X</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	0.11±0.01	0.07±0.01	0.14±0.01	0.05±0.003
<b>t<sub>d</sub> (h)</b>	6.50±0.29	10.42±0.93	4.94±0.40	14.58±0.79
<b>ŞKO (%)</b>	69.62±1.12	69.42±1.33	84.79±2.28	65.00±1.51
<b>% teorik verim</b>	92.53±0.91	98.97±0.39	94.27±0.64	61.05±0.40

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ).



Şekil 4.1. Saf karbon kaynakları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

Tüm hidrolizatların etanol fermentasyonları belirlenen optimum detoksifikasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Her bir hidrolizat için uygun detoksifikasyon ( $D_1$  veya  $D_2$ ) metodu fermentasyon sonuçlarına göre belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen hidrolizatların detoksifiye edilmeden doğrudan fermentasyonları ( $F_D$ ) da gerçekleştirilmiştir.

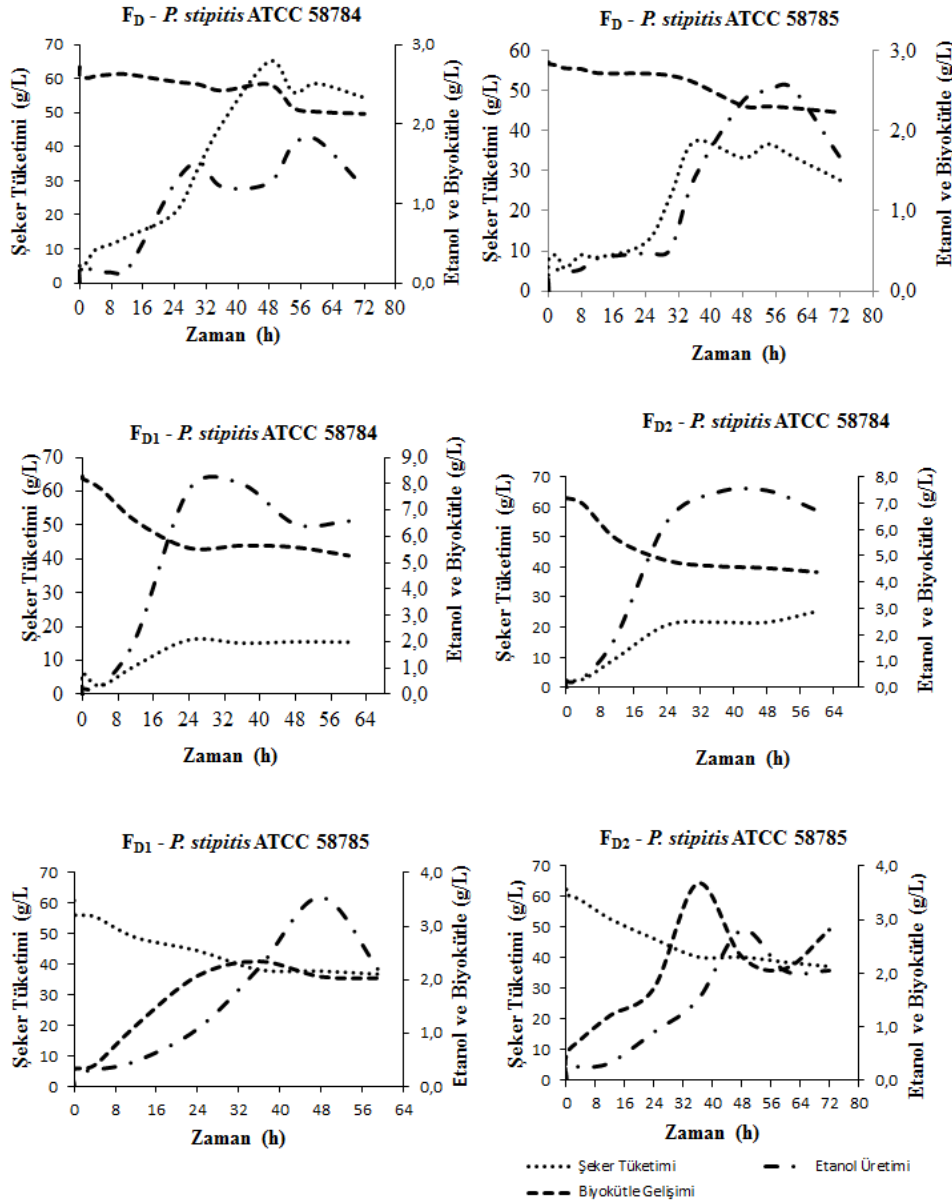
#### 4.5.2. Optimum koşullarda elde edilen AK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar

Optimum hidroliz koşullarında elde edilen AK hidrolizatlarının fermentasyonlarına ait kinetik parametreler Çizelge 4.29'da belirtilmiştir. Çizelge incelendiğinde *P. stipitis* ATCC 58784 ile yapılan fermentasyonlar arasında verim ve maksimum üretim hızı açısından  $F_{D1}$  istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir. *P. stipitis* ATCC 58785 ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ise hem etanol verimi hem de üretim hızı açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark oluşmamıştır. Tüm bu nedenlerle AK hidrolizatları için aktif kömür detoksifikasyon uygulamasının  $D_1$  yönteminin optimum nokta olduğu tespit edilmiştir. Tüm koşullarda gerçekleştirilen etanol fermentasyonu süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim grafikleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.29. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen AK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	<i>P. stipitis</i> ATCC 58784			<i>P. stipitis</i> ATCC 58785		
	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$
<i>S</i> (g/L)	10.53±0.42	18.13±1.63	22.17±1.04	9.10±1.37	18.23±0.29	19.29±0.70
<i>P</i> (g/L)	1.69±0.02	7.68±0.09	7.25±0.03	1.60±0.01	3.22±0.07	2.40±0.15
<i>X</i> (g/L)	3.31±0.67	1.72±0.03	2.34±0.28	2.28±0.03	2.61±0.59	3.33±0.14
$Y_{P/S}$ (%)	16.09±0.81 <sup>c</sup>	42.65±3.32 <sup>a</sup>	35.07±0.91 <sup>b</sup>	17.96±2.87 <sup>c</sup>	17.65±0.11 <sup>c</sup>	12.50±1.25 <sup>c</sup>
$Y_{X/S}$ (%)	31.72±7.59	9.54±0.70	10.54±0.75	25.64±3.57	14.39±3.49	17.26±0.07
$Y_{P/X}$ (g/g)	0.53±0.10	4.47±0.02	3.13±0.36	0.70±0.01	1.30±0.32	0.72±0.08
$Q_S$ (g/L/h)	0.22±0.02	1.03±0.18	1.39±0.07	0.29±0.13	0.76±0.10	0.72±0.05
$Q_P$ (g/L/h)	0.06±0.001 <sup>b</sup>	0.41±0.06 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>a</sup>	0.11±0.002 <sup>b</sup>	0.11±0.003 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>b</sup>
$Q_X$ (g/L/h)	0.10±0.02	0.10±0.002	0.10±0.001	0.08±0.000	0.08±0.00	0.17±0.01
$\mu_S$ (h <sup>-1</sup> )	0.004±0.00	0.02±0.004	0.02±0.003	0.01±0.01	0.01±0.002	0.01±0.001
$\mu_P$ (h <sup>-1</sup> )	0.08±0.001	0.26±0.01	0.23±0.01	0.08±0.03	0.07±0.001	0.06±0.02
$\mu_X$ (h <sup>-1</sup> )	0.32±0.06	0.15±0.001	0.16±0.002	0.16±0.003	0.05±0.002	0.07±0.01
$t_d$ (h)	2.27±0.42	4.54±0.03	4.36±0.05	4.24±0.08	14.56±0.54	9.72±1.25
ŞKO (%)	15.39±0.69	28.88±1.79	35.35±1.55	16.06±2.43	29.47±0.91	30.93±1.14
% teorik verim	31.49±0.04	64.91±0.18	70.41±0.07	35.15±0.03	26.59±0.14	19.87±0.30

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ).



Şekil 4.2. AK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

#### 4.5.3. Optimum koşullarda elde edilen BK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar

Optimum hidroliz koşullarında elde edilen BK hidrolizatlarından *P. stipitis* ATCC 58784 ve *P. stipitis* ATCC 58785 suşları kullanılarak etanol fermentasyonlarına ait kinetik parametreler Çizelge 4.30'da gösterilmiştir. Fermentasyonlar sonucu hesaplanan kinetik parametreler incelendiğinde *P. stipitis* ATCC 58784 ile yapılan fermentasyonlar arasında en yüksek etanol konsantrasyonu 7.33 g/L olarak FD<sub>1</sub>'de elde edilmiştir. Aynı zamanda detoksifikasyon uygulaması etanol verimi ve üretim hızı açısından istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). *P. stipitis* ATCC 58785 ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ise en yüksek etanol üretimi, etanol verimi ve



