

**DALLI DARI BİTKİSİNDEN (*Panicum Virgatum* L.) BİYOETANOL ÜRETİMİNDE SEYRELTİK ASİT VE KİREÇ ÖN UYGULAMALARININ OPTİMİZASYONU ve BAZI GENOTİPLERİN BİYOETANOL VERİMLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ<sup>1</sup>**

*Optimization of Diluted Acid and Lime Pretreatments in Bioethanol Production from Switchgrass (*panicum virgatum* l.) and Determination of Ethanol Yields of Some Genotypes*

Sara Betül

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

DOLĞUNM.Ümit ÜNAL

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**ÖZET**

Bu çalışmada dünya biyoenerji model türü dallı darı bitkisinden (*Panicum virgatum* L.) biyoetanol üretiminde seyreltik asit ve kireç ön uygulamalarının optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada 3 farklı enzim (Novozymes Cellic CTec2) konsantrasyonu ile 7 gün hidroliz gerçekleştirilmiş ve optimum enzim konsantrasyonu ve süresi belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre optimum enzim konsantrasyonu 0.06 mL/g dallı darı, hidroliz süresi ise 3 gün olarak belirlenmiştir.

Piroliz optimizasyonu amacı ile seyreltik sülfürik asit ve kireç ile 2 farklı konsantrasyonda (% 0.5 ve % 1.0 sülfürik asit (h/h), 0.05 ve 0.1 g kireç/g dallı darı), 3 sıcaklık (120, 140 ve 180 °C) ve sürede (30, 60, 90 dak) deneme yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonuçlarına göre en yüksek fermente edilebilir şeker miktarına seyreltik sülfürik asit ile pirolizde 120 °C'de % 0.5 (h/h) asit konsantrasyonu ile 90 dak sonucu, kireç ile pirolizde 120 °C'de 0.1 g kireç/g dallı darı ile 60 dak sonucu ulaşılmış, miktarları ise sırasıyla 50.58 ve 44.76 g/100 g dallı darı olarak bulunmuştur.

Fermantasyon optimizasyon çalışmasında ise *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanılarak 2 farklı sıcaklık (25 ve 30 °C ) ile 4 gL<sup>-1</sup> maya ekstraktı (YE) ilaveli ve ilavesiz olmak üzere toplamda 4 farklı koşul ile denemeler kurulmuştur. En yüksek etanol veriminin elde edildiği koşul 25 °C ve YE eklenmiş denemeden elde edilmiş ve 0.0966 g etanol/g dallı darı olarak bulunmuştur. 10 farklı dallı darı genotipinin biyoetanol verimlilikleri ise 0.0842 ile 0.122 g/g dallı darı arasında bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Lignoselüloz, *Panicum virgatum* L., Dallı darı, Biyoetanol, Seyreltik asit, Kireç.

**Abstract**

In this study, optimization of bioethanol production was performed by diluted acid and lime pretreatments from switchgrass (*Panicum virgatum* L.) which is known as an energy crop type. Firstly, biomass was hydrolyzed with 3 different enzyme (Novozymes Cellic CTec2) dosages for 7 days so that optimum dosage

<sup>1</sup> Aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

and time was determined. According to results, optimum enzyme dosage was 0.06 mL/g biomass and hydrolysis time was 3 days.

For pyrolysis optimisation, switchgrass was pyrolyzed with two different chemicals (sulphuric acid and lime) in two different concentrations (0.5% and 1.0% (w/w) sulphuric acid or 0.05 and 0.10 g lime/biomass) at various temperatures (120,140 and 180 °C) for three different process time (10, 60, 90 min). According to the obtained results, the maximum total fermentable sugar was found to be 50.58 g/100 g biomass, optimum pyrolysis condition was 120 °C, 0.5% of sulphuric acid treatment for 90 minutes. Additionally, the maximum total fermentable sugar was found to be 44.76 g/100 g biomass at 120 °C, 0.1 g lime/biomass for 60 minutes.

In order to determinate optimum fermentation conditions, fermentation was carried out by *Saccharomyces cerevisiae* at two temperatures (25 and 30 °C) and two mediums (control and 4 gL<sup>-1</sup> YE additions). The maximum ethanol yield was obtained at 25 °C and 4 gL<sup>-1</sup> YE added medium and the yield was found to be 0.0966 g ethanol/100 g biomass. The results showed that the bioethanol yields from 10 genotypes ranged between 0.0842 and 0.1220 g/100 g biomass.

