



# **Enzimatik Ksilooligosakkarit Üretimi İçin Organosolv Önişleminin Kullanımı**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 218M252**

**Proje Yürütücüsü:**

**Doç. Dr. Ali Oğuz Büyükkileci**

**Bursiyer:**

**Nuran Temelli**

**ŞUBAT 2020**

**İZMİR**

## **ÖNSÖZ**

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 218M252 kod numarası ile desteklenen “Enzimatik Ksilooligosakkarit Üretimi İçin Organosolv Önişleminin Kullanımı” başlıklı projenin sonuç raporudur. Projede, ekonomik öneme sahip bir gıda katkısı olan ve prebiyotik özelliğinden dolayı insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan ksilooligosakkarit üretimi için yeni bir süreç geliştirilmiştir. Raporda literatür bilgisi verildikten sonra kullanılan yöntemler özetlenmiş, sonrasında da elde edilen sonuçlar ayrıntılı olarak sunulmuş ve tartışılmıştır. Son olarak çıkarımlarımızla beraber önerilerimiz ve bu projenin devamındaki planlarımız verilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	ii
TABLO LİSTESİ .....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR .....	vii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	v
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Lignoselülozik Hammadde .....	3
2.2 Ksilooligosakkaritler (KOS).....	4
2.3 KOS Üretim Yöntemleri .....	5
2.4 Organosolv.....	7
2.5 Enzimatik Hidroliz.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	10
3.1 Gereçler .....	10
3.2 Yöntem.....	10
3.2.1 Ksilooligosakkarit (KOS) Üretimi .....	10
3.2.2.1 Mısır Koçanının Saklanması .....	11
3.2.2.2 Organosolv Önışlemi .....	11
3.2.2.3 Enzim Hidrolizi.....	12
3.2.2 Analizler .....	13
3.2.2.1 Nem Analizi .....	13
3.2.2.2 Yapısal Karbonhidrat Analizi.....	13
3.2.2.2.1 Katı Örneklerin Analizi .....	14
3.2.2.2.2 Sıvı Örneklerin Analizi.....	14
3.2.3 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri .....	16
3.2.4 Ksilanaz Aktivitesi Analizi .....	16

4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	17
4.1 Mısır Koçanının Karakterizasyonu.....	17
4.2 Organosolv Önişlemi .....	18
4.3 Enzim Hidrolizi .....	22
4.3.1 Ksilanaz Enzim Hidrolizinde Sıcaklığın Etkisi .....	23
4.3.2 Organosolv Önişlem Koşullarının KOS Üretimine Etkisi .....	26
4.3.3 Organosolv Koşullarının KOS Polimerleşme Dercesine Etkisi .....	30
4.3.4 Katı Yüklemesinin KOS Üretimine Etkisi.....	32
4.3.5 Enzim Derişiminin KOS Üretimine Etkisi.....	33
5. SONUÇ .....	34
KAYNAKLAR.....	37

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 2.1. Çeşitli liginoselüzik maddelerin bileşimi (kuru bazda).....	4
Tablo 2.2. Ksilooligosakkarit üretim yöntemlerinin etki mekanizmaları.....	7
Tablo 2.3. Farklı Biyokütlelere uygulanmış organosolv önişlemleri .....	8
Tablo 4.1. Mısır koçanının kompozisyonu <sup>a</sup> .....	18
Tablo 4.2. Organosolv önişlemi koşullarının mısır koçanı katısına etkileri <sup>a</sup> .....	22

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Lignoselülozik hammaddenin yapısı..	3
Şekil 2.2. Önişlemin lignoselülozik yapıya etkisi	5
Şekil 2.3. KOS üretiminde organosolv önişleminin lignoselüloza etkisi.	9
Şekil 3.1. Ksilooligosakkarit (KOS) üretiminin akış şeması.	11
Şekil 3.2. Organosolv sonrası katının enzim hidrolizine hazırlanışı (a: reaktörden çıkan katının tülbent ile süzülmesi; b: Katının su ile yıkanması; c: yıkama suyunun ayrımı; d: ıslak organosolv katısı; e: enzimatik hidrolize hazır öğütülmüş katı)	12
Şekil 3.3. Enzim hidrolizi Süspansiyonu ve enzim hidrolizi sonucu elde edilen KOS çözeltisi.	13
Şekil 4.1. Organsolv önişlemi koşullarının lignin ayırımına, selüloz ve ksilan kazanımına ve likör pH değerine etkisi.	22
Şekil 4.2. Enzimatik hidroliz sıcaklığının KOS üretimine etkisi.	25
Şekil 4.3. Önişlem koşullarının enzimatik hidrolize etkisi.	29
Şekil 4.4. Önişlem koşullarının ürün verimine etkisi.	29
Şekil 4.5. Önişlem koşullarının KOS polimerleşme derecesine etkisi.	32
Şekil 4.6. Enzim miktarının KOS üretimine etkisi	33

## KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
CaCO <sub>3</sub>	Kalsiyum Karbonat
dk	Dakika
DPD KOS	Düşük polimerleşme dereceli ksilooligosakkarit
g	Gram
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik Asit
KOH	Potasyum Hidroksit
KOS	Ksilooligosakkarit
l	Litre
mg	Miligram
MgO	Magnezyum Oksit
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum Hidroksit
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PD	Polimerleşme derecesi
PTFE	Teflon
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sa	Saat
T	Sıcaklık
U	Ünite
a/h	Ağırlık/hacim

mm

Mikrometre



## ÖZET

Prebiyotik karbonhidrat olan ksilooligosakkaritler (KOS), lignoselülozik tarım ve gıda atıklarındaki ksilan polisakkaritinin hidroliz edilmesiyle üretilir. Alkali ekstraksiyona dayanan enzimatik hidroliz ve otohizoliz kullanılan yöntemler çeşitli kısıtlara sahiptir. Bu çalışmada bu kısıtları aşabilecek olan bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Model olarak kullanılan mısır koçanı organosolv önişlemeden geçirilmiştir. Organosolv şartları (çözgen derişimi, süre, sıcaklık, katalizör ilavesi) biyokütledeki lignini uzaklaştıracak ancak ksilanın biyokütleda kalmasını sağlayacak şekilde ayarlanmıştır. Uygun şartlarda ligninin %40-%50'si ayrılabilirken ksilan yaklaşık %85 oranında katıda kalmıştır. İşlem görmüş biyokütla üç ticari ksilanaz ile hidroliz edilerek organosolv işleminin KOS üretimine etkisi belirlenmiştir. Organosolv ve enzimatik hidroliz şartlarının toplam KOS üretiminde etkili olduğu görülmüştür. En verimli KOS üretimi 150°C'de 1 sa %70 etanol ve 0,1M MgO varlığında organosolv işleml görmüş biyokütla ile elde edilmiştir. Bu biyokütlenin 70°C'de 0,6 U/ml ksilanaz ile gerçekleştirilen enzimatik hidrolizi sonucu ksilanın %82'si dönüştürülerek 11 g/l KOS içeren hidrolizat elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem sayesinde ksilanın ekstrakt edilmesine ihtiyaç duyulmadığı için derişik alkali ya da asit gibi kimyasallar kullanılmayacak ve otohizoliz yöntemindeki gibi çok yüksek sıcaklıklar kullanılmadığı için karbonhidrat bozunma ürünleri oluşmayacaktır. Bunlar ürün saflaştırma aşamalarını kolaylaştıracak ve çevreye zararlı kimyasal atık miktarını azaltacaktır. Süreçte lignince zengin bir sıvı faz ve selülozca zengin katı faz oluşmaktadır ve ksilan ile beraber bunlar da değerlendirilerek biyorafineri yaklaşımıyla lignoselülozik atıklara katma değer kazandırılabilir. Bu çalışmanın devamında ürünün saflaştırılması ve prebiyotik etkilerinin belirlenmesi için projeler geliştirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca geliştirilen süreç diğer lignoselülozik atıklar üzerinde de test edilecektir.

Anahtar kelimeler: Ksilooligosakkaritler, prebiyotikler, lignoselülozik atıklar, organosolv, ksilanaz, enzimatik hidroliz

## **ABSTRACT**

Xylooligosaccharides (XOS), which are among the prebiotic carbohydrates, are produced from hydrolysis of xylan in the lignocellulosic agricultural and food wastes. Production processes, such as enzymatic hydrolysis based on alkali extraction and autohydrolysis have some limitations. In this study, we aimed to develop a process that could overcome those limitations. Corn cob was used as the model biomass and it was pretreated with organosolv. The conditions of the organosolv pretreatment (solvent concentration, time, temperature, catalyst addition) was adjusted to maximize the lignin removal from the biomass as well as the xylan recovery. Delignification could be achieved with 40%-50% lignin removal, while around 85% of the xylan was retained in the biomass. The effect of organosolv conditions on XOS formation was determined by hydrolysis of pretreated biomass using three commercial xylanases. The organosolv and enzymatic hydrolysis conditions were effective on the XOS formation. The maximum XOS production was observed with biomass pretreated at 150°C for 1 h with 70% ethanol and 0.1 M MgO. That biomass was enzymatically hydrolyzed at 70°C with 0.6 U/ml xylanase and 82% of the xylan was converted to XOS yielding a hydrolysate containing 11 g/l XOS. With the developed in this study, the need of application of concentrated alkaline and acidic chemicals is eliminated since xylan extraction step is not needed. In addition to that, formation of carbohydrate degradation products can be avoided due to the lower treatment temperatures compared to autohydrolysis. These can simplify the downstream processing following the production of XOS and minimize the environmentally harmful chemical wastes. In this process, a liquid stream rich in lignin and a solid stream rich in cellulose are released. Following a biorefinery concept, these streams could be valorized together with the xylan, so that lignocellulosic wastes can have an added value. This study will be followed by related projects on XOS purification and determination of the prebiotic potential of XOS. In addition to that, the process developed will be tested on other lignocellulosic wastes.

Keywords: Xylooligosaccharides, prebiotics, lignocellulosic wastes, organosolv, xylanase, enzymatic hydrolysis

## 1. GİRİŞ

Günümüzde dünya nüfusunun büyük bir kısmı için sağlıklı ve uygun fiyatlı gıda üretimini arttırmak öncelikli hedefler arasındadır. Bu hedef doğrultusunda üretimdeki artışın sürdürülebilir olması ve hali hazırda yıpratılmış olan doğal hayatın korunması önemli kistaslardır. Tarım ve gıda atıklarının kullanımı bu bağlamda önemli bir rol almaktadır. Bu biyokütlelerin bir kısmı hayvan yemi ve gübre olarak veya değeri yüksek olmayan diğer bazı uygulamalarda kullanılmasına karşın, büyük bir kısmı imha edilerek ekonomik ve çevresel sorunlara neden olmaktadır.

Tarım-gıda atığı formundaki lignoselülozik biyokütle yapısında bulundurduğu selüloz, hemiselüloz ve lignin polimerleri sayesinde değerli birçok ürün için uygun bir hammadde olarak kabul edilir. Yapının içindeki selülozdan üretilen biyoetanol veya biyobütanol gibi yakıtlar geleneksel yakıtların yerini alabilir. Glikoz ve fermente edilebilir diğer karbonhidratlar biyoteknolojik yöntemlerle değerli birçok biyo-ürünün üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Ancak, özellikle lignoselüloziklerin ön işleme ihtiyaç duyması üretim maliyetinin yüksek olmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple bir lignoselülozik maddeden birden çok getirisi yüksek ürün elde etmek ekonomik açıdan bir gereksinimdir. Bu açıda, selülozun yanında hemiselülozun ve ligninin de değerlendirilmesi önemli bir noktadır.

Doğal olarak bal ve bambu filizi gibi kaynaklarda bulunan ksilooligosakkaritler (KOS), insan ve hayvanlar tarafından tüketildiğinde sindirim sisteminden parçalanmadan ve emilmeden geçer ve kalın bağırsağa ulaşır. Burada *Bifidobacterium* türleri gibi sağlık açısından faydalı bakteriler tarafından metabolize edilerek prebiyotik etki gösterirler. Ancak, doğal kaynaklarındaki konsantrasyonlarının düşüklüğü nedeniyle etkilerini göstermek için yetersizdirler. Bu sebepten KOS ticari olarak, lignoselülozik malzemede bulunan ksilan polimerinin enzimatik hidrolizi ile elde edilmektedir.

Ksilan alkali kimyasallar ile çözdürülüp alkol ile çöktürüldükten sonra farklı saflıklarda ve verimlerde polimer halde elde edilir. Ekstrakt edilen ksilan polimeri daha sonra sulu çözeltilerde ksilanaz enzimleriyle hidroliz edilir. Bu yöntemde kullanılan kimyasalların aşındırıcı özelliklerinden dolayı kullanılan ekipmana verdiği zarar, fazla kullanımlarından dolayı oluşan maliyetler ve çevre kirliliği gibi olumsuzluklar sebebiyle yeni üretim yöntemleri arayışına girilmiştir. Alternatif yöntem olarak geliştirilen otohizoliz yönteminde, KOS yüksek sıcaklıkta lignoselülozik hammaddeden doğrudan koparak ortamdaki sıvıya geçer. Fakat bu işlem sırasında oluşan furfural, hidroksimetil furfural ve asetik asit gibi toksik olabilecek bozunma ürünleri bu yöntemin kullanımında önemli bir engeldir. Ayrıca kullanılan yüksek sıcaklıklar hem enerji hem de ekipman maliyetini arttırmaktadır.

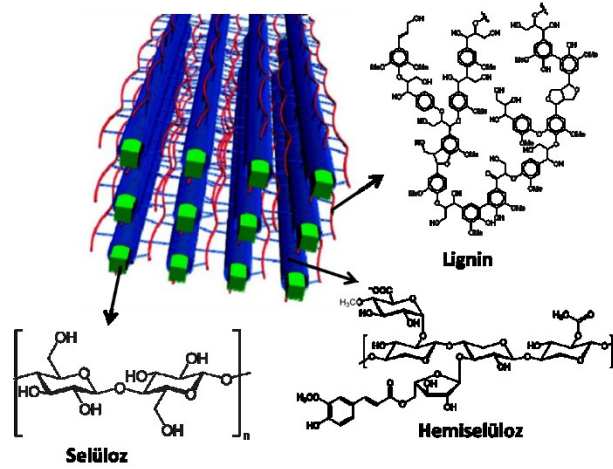
Lignoselülozik yapıyı bozmak için kullanılan bir diğer yöntem olan organosolv işleminde ise organik çözücü kullanılarak lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılıp selülozca zengin bir katı elde edilir. Sonrasında selülaz enzimiyle sakkarifikasyon gerçekleştirilerek daha sonra kullanılmak üzere saf glikoz çözeltisi elde edilir. Yüksek sıcaklık kullanılması dezavantaj olarak görülen bu yöntemde organik çözücülerin geri kazanılabilir olması hem maliyet hem de çevre ile ilgili sorunların açısından bir avantajdır.

Bu çalışmada bilinen KOS üretim yöntemlerinin limit ve dezavantajlarını aşabilecek bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Ksilanın ekstrakt edilmesine dayalı yöntemdeki aşırı kimyasal kullanımı ve otohizolizde oluşan ve ayrılması gereken şeker bozunma ürünleri bilinen yöntemlerin önemli sorunlarıdır. Bu çalışmadaki temel yaklaşım, ksilanın biyokütleden ayrılmadan doğrudan enzimatik yolla hidroliz edilmesinin sağlanmasıdır. Lignoselülozik biyokütteleler ham hallerinde enzimlerin faaliyetine engel olan bir yapıya sahiptir. Projede bu yapıyı zayıflatmak için organosolv işleminin kullanılmış, ancak önışlem şartları ksilanın katıdan ayrılmasına engel olacak şekilde ayarlanmıştır. Önışlemin özellikle lignin üzerinde etkin olması böylece sonrasındaki enzimatik hidroliz için uygun bir biyokütle sağlanması hedeflenmiştir. Çalışmanın ilk bölümünde organosolv işleminde önemli olan sıcaklık, süre ve çözgen konsatrasyonu değiştirilerek lignini uzaklaştırırken ksilanı katıdan ayırmayan şartlar belirlenmiştir. İkinci bölümde, önışlemden geçmiş biyokütleye enzimatik hidroliz uygulanarak ksilanın parçalanması ve hidrolizatta KOS formunda toplanması için uygun şartlar sağlanmıştır. Bunun için üç ticari enzim kullanılmış ve KOS üretiminin yüksek ve ksiloz üretiminin düşük olduğu hidroliz şartları belirlenmiştir. Önerdiğimiz yöntemde çevreye zararlı asit ya da alkali kimyasallar kullanılmamakta, enerji kullanımı otohizolize göre daha düşük seviyede kalmakta ve KOS üretim ortamında şeker bozunma ürünleri bulunmamaktadır. Bu proje çıktıları devamında yapılabilecek olan ayrıntılı çalışmalarla daha üst seviyeye çıkarılabilir, birçok biyokütleye uygulanabilir ve tekno-ekonomik analizler neticesinde endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Lignoselülozik Hammadde

Lignoselüloz selüloz, hemiselüloz ve ligninin polimerlerinden oluşan karmaşık bir yapıdır. Ana bileşen olan selüloz fiberleri iyonik etkileşimler sayesinde hemiselüloz ile kaplanmıştır ve aromatik yapıdaki lignin bu yapının koruyuculuğunu sağlamaktadır (Şekil 2.1). Selüloz ve hemiselüloz hem polimer halinde hem de fermente edilebilir karbonhidarlara dönüştürülerek kullanılırlar. Lignin ise aromatik kimyasalların üretimi, kombine ısı ve güç veya diğer amaçlar için kullanılabilir (Hamsen vd., 2010).



Şekil 2.1. Lignoselülozik hammaddenin yapısı.

Glikoz monomerinin beta 1-4 bağı tekrarıyla oluşan doğrusal yapıdaki selüloz içerdiği çok sayıdaki hidrojen bağından kaynaklı esnek olmayan bir yapıdadır. Doğada yaygın olarak bulunan bir diğer biyopolimer olan hemiselüloz, beta 1-4 bağlarından oluşan ksiloz omurgasına bağlı farklı monosakkarit ya da asetil ünitelerinden oluşan karmaşık bir polimerdir. Kaynağına göre farklılık gösteren hemiselüloz yapısının polimerleşme derecesi (PD) 40-600 arasında değişmektedir. Arabinoz, galaktoz, riboz şekerleri ya da asetil gruplarından oluşan dallar  $\alpha$ 1-2 ve  $\alpha$ 1-3 bağlarıyla ana zincire bağlanır. Dalların büyüklüğü selüloz ile yapılan hidrojen bağlarını etkilediği için, dallar aynı zamanda hemiselülozun hidrolizini de etkilemektedir (Avivila vd., 2020; Kalim vd., 2015). Fenolik yapıların polimerleşmesi sonucu oluşan lignin, hemiselüloz ve selüloza kovalent şekilde bağlıdır. Selüloz ve hemiselüloz yapıya direnç sağlanmasına yardımcı olurken yapının çevresini kaplayarak içerdeki yapıların su ile nüfuzunu azaltır, enzim hidrolizine karşı doğal bir savunma sağlar (Kumar vd., 2019).

