



Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri

Ali Osman Adıgüzel*

Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mersin

29.04.2013 Geliş/Received, 30.07.2013 Kabul/Accepted

ÖZET

Son yirmi yıldır bilim ve teknoloji hızla gelişmiş ve tüm olanaklarıyla insanlığın hizmetine sunulmuştur. İnsanlık birtakım sorunlarını gelişen teknoloji yardımıyla çözebilse de artan nüfus ve tüketimden kaynaklı çevresel tahribat, enerji ve hammadde kıtlığı, besin yetersizliği ve atık yönetimi gibi temel problemlerle karşı karşıyadır. Bundan dolayı, çalışmamızın ana temasını tarımsal, ormansal ve kentsel atıkların katma değeri yüksek bir ürün olan biyoetanole dönüştürülmesi sırasında kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: biyoetanol, ön-muamele, hidroliz, biyokütle

Pre-Treatment and hydrolysis methods for bioethanol production from lignocellulosic material

ABSTRACT

Science and technology has rapidly expended and used for human benefits over the last 20 years. Humanity can solve some problems with the help of developing technology. But, they faced with fundemantal problem such as environmental distortion from increasing population and consumption of energy, raw material acarcity, nutrient deficiency, and waste management. Therefore, the main theme in our research covers the pre-treatment and hydrolysis methods use during production bioethanol from agricultural, forestry and municipal wastes.

Keywords: bioethanol, pre-treatment, hydrolysis, biomass

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

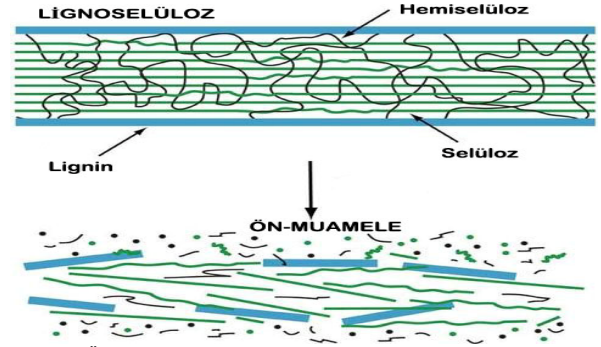
1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol elde edilmesi için birçok farklı dönüştürme teknolojisi mevcuttur. Biyokimyasal dönüşüm prosesleri ve tamamen biyolojik olmayan metodlarla dönüştürme işlemi (termokimyasal) iki ana prosestir. Biyokimyasal dönüşüm prosesinin temeli katalizörlere dayanmaktadır. Bu biyokatalistler ise enzimler ve mikrobiyal hücreler olabilirler. Bununla birlikte, biyokimyasal proseslerde proses aşamalarından hepsinin tamamen biyolojik ajanlar (enzim yada mikrobiyal hücreler) yardımıyla yapılması zorunlu değildir. Termokimyasal dönüşüm teknolojileri ise ısı, sıcaklık ve/veya fiziksel katalistlere dayanmaktadır. Termokimyasal teknolojiler yakıt üretimi açısından 2 temel grup altında toplanabilirler. Bunlardan biri "gazifikasyon", diğeri ise "pirolizis" dir. Gazifikasyon, yüksek sıcaklık ve oksijen yokluğunda biyokütlenin tamamen depolimerizasyonudur. Uygulanan sıcaklık 850 °C dolaylarındadır. Pirolizis işlemi ise biyokütlenin depolimerizasyonu daha yumuşaktır. Buradaki koşullar; düşük sıcaklık ve oksijen yokluğunu gerektirmektedir. Bu proseste uygulanan sıcaklık yaklaşık olarak 400-600 °C arasında değişmektedir [1].

Biyokimyasal olarak lignoselülozdan etanol üretim prosesi dört temel operasyon bölümüne ayrılır. Bunlar; ön-muamele, hidroliz, fermantasyon, ürünlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasıdır [2]. Bazı yayınlarda ise lignoselülozik materyalden etanol eldesi için gerekli proses fermente edilebilir şekerlerin oluşumu, fermantasyon ve saflaştırma olmak üzere üç ana basamağa ayrılmaktadır [3].

2. ÖN-MUAMELE (PRE-TREATMENT)

Biyoetanol üretimi için biyokütlenin ön-muameleden geçmeden önce sıcak hava ile kurutma, güneşte kurutma, vakumla kurutma gibi işlemlerle depolanması gerekmektedir [4]. Ön-muamele teknolojilerinin temel amacı, hidroliz işlemi için yapısal ve içeriksel engelleyicileri biyokütleden ayırmak, lignoselülozik yapıyı gevşetmek ve böylece enzimatik hidroliz oranını ve selüloz ya da hemiselülozdan fermente edilebilir şeker oluşumu miktarını arttırmaktır (Şekil 1). Bu metodlar bu amacı başarmak için bitki biyokütlesinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler gerçekleştirirler.



Şekil 1. Ön-muamelenin lignoselülozik yapıya potansiyel etkisinin şematik görüntüsü (Schematic view of potential impact of pre-treatment to lignocellulosic structure) [5]

Ön-muamele işlemi sırasında dikkat edilmesi gerekenler şunlardır; selülozların enzimatik hidroliz için selüloz yüzey alanına ulaşılabilirliğin artırılması, karbonhidrat kaybının en düşük seviyede tutulması, hidroliz ve fermantasyon işlemi sırasında mikroorganizmalara ya da enzimlere karşı inhibitör etki yaratan yan-ürünlerin oluşumundan kaçınılması ve bunları yaparken maliyetin düşük olmasına önem vermektir.

Ön-muamele yönteminin seçimi ve uygulanmasındaki bir diğer etkili faktör ise kullanılacak lignoselülozik materyalin içeriğidir. Her ne kadar türden türe değişiklik gösterse de selüloz, hemiselüloz ve ligninden meydana gelen yapının genel olarak %50-60'ı karbonhidratlar, % 30'u ise ligninden oluşmaktadır (Tablo 1). Türler arasındaki ana bileşenlerin oranlarına ek olarak bunların içerikleri dahi farklılık göstermektedir. Örneğin; yumuşak odunlarla karşılaştığımızda tarımsal ürünler ile sert odunların lignoselülozik yapısında pentoz şekerler daha fazladır [6].

Ön-muamele, elde edilen ürün miktarının artırılması için önemli bir basamaktır. Ortalama olarak proses maliyetinin %18'e yakını bu basamak için harcanmaktadır. Ön-muamele metodları ise fiziksel, kimyasal, biyolojik ve termo/fiziko kimyasal olarak 4 sınıf içinde katagorize edilebilir. Tercihen, bu ön-muamele yöntemlerinden herhangi biri ya da birkaç tanesi beraberce kullanılabilir. Ek olarak, ön-muamele metodları asidik, bazik ve nötral ön-muameleler olarak da sınıflandırılabilir.

2.1. Fiziksel Ön-Muamele (Physical Pre-Treatment)

Yaygın olarak fiziksel ön-muamele iki şekilde gerçekleştirilir. Birincisi çeşitli araçlar yardımıyla öğütme şeklinde mekanik olarak, diğeri ise pirolizis ile gerçekleşir. Mekanik ezme, çeşitli şekillerde yapılan öğütme ve parçalama işlemi yardımıyla biyokütleyi ince bir toz haline dönüştürmelidir. Sonuçta oluşan parçaları kullanan öğütme metoduna göre genellikle ya 10-30

mm ya da 0,2-2 mm arasında olmaktadır. Bu metod ulaşılabilen yüzey alanı oranını arttırmakta, polimerizasyonu azaltmakta, biyokütlenin parçalara ayrılmasını sağlamaktadır [9]. Piroliz daha çok biyokütleden ikincil yakıtların ve kimyasal ürünlerin üretiminde başvurulan bir yöntemdir ve nikel dolamit ve toprak alkali, toprak alkali ve geçiş metali tuzları katalizör olarak kullanılır [10]. Prolizis işleminde, materyaller 300 °C'den daha yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığında selüloz gaz şeklinde ürünler ve atık kömür oluşturmak için hızla parçalanır [11]. Şayet bu işlem düşük sıcaklıkta gerçekleştirilirse, parçalanma daha yavaş olur ve buharlaşabilen ürün miktarı azalır. Pirolizis uygulamasından sonra atıklar seyreltik asit ile hidrolize olurlarsa selülözün glukozaya dönüşüm oranı %80-85 oranındadır [12]. Bu proses oksijen varlığında gerçekleştirilir. Eğer proses sırasında çinko klorit veya sodyum karbonat ilave edilirse, saf selülözün yıkımı daha düşük sıcaklıklarda da gerçekleştirilebilir [13]. Sıklıkla olmasa da fiziksel ön-muamele işlemlerinde kullanılan bir diğer metod da "sıkma" dır. Bu yöntemle inhibitörlerin karıştırılması amaçlanmaktadır. Metodun sonunda yıkama işlemiyle birlikte bu inhibitörlerin bir kısmı fermentasyondan önce süzülür. Bu yöntem daha çok lignoselülozik biyokütlelerde kullanışlıdır [9].

Tablo 1. Bazı lignoselülozik materyallerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri (Cellulose, hemicellulose and lignin content of some lignocellulosic materials [7, 8])

Ham Materyal	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin
Sertodunlar			
Huş ağacı	41	36,2	18,9
Ak kavak	50,8-53,3	26,2- 28,7	15,5-16,3
Kızıl akçağaç	44,1	29,2	24
Melezkavak	41,7	20,2	29,3
<i>Eucalyptus viminalis</i>	41,7	14,1	31
Yumuşakodunlar			
<i>Pinus banksiana</i>	41,6	25,6	28,6
<i>Pinus pinaster</i>	42,9	17,6	30,2
Köknar	43,9	26,5	28,4
Tarımsal atıklar			
Mısır koçanı	33,7-41,2	31,9-36	6,1-15,9
Şeker kamışı küspesi	40-41,3	27-37,5	10-20
Buğday samanı	32,9-50	24-35,5	8,9-17,3
Pirinç samanı	36,2-47	19-24,5	9,9-24
Mısır sapı	35-39,6	16,8-35	7-18,4
Arpa samanı	33,8-37,5	21,9-24,7	13,8-15,5
Soya sapı	34,5	24,8	19,8

Pamuk sapı	38,4-42,6	20,9-34,4	21,45
Muz atığı	13	15	14
Kahve hamuru	33,7-36,9	44,2-47,5	15,6-19,1
Fındık kabuğu	25-30	22-28	30-40
Sorgum samanı	32-35	24-27	15-21
Yulaf samanı	31-35	20-26	10-15
Diğer			
Bambu	40-50	18-20	23
Okaliptus	45-51	11-18	29
Çim	25-40	25-50	10-30
Gazete kağıdı	40-55	24-39	18-30
Zeytin ağacı	25,2	15,8	19,1
Dallı darı	35-40	25-30	15-20

2.2. Kimyasal Ön-Muamele (Chemical Pre-Treatment)

Kimyasal yöntem, ön-muamele için kullanılan en yaygın metodlardandır. Proses maliyeti düşük ve etkili bir uygulama şeklidir. Alkali ve asidik olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Ayrıca, ozon ile ön-muamele (ozonolizis) de bu başlıkta incelenebilir.

