YENİLENEBİLİR ENERJİ KAYNAĞI OLARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN KULLANILABİLECEK VERİMLİ MİKROORGANİZMALARIN BÖLGESEL EKOSİSTEMDE ARAŞTIRILMASI

Mehmet KARADAYI

Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE
2016
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

YENİLENEBİLİR ENERJİ KAYNAĞI OLARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN KULLANILABİLECEK VERİMLİ MİKROORGANİZMALARIN BÖLGESEL EKOSİSTEMDE ARAŞTIRILMASI

Mehmet KARADAYI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ ONAY FORMU

Yenilenebilir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol Üretimi İçin Kullanılabilecek Verimli Mikroorganizmaların Bölgesel Ekosistemde Araştırılması

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Mehmet KARADAYI tarafından hazırlanan bu çalışma, 23/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE	İmza	:
Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR	İmza	:
Üye : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL	İmza	:
Üye : Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ	İmza	:
Üye : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ	İmza	:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 27.10./2016 tarih ve ...61.../.....9..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK, TAGEM ve BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: TÜBİTAK - 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu
Proje No: TAGEM-13/AR-GE/17
Proje No: Atatürk Üniversitesi BAP 2012-168

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

YENİLENEBİLİR ENERJİ KAYNAĞI OLARAK BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN KULLANILABİLECEK VERİMLİ MİKROORGANİZMALARIN BÖLGESEL EKOSİSTEMDE ARAŞTIRILMASI

Mehmet KARADAYI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Bu çalışmada, Erzurum ve çevresindeki ormanlık alanlardan çürümekte olan lignoselülozik örnekler toplanmış ve aseptik koşullarda laboratuvar ortamına taşınmıştır. Bu örneklerden saf fungal izolatlar elde edilmiş ve bunların arasından aktif izolatlar MBMC besiyerinde etanol üretebilme ve tarım atıklı besiyerinde gelişebilme kriterlerine göre seçilmiştir. Aktif izolatların tanılanmasında klasik mikroskobik incelemeler ve moleküler teknikler kullanılmıştır. İzolatların moleküler identifikasyonu evrensel ITS primerlerinin kullanıldığı PCR uygulaması, amplikonların sekans analizleri ve NCBI veri tabanında BLAST analizi ile yapılmıştır. Daha sonra bu izolatların ön işlem görmüş ve görmemiş tarım atıklı besiyerlerinde etil alkol üretebilme potansiyelleri araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda lignoselülozik materyallerden etil alkol ve değerli yan ürünlerin üretiminde kullanılabilecek 33 aktif izolat belirlenmiş ve bunların *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Nectria*, *Neonectria*, *Penicillium*, *Sarea*, *Trichoderma* ve *Trichotecium* cinslerine ait oldukları belirlenmiştir.

2016, 143 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoetanol, Biyokütle, Lignoselüloz, Yenilenebilir Enerji.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF EFFICIENT MICROORGANISMS IN LOCAL ECOSYSTEMS FOR BIOETHANOL PRODUCTION AS RENEWABLE ENERGY SOURCE

Mehmet KARADAYI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

In the present study, decaying lignocellulosic materials were collected from Erzurum and near locations, and aseptically transferred to the laboratory. Pure fungal isolates were obtained and active ones were selected according to the criteria that include their ethanologenic potential in MBMC medium and growth potential in the medium composed with agricultural wastes. Conventional microscopic examinations and molecular techniques were used for identification of the active isolates. Molecular identification of the isolates was done by using PCR with universal ITS primers, sequencing of amplicons and the BLAST analysis of NCBI database. Then, ethanologenic potential of the isolates in the media with pretreated or non-pretreated agricultural wastes was determined.

According to the results, 33 active isolates, which may use in production of ethanol and valuable co-products from lignocellulosic materials, were determined and they grouped in *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Nectria*, *Neonectria*, *Penicillium*, *Sarea*, *Trichoderma* and *Trichotecium* genera.

2016, 143 pages

Keywords: Bioethanol, Biomass, Lignocellulose, Renewable Energy.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma TÜBİTAK (2211-C: Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı), TAGEM (TAGEM-13/AR-GE/17) ve Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı (Proje No: 2012/168) tarafından desteklenmiş olup, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Biyoloji Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını gördüğüm, Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a, Sayın Uzm. Biyolog Burak ALAYLAR'a, Sayın Uzm. Biyolog Abdussamed Yasin DEMİR'e, Sayın Uzm. Biyolog Taha Yasin KOÇ'a, Sayın Uzm. Biyolog Selin DOĞAN'a, Sayın Uzm. Biyolog Ceyda BOZOĞLU'na ve Sayın Uzm. Biyolog Selma SEZEN'e teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında destek ve teşviklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli annem Nevriye KARADAYI, babam Mahmut KARADAYI ve eşim Gökçe KARADAYI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Mehmet KARADAYI
Eylül, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 5
2.1. Etanol 5
2.1.1. Tarihçe 6
2.1.2. Etanolün fiziksel özellikleri 7
2.1.3. Etanolün kimyasal özellikleri 8
2.1.3.a. Ester oluşumu 9
2.1.3.b. Yanma 9
2.1.3.c. Dehidrasyon 9
2.1.3.d. Asit-baz kimyası 10
2.1.3.e. Halojenler ile tepkimeler 10
2.1.3.f. Oksidasyon 11
2.1.4. Etanolün üretim yöntemleri 11
2.1.4.a. Kimyasal yollarla etanol üretimi 12
2.1.4.b. Biyolojik yollarla etanol üretimi 12
2.2. Yenilenebilir Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol 16
2.2.1. Biyoyakıt olarak biyoetanol kullanımının tarihsel gelişimi 18
2.2.2. Biyoyakıt üretiminde kullanılan yenilenebilir biyokütle kaynakları ve bunların biyoenerji potansiyelleri 20
2.2.2.a Birinci nesil hammaddeler 20
2.2.2.b. İkinci nesil hammaddeler 25
2.2.2.c. Üçüncü nesil hammaddeler 29
2.3. Lignoselülozik Hammaddelerin Yapısal Organizasyonu 30

2.3.1. Selüloz 31
2.3.2. Hemiselüloz 31
2.3.3. Pektik maddeler ve proteinler 31
2.3.4. Fenolik maddeler 32
2.4. Lignoselülozik Materyallerden Biyoetanol Üretim Süreci 33
2.4.1. Ön işlem 33
2.4.1.a. Fiziksel ön işlem 33
2.4.1.b. Kimyasal ön işlem 35
2.4.1.c. Fizikokimyasal ön işlem 40
2.4.1.d. Ön işlem metotlarının kombinasyonları 47
2.4.2. Hidroliz 52
2.4.3. Fermantasyon 55
2.4.4. Separasyon/Destilasyon (Damıtma) 56
2.5. Lignoselülozik Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar 57
2.6. Lignoselülozik Biyoetanol Üretebilen Fungal İzolatların Tanılanmasına Yönelik Moleküler Yaklaşımlar 58
2.6.1. Protein esaslı teknikler 58
2.6.1.a. SDS-PAGE 58
2.6.1.b. İmmünolojik metotlar 59
2.6.2. DNA esaslı teknikler 60
2.6.2.a. RAPD analizi 60
2.6.2.b. rDNA'nın kullanımı 61
2.6.3. Fungal izolatların identifikasyonu için kullanılan diğer moleküler teknikler 64
3. MATERYAL ve YÖNTEM 65
3.1. Materyal 65
3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar 65
3.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler 66
3.2. Yöntem 76
3.2.1. Tarımsal atıkların temini ve analiz çalışmaları 76
3.2.2. Fungal izolat kaynaklarının temini ve izolasyon çalışmaları 78
3.2.2.a. Fungal izolat kaynaklarının temini için arazi çalışmaları 78

3.2.2.b. Fungal izolasyon çalışmaları ve saf kültürlerin elde edilmesi 86
3.2.2.c. Stok kültürlerin hazırlanması ve saklanması 86
3.2.3. Fermantasyon denemeleri ve aktif fungal izolatların tanılanması 87
3.2.3.a. Saf olarak izole edilen fungal mikroorganizmaların biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması 87
3.2.3.b. Fermantasyon deneyi numunelerinin ekstraksiyonu ve gaz kromatografisi analizleri 87
3.2.3.c. Etanol üretme potansiyeli olan izolatların tarım atıklı besiyerinde gelişebilme özelliklerinin araştırılması 88
3.2.3.d. Aktif fungal izolatların tanılanması 88
3.2.3.e. Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması 92
3.2.3.f. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması 92
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 93
4.1. Tarımsal Atıkların Temini ve Analiz Çalışmaları 93
4.2. Fungal İzolat Kaynaklarının Temini ve İzolasyon Çalışmaları 97
4.2.1. Fungal izolat kaynaklarının temini için arazi çalışmaları 97
4.2.2. Fungal izolasyon çalışmaları ve saf kültürlerin elde edilmesi 106
4.3. Fermantasyon Denemeleri ve Aktif Fungal İzolatların Tanılanması 106
4.3.1. Saf olarak izole edilen fungal mikroorganizmaların biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması 106
4.3.2. Etanol üretme potansiyeli olan izolatların tarım atıklı besiyerinde gelişebilme özelliklerinin araştırılması 108
4.3.3. Aktif fungal izolatların tanılanması 111
4.3.4. Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması 113
4.3.5. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması 119
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 124
KAYNAKLAR 133
ÖZGEÇMİŞ 144

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AFEX	Ammonia fiber explosion
C	Sitozin
CBP	Consolidated bioprocessing
DMSO	Dimetil sülfoksit
DDGS	Dried distillers' grains and solubles
DNA	Deoksiribonükleotik asit
g	Gram
G	Guanin
HMF	5-Hydroxy methyl-furfural
L	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
ml	Mililitre (10^{-3})
µl	Mikrolitre (10^{-6})
SHF	Separate hydrolysis and fermentation
SSF	Simultaneous saccharification and fermentation
RNA	Ribonükleik asit
T	Timin
TAG	Triaçilgliserol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Etanolün kimyasal yapısı 5
Şekil 2.2. Glikoliz 13
Şekil 2.3. Pentoz fosfat yolu 15
Şekil 3.1. Tarım atıklarının toplandığı alanın haritası 77
Şekil 3.2. Tarım atıklarının toplandığı alanın uydu görüntüsü 77
Şekil 3.3. 40°22’22’’ Kuzey - 39°49’43’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 79
Şekil 3.4. 40°19’56’’ Kuzey - 39°30’54’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 79
Şekil 3.5. 40°40’44’’ Kuzey - 39°26’21’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 80
Şekil 3.6. 40°36’45’’ Kuzey - 40°18’44’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 80
Şekil 3.7. 40°35’48’’ Kuzey - 40°19’18’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 81
Şekil 3.8. 40°36’59’’ Kuzey - 40°17’35’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 81
Şekil 3.9. 40°46’49’’ Kuzey - 40°15’6’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 82
Şekil 3.10. 40°8’20’’ Kuzey - 41°1’8’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 82
Şekil 3.11. 40°25’44’’ Kuzey - 40°50’13’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 83
Şekil 3.12. 40°26’20’’ Kuzey - 40°50’21’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 83
Şekil 3.13. 40°41’51’’ Kuzey - 40°41’0’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 84
Şekil 3.14. 40°18’15’’ Kuzey - 41°31’56’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 84
Şekil 3.15. 40°25’59’’ Kuzey - 41°35’28’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 85
Şekil 3.16. 40°49’4’’ Kuzey - 42°4’26’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 85
Şekil 3.17. 40°49’36’’ Kuzey - 42°6’47’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü 86
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan tarımsal atıkların temin edildiği ekili arazilerden genel bir görünüm 93
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan tarımsal atıkların temin edildiği ekili arazilerin hasat sonrasını gösteren genel bir görünüm 93
Şekil 4.3. Buğday atıklarının temin edildiği tarlanın genel görünümü 94
Şekil 4.4. Ayçiçeği atıklarının ayrıştırılması 94
Şekil 4.5. Tarımsal atıkların öğütülmesi 94
Şekil 4.6. Öğütülmüş tarımsal atıklar 95
Şekil 4.7. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 98

Şekil 4.8. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 99
Şekil 4.9. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 99
Şekil 4.10. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 100
Şekil 4.11. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 100
Şekil 4.12. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 101
Şekil 4.13. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 101
Şekil 4.14. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 102
Şekil 4.15. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 102
Şekil 4.16. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 103
Şekil 4.17. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 103
Şekil 4.18. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 104
Şekil 4.19. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 104
Şekil 4.20. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 105
Şekil 4.21. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü 105
Şekil 4.22. Fungal saf kültürlere ait örnek görüntü 106
Şekil 4.23. Fungal izolatların katı kültürdeki örnek görüntüsü (MG26) 111
Şekil 4.24. Fungal izolatların mikroskop incelemelerindeki örnek görüntüleri (MG26) 111
Şekil 4.25. Aktif izolatların DNA izolasyonu çalışmalarına ait sonuçların agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmesi 112
Şekil 4.26. ITS-PCR uygulamalarına ait sonuçların agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmesi 112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Arazi çalışmasına ait örnekleme merkez istasyonu ve konum bilgileri 76
Çizelge 3.2. Arazi çalışmasına ait örnekleme istasyonları ve konum bilgileri 76
Çizelge 4.1. Tarım atıklarının genel içerik analizi sonuçları 95
Çizelge 4.2. Tarım atıklarının karbohidrat içeriği analizi sonuçları. 96
Çizelge 4.3. Tarım atıklarının mineral içeriği analizi sonuçları 96
Çizelge 4.4. Tarım atıklarının eser element içeriği analizi sonuçları.96**Çizelge 4.5.** Arazi çalışmasına ait konum ve örnekleme bilgileri 97
Çizelge 4.6. Fungal izolatların MBMC besiyerinde etil alkol üretim potansiyelleri 106
Çizelge 4.7. Fungal izolatların tarım atıklı besiyerinde gelişebilme potansiyelleri 109
Çizelge 4.8. Aktif fungal izolatların tanı verileri 112
Çizelge 4.9. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "ayçiçeği-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 114
Çizelge 4.10. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "ayçiçeği-çiçek tablası" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 115
Çizelge 4.11. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "mısır-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 116
Çizelge 4.12. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "mısır-koçan ve yapraklar" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 117
Çizelge 4.13. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "buğday-sap" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 118
Çizelge 4.14. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "ayçiçeği-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri. 119
Çizelge 4.15. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "ayçiçeği-çiçek tablası" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 120

Çizelge 4.16. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "mısır-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 121
Çizelge 4.17. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "mısır-koçan ve yapraklar" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 122
Çizelge 4.18. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "buğday-sap" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri 123

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasındaki mevcut ekonomi; ağırlıklı olarak petrol, kömür ve doğal gaz gibi fosil yakıtlara bağımlıdır. Bu hammaddeler insanların ihtiyaç duyduğu ısınma, motorlu taşıtlar için yakıt, elektrik üretimi ve çeşitli endüstriyel ürünlerin üretimi için en temel öğelerdir (Uihlein and Schebek 2009). Fosil yakıtların son yıllardaki aşırı tüketimi, özellikle geniş şehirsel alanlarda insan ve çevre sağlığını önemli ölçüde etkileyen değişimlerin ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır. Bu bölgelerdeki değişimlerden en çok dikkat çeken öğelerden birisi de küresel ısınmaya yol açan gazların seviyesindeki yükseliştir (Ballesteros *et al.* 2006).

Dünya nüfusunda ve buna bağlı olarak ortaya çıkan endüstriyel uygulamalardaki artışa paralel olarak küresel enerji tüketimi de artış göstermektedir. Mevcut enerji ihtiyaçlarını karşılamak için ülkelerin fosil yakıtlarca zengin diğer ülkelerden ithalat yapmaları, bu yakıtların dünya üzerindeki rezervlerinin belirli miktarlarda olması ile doğrudan sınırlandırılmaktadır. Bu olguya göre yakın gelecekte, petrol gibi fosil yakıtlardan elde edilen ürünlerin yıllık üretim miktarlarında önemli bir düşüşün yaşanılması kaçınılmazdır (Sarkar *et al.* 2012).

Bu senaryonun gerçekleşmesi halinde, yenilenebilir enerji kaynakları önemli bir alternatif olarak ortaya çıkacaktır. Rüzgar, su, güneş ve jeotermal ısı gibi kaynaklar enerji üretimi odaklı endüstri için alternatif oluştururken, kimyasal madde ve yakıt üretimi odaklı endüstriyel uygulamalar için en uygun alternatifin biyomas olabileceği öne sürülmektedir (Lynd and Wang 2003).

Şeker kamışı, mısır, patates, alg türleri gibi birçok biyolojik hammaddeden elde edilebilen biyoetanol, biyodizel ve biyohidrojen gibi çok çeşitli yenilenebilir enerji kaynakları, petrol ve türevlerinden üretilen tüm yakıtların alternatifi olabilme potansiyeline sahiptir. Yapılan güncel çalışmalarda, benzer özelliklere sahip olan

biyogazın, organik çiftliklerde kısa ve orta süreli uygulamalar için kullanışlı bir yakıt olduğu sonucuna varılmıştır (Sarkar *et al.* 2012).

Yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak kullanıldığı zaman, organik materyallerin anaerobik yıkımı sonucunda açığa çıkan biyogazın mevcut enerji içeriğini arttırmak amacıyla yapısında bulunan karbondioksitin (CO_2) uzaklaştırılması ve yüksek basınç altında gaz halinde saklanması gerekmektedir. Bu şekilde optimize edilmiş biyogaz, kırsal alanlarda doğal gaz ya da propanın yerini alarak ısı ve elektrik üretiminde kullanılabilir. Hindistan'da yapılan bir çalışma, bu ülkede zirai atıklardan yaklaşık 1281 megawatt enerjiye eşdeğer biyogazın elde edildiğini göstermiştir (Dhussa 2004). İsveç'te yapılan benzer bir çalışmada ise organik atıklardan yaklaşık 38 petajoule enerjiye eşdeğer metan gazının yıllık olarak üretildiği ve bunun 2007 yılında bu ülkedeki evsel enerji ihtiyacının %11'ini karşıladığı ortaya konmuştur (Lime *et al.* 2008).

Ekonomik açıdan kalkınmakta olan ülkelerin alternatif enerji kaynakları arayışındaki en önemli ilkeler; hızla tükenmekte olan fosil yakıt kaynaklarına olan bağımlılığın ortadan kaldırılması ve Kyoto Protokolü çerçevesinde öngörülen CO_2 salınımını azaltmak, şeklinde sıralanabilir. Biyomas, etanol gibi taşınabilir yakıtların üretimi için çok önemli bir kaynak olmasına karşın, daha çok kimyasal yanma orijinli mekanik güç ve ısının üretilmesinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çağımızda motorlu taşıtlar için en çok kullanılan sıvı özellikteki yenilenebilir enerji kaynağı olan yakıt etanoldür (Lewis 1996; Demirbas 2005).

Etanolün önemi başta küresel ısınma ve iklim değişiklikleri olmak üzere birçok nedenden dolayı hızla artmakta, biyoetanole olan ilgi uluslararası, ulusal ve bölgesel platformlarda giderek büyümektedir. Buna bağlı olarak küresel biyoetanol pazarı hızlı ve değişken bir büyüme fazına girmiştir. Dünya çapındaki birçok ülke fosil yakıtların hızlı tükenişine bağlı olarak araştırma odaklarını mekanik güç ve yakıt üretiminde kullanılabilecek yenilenebilir enerji kaynaklarına yöneltmiştir. Bu bağlamda taşımacılık

için motorlu taşıtlarda kullanılabilecek yakıtların eldesi de bir diğer önemli konu başlığı olmuştur (Sarkar *et al.* 2012).

Etanol, taşımacılık amacıyla kullanılan yakıt pazarında petrolden elde edilen ürünlerin yerini alabilecek potansiyele sahiptir. Ayrıca, biyoetanol üretiminin maliyeti fosil yakıtlarınki ile kıyaslanabilir niteliktedir. Bu durum ise biyoetanol üretimini olumlu yönde etkilemektedir. Literatür verilerine göre 2001 yılında dünya biyoetanol üretimi 31 milyar litre, 2006 yılında ise 39 milyar litre olarak kaydedilmiş ve bu oranın 2015 yılında 100 milyar litreye ulaşacağı öngörülmüştür (Taherzadeh and Karimi 2007; Sarkar *et al.* 2012).

Dünya genelindeki toplam biyoetanol üretiminin %62'lik bölümünün yapımından sorumlu Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.), bu alandaki en önemli iki ülkedir. Yakıt olarak kullanılan biyoetanolün büyük kısmı; Brezilya'da şeker kamışından elde edilen sükrozdan, A.B.D.'de ise çoğunlukla mısırdan elde edilen nişastadan üretilmektedir (Kim and Dale 2004). Bununla birlikte, biyoetanol üretiminde ağırlıklı olarak kullanılan bu hammaddelerin insanlar ve diğer canlılar için yüksek besin değeri taşıması, biyoetanolün dünya çapında daha yaygın kullanıma sahip olmasını engelleyen mevcut birçok tartışmanın ve anlaşmazlığın temel kaynağı olmuştur. Benzer şekilde, hayvan yemi olarak kullanılan çeşitli tahılların da biyoetanol üretiminde kullanılması ekonomik açıdan elverişsizdir (Taherzadeh and Karimi 2007).

Bu sorunun çözümünde, insan ve diğer canlıların besinleri ile ilişkili olmayan ve kendi başına ekonomik değer arz etmeyen lignoselülozik atıklar çok büyük potansiyele sahiptir (Bjerre *et al.* 1996). Yapılan araştırmalara göre, atık niteliğinde olan lignoselülozik materyalden yıllık 491 milyar litre biyoetanolün üretilebileceği varsayılmaktadır. Bu değer günümüzde, dünya çapındaki biyoetanol üretiminin yaklaşık 16 katı olarak tanımlanabilir (Kim and Dale 2004; Sarkar *et al.* 2012).

Lignoselülozik materyaller dünyanın her yerinde her zaman bulunabilen, ucuz maliyetli ve yenilenebilir özellikte olan hammaddelerdir. Bu materyallere zirai ürünlerden geriye

kalan artıklar, çimen ve ot türevleri, marangozluk ve kerestecilik artıkları ve kağıt endüstrisinden elde edilen artık maddeler örnek olarak verilebilir. Son 20 yıl içerisinde lignoselülozik materyalden etanol elde edilmesi üzerine birçok araştırma yapılmakta ve çalışmaların sayısı giderek artmaktadır (Binod *et al.* 2010).

Mısır, şeker kamışı, meyveler, tahıllar ya da lignoselülozik materyaller gibi karbohitratça zengin hammaddelerden biyoetanol üretilmesinde en önemli reaksiyonların mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Mikrobiyal biyokatalist olarak da adlandırılan bu canlılar güçlü fermentasyon yeteneği, fermentasyon sonucu ortaya çıkan ürünlere ya da inhibitörlere karşı yüksek tolerans, kontaminasyona karşı direnç ve fazla ürün verebilme gibi özelliklere sahip olmalıdır. Dolayısıyla etkili bir biyoetanol üretimi için en önemli konu başlıklarından bir diğeri de bu çalışmalarda kullanılabilecek bilinen mevcut mikroorganizmalardan en uygun olanının seçilmesi, istenilen özellikler yönünden bu mikroorganizmaların genetiksel olarak modifiye edilmesi ya da daha güçlü özelliklere sahip yeni mikroorganizmaların doğadan izole edilerek tanılanması olarak tanımlanabilir (Holmgren and Sellstedt 2008; Weber *et al.* 2010).

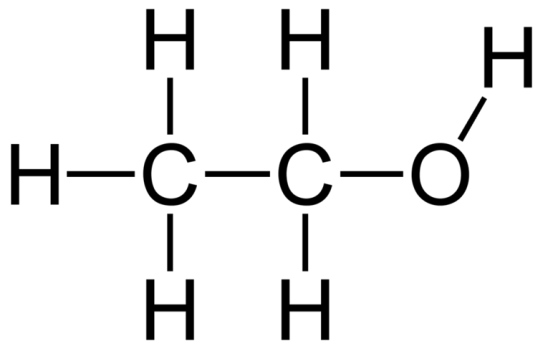
Benzer şekilde bu çalışmanın ilk aşamasında, yenilenebilir enerji kaynağı olarak biyoetanol üretimi için kullanılabilecek verimli mikroorganizmaların Erzurum ve çevresini kapsayan bölgesel ekosistemlerden izole edilmesi, genel özelliklerinin klasik ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Yine bu çalışma kapsamında, saf olarak elde edilen aktif izolatların çeşitli tarımsal atık niteliğindeki materyallerden etanol üretme potansiyellerinin araştırılması ve bu bilgilerin ülke ekonomisine kazandırılma stratejilerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Etanol

Etil alkol, saf alkol ya da içilebilir alkol gibi isimleri de olan etanol; oda ısısında sıvı, renksiz, uçucu ve yanıcı özelliklere sahip bir maddedir. Etanol, psikoaktif özelliğinden dolayı alkollü içeceklerin temel bileşeni olmasının yanısıra, basit ispirto ocaklarından modern termometrelerin yapımına kadar birçok alanda etkin biçimde kullanılmaktadır.

Bilinen en eski reaksiyonel maddelerden birisi olan ve günlük yaşamda kısaca alkol olarak adlandırılan etanol düz zincir yapısına sahip bir maddedir ve moleküler formülü C_2H_5OH veya C_2H_6O şeklinde gösterilebilir (Şekil 2.1). Bunun yanısıra, daha ileri düzeydeki tanımlamalarda etanol; $CH_3–CH_2–OH$ formülü ile de gösterilebilir. Bu formül, etanol oluşumunda bir metil grubuna ($CH_3–$) ait karbonun bir metilen grubuna ($–CH_2–$) ait karbona, bu karbonun da bir hidroksil grubuna ($–OH$) ait bir oksijene bağlandığını ifade eder. Organik kimya gösterimlerinde ise etanolün yapısındaki etil grubu (C_2H_5) sıklıkla "Et" ile sembolize edilir ve moleküler formül EtOH olarak kısaltılır (Karadayı 2010).



Şekil 2.1. Etanolün kimyasal yapısı

Şekerlerin etanole fermentasyonu, insanlık tarihinde bilinen en eski biyoteknolojik ve organik reaksiyonlardan birisidir. Etanolün psikoaktif özelliğinin keşfedilmesi antik çağlarda olmasına karşın, endüstriyel amaçlı kullanımı ve bu yönde büyük ölçekli üretiminin tarihçesi oldukça kısa bir zaman öncesine gitmektedir (Karadayı 2010).

Günümüzde etanol; alkollü içecek üretimi dışında, kokular, tatlandırıcılar, renklendiriciler ve ilaçlar gibi insanlar tarafından temas edilen ya da tüketilen birçok endüstriyel ürünün üretilmesinde hammadde ya da çözücü olarak çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Etanolün insanlar tarafından ısı eldesi ya da aydınlatma amaçlı kullanılma potansiyelinin oluşu çok eski zamanlardan bu yana bilinmesine karşın motorlu taşıtlarda yakıt olarak kullanılabilmesi oldukça yeni ve popüler bir konudur (Karadayı 2010).

2.1.1. Tarihçe

Etanol, tarih öncesi çağlardan bu yana alkollü içecek yapımında kullanılan en temel maddelerden birisidir. Distilasyon teknikleri eski Yunan ve Arap uygarlıkları tarafından bilinmesine karşın, şarabın distilasyonundan alkol eldesini konu alan ilk bilimsel kayıt 12. yy.'da İtalyan Schola Medica Salernita isimli ortaçağ tıp okulundaki dönemin simyacılarının yazıtlarıdır (Karadayı 2010).

1976 yılında distile alkolü aktif kömür ile filtre eden Johann Tobias Lowitz, tarihte ilk kez saf alkolü elde etmeyi başaran bilim insanı olmuştur. Daha sonra Antonie Lavoisier etanolün karbon, hidrojen ve oksijenden oluşan bir madde olduğunu ortaya koymuş, 1808 yılında ise moleküler formülü Nicolas-Théodore de Saussure tarafından açıklanmıştır. Bu olaydan elli yıl sonra ise Archibald Scott Couper isimli bilim insanı etanolün açık kimyasal formülünü belirlemeyi başarmıştır (Karadayı 2010).

1826 yılında birbirinden bağımsız olarak çalışan Büyük Britanyalı Henry Hennel ve Fransız S. G. Sérullas isimli bilim insanları ilk kez etanolü sentetik olarak sentezlemeyi başarmışlardır. 1828 yılında ise Michael Faraday etilenden asit ile katalize edilmiş

hidrasyon reaksiyonu ile etanol sentezlemeyi başarmıştır. Faraday tarafından bulunan bu yöntem günümüzde endüstriyel kullanım amaçlı etilenden etanol üretilmesinin temelini teşkil etmektedir (Karadayı 2010).

1840'lı yılların başlangıcında Amerika Birleşik Devletleri'nde, etanol yaygın bir şekilde aydınlatma amaçlı lambalarda yakıt olarak kullanılmıştır. Ancak bu yıllarda çıkan iç savaş ve buna bağlı vergiler yüzünden etanolün halk tarafından kullanımı önemli ölçüde kısıtlanmış ve bu olumsuz etki 1906-1908 yıllarında etanol ile çalışan bazı otomobil modellerinin piyasaya sürülmesine kadar devam etmiştir. Bununla birlikte, 1920 yılında çıkarılan kullanım yasağı sonucunda etanolün motorlu taşıtlar için alternatif enerji kaynağı olmasını öngören araştırmalar 20. yy.'ın sonlarına kadar ertelenmiştir (Karadayı 2010).

2.1.2. Etanolün fiziksel özellikleri

Karakteristik keskin bir kokuya sahip olan etanol, oda sıcaklığında uçucu ve renksiz bir sıvıdır. Dumansız mavi bir alev ile yanma özelliği gösteren bu maddenin fiziksel özellikleri temel olarak yapısında hidroksil grubunun varlığından ve mevcut karbon zincirinin kısalığından dolayı ortaya çıkmaktadır. Yapısında bulunan hidroksil grubu, hidrojen bağlarının oluşmasını sağlar. Böylelikle etanol, kendisine benzer moleküler ağırlığa sahip ancak daha az polar özellik gösteren diğer organik moleküllerden daha viskoz yapıdadır ve buna bağlı olarak daha az uçucu özellik gösterir (Karadayı 2010).

Oldukça etkili ve kullanışlı bir çözücü olan etanol aynı zamanda suda ve asetik asit, aseton, benzen, karbon tetraklorit, kloroform, dietil eter, etilen glikol, gliserol, nitrometan, piridin ve tolüen gibi pekçok organik çözücü içinde çok iyi derecede çözünür. Etanolün çözündüğü hafif alifatik hidrokarbonlara da pentan ve hekzan, alifatik kloritlere ise trikloroetan ve trikloroetilen örnek olarak verilebilir (Karadayı 2010).

Etanolün beş ya da daha fazla karbon atomu içeren diğer uzun zincirli alkollerin aksine suda çok iyi çözünmesi, organik moleküllerdeki karbon sayısının artışına paralel olarak suda çözünürlüğün azalması kuramı ile açıklanabilmektedir (Karadayı 2010).

Etanolün alkanlarla olan çözünürlüğü için üst limit undekandır. Dodekan ve daha kompleks alkanlar ile hazırlanan karışımlarda ise belirli sıcaklıkların altında (dodekan için yaklaşık 13°C) çözünme olayı gerçekleşmez. Çözücü olarak kullanılan alkanın yapısındaki kompleksliğin artışı ile çözünürlüğün sınırlandırıldığı sıcaklık skalasının genişlediği ve olayın gerçekleşmesi için gereken ısı miktarının arttığı bilinmektedir (Karadayı 2010).

Etanol-Su karışımları; etanol ve suyun bireysel hacimlerinden daha düşük hacimlere sahiptir. Örneğin, eşit miktarlarda etanol ve sudan hazırlanacak olan bir karışımın toplam hacmi 1,92 olacaktır. Bu olay etanol ve suyun karıştırılmasının ekzergonik bir reaksiyon olması ile açıklanır ve bu tepkime 298 K (25°C) ısıda gerçekleştiğinde yaklaşık 777 J/mol enerji açığa çıkar (Karadayı 2010).

Etanol ve su karışımları 89 mol (ya da %) etanol ve 11 mol su (ya da %) ile hazırlandığında %96 etanol ve %4 su hacimli azeotrop bir çözelti hazırlanmış olur. Bu çözeltinin normal atmosfer basıncı altında kaynama noktası 351 K (78°C)'dir. Bu azeotrop çözeltinin oluşum mekanizması doğrudan ortam sıcaklığı ve basınç ile ilişkilidir ve uygun koşulların sağlanmadığı belirli durumlarda bu mekanizma ortadan kalkar (Karadayı 2010).

2.1.3. Etanolün kimyasal özellikleri

Etanol, yapısındaki hidroksil grubunun bağlandığı karbon atomunun en az iki hidrojen atomuyla daha bağ yapmasından dolayı basit ya da primer alkol olarak sınıflandırılır ve verdiği reaksiyonların birçoğu bu hidroksil grubu ile ilişkilidir (Karadayı 2010).

2.1.3.a. Ester oluşumu

Asit yapısındaki katalizörlerin varlığında, etanol karboksilik asitler ile reaksiyona girerek etil esterlerin ve suyun oluşmasını sağlar.

$$RCOOH + HOCH_2CH_3 \rightarrow RCOOCH_2CH_3 + H_2O$$

Endüstriyel alanda çok geniş kullanım alanlarına sahip olan bu reaksiyon, esterlerin ortamda bir asit ya da bazın bulunması halinde başlangıçtaki alkol ve karboksilik asiti oluşturacak şekilde geri tepkime vermesinden dolayı reaksiyon sonucunda oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyar. Sabun üretiminde kullanılan bu reaksiyon aynı zamanda saponifikasyon olarak da adlandırılır. Yine önemli ürünlerden olan dietil sülfat, etanolün sülfür trioksit; trietil fosfat ise fosfor pentoksit ile muamele edilmesinden elde edilmektedir. Dietil sülfat organik sentezlerde kullanılan önemli bir etilleyici ajandır ve endüstriyel açıdan üretimi büyük önem taşımaktadır. Etanolün sodyum nitrat ve sülfürik asit ile reaksiyonundan elde edilen etil nitrat ise yaygın olarak kullanılan önemli bir diüretic maddedir (Karadayı 2010).

2.1.3.b. Yanma

Etanolün tamamen yanması sonucunda karbondioksit ve su açığa çıkar (Karadayı 2010).

$$CH_3CH_2OH + 3\ O_2 \rightarrow 2\ CO_2 + 3\ H_2O\ (\Delta Hc = -1409\ kJ/mol)$$

2.1.3.c. Dehidrasyon

Kuvvetli asitler etanolün dietil eter ya da belli koşullar altında etilene dehidrasyonunu sağlarlar.

$$2\ CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CH_2OCH_2CH_3 + H_2O$$

Günümüzde endüstriyel ölçekli üretimlerde her yıl milyonlarca kilogram dietil eter sülfürik asit katalizörlüğünde bu yol kullanılarak üretilmektedir (Karadayı 2010).

2.1.3.d. Asit-baz kimyası

Etanol nötral bir moleküldür ve suda çözünmüş olan solüsyonlarının yaklaşık pH değerleri 7,00'dir. Etanol sodyum gibi alkali bir metal ile reaksiyona sokularak kantitatif olarak kendi baz formu olan etoksit ($CH_3CH_2O–$)'e dönüştürülebilir.

$$2\ CH_3CH_2OH + 2\ Na \rightarrow 2\ CH_3CH_2ONa + H_2$$

Aynı reaksiyon sodyum hidrit gibi çok kuvvetli bir baz ile de gerçekleştirilebilir.

$$CH_3CH_2OH + NaH \rightarrow CH_3CH_2ONa + H_2$$

pKa değerleri su için 15,7 ve etanol için 16,0 olduğundan dolayı su ve etanolün asitlik dereceleri neredeyse aynı olarak kabul edilir. Buna bağlı olarak sodyum hidroksit ve sodyum epoksit arasında çok hassas bir denge vardır (Karadayı 2010).

$$CH_3CH_2OH + NaOH \rightarrow CH_3CH_2ONa + H_2O$$

2.1.3.e. Halojenler ile tepkimeler

Endüstriyel açıdan kullanım alanı olmamasına karşın, etanol hidrojen halitlerle reaksiyona sokulabilir ve bunun sonucunda etil klorit ve etil bromit gibi etil halitler açığa çıkar.

$$CH_3CH_2OH + HCl \rightarrow CH_3CH_2OCl + H_2O$$

Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için çinko klorit gibi katalizörlere ihtiyaç vardır.

HBr benzer bir tepkimeye girmek için sülfürik asitin katalizörlüğüne ihtiyaç duyar. Ayrıca etil halitler teoride etanolün tionil klorit ya da fosfor tribromit gibi özelleşmiş halojenizasyon ajanları ile muamele edilmesinden de üretilebilmektedir.

$$CH_3CH_2OH + SOCl_2 \rightarrow CH_3CH_2OCl + SO_2 + HCl$$

Ortamda bir bazın bulunduğu durumlarda halojenlerle muamelenin ardından etanol, uygun olan haloformu (CHX_3; X=Cl, Br, I) oluşturacak tepkimeyi verir. Bu tepkime haloform reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu reaksiyonda ara ürün olarak ortaya çıkan klorine ise kloral adı verilir (Karadayı 2010).

$$4\ Cl_2 + CH_3CH_2OH \rightarrow CCl_3CHO + 5\ HCl$$

2.1.3.f. Oksidasyon

Etanol basit olarak asetaldehit ile oksitlenebilir. Ayrıca ortam koşullarına bağlı olarak daha ileri düzeyde oksitlenmesi için asetik asit de kullanılmaktadır. Bunun endüstriyel açıdan önemi olmamasına karşın, insan vücudunda bu reaksiyonlar alkol dehidrogenaz enzimleri katalizörlüğünde yoğun olarak gerçekleşmektedir. Etanolün oksidasyonu canlılar için besin değeri taşıyan ve asetil CoA'nın öncü molekülü olan asetik asitin ortaya çıkması ile sonuçanır. Bu madde enerji kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra biyosentez olaylarına da katılması yönünden canlılar için önem arz etmektedir (Karadayı 2010).

2.1.4. Etanolün üretim yöntemleri

Etanol üretimi biyolojik ve kimyasal üretim olmak üzere iki temel başlık altında incelenmektedir.

2.1.4.a. Kimyasal yollarla etanol üretimi

Etanol; endüstriyel hammadde ya da çözücü olarak kullanılacağı zaman, çoğunlukla petrokimyasal maddelerden sentetik olarak elde edilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden en çok bilineni asit katalizörlğünde etilenin hidrasyonudur (Karadayı 2010).

$$C_2H_4 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH$$

Bu reaksiyonda en yaygın olarak kullanılan katalizör silika jel veya diyatome toprağına adsorbe edilmiş fosforik asittir. Bu tepkimenin gerçekleşmesi için 300°C sıcaklığa ve yüksek basınca ihtiyaç vardır. Ayrıca etanol üretiminde kullanılan bir diğer metotta; etilen konsantre sülfürik asit ile tepkimeye sokulurak etil sülfür elde edilir. Daha sonra etil sülfür hidrolize edilerek sülfürik asit ve etanol elde edilir (Karadayı 2010).

