



Selülozik Biyoetanol Üretim Teknolojisi

Yalçın ÇÖPÜR¹, Ayhan TOZLUOĞLU¹, Ömer ÖZYÜREK¹

Özet

Nüfusun hızla artmasına paralel olarak enerji tüketiminin de hızla artması, enerji kaynaklarının fosil kökenli ve yakın gelecekte tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olması, öte yandan enerji fiyatlarının hızla yükselmesi ve çevresel problemlerle karşılaşması insanları yenilenebilir temiz enerji kaynaklarına yöneltmiştir. Fosil kökenli yakıt kaynaklarının yerine günümüzde sağladığı avantajlarıyla özellikle enerji sektöründe kullanım alanı bulan biyoetanol üretiminin odun biyokütlesi yerine farklı biyokütle kaynaklarından sağlanabiliyor olması özellikle bu sektör ve ülke ekonomisi için çok önem arz etmektedir. Yıllık bitki ve tarımsal atıkların bu sektörde değerlendirilmesiyle hem ormanlara olan talebin azalacağı hem de var olan potansiyelleri ile orman endüstrisinde ve enerji üretimi amaçlı kullanım alanlarında önemli bir boşluğu dolduracakları kesindir.

Anahtar Kelimeler: Ön muamele, hidroliz, fermentasyon, biyoyakıt.

Cellulosic Bioethanol Production Technology

Abstract

Increase in consumption of energy paralel to increased population, environmental issues and danger of depletion of present energy sources forces countries to renewable resources to produce clean energy. Instead of fossil based energy sources, renewable bioresources especially agricultural wastes to produce bioethanol is very important for the energy sector and country's economy. Using annual plants and agricultural wastes in energy sector expected to diminish the pressure on natural forests and fill the raw material gap in production.

Key Words: Pretreatment, hydrolysis, fermentation, biofuel.

1. Giriş

Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak aşırı kullanma sonucu fosil kökenli kömür, doğalgaz, petrol vb. diğer bir deyimle yenilenemeyen enerji kaynağı rezervleri önümüzdeki yıllarda tükenmekle karşı karşıya kalacaktır. Diğer yandan enerji kullanan endüstrilerin sürekli gelişmesi enerji gereksinimini artırmaktadır. Halihazırda üretilen enerji ile tüketimi arasındaki farkı kapatmak için yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi artmıştır.

Uluslararası Enerji Ajansı tarafından yapılan çalışmaya göre, 2000- 2030 yılları arasında fosil enerji kaynaklarının payının % 85, petrol ve doğalgazın payının %60 seviyelerinde, yenilenebilir enerji payının ise % 15'e yükseleceği varsayılmaktadır. Yenilenebilir enerjinin payı, kaynakları zengin ve hızla programlarını uygulamaya alan ülkelerde daha yüksek oranlara ulaşabilir. 2004 yılında ülkemizde genel enerji tüketimi 87.8 MTEP (Milyon Ton Esdeger Petrol), yerli birincil enerji kaynakları üretimi 25.2 MTEP şeklinde gerçekleşmiş ve enerji talebinin %72'si ithalat ile sağlanmıştır. Genel enerji tüketimi payları; %38 petrol, %27 kömür, %23 doğalgaz ve %12 yenilenebilir enerji kaynaklarıdır. Yenilenebilir enerji kaynakları kullanımının %57.2'sini biyokütle, % 30.2'sini hidrolik ve %12'sini diğer yenilenebilir (rüzgar, güneş, jeotermal) kaynaklar oluşturmaktadır. Enerji talep artışının, herhangi bir tedbir alınmadığı takdirde, 2020 yılında ancak %22'sinin yerli üretimle karşılanabileceği beklenmekte ve arz-talep projeksiyonları, artan enerji talebimizin mevcut-bilinen yerli kaynaklarımız ile karşılanamayacağını ortaya koymaktadır (Karaosmanoğlu, 2006).

¹ Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman End. Müh. Bölümü Konuralp Yerleşkesi, 81620 DÜZCE

Motor biyoyakıtları otomotiv endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. Motor biyoyakıtları Birinci Nesil Biyoyakıtlar ve İkinci Nesil Biyoyakıtlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

İçten yanmalı motorlarda mevcut tasarımlarında değişiklik gerekmeksizin AB uygulamalarında 2005–2010 döneminde uygulamada olacak Birinci Nesil Biyoyakıtlar biyodizel, biyoetanol olarak belirlenmiştir. Biyoyakıt endüstriyel üretiminin gelişiminin ardından, 2010 sonrasında, esnek yakıtlı tasıtlarda kullanılacak, İkinci Nesil Biyoyakıtlar uygulamada olacaktır. İkinci nesil biyoyakıtlar: bitkisel yağlar ile biyokütleden termokimyasal ve biyokimyasal dönüşüm teknolojileri ile elde edilen; biyometanol, biyoetanol, biyobütanol, biyodimetiler, biyometan, biyohidrojen ve biyokütleden sıvı yakıt teknolojisi ürünleri (BTL Ürünleri: Fischer-Tropsch Motorini ve Fischer-Tropsch Benzini) olup, bu ürünlerin giderek artan oranlarda, zorunlu kullanımları ile akaryakıt sektöründe yer bulması beklenmektedir. AB Yeşil Kitap Yönergesi kapsamında 2020 yılında kara taşımacılığında %20 oranında alternatif motor yakıtlarının kullanımı hedefi strateji olarak verilmektedir. 2003/30/EC nolu ve 8 Mayıs 2003 tarihli “Tasıtlarda Kullanılacak Biyoyakıtlar ve Diğer Yenilenebilir Yakıtlar” adlı AB yönergesinde ise, alternatif motor yakıtlarının 31 Aralık 2005’ten itibaren en az %2 oranında, 31 Aralık 2010 tarihinden sonra ise, en az %5.75 oranında pazarda bulunması gerekliliği belirtilmektedir. Ülkeler ulusal planlamalarındaki hedeflerini de dikkate alarak uygulamalarını birinci nesil biyoyakıtlar için sürdürmektedirler (Karaosmanoğlu, 2006).

Biyoetanol sakkaroz içeren (şeker pancarı, şeker kamışı, sorgum vb.), nişastalı materyaller (buğday, mısır, arpa vb.) veya lignoselülozik biyokütlelerden (odun, saman, ot vb) elde edilen bir üründür. Benzin ile kullanıldığında oktan sayısını artırır, CO ve hidrokarbonlar gibi zararlı gazların emisyonlarını azaltarak tam yanma sağlar. Biyoetanol buhar ile etilenin kimyasal reaksiyonu sonucu üretilmesine rağmen genellikle şekerin fermentasyonu ile üretilir (Güler ve Akgül, 2001; Anonim, 2008a). Etanol veya etil alkol temiz renksiz bir sıvı olup, biyolojik olarak bozunur ve çevre açısından bir tehdit oluşturmaz. Etanol yüksek oktanlı bir yakıt olup, petrolde oktan artırıcı olarak kullanılır. Etanol ile benzin karıştırılarak emisyonu azaltmak ve tam bir yanma sağlamak mümkündür. Yaygın olarak karıştırılan kullanma oranları %10 etanol ve %90 petrol şeklindedir (Ballesteros ve ark., 1991).

Kullanılan enerji kaynaklarının yenilenebilir olması yanında çevre dostu olmaları da oldukça önemlidir. Bitkisel kökenli hammaddelerden elde edilen ürünler, petrol kökenli ürünlere göre kullanım sonrası atılan ürünlerinin kısa sürede biyobozunur olabilmesiyle çevreye zarar vermemektedir. Ancak petrol ürünleri yüzlerce yıl bozunmadan kalarak çevreyi tehdit etmektedir. Fosil yakıtlarının enerji amaçlı kullanılması sonucu, atmosferdeki CO₂ emisyon miktarı 150 yıl içinde büyük oranda artarak 280 ppm’den 365 ppm’e çıkmıştır. Atmosferdeki CO₂ emisyonunun global olarak sınırlandırılması Kyoto protokolü ile kabul edilmiş ve Avrupa Birliği ülkeleri enerji tüketimini daha çok yenilenebilir doğal kaynaklardan üretmeyi hedeflemişlerdir (Galbe ve Zacchi, 2002). Türkiye bu yönergeye uyacağını, Avrupa Birliği Müktesebatının Üstlenilmesine ilişkin Türkiye Ulusal Programı’nda beyan etmiştir. Ulusal Program’ın uygulanması için yasal çalışmalar yürütülmüş ve halen sürdürülmektedir. “Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının (YEK) Elektrik Enerjisi Üretimi Amaçlı Kullanımına İlişkin Kanun”, yaygın ismi ile Yenilenebilir Enerji Kanunu, 10 Mayıs 2005 tarihinde TBMM’de kabul edilmiştir. Kanun, yenilenebilir enerji kaynak alanlarının korunması, bu kaynaklardan elde edilen elektrik enerjisinin belgelendirilmesi ve bu kaynakların kullanımına ilişkin usul ve esasları kapsamaktadır (Karaosmanoğlu, 2006).

Daha temiz ve yaşanılabilir bir dünya için çevre ile dost, yüksek miktarda elde edilebilen bölgelerde biyokütlenin enerji üretmek için kullanılması, teknolojilerdeki ilerlemeler ve çevresel ihtiyaçlar ile beraber önem kazanmıştır. Bu noktada, yenilenebilir

doğal kaynaklardan kimyasal ve biyolojik yolla elde edilen yakıt değeri yüksek etanolün kullanılması birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (Zerbe, 1982). Ayrıca etanolün yanması sonucu, petrol ürünlerine göre daha düşük oranlarda CO, CO₂ ile yanıcı olmayan hidrokarbonlar, azot oksitler ve uçucu organik bileşiklerin oluşması bu konunun önemini daha da çok artırmaktadır (Galbe ve Zacchi, 2002).

Bu çalışmada selülozik biyoetanol üretim teknolojisi tüm hatlarıyla ele alınacak ve ülkemizdeki biyoetanol üretim potansiyeli değerlendirilecektir.

2. Biyoetanol

Etanol temiz, renksiz ve zehirli olmayan bir sıvıdır. Etanol'ün ısı değeri benzinden daha düşüktür. Etanol su ile her oranda karışabilme özelliğine sahiptir. Etanol yüksek oktan sayısına sahip olmasına karşın, çok düşük setan sayısına sahip olması ve kendi kendine tutuşma direnci nedeni ile dizel motorlarında kullanımında birtakım sorunlar yaratabilmektedir. Kendi kendine tutuşma direnci, benzinli motorlarda sıkıştırma oranının artırılmasına olanak sağladığından, etanolün benzinli motorlarda kullanımı daha avantajlıdır. Düşük setan sayısına sahip olan yakıtların dizel motorlarındaki yanma kalitesini düzeltmek için araştırmalar devam etmektedir. Etanolün motorlarda kullanımı düşüncesi daha çok geniş tarım alanlarına sahip ülkelerde yaygındır.

Etanol, hava kirliliğini azaltmak ya da petrol ürünlerinin tüketimini azaltmak amacıyla, benzinle değişik oranlarda karıştırılarak kullanılabilir. En yaygın uygulamalar E10 ya da E85 diye bilinen sırasıyla % 10 ve % 85 etanol içeren karışımlardır. Biyoetanol sürdürülebilir bir enerji kaynağı olarak sağladığı çevresel ve ekonomik yararlar nedeniyle fosil yakıtlara göre avantajlar sağlamaktadır. Bünyesinde yüksek oranda seker veya nişasta-selüloz gibi sekere dönüştürülebilir madde bulunduran hammaddeler etanol üretiminde kullanılabilirler. Dünya etanol piyasası nişasta ve şeker dayalı olarak gelişim göstermektedir (Acaroğlu, 2003).

3. Biyoetanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

Biyofuel (biyoetanol, biyoyakıt) bitkisel yağlarından, şeker pancarından, tahıllardan, organik atıklardan ve işlenmiş biyokütlelerden elde edilebilir. Kullanılan biyolojik hammaddenin kayda değer miktarda etanole dönüşebilen nişasta veya selüloz gibi içeriğe sahip olması bu noktada önem arz etmektedir. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddeler üç sınıfa ayrılmaktadır : (1) Sakkaroz içeren hammaddeler (şeker pancarı, şeker kamışı, sorgum vb.), (2) Nişastalı materyaller (buğday, mısır, arpa vb.), (3) Lignoselülozik biyokütle (odun, saman, ot vb.). Biyoetanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 1'de verilmiştir.

Biyoetanol üretiminde en önemli problem üretimde kullanılacak hammaddenin varlığıdır. Kullanılacak hammaddenin mevsimsel değişimi ve coğrafik konumu biyoetanol üretiminde önemli etkenler olmaktadır. Öte yandan hammadde maliyetlerindeki değişim biyoetanol üretim maliyetlerini büyük ölçüde etkilemektedir. Kullanılan hammadde bağlamında hammaddenin içeriği genel olarak etanol üretiminde verimliliği etkileyen ana faktörlerden biridir. Aşağıda biyoetanol üretimi için kullanılan hammadde kaynakları detaylı olarak anlatılmaktadır.

Çizelge 1. Biyoetanol üretiminde kullanılan farklı hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri (Linoj ve ark., 2006)

Hammadde	Biyoetanol üretim potansiyeli (litre/ton)
Şeker kamışı	70
Şeker pancarı	110
Tatlı patates	125
Patates	110
Kassava	180
Mısır	360
Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340
Sorgum	60
Bagasse	280

3.1. Sakkaroz İçeren Hammaddeler

Sakkaroz veya diğer adlarıyla sükroz veya çay şekeri, $C_{12}H_{22}O_{11}$ formülüyle gösterilen ve bir glikoz ve bir fruktoz molekülünün bir araya gelmesiyle meydana gelen disakkarittir (Anonim, 2011). Sakkaroz içeren hammaddeler, nişastalı hammaddelere veya lignoselülozik biyokütlelere nazaran sadece disakkarit yapısında olduğu için biyoetanol dönüşümünün daha kolay olması nedeniyle üretimde tercih sebebidir. Çünkü bu hammaddeler ön hidroliz gerektirmez ve disakkaritler sadece maya hücreleri tarafından degradasyona uğratılabilir (Cardona ve Sanchez, 2007).

Biyoetanol üretiminde kullanılan sakkaroz içeren hammaddeler esasen şeker kamışı ve şeker pancarından oluşmaktadır (Zarzycki ve Polska, 2007). Avrupa ülkelerinde ise pancar molazları sakkaroz içeren hammaddeler olarak daha fazla biyoetanol üretimi için kullanılmaktadır (Cardona ve Sanchez, 2007). Bizim ülkemizde ise Şeker Fabrikalarında şeker pancarından şeker üretimi sonrası kalan atıklardan (melas) fermentasyon işlemi ile etil alkol üretilmektedir.

Diğer taraftan sorgum ise kuraklığa dayanıklı önemli tarımsal ürünlerden biridir. Özellikle gelişmekte olan ülkeler için bu hammadde kaynağı gerek biyoetanol üretiminde gerekse kimyasal maddeler ve enerji üretiminde büyük potansiyele sahiptir.

3.2. Nişastalı Materyaller

Biyoetanol üretiminde kullanılacak diğer hammadde kaynakları nişasta bazlı materyallerdir (Yoosin ve Sorapipatana, 2007). Nişasta bir homopolimer olarak tanımlanan biyopolimer olup, sadece tek bir monomer, D-glikozdan oluşur (Pongsawatmanit ve ark., 2007). Nişastadan biyoetanol elde edebilmek için bu karbonhidrat zincirinin koparılarak glikoz şurubunun elde edilmesi amacıyla mayalar kullanılmaktadır. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde biyoetanol üretimi için bu hammadde kaynakları büyük ölçüde kullanılmakla beraber çoğunlukla bu amaç için mısır ve buğday tercih edilmektedir (Cardona ve Sanchez, 2007).