**Keywords:** Lignocellulose, *Panicum virgatum* L., Switchgrass, Bioethanol Diluted acid, Lime.

## Giriş

Günümüz dünya ekonomisinin büyük bir kısmı kömür, petrol ve doğal gaz gibi fosil enerji kaynaklarına bağımlı durumdadır. Bu enerji kaynakları yakıt, elektrik, kimyasal ve diğer maddeleri üretmek için kullanılmaktadır (Uihlein ve Schebek, 2009). İnsanların enerji tüketiminin büyük oranda artması ve fosil yakıtlara olan bağımlılık, fosil yakıt rezervlerinin tükenmesine neden olmaktadır. Bu rezervlerin tekrar yenilenebilmesi için milyonlarca yıl gerekmektedir (Suryaningsiha ve Irhas, 2014). British Petroleum'un yayınladığı bir raporda petrol, doğal gaz, kömür rezervlerinin sırasıyla 41, 64 ve 155 yıl içinde tükeneceği belirtilmektedir (Anon, 2013).

Artan enerji talebi ile birlikte fosil kaynakların aşırı kullanımı ve bu durumun sonucu olarak ciddi çevresel zararlar oluşmaktadır. Yaşanan bu gelişmelerle birlikte biyokütle enerji kaynakları gibi alternatif kaynakların kullanımı önem kazanmaya başlamıştır (Sabancı ve ark., 2010). Biyokütle enerji kaynakları, içerisinde karbonhidrat bileşikleri olan bitkisel ve hayvansal kökenli tüm maddelerdir. Bu kaynaklar kullanılarak, biyoetanol, biyodizel ve biyogaz olmak üzere üç temel yakıt elde edilebilmektedir (Sarkar ve ark., 2012; Koç ve Şenel, 2013).

Günümüzde en önemli yenilenebilir biyoyakıtlar 1. nesil biyodizel ve biyoetanoldür. Ancak, kötü ekolojik performansları ve gıda hammaddelerinden üretilmeleri nedeniyle, 1. nesil biyoyakıtlar sıklıkla eleştirilmektedir. Son zamanlarda, farklı tür lignoselülozik materyallerden üretilen 2. nesil biyoyakıtlar bu problemlerin ortadan kalkmasında umut vaat etmektedir (Ajanovic, 2013).

Motorlu taşıtlar için en yaygın olarak kullanılan biyoetanol petrolün yerini almada önemli bir potansiyele sahiptir (Sarkar ve ark., 2012). Biyoetanol farklı

biyolojik hammaddelerin fermantasyonu sonucu oluşan renksiz, uçucu, yanıcı ve oda koşullarında sıvı halde bulunan kimyasal bir maddedir. Molekül formülü C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH'dır. Molekül yapısında karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu (-OH) bulundurur (Walker, 2010).

Biyooetanol, genel olarak formülü (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> olan her karbonhidrat bileşiğinden elde edilebilir. Biyoetanol üretimi için kullanılan birinci nesil kaynaklar şeker içerikli bitkileri ve nişasta içerikli bitkileri, ikinci nesil kaynaklar ise büyük oranda lignoselülozik biyokütleri temsil eder. Birinci nesil kaynaklar beslenme amacıyla kullanıldıkları için biyoetanol kaynağı olarak kullanımları avantajlı değildir. İkinci nesil kaynaklardan etanol üretimi ise hammaddenin bol miktarda bulunması nedeniyle çok daha ekonomiktir. İkinci nesil kaynaklar tarımsal artıkları ve bu amaçla yetiştirilen enerji bitkilerini kapsar (Bajpai, 2013).

Dallı darı (*Panicum virgatum* L.) Amerika kökenli, çok yıllık, sıcak iklim bitkisidir. Sıcağa, soğuğa ve kuraklığa toleransı yüksektir. Dallı darı yüksek verimi, farklı toprak tiplerine uyumluluğu, düşük su ve besin gerekliliği, çevresel yararları ve çok amaçlı kullanılabilir olması nedeniyle umut vaat edici bir lignoselülozik bitkidir. Geleneksel yöntemlerden farklı ekim ve hasat ekipmanlarına gerek duymaması, bu bitkinin tarımsal bir avantajıdır (Keshwani ve Cheng, 2009; Kenneth, 2004).

## **MATERYAL**

Araştırmalarda kullanılan 2014 yılına ait dallı darı örnekleri Hatay ilinde yetiştirilmiş ve Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir. Çalışmada 10 farklı dallı darı genotipi kullanılmıştır.

### **Metot**

#### **Ön Hazırlık**

Dallı darı örnekleri oda sıcaklığında veya 50 °C'lik etüvde (nem düzeyi % 10'un altında olacak şekilde) kurutulduktan sonra bitki öğütme değirmeninde (Wiley mill) partikül çapı 0.4 mm olacak şekilde öğütülmüştür (Hu ve Ragauskas, 2011; Kim ve ark., 2011).

#### **Lignoselülozik Yapı Tayini**

Hasat edilen biyokütle örnekleri 60 °C'ye ayarlanmış etüvde 24 saat süre ile kurutulduktan sonra, partikül büyüklüğü <0.5 mm olacak şekilde değirmende öğütülmüştür. Örneklerde % ADF (Asit Deterjan Fiber), % NDF (Nötral Deterjan Fiber) ve % ADL (Asit Deterjan Lignin) analizleri Van Soest ve ark. (1991)'na göre, Ankom filterbag tekniği ile sodyum sülfid (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) kullanılmadan α-amilaz ilave edilerek, A220 Fiber (ANKOM Technology, Fairport, NY) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

#### **NDF (%) Analizi**

Öğütülmüş dallı darı örnekleri darası alınmış F57 keselerine (FilterBag F57) 0.5 g tartılmış ve kese ağzı sıcak baskı ile kapatılmıştır. Ankomlif analizörün

plastik taşıyıcısına yerleştirilen torbalar, analiz haznesine yerleştirilip 21 NDF çözültisi (Ankom NDF Drypowder – Ankom FND20C, Trietilenglikol ) ve 4 mL $\alpha$ -amilaz ilavesi ile 100 °C'de 75 dak işlem görmüştür. Kaynama sonunda haznedeki çözülti boşaltılmış ve örnek keseleri 5'er dak olmak üzere 2 sıcak, 1 kez soğuk saf su ile yıkanmıştır. Örneklerdeki yağın uzaklaştırılması amacıyla 3–5 dak asetonla yıkanan keseler önce oda sıcaklığında 1 saat ve sonra 105 °C de 4–5 saat kurutulup tartılarak % NDF içerikleri aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ NDF} = ((W3-(W1 \cdot C))/W2)$$

W1= F57 boş kese ağırlığı

W2= Örnek ağırlığı

W3= Ekstraksiyon sonrası kese + örnek ağırlığı

C= Boş (kör/blank) kese düzeltme faktörü

#### **ADF (%) Analizi**

Öğütülmüş dallı darı örnekleri darası alınmış F57 keselerine (FilterBag F57) 0.5 g tartılmış ve kese ağzı sıcak baskı ile kapatılmıştır. Ankomlif analizörün plastik taşıyıcısına yerleştirilen torbalar, analiz haznesine yerleştirilip 21 ADF çözültisi (Ankom ADF Drypowder “CTAB” – Ankom FAD200 1 Normal H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ilave edilerek 100 °C'de 60 dak muamele edilmiştir. Kaynatma sonunda örnek keseleri 5'er dak olmak üzere 2 sıcak, 1 kez soğuk saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Preslenen keseler 3–5 dak asetonla yıkanmış ve oda sıcaklığında 1 saat ve sonra 105 °C de 4–5 saat kurutulup tartılarak % ADF içerikleri aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ADF} = ((W3-(W1 \cdot C))/W2)$$

W1= F57 boş kese ağırlığı

W2= Örnek ağırlığı

W3= Ekstraksiyon sonrası kese + örnek ağırlığı

C= Boş (kör/blank) kese düzeltme faktörü

#### **ADL (%) Analizi**

% ADF oranı belirlenen F57 örnek keseleri, içerisinde % 72'lik sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) çözültisi bulunan beher kaba yerleştirilerek tamamen çözültiye batması sağlanmıştır. Örnekler 30 dak aralıklarla hafifçe çalkalanmış ve böylece 3 saat asitle muamele edilmiştir. Daha sonra bol çeşme suyu ile pH nötr oluncaya kadar yıkanan örnekler 3 dak süreyle aseton uygulanmıştır. 105 °C de 4–5 saat kurutulup tartılarak % ADL içerikleri aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ADL} = ((W3-(W1 \cdot C))/W2)$$

W1= F57 boş kese ağırlığı

W2= Örnek ağırlığı

W3= Ekstraksiyon sonrası kese + örnek ağırlığı

C= Boş (kör/blank) kese düzeltme faktörü

Örneklerin selüloz ve hemiselüloz içerikleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

Selüloz (%)=ADF-ADL

Hemiselüloz (%)=NDF-ADF

#### **Kül (%) Tayini**

Öğütülmüş dallı darı örneklerinde kül tayini öncesi temizlenen porselen krozeler, 550–600 °C'de kül fırınında kurutulmuştur. Krozeler desikatörde soğutulup tartıldıktan sonra içerisine 3–4 g dallı darı örneği konulmuştur. Kül fırınına yerleştirilen örnekler kömürleşme olmayacak şekilde, kül açık griden beyaza değişen bir renge ulaşana kadar (3–4 saat) 550–600 °C'de yakılmıştır. Desikatörde soğutulan örnekler tartılmış ve % kül oranı şu formül ile hesaplanmıştır.