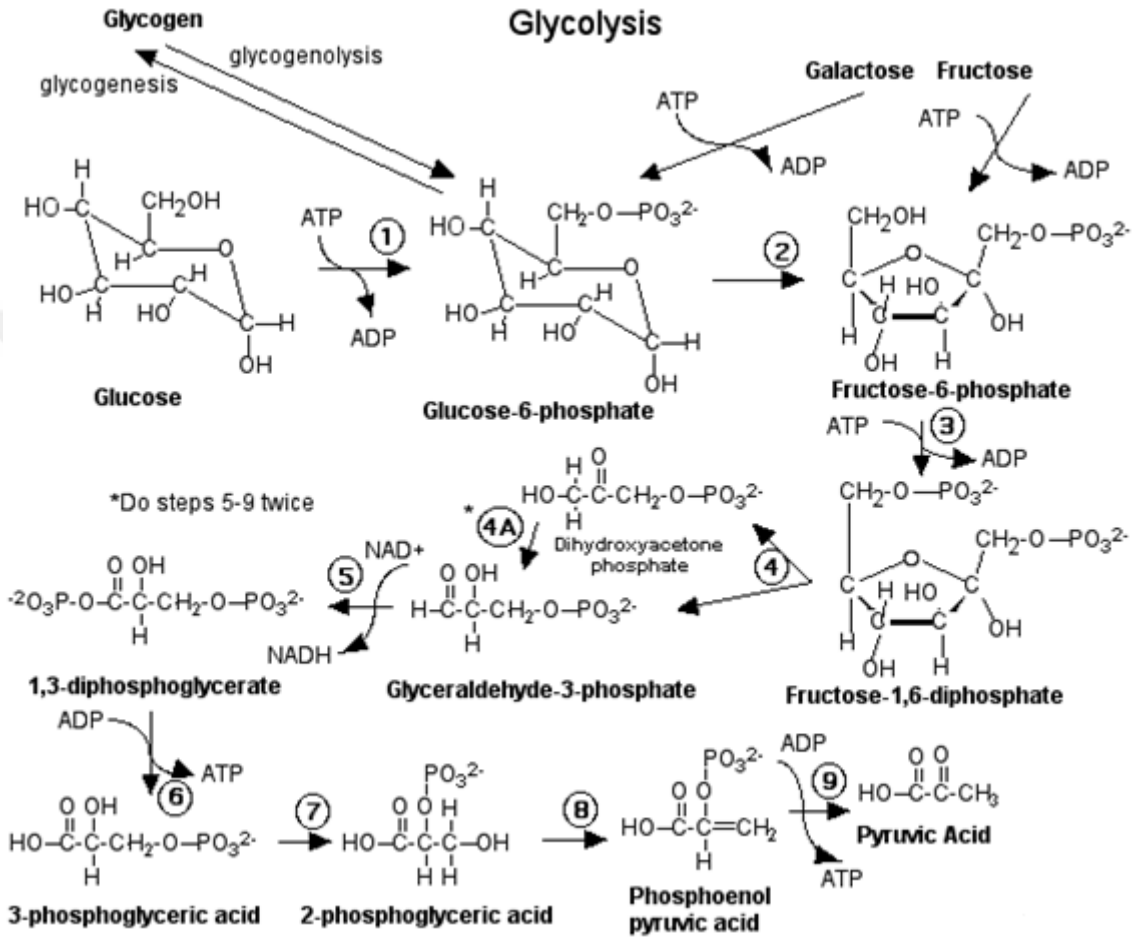
$$C_2H_4 + H_2SO_4 \rightarrow CH_3CH_2SO_4H$$

$$CH_3CH_2SO_4H + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + H_2SO_4$$

2.1.4.b. Biyolojik yollarla etanol üretimi

Dünya üzerinde en eski ve en yaygın olarak kullanılan etanol üretim yöntemi; glikoz gibi altı karbonlu şekerlerin *Saccharomyces cerevisia* tarafından etil alkole fermentasyonudur. Yakın geçmişimizden bu yana gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde bu yöntemde kullanılabilecek şeker ve mikroorganizma türevlerinin çeşidi önemli ölçüde arttırılmıştır. Buna karşın, tüm biyolojik yollarla etanol üretimi çalışmalarının merkezini mikroorganizma hücreleri tarafından gerçekleştirilen glikoliz yolu oluşturmaktadır. Bu yönde yapılan araştırmalar, mikroorganizmalar tarafından hücre içine alınan şekerlerin glikolize girmeden önce farklı metabolik yollardan geçtiklerini ve

beş karbonlu şekerleri de kullanabilen bazı mikroorganizma türlerinde pentoz fosfat metabolik yolunun glikoliz yoluna eşlik ettiğini göstermiştir (Holmgren 2008).



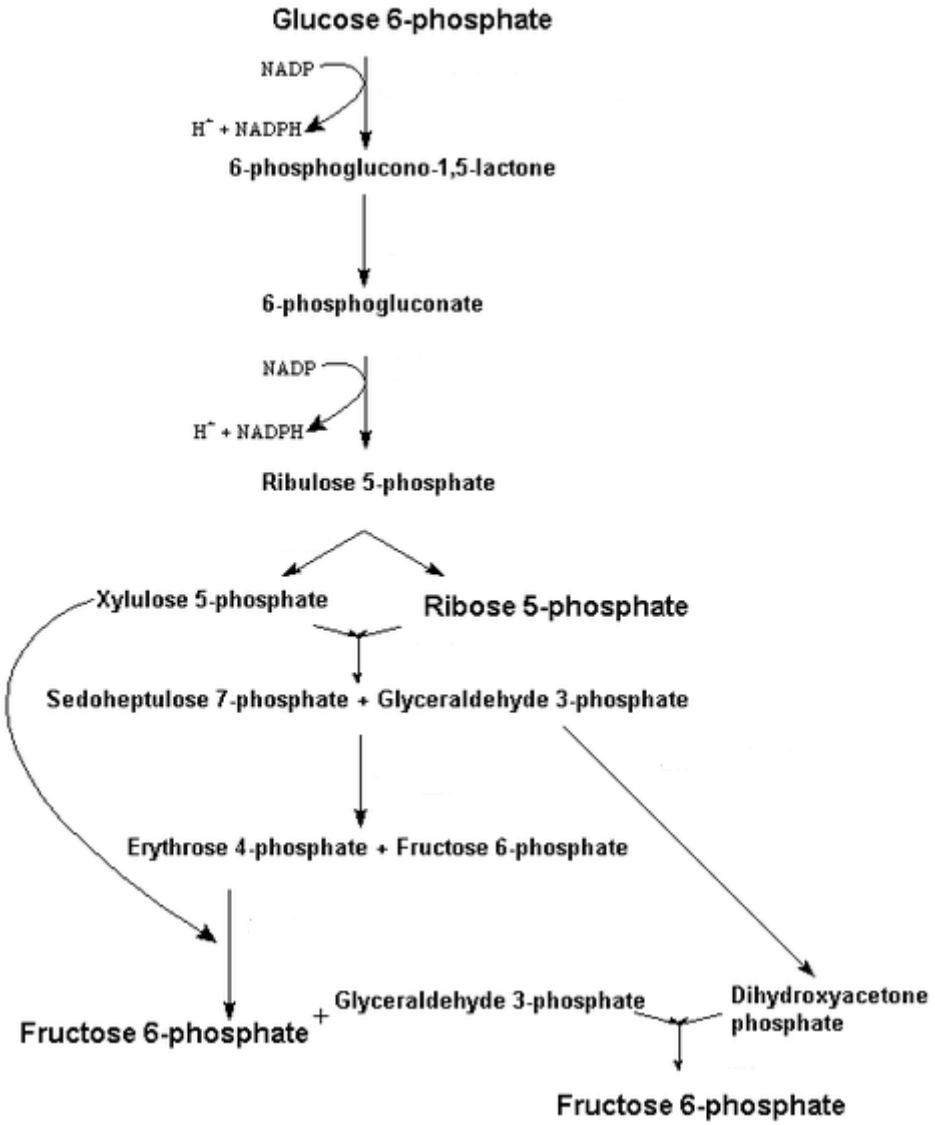
Şekil 2.2. Glikoliz

Embden-Meyerhof yolu olarak da bilinen glikoliz, birçok hücrenin glikoz fermentasyonu için kullandığı en temel metabolik yoldur (Şekil 2.2). Birbirinden bağımsız enzimler tarafından katalizlenen ve hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda gerçekleşen bu olay üç temel safha halinde incelenmektedir. Bu safhalardan birincisi hazırlık reaksiyonlarından, ikincisi oksidasyon reaksiyonlarından ve üçüncüsü redüksiyon ve fermentasyon reaksiyonlarından oluşmaktadır (Holmgren 2008).

Glikoliz safhasında oksijene ihtiyaç yoktur ve bu olay sitoplazmada meydana gelir. Bu metabolik olay altı karbonlu bir heksoz olan glikozun, çeşitli reaksiyon kademelerinden geçerek üçer karbonlu iki molekül pirüvata dönüşmesi ile son bulur. Heksoz şekerler glikolize doğrudan giremezler, önce ATP tarafından aktifleştirilmeleri gerekmektedir. Şayet glikoliz, nişasta gibi bir polimerden başlarsa fosforilaz-a enziminin katalitik aktivitesiyle glukoz-1-fosfata (G-1-P) dönüşür. Daha sonra G-1-P, fosfoglukomutaz enzimi yardımıyla glukoz-6-fosfata (G-6-P) dönüştürülür. Aynı reaksiyon glukoz ile başlatılırsa, glukoz hekzokinaz yardımıyla doğrudan G-6-P'ye dönüştürülür. Oluşan bu hekzos fosfat, fosfoglukoz izomeraz enziminin katalitik etkisi sonucunda fruktoz-6-fosfata dönüşür. Fruktoz-6-fosfatın daha sonraki etkileşimlere girebilmesi için, yeniden enerji kazanması ve aktifleşmesi gerekmektedir. Bu amaçla fruktoz-6-fosfat ATP'den bir fosfat almak suretiyle fruktoz-1,6-difosfatı oluşturur. Bu ürün aldolaz enzimi yardımıyla ikiye bölünür ve bir molekül dihidroksi aseton fosfat ile bir molekül fosfogliseraldehit oluşur. Daha sonra fosfogliseraldehit, 1,3-difosfogliseraldehite dönüşür. Oluşan 1,3-difosfogliseraldehit dehidrogenaz enzimin yardımıyla yapısından hidrojen kaybeder ve difosfogliserat oluşur. Bu sırada serbest kalan hidrojenleri NAD^+ alır ve NADH oluşur. Etkileşmenin bundan sonraki kısmında difosfogliserat, fosfogliserat kinaz enzimi ile iki molekül 3-fosfogliserata dönüşür. Bu dönüşümde açığa çıkan enerji ATP oluşumu ile depolanır. 3-fosfogliserat, fosfogliseromutaz enzimiyle 2-fosfogliserata dönüşür. Daha sonra enolaz enzimi, 2-fosfogliserattan suyu serbest hale getirir ve fosfoenol piruvat (PEP) oluşur. Bu olayın son basamağında ise piruvat kinaz enzimi ile fosfoenol piruvattan pirüvat (PA) oluşur (Holmgren 2008).

Etanol üretimi için önemli bir diğer metabolik yol olan pentoz fosfat yolunda, organizma için çok önemli bileşiklerden pentozlar (beş karbonlu şekerler), nükleik asitler, fotosentezdeki CO_2'den glikoz ve bazı aminoasitler sentezlenmektedir (Şekil 2.3). Bu noktada 5 karbonlu şekerlerin kullanımında bakteri, maya ve funguslarda önemli farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, ksiloz izomeraz enzimlerine sahip olan bakterilerde ksiloz doğrudan izomeri olan ksiluloza dönüştürülür. Maya ve funguslarda ise ksiloz ksiluloz-5-fosfata iki aşamalı bir metabolik yol ile dönüştürülmektedir. Bu metabolik yolda ilk olarak ksiloz, ksilitole ksiloz redüktaz enzimi ile indirgenir. Daha

sonra elde edilen ksilitol, ksilitol dehidrogenaz enzimi tarafından ksilüloz-5-fosfata yükseltgenir (McMillan 1996).



Şekil 2.3. Pentoz fosfat yolu

Ksilüloz-5-fosfat, glikolizde kullanılan gliseraldehit-3-fosfatı oluşturmak için pentoz fosfat yoluna girebilecek bir moleküldür. $NADP^+$'den NADPH üretimi de bu metabolik yol sırasında olmaktadır (McMillan 1996).

2.2. Yenilenebilir Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol

Biyoetanol genel olarak literatürde tahıl alkolü veya etil alkol isimleriyle ya da kimyasal olarak C_2H_5OH ve EtOH formülleriyle anılmaktadır. Biyoetanolün yalnız başına veya mevcut petrol ürünleriyle karıştırılarak alternatif bir yakıt olarak kullanılmasının oldukça eski bir tarihçesi vardır. Daha önce de değinildiği gibi biyoetanol, içten yanmalı motor endüstrisinin başlangıcı sayılabilecek 1894 yılından bu yana çeşitli taşıt türlerinde yakıt olarak kullanılmaktadır (Demirbas and Karslioglu 2007). Brezilya etanolü 1925 yılından bu yana temel yakıtları arasında kullanmaya başlamıştır. Yine Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde biyoetanolün taşıt yakıtı olarak kullanılmasının tarihçesi 1900'lü yılların başlarına kadar uzanmaktadır. Özellikle 2. Dünya Savaşı'nın ardından üretim maliyetleri petrol temelli yakıtlara nazaran daha yüksek olduğu için biyoetanol kullanımı 1970'lerde ortaya çıkan petrol krizine kadar önemli ölçüde azalmıştır (Balat 2009). 1980 yılından bu yana ise alternatif bir yakıt olarak biyoetanol eski popülerliğini yeniden kazanmış ve bu alanda pek çok araştırma gerçekleştirilmiştir. Başta Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya olmak üzere bazı ülkeler yerel kaynaklardan biyoetanol üretimini teşvik edici politikalar geliştirmişlerdir. Ekonomik enerji politikalarına ilave olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde benzin/biyoetanol karışımlarının kullanılması, mevcut yakıtların çevreye olan zararlarının azaltılmasını sağlamak yönünden de teşvik edilmiştir. Bu amaçla mevcut yakıtlarda oktan arttırıcı olarak kullanılan kurşunun yerini biyoetanol almıştır. Biyoetanol ayrıca benzinin daha iyi yanması için oksijenlenmesine ve dolayısıyla istenmeyen egzoz emisyonlarının azaltılmasına katkı sağlar (Demirbas 2005; Balat and Balat 2009).

Biyoetanol diğer yakıtlara kıyasla daha yüksek oktan değerine (108), daha geniş alev alma limitlerine, daha hızlı ateşlenebilme özelliğine ve daha yüksek buhar ısısına sahip olması yönünden oldukça dikkat çekicidir. Bu özellikler biyoetanolün daha yüksek kompresyon oranının ve daha kısa yanma süresinin temelini oluşturur. Bu temel, içten yanmalı bir motorda biyoetanolün benzine kıyasla daha verimli yanmasının asıl sebebidir. Oktan değeri erken ateşlemeden korunmayı sağlayan benzin kalitesinin bir

ölçüsüdür ve bu kalitenin düşük olması motorun düzgün çalıştırılmasına engel olur. Bu yüzden yüksek oktan değerlerine sahip yakıtlar, buji ateşleme sistemli içten yanmalı motorlar için tercih edilirler. Biyoetanol gibi oksijence zengin bir yakıt, motorun ateşlenmesinde karşılaşılabilecek sorunları azaltıcı önemli bir "anti-knock" etkiye sahiptir (Balat and Balat 2009).

Biyoetanolün dezavantajları, korozif özelliği, benzine oranla daha düşük enerji yoğunluğuna sahip olması (biyoetanol, aynı miktardaki benzinin %66'sı kadar enerjiye sahiptir), düşük alev aydınlığı, soğukta ateşlenmeyi zorlaştıran daha düşük buhar basıncı, su ile karışabilirliği, ekosistemler üzerine toksik etkiye sahip olması, egzozdaki aldehit emisyonlarını arttırması, benzinle karıştırıldığında buhar ve evoporatif emisyonları arttırması şeklinde sıralanabilir (MacLean and Lave 2003).

Biyoetanol, taşıtlar için yakıt olarak çok çeşitli metotlarla kullanılabilir. Günümüzde doğrudan yakıt olarak kullanılabildiği gibi benzin ile çok çeşitli oranlarda karıştırılarak da kullanılmaktadır. Biyoetanol benzin ile karıştırıldığında çoğu zaman kullanımı için taşıtların motorlarında herhangi bir modifikasyona ihtiyaç duymaz. Günümüzde en yaygın kullanılan etanol-benzin karışımı %10 etanol ve %90 benzinden oluşur. E10 olarak bilinen bu yakıt aynı zamanda Gasohol olarak da adlandırılmaktadır. Brezilya'da biyoetanol hem saf olarak hem de yine gasohol olarak adlandırılan daha farklı bir karışım halinde (%24 biyoetanol ve %76 benzin) yaygın olarak kullanılmaktadır. Avrupa Birliği kalite standartlarına göre (Standart No: EN 228) biyoetanol, %5 oranında benzin katkısı olarak kullanılmalıdır. Bu oran motor modifikasyonu gerektirmemesi ve tüm üretici kuruluşların garanti kapsamında olması yönünden dikkate değerdir. Yapılacak motor modifikasyonları ile biyoetanol, yakıt karışımlarında çok daha yüksek oranlarda kullanılabilmektedir. Örneğin E85, %85 oranında biyoetanol içermektedir (Balat and Balat 2009).

Oksijence zengin olan biyoetanol %35 oranında oksijen içerir ve bu durum yanma sonucunda partiküllerin ve nitrojen oksitlerin (NO_x) emisyonunu azaltır. Biyoetanol katkılı yakıtların otomobillerde kullanılması petrol kullanımını ve sera gazlarının

emisyonunu azaltmaktadır. Biyoetanolü benzine katmak yakıtın oksijen içeriğini arttırır, benzinin daha iyi yanmasını sağlar ve motorlu taşıtlarda genellikle iyi yanmamanın bir sonucu olarak ortaya çıkan karbon monoksit (CO) ve çeşitli hidrokarbonlar gibi egzoz emisyonlarının azaltılmasını sağlar (Balat and Balat 2009).

2.2.1. Biyoyakıt olarak biyoetanol kullanımının tarihsel gelişimi

Etanolün taşıtlarda yakıt olarak kullanılmasının geçmişi oldukça eski tarihlere kadar dayanmaktadır. Etanolü yakıt olarak kullanan ilk içten yanmalı motor prototipleri 19. yüzyılda 1826'da Samuel Morey ve 1876 yılında Nikolaus August Otto tarafından geliştirilmiştir (Demirbas *et al.* 2009). Saf etanolü yakıt olarak kullanan ilk araç ise 1896 yılında Henry Ford tarafından üretilmiştir. Bu buluşların ardından 1908 yılında hem saf etanol, hem saf benzin hem de etanol ve benzinin çeşitli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilen çeşitli yakıtlarla çalışabilen Ford Model-T isimli araç geliştirilerek seri üretime geçilmiştir. Bu sayede biyoetanolün yakıt olarak kullanılması 1900'lü yılların başlarında Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde önemli derecede yaygınlaşmıştır (Solomon *et al.* 2007; Balat and Balat 2009; Mussatto *et al.* 2010).

Birinci Dünya Savaşı'ndan sonra etanole olan talep, bu dönemde etanolün petrol temelli yakıtlara göre daha fazla maliyetli olmasından dolayı hızla azalmıştır. Bununla birlikte General Motors Corporation ve DuPont gibi önemli şirketler, etanolün detanasyon önleyici özelliklerinden ve fosil yakıtların yakın gelecekteki en muhtemel alternatifi olmasından dolayı bu alandaki araştırmalarını bu dönemde de ara vermeksizin sürdürmüşlerdir (Mussatto *et al.* 2010).

Biyoetanolün taşıtlarda yakıt olarak kullanılmasının tarihçesinde önemli yere sahip bir diğer ülke olan Brezilya, otomobiller için alkol üretimini kapsayan öncü bir ulusal programa 1927 yılından bu yana sahiptir. Bu kapsamda dünya genelindeki ilk alkol istasyonu bu ülkede 1927 yılında kurulmuş ve bu istasyon işlevselliğini geride bıraktığımız son 10 yıla kadar aralıksız olarak sürdürebilmiştir. Her ne kadar Birinci Dünya Savaşı sonrasında etanol, bir yakıt olarak popülerliğini kısa bir süre için

yitirmişse de, biyoyakıt olarak etanol pazarı 1970'li yıllarda ortaya çıkan küresel petrol krizi ve uluslararası aşırı üretimden kaynaklanan şeker stoku problemlerinin bir neticesi olarak yeniden canlanmıştır. Bu kapsamda Brezilya'da ulusal alkol programı (ProAlcool) 1975 yılında yürürlüğe alınmıştır. Bu program, alkol üretiminde hammadde olarak şeker kamışının kullanılmasını ve petrol türevi yakıtların yerini büyük oranda ülke içerisinde üretimi yapılan etil alkolün almasını hedeflemiştir. Bu sayede Brezilya, etanol taleplerinin ve kaynaklarının arttırılmasına yönelik politikalar ile büyük ölçekte yenilenebilir enerji kullanımı için kurumsal kapasitesini ve ilgili teknolojilerini önemli ölçüde geliştirmiştir. Yürürlüğe alınan programların ilk meyvelerini vermeye başladığı 1984 yılında, Brezilya'da satılan yeni arabaların büyük çoğunluğunun hidrate biyoetanol (%96 biyoetanol + %4 su) ile çalıştığı rapor edilmiştir. Daha sonraları şekerden alkol üretme endüstrileri ulusal manada olgunluğa eriştiğinde yeni poliçeler geliştirilmiş ve ProAlcool programı 1999 yılında kademeli olarak sonlandırılmıştır. Bu sayede ülkedeki biyoetanol üretimi özel şirketlere ve girişimcilere açılmış, hükümet desteği geri çekilmiş ve şirketler arası rekabet neticesinde biyoetanol fiyatları önemli ölçüde düşürülmüştür. Günümüzde Brezilyalıların bir kısmı 1979 yılından bu yana yalnızca etanol ile çalışan arabalar kullanırken, diğer bir kısmı ise yeni nesil motorların geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi sonucunda daha farklı alternatiflere yönelmiştir. Bu alternatifler içerisinde en dikkat çekicileri hem etanol hem de benzinle çalışan flex-fuel taşıtların yaygınlaşması ve son yıllardaki artan petrol fiyatları, 2000 yılından beri Brezilya genelinde biyoetanol ve şeker kamışı üretimini önemli ölçüde arttırmıştır. Günümüzde Brezilya'daki mevcut araç üretiminin %80'inden fazlasını flex-fuel özellikli taşıtların oluşturduğu bilinmektedir (Bray *et al.* 2000; Kline *et al.* 2008; Mussatto *et al.* 2010).

Amerika Birleşik Devletleri'nde ise büyük petrol üreticilerinin baskıları sonucunda yürürlüğe giren yüksek vergilerden ve bu ülkede ucuz petrol varlığından dolayı etanolün taşımacılıkta yakıt olarak kullanılması fikri 20. yüzyılın başlarında popülerliğini yitirmiştir. Daha sonra özellikle aşırı zirai üretimin bir sonucu olarak 1980'li yıllarda biyoetanolün üretilmesi ve çeşitli amaçlar için kullanılması yeniden popülerite kazanmıştır. Bu kapsamda Amerika Birleşik Devletleri, etanol endüstrisini Brezilya'ya

nazaran daha kademeli bir şekilde yeniden inşa etmiş ve günümüzde hem üretim hem de kullanım bakımından dünya lideri konumuna yükselmiştir. Bu ülkede özel olarak dizayn edilmiş ve E85 yakıt karışımı (%85 biyoetanol + %15 benzin) ile çalışan araçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Yönetimdeki hükümetlerin bu yakıt karışımını kullanmayı ve geliştirmeyi çeşitli projelerle desteklediği bilinmektedir. Bununla birlikte Ford, Chrysler ve GM gibi bazı motorlu taşıt üreticileri de saf benzinden E85'e kadar tüm karışımlarla çalışabilen flexible-fuel araçların üretimini arttırmıştır (Mussatto *et al.* 2010).

Günümüzde etanol, dünya genelinde en yaygın kullanılan biyoyakıt çeşididir ve kullanım oranı gittikçe artmaktadır. Yine dünya genelindeki ortak görüş, biyoetanol kullanımının gelecek yıllarda çok daha fazla artacağına işaret etmektedir (Mussatto *et al.* 2010).

2.2.2. Biyoyakıt üretiminde kullanılan yenilenebilir biyokütle kaynakları ve bunların biyoenerji potansiyelleri

2.2.2.a Birinci nesil hammaddeler

Dünya genelinde biyoyakıt üretimi son on yıl içerisinde hızla artmış ve günümüzde global karasal ulaşım ve nakliye için gerekli olan enerjinin %3,4'lük kısmını karşılar hale gelmiştir. Bu oranın %21'lik kısmını Brezilya, %4'lük kısmını Amerika Birleşik Devletleri ve %3'lük kısmını ise Avrupa Birliği ülkelerinin paylaştığı bilinmektedir. Günümüzde yaklaşık 40 milyon hektarlık alan; biyoetanol, biyodizel ve biyogaz gibi biyoyakıtların üretiminde temel teşkil eden biyoenerji mahsullerinin yetiştirilmesi için kullanılmaktadır. Bu alan, yer küredeki ekilebilir arazilerin %2,5'lik kısmına eşittir (Ho *et al.* 2014).

Birinci nesil biyoyakıtların üretiminde kullanılan hammaddeler temelde biyoetanol ürerimi için nişasta ve şeker içerikli mahsuller ile biyodizel üretimi için yağlı tohumlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Ho *et al.* 2014).

Nişasta ve şeker içerikli mahsuller: Birinci nesil biyoetanol; şeker kamışı, şeker pancarı ve şeker darısı gibi şeker yönünden zengin mahsullerin doğrudan fermantasyonu ya da mısır, buğday ve manyok gibi nişasta bakımından zengin mahsullerin önce hidroliz edilmesi ve daha sonra da bu hidrolizatların fermantasyonu ile üretilmektedir. Temel üreticisi Amerika Birleşik Devletleri olan mısır orijinli biyoetanol, 2012 yılında yaklaşık olarak 60 milyar litre üretilerek global etanol pazarına egemen olmuştur. Bunu en bilinen üreticisi Brezilya olan şeker kamışı orijinli biyoetanol, 20 milyar litrelik üretim miktarı ile takip etmiştir (Ho *et al.* 2014).

Yine birinci nesil biyoyakıtların üretiminde kullanılan diğer hammaddelere; şeker pancarı (Avrupa Birliği ülkeleri), darı ve şeker darısı (Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya), tahıl bitkileri (Kanada, Avrupa Birliği ülkeleri) ve manyok (Nijerya, Brezilya, Tayland ve Endonezya) örnek olarak verilebilir (Ho *et al.* 2014).

Şeker içerikli biyokütleleri *Saccharomyces cerevisiae* ya da *Zymomonas mobilis* gibi mayalar kullanarak C_6 (6 karbonlu) şekerlerin, çoğunlukla da glikozun fermantasyonu sonucunda etanole dönüştürme süreci oldukça basittir. Nişasta içerikli biyokütlelerin fermantasyonu ise, nişastanın fermantasyondan önce α-amilaz enzimleri tarafından şekerlere hidroliz edilmesi gerekliliğinden dolayı daha kompleks bir süreç olarak tanımlanır. Bunun bir sonucu olarak, nişasta içerikli biyokütlelerden etanol üretim sürecinin şeker içerikli biyokütlelerden üretim sürecine göre daha fazla enerjiye ihtiyaç duyacağı açıkça görülebilir. Her iki durumda da etanol üretim süreçlerinin, kurutulmuş damıtık tahıl ve bunun çözünür maddeleri (DDGS: dried distillers' grains and solubles) gibi yan ürünleri hayvancılıkta protein yönünden zengin besin kaynakları olarak kullanılabilir. Bu yan ürünler, birinci nesil biyoetanol üretimi maliyetini düşüren ve toplam kazancı arttıran en önemli parametrelerdir (Lin and Tanaka. 2006).

Günümüzde dünya genelinde işletilmekte olan yaklaşık 650 tane birinci nesil biyoetanol üretim tesisi bulunmaktadır ve bu tesisler toplamda yıllık 100 milyar litre üretim kapasitesine sahiptir. Genel bir kıyaslama yapıldığında 1 litre etanol, 1 litre petroldeki enerjinin %66'sına sahiptir. Etanol doğrudan kullanılabileceği gibi, araçlarda yakıt

verimini arttırmak, CO_2 emisyonunu düşürmek, petrol ve fosil yakıt rezervlerinin kullanımını azaltmak maksadıyla mevcut yakıtlarla karıştırılarak da kullanılabilir. Örneğin, %10 etanol içerikli ticari bir yakıt olan E10 kullanılması sonucunda, petrol kullanımı %6, sera gazı emisyonu %2 ve fosil yakıt rezervlerinin kullanımı %3 oranında azaltılmaktadır (Ho *et al.* 2014).

Yağ içerikli mahsuller: Biyodizel yağca zengin tohumlar ve kabuklu yemişlerden ekstrakte edilen yağlar ile bir alkol türevinin kimyasal reaksiyona sokulması sonucunda elde edilmektedir. Bu süreçte kullanılan kimyasal reaksiyon, transesterifikasyon olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde bulunan en yaygın yağ mahsulleri; kolza (Avrupa Birliği ülkeleri), soya fasulyesi (Amerika Birleşik Devletleri ve Latin Amerika ülkeleri), palmiye ve Hindistan cevizi yağı (Malezya ve Endonezya gibi tropik Asya ülkeleri) olarak sıralanmaktadır. Kolza ve soya fasulyesinin yağ içerikleri sırasıyla %35 ve %21 olarak belirlenmiştir. Diğer yağ içerikli mahsullerle kıyaslandığında, birim alanda en yüksek yağ verimine sahip olan palmiye yağı %40 yağ içeriği ile öne çıkmaktadır. Örneğin kolza için birim alandaki yağ içeriği 1 ton/hektar ve soya fasulyesi için 0,52 ton/hektar olarak hesaplanırken, bu miktar palmiye yağında yaklaşık olarak 5 ton/hektar olarak belirlenmiştir. Ayrıca hayvansal donyağları ve kullanılmış kızartma yağları da biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilir (Balat and Balat 2010).

2012 yılında dünya genelinde toplam 22,5 milyar litre biyodizel üretilmiş ve bu üretimin büyük kısmı (%41) başta Almanya olmak üzere Avrupa Birliği ülkeleri tarafından gerçekleştirilmiştir. Bunu %16 ile Amerika Birleşik Devletleri ve her biri %10'un üzerinde olacak şekilde sırasıyla Arjantin, Brezilya ve Çin takip etmiştir (Ho *et al.* 2014).

Biyodizel üretiminde kullanılan çeşitli yağ içerikli hammaddeler arasındaki en temel fark; doygunluk derecesini ve moleküler yapılanmayı belirleyen temel faktör olan triaçilgliserollere (TAG) bağlı olan yağ asidi tipleridir. Bu faktörler, üretim süreçlerini, ürün kalitesini ve biyodizel ürünlerin maliyetini doğrudan etkiler. Yağların biyodizele transesterifikasyonu aşamalı bir süreçtir. Bu süreçte TAG; esterleri ve gliserolü

oluşturmak üzere uygun bir alkolle (genellikle metanol) katalizör varlığında reaksiyona girer. Bir çok biyodizel çeşidi için alkali bir katalizör varlığında transesterifikasyon reaksiyonunun yapılması en ekonomik seçenektir. Bu uygulama düşük reaksiyon sıcaklıklarında ve düşük basınçta uygulanabilir olmasıyla ve %98 konversiyon verimine ulaşılabilmesi yönleriyle oldukça dikkat çekicidir. Öte yandan, enzim katalizörlüğünde gerçekleştirilen uygulamalar, daha az enerji tüketmeleri, daha az sabun oluşumuna sebep olmaları ve daha yüksek saflıkta gliserol üretimine olanak sağlamaları bakımından son yılların popüler araştırma konuları içerisine girmiştir. Buna karşın, bu süreçlerin ticarileşmesini önleyen en önemli darboğazlar enzimlerin yüksek maliyetleri ve reaksiyonların düşük verimli olması olarak tanımlanmaktadır. Biyodizel üretimindeki konversiyon süreci, gıda ve ilaç sanayi için oldukça kıymetli olan gliserol ve değerli hayvan yemi katkıları gibi çeşitli yan ürünlerin oluşmasıyla da ekonomik anlamda dikkat çekicidir (Balat and Balat 2010; Christopher *et al.* 2014; Ho *et al.* 2014).

Biyoetanole benzer şekilde, biyodizel de doğrudan dizel yakıtlarla çalışan araçlarda doğrudan kullanılabileceği gibi mevcut yakıtlarla da karıştırılarak kullanılabilir. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan biyodizel karışımlı yakıtlara; B2 (%2 biyodizel ve %98 petrodizel), B5 (%5 biyodizel ve %95 petrodizel) ve B20 (%20 biyodizel ve %80 petrodizel) örnek olarak verilebilir. Doğrudan biyodizel kullanımı, petrodizel ile kıyaslandığında, artan bitkisel yağ maliyetlerinden dolayı ekonomik değildir. Bununla birlikte süreç veriminin arttırılması ve yan ürünlerin yaygın bir şekilde kullanımı ile maliyetlerin yakın gelecekte düşürülebileceği ön görülmektedir (Ho *et al.* 2014).

Birinci nesil hammaddelerin sürdürülebilirlikleri üzerine kaygılar: Biyokütle temelli hammaddelerin üretimi ve bu hammaddelerin biyoenerji türevlerine dönüştürülmesi süreçleri çok sayıda sosyo-ekonomik ve çevresel etkiye sahiptir. Her ne kadar gününüzde birinci nesil biyoyakıtlar, kendileri için geliştirilmiş teknolojiler ve yüksek pazar payları vasıtasıyla dünya genelinde ticarileştirilmişse de, bunların gelecekte de kullanımının sürdürülebilirliği gıda mahsulleri ile olan rekabetlerinden ve iklim değişikliğine yol açma gibi çevre üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı halen tartışılmaktadır. Biyoyakıt kullanımı artışı, aynı zamanda küresel tahıl, şeker ve bitkisel

yağ içerikli hammaddelerin kullanımını da önemli ölçüde arttırmaktadır. Yapılan tahminlere göre 2008-2010 döneminde üretilen mısırların %11'i biyoetanol üretimi için kullanılırken, bu oran 2020'ye kadar %13'e çıkacaktır. Yine şeker kamışı için de bu oranın %21'den %35'e yükseleceği öngörülmektedir. Benzer bir senaryo biyodizel üretimi için de geçerliliğini korumaktadır. 2008-2010 dönemi temel alındığında, bu dönemde global ölçekte üretilen sıvı yağların %9'luk kısmı biyodizel üretimi için kullanılırken, gelecekti oranın 2020 yılına kadar %16'ya ulaşması beklenmektedir. OECD-FAO tarafından yayınlanan raporlar birinci nesil biyoyakıt kullanımının gıda kaynaklarını ve fiyatlarını önemli ölçüde etkilediğine işaret etmektedir (Ho *et al.* 2014). Bu alanda yapılan yapılan güncel bir çalışma bu raporları desteklemekte ve 2020 yılına kadar zirai ürünlerin fiyatlarında önemli artışların ortaya çıkacağını öne sürmektedir. Bu çalışmaya göre tahıl fiyatlarında %8-34, diğer mahsullerde %9-27 ve temel gıda fiyatlarında da %1-6 oranlarında artışların olabileceği öne sürülmektedir (Ho *et al.* 2014).

Ayrıca çeşitli zirai gübrelerin ve kimyasalların aşırı kullanılması sonucunda su ve toprak kalitesinin azalması da doğrudan birinci nesil biyoyakıtların kullanılmasıyla da ilişkilendirilebilir. Bu duruma Brezilya'da şeker kamışı kaynaklı biyoetanol üretiminin ve Güneydoğu Asya'da palmiye yağı kaynaklı biyodizel üretiminin giderek daha fazla alana yayılması örnek olarak verilebilir. Bu yüzden artan biyoyakıt üretiminin besin üretiminde kullanılabilecek su miktarını azalttığı ve Hindistan gibi su kıtlığı ile karşı karşıya olan ülkelerde mevcut su kaynakları üzerinde olan baskıyı arttırdığı öne sürülmektedir. Birinci nesil biyoyakıt üretimi ve kullanımının diğer olumsuz etkilerine; sera gazı emisyonlarının artışı, hava kirliliğinin artışı, biyoçeşitliliğin azalması ve ormanların yok olması örnek olarak verilebilir (Ho *et al.* 2014).

Gıda kaynaklarından biyoyakıt üretiminin kümülatif çevresel ve sosyo-ekonomik dezavantajları araştırma odaklarını orman döküntüleri, zirai ve kentsel atıklar gibi daha ucuz ve halihazırda bol miktarlarda mevcut olan biyokütle tiplerinin kullanımına yöneltmiştir (Ho *et al.* 2014).

2.2.2.b. İkinci nesil hammaddeler

Artan global enerji ihtiyacını karşılama çabalarına karşı toplum odaklı gıda güvenliği baskısı altında lignoselülozik biyokütleler, düşük karbon salınımını hedefleyen ekonomilere geçişte en temel hammaddeler olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzden ikinci nesil hammaddeler gıda değeri taşımayan lignoselülozik materyallerden oluşmaktadır. Bu materyaller (i) homojenler (örneğin odun talaşı veya enerji mahsullerinin çeşitli kısımları – 100-120 US$/ton), (ii) yarı homojenler (zirai ve orman kalıntıları – 60-80 US$/ton) ve (iii) homojen olmayanlar (düşük değerli kentsel ve endüstriyel katı atıklar – 0-60 US$/ton) olarak üç ayrı grupta sınıflandırılır. Geride kalan birkaç yıl içerisinde bu hammaddelerin potansiyeli ve ikinci nesil teknolojilerin geliştirilmesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte bu süreçlerin ticari olarak yaygınlaşmasından önce halen daha üstesinden gelinmesi gereken bir takım darboğazlar mevcuttur. 2012 yılında, toplam biyoenerji üretiminin 1/3'lük kısmı zirai ve orman kalıntılarından üretilmiştir. Örneğin, Çin 3 milyon litre etanolü mısır koçanlarından üretmiş ve mevcut yakıtlarla karıştırarak kullanmıştır. Yine 2012 yılında Amerika Birleşik Devletleri, aynı alanda önemli gelişmeler kaydetmiş ve lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretme kapasitesini 2 milyon litreye kadar yükseltmiştir. Aynı yılda alınan radikal kararlarla, çoğunluğu askeri alanda kullanılmak üzere bu kapasitenin 2013 yılında 36 milyon litreye yükseltilmesi hedeflenmiştir. Yakın zamanda Avrupa'da da benzer ilkeler çerçevesinde, küçük çaplı üretim yapan model tesisler kurulmuştur (Balat and Balat 2010; Christopher *et al.* 2014; Gupta *et al.* 2014; Ho *et al.* 2014).