Kaynağına ve türüne yüksek derecede bağlı olan lignoselülozik biyokütlenin bileşenlerinin oranı kabaca %10-25 lignin, %40-50 selüloz ve %5-30 hemiselülozdur (Kumar vd., 2019).

KOS üretimi için en uygun hammadde arandığında verimin yüksek olabilmesi için hemiselüloz oranının yüksek olduğu kaynaklar seçilmelidir. Ayrıca koruyucu polimer olan ligninin görece az olduğu seçenek hidrolizi kolaylaştırır. Tablo 2.1.'deki farklı tarım-gıda atıklarının lignoselülozik yapıları incelendiğinde mısır koçanının bu kriterlere uygun olduğu görülmektedir. Tahıl grubundan bir tarım atığı olan mısır koçanı hemiselüloz yapısındaki yüksek ksilan içeriği ile KOS için doğru hammadde olarak kabul edilebilir (Girio vd., 2010).

Tablo 2.1. Çeşitli lignoselülozik atıkların bileşimi (kuru bazda) (Sun ve Cheng, 2002).

Tarım-Gıda Atıkları	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Buğday Samanı	35,0-39,0	23,0-30,0	12,0-16,0
Arpa Kabuğu	34	36	13,8-19,0
Arpa Samanı	36,0-43,0	24,0-33,0	6,3-9,8
Pirinç Samanı	29,2-34,7	23,0-25,9	17,0-19,0
Prinç Kabuğu	28,7-35,6	12,0-29,3	15,4-20,0
Yulaf Samanı	31,0-35,0	20,0-26,0	10,0-15,0
Mısır Koçanı	33,7-41,2	31,9-36,0	6,1-15,9
Mısır Saplari	35,0-39,6	16,8-35,0	7,0-18,4
Şeker Kamışı Bagası	25,0-45,0	28,0-32,0	15,0-25,0
Süpürge Darısı	32,0-35,0	24,0-27,0	15,0-21,0

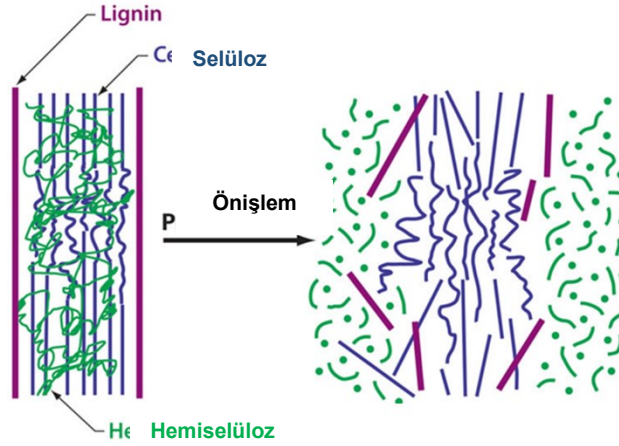
Yaygın olarak yetiştirilebilen mısır yıllık yaklaşık 1 milyar ton üretim miktarıyla dünyada en çok üretilen tahıldır (IGC, 2018). %38 gibi büyük bir oranla (371 milyon ton) lider olan ABD'yi %21'le (216 milyon ton) Çin ve %10 ile (88 milyon ton) Brezilya takip etmektedir (Uluslararası Tahıl Konseyi, 2018). Yıllık 5,9 milyon ton üretim hacmiyle 10. sırada yer alan Türkiye, verim olarak ABD ve Kanada'dan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2018). Türkiye'deki duruma baktığımızda, toplam tarım alanlarının yaklaşık %71'inde (11,1 milyon hektar) tahıl ekilmektedir. TÜİK verilerine göre, bu ekim alanı içerisinde %69'lık payla ilk sırada buğday, %22'lük payla ikinci sırada arpa ve %6'lık payla üçüncü sırada mısır yer almaktadır (Toprak Mahsulleri Ofisi, 2018). Mısırın yüksek üretim hacminin yanı sıra ABD Biyoenerji Teknolojileri Departmanı verilerine göre, mısırın üretim tonu başına düşen atık miktarı buğday arpa ve diğer tahıllara göre daha fazladır (U.S. Department of Energy (ABD Enerji Bakanlığı), 2018). Bütün veriler göz önüne alındığında mısır ulaşılabilirliği, miktarı ve yüksek atık oranıyla hem ülkemizde hem de dünyada konuyla ilgili herkesin ilgisini çekecek, ikincil madde üretiminde ümit verici ve diğer hammaddelere uygulamada kolaylık sağlayacak bir model durumundadır.

## 2.2. Ksilooligosakkaritler (KOS)

Prebiyotikler arasında KOS, asidik ortamlardaki stabilitesi, sıcaklığa karşı direnci, kalın bağırsakta insan sağlığına faydalı bakteriler tarafından seçici olarak kullanılması ve yüksek miktarda asit oluşturması özellikleriyle dikkat çekmektedir (Otieno ve Ahring, 2012; Samanta vd., 2015; Singh vd., 2015; Fehlbauer vd., 2018). KOS, 2 ila 10 arasındaki ksiloz monomerin  $\beta$ 1-4 kovalent bağı ile bağlanmasından oluşan moleküllerdir. Bununla birlikte KOS genellikle 2-4 arasındaki polimerizasyon derecesindeyse gıda uygulamaları için tercih edilir çünkü küçük zincirli oligomerler asidik koşullara büyük zincirliye göre daha duyarlıdır (Childs vd., 2014). Prebiyotik olarak KOS, kolon kanseri, nörotoksite ve diyabeti önlemesi üzerinde olumlu etkiler göstermektedir (Aachary vd., 2015; Krishna vd., 2015; Yang vd., 2015). Biyolojik faydalarının yanısıra, emülgatör, yağ ikame edici ya da stabilizatör gibi gıda katkı maddelerinin yerine kullanılabilir (Amorim vd., 2019). Doğal kaynaklarında düşük konsantrasyonlarda bulunmasından ötürü KOS, ticari olarak lignoselülozik malzemede ksilan polimerinin endosilaz katalizörlü hidrolizi ile elde edilir (Singh vd., 2015).

### 2.3. KOS Üretim Yöntemleri

Lignoselülozik biyokütlerde ksilanın lignin ve selüloz ile yaptığı karmaşık bağlar doğrudan enzimatik hidrolizin önündeki engellerdir. Bu sebepten koruyucu lignini uzaklaştırılıp biyokütleyi gözenekli yapıya getirecek bir ön işleme gereksinim vardır (Şekil 2.2) (Mazlan vd., 2018). Böylece açığa çıkan ksilan enzim faaliyetine açık hale gelebilir ve hidrolizi mümkün olur.



Şekil 2.2. Önişlemin lignoselülozik yapıya etkisi.

Lignoselülozik malzemelerden KOS elde edilmesi malzemedeki ksilan polisakaritinin ayrıştırılması ve kısmen parçalanmasına dayanır. Tablo 2.2'de gösterilen ve yaygın olarak kullanılan alkali ekstraksiyon ve bunu takiben enzimatik hidroliz yönteminde lignoselülozik malzeme önce alkali çözeltilerle muamele edilerek ksilanın çözünmesi sağlanır. Daha sonra ksilan ksilanaz enzimi ile hidroliz edilir. Oda sıcaklığında ya da 50-60°C gibi sıcaklıklarda,

yüksek derişimdeki NaOH ve KOH gibi alkalilerde bulunan hidroksil iyonları (OH<sup>-</sup>) hemiselüloz ve lignin arandaki ester bağlarını kırar ve hemiselüloz biyokütleden ayrılarak sıvı faza geçer (Rabetafika vd., 2013). Sıvı fazın asit kullanılarak nötrleştirilmesi sonrasında alkol eklenerek ortamın dielektrik sabiti düşürülür. Suda çözülmüş halde olan ksilan polimeri değişen dielektrik sabiti nedeniyle konfirmasyonel değişime girerek çökelti haline gelir. Bu işlemlerden sonra katı haldeki ksilan sulu tampon çözeltide çözülür ve ksilanz enzimi ile hidroliz edilerek KOS üretimi gerçekleştirilir (Carvalho vd., 2013; Akpınar vd., 2007). Örneğin; pamuk, tütün ve ayçiçeği sapsarı ve buğday samanından KOS elde etmek için %24 KOH (%1 sodyum borohidrat içeren) kullanılmıştır (Akpınar vd., 2007, 2009). Mısır koçanı %12, mısır sapı %10, şeker kamışı küspesi %12 NaOH ile muamele edilmiştir (Samanta, 2012). Bu işlem genelde oda sıcaklığında ya da 50<sup>0</sup> C civarındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Alkali işlemi ksilanın büyük bir kısmının çözünerek sıvı kısımda toplanmasını ve selüloz ve ligninden ayrılmasını sağlar. Alkali hidrolizinde en önemli kısıt, işlem sırasında çevre açısından zararlı kimyasalların (asit ve alkali) yüksek miktarda kullanılmasıdır. Ayrıca, kimyasalların sebep olduğu korozyonu önlemek için dayanıklı teçhizata ihtiyaç vardır.

KOS üretimi için kullanılan diğer bir yöntem otohizoliz olarak da bilinen sıvı sıcak su ön işlemdir. Biyokütlenin yüksek sıcaklıklarda su ile işlendiği otohizoliz ön işleminde, suyun otoiyonizasyonu sonucu açığa çıkan hidronyum iyonları ve hemiselüloz zincirindeki asetil gruplarının kopması sonucu oluşan asetik asit, katalizör olarak davranarak ksilanın lignoselülozik ağdan kopup parçalanmasını sağlar (Otieno ve Ahring, 2012). Alkali-enzimatik yöntemdekinin aksine enzimatik işleme gerek kalmadan hidroliz gerçekleşir. Biyokütle basınçlı reaktörde su ile karıştırılır; 160-240<sup>0</sup> C arasında sıcaklığa ısıtılır; belirli bir süre bekletildikten sonra, reaktör soğutulur ve likörü alınır (Alvira vd., 2010). Her hammadde farklı yapıda olduğu için her biri için sıcaklık ve süre gibi reaksiyon koşulları optimize edilmelidir. Koşullar sertleştikçe elde edilen KOS'un polimerleşme derecesi düşer ancak aynı zamanda ksiloz gibi monosakkaritler ve karbonhidratların bozunması sonucu furfural, hidroksimetilfurfural, asetik asit ve formik asit oluşumu gözlenir (Surek ve Buyukkileci, 2017). İşlem sonunda sıvıda oligosakkaritler, monosakkaritler, şeker bozunma ürünleri, ekstraktlardan elde edilen fraksiyonlar ve asitle çözünebilen lignin bulunurken; katı fazda selüloz ve lignin kalır (Petersen vd., 2009). Bu yöntemin en büyük avantajı, yüksek derişimde kimyasal madde gerektirmemesi ve dolayısıyla bu işlemde önemli bir korozyon problemi yaratmaması ve korozif kimyasallara dayanıklı reaktör sistemlerine ihtiyaç duyulmamasıdır. Bu nedenle çevre dostu bir teknoloji olarak değerlendirilebilir. Temel dezavantajları ise, yüksek enerji talebi, sıcaklık ve basınca dayanıklı reaktör ihtiyacı ve yan ürünlerinin saflaştırma aşamasını zorlaştırmasıdır (Hendriks ve Zeeman, 2009). Laboratuvarımızdaki önceki çalışmamızda fındıkkaşuğundaki ksilan otohizoliz (190°C-5 dk) yöntemiyle %63



verimle KOS'a çevrilmiştir (Surek ve Buyukkileci, 2017). Bu işlem sırasında furfural ve asetik asit oluşumu gözlemlenmiştir. Daha yüksek sıcaklık ve daha uzun süreler kullanıldığında hem şeker bozunma ürünleri hem de ksiloz miktarında önemli derecede artış olmuştur. Otohüroliz birçok lignoselülozik malzemedan KOS elde etmek için kullanılmıştır. Mısır koçanı, badem kabuğu, zeytin çekirdeği, buğday samanı, arpa samanı, pirinç kavuzu 179°C'de 23 dk muamele edilmiş ve %40-%60 verimle KOS elde edilmiştir (Nabarlatz vd., 2004; Cara vd., 2012).

Tablo 2.2. Ksilooligosakkarit üretim yöntemlerinin etki mekanizmaları.

Yöntem	Mekanizma	Sonuç	Notlar
Alkali Ekstraksiyon + Enzimatik Hidroliz	Biyokütle + alkali → Ksilan sıvıya geçer Ksilan+ alkol → Ksilan çökeltisi	Polimer halde elde edilen ksilan enzimatik olarak KOS'a parçalanır.	-Aşırı kimyasal kullanımı -korozyon problemleri
Otohüroliz	Suyun iyonlaşması → H iyonları ve asetil grupların katalizör etkisi	Hemiselüloz biyokütleden KOS halinde ayrılır.	-Yüksek enerji ihtiyacı -Bozunma ürünleri oluşumu
Organosolv (+ Enzimatik Hidroliz)	Organik çözücü + su → lignin-lignin ve lignin-karbonhidrat bağlarına etki	Biyokütleden hemiselüloz ve lignin ayrılır. (Bu çalışmada hemiselüloz biyoküttelede kalır, sonraki aşamada enzimatik olarak KOS'a parçalanır.)	-Yüksek enerji ihtiyacı

## 2.4. Organosolv

Organosolv ön işlemi, lignoselülozik malzemenin çözücü rolü olan organik bir sıvı ve su karışımı ile yüksek sıcaklıklarda muamele edilmesini içerir. Bu karışım belli bir sıcaklıkta, lignin bağlarını ve lignin-karbonhidrat bağlarını koparır (Zhang vd., 2016). Hemiselüloz ve ligninin katıdan ayrılması sayesinde geriye büyük ölçüde selülozdan oluşan bir biyokütle kalır (Tablo 2.3). Bu sayede selüloolitik enzimler selüloz üzerine etki edebilir ve glikoz açığa çıkarır. Bu sebeple organosolv biyoetanol ya da diğer değerli kimyasalların fermantasyon yolu ile kullanımı için çok uygun bir ön işlem olarak değerlendirilir. Organosolv işlemi için etanol ve metanol gibi düşük moleküler ağırlıklı alkoller tercih edilir. Etanol, düşük kaynama noktası sayesinde ön işlemde sonra kolayca geri kazanılabilir (Brosse vd., 2009). Organosolv, etanol geri dönüşümü ve daha az su kullanımı sayesinde otohürolize göre daha az enerji kullanımı ve düşük maliyet sağlamaktadır. Bu durum, organosolv ön işlemini ekonomik açıdan daha cazip hale getirmektedir. Otohürolizde olduğu gibi organosolv ön işleminde de sıcaklık ve süre gibi reaksiyon koşulları optimize edilmelidir.

Tablo 2.3. Farklı biyokütlelere uygulanmış organosolv ön işlemleri (Jiang vd., 2018).

Biyokütle	Çözücü/Katalizör	Sıcaklık (° C)	Zaman (dk)	Delignifikasyon (%)	Ksiloz Ayırımı (%)
Buğday Samanı	50% etanol	210	90	85	95
Buğday Samanı	60% etanol/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	190	60	60	81
Buğday Samanı	70% Gliserol	220	240	65	70
Şeker Kamışı Bagazı	50% etanol/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	175	60	10	50
Şeker Kamışı Bagazı	50% etanol/ NaOH	175	60	10	20
Mısır Sapı	50% etanol	140	60	39	16
Mısır Sapı	50% etanol/ oksalik a.	140	60	89	88

Organik sıvı olarak alkoller, esterler, ketonlar, glikoller, organik asitler, fenoller ve eterler gibi çeşitli seçenekler olmasıyla birlikte çözücünün fiyatı ve çözücünün geri kazanımı için uygunluk da dikkate alınmaktadır. Lignoselülozik yapıyı parçalamak için yapılan çalışmalarda organosolv yöntemi arpa, şeker kamışı, buğday, bambu gibi birçok hammaddeye uygulanmıştır. İşlemin verimi kullanılan çözücü, sıcaklık ve zaman değişkenlere ve hammaddeye bağlıdır. Buğday samanına organik çözücü olarak gliserol kullanıp organosolv ön işleminde uygulandığında görülen delignifikasyon ve sıvıya geçen %65 ve 70 iken, sıcaklık ve zaman değişkenlerinin ağırlaşmasına rağmen çözücü değiştirildiğinde delignifikasyon ve ksiloz yüzdesi artmaktadır (Jiang vd., 2018).

Mısır sapına etanolla uygulanan organosolv sonucuyla elde edilen delignifikasyon ve sıvıdaki ksiloz sırasıyla %39 ve %16 iken, çözücüye oksalik asit eklenmesiyle beraber %89 ve 88 çıkmıştır (Tablo 2.3) (Jiang vd., 2018). Ayrıca değişkenler, farklı yapı taşlarında farklı etkiler yaratmaktadır. Şeker kamışı maddesine aynı koşullarda farklı katalizörler eklendiğinde delignifikasyonlar değişmez iken, sıvıdaki ksiloz oranları %20 ve 50. Sonuçlara bakıldığında, 170° C ve üstü sıcaklıklarda ve 30-60 dk süreyle lignin ve hemiselüloz ayrımı gerçekleştirildikten sonra, katıda kalan selüloza uygulanan enzimler kolayca etki ederek hidroliz tamamlanıp fermente edilebilir basit şekerler elde edilebilir (Zhang vd., 2016). Önceki çalışmalarda genellikle selüloz hidrolizi konu edildiğinden hemiselülozun da selüloz içeren katıdan uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Literatüre organosolv ön işleminin KOS üretimi için uygulandığı bir çalışmaya rastlanmıştır.

## 2.5. Enzimatik Hidroliz

KOS üretimi, ksilanın polimerinin hidroliz ile kısmen parçalanarak elde edilir. Enzimatik hidroliz ılımlı koşullarda gerçekleştirildiği için genellikle tercih edilen yöntemdir. Farklı türleri bulunan ksilinaz enzimleri ticari üreticiler tarafından toplam aktiviteyi arttırdığı için endo-, ekzo-, ve beta- ksilanaz enzimlerinin tamamı kompleks olarak sunulur (Kumar vd., 2019). Büyük zincirli ksilanın iç yapısında bulunan beta1-4 bağlarına etki eden endo ksilanazlar polimerden kısa zincirli oligomerler oluştururlar. Ekzo ksilanazlar ise ksilan polimerinin sadece indirgen olmayan ucundan beta1-4 bağlarına etki ederek ksiloz monomerleri oluşturur. Diğer taraftan beta-ksilanaz ise oligomerlerdeki indirgen olmayan uçlara etki ederek ksiloz monomerlerini oluşturur. Bu doğrultuda ksilanaz komplekslerine bakıldığında oligosakkarit üretimi için endo ksilanaz aktivitesi yüksek iken diğer enzimlerin aktivitelerinin en az olduğu koşullar seçilmelidir (Avila vd., 2020).