Nişasta bazlı biyoetanol endüstrisi yaklaşık 30 yıldır yaşamakta olup, geçen zaman içinde enzim verimliliğinde sağlanan iyileşmeler yanında işlem süresi ve maliyetlerin düşürülmesi biyoetanol verimliliğini olumlu yönde etkilemiştir (Mabee ve ark., 2006).

3.3. Lignoselülozik Biyokütle

Bütün lignoselülozik biyokütlelerin temel yapısı üç temel polimerden oluşmaktadır (Shibuya ve Iwasaki, 1985; Kormelink ve Voragen, 1993): Selüloz ($C_6H_{10}O_5$)_n, hemiselüloz ($C_5H_8O_4$)_n ve lignin [$C_9H_{10}O_3$] (OCH_3)_{0.9-1.7}]_n Aşağıda kısaca lignoselülozik bileşenler hakkında bilgi verilecektir.

Selüloz lignoselülozik biyokütlenin ana bileşeni olup odunun ağırlıkça % 40-50'sini oluşturmaktadır (Gurgel ve ark., 1995). Hücre çeperinin ana yapı elemanı olup, hücrelerinin direnç değerinden sorumludur. Selüloz β-1,4 bağı ile bağlı glikoz birimlerinden oluşmaktadır. Binlerce glikoz birimlerinin bir araya gelmesiyle selüloz zincirleri meydana gelir. Selüloz zincirlerinin içerdikleri hidroksil grupları ile hidrojen köprü bağları oluşturarak bir araya gelmesiyle fibriller meydana gelmektedir (Granstorm ve ark., 2001). Bitkideki selüloz miktarı hücre çeper içeriğine bağlı olup bitki türleri ve çeşitleri arasında farklılık göstermektedir. Bitkinin yaşı ve bitki kısımları ayrıca selüloz miktarını etkilemektedir.

Hemiselülozlar yapı taşı olarak pentoz (ksiloz ve arabinoz), heksoz (mannoz, glikoz, galaktoz) ve üronik asitlerinden oluşan heterojen polimerlerdir. Hemiselüloz polimerlerinin içerikleri bitki türü ve dokusuna bağlıdır. Ksilanlar yapraklı ağaç odunlarında en fazla miktarda bulunan selülozik olmayan polisakkaritlerdir. Ksilan ana zincirinin yaklaşık %80'i ksiloz içermekte olup ana zincire O-2 ve/veya O-3 bağı ile bağlı arabinoz, ksiloz ve bazen de galaktoz atıklarını içeren oligomerik yan dallarla karşılaşmak mümkündür (Saulnier ve Thibault, 1999). Buna karşılık dallanma göstermeyen lineer ksilanlarda mevcut olup bunlar guar husk tohumlarından, esparto otundan ve tütün saplarından izole edilmişlerdir (Eda ve ark., 1976). Dolayısıyla ksilanlar lineer homoksilanlar, arabinoksilanlar, glukouronoksilanlar ve glukouronoarabinoksilanlar olarak karakterize edilmektedirler. İğne yapraklı ağaçlarda ise galaktoglukomannanlar ve glukomannanlar ana hemiselüloz bileşenleri olup ksilanlar az miktarda bulunmaktadırlar.

Hemiselülozlar lignoselülozik odunsu biyokütlenin yaklaşık %30'unu oluşturan selülozdan sonra ikinci en önemli odun polisakkarit kısmıdır (McMillan, 1997). Odun dışı bitkilerde ise hemiselüloz oranı biraz daha yüksek olabilmektedir. Mısır sapı, mısır koçanı, buğday sapı, pirinç sapı ve şeker kamışı gibi farklı tarımsal atıklarda hemiselüloz oranı %40'lara ulaşabilmektedir (Kormelink ve Voragen, 1993). Pirinçte nötral ksilan %46 ksiloz, %44.9 arabinoz, %6.1 galaktoz, %1.9 glikoz ve %1.1 anhidrouronik asit içermektedir (Shibuya ve Iwasaki, 1985). Saman arabinoksilanı %65.8 ksiloz, %33.5 arabinoz, %0.1 mannoz, %0.1 galaktoz ve %0.3 glikoz içermektedir. Mısır sapı ksilanı ise en önemli heteroksilan komplekslerinden biri olup β-(1,4) bağı ksiloz ünitelerinden oluşmakta olup, %48-54 ksiloz, %33-35 arabinoz, %5-11 galaktoz ve %3-6 glukouronik asit içermektedir (Doner ve Hicks, 1997; Saha ve Bothast, 1999). Sert odunlarda arabinoz oranı toplam pentozun %2-4'ünü oluştururken, bu oran otsu bitkilerde %10-20'lere ulaşmaktadır. Arabinoz içeriğinin mısır liflerinde ise %30-40'lara ulaşabileceği bildirilmektedir.

Hemiselülozların biyolojik dönüştürülme işlemi (bioconversion) hemiselüloz içeren biyokütlenin, yakıt ve kimyasallara dönüşümü, kağıt hamuru üretimi ve hayvan yemlerinin sindirilebilirliğini artırması gibi farklı agro-endüstriyel yöntemlerdeki pratik uygulamaları nedeniyle son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Wong ve ark., 1988; Zeikus ve ark., 1991; Viikari ve ark., 1993). Dönüştürme işleminde kullanılan kimyasal maddelerin çevreye olan etkileri nedeniyle özellikle günümüzde hemiselülozu degridede (yıkım) eden ya da hemiselüloz degradasyonuna yardımcı olan enzimler endüstriyel olarak kullanılmaya başlanmış ve konu ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Diğer taraftan hemiselülozik şekerler lignoselülozik materyalin etanol ve diğer fermentasyon ürünlerine dönüşümünde büyük önem taşımaktadır. Ksilan degridede edici enzimler son yıllarda çeşitli tarımsal ve orman atıklarının sakkarifkasyon işlemlerinde önemli ölçüde kullanılmaktadır. Hemiselülozların

diğer potansiyel uygulamaları arasında odunun biyoliflendirilmesi, meyve ve sebze maserasyonu ve yüksek lifli ürünlerin üretilmesi gibi işlemler sayılabilir (Eggeman ve Elander, 2005).

Çoğu sert odun hemiselülozlarında en baskın pentoz şekeri ksilan iken, enerji ürünleri olarak ifade edilen switchgrass gibi diğer otsul bitkiler ve tarımsal atık hemiselülozlarında ise en baskın şeker arabinoz olabilmektedir. Bu ise biyoetanol üretimi için kullanılan hammadde ve bu hammadde içeriğinin önemini göstermektedir.

Lignin polisakkaritlerden sonra hücre çeperinde en fazla miktarda bulunan dallanmış yapıdaki fenolik bileşendir. Lignin bütün vaskular bitkilerde hücre içi duvarında bulunmaktadır. Lignin doğada oldukça fazla miktarda bulunan ve ekonomik öneme sahip doğal hammadde olması nedeniyle yapısı ve biyosentezi konusunda birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. Yumuşak odun ve sert odunların lignin içerikleri %20-40 arasında değişirken bu oran bagasse (Bagas= Şeker kamışı artığı veya sapı), mısır koçanı, fıstık kabuğu ve saman gibi otsul bitkilerde %10-40 arasında sınırlı kalmaktadır (Yaman, 2004). Kâğıt üretim işleminde, ligninin kimyasal olarak çözünmesiyle lifler bireysel hale getirilir diğer taraftan hayvan yemi olarak kullanılan bitkilerdeki lignin sindirimi belirgin bir şekilde azaltılmaktadır.

Lignin polimeri yapıtaşları p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol olarak adlandırılan birimlerinden oluşmaktadır. Herbir ünite bir diğeriyle birçok tipte bağlantı yaparak lignin polimerini oluşturmaktadır. Lignin yapısındaki ve miktarındaki farklılıklar bitki grupları ve türleri arasında farklılık arz etmekte olup ayrıca bitkinin yaşı, hücre tipi ve tek bir hücrenin farklı kısımlarında farklılık arz etmektedir.

İğne yapraklı ağaç lignini başlıca guayasil (G-üniteleri) birimlerini içermekte olup, az miktarda p-hidroksi fenil (H-üniteleri) birimleri içermektedirler. Yapraklı ağaç lignini hem siringil (S-üniteleri) hem de guayasil (G-üniteleri) birimleri ve az miktarda H-üniteleri içermektedir. Ekin türlerinde, toplam lignin miktarı %15-26 arasında değişmektedir. Lignin hücre çeperinin mikrobiyal hücumlara karşı dirençli olmasını sağlamaktadır. Lignin hücre çeperinde diğer temel bileşenler ile de bağ yapmaktadır. Polisakkarit ve proteinlerle olan karşılıklı bağlar oldukça kompleks üç boyutlu networkler oluşturmaktadırlar. Fenolik bileşikler ve karbonhidratları arasındaki bu bağ liflerin bireysel hale getirilmeleri ve kullanımlarını zorlaştırmaktadırlar.

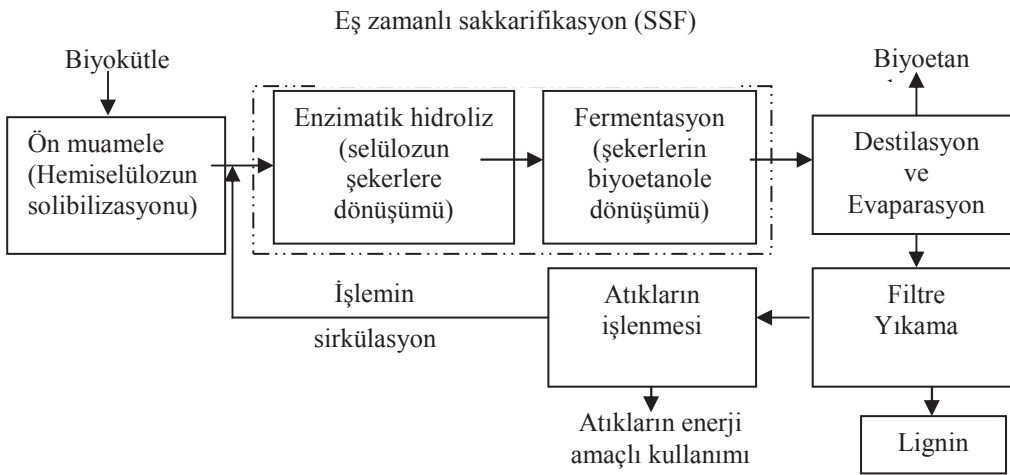
Mineraller bitkilerin büyüme ve gelişmeleri için gereklidir. Bunların bitkilerdeki oranları %0.1-1.5 (kuru madde) arasındadır. Makro besinlerden olan N, P, S, K, Mg ve Ca gibi organik bileşikler proteinler ve nükleik asitler için gereklidir ve bitkide ozmotik basıncı sağlamaktadırlar. Mikro besinlerden olan Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl ve Ni gibi bileşenler genellikle enzim üretimi veya aktivasyonu etkilemekte olup bunların bitkilerdeki miktarları düşüktür. Bitkilerdeki mineral maddelerin oranları bitki yaşı veya gelişme dönemi, bitki türü ve diğer minerallerin konsantrasyonunun ve aynı zamanda bitkide bulunduğu kısma bağlı olarak değişmektedir.

4. Biyoetanol Üretim Prosesleri

Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanole dönüşümü dört ana aşamadan oluşmaktadır: Ön muamele, hidroliz, fermentasyon ve ürünlerin ayrılması/distilasyon. Basit bir şekilde biyokütlenin biyoetanole dönüşümü Şekil 1'de gösterilmiştir.

4.1. Ön Muameleler

Lignoselülozik maddelerin biyo-dönüşümünde birinci adım boyut küçültme ve ön muameledir (Yaman, 2004). Ön muamele selülozun dönüşümünde önemli bir araçtır. Ön muamele selülozik biyokütlenin yapısını değiştirerek enzimler açısından daha kolay ulaşılabilir bir yapıya dönüştürmekte ve karbonhidratların fermente edilebilir şekerlere ve selüla üretici mikroorganizmalar tarafından dönüşümünü kolaylaştırmaktadır. Ön muamelenin başarılı olabilmesi için: (1) şekerlerin formasyonunu artırmalı ya da şekerleri daha sonraki hidroliz işlemleri için uygun yapıya dönüştürebilmeli, (2) karbonhidratların degradasyonunu ve kaybını önlemeli, (3) sonraki hidroliz ve fermentasyon işlemlerinde yan ürün inhibitörlerinin oluşumunu önlemeli ve (4) maliyeti olumsuz etkilememelidir.



Şekil 1. Biyokütleden biyoetanol üretiminde kullanılan prosesler (Balat ve ark., 2008).

Ön muamele aşaması asit veya enzim katalizörlü hidroliz işlemlerinin etkisini kolaylaştırmak amacıyla lignoselülozik yapının fiziksel bozulmasına katkıda bulunmaktadır. Ön muamele işlemleri sonraki işlemlerin etkinliği ve konfigürasyonu üzerinde etkili olmakla beraber yöntemin ekonomikliğini de büyük ölçüde etkilemektedir. Günümüzde ön muamelelerin maliyet ve performansını değerlendirmek amacıyla tekno-ekonomik analizler uygulanmaktadır (Hamelinck ve ark., 2005; Eggeman ve Elander, 2005; Chen ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar karbonhidratların biyoetanole dönüşümünde maliyet ve süreç açısından en önemli belirleyici faktörün ön muamele işlemleri olduğunu göstermiştir. Bu konuyla ilgili olarak ön muamelelerin maliyetini düşürücü birçok araştırma ve geliştirme (AR-GE) yaklaşımı mevcuttur (Chandel ve ark., 2007). Maliyet araştırmaları ve etkin ön muameleler biyoetanol teknolojisinin temelini oluşturmaktadır (Hamelinck ve ark., 2005).

Ön muameleler; mekanik (Rivers ve Emert, 1987), buhar patlatılması (Brownell ve Saddler, 1987; Zhang ve ark., 2007), amonyak lif patlatılması (Alizadeh ve ark., 2005; Indacochea ve ark., 2006), süperkritik CO₂ muamelesi (Kim ve Hong, 2001), alkali veya asit ön muamelesi (Silverstein ve ark., 2007; Champagne, 2007), ozon ön muamelesi ve biyolojik ön muamele (Patel ve ark., 2007) işlemlerini kapsamaktadır. Çizelge 2’de çeşitli ön muamele işlemleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Aşağıda ön muamele işlemlerinden bazıları hakkında detaylı bilgi verilecektir.

Çizelge 2. Ön muamele yöntemleri (lignin uzaklaştırıcı ve hemiselülozları hidrolize edici) (Hamelinck ve ark., 2003; Hamelinck ve ark., 2005).