Ozon, suda çözünebilir ve hızla kullanılabilir güçlü bir oksidanttır. Ozonolizis son 10 yıldır lignin degradasyonu ve hemiselülözün yavaşça ayrışmasını sağlamak amaçlı, kağıt üretiminde beyazlatma ajanı olarak kullanılmıştır [14]. Bu prosesle ilgili temel avantaj hidroliz ve fermentasyon basamaklarında ara ürün oluşumunun çok az olması ve prosesin oda sıcaklıklarında gerçekleşebilmesidir [15]. Ozon ile ligninin parçalanma çalışmalarından birinde ise şu sonuçlar elde edilmiştir: (i) α karbonil yapılar ozon karşısında benzil alkol yapılarına karşı daha karardır, (ii) guaykil çekirdekler veratril asitlere göre ozon ile daha hızlı reaksiyona girerler, (iii) bifenil ve fenilokumaranlar ozon ile hızlı reaksiyona girerler. Fakat, veratril çekirdeğin bifenil yapısı ozon karşısında daha karardır [16].

Alkali metotta, biyokütle sodyum hidroksit (NaOH) gibi bazik çözelti içerisinde ısıtılır ve daha sonra belirli bir süre daha ısıtılır [17, 18]. Bu proses sırasında çözünme ve sabunlaşma reaksiyonları meydana gelir. Bu reaksiyonlar ise hemiselülozlar ve diğer bileşenler arasındaki çapraz bağların koparılmasını sağlar. Materyalin gözenekliliği artırılır ve böylece ulaşılabilen yüzey alanı genişletilmiş olur. Bu proses ile selülözün kristalinitesi ve polimerizasyon derecesi azaltılır. Bu yöntem daha çok yapısında yoğun lignin içeren hammaddeler için kullanılır.

Bir C4 bitkisi olan *Miscanthus*'un çift-helozonlu ekstruder kullanılarak NaOH ile ön-muamelesi ve

enzimatik hidrolizi optimize edilmiş en uygun reaktör sıcaklığı 95 °C. NaOH çözeltisinin molaritesi 0,4 M, helozon hızı 80 rpm, akış oranı 120 ml/dk, hidroliz enzimi aktivitesi 30 FPU/g olarak tespit edilmiştir. Bu koşullar altında 1 ton *Miscanthus*'tan 180 kg etanol elde edilmiştir [19]. Şeker kamışı küspesinin %1'lik NaOH ile 600 W'lık mikrodalgada 4 dk ön-muamelesi ve ardından enzimatik hidrolizi (30 FPU/g'lık selüla, Zytex India Private Limited) sonucunda 1 gr kuru biyokütleden 0,665 g indirgenmiş şeker elde edilmiştir [20]. Sodyum hidroksitle ön-muamele yönteminin etkisi ilave çözeltiler ve maddelerle artırılabilir. Tatlı sorgum küspesinin enzimatik hidroliz oranını arttırmak için yapılan bir çalışmada seyreltik NaOH ile otoklavlama yoluyla ön-muamele, yoğun NaOH ile ön muamele, seyreltik NaOH ile otoklavlama ardından H₂O₂ ile ön-muamele, alkalik peroksit ile ön-muamele ve sadece otoklavlama ile ön-muamele yöntemleri karşılaştırılmıştır. En iyi verim seyreltik NaOH ile otoklavlama ardından H₂O₂ ile ön-muamele yönteminden elde edilmiştir [21]. Bir başka çalışmada ise bir yumuşakodun olan ladin ve sertodun olan huş ağacı parçalarının 15 °C, atmosferik basınçta NaOH/üre, NaOH/tiyüüre, NaOH/tiyüüre/üre ve NaOH/polietil glikol (PEG) ile ön-muamelesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan solüsyonlardaki NaOH, üre, tiyüüre, PEG yüzdeleri sırasıyla 7, 12, 5,5 ve 1'dir. Sonuçta, enzimatik hidroliz ve ürün oluşumu için en iyi sonuç NaOH/tiyüüre çözeltisinden elde edilmiştir [22].

Alkali ön-muamelelerin bir çeşiti ise kireç muamelesidir. Kireçle ön-muamele işleminin temeli lignoselülozik biyokütleden önemli derecede karbonhidrat kaybı olmadan lignini ayrıştırmak. Yani amaç, seçici olarak lignini azaltmaktır [23]. Bu ön-muamele yönteminde biyokütle kalsiyum hidroksit ve çeşitli sıcaklık ve basınçtaki suya maruz bırakılır. Genel olarak kireçle ön-muamele 3 şekilde yapılır; kısa süreli ön-muamele (6 saat, 100-160 °C, oksijensiz, 200 psi basınç), uzun süreli ön-muamele (8 hafta, 55-65 °C, havasız), basit ön-muamele (biyokütle hava basıncı ya da oksijensiz ortamda bir saat kaynamış suyun içinde bekletme). Kireç ile ön-muamele işlemi diğer ön muamele işlemleri ile karşılaştırılacak olursa; daha az şiddetli olması, selüloz ve hemiselüloz kaybını ciddi oranda azaltması, maliyetin az olması, güvenli ve başa çıkılabilir olması açısından önemlidir [24].

Bir başka alkali muamele metodu ise sulu amonyak (amonyum hidroksit) ile ön-muameledir. Biyokütleyle yapılan amonyak uygulamasının temel etkisi biyokütlenin delignifikasyonu, yani lignoselülozun fraksiyonlanmasıdır. Biyokütlerdeki lignin içeriği istenilen seviyeye düşürülür. Ayrılan lignin daha sonra yakıtlara ve polimerlere ilave olarak, yapıştırıcı olarak ve asfalt yapımında kullanılmak amaçlı pazarlanabilir.

Delignifikasyon ile biyokütlenin yapısı açılır, enzimatik hidroliz için selüloz kullanılabilir hale getirilir. Bu uygulama, özellikle tarım atıkları ve otçul hammaddeler gibi düşük lignin içerikli substratlar açısından oldukça etkilidir. Amonyak temelli ön-muamele kendiliğinden sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon için çok uygundur. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bu ön-muamele yönteminin diğer biyoetanol üretim prosesleriyle kullanılmasyla mısır sapından biyokütlenin %75'i oranında biyoetanol elde edilmiştir. Mısır sapının %29,5'lik sıvı amonyakla (1/10-15 katı/sıvı) 10 gün oda sıcaklığı ve atmosferik basınçta ön-muamelesi sonucunda ligninin %75'inin giderildiği, bununla birlikte glukozun %100'e yakını ve ksilanın %85'inin zarar görmediği rapor edilmiştir [25]. Sulu amonyak temelli ön-muamele işleminin 2 tipi mevcuttur: (1) ARP (yüksek yoğunluk, düşük temas zamanı), (2) SAA (düşük yoğunluk, yüksek muamele zamanı).

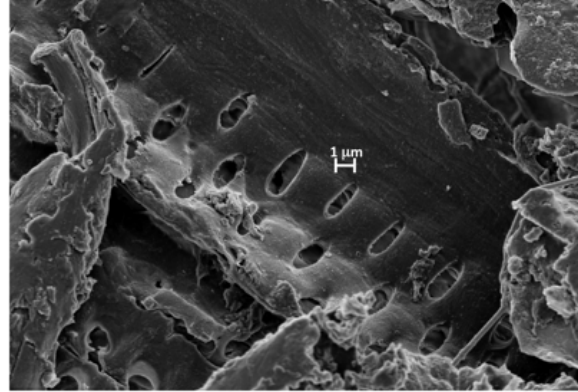
Sulu amonyak ön-muamelesi önemli derecede karbonhidrat kaybına neden olmaz. Sulu amonyak, diğer delignifikasyon yöntemlerine göre biyokütle içerisinde önemli morfolojik değişiklikler meydana getirmede uygun bir kimyasal etkilendiricidir. Amonyakın oldukça uçucu oluşu, sıvı karışımlardan ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Buharlaştırma yoluyla elde edilen kullanılmış amonyak ise daha sonra tekrar tekrar kullanılabilir. Amonyak, pahalı değildir ve akut sağlık sorunlarına sebep olmaz. Endüstriyel bir kimyasal olduğundan yaygın olarak bulunur ve lignoselülozik biyokütle ile kullanıldığında herhangi bir zararlı yan-ürün oluşumuna sebep olduğu gözlenmemiştir. Yöntemin uygulandığı kaba aşındırıcı etkisi yoktur ve molar temelde fiyatı sülfirik asitin dörtte biri kadardır [26]. Kanola samanının sulu amonyakla ön-muamelesi yüzey yanıt yöntemi ile optimize edilmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek %60,7 oranında glukoz kazanımı sağlayan parametreler %19,8 sulu amonyak (1/10, katı/sıvı), 14,2 saat ön-muamele süresi ve 69 °C ön muamele sıcaklığı olarak hesaplanmıştır [27].

Asit ile ön-muamele işleminde biyokütle, hem konsantre (yoğun) hem de seyreltilmiş asit ile muamele yapılabilir [28]. Konsantre asit ile ön-muamele yönteminin avantajı prosesin düşük sıcaklıklarda gerçekleşebilmesidir. Bu durum prosesin maliyetini de düşürmektedir. Bazı durumlarda konsantre asit ile muamele sonucunda ek bir enzimatik hidroliz basamağına gerek kalmayabilir. Fakat, sülfirik asit ve hidroklorik asit gibi konsantre asitler genellikle toksik, zarar verici ve aşındırıcıdır. Aşındırıcı özelliğinden dolayı ilave ekipmanlara ihtiyaç duyulur. Bu ilave ekipmanlar ise prosesin maliyetini arttırmaktadır. Konsantre asit, prosten sonra iyileştirilerek kullanılabilir. Yoğun sülfirik asit (%65-80) ile yapılan bir çalışmada sıcaklık (30-60 °C), asit/biyokütle değeri (1/1, 2/1) ve sürenin (10- 40 dk) yan

ürün oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. Buna göre, temel yan ürün olarak furfural ya da 5 hidroksimetilfurfural yerine organik asitler tespit edilmiştir. Sıcaklıktaki değişimin levunilik asit ve formik asit oluşumuna etki ettiği, asetik asit oluşumuna etki etmediği belirlenmiştir. Ayrıca, asit/biyokütle değeri glukoz geri kazanımına etki ederken toplam şeker kazanımına etki etmemiştir [29].

Yoğun inorganik asitler (sülfirik asit, hidroklorik asit, nitrik asit gibi) selüloz çözücüsü olarak bilinirler [30]. Örneğin selüloz yoğun sülfirik asit ve fosforik asit ile muamele edildiğinde, kristalin yapısını kaybeder. Bu yöntemin uygulanmasında 3 adet sınırlayıcı etmen bulunmaktadır. Bunlar; asitle çözünür şekerlerin ayrıştırılması, asitlerin tekrar kullanımı ve asitin yeniden yoğunlaştırılmasıdır.

Hemiselülozlarda bulunan şeker oranı %70-90 arasında değişmektedir. Özellikle mikroalglerde bulunan hemiselülozlardaki şekerlerin parçalanabilmesi için kullanılan en verimli metotlardan biri seyreltilmiş asit ile ön-muameledir. Asit konsantrasyonu genellikle %1-10 arasında olmaktadır. Isı miktarı ise ılımlı olup, genellikle 100-110 °C'dir. Asit ile ön-muamele diğer hidroliz tipleri ile kıyaslandığında birkaç avantaja sahiptir. Örneğin, hidroliz hızı daha fazladır ve glukozun parçalanmasına öncülük edebilir. Lignoselülozik yapıda gözenekliliği artırır (Şekil 2). Bununla birlikte, proses fermentasyon basamağında inhibitör etki yaratabilecek furfural ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF), karboksilik asitler gibi maddelerin ortaya çıkmasını da sağlayabilir. Yüksek sıcaklık ve yüksek asit konsantrasyonlarında bu inhibitör maddelerin ortaya çıkma oranı artar. Bu maddelerin toksik etkisini yok etmek için kimyasal ilaveler (dithiyonit ve sülfid gibi redükte edici ajanlar), enzimatik müdahaleler (peroksidaz ve lakkaz) başta olmak üzere ısıtma ve buharlaştırma, sıvı-sıvı ekstraksiyon, sıvı-katı ekstraksiyon gibi ilave işlemler gerçekleştirilmelidir [31]. Asitlerle muamele yöntemlerinde bir diğer önemli nokta ise asitin nötralize edilmesi ve fermentasyondan önce uzaklaştırılmasıdır [32].