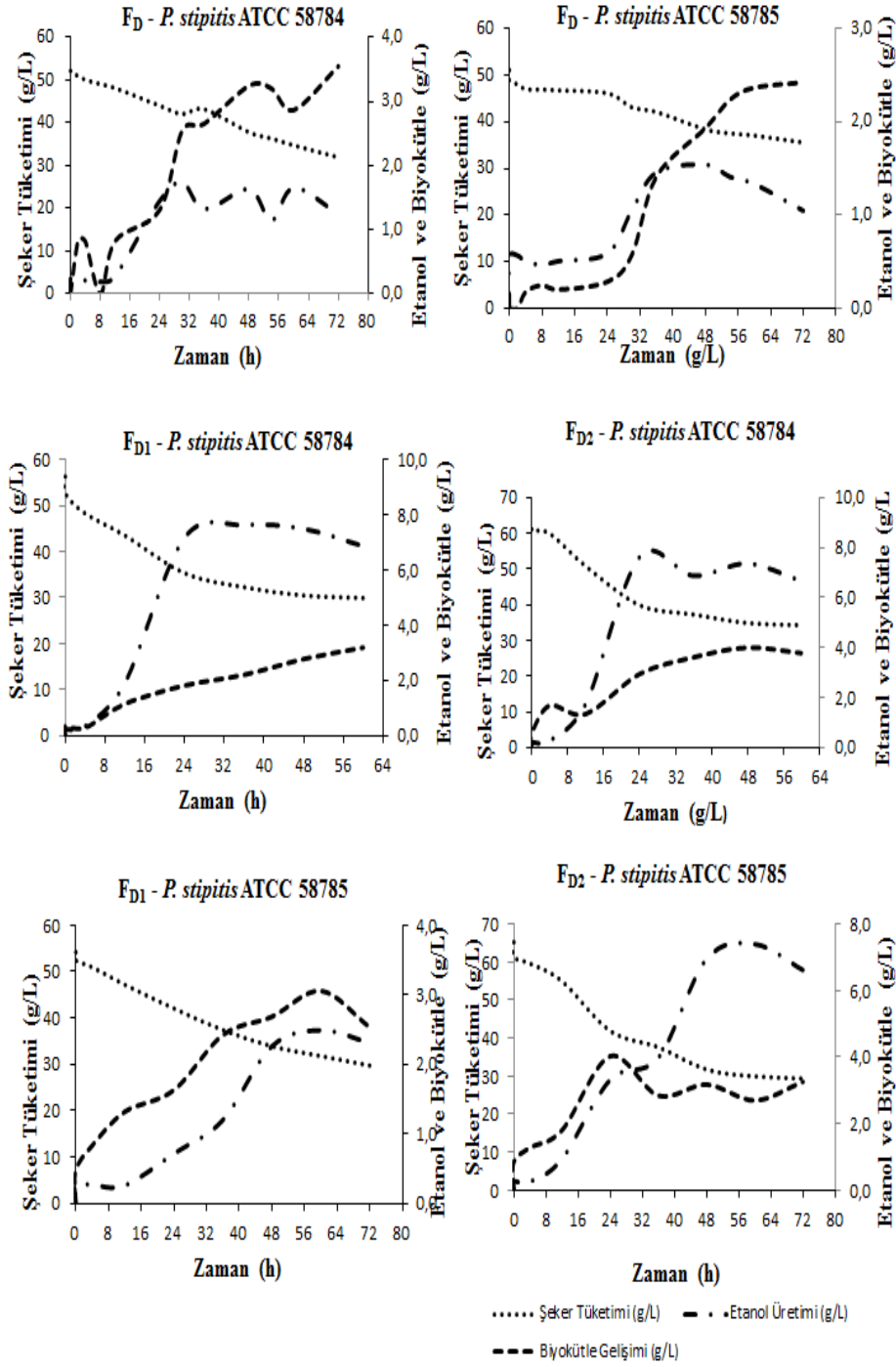
maksimum üretim hızı  $F_{D2}$ 'de görülmüştür. İstatistiksel olarak da etanol verimi ve üretim hızı  $F_{D1}$ 'e göre önem seviyesinde ( $P<0.05$ ) tespit edilmiştir. Dolayısıyla BK hidrolizatları ile gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda aktif kömür detoksifikasyon uygulamasının optimum koşulu  $D_2$  olarak tespit edilmiştir. Fermentasyonda kullanılan suşlar karşılaştırılacak olursa uygulanan detoksifikasyon işleminin her iki suş ile yapılan fermentasyonlarda etanol verimi ve üretim hızı açısından istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) olduğu görülmektedir. Tüm koşullarda gerçekleştirilen etanol fermentasyonu süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim grafikleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.30. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen BK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	<i>P. stipitis</i> ATCC 58784			<i>P. stipitis</i> ATCC 58785		
	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$
S (g/L)	21.02±0.78	20.46±0.06	21.82±1.01	13.44±0.10	15.14±0.26	26.12±5.24
P (g/L)	1.54±0.02	7.33±0.09	7.28±0.14	1.10±0.03	2.16±0.07	7.19±0.04
X (g/L)	3.20±0.35	2.76±0.15	3.56±0.13	2.23±0.01	2.63±0.05	2.82±0.36
$Y_{PS}$ (%)	7.34±0.36 <sup>b</sup>	35.84±0.56 <sup>a</sup>	33.47±2.19 <sup>a</sup>	8.21±0.26 <sup>b</sup>	14.27±0.23 <sup>b</sup>	28.70±5.90 <sup>a</sup>
$Y_{XS}$ (%)	15.30±2.23	13.48±0.80	16.31±0.15	16.62±0.04	17.38±0.62	10.96±0.82
$Y_{PX}$ (g/g)	0.49±0.05	2.67±0.12	2.05±0.11	0.49±0.01	0.82±0.04	2.59±0.34
$Q_S$ (g/L/h)	0.34±0.01	0.70±0.02	0.95±0.20	0.54±0.04	0.37±0.07	0.98±0.11
$Q_P$ (g/L/h)	0.10±0.00 <sup>c</sup>	0.45±0.01 <sup>a</sup>	0.47±0.02 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>c</sup>	0.09±0.002 <sup>c</sup>	0.30±0.05 <sup>b</sup>
$Q_X$ (g/L/h)	0.20±0.004	0.10±0.01	0.13±0.15	0.04±0.002	0.09±0.03	0.16±0.03
$\mu_S$ (h <sup>-1</sup> )	0.01±0.00	0.02±0.001	0.02±0.002	0.01±0.00	0.01±0.001	0.02±0.004
$\mu_P$ (h <sup>-1</sup> )	0.10±0.015	0.12±0.01	0.17±0.06	0.07±0.003	0.09±0.003	0.10±0.00
$\mu_X$ (h <sup>-1</sup> )	0.06±0.001	0.04±0.00	0.17±0.10	0.16±0.01	0.04±0.01	0.08±0.03
$t_d$ (h)	11.47±0.23	18.32±0.11	6.41±3.83	4.42±0.21	17.14±3.76	10.44±3.55
ŞKO (%)	40.82±2.02	37.23±1.05	35.38±1.32	26.32±0.15	27.50±0.89	39.69±8.39
% teorik verim	14.35±0.04	54.96±0.18	54.09±0.28	16.07±0.05	17.87±0.14	38.97±0.08

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ).

$D_1$  metoduna göre detoksifiye edilen BK hidrolizatlarından *P. stipitis* ATCC 58784 suşu ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda teorik verim %54.96 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde BK hidrolizatından etanol üretimi üzerine yapılan bir çalışmada Wood vd (2016), BK'nin kimyasal içeriğini %15,70 nişasta, %18,20 ksiloz, %7,80 arabinoz, %5,10 lignin, %10,40 su, %17,60 protein ve %7,10 diğer kimyasallar olarak belirlemişlerdir. Materyalin ön işleminde selüloz enzimi kullanarak eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon yönteminin sıcaklık ve süre koşullarının etanol üretimi ve inhibitör bileşik oluşumu üzerine etkilerini incelemiş ve en etkili ön işlemleri  $>190^\circ\text{C}$ 'de 10 dk olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda hidrolizatta 1.35 g/L formik asit, 1.03 asetik asit, 0.33 g/L furfural tespit etmişlerdir. Ayrıca sıcaklık ve süre artışıyla inhibitör bileşiklerin konsantrasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon yöntemiyle 25 g/L etanol, teorik olarak %93 verim, elde etmişlerdir.



Şekil 4.3. BK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

#### 4.5.4. Optimum koşullarda elde edilen ÇK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar

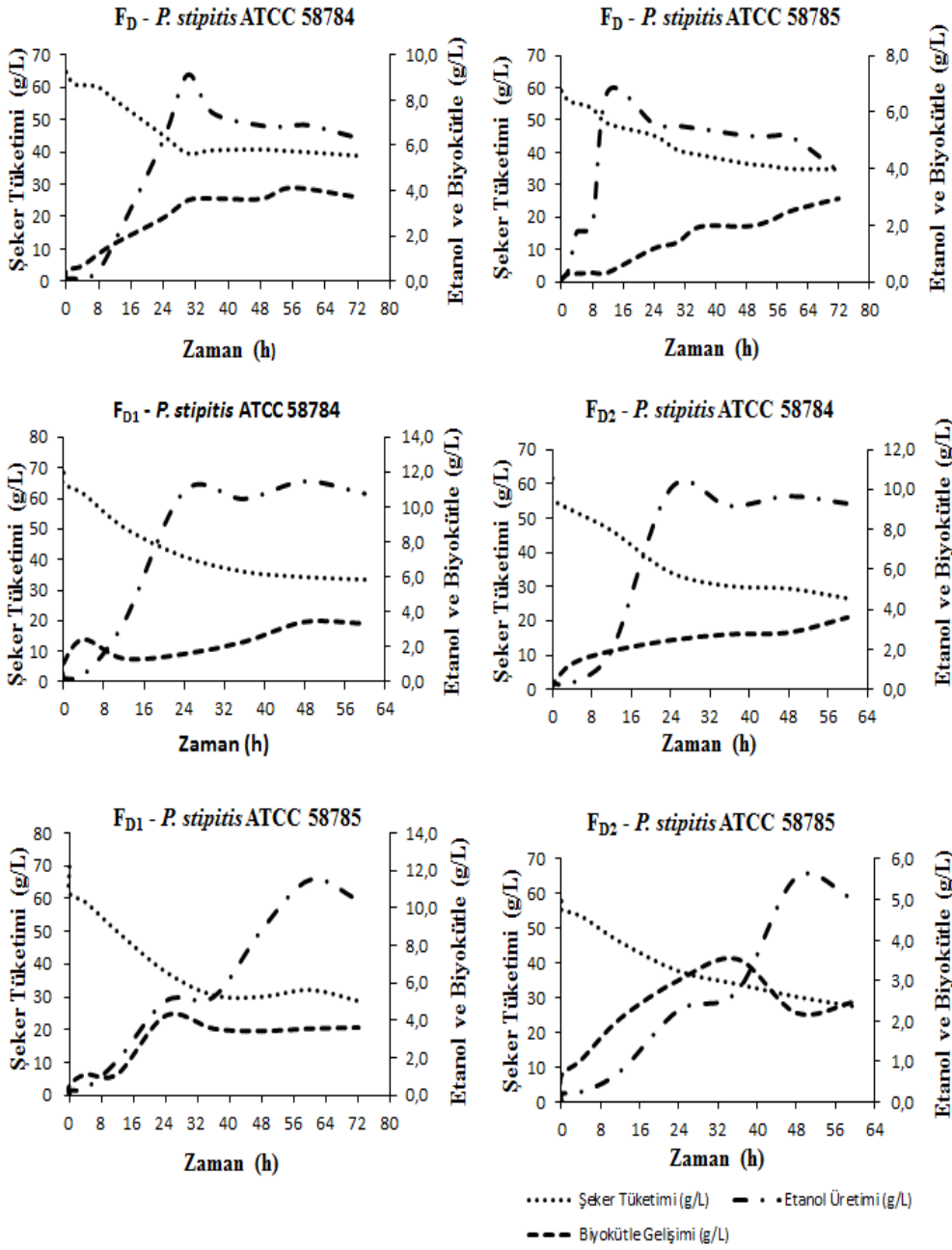
Optimum hidroliz koşullarında elde edilen ÇK hidrolizatlarından *P. stipitis* ATCC 58784 ve *P. stipitis* ATCC 58785 suşları kullanılarak gerçekleştirilen etanol