Ön muamele metodu	Kimyasallar	Sıcaklık/basınç	Reaksiyon süresi (dak.)	Ksiloz verimi (%)	Aşağı yönde enzimatik etki	Maliyet
Seyreltik asit hidrolizi	Asit	>433 K	2-10	75-90	<%85	+
Alkali hidrolizi	Baz			60-75	%55	++
Katalizlenmemiş buhar patlatılması	-	433-533 K	2	45-65	%90	-
Asit katalizörlü buhar patlatılması	Asit	433-493 K			%88 (2 adım)	-
Amonyak lif patlatılması	Amonyak	363 K	30		%50-90 (2 adım)	
CO ₂ patlatılması	CO ₂	56.2 bar			%75 (2 adım)	

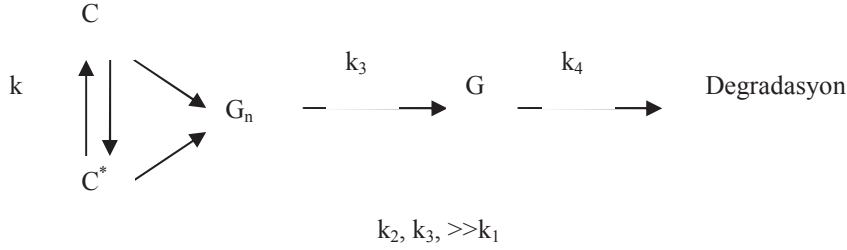
Buhar Patlatılması (Otohidroliz-Steam explosion): Biyokütlenin ön parçalanmasında kullanılan işlemlerden biri buhar patlatılmasıdır. Yöntem buhar patlaması, sulu ayırma ve sıcak su sistemlerini kapsamaktadır. Buhar patlatılması Kanada'daki Stake Teknoloji Ltd. tarafından geliştirilmiş olup, yüksek sıcaklık ve basınçta biyokütlenin ekstrüzyon işlemini kapsamaktadır.

Buhar patlatılması ön muamelesiyle ise hemiselülozun degradasyonu ve çözülebilirliği yüksek sıcaklık ve kısa reaksiyon süresi (270°C, 1 dk.) veya düşük sıcaklık, yüksek reaksiyon süresi (190°C, 10 dk.) işlemlerinin her iki şekliyle de sağlanabilir (Duff ve Murray, 1996). Uygulama sonrasında basınç serbest bırakılarak materyalde fazla kayıp olmaksızın, patlatma sonrası lifler bireysel hale dönüştürülmektedir. Uygulamada buhar lignoselülozik matriks içerisine işlemekte ve hemiselüloz hidrolizine katkıda bulunarak doğal asitlerin hemiselülozdan serbest kalmasını sağlamaktadır (Mabee ve ark., 2006). Bahsedilen bu yöntem kavramsal olarak basit olmakla beraber hemiselülozlardan elde edilen şekerlerin verimi %65'lerden daha düşüktür (Wyman, 1999).

Bu yöntemde buhar patlatılması ön muamelesi süresince açığa çıkan asetik ve diğer asitlerin hemiselüloz hidrolizine katkı sağladığı düşünülmektedir. Buhar patlatılması Şekil 2'de gösterildiği gibi ardı ardına gelen reaksiyonları ve bunların sonucunda oluşan kimyasal etkileri kapsamaktadır. Çünkü hemiselüloz içerisinde var olan asetil gruplarının hidroliziyle oluşan asetik asit adeta bir katalizör olarak reaksiyon süresince ksiloz veya glikoz degradasyonuna katkı sağlamaktadır. Öte yandan su yüksek sıcaklıklarda asit gibi etki etmektedir (Mosier ve ark., 2005).

Bu basit uygulama kimyasalların eşzamanlı kullanımı ile geliştirilmiştir. USA'daki Xylan Inc. peroksit ön muamelesi ile ekstrüzyon işlemini beraber kullanarak biyokütlenin iç yapısı bozunduran yeni bir uygulama geliştirmiştir (Dale ve Moelhman, 2000). Bununla beraber, uygulamada buhar ön muamelesine ek olarak daha yüksek şeker verimi elde etmek için H₂SO₄ ve SO₂ gibi katalizörlerin de uygulandığı yöntemler mevcuttur. Ön muamele sırasında kullanılan asit katalizörü hemiselüloz şekerlerinin kazanımını ve katı fraksiyonun enzimatik hidrolizini artırmaktadır. Asit katalizörlü buhar ön muamelesi asit hamur üretimine benzese de yöntemin sıvı içeriği daha düşüktür (Hahn-Hagerdal, 2006). H₂SO₄ güçlü bir katalizör olup, hemiselülozların uzaklaştırılmasını artırmakta ve öte yandan çeşitli inhibitör maddelerin üretimini kolaylaştırmaktadır. Morjanoff ve Gray (Morjanoff ve Gray, 1987) yaptıkları çalışmada buhar patlatılması (220 °C, 30 sn, su/katı oranı: 2/1 ve %1 H₂SO₄ ile) ön muamelesinden sonraki enzimatik ön hidroliz işlemiyle %65.1 verimde şeker üretilebildiğini belirtmişlerdir. SO₂ ise daha ılımlı bir katalizör olup, daha düşük hemiselüloz hidrolizi

yanında, daha düşük inhibitör madde üretimi sağlamaktadır (Bertilsson, 2007). Buhar ön muamelesi süresince SO₂'nin katalizör olarak kullanılmasıyla hemiselüloz türevli şekerlerin geri kazanımı artmakta ve diğer taraftan selüloz üzerinde enzimatik hidroliz öncesi istenilen geçirgenlik oluşturulabilmektedir (Brownell ve Saddler, 1984). Bunun dışında 200-210°C'de %1 SO₂ (w/w) ilavesiyle uygulanan buhar ön muamelesinin diğer ön muamele işlemlerine nazaran daha kuvvetli olduğu ve hammadde içindeki glukoz varlığına bağlı olarak %95 glikoz veriminin elde edildiği belirtilmiştir (Eklund ve Zacchi, 1995). Ön muamele işlemleri iki kademeli olarak da uygulanabilmektedir. Optimize edilmiş asit katalizörlü buhar ön muamelesi koşulları Çizelge 3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. Buhar patlatılması ön muamelesinde oluşan adımların şematik gösterimi. Kristalin (C) ve amorf selüloz (C*) arasındaki dönüşüm tersinirdir. Her ikisi de oligosakkaritlere ve devamında glikoza dönüşebilir. Glikoz (G) degradasyonunu daha sonrasında fermentasyon inhibitörlerini oluşturmak için meydana gelebilir. K denge sabiti ve k ise oransal sabittir (Mosier ve ark., 2005).

Çizelge 3. Optimize edilmiş asit katalizörlü buhar ön muamelesi koşulları (Balat ve ark., 2008).

2-KADEMELİ ÖN MUAMELE		TEK ADIMLI ÖN MUAMELE
1. adım	2. adım	-
453 K, 180 °C, 10 dak., H ₂ SO ₄ (%0.5)	473 K, 200 °C, 2 dak., H ₂ SO ₄ (%2)	498 K, 225 °C, 5 dak., H ₂ SO ₄ (%0.5)
463 K, 190 °C, 2 dak., SO ₂ , (%3)	493 K, 220 °C, 5 dak., SO ₂ , (%3)	483 K, 210 °C, 5.5 dak., SO ₂ , (%3.5)

Buhar patlatılması ön muamelesinin lignoselülozik maddeler üzerine etkileri özetlenirse (Jeoh, 1998):

- (1) selülozun amorf kısımlarını kristalleştirerek, selülozun kristalinitesini artırır,
- (2) hemiselülozlar kolaylıkla hidrolize edilebilir
- (3) delignifikasyonu artırır.

Buhar patlatılmasının en önemli avantajı mekanik liflendirme (%70'ten fazla enerji gerektirir) ile karşılaştırıldığında daha düşük enerji kullanımını gerektirmesi ve geri dönüşüm ve çevresel açıdan ortaya çıkabilecek maliyetleri azaltması olarak gösterilebilir. Bu yöntemin tarımsal atıklar ve sert odunlar için maliyet açısından oldukça etkin olduğu düşünülebilir; ancak yumuşak odunlar için aynı durum söz konusu değildir (Balat ve ark., 2008).

Bunun dışında yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde enzimatik hidroliz işlemi öncesinde CO₂, patlatılması metodunda selüloz materyali üzerinde oldukça etkin olduğu görülmüştür (Zheng ve ark., 1995; Kim ve Hong, 2001). Zheng ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada CO₂, buhar ve amonyak patlatılması ön muamele metodlarını şeker kamışı üzerinde denemişler ve CO₂ patlatılması metodunun diğerlerine nazaran maliyet açısından daha etkin olduğunu ve özellikle buhar patlatılması metodunda odun bileşenlerinde ortaya çıkan olumsuz etkinin CO₂ patlatılması metoduyla indirgeniğini gözlemlemişlerdir.

Amonyakla Muamele Edilmiş Liflerin Soğuk Buharla Patlatılması (AFEX): AFEX ön muamelesi liflerin sıvı amonyak ile muamelesini ve ardından soğuk buharla patlatılması

işlemlerini kapsamaktadır (Hamelinck ve ark., 2005). Bu yöntemde önceden ıslatılmış %15-30 rutubet içeriğindeki lignoselülozik materyal 1-2 kg sıvı NH₃ (o.d. biyokütle) ile muamele edilir. Oda sıcaklığındaki uygulamalar için 12 atm'i aşan basınçlar gerekli olmaktadır (Silverstein, 2004). Yöntem basit ve işlem süresi kısadır. Bu sistem hiçbir şekeri direkt olarak serbest bırakmamakta ancak polimerlerin (selüloz ve hemiselüloz) enzimatik atağa karşı daha duyarlı hale gelmesini sağlamakta ve şekerleri azaltmaktadır (Dale ve Moelhman, 2000). AFEX metodu amonyağın yüksek maliyeti dolayısıyla, yöntemin ekonomikliğini sağlayabilmek amacıyla amonyağın geri kazanımını gerekli kılmaktadır. Amonyağın geri kazanımında en önemli yaklaşım muamele sonrasında uygulanabilecek olan evaporasyon işlemidir (Lee, 2005). AFEX ön muamelesi düşük enzim yüklerinde (<5 FPU/g biyokütle veya 20 FPU / g selüloz) muamele edilmiş lignoselülozikler için teoritik verimlere yakın optimal hidroliz oranları sağlamaktadır (Mosier ve ark., 2005). Mısır saplarının ön muamelesi için uygun bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Cao ve ark. (1996) sert koşullar altında lignoselülozik biyokütlenin (mısır koçanı lifleri) seyreltik NH₄OH ile oda sıcaklığında muamelesiyle lignin, asetat ve ekstraktiflerin uzaklaştırılabileceğini ve ardından liflere uygulanacak olan seyreltik asit muamelesiyle hemiselüloz fraksiyonlarının başta ksiloz olmak üzere basit şekerlere hidrolize olabileceğini ve atık selüloz fraksiyonlarının ise enzimatik hidroliz yoluyla glikoza indirgenmesinin daha kolay olacağını belirtmişlerdir. Kurakare ve ark. (2001) da şeker kamışı, mısır zuru ve switchgrass türlerinde enzimatik hidrolizin etkinliğini artırmak amacıyla amonyaklı su ile ön muamele işlemlerini uygulamışlardır. Buna karşılık şeker kamışından daha fazla lignin içeriğine sahip kavak yongalarında AFEX ön muamelesinin daha az etkili olduğu gözlemlenmiştir (Silverstein, 2004).

Asit Ön Muamelesi: Asit ön muamelesi lignoselülozik biyokütleden yüksek verimlerde şeker üretimini amaçlamaktadır (Lee, 2005). Asit ön muamelesinin sülfürik asit (Parajo' ve ark., 1993), hidroklorik asit (Kurakare ve ark., 2005), perasetik asit (Teixeira ve ark., 1999), nitrik asit (Brink, 1993) ve fosforik asit (Hussein ve ark., 2001) gibi farklı çeşitleri mevcuttur. Asit ön muamelesi selülozu hidrolize etmek amacıyla seyreltik veya konsantre asitleri kullanabilir. Bütün bu ön muamele metotları içerisinde seyreltik asit ön muamelesi en fazla tercih edilen metottur.

Genel olarak seyreltik asit ön muamelesinin iki farklı uygulama şekli mevcuttur: (1) Düşük katı madde oranı (%5-10 w/w) ve yüksek sıcaklıktaki (T>433 K, 160 °C) sürekli sistemler, (2) yüksek katı madde oranı (%10-40 w/w) ve düşük sıcaklıktaki (T<433 K, 160°C) kesintili sistemler (Silverstein, 2004). İki sistem karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklık ve reaksiyon süresi ile uygulamada çözülebilir ksilozların miktarının ve selülozların enzimatik yoldan sindirilebilirliğinin arttığı belirlenmiştir (Tucker ve ark., 2003). Örnek bir uygulamada, daha ılımlı sıcaklık derecelerinde seyreltik asit ile ön muamelelemeden sonra enzimatik yoldan fermante edilebilir şekerlere dönüşümün %85-100 verimle gerçekleştiği mısır hammaddesi için belirtilmiştir (Saha ve Cotta, 2006). Bu bağlamda ön muamele koşullarına ve kullanılan substrata bağlı olarak, seyreltik asit ön muamelesi ile lignoselülozik hammaddeden %80-95 verimle hemiselülozik şekerlerin elde edilebileceği belirtilmiştir (Torget ve ark., 1996; Jeffries ve Jin, 2000; Karimi ve ark., 2006).

Son yıllarda lignoselülozik biyokütlenin seyreltik sülfürik asit ile ön muamelesi, hemiselülozun hidrolizi amacıyla veya selülozun enzimatik hidrolizi için ön muamele işlemi olarak çoğunlukla tercih edilen bir yöntemdir. Bu işlemde, biyokütle seyreltik sülfürik asit ile muamele edilerek, hemiselülozlar ksiloz ve diğer şekerlere parçalanır ve devamında da ksilozdan furfural elde etmek amacıyla karıştırılır. Furfural ise distilasyon yoluyla geri kazanılmaktadır. Biyokütle ile karıştırılan asit 433-493 K sıcaklık derecelerinde saniyeden dakikaya kadar değişen reaksiyon sürelerinde muamele edilir (Mosier ve ark., 2005).

Sıcak yıkama prosesi, seyreltik asit ön muamelesinin bir varyasyonu olup, yüksek sıcaklıklarda ayrışmayı ve ön muamele görmüş materyalin yıkanması işlemini kapsamaktadır.

Bu yıkama işleminin ise ön muamele koşullarında çözünmüş lignin veya ksilan fraksiyonlarının tekrar çökmesini önlemek amacıyla uygulanmaktadır. Çünkü, uygulama sonrasında lignin çökmesi ön muamele görmüş materyalin daha sonraki enzimatik hidrolizini negatif yönde etkilemektedir (Knauf ve Moniruzzaman, 2004). Uygulamadaki yüksek sıcaklık daha yüksek verimin yanında daha fazla seyreltik şeker solüsyonu oluşturmaktadır. Kesintili sistemle seyreltik asit hidrolizi ile odundaki selülozun yaklaşık %50-55'i şekerlere dönüştürülebilmektedir. Kullanılan ön muamele işlemlerine bağlı olarak atık selüloz ve degrede olmuş selüloz fraksiyonlarının miktarı, yöntemin ekonomikliği üzerinde etkin olmaktadır.

Alkali Ön Muamelesi: Alkali ön muamelesi, diğer ön muamele teknolojileri ile karşılaştırıldığında daha düşük basınç ve sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. Alkali ön muamelesi çevre koşullarında uygulanabilir ancak muamele süresi saniye ve dakikalardan ziyade saat veya günlerle ifade edilmektedir. Asit katalizörlü ön muamelelerden farklı olarak alkali ön muamelesinde bazı alkalilerin geri dönüşümü olmayan tuzlara dönüşümü veya ön muamele sırasında meydana gelen reaksiyonlarla biyokütle içerisine tuz gibi işlemleri yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (Silverstein, 2004). Alkali ön muamelesinin en önemli özelliği kullanılan alkalinin diğer bileşenler üzerinde büyük etkiler oluşturmaksızın lignini uzaklaştırabilme kapasitesine sahip olmasıdır (McMillan, 1997).