$Kül\ (\%) = \frac{(W3 - W1)}{W2} \times 100$

W1= Yakma sonrası boş kroze ağırlığı

W2= Örnek ağırlığı

W3= Yakma sonrası örnek+kroze ağırlığı

#### **Kuru Madde Analizi**

Dallı darı örneklerinin kuru madde oranlarının belirlenmesinde Memmert UNB 400 (Almanya) marka etüv kullanılmıştır. Bu amaçla, oda sıcaklığında kurutulmuş 5 g bitki örneği önceden 105 °C'lik etüvde 2 saat bekletildikten sonra desikatörde tutularak oda sıcaklığına getirilmiş ve darası alınmış alüminyum kaplara konularak hassas terazide tartılmış daha sonra etüvde 105 °C'de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur. Örneklerin toplam kuru madde oranlarının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Kalra, 1998; Sluiter ve ark., 2008):

$\% \text{ Toplam kuru madde} = \frac{(B - d)}{(A - d)} \times 100$

A: Başlangıçta tartılan örnek miktarı (dara ile birlikte)

B: Analiz sonunda tartılan örnek miktarı (dara ile birlikte)

d: Tartım kabının ağırlığı

#### **Enzimatik Hidroliz Optimizasyonu**

Enzimatik hidroliz optimizasyonunda 400 mL % 1.0'lik sülfürik asit çözeltisi ve 20 g dallı darı karıştırılarak 120 °C'de 60 dak süre ile piroliz edilmiş örnek kullanılmıştır. Reaktörde piroliz işlemi tamamlandıktan sonra 150 mL örnek alınarak pH'sı 10 M NaOH ile 5.0'a ayarlanıp mikrobiyal gelişimi önlemek amacı ile 0.5 g/L-1 kloramfenikol ilave edilmiştir. Daha sonra farklı novozymes Cellic CTec2 enzim dozajları (E1 (0.03 mL enzim/g dallı darı), E2 (0.06 mL enzim/g dallı darı) ve E3 (0.09 mL enzim/g dallı darı) kullanılarak, çalkalamalı inkübatörde 50 °C'de 200 rpm karıştırma hızında hidroliz gerçekleştirilmiştir. 7 gün boyunca 24 saatte bir aralıkla alınan örnekler 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra HPLC'de analiz edilinceye kadar -25 °C'de muhafaza edilmiştir. Oluşan şeker miktarı sonuçlarına göre optimum enzim dozajı ve hidroliz süresi belirlenmiştir. Enzim dozajlarının ve

hidroliz koşullarının (sıcaklık ve pH) belirlenmesinde enzim üretici firmanın önerileri referans alınmıştır (Anon, 2010).

### **Piroliz Optimizasyonu**

Piroliz optimizasyonu Parr (ABD) yüksek basınç reaktöründe gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.5). Ayrıca, uygulamada "cam hazne" kullanılarak yüksek sıcaklığın ve asit konsantrasyonunun neden olduğu korozyonu ve buna bağlı olarak oluşabilecek fermantasyon inhibitörlerini en aza indirmek amaçlanmıştır (Raja ve Sethuraman, 2008).

### **Seyreltik Sülfürik Asit ile Piroliz**

Seyreltik asit ile piroliz optimizasyonu için, 20 g dallı darı örneği 400 mL sülfürik asit (% 0.5 ve % 1.0 (h/h)) çözeltisi ile karıştırılarak 120, 140, 180 °C'de 30, 60, 90 dak süre ile yüksek basınç reaktöründe tutulmuştur. Piroliz işleminin ardından örneklerden 150 mL alınıp 10 M NaOH ile pH'sı 5.0'e ayarlanmıştır. Ardından mikrobiyal gelişimi önlemek amacı ile 0.5 gL<sup>-1</sup> kloramfenikol ilave edilmiş ve Cellic CTec2 enzimi 0.06 mL enzim/g dallı darı olacak şekilde eklenerek 3 gün çalkalamalı inkübatörde 50 °C'de ve 200 rpm'de enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Pirolizin ardından, örneklerin şeker içeriği HPLC ile belirlenmiştir.

### **Kireç ile Piroliz**

Kireç ile piroliz optimizasyonu için 20 g dallı darı örneği 400 mL kireç (0.05 ve 0.1 g Ca(OH)<sub>2</sub>/g kuru dallı darı) çözeltisi ile karıştırılarak 120, 140, 180 °C'de 30, 60, 90 dak süre ile yüksek basınç reaktöründe tutulmuştur. Piroliz işleminin ardından örneklerden 150 mL alınıp asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) ile pH'sı 5.0'e ayarlanmıştır. Ardından mikrobiyal gelişimi önlemek amacı ile 0.5 gL<sup>-1</sup> kloramfenikol ilave edilmiş ve Cellic CTec2 enzimi 0.06 mL enzim/g dallı darı olacak şekilde eklenerek 3 gün çalkalamalı inkübatörde 50 °C'de ve 200 rpm'de enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Pirolizin ardından, örneklerin şeker içeriği HPLC ile belirlenmiştir (Chang ve ark., 2001).

### **İnokulum Hazırlanması**

Etil alkol fermantasyonu için kullanılacak 0.2 gL<sup>-1</sup> *S. cerevisiae* (Lalvin, Lallemand, Inc., Kanada) aktif kuru maya 20 gL<sup>-1</sup> glikoz, 8.5 gL<sup>-1</sup> maya ekstraktı, 1.32 gL<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0.11 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, ve 0.06 gL<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> içeren pH'sı 5.5 olarak ayarlanan sıvı besi yerinde 30 °C'de 24 saat çoğaltılmıştır. Daha sonra maya süspansiyonu içeren besi yeri, alkol fermantasyonu yapılacak hidrolizat miktarının % 10 hacminde alınıp 4000 rpm'de 4 °C'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında maya, fermantasyonunun gerçekleştirileceği hidrolizat ile süspansiyon edilerek alkol fermantasyonunun gerçekleştirileceği ortama eklenmiştir (Yang ve ark., 2009).

### **Etil Alkol Fermantasyonunun Optimizasyonu**

*S. cerevisiae* (Lalvin, Lallemand, Inc., Kanada) instant maya kullanılarak yapılan fermentasyon optimizasyonu çalışmalarında 2 farklı sıcaklık (25 °C ve 30 °C) kullanılmıştır. Ayrıca, dallı darı bitkisinin düşük azot içeriği nedeniyle alkol verimini arttırmak için 4 gL<sup>-1</sup> YE ilave edilmiş, kontrol örneklerine herhangi bir ilave yapılmamıştır. Fermantasyon optimizasyonu için 20 g dallı darı 400 mL % 0.5 sülfürik asit çözeltisi ile karıştırılıp 120 °C'de 90 dak süre ile piroliz edilmiştir. Piroliz edilen örnekten 150 mL alınarak 0.06 mL/g dallı darı oranında Cellic CTec2 enzimi kullanılarak hidroliz gerçekleştirilmiştir. Hidroliz edilen örnekler 6000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiş ve berrak kısım alınarak 10 M NaOH ile pH'sı5.5'e ayarlanmıştır. PH'sı ayarlanan hidrolizattan erlenlere 100 mL alınarak ağızları pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılıp 121 °C'de 15 dak steril edilmiştir. Ardından, örneklere hidrolizat hacminin % 10'u kadar inokulum ilave edilmiştir. Fermantasyon sırasında şeker ve alkoldeki değişimi gözlemlmek için 24 saatte bir örnek alınarak HPLC'de analiz yapılmıştır. Etanol veriminin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ Etanol verimi} = \frac{\text{oluşan etanol miktarı (g/L)}}{\text{fermente edilen şeker miktarı (g/L)}} \times 100$$

### **HPLC ile şeker ve alkol analizi**

HPLC ile şeker (sükroz, glikoz, früktoz) ve etil alkol tayini amacıyla piroliz sonucu, enzimatik hidroliz ve fermentasyon boyunca alınan örnekler 5000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda elde edilen süpernatant analizde kullanılmıştır. Bunun için örnekler 0.45 µm'lik filtreden (Milipore Millex-HV, Hidrofilik PVDF filtre) geçirilip HPLC'ye enjekte edilmiştir. (Pickering ve ark., 1998; Cordier ve ark., 2007).

### **Dallı darı genotiplerinden biyoetanol üretimi**

10 farklı dallı darı genotipine, optimum piroliz koşulu uygulandıktan sonra optimum şeker sonucunun alındığı enzim dozajı ve süresine göre enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Daha sonra optimum fermentasyon koşullarına göre etanol üretimi gerçekleştirilip her aşamanın sonucunda örnek alınarak HPLC'de analiz edilmiştir.

### **ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

#### **Dallı darı genotiplerinin bileşimleri**

Analiz sonucuna göre dallı darı örneklerinin kuru madde oranları % 92.14 ile 93.47, kül içerikleri ise % 6.3 ile 19.6 arasında bulunmuştur. Ayrıca selüloz içerikleri % 27.8–38.0, hemiselüloz içerikleri % 29.4–37.2, lignin içerikleri ise 2.4–9.7 arasında bulunmuştur.

#### **Enzimatik hidroliz optimizasyonu**

Enzim optimizasyonu için % 1.0'lik sülfürik asit ile 120°'de 60 dak piroliz edilmiş örnek kullanılmış, ardından üç farklı enzim konsantrasyonunda (E1: 0.03, E2: 0.06, E3: 0.09 ml Cellic CTec2/g dallı darı) denemeler gerçekleştirilmiştir.

Enzimatik hidroliz optimizasyonun sonuçlarına göre; E1 enzim konsantrasyonu ile oluşan en yüksek fermente olabilir şeker miktarına 5. günde (32.90 toplam şeker g/100 g dallı darı) ulaşılmıştır. E2 ve E3 enzim konsantrasyonlarında ise en yüksek fermente edilebilir şeker miktarı 3. günün sonunda elde edilmiş, miktarları ise sırasıyla 34.62 g toplam şeker/100 g dallı darı ve 37.80 g toplam şeker/100 g dallı darı olarak bulunmuştur.

#### **Seyreltik sülfürik asit ile piroliz**

Seyreltik asit ile yapılan piroliz optimizasyonu amacı ile iki farklı sülfürik asit konsantrasyonu (% 0.5 ve % 1.0 (h/h)), üç farklı sıcaklık (120, 140, 180 °C) ve üç farklı süre (10, 60, 90 dak) ele alınmıştır. Enzimatik hidroliz sonrası oluşan toplam fermente edilebilir şeker miktarı, piroliz süresi arttıkça artmış ancak sıcaklık arttıkça miktarı azalmıştır. Sonuçta en yüksek fermente edilebilir şeker miktarına (50.58 g/100 g dallı darı) 120 °C'de % 0.5 asit konsantrasyonu ile 90 dak sonunda ulaşılmıştır.

#### **Kireç (Ca(OH)<sub>2</sub>) ile piroliz**

Kireç ile yapılan piroliz optimizasyonunda iki farklı kireç konsantrasyonun (0.05 ve 1.0 g kireç/g dallı darı), üç farklı sıcaklığın (120, 140, 180°C) ve üç farklı sürenin (10, 60, 90 dak) şeker oluşuma etkisi araştırılmıştır. En yüksek toplam fermente edilebilir şeker miktarı 120 °C'de 0.01 g kireç/g dallı darı çözeltisinin 60 dak koşullarında elde edilmiş ve bu koşullarda elde edilen toplam şeker miktarı 44.76 g şeker/100 g dallı darı olarak bulunmuştur.

#### **Fermantasyon optimizasyonu**

Fermantasyon optimizasyonu sonucuna göre etanol verimi (g etanol/g dallı darı) ve % etanol verimi sonuçları sırası ile 0.0526–0.966 ve 15.6–23 arasında bulunmuştur. Ayrıca en yüksek etanol verimi 24 saat sonucunda 25 °C ve 4 gL<sup>-1</sup> YE eklenmiş denemede 0.0966 g etanol/g dallı darı olarak bulunmuştur.

#### **Farklı dallı darı genotiplerinin biyoetanol verimliliklerinin belirlenmesi**

Belirlenen optimum piroliz, enzim hidrolizi ve fermantasyon koşullarında 10 farklı dallı darı genotipinin etanol verimlilikleri belirlenmiştir. Bu amaçla dallı darı örnekleri 120 °C'de % 0.5 sülfürik asit (h/h) çözeltisi ile yüksek basınç reaktöründe 90 dak piroliz edilmiş ardından 0.06 mL/g dallı darı enzim konsantrasyonuna göre enzim ilave edilerek 3 gün hidroliz edilmiştir. Hidroliz edilen örnekler santrifüj işleminden sonra 4 gL<sup>-1</sup> YE ve maya ilavesi yapılarak 25 °C'de fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre her bir genotipten elde edilen etanol verimi ve % etanol verimi çizelge 4.6'da gösterilmektedir. Genotiplerin etanol verimlilikleri 0.0842 ile 0.122 g etanol/g dallı darı, % etanol verimlilikleri ise 23–50.05 arasında bulunmuştur.



### Sonuçlar

Bu araştırmada, dallı darı bitkisi üç farklı enzim konsantrasyonu ile hidroliz edilip optimum enzim dozajı ve hidroliz süresi belirlenmiş, ardından örneklere toplamda 36 farklı piroliz kombinasyonu uygulanıp en yüksek fermente edilebilir şeker miktarının elde edildiği koşul saptanmıştır. En son olarak, seçilen optimum enzim ve piroliz koşullarına göre iki farklı sıcaklık ve ortamda *S. cerevisiae* ile etanol üretimi gerçekleştirilip seçilen 10 farklı dallı darı genotipinden etanol elde edilmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgulara göre;

- ✓ Enzimatik hidroliz optimizasyonu sonucu, optimum enzim dozajı 0.06 mL/g dallı darı, hidroliz süresi ise 3 gün olarak belirlenmiştir.
- ✓ Piroliz optimizasyonunda en yüksek toplam fermente edilebilir şeker miktarı 120 °C'de % 0.5 sülfürik asit (h/h) çözeltisi ile 90 dak sonucu elde edilmiş ve miktarı 50.58 g şeker/100 g dallı darı olmuştur. Kireç kullanımında ise en yüksek fermente edilebilir şeker 120 °C'de 0.1 g kireç/g dallı darı ile 60 dak sonucu elde edilmiş ve miktarı 44.76 g şeker/100 g dallı darı olarak bulunmuştur. Bu iki kimyasal piroliz yöntemi kıyaslandığında, seyreltik asit ile piroliz sonucu daha yüksek fermente edilebilir şeker miktarına ulaşıldığı görülmekte böylece optimum piroliz yöntemi olarak önerilmektedir.
- ✓ Fermantasyon optimizasyonunda ise en yüksek etanol verimi 25 °C'de 4 gL<sup>-1</sup> YE ilave edilmiş örnekten elde edilmiş ve 0.0966 g etanol/g dallı darı olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonucuna göre etanol verimi 30 °C'de YE ilavesi ile % 17, 25 °C'de YE ilavesi sonucu ise yaklaşık olarak % 83 artış göstermiştir.
- ✓ 10 farklı dallı darı genotipinden etanol üretimi sonucu ise etanol verimlilikleri 0.0842 ile 0.122 g etanol/ g dallı darı, % etanol verimlilikleri ise 23–50.05 arasında bulunmuştur.

### Kaynaklar

- Acaroğlu, M., 2008. Türkiye'de Biyokütle, Biyoetanol ve Biyomotorin Kaynakları ve Biyoyakıt Enerjisinin Geleceği. VII. Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu, Aralık, İstanbul. Bildiriler Kitabı, 351-362.
- Ajanovic, A., 2013. Renewable fuels - A Comparative Assessment from Economic, Energetic and Ecological Point-of-view up to 2050 in EU-countries. Renewable Energy, 60:733-738.
- Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., and Gustafsson, L., 1996. Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation. Applied and Environmental Microbiology, 62(9): 3187-3195.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Nefo, M. J., 2010. Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A review. Bioresource Technology, 101:4851-4861.