Şekil 2. Dalı darmanın asit ile ön-muamelesi sonucunda artan gözenekliliğin Taramalı Elektron Mikroskobu ile gösterimi (View of increasing porosity with Scanning Electron Microscopy as a result of pre-treatment with acid of switchgrass [33]

Adi yonca, delice, çayır otu, çavdar samanı, buğday samanı, yem bitkileri seyreltik asit ile ön-muameleye (150°C, H₂SO₄, 15dk) tabi tutulmuş sonuçta hemen hepsinden %95-99 oranında selüloz, %81-91 oranında ise hemiselüloz geri kazanılmıştır. Çalışma sonucunda en iyi biyoetanol üretim potansiyeli ayrık otu (292 l/ton) ve buğday samanından (308 l/ton) elde edilmiştir [34]. Şeker kamışı samanının seyreltik asit (HCl, H₂SO₄) ile ön-muamelesi optimize edilmiş ve her bir gram biyokütleden 0,685 g indirgenmiş şeker elde edilmiştir [35]. Şeker pancarı küspesinin optimum koşullarda seyreltik sülfirik asit(%0,66) ile ön-muamele, enzimatik hidroliz ve fermentasyonu sonucunda 1 g kuru biyokütle başına 0,4 g etanol elde edilmiştir [36]. Ayçiçeği sapının sülfirik asitle ön-muamelesinin optimizasyonu sonucunda en uygun muamele sıcaklığı 167 °C, asit yoğunluğu ise %1,3 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, 100 g kuru biyokütleden 33 g glukoz ve ksiloz elde edilmiştir [37].

Yapılan çalışmalar sonunda %81'lik fosforik asitin de ideal selüloz çözücülerinden olduğu bulunmuştur. Çünkü; fosforik asitle çözünme düşük sıcaklıkta meydana gelmekte, su bulunan ortamda selülozu çözebilmekte, muamele edilen selüloz hidroliz işlemi için uygun bir amorf yapı oluşturmakta, fosforik asit atığı ise hidroliz ve fermentasyon basamaklarında inhibitör etki yapmamaktadır. Fosforik asitle ön-muamele sonrasında genellikle reaksiyonu durdurmak için bir miktar aseton kullanılır. Kullanılan aseton basit bir buharlaştırma yöntemi ile geri kazanılır [38]. Muamele edilmiş selülozun yüksek derecede reaktif olduğu belirtilmiştir. Benzer sonuçlar iyonik sıvılarda da gözlemlenmiştir [39].

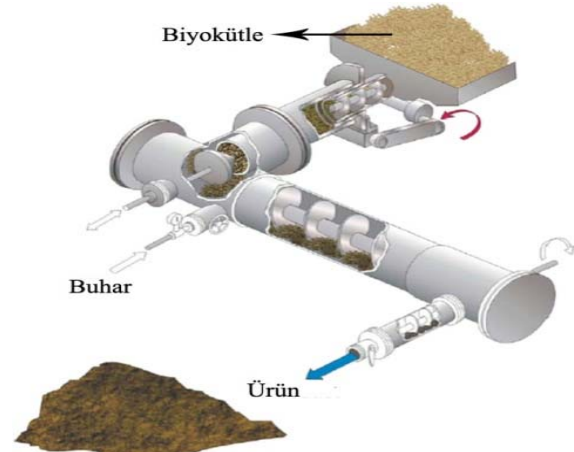
2.3. Termal/Fiziko-Kimyasal Ön-Muamele (Thermal/Physico-Chemical Pre-Treatment)

Termokimyasal dönüşüm proseslerinin 2 temel prensibi mevcuttur. Birincisi, biyokütlenin gazlaştırılması ve hidrokarbona dönüşümünü sağlamaktır. İkincisi yüksek sıcaklık, yüksek basınç sıvılaştırması, ultra sıvılaştırma yada süperkritik ekstraksiyon ile direkt olarak sıvılaştırmadır [40]. Fiziksel ve kimyasal metotların bir tür kombinasyonu ile oluşan metotlar genellikle, parçalanmış ya da öğütülmüş biyokütlenin yüksek basınçlı doymuş buhar, sıvı amonyak ya da CO₂ ye maruz bırakılarak basıncın aniden düşürülmesi ile gerçekleştirilirler [41]. Bu tür metotlardaki temel avantaj ise proseste yoğun kimyasal kullanımının olmamasıdır [42]. Bu durum proseste kullanılacak olan ekipman sayısında ve proses için yapılacak masrafta düşüşe neden olmaktadır. Ayrıca çevresel açıdan da etkili metotlardır. Otohizoliz, buhar patlama, AFEX, karbondioksit patlaması metotları bu tip ön-muamele işlemlerinin en önemlilerine örnek oluşturmaktadır.

Otohizoliz prosesinde, biyokütle basınçlı su ile muamele edilir. Bu tip ön-muamele yöntemine hidrotermal ön-muamele de denilmektedir. Yöntemin temel avantajı çoğunlukla harici bir kimyasal ya da katalist kullanılmaması ve bundan dolayı görece düşük yürütme maliyetinin olmasıdır [43]. Proses, seyreltik asit ile muamele metoduna benzer şekilde gerçekleştirilir. Bazı durumlarda hidronyum (H₃O) iyonu gibi bileşenler proses içerisinde katalist olarak kullanılabilir. Yöntemin uygulama sıcaklığı 150-230 °C, uygulama süresi 15-180 dk arasında değişmektedir. Ön-muamele sırasındaki sıvı/katı oranı genellikle 15'tir [44]. Proses sırasında, seçici olarak hemiselülozlar hidrolize olur. Dönüşüm, %55-84 arasında sağlanır ve oluşan inhibitör madde ise çok azdır.

Buhar patlama metodu ticari ürünlerin elde edilmesi için hemiselülozun hidrolizini gerçekleştirmek amacıyla uygulanmaktadır (Masonite prosesi). Odun parçaları geniş bir tanka taşınır ve herhangi bir kimyasal eklenmeksizin yüksek basınçlı buhar ile muamele edilir. Uygun bir zaman sonra, basıncın azaltılması için reaktör/tank hızlıca havalandırılır ve içeriği başka bir tanka konularak soğutulur. Buhar patlama yöntemi herhangi bir kimyasal kullanmadan lignoselülozik biyokütlenin yüksek-basınçlı buhar ile hızlı bir şekilde ısıtılmasına dayanmaktadır. Biyokütlenin yüksek basınçlı buhara maruz kalması hemiselülozun hidrolizini sağlar [45]. Hemiselülozun bu ön-muamele işlemi esnasında salınan asetik asit ve diğer bazı asitlerce hidrolize olduğu düşünülmektedir. Bu işlem biyokütle üzerinde dolaylı da olsa kimyasal bir etki içermektedir. Bu işlem sırasında lignoselülozik parçaların boyutlarındaki azalma ise dikkate değer bir boyutta

değildir. Proses sırasında H₂SO₄ (ya da SO₂) ya da CO₂ ilavesi, enzimatik hidrolizi etkili bir şekilde artırır, ket vurucu etki yaratan bileşiklerin oluşumunu azaltır ve hemiselülozun tamamen uzaklaştırılmasına olanak sağlar [46]. İtalya'nın ENEA (İtalian National Agency for New Technologies) laboratuvarlarında yapılan Buhar patlama ünitesinin şematik görüntüsü Şekil 3'de gösterilmektedir [47].



Şekil 3. Şematize edilmiş pilot buhar patlama ünitesi (Schematized pilot steam explosion unit)

Buhar patlama ön-muamele yönteminin enerji gereksinimi mekanik ön-muamele yöntemiyle karşılaştırıldığında daha düşüktür. Ön-muamele yöntemleri arasında en çevreci olanlarındandır [48]. Geleneksel mekaniksel metotlar buhar patlama metoduyla karşılaştırıldığında %70 daha fazla enerji gereksinimine ihtiyaç duyar [49]. Buhar patlama yöntemi daha çok sert odunlar ve tarımsal atıklar üzerinde etkilidir. Yumuşak odunlar üzerindeki etkisi ise daha azdır [50]. Dezavantajları ise ksilan fraksiyonlarının yıkımının az olması, lignin-karbonhidrat matriksinin kısmi yıkımı, etanol prosesinde kullanılan mikroorganizmalara olumsuz etki eden ürünlerin oluşabilmesidir [51]. Proses sırasında mikrobiyal büyümeyi, enzimatik hidrolizi, fermantasyonu engelleyen ürünlerin oluşabilmesinden kaynaklı olarak ön-muamele yapılmış biyokütle su ile yıkanır. Böylece istenmeyen bileşikler su ile uzaklaştırılır. Su ile yıkamanın dez avantajı ise istenmeyen ürünlerle birlikte, suda çözünebilir hemiselüloz parçalarının da uzaklaşmasıdır. Tipik olarak kuru maddenin %20-25'i su ile yıkama sırasında kaybedilir [52]. Maksimum şeker kazanımı amacı ile bazı araştırmacılar buhar patlama metodunu iki adımlı şekilde önermektedirler. Buna göre, ilk adım düşük sıcaklıkta gerçekleştirilirken, ikinci adım ise 210 °C'den daha yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir [53]. Farklı metotlar da buhar patlama metoduyla eşleştirilerek kullanılabilir. Alkalik peroksit uygulaması sonrası buhar patlama ön-muamele

metodu, iyonik sıvılarla birlikte buhar patlama ön-muamele metodu, organik çözücü ekstraksiyonu ile birlikte buhar patlama ön-muamele metodu, buhar patlama metodu öncesi öğütme metodu, buhar patlama metodu sonrası taraklama metodları bunlara örnek olarak verilebilir.

Buğday samanının buhar patlama ile ön-muamelesi ve ardından enzimatik hidrolizi sonucunda (30 FPU/g selüloz) 300 g/kg'dan daha fazla glukoz açığa çıkarılmıştır. Elde edilen şekerin fermentasyonu ile de 120-140 g/kg etanol elde edilmiştir [54]. Kargının (*Arundo donax*) 0,07 M H₂SO₄ ile 200 °C'de 48 saat asit katalizli buhar patlama ön-muamelesi (ACSE) ve enzimatik hidrolizi sonucunda (0,28 g Ctec2/g) 91 g/l şeker (glukoz + ksiloz) elde edilmiştir [55]. Şeker kamışı küpsenin 215 °C'de 5 dk buhar patlama ile ön-muamelesi (2L-SE pilot reaktör, Masonite Technology), enzimatik hidroliz (Selüloz, β-glukosidaz, ksilanaz/Novozymes) ve *S. cerevisiae* ile fermentasyonu sonucunda en fazla 56 g/L etanol elde edilmiştir [56].