Alkali ön muamelesi için daha çok seyreltik NaOH kullanılmaktadır (Lee, 2005). NaOH muamelesi lignoselülozik biyokütlenin şişmesine, iç yüzey alanının artmasına, kristallik derecesinin düşmesine ve lignin yapısının bozulmasına sebebiyet vermektedir (Li ve ark., 2004). Ekonomik çevresel koşullar göz önüne alındığında, seyreltik NaOH muamelesinin konsantre NaOH muamelesine nazaran kullanılması daha uygun olmaktadır. Seyreltik NaOH ile diğer muamele işlemlerinin kombinasyonunun daha verimli olduğu görülmektedir. Örneğin mısır sapında %2 seyreltik NaOH+irradiyasyon (500 kGy) muamelesinin NaOH ön muamelesine (verim %43) nazaran verimi %20 oranında artırdığı gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2004).

Öte yandan kireç (kalsiyum hidroksit, CaOH) alkali ön muamele kimyasalı olarak buğday sapı (3 saat, 358 K, 85 °C), kavak odunu (6 saat, 423 K, 150 °C, 14 atm oksijen), switchgrass (2 saat, 373 K, 100 °C) ve mısır saplarında (13 saat, 373 K) denenmiştir. Bu yöntemde ise kalsiyum hidroksit, su ve hava veya oksijen (O₂) gibi oksidize edici maddeler 313-426 K, 40-153 °C sıcaklıkta, saat veya hafta arasında değişebilen reaksiyon sürelerinde biyokütle ile muamele edilmektedirler. Yöntemin en önemli avantajı biyokütleden ligninin uzaklaştırılması sonrasında kalan polisakkaritlerin reaktifliğini artırmasıdır. Buna karşılık, bu ön muamele işlemi hemiselülozlardan asetil ve farklı üronik asit gruplarını uzaklaştırarak enzimlerin selüloz ve hemiselüloz fraksiyonları üzerine etkilerini sınırlamaktadır (Ramirez, 2005).

Biyolojik Ön Muamele: Biyolojik ön muamele işleminde lignoselülozik madde içerisindeki lignini çözmek amacıyla mantarları kullanılmaktadır. Biyodelignifikasyon olarak tanımlanan işlemde biyokütle içerisindeki ligninin mikroorganizmalar tarafından biyolojik degradasyonunu ifade edilmektedir. Bu yöntem 1980'li yıllarda ilk anıldığında pahalı olması, uzun muamele süresi gerektirmesi, bazı yönleriyle yetersiz olması ve mikroorganizmaların lignin türevlerince zehirlenebilir yapıda olması gibi nedenler yöntemin kullanılabilirliğini sınırlamakla beraber gelecekte daha etkin bir yöntem olabileceği düşünülmektedir (Hamelinck ve ark., 2003; 2005). Bu ön muamele şekli fazlasıyla kolay olmakla birlikte elde edilen verim düşük ve delignifikasyon oranı oldukça yavaştır. Ayrıca yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde bu ön muamele işlemini kapsayan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Wyman, 1999).

4.2. Hidroliz

Ön muamele işleminin ardından biyokütlenin fermente edilebilir şekerlere dönüşümünde gerekli olan ikinci adım su molekülünün ilavesiyle ana molekülün koparılmasını ifade eden hidroliz işlemidir (Balat ve ark., 2008). $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$ reaksiyonunda gösterildiği gibi selüloz seyreltik asit, konsantre asit veya enzim (selülaz) yoluyla katalizlenir. Selüloz polimerini glikoza hidrolizleyen yöntemlerden bir kısmı son birkaç yıl içerisinde geliştirilmiştir. Bu yöntemler genellikle selülitik enzimleri veya farklı konsantrasyonlarda sülfürik asitleri hidroliz amacıyla kullanmaktadır. Bu uygulamalarda enzim kullanımı durumunda pahalı yatırımlar gerekli olmakta buna karşılık sülfürik asitin bu işlemde kullanımının daha ucuz olduğu görülmesine karşılık uygulamada sülfürik asit kullanımının en önemli dezavantajı yüksek sıcaklık değerlerinin gerekliliğidir (Mosier ve ark., 2002). Ayrıca enzimatik uygulamada (pH 4.8 ve sıcaklık 318-323 K, 40-50 °C) daha yüksek verim sağlanabilmektedir. Alkali veya asit hidroliz işlemlerinin neden olduğu korozyon problemleri bu uygulamaları sınırlamaktadır (Balat ve ark., 2008).

Diğer taraftan lignoselülozik biyokütle gama ışını, elektron ışın radyasyonu veya mikrodalga radyasyonu yoluyla hidrolize edilebilir (Demirbaş, 2004; 2005). Lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi saf selüloza nazaran glukoz olmayan lignin ve hemiselüloz gibi bileşenler nedeniyle oldukça karmaşıktır (Zhang ve Lynd, 2004). Hidroliz işlemi farklı uygulamalar ile gerçekleştirilebilmekte olup devam eden kısımda bu uygulamalar hakkında kısaca bahsedilecektir.

Asit Hidrolizi: Asit katalizörlü selüloz hidrolizi kompleks heterojen bir reaksiyondur. Bu hidroliz işlemi hidrolitik kimyasal reaksiyonlar kadar fiziksel bazı faktörleri de kapsamaktadır (Xiang ve ark., 2003). Monosakkarit ürünlerinin daha yoğun degradasyonu ise istenilmeyen kimyasalların oluşumuna neden olabilmektedir. Meydana gelmesi mümkün olan yan reaksiyonların sayısı, tamamıyla uygulanan asidin nüfuzuna bağlıdır. Öte yandan asit hidrolizi sonrası uygulanan enzimatik hidroliz işlemi ile mısır sapında verimin %100 oranında, meşe odununda ise %90 oranında arttığı gözlemlenmiştir (Jeoh, 1998).

Lignoselülozik biyokütle asit ile hidrolize edildiğinde, değişmeden kalan lignin ve selüloz fraksiyonları yanında ksilanın ksiloza dönüştürüldüğü belirtilmektedir. Bu durum ksilanın selüloz ile karşılaştırıldığında amorf yapıda olması ve asit muamelesi sonucunda hidroliz işlemine daha çok dayanıksız olması ile açıklanabilir (Rahman ve ark., 2007). Şeker kamışı örneklerinde yapılan çalışmada asit hidrolizatlarının önemli ölçüde ksiloz içerdiği belirtilmektedir. Ayrıca asit hidrolizi ksilozu hızlı bir şekilde furfural ve diğer kondensasyon yan ürünlerine degrade etmektedir. Oluşan bu degradasyon ürünleri ise mikroorganizmaların etkisini yavaşlatan inhibitörler olarak kabul edilmektedir. İnhibitör etkisi gösteren bileşikler furfural, 5-hidroksimetil furfural (HMF), asetat hidroksibenzaldehit (HBA), siringaldedid (SGA) ve vanilin gibi ürünlerdir (Rao ve ark., 2006). Asit hidrolizinin yaygın olarak kullanılan iki şekli var olup bunlar seyreltik asit ve konsantre asit uygulamalarıdır.

Seyreltik Asit Hidrolizi: Bu yöntem selüloz biyokütlesini bioetanolle dönüştürmede bilinen en eski teknolojidir (Anonim, 2008b). Seyreltik asit hidrolizinde hemiselüloz fraksiyonları, selüloz fraksiyonlarına nazaran daha düşük sıcaklıklarda depolimerize olmaktadır. Bu yöntemde hemiselülozdan ksiloz veya diğer şekerleri elde etmek amacıyla seyreltik asitle biyokütle işleme sokulmaktadır. Seyreltik asit prosesi %1 sülfürik asit konsantrasyonunda, yüksek sıcaklıklarda (yaklaşık 488 K, 215 °C), kesintisiz üretim yapan kazanlar kullanılarak uygulanmaktadır (Anonim, 2008b). Çoğu seyreltik asit yöntemleriyle elde edilen şeker verimleri yaklaşık %50 ile sınırlı kalmaktadır (Badger, 2002). Gerçekleştirilen çalışmalar daha yüksek selüloz hidrolizi yanında glikozun bozunmasını minimize ederek ekonomik bir şekilde verimin %70'lerin üzerine çıkarılması

doğrultusundadır. Seyreltik asitlerin daha yüksek oranlarda kullanımı durumunda kristalin bölgeleri azalttığı; ancak glikozu degrades ettikleri gözlemlenmiştir (Lee, 2005).

Seyreltik asit hidrolizi selüloz ve hemiselüloz arasındaki farklılıktan ötürü iki kademe uygulanmaktadır. Birinci kademe daha düşük sıcaklıklarda hemiselülozun hidrolizi sağlanırken, ikinci kademe daha yüksek sıcaklıklarda biyokütlenin selüloz kısmının hidrolizi gerçekleştirilir (Demirbaş, 2006; 2007). Seyreltik asit yönteminin en önemli avantajı kesintisiz işlemi kolaylaştıran hızlı reaksiyon oranı olmakla beraber en büyük dezavantajı ise elde edilen düşük şeker verimidir. Ayrıca hızlı kesintisiz yöntemlerde daha iyi asit penetrasyonu sağlayabilmek amacıyla hammaddenin boyutsal olarak küçültülmesi önem arz etmektedir (Badger, 2002).

Konsantre Asit Hidrolizi: Konsantre asit yöntemi, tamamen ve hızlı bir şekilde selülozun glikoza ve hemiselülozların çok az degradasyona uğratılmasıyla 5-karbonlu şekerlere dönüşümünü mümkün kılmaktadır. Yöntemin ekonomik uygulanabilirliğini sağlamak amacıyla gerekli olan faktörler şeker veriminin optimizasyonu ve asit geri kazanımının etkin şekilde gerçekleştirilebilmesidir (Demirbaş, 2004; 2005). Konsantre asit yönteminde reaksiyon süresi seyreltik asit yöntemine nazaran daha uzundur (Anonim, 2008b). Bu yöntemde 313-323 K, 40-50 °C sıcaklıkta 2-4 saat süreyle, %70'lik sülfürik asit ile biyokütle reaktör içerisinde muamele edilmektedir. Bu yöntemde hidroliz işlemi sonrasında materyal yıkanarak şekerlerin ayrılması sağlanmaktadır. Bir sonraki adımda ise selüloz fraksiyonlarının depolimerize olmasını sağlamak amacıyla materyalin kalan kısmından suyu uzaklaştırıldıktan sonra 373 K, 100 °C, 50 dakika süreyle %30-40 sülfürik asit solüsyonuyla ısıtılmaktadır (Chandel ve ark., 2007).

Konsantre asit yönteminin en önemli avantajı yüksek şeker verimi sağlamasıdır. Konsantre asit yöntemi, seyreltik asit yöntemine nazaran daha fazla maliyet düşürücü potansiyele sahiptir (Demirbaş, 2005). Konsantre sülfürik veya hidroklorik asitle çalışmak zor olmakla beraber, kullanılan tüm asitlerin yöntemin ekonomikliğini sağlamak amacıyla geri dönüştürülebilir ve tekrar konsantre olabilir nitelikte olması gerekir (Jeffries ve Jin, 2000).

Enzimatik Hidroliz: Bir diğer hidroliz metodu enzimatik hidroliz işlemi olup, enzimlerin bitki proteinlerinde bazı kimyasal reaksiyonlara sebep olması ile gerçekleşmektedir. Bu yöntemin uygulanmasında son yıllarda iki teknolojik gelişme sağlanmış olup bunlar enzimatik ve direkt mikrobiyal dönüşüm metodlarıdır (Demirbaş, 2005).

Selüloz hidrolizinde substratın lignin ve hemiselüloz içeriği, yüzey alanı ve selülozun kristallik derecesi gibi yapısal parametreler lignoselülozik materyallerin enzimatik hidroliz işlemi oldukça etkilemektedir. Enzimatik hidroliz işlemiyle lignoselülozlarda var olan glukanın yalnızca %20'si (wt) çözülebilir hale getirilebilirken, yapılan ön muamele işlemleri sayesinde enzimatik etkinin artırılabilceği belirtilmiştir. Uygun koşullar altında ön muamele işlemiyle selülozun neredeyse tamamı orjinal materyal içinde kalmakta ve bu da enzimatik hidrolizi büyük ölçüde etkilemektedir (Zhang ve Lynd, 2004).

Selülozik substratın enzimatik hidrolizi süresince çeşitli faktörler selülaz karışımının katalitik aktivitesini sınırlamaktadır. Bu sınırlamaların enzim- ve substrat- ilişkili faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Lu ve ark., 2001; Mais ve ark., 2002). Selülazların tekrar kullanımını veya geri dönüşümünü düşünmek şu anki teknoloji ile zordur; çünkü lignoselülozik substratlar üzerine selülazların adsorbsiyonu üzerine bugüne kadar elde edilen bilgiler eksik ve yetersizdir (Lu ve ark., 2001). Öte yandan selülozun enzimatik degradasyonu oldukça karmaşık bir işlem olmakla birlikte, bu degradasyon işlemi enzimlerin hareketli bileşenleri olarak yer aldıkları katı-sıvı faz sınırında meydana gelmektedir (Nutt, 2006). Selülaz enzim sistemleri çözünmez selülozik substrat üzerine etki ettiğinde eş zamanlı olarak üç süreç ortaya çıkmaktadır (Mosier ve ark., 2002): (1) çözünmemiş kalıntı selülozda

kimyasal ve fiziksel değişiklikler, (2) selüloz molekülünün yüzeyinden çözülebilir kısımların ayrılmasını kapsayan birincil hidroliz işlemi ve (3) çözülebilir ve düşük moleküler ağırlıklı kısımların ve hatta glikozun hidrolizini kapsayan ikincil hidroliz işlemleridir. Selülozik materyallerin enzimatik hidroliz oranı oldukça hızlı bir şekilde düşmektedir. Genel olarak enzimatik selüloz degradasyonu hızlı birincil faz ve bunu takip eden ve substrat tamamen tükeninceye kadar devam eden daha yavaş ikincil faz süreçlerinin toplamıyla karakterize edilebilir (Nutt, 2006).

Selülozun enzimatik hidrolizinde geniş çerçevede kullanılan enzimler endo-glukonazlar veya endo-1,4-β-glukanazlar (EG), ekzoglukanazlar veya sellobio hidrolazlar (CBH) ve β-glukosidazlardır (BGL) (Howard ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2006). Bahsedilen bu enzim türleri içinde EG enzimleri selüloz zincirinde rastgele kopmalara neden olarak degradasyon etkisini artıran en etkin türdür (Oyekola, 2004). EG selüloz zincirinin duyarlı olan intra moleküler β-1,4 glukosidik bağlarını hidrolizlerken, ekzo-glukonazlar çözülebilir sellobioz veya glikoz kısımlarını serbest bırakmak amacıyla selüloz zincirlerini uç noktalarında koparır. BGL ise sellobioz inhibisyonunu engellemek amacıyla sellobiozu glikoza hidrolizler (Zhang ve ark., 2006). BGL sellobiozun glikoza hidrolizini katalizleyerek hidroliz işlemi tamamlar (Heikinheimo, 2002).

Bakteriler ve mantarlar lignoselülozik materyallerin hidrolizi için kullanılan selülaz enzimini üretebilmektedirler. Bu mikroorganizmalar aerobik ya da aneorobik, mezofilik yada termofilik olabilirler. *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* ve *Streptomyces* sınıfına ait olan bakteriler selülaz üretebilmektedirler (Sun, 2002).

Filamentli mantarlar selülaz ve hemiselülaz enzimlerinin asıl kaynağını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Trichoderma sp.* (*T. viride*, *T. reesei*, *T. logibrachiatum*) türlerinin kristalin selülozu degrades etme kapasitesine sahip en üretken tür oldukları belirlenmiştir. CBH I ve CBH II en baskın *T.reesei* enzimleri olmakla beraber, toplam selüloolitik proteinin %60'ından fazlasını CBH I ve yaklaşık %20'sini CBH II kapsamaktadır (Gusakov ve ark., 2005). EG I ve EG II ise *T. reesei*'deki baskın endo-glukanazlar olup, CBH I gibi hareket ettikleri düşünülmektedir (Valjamae ve ark., 2001).

Ksilanların biyodegradasyonunda kullanılan enzimler ise endo-β-1,4 ksilanaz, β-ksilosidaz ve dallanmış yapıya sahip ksilanların hidrolizinde kullanılan α-L-arabinofuranosidaz, asetil ksilan esteraz, ferulik asit esteraz ve p-kumarik asit esteraz gibi enzim türleridir. Çizelge 4'te ksilan degradasyonunu kapsayan enzimler ile bunların etki mekanizması gösterilmektedir. Endo-ksilanaz ksilanların ana zincirine etki etmekte ve β-ksilosidaz ise ksilooligosakkaritlerin ksiloza hidrolizinde etkili olmaktadır. α-L-arabinofuranosidaz ksilan ana zincirinden arabinozu, α-glukouronidaz ise 4-O-metil glukouronik asit yan dallarını ksilan ana zincirinden uzaklaştırmaktadır. Esterazlar ise ksilanın ksiloz üniteleri ile asetik asit (asetil ksilan esteraz) veya arabinoz yan zincirleri ile ferulik asit (ferulik asit esteraz) ve p-kumarik asit (p-kumarik asit esteraz) gibi ferulik asitler arasındaki ester bağlarını hidrolize etmektedir.

Penicillium capsulatum ve *Talaromyces emersoni* gibi bir çok mikroorganizma ksilanı tamamıyla parçalayan enzim sistemlerine sahiptir (Filho ve ark., 1991). Bachmann ve Mc Carthy (1991) *Thermomonospora fusca*'nın endo-ksilanaz, β-ksilosidaz, α-arabinofuranosidaz ve asetil ksilan esteraz enzimleri arasında önemli bir sinerjistik interaksiyon olduğunu belirtmişlerdir. Bir çok ksilanaz dallanmış ksiloz üniteleri arasındaki glikosidik bağları koparmaz. Ksilan ana zincirinin tamamıyla hidrolizinden önce yan zincirlerin koparılması gereklidir (Lee ve Forsberg, 1987). Bunun dışında sadece birkaç enzim türü ksilooligosakkaritlerden yan zincirleri koparabilmektedir. Bu enzimler yan dalların koparılmasından önce ksilan ana zincirinin kısmi hidrolizine gerek duymaktadırlar (Poutanen

ve ark., 1991). Ksılan selüloza nazaran daha kompleks bir yapıya sahip olmasına ve hidrolizi için bazı spesifik haller gerektirmesine rağmen, selüloz gibi kristal bir yapı göstermediği için enzimatik hidrolize çok daha fazla yatkındır (Gilbert ve Hazlewood, 1993).

Çizelge 4. Heteroarabinoksılanların hidrolizini kapsayan enzimler (Saha ve ark., 1998).

ENZİM	ETKİ
Endo-ksilanaz	Özellikle ksılan ana zincirinde iç kısımlardaki β -1,4-ksiloz bağlarını hidrolize eder
Exo-ksilanaz	Ksilobioz'u serbest bırakarak β -1-4-ksilozu hidrolize eder
β -ksilosidaz	Ksilobiozdan ve kısa zincirli ksilooligosakkaritlerden ksilozu serbest bırakır
α -arabinofuranosidaz	Arabinoksılanlardan indirgen olmayan terminal α -arabinofuronozları hidrolize eder
α -glukouronidaz	Glukouronoksılanlardan glukouronik asitleri uzaklaştırır
Asetil ksılan esteraz	Asetil ksılanlardaki asetil ester bağlarını hidrolize eder
Ferulik asit esteraz	Ksılanlardaki ferulolilesterbağlarını hidrolize eder
p-kumarik asit esteraz	Ksılanlardaki p-kumarik ester bağlarını hidrolize eder

Mısır lifleri %15 selüloz ve %35 hemiselüloz yanında %20 nişasta içermektedir (Saha ve ark., 1998). Saha ve Bothast (1999) mısır lifindeki nişasta, selüloz ve hemiselülozun fermente edilebilir şekerlere dönüşümü için çeşitli ön muamele işlemlerini de kapsayan (sıcak su, alkali ve seyreltik asit) enzimatik sakkarifikasyon yöntemlerini denemişler ve sıcak su ön muamelesinin (121 °C, 1 sa.) nişasta ve selülozun enzimatik sakkarifikasyonunu kolaylaştırdığını ancak hemiselülozun enzimatik sakkarifikasyonunu etkilemediğini ortaya koymuşlardır. Alkali ile ön muamele görmüş mısır liflerinin (10:1 w/w, 121 °C, 3 sa.) hemiselülaz enzimiyle hidrolizi de benzer sonuçlar vermiştir. Elde edilen sonuçlar mısır lifi hemiselülozlarını monomerik şekerlere verimli bir şekilde dönüştüren hiçbir ticari hemiselülaz enziminin olmadığını ortaya koymuştur. Ancak hemiselüloz ve nişasta bileşiklerinin seyreltik asit ön muamelesiyle basit şekerlere dönüştürülmesi ile arta kalan selüloz kısmı ticari olarak kullanımı olan herhangi bir enzim ile glikoza dönüştürülebilir. Bu yöntem mısır liflerinin seyreltik asit ile ön muamelesini (%15 katı madde w/v, %0.5 H₂SO₄ v/v, 121 °C, 1 sa., pH 5.0) ve ardından ön muamele görmüş liflerin ticari selülaz ve β -glukosidaz enzimleriyle sakkarifikasyonunu kapsamakta olup, elde edilen monomerik şekerlerin verimi %85-100 arasında değişmektedir. Bu yöntemle furfural ve HMF gibi fermentatif mikroorganizmalar için inhibitör olarak kabul edilen yan ürünlerin oluşumu söz konusu değildir. Bu yüzden seyreltik asit ön muamelesi inhibitör bileşiklerinin oluşumunu engellemek ve devam eden enzimatik sakkarifikasyonda selülozun fermente olabilen şekerlere daha mükemmel bir şekilde dönüşümünü sağlamak amacıyla nispeten düşük sıcaklıklarda uygulanır.

Leathers ve Gupta (1997) *Aurebasidium sp.* türlerinden elde edilen ham enzim preparasyonlarının mısır lifinin sakkarifikasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Cristov ve ark. (1997) ise *Aurebasidium pullulans*'dan elde edilen ham enzim preparasyonlarının kısmen çözünür hamurlarda uzaklaşan ksılan fraksiyonları üzerinde etkin olduğunu belirtmişlerdir.

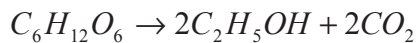
Saha (2001, 2002) mısır lifi ksilanını degrede etme kapasitesine sahip üç mantar kültürü belirlemiştir (*Fusarium proliferatum* NRRL 26517, *Fusarium verticillioides* NRRL Y-26518 ve *Mucor circinelloides* NRRL Y-26519). İzole edilmiş bu kültürlerden elde edilen ham enzim preparasyonları mısır lifi ksilanını degrede etme kapasitesine sahip iken, kültürlerden elde edilen saflaştırılmış endo-ksilanazlar benzer kapasiteye sahip değildir. Saflaştırılmış β -ksilosidazlar ksilobioz ve diğer kısa zincirli ksilooligosakkaritlerden ksilozu serbest bırakabilirler (Saha, 2001). Ksilanın daha etkin hidrolizi için endo-ksilanaz ile farklı ek enzim sistemlerinin karışımı bazı hallerde gerekli olabilmektedir. Ek enzim olarak β -ksilosidaz kullanıldığı takdirde ksiloz hidrolizinde enzimler arasında ortaya çıkan rekabet hidroliz işlemine sınır koymaktadır. Enzimatik sakkarifikasyonda hidroliz etkisini azaltmayan rekabetçi olmak yerine hidroliz etkisini artıran ek enzimlerin kullanımı daha olumlu sonuçlar ortaya koyabilmektedir.

Saha ve Bothast (1998) yulaf ksilanı üzerinde yetişen *Aureobasidium pullulans*'ın son derece termo stabil ekstrasellüler α -L-arabinofuronosidaz enzimini ürettiğini ve bu enzimin arabinoz ve dallanmamış arabinanı kolaylıkla hidrolize ettiğini ve farklı arabinoksilanlardan arabinozu uzaklaştırdıklarını belirtmişlerdir. Enzim üretimini daha çok arabinoz indüklemektedir (Saha ve Bothast, 1998). Dolayısıyla arabinozca zengin hemiselüloz hidrolizatları enzim üretimi için kullanılabilir.

Asit veya alkali hidroliz işlemleriyle karşılaştırıldığında enzimatik işlem daha ılımlı koşullar altında (pH 4.8 ve sıcaklık 318-323 K, 45-50 °C) gerçekleştirilir ve kazanda korozyon problemlerine neden olmaz. Enzimatik hidroliz işlemi asit katalizörlü hidroliz işlemlerine nazaran daha iyi verim sağlaması dolayısıyla daha fazla tercih edilmekte olup, yöntemin maliyet üzerindeki olumsuz etkileri ise son yıllarda üreticilerin üretimlerinde modern biyoteknolojiyi kullanmalarına bağlı olarak minimize edilmeye çalışılmaktadır (Pan ve ark., 2005).

4.3. Fermentasyon

Genellikle asit muamelesiyle hidrolize olmuş lignoselülozlardan elde edilen hidrolizatlar biyoetanol üretimi amacıyla daha çok maya gibi mikroorganizmalar ile muamele edilmektedirler. Lignoselüloz hidrolizatları glikoz haricinde ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz ve oligosakkaritleri de içermekte olup, kullanılan mikroorganizmaların tüm bu şekerleri etkin bir şekilde fermente edebilme kapasitesine sahip olması gerekir (Katahira ve ark., 2006). Aşağıda belirtilen reaksiyonlara bağlı olarak ksiloz ve glikozdan kg başına elde edilen maksimum teoritik verim 0.51 kg biyoetanol ve 0.49 kg CO₂'dir (Hamelinck ve ark., 2003, 2005; Balat ve ark., 2008).



Öte yandan fermentasyon işleminde kullanılan bazı mikroorganizmalar fermente edilebilir şekerleri besin kaynağı (yiyecek) olarak görebilmekte ve bunun sonucunda etil alkol ve diğer bazı yan ürünler oluşabilmektedir. Bu mikroorganizmalar daha çok glikoz gibi 6-karbonlu şekerleri tüketmektedirler. Bu yüzden yüksek glikoz içeriğine sahip selülozik biyokütlelerin biyoetanole dönüşümü daha kolay olmaktadır. Öte yandan etanolojenler olarak isimlendirilen mikroorganizmaların, biyokütleden elde edilen şekerlerin yalnızca çok az bir kısmını biyoetanole dönüştürebildiği belirlenmiştir (Demirbaş, 2004). Ancak önemli miktarlarda biyoetanol üretimi sağlayabilen çeşitli mikroorganizmalar da (%1 w/v'den fazla) mevcuttur (Stewart ve Russell, 1987).

Fermentasyon amacıyla yakın gelecekte çok daha fazla öneme sahip olacağı düşünülen etanolojenik bakteriler ise *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *Zymomonas mobilis*

türleridir (Dien ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda *Z. mobilis* bakterisi türlerinin glikoz bazlı hammaddelerden hızlı ve etkin bir şekilde biyoetanol üretme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiş olup, *Z. mobilis* ile yapılan karşılaştırılabilir performans denemelerinde geleneksel mayalara nazaran %5 daha yüksek verim ve beş katından daha fazla hacimsel verimlilik elde edildiği gözlemlenmiştir. *Z. mobilis* glikoz fermentasyonunda %97'den fazla biyoetanol verimi ve %12 (w/v)'den fazla biyoetanol konsantrasyonu sağlamaktadır (Mohagheghi ve ark., 2002). *Z. mobilis* glikoz ve fruktoz gibi heksoz şekerlerinden etkin şekilde biyoetanol üretebilir; ancak pentoz şekerlerinde aynı başarıyı gösterememektedir. Bakteri, maya ve filamentli mantarlar arasında ksiloz fermente edici mikroorganizmalar mevcuttur (Hahn-Hagerdal ve ark., 2006). Ksiloz fermente edici bakteriler doğal ve genetik olarak oluşmuş çeşitli organizmalara sahip olup, eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon için yararlı olabilecek birçok özelliğe sahiptirler (Çizelge 5) (Jeffries ve Jin, 2000).

Çizelge 5. Ksilozu fermente etme kapasitesine doğal olarak sahip olan ve üzerinde çalışılan bakteri türleri (Jeffries ve Jin, 2000).

TÜRLER	ÖZELLİKLERİ
<i>Clostridium acetobutlicum</i>	Ksilozun aseton ve bütanole fermentasyonunda başarılıdır, biyoetanol verimi düşüktür.
<i>Clostridium thermocellum</i>	Selülozu direkt olarak etanole ve asetik asite dönüştürme kapasitesine sahip, biyoetanol konsantrasyonları genellikle 5 g/l'den daha azdır.
<i>Escherichia coli</i>	Ksilozu doğal olarak biyoetanol, sukkinik ve asetik asite fermente etme kapasitesine sahip ancak etanol toleransı düşüktür, genetik olarak çalışılmış türleri genel olarak biyoetanol üretmektedir.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ksiloz ve sellobiozu doğal olarak hızlı bir şekilde fermente edebilirler, selülozun fermentasyonu ve biyoetanol üretimi geniş bir şekilde çalışılmaktadır.
<i>Lactobacillus pentoaceticus</i>	Ksiloz ve arabinozu tüketir, glikoz ve sellobiozu yavaş yavaş kullanır, asetik asit ve laktik asit 1/1 oranında üretilir.
<i>Lactobacillus casei</i>	Laktozu çok iyi bir şekilde fermente edebilir.
<i>Lactobacillus xylosus</i>	Besin kaynağı gerekli olduğu durumda sellobiozu kullanır: n-glikoz, D-ksiloz ve L-arabinozu kullanmaktadır.
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Homokatalitik fermentasyon sağlar, bazı alt türleri sülfid atık çözeltisinden laktik asit üretebilir.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sellobiozu glikoz, ksiloz ve arabinozdan daha hızlı bir şekilde tüketir, pektinleri depolimerize etmiş gibi görünür, tarımsal atıklardan laktik asit üretir.
<i>Zymomonas mobilis</i>	Normal olarak glikoz ve fruktozu fermente eder, ksiloz fermentasyonu üzerine araştırmalar devam etmektedir.

E. coli ise ksiloz fermente edici bir bakteri türü olup, son yıllarda fermentasyon amacıyla tercih edilebilmektedir. Etanolojen *Z. mobilis* bir takım avantajlarına rağmen yalnızca glikoz, fruktoz ve sakkarozun dönüşümünü sağladığı için biyokütlenin dönüşümünde tam olarak yeterli bir tür olmamaktadır. Ancak son on yıl içinde NRRL (Enerji Departmanı, USA)'de yapılan bazı çalışmalar ksiloz ve arabinoz fermente edici türlerin varlığını ortaya koymuştur (Dien ve ark., 2003). *E. coli* ve *K. oxytoca* arabinozu doğal bir şekilde metabolize etmekte olup, öyle ki etanolojenik bu türler tüm lignoselüloz türevli şekerleri fermente edebilmektedirler (Hahn-Hagerdal ve ark., 2006).

K. oxytoca ise enterik bir bakteri türü olup kağıt ve kağıt hamurunda gelişme gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bakteri pH 5.0 ve 308 K, 35 °C sıcaklıkta gelişme gösterme kapasitesine sahip olup, sellobioz ve sellotrioz kadar heksoz ve pentoz içeren şekerler de etkili olmaktadır.

E. coli ve *K. oxytoca*, *Z. mobilise* nazaran daha fazla şeker substratı üzerinde etkin olmaktadır (Dien ve ark., 2003).

Son yıllarda ise, bakterilerle etanol fermentasyonunun (özellikle pentozların etanole fermentasyonu) sınırlı düzeyde gerçekleşmesi nedeniyle, bakteriler üzerinde genetik çalışmalar yapılarak (bakterilerin genleri ile oynanarak) özellikle 5-karbonlu şekerleri fermente etme yetenekleri artırılmaya çalışılmaktadır. Nichols ve ark. (2001) glikoz fosfo-transferans (ptsG) mutasyonuna sahip etanolojenik *E. coli* türleri ile yaptıkları çalışmalarda mutantların karışık şekerleri (glikoz, ksiloz, arabinoz) sıralı olmaktan ziyade eş zamanlı olarak %87-94 verimlerde etanol fermente edebildiklerini göstermişlerdir. Martinez ve ark. (1999) ise daha yüksek gen dozajları (plasmidler) kullanarak etanolojenik rekombinant *E. coli* kompleks besinlerine olan gereksinimi ortadan kaldırmışlardır. Bunun dışında %6 oranına kadar etanol üretebilen rekombinant *E. coli* mutantları geliştirilmiştir (Yomano ve ark., 1998). Rekombinant *Z. mobilis* içine aktarılmış olan dört gen sayesinde tek karbon kaynağı olarak ksiloz üzerinde yetişmekte ve teoritik verimin %86'sı ölçüsünde etanol üretmektedir (Zhang ve ark., 1995). Deng ve Ho (1990) pentoz fosfat yolu (pentose phosphate pathway-PPP) aracılığıyla fosforilasyonun ksiloz metabolizması için önemli bir adım olduğunu ortaya koymuşlardır. *S. cerevisiae*'den elde edilen XKS1 (ksilokinaz) ve *P. stipitis*'den elde olunan XYL1 ve XYL2 heterolog genleri *Saccharomyces uvarum* ve *Saccharomyces diastaticus*'un eşleştirilmesiyle elde edilen hibrit mayaya aktarıldığında sadece ksilozun üzerinde yetiştirme kapasitesine sahip olabilen *Saccharomyces pLNH32* türü elde edilmiştir. Eliasson ve ark. (1990) XYL1-XYL2-XYLS1 kasetinin tek kopyasını *S. cerevisiae* kromozomuna yerleştirerek *TMB3001* rekombinant suşunu elde etmişlerdir. Bu tür minimal ortam kullanarak sürekli kültürle üretim gerçekleştirildiğinde sırasıyla 0.47 ve 0.21 (gg⁻¹h⁻¹) oranlarında glikoz ve ksiloz üretebilmektedir. Sedlak ve Ho (2001) ise *S. cerevisiae*'deki *E.coli* arabinoz metabolize edici genlerini [arab (L-ribulokinaz), araA (L-arabinoz isomeraz) ve araD (L-ribuloz-5-fosfat)] klonlayarak araBAD operonlarına dönüştürmüşlerdir; ancak elde edilen rekombinant organizma arabinozdan gözle görülür miktarda etanol üretememiştir. Zhang ve ark. (1998) ksiloz ve arabinoz metabolize edici genleri ve PPP genlerini klonlayarak *Z. mobilis* (*PZB301*) e aktarmışlar ve rekombinat bir suş oluşturmuşlardır. Bu rekombinant tür ksiloz ile arabinozdan oluşam şeker karışımında 30 °C'de 80-100 saat arasında %82-84 teoritik verimle etanole fermente etme becerisi göstermiştir. Richard ve ark. (2002) *S. cerevisiae*'deki L-arabinoz katabolik yolundaki tüm beş enziminin (aldoz reduktaz, L-arabinitol 4-dehidrogenaz, L-ksiluloz reduktaz, ksilitol dehidrogenaz ve ksilokinaz) aşırı üretimi ile *S. cerevisiae*'nin L-arabinoz üzerinde büyüme yeteneği kazandığını ortaya koymuşlardır. Ön muamele süresince ortaya çıkan yaygın fermentasyon inhibitörlerine tolere etme ve hemiselüloz biyokütlesinden rekabetçi ve ekonomik fuel-etanol elde etme becerisine sahip güçlü, etanol toleranslı, istikrarlı rekombinant etanolojenik organizmalar gelecek için büyük öneme sahiptirler.

Fermentasyon işlemi amacıyla en fazla kullanılan mikroorganizmalardan biride mayalardır. *Saccharomyces cerevisiae*, heksozlardan yüksek biyoetanol üretimi sağlaması ve lignoselülozik biyokütlenin asit hidrolizatlarında biyoetanol ve diğer inhibitör bileşikler yüksek toleransı nedeniyle biyoetanol üretiminde kullanılan en etkin maya türüdür; ancak bu maya ksiloz ve arabinoz gibi şekerleri etanole fermente edememektedir. *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* ve *Candida shehate* mayaları ise doğal olarak (doğal yapılarıyla) ksilozu etanole fermente etme kapasitesine sahiptirler (Wang ve ark., 1980; Schneider ve ark., 1981; Bothast ve Saha, 1997). Ksilozdan etanol üretiminde bu mayaların kullanımını; mayaların düşük etanol toleransı, uzun fermentasyon süresi, optimal seviyede oksijen ile besleme oranının kontrolündeki zorluk ve ayrıca lignoselülozik materyalin ön muamele veya hidrolizi süresince oluşan inhibitörler hassas olmaları gibi faktörler sınırlamaktadır. Bununla birlikte izomeraz enzimleri kullanılarak ksiloz ksiluloza dönüştürülebilir ve ksilulozda ticari

mayalar kullanılarak etanole dönüştürülebilir (Gong ve ark., 1981; Hahn-Hagerdal ve ark., 1986); ancak bu yöntem maliyet açısından uygun değildir. Arabinoz ise hemiselüloz hidrolizatlarında kaynağa bağlı olarak var olan bir diğer 5-karbonlu şekerdir ve yalnızca birkaç maya türü arabinozu etanole fermente edebilir (Chen ve Gongi, 1985; Dien ve ark., 1996). Görüldüğü üzere doğal olarak bulunan hiçbir maya türü tüm şekerleri etanole fermente edememektedir.

Mikroorganizmaların biyoetanol fermentasyonu performans parametrelerine (sıcaklık aralığı, pH aralığı, alkol toleransı, gelişme oranı, verimlilik, ozmotik tolerans, özgüllük, verim, genetik stabilite ve inhibitör toleransı) ve diğer gereksinimlerine (var olan ürünlerle uyum, yöntem ve donanım) bağlı olarak değişim göstermektedir (Demirbaş, 2004). Bir organizma hayatta kalabilmek amacıyla mutlak suretle pH dengesini sürdürebilmelidir, öyle ki çoğu bakteri 6.5-7.5 gibi dar bir pH aralığına gelişim gösterebilmektedir (Aminifarshidmehr, 1996). Mayalar ve mantarlar ise 3.5-5.0 gibi daha geniş bir pH aralığına tolere edebilmektedirler. Bundan başka organizmaların çoğu %10-15 (w/v)'ten yüksek biyoetanol konsantrasyonlarını tolere edememektedirler (Anonim, 2008c).

Fermentasyon işlemi kesintili veya kesintisiz sistemlerden oluşabilmektedir. En uygun yöntemin seçilmesi ise mikroorganizmaların kinetik özelliklerine, lignoselülozik hidrolizatın tipine ve yöntemin ekonomikliğine bağlıdır (Chandel ve ark., 2007). “Kesikli beslemeli-fed batch” (kültürün gelişimi için besin ilavesinin yapıldığı kesintili sistemler) fermentasyon reaktörleri kesintili ve kesintisiz yöntemlerin her ikisine nazaran sağladığı faydalarla endüstriyel olarak uygulama alanı bulmuştur (Saarela ve ark., 2003). Fed-batch sistemi biyoreaktörde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmak amacıyla uygulanır. Çoğunlukla besin solüsyonu biyoreaktörün dilüsyonunu önlemek amacıyla konsantre halinde uygulanır ve kontrollü olarak ilave edilen besin, kültürü gelişimini direk olarak etkiler. Ayrıca sisteme yapılan besin ilavesi, çeşitli metabolitlerin (*Escherichia coli* için asetat, hücre kültürlerinde laktik asit, *S. cerevisiae*' de etanol gibi yan metabolitlerin oluşumu) aşırı birikimini engellemektedir. Genel olarak kültürün gelişimini kısıtlayan glikoz olup, kültüre konsantre glikoz şurubu olarak eklenmektedir (600-850 G/L). Fed-batch sisteminin batch (kesintili) sisteme kıyasla en önemli avantajı hücre konsantrasyonunu arttırması, kültürün yaşam sürecini uzatması ve yüksek konsantrasyonlara ulaşmak için ürünlerin kümelenmesine izin vermesidir (Frison ve Memmert, 2002).

4.4. Ethanol Eldesi/Distilasyon

Biyokütlenin hidrolizi ve fermentasyonunda ilerleyen teknolojik gelişmeler ve ticari uygulanabilirlik çalışmaları yanında, fermentasyon sonucunda elde edilen ürünlerin toplanması üzerine de gerekli çalışmaların yapılması önem arz etmektedir, öyle ki fermentasyon ürünleri çoğunlukla sudan daha uçucu olup, toplanmaları daha çok distilasyon yoluyla yapılmaktadır. Fermentasyon sonucu oluşan ve uçucu ürünleri içeren süspansiyon halindeki materyalden ürünlerin toplanmasında ticari olarak geliştirilmiş distilasyon teknolojisi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Madson ve Lococo, 2000). Distilasyon sistemiyle sıvı karışım içinde biyoetanol sudan ayrılabilir. İşlenmemiş biyoetanolün su içeriği ise genel olarak %80'den fazladır. Etanolü %95.6 konsantrasyonuna (etanölün suyla eş kaynar karışımı) ulaştırmak amacıyla oldukça yüksek enerji gereksinimi vardır.

5. Dünya’da ve Ülkemizde Biyoetanolün Stratejik Önemi

1970’lerin başında Brezilya’nın öncülüğünde başlayan biyoetanol üretimi ve otomobillerde kullanımı 1980’lerde ABD’nin de üretime katılımı ile büyük ivme kazanmıştır. Biyoetanol kullanımının yaygınlaşması tarım sektörü için yüksek katma değerli yepyeni bir sanayi uygulaması başlatmıştır. Biyoetanolün içeriğindeki yüzde 35 oksijenden dolayı motorlarda benzinin yerine kullanıldığı oranda zehirli egzoz gazlarının emisyonunu azaltmaktadır. Biyoetanol kullanımının artması petrol ve petrol türevi ürünlerin ithalatını azaltmaktadır. Özellikle yerli tarım ürünü kullanan ülkeler, biyoetanol üretimi ile yaratılan katma değerini tamamını ülkelerinde alıkoymaktadırlar. Yenilenebilir enerji kaynaklarının içinde en yüksek üretim potansiyeline sahip olan biyoetanol tüm anılan özellikleri açısından üretici ülkeler için stratejik önem arz etmektedir.

Biyoetanolün benzine karışım oranı %10 düzeyinde olan ABD’de, E85 (%85 biyoetanol+%15 benzin) uygulaması hedeflenmektedir. Ayrıca hava kirliliğinin azaltılması için biyoetanol kullanımı yasal düzenlemelerle zorunlu hale getirilmiştir (Kavruk ve Atalay, 2007). Halen şeker kamışından yaptığı biyoetanol üretimi ile dünyadaki en düşük üretim maliyetine sahip olan Brezilya, 2006 yılında 13 milyon ton biyoetanol üretimi gerçekleştirmiştir. Biyoyakıt üretiminde Hindistan, ekolojisine uygun *Jatropha* bitkisine yoğunlaşmıştır. Dolayısıyla mevzuatını ve araştırmalarını bu doğrultuda düzenlemiştir (Anonim, 2007a). Uzakdoğu’da hızla artan biyoetanol üretiminde başı Çin çekmektedir. Hızla büyüyen Çin ekonomisinin enerji ihtiyacı da artmaktadır. Bu doğrultuda kendi kaynaklarına yönelik ulusal biyoyakıt politikasını kararlılıkla uygulamaktadır (Anonim, 2007b). Öte yandan Japonya özellikle Brezilya’da üretim tesisleri satın almaktadır (Anonim, 2010a). Yeni Zelanda hemen hemen tüm peynir üretiminden gelen atıksularından biyoetanol üretmekte ve yoğun enerji talebi olan Japonya ve Singapur’a ihraç etmektedir (Anonim, 2010b).

Avrupa Birliği, 2003 yılında yayınladığı direktif ile 2010 yılında tüm üye ülkelerde biyoyakıt kullanımını %5.75 (petrol eşdeğeri) olarak hedeflemiş ancak 2006 yılında yapılan değerlendirmeler sonucunda söz konusu hedefin yetersiz kalacağı tespit edilince, 8-9 Mart 2007’de toplanan Başkanlık Konseyi yeni bir direktif teklifini onaylayarak hem biyoyakıt kullanımını zorunlu kılmaya karar vermiş hem de yeni hedefi 2020 yılında yüzde 10 olarak belirlemiştir. Avrupa Birliği, aynı çalışma neticesinde teknik alanda da biyoetanol kullanımının artmasını kısıtlayan benzin standartlarında revizyona gitmiştir. Avrupa Birliği’nde 2006 biyoetanol üretimi 2.7 milyon ton olmuştur. Avrupa Birliği stratejik öneme haiz biyoetanol üretiminde bir miktar geride kalmış olsa da, özellikle tarım sektörü büyük olan üye ülkelerin tamamında yeni üretim tesisleri inşa halindedir (Anonim, 2010a).

2004 yılından bu yana Türkiye’de üretilmekte olan biyoetanol halen yürürlükteki ÖTV uygulaması nedeniyle benzine yüzde 2 oranında harmanlanabilmektedir. Önümüzdeki günlerde biyoetanol karışım oranına gelecek düzenlemelere bağlı olarak, ülkemizdeki tüketim miktarının artacağı beklenmektedir. Ayrıca dizel araçlarda %15 oranına kadar biyoetanol kullanılmaya başlanılmıştır.

Türkiye, dünyanın sekizinci büyük tarım ürünleri üreticisi olarak yılda 19 milyon ton buğday ve 3.5 milyon ton mısır üretimini gerçekleştirmektedir. Bu tarım potansiyeline rağmen vergilendirme nedeni ile Türkiye yılda 132.000 m³’lük bir üretim kapasitesine sahiptir. Bu ise Avrupa Birliği toplamının yaklaşık yüzde 5’ini ifade etmektedir (Anonim, 2010c).

Türkiye biyoetanol pazarının büyümesi, Avrupa Birliği’nde hedeflenen harmanlama oranına Türkiye’de de izin verilmesi ile olacaktır. Bu ise Türkiye’de ÖTV mevzuatının değiştirilmesi ile mümkündür. Türkiye’nin Avrupa Birliği’nin yeni tesis ettiği ve zorunlu olan

yüzde 10 biyoetanol kullanım hedefini yakalaması halinde ise yurt içi olası pazar büyüklüğü 345,000 m³/yıl olacaktır.

6. Sonuç ve Öneriler

Enerji talebinin büyük bir bölümünü ithalatla karşılayan ülkemizde, sürdürülebilir enerjinin sağlanması için yenilenebilir enerji kaynaklarından biri olan biyoetanol üretimi önemli ve büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Artan nüfusa bağlı olarak gıda ve enerjiye olan gereksinim her geçen gün artmakta ve bu konu özellikle ülkemiz için çok daha fazla önem arz etmektedir.

Biyoyakıt sektörü ülkemiz için ekonomik ve sosyal anlamda büyük bir fırsat taşımakta olup, bu sektörün gelişmesiyle ülkemizde yenilenebilir hammadde kaynaklarına ve dolayısıyla tarım alanlarına daha fazla yönelim gerçekleşecek ve bu sayede hem enerji sektörü hem de tarım ve ormancılık sektörüne büyük katkı sağlanacaktır. Yerli hammadde ile standartlara uygun olarak üretilebilecek biyoyakıtlar ülke ekonomisine olduğu kadar daha refah bir kırsal kesim yaşantısına da olanak sağlayacaktır. Gerek hammadde imkanları gerekse yerli sanayi imkanları kullanılarak üretilen biyoyakıtların ulusal ve uluslar arası ticareti ülkemizde önemli bir katma değer yaratabilir. Ancak mevcut potansiyeli iyi değerlendirmenin yolu bu adımda atılabilecek iyi bir vizyondan geçmektedir. Şöyle ki, küresel ısınma ve buna bağlı iklim değişikliği nedeniyle ekilebilir alanların azalması yada az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerin tarımda vizyon eksikliği, öngörülükleri ve yönetim zafiyetleri mevcut hammadde kaynakları ne kadar fazla olursa olsun etkin ve verimli bir üretimin gerçekleşmesine engel olacaktır. Yapılabilecek düzenlemeler ve alınabilecek önlemler sayesinde ülkemiz tarımına yeni ve katma değeri yüksek bir sektör kazandırılmış olacak hemde tarım ürünlerimiz çeşitlendirilmiş olacaktır. Öte yandan akaryakıt fiyatlarındaki artışlar tarımsal üretimdeki maliyeti doğrudan etkilemektedir. Dolayısıyla biyoetanol kullanımının tarım sektörüne getirdiği büyük katma değer ve petrol ithalatını azaltıcı etkisi göz önüne alınarak yerli tarım ürünlerinden üretilen biyoetanolün ÖTV muafiyeti olabildiğince artırılmalıdır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda odun biyokütlesi yerine farklı hammadde kaynaklarından (nişasta içerikli tüm bitkisel kaynaklar-tarımsal atık, yıllık bitki vb.) biyoetanol üretimi üzerine birçok çalışma yapıldığı ve bu çalışmaların o ülkelerin hükümetleri tarafından desteklendiği ve biyoyakıt pazarını genişletmek için yasal çalışmalar sürdürdükleri görülmektedir. Fosil kökenli yakıt kaynaklarının yerine günümüzde sağladığı avantajlarıyla özellikle enerji sektöründe bir devrim haline gelen biyoetanol üretiminin odun biyokütlesi yerine farklı yenilenebilir hammadde kaynaklarından sağlanabiliyor olması özellikle bu sektör ve ülke ekonomisi için ikinci büyük devrimdir. Yıllık bitki ve tarımsal atıkların bu sektörde değerlendirilmesiyle hem ormanlara olan talebin azalacağı hem de var olan potansiyelleri ile orman endüstrisinde ve enerji üretimi amaçlı kullanım alanlarında önemli bir boşluğu dolduracakları kesindir. Üretimde yada hammaddede yapılabilecek modifikasyonların biyoetanol verimi üzerindeki etkileri bilim adamlarınca sürekli çalışılmaktadır. Ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerin bu denli verim artırıcı yaklaşımlara önem vermesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Acaroğlu M., "Alternatif Enerji Kaynakları", ISBN, 975-6574-25-9, 208-209, 2003.
- Agbogbo F., Wenger K., "Effect Of Pretreatment Chemicals on Xylose Fermentation By *Pichia stipitis*", Biotechnol. Lett., 28, 2065–2069, 2006.
- Alizadeh H., Teymouri F., Gilbert T.I., et al., "Pretreatment of Switchgrass By Ammonia Fiber Explosion (AFEX)", Appl. Biochem. Biotechnol., 124, 1133–1141, 2005.
- Aminifarshidmehr N., "The Management of Chronic Suppurative Otitis Media with Acid Media Solution", Am. J. Otol., 17, 24–25, 1996.

- Anonim, 2007a. http://www.ethanolindia.net/biodiesel_india.html. [ulaşım Aralık 12, 2007].
- Anonim, 2007b. <http://www.biofuelsbusiness.com/country.asp>. [ulařım Ocak 20, 2007].
- Anonim, 2008a. <http://www.abengoabioenergy.com/bioethanol>. [ulaşım Kasım 27, 2008.]
- Anonim (2008b). www.ethanol-gec.org/information/briefing/20a. [ulařım Haziran 22, 2008.]
- Anonim, 2008c. www.p2pays.org/ref/38/37753. [ulaşım Mayıs 23, 2008].
- Anonim (2010a). <http://www.gidasanayii.com/> [ulařım Haziran 21, 2010].
- Anonim (2010b). [://www.tarimmerkezi.com/yazar_kose.php?hid=29707](http://www.tarimmerkezi.com/yazar_kose.php?hid=29707) [ulařım Haziran 21, 2010].
- Anonim (2010c). <http://www.konyaseker.com.tr> [ulařım Temmuz 28, 2010].
- Anonim (2011). <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sakkaroz> [ulaşım Mayıs 24, 2011].
- Bachmann S.L., McCarthy A.J., “Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constituting The Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2121–2130, 1991.
- Badger P.C., “Ethanol from Cellulose: A General Review. In: Janick J, Whipkey A, editors. Trends In New Crops and New Uses. Alexandria, VA: ASHS Press, 17–21, 2002.
- Balat M., Balat H., Öz C., “Progress In Bioethanol Processing”, *Progress In Energy And Combustion Science*, 34, 551–573, 2008.
- Ballesteros I., Ballesteros M., Cabañas A., et al., “Selection of Thermotolerant Yeasts for Simultaneous Saccharification and Fermentation Process (SSF) Of Cellulose To Ethanol”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28–29, 307–315, 1991.
- Bertilsson M., “Simultaneous Saccharification and Fermentation of Spruce—A Comparison of Pretreatment Conditions and Different Enzyme Preparations”, Master Thesis, Department of Chemical Engineering, Lund University, Lund, Sweden, 2007.
- Bothast R.J., Saha B.C., “Ethanol Production from Agricultural Biomass Substrates”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 44, 261–286, 1997.
- Brink D.L., “Method of Treating Biomass Material”, US Patent 5221357, 1993.
- Brownell H.H., Saddler J.N., “Steam Explosion Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis”, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 14, 55–68, 1984.
- Brownell H.H., Saddler J.N., “Steam Pretreatment of Lignocellulosic Material for Enhanced Enzymatic Hydrolysis”, *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 228–235, 1987.
- Coughlan M.P., Hazlewood G.P., “B-1,4-Xylan-Degrading Enzyme Systems: Biochemistry, Molecular Biology and Applications”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 259–289, 1993.
- Cao N.J., Krishnan M.S., Du J.X., et. al., “Ethanol Production From Corn Cob Pretreated By The Ammonia Steeping Process Using Genetically Engineered Yeast”, *Biotechnol. Lett.*, 18, 1013–1018, 1996.
- Cardona C.A., Sanchez O.J., “Fuel Ethanol Production: process Design Trends And Integration Opportunities”, *Bioresource Technol.*, 98, 2415–2457, 2007.
- Champagne P., “Feasibility of Producing Bio-Ethanol from Waste Residues: A Canadian Perspective, Resources”. *Conserv. Recycl.*, 50, 211–230, 2007.
- Chandel A.K., Es C., Rudravaram R., et. al., “Economics and Environmental Impact of Bioethanol Production Technologies: An Appraisal”, *Biotechnol Molec. Biol. Rev.*, 2, 14–32, 2007.
- Chen L.F., Gongi C.S., “Fermentation of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzate to Xylitol By A Hydrolyzate-Acclimatized Yeast”, *J. Food Sci.*, 50, 226–228, 1985.,
- Chen Y., Sharma-Shivappa R.R., Chen C., “Ensiling Agricultural Residues for Bioethanol Production”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 143, 80–92, 2007.
- Christov L.P., Myburgh J., van Tonder A., et. al., “Hydrolysis of Extracted and Fiber-Bound Xylan with *Aureobasidium pullulans* Enzymes”, *J. Biotechnol.*, 55, 21–29, 1997.

- Dale M.C., Moelhman M., “Enzymatic Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Biomass to Ethanol in A Pilot 130 L Multistage Continuous Reactor Separator”, Ninth Biennial Bioenergy Conference, Buffalo, New York, October 15–19, 2000.
- Demirbas A., “Ethanol from Cellulosic Biomass Resources”, *Int. J. Gren. Ener.*, 1, 79–87, 2004.
- Demirbas A., “Global Biofuel Strategies”. *Energy Edu. Sci. Technol.*, 17, 32–63, 2006.
- Demirbas A., “Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass” *Energy Sources.*, 27, 327–337, 2005.
- Demirbas A., “Progress and Recent Trends in Biofuels”, *Prog. Energy Combust Sci.*, 33, 1–18, 2007.
- Deng X.X., Ho N.W.Y., “Xylulokinase Activity in Various Yeasts Including *Saccharomyces cerevisiae* Containing The Cloned Xylulokinase Gene”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25, 193–199, 1990.
- Dien B.S., Kurtzman C.P., Saha B.C., et. al., “Screening for L-Arabinose Fermenting Yeasts”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58, 233–242, 1996.
- Dien B.S., Cotta M.A., Jeffries T.W., “Bacteria Engineered for Fuel Ethanol Production: Current Status”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 258–266, 2003.
- Doner L.W., Hicks K.B., “Isolation of Hemicellulose from Corn Fiber By Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction”, *Cereal. Chem.*, 74, 176–181, 1997.
- Duff S.J.B., Murray W.D., “Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: A Review”, *Bioresour. Technol.*, 55, 1–33, 1996.
- Eda S., Ohnishi A., Kato K., “Xylan Isolated from The Stalk of *Nicotiana tabacum*”, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 359–364, 1976.
- Eggeman T., Elander R.T., “Process and Economic Analysis of Pretreatment Technologies”, *Bioresource Technol.*, 96, 2019–2025, 2005.
- Eklund R., Zacchi G., “Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Willow”, *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 255–259, 1995.
- Eliasson A., Christensson C., Wahborn C.F., et. al., “Anaerobic Xylose Fermentation By Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Harboring XYL1, XYL2 and XKS1 in Mineral Media Chemostat Cultivations”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3381–3386, 2000.
- Filho E.X.F., Touhy M.G., Pulls J., et. al., “The Xylan-Degrading Enzyme Systems of *Penicillium capsulatum* and *Talaromyces emersonii*”, *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 25S, 1991.
- Frison A., Memmert K., “Fed-Batch Process Development for Monoclonal Antibody Production With Cellferm-Pro”, *Genetic Eng. News.*, 22, 66–67, 2002.
- Galbe M., Zacchi G., “A Review of the Production of Ethanol from Softwood”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 618-628, 2002.
- Gilbert H.J., Hazlewood G.P., “Bacterial Cellulases and Xylanases”, *J. Gen. Microbiol.*, 139, 187–194, 1993.
- Gong C.S., Chen L.F., Flickinger M.C., et. al., “Production of Ethanol from D-Xylose By Using D-Xylose Isomerase and Yeasts”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 430–436, 1981.
- Granstorm T., Ojama H., Leisola M., “Chemostat Study of Xylitol Production By *Candida guilliermondii*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 36–42, 2001.
- Gurgel P.V., Manchilha I.M., Pecanha R.P., et. al., “Xylitol Recovery from Fermented Sugarcane Bagasse Hydrolyzate”, *Bioresour. Technol.*, 5, 219–223, 1995.

- Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Salanovich T.N., et. al., “Purification, Cloning and Characterisation Of Two Forms of Thermostable and Highly Active Cellobiohydrolase I (Cel7A) Produced By The Industrial Strain of *Chrysosporium lucknowense*”, *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 57–69, 2005.
- Güler C., Akgül M., “Enerji Üretiminde Odun ve Tarımsal Artıkların Değerlendirilmesi”, *Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu ve Sergisi, Kayseri*, 2001, 265-272.
- Hahn-Hagerdal B., Berner S., Skoog K., “Improved Ethanol Production from Xylose with Glucose Isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* Using Respiratory Inhibitor Azide”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 287–293, 1986.
- Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., et. al., “Bio-Ethanol—The Fuel of Tomorrow From The Residues of Today”, *Trends Biotechnol.*, 24, 549–556, 2006.
- Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., “Prospects for Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance As Development Progresses”, *Scientific Report- NWS-E-2003-55*, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands: Copernicus Institute, Department of Science, Technology and Society, 2003, 35pp.
- Hamelinck C.N., van Hooijdonk G., Faaij A.P.C., “Ethanol From Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short-, Middle- and Long-Term”, *Biomass Bioenergy*, 28, 384–410, 2005.
- Heikinheimo L., “*Trichoderma reesei* Cellulases In Processing of Cotton”, Espoo 2002, VTT Publications 483, VTT Technical Research Centre of Finland, 2002.
- Howard R.L., Abotsi E., van Rensburg E.L.J., et. al., “Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production”, *Afr. J. Biotechnol.*, 2, 602–619, 2003.
- Hussein M.Z.B., Rahman M.B.B.A., Yahaya A.H.J., et. al., “Oil Palm Trunk As A Raw Material for Activated Carbon Production”, *J. Porous Mater.*, 8, 327–334, 2001.
- Indacoechea I., Bolado S., Garcı’a-Cubero M.T., et. al., “Pretreatment Processes of Lignocellulosic Material for Bioethanol Conversion: Ozonolysis”, *17th International Congress of Chemical and Process Engineering*, Chisa, Prague, 2006.
- Jeffries T.W., Jin Y.S., “Ethanol and Thermotolerance in The Bioconversion of Xylose By Yeasts”, *Adv. Appl. Microbiol.*, 47, 221–268, 2000.
- Jeoh T., “Steam Explosion Pretreatment of Cotton Gin Waste for Fuel Ethanol Production”, *Master’s Thesis*, Virginia Tech. University, VA, 1998.
- Karaosmanoğlu, F., “Biyoyakıt Teknolojisi ve İTÜ araştırmaları”, *ENKÜS 2006- İTÜ Enerji Çalıştay ve Sergisi, İstanbul*, 22-23 Haziran 2006.
- Karimi K., Emtiazi G., Taherzadeh M.J., “Ethanol Production from Dilute-Acid Pretreated Rice Straw By Simultaneous Saccharification and Fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 138–144, 2006.
- Katahira S., Mizuike A., Fukuda H., et. al., “Ethanol Fermentation from Lignocellulosic Hydrolysate By A Recombinant Xylose- and Cellooligosaccharide-Assimilating Yeast Strain”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 1136–1143, 2006.
- Kavruk H.R., Atalay A., “Enerji Tarımına Geçiş Sürecinde Biyoyakıtlara Bakış ve Bakanlığımız Politikaları”, *4. Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB Makine Mühendisleri Odası, Kayseri Şubesi*, 23-24 Kasım 2007, Kayseri, 2007, 71-80.
- Kim K.H., Hong J., “Supercritical CO₂ Pretreatment of Lignocellulose Enhances Enzymatic Cellulose Hydrolysis”, *Bioresource Technol.*, 77, 139–144, 2001.
- Knauf M., Moniruzzaman M., “Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective”, *Int. Sugar J.*, 106, 147–150, 2004.