Enzimatik hidrolizin en önemli avantajı, hidrotermal uygulamalarda ortaya çıkan istenmeyen yan ürünleri oluşturmamasıdır. Enzimatik hidroliz sırasında bir diğer önemli nokta ise ksilanazların hidroliz koşullarına uygun olmalarıdır. Enzim aktivitesi, uygun pH ve sıcaklık, termal stabilite gibi parametreler KOS veriminin artırılmasının yanı sıra büyük ölçekli üretimler için de önemlidir (Achary ve Prapulla, 2009). Mısır koçanıya daha önce yapılmış çalışmalarda %4'lük NaOH çözeltisiyle 100°C'de 3 saat sonunda ekstrakte edilen ksilan polimerine 24 saat süreyle eklenen ksilanaz enzimi sonucunda %29,2 verimle 8 g/l KOS elde edilmiştir (Yang vd., 2007). Yine tütün sapı, pamuk sapı ya da buğday samanı gibi birçok farklı materyalden 60°C'deki %24 KOH çözeltisiyle 16 saatte elde edilen ksilanlardan enzimatik hidroliz ile %20-30 varasında verim ile 2-3g/l arasında KOS üretilmiştir (Akpınar vd., 2009). Mısır Koçanıya yapılan bir diğer çalışmada 2,5 M NaOH ile 100°C'de bir saat bekletilerek ekstrakte edilen ksilanın ticari enzimle hidrolizi sonucu %23 KOS elde edilmiştir (Kundu vd., 2018). Şekere kamışı bagazının hidrojen peroksit ve asetik asit ile 60°C'de 6 saat boyunca hidroliz edilip elde edilen ksilanın ticari enzimlerle hidroliziyle 120mg/g KOS elde edilmiştir (Bragato, vd., 2013).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Projenin amaç ve hedeflerine uygun olarak kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır

#### 3.1. Gereçler

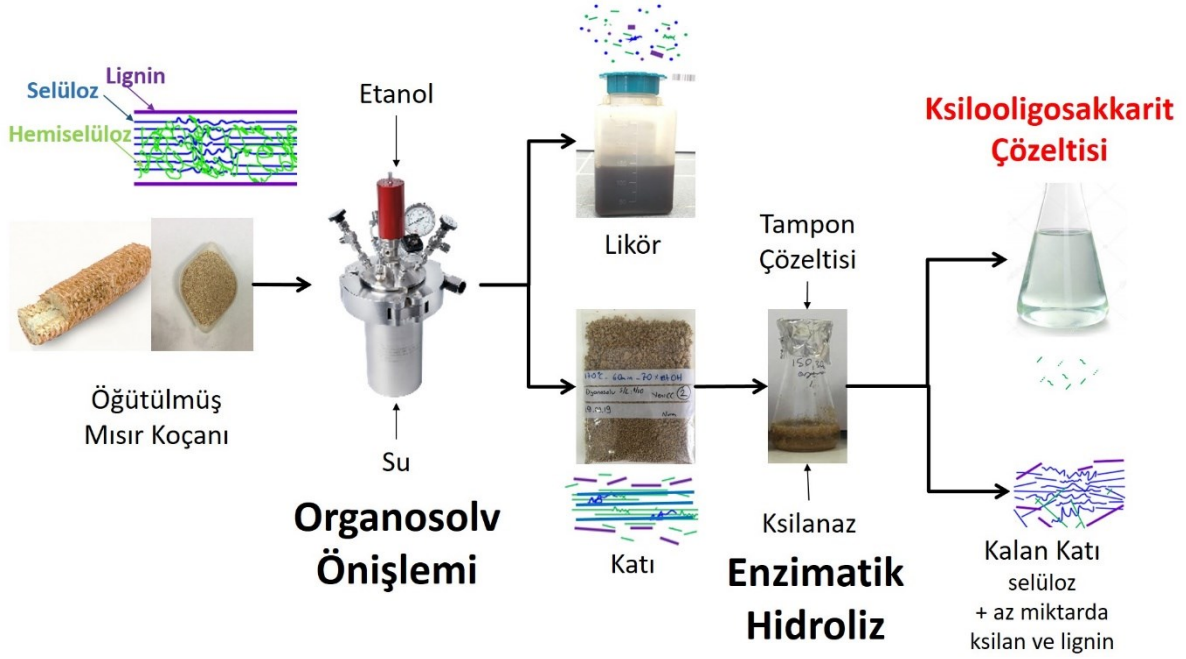
Çalışmada kullanılan malzemeler ve markaları ya da kaynakları aşağıda listelenmiştir:

- Mısır Koçanı (Ege Tarımsal Araştırmalar Müdürlüğü)
- Etanol (%98 Teknik Etanol, Isolab)
- Accelarase XY (Genancor, Danisco, Finlandiya)
- Veron 191S (AB Enzymes)
- EconaseXT (AB Enzymes)
- Sodyum Sitrat (Sigma-Aldrich)
- Sitrik Asit (Sigma-Aldrich)
- Sülfürik Asit (Sigma)
- Aseton (%98 Teknik Aseton, Isolab)
- Asetik Asit, Glikoz monohidrat, Ksiloz, Arabinoz (Sigma-Aldrich)
- Ksilobioz, Ksilotrioz, Ksilotetroz, Ksilopentoz, Ksiloheksoz (Megazyme)
- Ksilan (kayınağacından) (Megazyme)
- DNS (Dinitro salisilikasit) (Sigma-Aldrich)
- Magnezyum oksit (Kimetsan)

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Ksilooligosakkarit (KOS) Üretim Süreci

Çalışmanın başında, lignoselülozik hammadde olarak kullanılan mısır koçanının içeriği belirlenmiştir. Sonrasında Şekil 3.1.'de gösterildiği şekilde, mısır koçanına çeşitli organosolv ön işlemler uygulanmış ve seçilen işlem görmüş katılar ksilanaz ile hidroliz edilerek KOS elde edilmiştir. Organosolv işleminde farklı sıcaklık, süre, etanol derişimi ve ayrıca katalizör kullanımı test edilmiştir. Enzimatik hidroliz sırasında, enzim miktarı, hidroliz süresi, katı:sıvı oranı, sıcaklık parametre olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Ksilooligosakkarit üretimi akış şeması.

### 3.2.1.1. Mısır Koçanının Temini ve Saklanması

Mısır koçanı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden açık havada kurutulmuş ve çekiçli değirmende öğütülmüş halde (tanecik boyutu < 2 mm) temin edilip, hava almayacak şekilde plastik kaplarda saklanmıştır.

### 3.2.1.2. Organosolv Önişlemi

Kati: sıvı oranı 1:10 olan organosolv ön işleme için, 25 g öğütülmüş mısır koçanı ve 250 ml toplam sıvı 600 ml'lik yüksek basınçlı reaktörün (Berghof, Almanya) paslanmaz çelik haznesine yerleştirildikten sonra reaktörün kapağı kapatılmıştır. Reaktör ısıtıcı silindire yerleştirilmiş ve ısıtıcı çalıştırılmıştır. Reaksiyon sırasında pedal karıştırıcı dakikada yaklaşık 300 devir/dk yapacak şekilde kurulmuş ve homojenizasyon sağlanmıştır. Belirlenen sıcaklığa ulaşıldığı andan itibaren, reaksiyon süresi manuel olarak tutulmuş ve süre sonunda sıcaklık kontrolü kapatılmış ve soğutma aşamasına geçirilmiştir. Soğutma aşamasında, musluk suyu soğutma serpantininde dolaşarak yaklaşık 20 dk içinde reaktörün sıcaklığını yaklaşık 60° C'ye düşürdükten sonra reaktörün kapağı açılmıştır (Sabancı ve Büyükkileci, 2018).

Organosolv önişlemi %50 ve %70'lik etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca karşılaştırma amacıyla için sadece su kullanılarak otohizoliz denemesi de yapılmıştır. Katalizörlü denemelerde 0,1 mol/g olacak şekilde 1 g MgO reaktörün içine eklenmiştir.

Reaksiyon sıcaklığı 130<sup>0</sup> C-190<sup>0</sup> C arasında, reaksiyon süresi 0,5, 1 ya da 2 sa olarak ayarlanmıştır.

Organosolv işlemini takiben biyokütle enzim hidrolizine uygun hale getirilmiştir (Şekil 3.2). Biyokütle, etanol ve sudan oluşan karışım likör dört kat tülbentten geçirilerek katı ve sıvı fazlar birbirinde ayrılmıştır. Sıvı kısmın pH değeri pH metre (Selecta, İspanya) kullanılarak ölçülmüştür. Katı faz yaklaşık 200 ml su ile yıkanmış ve kaba filtre kâğıdından vakum altında süzölmüştür. Filtre kâğıdının üstünde kalan biyokütle 60°C'de sabit tartıma kadar kurutulmuştur. Kurutulmuş biyokütle mutfak tipi kahve öğütücüsünde öğütülerek homojen hale getirilmiştir (Kapoor vd. 2019). Öğütölmüş biyokütle enzim hidrolizi ve analizler için plastik poşetlerde etiketlenerek oda sıcaklığında saklanmıştır.



Şekil 3.2. Organosolv sonrası katının enzim hidrolizine hazırlanışı. a: reaktörden çıkan katının tülbent ile süzölmesi; b: Katının su ile yıkanması; c: yıkama suyunun ayrımı; d: ıslak organosolv katısı; e: enzimatik hidrolize hazır öğütölmüş katı.

### 3.2.1.3. Enzim Hidrolizi

Enzim hidrolizinde üç farklı ksilanaz enzimi (Accelarase XY, Veron 191S ve Econase XT) kullanılmıştır. Ön işleme tabi tutulmuş mısır koçanları sitrik asit ve sodyum sitrattan oluşan 50mM konsantrasyonundaki sitrat tampon çözeltisinde süspanse edilmiştir. Üreticilerden alınan bilgiye göre tamponun pH değeri Accelarase XY ve Veron enzimleri için 5,5, Econase XT için 6,0 olarak ayarlanmıştır. Aksi belirtilmedikçe enzim hidroliz ortamında katı:sıvı oranı 1:20 olarak kullanılmıştır. Süspansiyonun katı:sıvı oranının örnek alımları sırasında bozulmasını önlemek amacıyla her bir örnekleme zamanı için her biri 0,1 g biyokütle ve 2 ml tampon içiren ayrı birer tüp hazırlanmıştır. Katı halde bulunan Econase XT ve Veron enzimleri %4'lük olacak şekilde uygun tampon çözeltide süspanse edilmiş; 5 dk boyunca vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra çözünmeyen kısım 5000 rpm'de 4 dk santrifüj ile ayrılmıştır. Süpernatantta kalan enzim hidroliz çalışmalarında kullanılmıştır. Tüpler 55°C, 70°C ve 90°C sıcaklıktaki su banyolarında statik olarak inkube edilmiş ve aralılarla elle çalkalanmıştır. Belli aralıklarda alınan örneklerdeki enzim aktivitesini durdurmak için Accelarase XY ve Veron enzimleri içeren tüpler katı mısır koçanı Santrifüj (25000 g) ile

ayrıldıktan sonra 100°C su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Yüksek sıcaklığa dayanıklı olan Econase XT enziminin inaktivasyonu için 5 dk santrifüjlenip katı kısım ayrıldıktan sonra 1 ml örneğe 4 ml derişik aseton eklenmesiyle sağlanmıştır. Bir gece boyunca -20°C'de bekletilen örneklerdeki proteinler çöktükten sonra aseton 100°C'de 20 dk boyunca uçurulup hacimler 7ml'ye tamamlanmıştır. Böylece hem sabit hacim elde edilmiş hem de seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. KOS üretimi; enzim miktarı- sıcaklık-süreye bağlı olarak, hidroliz miktarı ve içeriği belirlenerek optimize edilmiştir. Daha sonrasında %5 (1: 20) olan mısır koçanı-tampon çözelti süspansiyonun derişimi %10 ve %20'e çıkarılarak denemeler yapılmış, sıvı kullanımını azaltma ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi amacıyla yapılan deneme de katı:sıvı oranının artışının verime etkisi incelenmiştir.

Enzimatik hidrolizden sonra elde edilen KOS ve ksiloz un derişimi kullanılarak dönüşüm ve toplam verim hesaplanmıştır.

$$\%dönüşüm = \frac{\text{Üretilen KOS ya da ksiloz (g)}}{\text{İşlenmiş biyokütledeki ksilan (g)}} \times 100 \quad \text{Denklem 1}$$

$$\%ürün verim = \frac{\text{Üretilen KOS (g)}}{\text{Ham biyoküttele (g)}} \times 100 \quad \text{Denklem 2}$$

### 3.2.2. Analizler

#### 3.2.2.1. Nem Analizi

Saklanan mısır koçanları NREL/TP-510-42621 yöntemini uygun olarak 105<sup>0</sup> C'deki etüvde gece boyu kurtulduktan sonra desikatörde nem kapmadan soğutulmuş sabit tartım sıcaklığına geldikten sonra hassas terazide (shimadzu) tartılıp nem miktarı Denklem 3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%Nem = 100 - \frac{\text{Kurutulan örneğin ağırlığı}}{\text{Analiz edilen örneğin ağırlığı}} \times 100 \quad \text{Denklem 3}$$

#### 3.2.2.2. Katı Örneklerdeki Yapısal Karbonhidratların Analizi

Yapısal Karbonhidrat analizinden önce çözünen madde miktarını belirlemek amacıyla mısır koçanı sırasıyla su ve etanolde (%96) Soxhlet cihazında (İsolab, Almanya) dört saat özütlenmiştir. Önışlem görmemiş mısır koçanı ve önışlem görmüş biyoküttele NREL/TP-510-42618 metodu kullanılarak analiz edilmiştir (Sluiter vd., 2012). Metota göre 0,3 g kuru biyokütlenin üzerine %72'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinden 3ml eklenerek bir saat oda sıcaklığında

inkübe edilmiştir. Karışıma 84ml su eklenerek asit konsantrasyonu %4'e düşürüldükten sonra otoklavda 121<sup>0</sup> C'de bir sa tutulmuştur. Lignin ve külün kaldığı katıyı analiz etmek için oda sıcaklığına gelen karışım filtreli porselen krozelerden vakum altında süzümüştür. Darası alınmış krozeler ilk önce 105<sup>0</sup> C'de gece boyu kurutulularak toplam ağırlık belirlenmiş, sonrasında kül fırınında 525<sup>0</sup> C'de 3 saat boyunca bekletildikten sonra kül miktarı gravimetrik olarak belirlenmiştir. Aradaki farktan Denklem 4 kullanılarak katıdaki asitte çözünmeyen lignin miktarı hesaplanır.

$$\% \text{ Asitte çözünmeyen lignin} = \left( \frac{\text{asit hidrolizi sonrası biyokütlenin kuru ağırlığı (g)} - \text{yakma sonrası kül miktar (g)}}{0,3 \text{ g}} \right) \times 100$$

Denklem 4

Örneklerin karbonhidrat miktarlarının belirlenmesi için asit hidrolizi sonrası oluşan monomerlerine HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir. Monomerlerin derişimleri belirlendikten sonra selüloz (glukan) için Denklem 5, ve hemiselüloz (ksilan, arabinan ve asetik asit) için Denklem 6 ve 7 kullanılarak katıdaki miktarları hesaplanmıştır. Hidroliz sırasında parçalanmış monomere su molekülleri bağlanığı için beş karbonlu şekerler 0,88; altı karbonlu şekerler 0,9; asetil grupları 0,72 düzeltme faktörüyle çapılıp polimer miktarları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Glukan} = \frac{\text{glikoz konsantrasyonu (g/l)} \times 0,087 \times 100 \times 0,90}{\text{Analiz edilen kuru katı örneğinin ağırlığı}} \quad \text{Denklem 5}$$

$$\% \text{Ksilan} - \% \text{Arabinan} = \frac{\text{ksiloz-arabinoz konsantrasyonu (g/l)} \times 0,087 \times 100 \times 0,88}{\text{Analiz edilen kuru katı örneğinin ağırlığı}} \quad \text{Denklem 6}$$

$$\% \text{Asetik asit} = \frac{\text{asetik asit konsantrasyonu (g/l)} \times 0,087 \times 100 \times 0,72}{\text{Analiz edilen kuru katı örneğinin ağırlığı}} \quad \text{Denklem 7}$$

### 3.2.2.3. Enzim Hidrolizatında Karbonhidrat Analizi

Enzim hidrolizden çıkan likörün içindeki ksiloz ve düşük polimer dereceli KOS miktarlarını belirlemek için likörler doğrudan HPLC'de analiz edilmiştir. Toplam KOS miktarlarını belirlemek için 5 ml sıvı örneğe 174µl %72 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi eklenerek tek aşamada otoklavda 121<sup>0</sup> C'de bir saat boyunca oligosakkaritler monomerlerine hidroliz edilmiştir (NREL, 2018). Toplam KOS Denklem 8 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam KOS} = \text{Asit hidrolizi sonucu oluşan ksiloz(g/l)} - \text{Doğrudan analiz edilen ksiloz(g/l)} \quad \text{Denklem 8}$$

### 3.2.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

Önişlem ve enzimatik hidrolizden çıkan tüm sıvı ve katı örneklerdeki monosakkarit, oligosakkarit ve polisakkarit (selüloz ve ksilan) miktarları yüksek performanslı sıvı



kromatografisinde (HPLC) uygun kolonlarla analiz edilmiştir. Asit hidrolizinden çıkan örneklerin kolon şartlarına uygun hale gelebilmesi için gerekli işlemler yapılmıştır. Analiz edilen örneklerin derişimlerini hesaplamak için kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Kalibrasyon eğrileri farklı derişimlerdeki analitlerin standart çözeltileri kullanarak hazırlanmıştır.

*Monosakkarit Analizi:* Asit hidrolizinden çıkan örnekleri kolon şartlarına uygun hale getirmek için nötrale edilmiştir. Bu işlem için 5ml örneğin üstüne 0,26 g CaCO<sub>3</sub> eklenip pH'ın 5-7 arasına çıkması sağlanmıştır. Çözünmeden kalan fazla CaCO<sub>3</sub>'ü uzaklaştırmak için örnekler 5dk boyunca dakikada 6000 devir yaparak santrifüjlenmişlerdir. Süpermatant ultra saf suyla seyreltilmiştir. Örnekler içlerinde bulabilecek küçük partiküllerden arındırılmak için 0,45µm gözenek çaplı membran filtrelerden geçirilip analiz için hazır hale getirilmiştir. Enzim hidrolizinde oluşan ksiloz miktarını belirlemek için asit hidrolizi uygulanmayan likörler doğrudan 0,45µm gözenek çaplı membran filtrelerden geçirilip analiz için hazır hale getirilmiştir.

Analizler HPLC cihazında (Perkin Elmer Series 200, ABD), kırılma indisi (RI) detektörü kullanılarak yapılmıştır. Asit hidrolizi sonucu monomerlerine parçalanan oligomer ve polimerlerin derişimi kurşun iyonik formlu kolon olan Rezex RPM-Monosakkarit kolonu (Phenomenex, ABD) ile belirlenmiştir. Sıvı faz olarak filtrelenmiş ultra saf suyun kullanıldığı analizde akış hızı 0,6 ml/dk, kolonun sıcaklığı ise 80<sup>0</sup> C'dir.