AFEX (Amonyak Lif Patlaması, Ammonia Fiber Explosion), lignoselülozik yapıda ultra ve makro yapıda fizikokimyasal değişiklik yaratır. AFEX, lignoselülozik materyalin yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı amonyağa maruz bırakılıp ardından basıncın hızlıca azaltıldığı

fizikokimyasal ön muamelelerin bir biçimidir. Proses genellikle yaklaşık olarak 1-2 kg amonyak/kg kuru biyokütle, 90 °C sıcaklık ve 30 dk süre koşullarında gerçekleştirilir [57]. AFEX uygulamasının temel avantajı proses sırasında kullanılan amonyağın geri dönüştürülebilir ve yeniden kullanılabilir olmasıdır. Diğer bir avantajı ise proses sonucunda hidroliz ve fermentasyon basamakları sırasında kullanılacak olan mikroorganizmaların gelişimine ket vurucu madde oluşmamasıdır [58]. AFEX ön-muamelesi lignoselülozik biyoküttele enzimatik sindirimi artırır. AFEX ön-muamelesi selülozun dekristalizasyonu ile sonuçlanır, hemiselülozun depolimerizasyonu sağlanır. Bazı substratların farklı koşullarda AFEX ile ön-muamelesi ve enzimatik hidrolizi sonucunda dönüştürülebilen selülozun yüzdesi Tablo 2'de belirtilmektedir [59]. AFEX ile hemiselüloz üzerindeki asetil grupları çıkarılır ve lignin lignoselülozdan ayrıştırılır. AFEX, yapısal parçalanmadan dolayı lignoselülozik yüzeye erişimi kolaylaştırır. AFEX yönteminde, amonyak biyokütleye sulu ortamda nüfuz ettiği zaman reaksiyon sonucunda amonyum hidroksit oluşmaktadır. Bu hidroksil iyonları ise lignoselülozik materyal içerisinde birkaç termokimyasal reaksiyonu katalizlemektedir. AFEX ön-muamelesindeki anahtar değişkenler; uygulama zamanı, sıcaklık, amonyak /

Tablo 2. Farklı substrat ve farklı ön-muamele ve hidroliz koşullarında dönüştürülebilen selülozun yüzdesi (Percentage of cellulose that can be converted in different substrate and different pre-treatment and hydrolysis condition)

Substrat	Ön-muamele koşulu	Hidroliz koşulu	Selüloz dönüşüm yüzdesi
Dallı darı	100 °C, 1/1 (amonyak/biyokütle) %80 nem, 54 dk	15 FPU selüloz (spezyme CP) ve 40 IU/g β-glukosidaz (Novazyme 188), 168 saat	93,0
Bermuda çimeni	90 °C, 1/1 (amonyak/biyokütle), %60 nem, 5 dk	30 FPU/g selüloz (<i>Trichoderma reesei</i>), 48 saat	87,1
	100 °C, 1/1 (amonyak/biyokütle), %60 nem, 5 dk	30 FPU/g selüloz (<i>Trichoderma reesei</i>), 48 saat	89,0
	80 °C, 1/1 (amonyak/biyokütle), %60 nem, 30 dk	30 FPU/g selüloz (<i>Trichoderma reesei</i>), 48 saat	97,3
Mısır sapı	90 °C, 1/1 (amonyak/biyokütle), %60 nem, 5 dk	60 FPU/g selüloz (Spezyme CP), 168 saat	93,0
	90 °C, 1/1 (amonyak/biyokütle), %60 nem, 5 dk	31 mg/g selüloz proteini (Spezyme CP) ve 33 mg/g β-glukosidaz (Novazyme 188), 168 saat	93,0
Kavak	180 °C, 2/1 (amonyak/biyokütle), %233 nem, 30 dk	125 mg/g selüloz proteini (Spezyme CP) ve 33 mg/g β-glukosidaz (Novazyme 188), 168 saat	93,0

biyokütle oranı ve nem içeriğidir. Bu değişkenlerin optimum kombinasyonu ise lignoselülozun dirençliliğine bağlı olarak değişmektedir. Herhangi bir biyokütle için

optimum koşulları bulabilmenin yolu ise tüm değişkenleri farklı değerlerde denemekten

geçmektedir. Geleneksel olarak, AFEX ön-muamelesinde yüksek sıcaklık, kısa uygulama süresi

uygulanırken son yıllardaki bazı araştırmacılar maliyeti azaltmak amacıyla düşük sıcaklıkta daha uzun uygulama süresinin kullanıldığı ön-muamele koşullarını optimize etmeye çalışmaktadır [60].

Karbondioksit patlama yönteminde ise karbondioksit ile karboksilik asit oluşumu gerçekleştirilir ve lignoselülozik yapının parçalanabilirliği artırılır. Bu metot ligninin giderimi için CO₂'nin süperkritik akışkan olarak kullanımına dayanmaktadır ve temel dez avantajı yüksek basınç gerektirmesidir [61]. Buhar patlama yöntemi ile karşılaştırıldığında daha fazla ürün elde edilmekte ve daha az toksik yan ürün oluşumu gözlemlenmektedir [62]. Bir çok ön-muamele metodları ile karşılaştırıldığında çok zayıf kalmaktadır [63]. Aynı

zamanda, diğer termo/fiziko kimyasal ön-muamele metodlarına oranla da daha fazla maliyet gerektirmektedir.

2.4. Biyolojik Ön-muamele (Biological Pre-Treatment)

Biyolojik ön-muamele işlemlerinde kahverengi, beyaz ve yumuşak çürükçül mantarlar gibi mikroorganizmalar lignin ve hemiselülozun parçalanması için kullanılabilir [64]. Kahverengi çürükçül funguslar selüloza etki ederken, beyaz çürükçüller hem selüloza hem de lignine etki etmektedir. Beyaz çürükçül mantarlardan en etkili ise Basidiomisetlerdir. Bunlar lignini tamamen mineralize edebilirler [65]. Değişik çalışmaların sonuçlarına göre *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida* 37 ve *Pycnoporus cinnabarinus* 115 gibi mikroorganizmaların samanı 4-5 haftada %30-50 oranında şekere parçalayabildiği ortaya çıkmıştır. Diğer bir çalışmada ise odun parçalarındaki ligninin daha fazla parçalanarak selüloz eldesini arttırmak için değişik mutant suşlar geliştirilmiştir. Bermuda çimeninin biyolojik parçalanması ise 6 haftada *Ceriporiopsis subvermispora* ile %29-32 oranında, *Cyathus stercoreus* ile ise %63-77 oranında gerçekleştirilmiştir [66]. Beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* karbon ve azotun olmadığı koşullarda sekonder metabolit olarak lignin degredasyon enzimi, lignin peroksidazlar ve manganaz bağımlı peroksidazlar üretirler [67,68]. Bu enzimler odunlarda hücre duvarının parçalanmasını sağlar. Bunların dışında polifenol oksidazlar, lakkazlar, hidrojen peroksit üretici enzimler gibi lignini parçalayabilen başka enzimler de vardır [69].

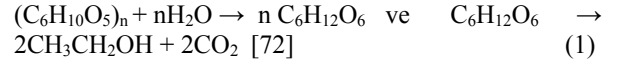
Fungal ön-muamele sırasında lignoselülozik materyalin içerdiği nem oranı ve parça boyutu, ilave katkılar (Mn, Cl, Cu ya da H₂O₂ ...vb), sıcaklık, havalandırma, zaman gibi parametreler önemlidir. Ligninin parçalanması ve beyaz çürükçül mantarların ligninolitik aktivitesi için substratın içerdiği nem oranı %70-80 olmalıdır. Substratın yüksek parça boyutu ön-muameleyi olumsuz

etkilemektedir. Mn⁺² varlığı lignin parçalanmasında rol alan enzimlerin sentezini arttırmaktadır. Ligninin parçalanması oksidatif bir proses olduğundan dolayı fungusun oksijene ulaşabilirliği sıkça denetlenmelidir [70].

Fungusların yanı sıra biyolojik ön-muamele için kullanım potansiyeli olan bakteri grubu ise aktinobakterilerdir. Fungus benzeri prokaryot olan aktinobakterilerden özellikle bazı *Streptomyces sp.* türlerinin sahip olduğu ligninolitik aktivite ligninin gideriminde kullanılabilir [71].

3. HİDROLİZ (HYDROLYSIS)

Ön-muamele işlemi bittikten sonraki aşama hidrolizdir. Hidroliz, bir molekülün su ekleyerek parçalanması anlamına gelmektedir ve aşağıdaki formüller (1, 2) ile ifade edilebilir.



Lignoselülozik materyal içerisindeki karbonhidrat polimerleri fermantasyon işleminden önce, hidroliz olarak adlandırılan bir prosesle basit şekere dönüştürülmelidir. Lignoselülozun hidrolizi için ise birkaç olası proses mevcuttur. Bu hidroliz metodlarını kimyasal hidroliz ve biyolojik hidroliz olarak ikiye ayırabiliriz. Reaksiyon sonunda lignin yan-ürün olarak kalırken selüloz ve hemiselüloz ise hidroliz ve fermantasyon prosesleri ile biyoetanolle dönüştürülebilir. Yukarıdaki iki hidroliz yöntemine ilaveten, gama ya da elektron ışınları ve mikrodalga ışınları gibi başka hidroliz metodları da bulunmaktadır. Fakat bu proseslerin ticari açıdan uygulaması bulunmamaktadır. Selülozun tamamen hidrolizi glukoz eldesi ile sonuçlanırken, hemiselülozun hidrolizi ile pentoz ve heksoz şekerler elde edilir. Yumuşak odunlu materyallerdeki hemiselülozlar temel olarak mannoz içerirken, sert odunlularda ise baskın bileşen ksilozdur [73].

3.1. Kimyasal Hidroliz (Chemical Hydrolysis)

Asitlerin selülozu parçalaması, derişime bağılı olarak genellikle iki aşamada olur. İlk aşamada asitler, kolayca ulaşabildiği amorf bölgeleri parçalarlar ve uzaklaştırırlar. Amorf bölgesi uzaklaşan selüloz, hidroselüloz olarak isimlendirilir. Bu nedenle, bozulmadan kalan selülozun kristallik derecesi artar. Derişik asitlerin kullanılması ve reaksiyon süresinin uzatılması sonucu selüloz monomerik yapıtaşları olan glikoza dönüşebilir.

Asit ile hidroliz yöntemi ikiye ayrılır: derişik asit ile hidroliz ve seyreltik asit ile hidroliz. Hidroliz işlemi için genellikle seyreltik asit ile hidroliz yöntemi

kullanılmaktadır. Bu yöntem, genellikle ya fermentasyonu destekleyen bir basamak olarak ya da direkt lignoselülozik materyalden şekerlerin eldesi için gerçekleştirilir. Derişik ya da seyreltik asit ile ön-muamelenin avantaj ve dezavantajları Tablo 3’de belirtilmiştir. Fakat enzimatik hidroliz ile karşılaştırıldığında seyreltik asit ile hidrolizin verimliliği daha düşüktür [74]. Asitler ile hidroliz kesikli bir prosestir. İstenmeyen yan-ürünlerin oluşumundan kaçınmak için ise genellikle iki basamaklı bir yöntem tercih edilir. Buna göre, ilk basamakta ılımlı koşullar uygulanırken, ikinci basamakta ağır koşullar uygulanır. Birinci basamakta düşük sıcaklıkta hemiselülozdan maksimum ürün elde edilirken, ikinci basamakta ise daha çok selülozun hidrolizi gerçekleştirilir [75]. Hindistan, Suidi Arabistan ve ABD’de yaygın olarak görülen ve karbonhidrat içeriği $67,4 \pm 1,6$ olan *Prosopis juliflora*’nın %2’lik sodyum ditiyonit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ile ön-muamelesi ve iki basamaklı asit ile hidrolizinden sonra holoselülozun $40,09 \pm 1,22$ ’si hidroliz edilmiştir. Ortama salınan fenol ve furanların miktarı ise sırasıyla $1,04 \pm 0,022$ g/l ve $0,41 \pm 0,012$ g/l’dir. Birinci basamakta hidroliz %1’lik sülfirik asit ile 110°C ’de 20 dk boyunca gerçekleştirilirken ikinci basamaktaki hidroliz %2’lik sülfirik asit ile 121°C ’de 30 dk süresince yapılmıştır [76].