Spesifik enerji mahsulleri: Biyoyakıt üretimi için özel olarak geliştirilen ve yetiştirilen enerji mahsulleri çok yıllık çimenleri (örneğin Çin kamışı, dallı darı ve kanarya otu) ve kısa rotasyonlu ağaçları (örneğin söğüt ve kavak türleri) içerir. Bu mahsuller yüksek enerji verimi sağlarken, fakir veya zarar görmüş topraklarda gelişebilirler ve biyokütleleri iki hasat mevsimi arasındaki dönemde depolama koşullarına oldukça dayanıklıdır (Ho *et al.* 2014).

a. Çok yıllık otsu bitkiler: Kuzey Amerika orijinli dallı darı ve Güneydoğu Asya orijinli Çin kamışı bitkileri, düşük sıcaklıklara olan toleransları, nispeten daha az su veya besin elementi ihtiyaçları ve geleneksel tarım yöntemlerinin kullanıldığı çok çeşitli arazilerde gelişebilme yeteneklerinden dolayı Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği ülkelerinde düşük maliyetli biyoenerji üretimi için en iyi seçeneklerdir. Dallı darının olgunlaşması genellikle 3 yıl sürer ve olgunluğunda katı madde verimi 5-19 ton/hektar olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, Çin kamışı da 2-3 yıl içerisinde olgunlaşır ve bu süre içerisinde rizomlarının budanmasına ihtiyaç duyması yönünden diğer hammadde bitkilerinden ayrılır. Bu da üretim maliyetini yükseltecek ek harcamalara yol açarak Çin kamışının biyoetanol üretimi için kullanılmasının yaygınlaşmasını önler. Bununla birlikte, toprakta kalan kısımlar yüksek biyokütle verimiyle büyümeye en az 14 yıl daha devam eder ve bu süre içerisinde yıllık 5-43 ton/hektar verime ulaşılabileceği kaydedilmiştir. Çok yıllık otların biyokütle verimleri iklim, arazi kalitesi, sulama ve gübreleme teknolojilerinin kullanım stratejileri gibi yerel şartlar ile doğrudan bağlantılıdır (Ho *et al.* 2014).

İkinci nesil biyoetanol üretimi çalışmalarında kullanılma potansiyeli olan diğer otsu bitkiler ise ılıman bölgeler için kanarya otu, dev kamış ve yonca iken tropik ve sub-tropik bölgeler için bana otu, napier çimi ve süpürge darısı olarak sıralanabilir. Bu çok yıllık otların ekimi ayrıca karbon salınımı ve toprak stabilizasyonu üzerine de olumlu etkiler gösterir ve böylelikle yapılacak kontrollü ekimlerle erozyonun önlenmesine yardımcı olunacağı, doğal yaşamın korunacağı ve su kalitesinin arttırılacağı öne sürülmektedir. Örneğin yonca ve mısırın birlikte ekilmesinde olduğu gibi, çok yıllık otlarla bir yıllık gıda bitkilerinin birlikte ekilmesinin arazi kullanımını geliştirdiği ve ürün verimini arttırdığı bilinmektedir (Ho *et al.* 2014).

b. Kısa devirli orman ürünleri: Bazı hızlı gelişen ağaç türleri; yüksek biyokütle verimleri, dünya üzerinde geniş dağılım göstermeleri, düşük maliyetleri ve çok yıllık otsu bitkilere nazaran daha az iş gücü gerektirmeleri gibi özelliklerinden dolayı ikinci nesil biyoetanol üretimi için önemli potansiyele sahiptir. Bu ağaçlar içerisinde ılıman bölgelerde daha bol bulunan kavak ve söğüt türleri ile daha çok tropik bölgelerde yayılış

gösteren okaliptüs türleri ön plana çıkmaktadır. Kavak ve söğüt türleri yaklaşık 3-4 yıl içerisinde olgunluğa ulaşır ve yıllık katı biyokütle verimi yaklaşık olarak 8-10 ton/hektar civarındadır. Buna karşın okaliptüs türlerinin olgunlaşması 4-6 yıl sürer ve yıllık ortalama verim 12 ton/hektar olarak hesaplanmıştır. Her ne kadar çok yıllık otsu bitkiler ve kısa devirli orman ürünlerinin kullanımı, bir yıllık zirai ürünlerin kullanımına göre çok daha avantajlı gibi görünse de, bu bitkilerin yetiştirilmesi için halen daha ekilebilir arazilere ihtiyaç duyulmaktadır ve bu durum da gıda ve yakıt kaynakları arasındaki rekabetten henüz tam anlamıyla kaçınılamadığını açıkça ortaya koyar. Bu bitkiler ancak, gıda değeri taşıyan zirai bitkilerin yetişmesine elverişli olmayan alanlarda yetiştirildikleri zaman çok daha yararlı olabilmektedirler (Ho *et al.* 2014).

c. Jatrofa: Jatrofa (*Jatropha curcas*) daha ucuz biyodizel üretimi için ümit vaat eden en önemli biyokütle kaynaklarından birisidir. Tropik Amerika'ya özgü olan bu bitki, vasfını yitirmiş arazilerde ve marjinal bölgelerde iyi gelişen, kuraklığa oldukça dayanıklı bir ağaç türüdür ve tohumlarında yaklaşık olarak %40 oranında yağ içerir. Bu yüzden gelimekte olan ülkelerin yarı kurak veya sapa arazilerini değerlendirmek için kullanılabilir. Son 10 yıl içerisinde, her yıl yaklaşık olarak 1,5-2 milyon hektar verimsiz alan Jatrofa ile ağaçlandırılmıştır. 2015 verilerine göre toplam ekim alanının 13 milyon hektara ulaştığı ve bunun %73'ünün Hindistan'da, %21'inin Güneydoğu Asya'da ve %6'lık kısmının da Afrika'da olduğu bildirilmiştir. Jatrofa yağı, biyodizele transesterifikasyonu yapılmaksızın da yerel araçlarda, dizel jeneratörlerde ve pişirme fırınlarında kullanılabilir. Yine biyodizel üretiminde kullanılabilecek diğer popüler türelere; pongamia, mahua, Hint yağı otu ve keten tohumu örnek olarak verilebilir (Ho *et al.* 2014).

Zirai ürün ve orman kalıntıları: Zirai üretimler sonrasında tarlalarda kalan atıklar ve orman kalıntıları herhangi bir ilave kültivasyon alanına gerek kalmaksızın biyoyakıt üretiminde kullanılabilecek muazzam bir biyokütle stoku oluştururlar. Zirai kalıntılar temelde buğday sapı, mısır kalıntıları (yapraklar, sap ve koçanlar) ve küspelerden oluşur. Orman kalıntıları ise tomruk kalıntılarından, yakacak odun parçalarından ve odun işleme süreçleri artıklarından oluşmaktadır. Dünya genelinde her yıl yaklaşık

olarak 5,1 milyar ton zirai kalıntının ve 501 milyon ton orman kalıntısının üretildiği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte bu miktarın yalnızca %10-25'lik kısmı biyoenerji üretimi için kullanılmaktadır. Bu yüzden mevcut kaynakların teknik potansiyelleri enerji bakımından 100 EJ/yıl ve maliyet bakımından da 2-3 USD$/GJ olarak hesaplanmaktadır. Biyokütle kalıntıları genel özellikleri ve kimyasal kompozisyonları bakımından oldukça farklılıklar göstermektedirler. Bununla birlikte temel bileşenlerini selülozik polisakkaritler (%35-50 heksozlar), hemiselülozlar (%20-35 oranında heksoz ve pentoz içeren bir karışım) ve lignin oluşturur. Bu komponenetler hidrolize karşı birinci nesil hammaddelerde bulunan yağ, nişasta ya da şekerlere göre daha dayanıklıdır ve bu durum lignoselülozik içerikli bu atıkların konversiyon süreçlerini daha karmaşık ve daha maliyetli yapar (Ho *et al.* 2014).

Kentsel ve endüstriyel atıklar: 2012 yılında dünya genelinde, başta kağıtlar, kartonlar ve plastikler olmak üzere çok çeşitli materyallerden oluşan yaklaşık 1,3 milyar ton kentsel katı atığın (MSW: municipal solid waste) üretildiği bildirilmiştir. Her ne kadar MSW içeriği oldukça fazla değişkenlik gösterebilse de bu kütlelerin büyük kısmının çözünebilen ve önemli kalorifik değerlere sahip bileşenlerden oluştuğu bilinmektedir. Bu durum MSW'yi enerji geri dönüşümü uygulamaları için uygun bir aday yapmaktadır. 1 ton MSW'den yaklaşık olarak 8-12 Gj enerji elde edilebilir. Bu miktar 1 ton kömürden elde edilebilecek enerjinin 1/3'üne eşittir ve bu enerjiyle yaklaşık 600 kWh elektrik üretilebilir. Ayrıca gıda ve kağıt endüstrileri de, çok yüksek miktarlarda biyoenerji üretiminde kullanılabilecek atık biyokütleler ve yan ürünler üretmektedir. Endüstriyel katı atıklar da yine biyoenerji üretiminde kullanılabilecek kabukları, çürük meyve artıklarını, sebze artıklarını, et ve süt ürünlerinin atıklarını, şeker ve nişasta üretimlerinden arta kalan küspe ve lifleri, kahve telvelerini ve daha bir çok değişik biyokütle kaynağını kapsar. Atıklardan enerji üretilmesi yaklaşımı güncel atık yönetimi uygulamalarıyla doğrudan ilişkilidir. Bu uygulamalar özellikle çöplerdeki maddelerin geri kazanımı, yeniden kullanımı, geri dönüştürülmesi ve azaltımı gibi ilkeleriyle, çöpleri kent merkezlerinden uzaklara gömmeyi kapsayan geleneksel atık yönetimi uygulamalarından açıkça ayrılır (Ho *et al.* 2014).

Kentsel ve endüstriyel atıklardan çeşitli biyoyakıtların üretilmesi, fosil yakıtların yerini alabilecek yeni teknolojilerin geliştirilmesine olanak sağlaması ve çöpler için ayrılan alanların geri kazanımı ya da sera gazı emisyonlarının azaltılmasını sağlaması yönünden oldukça dikkat çekicidir (Ho *et al.* 2014).

2.2.2.c. Üçüncü nesil hammaddeler

Alglerin biyoyakıt üretiminde kullanılabilecek biyokütlelerin üretilmesindeki potansiyelleri uzun zamandır bilinmektedir. Algler genel olarak deniz kıyılarında, tuzlu sularda, şehirlerin atık sularında ya da ziraat veya çiftçilik için uygun olmayan karasal alanlarda hızla yetişebilen fotosentetik mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Bu organizmalar ışık enerjisi ve karbondioksiti kullanarak çeşitli hücresel reaksiyonlar sonucunda karbohitratlar, proteinler, lipitler, vitaminler ve pigmentler gibi kimya ve ilaç endüstrilerinde, kozmetikte, sağlık uygulamalarında ve gıda sanayinde çok çeşitli kullanım alanı olan bir çok kimyasalı üretirler. Mikroalg türleri çoğunlukla TAG gibi lipitleri biriktirirler. *Botryococcus* ve *Chlorella* gibi türler yüksek lipit içeriğine (%50-80) sahiptir ve biyodizel üretimi için kullanılabilirler. Yine bazı mikroalgler ve *Chlamydomonas* sp., *Cyanothece* sp. ve *Spirulina platensis* gibi bazı siyanobakteriler yüksek oranda karbohidrat depolarlar ve bunun fermantasyonu sonucunda biyoetanol üretilebilir (Chen *et al.* 2011; Costa and de Morais 2011; Pittman *et al.* 2011; Ho *et al.* 2014).

Algler 2-5 gün içerisinde kendi biyokütlelerini iki katına çıkarabilir ve bu durum yılda bir ya da iki kez hasat yapılabilen diğer biyokütle kaynaklarıyla kıyaslandığında oldukça avantajlıdır. *Pleurochrysis carterae* yılda 60 ton/hektar kuru madde verimine kadar ulaşabilir ve bundan yaklaşık olarak 20 ton yağ elde edilmesi mümkündür. Bu oran, bilinen en verimli yağ bitkisi olan palmiye yağının veriminden 5 kat daha fazladır. Ayrıca alglerle lignin bulunmaz ve hemiselülozların miktarı da oldukça azdır. Bu avantajlı yapılanma hidroliz ve fermantasyon verimini arttırırken süreç maliyetini de önemli ölçüde düşürür. Alg biyokütlelerin biyodizel ve biyoetanolün haricinde de çeşitli yakıt türlerinin üretilmesine olanak sağlamaları açısından da ilgi çekicidirler. Bunların

en göze çarpan örnekleri yakıt hücrelerinde kullanılabilen biyohidrojen ve taşımacılıkta, elektrik üretiminde veya ısı üretimi amacıyla kullanılabilen biyometandır (Chen *et al.* 2011; Costa and de Morais 2011; Pittman *et al.* 2011; Ho *et al.* 2014; Li *et al.* 2014).

Tüm bu avantajlara rağmen algal biyokütlelerden üretilen biyoyakıtların ticarileşmesi ve yaygın bir şekilde kullanılabilmesi için halen daha aşılmayı bekleyen çok sayıda darboğaz vardır. Bunlara örnek olarak algal kültivasyon koşullarının optimize edilmesi, üretim teknolojilerinin geliştirilmesi, fotobiyoreaktör tasarımlarının iyileştirilmesi ve daha verimli ürün ayrıştırma tekniklerinin araştırılması gerekliliği sıralanabilir. Mikroalglerin kültivasyonu bu süreçlerin ticarileştirilmesinin önündeki en önemli engeldir. Genellikle kültivasyon düşük maliyetli olan açık sistemlerde yapılır. Ancak bu durumda biyokütle verimi de az olmaktadır. Öte yandan kapalı biyoreaktörlerin ya da hibrit sistemlerin kullanılmasıyla biyokütle verimi arttırılmaktadır. Ancak bu durumda da süreç maliyeti arttığından bu yöntem gerçek bir çözüm olamaz. Bu yüzden mevcut durumda yatırım maliyeti ve algal biyokütle verimi arasında kesin bir çelişki vardır. Buna ek olarak alg türleri ve bunların çeşitli ırkları arasında; gelişme oranı, verimlilik, fotosentetik verim, besin ihtiyacı ve olumsuz koşullara adaptasyon yeteneği bakımından oldukça fazla çeşitlilik gözlenmektedir. Biyoyakıt üretiminde kullanılacak ticari alg ırkının seçiminde ki en önemli kriter yüksek karbohidrat ve lipid içerikli biyokütle veriminin ideal olmasıdır. Buna karşın, lipid üretiminin maksimize edilmesi için genellikle hücre büyümesi ve fotosentezin kısıtlanması gerekmektedir. Bu da total verimin düşmesine sebep olur. Bu sorunun aşılmasında genetik modifikasyonlardan ve çeşitli gen manipülasyonlarından yararlanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca üretim sonrasını kapsayan işleme süreçlerinin ve ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi de üçüncü nesil hammaddelerden üretilen yakıtların gelecek yıllarda yaygın olarak kullanılmasına katkıda bulunacaktır (Ho *et al.* 2014).

2.3. Lignoselülozik Hammaddelerin Yapısal Organizasyonu

Doğadaki çok çeşitli bitkisel biyokütleler, buğday sapı, pirinç sapı, küspe, pamuk kozası ve buğday kepeği gibi tarımsal atıklar lignoselüloz yönünden oldukça zengindir. Bu

yapı temelde selüloz, lignin, hemiselüloz ve çeşitli ekstraktivlerden oluşur. Burada selüloz bir iskelet oluşturur. Bu iskelet hemiselülozlar tarafından kuşatılır ve daha dışta bir matriks görevi üstlenen lignin ve çeşitli kaplama materyalleri yer alır. Dolayısıyla hücre duvarı polisakkaritleri klasik olarak selüloz, hemiselüloz, pektik polisakkaritler, proteinler ve diğer çeşitli bileşenler olmak üzere bazı spesifik alt gruplar halinde sınıflandırılabilir (Saini *et al.* 2015a).

2.3.1. Selüloz

Bitki hücre duvarının temel yapısal komponenti olan selüloz, anhidroz glukoz ünitelerinden oluşan (500-1500) lineer bir homopolisakkarittir. Bu yapıda üniteler birbirine ß-1,4-glikozidik bağları ile bağlanırlar ve yapının tekrar eden en küçük birimi sellobiyozdur. Glikozidik bağlardaki ß-1,4 oryantasyonu intramoleküler ve intermoleküler hidrojen bağlarının oluşumuna olanak sağlar. Bu durum doğal selülozun yüksek kristalin, çözünmez ve enzim ataklarına karşı dirençli yapıda olmasını sağlar (Saini *et al.* 2015a).

2.3.2. Hemiselüloz

Hemiselüloz 50-200 birimlik pentozların (örneğin D-ksiloz ve L-arabinoz) ve heksozların (örneğin D-mannoz, D-galaktoz ve D-glikoz) kısa ve çok dallanmış bir polimeridir. Yapının asetat grupları şeker halkalarının hidroksil gruplarına ester bağlarıyla rasgele düzende bağlanmıştır. Hemiselülozun yapıdaki görevi lignin ve selüloz arasında bir bağ kurmaktır (Saini *et al.* 2015a).

2.3.3. Pektik maddeler ve proteinler

Pektik polisakkaritler birincil hücre duvarının yaklaşık %35'ini oluşturur ve bunların büyük çoğunluğu galaktosiluronik kalıntılarıdır. Bu yapının diğer temel komponentleri arasında ramnoz, arabinoz ve galaktoz sayılabilir. Buradaki pektik maddeler hidrofiliktir ve bu yüzden önemli adhezif özellikler gösterirler (Saini *et al.* 2015a).

Proteinler bitki hücre duvarı komponentleri arasında en az dikkat çekici olanlarıdır. Çoğunlukla lignin ile polisakkaritler arasında kovalent çapraz bağlarla bağlanmış halde bulunurlar (Saini *et al.* 2015a).

2.3.4. Fenolik maddeler

Bitki hücre duvarlarında bulunan fenolik maddeler lignin, taninler ve fenolik asitler olmak üzere üç grup altında toplanır. Lignin, temel aromatik komponentleri trans-koniferil, trans-sinapil ve trans-koumaril alkoller olan heterojen, amorf ve yapısında çapraz bağlar içeren bir polimerdir. Lignin farklı hemiselülozların yan gruplarına kovalent bağlarla bağlanır ve selüloz mikrofibrillerini kuşatacak kompleks bir matriks oluşturur. Bitki hücre duvarlarında lignin oranı %2-40 arasında değişmektedir. Lignin yapısında güçlü karbon-karbon (C – C) ve eter (C – O – C) bağlantılarının varlığı bitki hücre duvarlarına dayanıklılık ve selülolitik mikroorganizma ataklarına karşı koruma sağlar (Saini *et al.* 2015a).

Diğer bir grubu oluşturan taninler, yüksek moleküler ağırlığa sahip (500-3000) polifenolik maddelerdir. Bu maddeler ya hidroksiflavanlar, lökoanthosiyanidin (flavan-3,4-diol) ve kateşin (flavan-3-ol) ya da glukozdan türevlenir (Saini *et al.* 2015a).

Son grup olan fenolik asitler ise bitki hücre duvarlarındaki lignin çekirdeğinin yapısal komponentleridir. Fenolik asitlerde karboksil ve fenolik grupların varlığı, böyle maddelerin lignin ve karbohidratlara eter ya da ester bağlarıyla bağlanmasını sağlar (Saini *et al.* 2015a).

2.4. Lignoselülozik Materyallerden Biyoetanol Üretim Süreci

2.4.1. Ön işlem

Lignoselülozik materyallerin daha iyi kullanılabilmesi için uygulanan ön işlemler fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik olmak üzere 4 gruba ayrılır. Bu 4 temel ilkenin kombinasyonuyla da çok sayıda yeni yöntem türetilebilmektedir (Mood *et al.* 2013).

2.4.1.a. Fiziksel ön işlem

Ezme, öğütme, rendeleme, dondurma ya da radyasyonla muamele etme gibi fiziksel önişlemlerin amacı lignoselülozik materyallerin yüzey alanlarının artırılması ve partikül boyutlarının düşürülmesidir. Ayrıca bu yöntemler hammaddelerin polimerizasyon ve dekristalizasyon seviyelerinin düşmesine-azalmasına yol açar. Günümüzde fiziksel yöntemler ile diğer yöntemlerin kombine edilerek kullanılması oldukça yaygındır (Harun *et al.* 2011; Mood *et al.* 2013).

Öğütme: Öğütme genellikle önişlemlerin ilk adımı olarak tanımlanır. Biyoeteanol üretim süreçlerinde kullanılan bazı öğütme tiplerine topla öğütme, ikili merdane ile öğütme, çekiçle öğütme, kolloid ile öğütme yöntemleri örnek olarak verilebilir. Biyoetanol üretim süreçlerinde elde edilecek nihai partikül boyutu uygulanacak fiziksel önişlemlerin tipine bağlıdır. Örneğin rendelemenin ardından partikül boyutu 10-30 mm'ye düşerken, öğütmenin ardından 0,2-2 mm'ye kadar düşer (Sun *et al.* 2002). Öğütme işlemindeki en büyük dezavantaj yüksek enerji gereksinimidir. Bunun üstesinden gelebilmek için, son yıllarda daha az enerji gereksinimi olan ıslak disk öğütme metodu geliştirilmiştir. Buna karşın topla öğütülmüş bazı biyokütlelerin enzim hidrolizi basamağında ıslak disk metoduyla işlenmiş olanlara nazaran daha yüksek verimde glukoz ve ksiloz açığa çıkarmaları yöntemin kullanışlılığının sorgulanabileceğine işaret etmektedir (Mood *et al.* 2013). Örneğin Hideno *et al.* (2009) çalışmalarında ıslak disk ve topla öğütme metotlarıyla ön işleme tabi tuttukları pirinç

saplarının enzimatik hidroliz sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmaya göre ıslak diskle öğütme metoduyla önişlem görmüş pirinç saplarında bulunan glikozun %78,5'i ve ksilozun %41,5'i kazanılabilirken, topla öğütülmüş olanlarda glikozun %89,4'ü ve ksilozun %54,3'ü kazanılabilmiştir (Hideno *et al.* 2009; Sant'Ana da Silva *et al.* 2010).

Sant'Ana da Silva *et al.* (2010) çalışmalarında şeker kamışı küspesinin önişleminde topla öğütme ve ıslak diskle öğütme metotlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada, optimum koşullarda topla öğütme sonucunda glikoz kazanımının %78,7 ve ksiloz kazanımının %72,1 olduğu buna karşın ıslak disk ile öğütme sonucunda bu oranların sırasıyla glikoz için %49,3'e ve ksiloz için %36,7'ye düştüğü görülmüştür.

Ekstrüzyon (Sıkma): Ekstrüzyon materyallerin karıştırıldığı ısıtıldığı ve yapılarında fiziksel ve kimyasal değişimlere olacak kırpılmaların yapıldığı termo-fiziksel bir önişleme yöntemidir. Bu yöntemin öne çıkan avantajları için yüksek kırpılma oranı, hızlı karışım, kısa süreç periyodu, ortalama sıcaklık ihtiyacı, furfural ve HMF gibi inhibitörlerin oluşmaması, yıkama ve ortam optimizasyonlarına ihtiyaç duyulmaması, çeşitli modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaması, sistemin kolayca işletilebilmesi ve en önemlisi sürekli (devamlı) uygulamalara uyumlu olması özellikleri örmek olarak sayılabilir (Mood *et al.* 2013). Dahası, esktrüzyon atık oluşmaması ve bunun sonucunda atık maddelerin uzaklaştırılması için maliyet gerektirmemesi ve katı madde kaybının yaşanmaması açısından da avantajlıdır. Yoo *et al.* (2011) yaptıkları çalışmada soya fasulyesi kabuklarını esktrüzyon ile önişleme tabi tutmuşlar (350 rpm, maksimum 80°C ve %40 nem) ve enzimatik hidrolizden sonra %94,8 glukoz verimine (biyokütleden glukoz verimi: 0,37 g/g) ulaşmışlardır.

Mikrodalga uygulaması: Mikrodalga uygulamaları selülozun ultra yapısının değiştirilmesi, lignin ve hemiselülzoun degrade edilmesi veya kısmen uzaklaştırılması, silikatlaşmış mumsu katmanın parçalanması ve nihayetinde şekerlerin indirgenmesinde enzimatik duyarlılığın arttırılması için konvensiyonel ısı yöntemlerinin alternatifi olabilir. Teknik olarak konvensiyonel ısıtma yüzeysel ısı transferi temeline dayanır. Ancak mikrodalga uygulamasında ısı doğrudan ısıtılan obje ve uygulanan

elektromanyetik alanın etkileşiminden üretilir. Daha spesifik olarak, mikrodalga uygulaması temelde dielektrik polarizasyondan kaynaklanan moleküler çarpışma vasıtasıyla selülozik yıkıma sebep olur. Bu metodun avantajları kısa süreç zamanı, yüksek verim ve seçicilik ve konvensiyonel ısıtmaya nazaran daha düşük enerji ihtiyacı olarak sıralanabilir (Cheng *et al.* 2011; Mood *et al.* 2013).

Dondurma: Son zamanlarda geliştirilen bir diğer yöntem biyokütlenin dondurulmasıdır ve özellikle pirinç sapının enzimatik duyarlılığını önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. Yüksek maliyeti ve günümüze kadar yeterli çalışmanın yapılmadığı göz önünde bulundurulduğunda, çevreye zararlı etkilerinin oldukça az olması, daha tehlikesiz kimyasalların kullanılabilmesine olanak sağlaması ve yüksek verimli olması gibi özellikleri oldukça dikkat çekicidir (Mood *et al.* 2013).

2.4.1.b. Kimyasal ön işlem

Asit ile ön işlem: Asit ile önişleme, özellikle de sülfürik asit ile önişleme lignoselülozik biyokütlelerin önişleme süreçlerinde kullanılan en yaygın kimyasal yöntemdir. Bu işlemde polisakkaritler (genellikle hemiselülozlar) monosakkaritlere hidroliz olurlar ve bu durum selülozu enzim hidrolizi için daha ulaşılabilir yapar. Asitle muamele hem düşük hem de yüksek asit konsantrasyonlarında yapılabilir. Yine bu işlem hem düşük hem de yüksek sıcaklıklarda uygulanabilir. Yüksek konsantrasyonda asit kullanımı düşük sıcaklıklarda etkin olduğu için daha ekonomiktir. Buna karşın, toksisite, ekipmanların korozyana uğraması, glukoz gibi monosakkaritlerin degrade olması ve çeşitli fermantasyon inhibitörlerinin oluşması (HMF: 5-Hydroxy methyl-furfural ve 2-furfuraldehit) bu yöntemin önemli dezavantajlarıdır (Almeida *et al.* 2007; Pedersen *et al.* 2010). Dahası, oluşan furfural gibi inhibitörler yüksek sıcaklıklarda formik ve levulinik asit gibi istenmeyen başka ürünlere de parçalanabilirler. Endüstriyel olarak dilüe asit kullanımı fermantasyon inhibitörlerinin daha düşük oranlarda oluşması yönünden daha caziptir. Bu sebeple literatürde dilüe asit kullanımına odaklanan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Örneğin, pirinç sapı %1'lik sülfürik asit ile 1-5 dakika 160-180°C'de önişlemden geçirilmiş ve ardından enzimatik hidrolize tabi tutulmuştur.

Bu çalışmanın azami şeker eldesi %83 olarak hesaplanmıştır. Bir başka çalışmada kolza sapları sülfürik asit ile 10 dakika 180°C'de önişleme tabi tutulmuş ve %75,12 ksilan ile %63,17 glukoz elde edilmiştir. Bunlar daha sonra enzimatik hidroliz ile ksiloz ve glukoza dönüştürülmüştür. Redding *et al.* (2011) çalışmalarında Bermuda sahil çimenini %1,2'lik sülfürik asit ve toplam şeker kazanımını %94'e yükseltmiştir.

Bu uygulamalarda kullanılan bir diğer asit ise lignini çözünebilir fragmentlere dönüştürebilen perasetik asittir. Buna karşın bu asit konsantre haldeyken patlayıcıdır ve oldukça pahalıdır. Rocha *et al.* (2011) çalışmalarında bir sülfürik asit ve asetik asit karışımını şeker kamışı küspesinin önişleminde kullanmıştır. Bu karışım %1 sülfürik asit ve %1 asetik asit içermektedir. Katı-sıvı oranları ise 1,5:10 ve 1:10 olarak belirlenmiştir. Uygulama 190°C'de 10 dakika yapılmıştır. Bunun sonucunda hemiselülozun %90 oranında uzaklaştırıldığı ve selüloz degradasyonun %15'in altında kaldığı gözlenmiştir.

İnorganik asitlere ilaveten bu çalışmalarda maleik ve fumarik asit gibi odaganik asitlerde kullanılabilir. Güncel bir çalışmada bu durumu değerlendirilmesi için buğday sapı sülfürik asitin yanı sıra maleik ve fumarik asitlerle de muamele edilmiş ve sonuçlar kıyaslnarak organik asitlerin de lignoselülozik materyallarin önişlemlerinde kullanılabileceği gösterilmiştir (Kootstra *et al.* 2009; Mood *et al.* 2013).

Alkali ön işlem: Bu işlemin en dikkat çekici avantajları selüloza sakarifikasyon enzimlerinin erişimini kısıtlayan lignin, asetil grupları ve çeşitli uronik asit türevlerinin uzaklaştırılmasını sağlamasıdır. Bu metotta selüloz ve hemiselülozun çözünme oranı asit ya da hidrotermal tekniklere kıyasla daha azdır. Bu metot ayrıca fibröz selülozun kimyasal olarak şişmesine (kabarmasına) sebep oluır. Burada saponifikasyon (sabunlaşma) ve ayrıştırma reaksiyonları meydana gelir. Bu reaksiyonlar hemiselüloz ve öteki komponentler arasındaki çapraz bağların kırılmasına ve nihayetinde biyokütlenin yapısındaki gözeneklerin artmasına sebep olurlar. Daha spesifik olarak, lignin ve ksilan çapraz ester bağları yıkılır ve bu durum delignifikasyonla sonuçlanır. Kıyaslanacak olursa, alkali önişlem daha düşük sıcaklıklarda işlevseldir ve uygulanması için

kompleks reaktörlere ihtiyaç duymaz. Bu durum basit çitliklerde bile kullanılabilmesine olanak sağlar. Öte yandan işlemin daha uzun sürmesi (saatler veya günler) ve elde edilen ürünün işlenmeden önce nötralize edilmesi gerekliliği en önemli teknik sorunlardır. Bu yöntemde en sık kullanılan kimyasallar sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, kalsiyum hidroksit ve amonyumdur (Mood *et al.* 2013). Wan *et al.* (2011) soya fasulyesi saplarını NaOH ile (4-40 g/100g kuru soya fasulyesi sapı) kontrollü ortam şartlarında muamele etmiş ve %64,55 oranında glikoz elde etmiştir. Bu çalışmada ayrıca ksilan gideriminin de %46,37'ye yükseltilebileceği gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada Bermuda sahil çimeni %0,75 NaOH ile muamele edilmiş ve toplam şeker indirgenme verimi %71 olarak belirlenmiştir. Buna ilaveten glukan ve ksilaz dönüşüm ortalamaları sırasıyla%90,43 ve %65,11 olarak bildirilmiştir (Mood *et al.* 2013).

Güncel bir çalışmada ise daha ekonomik bir süreç geliştirmek maksadıyla NaOH ve $CaOH_2$ kombinasyonu çimenlerin önişleminde kullanılmış ve ortalama glukoz eldesi %59,4 ve ortalama ksiloz eldesi %57,3 olarak belirlenmiştir (Wang *et al.* 2010).

İyonik Çözelti Uygulaması: Son yıllarda lignoselülozik iyonik çözelti temelli biyokütlelerin önişlemlere tabi tutulması oldukça popüler olmuştur. Bu çözeltiler karbohidratları ve lignini kendiliğinden çözebilirler. İyonik çözeltiler erime noktaları 100°C'nin altında olan, katyon ve anyonlardan oluşan organik tuzlardır. Bunlar genellikle büyük organik katyonları ve küçük inorganik iyonları içerir. Gerçekte, katyon yapısı (simetri, alkil gruplarının uzunluğu hidrofobik grupların varlığı vb.) ve anyon yük delokalizasyonunun derecesi iyonik çözeltilerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini etkileyen en önemli iki faktördür. Genellikle lignoselülozik materyal ve kullanılan iyonik çözelti arasındaki etkileşimi belirleyen temel faktörler katyonlar, anyonlar, sıcaklık ve süreç zamanı olarak sıralanabilir. Selüloz kuvvetli hidrojen bağlarının oluşumuna yol açan klorit, farmat, asetat veya alkil fosfonat içeren iyonik çözeltilerin kullanılmasıyla çözülebilir. Diğer bir deyişle, hidrojen bağları iyonik çözeltilerin non-hidrat iyonlarıyla şekerlerin hidroksil protonları arasında oluşur ve bu durum selüloz, hemiselülozlar ve lignin arasındaki karmaşık ağı bozar (Mood *et al.* 2013). Araştırılan iyonik çözeltiler arasında 1-allyl-3-methylimidazolium-chloride

([AMIM]Cl), 1-ethyl-3-methylimidazolium-acetate ([EMIM]Ac), 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM]Cl) ve 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate ([EMIM]DEP) yüksek selüloz çözme yeteneklerinden dolayı özellikle dikkat çekmektedir (Zavrel *et al.* 2009).

Güncel bir çalışmada çimen [EMIM]Ac kullanılarak işlenmiş ve %50,4-%67,7 oranlarında glukan elde edilmiştir. Ayrıca aynı iyonik çözeltinin çimende 160 °C'de 3 saatlik uygulama sonunda %69,2'lik lignin olduğu bulunmuştur (Li *et al.* 2010). Yine bir başka çalışmada [BMIM]Cl'nin de en iyi selüloz çözücülerinden biri olduğu rapor edilmiştir (Swatloski *et al.* 2002). Benzer bir başka çalışmada, palmiye yaprakları [BMIM]Cl ile muamele edilmiş ve selüloz kristalinitesinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Tan *et al.* 2010). Literatürde lignin için en iyi çözücüler olarak 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ve 1,3-dimethylimidazolium methylsulphate iyonik çözeltileri verilmektedir (Mood *et al.* 2013).

Her ne kadar iyonik çözelti uygulamasından sonra biyokütle yapısında önemli değişimler meydana gelse de içerikte temel olarak çok az bir farklılığın oluştuğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin herhangi bir işlem görmemiş palmiye yapraklarının lignin, hemiselüloz ve selüloz içeriklerinin sırasıyla %27, %36 ve %37 olduğu ölçülmüş ve bu değerlerin iyonik çözelti muamelesinden sonra yine sırasıyla %27, %34 ve %39 olarak ölçüldüğü bildirilmiştir. Bu durum iyonik çözelti muamele sonrası elde edilen selülozun selülazlar tarafından degradasyona çok daha duyarlı olan amorf ve poröz yapıda olmasıyla açıklanabilir (Mood *et al.* 2013).

Diğer konvensiyonel metotlarla kıyaslandığında iyonik çözelti kullanmanın avantajları daha az tehlikeli süreç şartlarına sahip olması, daha tehlikesiz kimyasalların kulanılması, çözeltinin çok daha geniş sıcaklık aralıklarında sıvı olarak kalabilmesi, düşük buhar basıncından dolayı yeşil kimya ürünü olarak değerlendirilmesi ve yüksek kimyasal ve termal stabilite göstermeleri şeklinde sıralanabilir. Bunun yanı sıra iyonik çözeltilerin türevlendirme potansiyeli yoktur, daha ılımlı koşullarda fonksiyoneldirler ve kolaylıkla geri dönüştürülebilirler. Öte yandan iyonik çözeltilerin selülözlar üzerine

olan negatif etkileri bilinen en önemli dezavantajlarından birisidir. İyonik çözeltilerin uygulanmasındaki en önemli faktör viskozitedir. Düşük viskozite selülozun daha düşük sıcaklıklarda çözülmesine ve bu sayede enerji tüketiminin azaltılmasına olanak sağlar (Mood *et al.* 2013).

İyonik çözeltilerin endüstriyel ölçekte uygulamalarını kısıtlayan en önemli üç handikap: a) günümüzde oldukça pahalı olan bu çözeltilere çok büyük miktarlarda ihtiyaç duyulması b) saf iyonik çözeltilerin geri kazanılmasının çok yüksek enerji gerektirmesi ve c) uygulama sırasında çözeltinin viskozitesinin artması ve işlemlerin zorlaşması olarak sıralanabilir. Fu and Mazza (2011) bu handikapların giderilmesi için iyonik çözeltilerin sulu karışımlarının kullanılmasını önermiştir. Yaptıkları çalışmalarda bu sayede gerek duyulan iyonik çözelti miktarını azaltmış, viskoziteyi önemli ölçüde düşürmüş ve evoparosyon veya ters osmoza gerek duymaksızın kolayca iyonik çözeltiyi geri kazanabilmişlerdir (Mood *et al.* 2013).

Organosolv (organik çözelti) uygulaması: Metanol, etanol, aseton etilen glikol ve tetrahydrofurfuril alkol gibi organik çözücüler bir katalizör eklenerek veya eklenmeyerek organosolv uygulama süreçlerinde kullanılabilirler. Burada kullanılacak katalist organik ya da inorganik asitler (hidroklorik asit ve sülfürik asit) veya bazlar (sodyum hidroksit, amonyak ve kireç) olabilir. Bu önişleme metodu lignin ve hemiselülozda bulunan iç bağları kırabilir ve bu yüzden özellikle lignin içeriği yüksek lignoselülozik biyokütlelerin işlenmesi için uygundur. Ayrıca bu süreç sonunda oldukça saf ve yüksek kaliteli lignin yan ürün olarak elde edilir. Bilindiği gibi lignoselülozik materyallerin yapısından ligininin uzaklaştırılması yapıda bulunan selülozu enzim uygulamaları için daha ulaşılabilir yapar. Bu yöntemin önemli dezavantajları için ise organik çözeltilerin düşük kaynama sıcaklıkları, yüksek basınç altında gerçekleştirilecek uygulamalar için büyük risk oluşturmaları, yanıcı özellikte olmaları ve kolayca buharlaşabilmeleri gibi maddeler sıralanabilir. Buna ilaveten işletim maliyetini düşürmek ve enzimatik hidroliz basamağı ya da mikroorganizmalar üzerine olabilecek inhibitör/olumsuz etkilerin önlenebilmesi için çözücüler geri kazanılmalı veya ortamadan uzaklaştırılmalıdır (Mood *et al.* 2013). Koo *et al.* (2011) yaptıkları

çalışmalarda *Liriodendron tulipifera*'yı sodyum hidroksit katalizörlüğünde etanol ile muamele etmiş ve glukan kaybını minimize etmeyi başarmıştır. Benzer bir başka çalışmada da Pinus radiata 195°C'de 2,0 pH seviyesinde aston-su (1:1) karışımı ile 5 dakika muamele edilmiş ve süreç sonunda %99,5 oranında etanol üretilmiştir (Araque *et al.* 2008).