Asit hidrolizi ve sonrası işlemlerde biriken iyon yoğunluğunun kolona ve kromotogramları etkisini önlemek amacıyla içinde H<sup>+</sup> ve CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> iyonlarının bulunduğu külden arındırma koruyucu kolonu (Biorad, ABD) ana kolondan önce bağlanarak iyonların tutulması sağlanmıştır. Ayrıca, kolon ömrünü uzatmak amacıyla likör analizleri için ana kolondan önce koruyucu güvenlik kolonu (Phenomenex, ABD) kullanılmıştır.

*Oligosakkarit Analizi:* Polimerleşme derecesi 2-6 arasında olan oligosakkaritlerin analizi için enzim hidrolizinden çıkmış likörler 0,45µm gözenek çaplı membran filtrelerden geçirildikten sonra Aminex HPX-42A oligosakkarit kolonu (Bio-Rad, ABD) ve aynı HPLC sistemi ve RI detektör kullanılmıştır. Taşıyıcı faz olan ultra saf suyun akış hızı 0,6ml/dk, kolon sıcaklığı ise 80°C'dir. Ayrıca kromotogramlardaki kaymaları önlemek için monosakkarit analizinde kullanılan külden arındırma koruyucu kolonu (Biorad, ABD) sisteme bağlanmıştır.

*Asetik Asit Analizi:* Yapısal karbonhidrat analizi sırasında mısır koçanı örnekleri asit hidrolizi sonrasında monosakkarit analizindeki işlemlerden geçtikten sonra aynı HPLC sisteminde kırılma indisi (RI) detektörü kullanılarak derişimler belirlenmiştir. Analiz için taşıyıcı fazın 5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, akış hızınının 0,6 ml/dk olduğu Aminex HPX-87H organik asit (Bio-Rad, ABD) kolonu kullanılmıştır. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 60°C olarak ayarlanmıştır.

### 3.2.2.5. Ksilanaz Enzimi Aktivitesi Analizi

Enzimlerdeki ksilanaz aktivitesi, ksilanın hidrolizi sonrası açığa çıkan indirgen şekerin dintirosalisilik asit (DNS) kullanılarak ölçülmesine dayanan yöntemle belirlenmiştir (Bailey vd., 1992; Yegin vd., 2017). Yönteme göre %0,5 (a/h)'lik kayın ağacından (beechwood) elde edilen ksilan substratı 50mM (pH5,2) sitrat tampon çözeltisiyle hazırlanmıştır. Sonrasında 900µl substratın üzerine farklı derişimlerdeki 100µl enzim eklenerek 50<sup>0</sup> C'de 5 dk boyunca su banyosunda inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1500µl DNS çözeltisi eklenip, numune 5 dakika boyunca kaynayan su banyosunda bekletilerek enzim aktivitesi durdurulmuş ve analiz öncesi 1 dk soğutulmuştur. Her örneğe spesifik enzim reaksiyonu kör noktası ise enzimin kaynamadan hemen önce eklenmesiyle oluşturulacaktır, böylece reaksiyon olmayacak ama enzimin kütesinin etkisi elimine edilecektir (Yeğın, 2017). Yönteme göre enzimatik hidrolizi sonucu substratın parçalanmasıyla oluşan indirgen şeker ve DNS'in reaksiyonuyla oluşan renk değişiminin spektrofotometrede okunmasıyla belirlenmiştir. Bütün örneklerin ve körlerin absorbansları spektrofotometre (Shimadzu, Japan) ile 540 nm dalga boyunda suya karşı okunduktan sonra kör noktalar çıkarılarak enzime bağlı renk değişimi elde edilmiştir.

Örneklerin derişimlerin belirlenmesi için kullanılacak standart grafiğinin hazırlanırken 2 g/l ksiloz stok çözeltisi 50mM (pH: 5,2) sitrat tampon çözeltisi ile 0-75 µg ksiloz içeren derişimlere seyreltilmiştir. Yukarıdaki prosedür kullanılarak ksiloz çözeltilerin DNS ile oluşturdukları renk spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kör olarak ise ksiloz çözeltisi yerine boş tampon çözeltisi eklenerek elde edilmiştir. Örneklerin absorbansları kör noktadan çıkarıldıktan sonra ksiloz derişimine bağlı renk değişimi elde edilmiş ve bu absorbanslar ile standart grafiği çizilmiştir. Standart grafik kullanılarak enzim etkisi sonucu ortaya çıkan indirgen şeker miktarı serbest ksiloz cinsinden bulunmuştur.

Enzim aktivite birimi (U/ml); belirtilen koşullarda (50°C ve pH 5,2) bir dakikada 1 µmol ksiloza eşdeğer gelen indirgen şekerleri serbest hale geçiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Örneklere ait enzim aktivitesi aşığıda verilen Denklem 9 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{X}{150,13} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{0,1} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

Denklem 9

X: µg ksiloz (standart eęrisiyle hesaplanır)

5: inkübasyon süresi

150,13: ksilozun moleküler ağırlığı

0,1: eklenen enzim miktarı

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Mısır Koçanının Karakterizasyonu

Lignoselülozik hammaddedeki hemiselüloz yapının temel karbonhidratı olan ksilan, KOS üretimi için substrattır. Dolayısıyla çalışmanın başında yüksek ksilan oranına sahip olan tarım-gıda atıkları arasından mısır koçanı KOS üretimi için hammadde olarak seçilmiştir (Hamsen vd., 2010; Dongen vd., 2011; Işıkgör vd., 2015). Ksilan, lignin ve selüloz polimerleri arasında konumlandığı için oligosakkaritlere hidrolizi sırasında lignin ile ilişkisi süreçte önemli bir rol almaktadır. Bu sebepten hidrolizi kolaylaştırmak amacıyla lignin miktarı diğer bir kıstas olarak belirlenmiş ve mısır koçanının bu açıdan da diğerlerine göre daha üstün olduğu görülmüştür.

Mısır koçanın karakterizasyonu daha sonra uygulanacak işlemlerin hammaddeye etkilerini ve KOS üretebilme yetilerini karşılaştırabilmek için temel verilerin elde edildiği basamaktır. Ayrıca, baştaki içeriğin istenilen koşullara uygunluğu ve literatür ile karşılaştırılabilmesi açısından önemlidir.

Tablo 4.1 deki analiz sonuçlarına göre, örnekteki en fazla polimer %41,9 ile selüloz (glukan cinsinden) iken, ksilan %26,8 ve lignin %18,8 olarak ölçülmüştür. Önceki çalışmalarda Liujan vd. (2016); Dongen vd. (2011); Fialho vd. (2015), örneklerinde sırasıyla %23 ksiloz (%20 ksilan); %28 ksiloz (%25 ksilan) ve %25 ksilan bulmuşlardır. Ksilan tipi hemiselüloz ksilozdan oluşan ana zincir üzerine bağlanmış diğer beş ya da altı karbonlu monosakkaritler ve asetil gruplardan oluşmaktadır. Analiz sonuçlarına göre kullanılan mısır koçanında %26,8 ksilan, %2,43 arabinan ve %3,76 asetil grup ile birlikte toplam %33,0 hemiselüloz bulunmaktadır. Önceki çalışmalarda, Pointer vd. (2014) %44, Hamsen vd. (2010) %44, Bajpai (2016) %35 ve Işıkgör vd. (2015) %26-%31 hemiselüloz olduğu rapor etmişlerdir. Aynı raporlarda lignin %6 ve %17 arasında değişmektedir. Önceki yayınlarla bu çalışma karşılaştırıldığında ksilan ve lignin miktarları yaklaşık olarak paralellik göstermektedir. Aradaki küçük farklar analiz yöntemlerinin değişikliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bazı kaynaklardaki özellikle hemiselüloz miktarlarındaki yüksek farklılıklar ise koçanın elde edildiği mısır bitkisinin cinsine ve hasat zamanına bağlanabilir (Keskin vd., 2018).

Tablo 4.1. Mısır koçanının bileşimi.

Bileşen	Derişim <sup>a</sup> (g/100 g Kuru Madde)
Kül	0.21 ±0.04
Selüloz (glukan cinsinden)	41.9 ±1.75
Ksilan	26.8 ±1.12
Arabinan	2.43 ±0.17
Asetil grup	3.76 ±0.43
Lignin (asitte çözünmeyen)	18.8 ±1.60
Çözünen Madde (suda ve alkolde toplam)	7.86 ±1.59
Toplam	101.8

<sup>a</sup>Değerler altı ölçümün ortalamasıdır. ± Standard sapma

## 4.2. Organosolv Önişlemi

Yukarıdaki bölümlerde belirtildiği üzere mısır koçanının ana bileşenleri selüloz, kslian ve lignindir. KOS üretimi için öncelikle bu bileşenlerin önişlemler kullanılarak birbirlerinden tamamen ya da kısmen ayrılması gerekmektedir. Bu çalışmada katı örneğe enzimatik hidroliz uygulanması hedeflendiğinden kullanılacak önişlemin ksilanı büyük oranda katıda bırakması öte yandan en önemli bariyer olan lignini uzaklaştırması gerekir. Buna uygun olarak bu çalışmada organosolv önişleminin kullanılması ve bu önişlemin şartlarının hedefler doğrultusunda optimize edilmesi konu edilmiştir. Çalışmada organosolv 130°C-190°C arasında, süre (0,5-2 sa) ve sıvı fazdaki etanol derişimi (%50-%70) değiştirilerek uygulanmıştır (Tablo 4.2). Ayrıca hedefler doğrultusunda metal oksit katalizör ilavesi de denenmiştir. Kontrol olarak otohizoliz yöntemi kullanılarak organosolv ile karşılaştırılmıştır. Önişlemler sonrasında çözünmeden kalan katının miktarı ve sıvı kısmın (likörün) pH değeri ölçülmüş ve katının yapısal bileşenleri belirlenmiştir.

Organosolv ön işleminde geçmiş katı analiz edildiğinde sabit süre (1 sa) ve etanol derişiminde (%70) sıcaklık arttıkça elde edilen katı kazanımının azaldığı görülmektedir (Tablo 4.2). 150°C'de 1 sa %70 etanol ile organosolv sonucu %20 katı çözünerek katıya geçerken 170°C'de aynı koşullarda bu oran %29'dur. Ana polimerlerin toplamına bakıldığında, sıcaklık arttıkça yapısal bileşenler dışındaki maddelerin (çözünebilen diğer maddeler) oranlarının azaldığı görülmektedir. Buradan, suda veya alkolde çözünebilen maddelerin bir kısmının görece düşük sıcaklıklardaki organosolv uygulaması sırasında katıda kaldığı anlaşılmaktadır.

Her üç sıcaklıkta da selülozun %83-%85 arası katıda çözünmeden kalmıştır (geri kazanım) (Şekil 4.1 a). 150°C ve 170°C'de ksilan büyük oranda geri kazanılırken (%85,4 ve %80,9), 190°C'de ksilanın sadece % 35,5'i geri kazanılmıştır. Lignin uzaklaştırma oranı sıcaklıkla beraber belirgin şekilde artmıştır. 190°C'de ligninin %76'sının uzaklaşmış olması selüloz ve ksilanın hidrolizi açısından olumlu değerlendirilebilir. Ancak ksilan geri kazanımı düşük olduğu için KOS üretimine uygun bir işlem olarak kabul edilemez. Öte yandan bu koşulda elde edilen katı, selüloz hidrolizi ile glikoz elde etmek için kullanılabilir. Bu nedenle bu koşul başka biyo temelli ürünlerin üretiminde kullanılma potansiyeline sahiptir.

170°C'de uygulanan ön işlem alkol kullanılmadan sadece su varlığında uygulandığında (otohidroliz) ksilan büyük oranda kaybedilmektedir (ksilan kazanımı %23,5) (Şekil 4.1b ve Tablo 4.2) . Bu durum pH'nın düşük olmasıyla ilişkilendirilebilir. Otohidroliz sırasında iyonlaşan sudaki  $H_3O^+$  iyonları ve hemiselülozdan ayrılan asetil grupları asit katalizörü etkisi görerek ksilanın ayırımını ve ayrıca hidrolizini tetiklemiştir (Zahao vd., 2009). Ayrıca, 170°C'de 1 sa %50 etanol ile ön işlem gerçekleştiğinde ksilan geri kazanımı aynı koşullarda ancak %70 etanolla gerçekleştirilene göre azalmaktadır. Bu durum reaksiyondaki su oranının, dolayısıyla iyonlaşmanın ve otohidroliz etkisinin artmasına bağlanabilir (Mataskas vd., 2019; Nitsos vd., 2017). 170°C'de 1 sa koşullarında %70 etanol ve %50 etanol ile gerçekleştirilen organosolv otohidroliz (%0 etanol) ile karşılaştırıldığında selülozun geri kazanımı da yine otohidroliz etkisi nedeniyle azaldığı görülmektedir. Sonuç olarak alkol derişimini azaltmak çözünürlüğü artırarak, geri kazanım oranını düşürmektedir.

150°C'de %70 etanol derişimde sürenin çözünürlüğe etkisinin düşük olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.2). Öte yandan işlem süresinin artmasının ksilan geri kazanımını azalttığı gömüştür (Şekil 4.1c ve Tablo 4.2). Ayrıca, 0,5 sa yapılan işlemde lignin ayırımının aynı koşullardaki 1 ve 2 sa süreyle yapılan işlemlere göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bunlara göre en uygun sürenin 1 sa olduğu sonucuna varılmıştır.

Asidik katalizörler ya da  $FeCl_3$  ve  $MgCl_2$  gibi metal tuzlar kimyasal ön işlemleri hızlandırması için kullanılmaktadır, fakat bu katalizörler lignin uzaklaştırılması artırırken aynı zamanda hemiselüloz degradasyonu da sebep olmaktadır (Nitsos vd. 2017; Huijigen vd. 2011; Matsakas vd. 2019; Farmanbordar vd. 2018, Zhang, 2018; Cuiilty vd. 2018). Katalizör olarak yapısında hidroksil bulunan moleküller kullanıldığında hidroksil iyonlarının reaksiyon sırasında düşen pH'yı nötralize ederek hemiselülozun ortamdaki asit nedeniyle parçalanmasının engelleneceği öngörülmektedir. Ancak metal hidroksiller çok reaktif olduğu için daha stabil olan metal oksitler kullanım kolaylığı sağlamaktadırlar (Li vd., 2018). Çalışmamızda, öngörüldüğü gibi, tüm sıcaklık koşullarında MgO organosolv ortamının pH değerini yukarıya çekmiş (Tablo 4.2 ve Şekil 4.1 d). MgO katalizörlüğünde 170°C'de 1 sa

%70 etanol ile yapılan organosolv aynı koşullardaki katalizörsüz işlem ile karşılaştırıldığında delignifikasyon artarken katıdaki ksilan miktarı aynı kalmıştır (Şekil 4.1 a ve d). Aynı karşılaştırma 190°C'deki işlemler için yapıldığında delignifikasyonun değişmemesine rağmen katıdaki ksilan miktarının iki katına çıktığı görülmüştür. MgO kullanımı otohroliz ve 190°C'de gerçekleşen organosolv işlemlerinde katıdaki ksilan miktarını artırma hedefini gerçekleştirmiştir. Aynı etkinin 170°C'deki işlemde görülmemesi MgO kullanılmadığında ksilan kaybının hali hazırda az olması ile açıklanabilir. Daha önceki çalışmalarda MgO'nun katalizör olarak kullanımı selüloz ve ksilanın selülaz enzimiyle olan etkileşimi test etmek için denemiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Deng vd. 2015, Li vd. 2018, You vd. 2019).

Organosolv ligninin uzaklaştırılmasında etkili olmuş ve sıcaklık lignin ayrımında rol oynayan en önemli değişken olmuştur. Yüksek sıcaklık organosolv sırasında ksilanın çözünerek kaybına sebep olmaktadır, ancak çözgündeki etanol miktarının yüksek tutulması ya da MgO eklenerek ortamın pH değerinin düşmesinin engellenmesi ile ksilan kaybı düşük bir seviyede tutulabilir. Önışlem süresi delignifikasyon ya da ksilan tutulmasında fark yaratan bir etki yapmamaktadır. Önışlem sonucu ksilan katıda tutulurken önemli miktarda delignifikasyon sağlanmıştır ve sonraki bölümde bu etkinin ksilanaz enzim faaliyetine etkisi incelenmiştir

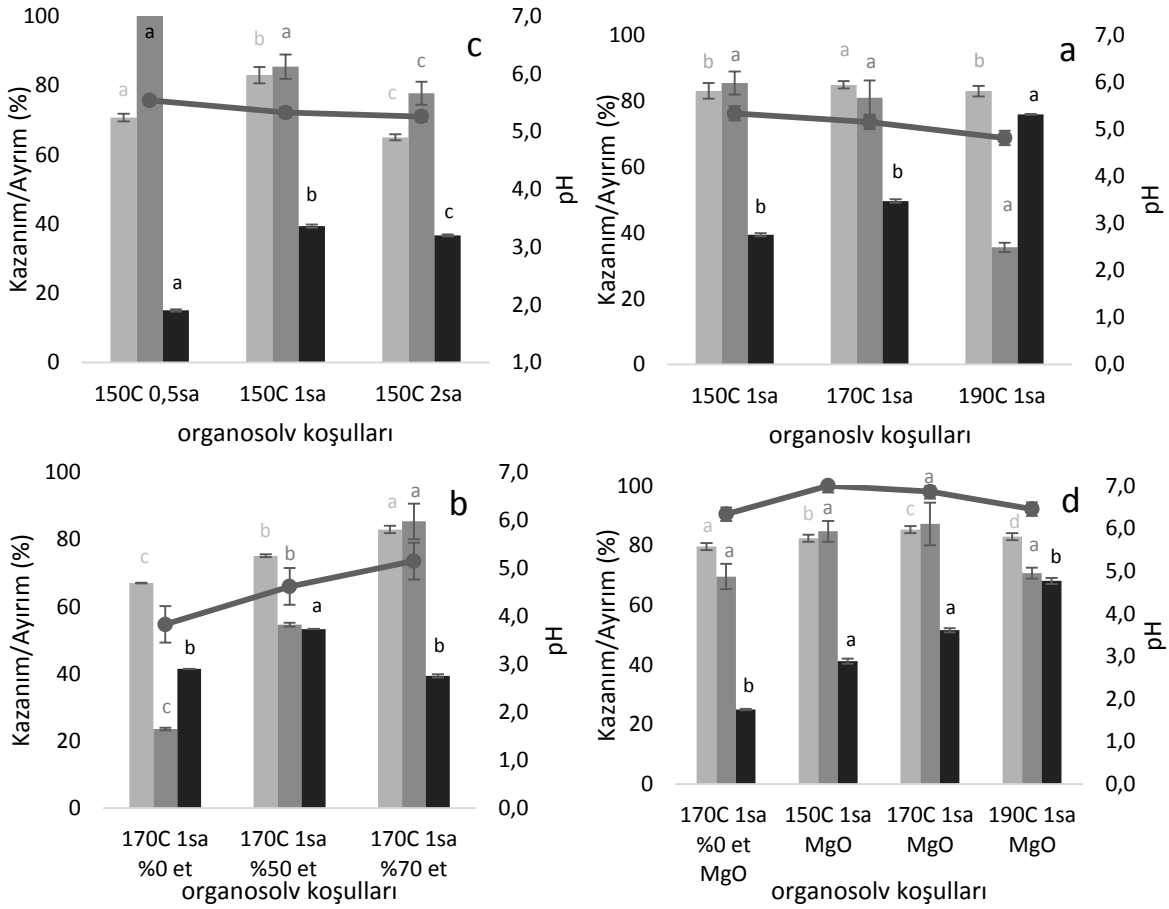
Tablo 4.2. Organosolv önişlemi koşullarının biyokütle bileşenlerine etkisi<sup>a</sup>.