Lignoselülozik materyalin asit ile hidrolizini etkileyen parametreler ise kullanılan substratın özelliği, sistemin asiditesi ve hidroliz sırasında ürünlerin ayrışma oranıdır. Kullanılan substratın özelliklerini; nötralizasyon kapasitesi, selüloz ve hemiselülozun kolay hidrolize olma özelliği, zor hidroliz edilen materyallerin oranı, makromoleküllerin uzunluğu, selülozun polimerizasyon derecesi, selüloz zincirlerinin konfigürasyonu ve selülozun lignin, pektin, hemiselüloz, proteinler, mineraller, elementler gibi bitki hücre duvarı içinde bulunan diğer koruyucu polimerik yapılarla ilişkisi belirler. Sistemin asiditesi kullanılan asit derişimi, asit çözeltisinin miktarı, hidroliz sırasında biyokütleden salınan asit miktarı, lignoselülozun nötralleşme kapasitesi, sıvı-katı oranı ve ısıtma sırasında çözeltinin hareketine bağlıdır [77]. Hidroliz sırasında ürünlerin parçalanma oranı ise sıcaklık, asidite, reaksiyon zamanı ve şeker derişimine bağlıdır.

Tablo 3. Asit ile hidroliz metodlarının avantaj ve dezavantajları (Advantage and disadvantage of hydrolysis methods with acid)

Hidroliz Metodu	Avantajlar	Dezavantajlar
Derişik asitile hidroliz	İşlem düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir. Yüksek şeker ürünü elde edilir.	Asit tüketimi fazladır. Ekipmanlarda paslanma meydana gelebilir. Kullanılan asidi tekrar döngüye katmak için yüksek oranda enerji sarf edilir. Daha uzun bekleme süresi.
Seyreltik asit ile hidroliz	Düşük asit tüketimi. Kısa direnç zamanı	İşlem yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilir. Düşük şeker ürünü elde edilir. Ekipmanlarda paslanma meydana gelebilir.. İstenmeyen yan-ürünler oluşabilir.

Hidrolizatlar, içerisinde birçok inhibitör madde barındırırlar. Bu maddelerin oluşumu daha önceki bölümde de bahsedildiği üzere lignoselülozik materyalin tipine ve içeriğine, ön-muamele ve hidroliz yöntemlerine bağlıdır. Hemiselülozlardan elde edilen hidrolizatlarda ise sadece heksozlar yoktur. Aynı zamanda ksiloz gibi pentozlar da bulunurlar. Ksiloz sert odunlu hammaddelerde hemiselülozun baskın parçalanma ürünüdür. *S. cerevisiae* etanol üretimi için ticari olarak en çok kullanılan mikroorganizmadır. Fakat ksilozu fermente edemez [78].

Asetik asit ve levulinik asit ise hidrolizatlar içerisinde en bol bulunan karboksilik asitlerdir. Asetik asit, sadece hidroliz için değil aynı zamanda fermantasyon prosesi için de iyi bilinen bir yan-üründür. Bununla birlikte, proses sırasında asetik asitin 10 g/L oranında var oluşu doğal karşılanmaktadır. Genel olarak fermantasyon sırasında mayalardaki asetik asit tolerans oranı ise 5 g/L’dir [74]. Fenolik/aromatik bileşiklerin birçoğu seyreltik asit hidrolizatları arasında bulunmuştur [79]. Bunların hidroliz esnasında ligninin parçalanma ürünü olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, aromatik bileşiklerin şeker yıkımının bir sonucu olarak da oluşabileceği düşünülmektedir. Fenolik bileşikler arasından vanilin ve şiringaldezin en önemli inhibitör maddelerdendir. Fakat bunlar fermantasyon işlemi esnasında *S. cerevisiae* tarafından asimile edilebilirler. Yayınlanan bir rapora göre, fenolik/aromatik bileşiklerin

miktarının litrede birkaç miligram olabileceği söylenmiştir. Bu ise fenolik bileşiklerin suda çözünürlüğü ile ya da hidroliz prosesinde lignin parçalanmasının sınırlandırılmasıyla giderilebilir. Bir diğer kimyasal hidroliz yöntemi de alkali hidrolizdir. Bu tür hidrolizde ön-muameleden geçmiş/geçmemiş biyokütle bazik maddelerle reaksiyona sokulur. Kullanılan kimyasal ise genellikle NaOH'tır.

3.2. Enzimatik Hidroliz (Enzymatic hydrolysis)

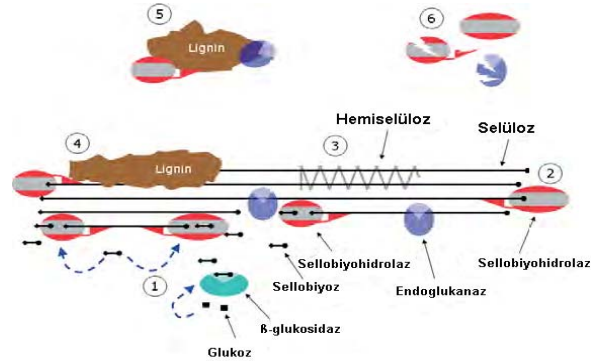
Lignoselüloz doğada bakteri ve funguslar tarafından parçalanır. Lignoselülozun değredasyonunda temel olarak selülaz, ksilanaz, peroksidaz ve lakkazlar rol oynarken β -ksilosidaz, α -L-arabinofuranosidaz, α -D-glukuronosidaz, asetil ksilan esteraz ve hidroksisinnamil asit esteraz gibi aksesuar enzimlerde rol almaktadırlar. Enzimler, mikroorganizmadan izole etmek ya da enzim kokteyli olarak kullanılmakla birlikte Novazyme, Zytex India Private Limited gibi firmalardan ticari olarak ta temin edilebilir.

3.2.1 Selülazlar (Cellulases)

Selülozun glukoza enzimatik olarak parçalanmasında 3 farklı sınıf enzimin sinerjistik etkisi rol oynamaktadır [80, 81, 82] (Şekil 4). Endo-1,4- β -glukanaz ya da 1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolazlar (E.C. 3.2.1.4) çözünür ya da çözünmez 1,4- β glukan substratlar üzerine etkilidir (β -1,4-glikozidik bağlara etki eder) [83]. Aktivitesi CMC (karboksimetilselüloz)'den salınan redükte gruplar yardımıyla tespit edilir. Ekzo-1,4- β -D-glukanazlar ise hem 1,4- β -D-glukanlardan 1,4- β -D-glukoza serbest bırakan 1,4- β -D-glukan glikohidrolazları (E.C.3.2.1.74) hem de 1,4- β -glukanlardan D-sellobiyoza koparan 1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolazları (E.C.3.2.1.91) içerir. 1,4- β -D glukan glikohidrolazlar aynı zamanda D-sellobiyozun yavaşça hidrolizini de katalizler. β -D-glukozid glukohidrolazlar (E.C. 3.2.1.21) glikozid dizileri, çözünür selodekstrinler ve sellobiyozdan D-glukoz birimlerini koparır. β -glukosidaz ise sellobiyozu glukoza parçalar [83].

Literatürde selülaz enzimlerini üreten birçok mikroorganizma bulunabilmektedir. Funguslardan *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Hemicolla insolens*, *H. grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Penicillium brasilianum*, *P. occitanis*, *P. decumbans*, *Trichoderma reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *Chaetomium cellulyticum*, *C. thermophilum*, *Neurospora crassa*, *P. fumigosum*, *Thermoascus aurantiacus*, *Mucor circinelloides*, *P. janthinellum*, *Paecilomyces inflatus*, *P. echinulatum*, *Trichoderma atroviride*, *Coniophora puteana*, *Lanzites trabeum*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustris*, *Fomitopsis sp.*, *Phanerochaete chrysosporium*,

Sporotrichum thermophile, *Trametes versicolor*, *Agaricus arvensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia gigantea* selüloolitik aktiviteye sahipken bakterilerde *Acinetobacter junii*, *A. amitratus*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Anoxybacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. flexus*, *Bacteriodes sp.*, *Cellulomonas biozotea*, *Cellvibrio gilvus*, *Eubacterium cellosolvans*, *Geobacillus sp.*, *Microbispora bispora*, *Paenibacillus curdolanolyticus*, *Pseudomonas cellulosa*, *Salinivibrio sp.*, *Rhodothermus marinus*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium thermocellum*, *C. cellulolyticum*, *C. acetobutylium*, *C. papyrosolvans*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* selüloolitik aktivite göstermektedir. İlave olarak, *Cellulomonas fimi*, *C. biozotea*, *C. uda*, *Streptomyces drozdowiczii*, *S. lividans*, *Thermomonospora fusca*, *T. curvata* gibi aktinobakterilerde de selüloolitik sistem mevcuttur [84, 85]. Mikrobiyal kökenli selülazlar biyoetanol üretimi için saflaştırılarak ya da duruma özgün olarak enzim kokteyli şeklinde kullanılabilir. Fakat bazı araştırmacılar selüloz parçalanmasında sinerjistik etki gösteren selüloolitik enzimleri kodlayan genlerin fermentasyon mikroorganizmasında ifadesine ilişkin çalışmalar gerçekleştirmektedir. Böylece, enzimin üretilmesi ve saflaştırma/kısmi saflaştırma gibi ek basamaklara ihtiyaç kalmaksızın mikroorganizma hem selülozu asimile edebilecek hem de asimilasyon ürününi fermentasyonla etanole dönüştürebilecektir [86].



Şekil 4. Selülazlar (Cellulases)

Günümüzde glikozil hidrolazlara (GH) ait 90 enzim ailesi belirlenmiştir. Sınıflandırma sistemi enzim mühendisliği çalışmaları için glikozil hidrolazların kullanımını kolaylaştırmaktadır. Selüloz değredasyonunda rol oynayan önemli GH aileleri 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 61 ve 74'tür. Bu selüloolitik enzimler protein sekans dizi algoritmalarının Hidrofobik Cluster Analizi ile gerçekleştirilmektedir. Selülozların bulunduğu GH aileleri oldukça farklı katlanmalara sahip üyeler içerir. Bu katlanma biçimleri

TİM-fiçı, β/α -fiçı, β sandöviç ve α -heliks şeklinde olabilir [87].

Selülozlar genel olarak β -1,4-glikozidik bağları hidroliz eder. "Gerçek selüloz" olarak adlandırılan enzimler yalnızca çözünmeyen selüloz üzerine aktivite gösterirler. GH7 ve GH61 aileleri yalnızca funguslarda, GH44 ailesi yalnızca bakterilerde bulunur. GH7 (sellobiyohidrolaz) en aktif ekzoglukanaz olarak bilinmektedir ve tek selüloz zinciri üzerine aktivite göstermektedir. GH7 ve GH6 ailesi hem endo- hem de ekzo-glukanazları içermektedir. GH9, GH48 ve GH74 aileleri yalnızca bakterilerde gözlemlenen ekzoglukanazları da içermektedir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler selüloolitik enzimlerin tümü **selülozomlar** olarak adlandırılan çoklu-protein kompleksleri şeklinde bulunabilir. Selülozomlar selülozların substrat üzerinde birikmesi ve pozisyon alması ile meydana gelmektedir. Selülozomun fonksiyonel birimlerine **scaffoldin** denir. Koenzimleri içeren, katalitik olmayan proteinlerdir. Koenzimler ise **dockerin** olarak adlandırılan diğer protein domainleriyle özgül bağlantı kurmaktadır. Selülozomal enzimler bir katalitik bir de bağlanma (dockerin) bölgesi içerir. Scaffoldinler karbonhidrat bağlayan modül bulundurur. İlk scaffoldin *Clostridium cellulovorans*'dan sekanslanmıştır. Bugün, birçok scaffoldin gen *Clostridium thermocellum*, *Clostridium josui*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Acidothermus cellulolyticus* ve *Ruminococcus flavefaciens*'ten izole edilmiş, sekanslanmış ve karakterize edilmiştir.

3.2.2 Endo-1,4-ksilanaz (Endo- 1,4-xylanase)

Temel olarak ksilan zincirindeki β -1,4 bağlarının kırılmasında rol oynar. Çoğu ksilanaz ekstraselülerdir ve Sec bağımlı metabolik yol ile üretilir. Fakat periplazmik olan ksilanazlara da rastlanılmıştır. Bu tür ksilanazlar *Cellvibrio mixtus* gibi bakterilerde görülmektedir [88]. Ksilanaz enzimlerinin periplazmik olarak lokasyonu proteazlardan korunmak amaçlı olabilir. Bir başka ksilanaz ise *Paenibacillus barcinonensis*'te stoplazmik olarak tanımlanmıştır [89]. Fizikokimyasal özelliklerine göre düşük moleküler ağırlıklı (≤ 30 kDa), bazik ve yüksek moleküler ağırlıklı, asidik olarak 2 gruba ayrılırlar. Yaygın olarak glikozid hidrolaz ailesinin 10. ve 11. ailesinde bulunurlar [90]. Farklı mikroorganizmalardan izole edilen enzimlerin optimum pH, sıcaklık ve tuzluluk istekleri farklıdır.

3.2.3 β -Ksilosidazlar (β -xylosidases)

Ksilanların etkin şekilde degradasyonunda endo-1,4-ksilanazla birlikte β -ksilosidazlar da rol oynamaktadır [91]. β -ksilosidazlar (β -1,4-ksilosidaz, EC 3.2.1.37) ksilanazlar tarafından üretilen ya da ksilanların

indirgenmemiş uçlarından salınan ksilobiyoz ya da kısa ksilooligosakkaritlerin hidrolizini sağlar [92]. β -glikosidazların afinitesi oligosakkaritlerin polimerizasyon derecesinin artışı azaltır. Bu enzimler direkt olarak ksilanın hidrolizi için kullanılmaz fakat *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosid gibi yapay substratların hidrolizinde kullanılır [93]. Bu gibi substratlar β -ksilosidaz aktivitesinin rutin kolorimetrik analizinde kullanılır. Bu enzimler glikozid hidrolazların 3., 39., 43. ve 52. ailelerinde sınıflandırılır. Birçok β -ksilosidaz transksilosidaz aktivitesi de gösterir, başlangıç substratlarından yüksek moleküler ağırlıklı ürünler oluşturabilirler. Bu özellikten faydalanılarak özgül oligosakkaritlerin üretimi gerçekleştirilir. Bu enzimlerin çoğunun ekstraselüler olduğu düşünülmektedir.

3.2.4. α -L-arabinofuranosidaz (α -L-arabinofuranosidase)

α -L-arabinofuranosidaz (E.C. 3.2.1.55) ekzo enzim olup, ksilan ve diğer arabinoz içeren polisakkaritlerin yan zincirlerinden arabinoz kalıntılarının kesilmesini katalizler [94]. Glikozid hidrolazlar arasında 43., 51., 54. ve 62. aileler içinde sınıflandırılırlar. Kolorimetrik tayini için substrat olarak *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosid kullanılır. Ksinolitik reaksiyon sonucu ortamda bulunan arabinozların aslında ksilanazdan değil α -L-arabinofuranosidazlardan kaynaklandığı nettir.

3.2.5. α -D-glukuronosidaz (α -D-glucuronosidase)

α -D-glukuronosidaz (E.C. 3.2.1.131) glukuronoksilanda bulunan ksiloz kalıntıları ve 4-O-metil glukuronik asit arasındaki bağları koparır [95]. GH67 ailesi içerisinde sınıflandırılır. Bazıları yalnızca kısa ksilooligomerler ya da küçük model moleküller üzerine aktivite gösterirlerken diğerleri polimerik ksilandan glukuronik asitin salınımını sağlayabilir.

3.2.6. Mannanazlar (Mannanases)

β -Mannanazlar glikozid hidrolazların 5. ve 26. ailelerinde sınıflandırılırlar. Yumuşak odunlardan elde edilen hemiselülozların degradasyonunda önemli rol oynarlar. Mannan degrade eden enzimler β -mannanaz (1,4- β -D-mannan mannohidrolaz, E.C. 3.2.1.78), β -mannosidaz (1,4- β -D-mannopiranosid hidrolaz, E.C. 3.2.1.2) ve β -glukosidazdır (1,4- β -D-glukosid glikohidrolaz, E.C. 3.2.1.21). Mannan degradasyonuna yardımcı enzimler ise asetil manan esteraz (E.C. 3.1.1.6) ve α -glukosidaz (1,6- α -D-galaktosid galaktohidrolaz, E.C. 3.2.1.22) dir.

β -mannanaz endo enzimdir ve mannan omurgasındaki β -1,4 bağlarını koparır [96]. Doğada endo-1,4- β -mannanaz, galaktomannan ana zincirini parçalayarak

oligosakkaritleri ve mannobiyozu meydana getirir [97]. Daha sonra ise 1,4- β -mannosidaz (E.C. 3.2.1.25) aktivitesi ile mannoz serbest kalır. β -mannosidaz ise ekso tip enzimdir ve mannosidler arasındaki β -1,4 bağlarını kopararak mannan ya da mannooligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarından mannozun serbest kalışını katalizler. β -glukosidaz ise ekso tip enzimdir ve glukomannan ve galaktoglukomannandan β -mannanaz aktivitesi sonucu salınan oligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarında 1,4- β -D-glukopiranoz hidrolizi yapar. α -Galaktosidaz, galaktomannan ve galaktoglukomannanların α -1,6 bağlı D-galaktopiranosil yan zincirlerinin hidrolizini katalizler. Asetil mannan esterazlar galaktoglukomannanlardan asetil gruplarının serbest kalmasını sağlar [98].

3.2.7. Ferulik asit esterazlar (Feruloil esterazlar) (Feruloil esterases)

Ferulik asit esterazlar (FAE, E.C. 3.1.1.73) karboksilik ester hidrolazların alt grubudur ve ksilan ya da pektinlerin temel zinciri içindeki polisakkaritlerle monomerik ve dimerik ferulik asit arasındaki ester bağlarını koparır. Feruloil esterazlar fenolik şeker esterlerinin enzimatik sentezi için kilit moleküldür. Ferulik asit ester bağları arabinoksilanlar ile lignin arasında kurulan temel köprüdür. Ferulik asit ve arabinoz arasındaki bağları kopardığı için hemiselülozların ligninden ayrıştırılmasını sağlamak suretiyle bitki hücre duvarı degradasyonunda dolaylı rol oynar [99]. FAE'ler hem tek katalitik modüle sahip proteinler olarak hem de çok modüllü protein yapılarının bir parçası olarak bulunurlar.

3.2.8 Lakkazlar (Laccases)

Lakkazlar (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.2) ekstraselüler, çoklu bakır enzimleridir [100]. Çeşitli aromatik ya da aromatik olmayan bileşikler moleküler oksijen kullanılarak radikal katalizleyen reaksiyon mekanizması ile okside edilir. Reaksiyon sırasında moleküler oksijen suya indirgenir [101]. Lakkaz terimi, Japon vernik ağacı *Rhus vernicifera*'dan köken almaktadır. Lakkazlar bitki, böcek ve bakteriler tarafından sentezlenebilse de funguslarda daha yaygın üretilmektedir [102]. Şimdiye kadar yaklaşık 60 fungal türde lakkaz aktivitesi analiz edilmiştir.

Moleküler oksijenin 4 elektronunun suya redüksiyonu ile redükte substratın 1 elektronunun oksidasyonunu katalizler [103]. *O*- ve *p*-difenoller, aminofenoller, metoksifenoller, benzenetioller, polifenoller, poliaminler, hidroksiindoller, bazı aril daiminler ve başka bileşikler lakkazlar tarafından dönüştürülebilir [104]. Fakat tirozini okside edemezler [105]. Bilinen tüm lakkazlar askorbik asit ve fenolik substratların

oksidasyonunu katalizler [106]. Kateşol ve hidrokuinon gibi basit difenoller oksidasyon için uygun substratlardır fakat guaikol ve 2,6 dimetoksifenol çok daha iyi okside edilir. Bununla birlikte; lakkazlar substrat olarak *p*-fenilenediamin, şiringaldezini [SGZ: N, N'-bis(3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzenilidin hidrozin; C_{525} : $65000M^{-1}cm^{-1}$) de okside edebilirler [107, 108]. Lakkazlar 4 bakır atomu içerir ve bu bakır atomları T1, T2 ve T3 olarak adlandırılan 3 redoks bölgesinde bulunur. Bu bölgeler spektroskopik ve paramagnetik özelliklere göre belirlenmiştir. Azid, halid, siyanid, tiyosiyamid, florid, hidroksid, yağ asitleri, bazı metal iyonları, sülfidril ajanları, hidroksiglisin, kojik asit ve katyonik amonyum deterjanları tarafından inhibe edilebilirler.

3.2.9. Yüksek redoks potansiyelli peroksidazlar (High redox potential peroxidases)

Daha çok bazidiyomisetler tarafından salınan yüksek redoks potansiyelli peroksidazlar lignin degradasyonunda merkezi rol oynar [109]. Enzimatik yıkım olarak adlandırılan bu proseste lignini meydana getiren aromatik birimler, hidrojen peroksitin salınımıyla mangan (MnP) peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi peroksidazlar tarafından okside edilir [110]. Lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz 1983-84'te *Phanerochaete chrysosporium*'dan izole edilmiştir ve dimerik lignin model bileşiklerini okside edebildikleri için bu enzimlere genel olarak ligninaz denilmiştir.