fermentasyonları sonucu hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.31’de gösterilmiştir. Çizelge incelendiğinde *P. stipitis* ATCC 58784 ile yapılan fermentasyonlar arasında en yüksek etanol konsantrasyonu 11.18 g/L olarak  $F_{D1}$ ’de elde edilmiştir. Bu suşla gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında etanol verimi açısından istatistiksel olarak bir fark oluşmamıştır. Ancak  $F_{D1}$  ve  $F_{D2}$ ’deki maksimum üretim hızları  $F_D$ ’ye göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). *P. stipitis* ATCC 58785 ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ise en yüksek etanol üretimi 10.63 g/L olarak  $F_{D1}$ ’de belirlenmiştir.  $F_{D1}$  etanol verimi ve maksimum üretim hızı açısından istatistiksel olarak önem seviyesinde ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir. Tüm durumlar beraber değerlendirildiğinde ÇK hidrolizatları için aktif kömür detoksifikasyon uygulamasının  $D_1$  yönteminin optimum nokta olduğu tespit edilmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen etanol fermentasyonu süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim grafikleri Şekil 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.31. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen ÇK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	<i>P. stipitis</i> ATCC 58784			<i>P. stipitis</i> ATCC 58785		
	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$
S (g/L)	23.83±1.33	29.34±1.02	28.42±0.70	19.73±0.38	28.96±0.48	26.79±1.76
P (g/L)	8.06±0.97	11.18±0.11	9.90±0.14	4.89±0.05	10.63±0.62	4.96±0.37
X (g/L)	3.34±0.27	2.48±0.11	3.02±0.36	2.82±0.02	2.79±0.09	2.69±0.18
$Y_{P/S}$ (%)	33.69±2.18 <sup>a</sup>	38.14±0.94 <sup>a</sup>	34.88±1.37 <sup>a</sup>	24.79±0.73 <sup>b</sup>	36.66±1.52 <sup>a</sup>	18.70±2.62 <sup>c</sup>
$Y_{X/S}$ (%)	13.99±0.37	8.47±0.68	10.60±1.00	14.30±0.38	9.62±0.16	10.11±1.34
$Y_{P/X}$ (g/g)	2.40±0.09	4.52±0.25	3.33±0.44	1.73±0.01	3.81±0.10	1.85±0.01
$Q_S$ (g/L/h)	0.79±0.13	1.43±0.06	1.12±0.10	1.05±0.27	1.11±0.05	0.89±0.04
$Q_P$ (g/L/h)	0.32±0.07 <sup>b</sup>	0.62±0.01 <sup>a</sup>	0.70±0.02 <sup>a</sup>	0.59±0.06 <sup>a</sup>	0.26±0.001 <sup>bc</sup>	0.14±0.01 <sup>c</sup>
$Q_X$ (g/L/h)	0.08±0.03	0.36±0.02	0.26±0.004	0.10±0.01	0.26±0.01	0.11±0.01
$\mu_S$ (h <sup>-1</sup> )	0.02±0.002	0.03±0.001	0.02±0.001	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.001
$\mu_P$ (h <sup>-1</sup> )	0.23±0.07	0.27±0.01	0.22±0.001	0.07±0.00	0.12±0.002	0.13±0.01
$\mu_X$ (h <sup>-1</sup> )	0.09±0.01	0.22±0.01	0.41±0.02	0.12±0.01	0.16±0.01	0.12±0.01
$t_d$ (h)	7.66±1.23	3.21±0.17	1.70±0.08	5.93±0.62	4.28±0.22	5.66±0.48
ŞKO (%)	37.29±1.58	42.86±1.49	45.29±1.92	35.67±0.63	41.12±1.07	45.84±2.66
% teorik verim	65.92±1.89	63.23±0.23	54.47±0.28	48.52±0.10	53.66±1.21	34.37±0.73

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ).



Şekil 4.4. ÇK hidrolizatları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait şeker tüketim, etanol üretim ve biyokütle gelişim grafikleri

#### 4.5.5. Optimum koşullarda elde edilen YK hidrolizatlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlar

Çizelge 4.32’de optimum hidroliz koşullarında elde edilen YK hidrolizatlarının fermentasyonlarına ait kinetik parametreler belirtilmiştir. Kinetik parametreler incelendiğinde *P. stipitis* ATCC 58784 ile yapılan  $F_D$ ,  $F_{D1}$  ve  $F_{D2}$  ‘de sırasıyla 1.86 g/L, 4.49 g/L ve 4.47 g/L etanol elde edilmiştir. Etanol verimleri karşılaştırıldığında  $F_{D1}$  ve  $F_{D2}$  istatistiksel olarak önem seviyesinde tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Ayrıca maksimum üretim hızlarına bakıldığında  $F_{D2}$ ’ye göre  $F_{D1}$  istatistiksel olarak önem seviyesindedir

( $P<0.05$ ). Fermentasyonda kullanılan suşlar karşılaştırılacak olursa *P. stipitis* ATCC 58785 suşu ile yapılan fermentasyonlarda etanol üretimi gerçekleştirilememiştir. Bunun nedeni *P. stipitis* ATCC 58785 suşunun tipik aerobik olması, fermentasyonun flask ortamında kontrolsüz olarak gerçekleştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca inhibitör konsantrasyonunun diğer hidrolizatlara göre daha yüksek olması da diğer bir nedendir. Dolayısıyla uygulanan detoksifikasyon işlemleri arasında etanol üretimleri ve etanol verimleri üzerine herhangi bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak tüm durumlar beraber değerlendirildiğinde YK hidrolizatları için aktif kömür detoksifikasyon uygulamasında  $D_1$  yönteminin optimum koşul olduğu belirlenmiştir. Tüm koşullarda gerçekleştirilen etanol fermentasyonu süresi boyunca toplam indirgen şeker, etanol ve biyokütle miktarındaki değişim grafikleri Şekil 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. Optimum hidroliz koşullarında elde edilen YK hidrolizatlarının farklı fermentasyonlarına ait kinetik parametreler

Kinetik parametreler	<i>P. stipitis</i> ATCC 58784			<i>P. stipitis</i> ATCC 58785		
	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$	$F_D$	$F_{D1}$	$F_{D2}$
S (g/L)	11.71±0.77	11.60±1.52	11.47±0.85	3.54±0.16	12.58±0.45	14.94±1.72
P (g/L)	1.86±0.01	4.49±0.06	4.47±0.15	0.26±0.03	0.68±0.02	0.28±0.06
X (g/L)	2.47±0.09	1.32±0.01	2.79±0.25	1.31±0.02	1.56±0.04	1.95±0.46
$Y_{P/S}$ (%)	15.92±0.98 <sup>b</sup>	39.30±4.65 <sup>a</sup>	39.06±1.54 <sup>a</sup>	7.46±1.11 <sup>c</sup>	5.43±0.03 <sup>c</sup>	1.93±0.61 <sup>c</sup>
$Y_{X/S}$ (%)	21.22±2.15	11.56±1.39	24.65±4.02	37.05±0.97	12.41±0.72	12.86±1.56
$Y_{P/X}$ (g/g)	0.75±0.03	3.40±0.01	1.62±0.20	0.20±0.02	0.44±0.02	0.16±0.07
$Q_S$ (g/L/h)	0.20±0.08	0.70±0.06	0.49±0.35	0.10±0.04	0.74±0.02	0.32±0.03
$Q_P$ (g/L/h)	0.22±0.01 <sup>c</sup>	0.56±0.01 <sup>a</sup>	0.24±0.003 <sup>b</sup>	0.03±0.002 <sup>d</sup>	0.01±0.002 <sup>d</sup>	0.02±0.004 <sup>d</sup>
$Q_X$ (g/L/h)	0.11±0.02	0.15±0.001	0.21±0.04	0.04±0.001	0.08±0.004	0.07±0.03
$\mu_S$ (h <sup>-1</sup> )	0.01±0.00	0.02±0.001	0.02±0.001	0.01±0.003	0.01±0.001	0.01±0.002
$\mu_P$ (h <sup>-1</sup> )	0.24±0.01	0.31±0.01	0.25±0.01	0.06±0.001	0.05±0.004	0.08±0.01
$\mu_X$ (h <sup>-1</sup> )	0.10±0.02	0.11±0.00	0.17±0.09	0.07±0.001	0.09±0.004	0.09±0.001
$t_a$ (h)	7.23±1.27	6.06±0.01	5.74±3.14	10.26±0.09	8.01±0.40	7.81±0.06
ŞKO (%)	26.38±1.50	24.06±3.08	21.40±1.71	10.09±0.54	28.93±2.23	30.97±4.08
% teorik verim	31.16±0.01	50.02±0.11	64.86±0.30	14.59±0.05	9.18±0.04	3.48±0.11

Aynı satırdaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark vardır ( $P<0.05$ ).



üretimi üzerine gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise *S.cerevisia* ve *P.pastoris* ile birlikte gerçekleştirilen fermentasyonda etanol verimini 0.42 g/g olarak belirlemişlerdir. Teorik verimi ise %82.6 olarak hesaplamışlardır (Zhang vd 2017).

#### 4.6. Detoksifiye Edilmemiş/edilmiş Hidrolizatların İçerik Analizleri

Fermentasyonda suş gelişimleri ve etanol üretimleri için önemli olan hidrolizatların şeker profili ve inhibitör bileşik kompozisyonları belirlenmiştir. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatlara ait içerik analizi sonuçları Çizelge 4.34'de belirtilmiştir. Detoksifikasyon işlemi sonrası hidrolizatların toplam FŞK'da önemli kayıplar yaşanmamıştır. Detoksifikasyon işlemiyle hidrolizatlardaki HMF ve furfural gibi furan türevleri, bazı organik asitler ve fenolik bileşiklerin yoğunluğu azaltılmıştır. Detoksifiye edilmemiş AK hidrolizatının FMK 1.12 g/L iken detoksifikasyon işleminden sonra bu rakam 0.46 g/L'ye düşürülmüştür. Detoksifikasyon işleminden önce FMK 1.20 g/L olan BK hidrolizatının detoksifikasyon sonunda FMK 0.62 g/L olarak belirlenmiştir. ÇK hidrolizatında 0.83 g/L olarak belirlenen FMK detoksifikasyon sonunda 0.23 g/L'ye indirilmiştir. Detoksifiye edilmemiş YK hidrolizatının FMK 1.63 g/L iken detoksifikasyon işleminden sonra bu değer 0.70 g/L'ye düşürülmüştür. Detoksifikasyon işleminden önce en yüksek asetik asit konsantrasyonu AK hidrolizatlarında 1.75 g/L olarak tespit edilmiş ve detoksifikasyonla bu değer 0.83 g/L'ye indirilmiştir. En düşük miktarda ise 0.56 g/L olarak ÇK hidrolizatında belirlenmiş ancak sadece 0.30 g/L seviyesine indirilebimiştir. 1.12 g/L asetik asit belirlenen BK hidrolizatına uygulanan detoksifikasyon işlemiyle bu değer 0.41 g/L olarak tespit edilmiştir. Detoksifiye edilmemiş YK hidrolizatında 0.62 g/L olarak belirlenen HMF içeriği de detoksifikasyondan sonra HPLC sisteminde belirlenemeyecek kadar azaltılmıştır. Detoksifiye edilmemiş AK, BK ve YK hidrolizatlarında sırasıyla 0.06, 0.13 ve 0.03 g/L olarak belirlenen furfural detoksifikasyon işlemlerinden sonra HPLC sisteminde belirlenemeyecek seviyeye indirilmiştir. Formik asit ise sadece ÇK hidrolizatında 0.27 g/L olarak tespit edilmiş ve yine detoksifikasyonla 0.17 g/L seviyesine düşürülmüştür. Toplam inhibitör bileşikler olarak değerlendirildiğinde YK hidrolizatları en yüksek ÇK hidrolizatları ise en düşük miktarda inhibitör bileşiğe sahip olmaktadır. Detoksifikasyon işlemlerinden sonra toplam inhibitör bileşik konsantrasyonlarında AK hidrolizatında %57, BK hidrolizatında %59, ÇK hidrolizatında %71 ve YK hidrolizatında ise %34 azalma tespit edilmiştir.

Çalışmaya benzer şekilde Zhu vd (2011) *P. stipitis* ile etanol üretimini geliştirmek için trialkilamin ekstraksiyonu ile mısır koçanının detoksifikasyonunu çalışmışlardır. Mısır koçanının ön işlemini oda sıcaklığında 1:15 K:S'da ve %2'lik seyreltik sülfürik asit çözeltisi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Detoksifikasyon işleminin sonucunda ise furfuralın %100'ü, HMF'nin %45.7'si ve asetik asidin %73.3'ü uzaklaştırmış ve glukoz ve ksiloz içeriği sırasıyla 7.8 g/L ve 52.8 g/L olarak belirlemişlerdir. 48 saatlik fermentasyonun sonunda 21.8 g/L etanol konsantrasyonu belirlerken şeker kullanım oranı da %93 olarak hesaplamışlardır.

Çizelge 4.33. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatların içerik analizleri

Analizler(g/L)	Detoksifiye edilmemiş hidrolizat				Detoksifiye edilmiş hidrolizat				% Değişim			
	AK	BK	ÇK	YK	AK	BK	ÇK	YK	AK	BK	ÇK	YK
Toplam FŞK	66.66±0.01	60.88±0.01	74.07±3.0	49.38±2.71	60.53±0.70	59.06±0.51	77.45±1.02	47.63±0.77	-8	-3	+4	-2
Maltoz	1.80	1.16	7.65	0.62	1.99	6.28	4.91	0.78	+10	+82	-35	+21
Glukoz	49.03	20.90	31.17	8.70	39.93	31.67	32.36	11.33	-18	+34	+3	+23
Ksiloz	20.41	18.69	8.05	23.59	16.50	12.76	12.23	24.03	-15	-32	+33	0
Arabinoz	3.07	8.23	6.01	9.49	2.59	6.38	4.81	2.10	-16	-22	-17	-78
Mannoz	Nd	1.90	8.24	nd	nd	8.45	3.50	nd		+78	-58	
Galaktoz	2.09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-100			
FMK	1.12±0.06	1.20±0.01	0.83±0.01	1.63±0.04	0.46±0.005	0.62±0.012	0.23±0.005	0.70±0.008	-59	-48	-72	-57
HMF	0.61±0.08	0.89±0.05	0.95±0.12	0.62±0.03	0.23±0.02	0.33±0.0	0.04±0.00	nd	-62	-63	-96	-100
Furfural	0.06±0.02	0.13±0.03	nd	0.026±0.09	nd	nd	nd	nd	-100	-100		-100
Asetik asit	1.75±0.02	1.12±0.06	0.56±0.05	2.80±0.00	0.83±0.01	0.41±0.04	0.30±0.00	2.63±0.04	-53	-63	-46	-6
Formik asit	Nd	nd	0.27±0.03	nd	nd	nd	0.17±0.01	nd			-37	

nd: Belirlenemedi



Benzer bir çalışmada etanol üretimi için AK'ye farklı ön işlem denemeleri yapmışlardır. Buharla ön işlem metodunda optimizasyon için hidroliz parametrelerini sıcaklık (190-215°C), seyreltik asit (% 0 ve 0.5 v/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve hidroliz süresi (5-15 dk) olarak belirlemişlerdir. Maksimum glukoz verimini, teorik olarak %88, %0.5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200°C sıcaklık ve hidroliz süresinin 10 dk olduğu hidroliz noktasında hesaplamışlardır. Bu koşullarda AK'nin şeker profilini 29 g/L glukoz, 15 g/L ksiloz ve 4 g/L arabinoz ve inhibitör kompozisyonunu ise 0.5 g/L HMF, 1.5 furfural ve 2.8 g/L asetik asit olarak belirlemişlerdir. Buharla ön işlem sonrası elde edilen hidrolizatla yapılan fermentasyon sonunda 7 g/L etanol elde ederlerken eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon yöntemiyle ise 14 g/L etanol elde etmişlerdir (Palmarola vd 2005).

Gerçekleştirilen tüm fermentasyonlar sonucunda aktif kömür uygulamasının etanol verimlerini arttırması istatistiksel olarak önem seviyesinde tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). AK hidrolizatlarıyla gerçekleşen fermentasyonlar sonucunda etanol verimi yaklaşık olarak 3 kat arttırılmıştır. BK hidrolizatlarındaki verim ise yapılan detoksifiyasyon uygulamasıyla yaklaşık 5 katına çıkarılmıştır. Benzer şekilde YK hidrolizatları kullanılarak gerçekleşen fermentasyon sonunda verim %15'den %39'a arttırılmıştır. En az artış ÇK hidrolizatları kullanılarak gerçekleşen fermentasyonlarda gerçekleşmiş ancak yine %5 artış sağlanmıştır. Suş gelişimini, ürün oluşumunu ve şeker tüketimini doğrudan etkileyen inhibitör bileşiklerin aktif kömür detoksifikasyon uygulamasıyla lignoselülozik materyllerdeki konsantrasyonları azaltılmış ve etanol verimleri arttırılmıştır.

## 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında AK, BK, ÇK ve YK'nin seyreltik sülfürik asit ile hidroliz koşullarının maksimum ve minimum noktaları OFAT metodu ile belirlenmiş ve daha sonra RSM ile materyallerin optimum hidroliz koşulları tespit edilmiştir. Elde edilen hidrolizatlara aktif kömür ile detoksifiye işlemi uygulanmıştır. Ayrıca detoksifikasyon koşulları da RSM ile optimize edilmiştir. Detoksifiye edilmemiş/edilmiş hidrolizatlar kullanılarak kesikli fermentasyon yöntemiyle erlenmayerde etanol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Son olarak da hidrolizatların inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir.

Öncelikle materyallerin hidroliz parametreleri OFAT ve RSM metotları yardımıyla optimize edilmiştir. Hidroliz denemeleri sonucunda AK'nin optimum hidroliz koşulları sıcaklık 130°C, K:S 1:8, AO 1.86 ve hidroliz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 76.28 g/L FŞK elde edilmiştir. AK hidrolizatları için optimum detoksifikasyon noktası ise D<sub>1</sub> olarak belirlenmiştir. Fermentasyon sonunda ise *P. stipitis* ATCC 58784 kullanılarak % 42.65 etanol verimi ile 7.68 g/L etanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Detoksifikasyon işlemleri sonunda AK hidrolizatındaki FMK'nın % 59, HMF'nin ise % 62 D<sub>1</sub> yöntemi ile uzaklaştırılmış ve etanol verimi %26 artırılmıştır. BK hidroliz denemeleri sonucunda optimum hidroliz koşulları sıcaklık 121°C, K:S 1:8, AO 2.66 ve hidroliz süresi 30 dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 72.73 g/L FŞK elde edilmiştir. BK hidrolizatları için optimum detoksifikasyon noktası ise D<sub>2</sub> olarak belirlenmiştir. Detoksifiye edilmemiş BK hidrolizatlarıyla yapılan ve *P. stipitis* ATCC 58784 suşu kullanılan fermentasyon sonunda % 7.34 olan etanol verimi D<sub>2</sub> yöntemiyle %33.47 olarak elde edilmiştir. Aynı şekilde *P. stipitis* ATCC 58785 suşu kullanılan fermentasyonlarda ise % 8.21 olan etanol verimi D<sub>2</sub> yöntemi ile % 28.70'e çıkartılmıştır. Detoksifikasyon işlemleri sonunda BK hidrolizatındaki FMK'nın % 48'ü, HMF'nin ve asetik asitin % 63'ü ve furfuralın %100'ü D<sub>2</sub> yöntemi ile uzaklaştırılmıştır. ÇK'nin optimum hidroliz koşulları 130 °C sıcaklık, 1:8 K:S, 1.58 AO ve 16 dk hidroliz süresi belirlenmiştir. Bu koşullarda 89.42 g/L FŞK elde edilmiştir. ÇK hidrolizatları için optimum detoksifikasyon noktası D<sub>1</sub> olarak belirlenmiştir. Detoksifiye edilmemiş ÇK hidrolizatlarıyla yapılan ve *P. stipitis* ATCC 58784 suşu kullanılan fermentasyon sonunda % 33.69 olan etanol verimi D<sub>1</sub> yöntemi % 38.14 ve *P. stipitis* ATCC 58785 suşu kullanılan fermentasyonda ise % 24.79 olan etanol verimi % 36.66 olarak elde edilmiştir. Detoksifikasyon işlemleri sonunda ÇK hidrolizatındaki FMK'nın % 72'si, HMF'nin ise % 96'sı ve asetik asitin %46'sı D<sub>1</sub> yöntemi ile uzaklaştırılmıştır. Ayrıca materyaller arasından sadece ÇK'de bulunan formik asit ise % 37 oranında azaltılmıştır. YK hidroliz denemeleri sonucunda ise optimum hidroliz koşulları sıcaklık 130°C, K:S 1:8, AO 1.0 ve hidroliz süresi 19 dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 60.16 g/L FŞK elde edilmiştir. Detoksifiye edilmemiş YK hidrolizatlarıyla yapılan ve *P. stipitis* ATCC 58784 suşu kullanılan fermentasyon sonunda % 15.92 olan etanol verimi D<sub>1</sub> yöntemi ile % 39.30 olarak elde edilmiştir. *P. stipitis* ATCC 58785 suşu kullanılan fermentasyonlarda ise sadece 0.68 g/L etanol üretilebilmiştir. Detoksifikasyon işlemleri sonunda YK hidrolizatındaki FMK'nın % 57'si, HMF ve furfuralın ise % 100'ü D<sub>1</sub> yöntemi ile uzaklaştırılmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatlarının optimum hidroliz koşulları belirlenmiştir. Hidrolizatların aktif kömür ile detoksifiye edilmesi etanol

fermentasyon verimlerini arttırmıştır. Bununla beraber elde edilen sonuçlar, AK, BK, ÇK ve YK'nin biyoteknolojik proseslerde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Yine sonuçların endüstriye aktarılabilir özellikte ve ölçek büyütme çalışmalarında kullanılabilir ve gelecek çalışmalara da temel oluşturabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir. Tüm bunların yanı sıra *P. stipitis* mayası kullanılarak kesikli fermentasyon yöntemiyle erlenmayerde yapılan çalışmanın reaktörde tekrarlanan-kesikli fermentasyon yöntemiyle de yapılabilirliği öngörülmektedir.