Koşullar (sıcaklık-süre-%etanol- katalizör)	Geri kazanılan biyokütle <sup>b</sup> (g)	Çözünürlük (%)	Likör pH değeri	Katıdaki Polimerler (%)			Geri Kazanım <sup>c</sup> (%)		Lignin Ayrımı <sup>c</sup> (%)
				selüloz	ksilan	lignin	selüloz	ksilan	
İşlenmemiş Mısır Koçanı				41,91 ±1,75	26,83 ±1,12	18,78 ±1,60			
170°C-1 sa-%0 (otohidroliz)	11,1	55,6	3,83	63,20 ±0,06	13,99 ±0,24	23,75 ±0,07	67,02 a	23,55 a	41,42 a
170°C-1 sa-%0-MgO (katalizörlü otohidroliz)	15,4	36,6	6,33	52,58 ±1,04	29,40 ±1,79	21,86 ±0,11	79,60 a	69,53 b	25,04 a
130°C-0,5 sa-%50	19,2	23,2		36,81 ±0,40	27,54 ±0,05	13,88 ±0,75	67,46 ab	78,82 b	40,78 b
150°C-0,5 sa-%70	20,0	20,0	5,54	37,02 ±0,59	34,56 ±0,35	16,33 ±0,35	70,70 ab	103,10 b	27,39 bc
150°C-1 sa-%70	19,9	20,2	5,33	43,59 ±1,24	28,71 ±1,17	13,68 ±0,47	82,97 ab	85,39 b	39,37 cd
150°C-2 sa-%70	19,1	23,7	5,26	35,70 ±0,48	27,33 ±1,17	14,93 ±0,30	65,01 ab	77,74 bc	36,70 de
170°C-1 sa-%50	14,8	40,8	4,62	53,15 ±0,31	24,72 ±0,25	14,18 ±0,60	75,13 bc	54,59 bcd	53,33 de
170°C-1 sa-%70	17,8	29,0	5,15	50,08 ±0,64	30,56 ±2,00	12,78 ±0,52	84,83 cd	80,86 cd	49,59 de
190°C-1 sa-%70	12,3	50,8	4,81	70,62 ±1,44	19,39 ±0,79	8,84 ±0,10	82,90 de	35,55 d	75,86 de
150°C-1 sa-%70-MgO	20,2	19,3		42,75 ±2,12	28,15 ±1,15	13,12 ±0,87	82,34 ef	84,68 e	41,16e
170°C-1 sa-%70-MgO	19,3	22,7	6,86	46,22 ±0,72	30,25 ±2,48	11,21 ±0,71	85,27 f	87,17 f	51,55 f
190°C-1 sa-%70-MgO	14,9	40,4	6,45	58,31 ±0,03	31,84 ±0,81	9,65 ±1,02	82,89 f	70,70 g	68,06 f

<sup>a</sup>Değerler iki ölçümün ortalamasıdır. ± Standard sapma

<sup>b</sup>Reaksiyona giren katı miktarı=25 g

<sup>c</sup>( selüloz kazanımı, ksilan kazanımı ve lignin ayrımı sonuçları kendi içlerinde tek yönlü varyans analizi (p<0,05)ve Tukey test kullanılarak karşılaştırılmıştır. Aynı sütundaki harfler istatistiksel benzerlik ve farklılıkları ifade eder.)



### 4.3. Enzim Hidrolizi

Organosolv işleminde KOS üretimi için potansiyel hammadde olabilecek biyokütleler ksilanaz ile muamele edilerek katı fazda yer alan ksilanın hidroliz olarak sıvı fazda KOS halinde birikmesi takip edilmiştir. Ticari üç enzim, üreticilerin ksilanaz aktivitesi için önerdiği koşullarda ve ayrıca farklı sıcaklık, enzim dozajı ve katı:sıvı oranlarında KOS üretimi için kullanılmıştır. Önişlemden geçen biyokütle tampon çözeltide süspanse edilmiş ve enzim eklendikten sonra aralıklarla alınan sıvı örneklerdeki toplam KOS ve ksiloz takip edilmiştir. Seçilen örneklerde KOS'un polimerleşme derecesi dağılımı da belirlenmiştir.

#### 4.3.1. Sıcaklığın KOS üretimine etkisi



Sıcaklık enzim hidrolizine etki eden en önemli faktörlerden biridir. Sıcaklık ayrıca substratların çözünürlüğüne ve ortamın akışkanlığı üzerinde etkilidir. Genel olarak yüksek sıcaklıklarda karıştırma ve kütle transferinin daha etkili olduğu söylenebilir (Gatt, 2019). Yüksek sıcaklık enzimin katı biyokütlerdeki ksilan ya da diğer polimerlere erişilebilirliğini ve böylece hidrolizin verimini yükseltebilir. Ek olarak yüksek sıcaklık mikrobiyal kontaminasyonu engellediği/geciktirdiği için antimikrobiyal ihtiyacını ortadan kaldırır.

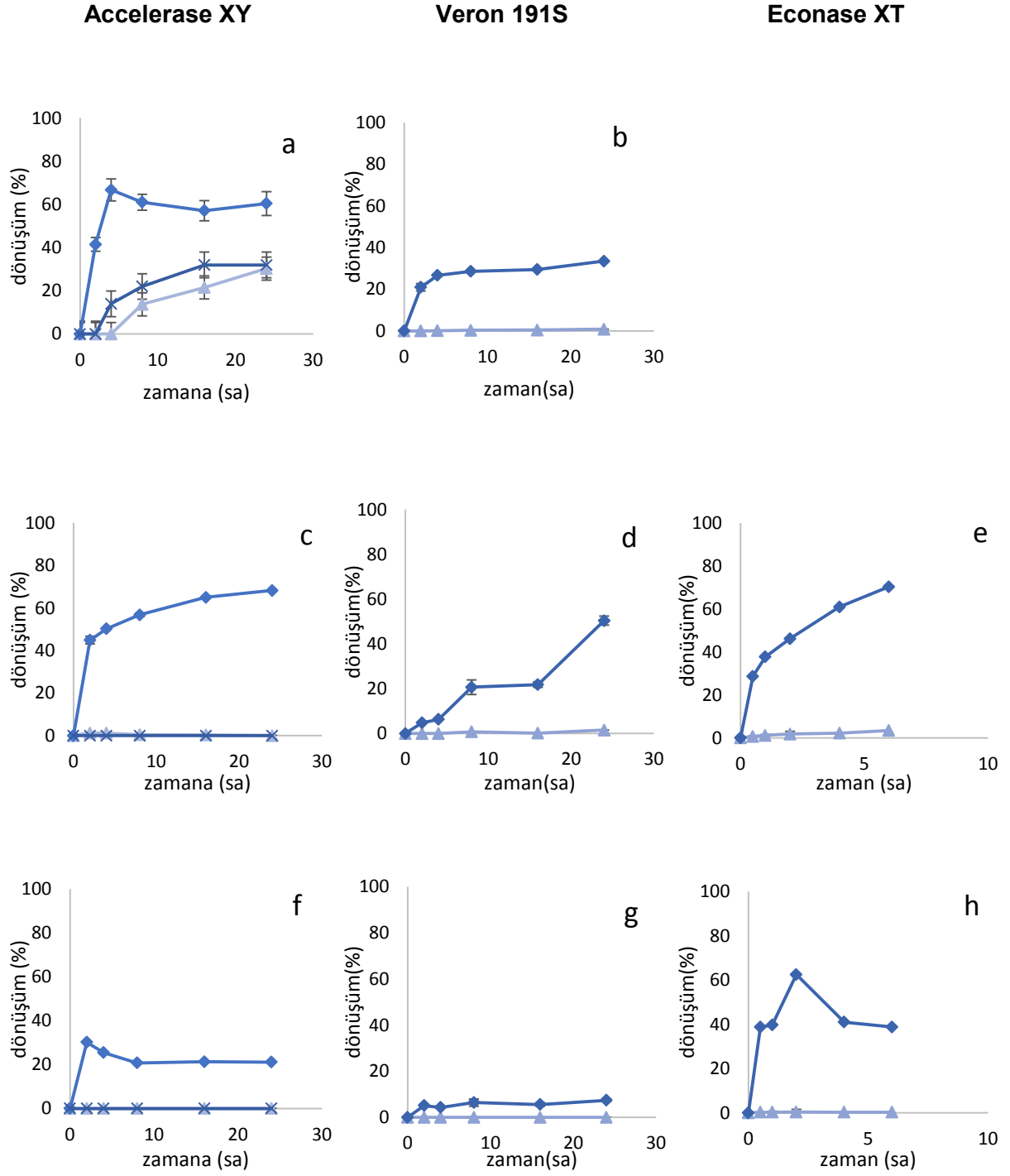
Çalışmamızın bu bölümünde öncelikle üç farklı enzim (Econase XT, Accelerase XY ve Veron 191S) üç farklı sıcaklıkta (55°C, 70°C ve 85°C) uygulanmıştır. Bu testte önışlemeden geçmiş katılar arasından model olarak bir tanesi kullanılmıştır; 170°C'de 1 sa %70 etanol ile muamele edilmiş olan biyokütle ksilan kazanımının ve lignin ayırımının yüksek olması sebebiyle bu test için seçilmiştir.

Üreticiden alınan bilgiye göre Accelerase XY enzimi için optimum sıcaklık 55-75°C arasındadır. Çalışmada, 55°C'de gerçekleştirilen hidroliz sırasında ksiloz, glikoz ve KOS oluşmuştur (Şekil 4.2 a). Enzimler mikroorganizmalar tarafından kompleks halinde üretildiği ve bu halde sinerjik etki yüksek oldukları için ksilan hidrolizine yönelik ticari enzimlerde endo- ve ekzo- aktiviteleri olan enzimler bir arada bulunur (Dhillon vd., 2011). Bu sebeple 55°C'de aktif olan endo- ve ekzo-ksilanaz ve ayrıca enzim kompleksinde bulunması muhtemel selüloz aktivite göstermiş olabilir. Hidrolizinin sonucunda 24 saatte %60'ı KOS halinde olmak üzere biyokütlerdeki ksilanın %90'ı enzimatik hidroliz ile sıvıya geçirilmiştir. Ek olarak selülozun %32'si glikoza dönüşmüştür. Hidrolizin ilk 4 saatinde ksilanın %44'ü hızlı şekilde dönüştürüldükten sonra geriye kalan 20 saatte hidroliz düşük bir hızda devam etmiştir. Hidroliz 70°C'de yapıldığında selüloz ve ekzo ksilanaz enzimleri yüksek aktivite gösterememiş ve glikoz hiç üretilmezken ksiloz miktarları azalmıştır (55 °C'deki hidrolize göre) (Şekil 4.2 c). Hidroliz sırasında ksiloz oluşumu, küçük oligosakkaritlerden ksiloz hidrolizleyen  $\beta$ -ksilosidaz enzimiyle de ilişkilendirilebilir. 70°C'de toplam ksilan dönüşümü 55°C'ye göre %35 daha az olmasına rağmen KOS oranı daha fazla olduğu için hedeflerimize daha uyundur. Bu şartlarda enzim hidrolizi 24 saatte tamamlanmıştır. 85°C'deki hidrolizde sıcaklık Accelerase XY enziminin sıcaklık profilinin dışına çıktığı için enzim düşük aktivite gösterebilmiş ve ilk iki saatte önışlem görmüş mısır koçanının sadece %21'ini KOS'a çevirebilmiştir. Bundan sonra KOS ya da ksilan oluşumu görülmediğinden enzimin bu sıcaklıkta aktivitesini kaybettiği sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak test edilen şartlarda, Accelerase XY enzimi ile en iyi dönüşüm 70°C'de 24 saatin sonucunda elde edilmiş, bu koşulda organosolv işleminden çıkan katıdaki ksilanın %68'i KOS'a dönüştürülmüştür. Hidroliz liköründeki KOS derişimi 7,40 g/l'dir.

Veron 191 S enzimi önceki bir çalışmada kullanılmış ve ksiloz oluşumunun düşük olduğu rapor edilmiştir (Kiran vd., 2013). Çalışmamızda da benzer şekilde üç farklı sıcaklıkta da ksiloz çevirimi çok düşük olmuştur (Şekil 4.2 b, d, g). Öte yandan KOS üretimi de düşük kalmıştır. En yüksek dönüşüm 70°C'de yapılan denemede elde edilmiştir (%50).

Econase XT yüksek sıcaklıklarda stabilitesini koruyan bir enzimdir. Üreticisi 65°C-95°C arasında bu enzimin aktivitesinin tamamına yakınının korunduğu bildirmiştir. Çalışmamızdaki yapılan ön testlerde 55°C'de enzimin düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek sıcaklığın daha önce belirtilen yararları da göz önüne alınarak enzimatik hidroliz 70°C ve 85°C'de gerçekleştirilmiştir. Altı saatlik hidroliz sonunda dönüşümü gerçekleştirebilen enzim bu yönüyle diğer enzimlere göre daha üstündür. Toplam ksilan dönüşüm oranı 70°C'de yaklaşık %70, 85°C'de %38 olmuştur. 70°C'de gerçekleşen hidroliz sırasında üretilen ksiloza dönüşüm %3 gibi düşük değerlerde kalmıştır. Bu sıcaklıkta 6 sa içinde gerçekleşen %70'lik ksilan dönüşümü ile 7,64 g/l KOS elde edilmiştir.

Sonuç olarak 70°C'de gerçekleştirilen enzimatik hidroliz Accelerase XY ve Econase XT enzimleri için gerek KOS'a dönüşümün yüksek olması gerekse ksiloza dönüşümün düşük olması sebepleriyle en uygun koşul olarak belirlenmiştir. Accelerase XY enzim kompleksindeki ekzo-ksilanaz optimum koşullarda hiçbir aktivite göstermeyip ksiloz oluşumunun gözlenmemesi önemli bir avantaj olsa da Econase XT ile karşılaştırıldığında hidroliz daha uzun (24 sa) sürmüş ve KOS verimi daha düşük olmuştur. Econase XT enzimi 70°C'de küçük miktardaki ksiloz oluşumu ile beraber en büyük miktardaki KOS dönüşümünün gerçekleştirmektedir. Hidrolizin kısa sürede gerçekleşmesi (6 sa) bu enziminin önemli bir avantajıdır.



Şekil.4.2. Enzimatik hidroliz sıcaklığının KOS üretimine etkisi  
 Enzimler: sol sütun: Accelerase XY; ortan sütun: Veron 191S; sağ sütun: Econase XT  
 Hidroliz sıcaklığı (T): a,b: 55°C; c, d, e: 70°C; f, g, h: 85°C  
 ▲ : ksiloz; ◆ : KOS; x: glikoz

#### 4.3.2. Organosolv Önişlemi Koşullarının KOS Üretimine Etkisi

Organosolv işlemindeki parametrelerin selüloz enzimatik hidrolizini nasıl etkilediği ve verimin nasıl arttırılabileceği ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Kalogiannis vd. 2018; Jang vd. 2018; Milling vd. 2018; Kim vd. 2019; Huijgen vd. 2011; Cebreiros vd. 2020; Matsakas vd. 2019; Park vd. 2010). Bazı çalışmalarda ise organosolv koşulları hemiselülozu katıda bırakacak şekilde ayarlanmış ve karbonhidratların selüloz ile hidrolizinin nasıl etkilediği incelenmiştir (Li vd. 2018, 2019a, 2019b). Öte yandan, önişlem görmüş katıdan KOS üretimi daha önce yapılmadığı için ksilanaz enziminin katıda kalan hemiselülozu hidrolizinde organosolvun etkisi incelenmemiştir. Çalışmamızda organosolv önişleminin KOS üretimine etkisini görmek için ksilan kazanımı ve lignin ayırımı yüksek katılar seçilerek belirlenen sıcaklıklarda üç farklı enzim ile hidroliz yapılmıştır.

55°C'deki testlerde Accelerase XY enzimi kullanılmıştır. İşlem görmemiş mısır koçanı (kontrol testi); 130°C'de 0,5 sa %50 etanol ve 170°C'de 1 sa %70 etanol ile organosolv işlemini görmüş örnekler enzim hidrolizine uğratılmıştır. İşlem görmemiş mısır koçanında KOS oluşmazken ksilanın %17,6'sı hidroliz sıvısına ksiloz formunda geçmiştir (Şekil 4.3). Daha önceki çalışmalarda (Jiang vd., 2019) da gösterildiği gibi doğrudan enzim hidrolizinin KOS üretiminde başarısız olduğu görülmüştür. 130°C'de işlem görmüş örnek kullanıldığında işlem görmemiş örneğe benzer sonuçların elde edilmiş olması bu sıcaklıkta yapılan işlemin etkisiz olduğunu göstermiş, bu sebeple sonraki denemelerde 130°C'deki organosolv örneği deneme desenlerinde kullanılmamıştır. Diğer yandan 170°C'de 1 sa %70 etanol ile organosolvden elde edilen biyokütle ile yapılan denemede %60 civarında KOS'un sıvıya geçmesi önişlemin KOS üretimi için etkili bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3).

Organosolv işleminden çıkan çeşitli biyokütle örnekleri 70°C'de enzim hidrolizine sokulduğunda alınan sonuçlar Şekil 4.3'de sunulmuştur.