4. SONUÇLAR (CONCLUSION)

Biyoetanol üretimi sırasında kullanılabilen ön-muamele ve hidroliz yöntemleri oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bunun temelinde hammadde kaynağı olarak oldukça farklı yapı ve içeriğe sahip biyokütellerin kullanılması yatmaktadır. Bundan dolayı farklı ön-muamele ve hidroliz koşulları, kullanılacak hammadde çeşiti ve fermentasyon prosesi göz önüne alınarak proses basamakları ve gerekleri deneysel yöntemlerle tespit edilmelidir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Foust, T.D., Aden, A., Dutta, A., Phillips, S., An Economic and Environmental Comparison of A Biochemical and A Thermochemical Lignocellulosic Ethanol Conversion Processes, *Cellulose*, 16, 547-565, 2009.
- [2] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M., Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Technol.*, 96, 673-686, 2005.
- [3] Alvira, P., Pejó E.T., Ballesteros, M., Negro, M.J., Pretreatment Technologies for An Efficient

- Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review, *Bioresource Technol.*, 101, 4851-4861, 2010.
- [4] Üçgül. İ., Akgül. G., *Biomass Technology, Journal of Yekarum*, 1(1), 3-11, 2010.
- [5] <http://www.ucl.ac.uk/chemeng/people/academic-researchers/ramirez>
- [6] Galbe, M. Zacchi, G., Pretreatment: The Key to Efficient Utilization of Lignocellulosic Materials, *Biomass Bioenerg.*, 46, 70-78, 2012.
- [7] Conde-Mejia, C., Jiménez-Gutiérrez, A., El-Halwagi, M., A Comparison of Pretreatment Methods for Bioethanol Production from Lignocellulosic Materials, *Process. Saf. Environ.*, 90, 189-202, 2012.
- [8] Menon, V. and Rao, M., Trends in Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, Platform Chemicals & Biorefinery Concept, *Prog. Energ. Combust.*, 38, 522-550, 2012.
- [9] Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T., Danquah, M.K., Microalgal Biomass AS A Cellulosic Fermentation Feedstock for Bioethanol Production, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2010.
- [10] Sultan. D., Kelleher. B., Ross. J.R.H., Review of Literature on Catalysts for Biomass Gasification, *Fuel. Process. Technol.*, 73, 155-173, 2001.
- [11] Kilzer, F.J., Broido, A., Speculations on The Nature of Cellulose Pyrolysis, *Pyrodynamics*, 2, 151-163, 1965.
- [12] Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer, 110(11), 211-230, 1987.
- [13] Shafizadeh, F., Lai, Y.Z., Thermal Degradation of 2-Deoxy-Darabino-Hexonic Acid and 3-Deoxy-D-Ribo-Hexono-1,4-Lactone, *Carbohydr. Res.*, 42, 39-53, 1975.
- [14] Mvula. E., Naumov. S., Sonntag. C.V., Ozonolysis of Lignin Models in Aqueous Solution: Anisole, 1,2-Dimethoxybenzene and 1,3,5-Trimethoxybenzene”, *Environ. Sci. Technol.* 43, 6275-6282, 2009.
- [15] Garcia-Cubero M. T., Gonzalez-Benito G., Indacochea I., Coca M., Bolado S., Effect of Ozonolysis Pretreatment on Enzymatic Digestibility of Wheat and Rye Straw, *Bioresource Technol.*, 100, 1608-1613 2009.
- [16] Kaneko H., Hosoya S., Iyama K., Nakano J., Degredation of Lignin with Ozone, *J. Wood. Chem. Technol.*, 3(4), 1983.
- [17] Wu L., Arakane M., Ike M., Wada M. Takai T., Gau M., Tokuyasu K., Low Temperature Alkali Pretreatment for Improving Enzymatic Digestibility of Sweet Sorghum Bagasse for Ethanol Production”, *Bioresource Technol.*, 102, 4793-4799, 2011.
- [18] Eggeman, T., Elander. R.T., Process and Economic Analysis of Pretreatment, *Technologies Bioresource Technol.*, 96, 2019-2025, 2005.
- [19] Kang, K. O., Han, M., Moon, S. K., Kanh, H. W., Kim, Y., Cha, Y. L. and Choi, G. W., Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*, *Fuel*, 109, 520-526, 2013.
- [20] Binod, P., Satyanagalakshmi, K., Sindhu, R., Janu, K. U., Sukumaran, R. K. and Pandey, A., Hort Duration Microwave Assisted Pretreatment Enhances The Enzymatic Saccharification and Fermentable Sugar Yield from Sugarcane Bagasse, *Renew. Energ.*, 37, 109-116, 2012.
- [21] Cao, W., Sun, C., Liu, R., Yin, R. and Wu, X., Comparison of The Effects of Five Pretreatment Methods on Enhancing The Enzymatic Digestibility and Ethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse, *Bioresource Technol.*, 111, 215-221, 2012.
- [22] Karimi, K., Taherzadeh, M.S., Alkali Pretreatment of Softwood Spruce and Hardwood Birch by NaOH/Thiourea, NaOH/Urea, NaOH/Urea/Thiourea, and NaOH/PEG to Improve Ethanol and Biogas Production, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 87, 1209-1214, 2012.
- [23] Rabelo S.C., Filho R.M., Costa A.C., Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 153, 139-150, 2009.
- [24] Mielenz J.R., “Biofuels: Methods And Protocols”, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, ISBN: 978-1-60761-214-8.
- [25] Thompson, D.N., Campbell, V., Bals, B., Runge, T., Teymouri, F. and Ovard, L.P., Chemical Preconversion: Application Of Low-Severity Pretreatment Chemistries For Commoditization Of Lignocellulosic Feedstock, *Biofuels*, 4(3), 323-340, 2013.
- [26] Zhang, C., Pang, f., Li, b., Xue, s. and Kang, y., Recycled Aqueous Ammonia Expansion (RAAE) Pretreatment to Improve Enzymatic Digestibility of Corn Stalks, *Bioresource Technol.*, 138, 314-320, 2013.
- [27] Kang, K. E., Jeong, G.T., Sunwoo, C. and Park, D. H., Pretreatment of Rapeseed Straw by Soaking In Aqueous Ammonia, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 35, 77-84, 2012.
- [28] Talebnia, F., Karakashev, D. and Angelidaki, I., Production of Bioethanol from Wheat Straw: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation, *Bioresource Technol.*, 101, 4744-4753, 2010.
- [29] Liu, Z. S., Wu, X. L., Kida, K. and Tang, Y. Q., Corn stover saccharification with Concentrated

- Sulfuric Acid: Effects of Saccharification Conditions on Sugar Recovery and By-Product Generation, *Bioresource Technol.*, 119,224-233,2012.
- [30] Wyman, C. E. Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities, *Bioresource Technol.*, 50, 3-16, 1994.
- [31] Jönsson, L.J., Alriksson, B. and Nilvebrant, N. O., Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification, *Biotechnol. Biofuels.*, 6:16, 2-10, 2013.
- [32] Ferreira, S., Gil, N, Queiroz, J. A., Duarte, A. P. and Domingues, F. C. Bioethanol from the Portuguese Forest Residue *Pterospartum tridentatum* –An Evaluation of Pretreatment Strategy for Enzymatic Saccharification and Sugars Fermentation, *Bioresource Technol.*, 101, 7797-7803, 2010.
- [33] <http://walkerlab.bee.cornell.edu/Pretreatment.html>
- [34] Njoku, S.I., Ahring, B.K. and Uellendahl, H., Pretreatment As The Crucial Step For A Cellulosic Ethanol Biorefinery: Testing The Efficiency Of Wet Explosion On Different Types Of Biomass, *Bioresource Technol.*, 124, 105–110, 2012.
- [35] Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Janu, K.U., Sukumaran, R.K. and Pandey, A., Dilute Acid Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Sugarcane Tops For Bioethanol Production, *Bioresource Technol.*, 102, 10915-10921, 2011.
- [36] Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y.S., Zhang, R., Jenkins, B.M. and VanderGheynst, J.S., Dilute Acid Pretreatment And Fermentation Of Sugar Beet Pulp To Ethanol, *Appl. Energ.*, 105, 1–7, 2013.
- [37] Ruiz, E., Romero, I., Moya, M., Cara, C., Vidal, J.D. and Castro, E., Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Sunflower Stalks for Sugar Production, *Bioresource Technol.*, 140, 292-298, 2013.
- [38] He, M. X., Li, Q., Liu, X., Hu, Q., Hu, G., Pan, K., Zhu, Q., and Wu, J., Bio-ethanol Production from Bamboo Residues with Lignocellulose Fractionation Technology (LFT) and Separate Hydrolysis Fermentation (SHF) by *Zymomonas Mobilis*, *Am. J. Biomass Bioenergy*, 1, 1-10,2013.
- [39] Hsu, W-H., Lee, Y-Y., Peng, W-H. and Wu, K.C-W. Cellulosic Conversion in Ionic Liquids (ILs): Effects Of H₂O/Cellulose Molar Ratios, Temperatures, Times, and Different ILs on The Production of Monosaccharides and 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), *Catal. Today*, 174, 65-69, 2011.
- [40] Kurtuluş M., Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [41] Mtui, G. Y. S., Recent Advances in Pretreatment of Lignocellulosic Wastes and Production of Value Added Products, *Afr. J. Biotechnol.*, 8(8), 1398-1415, 2009.
- [42] Kristensen, J. B., Thygesen, L. G., Felby, C., Jørgensen, H., and Elder, T., Cell-Wall Structural Changes in Wheat Straw Pretreated for Bioethanol Production, *Biotechnol. Biofuels.*, 1(5), 1-9, 2008.
- [43] Chandra, R., Takeuchi, H. and Hasegawa, T., Hydrothermal Pretreatment of Rice Straw Biomass: A Potential and Promising Method for Enhanced Methane Production, *Appl. Energ.*, 94, 129-140, 2012.
- [44] Nitsos, C.K., Matis, K.A. and Triantafyllidis, K.S., Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass in the Bioethanol Production Process, *Chem.Sus.Chem.*, 6, 110-122, 2013.
- [45] Zhang, Y., Lu, C., Tang, J., Yu, X., Lu, J., Meng, Q., Liu, D., Zheng, X. and Lin, F., Enhanced Saccharification of Steam Explosion Pretreated Corn Stover by The Supplementation of Thermoacidophilic B-Glucosidase from a Newly Isolated Strain, *Tolypocladium cylindrosporum* syzx4, *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5(17), 2413-2421, 2011.
- [46] Morjanoff, P.J. and Gray, P.P., Optimization of Steam Explosion as Method for Increasing Susceptibility of Sugarcane Bagasse to Enzymatic Saccharification, *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 733–741, 1987.
- [47] Chiaramonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonella, P., Torre, P. and Cherchi, F., Review of Pretreatment Processes for Lignocellulosic Ethanol Production, and Development of An Innovative Method, *Biomass Bioenerg.*, 46, 25-35, 2012.
- [48] Scott, F.; Quintero, J.; Morales, M.; Conejeros, R.; Cardona, C., And Aroca, G. (2013). Process Design and Sustainability in the Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials. *Electron. J. Biotechn.*, vol. 16, no. 3. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-7>
- [49] Holtzaple, M.T., Humphrey, A.E. and Taylor, J.D., Energy Requirements for The Size Reduction of Poplar and Aspen Wood, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 207-210, 1989.
- [50] Clark, T.A. and Mackie, K.L., Steam Explosion of The Soft-Wood *Pinus Radiata* with Sulphur