**6. KAYNAKLAR**

- ACAROĞLU, M., 2008. Türkiye’de biyokütle, biyoetanol ve biyomotorin kaynakları ve biyoyakıt enerjisinin geleceği, VII, Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, Aralık, İstanbul. Bildiriler Kitabı, ss. 351-362.
- ADIGÜZEL, A. 2012. Kimyasal Ön-işlemlerden Geçirilmiş Lignoselülozik Atıkların *streptomyces sp. aoa40* Enzimleriyle Şeker Şurubuna Dönüştürülmesi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 158 s.
- ADIGÜZEL, A.O. 2013. Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi İçin Gerekli Hammade Kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2: (2).
- ANONİM, 2011. TTTG (Türkiye Teknolojileri Geliştirme Vakfı), İleri Teknolojiler Projeleri Destek Programı, Ankara.
- ANONİM 2012. Dünya Enerji Konseyi Türk Milli Komitesi (DEK-TMK), “Enerji Raporu 2012”, <http://www.dektmk.org.tr/upresimler/enerjirapor2012.pdf>. [Son erişim tarihi: 16.06.2016]
- ANONİM 2014. DELOITTE. Biyokütlenin altın çağı. <http://www.denetimnet.net/UserFiles/Documents/Biyok%C3%BCtlenin%20alt%C4%B1n%20%C3%A7a%C4%9F%C4%B1Sonn.pdf>. [Son erişim tarihi: 16.06.16]
- ANONİM 2015a. <http://faostat3.fao.org/home/E>. [Son erişim tarihi: 08.11.15]
- ANONİM 2015b. <https://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%87avdar>. [Son erişim tarihi: 08.11.2015]
- ANONİM 2015c. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Yulaf>. [Son erişim tarihi: 08.11.2015]
- ANONİM 2016a. <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>. [Son erişim tarihi: 06.07.2016]
- ANONİM 2016b. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/05/20050518-1.htm>. [Son erişim tarihi: 15.06.2016]
- ANONİM 2016c. <https://books.google.com.tr/books?id=KtqQ1E1tTAC&pg=PA50&lpg=PA50&dq=%C3%A7C4%B1plak+arpa&source=bl&ots=8qEaPlgSqY&sig=UgoHB4QvPUM-3EKgUPI141OMH DU&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwiE3Pzsp6DNAhXGthQKH RjdADEQ6AEIQjAH#v=snippet&q=arpa&f=false>. [Son erişim tarihi: 12.02.16]
- ANONİM 2016d. [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pichia\\_stipitis](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pichia_stipitis). [Son erişim tarihi: 22.06.2016]

- BALAT, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52 (2): 858-875.
- BARAL, N.R. and SHAH, A. 2014. Microbial inhibitors: formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (22): 9151-9172.
- BARISIK, G. , ISCI, A. , KUTLU, N. , BAGDER ELMACI, S. and AKAY, B. 2016. Optimization of organic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnol. Prog.*, 32 (6): 1487-1493.
- BENGISU, G. 2014. Alternatif Yakıt Kaynağı Olarak Biyoetanol/Bioethanol as an Alternative Fuel Source. *Alinteri Zirai Bilimler Dergisi*, 27 (2): 43-52.
- BLEDZKI, A.K. , MAMUN, A.A. and VOLK, J. 2010. Physical, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites. *Composites Part a-Applied Science and Manufacturing*, 41 (4): 480-488.
- BRETHAUER, S. and STUDER, M.H., 2015. Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals - A Review, *Chimia (Aarau)*, 2015/11/26 ed, 572-581.
- CARVALHEIRO, F. , DUARTE, L.C. , LOPES, S. , PARAJÓ, J.C. , PEREIRA, H. and GÍRIO, F.M. 2005. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Process Biochemistry*, 40 (3-4): 1215-1223.
- CHANDEL, A. , ES, C. , RUDRAVARAM, R. , NARASU, L. , RAO, L. and RAVINDRA, P. 2007a. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2 (1): 014-032.
- CHANDEL, A. , KAPOOR, R. , SINGH, A. and KUHAD, R. 2007b. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.*, 98 (10): 1947-1950.
- CHAUD, L. , SILVA, D. , MATTOS, R. and FELIPE, M. 2012. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipitis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55: 771-777.
- CHEN, H. and FU, X. 2016. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57: 468-478.
- ÇÖPÜR, Y. , TOZLUOĞLU, A. ve ÖZYÜREK, Ö. 2011. Selülozik Biyoetanol Üretim Teknolojisi. *Ormanlık Dergisi* ss. 10-37.

- ERTAŞ, M. , FIDAN, M. ve ALMA, M., 2007. Alternatif Enerji Kaynağı Biyoetanolün Üretimi ve Önemi (yayınlanmamış)
- ERTUGAY, Z. and ELGÜN, A. 1992. Tahıl işleme teknolojisi. Atatürk Üniveristesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 375 p.
- ETKB, 2013. “Mavi Kitap 2013”, Enerji Tabii ve Kaynaklar Bakanlığı ile Bağlı ve İlgili Kuruluşlarının Amaç ve Faaliyetleri, Ankara.
- ETKB, 2015. “Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı 2015-2019 Stratejik Planı”.
- EVCAN, E. 2012. Bioethanol production from fungal sources using low-cost agro-industrial waste products, İzmir Institute of Technology, İzmir, 86 s.
- FALCK, P. , ARONSSON, A. , GREY, C. , STÅLBRAND, H. , NORDBERG KARLSSON, E. and ADLERCREUTZ, P. 2014. Production of arabinoxylan-oligosaccharide mixtures of varying composition from rye bran by a combination of process conditions and type of xylanase. *Bioresource Technology*, 174: 118-125.
- FAVARO, L. , BASAGLIA, M. , VAN ZYL, W.H. and CASELLA, S. 2013. Using an efficient fermenting yeast enhances ethanol production from unfiltered wheat bran hydrolysates. *Applied Energy*, 102: 170-178.
- FONSECA, B. , PUENTES, J. , MATEO, S. , SÁNCHEZ, S. , MOYA, A. and ROBERTO, I. 2013. Detoxification of Rice Straw and Olive Tree Pruning Hemicellulosic Hydrolysates Employing *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effect on the Ethanol Production by *Pichia stipitis*. *J. Agric. Food Chem.*, 61 (40): 9658–9665.
- GERMEC, M. , KARTAL, F.K. , BILGIC, M. , ILGIN, M. , ILHAN, E. , GULDALI, H. , ISCI, A. and TURHAN, I. 2016. Ethanol production from rice hull using *Pichia stipitis* and optimization of acid pre-treatment and detoxification processes. *Biotechnol. Prog.*, 32: (4).
- GOMEZ-TOVAR, F. , CELLS, L.B. , RAZO-FLORES, E. and ALATRISTE-MONDRAGON, F. 2012. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresource Technology*, 116: 372-378.
- GOPINATH, V. , MEISWINKEL, T.M. , WENDISCH, V.F. and NAMPOOTHIRI, K.M. 2011. Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92 (5): 985-996.
- GUPTA, A. and VERMA, J.P. 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41: 550-567.
- GUPTA, R. , SHARMA, K.K. and KUHAD, R.C. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of

- cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100 (3): 1214-1220.
- HAGHIGHI , S. , HOSSEIN GOLFESHAN, A. , TABATABAEI, M. , SALEHI JOUZANI, G. , 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.
- IBRAHEEM, O. and NDIRIMBA, B.K. 2013. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. *Int. J. Biol. Sci.*, 9 (6): 598-612.
- IRMAK, S. , KURTULUŞ, M. , HASANOĞLU, A. and ERBATUR, O. 2013. Gasification efficiencies of cellulose, hemicellulose and lignin fractions of biomass in aqueous media by using Pt on activated carbon catalyst. *Biomass and Bioenergy*, 49: 102-108.
- ISCI, A. , HIMMELSBACH, J.N. , POMETTO, A.L., 3RD , RAMAN, D.R. and ANEX, R.P. 2008. Aqueous ammonia soaking of switchgrass followed by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 144 (1): 69-77.
- JEFFRIES, T.W. and VAN VLEET, J.R. 2009. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.*, 9 (6): 793-807.
- JÖNSSON, L. , ALRIKSSON, B. and NILVEBRANT, N.-O. 2015. Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification. *New Biotechnologies for Increased Energy Security*. Apple Academic Press, 41-64 p.
- KAPLAN, M. , AYDIN, S. ve FIDAN, S. 2009. Geleceğin Alternatif Enerji Kaynağı Biyoetanolün Önemi ve Sorgum Bitkisi. *KSÜ Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 12 (1).
- KAPLUHAN, E. 2014. Enerji coğrafyası açısından bir inceleme: biyokütle enerjisinin dünyadaki ve Türkiye'deki kullanım durumu. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 30: 97-125.
- KAR, Y. and TEKELI, Y. 2008. The Potential of Biomass Residues in Turkey and Their Importance as Energy Resources. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 30 (6): 483-493.
- KARADUMAN, Y. 1999. Kavuzsuz Arpa Potansiyeli. *Unlu Mamuller Teknolojisi*, 74: 21-26.
- KIM, T.H. , TAYLOR, F. and HICKS, K.B. 2008. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 99 (13): 5694-5702.

- KOÇTÜRK, D. 2011. Farklı Özelliklerdeki Etanol-benzin Karışımı Yakıtların Buji ile Ateşlemeli Motorlarda Kullanılmasının Çevresel ve Ekonomik Yönden Değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 184 s.
- KÖTEN, M. , ÜNSAL, S. and ATLI, A. 2013. Evaluation of Barley as Human Food. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 1: (2).
- KURTULUŞ, M. 2010. Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 91 s.
- LEE, J.W. , ZHU, J.Y. , SCORDIA, D. and JEFFRIES, T.W. 2011. Evaluation of ethanol production from corncob using *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 6054 by volumetric scale-up. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 165 (3-4): 814-822.
- LI, S. , XU, S. , LIU, S. , YANG, C. and LU, Q. 2004. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. *Fuel Processing Technology*, 85 (8–10): 1201-1211.
- LIU, Z.L. , SLININGER, P.J. and GORSICH, S.W. 2005. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 121-124: 451-460.
- MARTIN, C. , ALRIKSSON, B. , SJODE, A. , NILVEBRANT, N.O. and JONSSON, L.J. 2007. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 137-140 (1-12): 339-352.
- MELIKOĞLU, M. and ALBOSTAN, A. 2011. Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26: (1).
- MELO, D.D. , NETO, V.D.S. , BARROS, F.C.D. , RAULINO, G.S.C. , VIDAL, C.B. and DO NASCIMENTO, R.F. 2016. Chemical modifications of lignocellulosic materials and their application for removal of cations and anions from aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 133 (15): 22.
- MERINO-PÉREZ, O. , MARTÍNEZ-PALOU, R. , LABIDI, J. and LUQUE, R. 2015. Microwave-Assisted Pretreatment of Lignocellulosic Biomass to Produce Biofuels and Value-Added Products. in: Z. Fang, J.L.R. Smithve X. Qi (Eds.), *Production of Biofuels and Chemicals with Microwave*. Springer Netherlands, Dordrecht, 197-224 p.
- MICHAEL, S. and FIKRET, K. 2002. *Bioprocess engineering: basic concepts*. Pearson Education Ltd., Harlow, England, 479 p.
- MILLER, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.



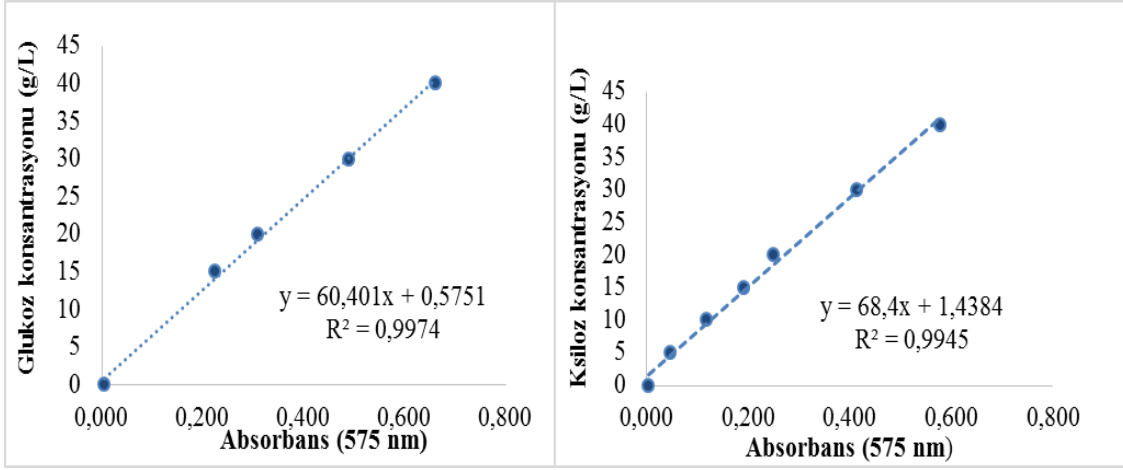
- MOHAGHEGHI, A. , EVANS, K. , CHOU, Y.C. and ZHANG, M. 2002. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98-100 885-898.
- MOON, H. , RE, H. and KIM, D. 2012. Bioethanol production from acid-pretreated rice hull. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 7(2): 206-211.
- MORENO, A.D. , IBARRA, D. , ALVIRA, P. , TOMAS-PEJO, E. and BALLESTEROS, M. 2015. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 35 (3): 342-354.
- MUSSATTO, S.I. and ROBERTO, I.C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour. Technol.*, 93 (1): 1-10.
- NIGAM, J.N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 87 (1): 17-27.
- OLIVEIRA, L.A. , PORTO, A.L.F. and TAMBOURGI, E.B. 2006. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 97 (6): 862-867.
- PALMAROLA, B. , GALBE, M. and ZACCHI, G. 2005. Pretreatment of barley husk for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80 (1): 85-91.
- REDMAN, M. and HEMMAMI, M., 2008. Agri-environment Handbook for Turkey, Avalon, IEEP, Buğday Association for Supporting Ecological Living and MARA, with financial support from The Netherlands Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality, under the BBI-MATRA Action Plan 2005-8.
- SABANCI, A. , ÖREN, M. , YAŞAR, B. , ÖZTÜRK, H. ve ATAL, M., 2013. Türkiye’de biyodizel ve biyoetanol üretiminin tarım sektörü açısından değerlendirilmesi, HASAD, ss 60-74.
- SARAÇOĞLU, N. 2006. Enerji Ormancılığının Kırsal Kalkınmaya Katkısı, Ormancılıkta Sosyo Ekonomik Sorunlar Kongresi, Ilgaz/Çankırı, 7-12 p.
- SARI, N. 2012. Yulafta (*avena sativa l.*) Verim ve Verim Komponentleri Arasındaki İlişkiler. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 76 s.
- SÁROSSY, Z. , TENKANEN, M. , PITKÄNEN, L. , BJERRE, A.-B. and PLACKETT, D. 2013. Extraction and chemical characterization of rye arabinoxylan and the effect of  $\beta$ -glucan on the mechanical and barrier properties of cast arabinoxylan films. *Food Hydrocolloids*, 30: 206-216.

- SIPPONEN, M.H. , PIHLAJANIEMI, V. , LITTUNEN, K. , PASTINEN, O. and LAAKSO, S. 2014. Determination of surface-accessible acidic hydroxyls and surface area of lignin by cationic dye adsorption. *Bioresour. Technol.*, 169: 80-87.
- SLUITER, A. , HAMES, B. , HYMAN, D. , PAYNE, C. , RUIZ, R. , SCARLATA, C. , SLUITER, J. , TEMPLETON, D. and WOLFE, J., 2008. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples laboratory analytical procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colo.
- STOUTENBURG, R. 2013. The effects and mitigation of lignocellulosic hydrolysate inhibitors for ethanol production by *scheffersomyces (pichia) stipitis*, Master Thesis, State University, New York. 189 p.
- SUN, Y. and CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 83 (1): 1-11.
- ŞAHİN, T. , ARSLAN, B. ve CENGİZ, M. 2007. Lignoselülozik maddelerin asit hidrolizi, IV.Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, Bildiriler Kitabı, TMMOB Elektrik Mühendisleri Odası Gaziantep şubesi, Gaziantep.ss 50-53.
- TAMANINI, C. , OLIVEIRA, A. , FELIPE, M. , CANETTIERI, E. , CÂNDIDO, E. and HAULY, M. 2004. Evaluation of oat hull for biotechnological production of xylitol. *Acta Scientiarum. Technology*, 26 (2): pp. 117-125.
- TURHAN, O. , ISCI, A. , MERT, B. , SAKIYAN, O. and DONMEZ, S. 2015. Optimization of ethanol production from microfluidized wheat straw by response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol*, 45 (8): 785-795.
- USAL, G. 2014. Buğday Tarlası Atıklarından Alkali Hidroliz ile Fenolik Maddelerin Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Gaziosman Paşa Üniversitesi, Tokat, 85 s.
- WEBSTER, J. and WEBER, R. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge University Press, New York, 841 p.
- WOOD, I.P. , COOK, N.M. , WILSON, D.R. , RYDEN, P. , ROBERTSON, J.A. and WALDRON, K.W. 2016. Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. *Food Chemistry*, 198: 125-131.
- YADAV, M.P. and HICKS, K.B. 2015. Isolation of barley hulls and straw constituents and study of emulsifying properties of their arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, 132: 529-536.
- YAĞDI, K. 2004. Bursa koşullarında geliştirilen ekmeçlik buğday (*Triticum aestivum* L.) hatlarının bazı kalite özelliklerinin araştırılması. *Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg.*, 18 (1): 11-23.

- YİĞİTOĞU, M. , İNAL, M. ve GÖKGÖZ, M. 2012. Alternatif Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyotanol. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1 (1): 11.
- ZHA, Y. , BAS, M. , LEON, C. and PETER, P. 2012. Inhibitory Compounds in Lignocellulosic Biomass Hydrolysates during Hydrolysate Fermentation Processes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 2 (1).
- ZHANG, Y. , WANG, C. , WANG, L. , YANG, R. , HOU, P. and LIU, J. 2017. Direct bioethanol production from wheat straw using xylose/glucose co-fermentation by co-culture of two recombinant yeasts. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 44 (3): 453-464.
- ZHU, J. , YONG, Q. , XU, Y. and YU, S. 2011. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresour. Technol.*, 102 (2): 1663-1668.

## 7. EKLER

**EK-1:** DNSA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen şeker analizlerinin spektrofotometreden alınmış değerlerle oluşturulan standart şeker çözeltilerine ait eğri ve değerleri (a), şeker konsantrasyonunun belirlendiği formül (b)



a. DNSA metodu ile şeker analiz için değerlendirme kurveleri

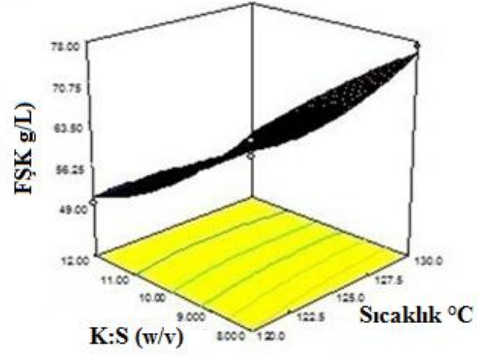
DNSA Kalibrasyon Kurvesi Verileri	
Glukoz konsantrasyonu (g/L)	ABS (575 nm)
40	0,661
30	0,490
20	0,310
15	0,225
Ksiloz konsantrasyonu (g/L)	ABS (575 nm)
40	0,579
30	0,414
20	0,251
15	0,193
10	0,119
5	0,048
0	0,005

b. Şeker konsantrasyonu = Hidrolize örneğin ABS(575 nm)\*kalibrasyon kurvesinin eğimi

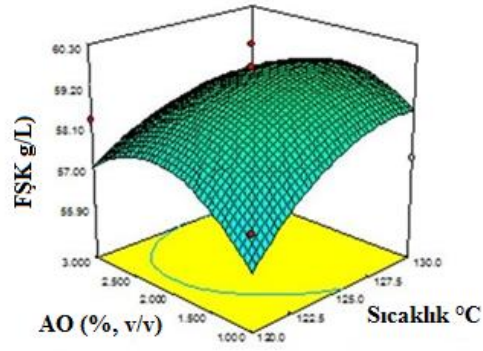
**EK-2:** Materyallerin hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri

**EK-2a:** AK seyreltik asit hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri

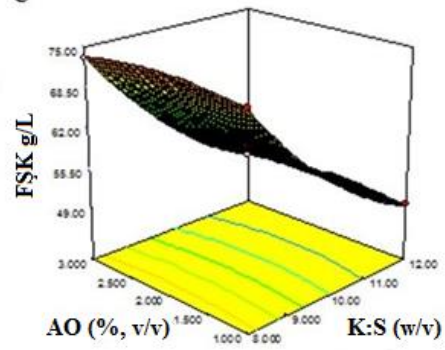
**A**



**B**

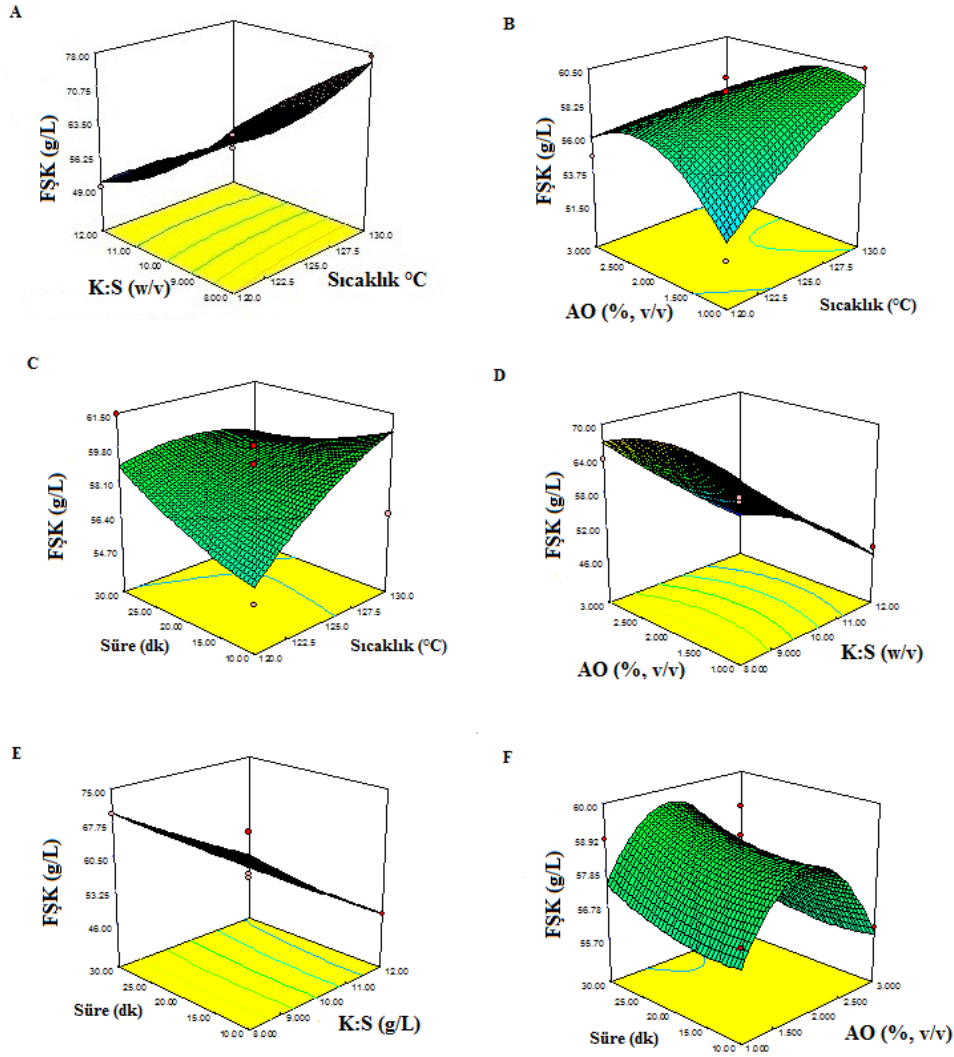


**C**



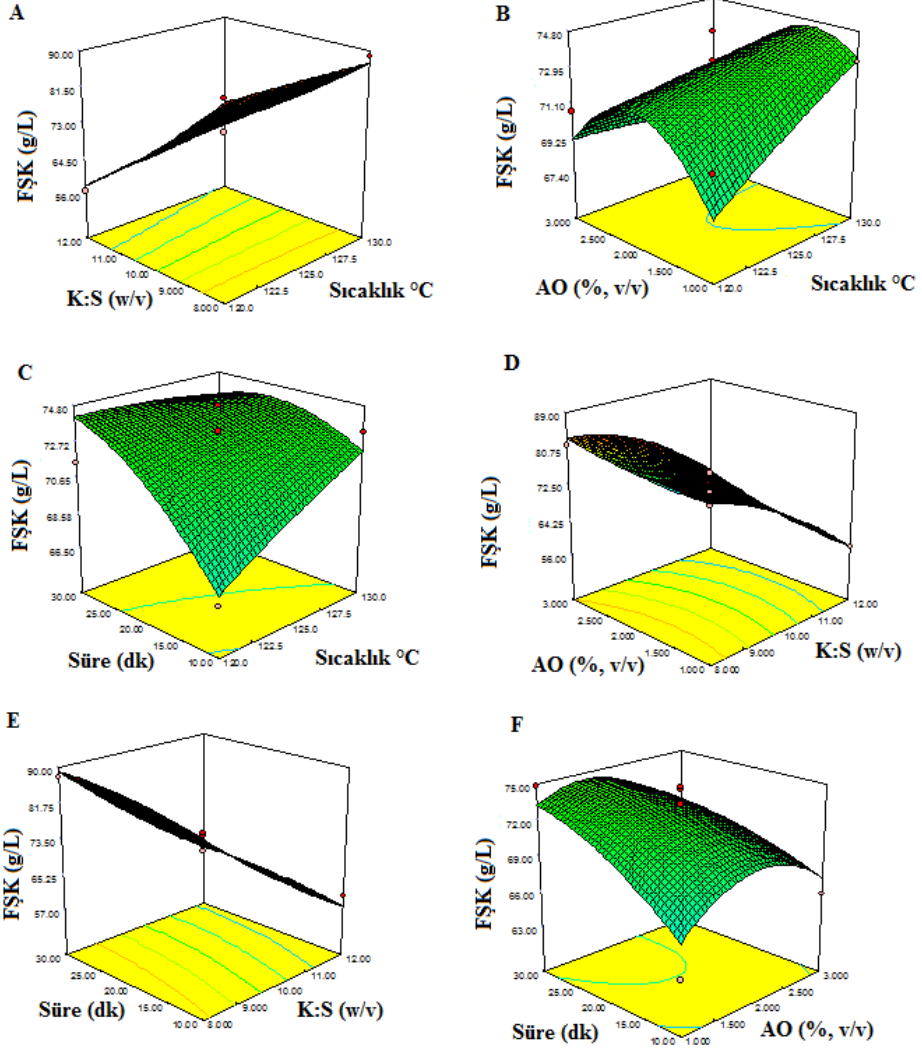
**A:** FŞK üzerine K:S ve sıcaklığın etkisi, **B:** FŞK üzerine AO ve sıcaklığın etkisi, **C:** FŞK üzerine K:S ve AO'nun etkisi

**EK-2b: BK seyreltik asit hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri**



**A:** FŞK üzerine K:S ve sıcaklığın etkisi, **B:** FŞK üzerine AO ve sıcaklığın etkisi, **C:** FŞK üzerine sıcaklığın ve sürenin etkisi, **D:** FŞK üzerine K:S ve AO'nun etkisi, **E:** FŞK üzerine süre ve K:S'nin etkisi, **F:** FŞK üzerine süre ve AO'nun etkisi

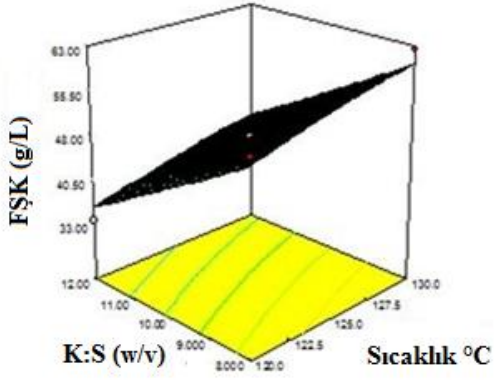
**EK-2c: ÇK seyreltik asit hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri**



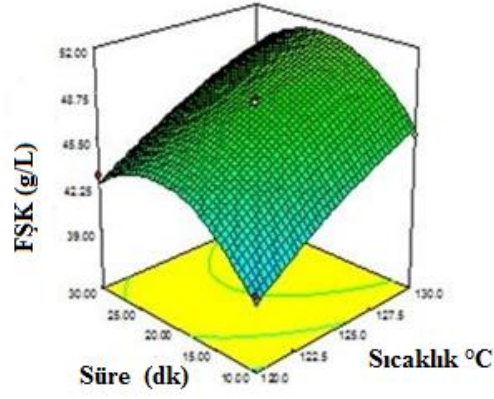
**A:** FŞK üzerine K:S ve sıcaklığın etkisi, **B:** FŞK üzerine AO ve sıcaklığın etkisi, **C:** FŞK üzerine sıcaklığın ve sürenin etkisi, **D:** FŞK üzerine K:S ve AO'nun etkisi, **E:** FŞK üzerine süre ve K:S'nin etkisi, **F:** FŞK üzerine süre ve AO'nun etkisi

**EK-2d:** YK seyreltik asit hidroliz optimizasyonuna ait kontur plot grafikleri

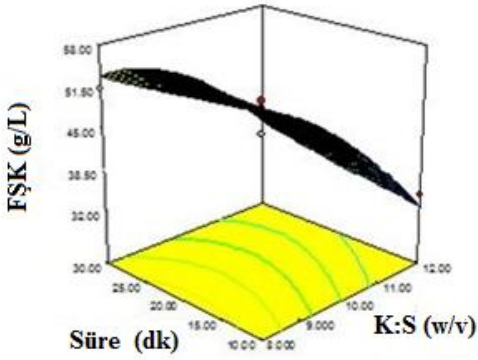
**A**



**B**



**C**



**A:** FŞK üzerine K:S ve sıcaklığın etkisi, **B:** FŞK üzerine sıcaklığın ve sürenin etkisi, **C:** FŞK üzerine K:S ve sürenin etkisi