Accelerase enzimi kullanıldığında 150°C'de 1 sa %70 etanol ile MgO katalizörlüğünde muamele edilmiş örneğin hidrolizinde 24 sa sonunda ksilanın %34'ü KOS'a dönüşürken %4'ü ksiloza dönüşmüştür (Şekil 4.3 c). 170°C'de organosolv işlemine uğramış örnekte ise 8 saatte ksilanın %68'i KOS'a, %8'u ksiloza dönüşmüştür (Şekil 4.3 f). Daha sonrasında 48. sa'in sonuna kadar toplam çevirim sabit kalırken KOS'un az bir miktarı ksiloza parçalanmıştır. Sonuç olarak 150°C'de MgO katalizörlüğündeki organosolv örneğinden 3,73 g/l, 170°C'deki organosolv örneğinden 7 g/l KOS elde edilmiştir. KOS verimi işlem görmeden önceki ham mısır koçanını bazında 150°C ve 170°C'de işlem görmüş örneklerde sırasıyla %8 ve %12 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4 a). Accelerase XY ile 55°C ve 70°C'deki hidrolizler karşılaştırıldığında sıcaklığın yükseltilmesiyle KOS üretiminin değişmediği ancak

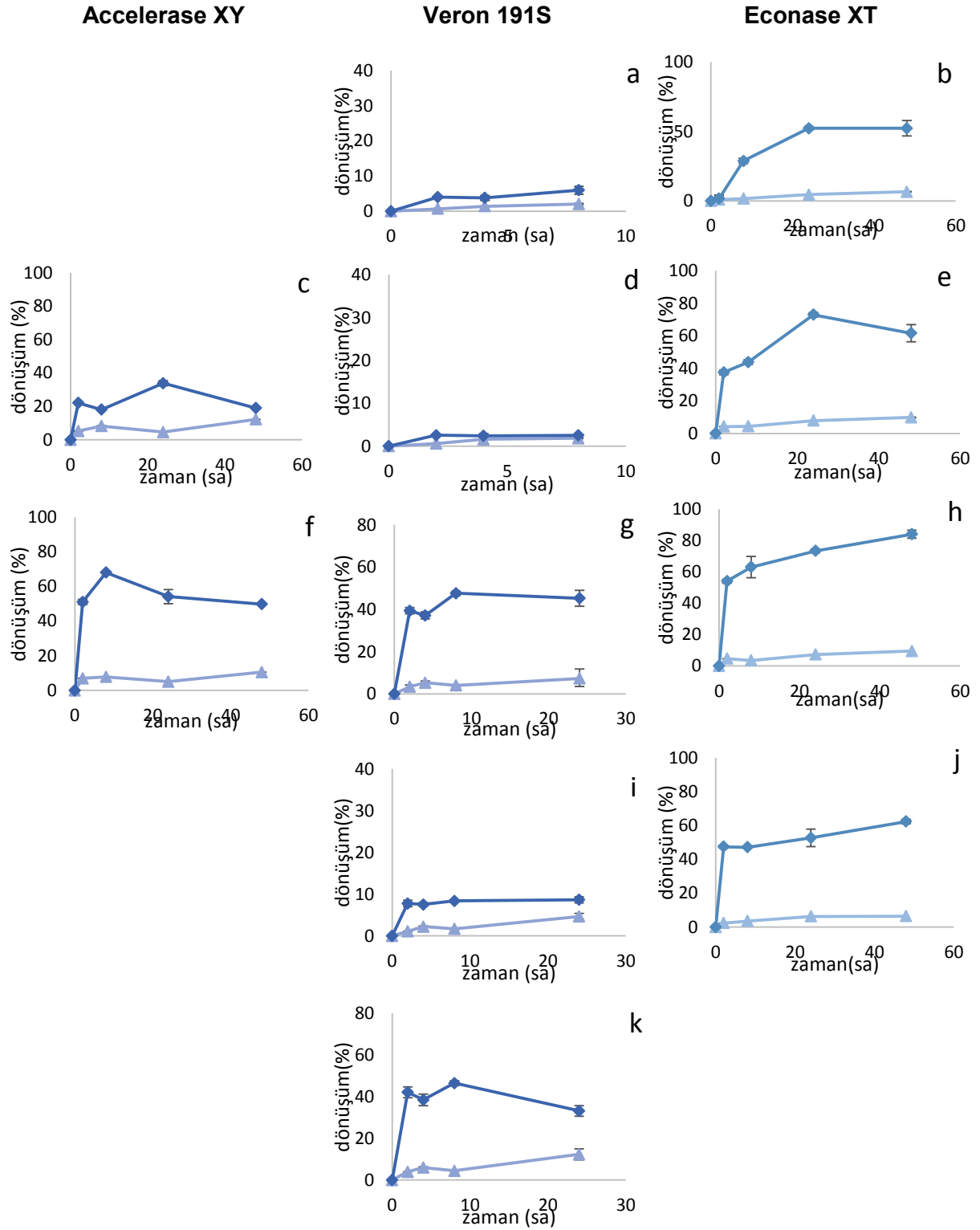
ksiloz üretiminin azaldığı görülmüştür. Bu durum ekzo-ksilanaz ve ksilosidaz enzimlerinin sıcaklıktan etkilenirken, endo-ksilanazın etkilenmediğini göstermiştir.

Veron 191S enzimi 70°C'de yüksek aktivite gösterememiş ve dönüşüm düşük kalmıştır. 150°C'de 1 sa %70 etanol; 150°C'de 1 sa %70 etanol-MgO katalizör ve 170°C 1 sa %70 etanol-MgO katalizör ile işlenmiş örneklerde ksilan dönüşümü %10'in altındadır (Şekil 4.3 a, d ve i). 170°C'de 1 sa %70 etanol ve 190°C'de 1 sa %70 etanol-MgO katalizör ile işlem görmüş örneklerin 2 saatlik enzimatik hidrolizleri sonucu ksilanın yaklaşık %42'sinin KOS'a dönüşümü sağlanmıştır (Şekil 4.3 g ve k). Bu iki katının önışlem görmüş örnekler arasında en yüksek delignifikasyona sahip olması lignin ayrışımının ksilanaz enzimi ile KOS üretimine olumlu etkisi olduğunu göstermiştir.

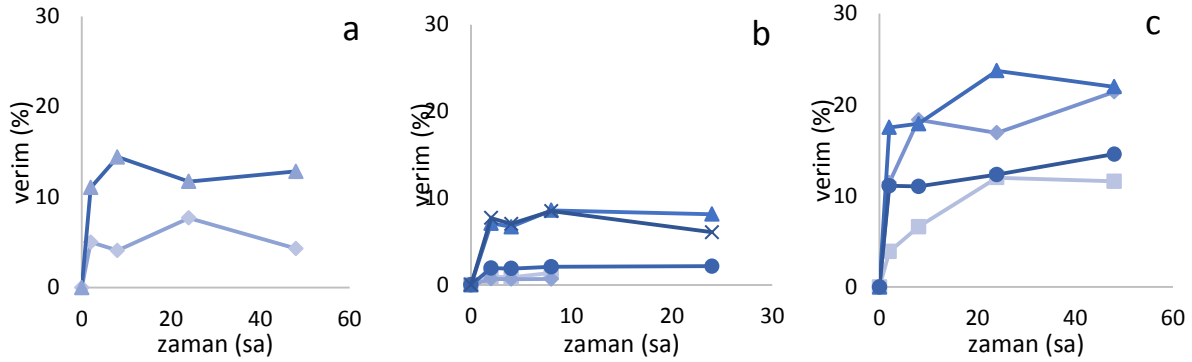
150°C ve 170°C'de 1 sa %70 etanol ile işlenmiş örnekler ve aynı koşullarda MgO katalizörlüğünde elde edilen örnekler kullanılarak Econase XT enzimi ile 70°C'de hidroliz gerçekleştirilmiştir. 150°C'de katalizör olmadan ve 170°C'de katalizör varlığında elde edilen örneklerin hidrolizleri sonucu ksilanın yaklaşık %52'si KOS'a dönüşmüştür (Şekil 4.3 c ve j). Öte yandan 150°C'de katalizör varlığında ve 170°C'de katalizör olmadan elde edilen örneklerde 24 ve 48 sa sonunda ksilanın sırasıyla %72 ve %84'i KOS olarak sıvıya geçmiştir (Şekil 4.3 e ve h). 150°C'deki önışlemlerde katalizör eklentisinin lignin ayırmada ve ksilanı katıda tutmada etkisi görülmemiştir (yaklaşık %40 lignin ayırımı, %85 ksilan tutumu). Öte yandan, enzim hidrolizi sonucu KOS oluşturma oranlarının farklı olması bu işlemlerin ksilanı tutma ve lignini uzaklaştırma kapasitelerinden bağımsız olarak enzimin lignoselüloza ulaşabilirliğini farklı etkilediği sonucuna varılabilir. Bu durum belirli miktardaki lignin uzaklaştıktan sonra geriye kalan selüloz-hemiselüloz etkileşiminin ve selüloz kristallenmesinin belirli bir miktarda bozunmasıyla açıklanabilir (Avila vd., 2020). Econase XT kullanıldığında ksiloz üretiminin görülmesi bu enzim kompleksinde ekzo ksilanaz ya da ksilosidaz aktivitelerinin var olduğunu göstermektedir. 150°C'de 1 sa %70 etanol ile MgO varlığında organosolv ile işlenmiş örnek kullanıldığında ksilanın %8'i ksiloz olarak sıvıya geçerken 170°C'de 1 sa %70 etanol ile işlenmiş biyokütle için bu değer %10'a çıkmıştır. Hidrolizler sonucunda bu örneklerde sırasıyla 8,9 g/l ve 10,9 g/l KOS içeren çözeltiler elde edilmiştir. Verim değerleri incelendiğinde 150°C'de katalizörsüz ve 170°C'de katalizörlü işlemler sonucu başlangıç hammaddesinin (işlem görmemiş mısırın) %12-13 kadarı KOS'a dönüşürken 150°C'de katalizörlü ve 170°C'de katalizörsüz işlemler sonucu KOS'a dönüşüm %21 olmuştur (Şekil 4.4).

Farklı yapıdaki ticari enzimler aynı işlemi görmüş katılardan farklı oranlarda KOS üretebilmektedir. Sıcaklık her enzimin özelinde değerlendirildiğinde KOS üretimini arttıran bir faktördür. Yüksek sıcaklık KOS üretimini arttırmasının yanı sıra mikrobiyal büyümeyi de

önleyeceği için antimikrobiyal kullanımı gereksinimini ortadan kaldırarak maliyetlerin azalmasını sağlar. MgO katalizörü 170°C'de kullanıldığında KOS üretimine olumsuz etki yaparken 150°C'de iyi yönde etki ederek KOS çevirimini Econase XT enzimi kullanıldığında %52'den %72'ye çıkarmıştır. Ticari enzim kullanılarak gerçekleştirilen KOS üretiminde, enzim kompleksleri ksilodiaz, endo- ve ekzo- ksilanazların yanısıra, selülaz aktivitesi de içerebilmektedir. Bu sebeple KOS üretim saflığını bozan ksiloz gibi glikoz üretimine de dikkat edilmelidir.



Şekil 4.3. Önişlem koşullarının enzimatik hidrolize etkisi (T=70°C)  
 Enzimler: sol sütun: Accelerase XY; ortan sütun: Veron 191S; sağ sütun: Econase XT  
 Önişlem koşulları: a, b: 150°C 1sa %70 etanol; c, d, e: 150°C 1sa %70etanol-MgO; f, g, h: 170°C 1sa %70etanol; i, j: 170°C 1sa %70etanol- MgO; k: 190°C 1sa %70etanol-MgO  
 ▲ : ksiloz; ◆ : KOS; x: glikoz



Şekil 4.4. Önişlem koşullarının ürün verimine etkisi

(%ürün verim=Üretilen KOS (g)/Ham biyokütle (g) x 100)

Enzimler: a:Accelerase XY; b:Veron 191S; c:Econase XT

Enzimatik hidroliz sıcaklığı: T= 70°C

Önişlem koşulları: ■: 150°C 1sa %70 etanol, ▲: 170°C 1sa %70etanol, x: 190°C 1sa %70etanol-MgO, ◆: 150°C 1sa %70etanol-MgO, ●: 170°C 1sa %70etanol- MgO

#### 4.3.3. Organosolv Koşullarının KOS Polimerleşme Dercesine Etkisi

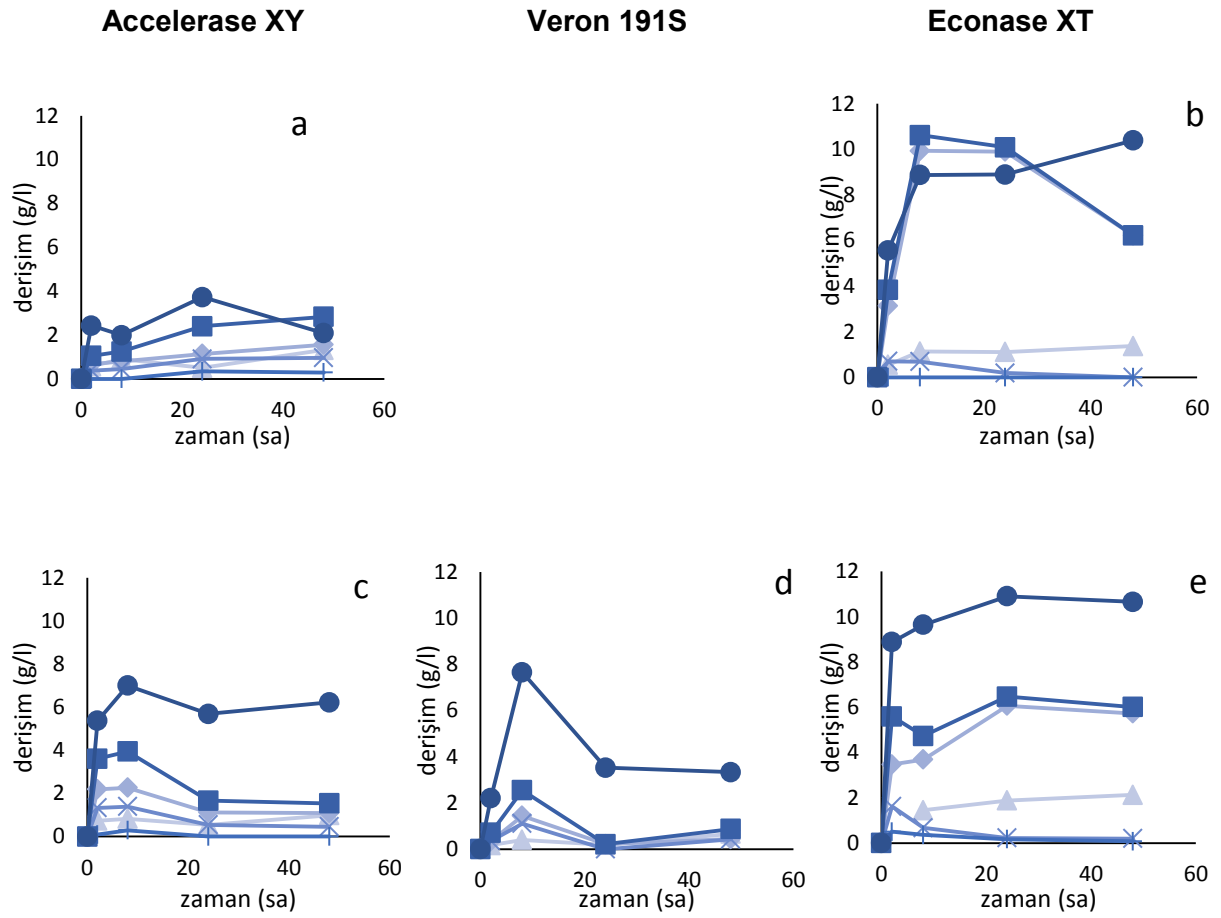
Farklı önişlemlerin lignin ayrımı ve ksilan kazanımının yanı sıra lignoselülozik yapının enzim ulaşılabilirliğine farklı etkiler yaptığı önceki bölümde sıvıya geçen toplam KOS oranlarıyla gösterilmiştir. Bu etkiyi daha derinlemesine incelemek için seçilen farklı önişlem görmüş örnekler ile üç farklı enzim kullanılarak yapılan hidrolizler sonucu elde edilen toplam KOS dışında düşük polimerizasyon derecesindeki KOS'ların her birinin miktarı belirlenmiştir. Polimerizasyon derecesi 1-6 olan oligosakkaritler düşük polimerizasyon derecesi kabul edilirken, küçük oligosakkaritlerin prebiyotik etkilerinin yüksek polimerizasyon derecesindeki KOS'lara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Childs vd., 2014).

Accelerase XY enzimi ile 70°C'de hidroliz edilen 150°C'de 1 sa %70 etanol ile MgO katalizörlüğünde organosolv önişlemi görmüş katı örnekten sıvıya 24 saatte 3,7 g/l toplam KOS geçmiştir (Şekil 4.5 a). Bunun 2,4 g/l'si düşük polimerizasyon dereceli oligomerlerden oluşmaktadır (toplam KOS'un %65'i). 170°C'de 1 sa %70 etanol ile organosolv önişlemi görmüş katı Accelerase XY ile hidroliz edildiğinde 8 sa sonunda sıvıda 7 g/l toplam KOS elde edilmiştir (Şekil 4.5 c). Sonrasında 48 saate kadar ksiloz derişimi az miktarda artarken KOS azalmıştır. Düşük polimerleşme dereceli oligomerlerin derişimi 3,9 g/l olmuştur (toplam KOS'un %56'sı). Bunların %58'i ksilobiozdur. Bu iki örnekte toplam KOS'lar arasındaki fark büyük olmasına rağmen, düşük polimerleşme dereceli KOS'ların toplam KOS'a oranları birbirine yakındır (%65 ve %58). Buna göre önişlem ksilanın hidroliz edilebilirliğini etkilerken, üretilen KOS'un polimerleşme derecesi dağılımı aynı oranda etkilenmediği sonucuna varılır.



Aynı örnekler Veron 191S enzimi ile 70°C'de hidroliz edildiğinde Accelerase XY enziminin etkisinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Her enzim aynı işlemi görmüş katıları aynı şekilde hidroliz edemiyor (Guo vd., 2018). 150°C'de MgO katalizörlüğünde organosolv işlemi gören biyokütle Veron 191S ile hidroliz edildiğinde düşük polimerizasyonlu oligosakkaritlerin derişimi çok düşük olmuştur. 170°C'de organosolva giren biyokütle hidroliz edildiğinde 8 saatte 7,65 g/l toplam KOS açığa çıkarken bunun 2,5 g/l'si düşük polimerizasyonlu KOS olmuştur (Şekil 4.5 d).

Aynı biyoküteller Econase XT enzimi ile 70°C'de hidroliz edildiğinde her iki örnek için de 10 g/l'den fazla toplam KOS elde edilmiştir (150°C'de MgO ile organosolv ile 10,6g/l; 170°C organosolv ile 10,9 g/l) (Şekil 4.5 b ve e). 150°C'de işlem görmüş biyokütle ile yapılan hidroliz sırasında 8. saatte en yüksek KOS derişimine ulaşılmıştır. DPD KOS'un derişimi 10,6 g/l, toplam KOS yaklaşık 9 g/l olarak ölçülmüştür. Toplam KOS'un daha düşük bir değerde olması bu ölçümde kullanılan asit hidrolizi sırasında KOS'ların kısmen bozunmasından kaynaklı olabilir. Dikkati çeken önemli bir nokta KOS'un büyük oranda ksilobiyozdan oluşuyor olmasıdır. Bu koşuldaki ksiloz oluşumu (1.1 g/l) düşük olarak kabul edilebilir. 170°C'de işlem görmüş biyokütlenin hidrolizi sonucunda 2 sa sonunda 8,8 g/l toplam KOS çözeltisi sıvıya geçerken derişim 8. saatte 9,6 g/l, 24. saatte 10,9 g/l'ye çıkmıştır. DPD KOS derişimi toplam KOS'a göre daha düşük bir seviyede kalmıştır. 24 saat sonunda toplam KOS çözeltisinin %60'ı düşük polimerli oligosakkaritlerden, büyük çoğunlukla ksilobiozlardan oluşmaktadır (6,4 g/l ksilobioz). Ksiloz derişimi ise 8 ile 48 saat arasında 0,6'dan 2,1'e yükselmiştir.