Ozonoliziz: Bu önişlemde lignin ve hemiselülozları parçalamak ve selüloz biyodegradasyonunu arttırmak için ozon gazı oksidant olarak kullanılır. Ozonun en temel avantajı güçlü bir oksidant olması ve suda kolayca çözünebilmesidir. Ozon ayrıca lignini daha düşük moleküler ağırlığa sahip asetik asit ve formik asit gibi çözünebilir maddelere de parçalar. Williams (2006) çalışmasında mısır bakterilerini ozonolizis ile işlenmiş %49 lignin degradasyonu yapmayı başarmıştır. Bu bulgular daha sonra Garcia-Cubero *et al.* (2009) tarafından yapılan bir diğer çalışma ile de desteklenmiştir. Bu çalışmada ozonolizise tabi tutulan buğday ve çavdar saplarının enzimatik hidroliz sonuçlarıyla muamele görmemiş sapların enzimatik hidroliz sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçta ozonolizis görmüş buğday sapının veriminin %86 ve çavdar sapının ise %57, buna karşın herhangi bir işleme tabi tutulmamış olan buğday sapının veriminin %29 ve çavdar sapının veriminin ise %16 olduğu gösterilmiştir. Bu metodun en önemli avantajı yan ürün degradasyonunun olmamasıdır. Bu da ileriki hidroliz aşamalarının daha kolay gerçekleştirilmesine olanak sağlar. Ayrıca bu süreç ılımlı ortam koşullarında gerçekleştirilmesi ile de avantajlıdır. Öte yandan bu yöntemin en kritik dezavantajı büyük miktarlardaki lignoselülozik biyokütlelerin işlenmesinde önemli miktarda ozona ihtiyaç duyulması ve ozon fiyatlarının yüksek oluşudur (Mood *et al.* 2013).

2.4.1.c. Fizikokimyasal ön işlem

Buhar patlaması (steam explosion): Bu yöntem günümüze kadar en fazla araştırılan termo-mekanokimyasal tekniktir. Yöntemde sıcak buhar tarafından yapısal komponentlerin ayrışması, termo, ani basınç düşüşlerinden ve evaporasyon olayları sonucunda ortaya çıkan kırpılmalar; mekano ve glikozidik bağların otohidrolizi; kimyasal basamakları oluşturur. Daha spesifik olarak bu yöntemde, biyokütle basınçlı

buhar (20-50 bar ve 160-270°C) kullanılarak birkaç saniye veya birkaç dakika ısıtılır, daha sonra basınç atmosferik seviyeler düşürülür ve yoğunlaşan buhar evapore edilir ve nihayetinde ayrım göstermeyen homojenize bir lignoselülozik matriks elde edilir. Bu yöntemin yüksek sıcaklıktan dolayı hemiselüloz hidrolizine ve lignin transformasyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Bu yöntemin ayrıca amorf kısımların kristalizasyonunu tetikleyerek selüloz kristalizasyonunu da arttırdığı bilinmektedir (Mood *et al.* 2013).

Buhar eksplozyonu sırasında hemiselülozun hidrolizi, diğer fonksiyonel gruplardan türevlendirilmiş formik ve levulinik asitler ya da hemiselülozla ilişkili asetil gruplarının hidrolizinden üretilen asetik asit gibi organik asitler tarafından gerçekleştirilir. Ortamdaki suda ayrıca yüksek sıcaklıklarda asit özellikleri gösterir ve asitmiş gibi hareket eder. Sonuçta, selüloz mikrofibrillerin yüzeylerinden hemiselülozun uzaklaştırılması enzimlerin substrata erişim olanaklarını arttırır ve selüloz yüzey alanındaki genişlemeye-artışa bağlı olarak enzimatik hidroliz verimi artar. Buna karşın mevcut asidik ortam koşullarından dolayı süreç sırasında şekerler furfural ve HMF gibi inhibitörlere degrade olabilir (Mood *et al.* 2013).

Örneğin yumuşak odunlu ağaçlarda olduğu gibi bazı lignoselülozik biyokütlelerde yüksek oranda şeker verimine ulaşabilmek için H_2SO_4 veya SO_2 gibi bir asit katalistin eklenmesi buhar eksplozyon sürecini olumlu yönde etkileyebilir. Bu katalist ihtiyacı yumuşak odunlu ağaçların hemiselülozlarının daha az oranda asetil grupları ihtiva etmeleriyle açıklanmaktadır. Ancak bu tip bir katalizör ilavesi ileriki fermantasyon süreçlerini negatif yönde etkileyecek inhibitörlerin oluşumunu arttırmaktadır. Bu yüzden inhibitörlerin uzaklaştırılması için bu şekilde bir önişleme tabi tutulmuş biyokütlelerin işlem sonrasında su ile yıkanmaları gerekmektedir (Mood *et al.* 2013).

Yapılan güncel bir çalışmada Reczey and Zacchi (2004) mısır kabuklarını %2 sülfürik asit ile yıkamış ve ardından 200°C'de 5 dakika buhar eksplozyonuna maruz bırakmıştır. Herhangi bir işlem görmemiş kontrol grubuyla kıyaslandığında, enzimatik konversiyon basamağının (50°C 24 saat) veriminin yaklaşık 4 kat arttığı, selülozdan glukoza

dönüşüm oranının %80'e yükseldiği ve etanol veriminin %90 olduğu gözlenmiştir. Bir diğer benzer çalışmada buğday sapının önişleminde kullanılabilecek optimal şartlar; katalist olarak %0,9 sülfürik asit varlığında %85 total şeker verimi için 180°C sıcaklıkta 10 dakika buhar eksplozyonu olarak belirlenmiştir. Bu yöntem daha düşük kapital gereksinimi ve yüksek enerji verimliliği ile pilot ölçekli üretimler ve ticari değere sahip uygulamalar için umut vaat eden sınırlı sayıdaki önişlem metotlarından birisidir (Ballesteros *et al.* 2006).

Amonyak fiber patlaması (AFEX – ammonia fiber explosion): AFEX metodunda, biyokütlenin önişleme süreci sıvı amonyağın kullanılmasıyla buhar eksplozyonu konsepti temeline göre yapılır. Sürecin optimizasyonu için amonyak yoğunluğu, su miktarı, reaksiyon süresi olmak üzere 4 temel parametre değiştirilebilir. Bu süreç genelde yüksek basınç (1.72-2.06 Mpa), orta dereceli sıcaklıklar (60-120°C), kısa reaksiyon süreleri (<30 dk) ve ani basınç değişimlerini içerir (basıncın süre sonunda aniden atmosfer basıncına düşürülmesini). Amonyak gazının ani genişlemesi lignin-karbohidrat kompleksinin çözülmesine ve nihayetinde biyokütledeki lif ve dokuların parçalanmasına sebep olur. Bu durum biyokütlenin işlenebilirliğini arttırmaktadır (Mood *et al.* 2013).

İşlem sırasında sulu bir şlam oluşturan buhar eksplozyonunun aksine AFEX, amonyağın düşük kaynama noktasından dolayı sadece katı materyaller oluşturur. Bu yöntem hemiselülozların düşük çözünürlüklerinden dolayı şeker salınımına doğrudan katkıda bulunamaz. Ancak lignoselülozik biyokütlenin dış etmenlere açılmasını, polimerlerin yüzey alanlarının artmasını ve nihayetinde enzim ulaşılabilirliğinin artmasına yol açar. Yapılan çalışmalarda AFEX önişleminin kavak odunu, buğday sapı, yonca kökleri, darı, pirinç sapı ve mısır kabuğu gibi çeşitli tipteki selülozik biyokütlelerin işlenmesinde başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte bu yöntemin sert ve yumuşak odun türevlerini işlenmesi için düğerlerinden daha az efektif olduğu bilinmektedir (Mood *et al.* 2013).

Günümüze kadar birçok çalışma farklı biyokütle çeşitleri için optimal AFEX şartlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Li *et al.* (2010) yaptıkları çalışmalarda amonyak-biyokütle oranını %120 nem yoğunluğunda 2:1 olarak belirlemişlerdir. Yine 140°C'de 5 dakikalık uygulamalar saman ve sorgum küspesinden etanol üretmek için optimal değerlerdir. Balan *et al.* (2009) *Populus nigra* (kara kavak) için optimal değerleri amonyak-biyokütle oranı; 2:1, %233 nem ve 180°C, mısır kabukları içinse amonyak-biyokütle oranı; 1:1, %60 nem 90°C olarak belirlemiştir. Yine de bu yöntemin yaygın olarak kullanılabilmesi için hem amonyak maliyetini düşürecek hem de çevreye zararları azaltacak efektif amonyak geri kazanım ve geri dönüşüm tekniklerinin geliştirilmesinde gerekliliği göz ardı edilmemelidir (Holtzapple *et al.* 1992).

CO_2 patlaması: Temelde süper kritik CO_2 AFEX ve buhar patlaması ile aynı özelliktedir. Bu yöntemdeki CO_2 molekülleri lignoselülozik materyallerin küçük porlarından penetre olabilen su ve amonyak molekülleriyle bezner boyut özelliklerine sahiptir. Buhar patlamasının aksine süper kritik CO_2 patlaması daha düşük ısı ihtiyacına sahiptir ve ayrıca AFEX ile kıyaslandığında bu süreç daha ekonomiktir. Bu özellikler bu tekniği eksplozyon temelli yöntemler içerisinde en avantajlı konuma yükseltmektedir. Ayrıca CO_2 patlamasının toksik olmaması ve yanıcı özellik göstermemesi yöntemin diğer önemli avantajlarıdır (Mood *et al.* 2013).

Süper kritik CO_2 (Kritik sıcaklık: 31°C ve kritik basınç 7.4 MPa) sıvı benzeri bir yoğunluğa sahiptir. Buna karşın viskozite ve difüze olabilme yönünden gaz benzeri transportasyon özellikleri gösterir. Öte yandan CO_2 suda çözüldüğünde karbonik asit oluşturduğu için bu yöntem aynı zamanda asit katalizörlüğünde gerçekleşen süreçlerin avantajlarını da gösterir. Bununla birlikte karbonik asitin diğer asitlere göre daha az korezyona sebep olması da bir diğer dikkat çekici özelliktir. Dahası basınç azaltılması yoluyla karbondioksitin kolayca uzaklaştırılabilmesinden dolayı süreç sonunda atık oluşmaz ve ilave bir arıtma basamağına gerek duyulmaz (Mood *et al.* 2013).

Kim and Hong (2001) çalışmalarında süper kritik CO_2 muamelesinin titrek kavak ve güney sarı çamının enzimatik parçalanması üzerine olan etkilerini araştırmıştır. Bu

çalışmada lignoselülozik biyokütleler süper kritik CO_2 ile 21,37 MPa basınçla 165°C'de 30 dakika muamele edilmemiş örneklerle kıyaslanmıştır. Buna göre önişleme tabi olmuş titrek kavaktaki şeker indirgenme oranı %14,5 ve güney sarıçamında ise %84,7 olarak ölçülmüştür. Buna karşın aynı oranlar muamele görmemiş titrek kavak için %12,8 ve güney sarıçamı için ise %27,3 olarak ölçülmüştür (Mood *et al.* 2013).

Sıvı sıcak su muamelesi: Bu yöntem yüksek sıcaklıklara (160-220°C) ve suyu sıvı halde tutmak için basınca ihtiyaç duyar. Biyokütle bu şartlarda herhangi bir katalizör ya da kimyasal kullanmaksızın 15 dakika süreyle önişlemden geçirilir. Sıvı sıcak su muamelesi yönteminde buhar patlaması yönteminden farklı olarak ani basınç azaltılmasına ya da genleşmeye gerek yoktur. Burada basınç yalnızca suyun varlığının sürdürülmesi ve evaporasyonun önlenmesi için önem arz eder. Güncel çalışmalar bu yöntemin mısır koçanı, şeker kamışı küspesi, mısır kabuğu, buğday sapı ve çavdar sapı gibi çok çeşitli lignoselülozik biyokütlelerin işlenmesi için oldukça efektif olduğunu göstermiştir. Yine güncel çalışmalarda bu yöntem ile toplam hemiselülozun %80'inden fazla bir kısmının uzaklaştırılabileceği ve bu sayede enzimatik selüloz parçalamasının arttırılabileceği gösterilmiştir. Buradan elde edilen karışım katı (zenginleştirilmiş selüloz ve suda çözünmeyen diğer bileşenler) ve sıvı (su ve büyük oranda suda çözülebilen hemiselülozlar) fraksiyonlardan oluşur. Ayrıca çok az veya hiç inhibitör içermez (Mood *et al.* 2013).

Süreç sırasında inhibitörlerin oluşumunun ve şekerlerin degradasyonunun önlenmesi pH 4-7 arasında tutulmalıdır. Laser *et al.* (2002) mısır kabuğu için pH kontrollü sıvı sıcak su önişleme tekniği optimize etmiş (190°C - 30 dk) ve minimum inhibitör oluşumu ile maksimum hemiselüloz çözülümüne ulaşmışlardır. Buna ilaveten aynı çalışmada enzimatik hidroliz sonrasında selülozun glukoza dönüşümünde %90 verime ulaşılmıştır. Bir başka çalışmada Perez *et al.* (2008) buğday sapı ile çalışmış ve optimize koşullarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada ksiloz ve glukoz verimi sırasıyla %80 ve %91 olarak hesaplanmıştır.

Yaş Oksidasyon: Bu teknolojide su ve katalizör olarak oksijen ya da hava kullanılır. Süreç genellikle 30 dakikadan daha kısa periyotlarda 120°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ve 0,5-2 MPa basınç aralığında verimlidir. Yapılan çalışmalarla yaş oksidasyon tekniğinin hemiselülozların çözünürlüğünü ve hidrolizini arttırdığı ayrıca süreç sırasında ve oksidatif reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan organik asitlerle delignifikasyona sebep olduğu kanıtlanmıştır. Bu durum yaş oksidasyon tekniğinin lignoselülozik materyallerin önişlenmesinde etkin bir şekilde kullanılabileceğine işaret eder. Buhar patlaması ve sıvı sıcak su uygulamaları ile kıyaslandığında yaş oksidasyon tekniğinde furfural ve HMF gibi inhibitörlerin oluşum oranları azdır. Ayrıca bu yönteme alkali kimyasalların entegrasyonu monosakkarit şeker üretiminin artmasına ve düşen asiditeden dolayı inhibitör madde oluşumunun azalmasına yol açar (Mood *et al.* 2013).

Yapılan çalışmalarda pirinç kabuğu için en iyi yaş oksidasyon şartları Banerjee (2009) tarafından belirlenmiş ve değerler 185°C sıcaklık, 0,5 MPa basınç, 15 dk reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada katı fraksiyondan %89 lignin uzaklaştırılırken selülozun %66,97'lik kısmı fraksiyon içinde korunabilmiştir. Öte yandan yaş oksidasyon süreci boyunca mevcut hemiselülozların %69,77'lik kısmı çözünmüşltür. Benzer bir diğer çalışmada şeker kamışı küspesi alkali yaş oksidasyon tekniği ile önişleme tabi tutulmuş (195°C-15 dk) ve katı materyalde selülozun %70'inin korunduğu, hemiselülozların yaklaşık %93 oranında çözüldüğü ve ligninin %50 oranında uzaklaştırıldığı görülmüştür. Ayrıca enzimatik hidrolizden sonra mevcut selülozun %75'inin konversiyona uğradığı kaydedilmiştir (Martin *et al.* 2007).

Sayılan tüm avantajlarına rağmen bu yöntemi kısıtlayan en önemli dezavantajlar özel ekipmanların gerekliliği ve kullanılan katalizörler ile oksijenin yüksek maliyetidir (Mood *et al.* 2013).

Biyolojik Önişleme: Kimyasal ve fizikokimyasal metotların aksine biyolojik ya da mikrobiyal önişleme tekniklerinde özel kimyasalların kullanılmasına ihtiyaç duyulmaz. Bu yöntemler temelde lignoselülozik biyokütlelerin başta funguslar olmak üzere

mikroorganizmalar tarafından hidroliz ve nihai olarak etanol üretimi basamakları için daha işlenebilir maddelere dönüştürülmesini kapsayan çevre dostu tekniklerdir. Yüksek kapital ve iletişim maliyeti gerektiren çoğu önişleme metodunun aksine, bu süreçler yalnızca lignoselülozik biyokütlelerin enzimatik hidrolizini teşvik edecek ve delignifikasyonu sağlayacak özel mikroorganizmalara (beyaz, kahverengi ya da yumuşak çürükçül funguslar gibi) ihtiyaç duyar. Yapılan çalışmalar beyaz çürükçül fungusların lignin degradasyonunda çok büyük potansiyele sahip olduğunu, buna karşın kahverengi ve yumuşak fungusların ise sadece selüloza yöneldiklerini göstermişlerdir (Mood *et al.* 2013).

Günümüze kadar kullanılan beyaz çürükçül funguslar içerisindeki en efektif örneklerden birisi yüksek büyüme oranı ve liginin biyodegradasyon yeteneğinden dolayı *Phanerochaete chrysosporium*'dur. Shi *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada pamuk kabuklarının *P. chrysosporium* ile iki farklı koşulda muamele etmiş ve daldırma kültivasyonda (SMC) liginin deegradasyon oranını %19,38 ve katı hal kültivasyonda (SSC) %35,53 olarak belirlemişlerdir (Mood *et al.* 2013).

Biyolojik önişlemede lignin degradasyonunu ve enzimatik işleme sonrası ürün verimini etkileyen en önemli faktörler partikül boyutu, nem miktarı, uygulama süresi ve uygulama sıcaklığıdır. Wan and Li (2010) çalışmalarında etanol üretimi için mısır kabuğunu Cesiporiopsis subvermispora ile önişleme tabi tutulmasını çalışmışlar ve bu sürecin önemini etkileyen çeşitli faktörleri araştırmışlardır. Bulgulara göre 18 günlük inkubasyonun ardından lignin degradasyonu %31,59'a ulaşmış ve mevcut selülozun %94'ünün korunduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca en yüksek glikoz verimi %66,61 için optimum koşullar 28°C sıcaklık, %75 nem içeriği ve 5 mm partikül boyutu olarak belirlenmiştir. Çeşitli mikrobiyal ajanların kullanılması da bu süreci etkileyebilecek en önemli parametreler arasında yer almaktadır. Patel (2007) çalışmasında birçok fungal ürün etkinliğini buğday sapı, pirinç sapı, pirinç kabuğu ve küspe gibi çeşitli lignoselülozik atıklardan etil alkol üretimi üzerinde araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre buğday ve pirinç saplarından etanol üretimi için en reaktif mikroorganizmalar *Aspergillus niger* ve *A. ausamori* olarak belirlenmiştir. Öte yandan pirinç kabuğu ve

küspe içinse en uygun mikroorganizmanın sırasıyla *A. ausamori* ve *Pleurotus sajor-caju* olduğu gözlenmiştir.

Düşük enerji tüketimi, ılımlı çevre koşullarına ihtiyaç göstermesi ve herhangi bir kimyasal ilavesine gerek duymamasının aksine biyolojik yöntemlerin ticarileştirilmesinin önünde halen çözülmeyi bekleyen problemler bulunmaktadır. Bu handikapların en önemlileri uzun işleme süreleri, geniş alanlara ihtiyaç duyulması ve sürekli olarak mikroorganizmaların gelişim durumlarının takip edilmesi gerekliliği olarak sıralanabilir (Mood *et al.* 2013).

2.4.1.d. Ön işlem metotlarının kombinasyonları

Bahsedilen temel önişleme metotlarının tamamı, ticari kullanımlarını engelleyen bazı dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek maksadıyla bu yöntemlerin birkaç tanesinin bir arada kullanılması fikri, lignoselülozik materyallerden etilalkol üretim teknolojilerinin geliştirilmesini amaçlayan güncel çalışmaların en önemli konu başlıklarından birisi olmuştur. Bu yaklaşımın şeker üretiminde etkinliği arttıracağı, inhibitör oluşumunu azaltacağı ve süreç zamanını kısaltacağı öngörülmektedir. Bu durum daha yüksek verimli ve daha ekonomik biyoetanol üretim süreçlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (Mood *et al.* 2013).

Alkali ve dilüe asit metotlarının kombinasyonu: Daha önce de belirtildiği gibi lignoselülozik materyalin dilüe asit ile muamele edilmesi delignifikasyonu ve selüloz fibrillerinin yüzey alanlarının artışına yol açar. Buna karşın örneğin asetik asitle muamelede olduğu gibi tek basamakta asit uygulamasında başarıya ulaşabilmesi için yüksek oranda asite (işlenen katı materyalin %50'si kadar) ihtiyaç duyulur. Bu sorunun üstesinden gelinebilmesi için ligninin kısmi uzaklaştırılmasını hedefleyen daha öncü bir işleme gerek vardır. Alkali önişleme delignifikasyon için oldukça uygun bir işlemdir ve bu yüzden asit önişleme ile kombine edilebilir (Mood *et al.* 2013).

Bu kapsamdaki bir çalışmada şeker kamışı küspesi NaOH ve Perasetik asitin kombinasyonu ile ılımlı bir ortam koşullarında muamele edilmiştir. İlk aşamada lignoselülozik materyal sıvı-katı oranı 3:1 olacak şekilde %10'luk NaOH çözeltisi ile 90°C'de 1,5 saat muamele edilmiştir. Daha sonra ilk aşamada kısmen işlenmiş olan materyal %10'luk perasetik asit ile 75°C'de 2,5 saat daha işleme tabi tutulmuştur. Sonuç olarak enzimatik hidroliz basamağının (15 FPU/g selülaz yoğunluğunda 120 saat) ardından şeker indirgenme oranı %92,04'e kadar ulaşmıştır. Bu sonuçlar alkali ve asit önişleme kombinasyonlarının bu yöntemlerin tek başlarına kullanılmalarına göre çok daha etkili olduğunu, daha ılımlı şartlarda meydana geldiğini, daha yüksek delignifikasyona yol açtıklarını ve daha az selüloz kaybına sebep olduklarını göstermektedir (Mood *et al.* 2013).

Alkali ve iyonik çözelti uygulamalarının kombinasyonu: Nguyen *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada amonyak ve IL([EMIM]Ac) kombinasyonuyla pirinç sapının başarılı bir şekilde muamele edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu kombine metodun temeli amonyağın delignifikasyon etkisine ve iyonik çözeltilerin yüksek çözücü niteliklerine dayanmaktadır. Dolayısıyla alkali ve iyonik çözeltilerin kombinasyonu ile oluşturulan yeni yöntemler lignoselülozik materyallerin biyolojik olarak işlenebilirliğini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu kombine önişlem yöntemlerinde selüloz kazanımının ve glikoz konversiyonunun (alkali) amonyak ve iyonik çözeltilerin tek başlarına uygulanmalarından daha fazla olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin verimliliği, işlenecek biyokütle çeşitliliğinin arttırılması, çözünme için gerekli zamanın kısaltılması, hidroliz için gerekli enzim miktarının azaltılması ve yeniden kullanılabilecek iyonik çözeltilerin geri dönüşüm oranlarının arttırılması yönünden de avantajlı olarak kabul edilmektedir.

Dilüe asit ve buhar patlaması kombinasyonu: Bu kombinasyon sakarifikasyon basamağının verimini arttırmaktadır. Bu yöntemdeki ilk basamak olan dilüe asit uygulaması ksiloz konversiyonunu maksimum düzeye çıkarır. İkinci basamak olan buhar patlaması uygulaması ise lignoselülozik yapıyı parçalar. Yakın zamanda Chen *et al.* (2011) bu yöntemin pirinç sapı üzerine olan etkinliğini birinci basamakta %2'lik

H_2SO_4 (165°C - 2 dk) ve ikinci basamakta buhar patlaması (180°C - 20 dk) kullanarak araştırmışlardır. Buradaki iki aşamalı önişleme sayesinde yüksek oranda ksiloz elde edildiği ve düşük oranda inhibitörlerin oluştuğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre mevcut ksilanın toplamda %75,9'unun kslioza ve mevcut glukanın %77,1'inin glukoza dönüştüğü gözlenmiştir (Mood *et al.* 2013).

Süper kritik CO_2 ve buhar patlama uygulamalarının kombinasyonu: Alinia *et al.* (2010) yaptıklarda çalışmalarda buğday sapının önişlemi için süperkritik CO_2 uygulaması ile süper kritik CO_2 ve buhar patlamasının kombinasyonunun uygulanmasını karşılaştırmıştır. Deneysel veriler buhar enjeksiyonu (200°C - 15 dk) ve süper kritik CO_2 patlaması (12 Mpa, 190°C ve 60 dk) basamaklarından oluşan iki aşamalı kombine metodun süperkritik uygulamasının tek başına yapılmasından çok daha efektif olduğunu göstermiştir. Buna göre 1 kg buğday sapının işlenmesi sonucunda şeker redüksiyonu miktarları süperkritik CO_2 patlaması için 149,1 g ve kombine yöntem için 234,6 g olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca ilginç bir veri olarak süperkritik CO_2 patlaması uygulamasının veriminin uygulama öncesi buğday sapının ıslanmasıyla 208,4 g/kg'a kadar yükseltilebileceği bulunmuştur.

Organosolv ve biyolojik yöntemlerin kombinasyonu (Bio-organosolv yöntem): Biyoorganosolv önişleme tekniği ilk olarak Monrroy *et al.* (2010) tarafından organik çözücü temelli ve biyolojik temelli yöntemlerin kombinasyonunun *P. radiata* odun talaşını işleme üzerine sinerjistik etkilerini incelemek maksadıyla geliştirilmiştir. Bu çalışmada lignoselülozik biyokütle önce 3 hafta boyunca kahverengi çürükçül bir küf olan *Gloephyllum trabeum* ile delignifiye edilmiş, daha sonra ise etanol:su çözeltisi ile muamele edilmiştir. Süreç sonundaki biyoetanol veriminin organosolv metodunun yalnız başına uygulanmasıyla benzer olduğu, buna karşın sürecin daha ılımlı koşullarda gerçekleşmesinden dolayı daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadaki biyoorganosolv metodu için gerekli şartlar etanol:su karışımı (60:40 v/v), 185°C, 18 dakika ve tek başına organosolv metodu için; etanol su karışımı (60:40 v/v), 200°C, 32 dakika olarak rapor edilmiştir. Benzer sonuçlar, kayın ağacı odununun *Ceriporiopsis subvermispora, Dichomitus squalas, Pleurotus ostreatus ve Coriolus versicolor* gibi

çeşitli beyaz çürükçül funguslarla 2-8 hafta boyunca işlenmesi ve ardından organosolv (etanolizis) muamelesine tabi tutulmasından oluşan çalışmalardan da elde edişlmiştir. Bu çalışmalarda en yüksek biyoetanol verimi: *C. subvermispora* ile önişlemeden sonra elde edilmiştir. Ayrıca bu kombine yöntem etanolizisin tek başına uygulanmasına göre 1,6 kat daha fazla verime ve elektrik ihtiyacında %15 azalmaya olanak sağlamıştır (Mood *et al.* 2013).

Bu bulgular ayrıca Munoz *et al.* (2007) tarafından *P. radiata* ve *Acacia dealbata* odun talaşının önce *C. subvermispora* ve *Ganoderma australe* ile biyolojik işlenmesi ve daha sonra etanol-su karışımı ile muamele edilmesiyle de desteklenmiştir. Buradaki uygulama koşulları biyolojik önişleme basamağı için 27°C, %55 nispi nem ve 30 gün olarak, organosolv önişlem basamağı için ise 200°C ve 1 saat olarak belirlenmiştir. Deneysel veriler, organosolv yöntemin yalnız başına uygulanmasına kıyasla biyo-organosolv tekniğin daha fazla glukan üretimini sağladığını ve odun talaşlarındaki lignin oranını azaltmada çok daha efektif olduğunu göstermektedir (Mood *et al.* 2013).

Biyolojik ve dilüe asit uygulamalarının kombinasyonu: Genellikle asit uygulamaları hemiselülozların çözülmesi için uygun metotlardır. Buna karşın fungusların kullanıldığı biyolojik önişlemler lignin-hemiselüloz katmanlarının bozunması için ılımlı çevre koşulu ve düşük enerji ihtiyaçlarıyla ön plana çıkarlar. Ancak her iki metodun da yaygın kullanımlarını önleyen önemli dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar asit uygulamaları için yüksek enerji gereksinimi, çevreye zararlı olma ve yüksek basınç ihtiyacı olarak sıralanabilir. Biyolojik yöntemlerin ise en dikkat çekici dezavantajları ekonomik fizibilitelerinin bulunmaması ve çok uzun süreç zamanlarıdır. Bu kapsamda Fuying *et al.* (2010) biyolojik ve dilüe asit uygulamalarının bir kombinasyonunu su sümbülü bitkisinin enzimatik hidroliz verimini arttırmak için test etmiştir. Bu çalışma sonucunda Echinodontium taxodii ve H_2SO_4 kullanılan kombine bir önişlemin enzimatik hidroliz basamağının verimini başarıyla teşvik ettiği, şeker indirgenme oranlarını ve nihayetinde etanol verimini arttırdığı gözlenmiştir.

Biyolojik ve buhar patlama önişlemlerinin kombinasyonu: Taniguchi *et al.* (2010) yaptıkları çalışmalarda 4 farklı beyaz çürükçül fungus türünü pirinç saplarını işlemek için kullanmış ve en yüksek biyolojik önişlem verimini *P. ostreatus* kullanarak elde etmişlerdir. Bu uygulamada yüksek lignin degradasyonu oldukça düşük seviyelerdedir. Bu yüzden uzun çüönişlem süresince (60 gün) yoğun holoselüloz kaybını azaltmak ve yöntemin etkinliğini arttırmak için yöntemin buhar patlama metoduyla (1,5 Mpa - 1 dk) kombine edilmesi planlanmıştır. Yapılan denemelerin sonuçlarında elde edilen net glikoz miktarı değişmeden 60 günlük uzun inkübasyon süresi 36 güne düşürülebilmiştir.

Mikrodalga yardımlı alkali önişleme: Bilindiği gibi mikrodalga uygulaması, biyokütle molekülleri arasında patlama etkisi yaratarak kimyasal reaksiyon verimliliğini sinerjistik yolla arttırır. Güncel bir çalışmada konvensiyonel ısıtma yerine mikrodalga temelli ısıtma teknolojisi kullanılarak alkali ortamda dallı darı önişleme tabi tutulmuştur. Bu çalışmada 190°C optimum sıcaklık koşulunda 50 g/L katı biyokütle varlığında 30 dakikalık uygulama süresi sonunda 100 g biyokütle için 58,7 g şeker elde edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise Shengdong *et al.* (2005) buğday sapının önişlemi için mikrodalga yardımlı alkali uygulamasını (700 w) kullanmış ve sonuçları konvensiyonel alkali (%1 NaOH) önişleme yöntemiyle kıyaslanmıştır. Bu çalışmaya göre selüloz içeriği kombine yöntem için %79,6 ve konvensiyonel yöntem için %73,5, lignin içeriği kombine yöntem için %5,7 ve konvensiyonel yöntem için %7,2, hemiselüloz içeriği kombine yöntem için %7,8 ve konvensiyonel yöntem için %11,2 ve reaksiyon süresi kombine yöntem için 25 dakika, konvensiyonel yöntem içinse 60 dakika olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak mikrodalga yardımlı alkali önişleme tekniği buğday saplarından lignin ve hemiselülozların uzaklaştırılmasında konvensiyonel alkali uygulamalarına göre daha efektiftir ve daha kısa süreç zamanlarına ihtiyaç duyar. Ayrıca kombine metodu hidroliz oranının konvensiyonel yönteme göre çok daha yüksek olduğunda bilinmektedir. Yine yapılan güncel çalışmalarda örneğin pirinç sapı gibi farklı lignıoselülozik materyallerin önişlenmesinde de benzer olumlu sonuçların elde edildiği rapor edilmiştir (Mood *et al.* 2013).

Dilüe asit ve mikrodalga uygulamalarının kombinasyonu: Yakın dönemde şeker küspesinin önişlemi için dilüe sülfürik asit ve mikrodalga uygulamalarının kombinasyonu kullanılmıştır. Bu çalışmada 10 g lignoselülozik materyal 200 ml %1,56'lık sülfürik asite daldırılmış 3 farklı sıcaklıkta (130, 160 ve 190°C) ve 2 farklı sürede (5 ve 10 dakika) işleme tabi tutulmuştur. Çalışma sonuçlarına göre 190°C'lik uygulamada en yüksek verime ulaşılmış, hemiselülozun tamamı degrade edilmiş ve maksimum biyokütle fragmentasyonuna ulaşılmıştır. Buna karşın artan uygulama zamanının verime önemli bir katkısının olmadığı da belirlenmiştir (Mood *et al.* 2013).

İyonik çözelti ve ultrasonik uygulamaların kombinasyonu: Lignoselülozik materyallerin önişlemlerinde konvensiyonel ısı yerine ultrasonik uygulamaların kullanılması sakkarifikasyon veriminde artışa sebep olmaktadır. Güncel bir çalışmada ise ultrasonik uygulamalara ilaveten çeşitli iyonik çözeltilerin de kullanılması gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmada ultrasonik uygulamalarla [BMIM]Cl, [AMIM]Cl, [EMIM]Cl, [EMIM]DEP ve [EMIM]Ac gibi iyonik çözeltiler kombine edilerek kullanılmıştır. Sonuçlara göre kenaf tozu önce iyonik çözeltilerle daha sonra da konvensiyonel ısı uygulamasıyla muamele edildiğinde (110 °C - 120 dk.) selüloz sakarifikasyon oranının %20 olduğu görülmüştür. Buna karşın bu oran konvensiyonel ısı uygulaması yerine ultrasonik uygulamaların kullanılmasıyla %60-95'e kadar yükseltilebilmiştir. Sonuçlar içerisinde en çarpıcı olan ise [EMIM]Ac ve termal uygulama kombinasyonunda verim %47 iken, aynı iyonik çözeltinin ultrasonik uygulama ile kombinasyonu (15 dk - 25°C) %86 verimle sonuçlanmıştır (Ninomiya *et al.* 2010).

2.4.2. Hidroliz

Hidroliz basamağının verimi doğrudan lignoselülozik materyalin tabi tutulduğu ön işleme basamağının başarısına bağlıdır. Bu reaksiyon sırasında, ön işleme sürecinde serbest kalan polimer şekerler, selüloz ve hemiselüloz türevleri fermantasyon basamağında biyoetanol üretimi için kullanılacak serbest monomerlere hidroliz edilirler.

Günümüzde bu amaçla yaygın olarak kullanılan asidik ve enzimatik olmak üzere iki temel yöntem vardır (Limayem and Ricke 2012).

Asidik reaksiyon konsantre ve dilüe asit kullanımına göre iki alt gruba ayrılır. Dilüe asit (%1-3) ile hidroliz yöntemi selülozun kristalinitesini kırabilmek için yüksek sıcaklıklara (200-240°C) ihtiyaç duyar. Bu durum beraberinde sakarifikasyon verimini önemli ölçüde etkileyen heksoz/pentoz degradasyonuna ve fermentasyon verimini önemli ölçüde etkileyen HMF ve çeşitli fenolik bileşenler gibi toksik maddelerin yüksek konsantrasyonlarda oluşmasına sebep olur. Madison süreci, 1940'lı yıllarda bu çerçevede alkol verimini arttırmak ve inhibitör maddelerin oluşumunu azaltmak maksadıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu uygulamada sülfürik asit (%0,5) biyokütle üzerinden yüksek ısıda (150-180°C) kısa bir süre akıtılır ve işlemin sonunda konvansiyonel yöntemlere nazaran daha yüksek oranda şeker verimi elde edilir (Limayem and Ricke 2012).

Günümüzde daha yaygın olarak kullanılan konsantre asit uygulamaları ise yüksek şeker veriminin sağlanması için en pratik yaklaşımlar olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, dilüe asit uygulama temelli metotların aksine yüksek konsantrasyonlarda inhibitör maddelerin oluşumu gözlenmez ve şeker verimi çok daha yüksektir (~%90). Bununla birlikte bu yöntemler yüksek miktarda aside ihtiyaç duymaları ve kullanılan asidin geri dönüşüm maliyetinin oldukça yüksek olmasından dolayı günümüzde henüz ekonomik açıdan uygulanabilir değildirler (Limayem and Ricke 2012).

Katalizör olarak asit kullanıldığında çeşitli reaktif bileşenlerin oluşması ve bu bileşenlerin monosakkaritler ile tepkimeye girmesi sonucunda biyoetanol üretim sürecinin olumsuz yönde etkilenmesi gibi nedenlerden dolayı araştırma odakları selülolitik enzimlere ve bu enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı enzimatik hidroliz süreçlerine yönelmiştir. Bu bağlamda etkin bir ön işlem basamağı, başarılı bir hidroliz süreci için elzemdir. Ön işlem süreci sırasında substrat porözitesinin ve selülaz enzimlerine karşı geçirgenliğin artmasının, lignoselülozik materyallerin enzimatik hidrolizlerinin verimine katkı sağladığı bilinmektedir (Limayem and Ricke 2012).

Endüstriyel ölçekli selülolitik enzim üretiminde en yaygın kullanılan fungal türlerden birisi *Trichoderma reesei*'dir. Bu fungal türden üretilen en yaygın enzim preparatları ß-glukosidaz, endoglukonazlar ve ekzoglukonazlardır. Bu enzimler selüloz yapısında bulunan ß-1,4 glikozidik bağları parçalarlar. Bununla birlikte selülaz enzimleri çoğu zaman lignin ve türevleri karşısında inaktive olurlar. Özellikle fenolik içerikli lignin türevlerinin selülazlar üzerine en güçlü inhibitör etkiyi gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar hem fenolik bileşenlerin hem de ligninin bizzat kendisinin selülazlar üzerine negatif etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Ligninin bu engelleyici etkisinin temelinde onun nonprodüktif adsorpsiyon özelliği ve selüloza selülazların erişimini kısıtlama yeteneği yatmaktadır (Limayem and Ricke 2012).

Her ne kadar günümüzde yapılan genetik mühendisliği uygulamalarıyla ligninin yapısı değiştirilmeye çalışılsa da, doğal ligninin kendisinin enerji değeri taşıması ve etil alkol üretim süreci sonunda elde edilen pek çok değerli yan ürünün ana kaynağı olmasından dolayı yapılan bu çalışmalardan olumlu sonuçlar alınamamıştır. Bunun bir sonucu olarak da, selülazların inhibisyonunu önlemek için genetik modifikasyonlar kullanılmaksızın daha farklı pratik yaklaşımların geliştirilmesi yoluna gidilmiştir. Örneğin Lui *et al.* (2010) yaptıkları çalışmalarda Ca(II) ve Mg(II) gibi metal komponentlerin lignin-metal kompleksi oluşturmada kullanılmasıyla hidroliz basamağının veriminin arttırılabileceğini göstermiştir. Ayrıca Erickson *et al.* (2002) da bovin serum albümin (BSA) ve surfaktanların selülazlar ve lignin arasındaki olumsuz etkileşimi engellediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Sewalt *et al.* (1997) yaptıkları çalışmalarla ligninin selülazlar üzerine olan olumsuz etkilerinin reaksiyon ortamına amonyak ve diğer azotlu bileşenlerin ilavesiyle giderilebileceğini göstermiştir. Ayrıca enzimatik muamele simultane olarak mikrobiyal kofermantasyon süreçleri ile de gerçekleştirilebilir. SSF (simultaneous saccharification and fermentation) olarak da adlandırılan bu süreç, 1970'li yıllardan bu yana selülolitik ürün inhibisyonunu azaltma ve nihayetinde etil alkol verimini yükseltme bakımından en dikkat çekici yöntemlerden birisi olmuştur. Tipik olarak SHF (separate hydrolysis and fermentation) süreci, hidrolitik enzimlerin (selülazlar) sellobiyoz ve glukoz gibi sakkaritler tarafından inhibe edilmesi sorunu ile karşı karşıyadır. SHF'den farklı olarak SSF sürecinde hidroliz ve

fermantasyon kombine haldedir. Bu sayede ürünlerin eş zamanlı olarak fermantasyona uğraması ile ortamdaki sakkarit konsantrasyonu selülaz inhibisyonuna sebep veremeyecek kadar düşük seviyelerde tutulur.

2.4.3. Fermantasyon

Lignoselülozik materyallerin ön işleme ve hidroliz basamakları aslen fermantasyon sürecinin optimize edilmesi maksadıyla dizayn edilmiştir. Bu doğal biyolojik süreç doğrudan ortam şartlarının etkisi altındadır ve kullanılan ham maddedeki mevcut şekerleri etanol, laktik asit veya diğer son ürünlere fermente edecek mikroorganizmalara ihtiyaç duyar. Bu bağlamda *Saccharomyces cerevisiae* gibi endüstriyel mayalar bira veya şarap gibi içeceklerin yapımında alkol üretmek için kullanılagelmiştir. *S. cerevisiae* ayrıca mısır ve şeker temelli biyoyakıt üretimi endüstrilerinde de birincil fermantatif strain olarak da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Burada, ön işleme tabi tutulmuş selülozik çamur bir kez enzimatik veya asidik hidroliz uygulamaları için uygun hale geldiğinde bu uygulamalar ile kolaylıkla fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilir. Bunun ardından, oluşan karışım su ile seyreltilerek fermantasyon için hazır hale getirilir. Tipik olarak kesikli fermantasyon sürecinde *S. cerevisiae* büyük bir tank içerisindeki heksozları (çoğunlukla glikoz) Embden-Meyerhof yolağı ile anaerobik şartlarda ve kontrollü sıcaklık koşullarında etanole dönüştürür. Maya temelli fermantasyon uygulamalarına daima yan ürün olarak CO_2 oluşumu eşlik eder ve bu süreçlerde reaksiyon veriminin arttırılması için ortama azot kaynaklarının eklenmesine ihtiyaç duyulur. *S. cerevisiae* için optimal reaksiyon sıcaklığı 30°C'dir. Bu konvansiyonel ırk ayrıca yüksek osmotik basınca, düşük pH değerlerine (4,0) ve çeşitli inhibitörlere karşı dirençlidir. *S. cerevisiae* heksoz şekerlerden çok yüksek oranda etanol üretebilir (%12-17; teorik olarak %90 verim) (Limayem and Ricke 2012).

Geleneksel olarak SHF, birbirini takip eden basamaklardan oluşan bir etil alkol üretim teknolojisidir. Bununla birlikte hemiselüloz fraksiyonunda hem heksozları hem de pentozları bulunduran lignoselülozik materyallerden efektif biyoetanol üretimi için bir çok yeni teknoloji de araştırılmaktadır. *S. cerevisiae* biyoetanol üretim sürecindeki pek

çok olumsuz şarta karşı gösterdiği toleransın aksine heksozlar haricindeki diğer şekerleri fermente edemez. Buna karşın lignoselülozik materyaller büyük oranda hemiselülozik biyokütle ihtiva ederler. Hemiselülozun ise büyük kısmını D-ksiloz gibi 5 karbonlu şekerler oluşturmaktadır. Dolayısıyla 6 karbonlu şekerlerle birlikte 5 karbonlu şekerleri de fermente edebilecek mikroorganizmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca optimal bir fermantatif mikroorganizma hem yüksek etil alkol konsantrasyonlarına hem de ön işlem ve hidroliz basamaklarında oluşabilecek kimyasal inhibitörlere karşı yüksek direnç göstermelidir. Doğal *S. cerevisiae* ırklarının pentozları fermente edemediğinin anlaşılması çalışma odaklarını hem heksozları hem de pentozları fermente edebilecek genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar tasarlamaya sevk etmiştir. Buna göre üretilmesi hedeflenen ideal mikroorganizmalar 5 ve 6 karbonlu şekerleri minimum miktarda toksik yan ürün açığa çıkarma koşuluyla simultane olarak fermente edebilmelidir. Yakın zamanda SSF (simultaneous saccharification and fermentation) ve CBP (consolidated bioprocessing) gibi çeşitli yöntemler etil alkol üretim sürecindeki hidroliz ve fermantasyon basamaklarını tek bir reaktörde birleştirmek ve bu sayede hem son ürün inhibisyonunu hem de ürün maliyetini azaltmak amacıyla geliştirilmiştir. Bunlar içerisinde CBP, hem selülaz üretimini hem de fermantasyonu tek bir mikroorganizmaya (selülolitik ve fermantatif mikroorganizma) yaptırması bakımından oldukça dikkat çekicidir. Bununla birlikte hem prokaryotik hem de ökaryotik mikroorganizmaların çoğu şekerlerden alkol üretebilse de; alkol verimi ve kimyasal inhibitörler, yüksek sıcaklık ve yüksek etanol konsantrasyonlarına karşı tolerans konuları çerçevesinde kullanıma uygun değildir (Limayem and Ricke 2012).

Bu mikroorganizmalar, yapılacak çeşitli optimizasyon çalışmaları neticesinde lignoselülozik materyallerden etanol üretimi odaklı uygulamalara kritik katkılar sağlayabilme yönünden çok önemli bir potansiyele sahiptir (Limayem and Ricke 2012).

2.4.4. Separasyon/Destilasyon (Damıtma)

Bir fermantasyon döngüsü sonucunda elde edilen biyoetanol, kullanımdan önce ileri separasyon uygulamalarına ve destilasyon tekniği ile sudan ayrıştırılmaya ihtiyaç duyar.

Bu bağlamda kullanılan fraksiyonel destilasyon, su ve etanolün farklı kaynama sahip olmaları gerçeğinden yararlanan bir ayrıştırma tekniğidir. Bu süreç basitçe su-etanol karışımının kaynatılması esasına dayanır. Suyun kaynama noktası (100°C) etanolünkinden (78,5°C) daha yüksek olduğu için karışımdaki etanol sudan daha önce buharlaşır. Bunun ardından buharın basit bir kondenzasyon (yoğunlaştırma) sürecinden geçirilmesi ile %95 konsantrasyonlu etanol elde edilebilir (Limayem and Ricke 2012).

Günümüzde tipik olarak bir çok büyük ölçekli endüstri kuruluşu ve biyorafineriler pek çok avantaja sahip kesintisiz destilasyon kolon sistemlerini kullanmaktadır. Bu sistemlerde sıvı karışımları ısıtılır ve kolon boyunca devamlı akışa izin verilir. Süreç sonunda kolon tepesinde uçucu kısım destile ürün olarak ve tabandakiler de kalıntı materyaller olarak toplanır (Limayem and Ricke 2012).

2.5. Lignoselülozik Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Selülozu oluşturan glikozu fermente edebilen mikroorganizmalar iyi bilinmektedir. Buna karşın, hemiselülozun yapısında bulunan ksiloz ve arabinoz gibi beş karbonlu şekerleri kullanabilen tanılanmış mikroorganizma sayısı oldukça azdır. Lignoselülozik materyalden biyoetanol üretilmesini sınırlandıran bu sorunun çözümüne yönelik, bazı araştırıcılar genetiksel olarak modifiye edilmiş *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* ve *Zymonas mobilis* türlerini üretmeyi başarmışlardır. Biyoetanol üretimi için beş karbonlu şekerleri kullanabilen bir diğer genetiği değiştirilmiş mikroorganizma türü de *Pichia stipitis*'tir (Holmgren 2008).

Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretilmesinde karşılaşılan ikinci sorun ise genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kazandıkları özellikleri uzun süre koruyamaması ve birkaç fermentasyon döngüsünden sonra başlangıçtaki yabanıl karakterlerine geri dönmeleri olmuştur. Bu sorunun çözümü için ise; günümüzde halen çok yoğun olarak sürdürülen, hem beş karbonlu hem de altı karbonlu şekerlerden biyoetanol üretebilen doğal ırkların izolasyonu çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda tanılanan ve lignoselülozik materyallerden etanol üretebilen doğal

mikroorganizma türlerine *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trametes versicolor*, *Pichea stipitis* ve *Pichea tannophilus* örnek olarak verilebilir (Holmgren 2008; Holmgren and Sellstedt 2008).

Günümüzdeki çalışma trendleri yoğun olarak, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların hem üretim maliyetlerinin çok yüksek oluşu hem de kazandıkları olumlu özellikleri uzun süre koruyamamaları sebeplerinden dolayı lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilecek doğal mikroorganizma türlerinin araştırılmasına yönelmiştir. Yine bu doğal orijinli mikroorganizma kaynakları içerisinde yüksek verim ve üretilen alkole karşı yüksek tolerans gösterme potansiyellerinden dolayı fungal izolatlar öne çıkmaktadır.

2.6. Lignoselülozik Biyoetanol Üretebilen Fungal İzolatların Tanılanmasına Yönelik Moleküler Yaklaşımlar

Organizmaların tanılanmasında ve karakterize edilmesinde kullanılan moleküler metotlar hedef organizmanın kompozisyonundan kaynaklanan spesifik farklılılara ait bilgilerden temel alırlar. Bu anlamda geliştirilen pek çok moleküler teknik odunsu materyalleri bozunmaya uğratan fungusları tanılamak ve filogenetik araştırmalar yapmak için 1980'li yıllardan bu yana kullanılagelmiştir (Jellison and Goodell 1988; Palfreyman *et al.* 1988; Schmidt and Kebernik 1989; Schmidt 2009).

2.6.1. Protein esaslı teknikler

2.6.1.a. SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) uygulamalarında fungal dokulardaki proteinin tamamı sırası ile ekstrakte edilir, denatüre edilir ve merkaptoetanol-sodyum dodesil sülfat muameleleri sonucunda negatif olarak yüklenir. Daha sonra bu proteinler akrilamid jellerde boyutlarına göre birbirinden ayrılır ve coomassie blue gibi uygun bir yöntem ile boyanır. Jel üzerinde gözlenen bant

profilleri bir çok organizmanın tür seviyesinde ayrılmasına olanak sağlar. Bu teknik aynı zamanda odunsu materyalleri çürüten çoğu fungusun tanılanmasında da kullanılabilmektedir (Schmidt and Kebernik 1989; Vigrow *et al.* 1991a; Palfreyman *et al.* 1991; Schmidt and Moreth 1995; Schmidt 2009). Örneğin birbiriyle yakın akraba olan *Serpula lacrymans* ile *S. himantioides* birbirinden kendilerine spesifik olan bant profilleri yardımıyla ayrılabilirler (Schmidt 2009). Saf kültürler ile yapılan araştırmalar için SDS-PAGE yöntemi oldukça hızlı ve pratik bir tekniktir. Bununla birlikte bir örnekte çok sayıda protein bandı bulunmasından dolayı odun çürütücü fungal izolatların daha önce bilinmeyen örneklerini tanılamada pratik bir yaklaşım değildir. Ayrıca bu tür organizmalar için mevcut izozim analizlerinin de mevcut olmaması bir diğer önemli dezavantajdır (Schmidt 2009).

2.6.1.b. İmmünolojik metotlar

İmmünolojik metotlar günümüze kadar *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Lentinus lepideus*, *Oligoporus placenta* ve *Serpula lacrymans* gibi türlerin de dahil olduğu odunsu materyallerin çürümesine sebep olan pek çok fungal izolatın tanılanmasında başarıyla kullanılmıştır (Jellison and Goodell 1988; Palfreyman *et al.* 1988; Glancy *et al.* 1990; Vigrow *et al.* 1991b; Toft 1993; Clausen 1997). Bu yöntemlerin diyagnostik potansiyelleri öncü izolasyon basamaklarına ve saf kültürlere ihtiyaç duymamaları neticesinde odunsu materyaldeki çüremenin oldukça erken safhalarında bile fungusun belirlenebilmesi temellerine dayanır (Clausen and Kartal 2003). Buna karşın yapılan deneyler çoğu zaman başka organizmalarla da çapraz reaksiyonlar verebilirler. Bu durum immünolojik metotların en dikkat çekici dezavantajıdır (Schmidt 2009).

İmmünolojik metotlar ayrıca çürükçül fungusun hif içerisinde, çevresinde ve odunsu dokulardaki enzim dağılımlarını incelemek için de kullanılmaktadır (Kim *et al.* 1991; Schmidt 2009).

2.6.2. DNA esaslı teknikler

Odunsu materyalleri çürüten fungal izolatların moleküler yöntemlerle tanılanmasına yönelik yapılan çoğu güncel çalışmanın temelini araştırılan örneğin DNA'sını çoğaltmayı amaçlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR: polymerase chain reaction) oluşturmaktadır. Bu çalışmalar geleneksel, multipleks veya real-time PCR gibi çok çeşitli uygulamaları kapsamaktadır (Vainio and Hantula 2000; Eikenes *et al.* 2005). Bu uygulamalarda PCR ürünlerinin incelenmesinde ve kalitelerinin kontrol edilmesinde genellikle agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır (Schmidt 2009).

2.6.2.a. RAPD analizi

RAPD analizi (randomly amplified polymorphic DNA veya random amplification of polymorphic DNA) tekniğinde sadece kısa (10 baz uzunluğunda – 10'mer) ve genoma birkaç kez bağlanan rasgele seçilmiş bir PCR primeri kullanılır. Bu sayede fungal izolatlar polimorfik bant profillerine göre sırasıyla izolat, grup ve tür düzeyindeki taksonomik seviyelerde ayrılabilir (Schmidt 2009). Theodore *et al.* (1995) yaptıkları çalışmada sekiz *Serpula lacrymans* izolatı arasında ayırt edici nitelikte polimorfizm olduğunu göstermiştir. Yine başka bir çalışmada diğer *S. lacrymans* izolatları arasında önemli bir polimorfik benzerliğin de olduğu Schmidt and Moreth (1998) tarafından gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada *S. himantioides* ve *Coniophora puteana* arasında bariz bir izolat polimorfizminin de olduğuna dikkat çekilmiştir. RAPD yöntemi hedef DNA hakkında mevcut öncü bilginin bulunmasına ihtiyaç duymaz ve saf kültürlerle çalışıldığında oldukça hızlı sonuç veren pratik bir yöntemdir. Bununla birlikte kullanılan kısa primerler kontaminasyonlara olan duyarlılığı arttırmaktadır. Bu durumda anlamsız sonuçlarla karşılaşımaması için primer tasarımlarının dikkatli bir şekilde yapılması gerekmektedir. Ayrıca şans eseri benzer bağlanma profilleri oluşturabilecekleri için daha önce tanılanmamış fungal izolatların identifikasyonunda bu tekniği kullanmak mümkün değildir (Göller and Rudolph 2003; Schmidt 2009).

2.6.2.b. rDNA'nın kullanımı

rDNA (ribozomal DNA) araştırmaları son yıllarda moleküler identifikasyon çalışmalarının popüler konu başlığı olmuştur. Korunmuş 18S ve 28S rDNA bölgeleri cinslerin, familyaların hatta daha yüksek taksonomik grupların filogenetik analizleri için kullanılabilir niteliktedir. Daha hızlı evrimleşen internal transcribed spacers (ITS I ve II) bölgeleri özellikle yakın akraba türlerin tanılanmasında oldukça kullanışlıdır. İntergenik spacers (IGS I ve II) bölgeleri gösterdikleri uzunluk polimorfizminden dolayı tüm rDNA bölgeleri arasında en yüksek intraspesifik çeşitliliğe sahiptirler. Çalışmaların amaçlarına göre RNA genleri ya da spacers bölgeleri kullanılabilir. Bu domainler hem RFLP çalışmaları için endonükleazlar ile kesilebilir hem de sekans analizi yapılabilir özelliktedir (Schmidt 2009).

rDNA'nın RFLP analizi: Zaremski *et al.* (1999) yaptıkları çalışmalarda *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum* ve *Oligoporus placenta* izolatlarının birbirinden ITS bölgelerinin endonükleazlar ile kesilmesini kapsayan RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi uygulamaları ile doğru bir şekilde ayrılabileceğini göstermiştir. Yine başka bir çalışmada yakın akraba olan *Serpula lacrymans* ve *S. himantioides*'in çeşitli izolatlarının *Hae*III/*Taq*I endonükleaz kesimi sonrasında oldukça belirgin fragment profili farklılıkları gösterdikleri bulunmuştur. *Taq*I uygulamalı RFLP analizi *S. lacrymans*, *S. himantioides*, *Donkioporia expansa*, *C. puteana*, *Antrodia vaillantii*, *O. placenta* ve *Gloeophyllum sepiarium* türlerini kolayca birbirinden ayırt etmektedir (Schmidt and Moreth 1999; Zaremski *et al.* 1999; Adair *et al.* 2002; Diehl *et al.* 2004; Råberg *et al.* 2004).

ITS-RFLP uygulamaları günümüzde lignolitik aktiviteye sahip fungal izolatların tanılanması için kullanılan popüler moleküler tekniklerden birisi olarak kabul edilmektedir. Uygulanması oldukça ekonomik olan bu teknik hedef DNA hakkında öncü bilgiye ihtiyaç duymaz. Bununla birlikte 600-700 baz uzunluğu ile sınırlı olan ITS bölgeleri bütün fungal türlerin birbirinden kesin olarak ayrıştırılmasına olanak vermez. Ayrıca henüz keşfedilmemiş bir türün bilinen başka bir türle benzer fragment profilleri

de verebileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir. İzolatların ITS bölgelerinde meydana gelebilecek varyasyonlar restriksiyon enzimlerinin var olan tanıma bölgelerinin kaybolmasına veya yeni tanıma bölgelerinin ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu olay non-spesifik fragment profillerinin gözlenmesiyle sonuçlanan dezavantajlı bir durumdur (Schmidt 2009).

T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) analizi uygulamalarında primerlerden teki ya da her ikisi birden floresan bir boya ile işaretlenir. Daha sonra boyalı uç fragmentler sekans analizine gönderilir ve sonuçlar değerlendirilir. Råberg *et al.* (2005) yaptıkları çalışmalarda *C. puteana* ve *O. placenta*'yı birbirinden bu yöntem ile ayırmıştır.

SSPP: Türler arasındaki sekans dağılımı farkları göz önünde bulundurulduğunda oligonükleotid sekansları türlere özgü PCR primerlerinin tasarımında kullanılabilir. Bu teknoloji SSPP (species-spesific priming PCR) olarak adlandırılmaktadır (Moreth and Schmidt 2000; Schmidt and Moreth 2000). Yapılan çalışmalarda 7 Basidiomycetes örneğinin ITS II bölgelerinde yer alan spesifik oligonükleotid sekanslarından yararlanılarak bilinmeyen fungal izolatların nihai tanısı için kullanılabilecek primerler dizayn edilmiştir. White *et al.* (1990) tarafından tasarlanan ITS 1 primerinin forward primer olarak kullanılması sonucunda fungal izolatların tanılanmasına olanak sağlayan ayırt edici ve belirli boyutlara sahip amplifiye ITS fragmentleri oluşur. Bu yöntem ile *S. lacrymans*, *S. himantioides*, *D. expansa*, *C. puteana* ve *A. vaillantii* türlerini birbirinden kolayca ayırmak mümkündür.

SSPP hızlı ve kesin sonuç veren bir tekniktir. İlk bakışta fungal izolatların moleküler identifikasyonu için oldukça güçlü bir teknik olarak görünür. PCR amplikonlarının kesilmesine, saf fungal kültürlerin kullanılmasına veya aksenik olarak elde edilmiş numunelere, laboratuvar veya örnekleme alanı kaynaklı kontaminasyonların uzaklaştırılmasına ihtiyaç duymaz. Bu teknik Almanya'da fungal izolatların ticari olarak tanılanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. ITS-RFLP'dekine benzer şekilde, oldukça sınırlı baz sayısına sahip olan ITS bölgelerinin kullanılması bu teknikte de

bütün fungal türlerin birbirinden kesin olarak ayrılmasına izin vermez ve henüz analiz edilmemiş bir tür yanlış tanılamaya sebep olacak şekilde bilinen bir türün primeriyle şans eseri reaksiyon verebilir. Gerçekten de yapılan çalışmalarda *Antrodia*, *Coniophora* ve *Gloeophyllum* cinslerine ait bazı yakın akraba türlerin ITS bölgelerinin türe özgü primerlerin tasarımına olanak vermeyecek kadar benzer oldukları gösterilmiştir (Schmidt *et al.* 2002a; Schmidt *et al.* 2002b; Schmidt and Moreth 2003b).

rDNA'nın sekans analizi: Ribozomal DNA domainlerinin sekans analizi, çalışma sonunda hedef DNA'nın tüm sekans verisini elde ettiği için SSPP ve RFLP çalışmalarındaki temel kısıtlamalar burada görülmez. Bu çalışmalardan elde edilen sekans bilgileri EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute, www.ebi.ac.uk), NCBI-GenBanK (National Center for Biotechnology Information, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov) veya DDBJ (DNA data bank of Japan, www.ddbj.nig.ac.jp) gibi bir uluslararası veritabanında depolanır (Schmidt 2009).

rDNA sekanslarının identifikasyon amacıyla kullanılması: Lignoselülozik materyallerde bozunmaya sebep olan fungusların büyük çoğunluğunun ITS sekansları bilinmektedir. Bunların ilk örneklerinden biri olan *S. lacrymans* S7 izolatına ait sekans bilgisi 1999 yılında veri tabanlarına kaydedilmiştir. Günümüzde ITS sekans bilgileri yaygın bir şekilde farklı kaynaklardan elde edilmiş fungal izolatların tanılanması için BLAST (basic local alignment search tool) uygulamasıyla birlikte kullanılmaktadır. Bu uygulama ile yapılan sekans kıyaslamaları sonucunda Himalayalar'dan elde edilmiş olan yabanıl *S. lacrymans* izolatlarının daha önce yanlış tanılandığı tespit edilmiş ve bunların gerçek tanılarının *Serpula* spp. ve *Antrodia* spp. olduğu belirlenmiştir. Yine benzer birçok çalışmada da daha önceden tanılanmış izolatlardaki hatalar bulunmuş ve bu mikroorganizmalar ITS sekans bilgisi ve BLAST uygulamaları kombinasyonu ile yeniden adlandırılmıştır. Bu durum fungal izolatların moleküler identifikasyonu için ITS sekans bilgisinin ve BLAST ile bu bilginin mevcut veritabanlarında var olan sekans bilgileri ile kıyaslanmasının ne kadar elzem olduğunu açıkça göstermektedir (White *et al.* 1990; Schmidt and Moreth 2000; Schmidt and Moreth 2003a; Palfreyman *et al.*

2003; Horisawa *et al.* 2004; Högberg and Land 2004; Råberg *et al.* 2004; Zaremski *et al.* 2005 Schmidt 2009).

Bu yöntemle bilinmeyen örneklerin moleküler identifikasyonunun yapılması, her örnek için sekans analizi yapılmasını gerektireceğinden oldukça zaman alıcıdır. Yine BLAST ile test örneklerinin identifikasyonunun yapılması ancak veri tabanında doğru kontrol sekansının bulunması halinde mümkündür. Sayılan bu önemli dezavantajlara karşın, ITS bölgesinin sekans analizi, bir örneğin yaklaşık 650 nükleotitlik eşsiz bir baz dizisi tarafından tanılanmasını sağlaması bakımından çeşitli kaynaklardan izole edilmiş fungal türlerin identifikasyonu için bilinen en iyi moleküler araçtır (Schmidt 2009).

2.6.3. Fungal izolatların identifikasyonu için kullanılan diğer moleküler teknikler

ITS bölgelerinin sekans analizlerine göre daha nadir olarak ve daha spesifik amaçlarla fungal izolatların moleküler tanılanmasında kullanılan diğer yöntemlere AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSR (microsatellite/simple sequence repeats), DNA-Arrays (DNA çipleri, mikroarrays), MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), Py-GC/MS (pyrolysis gas chromatography mass spectrometry) ve MVOCs (microbial volatile organic compounds) analizleri örnek olarak verilebilir (Fan *et al.* 1995; Peyretaillade *et al.* 1998; Bresinsky *et al.* 1999; Korpi *et al.* 1999; Martin *et al.* 1999; Jarosch and Besl 2001; Kauserud *et al.* 2004a; Kauserud *et al.* 2004b; Blei *et al.* 2005; Moreth and Schmidt 2005; Högberg *et al.* 2006; Kauserud *et al.* 2007; Schmidt and Kallow 2005; Schmidt and Moreth 2008; Schmidt 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma süresince kullanılan alet ve cihazların listesi aşağıda verilmiştir.

Buzdolabı	: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör	: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B
Masa Tipi Çalkalamalı İnkübatör	: Daihan Scientific, KOREA, WiseTherm HB-96
Derin Dondurucu	: Nuaire, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK
Hassas Terazi	: Mettler Toledo, CHINA, AL204
İnkübatör	: Binder, GERMANY, BD53
Manyetik Karıştırıcı	: Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
Mikrodalga Fırın	: Arçelik, TÜRKİYE, MD592
Mini Karıştırıcı	: IKA, U.S.A., M51, SN 03017581
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Saf Su Cihazı	: GFL, GERMANY, 2004
Sıcak Su Banyosu	: Memmert, GERMANY, 854
Steril Kabin	: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
UV/VIS Spektrofotometre	: PG Instruments Limited, UNITED KINGDOM, T80+
pH Metre	: Hanna, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202
Vortex	: IKA, U.S.A., MS2
Heating Block	: Daihan Scientific, KOREA, WiseTherm HB-96

Rotator	: GFL, GERMANY, 3025
Otomatik Pipet Setleri	: Eppendorf, GERMANY, 0.1-2.5, 1-10, 10-100, 20-200, 100-1000 µl
Elektroforez Tankı	: Owl, U.S.A., B2
Elektroforez Akım Sağlayıcı	: Owl, U.S.A., OSP300-2Q
Jel Görüntüleme Sistemi	: DNR BioImaging Systems, ISRAEL, MiniBis Pro
Buz Makinesi	: Scotsman, ITALY, AC45
Ultra Saf Su Cihazı	: Merck-Millipore, GERMANY, Direct-Q 3UV
Santrifüj	: Hettich, GERMANY, Mikro 22 R
Fermantör	: Electrolab Biotech, UK, FerMac 360
Blender	: Waring Commercial, U.S.A, 8011ES
Standart Işık Mikroskopu	: Boeco, GERMANY, BM 180
Kameralı Işık Mikroskopu	: Leica, GERMANY, DM 750
Binoküler Stereo Mikroskop	: Prior Scientific Instruments, ENGLAND, S1C1Z/S115
PCR Cihazı	: SensoQuest, GERMANY, Gradient LabCycler 1123240169
Gaz Kromatografisi Sistemi	: Agilent, U.S.A., 6890N Network Gas Chromatograph
Gaz Kromatografisi Kolon Seti	: Agilent, U.S.A., CP-Wax 57VB

3.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir.

Potato Dextrose Agar (PDA): Fungal izolasyon çalışmalarında, morfolojik incelemelerde ve izolatların muhafaza edilemsinde temel besiyeri olarak kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Potato dextrose agar (Oxoid® CM0139)	39 g

Bu besiyerinin hazırlanışında yukarıda belirtilen miktarda toz besiyeri bir erlene aktarılır ve ardından üzerine 1000 ml distile su ilave edilir. Oluşan karışımın manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanır ve ardından 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti uygun dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülür. Bu besiyeri oda sıcaklığındaki steril ortamlarda kısa süreli olarak muhafaza edilmelidir.

Sabouraud Dextrose Agar (SDA): Fungal izolasyon çalışmalarında, morfolojik incelemelerde ve izolatların muhafaza edilemsinde alternatif besiyeri olarak kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Sabouraud dextrose agar (Oxoid® CM0041)	65 g

Bu besiyerinin hazırlanışında yukarıda belirtilen miktarda toz besiyeri bir erlene aktarılır ve ardından üzerine 1000 ml distile su ilave edilir. Oluşan karışımın manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanır ve ardından 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti uygun dökme ısısına geldiğinde her biri 25-30 ml besiyeri içerecek şekilde petri kaplarına dökülür. Bu besiyeri oda sıcaklığındaki steril ortamlarda kısa süreli olarak muhafaza edilmelidir.

Sabouraud Dextrose Broth (SDB): Fungal izolatların kütlesel gelişimlerine ihtiyaç duyulan genomik DNA izolasyonu ve çeşitli analiz çalışmalarında temel sıvı besiyeri olarak kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Sabouraud dextrose broth (Oxoid® CM0147)	30 g

Bu besiyerinin hazırlanışında yukarıda belirtilen miktarda toz besiyeri bir behere aktarılır ve ardından üzerine 1000 ml distile su ilave edilir. Oluşan karışımın manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanır ve ardından karışım 50 ml'lik hacimlerle steril edilebilir kaplara bölünür. Daha sonra bu kaplar 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. Hazırlanan besiyerlerinin sıcaklığı oda ısısına soğuduğunda kullanılacakları zamana kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilirler.

Modified BMC Medium (MBMC): Fungal izolatların lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılmasında model besiyeri olarak kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Tuz çözeltisi	490 ml
Şeker çözeltisi	490 ml
Vitamin çözeltisi	0,7 ml
İz metal çözeltisi	6,7 ml
Üreme teşvik çözeltisi	11,4 ml

Bu besiyerinin hazırlanışında yukarıda belirtilen önceden steril edilmiş çözeltiler aseptik koşullarda sırası ile bir araya getirilir. Hazırlanan besiyeri kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

MBMC İçin Tuz Çözeltisi: Fungal izolatların lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılan model besiyerinin (MBMC) ve tarımsal atıklarla fermantasyon denemelerinin hazırlanması için kullanılmıştır.

İçerik	490 ml için
Amonyum sülfat	7,5 g
Potasyum fosfat	3 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,5 g

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 200 ml distile su içerisinde ısıtılarak ve karıştırılarak iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 490 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

MBMC İçin Şeker Çözeltisi: Fungal izolatların lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılan model besiyerinin (MBMC) hazırlanması için kullanılmıştır.

İçerik	490 ml için
Glikoz	9,7 g
Mannoz	27 g
Ksiloz	11 g

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 250 ml distile su içerisinde ısıtılarak ve karıştırılarak iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 490 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

MBMC İçin Vitamin Çözeltisi: Fungal izolatların lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılan model besiyerinin (MBMC) ve tarımsal atıklarla fermantasyon denemelerinin hazırlanması için kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
p-Aminobenzoic acid (PABA)	0,2 g
Nicotinic acid	1 g
Calcium pantothenate	1 g
Pyridoxine • HCl	1 g
Thiamine • HCl	1 g
d-Biotin	0,05 g
m-Inositol	25 g

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 500 ml distile su içerisinde ısıtılarak ve karıştırılarak iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

MBMC İçin İz Metal Çözeltisi: Fungal izolatların lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılan model besiyerinin (MBMC) ve tarımsal atıklarla fermantasyon denemelerinin hazırlanması için kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
EDTA	3 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,9 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,9 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6 g
H_3BO_3	0,2 g
$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,16 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,08 g
$CoCl_2 \cdot 2H_2O$	0,06 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,06 g
KI	0,02 g

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 500 ml distile su içerisinde ısıtılarak ve karıştırılarak iyice çözülür. Daha sonra çözeltinin hacmi yine distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

MBMC İçin Üreme Teşvik Çözeltisi: Fungal izolatların lignoselülozik materyallerden etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılan model besiyerinin (MBMC) ve tarımsal atıklarla fermantasyon denemelerinin hazırlanması için kullanılmıştır.

İçerik	11,6 ml için
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Maya özütü	2,5 g

Bu çözeltinin hazırlanışında yukarıda belirtilen kimyasallar sırası ile 11,6 ml distile su içerisinde ısıtılarak ve karıştırılarak iyice çözülür. Hazırlanan çözelti membran filtre (Merck-Millipore®/Por çapı: 0,22 μm) ile steril edilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

Isıl Ön İşlem Görmüş Tarım Atıklı Fermantasyon Ortamı: Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarımsal atıklardan etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Tuz çözeltisi	490 ml
Isıl ön işlem görmüş tarımsal atık çözeltisi	490 ml
Vitamin çözeltisi	0,7 ml
İz metal çözeltisi	6,7 ml
Üreme teşvik çözeltisi	11,4 ml

Bu besiyerinin hazırlanışında yukarıda belirtilen önceden steril edilmiş çözeltiler aseptik koşullarda sırası ile bir araya getirilir. Hazırlanan besiyeri kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

Isıl Ön İşlem Görmüş Tarımsal Atık Çözeltisi: Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarımsal atıklardan etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla formüle edilen fermantasyon ortamının hazırlanmasında kullanılmıştır.

İçerik	490 ml için
Öğütülmüş tarımsal atık	25 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 490 ml distile suya 25 g öğütülmüş tarımsal atık eklenir ve karışım 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak ısıl ön işleme tabi tutulur. Hazırlanan bu çözelti kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.

Ön İşlem Görmemiş Tarım Atıklı Fermantasyon Ortamı: Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarımsal atıklardan etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Tuz çözeltisi	490 ml
Ön işlem görmemiş (non-steril) tarımsal atık çözeltisi	490 ml
Vitamin çözeltisi	0,7 ml
İz metal çözeltisi	6,7 ml
Üreme teşvik çözeltisi	11,4 ml

Bu besiyerinin hazırlanışında yukarıda belirtilen önceden steril edilmiş çözeltiler ve non-steril ön işlem görmemiş tarımsal atık çözeltisi aseptik koşullarda sırası ile bir araya getirilir. Hazırlanan besiyeri bekletilmeksizin kullanılır.

Ön İşlem Görmemiş Tarımsal Atık Çözeltisi: Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş tarımsal atıklardan etil alkol üretebilme potansiyellerinin araştırılması amacıyla formüle edilen fermantasyon ortamının hazırlanmasında kullanılmıştır.

İçerik	490 ml için
Öğütülmüş tarımsal atık	25 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 490 ml distile suya 25 g öğütülmüş tarımsal atık eklenir. Hazırlanan bu çözelti bekletilmeksizin fermantasyon ortamının hazırlanması için kullanılır.

TE Tamponu: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Tris-HCI	1.2g
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	0.372 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 1.2 g Tris-HCI ve 0.0372 g etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) 1000 ml ultra saf su içerisinde çözülür ve oluşan çözeltinin pH değeri 8'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

%70'lik Etil Alkol: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Saf etil alkol	700 ml
Ultra saf su	300 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında 700 ml saf etil alkolün hacmi 300 ml steril ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de karanlıkta saklanır.

Liziz Tamponu: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Tris-HCI	1,36 g
EDTA	0,422 g
NaCl	0,664 g
%10'luk SDS çözeltisi	250 ml
Triton X-100	22,7 ml

Bu çözeltinin hazırlanışında ilk önce Tris-HCl ve EDTA 650 ml ultra saf su içerisinde tamamen çözülür ve çözeltinin pH değeri 8'e ayarlanır. Daha sonra pH ayarlaması yapılan çözeltinin üzerine NaCl eklenir ve son hacim 727,3 ml'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir. Çözelti otoklavdan çıkartıldıktan sonra uygun sıcaklığa geldiğinde üzerine 250 ml %10'luk SDS ve 22,7 ml Triton X-100 eklenir. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.

%10'luk SDS çözeltisi: Genomik DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Sodyum dodasil sülfat	100 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 100 g sodyum dodasil sülfat 800 ml ultra saf su içerisinde çözültüldükten sonra son hacim yine ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir ve kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilir.

Etidyum Bromür Çözeltisi: DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
Etidyum bromür	10 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 10 g etidyum bromür 1000 ml steril ultra saf su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak iyice çözülür. Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar amber şişe içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilir.

6X Yükleme Tamponu: DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	100 ml için
Bromfenol blue	10 g
Gliserol	10 g

Bu çözeltinin hazırlanışında 0,1 g bromfenol blue 40 ml gliserol içerisinde çözülür. Çözeltinin toplam hacmi 1X TAE ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar karanlıkta +4°C'de muhafaza edilir.

0,5X TBE Tamponu: DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
10X TBE stok çözeltisi (Sigma T4415)	50 ml
Steril ultra saf su	950 ml

Bu tamponun hazırlanışında 50 ml 10X TBE stok solüsyonu üzerine 950 ml steril ultra saf su eklenir. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilir.

1X TAE Tamponu: DNA jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.

İçerik	1000 ml için
10X TAE stok çözeltisi (Sigma T9650)	100 ml
Steril ultra saf su	900 ml

Bu tamponun hazırlanışında 100 ml 10X TAE stok solüsyonu üzerine 900 ml steril ultra saf su eklenir. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edilir.

3.2. Yöntem

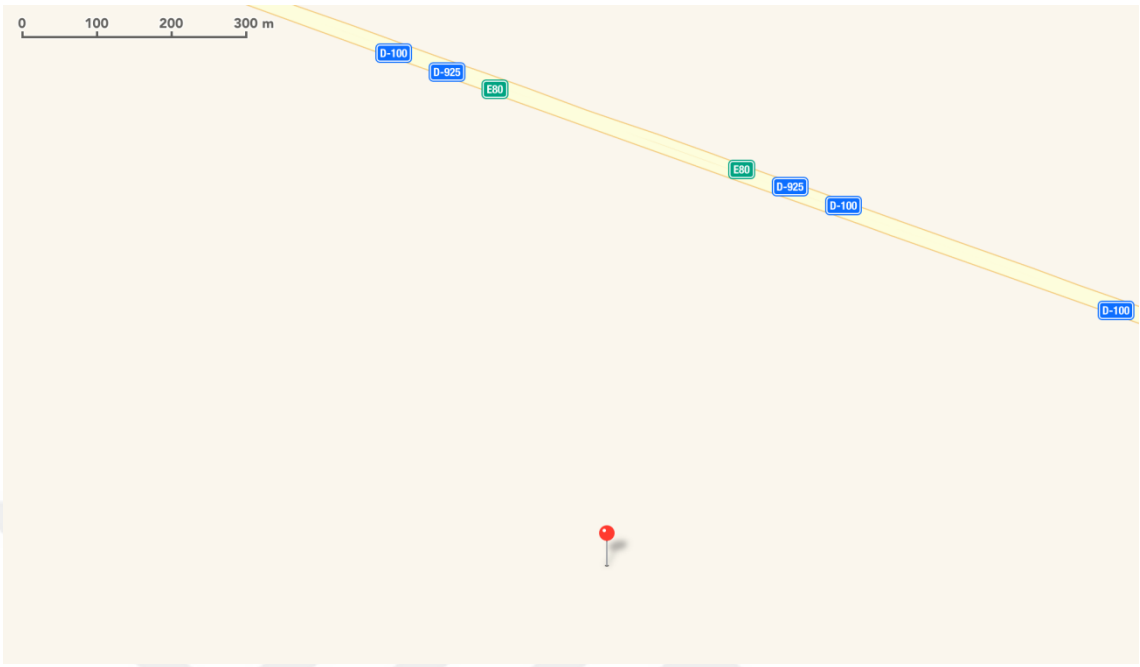
3.2.1. Tarımsal atıkların temini ve analiz çalışmaları

Çalışmada kullanılacak ayçiçeği, buğday ve mısır bitkilerine ait tarımsal atıklar Erzurum ili sınırlarında yer alan uygun zirai ekim alanlarından ürün hasadı sonrasında toplanmış ve laboratuvar ortamına getirilmiştir. Tarım atıklarının toplandığı merkez istasyona ait konum bilgileri Çizelge 3.1, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Arazi çalışmasına ait örnekleme merkez istasyonu ve konum bilgileri

Yer Adı	Konum
Erzurum-Pasinler (Hasankale) Yolu	39°58'40.1'' Kuzey - 41°36'11,8'' Doğu

Araziden temin edilerek laboratuvar ortamına transfer edilen tarımsal atıklar bol distile su ile yıkanmış, doğrudan güneş ışığı almayacak şekilde havalandırmalı ortamlarda kurutulmuş ve 1-2 mm partikül boyutunda olacak şekilde blender ile öğütülmüştür. Bu şekilde laboratuvar uygulamaları için hazır hale getirilmiş olan tarımsal atıkların genel içerik, karbohidrat içeriği, mineral içeriği ve eser element içeriği analizleri Yeditepe Üniversitesi Ar-Ge ve Analiz Merkez Laboratuvarı'nda yaptırılmıştır.



Şekil 3.1. Tarım atıklarının toplandığı alanın haritası



Şekil 3.2. Tarım atıklarının toplandığı alanın uydu görüntüsü

3.2.2. Fungal izolat kaynaklarının temini ve izolasyon çalışmaları

Çalışmamızın bu aşamasında tarımsal atık niteliğindeki lignoselülozik materyallerden etanol üretiminde kullanılabilecek fungal mikroorganizmaların; yoğun yağış alan ormanlık alanlarda kendiliğinden çürümeye başlamış olan odun ve türevlerinden, uygun dönemlerde alınan örneklerden laboratuvar ortamında saf kültürler halinde izole edilmesi planlanmıştır.

3.2.2.a. Fungal izolat kaynaklarının temini için arazi çalışmaları

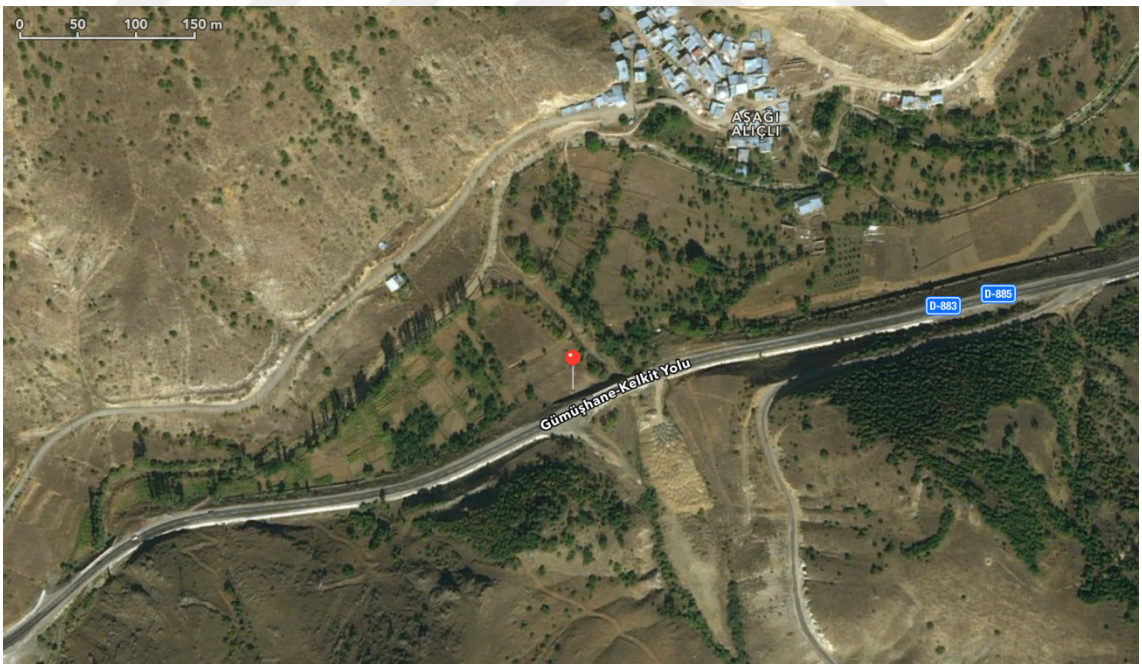
Bu amaç için Erzurum ve çevresinde yer alan farklı ekolojik özelliklere sahip 15 alan belirlenmiş ve arazi çalışmaları bu istasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Bu istasyonlara ait konum bilgileri Çizelge 3.2 ve Şekiller 3.3 – Şekil 3.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Arazi çalışmasına ait örnekleme istasyonları ve konum bilgileri

No	Yer Adı	Konum
1	Güvercinlik Köyü/GÜMÜŞHANE	40°22'22'' Kuzey - 39°49'43'' Doğu
2	D-883/883.04 / GÜMÜŞHANE	40°19'56'' Kuzey - 39°30'54'' Doğu
3	Hamsiköy / TRABZON	40°40'44'' Kuzey - 39°26'21'' Doğu
4	Uzungöl / TRABZON	40°36'45'' Kuzey - 40°18'44'' Doğu
5	Uzungöl / TRABZON	40°35'48'' Kuzey - 40°19'18'' Doğu
6	Uzungöl / TRABZON	40°36'59'' Kuzey - 40°17'35'' Doğu
7	Dernekpazarı / TRABZON	40°46'49'' Kuzey - 40°15'6'' Doğu
8	Ilıca / ERZURUM	40°8'20'' Kuzey - 41°1'8'' Doğu
9	Pazaryolu / ERZURUM	40°25'44'' Kuzey - 40°50'13'' Doğu
10	Pazaryolu / ERZURUM	40°26'20'' Kuzey - 40°50'21'' Doğu
11	İkizdere / RİZE	40°41'51'' Kuzey - 40°41'0'' Doğu
12	Tortum / ERZURUM	40°18'15'' Kuzey - 41°31'56'' Doğu
13	Tortum / ERZURUM	40°25'59'' Kuzey - 41°35'28'' Doğu
14	Olur / ERZURUM	40°49'4'' Kuzey - 42°4'26'' Doğu
15	Olur / ERZURUM	40°49'36'' Kuzey - 42°6'47'' Doğu



Şekil 3.3. 40°22’22’’ Kuzey - 39°49’43’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.4. 40°19’56’’ Kuzey - 39°30’54’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



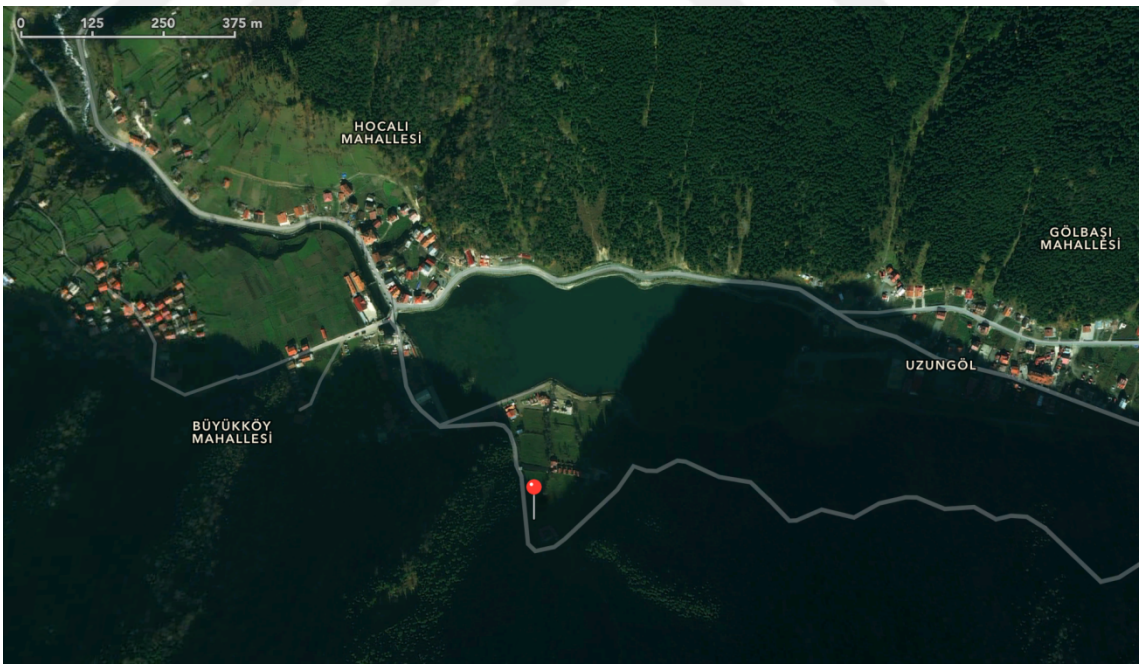
Şekil 3.5. 40°40’44’’ Kuzey - 39°26’21’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



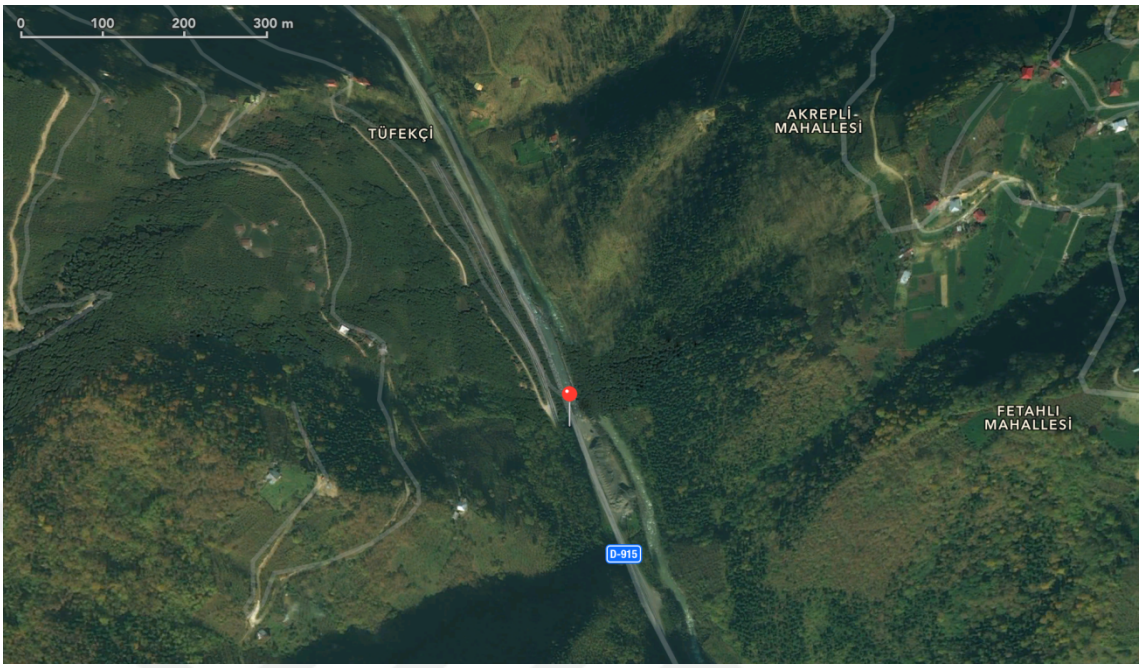
Şekil 3.6. 40°36’45’’ Kuzey - 40°18’44’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.7. 40°35’48’’ Kuzey - 40°19’18’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.8. 40°36’59’’ Kuzey - 40°17’35’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.9. 40°46’49’’ Kuzey - 40°15’6’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.10. 40°8’20’’ Kuzey - 41°1’8’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.11. 40°25’44’’ Kuzey - 40°50’13’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.12. 40°26’20’’ Kuzey - 40°50’21’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



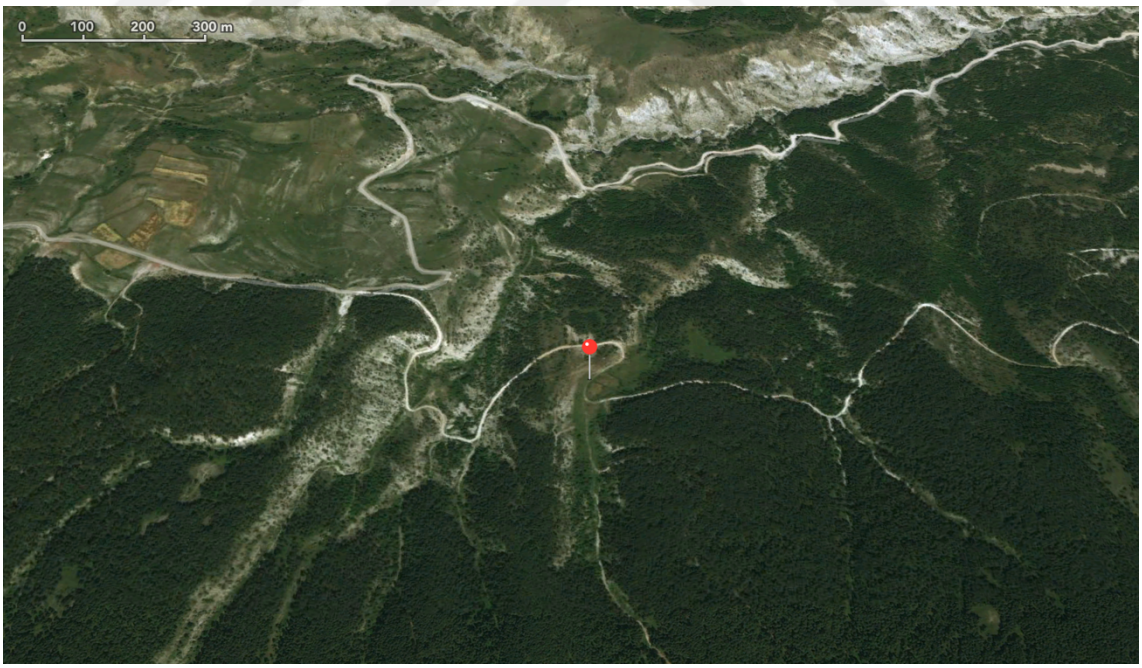
Şekil 3.13. 40°41’51’’ Kuzey - 40°41’0’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.14. 40°18’15’’ Kuzey - 41°31’56’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.15. 40°25’59’’ Kuzey - 41°35’28’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.16. 40°49’4’’ Kuzey - 42°4’26’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü



Şekil 3.17. 40°49’36’’ Kuzey - 42°6’47’’ Doğu konumunun uydu görüntüsü

3.2.2.b. Fungal izolasyon çalışmaları ve saf kültürlerin elde edilmesi

Araştırma kapsamındaki istasyonlardan uygun tekniklerle toplanan örnekler, aseptik koşullarda laboratuvar ortamına getirilerek saflaştırma işlemlerinin gerçekleştirileceği uygun besiyerlerine (PDA ve SDA) inoküle edilmiştir. Örneklerin 28°C’de 48 saatlik inkübasyonundan sonra oluşan karışık kültürlerden PDA veya SDA üzerine 3 nokta ekimi tekniği ile inokülasyonlar yapılmış ve hazırlanan yeni kültürler de aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Saf fungal kültürlerin izole edildiğinden emin olununcaya kadar 3 nokta ekimi uygulamaları tekrar edilmiştir.

3.2.2.c. Stok kültürlerin hazırlanması ve saklanması

PDA veya SDA yatık agar besiyerinde geliştirilmiş olan saf kültürler parafilm ile kaplanarak +4°C’de karanlıkta saklanmış ve her altı ayda bir yeni besiyerlerine ekilerek stokların devamı sağlanmıştır.

3.2.3. Fermantasyon denemeleri ve aktif fungal izolatların tanılanması

3.2.3.a. Saf olarak izole edilen fungal mikroorganizmaların biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması

Fungal izolatların biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması için stok kültürlerden yeniden PDA besiyerlerine inoküle edilerek hazırlanan taze saf kültürler kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından yeterli gelişme düzeyine ulaşan taze kültürlerden miseller aseptik koşullarda toplanmış ve 50 ml steril MBMC içeren fermantasyon deneyi düzeneklerine aktarılmıştır. Daha sonra bu düzenekler 28°C'de, 150 rpm hızla çalkalamalı olarak 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kültürlerin sıvı kısımlarından örneklemeler yapılmış ve bu örnekler etil alkol fermantasyonu araştırmalarına uygun ekstraksiyon metodu kullanılarak gaz kromatografisi analizi için uygun hale getirilmişlerdir.

3.2.3.b. Fermantasyon deneyi numunelerinin ekstraksiyonu ve gaz kromatografisi analizleri

Fermantasyon deneyleri neticesinde elde edilen örneklerin gaz kromatografisi analizlerine hazır hale getirilebilmesi için Gerchman *et al.* (2012) tarafından tanımlanan ekstraksiyon protokolü kullanılmıştır. Bu protokole göre;

1. Fermantasyon ortamından 600 µl sıvı alınarak steril bir 2 ml hacimli eppendorf tüpüne transfer edilir.
2. Örnek 8000 g'de 2 dakika santrifüj edilir.
3. Alttaki pelet rahatsız edilmeksizin 500 µl berrak üst faz alınır ve yeni bir tüpe transfer edilir.
4. İnternal standart olarak 5 µl *n*-bütanol eklenir ve 30 saniye en yüksek hızda vorteks ile karıştırılır.
5. Daha sonra 1 ml etil asetat eklenir ve 5 dakika boyunca en yüksek hızda vorteks ile karıştırılır.

6. Örnek 5000 g'de 2 dakika santrifüj edilir.
7. Üst faz gaz kromatografisi tüplerine transfer edilir ve analiz zamanına kadar +4 C°'de karanlıkta saklanır.

Ekstraksiyon işleminin ardından numunelerin gaz kromatografisi kullanılarak etil alkol içeriklerinin analizi Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde yaptırılmıştır.

3.2.3.c. Etanol üretme potansiyeli olan izolatların tarım atıklı besiyerinde gelişebilme özelliklerinin araştırılması

Çalışmamızda aktif izolatların belirlenebilmesi için saf fungal kültürlerin etil alkol üretebilme potansiyellerinin yanında onların tarım atıklı besiyerinde (ısıl ön işlem görmüş tarım atıklı fermantasyon ortamı) gelişebilme özellikleri de araştırılmıştır. Bu amaç için taze kültürlerden miseller aseptik koşullarda toplanmış ve 50 ml steril tarım atıklı besiyeri içeren deney düzeneklerine aktarılmıştır. Daha sonra bu düzenekler 28°C'de, 150 rpm hızla çalkalamalı olarak 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kültürlerde meydana gelen fungal gelişim incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2.3.d. Aktif fungal izolatların tanılanması

Çalışmamızda biyoetanol üretme yetenekleri ve tarım atıklı besiyerinde gelişme potansiyelleri tespit edilen aktif fungal izolatların tanılanmasında hem klasik mikroskobik incelemelerden hem de moleküler tekniklerden yararlanılmıştır. Klasik mikroskobik incelemelerin temelini Hasenekoğlu (1991) tarafından tanımlanan kriterler ve gözlemler oluşturmuştur.

Aktif fungal izolatların moleküler tekniklerle tanılanmasında ise ITS gen bölgelerinin sekans benzerliklerinin kıyaslanması temeli kullanılmıştır. Burada sırası ile fungal izolatların genomik DNA'ları izole edilmiş, bu DNA'lardaki ITS bölgeleri içerisindeki

belirli bölgeler spesifik primerlerin kullanılmasıyla PCR reaksiyonu sonucunda çoğaltılmış, PCR ürünlerinin sekans analizleri yaptırılmış ve elde edilen dizilerin NCBI'ın uluslararası veri bankasındaki bilgilerle kıyaslanması sonucunda moleküler tanılama yapılmıştır.

Fungal izolatlardan genomik DNA izolasyonu: Çalışmamızın bu aşamasında MBMC ortamında alkol ürettiği tespit edilen aktif izolatların genomik DNA izolasyonu için Alaylar (2014)'dan uyarlanan protokoller kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan DNA izolasyon protokol aşamaları aşağıda verildiği gibidir.

1. SDB besiyerinde 28°C'de 48 saat geliştirilen genç kültürler 10 dakika +4°C'de 18.000 rpm'de santifürüjlenir.
2. Üst faz dökülür ve geride kalan pelet üzerine sıvı azot dökülerek havan yardımıyla iyice ezilir.
3. Toz haline gelmiş pelet steril bir eppendorf tüpüne aktarılır. Üzerine 0,3 g steril cam boncuk (glass bead) ve 200 µl liziz tamponu eklenir.
4. Oluşan karışım maksimum hızda en az 2 dakika vortekslenerek iyice karıştırılır.
5. Üzerine 200 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımı ilave edilir ve numune tüpleri 5-10 kez alt-üst edilerek iyice karıştırılır.
6. 200 µl TE eklenir ve tekrar maksimum hızda en az 2 dakika vortekslenir.
7. Tüp +4°C'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürüjlenir.
8. Santifürüjleme işleminin ardından 400 µl'lik süpernatant kısmı yeni bir 2 ml'lik steril tüpe aktarılır.
9. Üzerine 1000 µl % 99,5'lik saf alkol eklenir ve tüpler birkaç kez alt-üst edilerek karıştırılır.
10. Yeniden +4°C'de 10 dakika 16.000 rpm'de santifürüj işlemi yapılır.
11. Santifürüj işleminden sonra pelet kısmı kalacak şekilde sıvı faz uzaklaştırılır ve 5 dakika kurutma kağıdı üzerinde süzme işlemi yapılır.
12. Peletlerin üzerine 300 µl Nuclei Lysis solüsyonu (Promega) eklenerek 1-2 kez alt-üst edilir.

13. Daha sonra 100 µl Protein Precipitation solüsyonu (Promega) eklenir ve oluşan karışım önce 1-2 kez alt-üst edilir ve daha sonra 1-2 dakika vortekslenir.
14. Örnekler 5 dakika -20°C'de veya buz üzerinde bekletilir ve + 4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüjlenir.
15. Santifürtüj işleminden sonra süpernatant kısmından 350 µl alınır ve yeni bir steril tüpe aktarılır.
16. Üzerine -20°C sıcaklığındaki izopropanolden 300 µl eklenir, tüpler 5-10 kez alt-üst edilir ve daha sonra + 4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüjlenir.
17. Üst faz dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra kalan pelet kurutma kağıdının üzerinde süzülmenin sağlanması maksadıyla 1 dakika bekletilir.
18. Peletin üzerine -20°C sıcaklığındaki %70'lik etanolden 300 µl eklenir ve karışım +4°C'de 16.000 rpm'de 6 dakika santifürüj edilir.
19. Üst faz ortamdan uzaklaştırılır ve kalan alkolün tamamen uçması için örnekler 37°C'lik etüvde 90 dakika veya 40°C'lik etüvde 60 dakika ağızları açık kalacak şekilde bekletilir.
20. Daha sonra örneklerin üzerine DNA Rehydration solüsyonundan (Promega) 50 µl eklenir.
21. Karışıma 1,5 µl RNase A solüsyonu (Promega) eklenir ve ardından örnekler 37°C'de 15 dakika inkübe edilir.
22. Bu sürenin ardından örnekler 65°C'lik etüvde 1 saat daha bekletildikten sonra PCR çalışmaları gerçekleştirilene kadar +4°C'de karanlıkta saklanır.

Genomik DNA'nın elektroforezi ve görüntülenmesi: 0,6 g agaroz üzerine 100 ml 0,5X TBE tamponu ilave edilir. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılır. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel çözeltisine 0,6 µl etidyum bromür çözeltisi eklenir ve içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tankına dökülür. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlanır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılır ve içerinde 0,5X TBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilir. Jeldeki çukurlara her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu ve 8 µl genomik DNA çözeltisi karıştırılarak yüklenir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 60 dakika yürütülür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile

görüntülenir ve sonuçlar bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilir.

ITS PCR reaksiyonunun hazırlanması: PCR'ı yapılacak her bir örnek için 25 µl'lik reaksiyon hazırlanır. Bir örnek için hazırlanan reaksiyon; 17,75 µl steril ultra saf su, 2,5 µl PCR Buffer (10x concentrated, without $MgCl_2$ – Sigma: P2317), 1 µl DMSO, 1,5 µl $MgCI_2$ solüsyonu (25 mM – Sigma: M8787), 0,25 µl ITS-1 primer solüsyonu (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), 0,25 µl ITS-4 primer solüsyonu (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0,5 µl dNTP solüsyonu (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – Sigma: D7295), 0.5 µl Taq DNA polimeraz enzim solüsyonu (Sigma: D4545) ve 1 µl genomik DNA ilave edilir.

ITS PCR programı: Hazırlanan örnekler, 3 dakika 94°C'de ilk denatürasyon, bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1,5 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 7 dakika uzama basamağının ardından oluşacak şekilde programlanan PCR cihazına yerleştirilir. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapılır (Hündür 2015).

ITS PCR ürünlerinin elektroforezi ve görüntülenmesi: 1 g agaroz üzerine 100 ml 0,5X TBE tamponu ilave edilir. Karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılır. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jel çözeltisine 0,6 µl etidyum bromür çözeltisi eklenir ve içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez tankına dökülür. 15-20 dakika beklenerek jelin donması sağlanır. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılır ve içerinde 0,5X TBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilir. Jeldeki ilk çukura, DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000 bç] (Sigma D7058) 10 µl yüklenir. Jeldeki diğer çukurlara ise her bir örnek için 2 µl 6X yükleme tamponu ve 8 µl genomik DNA çözeltisi karıştırılarak yüklenir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 90 dakika yürütülür. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenir ve sonuçlar bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilir.

Sekans analizi ve sonuçların değerlendirilmesi: ITS PCR uygulamasıyla çoğaltılan spesifik DNA fragmentlerinin sekans analizleri MACROGEN firmasından hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. Daha sonra elde edilen bu sekans verilerinin NCBI veri tabanında analizleri sonucunda izolatların moleküler tanı işlemleri tamamlanmıştır.

3.2.3.e. Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması

Çalışmanın bu aşamasında aktif fungal izolatların PDA besiyerlerinde taze kültürleri hazırlanmış ve bu kültürlerden toplanan miseller aseptik koşullarda %2,5 oranında ön işleme tabi tutulmuş tarım atığı içeren fermentör düzeneğine transfer edilmiştir. Hazırlanan fermantasyon ortamı 28°C'de, 150 rpm hızla çalkalamalı olarak 15 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca 1. 2. 3. 5. 10. ve 15. günlerde kültürlerin sıvı kısımlarından örneklemeler yapılmış ve bu örnekler etil alkol fermantasyonu araştırmalarına uygun ekstraksiyon metodu kullanılarak gaz kromatografisi analizi için uygun hale getirilmişlerdir.

3.2.3.f. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması

Çalışmanın bu aşamasında aktif fungal izolatların PDA besiyerlerinde taze kültürleri hazırlanmış ve bu kültürlerden toplanan miseller aseptik koşullarda %2,5 oranında ön işleme tabi tutulmamış tarım atığı içeren fermentör düzeneğine transfer edilmiştir. Hazırlanan fermantasyon ortamı 28°C'de, 150 rpm hızla çalkalamalı olarak 15 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca 1. 2. 3. 5. 10. ve 15. günlerde kültürlerin sıvı kısımlarından örneklemeler yapılmış ve bu örnekler etil alkol fermantasyonu araştırmalarına uygun ekstraksiyon metodu kullanılarak gaz kromatografisi analizi için uygun hale getirilmişlerdir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Tarımsal Atıkların Temini ve Analiz Çalışmaları

Çalışmada kullanılan ayçiçeği, buğday ve mısır bitkilerine ait tarımsal atıkların Erzurum ili sınırlarında yer alan uygun zirai ekim alanlarından ürün hasadı sonrasında toplanması, laboratuvar ortamına getirilmesi ve içerik analizlerine hazırlanması aşamaları Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan tarımsal atıkların temin edildiği ekili arazilerden genel bir görünüm



Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan tarımsal atıkların temin edildiği ekili arazilerin hasat sonrasını gösteren genel bir görünüm



Şekil 4.3. Buğday atıklarının temin edildiği tarlanın genel görünümü



Şekil 4.4. Ayçiçeği atıklarının ayrıştırılması



Şekil 4.5. Tarımsal atıkların öğütülmesi



Şekil 4.6. Öğütülmüş tarımsal atıklar

Çalışmamız kapsamında bölgemizden toplanan ve laboratuvar uygulamaları için hazır hale getirilmiş olan tarımsal atıkların genel içerik, karbohidrat içeriği, mineral içeriği ve eser element içeriği analizleri bulguları Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Tarım atıklarının genel içerik analizi sonuçları

Tarım Atığı	Toplam Karbon (C) %	Toplam Azot (N) %	Nem %	Kül %
Mısır Gövde	36,4765	1,029	14,32	3,76
Mısır Koçan ve Yaprağı	23,7065	0,556	12,33	2,11
Ayçiçeği Gövde	34,1765	0,737	15,46	4,35
Ayçiçeği Çiçek Tablası	37,7560	0,720	12,14	2,35
Buğday Sapı	35,1824	0,891	10,24	2,04

Çizelge 4.2. Tarım atıklarının karbohidrat içeriği analizi sonuçları.

Tarım Atığı	Sükroz %	Trehaloz %	Glukoz %	Rafinoz %	Toplam Oligosakkarit %	Toplam Şeker %
Mısır Gövde	0,34	0,22	0,25	0,89	1,76	5,15
Mısır Koçan ve Yaprağı	0,28	0,43	0,76	1,65	2,11	5,55
Ayçiçeği Gövde	2,44	0,49	0,35	1,96	2,30	5,64
Ayçiçeği Çiçek Tablası	3,75	0,61	0,43	2,88	3,44	9,22
Buğday Sapı	0,29	0,41	0,32	1,93	2,02	5,49

Çizelge 4.3. Tarım atıklarının mineral içeriği analizi sonuçları

Tarım Atığı	Fosfor (P) %	Potasyum (K) %	Kalsiyum (Ca) %	Magnezyum (Mg) %	Sodyum (Na) %
Mısır Gövde	0,24	1,65	0,24	0,15	0,03
Mısır Koçan ve Yaprağı	0,11	1,24	0,20	0,12	0,05
Ayçiçeği Gövde	0,18	2,34	0,30	0,22	0,06
Ayçiçeği Çiçek Tablası	0,15	3,45	0,37	0,21	0,04
Buğday Sapı	0,17	2,11	0,21	0,21	0,06

Çizelge 4.4. Tarım atıklarının eser element içeriği analizi sonuçları.

Tarım Atığı	Demir (Fe) mg/kg	Bakır (Cu) mg/kg	Mangan (Mn) mg/kg	Çinko (Zn) mg/kg	Bor (B) mg/kg
Mısır Gövde	56,47	28,12	18,44	20,13	15,64
Mısır Koçan ve Yaprağı	90,12	26,57	32,13	24,35	13,22
Ayçiçeği Gövde	75,64	18,79	23,35	17,65	20,12
Ayçiçeği Çiçek Tablası	87,23	34,23	24,33	28,76	11,25
Buğday Sapı	61,01	29,17	21,22	21,45	11,90

4.2. Fungal İzolat Kaynaklarının Temini ve İzolasyon Çalışmaları

4.2.1. Fungal izolat kaynaklarının temini için arazi çalışmaları

Fungal izolat kaynaklarının temini için yapılan arazi çalışmalarına ait konum bilgileri ve ilgili örnekleme verileri Çizelge 4.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Arazi çalışmasına ait konum ve örnekleme bilgileri.

No	Yer Adı	Konum	Örnekleme Sayısı
1	Güvercinlik Köyü GÜMÜŞHANE	40°22'22'' Kuzey 39°49'43'' Doğu	21
2	D-883/883.04 GÜMÜŞHANE	40°19'56'' Kuzey 39°30'54'' Doğu	17
3	Hamsiköy TRABZON	40°40'44'' Kuzey 39°26'21'' Doğu	30
4	Uzungöl TRABZON	40°36'45'' Kuzey 40°18'44'' Doğu	20
5	Uzungöl TRABZON	40°35'48'' Kuzey 40°19'18'' Doğu	55
6	Uzungöl TRABZON	40°36'59'' Kuzey 40°17'35'' Doğu	42
7	Dernekpazarı TRABZON	40°46'49'' Kuzey 40°15'6'' Doğu	9
8	Ilıca ERZURUM	40°8'20'' Kuzey 41°1'8'' Doğu	5
9	Pazaryolu ERZURUM	40°25'44'' Kuzey 40°50'13'' Doğu	10
10	Pazaryolu ERZURUM	40°26'20'' Kuzey 40°50'21'' Doğu	22
11	İkizdere RİZE	40°41'51'' Kuzey 40°41'0'' Doğu	31

Çizelge 4.5. (devam)

12	Tortum ERZURUM	40°18’15’’ Kuzey 41°31’56’’ Doğu	8
13	Tortum ERZURUM	40°25’59’’ Kuzey 41°35’28’’ Doğu	7
14	Olur ERZURUM	40°49’4’’ Kuzey 42°4’26’’ Doğu	34
15	Olur ERZURUM	40°49’36’’ Kuzey 42°6’47’’ Doğu	30

Yine Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de bu istasyonlardan alınan bazı örnekler görülmektedir.



Şekil 4.7. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.8. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.9. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.10. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.11. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.12. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.13. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.14. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.15. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.16. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.17. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.18. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.19. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.20. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü



Şekil 4.21. Bozunmakta olan lignoselülozik materyallerin örnek görüntüsü

4.2.2. Fungal izolasyon çalışmaları ve saf kültürlerin elde edilmesi

PDA ve SDA besiyerlerine yapılan tekrarlı ekimler sonucunda, lignoselüloz içeren atık materyallerden etanol üretiminde kullanılabilecek lignoselülozik etkinlik potansiyelli 351 adet saf fungal mikroorganizma kültürü elde edilmiştir. Fungal saf kültürlere ait örnek görüntü Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Fungal saf kültürlere ait örnek görüntü

4.3. Fermantasyon Denemeleri ve Aktif Fungal İzolatların Tanılanması

4.3.1. Saf olarak izole edilen fungal mikroorganizmaların biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması

Çalışmamızın bu basamağında fungal izolatların 61 tanesi model test ortamı olan MBMC besiyerinde yeterli gelişme gösterebilmiş ve etil alkol analizleri bu kültürler üzerinden yapılmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Fungal izolatların MBMC besiyerinde etil alkol üretim potansiyelleri

No	Örnek Kodu	Örnek Özelliği	Etanol Üretim Potansiyeli (g/L)
1	MG1	Negatif Kontrol	0,00000
2	MG2	Pozitif Kontrol	26,09683
3	MG3	Test Organizması	1,72349
4	MG4	Test Organizması	0,00000

Çizelge 4.6. (devam)

5	**MG5**	**Test Organizması**	**0,00000**
6	MG6	Test Organizması	5,25874
7	MG7	Test Organizması	4,27846
8	MG8	Test Organizması	6,61101
9	MG9	Test Organizması	26,68950
10	MG10	Test Organizması	0,00000
11	MG11	Test Organizması	9,93469
12	MG12	Test Organizması	5,88301
13	MG13	Test Organizması	7,50806
14	MG14	Test Organizması	0,00000
15	MG15	Test Organizması	0,00000
16	MG16	Test Organizması	6,12998
17	MG17	Test Organizması	0,00000
18	MG18	Test Organizması	6,54332
19	MG19	Test Organizması	3,22856
20	MG20	Test Organizması	0,00000
21	MG21	Test Organizması	7,71234
22	MG22	Test Organizması	6,55370
23	MG23	Test Organizması	7,71035
24	MG24	Test Organizması	7,94076
25	MG25	Test Organizması	1,87142
26	MG26	Test Organizması	23,41578
27	MG27	Test Organizması	7,97773
28	MG28	Test Organizması	6,96947
29	MG29	Test Organizması	1,65679
30	MG30	Test Organizması	0,00000
31	MG31	Test Organizması	4,33970
32	MG32	Test Organizması	18,83114
33	MG34	Test Organizması	13,72330
34	MG35	Test Organizması	5,35174
35	MG36	Test Organizması	11,21028
36	MG37	Test Organizması	8,37723
37	MG38	Test Organizması	0,00000
38	MG39	Test Organizması	1,97188
39	MG40	Test Organizması	0,00000
40	MG41	Test Organizması	9,24648

Çizelge 4.6. (devam)

41	**MG42**	**Test Organizması**	**0,00000**
42	MG43	Test Organizması	1,35502
43	MG44	Test Organizması	0,00000
44	MG45	Test Organizması	4,12368
45	MG46	Test Organizması	0,00000
46	MG47	Test Organizması	4,37809
47	MG50	Test Organizması	3,91674
48	MG51	Test Organizması	0,00000
49	MG52	Test Organizması	6,17964
50	MG53	Test Organizması	7,10869
51	MG54	Test Organizması	8,56928
52	MG55	Test Organizması	30,66045
53	MG56	Test Organizması	2,12588
54	MG57	Test Organizması	29,57240
55	MG58	Test Organizması	6,92494
56	MG59	Test Organizması	3,38413
57	MG60	Test Organizması	0,00000
58	MG61	Test Organizması	0,00000
59	MG62	Test Organizması	2,48440
60	MG63	Test Organizması	4,99565
61	MG64	Test Organizması	1,68426
62	MG65	Test Organizması	0,00000
63	MG66	Test Organizması	0,00000

4.3.2. Etanol üretme potansiyeli olan izolatların tarım atıklı besiyerinde gelişebilme özelliklerinin araştırılması

Çalışmamızın bu basamağında fungal izolatların 33 tanesi steril tarım atıklı besiyerinde yeterli gelişme gösterebilmiş ve mikrobiyal tanılama çalışmaları bu kültürler üzerinden yapılmıştır. MBMC ortamında yapılan etil alkol üretebilme potansiyeli araştırmasına tamamlayıcı olarak yapılan bu deneye dahil olan 61 örneğin tarım atıklı besiyerinde gelişebilme potansiyeli test sonuçları Çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7. Fungal izolatların tarım atıklı besiyerinde gelişebilme potansiyelleri

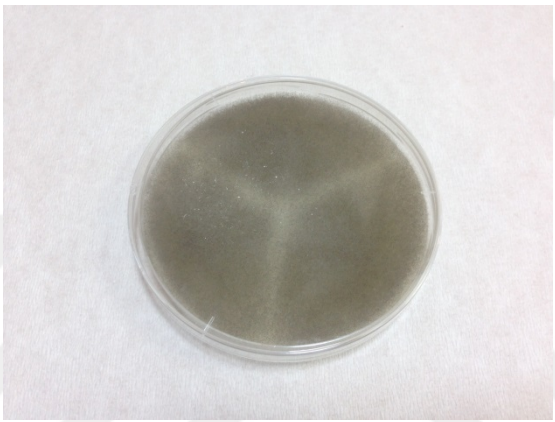
Örnek Kodu	Gelişme Durumu
MG3	Gelişme gözlenmiştir.
MG4	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG5	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG6	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG7	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG8	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG9	Zayıf gelişme gözlenmiştir.
MG10	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG11	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG12	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG13	Gelişme gözlenmiştir.
MG14	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG15	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG16	Gelişme gözlenmiştir.
MG17	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG18	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG19	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG20	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG21	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG22	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG23	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG24	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG25	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG26	Gelişme gözlenmiştir.
MG27	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG28	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG29	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG30	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG31	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG32	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG34	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG35	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. (devam)

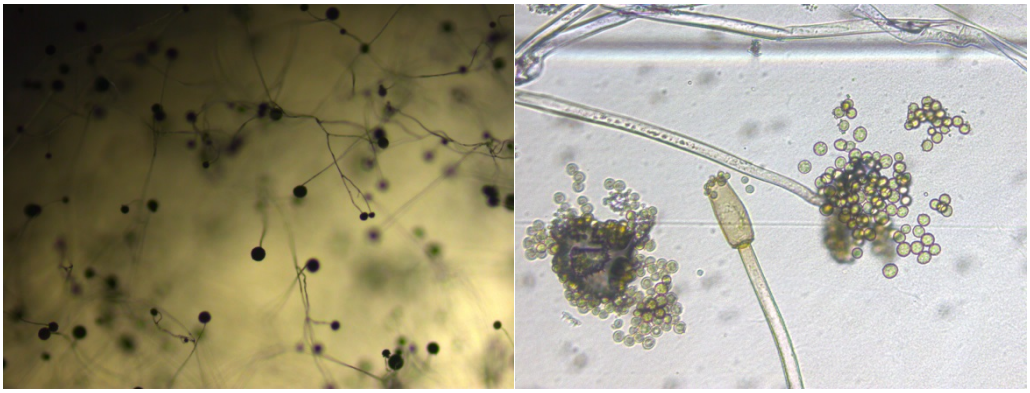
MG36	**Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.**
MG37	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG38	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG39	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG40	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG41	Çok iyi biyokütle oluşturduğu gözlenmiştir.
MG42	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG43	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG44	Gelişme gözlenmiştir.
MG45	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG46	Gelişme gözlenmiştir.
MG47	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG50	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG51	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG52	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG53	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG54	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG55	Zayıf gelişme gözlenmiştir.
MG56	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG57	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG58	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG59	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG60	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG61	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG62	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG63	İyi derecede gelişme gözlenmiştir.
MG64	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG65	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.
MG66	Dikkate değer bir gelişme gözlenmemiştir.