- Anonymous, 2010. Sheet, Fuel Ethanol Application. Cellic CTec and HTec2— Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. Novozymes A/S, Luna-01668:01.
- Anonymous, 2012. Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu, Benzin Türlerine Etanol Harmanlanması Hakkında Tebliğ, [www.epdk.org.tr/TR/Dokuman/3707](http://www.epdk.org.tr/TR/Dokuman/3707).
- Anonymous, 2013. BP: Statistical Review of World Energy, Workbook (xlsx), London.
- Anonymous, 2013. BP: Statistical Review of World Energy, Workbook (xlsx), London.
- Bajpai, P., 2013. Global Production of Bioethanol: In Advances in Bioethanol, Springer, India, pp. 79-88.
- Berthels, N. J., Otero, R. R. C., Bauer, F. F., Pretorius, I. S., and Thevelein, J. M., 2008. Correlation Between Glucose/Fructose Discrepancy and Hexokinase Kinetic Properties in Different *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5):1083-1091.
- Bunnell, K., 2013. Characterization and Quantification of Monomers, Oligomers, and By-products from Switchgrass Hemicelluloses During Biomass Pretreatment, University of Arkansas, USA, PhD Thesis, 136 p.
- Chang, V. S., Burr, B., and Holtzapple, M. T., 1997. Lime Pretreatment of Switchgrass. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, pp. 3-19.
- Chang, V. S., Nagwani, M., and Holtzapple, M. T., 1998. Lime Pretreatment of Crop Residues Bagasse and Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74:135-159.
- Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, and I., François, J.M., 2007. A Metabolic and Genomic Study of Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains for High Glycerol Production. *Metabolic Engineering*, 9:364-378.
- Dien, B. S., Jung H. J., Vogel, K. P., Casler, M. D., Lamb, J. F., Iten, L., Mitchell, R. B., and Sarath, G., 2006. Chemical Composition and Response to Dilute-acid Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Alfalfa, Reed Canarygrass, and Switchgrass. *Biomass Bioenergy*, 30(10):880-891.
- Duff, S. J., and Murray, W. D., 1996. Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review. *Bioresource Technology*, 55(1):1-33.
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J., and Penner, M. H., 1997. Modeling and Optimization of the Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover, Poplar and Switchgrass. *Bioresource Technology*, 59(2):129-136.
- Falls, M., and Holtzapple, M. T., 2011. Oxidative Lime Pretreatment of Alamo Switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2):506-522.
- Garlock, R. J., et al., 2011. Comparative Material Balances Around Pretreatment Technologies for the Conversion of Switchgrass to Soluble Sugars. *Bioresource Technology*, 102(24):11063-11071.

- Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999. Ethanol Production from Renewable Resources. In *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. Springer, Berlin, pp. 207-241.
- Göycincik, S., ve Yücel, Y., 2015. Defne Yaprağı Artığının Biyoetanol Üretiminde Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29(1):87-96.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., and Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol–The Fuel of Tomorrow from The Residues of Today. *Trends in biotechnology*, 24(12):549-556.
- Hamelinck, C. N., Hooijdonk, G. V., and Faaij, A. P. C., 2005. Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-economic Performance in Short-, Middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28:384-410.
- Hu, Z., and Ragauskas, J., 2011. Hydrothermal Pretreatment of Switchgrass. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50:4225-4230.
- Hu, Z., and Wen, Z., 2008. Enhancing Enzymatic Digestibility of Switchgrass by Microwave-assisted Alkali Pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3):369-378.
- Jackson, R. S., 2008. *Wine Science: Principles and Applications*. Academic press, Cambridge, 648 p.
- Jensen, J. R., Morinelly, J. E., Gossen, K. R., Brodeur-Campbell, M. J., and Shonnard, D. R., 2010. Effects of Dilute Acid Pretreatment Conditions on Enzymatic Hydrolysis Monomer and Oligomer Sugar Yields for Aspen, Balsam, and Switchgrass. *Bioresource Technology*, 101(7):2317-2325.
- Kalra, Y. P., 1998. *Handbook of Reference Methods for Plant analysis*. CRC press, New York, 320 p.
- Keshwani, D. R., 2009. *Microwave Pretreatment of Switchgrass for Bioethanol Production*. North Carolina State University, PhD Thesis, 238 p.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., and Aikat, K., 2012. Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37:19-27.
- Suryaningsiha, R., and Irhas., 2014. Bioenergy Plants in Indonesia: Sorghum for Producing Bioethanol As an Alternative Energy Substitute of Fossil Fuels. *Energy Procedia*, 47:211-216.
- Uihlein, A., and Schebek, L., 2009. Environmental Impacts of a Lignocellulose feedstock Biorefinery System: An assessment. *Biomass and Bioenergy*, 33:793-802.
- Keshwani, D. R., and Cheng, J. J., 2009. Switchgrass for Bioethanol and Other Value-Added Applications: A Review. *Bioresource Technology*, 100: 1515-1523.
- Kim, Y., et al., 2011. Comparative Study on Enzymatic Digestibility of Switchgrass Varieties and Harvests Processed by Leading Pretreatment. *Technologies Bioresource Technology*. 102:11089-11096.
- Kumar, R., and Wyman, C.E., 2009. Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. *Biotechnology Progress*, 25:302-314.

- Kurtuluş, M., 2010. Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 104 s.
- Larsson, S., et al., 1998. The Generation of Fermentation Inhibitors During Dilute Acid Hydrolysis of Softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:151-159.