- Kormelink F.J.M., Voragen A.G., “Degradation of Different [(glucurono)arabino]Xylans by A Combination of Purified Xylan-Degrading Enzymes”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 688–695, 1993.
- Kurakake M., Kisaka W., Ouchi K., et. al., “Pretreatment with Ammonia Water for Enzymatic Hydrolysis of Corn Husk, Bagasse, And Switchgrass”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 90, 251–259, 2001.
- Kurakake M., Ouchi K., Kisaka W., et. al., “Production of L-Arabinose And Xylose from Corn Hull And Bagasse”, *J. Appl. Glycosci.*, 52, 281–285, 2005
- Leathers T.D., Gupta S.C., “Saccharification of Corn Fiber Using Enzymes from *Aureobasidium sp.* Strain NRRL Y-2311- 1”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 59, 337–347, 1997.
- Lee S.F., Forsberg C.W., “Purification and Characterization of An A-L-Arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum ATCC 824*”, *Can. J. Microbiol.*, 33, 1011–1016, 1987.
- Lee Y.J., “Oxidation Of Sugarcane Bagasse Using A Combination of Hypochlorite and Peroxide”, Master’s Thesis, Department of Food Science, Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2005.
- Li Y., Ruan R., Chen P.L., et. al., “Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover Pretreated By Combined Dilute Alkaline Treatment and Homogenization”, *Trans. ASAE.*, 47, 821–825, 2004.
- Linoj Kumar N.V., Dhavala P., Goswami A., et. Al., “Liquid Biofuels In South Asia: Resources and Technologies”, *Asian Biotechnol. Develop. Rev.* 8, 31–49, 2006.
- Lu Y., Yang B., Gregg D., et. al., “Cellulase Adsorption and An Evaluation of Enzyme Recycle During Hydrolysis of Steam-Exploded Softwood Residues”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98–100, 641–654, 2001.
- Mabee W.E., Saddler J.N., Nielsen C., et. al., “Renewable-Based Fuels for Transport. In: Renewable Energy for Power and Transport”, *Riso Energy Report 5*, 47–50, 2006.
- Mabee W.E., Gregg D.J., Arato C., et. al., “Updates on Softwood-to-Ethanol Process Development”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 129–132, 55–70, 2006.
- Madson P.W., Lococo D.B., “Recovery of Volatile Products from Dilute High-Fouling Process Streams”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84–86, 1049–1061, 2000.
- Mais U., Esteghlalian A.R., Saddler J.N., et. al., “Enhancing The Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials Using Simultaneous Ball Milling”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98–100, 815–32, 2002.
- Morjanoff P.J., Gray P.P., “Optimization of Steam Explosion As Method For Increasing Susceptibility of Sugarcane Bagasse to Enzymatic Saccharification” *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 733–741, 1987.
- Martinez A., York S.W., Yomano L.P., et. al., “Biosynthetic Burden and Plasmid Limit Expression of Chromosomally Integrated Heterologous Genes (pdc, adhB) in *Escherichia coli*”, *Biotechnol Prog.*, 15, 891–897, 1999.
- McMillan J.D., “Bioethanol Production: Status and Prospects”, *Renew. Energy*, 10, 295–302, 1997.
- McMillan J.D., “Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: Himmel M.E., Baker J.O., Overend R.P. (eds) *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuel Production*”, American Chemical Society, Washington, D.C., 1993, 292–323.
- Mohagheghi A., Evans K., Chou Y.C., et. al., “Cofermentation of Glucose, Xylose, and Arabinose By Genomic DNA–Integrated Xylose/Arabinose Fermenting Strain of *Zymomonas mobilis AX101*”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 98–100, 885–898, 2002.

- Mosier N.S., Ladisch C.M., Ladisch M.R., “Characterization of Acid Catalytic Domains for Cellulose Hydrolysis and Glucose Degradation”, *Biotechnol. Bioeng.*, 79, 610–618, 2002.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., et. al., “Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass”, *Bioresource Technol.*, 96, 673–686, 2005.
- Nichols N.N., Dien B.S., Bothast R.J., “Use of Catabolic Repression Mutants For Fermentation of Sugar Mixtures to Ethanol”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 120–125, 2001.
- Nutt A., “Hydrolytic and Oxidative Mechanisms Involved in Cellulose Degradation”, *Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 185, Uppsala, 51pp, 2006.
- Oyekola O.O., “The Enzymology of Sludge Solubilisation Under Biosulphidogenic Conditions: Isolation, Characterisation and Partial Purification Of Endoglucanases”, *Masters Thesis, Rhodes University, Grahamstown, South Africa*, 2004.
- Pan X., Arato C., Gilkes N., et. al., “Biorefining of Softwoods Using Ethanol Organosolv Pulping: Preliminary Evaluation of Process Streams for Manufacture of Fuelgrade Ethanol and Co-Products”, *Biotechnol. Bioeng.*, 90, 473–81, 2005.
- Parajo J.C., Va' zquez D., Alonso J.L., et. al., “Prehydrolysis of Eucalyptus Wood With Dilute Sulphuric Acid: Operation At Atmospheric Pressure”, *Holz. als Roh.- und Werkstoff.*, 51, 357–363, 1993.
- Patel S.J., Onkarappa R., Ks S., “Fungal Pretreatment Studies on Rice Husk and Bagasse for Ethanol Production”, *Electron J. Environ. Agric. Food Chem.*, 6,1921–6, 2007.
- Pongsawatmanit R., Temsiripong T., Suwonsichon T., “Thermal and Rheological Properties of Tapioca Starch and Xyloglucan Mixtures in The Presence of Sucrose”, *Food Res. Int.*,40, 239–248, 2007.
- Poutanen K., Tenkanen M., Korte H., et. al., “Accessory Enzymes Involved in The Hydrolysis of Xylans. In: Leatham G.F., Himmel M.E. (eds) *Enzymes in Biomass Conversion*”, *American Chemical Society, Washington, D.C.*, 426–436, 1991.
- Rahman S.H.A., Choudhury J.P., Ahmad A.L., et. al., “Optimization Studies on Acid Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber for Production of Xylose”, *Bioresource Technol.*, 98, 554–559, 2007.
- Ramirez S.E., “Long-Term Lime Pretreatment of Poplar Wood”, *Master’s Thesis, Texas A&M University*, 2005.
- Rao R.S., Jyothi C.P., Prakasham R.S., et. al., “Xylitol Production from Corn Fiber and Sugarcane Bagasse Hydrolysates By *Candida tropicalis*”, *Bioresource Technol.*, 97, 1974–1978, 2006.
- Richard P., Putkonen M., Vaananen R., et.a., “The Missing Link in The Fungal L-Arabinose Catabolic Pathway, Identification of The L-Xylulose Reductase Gene”, *Biochemistry*, 41, 6432–6437, 2002.
- Rivers D.B., Emert G.H., “Lignocellulose Pretreatment: A Comparison of Wet and Dry Ball Attrition”, *Biotechnol. Lett.*, 9, 365–368, 1987.
- Saarela U., Leiviska K., Juuso E., “Modelling of A Fed-Batch Fermentation Process”, *Control Engineering Laboratory. Department of Process And Environmental Engineering, University of Oulu, Report A No. 21*, 2003.
- Saha B.C., Bothast R.J., “Effect of Carbon Source on Production of A-L-Arabinofuranosidase By *Aureobasidium pullulans*”, *Curr. Microbiol.*, 37, 337–340, 1998.
- Saha B.C., Bothast R.J., “Purification and Characterization of A Novel Thermostable A-L-Arabinofuranosidase From A. colorvariant Strain of *Aureobasidium pullulans*”, *Appl. Environ. Microbiol.*,64, 216–220, 1998.

- Saha B.C., Dien B.S., Bothast R.J., "Fuel Ethanol Production from Corn Fiber: Current Status and Technical Prospects", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 70–72, 115–125, 1998.
- Saha B.C., Bothast R.J., "Production Of Xylitol By *Candida peltata*", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22:, 633–636, 1999.
- Saha B.C., Bothast R.J., "Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corn Fiber" *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 76, 65–77, 1999.
- Saha B.C., "Purification and Characterization of An Extracellular B-Xylosidase from A Newly Isolated *Fusarium verticillioides*", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 241–245, 2001.
- Saha B.C., "Xylanase from A Newly Isolated *Fusarium verticillioides* Capable of Utilizing Corn Fiber Xylan", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 762–766, 2001.
- Saha B.C., "Production, Purification and Properties of Xylanase from A Newly Isolated *Fusarium proliferatum*", *Process Biochem.*, 37, 1279–1284, 2002.
- Saha B.C., Cotta M.A., "Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw", *Biotechnol. Prog.*, 22, 449–453, 2006.
- Saulnier L., Thibault J.F., "Ferulic Acid and Diferulic Acids As Components of Sugar-Beet Pectins and Maize Bran Heteroxylans", *J. Sci. Food Agric.*, 79, 396–402, 1999.
- Schneider H., Wang P.Y., Chan Y.K., et. al., "Conversion of D-Xylose Into Ethanol By The Yeast *Pachysolen tannophilus*", *Biotechnol. Lett.*, 3, 89–92, 1981.
- Sedlak M., Ho N.W.Y., "Expression Of E. coli araBAD Operon Encoding Enzymes for Metabolizing L-Arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*", *Enzyme Microb. Technol.*, 2, 16–24, 2001.
- Shibuya N., Iwasaki T., "Structural Features of Rice Bran Hemicellulose", *Phytochemistry*, 24, 285–289, 1985.
- Silverstein R.A., "A Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Converting Cotton Stalks to Ethanol", Master's Thesis (adv: R. Sharma), Biological And Agricultural Engineering, North Carolina State University, 2004.
- Silverstein R.A., Chen Y., Sharma-Shivappa R.R., et. al., "A Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Improving Saccharification of Cotton Stalks", *Bioresource Technol.*, 98, 3000–3011, 2007.
- Stewart G.G., Russell I., "Biochemistry and Genetics of Carbohydrate Utilization By Industrial Yeast Strains", *Pure Appl. Chem.*, 59, 1493–1500, 1987.
- Sun Y., "Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production", PhD thesis, Biological And Agricultural Engineering, North Carolina State University, 2002.
- Teixeira L.C., Linden J.C., Schroeder H.A., "Optimizing Peracetic Acid Pretreatment Conditions for Improved Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF) of Sugar Cane Bagasse To Ethanol Fuel", *Renew. Energy.*, 16, 1070–1073, 1999.
- Torget R., Hatzis C., Hayward T.K., et. al., "Optimization of Reverse-Flow, 2-Temperature, Dilute-Acid Pretreatment to Enhance Biomass Conversion to Ethanol", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 58, 85–101, 1996.
- Tucker M.P., Kim K.H., Newman M.M., et. al., "Effects Of Temperature And Moisture On Dilute-Acid Steam Explosion Pretreatment of Corn Stover and Cellulase Enzyme Digestibility", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 105, 165–178, 2003.
- Valjamae P., Pettersson G., Johansson G., "Mechanism of Substrate Inhibition in Cellulose Synergistic Degradation", *Eur. J. Biochem.*, 268, 4520–4526, 2001.
- Viikari L., Tenkanen M., Buchert J., et. al., "Hemicellulases for Industrial Applications. In: Saddler J.N. (ed) *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*", CAB, Oxford, 1993, 131–182.

- Wang P.Y., Shopsis C., Schneider H., "Fermentation of A Pentose By Yeasts", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 94, 248–254, 1980.
- Wyman C.E., "Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges", *Annu. Rev. Energy Environ.*, 24, 189–226, 1999.
- Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N., "Multiplicity Of B-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions And Applications", *Microbiol. Rev.*, 52, 305–317, 1988.
- Xiang Q., Lee Y.Y., Pettersson P.O., et. al., "Heterogeneous Aspects of Acid Hydrolysis of A-Cellulose", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 105–108, 505–514, 2003.
- Yaman S., "Pyrolysis of Biomass to Produce Fuels and Chemical Feedstocks", *Energy Convers. Manage.*, 45, 651–671, 2004.
- Yomano L.P., York S.W., Ingram L.O., "Isolation and Characterization of Ethanol Tolerant Mutants of *Escherichia coli* KO11 For Fuel Ethanol Production", *J. Ind. Microbiol.*, 20, 132–138, 1998.
- Yoosin S., Sorapipatana C., "A Study of Ethanol Production Cost for Gasoline Substitution in Thailand and Its Competitiveness", *Thammasat Int. J. Sci. Technol.*, 12, 69–80, 2007.
- Zarzycki A., Polska W., "Bioethanol production from sugar beet- European and Polish perspective", In: The first TOSSIE workshop on technology improvement opportunities in the european sugar industry, Ferrara, Italy, January 25–26, 2007.
- Zeikus J.G., Lee C., Lee Y.E., et. al., "Thermostable Saccharidases: New Sources, Uses, and Biodesign. In: Leatham G.F., Himmel M.E. (eds) *Enzymes in Biomass Conversion*", American Chemical Society, Washington, D.C., 1991, 36–51.
- Zerbe J.I., "Energy Properties of Wood. In: *Fuelwood Management and Utilization Seminar: Proceedings*", East Lansing, MI, USA; 1982, 6-13.
- Zhang M., Eddy C., Deanda K., et. al., "Metabolic Engineering of A Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*", *Science*, 267, 240–243, 1995.
- Zhang M., Chou Y., Picataggio S., et. al., "*Zymomonas mobilis* Strain for Xylose Utilization and Arabinose Fermentation", US Patent 5,843, 760, 1998.
- Zhang Y.H.P., Lynd L.R., "Toward An Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 88, 797–824, 2004.
- Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R., "Outlook for Cellulase Improvement: Screening and Selection Strategies", *Biotechnol. Adv.*, 24, 452–481, 2006.
- Zhang L., Wang T., Jiao S., et. al., "Effect of Steam-Explosion on Biodegradation of Lignin in Wheat Straw", 2007 ASAE Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, June 17–20, 2007, Paper number 077076.
- Zheng Y., Lin H.M., Wen, J., et. al., "Supercritical Carbon Dioxide Explosion As a Pretreatment for Cellulose Hydrolysis", *Biotechnol. Lett.*, 17, 845–850, 1995.
- Zheng Y.Z., Lin H.M., Tsao G.T., "Pretreatment of Cellulose Hydrolysis By Carbon Dioxide Explosion", *Biotechnol. Prog.*, 14, 890–896, 1998.