Şekil 4.5. Önişlem koşullarının KOS polimerleşme derecesine etkisi

Enzimler: sol sütun: Accelerase XY; ortan sütun: Veron 191S; sağ sütun: Econase XT

Önişlem koşulları: a,b: 150°C 1sa %70etanol-MgO; c,d,e: 170°C 1sa %70etanol

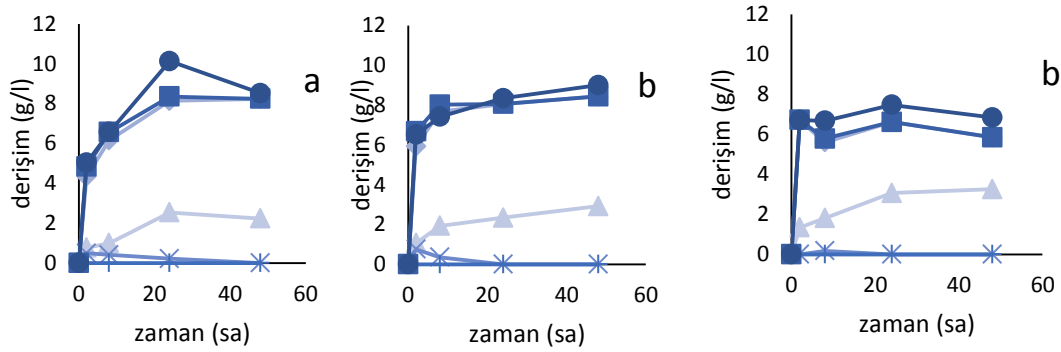
●: toplam KOS; ■: Toplam DPD KOS; ▲: ksiloz; ◆: ksilobioz; x: ksilotrioz; | : ksilotetraoz

#### 4.3.4. Katı Yüklemesinin KOS Üretimine Etkisi

Enzim hidrolizi yapılan birçok çalışmada %5 (katı:sıvı=1:20) veya aşağısı katı yüklemesi kullanılmaktadır (Quiñones vd., 2015; Akpınar vd., 2009). Katı:sıvı oranının artırılması yüksek derişimde çözelti elde edilmesini sağlarken aynı zamanda işletim ve enerji maliyetlerini düşürebilir. Fakat katı yüklemesi yüksek olduğunda hidroliz verimi düşmesine sebep olabilir. Lignoselülozda bulunan ligninin enzime bağlanması ve ortamdaki su azlığından dolayı kütle transferi ve çözünürlüğün azalması verim düşüklüğünün nedenleri olarak görülmektedir (Gatt vd. 2019).

Organosolv ile lignini uzaklaştırılmış biyokütlenin hidroliz ortamındaki oranının enzim hidrolizine olan etkisine görmek amaçlı gerçekleştirilen denemede, 150°C'de 1 sa %70 etanol ve MgO varlığında organosolv işleminden çıkan biyokütle kullanılmıştır. Bu biyokütle

%5, %10 ve %20 oranında yüklenerek Econase XT enzimi ile 70°C'de hidrolize tabi tutulmuştur. %5 katı yüklenerek yapılan hidrolizde 8,36 g/l'si düşük polimerizasyon dereceli olmak üzere toplamda 10,1 g/l KOS üretilirken (%84 ksilan dönüşümü), çözeltide aynı zamanda 2,5 g/l ksiloz açığa çıkmıştır (Şekil 4.6 a). Toplam KOS'un %87'si DPD KOS olmuştur. Katı yüklemesi %10'a çıkarıldığında ise toplam KOS 8,34 g/l ksiloz 2,3 g/l olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6 b).Görüldüğü üzere hidroliz ortamındaki biyokütle miktarının dolayısıyla ksilanın iki katına çıkması oluşan ürün miktarında artışa sebep olmamıştır. KOS ve ksiloz derişimleri düşük yüklemedekiyle aynı olmuştur. Dolayısıyla ksilan dönüşüm oranı yarısına düşmüştür. Bu durum su miktarının azalmasıyla birlikte kütle transferinin azalmasından kaynaklanmış olabilir (Hodge vd., 2008); Kim vd., 2008). Katı yüklemesi %20'ye çıkartıldığında 7,42 g/l KOS elde edilmiştir (Şekil 4.6 c). Ksiloz derişimi 3,1 g/l olmuştur. Bu katı yüklemesi oranında ksilan dönüşümünün daha da azaldığı görülmektedir. Çalışmadaki koşullarda katı yüklemesi oranındaki artışın üretimi olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6. Katı: Sıvı Oranının KOS Üretimine Etkisi (150°C 1sa %70etanol organosolv edilmiş katının 70°C'de Econase XT enzimi ile hidrolizi) Katı yükleme oranları: a: %5; b: %10; c: %20

●: toplam KOS; ■: Toplam DPD KOS; ▲: ksiloz; ◆: ksilobioz; x: ksilotrioz; | : ksilotetraoz

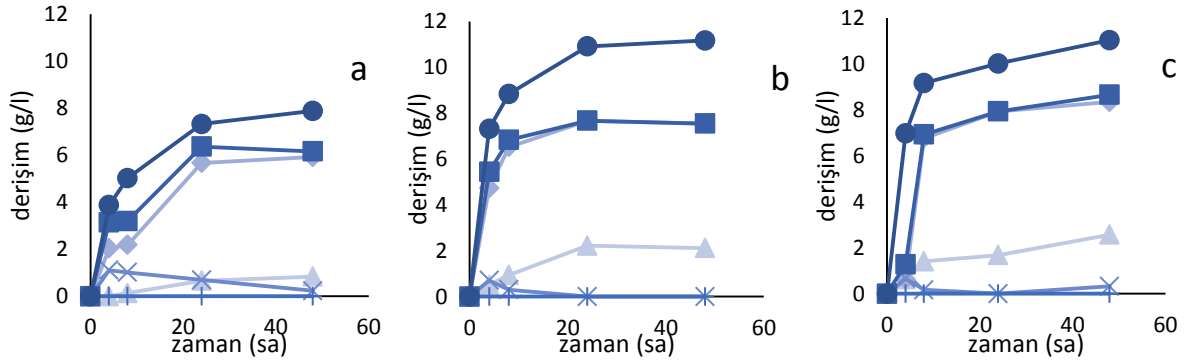
#### 4.3.5. Enzim Miktarının KOS Üretimine Etkisi

Enzim miktarının KOS üretimine etkilerini incelemek için 150°C'de 1 sa %70 etanol ile MgO katalizörlüğündeki organosolv işleminden çıkan biyokütle %10 katı yüklemesinde kullanılmıştır. Econase XT enzim 70°C'de 0,1; 0,6 ve 1 U/ml aktivitede uygulanmıştır. Diğer denemelerde olduğu gibi 0,6 U/ml derişimdeki enzimle hidroliz gerçekleştiğinde 24 saatte 7,6 g/l'si düşük polimerlerden oluşan 10,5 g/l KOS ve 2,2 g/l ksiloz açığa çıkmıştır. Bu derişim 48 saat boyunca değişmemiştir (Şekil 4.8 b). İşlem görmüş katının % 47'i KOS'a çevrilirken, bu oranın %33'sini düşük polimerleşme derecesine sahip oligomerler oluşturmaktadır. Enzim derişimi altıda birine düşürüldüğünde 24 saatte 6,3 g/l düşük polimerli KOS, toplam 7,5 g/l

toplam KOS elde edilmiştir. Bu derişim 48 saat boyunca benzer seviyede kalmıştır. Katıdan çevrilen KOS olarak % 31'i toplam oligomerlerden oluşurken, bu oranın %27'sini düşük polimerleşme derecesine sahip oligomerler oluşturmaktadır. Bu koşulda ksiloz derişimi düşük olmasına rağmen (0,84 g/l), KOS derişiminin üstteki enzim seviyesine (0,6 U/ml) göre düşük olması bu enzim derişiminin yetersiz kaldığını göstermiştir.

Enzim aktivitesi 1 U/ml'ye çıkarıldığında daha hızlı bir hidroliz gerçekleşmiş olsa da (8 saatte 9,16 g/l KOS), 24. saatteki derişimler karşılaştırıldığında 0,6 U/ml ile aynı seviyede toplam KOS çözeltisi elde edildiği görülmektedir. KOS çözeltisinde daha fazla düşük polimerli oligomerler bulunurken (7,93 g/l), ksiloz derişiminde bariz bir fark yoktur. Dönüşüm olarak bakıldığında %43'lük toplam oligosakkarit çeviriminin %34'ünü düşük polimerli oligomerler oluşturur. Sonuç olarak katıdan elde edilebilecek en yüksek verim alındığı için enzim derişimini arttırmak KOS çözeltisinin derişimini değiştirmemiştir.

Sonuç olarak 150°C'de MgO katalizörlüğünde organosolv edilmiş katının çözeltideki oranı 1:10 olarak 70° C'de 0,6 U/ml derişimindeki Econase XT enzimi 48 saat boyunca hidroliz edildiğinde işlem görmemiş katıdaki ksilanın %82'si KOS olarak hidrolizata geçirilmiş, 11g/l KOS çözeltisi elde edilmiştir.



Şekil 4.7. Enzim miktarının KOS üretimine etkisi (150°C 1sa %70etanol organosolv edilmiş biyokütle kullanılmıştır. Hidroliz 70°C'de Econase XT enzimi ile gerçekleştirilmiştir.)

Enzim aktivitesi: a: 0,1U/ml; b: 0,6U/ml; c: 1U/ml

●: toplam KOS; ■: Toplam DPD KOS; ▲: ksiloz; ◆: ksilobioz; x: ksilotrioz; | : ksilotetroz).

## 5.SONUÇ

İnsan sindirim sisteminde sindirilemeyen besin bileşenleri olan ve kalın bağırsakta sağlığa faydalı mikroorganizmaların aktivitesini arttıran prebiyotikler ilgi duyulan fonksiyonel gıda bileşenlerindedir. Prebiyotikler arasında ksilooligosakkaritler (KOS) önemli bir yere sahiptir. Temel olarak insan tüketimi için uygun olmayan ve tüm dünyada bol miktarda bulunan

lignoselülozik biyokütledeki ksilan KOS üretiminin hammaddesi olarak ele alındığında atık olarak değerlendirilen bu maddenin katma değerli ürüne dönüştürülmesi hem ekonomik hem de insan sağlığı açısından yarar sağlayacaktır. Bilinen KOS üretim yöntemlerinin kısıtlarını aşabilecek bir üretim süreci geliştirilmesinin önemi büyüktür. KOS üretimi için yaygın olarak kullanılan enzimatik hidrolizde yüksek miktarda alkali ve asit kullanılması, otohizolizde ise karbonhidrat bozunma ürünleri ortaya çıkması teknik, ekonomik, sağlık ve çevre açılarından olumsuzdur. Bu çalışmada genellikle selülozun enzimatik sakkarifikasyonunu kolaylaştırmak için kullanılan bir önışlem olan organosolvun KOS üretiminde kullanımına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın yaklaşımında ksilanın biyokütleden özütlenmeden enzimatik olarak hidroliz edilmesi, bunun sağlanması için de lignoselülozik yapıyı kısmen bozabilecek organosolv önışleminin uygulanması denenmiştir.

Organosolv işleminde kullanılan sıvı faz yüksek oranda (%70) etanolden oluştuğu için çözgenin geri kazanımı ve yeniden kullanımı düşük bir enerji tüketimiyle sağlanabilir. Böylece işlenmesi gereken ya da atık olan malzemenin hacmi de azalmış olur. Bu önışlem otohizolize göre biokütle üzerinde daha etkili olduğundan daha düşük sıcaklıklarda uygulanabilmekte, böylece enerji tüketimi ve karbonhidratların bozunması azaltılabilmektedir. Nitekim bu çalışmada organosolv 150°C-170°C arasında etki göstermiştir. Bu koşullarda ligninin biokütleden kısmen ayrılması sağlanırken ksilanın ve ayrıca selülozun büyük oranda biyoküttelede kalması sağlanmıştır. Böylece sonrasındaki enzimatik hidroliz önündeki engellerden olan lignin bariyeri zayıflatılmıştır. Organosolv işlemi sırasında ortama MgO eklenmesiyle ortam pH değerinin düşmesi engellemek mümkün olmuştur. Böylece seyreltik asit etkisiyle ksilanın biyokütleden ayrılması ve parçalanması konusunda ilave bir engel sağlanmıştır. MgO'nun etkisi özellikle ksilan kaybının yüksek olduğu 190°C'deki organosolvda önemli olmuştur. Etanol derişimi azaltıldığında ksilan kaybının artması artan su miktarının iyonlaşma yüzünden asitliğin artmasıyla beraber ksilan kaybı artmıştır. Bu da bu çalışmada elde edilen önemli bir bilgidir.

Önışlem sonuçları delignifikasyon ve ksilan kazanımı açısından incelenerek, sonraki enzimatik hidroliz testlerinde kullanılacak işlenmiş biyokütteleler seçilmiştir. Bunlar üç ticari enzim ile muamele edilmiş ve sıcaklık, süre, enzim miktarı ve katı yüklemesi gibi parametreler test edilmiştir. Enzimatik hidrolizlerde katı biyokütledeki ksilan büyük oranda KOS'a çevrilmiştir. Böylece projenin ana hedefi olan KOS üretimine ulaşılmıştır. Her bir enzim farklı şartlarda organosolv işleminden geçmiş biyokütteleler üzerinde farklı sıcaklıklarda test edilerek KOS üretimi için en uygun şartlar aranmıştır. Econase XT enzimi ksilanın KOS'a dönüşüm verimini yüksek seviyelere çıkarmıştır. KOS üretimini optimum noktaya getirmek için yapılan çalışmalarda organosolv önışleminden geçmiş katılar Econase XT enzim

kompleksinin hidrolizine uygun hale gelmiştir. Organosolv sırasındaki sıcaklık değişimleri ve katalizör kullanımı enzimin etkinliğini etkilediği görülmüştür. Bu enzim termal olarak dayanıklı olduğu ve yüksek sıcaklıkta aktivite gösterebildiği için endüstriyel süreçler için avantajlıdır. Yüksek sıcaklık çoğunlukla mikrobiyal gelişmeleri de engellediği için enzimatik hidroliz sırasında antimikrobiyal kullanımı gereksinimi azalmış olacaktır.

KOS çözeltisinin içinde bulunan ksiloz monomerleri prebiyotik özellikte olmadığından istenmeyen bir yan ürün olarak kabul edilir. Ksiloz oluşumu ksilanın bir kısmını harcadığı için KOS üretim verimini de azaltır. DPD KOS'lara yakın molüküler ağırlığına sahip olduğundan ortamdaki ayrımı için kompleks alt akım işlemleri gerekir. KOS üretim süreçlerinde ksiloz üretiminin olmaması ya da düşük miktarda ksiloz üretimi olması bu gereksinimi ortadan kaldırır. Çalışmada kullanılan enzimlerden Econase XT ve Accelerase XY kullanıldığında ksiloz oluşumunun az olması bu enzimlerin KOS üretimi için ümit verici olduğunu göstermiştir. Ayrıca hidroliz sıcaklığının kimi durumlarda ksiloz oluşumunda etkili olduğu da görülmüştür. Ekzo-ksilanaz ve  $\beta$ -ksilodaz aktivitelerine sahip olmayan enzimlerin bulunması ya da sentetik biyoloji yöntemleriyle bu enzimlerin olmadığı ksilanaz komplekslerinin üretilmesi KOS üretiminde ksiloz oluşmasını engelleyecektir.

Bu çalışmada biyoküttelede tampon çözelti içinde askıya alındıktan sonra ksilanaz enzimi eklenerek hidroliz gerçekleştirilmiştir. Biyoküttelede bulunan suda ya da alkolde çözünebilen maddeler organosolv işlemi sırasında uzaklaşmış olacağından enzimatik hidroliz sırasında hidroliz ürünleri dışında sıvıya geçen madde beklenmemektedir. Böylece hidrolizatta alt akım işlemleri ile ayrılması gereken yan ürünlerin olmadığı ya da az olduğu varsayılabilir. Bu durum geliştirdiğimiz sürecin önemli bir avantajıdır. KOS'un saflaştırılmasında ortamdaki ayrılacak maddeler protein (enzim) ve tampon çözeltinin bileşenleri olacaktır. KOS üretimi için otohidroliz kullanıldığında furfural, hidroksimetilfurfural, asetik ve formik asitler gibi bozunma ürünleri oluşmaktadır. Ayrıca yüksek sıcaklık yüzünden geniş bir polimerleşme derecesi aralığında KOS'lar oluşmaktadır. Bu sebeplerden hem saflaştırma zor ve maliyetli olur. Alkali hidroliz ve ardından enzimatik hidroliz kullanıldığında ise yüksek miktarda alkali ve asit kullanımı gerekmektedir.

Çalışmada kullanılan şartlardaki organosolv sırasında selüloz ve ksilan büyük oranda katı biyoküttelede kaldığından sıvı ortama geçen maddenin büyük çoğunluğu ligninden oluşmaktadır. Ortamdaki etanol geri kazanılığında arda kalan sulu çözeltide lignin konsantre halde bulunacaktır. Bu sayede lignin bu ortamdaki ayrılabilir ve saflaştırılarak lignin elde edilebilir. Enzimatik hidroliz sırasında ksilan biyokütleden büyük oranda ayrılmaktadır. Böylece geriye selülozca zengin bir katı biyokütle kalmaktadır. Ligninin ve ksilanın kısmen ayrılmış olması sayesinde selülozun selüloolitik enzimlere glikoza hidrolizi mümkün olabilir.

Lignin ve selülozun da değerlendirilmesiyle çalışmada geliştirilen süreç bir biyorafineri yaklaşımı haline getirilebilir.

Projeden elde edilen bilgiler ışığında yeni projelerin ortaya çıkarılması mümkündür. Bununa ilgili planlarımız bulunmaktadır. Öncelikle projedeki şartlarda üretilen KOS'un saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılacaktır. Elde edilen saf KOS *Bifidobacterium* türleri üzerinde test edilerek prebiyotik potansiyelleri belirlenecektir. Organosolv-Enzimatik hidroliz sistemi diğer lignoselülozik biyokütle üzerinde de test edilecektir. Biyoküteller farklı yapılarda olduğundan her biri için ortam şartlarının optimize edilmesi gerekir. Yapılması planlanan ilave çalışmalarla birlikte bu sürecin patentlenmesi planlanmaktadır. Proje çıktılarından bir makale hazırlığımız başlamıştır.

## KAYNAKLAR

Aachary, A. A., Prapulla, S. G. 2009. "Value Addition to Corncob: Production and Characterization of Xylooligosaccharides from Alkali Pretreated Lignin-Saccharide Complex Using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154", *Bioresource Technology*, 100, 991-995.

Aachary, A. A., Prapulla, S. G. 2011. "Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2-16.

Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., Yılmaz, L. 2007. "Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Cotton Stalks", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5544-5551.

Akpinar, O., Erdogan, K., & Bostanci, S. 2009. "Enzymatic Production of Xylooligosaccharide from Selected Agricultural Wastes", *Food and Bioproducts Processing*, 87(2), 145-151.

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review", *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861.