4.3.3. Aktif fungal izolatların tanılanması

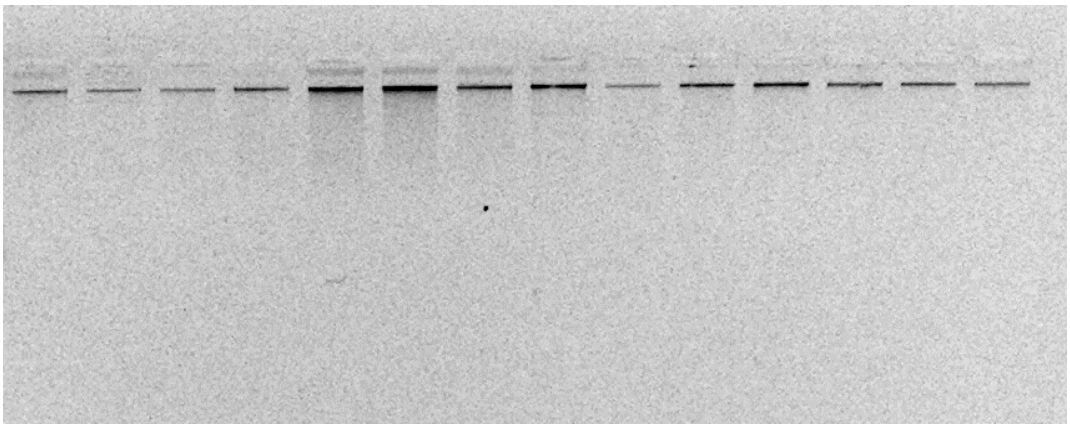
Çalışmamızda biyoetanol üretme yetenekleri ve/veya tarım atıklı besiyerinde gelişebilme özellikleri dikkate alınarak seçilen 33 aktif fungal izolatın mikroskobik incelemeler ve moleküler yöntemlerle tanılama işlemleri yapılmıştır. Çalışmanın bu adımına ait bulgular Şekiller 4.23 – 4.26'da ve Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.



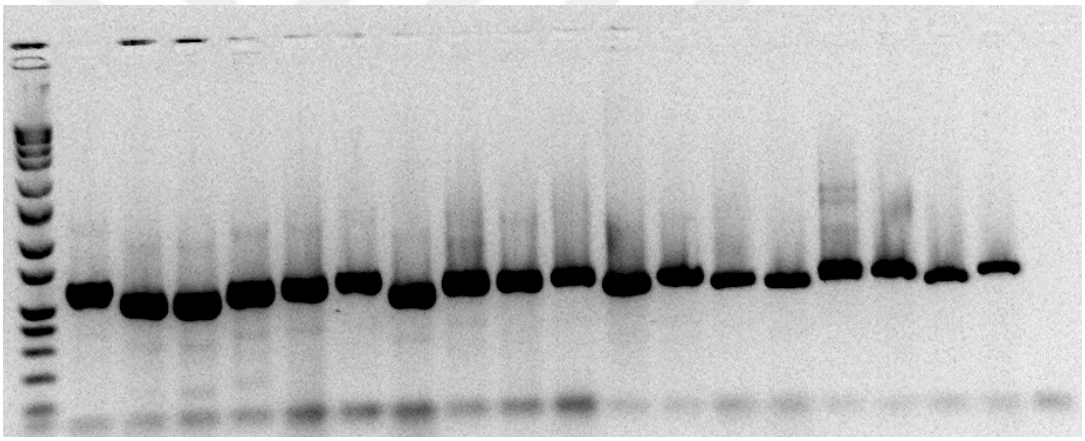
Şekil 4.23. Fungal izolatların katı kültürdeki örnek görüntüsü (MG26)



Şekil 4.24. Fungal izolatların mikroskop incelemelerindeki örnek görüntüleri (MG26)



Şekil 4.25. Aktif izolatların DNA izolasyonu çalışmalarına ait sonuçların agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmesi



Şekil 4.26. ITS-PCR uygulamalarına ait sonuçların agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmesi

Çizelge 4.8. Aktif fungal izolatların tanı verileri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Okunan Nükleotid Sayısı
MG3	*Penicillium brevicompactum*	515
MG6	*Fusarium solani*	530
MG8	*Trichoderma harzianum*	545

Çizelge 4.8. (devam)

MG9	***Mucor plumbeus***	**549**
MG11	*Fusarium solani*	485
MG13	*Mucor plumbeus*	663
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	482
MG18	*Fusarium verticillioides*	493
MG23	*Trichoderma polysporum*	560
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	530
MG25	*Trichoderma atroviride*	383
MG26	*Mucor plumbeus*	459
MG27	*Fusarium verticillioides*	454
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichodermaroseum*)	345
MG35	*Fusarium solani*	304
MG37	*Trichoderma harzianum*	522
MG41	*Trichoderma atroviride*	346
MG43	*Fusarium oxysporum*	355
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	341
MG45	*Fusarium sp. A*	523
MG46	*Botrytis cinerea*	393
MG47	*Fusarium solani*	490
MG50	*Trichoderma harzianum*	360
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	321
MG52	*Trichoderma harzianum*	419
MG53	*Trichoderma harzianum*	490
MG54	*Trichoderma harzianum*	338
MG55	*Mucor sp.*	393
MG56	*Trichoderma harzianum*	389
MG58	*Fusarium verticillioides*	377
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	577
MG62	*Fusarium sp. B*	396
MG63	*Trichoderma harzianum*	380

4.3.4. Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması

Aktif fungal izolatların ön işlem görmüş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerini belirlemek amacıyla yapılan deneylerin 1. 2. 3. 5. 10. ve 15. günlerde yapılan örneklemelerine ait etil alkol analizi sonuçları Çizelgeler 4.9–4.13'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.9. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "ayçiçeği-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0,5	1	1	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	2	2,5	2,7	2,7	2,8	2,8
MG9	*Mucor plumbeus*	5	7	10	11,1	12	12
MG11	*Fusarium solani*	2	2,2	2,2	2	2	2
MG13	*Mucor plumbeus*	18	22,1	22,1	22,2	22	17
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0,8	1	1	0,5	0,5	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0,1	1	1	1	1,1	1
MG25	*Trichoderma atroviride*	0,3	0,1	0,1	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	23	23,5	24	24	25	24,7
MG27	*Fusarium verticillioides*	0,5	3	2,8	3	3	3
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0,4	0,2	0,2	0,3	0,1	0
MG35	*Fusarium solani*	4	5	5,1	5	5,5	5
MG37	*Trichoderma harzianum*	0,1	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	22	25	26	26	25,9	22
MG43	*Fusarium oxysporum*	4	5	5,5	5,7	5,5	5
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	3	5	5,5	6	6,1	5,7
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	2	2	2	2	1,9	1
MG50	*Trichoderma harzianum*	4,4	5	5	5,1	4,5	4,4
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	2,1	2,1	2,2	2	2	2
MG53	*Trichoderma harzianum*	4	4,4	4,4	4,5	4,2	4
MG54	*Trichoderma harzianum*	4	4,1	4,2	4	4	4
MG55	*Mucor sp.*	15	21	22	22,1	20	18
MG56	*Trichoderma harzianum*	3	3,1	3,1	3	3,2	3,3
MG58	*Fusarium verticillioides*	6	6,1	6,1	3	1	0
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	12	12,4	12,4	13	12,5	12
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	1	1	1,1	0,9	0,9	0,9

Çizelge 4.10. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "ayçiçeği-çiçek tablası" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	1	1,1	1,1	1	0,9	0,6
MG8	*Trichoderma harzianum*	2,4	2,6	2,7	2,7	2,6	2,6
MG9	*Mucor plumbeus*	5,5	5,7	7	11	11	10
MG11	*Fusarium solani*	2	2	2	2,1	2	2
MG13	*Mucor plumbeus*	18,8	20	20,2	20,3	23	23
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0,1	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	1	1	1	1,1	0,8	0,5
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0,2	0,3	0,1	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0,5	0,6	1	1	1	1
MG25	*Trichoderma atroviride*	0,1	0,1	0,2	0,1	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	20	22	23	23	21	20
MG27	*Fusarium verticillioides*	0,5	0,7	1	1	1,1	1,3
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0,3	0,8	1,5	1,6	1,9	1
MG35	*Fusarium solani*	3	3,7	5	5,1	4,9	4,9
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	20	22	23	23,5	23	23
MG43	*Fusarium oxysporum*	3	3,3	4	4	3,7	3,5
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	3	3,4	3,4	4	3	3,1
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	1	2	2,2	2,3	2,2	2,2
MG50	*Trichoderma harzianum*	0,7	1	1	1,3	1,2	1
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	2,6	3	3	3,3	3,4	3,3
MG53	*Trichoderma harzianum*	4	4,1	4,1	5	4,9	4,9
MG54	*Trichoderma harzianum*	3	3,3	3,7	4,2	4	4
MG55	*Mucor sp.*	15,5	17	22	21,9	22	20
MG56	*Trichoderma harzianum*	2,5	2,6	3	3,3	3,1	3
MG58	*Fusarium verticillioides*	3	3,3	5	5,2	5	5,1
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	9	11,2	11,3	14	11	10
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0,9	1,3	1,4	2	2	1,8

Çizelge 4.11. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "mısır-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	1,1	1	1	0,9	0,9	0,5
MG9	*Mucor plumbeus*	2	2,2	2,3	2,5	2	2,1
MG11	*Fusarium solani*	1	0,9	1,1	1,2	1,1	1,1
MG13	*Mucor plumbeus*	16	17,7	18	18,3	17	16,9
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	0,5
MG25	*Trichoderma atroviride*	0	0	0	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	17	17,3	17,5	17,4	17	16,1
MG27	*Fusarium verticillioides*	0	0,2	1	1,1	1,7	1,6
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	2	2,4	2,6	2,6	2,5	2,5
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	17	22	24	22,2	20	20
MG43	*Fusarium oxysporum*	3,3	3,2	3,3	3,5	3	2,8
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	2,1	2,2	2,2	2,5	2,4	2,4
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	1	1,1	1,1	1,1	1	1
MG50	*Trichoderma harzianum*	4	4,1	4	4	4,1	3,9
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	2	2	2,1	1,9	2	2
MG53	*Trichoderma harzianum*	2,2	2,2	2,2	2,3	2	2
MG54	*Trichoderma harzianum*	3,5	3,3	3,6	3,6	3,4	3,1
MG55	*Mucor sp.*	15	16,6	21	21,2	21	20,9
MG56	*Trichoderma harzianum*	2,2	1,9	2,3	2,2	2,1	2,2
MG58	*Fusarium verticillioides*	3	3,3	3,3	3,2	3,1	3
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	7	7,1	7,5	7,6	7,5	7,3
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.12. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "mısır-koçan ve yapraklar" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0,1	0,3	0,9	0,9	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	1,9	2	2,1	2,2	2,2	2,1
MG9	*Mucor plumbeus*	8	8,5	9	9	12	12,2
MG11	*Fusarium solani*	2,5	2,7	3	3	2,9	2,9
MG13	*Mucor plumbeus*	19	23	24	24,4	24,5	23,1
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0,9	1,1	0,8	0,7	0,7	0,5
MG18	*Fusarium verticillioides*	1	1	1	1	1,1	1
MG23	*Trichoderma polysporum*	0,2	0,4	0,3	0,3	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0,5	1	1	1,5	1,5	1,5
MG25	*Trichoderma atroviride*	0,2	0,5	0,5	1	1	1,1
MG26	*Mucor plumbeus*	22	22,7	24	24,1	24,2	22,2
MG27	*Fusarium verticillioides*	2,5	4	4,1	4,1	4	4
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0,1	0,2	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	4,1	4	4	4	3,9	3,1
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	20	22	22,6	22,9	24	24
MG43	*Fusarium oxysporum*	3,3	4,1	4,5	4,5	4,7	4,2
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	3,1	3	3	3	1,9	1
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	1,8	2,2	2,4	2,5	2,6	2,1
MG50	*Trichoderma harzianum*	3,5	3,3	3,3	3,5	3,1	2,6
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	1,1	1,1	1,4	2	2	2
MG53	*Trichoderma harzianum*	1,6	2	2,2	2,2	2	1,9
MG54	*Trichoderma harzianum*	2	2	2	2,1	1,9	1,3
MG55	*Mucor sp.*	16	23	25	25,1	22	20
MG56	*Trichoderma harzianum*	1,8	2	2,1	2,3	2	2
MG58	*Fusarium verticillioides*	2	2	2,4	5	4,9	5
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	10	11,1	11,3	12	11,9	11,7
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	1	1,2	1	1	0,9	0,7

Çizelge 4.13. Aktif fungal izolatların ısıl işlem görmüş "buğday-sap" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	1,8	2,5	2,6	2,6	2,4	2,2
MG9	*Mucor plumbeus*	8	8,1	8,8	9	9	8,9
MG11	*Fusarium solani*	1	1,9	2,5	2,7	2,6	2,6
MG13	*Mucor plumbeus*	19	21	22	24	24	20
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0	0	0	0	0	0
MG25	*Trichoderma atroviride*	0,1	0,3	0,3	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	22	26	26,2	27,1	26,9	25,5
MG27	*Fusarium verticillioides*	1	1	1,2	1,5	1,5	1,4
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	4	4,5	4,9	5	5	4,2
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	15	17,7	20,1	21	20,9	20
MG43	*Fusarium oxysporum*	3,5	4,2	4,7	5	5	5
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	3,5	3,7	3,9	4	4	4,1
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	2,2	2,5	2,5	2,3	2	1,6
MG50	*Trichoderma harzianum*	3,7	4,2	4,4	4,4	4,4	4
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	1,5	1,7	1,9	2	1,8	1,1
MG53	*Trichoderma harzianum*	4	4,2	4,2	4,2	4	4,1
MG54	*Trichoderma harzianum*	3,9	4,4	4,4	4,5	4,4	4,4
MG55	*Mucor sp.*	15	17	17,9	20	20	19
MG56	*Trichoderma harzianum*	2,5	2,9	2,9	3	3	3
MG58	*Fusarium verticillioides*	5	5,5	5,5	5,7	5,5	5,6
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	10,9	12	12	12,1	12	11,9
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0,6	1	1,1	1	1	1

4.3.5. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerinin araştırılması

Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş tarım atıklarından biyoetanol üretme potansiyellerini belirlemek amacıyla yapılan deneylerin 1. 2. 3. 5. 10. ve 15. günlerde yapılan örneklemelerine ait etil alkol analizi sonuçları Çizelgeler 4.14–4.18'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.14. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "ayçiçeği-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri.

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG9	*Mucor plumbeus*	0	0	0	0	0	0
MG11	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG13	*Mucor plumbeus*	0,1	1	1,1	0,8	0,2	0,2
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0	0	0	0	0	0
MG25	*Trichoderma atroviride*	0	0	0	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	0	2	2,2	1,8	1,1	1
MG27	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	0,1	2,3	2,8	2,2	2,1	1,6
MG43	*Fusarium oxysporum*	0	0	0	0	0	0
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	0	0	0	0	0	0
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG50	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG53	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG54	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG55	*Mucor sp.*	0,1	1,5	1,7	1,6	1,1	0,3
MG56	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.14. (devam)

MG58	***Fusarium verticillioides***	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	0,1	1,4	2	1,9	1,5	1,1
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.15. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "ayçiçeği-çiçek tablası" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	**Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı**	**Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)**					
		1.	**2.**	**3.**	**5.**	**10.**	**15.**
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG9	*Mucor plumbeus*	0	0	0	0	0	0
MG11	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG13	*Mucor plumbeus*	0	1	1,1	0,8	0,3	0
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0	0	0	0	0	0
MG25	*Trichoderma atroviride*	0	0	0	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	0,2	1,1	2,9	1,8	1	0
MG27	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	0,1	2	3,1	2,1	1,7	1,5
MG43	*Fusarium oxysporum*	0	0	0	0	0	0
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	0	0	0	0	0	0
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG50	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG53	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG54	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG55	*Mucor sp.*	0	0,5	1	0,5	0,2	0
MG56	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG58	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	0,2	0,6	0,9	0,9	0	0
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.16. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "mısır-gövde" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG9	*Mucor plumbeus*	0	0	0	0	0	0
MG11	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG13	*Mucor plumbeus*	0	0,1	0,2	0	0	0
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0	0	0	0	0	0
MG25	*Trichoderma atroviride*	0	0	0	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	0	0,5	1,6	0,6	0,1	0
MG27	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	0	0,1	1	0,8	0	0
MG43	*Fusarium oxysporum*	0	0	0	0	0	0
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	0	0	0	0	0	0
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG50	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG53	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG54	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG55	*Mucor sp.*	0	0,2	0,5	0,4	0	0
MG56	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG58	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	0	0	0	0	0	0
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.17. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "mısır-koçan ve yapraklar" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG9	*Mucor plumbeus*	0	0	0	0	0	0
MG11	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG13	*Mucor plumbeus*	0	0,1	0,3	0,3	0,2	0
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0	0	0	0	0	0
MG25	*Trichoderma atroviride*	0	0	0	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	0,4	2	2,1	1,6	1,5	1
MG27	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	0,2	1,7	2,7	2,4	2,4	2,2
MG43	*Fusarium oxysporum*	0	0	0	0	0	0
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	0	0	0	0	0	0
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG50	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG53	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG54	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG55	*Mucor sp.*	0,2	1	1,2	1,1	0,7	0,1
MG56	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG58	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	0	0,1	0,5	0,4	0,2	0,1
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.18. Aktif fungal izolatların ön işlem görmemiş "buğday-sap" tarım atıklı besiyerlerinde etanol üretebilme potansiyelleri

Örnek Kodu	Mikroskobik İnceleme + Moleküler Tanı	Etanol Üretim Potansiyeli (%) Örnekleme Zamanı (Gün)					
		1.	2.	3.	5.	10.	15.
MG3	*Penicillium brevicompactum*	0	0	0	0	0	0
MG6	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG8	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG9	*Mucor plumbeus*	0	0	0	0	0	0
MG11	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG13	*Mucor plumbeus*	0	0,2	0,5	1	0,9	0,2
MG16	*Neonectria candida* (*Fusarium candidum*)	0	0	0	0	0	0
MG18	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG23	*Trichoderma polysporum*	0	0	0	0	0	0
MG24	*Trichoderma paraviridescens*	0	0	0	0	0	0
MG25	*Trichoderma atroviride*	0	0	0	0	0	0
MG26	*Mucor plumbeus*	0,2	1,7	2,8	2,1	2	1,7
MG27	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG28	*Trichothecium roseum* (*Trichoderma roseum*)	0	0	0	0	0	0
MG35	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG37	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG41	*Trichoderma atroviride*	0,4	2,4	3,2	2,7	2,7	2,6
MG43	*Fusarium oxysporum*	0	0	0	0	0	0
MG44	*Sarea difformis* (*Lichen sarea*)	0	0	0	0	0	0
MG45	*Fusarium sp. A*	0	0	0	0	0	0
MG46	*Botrytis cinerea*	0	0	0	0	0	0
MG47	*Fusarium solani*	0	0	0	0	0	0
MG50	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG51	*Nectria haematococca* (*Fusarium solani*)	0	0	0	0	0	0
MG52	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG53	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG54	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG55	*Mucor sp.*	0,1	1	1,1	1,3	1,2	1
MG56	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0
MG58	*Fusarium verticillioides*	0	0	0	0	0	0
MG59	*Trichoderma citrinoviride*	0	0,1	0,5	0,5	0	0
MG62	*Fusarium sp. B*	0	0	0	0	0	0
MG63	*Trichoderma harzianum*	0	0	0	0	0	0

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşam standartlarının yükseltilmesinde önemli bir rol oynayan enerji; ekonomik ve sosyal kalkınmanın temel bileşenlerinden biridir. Sürdürülebilir bir kalkınma da, sürekli ve kaliteli bir enerji arzıyla mümkündür (Kavak 2005). Günümüzde en önemli enerji kaynağı olan fosil yakıtların (kömür, petrol, doğalgaz) süratle azalması, öte yandan bu kaynakların yarattığı çevresel problemler, alternatif enerji kaynakları arayışını ve yeni politikaların belirlenmesi ihtiyacını doğurmuştur (Kavak 2005; Hahn-Hägerdal *et al.* 2006; Wright 2006; Uihlein and Schebek 2009; EIA 2012). Bu çerçevede, fosil yakıtların yerini rüzgar, güneş, hidrojen ve biyoyakıtlar gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının alması öngörülmektedir (Cheng and Timilsina 2011; EERE 2011; Melikoğlu ve Albostan 2011; Wang *et al.* 2011; EIA 2012; Limayem and Ricke 2012; RFA 2012). Bu alternatif enerji kaynakları içerisinde biyoyakıtlar, üretimlerinin kolay, uygulanabilir ve teknolojik açıdan oturmuş olması sebebiyle dikkat çekmektedir (Cheng and Timilsina 2011; EERE 2011; Kuhad *et al.* 2011; Melikoğlu ve Albostan 2011; Nigam and Singh 2011; Lee *et al.* 2012). Biyoyakıtlar içerisinde de, çağımızda, motorlu taşıtlar için en çok kullanılan, sıvı özellikteki, yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyoetanolün önemi giderek artmaktadır (Lewis 1996; Demirbas 2005; Hahn-Hägerdal *et al.* 2006; Chandel *et al.* 2007; Cheng and Timilsina 2011; Lee *et al.* 2012; Limayem and Ricke 2012).

Dünya çapındaki birçok ülke fosil yakıtların hızlı tükenişine bağlı olarak araştırma odaklarını mekanik güç ve yakıt üretiminde kullanılabilecek yenilenebilir enerji kaynaklarına yöneltmiştir (Mabee and Saddler 2010; Wang *et al.* 2011; Limayem and Ricke 2012; Menon and Rao 2012; Sarkar *et al.* 2012). Taşımacılık amacıyla kullanılan, yakıt pazarında, petrolden elde edilen ürünlerin yerini alabilecek potansiyele sahip olan biyoetanol üretiminin maliyeti de fosil yakıtlarla kıyaslanabilir özelliktedir. Böylelikle biyoetanolün önemi, küresel enerji pazarlarında, küresel ısınma ve iklim değişiklikleri de dahil olmak üzere birçok nedenden dolayı hızla artmaktadır. Literatür verilerine göre 2001 yılında dünya biyoetanol üretimi 31 milyar litre, 2006 yılında ise 39 milyar litre

olarak kaydedilmiştir ve bu oranın yakın zamanda 100 milyar litreyi aşması beklenmektedir (Taherzadeh and Karimi 2007; Sarkar *et al.* 2012).

Dünya genelindeki toplam biyoetanol üretiminin yarısından fazlası Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) tarafından yapılmaktadır. Günümüzde yakıt olarak kullanılan biyoetanolün büyük kısmının kaynağı; Brezilya için şeker kamışından elde edilen sükroz ve A.B.D. içinse çoğunlukla mısırdan elde edilen nişastadır (Kim and Dale, 2004). Bununla birlikte, biyoetanol üretiminde ağırlıklı olarak kullanılan bu hammaddelerin insanlar ve/veya hayvanlar için yüksek besin değeri taşıması, biyoetanolün dünya çapında daha yaygın kullanıma sahip olmasını engelleyen mevcut birçok tartışmanın ve anlaşmazlığın en temel kaynağı olmuştur. Ayrıca, insanlar ve/veya hayvanların besinleri olan çeşitli tahılların da biyoetanol üretiminde kullanılmasının ekonomik açıdan elverişsiz olduğu öne sürülmektedir (Sun and Cheng 2002; Taherzadeh and Karimi 2007; Kuhad *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011; Sarkar *et al.* 2012).

Bu sorunun çözümünde, insan ve diğer canlıların besinleri ile ilişkili olmayan ve kendi başına ekonomik değer arz etmeyen, bitkisel ve hayvansal ürün elde edilmesi ve işlenmesi sonucunda ortaya çıkan atık ve artık materyaller olarak tanımlanan, tarımsal atıklar (saman, sap, kabuk, çekirdek, budama atığı, hayvan dışkıları, küspeler, vb.) çok büyük potansiyele sahiptir (Bjerre *et al.* 1996). Bunlar içerisinde bitkisel kökenli tarımsal atıklar ise yapılarında yüksek oranda bulunan fermente edilebilir şekerlerden dolayı biyoetanol üretimi için en uygun olan atık çeşididir (Mabee and Saddler 2010; Cheng and Timilsina 2011; Kuhad *et al.* 2011; Limayem and Ricke 2012; Sarkar *et al.* 2012). Güncel literatür verileri de bitkisel kökenli tarımsal atıkların biyoetanol üretimindeki yüksek potansiyeline dikkat çekmiş ve bu alanda yapılacak araştırmaların önemini vurgulamıştır. Örneğin, Sarkar *et al.* (2012) bitkisel kökenli tarımsal atıkların dünya genelindeki dağılımları ile etanol üretim potansiyellerini araştırmış ve ekonomik kayıp olarak görülen tarımsal atıkların enerji üretiminde kullanılmasıyla büyük ekonomik kazançların elde edilebileceğine dikkat çekmiştir. Ayrıca bu alanda en çok atıf alan çalışmalardan bir diğerinde ise (Kim and Dale 2004) tarım ürünlerinin ve atıklarının etanol üretim kapasiteleri araştırılmış ve ayrıntılı verim analizleri yapılarak

birbiri ile kıyaslanmıştır. Bu çalışmanın içeriği incelendiğinde; tarım atıklarının da en az tarım ürünleri kadar iyi bir karbohidrat kaynağı olarak kullanılabileceği, birçok ürün için eşdeğer nitelikte etanol verimi elde edilebileceği ve eşdeğer verimin yakalanamadığı bazı ürünlerde bile üretim maliyetleri dikkate alındığında bu yeni teknolojinin daha ekonomik olacağı açıkça görülmektedir.

Yapılan araştırmalara göre, atık niteliğinde olan lignoselülozik materyalden yaklaşık 491 milyar litre/yıl biyoetanolün üretilebileceği varsayılmaktadır. Bu değer günümüzde, dünya çapındaki biyoetanol üretiminin yaklaşık 16 katı olarak tanımlanabilir (Kim and Dale 2004; Wang *et al.* 2011; Sarkar *et al.* 2012).

Önemli bir tarımsal üretici olan ülkemiz ise ekonomik bir girdi olabilme potansiyeline sahipken yanlış politikalar neticesinde yeterince değerlendirilemeyen tarımsal atıkların kullanılması noktasında gelişmiş dünya ülkeleri ile karşılaştırıldığında oldukça geridedir. Güncel verilere göre Kanada'da biyoyakıt endüstrisinde buğday, arpa ve yulaftan oluşan tarımsal atıkların kullanılması ile yaklaşık 18 milyon ton atık ile 4.9 milyar litre biyoyakıt üretilebileceği hesaplanmıştır (Mabee and Saddler 2010). Bu verilere göre Kanada ulusal yakıt ihtiyacının yaklaşık %11.9'unu karşılayabilmektedir. Öte yandan ülkemizde 12.001.271 hektar tarım alanı tahıl üretimi için kullanılmakta ve 31.912.550 ton ürün elde edilmektedir (TOBB 2012). Mabee and Saddler'a (2010) göre tahıl ürünlerinden hektar başına ortalama 1.3 ton tarımsal atık oluştuğu dikkate alındığında, ülkemiz için 15.601.625 ton/yıl atık oluştuğu hesaplanabilir. Bu atık miktarı ile yıllık yaklaşık 4.2 milyar litre biyoetanol üretilebileceği varsayılmaktadır. Buna karşın oluşan tarımsal atıkların büyük kısmı ya etkin bir şekilde değerlendirilememekte ya da kontrolsüz ve çevreye oldukça zararlı anız yakımı gibi kullanılabilir enerjinin boşa harcandığı işlemlerle geriye dönüşsüz olarak kaybedilmektedir.

Tahıllar ya da lignoselülozik materyaller gibi karbohitratça zengin hammaddelerden biyoetanol üretilmesinde en önemli reaksiyonların mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Mikrobiyal biyokatalist olarak da adlandırılan bu

canlılar güçlü fermentasyon yeteneği, fermentasyon sonucu ortaya çıkan ürünlere ya da inhibitörlere karşı yüksek tolerans, kontaminasyona karşı direnç ve daha fazla ürün verebilme gibi özelliklere sahip olmalıdır. Dolayısıyla etkili bir biyoetanol üretimi için en önemli konu başlıklarından bir diğeri de bu çalışmalarda kullanılabilecek bilinen mevcut mikroorganizmalardan en uygun olanının seçilmesi, istenilen özellikler yönünden bu mikroorganizmaların genetiksel olarak modifiye edilmesi ya da daha güçlü özelliklere sahip yeni mikroorganizmaların doğadan izole edilerek tanılanması olarak tanımlanabilir (Hahn-Hägerdal *et al.* 2006; Balat *et al.* 2008; Holmgren and Sellstedt 2008; Weber *et al.* 2010; Kuhad *et al.* 2011; Limayem and Ricke 2012).

Lignoselüloz; lignin, selüloz ve hemiselülozdan oluşan heterojen bir maddedir. Selülozu oluşturan altı karbonlu glikozu fermente edebilen mikroorganizmalar iyi bilinmesine karşın, hemiselülozun yapısında bulunan ksiloz ve arabinoz gibi beş karbonlu şekerleri kullanabilen tanılanmış mikroorganizma sayısı oldukça azdır (Kuhad *et al.* 2011; Kudahettige *et al.* 2012). Lignoselülozik materyalden biyoetanol üretilmesini sınırlandıran bu sorunun çözümüne yönelik, bazı araştırıcılar genetiksel olarak modifiye edilmiş *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces* ve *Zymomonas mobilis* mikroorganizma türlerini üretmeyi başarmışlardır (Kuhad *et al.* 2011). Biyoetanol üretimi için beş karbonlu şekerleri kullanabilen bir diğer genetiği değiştirilmiş mikroorganizma türü de *Pichia stipitis*'tir (Holmgren and Sellstedt 2008; Kuhad *et al.* 2011). Buna karşın lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretilmesinde genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kullanımında karşılaşılan önemli bir sorun, bu mikroorganizmaların kazandıkları özellikleri uzun süre koruyamaması ve birkaç fermentasyon döngüsünden sonra başlangıçtaki yabanıl karakterlerine geri dönmeleridir (Holmgren and Sellstedt 2008). Bu sorunun çözümü için sürdürülen çalışmalarda; hem beş karbonlu hem de altı karbonlu şekerlerden biyoetanol üretebilen doğal kaynaklardan yeni izole edilmiş mikroorganizmaların kullanılması öngörülmektedir (Holmgren and Sellstedt 2008; Kuhad *et al.* 2011; Kudahettige *et al.* 2012). Öte yandan seçilen doğal mikroorganizmların metabolik ürün inhibisyonuna karşı yüksek oranda tolerasyon göstermesi de, bu organizmaların endüstriyel ölçekli üretimlerde kullanılabilme şansını arttırmaktadır. Bu bağlamda yapılan literatür araştırmaları, etil alkol inhibisyonuna

yüksek tolerans gösteren en önemli mikroorganizma gruplarının küf ve mayalardan oluştuğunu göstermektedir. Bu çalışmalar sonucunda tanılanan ve lignoselülozik materyallerden başarılı bir şekilde etanol üretebilen doğal orijinli maya ve küf türlerine *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trametes versicolor*, *Pichea stipitis* ve *Pichea tannophilus* örnek olarak verilebilir (Holmgren 2008; Holmgren and Sellstedt 2008).

Bu çerçevede, yenilenebilir enerji kaynağı olarak biyoetanol üretimi için kullanılabilecek verimli mikroorganizmaların bölgesel ekosistemde araştırılması konulu çalışmamızın bulguları incelendiğinde elde edilen fungal izolatlardan 29 tanesinin öncü denemelerdeki model fermantasyon ortamı olan MBMC besiyerinde inkübasyon süresinin ardından 1,36 g/L ile 30,66 g/L arasında değişen oranlarda etil alkol ürettiği gözlenmiştir. Bu mikroorganizmaların tanı değerleri incelendiğinde ise bunların 1 *Penicillium brevicompactum* (MG3), 4 *Fusarium solani* (MG6, MG11, MG35 ve MG47), 3 *Fusarium verticillioides* (MG18, MG27 ve MG58), 1 *Fusarium oxysporum* (MG43), 1 *Fusarium* sp. (MG45), 1 *Fusarium candidum* (MG16), 8 *Trichoderma harzianum* (MG8, MG37, MG50, MG52, MG53, MG54, MG56 ve MG63), 1 *Trichoderma polysporum* (MG23), 1 *Trichoderma paraviridescens* (MG24), 2 *Trichoderma atroviridae* (MG25 ve MG41), 1 *Trichoderma citrinoviridae* (MG59), 1 *Trichoderma roseum* (MG28), 3 *Mucor plumbeus* (MG9, MG13 ve MG26) ve 1 *Mucor* sp. (MG55)'den oluştuğu görülmüştür.

Lignoselülozik materyallerden etil alkol üretimi üzerine yapılan birçok çalışmada başarılı süreçlerin tasarlanabilmesi için çeşitli *Penicillium* türlerinden yararlanılmıştır. Bununla birlikte bu çalışmaların neredeyse tamamında *Penicillum* türlerinin etil alkol üretebilme potansiyellerinden çok onların çeşitli enzimleri sentezleyebilme yetenekleri ve bu enzimlerin ön işlem veya hidroliz basamaklarında nasıl kullanılabileceği üzerinde durulmuştur. Örneğin güncel bir çalışmada havuç, patates, soğan ve şeker pancarı kabuklarından oluşan tarımsal atıklar asit hidrolizi uygulamasından önce *Penicillium* sp. kullanılarak hidrolize hazırlanmış ve daha sonra da elde edilen hidrolizatlar *S. cerevisiae* ile etil alkol fermantasyonu için kullanılmışlardır (Mushimiyimana and

Tallapragada 2016). Yine bir diğer güncel çalışmada badem kabukları, *S. cerevisiae* ile etil alkol fermantasyonu öncesinde alkali ve dilüe asit ön işlem metotlarının bir kombinasyonu (%4 NaOH - 121 C°'de 60 dakika, ardından %1 sülfürik asit - 121 C°'de 60 dakika) ile muamele edilmiş ve enzimatik sakkarifikasyon basamağı *Penicillium occitanis* kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kacem *et al.* 2016). Almeida *et al.* (2015) yaptıkları çalışmalarda tarımsal lignoselülozik atıklardan biyoetanol üretilmesinde kullanılabilecek değerli ß-glukosidazları *Penicillium verruculosum* kullanarak yine tarımsal atıklardan üretebilmeyi başarmışlardır. Yine benzer bir diğer çalışmada çeşitli selülazlar doğadan izole edilen *Penicillium oxalicum* kullanılarak özel bir besiortamında üretilmiş ve bu sürecin verim açısından *Trichoderma reesei*'nin kullanıldığı geleneksel yöntemlere alternatif olabileceği öne sürülmüştür (Saini *et al.* 2015b). Bunun aksine Liu *et al.* (2015) alkali ön işlem ile muamele edilmiş şeker kamışı posasından etil alkol üretmek için önce sakkarifikasyon basamağında *Penicillium decumbens* ve *Trichoderma reesei*'yi birlikte kullanmış, daha sonra da fermantasyon basamağında *S. cerevisia*'dan yararlanmışlardır. Literatürde yer alan benzer birçok çalışmanın temelini *Penicillium* türlerinin çoğunun lignoselülozik materyallerden yeterli miktarda alkol üretememesi ancak bu materyallerin işlenebilirliğini arttıran çok kıymetli enzimleri üretebilmeleri gerçeği oluşturmaktadır. Mevcut çalışmamızda da *Penicillium brevicompactum* MG3 literatürdeki verilere benzer şekilde oldukça düşük verimde alkol üretmiş (MBMC besiyerinde: 1,72 g/L) buna karşın tarımsal atıklı besiyerlerinde gözle görünür gelişme göstermiştir. Bu durum test organizmamızın diğer *Penicillium* türlerinde olduğu gibi çeşitli selülolitik enzimleri sentezleme yeteneğinde olabileceğine işaret etmektedir.

Mevcut çalışmamız neticesinde elde edilen bir diğer etanolojenik grup olan *Fusarium* türleri de eşsiz enzim üretim kapasiteleriyle literatürdeki pek çok çalışmanın temel araştırma odağı olmuştur. Bununla birlikte başta *Fusarium oxysporum* olmak üzere bazı izolatların hem lignolitik enzimler üretmeleri hem de 5 ve 6 karbonlu şekerleri etil alkole fermente edebilmeleri oldukça dikkat çekicidir (Paschos *et al.* 2015a). Bu özellikler, etil alkol üretim sürecindeki hidroliz ve fermantasyon basamaklarını tek bir reaktörde birleştirmek ve bu sayede hem son ürün inhibisyonunu hem de ürün

maliyetini azaltmak amacıyla geliştirilen SSF (simultaneous saccharification and fermentation) ve CBP (consolidated bioprocessing) gibi yöntemlerde *Fusarium* türlerinin etkin bir şekilde kullanılmasına olanak sağlar. Özellikle lignoselülozik materyallerden etanol üretimi sırasında hem selülaz üretimini hem de fermantasyonu tek bir mikroorganizmaya (selülolitik ve fermantatif mikroorganizma) yaptırmayı hedefleyen CBP uygulamalarının geliştirilmesi için *Fusarium* türleri büyük potansiyele sahiptir. Hossain *et al.* (2012) yaptıkları çalışmalarda *Fusarium oxysporum*'un tarım atıklarından etanol üretiminde hem hidroliz basamağında hem de fermantasyon basamağında kullanılabileceğine işaret etmişlerdir. Ayrıca, yapılan güncel çalışmalarda *Fusarium* türleri hem tek başlarına hem de *S. cerevisiae* gibi diğer etanolojenik türler veya *T. reesei* gibi diğer lignolitik enzim üreticileri ile birlikte kullanılmış ve bu çalışmalar neticesinde lignoselülozik biyoetanol üretimi için önemli gelişmeler elde edilmiştir (Paschos *et al.* 2015a; Paschos *et al.* 2015b; Ali *et al.* 2016). Mevcut çalışmamızda elde edilen *Fusarium* türlerinin MBMC ortamındaki etil alkol verimleri 1,36 g/L (*Fusarium oxysporum* MG43) ile 9,94 g/L (*Fusarium solani* MG11) arasında değişkenlik göstermektedir. Yine *Fusarium candidum* MG16 haricindeki diğer tüm *Fusarium* izolatlarının tarım atıklı besiyerinde iyi derecede gelişme göstermeleri bu izolatların lignolitik enzim üretme potansiyellerine işaret etmektedir.

Başta *Trichoderma reesei* olmak üzere çeşitli *Trichoderma* türleri II. Dünya Savaşı'ndan günümüze kadar bilinen en verimli endüstriyel ölçekli selülolitik enzim üreticileri olarak gelmiştir (Phitsuvan *et al.* 2013). Bu nedenle lignoselülozik materyallerden etil alkol üretimi çalışmalarında çoğunlukla ön işlem veya hidroliz basamaklarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Liu *et al.* 2015; Paschos *et al.* 2015a; Paschos *et al.* 2015b; Saini *et al.* 2015b; Ali *et al.* 2016; Wu *et al.* 2016). Bununla birlikte bu mikroorganizma grubunun etil alkol fermantasyon potansiyelini öne çıkaran çalışma sayısı oldukça azdır. Çalışmamız sonucunda izole edilen *Trichoderma* türlerinin MBMC ortamındaki etil alkol verimleri 1,87 g/L (*Trichoderma atroviridae* MG25) ile 9,25 g/L (*Trichoderma atroviridae* MG41) arasında değişkenlik göstermektedir. Mevcut *Trichoderma* izolatlarının hem etanol üretme potansiyellerinin olması hem de tarım atıklı besiyerinde yeterli miktarlarda gelişme gösterebilmeleri bu izolatların SSF ve

CBP gibi yöntemlerde kullanılabilme potansiyelleri yönünden oldukça dikkat çekicidir. Bu hipotez ayrıca *Trichoderma atroviridae* MG41 ve *Trichoderma citrinoviridae* MG59 izolatlarının hem ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş tarım atıklı besiyerlerinde değişen miktarlarda etil alkol üretebildiklerini gösteren çalışma bulgularımız ile de desteklenmektedir.

Çalışmamızın son izolat grubunu oluşturan *Mucor* türleri literatürdeki pek çok çalışmada da etanolojenik özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Örneğin Inokumo *et al.* (2013) yaptıkları çalışmalarda *N*-asetilglukozamin ve kitin içerikli substratlardan *M. albo-ater*, *M. ambiguus*, *M. bacilliformis*, *M. circinelloides*, *M. flavus*, *M. fragilis*, *M. genevensis*, *M. gulliermondii*, *M. hiemalis*, *M. inaequisporus*, *M. indicus*, *M. mucedo*, *M. oblongiellipticus*, *M. oblongisporus*, *M. odoratus*, *M. petrinsularis*, *M. plasmaticus*, *M. plumbeus*, *M. racemosus*, *M. recurvus*, *M. saturninsus*, *M. strictus*, *M. subtilissimus* ve *M. tuberculisporus* türlerinin de dahil olduğu pek çok fungal mikroorganizmanın etanol üretme potansiyellerini göstermişlerdir. Ayrıca literatürdeki pek çok güncel çalışma da başta *M. indicus* olmak üzere çeşitli *Mucor* türlerinin lignoselülozik materyallerden etanol üretme potansiyellerine dikkat çekmektedir (Asachi and Karimi 2013; Karimi and Zamani 2013; Keikhosro and Akram 2013; Khaleghian *et al.* 2015; Aghbashlo *et al.* 2016; Bhatia and Johri 2016). Yine Komeda *et al.* (2014) yaptıkları çalışmalarda *M. circinelloides*'in D-ksilozu fermente etme mekanizmasını incelemiş ve 5 karbonlu şekerlerin *Mucor* türleri tarafından fermantasyonu hakkında önemli veriler elde etmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen *Mucor* türleri MBMC ortamında literatürdeki verilere paralel şekilde yüksek verimli alkol üretmişlerdir. Bu izolatların etanol üretme verimleri 7,51 g/L (*Mucor plumbeus* MG13) ile 30,66 g/L (*Mucor* sp. MG55) arasında değişkenlik göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda çalışmamızda MBMC ortamı için elde edilen en yüksek verim değerleridir. Ayrıca, izolatlardan *Mucor plumbeus* MG13, *Mucor plumbeus* MG26 ve *Mucor* sp. MG55'in efektif bir şekilde hem ön işlem görmüş hem de ön işlem görmemiş tarım atıklı besiyerlerinde etil alkol üretebilmeleri bu izolatların kullanılacağı teknolojilerin geliştirilmesine odaklanacak yeni çalışmaların da önünü açmaktadır.

Bu noktada çalışmamızdan elde edilen fungal kültür koleksiyonu ülkemizin enerji güvenliğine katkı sağlayabilecek ileriki çalışmalara kaynak sağlayabilecek niteliktedir.

Öte yandan tükenmekte olan fosil kaynaklar toplumların yalnızca enerji güvenliklerini değil, aynı zamanda modern yaşamın neredeyse her alanında kullanım alanları olan çok sayıda önemli petrokimyasalın da varlığını tehlikeye atmaktadır. Bu noktada lignoselüloz işleme ve lignoselülozik etanol üretim süreçleri 200'den fazla değerli kimyasalın da üretilmesine kaynak sağlayabilecek potansiyeldedir. Bu ürünlerden bazılarına zaten lignoselülozik materyallerin temel yapı taşlarından olan 5 ve 6 karbonlu şekerler haricinde 1,4-diasitler (suksinik asit, fumarik asit, malik asit), 2,5-furan dikarboksilik asit (2,5-FDCA), 3-hidroksi propionik asit (3-HPA), aspartik asit, glukarik asit, glutamik asit, itakonik asit, levulinik asit, 3-hidroksibutirolakton (3-HBL), gliserol, sorbitol ve ksilitol/arabinitol gibi çok sayıda örnek vermek mümkündür (Isikgor and Becer 2015). Bu durum birden fazla son ürünü olan lignoselüloz biyorafinerileri konseptinin oluşmasına yol açmıştır (Zhang 2008). Şüphesiz bu konseptin en önemli ayaklarından bir tanesi de lignoselülozik materyallerde çeşitli biyokonversiyon olaylarını sağlayan fungal mikroorganizmlardır. Çalışmamızın bulguları lignoselülozik substratlar üzerinde gelişen 33 fungal izolatı kapsaması yönünden bu alanda da önem arz etmektedir. Yapılacak ileriki çalışmalarla mevcut fungal izolatların lignoselülozik materyallerden yan ürün üretebilme potansiyelleri araştırılabilir. Bunun sonucunda hem çeşitli petrokimyasalların alternatifleri üretilerek ülke ekonomisine katkı sağlanacak hem de lignoselülozik etanol üretim maliyetleri düşürülebilecektir.

KAYNAKLAR

Adair, S., Kim, S.H. and Breuil, C., 2002. A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. FEMS Microbiology Letters, 211, 117–122.

Aghbashlo, M., Tabatabaei, M. and Karimi, K., 2016. Exergy-based sustainability assessment of ethanol production via Mucor indicus from fructose, glucose, sucrose, and molasses. Energy, 98, 240–252.

Alaylar, B., 2014. Sukroz ve Glukoz Varlığında *Saccharomyces cerevisiae*'da İlgili Gen Bölgelerinde Meydana Gelen Epigenetiksel Değişimlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Ali, S.S., Nugent, B., Mullins E. and Doohan, F.M., 2016. Fungal‐mediated consolidated bioprocessing: the potential of Fusarium oxysporum for the lignocellulosic ethanol industry. Applied and Industrial Microbiology and Biotechnology, 6(13), 1–13.

Alinia, R., Zabihi, S., Esmaeilzadeh, F. and Kalajahi, F.J., 2010. Pretreatment of wheat straw by supercritical CO2 and its enzymatic hydrolysis for sugar production. Biosystems Engineering, 107, 61–6.

Almeida, J.M., Lima, V.A., Giloni-Lima, P.C. and Knob, A., 2015. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced b-glucosidases production by Penicillium verruculosum: Potential of the crude extract for biomass hydrolysis. Biomass and Bioenergy, 72, 216–226.

Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Liden, G. and Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82, 340–349.

Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, D., Rodriguez, J., Mendonc, R. and Baeza, J., 2008. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of Pinus radiata D. Don to ethanol. Enzyme and Microbial Technology, 43, 214–219.

Asachi, R. and Karimi, K., 2013. Enhanced ethanol and chitosan production from wheat straw by Mucor indicus with minimal nutrient consumption. Process Biochemistry, 48, 1524–1531.

Balan, V., Sousa, L.C., Chundawat, P.S. and Marshall, D., 2009. Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX–treated hardwoods (Populus nigra). Biotechnology Progress, 25, 365–375.

Balat, M. and Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Applied Energy, 86, 2273–2282.

Balat, M. and Balat, H., 2010. Progress in biodiesel processing. Applied Energy, 87, 1815–1835.

Balat, M., 2009. New biofuel production technologies. Energy Education Science and Technology, 22, 147–161.

Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Cabanas, A., Manzanares, P. and Ballesteros, M. 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. Applied Biochemistry and Biotechnology 130, 496-508.

Banerjee, S., Sen, R., Pandey, R.A., Chakrabarti, T., Satpute, D., Giri, B.S. and Mudliar, S., 2009. Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. Biomass and Bioenergy, 33, 1680–1686.

Bhatia, L. and Johri, S., 2016. FTIR Analysis and Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation Parameters for Sustainable Production of Ethanol from Peels of Ananas cosmosus by Mucor indicus MTCC 4349. Waste Biomass Valor, 7, 427–438.

Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R. R., Vikram, S., Devi, L. and Nagalakshmi, S. 2010. Bioethanol production from rice straw: an overview. Bioresource Technology 101, 4767-4774.

Bjerre, A.B., Olesen, A.B. and Frenqvist, T. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wed oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. Biotechnology and Bioengineering, 49, 568-577.

Blei, M., Fiedler, K., Rüden, H. and Schleibinger, H.W., 2005. Differenzierung von Holz zerstörenden Pilzen mittels ihrer mikrobiellen flüchtigen organischen Verbindungen (MVOC). In: Keller, R., Senkpiel, K., Samson, R.A. and Hoekstra, E.S., (Eds.), Mikrobielle allergische und toxische Verbindungen. Schriftenreihe Institut Medizin. Mikrobiol. Hygiene Universität Lübeck 9, pp. 163-178.

Bray, S.C., Ferreira, E.R. and Ruas, D.G.G., 2000. As políticas da agroindústria canavieira e o proálcool no Brasil. Marília: Unesp-Marília-Publicações.

Bresinsky, A., Jarosch, M., Fischer, M., Schönberger, I. and Wittmann-Bresinsky, B., 1999. Phylogenetic relationships within Paxillus s.l. (Basidiomycetes, Boletales): separation of a southern hemisphere genus. Plant Biology, 1, 327–333.

Chandel, A.K., ES, C., Rudravaram, R., Narasu, M.L., Rao, L.V. and Ravindra P., 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. Biotechnology and Molecular Biology Review, 2, 14–32.

Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J. and Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. Bioresource Technology, 102, 71–81.

Cheng, J., Su, H., Zhou, J., Song, W. and Cen, K., 2011. Microwave-assisted alkali pretreatment of rice straw to promote enzymatic hydrolysis and hydrogen production in dark- and photo-fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, 36, 2093–2101.

Christopher, L.P., Hemanathan, K. and Zambare, V.P., 2014. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. Applied Energy, 119, 497–520.

Clausen, C., 1997. Immunological detection of wood decay fungi – an overview of techniques developed from 1986 to present. International Biodeterioration & Biodegradation, 39, 133–143.

Clausen, C.A. and Kartal, S.N., 2003. Accelerated detection of brown-rot decay: Comparison of soil block test, chemical analysis, mechanical properties, and immunodetection. Forest Products Journal, 53, 90–94.

Costa, J.A.V. and de Morais, M.G., 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. Bioresource Technology, 102, 2–9.

Demirbas, A. and Karslioglu, S., 2007. Biodiesel production facilities from vegetable oils and animal fats. Energy Sources Part A, 29, 133–141.

Demirbas, A., 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. Energy Sources Part A, 27, 327–337.

Demirbas, M.F., Balat, M. and Balat, H., 2009. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. Energy Convers Manage, 50, 1746–1760.

Dhussa, A. 2004. Biogas in India – Methane to markets partnership. Meeting of agriculture subcommittee (22 Nisan 2004).

Diehl, S.V., McElroy, T.C. and Prewitt, M.L., 2004. Development and implementation of a DNA-RFLP database for wood decay and wood associated fungi. 35. International Research Group on Wood Preservation, Ljubljana, Slovenia.

EERE (Energy Efficiency and Renewable Energy), 2011. Renewable Energy Data Book.

EIA (Energy Information Administration), 2012. Annual Energy Outlook 2012 with Projections to 2035.

Eikenes, M., Hietala, A., Alfredsen, G., Fossdal, C.G. and Solheim, H., 2005. Comparison of quantitative real-time PCR, chitin and ergosterol assays for monitoring colonization of Trametes versicolor in birch wood. Holzforschung 59, 568–573.

Erickson, T., Borjesson, J. and Tjerneld, F., 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. Enzyme and Microbial Technology, 31, 353–364.

Fan, M., Chen, L.C., Ragan, M.A., Gutell, R.R., Warner, J.R., Currie, B.P. and Casadevall, A., 1995. The 5S rRNA and the rRNA intergenic spacer of the two varieties of Cryptococcus neoformans. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 33, 215–221.

Fu, D. and Mazza, G., 2011. Aqueous ionic liquid pretreatment of straw. Bioresource Technology, 102, 7008–7011.

Fuying, M.N., Yang, C., Xu, H., Yu, J. and Wu, X.Z., 2010. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. Bioresource Technology, 101, 9600–9604.

Garcia-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M. and Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. Bioresource Technology, 100, 1608–1613.

Gerchman, Y., Schnitzer, A., Gal, R., Mirsky, N. And Chinkov, N., 2012. A simple rapid gas-chromatography flame-ionization-detector (GC-FID) method for the determination of ethanol from fermentation processes. African Journal of Biotechnology, 11, 3612 – 3616.

Glancy, H., Palfreyman, J.W., Button, D., Bruce, A. and King, B., 1990. Use of an immunological method for the detection of Lentinus lepideus in distribution poles. Journal of the Institute of Wood Science, 12, 59–64.

Göller, K. and Rudolph, D., 2003. The need for unequivocally defined reference fungi–genomic variation in two strains named as Coniophora puteana BAM Ebw. 15. Holzforschung, 57, 456–458.

Gupta, V.K., Potumarthi, R., O'Donovan, A., Kubicek, C.P., Sharma, G.D. and Tuohy, M.G., 2014. Chapter 2 – Bioenergy Research: an overview on technological developments and bioresources. In: Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Kubicek, C.P.,

Saddler, J. and Xu, F. (Eds.), Bioenergy Research: Advances and Applications. Elsevier, Amsterdam, pp. 23–47.

Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G. and Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. TRENDS in Biotechnology, 24(12), 549–555.

Harun, M.Y., Radiah, A.B.D., Abidin, Z.Z. and Yunus, R., 2011. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (Eichhornia crassipes). Bioresource Technology, 102, 5193–5199.

Hasenekoğlu, İ., 1991. Toprak Mikrofungusları (Cilt: 1 – 7). Atatürk Üniversitesi Yayınları (No: 689).

Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T. and Sawayama, S., 2009. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. Bioresource Technology, 100, 2706–2711.

Ho, D.P., Ngo, H.H. and Guo, W., 2014. A mini review on renewable sources for biofuel. Bioresource Technology, 169, 742–749.Hietela, A., Eikenes, M., Kvaalen, H., Solheim, H. and Fossdal, C., 2003. Multiplex realtime PCR for monitoring Heterobasidion annosum colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4413–4420.

Holmgren, M., 2008. Optimization of ethanol production from spent sülfite liquor. Licentiate Thesis. Department of Plant Physiology (UPSC) – Umea University.

Holmgren, M. and Sellstedt, A. 2008. Identification of white-rot and soft-rot fungi increasing ethanol production from spent sülfite liquor in co-culture with Saccharomyces cerevisiae. Journal of Applied Microbiology, 105, 134-140.

Holtzapple, M.T., Lundeen, J.E. and Sturgis, R., 1992. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). Applied Biochemistry and Biotechnology, 3435, 5–21.

Horisawa, S., Sakuma, Y., Takata, K. and Doi, S., 2004. Detection of intra-and interspecific variation of the dry rot fungus Serpula lacrymans by PCR-RFLP and RAPD analysis. Journal of Wood Science, 50, 427–432.

Hossain, S.M., Anantharaman, N. and Das, M., 2012. Bioethanol fermentation from untreated and pretreated lignosellülosic wheat straw using fungi Fusarium oxysporum. Indian Journal of Chemical Technology, 19, 63–70.

Högberg, N. and Land, C.J., 2004. Identification of Serpula lacrymans and other decay fungi in construction timber by sequencing of ribosomal DNA – a practical approach. Holzforschung, 58, 199–204.

Högberg, N., Svegården, I.B. and Kauserud, H., 2006. Isolation and characterization of fifteen polymorphic microsatellite markers for the devasting dry rot fungus Serpula lacrymans. Molecular Ecology Notes, 6, 1022-1024.

Inokuma, K., Takano M. and Hoshino, K., 2013. Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by Mucor species. Biochemical Engineering Journal, 72, 24–32.

Isikgör, F.H. and Becer, C.R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. Royal Society of Chemistry, 6, 4497–4559.

Jarosch, M. and Besl, H., 2001. Leucogyrophana, a polyphyletic genus of the order Boletales (Basidiomycetes). Plant Biology, 3, 443–448.

Jellison, J. and Goodell, B., 1988. Immunological detection of decay in wood. Wood Science and Technology, 22, 293–297.

Kacem, I., Koubaa, M., Maktouf, S.,Chaari, F., Najar, T., Chaabouni, M., Ettis, N. and Chaabouni, S.E., 2016. Multistage process for the production of bioethanol from almond Shell. Bioresource Technology, 211, 154–163.

Karadayı, M., 2010. Condition optimization for bio-ethanol production from 5-carbon sugars. Project Course in Molecular Biology – Final Report. Department of Plant Physiology (UPSC) – Umea University.

Kauserud, H., Högberg, N., Knudsen, H., Elbornes, S.A. and Schumacher, T., 2004a Molecular phylogenetics suggest North American link between the anthropogenic dry rot fungus Serpula lacrymans and its wild relative S. himantioides. Molecular Ecology, 13, 3137–3146.

Kauserud, H., Schmidt, O., Elfstrand, M. and Högberg, N., 2004b. Extremely low AFLP variation in the European dry rot fungus (Serpula lacrymans): implications for self/nonself-recognition. Mycological Research, 108, 1264–1270.

Kauserud, H., Svegården, I.B., Sætre, G.P., Knudsen, H., Stensrud, Ø., Schmidt, O., Doi, S., Sugiyama, T. and Högberg, N., 2007. Asian origin and rapid global spread of the destructive dry rot fungus Serpula lacrymans. Molecular Ecology, 16, 3350–3360.

Kavak, K., 2005. Dünyada ve Türkiye'de enerji verimliliği ve Türk sanayiinde enerji verimliliğinin incelenmesi (Uzmanlık Tezi), DPT, İktisadi Sektörler ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü.

Keikhosro, K. and Akram, Z., 2013. Mucor indicus: Biology and industrial application perspectives: A review. Biotechnology Advances, 31, 466–481.

Khaleghian, H., Karimi, K. and Behzad, T., 2015. Ethanol production from rice straw by sodium carbonatepretreatment and Mucor hiemalis fermentation. Industrial Crops and Products, 76, 1079–1085.

Kim, D. and Dale, B. E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and Bioenergy, 26, 361-375.

Kim, K.H. and Hong, J., 2001. Supercritical CO2 pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. Bioresource Technology, 77, 139–144.

Kim, Y.S., Goodell, B. and Jellison, J., 1991. Immuno-electron microscopic localization of extracellular metabolites in spruce wood decayed by brown-rot fungus Postia placenta. Holzforschung, 45, 389–393.

Kline, K.L., Oladosu, G.A., Wolfe, A.K., Perlack, R.D., Dale, V.H. and McMahon, M., 2008. Biofuel feedstock assessment for selected countries. ORNL biofuel feedstock assessment.

Komeda, H., Yamasaki-Yashiki, S., Hoshino, K. and Asano, Y., 2014. Identification and characterization of D-xylulokinase from the D-xylose-fermenting fungus, Mucor circinelloides. FEMS Microbiology Letter, 360, 51–61.

Koo, B.W., Kim, H.Y., Park, N., Lee, S.M., Yeo, H. and Choi, I.G., 2011. Organosolv pretreatment of Liriodendron tulipifera and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production. Biomass and Bioenergy, 35, 1833–1840.

Kootstra, A.M.J., Beeftink, H.H., Scott, E.L. and Sanders, J.P.M., 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. Biochemical Engineering Journal, 46, 126–131.

Korpi, A., Pasanen, A.L. and Viitanen, H., 1999. Volatile metabolites of Serpula lacrymans, Coniophora puteana, Poria placenta, Stachybotris chartarum and Chaetomium globosum. Building and Environment, 34, 205–211.

Kudahettige, R.L., Holmgren, M., Imerzeel, P. and Sellstedt, A., 2012. Characterization of Bioethanol Production from Hexoses and Xylose by the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. Bioenergineering Research, 5, 277–285.

Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh, A. and Zhang, Y.H.P., 2011. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15, 4950– 4962.

Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J. and Lynd, L.R., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for conversion to ethanol. Bioresource Technology, 81, 33–44.

Lee, W.S., Chena, I.C., Changa, C.H. and Yang, S.S., 2012. Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. Renewable Energy, 39, 216–222.

Lewis, S.M., 1996. Fermentation alcohol. In: Godfrey, T., West, S., edt. Industrial Enzymology. 2nd ed. Newyork: Stockton Press; pp. 12–48.

Li, B.Z., Balan, V., Yuan, Y.J. and Dale, B.E., 2010. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol basedon ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. Bioresource Technology, 101, 1285–1292.

Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H.V., Auer, M., Vogel, K.P., Simmons, B.A. and Singh, S., 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. Bioresource Technology, 101, 4900–4906.

Li, K., Liu, S. and Liu, X., 2014. An overview of algae bioethanol production. International Journal of Energy Research, 38, 965–977.

Limayem, A. and Ricke, S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. Progress in Energy and Combustion Science, 38, 449–467.

Lime, M., Ekstrandh, A., Englesson, R., Persson, E., Bjornsson, L. and Lantz, M. 2008. The Swedish biogas potential from domestic raw materials. Swedish, Malmo: Avfall Sverige utveckling Report (2008:02).

Lin, Y. and Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology, 69, 627–642.

Liu, Y., Zhang, Y., Xu, J., Sun, Y., Yuan, Z. and Xie, J., 2015. Consolidated bioprocess for bioethanol production with alkali-pretreated sugarcane bagasse. Applied Energy, 157, 517–522.

Lui, H., Zhu, J.Y. and Fu, S., 2010. Effects of lignin-metal complexation on enzymatic hydrolysis of cellulose. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, 7233–7238.

Lynd, L.R. and Wang, M.Q. 2003. A product – nonspesific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels. Journal of Industrial Ecology, 7, 17–32.

Mabee, W.E. and Saddler, J.N., 2010. Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in Canada. Bioresource Technology, 101, 4806–4813.

MacLean, H.L. and Lave, L.B., 2003. Evaluating automobile fuel/propulsion system technologies. Progress in Energy and Combustion Science, 29, 1–69.

Martin, C., Klinke, HB. and Thomsen, A.B., 2007. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. Enzyme Microbial Technology, 40, 426–432.

Martin, F., Selosse, M.A. and Le Tacon, F., 1999. The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria bicolor: structural analysis and allelic polymorphism. Microbiology, 145, 1605-1611.

McMillan, J.D., 1996. Hemicellulose conversion to ethanol. In handbook on bioethanol: production and utilization. Wyman, C. E. edt. Taylor & Francis Washington DC. pp. 287-313.

Melikoğlu, M. ve Albostan, A., 2011. Türkiye'de Biyoetanol Üretimi ve Potansiyeli. Journal of Faculty Engineering and Architecture, Gazi University, 26, 151–160.

Menon, V. and Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science, 38, 522–550.

Monrroy, M., Ibanez, J., Melin, V., Baeza, J., Mendonca, R.T., Contreras, D. and Freer, J., 2010. Bioorganosolv pretreatments of P. radiata by a brown rot fungus (Gloephyllum trabeum) and ethanolysis. Enzyme and Microbial Technology, 47, 11–6.

Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M. and Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27, 77–93.

Moreth, U. and Schmidt, O., 2000. Identification of indoor rot fungi by taxon-specific priming polymerase chain reaction. Holzforschung, 54, 1–8.

Moreth, U. and Schmidt, O., 2005. Investigations on ribosomal DNA of indoor wood decay fungi for their characterization and identification. Holzforschung, 59, 90–93.

Munoz, C., Mendonc, R., Baeza, J., Berlin, A., Saddler, J. and Freer, J., 2007. Bioethanol production from bio-organosolv pulps of Pinus radiata and Acacia dealbata. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82, 767–774.

Mushimiyimana, I. and Tallapragada, P., 2016. Bioethanol Production from Agro Wastes by Acid Hydrolysis and Fermentation Process. Journal of Scientific & Industrial Research, 75, 383–388.

Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimaraes, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L. and Teixeira, J.A., 2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. Biotechnology Advances, 28, 817–830.

Nguyen, T.A., Kim, K.R., Han, S.J., Cho, H.Y., Kim, J.W., Park, S.M. and Sim, S.J., 2010. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocelluloses conversion to fermentable sugars. Bioresource Technology, 101, 7432–7438.

Nigam, P.S. and Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. Progress in Energy and Combustion Science, 37, 52–68.

Ninomiya, K., Kamide, K., Takahashi, K. and Shimizu, N., 2010. Enhanced enzymatic saccharification of kenaf powder after ultrasonic pretreatment in ionic liquids at room temperature. Bioresource Technology, 103, 259–265.

Palfreyman, J.W., Gartland, J.S., Sturrock, C.J., Lester, D., White, N.A., Low, G.A., Bech-Andersen, J. and Cooke, D.E.L., 2003. The relationship between "wild" and "building" isolates of the dry rot fungus Serpula lacrymans. FEMS Microbiology Letters, 228, 281–286.

Palfreyman, J.W., Glancy, H., Button, D., Bruce, A., Vigrow, A., Score, A. and King, B., 1988. Use of immunoblotting for the analysis of wood decay basidiomycetes. 19. International Research Group on Wood Preservation, Madrid, Spain.

Palfreyman, J.W., Vigrow, A., Button, D., Hegarty, B. and King, B., 1991. The use of molecular methods to identify wood decay organisms: The electrophoretic analysis of Serpula lacrymans. Wood Protection, 1, 15–22.

Paschos, T., Xiros, C. and Christakopoulos, P., 2015a. Simultaneous saccharification and fermentation by co-cultures of Fusarium oxysporum and Saccharomyces cerevisiae enhances ethanolproduction from liquefied wheat straw at high solid content. Industrial Crops and Products, 76, 793–802.

Paschos, T., Xiros, C. and Christakopoulos, P., 2015b. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus Fusarium oxysporum. BMC Biotechnology, 15, 1–12.

Patel, S.J., 2007. Comparative study of ethanol production from microbial pretreated agricultural residues. JASEM, 11, 137–41.

Pedersen, M., Vikso-Nielsenb, A. and Meyer, A.S., 2010. Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to pH and catalyst type during mild thermal pretreatment. Process Biochemistry, 45, 1181–1186.

Perez, J.A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Saez, F., Negro, M.J. and Manzanares, P., 2008. Optimization liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel–ethanol production. Fuel, 87, 3640–3647.

Peyretaillade, E., Biderre, C., Peyret, P., Duffieux, F., Méténier, G., Gouy, M., Michot, B. and Vivarès, C.P., 1998. Microsporidian Encephalitozoon cuniculi, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rDNA reduced to the universal core. Nucleic Acids Research Journal, 26, 3513–3520.

Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K.L. and Ratanakhanokchai, K., 2013. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. Folia Microbiology, 58, 163–176.

Pittman, J.K., Dean, A.P. and Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology, 102, 17–25.

Råberg, U., Högberg, N. and Land, C.J., 2004. Identification of brown-rot fungi on wood in above ground conditions by PCR, T-RFLP and sequencing. 35. International Research Group on Wood Preservation, Ljubljana, Slovenia.

Råberg, U., Högberg, N. and Land, C.J., 2005. Detection and species discrimination using rDNA T-RFLP for identification of wood decay fungi. Holzforschung, 59, 696–702.

Reczey, V.K. and Zacchi, G., 2004. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology, 113–116, 509–523.

Redding, A.P., Wang, Z., Keshwani, D.R. and Cheng, J.J., 2011. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology, 102, 1415–1424.

RFA (Renewable Fuels Association), 2012. Accelerating Industry 2012 Ethanol Industry Outlook.

Rocha, G.J.M., Martin, C., Soares, I.B., Maior, A.M.S., Baudel, H.M. and Abreu, C.A.M., 2011. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. Biomass and Bioenergy, 35, 663–670.

Saini, J.K., Saini, R. and Tewari, L., 2015a. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. 3 Biotech, 5, 337–353.

Saini, R., Saini, J.K., Adsul, M., Patel, A.K., Mathur, A., Tuli, D. and Singhania, R.R., 2015b. Enhanced cellulase production by Penicillium oxalicum for bio-ethanol application. Bioresource Technology, 188, 240–246.

Sant'Ana da Silva, A., Inoue, H., Endo, T., Sh, Y. and Bon, E.P.S., 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Bioresource Technology, 101, 7402–7409.

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

Schmidt, O., 2009. Molecular Identification and Characterization of Indoor Wood Decay Fungi. In: Gherbawy, Y., Mach, R.L., Rai, M., (Eds.), Current Advances in Molecular Mycology. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 333–348.

Schmidt, O. and Kallow, W., 2005. Differentiation of indoor wood decay fungi with MALDI-TOF mass spectrometry. Holzforschung, 59, 374–377.

Schmidt, O. and Kebernik, U., 1989. Characterization and identification of the dry rot fungus Serpula lacrymans by polyacrylamide gel electrophoresis. Holzforschung 43, 195–198.

Schmidt, O. and Moreth, U., 1995. Detection and differentiation of Poria indoor brown-rot fungi by polyacrylamide gel electrophoresis. Holzforschung, 49, 11–14.

Schmidt, O. and Moreth, U., 1998. Characterization of indoor rot fungi by RAPD analysis. Holzforschung, 52, 229–233.

Schmidt, O. and Moreth, U., 1999. Identification of the dry rot fungus, Serpula lacrymans, and the wild merulius, S. himantioides, by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Holzforschung, 53, 123–128.

Schmidt, O. and Moreth, U., 2000. Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for Serpula lacrymans. Mycological Research, 104, 69–72.

Schmidt, O. and Moreth, U., 2003a. Data bank of rDNA-ITS sequences from buildingrot fungi for their identification. Wood Science and Technology, 36, 429–433, revision in Wood Science and Technology, 37, 161–163.

Schmidt, O. and Moreth, U., 2003b. Molecular identity of species and isolates of internal pore fungi Antrodia spp. and Oligoporus placenta. Holzforschung, 57, 120–126.

Schmidt, O. and Moreth, U., 2008. Ribosomal DNA intergenic spacer of indoor wood-decay fungi. Holzforschung, 62, 759–764.

Schmidt, O., Grimm, K. and Moreth, U., 2002a/2003. Molecular identity of species and isolates of the Coniophora cellar fungi. Holzforschung, 56, 563–571, addendum, Holzforschung, 57, 228.

Schmidt, O., Grimm, K. and Moreth, U., 2002b. Molekulare und biologische Charakterisierung von Gloeophyllum-Arten in Gebäuden. Zeitschrift für Mykologie, 68, 141–152.

Sewalt, V.J.H., Glasser, W.G. and Beauchemin, K.A., 1997. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 1823–1828.

Shengdong, Z.Y., Wu, Z., Yu, J. and Liao, Y.Z., 2005. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. Process Biochemistry, 40, 3082–3086.

Shi, J., Sharma–Shivappa, R.R., Chinn, M. and Howell, N., 2009. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. Biomass and Bioenergy, 33, 88–96.

Solomon, B.D., Barnes, J.R. and Halvorsen, K.E., 2007. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. Biomass & Bioenergy, 31, 416–425.

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

Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D. and Rogers, R.D., 2002. Dissolution of cellose withionic liquids. Journal of American Chemical Society, 124(18), 4974–4975.

Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. 2007. Acid based hydrolysis processer for ethanol from linocellulosic materials: a review. Bioresources, 2, 472-499.

Tan, H.T., Lee, K.T. and Mohamed, A.R., 2010. Pretreatment of lignocellulosic palmbiomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimisation study using response surface methodology. Carbohydrate Polymer, 83, 1862–1868.

Taniguchi, M., Takahashi, D., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Kouya and T., Tanaka, T., 2010. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with Pleurotus ostreatus for the enzymatic hydrolysis of rice straw. Journal of Bioscience and Bioengineering, 110, 449–452.

Theodore, M.L., Stevenson, T.W., Johnson, G.C., Thornton, J.D. and Lawrie, A.C., 1995. Comparison of Serpula lacrymans isolates using RAPD PCR. Mycological Research, 99, 447–450.

TOBB (Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği), 2012. 2012 yılı Bitkisel Üretim ve Bitkisel Ürün Denge İstatistikleri, E.6/299.

Toft, L., 1993. Immunological identification in vitro of the dry rot fungus Serpula lacrymans. Mycological Research, 97, 290–292.

Uihlein, A. and Schebek, L. 2009. Environmental impacts of a lignocellulosic feedstock biorefinery system: an assessment. Biomass and Bioenergy, 33, 793-802.

Vainio, E.J. and Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. Mycological Research, 104, 927–936.

Vigrow, A., King, B. and Palfreyman, J.W., 1991b. Studies of Serpula lacrymans mycelial antigens by Western blotting techniques. Mycological Research, 95, 1423–1428.

Vigrow, A., Palfreyman, J.W. and King, B., 1991a. On the identity of certain isolates of Serpula lacrymans. Holzforschung, 45, 153–154.

Wan, C. and Li, Y., 2010. Microbial pretreatment of corn stover with Ceriporiopsis subvermispora for enzymatic hydrolysis and ethanol production. Bioresource Technology, 101, 6398–6403.

Wan, C., Zhou, Y. and Li, Y., 2011. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. Bioresource Technology, 102, 6254–6259.

Wang, Z., Keshwani, D.R., Redding, A.P., Cheng, J.J. and Jay, J.C., 2010. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. Bioresource Technology, 101, 3583–3585.

Wang, M., Wang, J. and Tan, J.X., 2011. Lignocellulosic Bioethanol: Status and Prospects, Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 33, 612–619.

Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T. and Boles, E. 2010. Trends and challanges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. Applied Microbiology and Biotechnology 87, 1303-1315.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninisky, J.J. and White, T.J. (Eds.) PCR protocols. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

Williams, K.C., 2006. Subcritical water and chemical pretreatments of cotton stalk for the production of ethanol. USA, North Carolina State University, Raleigh, NC, Master's thesis.

Wright, L., 2006. Worldwide commercial development of bioenergy with a focus on energy crop-based projects. Biomass and Bioenergy, 30, 706–714.

Wu, X., Zhang, J., Xu, E., Liu, Y., Cheng, Y., Addy, M., Zhou, W., Griffith, R., Chen, P. and Ruan, R., 2016. Microbial hydrolysis and fermentation of rice straw for ethanol production. Fuel, 180, 679–686.

Yoo, J., Alavi, S., Vadlani, P. and Amanor-Boadu, V., 2011. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. Bioresource Technology, 102, 7583–7590.

Zaremski, A., Ducousso, M., Domergue, O., Fardoux, J., Rangin, C., Fouquet, D., Joly, H.,Sales, C., Dreyfus, B. and Prin, Y., 2005. In situ molecular detection of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. Canadian Journal of Forest Research, 35, 1256–1260.

Zaremski, A., Ducousso, M., Prin, Y. and Fouquet, D., 1999. Molecular characterization of wood-decaying fungi. Bois Forêts Tropiques, Special Issue, 76–81.

Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J. and Spiess, A.C., 2009. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (lingo-)cellulose. Bioresource Technology, 100, 2580–2587.

Zhang, Y.H.P., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35, 367–375.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Şumnu'da (Bulgaristan) doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006'da biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Şubat 2009'da Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü araştırma görevlisi kadrosuna atandı. 18 Ocak–6 Haziran 2010 tarihleri arasında Erasmus Değişim Programı kapsamında Umeå Üniversitesi'nde (İsveç) değişim öğrencisi olarak görev yaptı. Aynı yıl yüksek lisans tezini tamamladı ve Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde doktora öğrenimine başladı. Halen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.