- Dioxide Addition, *J. Wood Chem. Technol.*, 7, 373-403, 1987.
- [51] Mackie, K.L., Brownell, H.H., West, K.L. and Saddler, J.N., Effect of Sulphur Dioxide and Sulphuric Acid on Steam Explosion of Aspenwood, *J. Wood Chem. Technol.*, 5, 405-425, 1985.
- [52] Dale, B.E. and Moreira, M.J., A Freeze-Explosion Technique for Increasing Cellulose Hydrolysis”, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12, 31-43, 1982.
- [53] Sun Y. and Cheng J., Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review, *Bioresource Technol.*, 8,; 1-11, 2002.
- [54] Eisenhuber, K., Jäger, A., Wimberger, J. and Kahr, H., Comparison of Different Pretreatment Methods for Straw for Lignocellulosic Bioethanol Production, *Agron. Res.*, 11(1), 173-182, 2013.
- [55] Bari, I.D., Liuzzi, F., Villone, A. and Braccio, G., Hydrolysis of Concentrated Suspensions of Steam Pretreated *Arundo donax*, *Appl. Energ.*, 102, 179-189, 2013.
- [56] Amores, I., Ballesteros, I., Manzanares, P., Sáez, F., Michelena, G. and Ballesteros, M., Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion, *Electronic Journal of Energy & Environment*, 1(1), 2013.
- [57] Vlasenko, E. Yu., Ding, H., Labovitch, J.M. and Shoemaker, S.P., Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Rice Straw, *Bioresource Technol.*, 59, 109-119, 1997.
- [58] Dale, B.E., Henk, L.L. and Shiang, M., Fermentation of Lignocellulosic Materials Treated by Ammonia Freze-Explosion, *Dev. Ind. Microbiol.*, 26, 223-233, 1984.
- [59] Hu, F., Ragauskas, A., Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry, *Bioenerg. Res.*, 5, 1043-1066, 2012.
- [60] Bals, B. D., Teymouri, F., Campbell, T., Jin, M. and Dale, B. E., Low Temperature and Long Residence Time AFEX Pretreatment of Corn Stover, *Bioenerg. Res.*, 5, 372-379, 2012.
- [61] Saritha, M., Arora, A. and Lata., Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility, *Indian. J. Microbiol.*, 52(2), 122-130, 2012.
- [62] Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. and Aikat, K., Bioethanol Production From Agricultural Wastes: An Overview, *Renew. Energ.*, 37, 19-27, 2012.
- [63] Zheng Y.Z., Lin H.M. and Tsao G.T., Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion, *Biotechnol. Prog.*, 14, 890-896, 1998.
- [64] Temp, U., Eggert, C. and Eriksson, K. L., A Small-Scale Method for Screening of Lignin-Degrading Microorganisms, *Appl. Environ. Microb.*, 60(4), 1548-1549, 1998.
- [65] Henriksson, G., Johansson, G. and Pettersson, G., A Critical Review of Cellobiose Dehydrogenases”, *J. Biotechnol.*, 78, 93-113, 2000.
- [66] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple M. and Ladisch M., Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Technol.*, 96, 673-686, 2005.
- [67] Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold M.H., Manganese Peroxidase from The *Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*: Spectral Characterization of The Oxidized States and The Catalytic Cycle, *Biochemistry*, 27, 5365-5370, 1988.
- [68] Sayadı S. and Ellouz R., Roles of Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in The Decolorization of Olive Mill Wastewaters, *Appl. Environ. Microb.*, 61(3), 1098-1103, 1995.
- [69] Blanchette, R.A., Delignification by Wood-Decay Fungi, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29, 381-398, 1991.
- [70] Wan, C., Li, Y., Fungal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, *Biotechnol. Adv.*, 30, 1447-1457, 2012.
- [71] Saritha, M., Arora, A., Singh, S. and Nain, L., *Streptomyces griseorubens* Mediated Delignification of Paddy Straw For Improved Enzymatic Saccharification Yields, *Bioresource Technol.*, 135, 12-17, 2012.
- [72] Kalia V.C. and Purohit H.J., Microbial Diversity and Genomics in Aid of Bioenergy, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 403-419, 2008.
- [73] Karimia, K., Kheradmandiniaa, S. and Taherzadeh, M.J., Conversion of Rice Straw to Sugars by Dilute-Acid Hydrolysis, *Biomass Bioenerg.*, 30, 247-253, 2006.
- [74] Taherzadeh, M.J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Liden, G., Characterization and Fermentation of Dilute Acid Hydrolyzates from Wood, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36(11), 4659-4665, 1997.
- [75] Balat, M., Balat, H. and Öz, C., Progress in Bioethanol Processing, *Prog. Energ. Combust.*, 34: 551-573, 2008.
- [76] Naseeruddin, S., Yadav, K. S., Sateesh, L., Manikyam, A., Desai, S. and Rao, L. V., Selection of The Best Chemical Pretreatment For Lignocellulosic Substrate *Prosopis juliflora*, *Bioresource Technol.*, 136, 542-549, 2013.
- [77] Kosaric, N., Wieczorirek, A., Cosentono, G.P., and Magee, R.J., Ethanol Fermentation in

- Biotechnology: A Comprehensive Treatise, Verlag. Chemie., 257-386, 1983.
- [78] Björling, T., and Lindman, B., Evaluation of Xlose-Fermenting Yeastfor Etanol Production from Spent Sulfite Liquor”, *Enzyme Microb. Technol.*, 11(4), 240-246, 1989.
- [79] Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P. and Singh, A., Bioethanol Production from *Lantana camara* (Red Sage): Pretreatment, Saccharification and Fermentation, *Bioresource Technol.*, 101, 8348-8354, 2010.
- [80] Ziegler, M. T., Thomas, S. R. and Danna, K. J. Accumulation Of A Thermostable Endo-1,4 -D-Glucanase in The Apoplast Of *Arabidopsis thaliana* Leaves, *Mol. Breeding*, 6, 37-46, 2000.
- [81] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas’ -Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M. and Rogalski, J., Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi”, *Fungal Genet. Biol.*, 27, 175-185, 1999.
- [82] Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C. and Qin, W., Cellulase Activities in Biomass Conversion: Measurement Methods and Comparison, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1-8, 2010.
- [83] Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. F., Bacterial Cellulase and Xylanases, *J. Gen. Microbiol.*, 139, 187-194, 1993.
- [84] Mathew, G. M., Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R. and Pandey, A., Progress in Research on Fungal Cellulases for Lignocellulose Degradation, *J. Sci. Ind. Res. India.*, 67, 897-907, 2008.
- [85] Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A., Microbial Cellulases and Their Industrial Applications, *Enzyme Research*, 1-10, 2011.
- [86] Yamada, R., Nakatani, Y., Ogino, C. and Kondo, A., Efficient Direct Ethanol Production from Cellulose by Cellulase- and Cellodextrin Transporter-Co-Expressing *Saccharomyces cerevisiae*, *AMB Express*, 3(34), 2-7, 2013.
- [87] Xu, Q., Adney, W. S., Ding, S.-Y. and Himmel, M. E. Cellulases for Biomass Conversion, *Industrial Enzymes*, (Editör: Polaina. J., MacCabe, A. P.), Springer, Dordrecht, 35-50, 2007.
- [88] Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Clarke, J.H., Prates, J.A.M., McKie, V.A., Nagy, T., Fernandes, T.H. and Ferreira, M.A., A Novel *Cellvibrio mixtus* Family 10 Xylanase That Is Both Intracellular and Expressed Under Non-Inducing Conditions”, *Microbiology*, 146, 1959-1967, 2000.
- [89] Gallardo, O., Pastor, F. I. J., Polaina, J., Diaz, P., Tysek, R., Vogel, P., Isorna, P., Gonzales, B. and Sanz-Aparicio, J., Structural Insights into the Specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and Its Improved Stability by Forced Protein Evolution, *J. Biol. Chem.*, 285(4), 2721-2733, 2010.
- [90] Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M. and Kluepfel, D. “Endo-P - 1,4-xylanase families: differences in catalytic properties”, *J. Biotechnol.* 57: 151-166, 1997.
- [91] Wainø, M. and Ingvorsen, K., Production of β -Xylanase and β -Xylosidase by The Extremely Halophilic Archaeon *Halorhabdus utahensis*, *Extremophiles*, 7, 87-93, 2003.
- [92] Martínez, G. A., Chaves, A. R. and Civallo, P. M., β -Xylosidase Activity and Expression of a β -Xylosidase Gene During Strawberry Fruit Ripening, *Plant. Physiol. Bioch.*, 42, 89-96, 2004.
- [93] Tuncer, M., Characterization of β -Xylosidase and α -L-Arabinofuranosidase Activities from *Thermomonospora Fusca* BD25, *Turk. J. Biol.*, 2, 753-767, 2000.
- [94] Gilead, S. and Shoham, Y., Purification and Characterization of α -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(1), 170-174, 1995.
- [95] Bronnenmeier, K., Meissner, H., Stocker, S. and Staudenbauer, W. L., α -D-Glucuronidases from The Xylanolytic Thermophiles *Clostridium stercorarium* and *Thermoanaerobacterium saccharoticum*, *Microbiology*, 141, 2033-2040, 1995.
- [96] Shallom, D. and Shoham, Y., Microbial Hemicellulases, *Curr. Opin. Microbiol.*, 6, 219-228, 2003.
- [97] Zakaria, M. M., Ashiuchi, M. and Yamamoto, S., Optimization for β Mannanase Production of A Psychrophilic Bacterium, *Flavobacterium sp.*, *Biosci. Biotechnol, Biochem.*, 62(4), 655-660, 1998.
- [98] Howard, R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S., Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production, *Afr. J. Biotechnol.*, 2(12), 602-619, 2003.
- [99] Tabka, M. G., Herpoel-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M. And Sigoillot, J. C., Enzymatic Saccharification Of Wheat Straw for Bioethanol Production by a Combined Cellulase Xylanase and Feruloyl Esterase Treatment, *Enzyme Microbial. Technol.*, 39, 897-902, 2006.
- [100] Fang, Z., Li, T., Wang, Q., Zhang, X., Peng, H., Fang, W., Hong, Y., Ge, H. and Xiao, Y., A Bacterial Laccase from Marine Microbial Metagenome Exhibiting Chloride Tolerance and Dye Decolorization Ability, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8,; 1103-1110, 2011.
- [101] Ruijssenaars, H. J. and Hartmans, S., A Cloned *Bacillus halodurans* Multicopper Oxidase

- Exhibiting Alkaline Laccase Activity, Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 177-182, 2004.
- [102] Lakshmipathy, D. T. and Kannabiran, K., A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic *Streptomyces sp.* Isolated from Saltpan Environment, Am. J. Infect. Dis., 5(3), 200-206, 2009.
- [103] Reiss, R., Ihssen, J. and Thöny-Meyer, L., *Bacillus pumilus* Laccase: A Heat Stable Enzyme with A Wide Substrate Spectrum”, B.M.C. Biotechnology, 11(9), 1-11, 2011.
- [104] Liu, Z., Zhang, D., Hua, Z., Li, J., Du, G. and Chen, J., A Newly Isolated *Paecilomyces sp.* WSH-L07 for Laccase Production: Isolation, Identification, and Production Enhancement by Complex Inducement, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36, 1315-1321, 2009.
- [105] Durán, N., Rosa, M. A., D’Annibale, A. and Gianfreda, L., Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review, Enzyme Microb. Tech., 31, 907-931, 2002.
- [106] Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P., Biodegradation of Phenols by Laccase Immobilised in a Membrane Reactor, Process Biochem., 36, 51-58, 2000.
- [107] Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo H., Miyamoto, K. and Inamorí, Y., A Thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN7: Purification, Characterization, Nucleotid Sequence, Expression, Biosci. Biotechnol. Bioschem., 67(10), 2167-2175, 2003.
- [108] Suresh, P. S., Kumar, A., Kumar, R. and Singh, V. P., An Insilco Approach to Bioremediation: Laccase as a Case Study, J. Mol. Graph. Model., 26, 845-849, 2008.
- [109] Ramachandra, M., Crawford, D. L. and Hertel, G., Characterization of an Extracellular Lignin Peroxidase of the Lignocellulolytic Actinomycete *Streptomyces viridosporus*, Appl. Environ. Microb., 54(12), 3057-3063, 1988.
- [110] Narayana, K. J. P., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, V., Venkateswarlu, Y. and Krishna, P. S. J., Biological Activity of Phenylpropionic Acid Isolated from a Terrestrial *Streptomyces*, Pol. J. Microb., 56(3), 191-197, 2007.