**EK-3: Materyallerin fenolik madde parametrelerinin varyans sonuçları****EK-3a. AK fenolik madde parametresinin varyans sonuçları**

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	339992.90	195.39±15.87	0.0002**
Aktif kömür konsantrasyonu (A)	313675.60	-198.01±9.72	< 0.0001**
Süre (B)	359.12	6.70±9.72	0.52133
Sıcaklık (C)	256.63	-5.66±9.72	0.58541
AB	120.12	5.48±13.74	0.70662
AC	94.97	-4.87±13.74	0.73746
BC	1317.69	-18.15±13.74	0.24394
A <sup>2</sup>	20478.79	74.47±14.30	0.00345*
B <sup>2</sup>	138.80	6.13±14.30	0.68611
C <sup>2</sup>	5107.85	37.19±14.30	0.04828*
Kalan	3779.52		
Uyum eksikliği	3221.83		0.21296
Kuramsal hata	557.69		
Toplam	343772.40		

$R^2 = 0.9890$  \*\*P<0.01 ve \*P<0.05

**EK-3b. BK fenolik madde parametresinin varyans sonuçları**

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	117312.50	445.84±83.59	0.7478
Aktif kömür konsantrasyonu (A)	46894.53	-76.56±51.19	0.1950
Süre (B)	63266.58	-88.93±51.19	0.1429
Sıcaklık (C)	290.77	6.03±51.19	0.9108
AB	213.60	-7.34±72.39	0.9235
AC	316.31	8.89±72.39	0.9070
BC	148.35	-6.09±72.39	0.9362
A <sup>2</sup>	5362.14	38.11±75.34	0.6345
B <sup>2</sup>	63.87	-4.16±75.34	0.9581
C <sup>2</sup>	881.46	15.45±75.34	0.8456
Kalan	104806.40		
Uyum eksikliği	104790.10		0.00023
Kuramsal hata	16.30		
Toplam	222118.90		

$R^2 = 0.5282$  \*\*P<0.01 ve \*P<0.05

**EK-3c. ÇK fenolik madde parametresinin varyans sonuçları**

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	105204.60	306.65±2.00	< 0.0001**
Aktif kömür konsantrasyonu (A)	99721.31	-111.65±1.23	< 0.0001**
Süre (B)	1.833613	-0.48±1.23	0.7125
Sıcaklık (C)	0.04	-0.071±1.23	0.9560
AB	8.56	-1.46±1.74	0.4378
AC	166.80	6.46±1.74	0.0137*
BC	227.10	7.54±1.74	0.0074**
A <sup>2</sup>	3763.81	31.93±1.81	< 0.0001**
B <sup>2</sup>	215.80	-7.65±1.81	0.0082**
C <sup>2</sup>	1139.83	17.57±1.81	0.0001**
Kalan	60.24		
Uyum eksikliği	57.22		0.0741
Kuramsal hata	3.02		
Toplam	105264.80		

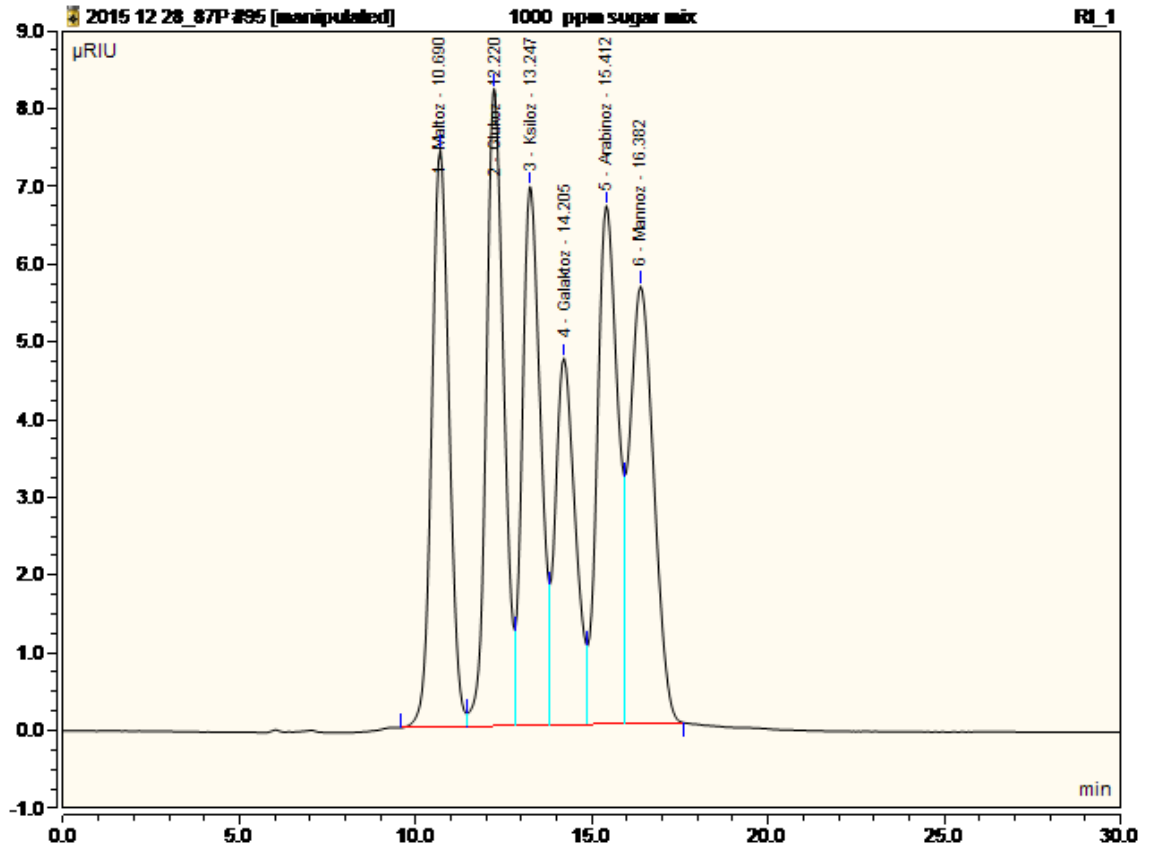
R<sup>2</sup> = 0.9994 \*\*P<0.01 ve \*P<0.05

**EK-3d. YK fenolik madde parametresinin varyans sonuçları**

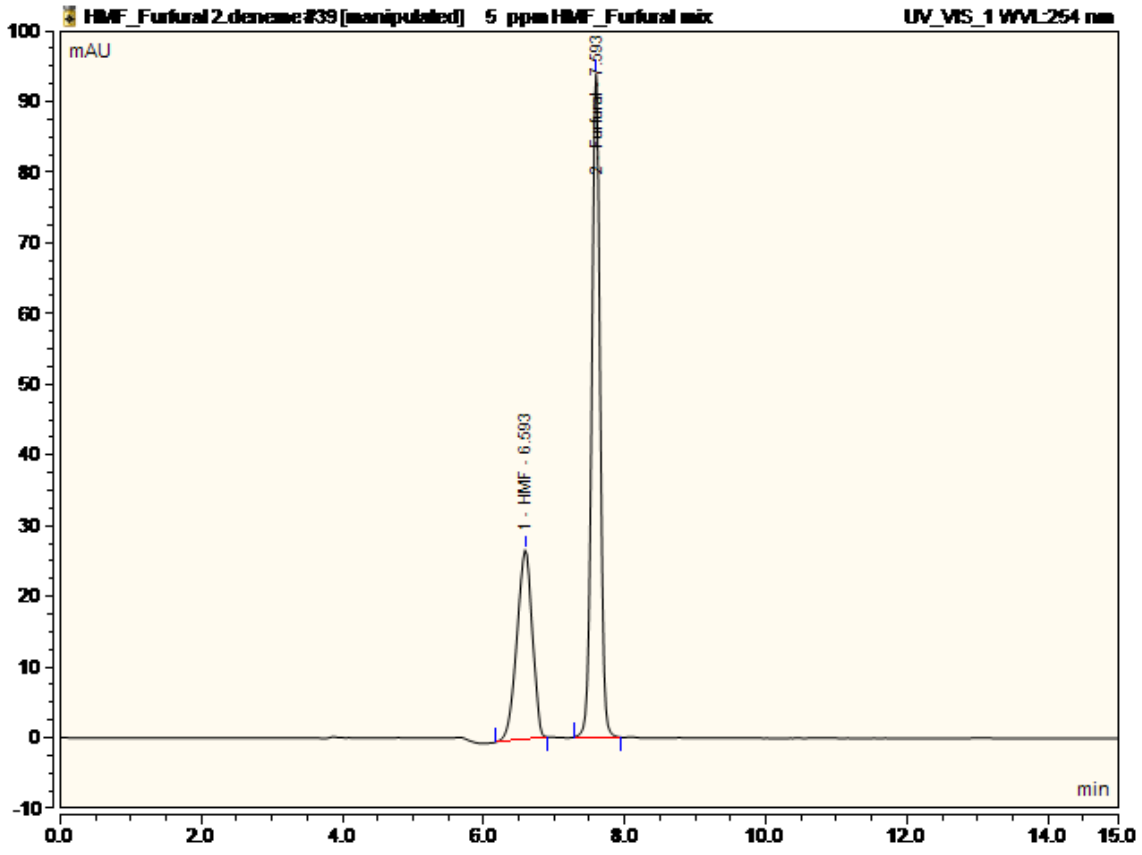
Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	P değerleri
Model	1017922.00	360.08±5.95	< 0.0001**
Aktif kömür konsantrasyonu (A)	980931.20	-350.17±3.64	< 0.0001**
Süre (B)	993.91	11.15±3.64	0.0281*
Sıcaklık (C)	30.42	-1.95±3.64	0.6153
AB	1635.80	-20.22±5.15	<0.0111*
AC	1817.32	-21.32±5.15	0.0090*
BC	72.76	-4.27±5.15	0.4453
A <sup>2</sup>	30602.61	91.04±5.36	< 0.0001**
B <sup>2</sup>	338.90	-9.58±5.36	0.1340
C <sup>2</sup>	297.28	-8.97±5.95	0.1550
Kalan	530.59		
Uyum eksikliği	132.92		0.8746
Kuramsal hata	397.67		
Toplam	1018453.00		

R<sup>2</sup> = 0.9994 \*\*P<0.01 ve \*P<0.05

**EK-4:** Farklı şeker standartları karışımlarına ait HPLC pik görüntüsü



EK-5: HMF ve Furfural standart karışımlarına ait HPLC pik görüntüsü



## ÖZGEÇMİŞ



1991 yılında Burdur'un Bucak ilçesinde doğmuştur. 2009 yılında Bucak Anadolu Lisesini bitirdikten sonra Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünü kazanmış ve 2014 yılında mezun olmuştur. Eylül 2014'de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.