Amorim, C., Silvério, S. C., Prather, Kristala L. J., Rodrigues, L. R. 2019. "From Lignocellulosic Residues to Market: Production and Commercial Potential of Xylooligosaccharides", *Biotechnology Advances*, 37(7),

Ávila, P. F., João, P. L., Cairo, F., Damasio, A., Forte, M. B. S., Goldbeck, R. 2020. "Xylooligosaccharides Production from a Sugarcane Biomass Mixture: Effects of Commercial

Enzyme Combinations on Bagasse/Straw Hydrolysis Pretreated Using Different Strategies”, *Food Research International*, 128.

Bajpai, P.2016. *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*. Editör: Sanjay K. Sharma, India. Springer.

Bailey, M., Biely, P., Poutanen, K.1992. “Inter Laboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity”, *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.

Bragatto, J., Segato, F., Squina, F. M. 2013. “Production of Xylooligosaccharides (XOS) from Delignified Sugarcane Bagasse by Peroxide-HAc Process Using Recombinant Xylanase from *Bacillus Subtilis*”, *Industrial Crops and Products*, 51, 123–29.

Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A.2009. “Pretreatment of *Miscanthus Giganteus* Using The Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production”, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(18), 8328-8334.

Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., Gírio, F.2012. “Production, Purification and Characterisation of Oligosaccharides from Olive Tree Pruning Autohydrolysis”, *Industrial Crops and Products*, 40, 225–231.

Carvalho, A. F. A., de Oliva Neto, P., Da Silva, D. F., Pastore, G. M.2013. “Xylooligosaccharides from Lignocellulosic Materials: Chemical Structure, Health Benefits and Production by Chemical and Enzymatic Hydrolysis”, *Food Research International*, 51(1), 75–85.

Cebreiros, F., Clavijo, L., Boix, E., Daniel, M., Lareo, C. 2020. “Integrated Valorization of Eucalyptus Sawdust within a Biore Fi Nery Approach by Autohydrolysis and Organosolv Pretreatments”, *Renewable Energy*, 149, 115-127.

Childs, C. E., Röytiö, H., Alhoniemi, E., Fekete, A. A., Forssten, S. D., Hudjec, N., Lim, Y. N., Steger, C. J., Yaqoob, P., Tuohy, K. M., Rastall, R. A., Ouwehand, A. C., Gibson, G. R. 2014. “Xylo-Oligosaccharides Alone or in Synbiotic Combination with *Bifidobacterium Animalis* Subsp. *Lactis* Induce Bifidogenesis and Modulate Markers of Immune Function in Healthy Adults: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised, Factorial Cross-over Study”, *British Journal of Nutrition*, 111(11), 1945–56.

Cuilty, K.R., Ballinas-casarrubias, L., Rodríguez, E., De San M., De Gyves, Robles-venzor, J. C., González-sánchez., J. C. 2018. “Cellulose Recovery from *Quercus* Sp. Sawdust Using Ethanosolv Pretreatment”, *Biomass and Bioenergy*, 111, 114–24.



Deng, A., Ren, J., Li, H., Sun., R. 2015. "Corncob Lignocellulose for the Production of Furfural by Hydrothermal Pretreatment", *RSC Advances*, 602, 64–72.

Dhillon, G.S., Oberoi, H.S., Kaur, S., Bansal, S., Brar, S.K. 2011. "Value-Addition of Agricultural Wastes for Augmented Cellulase and Xylanase Production through Solid-State Tray Fermentation Employing Mixed-Culture of Fungi", *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1160–67.

Dongen, V., Van Eylen, F. E. M., Kabel, M. A. 2011. "Characterization of Substituents in Xylans from Corn Cobs and Stover", *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 722–31.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. "FAOSTAT". <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Son erişim tarihi: 10 Şubat 2020.

Farmanbordar, S., Amiri, H., Karimi, K. 2018. "Simultaneous Organosolv Pretreatment and Detoxification of Municipal Solid Waste for Efficient Biobutanol Production", *Bioresource Technology*, 270, 236–44.

Fehlbaum, S., Prudence, K., Kieboom, J., Heerikhuisen, M., van den Broek, T., Schuren, F.H. J., Steinert, R.E., Raederstorff, D. 2018. "In Vitro Fermentation of Selected Prebiotics and Their Effects on the Composition and Activity of the Adult Gut Microbiota", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3097.

Fialho, J., L. C. Duarte, P. Moniz, P. Louro-Martins, A. Dionísio, and F. Carvalheiro. 2015. "Development of Selective Fractionation Methods for the Integrated Upgrade of Corn Cobs in the Biorefinery Framework", *Technico Lisboa*, May, 42–43.

Gatt, E., Khatri, V., Bley, J., Barnabé, S., Vandebossche, V., Beauregard, M. 2019. "Enzymatic Hydrolysis of Corn Crop Residues with High Solid Loadings: New Insights into the Impact of Bioextrusion on Biomass Deconstruction Using Carbohydrate-Binding Modules", *Bioresource Technology*, 282, 398–406.

Gírio, F.M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L.C. Duarte, S. Marques, R. Bogel-Lukasik .2010. "Review Hemicelluloses for fuel ethanol: A review", *Bioresource Technology*, 101, 4775–4800.

Guo, H., Hong, C., Zheng, B., Jiang, D., Qin, W. 2018. "Improving Enzymatic Digestibility of Wheat Straw Pretreated by a Cellulase-Free Xylanase-Secreting *Pseudomonas boreopolis* G22 with Simultaneous Production of Biofloculants", *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–10.

Harmsen, P., W. Huijgen, L. López, and R. Bakker. 2010. "Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass", *Food and Biobased Research*, January, 1–49.

Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. 2009. "Pretreatments to Enhance The Digestibility of Lignocellulosic Biomass", *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18.

Hodge, D. B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D. 2008. "Soluble and Insoluble Solids Contributions to High-Solids Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose", *Bioresource Technology*, 99(18), 8940–48.

Huijgen, W.J. J., Smit, A.T., Reith, J.H., Uil, H.D. 2011. "Catalytic Organosolv Fractionation of Willow Wood and Wheat Straw as Pretreatment for Enzymatic Cellulose Hydrolysis", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86, 1428–38.

International Grains Council. "Grain Market Report GMR 489-2 July 2018". <https://www.trouwnutritionasiapacific.com/siteassets/grain-market-report-july-2018.pdf>  
Son erişim tarihi: 26 Eylül 2018

Isikgor, F. H., Becer, C. R. 2015. "Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers", *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559.

Jiang, Z., Zhao, P., Hu, C. 2018. "Controlling the Cleavage of the Inter- and Intra-Molecular Linkages in Lignocellulosic Biomass for Further Biorefining: A Review", *Bioresource Technology*, 256, 466–77.

Kalim, B., Böhringer, N., Ali, N., Schäberle, T.F. 2015. "Xylanases – from Microbial Origin to Industrial Application", *British Biotechnology Journal*, 7(1), 1–20.

Kalogiannis, K. G., S. D. Stefanidis, S. A. Karakoulia, K. S. Triantafyllidis, H. Yiannoulakis, C. Michailof, and A. A. Lappas. 2018. "First Pilot Scale Study of Basic vs Acidic Catalysts in Biomass Pyrolysis: Deoxygenation Mechanisms and Catalyst Deactivation", *Applied Catalysis B: Environmental*, 238, 346–57.

Kapoor, M., Semwal, S., Satlewal, A., Christopher, J., Ravi P. Gupta, Ravindra K., Suresh, K., Ramakumar, S. S. V. 2019. "The Impact of Particle Size of Cellulosic Residue and Solid Loadings on Enzymatic Hydrolysis with a Mass Balance", *Fuel*, 245, 514–20.

Keskin, B., Akdeniz, H., Temel, S., Eren, B. 2018. "Farklı Tane Mısır ( *Zea Mays L.* ) Çeşitlerinin Besleme Değerlerinin Belirlenmesi", *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(1), 15–19.

- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Bals, B., Balan, V., Dale, B.E. 2008. "Enzyme Hydrolysis and Ethanol Fermentation of Liquid Hot Water and AFEX Pretreated Distillers' Grains at High-Solids Loadings", *Bioresource Technology*, 99(12), 5206–15.
- Kim, T.H., Ryu, H.J., Oh, K. K. 2019. "Improvement of Organosolv Fractionation Performance for Rice Husk through A Low Acid-catalyzation", *Energies*, 12.
- Kumar, R., Chatterjee, S., Behari, P. 2019. "Bioethanol Production from Waste Lignocelluloses: A Review on Microbial Degradation Potential", *Chemosphere*, 231, 588–606.
- Kundu, P., Kumar, S., Ahluwalia, V., Kansal, S.K., Elumalai, S. 2018. "Extraction of Arabinoxylan from Corncob through Modified Alkaline Method to Improve Xylooligosaccharides Synthesis", *Bioresource Technology Reports*, 3, 51–58.
- Li, J., Zhang, M., Li, J., Wang, D. 2018. "Corn Stover Pretreatment by Metal Oxides for Improving Lignin Removal and Reducing Sugar Degradation and Water Usage", *Bioresource Technology*, 263, 232–41.
- Li, J., Zhang, M., Li, J., Wang, D. 2019. "Enhancing Delignification and Subsequent Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover by Magnesium Oxide-Ethanol Pretreatment", *Bioresource Technology*, 279, 124–31.
- Li, J., Zhang, M., Li, J., Wang, D. 2019. "High-Solids Hydrolysis of Corn Stover to Achieve High Sugar Yield and Concentration through High Xylan Recovery from Magnesium Oxide-Ethanol Pretreatment", *Bioresource Technology*, 280, 352–59.
- Ma, L., Du, L., Cui, Y., Song, P., Jiang, F., Ma, Q., Xiao, D. 2016. "Isolation and Structural Analysis of Hemicellulose from Corncobs after a Delignification Pretreatment", *Analytical Methods*, 8(41), 7500–7506.
- Matsakas, L., Raghavendran, V., Yakimenko, O., Persson, G., Olsson, E., Rova, U., Olsson, L., Christakopoulos, P. 2019. "Lignin-First Biomass Fractionation Using a Hybrid Organosolv – Steam Explosion Pretreatment Technology Improves the Saccharification and Fermentability of Spruce Biomass", *Bioresource Technology*, 273, 521–28.
- Mazlan, N.A., Samad, K.A., Yussof, H.W., Saufi, S.M., Jahim, J. 2019. "Xylooligosaccharides from Potential Agricultural Waste: Characterization and Screening on the Enzymatic Hydrolysis Factors", *Industrial Crops and Products*, 129, 575–84.

Nabarltz, X., Farriol, X., Montane, D.2004. "Kinetic Modeling of the Autohydrolysis of Lignocellulosic Biomass for the Production of Hemicellulose Derived Oligosaccharides", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43(15), 4124-4131.

Nitsos, C., Rova, U. 2018. "Organosolv Fractionation of Softwood Biomass for Biofuel and Biorefinery Applications", *Energies*, 11, 50.

Otieno, D. O., Ahring, B. K.2012. "The Potential for Oligosaccharide Production from the Hemicellulose Fraction of Biomass Trough Pretreatment Process: Xylooligosaccharides (XOS), Arbinooligosaccharides (AOS), and Mannooligosaccharides (MOS)", *Carbohydrate Research*, 360, 84-92.

Park, N., Kim, H., Koo, B., Yeo, H., Choi, I. 2010. "Organosolv Pretreatment with Various Catalysts for Enhancing Enzymatic Hydrolysis of Pitch Pine (*Pinus Rigida*)", *Bioresource Technology*, 101, 7046–53.

Petersen, M. Ø., Larsen, J., Thomsen, M. H.2009. "Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Wheat Straw for Production of Bioethanol at Low Water Consumption without Addition of Chemicals", *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 834-840.

Pointner, M., P. Kuttner, T. Obrlik, A. Jäger, and H. Kahr. 2014. "Composition of Corncobs as a Substrate for Fermentation of Biofuels", *Agronomy Research*, 12(2), 391–96.

Rabetafika, H. N., Bchir, B., Blecker, C., Wathelet, B. 2014. "Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace", *Biomass and Bioenergy*, 61, 254-264.

Sabancı, K., Büyükkileci, A. O.2018. "Comparison of Liquid Hot Water, Very Dilute Acid and Alkali Treatments for Enhancing Enzymatic Digestibility of Hazelnut Tree Pruning Residue", *Bioresource Technology*, 261, 158-165.

Samanta, A. K., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M., Sampath, K. T., Jayapal, N., Devi, A.2012. "Production and in vitro Evaluation of Xylooligosaccharides Generated from Corn Cobs", *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 466–474.

Samanta, A. K., Jayapal, N., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M.2015. "Xylooligosaccharides as Prebiotics from Agricultural By-Products: Production and Applications", *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 62-71.

Singh, Ramkrishna D., Jhumur Banerjee, and Amit Arora. 2015. "Prebiotic Potential of Oligosaccharides: A Focus on Xylan Derived Oligosaccharides", *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 19–30.

Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J. 2008. "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42621". National Renewable Energy Laboratory.

<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42621.pdf>

Son erişim tarihi: 26 Eylül 2018

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2012. "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42618". National Renewable Energy Laboratory.

<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>

Son erişim tarihi: 26 Eylül 2018

Smith, Micholas Dean, Charles M. Cai, Xiaolin Cheng, Loukas Petridis, and Jeremy C. Smith. 2018. "Temperature-Dependent Phase Behaviour of Tetrahydrofuran-Water Alters Solubilization of Xylan to Improve Co-Production of Furfurals from Lignocellulosic Biomass", *Green Chemistry*, 20(7), 1612–20.

Sun, J. X., Sun, X. F., Sun, R. C., Su, Y. Q. 2004. "Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses", *Carbohydrate Polymers*, 56: 195-204.

Sürek, E., Büyükkileci, A. O. 2017. "Production of Xylooligosaccharides by Autohydrolysis of Hazelnut (L.) Shell", *Carbohydrate Polymers*, 174, 565-571.

Toprak Mahsulleri Ofisi. "2017 Hububat Sektör Raporu".

<http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/hububatsektorraporu2017.pdf>

Son erişim tarihi: 03 Eylül 2018

Kiran Uçkun, E., Akpınar, O., Bakir, U. 2013. "Improvement of Enzymatic Xylooligosaccharides Production by the Co-Utilization of Xylans from Different Origins", *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 565–74.

U.S. Department of Energy. “2016 Billion-ton Report Advancing Domestic Resources for Thriving Bioeconomy Volume 1: Economic Availability of Feedstocks”.

<https://www.energy.gov/eere/bioenergy/2016-billion-ton-report>

Son erişim tarihi: 03 Eylül 2018

Yang, C., Yang, S., Liu, W. 2007. “Production of Xylooligosaccharides from Xylans by Extracellular Xylanases from *Thermobifida Fusca*.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3955-3959.

Yeğın, S.2017. “Single-Step Purification and Characterization of an Extreme Halophilic, Ethanol Tolerant and Acidophilic Xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with Application Potential in Food Industry”, *Food Chemistry*, 221, 67-75.

You, Z., Zhang, S., Kim, H., Chiang, P., Sun, Y. 2018. “Effects of Corn Stover Pretreated with NaOH and CaO on Anaerobic Co-Digestion of Swine Manure and Corn Stover”, *Applied Sciences*, 1–12.

Zhang, Z., Harrison, M. D., Rackemann, D. W., Doherty, W. O., O'Hara, I. M.2016. “Organosolv Pretreatment of Plant Biomass for Enhanced Enzymatic Saccharification”, *Green Chemistry*, 18(2), 360-381.

Zhang, H., Fan, M., Li, X., Zhang, A., Xie, J. 2018. “Bioresource Technology Enhancing Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse by Ferric Chloride Catalyzed Organosolv Pretreatment and Tween 80”, *Bioresource Technology*, 258, 295–301.

Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. 2009. “Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 815–27.

Wu, Y., Jiang, L., Lin, Y., Qian, L., Xu, F., Lang, X., Fan, S., Zhao, Z., Li, H. 2019. “Novel Crude Glycerol Pretreatment for Selective Saccharification of Sugarcane Bagasse via Fast Pyrolysis”, *Bioresource Technology*, 294,

Quiñones, T.S., Retter, A., Hobbs, P.J., Budde, J., Heiermann, M., Plöchl, M., Ravella, S.R. 2015. “Production of Xylooligosaccharides from Renewable Agricultural Lignocellulose Biomass”, *Biofuels*, 6(3–4), 147–55.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ALİ OĞUZ BÜYÜKKİLECI
Proje No:	218M252
Proje Başlığı:	Enzimatik Ksilooligosakkarit Üretimi İçin Organosolv Önişleminin Kullanımı
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/12/2018 - 15/12/2019
Onaylanan Bütçe:	45000.0
Harcanan Bütçe:	44319.31
Öz:	<p>Prebiyotik karbonhidrat olan ksilooligosakkaritler (KOS), lignoselülozik tarım ve gıda atıklarındaki ksilan polisakkaritinin hidroliz edilmesiyle üretilir. Alkali ekstraksiyona dayanan enzimatik hidroliz ve otohizoliz kullanılan yöntemler çeşitli kısıtlara sahiptir. Bu çalışmada bu kısıtları aşabilecek olan bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Model olarak kullanılan mısır koçanı organosolv önişleminde geçirilmiştir. Organosolv şartları (çözgen derişimi, süre, sıcaklık, katalizör ilavesi) biyokütlerdeki lignini uzaklaştıracak ancak ksilanın biyokütlerde kalmasını sağlayacak şekilde ayarlanmıştır. Uygun şartlarda ligninin %40-%50'si ayrılabilirken ksilan yaklaşık %85 oranında katıda kalmıştır. İşlem görmüş biyokütle üç ticari ksilanaz ile hidroliz edilerek organosolv işleminin KOS üretimine etkisi belirlenmiştir. Organosolv ve enzimatik hidroliz şartlarının toplam KOS üretiminde etkili olduğu görülmüştür. En verimli KOS üretimi 150°C'de 1 sa %70 etanol ve 0,1M MgO varlığında organosolv işlemi görmüş biyokütle ile elde edilmiştir. Bu biyokütlenin 70°C'de 0,6 U/ml ksilanaz ile gerçekleştirilen enzimatik hidrolizi sonucu ksilanın %82'si dönüştürülerek 11 g/l KOS içeren hidrolizat elde edilmiştir. Geliştirilen yöntem sayesinde ksilanın ekstrakt edilmesine ihtiyaç duyulmadığı için derişik alkali ya da asit gibi kimyasallar kullanılmayacak ve otohizoliz yöntemindeki gibi çok yüksek sıcaklıklar kullanılmadığı için karbonhidrat bozunma ürünleri oluşmayacaktır. Bunlar ürün saflaştırma aşamalarını kolaylaştıracak ve çevreye zararlı kimyasal atık miktarını azaltacaktır. Süreçte lignince zengin bir sıvı faz ve selülozca zengin katı faz oluşmaktadır ve ksilan ile beraber bunlar da değerlendirilerek biyorafineri yaklaşımıyla lignoselülozik atıklara katma değer kazandırılabilir. Bu çalışmanın devamında ürünün saflaştırılması ve prebiyotik etkilerinin belirlenmesi için projeler geliştirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca geliştirilen süreç diğer lignoselülozik atıklar üzerinde de test edilecektir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Ksilooligosakkaritler,prebiyotikler,lignoselülozik atıklar,organosolv,ksilanaz,enzimatik hidroliz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır