



**Otohidroliz ve Enzimatik Hidroliz Kullanılarak Fındık
Atıklarından Prebiyotik Olarak Kullanılabilecek
Ksilooligosakkarit Üretimi**

Program Kodu: 1001 (COST FP1306)

Proje No: 2130126

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Ali Oğuz BÜYÜKKİLECI

Araştırmacı:
Dr. Sırma YEĞİN

Danışman:
Prof. Dr. Ahmet YEMENİCİOĞLU

Bursiyerler:
Ece SÜREK
Kevser DOĞRU
Nüket POLAT
Bilal AHMAD

MAYIS 2017
İZMİR



ÖNSÖZ

Bu rapor Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 216O123 kod numarası ile desteklenen “Otohidroliz ve Enzimatik Hidroliz Kullanılarak Fındık Atıklarından Prebiyotik Olarak Kullanılabilecek Ksilooligosakkarit Üretimi” 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 ülkemizde bolca bulunan bir kaynağın hammadde olarak kullanılma potansiyeli ortaya konmuştur. Elde edilen ürün kısmen saflaştırılmış bazı koşullar altındaki dayanıklılığı test edilmiştir. Raporda literatür bilgisi verildikten sonra kullanılan yöntemler özetlenmiş, sonrasında da elde edilen sonuçlar ayrıntılı olarak sunulmuş ve tartışılmıştır. Son olarak çıkarımlarımızla beraber önerilerimiz verilmiştir.

Proje kapsamında TÜBİTAK-TOVAG 112O521 numaralı “Tarımsal Yan Ürünler Kullanılarak *Aureobasidium pullulans* ile Ksilanaz Üretimi İçin Biyoproses Stratejilerinin Geliştirilmesi” başlıklı projede üretilen ksilanaz enzimi başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu yolla farklı projelerin ticarileşmesinin ve uygulanabilirliğinin desteklenmesi ve çeşitli ürün gruplarında dışa bağımlılığın azaltılması amaçlanmıştır.

Bu proje aynı zamanda Avrupa Bilim ve Teknoloji Komisyonu'nun (COST-European Commission in Science and Technology) COST- FP1306 numaralı aksiyonunun bir parçasıdır. TÜBİTAK 'a sağlamış olduğu finansal destekten dolayı teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖNSÖZ | ii |
| TABLO LİSTESİ | v |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | vi |
| KISALTMALAR | viii |
| ÖZET | x |
| ABSTRACT | xi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ..... | 2 |
| 2.1 Lignoselülozik biyokütle..... | 2 |
| 2.2 Fındık atıkları | 4 |
| 2.3 Prebiyotik oligosakkaritler..... | 6 |
| 2.4 Otohıroliz ile KOS üretimi | 8 |
| 2.5 Enzimatik KOS üretimi | 10 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 11 |
| 3.1 Atıkların temini ve saklanması..... | 11 |
| 3.2 Atıkların karakterizasyonu | 11 |
| 3.2.1 Nem ve Protein tayini | 11 |
| 3.2.2 Özütlenen madde miktarı, kül ve üronik asit analizi | 11 |
| 3.2.3 Yapısal karbonhidrat analizi | 11 |
| 3.3 Otohıroliz yoluyla KOS üretimi..... | 12 |
| 3.3.1 Otohıroliz..... | 12 |
| 3.3.2 Otohıroliz koşullarının incelenmesi | 13 |
| 3.4 Enzimatik KOS üretimi | 13 |
| 3.4.1 Alkali özütleme | 13 |
| 3.4.2 Enzimatik hidroliz | 14 |
| 3.5 KOS saflaştırılması ve biyoaktivite testi | 15 |
| 3.5.1 KOS'un saflaştırılması..... | 15 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.5.2 | Gıda üretim koşullarının etkisi | 16 |
| 3.5.3 | Sindirim sistemi koşullarının etkisi | 16 |
| 3.5.4 | Prebiyotik aktivite testi..... | 17 |
| 3.6 | Analitik yöntemler | 18 |
| 3.6.1 | Monosakkarit analizi..... | 18 |
| 3.6.2 | Oligosakkaritlerin polimerleşme derecesinin belirlenmesi..... | 18 |
| 3.6.3 | Asetik asit ve şeker bozunma ürünlerinin analizi | 19 |
| 4. | BULGULAR VE TARTIŞMA | 19 |
| 4.1 | Fındık atıklarının karakterizasyonu | 19 |
| 4.2 | Fındık atıklarının otohizrolizi..... | 20 |
| 4.3 | Fındık kabuğunun otohizrolizi..... | 23 |
| 4.3.1 | Fındık kabuğu otohizroliz katısının bileşimi | 24 |
| 4.3.2 | FK otohizroliz likörünün bileşimi | 26 |
| 4.4 | Fındık atıklarının alkali kullanılarak özütlenmesi..... | 35 |
| 4.5 | FK otohizroliz likörünün enzimatik hidrolizi | 38 |
| 4.6 | Safılaştırma çalışmaları | 45 |
| 4.6.1 | Aktif karbon uygulaması | 45 |
| 4.6.2 | Ultrafiltrasyon (UF) | 46 |
| 4.7 | Stabilite testleri..... | 49 |
| 4.8 | Prebiyotik aktivite testi..... | 55 |
| 5. | SONUÇ | 56 |
| | KAYNAKLAR..... | 58 |

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 4.1. Fındık atıklarının kompozisyonu ^a | 20 |
| Tablo 4-2. Fındık atıklarının otohıroliz katılarının içeriği | 22 |
| Tablo 4.3. Fındık kabuğu otohıroliz katılarının içeriği | 25 |
| Tablo 4.4. FK'nın alkali ile muamelesinde kullanılan koşullar ve geri kazanılan madde miktarları | 36 |
| Tablo 4.5. FBA'nın alkali ile muamelesinde kullanılan koşullar ve geri kazanılan madde miktarları | 37 |
| Tablo 4.6. KOS özeltilerinin esmerlik dereceleri (420 nm'deki absorbanları) ve esmerleşme oranları. Kontrol olarak glikoz çözeltisi kullanılmıştır. % esmerleşme derecesi glikoz çözeltisinin 3 sa sonundaki esmerliğine göre hesaplanmıştır. (OH: otohıroliz, EH: enzimatik hidroliz) | 53 |
| Tablo 4.7. Bazı Bifidobacterium türlerinin ve E. coli'nin KOS ve glikoz üzerinde gelişme miktarı ve prebiyotik aktivite skoru (PAS). (OH: otohıroliz, EH: enzimatik hidroliz) | 56 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Hemiselülozlardan elde edilebilecek ürünler (Kaynak: Peng vd., 2012)..... | 4 |
| Şekil 2.2. Fındık üreten ülkeler ve üretim miktarlarının toplam üretime oranı (%). (FAO 2017) | 5 |
| Şekil 2.3. Fındık ve bazı fındık atıkları (Kaynak: Shahidi vd., 2007)..... | 5 |
| Şekil 4.1. Farklı hedef sıcaklıklardaki otohizlizler sırasında sıcaklığın zamanla değişimi. ... | 23 |
| Şekil 4.2. Uygulama şiddetinin FK çözünürlüğüne etkisi. | 26 |
| Şekil 4.3. Uygulama şiddetinin katının ksilan ve galaktan içeriğine etkisi. | 26 |
| Şekil 4.4. Uygulama şiddetinin KOS verimine etkisi. | 27 |
| Şekil 4.5. Uygulama şiddetinin likördeki GaOS ve GOS derişimlerine etkisi. | 28 |
| Şekil 4.6. 180 °C ve 190 °C'deki otohizlizlerde uygulama süresinin KOS verimine etkisi. ... | 30 |
| Şekil 4.7. HPLC'de KOS analizi öncesi yapılan alkali uygulamasında kullanılan NaOH derişiminin örnek otohizliz likörünün kromatogramı üzerindeki etkisi. Piklerin hangi polimerleşme derecelerine ait olduğu üzerlerinde gösterilmiştir (PD 2 - PD 6). Derişimler ve o derişime ait kromatogramlar aynı renk ile gösterilmiştir. | 31 |
| Şekil 4.8. Farklı sıcaklık-süre çiftlerinde gerçekleşen otohizlizlerde elde edilen KOS'un PD dağılımı. Farklı harfler istatistiksel olarak farkı ifade eder. ($p < 0,05$, tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi uygulanmıştır.)..... | 32 |
| Şekil 4.9. Şiddet faktörünün düşük PD KOS üretimine etkisi. A: Likördeki düşük PD KOS derişimi. B: Düşük PD KOS'un toplam KOS'a oranı..... | 33 |
| Şekil 4.10. Şiddet faktörünün düşük PD KOS'larının her birinin derişimine etkisi | 33 |
| Şekil 4.11. Uygulama şiddetinin otohizliz liköründeki monosakkarit derişimlerine etkisi. A: Ksiloz derişimi; B: Glikooligosakkarit (GOS) ve galaktooligosakkarit (GaOS). | 34 |
| Şekil 4.12. Uygulama şiddetinin bozunma ürünleri derişimlerine ve likör pH'sına etkisi. | 35 |
| Şekil 4.13. Ksilanaz aktivitesinin düşük PD KOS üretimine etkisi. A: Ticari ksilanaz (hidroliz koşulları: T=60 °C, başlangıç pH'sı=6,0), B: AP ksilanazı (hidroliz koşulları: T=50 °C, pH=5,0) | 40 |
| Şekil 4.14. Sıcaklığın KOS hidrolizine etkisi. A: Ksiloz ve KOS derişimleri; B: Düşük PD KOS derişimleri. (pH=5,0, başlangıç KOS derişimi = 18,9 g/L, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=24 sa)..... | 41 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.15. pH'nın KOS hidrolizine etkisi. A: Ksiloz ve KOS derişimleri; B: Düşük PD KOS derişimleri. (T=50 °C, başlangıç KOS derişimi = 18,9 g/L, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=24 sa)..... | 42 |
| Şekil 4.16, Başlangıç substrat miktarının düşük PD KOS üretimi üzerine etkisi. A: Ksiloz ve KOS derişimleri; B: Düşük PD KOS derişimleri. (T=40 °C, pH=5,0, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=48 sa, küçük şekillerde içi boş barlar 24 sa, içi dolu barlar 48 sa'de alınan sonuçları göstermektedir.)..... | 43 |
| Şekil 4.17. Enzimatik hidrolizin başlangıcında ortamdaki KOS derişiminin düşük PD KOS ve ksilozun toplam KOS içindeki oranlarına etkisi. Koyu renkli barlar: ksiloz, Açık renkli barlar: düşük PD KOS. (T=40 °C, pH=5,0, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=48 sa, küçük şekillerde içi boş barlar 24 sa, içi dolu barlar 48 sa'de alınan sonuçları göstermektedir.)..... | 44 |
| Şekil 4.18. Aktif karbon uygulamasının likör kompozisyonuna etkisi. Farklı harfler istatistiksel olarak farkı ifade eder (p<0,05, tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi uygulanmıştır). | 46 |
| Şekil 4.19. Otohidroliz likörünün ultrafiltrasyonu sırasında filtrelerde tutulan ve süzülen sıvıların bileşimi..... | 47 |
| Şekil 4.20. Enzimatik olarak hidrolize edilmiş otohidroliz likörünün ultrafiltrasyonu sırasında filtrelerde tutulan ve süzülen sıvıların bileşimi. | 49 |
| Şekil 4.21. Gıda üretim koşullarının otohidroliz ile elde edilen KOS'un stabilitesine etkisi. Toplam düşük PD KOS ve her bir oligomer ayrı renkle gösterilmiştir. Başlangıç pH değerleri: A: pH 3, B: pH 4, C: pH 5, D: pH 6. Bar renklerinin açıklaması için A'ya bakınız..... | 51 |
| Şekil 4.22. Gıda üretim koşullarının otohidroliz sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen KOS'un stabilitesine etkisi. Toplam düşük PD KOS ve her bir oligomer ayrı renkle gösterilmiştir. Başlangıç pH değerleri: A: pH 3, B: pH 4, C: pH 5, D: pH 6. Bar renklerinin açıklaması için A'ya bakınız. | 52 |
| Şekil 4.23. Sindirim sistemi koşullarının KOS stabilitesine etkisi. A: Otohidroliz ile elde edilen KOS, B: Otohidroliz sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen KOS..... | 54 |

KISALTMALAR

| | |
|--------------|--|
| °C | Santigrat derece |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| µmol | Mikromol |
| AÇL | Asit ile çözünen lignin |
| AP | <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| dak | Dakika |
| düşük PD KOS | düşük polimerleşme dereceli ksilooligosakkarit |
| DNS | Dinitrosalisilik asit |
| EH | Enzimatik hidroliz |
| FBA | Fındık budama atıkları |
| FK | Fındık kabuğu |
| FZ | Fındık zürufu |
| g | Gram |
| GaOS | Galaktooligosakkarit |
| GOS | Glukooligosakkarit |
| HMF | Hidroksimetilfurfural |
| HPLC | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| kDa | Kilo Dalton |
| KOS | Ksilooligosakkarit |
| L | Litre |
| R_o | Şiddet faktörü |
| M | Molar |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| mM | Milimolar |
| nm | Nanometre |
| NREL | National Renewable Energy Laboratory |
| OD | Optik yoğunluk (Optical Density) |
| OH | Otohidroliz |
| PAS | Prebiyotik aktivite skoru |
| PD | Polimerleşme derecesi |
| PTFE | Teflon |
| RCM | Reinforced Clostridial Medium |
| RI | Kırılma indisi (refractive index) |
| sa | saat |
| T | Sıcaklık |
| t | Süre |
| TSB | Triptik soya besiyeri |
| U | ünite |
| w/v | Ağırlık/hacim |
| ϵ | Absorptivite değeri (L/g cm) |
| μm | Mikrometre |

ÖZET

Fındık Türkiye'nin en önemli tarım ürünlerinden biridir ve Türkiye fındık üretiminde dünya lideridir. Fındığın üretimi ve işlenmesi sırasında çeşitli lignoselülozik atıklar açığa çıkmaktadır ve ancak bu atıklar ekonomik olarak değerli ürünlere dönüştürülmemektedir. Bu çalışmada, fındık kabuğu (FK), züruf ve budama atığı dalların yapısal bileşimi belirlenmiş ve çalışmanın hedef ürünü olan ksilooligosakkarit (KOS) üretimi için en uygun atık olarak FK seçilmiştir. FK'deki hemiselülozik polisakkarit ksilan, otohizoliz yöntemiyle hidroliz edilerek KOS elde edilmiştir. Otohizoliz sıcaklığı ve süresi FK'den ayrılan ksilan miktarını, elde edilen KOS'un verimini, polimerleşme derecesini (PD) ve termal bozunma ürünlerinin miktarını önemli derecede etkilemiştir. KOS veriminin yüksek olduğu koşulda elde edilen otohizoliz liköründeki büyük molekül ağırlıklı KOS, ksilanaz ile hidroliz edilerek düşük PD'ye sahip KOS (PD < 6) elde edilmiştir. Likörlere aktif karbon uygulanarak fenolik maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Ultrafiltrasyon ile likördeki büyük molekül ağırlıklı KOS uzaklaştırılmış, böylece düşük PD'ye sahip KOS'un oranı artırılmıştır. KOS'lar çalışmada test edilen gıda üretim koşullarına ve sindirim sistemi ortamına dayanıklılık göstermiş ve yapısını büyük oranda koruyabilmiştir. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve *Bifidobacterium bifidum* hem otohizoliz ile elde edilen hem de enzimatik olarak elde edilen KOS üzerinde gelişebilmişlerdir. Enzimatik hidrolizat ile daha yüksek bir gelişme görülmüştür. Proje kapsamında yapılan çalışmalar FK'nin prebiyotik olarak kullanılma potansiyeli olan KOS üretimi için uygun bir hammadde olduğunu göstermiştir. Ksilan ile birlikte FK'nin selüloz, lignin, fenolik maddeler gibi diğer bileşenleri de biyofineri yaklaşımıyla değerlendirilebilir, böylece bu atık biyotemelli ürünlerin üretimi açısından sürdürülebilir bir hammadde olarak kabul edilebilir.

Anahtar kelimeler: fındık atıkları; fındık kabuğu; ksilooligosakkarit; prebiyotikler; otohizoliz; ksilanaz; ksilan

ABSTRACT

Hazelnut is among the main agricultural products in Turkey, which is the world leader in hazelnut production. During agriculture and processing of hazelnut, several lignocellulosic wastes are released, which are currently have no economic value. In this study, hazelnut shell (HS), husk and pruning residues were characterized and the HS was selected for the production of prebiotic xylooligosaccharides (XOS), which was the target product of the study. Xylan, which is the hemicellulosic polysaccharide in HS, was hydrolyzed using autohydrolysis treatment. Autohydrolysis temperature and time had a profound effect on xylan solubilization, XOS yield and degree of polymerization (DP) and the formation of thermal degradation products. High molecular weight XOS, obtained under high XOS yielding autohydrolysis condition, was hydrolyzed using xylanase in order to obtain low DP XOS (DP < 6). Phenolics in the liquors were removed partially applying activated carbon. High molecular weight XOS was removed using ultrafiltration, which increased the percentage of low DP XOS. XOS were resistant to food production conditions tested as well as to the digestive system conditions, so that, its structure was maintained. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Bifodobacterium bifidum* could grow in the basal medium containing the XOS obtained using autohydrolysis or enzymatic hydrolysis. XOS from enzymatic hydrolysis supported the growth more than the former. This study showed that HS can be used as a feedstock for production of XOS with a prebiotic potential. The other constituents of HS. such as cellulose, lignin, phenolics, as well as xylan, can be valorized, thus this waste material can be considered as a sustainable feedstock for production of bio-based products.

Keywords: hazelnut wastes; hazelnut shell; xylooligosaccharide; prebiotics; autohydrolysis; xylanase; xylan



1. GİRİŞ

Günümüzde enerji kaynaklarının ve hammaddelerin kullanımında daha bilinçli ve sorumlu davranmak gerektiği ortaya çıkmış durumdadır. Dünya çapında ana enerji kaynakları petrol, kömür ve doğalgaz gibi yenilenemeyecek kaynaklardır. Yine birçok kimyasal madde petrol rafinerisi ara ürünlerinden elde edilmektedir. Sürdürülebilir kimyasal, materyal ve enerji üretim süreçleri geliştirilmesi ve yenilenebilir kaynakların kullanımı bir zorunluluk haline gelmiştir. Nitekim bunu sağlamak için çeşitli sosyal, ekonomik ve politik adımlar atılmaktadır. Örneğin; dünya ülkeleri karbon salınımlılarını azaltmak için protokoller üzerinde anlaşmakta ve çeşitli tedbirler almaktadır. Güneş ve rüzgâr gibi doğal ve sürdürülebilir enerji kaynaklarının kullanımı hızla artmaktadır. Enerji kaynağı olarak bitkilerin kullanılması da gündemdedir. Özellikle ekonomik değeri olmadığından çoğunlukla yakılan lignoselülozik tarımsal atıkların değerlendirilmesine yönelik artan bir eğilim vardır. Bu bağlamda, bitkisel yağların biyodizele, polisakkaritlerin ise biyoetanol veya biyobütanol gibi yakıtlara dönüştürülebilmesi ve geleneksel yakıtların yerini alabilmesi mümkün görülmektedir. Mısır gibi nişasta kaynakları biyoetanol üretiminde çokça kullanılmış olsa da lignoselülozik yapıda olan tarımsal atıkların yapısındaki selülozun ve kısmen hemiselülozun kullanılması daha önemlidir. Mısır ve benzeri ürünler aynı zamanda gıda maddesi de olduğundan biyo-yakıt üretiminde kullanılmaları söz konusu ürünlerin gıda amaçlı ekimini azaltmakta ve fiyatını yükseltmektedir. Atık bitki biyokütlesini biyo-yakıt üretimine uygun hale getirmek için uygulanan işlemler sürecin maliyetini artırdığı için biyo-yakıt üretimi ekonomik olarak uygun olamamaktadır. Bu olumsuz durumu gidermenin en önemli yolu atıkta bulunan ve katma değer yaratacak bileşenlerin hepsinin kullanılmasıdır. Bitki biyokütlesinin büyük çoğunluğunu oluşturan selüloz, hemiselüloz, lignin ve ayrıca proteinler, fenolik maddeler, yağlar gibi diğer bileşenler geri kazanılarak ekonomik değeri yüksek biyo-temelli ürünlere dönüştürülebilirler.

Tarım Türkiye'nin önemli bir sanayisidir ve büyük alanlarda çok çeşitli tarımsal ürünlerin üretimi yapılmaktadır. Tarımsal üretimi ve ürünlerin işlenmesi sırasında sap, saman, yaprak, kabuk, kepek, kavuz, çekirdek, budama atıkları, küspe gibi birçok yan ürün ve atık açığa çıkmaktadır. Bunlar ya tamamen değersiz olarak görülerek bertaraf edilmekte, yakacak olarak kullanmakta ya da gübre amaçlı kompost üretimi gibi ekonomik getirisi yüksek olmayan şekillerde değerlendirilmektedir. Bu atıkların katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesinin ülke ekonomisine ve tarımla uğraşan kesime ekonomik fayda sağlayacağı açıktır. Türkiye'de bu zenginliğin kullanılmasıyla biyo-temelli ürünler için bir sanayi oluşması mümkündür. Bu sebeplerle ülkemizde çokça bulunan atıkların potansiyelinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmaların önemi büyüktür. Fındık tarımı ve işlenmesi sırasında da çeşitli lignoselülozik atıklar ortaya çıkmaktadır. Fındık üretiminde dünya lideri olan Türkiye'de büyük hacimde üretim vardır; dolayısıyla atık miktarı da fazladır. Bu sebeple fındık atıklarının

karakterize edilerek potansiyelinin ortaya konması ve çeşitli ürünlere dönüştürülmesine yönelik çalışmaların artmasının önemi büyüktür.

İnsan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri sebebiyle zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalara olan ihtiyaç ve ilgi artmaktadır. Sağlıklı ve fonksiyonel gıdaların ucuz ve sürdürülebilir olarak üretilmesi ve geniş kitlelere ulaştırılması günümüzün önemli sorunları arasındadır. Fruktoligosakkaritler, galakto-oligosakkaritler ve ksilooligosakkaritler (KOS) prebiyotik özellik gösterirler ve bitkisel kaynaklardan elde edilirler. Prebiyotik özellikli katkı maddeleri ülkemizde üretilmediğinden, bu ürünler ithal edilmektedir. Dolayısıyla prebiyotik ürünlerin üretimi için ülkemizde yaygın olarak ulaşılabilecek bir atığın kullanılmasının ve uygulanabilir bir süreç geliştirilmesinin büyük bir ekonomik değer taşıyacağı açıktır.

Biyoaktivite gösteren bileşiklerin doğal kaynaklardan ekonomik bir süreç kullanılarak elde edilmesiyle ilgili yürütülen çok sayıda çalışma nedeniyle yakın bir gelecekte bunların gıda formülasyonlarında katkı maddesi olarak kullanılmasının oldukça yaygınlaşması beklenmektedir. Tarım ve gıda sanayileri atıklarının hammadde olarak kullanılması ve geliştirilecek çevre dostu süreçler prebiyotik ürünlerin üretiminin ekonomik ve sürdürülebilir olmasını sağlayabilir. Bu projedeki çalışmalarımız Türkiye’de bol bulunan fındık üretim atıklarından katma değeri yüksek prebiyotik oligosakkaritlerin elde edilmesi için süreçler geliştirilmesiyle ilgili olup, fındık atıklarından prebiyotik olarak kullanılma potansiyeli olan KOS üretimi konusunda gerçekleştirilen ilk çalışmadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Lignoselülozik biyokütle

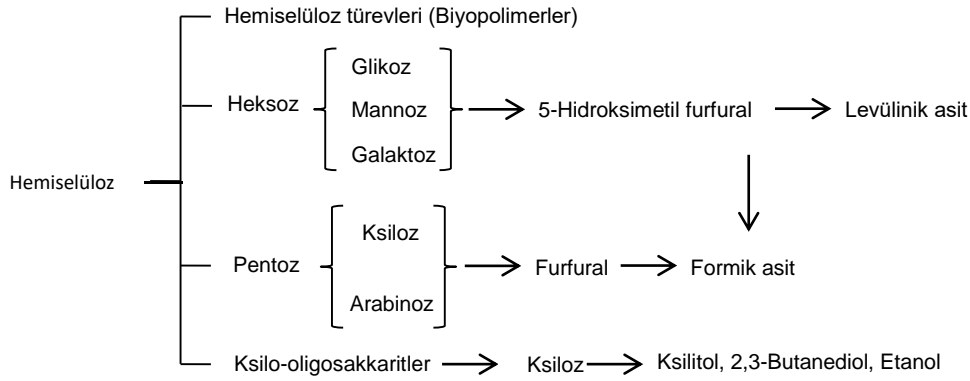
Lignoselülozik biyokütle selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşan karmaşık bir yapıdır. Atık biyokütlenin kullanımının ekonomik olarak uygun hale gelmesi için biyokütlenin tüm kısımlarının kullanılması gerekir. Biyorafinerilerin ana amacı bunu sağlamak ve çevre dostu ve uygun maliyetli teknolojiler kullanarak biyo-enerji ve biyo-temelli ürünlerin kullanımını arttırmaktır. Bu sebepten biyorafineri yaklaşımı, selülozun değerlendirilmesi yanında hemiselülozu ksilan ya da furan ürünlerine dönüştürmeyi ve lignini değerli kimyasallara dönüştürmeyi hedef almalıdır (Sarkar vd., 2012). Lignoselülozik biyoküteller endüstriyel ve tarımsal artık maddeler gibi ucuz kaynaklardan elde edilebilirler. Mısır sapı, şeker pancarı küspesi, çeltik ve buğday sapları en çok rastlanan lignoselülozik hammaddelerdir. Lignoselülozik maddelerin değerlendirilmesi için en yaygın yol biyoetanol üretimi olmuştur. Lignoselüloz temelli etanol üretimi dört ana adımdan meydana gelir: (i) delignifikasyon ve selülozun dirençliliğini azaltmak için ön işlemlerin uygulanması, (ii) selüloz ve hemiselülozun

hidrolizi sonucu fermente edilebilen glikoz, ksiloz, arabinoz, galaktoz, mannoz gibi şekerlerin açığa çıkması; (iii) fermantasyon ile etanol üretimi; (iv) distilasyon (Limayem ve Ricke, 2012; Sarkar vd., 2012). Fermantasyon için kullanılan maya veya bakteriler başta glikoz olmak üzere heksozları etkin biçimde kullanabilirler. Öte yandan hemiselülozik karbonhidratlar ve lignin kullanılmadan kalır. Biyorafineri yaklaşımı bunların da değerlendirilmesini sağlayarak biyo-yakıt veya diğer fermentatif üretimlerin ekonomik olarak uygulanabilir olmasını sağlayabilir.

Selüloz: Lignoselülozik biyokütlenin ana bileşeni selülozdur. Bu doğrusal glukon polimerinde molekül içi ve moleküller arası birçok hidrojen bağı bulunur ki bunlar glikozları sıkıca bağlar. Dünyadaki organik karbonun yarısı selüloz formundadır, bu da selülozun yakıt ve değerli kimyasallara dönüştürülmesinin ne kadar önemli olduğunu gösterir (Isikgor ve Becer, 2015)

Hemiselüloz: Lignoselülozik biyokütlelerde selülozdan sonra en çok bulunan ikinci bitki polisakkariti hemiselülozlardır. Bunlar, polimerleşme derecesi (PD) 80-200 arasında olan düşük molekül ağırlıklı dallı polimerlerdir (Peng vd., 2012). Karmaşık yapılarında farklı bitkilerde farklı miktarlarda olmak üzere ksiloz, glikoz, mannoz, galaktoz, ramnoz, glukuronik asit, galakturonik asit bulunur. Hemiselülozun yapısı bitkiden bitkiye değiştiği gibi, bitkinin sap, dal, kök, kabuk gibi farklı bölümlerinde de farklılık gösterebilir. Ksilan bitki hücre duvarındaki hemiselülozlarda en çok rastlanan polisakkarittir. Bitkideki oranları %30'un üstüne kadar çıkabilir (Sun vd., 2004). Diğer hemiselülozlar arabinoksilan, ksiloglukan, mannan ve glikoomannanlardır (Peng vd., 2012). Hemiselüloz ana zinciri β -(1→4) bağlarıyla bağlı ksiloz, mannoz veya glikoz ihtiva eder. Hemiselülozlar biyokütleden sıvı sıcak su, alkali, alkali peroksit, dimetil sülfoksit, buhar patlatma, mikrodalga, ultrason gibi uygulamalarla özütlenabilir; ancak hemiselülozun ticari üretimi ve kullanımı için bu uygulamaların geliştirilmesi gerektiği bildirilmiştir (Celebioglu vd., 2012; Peng vd., 2012).

Şekil 2.1'de hemiselülozlardan elde edilebilecek potansiyel kimyasallar gösterilmektedir. Hemiselülozlar hidrolize edilerek KOS gibi oligomerler, monomerik pentozlar (ksiloz ve arabinoz) ve heksozlar (glikoz, galaktoz ve mannoz) elde edilebilirken, furfural, 5-hidroksimetilfurfural (HMF), levulinik asit, ksilitol, etanol gibi değerli kimyasallara dönüşmesi de sağlanabilir. Hemiselülozlar polimer halinde de önemli kullanım alanlarına sahiptir. Jel ve film oluşturma, biyo-uyumluluk, biyolojik olarak bozunabilme gibi özellikleri sayesinde gıda paketleme, ilaç üretimi, hücre terapisi, enkapsülasyon ve emülsifikasyon gibi uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahiptirler (Celebioglu vd., 2012).



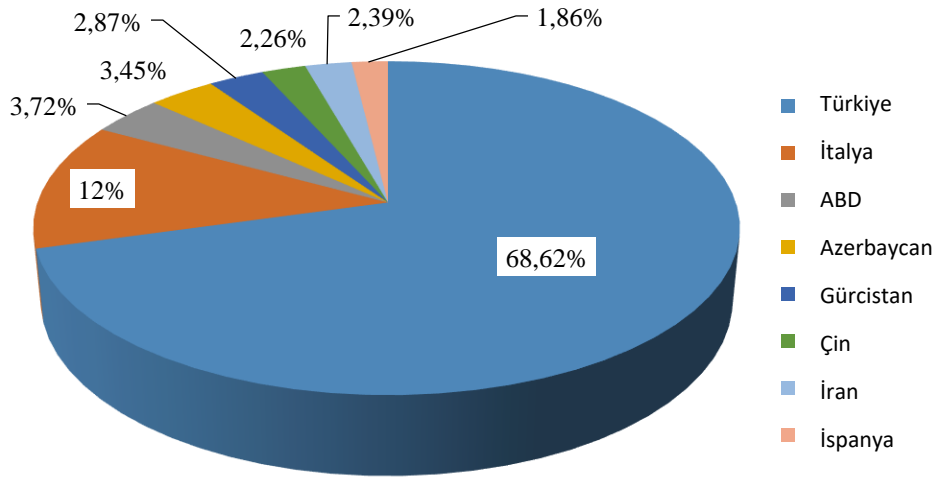
Şekil 2.1. Hemiselülozlardan elde edilebilecek ürünler (Kaynak: Peng vd., 2012).

Lignin: Aromatik ve sert bir biyopolimer olan lignin yaklaşık 10 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve selüloz ve hemiselüloza kovalent bağla sıkıca bağlı durumdadır (Sarkar vd., 2012). Üç boyutlu fenolik bir polimer olan lignin üç tane monolignol olan p-koumaril, koniferil ve sinapil alkolden oluşur. Karmaşık izolasyon, karakterizasyon ve analiz yöntemleri sebebiyle diğer karbonhidratlar gibi net tanımlanmış bir bileşik olarak değil, doğal fenolik polimer sınıfı olarak tanımlanır (Ghaffar ve Fan, 2014). Tarımsal atıklar en düşük (3-15%), kozalaklı ağaç kabukları ise en yüksek (30-60%) lignin içeren lignoselülozik maddelerdendir. Yapı malzemesi ya da doğal antioksidan olarak kullanımına olan ilgi artmaktadır (Ghaffar ve Fan, 2014).

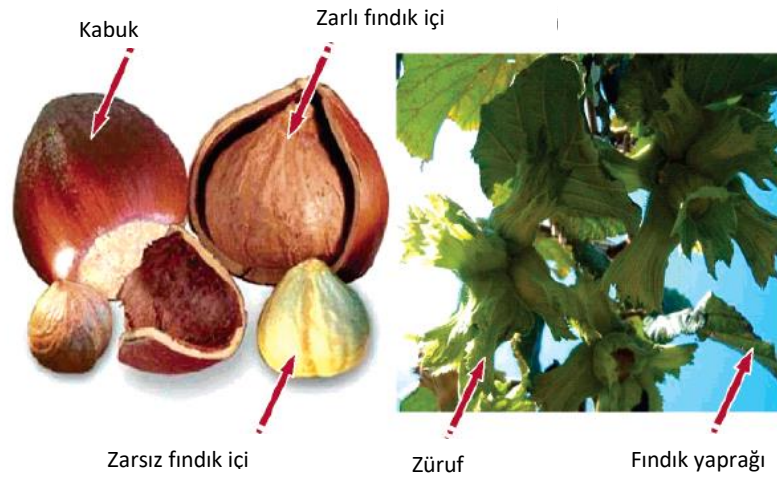
2.2 Fındık atıkları

Türkiye yıllık 550.000 ton kabuklu fındık üretimiyle (2009-2013 arası yılların ortalaması) dünyanın en büyük fındık üreticisidir ve bu rakam dünyanın toplam üretiminin %65'i kadardır (FAO 2017). Türkiye'yi sırasıyla İtalya, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Azerbaycan, Gürcistan, Çin, İran ve İspanya takip etmektedir (Şekil 2.2). Bu üretim rakamları ülkemizde fındık yetiştiriciliği ve işlenmesinden ortaya çıkan fındık kabuğu (FK), fındık zürufu (FZ) (kabuklu fındığı içinde barındıran yeşil yapraksı kabuk), iç fındık zarı, yaprak, fındık ağacı budama atıkları (FBA) ile yağ üretiminden kaynaklanan fındık küspesinin hammadde olarak ne kadar önemli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 2.3). Halen, fındık ağacı kabukları ve FBA yakıt olarak kullanılırken, FZ hasattan sonra gübre olarak toprakta bırakılır ya da yakılır (Çöpür vd., 2008). Fındık küspesi ise az miktarda da olsa hayvan yemi üretiminde kullanılmaktadır. Kabuklu fındık üretiminden ürün ağırlığının %70'i kadar FK, 2,7 katı kadar FBA açığa çıktığı bildirilmiştir (Alkaya vd., 2010). Bu kadar büyük miktardaki lignoselülozik maddenin düşük değerli uygulamalar yerine değerli ürünlere dönüştürülmesinin ülkemiz ekonomisi ve çevresel açıdan önemli olduğu açıktır. Dolayısıyla bu konuda,

çoğunluğu ülkemizde olmak üzere, çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar genel olarak FK'da antioksidan özellik taşıyan fenolik maddelerin karakterize edilmesi ve özütlenmesi ile lignoselülozik içeriğin etanol üretiminde kullanılması konularında olmuştur. Buna karşın şimdiye kadar literatürde FK, FZ veya FBA'dan prebiyotik özellik gösteren oligomerler üretilmesi konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece Montella vd. (2013a) ve Montella vd. (2013b) çalışmalarında fındık iç zarını kullanmışlar ve bu bileşenden polifenolün yanında diyet lifi de özütlemişlerdir. Elde ettikleri oligosakkaritlerin galakto-oligosakkarit ve ksiloglukan yapıda olduğunu göstermişlerdir.



Şekil 2.2. Fındık üreten ülkeler ve üretim miktarlarının toplam üretime oranı (%). (FAO 2017)



Şekil 2.3. Fındık ve bazı fındık atıkları (Kaynak: Shahidi vd., 2007).

Literatür incelendiği zaman fındık atıklarından elde edilebilecek en muhtemel ürünlerden birisinin fenolik madde özütleri olarak düşünüldüğü görülmektedir. Fındık ve bazı atıklarının yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Shahidi vd. (2007) fındık yan ürünlerinin özütlerinin fındık çekirdeğinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Fındığın zar kısmı en yüksek toplam fenolik madde içeriğini gösterirken (577,7 mg kateşin eşdeğerleri/g etanolik özüt), iç fındık en düşük değeri (13,7 mg kateşin eşdeğerleri/etanolik özüt) göstermiştir (Shahidi vd., 2007). Diğer bir çalışmada en yüksek toplam antioksidan aktiviteyi fındık ağacı yaprakları gösterirken (148 µmol troloks eşdeğeri/g etanolik özüt), en düşük aktiviteyi iç fındık (29 µmol traloks eşdeğeri/g etanolik özüt) göstermiştir (Alasalvar vd., 2008). Yine Alaşalvar vd. (2006) FZ'nin, iç fındıktan daha fazla antioksidan ve radikal tutucu aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. İç fındık ve yan ürünlerinin etanolik özütlerinde, bir hidroksibenzoik asit (gallik asit) ve dört hidroksisinnamik asit (kafeik, p-kumarik, ferulik ve sinapik asit) tanımlanmıştır. Fındık, fenolik asitlerin yanında siyanidin antosiyanidini ve (-)-epikateşin, (-)-epigallokateşin, (-)-epigallokateşin 3-gallat, (+)-kateşin flavonol-3-ollerini de içermektedir (Alasalvar vd., 2008). Contini vd. (2008) fındık kabuğundan ve zarından elde edilen doğal antioksidanları ölçmüş ve zardan elde edilen özütlerin aynı derişimlerde bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, troloks, α-tekoferol sentetik antioksidanlarına benzer olarak en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiklerini bulmuştur. ABD'de yetişen fındıkların kabuklarının da potansiyel doğal antioksidan kaynağı olduğu gösterilmiştir (Xu vd., 2012).

Önceki çalışmalarda fındık kabuğunda yaklaşık %25-27 selüloz, % 25-30 hemiselüloz ve % 41-43 lignin olduğu rapor edilmiştir (Cimino vd., 2000; Demirbas, 2006; Demirbas, 2008; Arslan ve Eken-Saracoglu, 2010). Çöpür vd. (2013) FZ'de %24,2 selüloz, %20 hemiselüloz ve %39 lignin tespit etmişlerdir (Çöpür vd., 2013). Bu atıkların etanol üretiminde kullanılması değerlendirilmiştir: Arslan ve Ekin-Saraçoğlu (2010) fındık kabuğunu doğrudan seyreltik asit ile muamele ettiklerinde indirgen şekerle birlikte etanol üretici organizma için toksik olan furfural oluştuğunu görmüşlerdir. Dolayısıyla asit hidrolizi öncesi delignifikasyon sonrasında süreçlerine toksin ayırma basamağı da eklemişler, *Pichia stipitis* kullanılan fermantasyon ile 16,79 g/L etanol üretmişlerdir. Diğer bir çalışmada, FZ'den etanol üretmek için bu atık önce %4 NaBH₄ ile delignifikasyona uğratılmış, sonra %2 NaOH ile ksilan ayrılmış, son olarak kalan selüloz enzimatik hidrolize tabi tutulmuştur. Bu hidrolizatın fermantasyonu ile 52,6 g etanol/kg FZ elde edilmiştir (Çöpür vd., 2013).

2.3 Prebiyotik oligosakkaritler

Lignoselülozik maddelerden elde edilebilecek değerli ürünler arasında hemiselülozik oligomerler vardır. Gıda, yem, ilaç gibi endüstrilerde kullanım alanı bulan bu fonksiyonel

oligomerlerin üretimine ilgi büyüktür. Frukto-, galakto-, ksilo-oligosakkaritler gibi oligomerler prebiyotik özellik gösterir. Bazı oligosakkaritler fonksiyonel gıda üretiminde kullanılmaktadır. İçecekler (meyve suyu, kahve, çay, gazlı içecekler, alkollü içecekler) probiyotik yoğurtlar ve diğer süt ürünleri (fermente ürünler, süt tozu, dondurma), gibi birçok üründe prebiyotik oligosakkaritler kullanılabilir (Mussatto ve Mancilha, 2007). Ülkemizde de prebiyotik katkılı süt ürünleri ve ekmek gibi ürünler marketlerde bulunmaktadır. Prebiyotikler ayrıca tek başlarına veya probiyotiklerle birlikte karışım olarak (simbiyotik ürün) da bulunabilir.

Prebiyotikler seçimli olarak fermente edilerek mide-bağırsak mikrobiyotasının bileşimini ve/veya aktivitesinde belli değişikliklere neden olan ve konakçının sağlığına olumlu katkılar sağlayan maddelerdir (Gibson vd., 2004). Prebiyotikler insanlar tarafından sindirilemez ve gastrointestinal mikrofloradaki yararlı bakteriler tarafından fermente edilerek bunların çoğalmalarını sağlarlar. Prebiyotik alımı bağırsaklardaki *Bifidobacterium* ve/veya *Lactobacillus* türlerinin miktarını artırır. Prebiyotiklerin kolon bakterileri tarafından sindirilmesiyle kısa zincirli yağ asitleri (asetat, propiyonat, butirat) ve laktat üretilir. Böylece zararlı bakterileri baskılayarak sindirim sistemi iltihaplarında azalma, daha iyi mineral absorpsiyonu ve kolon kanserini baskılanma gibi olumlu sonuçlar ortaya çıkar (Broekaert vd., 2011). Bir maddenin istenilen özellikli kolon bakterilerinin çoğalmalarını sağlarken diğer bakteriler tarafından kullanılmaması prebiyotik özellik göstermesini sağlar. Ayrıca prebiyotik maddenin gıda üretimi sırasındaki (düşük pH, yüksek sıcaklık vb.) ve sindirim sistemindeki (düşük pH, enzimler vb.) koşullara dayanıklı olması gerekir (Huebner vd., 2007; Huebner vd., 2008; Charalampopoulos ve Rastall, 2012). Bu sebeplerden prebiyotikler üretim ve sindirim koşullarında test edilmelidir.

Prebiyotikler arasında market lideri frukto-oligosakkaritlerdir. Ancak KOS'un bilinen prebiyotiklerden daha iyi özellik gösterdiği düşünülmektedir (Otieno ve Ahring, 2012). KOS geniş bir pH aralığında (2,5-8,0) stabil olması ve yüksek sıcaklığa (100°C) dayanıklı olması, ayrıca toksik olmaması, düşük dozlarda etkili olması gibi sebeplerle teknolojik açıdan da avantajlıdır (Vazquez vd., 2000). İn vitro çalışmalar göstermiştir ki *Bifidobacterium* türleri de dâhil olmak üzere bağırsaktaki organizmaları KOS'u metabolize edebilmektedir (Mäkeläinen vd., 2009). Makelainen vd. (2010b) çeşitli prebiyotikleri (ksilo-, galakto- ve frukto-oligosakkaritler, polidekstroz, laktitol, gentabiyoz ve pullulan) probiyotikler (*Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri) ve sindirim sistemi patojenleri üzerinde denemişlerdir. KOS özellikle *B. lactis* tarafından kullanılmış, frukto- ve galakto-oligosakkaritlerin aksine patojen bakteriler tarafından kullanılmamıştır. Bu özelliğiyle KOS yaygın bir probiyotik olan *B. lactis* ile birlikte simbiyotik bir ürün hazırlamak için çok uygundur. Bu ürün kolon mikrobiyotasında bahsedilen probiyotığın baskın hale gelmesini sağlayabilir. Diğer prebiyotikler için de geçerli olduğu gibi

KOS'un da molekül ağırlığı prebiyotik aktivitesinde önemlidir (Carvalho vd., 2013). Çeltik kavuzunun hidrolizi ile elde edilen dört ya da daha az monomere sahip KOS'un bifidobakterlerin çoğalmasını sağladığı bildirilmiştir (Gullon vd., 2008). Atmış beş yaş üstü denekler üzerinde yapılan bir çalışmada üç hafta boyunca günde 4 g KOS verilen deneklerin dışkıında bifidobakter sayısı ve nem oranının arttığı, pH'nın düştüğü (kontrol grubuna göre) ve olumsuz bir sağlık etkisine rastlanmadığı görülmüştür (Chung vd., 2007).

KOS lignoselülozik hemiselülozun seyreltik asit ile hidrolizi, alkali ile özütlenmesi veya doğrudan enzimatik hidrolizi ile üretilebildiği gibi buhar ya da sıvı sıcak su (otohidroliz) gibi hidrotermal işlemler uygulanarak da elde edilebilir (Aachary ve Prapulla, 2011). Alkali ile özütlemeye ksilan KOH ya da NaOH ile biyokütleden ayrılır. Daha sonra ksilan, endo-ksilanaz aktivitesi yüksek olan enzimlerle oligosakkaritlere hidroliz edilir (Akpınar vd., 2007). Önişlem olmadan doğrudan enzim uygulamasına uygun ürünler ise fazla değildir (Aachary ve Prapulla, 2011). Alkali ile özütlenmiş ksilandan kontrollü asit hidrolizi ile de KOS elde edilebilir (Akpınar vd., 2010a). Yüksek sıcaklıklarda (>140 °C) seyreltik asit kullanarak ksilanın oligo ve monomerlerine hidroliz olması da mümkündür (Kumar ve Wyman, 2008). Asit veya alkali gibi kimyasallar kullanılması bu yöntemlerin dezavantajlarını oluşturur. Otohidroliz uygulamasında ise enzimler, özütleyici veya hidroliz edici kimyasallar veya katalizörler kullanılmadan hemiselülozun oligosakkaritlere hidrolizi sağlanır.

2.4 Otohidroliz ile KOS üretimi

Otohidroliz (sıvı sıcak su uygulaması) hidrotermal bir işlemdir. Bitki biyokütlesi sadece suyla karıştırılıp basınçlı reaktörde 160-240 °C'ye ısıtılır. Belirli bir süre istenilen sıcaklıkta bekletilen reaktör daha sonra soğutulur ve otohidroliz likörü boşaltılır. Bu koşullarda hemiselüloz hidroliz olur ve geriye kalan katıdaki selüloz selülozik enzimlerle hidroliz edilebilir hale gelir (Hendriks ve Zeeman, 2009; Alvira vd., 2010). Bu sebeple biyoetanol üretimi öncesi uygulanabilecek önişlemler arasındadır. Otohidroliz sırasındaki yüksek sıcaklık suyun otoiyonizasyonuna ve hemiselüloz zincirindeki asetil gruplarının asetik aside dönüşmesine sebep olur. Böylece ortamın asitliği artar, bu da hemiselülozun lignin ve selülozdan ayrılarak parçalanmasına sebep olur (Aachary ve Prapulla, 2011; Otieno ve Ahring, 2012). Bu özelliğiyle otohidroliz, zeytin budama atıkları (Cara vd., 2012), bira atığı (Carvalho vd., 2004), badem kabuğu, üzüm posası, kestane dikenli kabuğu (Conde vd., 2011), mısır sapı (Egues vd., 2012, Buruiana vd., 2017), buğday sapı, ayçiçeği sapı (Akpınar vd., 2010b), fil otu (Chen vd., 2016), arpa kavuzu (Garrote vd., 2008) ve pirinç kabuğundan (Garrote vd., 2007) KOS gibi hemiselülozik oligomerlerin üretiminde kullanılmıştır. Atıklar farklı yapılarda olduğu için her bir atık için sıcaklık ve süre gibi reaksiyon koşulları optimize edilmelidir. Koşullar şiddetlendikçe elde edilen hemiselülozun PD düşer ancak aynı zamanda ksiloz gibi

monosakkaritler de oluşmaya başlar. Ayrıca monosakkaritlerin bozunması sonucu furfural oluşumu gözlenir (Aachary ve Prapulla, 2011). Bu bulgular oligomer veya başka bir hedef ürün elde etmek için reaksiyon koşullarının incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Uygulama farklı şiddet faktörü (severity factor) derecesinde denenmeli ve uygun koşullar bulunmalıdır.

Nabarlatz vd. (2005) badem kabuğunu 150-190 °C'de otohizolize uğratmışlar ve 150 °C ve 300 dak'da KOS verimi %42 iken, 190 °C ve 19 dak'da verim %63 olmuştur. Aynı çalışmada araştırmacılar 179 °C ve 23 dak'da elde ettikleri otohizoliz likörünü püskürtmeli kurutucuda kurutarak %58,3'ü KOS olan bir ürün elde etmişlerdir. Bu ürün başlangıçtaki kuru badem kabuğunun %24'ü kadardır. Cara vd. (2012) zeytin budama atıklarını 170-230 °C'de 10 dak muamele etmişler ve en yüksek KOS verimini (60 g/kg) 180 °C'de elde etmişlerdir. Bu çalışmada yan ürünlerin (furfural ve asetik asit) oluşumu sıcaklık arttıkça artmış, ksiloz oluşumu ise 200 °C'ye kadar artmış, daha sonra azalmıştır. Bira atığı tahılların otohizolizinde en yüksek verim (başlangıçtaki ksilanın %61'i kadar KOS) ise 190 °C'de 5 dak' da elde edilmiştir (Carvalho vd., 2004). Daha düşük sıcaklıkta çözünen ksilan miktarını yükseltmek için süreyi uzatmak gerekmiştir. Elde edilen KOS'un PD dağılımı sıcaklık ve süre ile değişmiştir. 2-3 polimerleşme dereceli KOS elde edilmesi için en uygun koşul 170 °C-60 dak olarak bulunmuştur (Carvalho vd., 2004). Çok yeni bir çalışmada biyoetanol üretimi öncesi ön işlemler olarak kayın ağacının otohizoliz koşulları (130-220 °C; 15-180 dak) ayrıntılı olarak incelenmiştir (Nitsos vd., 2013). Şiddet derecesi ($\log R_o$ ($R_o = t \exp[(T-100)/14.75]$)) arttıkça çözünen biyokütle ve hemiselüloz ayrıca bozunma ürünleri derişimi (furfural ve asetik asit) artarken, lignin ve selüloz az miktarda çözülmüştür. $\log R_o$ 3,8-4,1 arasında ksilan çözünlüğü en üst düzeye (yaklaşık %60) ulaşmıştır. $\log R_o$ 4,3-4,7 arasında ise ksiloz bozunma ürünleri artmıştır. Ksilan çözünlüğünün arttığı $\log R_o$ değerlerinde selülozun enzimatik hidrolizi de en yüksek seviyelere çıkmıştır (Nitsos vd., 2013). Bu da uygun otohizoliz koşullarının bulunması ile hem ksilan çözünlüğünün hem de KOS miktarının arttığını, ortamda kalan selülozun ise ayrıca biyoetanol üretimi için de kullanılabileceğini göstermektedir. Otohizoliz reaksiyonu seçici olarak gerçekleşmediğinden hemiselüloz hidrolizinin yanında özütlenir diğer maddeler, asitte çözünür lignin ve proteinler gibi diğer bazı maddeler de açığa çıkar (Garrote vd., 2007). KOS üretiminde bu maddeler otohizoliz likörü içinde kirlilik olarak görülür ve membran filtrasyon veya organik çözücü özütlemesiyle ortamdan ayrılabilir. Literatürdeki çalışmalar göstermiştir ki otohizoliz, lignoselülozik atıkların bileşenlerine ayrılması için uygun bir yöntemdir. Bu işlemlerle KOS gibi değerli bir prebiyotik doğrudan elde edilmesi mümkündür.

2.5 Enzimatik KOS üretimi

KOS üretiminde kullanılacak diğer bir yöntem olan enzimatik hidrolizin avantajı, yüksek sıcaklık ve basınç kullanılmadığından özel bir donanım ihtiyacı duyulmamasıdır. Ayrıca hidrotermal uygulamalarda ortaya çıkan istenmeyen yan ürünler de enzimatik yöntemde oluşmaz. Ancak bu yöntem alkali gibi kimyasallara ve nispeten pahalı enzimlere ihtiyaç duyar. Alkali özütleme sonrasında bulaşı olarak kalan etanol ve pigmentlerin enzim faaliyetini baskıladığı bildirilmiştir (Shen vd., 2016). Bu sebepten koşullar incelenerek alkali ve enzim miktarı mümkün olan en az seviyeye indirilmelidir. Bu yöntemde ksilan önce lignoselülozik ağdan ayrılır, sonra ksilanaz enzimleriyle oligosakkaritlere parçalanır. Ksilan özütlemek için genellikle NaOH ve KOH gibi alkaliler kullanılır (Carvalho vd., 2013). Alkaliden önce veya alkali uygulamasıyla aynı anda delignifikasyon da gerekebilir. Delignifikasyon sodyum borohidrat, sodyum klorit, hidrojen peroksit veya perasetik asit kullanılarak sağlanabilir (Akpınar vd., 2007; Kumar vd., 2013). Daha sonra endo-ksilanaz aktivitesi yüksek, ekzo-ksilanaz ve β -ksilosidaz aktivitesi düşük enzimler kullanılarak ksilanın hidroliz edilir ve KOS elde edilir.

Bu yöntemle şeker kamışı, mısır koçanı, pamuk ve ayçiçeği sapları, buğday samanı gibi lignoselülozik yan ürünlerden oligosakkarit üretimi gerçekleştirilmiştir (Akpınar vd., 2007; Aachary ve Prapulla, 2009; Akpınar vd., 2010b; Carvalho vd., 2013; Uçkun Kiran vd., 2013). Enzimatik hidroliz için ticari enzimler kullanılabilir gibi, ham enzimler de kullanılabilir. Örneğin Bian vd. (2013) *Pichia stipitis* kullanarak ürettikleri ksilanazı şeker kamışından oligosakkarit üretiminde kullanmışlardır. Aachary ve Prapulla (2009) *Aspergillus oryzae* fermantasyon sıvısını mısır koçanından KOS üretimi için endo-ksilanaz kaynağı olarak kullanmışlardır. Alkalifilik *B. halodurans* ksilanazı serbest ve tutuklanmış halde mısır koçanı ksilanı üzerinde denenmiş ve enzimin tutuklanmış halde daha kısa zincirli oligomerler (ksilobioz ve ksilotrioz) ürettiği görülmüştür (Lin vd., 2011). Çalışmamızda benzer şekilde, *Auerobasidium pullulans* ile üretilmiş ham ksilanaz KOS üretimi için kullanılmıştır.

KOS gıdalarda katkı olarak veya gıda destekleyicisi olarak doğrudan kullanılacağı için saflığının yüksek olması, insana zarar verebilecek ya da kolon bakterilerinin bunları kullanmasını engelleyecek safızlıklar barındırmaması gerekir. Otohizoliz liköründe çeşitli karbonhidrat bozunma ürünleri (asetik asit furfural, hidroksi metil furfural, fumarik asit vb.), monosakkaritler, enzimatik hidrolizatlarda ise proteinler, polisakkaritler yüksek miktarda bulunabilir. Yüksek saflıkta KOS ürünü elde etmek için kullanılacak yöntemler arasında santrifügasyon, filtreleme, membran filtrasyon, nanofiltrasyon, aktif karbona adsorpsiyon, vakum buharlaştırma, renk giderme, püskürtmeli kurutma gibi yöntemler sayılabilir (Otieno ve Ahring, 2012). Ultrafiltrasyon son zamanlarda daha fazla ilgi çekmiş ve çeşitli çalışmalarda

KOS'u fraksiyonlarına ayırma veya saflaştırma amacıyla kullanılmıştır (Akpınar vd., 2007; Akpınar vd., 2010a; Akpınar vd., 2010b; Zhao ve Dong, 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın başında fındık atıklarının lignoselülozik içeriği belirlenmiştir. Daha sonra bu atıklara otohizoliz ve enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Uygun olan atıklar kullanılarak KOS üretimini artıracak otohizoliz ve enzimatik hidroliz koşulları belirlenmiştir. Hidrolizatlar ultrafiltrasyondan geçirilerek kısmi saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen KOS'un seçilen bakterilerin gelişmesine etkisi ve farklı koşullara dayanıklılığı ölçülmüştür.

Otohizolizler iki, diğer uygulamalar üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Projenin amaç ve hedeflerine uygun olarak kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

3.1 Atıkların temini ve saklanması

Fındık atıkları fındık hasat ve işleme döneminde Gürsoy Tarımsal Ürünler Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Ordu, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. FK, FZ ve FBA etüvde (Termal, Türkiye) 60 °C'de 24 sa kurutulduktan sonra tanecik boyutu 2 mm'den küçük olacak şekilde laboratuvar tipi bitki öğütme değirmeninde (Yüksel Kaya Makine, Türkiye) öğütülmüştür. Öğütülen fındık atıkları hava geçirmeyen paketlerde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2 Atıkların karakterizasyonu

Kurutulmuş ve öğütülmüş fındık atıklarının nem, protein, özütlenen madde, kül, yapısal karbonhidrat, lignin, asetil grupları ve üronik asit içeriği belirlenmiştir.

3.2.1 Nem ve Protein tayini

Fındık atıklarının nem içeriği 105 °C' de bir gece kurutularak, protein içeriği de Kjeldahl yöntemiyle (Gerhardt, Almanya) (protein=6,25xN) belirlenmiştir.

3.2.2 Özütlenen madde miktarı, kül ve üronik asit analizi

Fındık atıklarının özütlenen madde miktarı, atıkların sırasıyla su ve etanolde (%96) Soxhlet cihazında 4 sa özütlenmesiyle elde edilmiştir. Kül miktarı ASTM E1755-01 metoduyla belirlenmiştir. Üronik asit, spektrofotometrik olarak m-hidroksidifenil metodu ile (Melton ve Smith, 2001) belirlenmiştir.

3.2.3 Yapısal karbonhidrat analizi

Atıkların selüloz, ksilan, arabinan, galaktan ve lignin içeriği NREL/TP-510-42618 yöntemiyle belirlenmiştir (Sluiter vd., 2010). Alkolde çözünen maddeler ayrıldıktan sonra iki aşamalı asit

(ağırlıkça %72 ve %4 H₂SO₄) hidrolizi uygulanmıştır. 0,3 g kuru ve öğütülmüş fındık kabuğu 3 mL %72 H₂SO₄ içinde oda sıcaklığında 60 dak bekletildikten sonra 84 mL su eklenerek asit derişimi %4 olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş karışım otoklavda, 121 °C' de 60 dak bekletilmiştir. Bu karışım daha sonra filtrelili porselen krozelerden vakum altında süzölmüş ve katı ve sıvı fazlar ayrılmıştır. Filtre üzerinde kalan katı kısım 105 °C' de bir gece kurutulmuştur. Filtre üstünde kalan katının ağırlığı ölçölmüş ve kül miktarı bu ağırlıktan çıkarılarak asit ile çözünmeyen lignin (Klason lignin) hesaplanmıştır. Hidroliz sonrası asit ile çözünen lignin (AÇL) spektrofotometrik yöntemle bulunmuştur. Süzölen sıvının absorbens değeri 240 nm'de ölçölmüştür. Yüzde AÇL Denklem 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%AÇL = \frac{UV_{ABS} \times Filtrat\ hacmi \times Seyreltme\ faktörü}{\epsilon \times Kuru\ Ağırlık} \quad \text{Denklem 1}$$

UV_{abs}: 240 nm'deki absorbens değeri

Filtrat hacmi: Asit hidrolizi hacmi (87 mL)

ϵ : Absorptivite değeri (L/g·cm)

Sıvı faz, pH'sı CaCO₃ eklenerek 5-7 arasına yükseltildikten sonra 0,45 µm gözenek çaplı teflon (PTFE) membran filtreden geçirilmiş ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) cihazında (Perkin Elmer, ABD) sıvının monosakkarit analizi yapılmıştır. Hidroliz sırasında monomerlere su bağlandığı için monomer derişimleri anhidro düzeltme faktörü ile çarpılmıştır. Bu faktör pentozlar için 0,88 (132/150), heksozlar için 0,90'dır (162/180).

3.3 Otohidroliz yoluyla KOS üretimi

3.3.1 Otohidroliz

Hidrotermal reaksiyon, 600 mL'lik paslanmaz çelik basınçlı reaktörde (Berghof, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Kuru biyokütle (35 g) katı:sıvı oranı 1:10 olacak şekilde su ile karıştırılmış ve reaktör kapağı kapatılmıştır. Reaktör ısıtma mantosuna yerleştirilmiş ve reaktör karıştırıcısı dakikada 300 devirde sürekli çalıştırılmıştır. Karışım belirlenen sıcaklığa ulaştıktan sonra bu sıcaklıkta belirlenen süre bekletilmiş, daha sonra reaktör soğutma serpantininde dolaştırılan su yardımıyla 60 °C'ye kadar soğutulmuştur. Reaktörün kapağı açıldıktan sonra, reaktör tankı çıkarılmış, sıvı ve katı kısım önce tülbent yardımıyla süzölmüş sonra da filtre kâğıdından vakum filtrasyon yöntemiyle süzölerek birbirinden ayrılmıştır. Kalan katı kısım su ile yıkandıktan sonra 45 °C' de bir gece boyunca kurutulmuş ve analizlere kadar oda sıcaklığında saklanmıştır. Otohidrolizden elde edilen likörler -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Otohidroliz sonrası elde edilen katıların daha önceki bölümde anlatıldığı gibi yapısal karbonhidrat, kül ve nem tayinleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Otohidroliz koşullarının incelenmesi

Sıcaklık ve sürenin etkisini birlikte incelemek amacıyla şiddet faktörü ($\log R_o$) hesaplanmıştır. Şiddet faktörü aşağıda belirtildiği gibi tanımlanmıştır.

$$R_o = t \cdot \exp[(T-100)/14.75] \quad \text{Denklem 2}$$

Burada t: süre (dak) ve T: sıcaklığı (°C) ifade etmektedir. 100 °C kaynak sıcaklık, 14,75 ise reaksiyonun aktivasyon enerjisiyle ilgili deneysel bir değerdir. Şiddet faktörünün hesaplanmasında ısıtma, reaksiyon sıcaklığında bekletme ve soğutma süreleri dikkate alınmıştır.

Öncelikle, FK, FZ ve FBA'ya 190 °C' de 15 dak (ısıtma ve soğutma için geçen süreler hariç) otohidroliz uygulanmıştır. Likörde çözünen ksiloz, KOS ve katıdaki selüloz, ksilan, galaktan, Klason lignin, kül ve asetil grupları miktarı belirlenmiştir.

Otohidroliz koşullarının fındık kabuğundan KOS ve yan ürünlerin oluşumuna etkisi, belirli sıcaklıklarda (150-200 °C) ve belirli sürelerde (0-45 dak) araştırılmıştır. KOS verimini en yükseğe çıkaran şiddet faktörü belirlenmiştir. Otohidroliz liköründeki monosakkaritler, KOS ve asetik asit ile yüksek sıcaklıkta şekerlerin bozunması sonucu ortaya çıkan HMF ve furfural derişimleri HPLC analizleri ile ölçülmüştür.

Otohidroliz likörlerinin toplam oligosakkarit içeriği likörlerin NREL/TP-510-42623 metoduna göre 4% H₂SO₄ ile at 121 °C'de 1 sa hidroliz edilmesiyle belirlenmiştir. Likördeki monomerik şeker derişimindeki artışın anhidro düzeltme faktörü ile çarpılmasından sonra toplam oligosakkarit değeri hesaplanmıştır. KOS'a bağlı asetil grupları da benzer şekilde asit hidrolizi sonrası asetik asit derişimindeki fark ile hesaplanmıştır.

3.4 Enzimatik KOS üretimi

3.4.1 Alkali özütleme

Lignoselülozik biyokütledeki mum, klorofil ve diğer özütlenebilir maddeler Soxhlet cihazında su ve etanol (%96) kullanılarak ayrılmıştır. Katı madde 60 °C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur.

Fındık kabuğuna alkali uygulamasında farklı derişimlerde çeşitli alkali çözeltiler oda sıcaklığında farklı süreler için kullanılmıştır: % 10 KOH ve % 1 NaBH₄ ile 3 sa; % 5 NaOH ile 16 sa; % 10 NaOH ile 16 sa; ve % 24 KOH ve % 1 NaBH₄ ile 3 sa (Goksu vd., 2007). Biyokütle katı:sıvı oranı 1:10 olacak şekilde alkali çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra çalkamalı inkübatörde dakikada 120 devir/dk'da karıştırılarak bekletilmiştir. İşlem sonrasında katı ve sıvı kısımlar vakum filtrasyon ile ayrılmıştır. Süzülen sıvının pH'sı HCl ile 5'e ayarlandıktan sonra ksilanı çöktürmek için iki hacim soğuk etanol ilave edilmiştir. 6000

devir/dk'da, 10 dak boyunca 4 °C'de santrifüj edildikten sonra çöken katı kısma 10 mL su ilave edilmiş ve özütlenen ksilan miktarının hesaplanması için % 4 H₂SO₄ ile 121 °C' de 1 sa hidroliz uygulanmıştır. Çöken katının ksilan miktarı hidroliz sonrası açığa çıkan ksilozun miktarının HPLC ile ölçülmesi ile hesaplanmıştır.

Ksilanın ayrıca FBA'dan da alkali özütlenmesi için %1 ve %2 NaOH çözeltileri de kullanılmıştır.

3.4.2 Enzimatik hidroliz

Hidroliz için TÜBİTAK-TOVAG 1120521 numaralı "Tarımsal yan ürünler kullanılarak *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimi için biyoproses stratejilerinin geliştirilmesi" başlıklı proje kapsamında üretilen ksilanaz enzimi ve ticari ksilanaz enzimi (Accelerase XY, Dupondt) kullanılmıştır. Kullanılan tüm enzimler için ksilanaz aktivitesi TÜBİTAK-TOVAG 1120521 numaralı projede oluşturulmuş yöntemle belirlenmiştir.

Ksilanaz aktivite tayini:

Ksilanaz aktivitesi DNS (dintirosalisilik asit) yöntemi ile belirlenmiştir (Bailey vd., 1992 & Yegin vd., 2017). Substrat olarak kayın ağacından (beechwood) elde edilen ksilan kullanılarak sitrat tamponu (50mM, pH 5,2) içerisinde % 0,5' lik (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır. 900 µl substrat ve 100 µl enzim örneği bir test tüpü içerisinde karıştırılmış ve su banyosunda 50°C' de, 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında karışım üzerine 1,5 mL DNS çözeltisi ilave edilerek karıştırılıp kaynamakta olan su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra 1 dakika soğuk suda bekletilerek hızla soğutulmuştur. Sonrasında örneklerin 540 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre kullanılarak kaydedilmiştir. Söz konusu her bir örneğe spesifik bir de kör deneme yapılmıştır. Kör deneme için enzim örneği, DNS çözeltisinin ilavesinden sonra eklenmiş olup bunun dışında örnek için uygulanan prosedür aynı şekilde izlenmiştir. Söz konusu enzim örnekleri 540 nm'de yaklaşık 0,6-0,7 arasında bir absorbans verecek şekilde sitrat tamponu (50 mM, pH 5,2) kullanılarak seyreltilmişlerdir.

Standart grafiğin hazırlanması için 2 mg/mL konsantrasyonunda stok ksiloz çözeltisi sitrat tamponu içerisinde (50 mM, pH 5,2) hazırlanmıştır. Söz konusu stok çözeltilerden 0-75 µg ksiloz içeren çözeltiler seyreltme yoluyla elde edilerek örnek için yukarıda ifade edilen prosedür izlenmiş ve elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik oluşturulmuştur. 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 aşağıda verilen Denklem 3 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = (X/150,13) \cdot (1/5) \cdot (1/0,1) \cdot \text{SF} \quad \text{Denklem 3}$$

X: µg ksiloz (Standartlar ile hazırlanan grafikten elde edilecektir)

SF: Seyreltme faktörü

Enzimatik hidroliz çalışmalarının ilk aşamasında *A. pullulans* (AP) ksilanazı ile ticari ksilanaz enzimi KOS üretme etkinlikleri açısından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla %2 substrat içeren 50 mM'lık sitrat tamponuna (*A. pullulans* ksilanazı için pH 5,0 ve ticari ksilanaz için pH 6,0) her 1 g KOS için 30-500 ünite ksilanaz aktivitesi olacak şekilde enzim çözeltisi eklenmiştir. Toplam 5 mL reaksiyon hacminde çalışılmıştır. Söz konusu enzim-substrat karışımı her bir enzim için önerilen en uygun sıcaklıkta su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Karışımlardan belirli aralıklarla örnekler alındıktan sonra beş dakika kaynatılarak enzim faaliyeti durdurulmuştur. Alınan örneklerde açığa çıkan KOS ve ksiloz doğrudan, hidroliz olmadan kalan ksilan ise asit hidrolizi sonrasında HPLC kullanılarak tespit edilmiştir. Farklı enzim miktarları kullanarak yapılan hidrolizlerin zamanla değişiminin ölçülmesi ile KOS veriminin en yüksek olduğu hidroliz süresi ve enzim miktarı belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz çalışmalarının sonraki aşamasında ise farklı pH, sıcaklık ve substrat derişiminin KOS verimi üzerine etkisi incelenmiştir.

3.5 KOS saflaştırılması ve biyoaktivite testi

3.5.1 KOS'un saflaştırılması

Başta fenolik maddeler olmak üzere karbonhidrat olmayan maddelerin bir kısmının ayrılması için otohizoliz sonucu elde edilen liköre ağırlıkça farklı oranlarda (%1, 2, 5 ve 10) toz halde aktif karbon (Merck, Almanya) ilave edilmiştir. Aktif karbon içeren likör oda sıcaklığında 1 sa karıştırılmış ve sırasıyla önce kaba filtre kâğıdı ve daha sonra 0.45 µm teflon (PTFE) membran filtreden süzölmüştür. Toplam KOS veriminin en yüksek olduğu otohizoliz koşulundan elde edilen liköre (190 °C'de 5 dak); ve otohizoliz sonrası ksilanaz uygulanmış likör aktif karbon ile muamele edilmiştir.

Aktif karbon sonrası elde edilen likörlerin bir kısmı prebiyotik aktivite testleri için liyofilize edilirken, bir kısmı da farklı moleköl ağırlığı sınırına (molecular weight cut-off) sahip membran filtreler içeren çapraz akış ultrafiltrasyon sisteminden (Sartorius, Almanya) geçirilmiştir. Öncelikle 10 kDa sınırlı membran kullanılarak büyük moleküllerin ayrılması sağlanmıştır. 10 kDa'dan geçen likör 2 kDa sınırlı membran filtreden süzölmüştür. Filtreden süzme işleminin verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi için süzölmeden kalan sıvının hacmi 3 katına tamamlanarak sisteme tekrar beslenmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra elde

edilen süzölmüş fazlar birleştirilmiştir. Elde edilen örnekler analize kadar -20 °C' de saklanmıştır. Her bir filtre için son aşamada kalan sıvı ve filtreden geçen toplam sıvının ksiloz, toplam KOS ve PD 7'den küçük olan KOS'larının analizi HPLC'de yapılmıştır.

3.5.2 Gıda üretim koşullarının etkisi

190 °C'de 5 dak'lık otohizolizle üretilen likör ve ksilanaz ile muamele edilmiş likör (190 °C'de 0 dak) ağırlıkça %1 aktif karbonda 1 sa bekletildikten sonra süzölmüş ve liyofilize edilerek stabilite testi için kullanılmıştır. Liyofilize likörler oligomerlerin bozulmasına sebep olabilecek düşük pH ve yüksek sıcaklık koşullarında test edilmiştir. Bunun için Huebner vd. (2008) tarafından önerilmiş yöntem kullanılmıştır. Tampon çözelti içinde çözülmüş KOS (ağırlıkça %2) çeşitli pH ve sıcaklık değerlerinde tutulmuştur. Muameleler sonunda her bir örneğin ksiloz ve KOS değerleri HPLC ile ölçölmüştür. Her işlem öncesinde hazırlanan çözeltilerden örnekler alınmıştır.

Düşük pH'nın etkisi: KOS pH'sı 3, 4, 5, 6 olan 20 mM sitrat-fosfat tamponu içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında 24 sa bekletildikten sonra farklı derişimlerde hazırlanmış NaOH çözeltileri ile pH'sı 7'ye çıkarılmıştır. Örnekler analize kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Düşük pH'da sıcaklığın etkisi: Yüksek sıcaklığın farklı pH koşullarında prebiyotik stabilitesine etkisini incelemek için yukarıdaki şekilde hazırlanan pH'sı 3, 4, 5, 6 olan KOS çözeltileri su banyosu içinde 85 °C'de 30 dak bekletilmiştir. İşlem sonunda pH'ları 7'ye yükseltile çözeltiler analize kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Maillard tepkimesi koşullarının etkisi: pH'sı 7 olan 20 mM sitrat-fosfat tamponuna %2 KOS ve %1 glisin eklenmiştir. Bu çözelti 85 °C'de 3 sa boyunca tutulmuş ve her saat örnek alınmıştır. Maillard tepkimesi sonucu renk değişimi çözeltilerin 420 nm'deki absorbansı ölçölerek belirlenmiştir. Bunun için referans olarak 85 °C'de 3 sa tutulmuş %2 glikoz ve %1 glisin içeren 20 mM sitrat-fosfat tamponu (pH 7) kullanılmıştır. Saat başı alınan örneklerin yüzde esmerleşme değeri şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Yüzde esmerleşme} = \frac{\text{Prebiyotikli çözeltilinin } ABS_{420} \text{ değeri}}{\text{Glikozlu çözeltilinin 3 sa sonraki } ABS_{420} \text{ değeri}} \times 100 \quad \text{Denklem 4}$$

3.5.3 Sindirim sistemi koşullarının etkisi

KOS öncelikle mide sıvısında test edilmesi amacıyla, % 0,3 pepsin içeren ve g/L olarak; NaCl (8), KCl (0,2), Na₂HPO₄.2H₂O (8,25) NaH₂PO₄ (14,35), CaCl₂.2H₂O (0,1), MgCl₂.6H₂O (0,18) bileşenlerinden oluşan pH'sı HCl ile 1'e ayarlanmış tampon çözelti içine ağırlıkça % 1 olacak şekilde ilave edilmiş ve bu karışım 37°C'de 4 sa inkübe edilmiştir (Korakli vd., 2002; Hongpattarakere vd., 2012). Bu koşullarda analiz için örnek alındıktan sonra, bağırsak sıvısındaki test için karışımın pH'sı sodyum hidroksit ile 8'e yükseltilmiş ve içerisine % 0,1

tripsin ilave edilmiştir. 37°C'de 6 sa inkübe edildikten sonra örnek alınmıştır. İnkübasyonun öncesinde ve sonunda alınan sıvı örnekler HPLC ile analiz edilerek ksiloz ve KOS miktarları ölçülmüştür.

3.5.4 Prebiyotik aktivite testi

Farklı koşullarda elde edilmiş KOS'un probiyotik bakterinin gelişmesi üzerine etkisini incelemek için *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* NRRL-B41405, *Bifidobacterium bifidum* NRRL-B41410, *Bifidobacterium longum* NRRL- B41409, *Bifidobacterium infantis* NRRL-B41661 ve *Bifidobacterium breve* NRRL- B41408 seçilmiştir. Bu bakterilerin, KOS içeren sıvı ortamlarda anaerobik şartlarda gelişmesi ölçülmüştür. Prebiyotik testler için kullanılan probiyotik bakterilerin aktifleşmesi için Reinforced Clostridial Medium (RCM) ve prebiyotik aktivite testleri için besiyeri olarak bazal ortam (Basal Medium) kullanılmıştır. Reinforced Clostridial Medium şu bileşenlerden oluşur (g/L): Maya özütü (13,0), pepton (10,0), glikoz (5,0), çözünen nişasta (1,0), NaCl (5,0), Na-asetat (3,0), sistein HCl (0,5), agar (0,5). Bazal ortam şu bileşenlerden oluşur (g/L): pepton su (2) maya özütü (2), NaCl (0,1) K₂HPO₄ (0,04), KH₂PO₄ (0,04), MgSO₄ 7H₂O (0,01), CaCl₂ 6H₂O (0,01), NaHCO₃ (0,2), Tween 80 (2 µl), sistein HCl (0,5), safra tuzu (0,5), resazurin (0,001), hemin (0,05), vitamin K₁ (10 µl).

RCM ve Basal Medium hazırlanmasında, Hungate yöntemi uygulanmıştır. Besiyeri kaynatılarak ve aynı zamanda karıştırılarak O₂ uzaklaştırılmış, indirgeyici madde olarak sistein HCl eklenmiş ve gaz akışı altında hungate tüplerine doldurulmuş, septumlar sıkıca kapatılarak 121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Kullanılan gaz, % 85 N₂, % 10 CO₂, ve % 5 H₂'den oluşmaktadır. Sıcaklıktan etkilenen kimyasallar sterilizasyon sonrası eklenmiştir. Böylece bakterilerin gelişmesi için anaerob şartlar sağlanmıştır.

KOS veya glikozun %10'luk sulu çözeltisi hazırlanmış ve bunlar 0,22 µm'lik membran filtreler kullanılarak steril edilmiştir. Karbonhidratlar daha sonra derişimleri %1 olacak şekilde, steril şırınga kullanılarak bazal ortam içeren tüplere eklenmiştir. RCM 'de 24 sa süresince aktifleştirilmiş olan kültürler %1 oranında bazal ortama eklenerek inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Tüpler 37 °C 'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. Başlangıçta ve 24. saatte olmak üzere iki kez örnek alınmıştır. Örnek alma işlemi steril şırınga ile septum üzerinden yapılmıştır. Ortamların absorbans değerleri spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüştür. 24. sa ile başlangıç absorbansları arasındaki fark organizmanın o ortamdaki gelişme miktarı olarak kullanılmıştır.

Prebiyotik skor hesaplamak için *Escherichia coli* kullanılmıştır. Aktifleşmesi için Triptik soya besiyeri (TSB) kullanılmıştır. TSB ortamı şu bileşenlerden oluşur (g/L): Kazein peptonu (17.0), soya peptonu (3.0), glikoz (2.5), NaCl (5.0), K₂HPO₄ (2.5). Aktif kültür % 1 glikoz veya

KOS içeren Basal Medium ortamına % 1 oranında aktırılarak 37 °C 'de 24 sa inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme yukarıdaki gibi ölçülmüştür. Aktifleştirmesi ve prebiyotik testler *E. coli* için atmosferik (aerobik) koşullarda gerçekleştirilmiştir.

En uygun koşullarda elde edilmiş KOS ve glikozun üzerinde gelişmesi ölçülen, probiyotik bakteriler ve enterik bakteri *E. coli*'nin bilgileri kullanılarak "prebiyotik aktivite skoru" (PAS) hesaplanmıştır.

3.6 Analitik yöntemler

Sıvı örneklerdeki monosakkarit, oligosakkarit, asetik asit ve diğer şeker bozunma ürünlerinden furfural, HMF ve formik asit derişimleri HPLC kullanılarak ölçülmüştür. Bütün örnekler analiz öncesi 0.45 µm gözenek çaplı teflon (PTFE) membran filtreden geçirilmiş ve eğer gerekiyorsa kullanılan akışkan faz ile seyreltilmiştir.

3.6.1 Monosakkarit analizi

Otohidroliz ve enzimatik hidroliz örneklerinde oluşan monosakkaritler, yapısal karbonhidrat tayininde iki aşamalı asit hidrolizi sonrası açığa çıkan monosakkaritler ve toplam KOS tayini için yapılan tek aşamalı asit hidrolizi sonrası açığa çıkan monosakkaritler tayin edilmiştir. Monosakkaritlerin derişimleri HPLC - kırılma indisi (refractive index (RI)) detektör sistemi (Perkin Elmer, ABD) ile ölçülmüştür. Glikoz, ksiloz, galaktoz ve arabinoz derişimleri kurşun iyonik formu kolon olan Rezex RPM-Monosakkarit kolonu (Phenomenex, ABD) ile 80 °C 'de RI detektörde analiz edilmiştir. Akışkan faz olarak akış hızı 0,6 mL/dak olacak şekilde su kullanılmıştır. Örneklerdeki iyon yoğunluğu sebebiyle kolon öncesi "külden arındırma koruyucu kolonu" (Bio-rad, ABD) kullanılmıştır. Koruyucu kolondaki H⁺ ve CO₃⁻² formundaki kartuşlar örnekteki katyon ve anyonları tutarak, kromatogramlardaki taban hattı kaymalarını önlemiştir.

3.6.2 Oligosakkaritlerin polimerleşme derecesinin belirlenmesi

Oligosakkaritlerin polimerizasyon derecesi (2-6) aynı sistemde külden arındırma koruyucu kolonu ile Aminex HPX-42A kolonu (Bio-Rad, ABD) ile 80 °C 'de 0.6 mL/dak akış hızında suyun hareketli faz olarak kullanımıyla belirlenmiştir. Oligomerlerin analizinin iyileştirilmesi amacıyla sıvı örnekler ağırlıkça 1% sodyum hidroksit çözeltisinde 15 dak boyunca oda sıcaklığına bekletilmiş ve pH'sı nötrale edildikten sonra HPLC ile analiz edilmiştir. KOS tespiti için ksiloz, ksilobioz, ksilotrioz, ksilotetraoz, ksilopentaoz, ksilohekzaoz standartları (Megazyme, İrlanda) kullanılmıştır.

3.6.3 Asetik asit ve şeker bozunma ürünlerinin analizi

Asetik asit ve formik asit derişimleri yukarıda bahsedilen sistemde RI dedektör kullanılarak ölçülmüştür. Hareketli faz olarak 5 mM H₂SO₄ kullanılmış, Aminex HPX-87H (Bio-Rad, ABD) kolon 65 oC' de tutulmuş, hidrojen formundaki koruyucu kolon kullanılmıştır. Sıvı örneklerin şeker bozunma ürünleri analizi (HMF ve furfural) akışkan faz olarak 0,6 mL/dak hızda 5mM H₂SO₄ kullanılarak Aminex HPX-87H (Bio-Rad, ABD) kolonda hidrojen formundaki koruyucu kolon ile 65 oC' de diyot dizisi (diode array) (DAD) detektör içeren HPLC (Agilent Technologies, ABD) sisteminde gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Fındık atıklarının karakterizasyonu

KOS üretimi için uygun hammaddenin ksilan içeriği yüksek olmalıdır ve bu ksilanın uygulanacak işlem sonrasında lignoselülozik ağdan ayrılabilmedir. Ayrıca ayrılan ksilanın oligosakkaritlere hidroliz olması gerekir. Bu sebeplerle fındık atıklarının ksilan içeriği belirlenmiştir. Böylece hem uygun hammadde belirlenmiş hem de sonraki aşamalardaki ön işlemlerin ksilan ayırmadaki başarısının ölçülmesi sağlanmıştır.

Fındık atıklarındaki ana bileşenlerin lignin ve selüloz olduğu görülmektedir; bunları ksilan takip etmektedir (Tablo 4.1). FZ bunların dışında alkol ve suda çözünen maddelerce de zengindir (Tablo 4.1). FZ'deki kül ve protein miktarları da FK ve FBA'ya göre yüksektir. Özellikle yüksek çözünen madde ve protein miktarları FZ'nin değerli aktif bileşenler için iyi bir kaynak olabileceğini göstermektedir. FBA yüksek miktarda selüloz (%34,7) içermektedir (Tablo 4.1). Bu sebeple bu atığın biyo-temelli ürün üretiminde kullanılması mümkündür. FBA ön işlemlerden geçirilip uygun enzimlerle hidroliz edilirse açığa çıkacak glikoz fermantasyon yolu ile çeşitli ürünlere dönüştürülebilir. Özellikle biyo-etanol üretimi için uygun bir hammadde olabilir.

KOS üretimi için başlangıç maddesi olması sebebiyle atıklardaki ksilan bu proje için en önemli bileşenidir. Fındık atıkları arasında FK %18,7 ile en yüksek ksilan oranına sahiptir (Tablo 4.1). FK'da tespit edilen diğer hemiselülozik karbonhidratlar olan galaktan ve arabinanın miktarı ksilana göre oldukça düşüktür (Tablo 4.1). Asetil grubu miktarları göz önüne alındığında fındık atıklarındaki ksilanın yüksek oranda asetillenmiş olduğu görülmektedir. Asetillerin ksiloza oranı (mol/mol) 0,4-0,5 olarak ölçülmüştür. Bir başka deyişle; her iki ksilozdan birinin asetil grubu taşıdığı ortaya çıkmaktadır. Asetil grupları otohizoliz sırasında ksilandan ayrılarak asetik asit halinde toplanır ve polisakkaritin hidrolizi sırasında katalizör olarak görev yapar. FK ksilanın üronik asit grupları açısından da zengin

olduğu görülmektedir (Tablo 4.1). FBA ksilanı FK'dakine benzer özellikler taşımaktadır, ancak oranı görece düşüktür (%12,8) (Tablo 4.1). FZ daha da düşük ksilana (%5,8) sahiptir ve ayrıca içerdiği arabinan ve galaktanın ksilana oranlarının yüksek olmasıyla FK ve FBA'dan farklıdır.

Bu çalışmada kullanılan FK'nin selüloz ve hemiselüloz içeriği daha önce rapor edilenlere göre düşüktür, lignin içeriği benzerdir (Aydinli ve Caglar, 2012; Çepelioğullar ve Pütün, 2014; Demirbas, 2008). Çöpür vd. (2013), FZ'de bu çalışmadakine göre daha yüksek karbonhidrat ve lignin değerleri gözlemlenmiştir. Bahsedilen farkların sebebi farklı hammaddeler kullanılmış olması ya da ölçümde kullanılan metotların farklı olması olabilir. Literatürde FBA'nın içeriği hakkında veriye rastlanmamıştır.

Tablo 4.1. Fındık atıklarının kompozisyonu^a

| Bileşen | İçerik (g/100 g kuru madde) | | |
|----------------------------|-----------------------------|------------|------------|
| | FK | FZ | FBA |
| Selüloz | 18,7 ± 0,5 | 15,4 ± 1,5 | 34,7 ± 4,3 |
| Klason lignin | 46,4 ± 0,2 | 25,9 ± 0,7 | 25,4 ± 0,8 |
| Asitte çözünen lignin | 0,3 ± 0,0 | 0,3 ± 0,0 | 0,4 ± 0,0 |
| Ksilan | 18,7 ± 0,1 | 5,8 ± 0,2 | 12,8 ± 1,6 |
| Galaktan | 1,6 ± 0,3 | 2,6 ± 0,1 | 1,3 ± 0,5 |
| Arabinan | 0,3 ± 0,0 | 1,7 ± 0,2 | 1,0 ± 0,0 |
| Asetil grupları | 2,6 ± 0,3 | 1,2 ± 0,1 | 2,0 ± 0,1 |
| Asetil/Ksiloz ^b | 0,4 | 0,5 | 0,5 |
| Üronik asit | 5,3 ± 1,7 | 10,6 ± 2,4 | 9,4 ± 1,1 |
| Kül | 0,9 ± 0,1 | 5,0 ± 0,3 | 1,0 ± 0,0 |
| Protein | 2,8 ± 0,1 | 8,0 ± 0,2 | 4,5 ± 0,1 |
| Çözünen madde | 1,2 ± 0,3 | 24,6 ± 1,7 | 4,0 ± 0,3 |
| Toplam | 102,3 | 103,0 | 98,6 |

^aDeğerler üç ölçümün ortalamasıdır. ± standart sapma

^bMol oranı olarak verilmiştir.

4.2 Fındık atıklarının otohıdrolizi

Fındık atıklarının kompozisyonu incelendiğinde FK'nin en yüksek oranda ksilan içerdiği görülmekte, bu sebeple KOS elde etmek için en uygun hammadde olacağı düşünülmektedir. Ancak atıklardaki lignoselülozik ağ yapısının farklı olması nedeniyle kullanılan ön işlem yöntemine farklı cevaplar vermesi olasıdır. Bu durum dikkate alınarak üç fındık atığı da otohıdroliz işlemine tabi tutulmuştur. Atıklar 190 °C'de 15 dak boyunca otohıdroliz edilmiştir. Bu koşullardaki log R_o değeri 4,02 olarak hesaplanmıştır. İşlem sonunda otohıdroliz liköründeki KOS derişimi ve kalan katının miktarı ölçülerek işlemin etkinliği hesaplanmıştır.

İşlemden sonra çözünmeden kalan katının kuru ağırlığına bakıldığında, üç atık için de başlangıçtaki miktarın üçte birinden fazlasının (%36-39) çözüldüğü görülmektedir (Tablo 4.2). Katıların yapısal karbonhidrat analizi yapılarak her bir bileşen başlangıç maddesindeki miktarlarıyla karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2). Buna göre otohizroliz işleminden en çok etkilenen bileşenin hemiselülozlar olduğu anlaşılmaktadır. Hammaddede arabinan olmasına rağmen işlemden sonra tespit edilmemiştir. Galaktan kısmen, ksilan ise büyük ölçüde çözünerek katıdan ayrılmıştır. Örneğin hammaddede %18,7 ksilan varken, otohizroliz sonunda %6,5'e düşmüştür. Buna göre ksilanın %78'inin katıdan ayrıldığı sonucu çıkar. Otohizroliz işlemi asetil gruplarının katı maddeden ayrılmasını sağlamaktadır ancak bu grubun bir kısmının katıda kaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Otohizroliz sırasında hemiselülozlar çözünürken, selüloz ve ligninin işlemden etkilenmemesi ve dolayısıyla katıda kalması sebebiyle bu bileşenlerin katıdaki oranı artmıştır. Özellikle FBA'nın selüloz içeriği dikkat çekmektedir. Hammaddede %34,7 olan selüloz oranı, otohizroliz sonrasında %57,7'ye çıkmıştır (Tablo 4.2). Otohizroliz lignoselülozik ağ yapısını zayıflattığı için selülozun direncini azaltmış olabilir. Direncinin azalmasıyla selüloz enzimatik sakkarifikasyona uygun hale gelir ve glikoz kaynağı olarak kullanılabilir. Bu sebeplerle otohizrolize tabi tutulan FBA biyo temelli malzemelerin üretimi için uygun bir hammadde olarak kabul edilebilir.

Otohizroliz liköründeki karbonhidratların analizine göre likörün ana bileşeni KOS'tur. FK, FZ ve FBA'dan elde edilen likörlerde sırasıyla 8,2, 3,3 ve 7,3 g/L KOS tespit edilmiştir. FZ'de ksilan miktarının düşük olması sebebiyle KOS miktarı da düşük olmuştur. FK ve FBA'dan elde edilen KOS miktarları yakındır ancak, FK, FBA'ya göre az da olsa daha yüksek miktarda KOS sağlamıştır. Ayrıca FK'da ksilan miktarının daha fazla olması (Tablo 4.1), ortam koşullarının optimizasyonu sayesinde bu atığın daha da fazla KOS sağlama potansiyeline sahip olduğunu düşündürmüştür. Bunlar dikkate alınarak otohizroliz yöntemiyle KOS üretme çalışmalarına FK ile devam edilmiştir.

Tablo 4.2. Fındık atıklarının otohidroliiz katılarının içeriği

| Biyokütle | Otohidroliz koşulları | | | Kalan katı (g/100 g kuru madde) | Bileşen (g/100 g kuru işlenmiş katı) | | | | | |
|-----------|-----------------------|--------------|--------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------|-----------|-----------|--------------------|-----------|
| | Sıcaklık (°C) | Süre (dk) | log R ₀ | | Selüloz | Klason lignin | Ksilan | Galaktan | Asetil grupları | Kül |
| FZ | 190 | 15 | 4,02 | 60,9 ± 2,7 | 31,1 ± 1,4 | 53,1 ± 0,5 | 5,7 ± 0,1 | 2,7 ± 0,1 | 0,40 ± 0,05 | 2,8 ± 0,0 |
| FBA | 190 | 15 | 4,02 | 64,3 ± 2,8 | 57,7 ± 2,3 | 39,6 ± 1,2 | 5,3 ± 0,1 | 0,7 ± 0,2 | 0,79 ± 0,05 | 0,9 ± 0,3 |
| FK | 190 | 15 | 4,02 | 64,7 ± 0,2 | 29,3 ± 0,2 | 61,4 ± 0,6 | 6,5 ± 0,5 | 0,1 ± 0,0 | 0,66 ± 0,25 | 0,6 ± 0,0 |

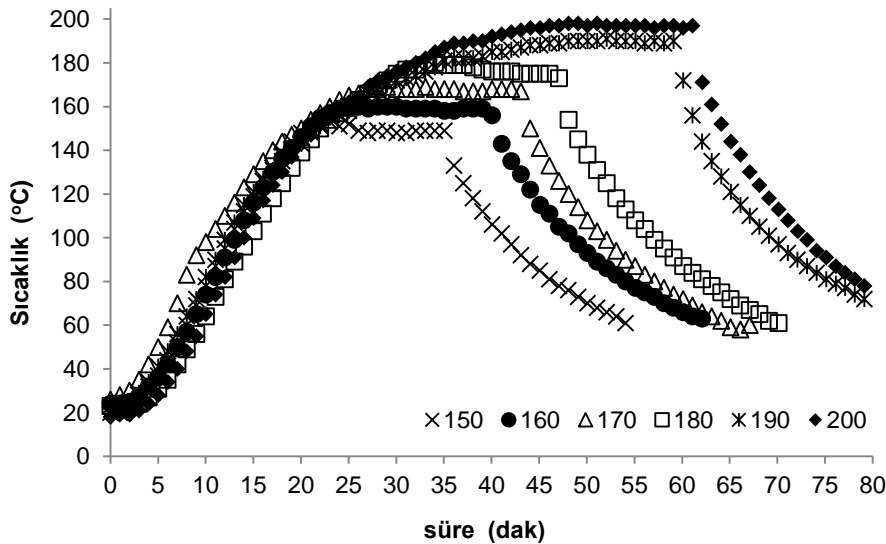
^a Değerler iki otohidroliiz uygulamasının ortalamasıdır. ± standart sapma.

4.3 Fındık kabuğunun otohıdrolizi

KOS üretimi için seçilen FK çeşitli sıcaklık ve süre koşullarında otohıdrolize tabi tutulmuştur. Bir yandan daha önce yapılmış olan çalışmalarda elde edilen sonuçlar dikkate alınırken diğeryandan da biyokütlelerin farklı yapılarından dolayı işleme farklı tepkiler vereceğiy düşünölmüş, bu sebeple geniş sıcaklık (150-200 °C) ve süre (0-45 dak) aralıkları seçilmiştir.

Şekil 4.1'de sıcaklığın ısıtma, izotermal dönem ve soğutma sırasında zamana bağılı değışimi görölebilir. 150 °C-160 °C'ye kadar sıcaklık çok hızlı artmıştır (5-6 °C/dak). Daha sonra ısıtma hızında belirgin bir yavaşlama olmuştur. Dolayısıyla hedef sıcaklığı yüksek olduğı durumlarda toplam uygulama süresi uzun olmuştur. Ortam sıcaklığı hedef değere ulaşana kadar FK yüksek sıcaklığa maruz kaldığından, bu süre içinde de otohıdroliz reaksiyonu olacaktır. Bu durum göz önüne alınarak uyguma şiddeti hesaplanırken sadece izotermal kısım değıl ısıtma ve soğutma da dâhil edilmiştir. Bunun için reaktör sıcaklığı 1 dak aralıklarla kaydedilmiş ve her dakika için $\exp[(T(t)-100)/14.75]$ değeri hesaplanmıştır. Bu değerin zamana karşı çizilen grafiğinin altında kalan alan R_o değeri olarak hesaplanmıştır.

İşlem sonrası kalan katının ve otohıdroliz likörünün ayrıntılı analizleri yapılarak KOS üretimi için en uygun koşulun bulunması sağlanmıştır. Bu yapılırken sadece likördeki KOS miktarı değıl, monosakkaritler ve yan ürünlerin miktarları da göz önüne alınmıştır. Ayrıca elde edilen KOS'un PD dağılımı da ölçölmüştür ki bu KOS 'un prebiyotik aktivitesi açısından önemli bir parametredir.



Şekil 4.1. Farklı hedef sıcaklıklardaki otohıdrolizler sırasında sıcaklığın zamanla değışimi.

4.3.1 Fındık kabuğu otohıdroliz katısının bileşimi

FK öncelikle 150-200 °C arasında 10 °C aralıkla 15 dak otohıdrolize uğratılmıştır. 150, 160 ve 170 °C'lerde işlemin sağladığı çözünmenin az olduğu gözlenmiştir. Buna dayanarak 180, 190 ve 200 °C'lerde başka sürelerde uygulamalar da yapılmıştır. Kullanılan tüm sıcaklık ve süre çiftleri ve hesaplanan log R_o değerleri Tablo 4.3'de görölmektedir.

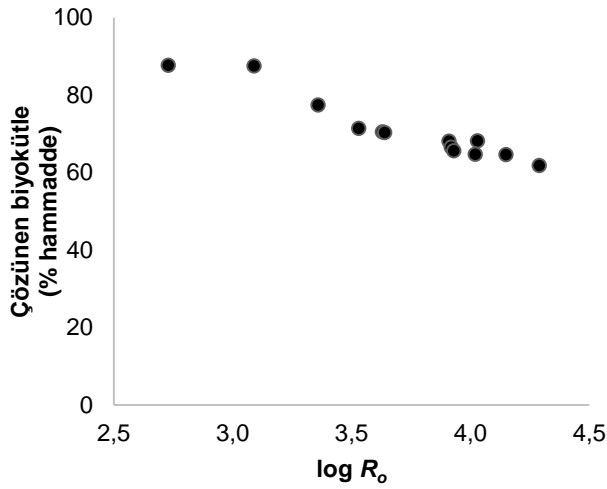
Otohıdroliz şiddeti (log R_o) arttıkça çözünmeden kalan katı miktarı azalmıştır (Tablo 4.3). Çözünen madde miktarının log R_o ile değişimi doğrusal bir eğilim göstermektedir (Şekil 4.2). 150 °C başlangıç maddesinin sadece %12,3'ü çözünürken 200 °C'de çözünme %38,2'e ulaşmıştır.

Hidrotermal uygulamalarda özellikle hemiselülozik karbonhidratlar etkilenmektedir (Aachary ve Prapulla, 2011; Carvalheiro vd., 2009, 2008). Dolayısıyla, bu çalışmada özellikle ksilan ve galaktan katıdan ayrılmıştır. Bu karbonhidratların bir kısmı çözünmeyerek katıda kalmış, katıdaki oranları log R_o ile azalmıştır (Şekil 4.3). Önceki çalışmalarda da benzer bir eğilim gözlemlenmiştir (Carvalheiro vd., 2009; Moniz vd., 2014, 2013). Ham FK'da az miktarda bulunan arabinan otohıdroliz katısında tespit edilmemiş olması, tüm arabinanın işlem sırasında çözündüğünü göstermektedir. Hemiselülozik karbonhidratların çözünmesi, geriye selüloz ve lignin açısından zengin katılar bırakmıştır (Tablo 4.3). Selüloz sıkı ve dirençli yapısı ve otohıdroliz koşullarına dayanıklılığı sayesinde çözünmeyerek katıda kalmıştır. Ham FK'da %18,7 olan selüloz oranı log R_o ile artan bir eğilim göstermiş %30 seviyesine kadar çıkmıştır (Tablo 4.2). Lignin de otohıdroliz koşullarına karşı direnç göstermiş ve ham FK'daki miktarının %85-90 kadarı işlemde sonra katıda kalmıştır (Tablo 4.2). KOS üretim süreci biyo-rafineri yaklaşımıyla ele alınırsa, yani hammaddenin mümkün olan tüm bileşenleri değerlendirilirse, katıda kalan selüloz ve lignin değerli bazı biyo-temelli ürünler için kullanılabilir.

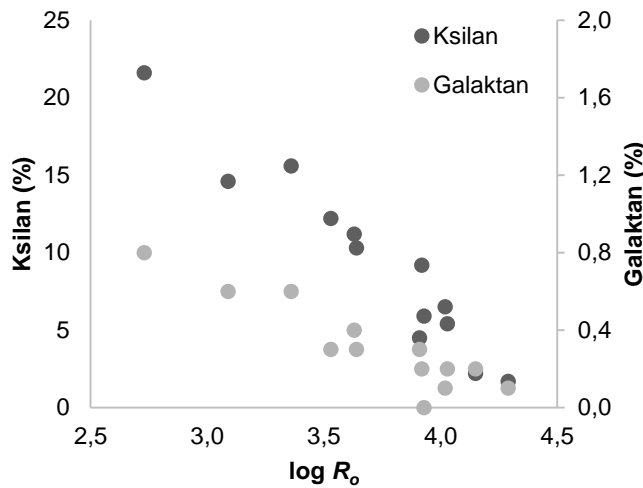
Tablo 4.3. Fındık kabuğu otohidroliz katılarının içeriği

| Otohidroliz koşulları | | | Bileşen (g/100 g kuru işlenmiş kat) | | | | | | | |
|-----------------------|-----------|--------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------|---------------|-----------|-------------|-----------------|-----|
| Sıcaklık (°C) | Süre (dk) | log R _o | Kalan katı | | Seiülöz | Klason lignin | Ksilan | Galaktan | Asetil grupları | Kül |
| | | | (g/100 g kuru madde) | (g/100 g kuru işlenmiş kat) | | | | | | |
| 150 | 15 | 2,73 | 87,7 ± 0,7 | 24,2 ± 0,9 | 46,8 ± 0,1 | 21,6 ± 0,5 | 0,8 ± 0,1 | 4,23 ± 0,38 | 0,8 ± 0,0 | |
| 160 | 15 | 3,09 | 87,5 ± 1,6 | 22,5 ± 1,4 | 52,1 ± 0,3 | 14,6 ± 2,6 | 0,6 ± 0,1 | 3,57 ± 0,35 | 0,8 ± 0,0 | |
| 170 | 15 | 3,36 | 77,4 ± 0,1 | 25,0 ± 0,6 | 50,8 ± 2,6 | 15,6 ± 1,1 | 0,6 ± 0,0 | 2,58 ± 0,20 | 0,7 ± 0,0 | |
| 180 | 5 | 3,53 | 71,4 ± 0,7 | 26,8 ± 1,4 | 55,4 ± 1,3 | 12,2 ± 0,7 | 0,3 ± 0,0 | 2,14 ± 0,18 | 0,7 ± 0,0 | |
| 180 | 15 | 3,63 | 70,5 ± 0,5 | 27,2 ± 1,1 | 54,9 ± 1,5 | 11,2 ± 0,7 | 0,4 ± 0,1 | 1,64 ± 0,37 | 0,6 ± 0,0 | |
| 180 | 30 | 3,91 | 68,1 ± 2,6 | 27,8 ± 0,9 | 58,7 ± 0,3 | 4,5 ± 0,5 | 0,3 ± 0,0 | 0,95 ± 0,01 | 0,7 ± 0,0 | |
| 180 | 45 | 4,03 | 68,2 ± 1,8 | 28,4 ± 1,3 | 62,7 ± 2,8 | 5,4 ± 0,2 | 0,2 ± 0,0 | 0,90 ± 0,11 | 0,6 ± 0,0 | |
| 190 | 0 | 3,64 | 70,3 ± 1,4 | 22,4 ± 2,5 | 61,3 ± 1,7 | 10,3 ± 3,0 | 0,3 ± 0,0 | 1,09 ± 0,14 | 0,5 ± 0,0 | |
| 190 | 5 | 3,92 | 66,5 ± 1,3 | 27,9 ± 2,3 | 58,7 ± 0,9 | 9,2 ± 0,2 | 0,2 ± 0,0 | 1,21 ± 0,09 | 0,6 ± 0,0 | |
| 190 | 15 | 4,02 | 64,7 ± 0,2 | 29,3 ± 0,2 | 61,4 ± 0,6 | 6,5 ± 0,5 | 0,1 ± 0,0 | 0,66 ± 0,25 | 0,6 ± 0,0 | |
| 190 | 30 | 4,15 | 64,6 ± 0,3 | 30,4 ± 1,1 | 63,1 ± 1,5 | 2,2 ± 0,2 | 0,2 ± 0,0 | 0,57 ± 0,02 | 0,7 ± 0,1 | |
| 200 | 0 | 3,93 | 65,6 ± 1,3 | 30,4 ± 0,4 | 59,4 ± 0,7 | 5,9 ± 0,9 | 0,0 ± 0,0 | 0,84 ± 0,14 | 0,7 ± 0,0 | |
| 200 | 15 | 4,29 | 61,8 ± 0,6 | 28,3 ± 1,3 | 67,9 ± 0,6 | 1,7 ± 0,1 | 0,1 ± 0,0 | 0,55 ± 0,08 | 0,6 ± 0,0 | |

^a Değerler iki otohidroliz uygulamasının ortalamasıdır. ± standart sapma.



Şekil 4.2. Uygulama şiddetinin FK çözünürlüğüne etkisi.



Şekil 4.3. Uygulama şiddetinin katının ksilan ve galaktan içeriğine etkisi.

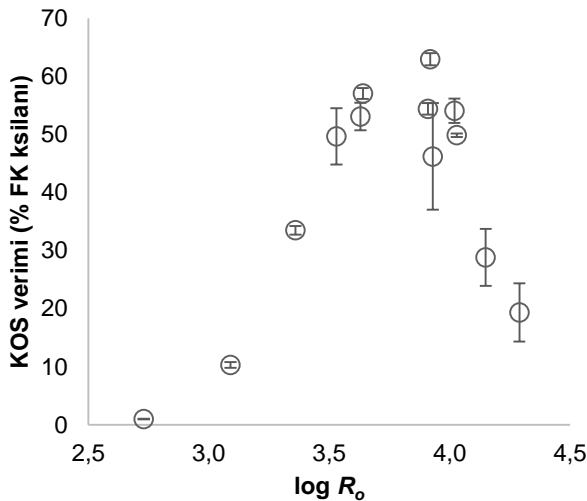
4.3.2 FK otohıdroliz likörünün bileşimi

Lignoselülozik biyokütlenin otohıdrolizinden sonra elde edilen sıvı kısımda (otohıdroliz likörü) monomer ve oligomer yapıda karbonhidratlar; asetik asit, formik asit, furfural ve HMF gibi karbonhidrat bozunma ürünleri; fenolik maddeler ve diğer çözünen maddeler bulunur (Carvalho vd., 2004). Bu çalışmada FK otohıdroliz liköründe bulunan oligosakkaritler, monosakkaritler ve bozunma ürünlerinin miktarları ölçülmüştür.

KOS veriminin log R_o ile değişimi parabolik bir eğilim takip etmiştir (Şekil 4.4). Görece düşük sıcaklık değerleri olan 150, 160 ve 170 °C'de 15 dak süreli otohıdrolizlerde uygulama şiddeti arttıkça KOS verimi artmıştır. 150 °C'de başlangıçtaki ksilanın sadece %1'i kadar KOS elde

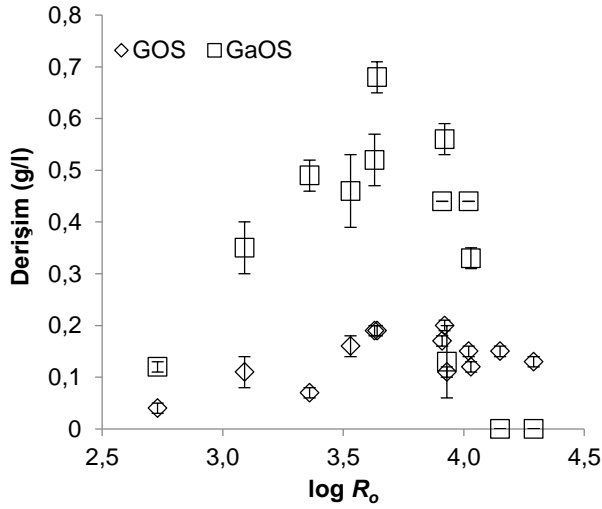
edilirken 170 °C'de verim %33'e çıkmıştır. 180, 190 ve 200 °C'de gerçekleştirilen otohizolizlerde verim genelde yüksek olmuştur. $\log R_o$ 3,53 ile 4,03 arasında ksılanın yarısından fazlasının KOS olarak likörde toplanması mümkün olmuştur. Artan $\log R_o$ sırasıyla şu sıcaklık-süre çiftlerinde KOS verimi yüksektir (°C-dak): 180-5; 180-15; 190-0; 180-30; 190-5; 200-0; 190-15; 180-45. En yüksek verim 190 °C sıcaklıkta 5 dak süreyle uygulanan otohizolizde elde edilmiştir. Bu koşulda likördeki KOS derişimi 10,1 g/L olurken, verim %63 olarak hesaplanmıştır. $\log R_o$ 4,03'den 4,15'e çıkarıldığında %50'den %29'a ani bir düşüş göstermiştir. $\log R_o$ daha da yükseltilecek 4,29'a çıkarıldığında verim daha da düşerek %19 olmuştur.

$\log R_o$ 3,53'den düşük uygulama şiddetlerinde KOS miktarının düşük olması, uygulamanın FK'daki ksılanın çözünmesindeki yetersizliği ile açıklanabilir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.4). Ksılan düşük verimle katıdan özütlenmiş dolayısıyla likörde toplanan KOS verimi de düşük olmuştur. Öte yandan yüksek $\log R_o$ değerlerindeki (4,15 ve 4,29) düşük KOS verimi aynı sebepten olamaz, çünkü bu uygulama şiddetlerinde katıda kalan ksılan miktarı düşüktür, bir başka deyişle çözünen ksılan miktarı yüksektir. Ancak bu koşullarda likördeki yan ürünlerin (ksiloz ve bozunma ürünleri) derişimleri de yüksek olmuştur. Bu sonuç daha önce ksilandan KOS üretimi için önerilmiş tepkime mekanizmasına uygundur. Buna göre likörde toplanan KOS önce ksiloza yıkılır, bu da şeker bozunma ürünlerine çevrilir (Garrote ve Parajó, 2002; Gullón vd., 2009). Bu çalışmadaki yüksek $\log R_o$ değerlerinde KOS verimi düşük olması bu mekanizma ile açıklanabilir.



Şekil 4.4. Uygulama şiddetinin KOS verimine etkisi.

Otohidroliz liköründe KOS'un yanı sıra galaktooligosakkarit (GaOS) ve glukooligosakkarite (GOS) de rastlanmıştır. Bunların derişimleri KOS'a göre oldukça azdır (Şekil 4.5). GaOS derişimi KOS'ununki ile benzer bir eğilim göstermiştir. Orta uygulama şiddetlerinde 0,7 g/L civarına çıkmış, ardından keskin şekilde azalmıştır. Yüksek log R_o değerlerinde likörde ölçülebilecek seviyede GaOS'e rastlanmamıştır. GOS değerleri görece daha azdır; log R_o 3,09'dan sonra 0,11-0,22 g/L arasında olmuştur.



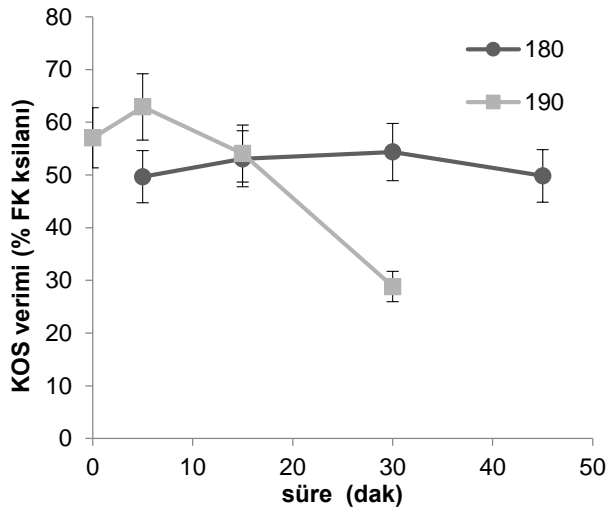
Şekil 4.5. Uygulama şiddetinin likördeki GaOS ve GOS derişimlerine etkisi.

Ham FK'daki ksilan gibi otohidroliz liköründeki KOS da kısmen asetilenmiş durumdadır. KOS veriminin yüksek olduğu koşullarda KOS'daki asetil/ksiloz oranı 0,25-0,35 arasında ölçülmüştür. Literatürdeki raporlarda da yapısında asetil içeren lignoselülozik biyokütleden otohidroliz yolu ile elde edilmiş olan KOS'un asetil grupları taşıdığı bildirilmiştir (Garrote vd., 1999; Ho vd., 2014; Nabarlatz vd., 2005; Vázquez vd., 2006; Xiao vd., 2013). Öte yandan, ksilanın alkali ile özütlenip enzimatik olarak KOS'a hidroliz edildiği yöntemde KOS'da asetile rastlanmaz. Çünkü alkali ortamda asetil grupları sabunlaşma tepkimesi sonucu ksilandan ayrılır (Nabarlatz vd., 2005). Asetillenme derecesi KOS'un çözünürlüğü ve prebiyotik aktivitesi üzerinde de etkilidir. İn vitro koşullarda fekal inokulanın asetilenmiş KOS ile yan grup taşımayan KOS'u farklı şekilde fermente ettiğini gösterilmiştir (Kabel vd., 2002). Çalışmada hem fermantasyon hızı hem de kısa zincirli yağ asitleri ve laktat üretiminin farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Şekil 4.4'de görüldüğü üzere şiddet faktörü sıcaklık ve zamanın birleşik etkisini nicel olarak ifade etmekte (kantifikasyon) başarılı olmuştur. KOS verimi değişen log R_o değerleriyle belirli bir eğilim göstermiştir. Aynı zamanda yakın log R_o değerlerine denk gelen farklı sıcaklık-süre

çiftleri yakın KOS verimleri sağlamışlardır. Örneğin 180 °C-15 dak ($\log R_o = 3,63$) ve 190 °C-0 dak ($\log R_o = 3,64$) koşullarında elde edilen KOS verimler çok yakındır. Benzer şekilde 180 °C-45 dak ($\log R_o = 4,03$) ve 190 °C-15 dak ($\log R_o = 4,02$) koşullarında da KOS verimleri benzerdir. Şiddet faktörü kavramı başka çalışmalarda da sıcaklık ve sürenin birleştirmek için kullanılmıştır. O çalışmalarda yüksek KOS üretimi sağlayan $\log R_o$ değerleri bu çalışmadakine benzer olmuştur. Mısır sapından izotermal olmayan otohüroliz ile KOS üretiminde en yüksek verim $\log R_o$ 3,60 ile 3,75 arasında elde edilmiş, bu değerlerin altında ve üstünde verim sert biçimde azalmıştır (Moniz vd., 2013). Aynı grup pirinç sapı ile de benzer bir eğilim görmüşler ve en yüksek verimi $\log R_o$ 3,59 noktasında elde etmişlerdir (Moniz vd., 2014). Carvalheiro vd. (2009) buğday sapının izotermal olmayan otohürolizi için KOS veriminin 215 °C'de ($\log R_o = 3,96$) en yüksek olduğunu rapor etmiştir. *Miscanthus x giganteus*'dan KOS elde etmek için en uygun $\log R_o$ 3,5 civarı olarak tespit edilirken, bu değer bu çalışmaya göre daha düşük sıcaklıkta (160 °C), ancak daha uzun uygulama süresinde (60 dak) elde edilmiştir (Ligero vd., 2011).

KOS verimi üzerinde sıcaklık ve sürenin birleşik etkisinin yanı sıra bu iki parametrenin etkisini ayrı ayrı incelemek de mümkündür. Örneğin, uygulama süresinin etkisi 180 °C'de ve 190 °C'de farklı olmuştur (Şekil 4.6). 180 °C'de süre 5 ile 45 dak arasında ($3,53 \leq \log R_o \leq 4,03$) değiştirilmiş ve tüm değerlerde yakın KOS verimi elde edilmiştir. 190 °C'de ise 0 dak (izotermal olmayan koşul), 5 dak ve 15 dak uygulama sürelerinde yüksek verim elde edilirken, süre 30 dak'ya çıkarıldığında ($\log R_o = 4,15$) verim belirgin şekilde düşmüştür. Farklı sıcaklarda 15 dak süre ile uygulanan otohürolizlere bakıldığında 150 ile 180 °C arasında KOS veriminin sıcaklıkla arttığı, ancak 190 °C'ye çıkıldığında daha fazla artış olmadığı görülmüştür. 200 °C'de ise KOS verimi oldukça düşüktür. Bütün bu gözlemler uygulama şiddetinin etkisiyle uyumlu olmuştur; verim için en uygun $\log R_o$ değerleri ulaşıldıktan sonra sıcaklığı veya süreyi artırmak KOS verimi üzerinde olumsuz bir etki yapmaktadır. Bu bulgular önceki çalışmaları desteklemektedir. Bambu (Xiao vd., 2013), biracılık atığı (Carvalheiro vd., 2004), ve zeytin budama atığı (Cara vd., 2012) otohürolizi ile KOS üretiminde sıcaklık arttıkça en uygun uygulama süresinin daha düşük değerlerde olduğu gösterilmiştir. *M. x giganteus*'dan KOS üretiminde süresi 5 ya da 15 dak iken en uygun sıcaklığın 190 °C olduğu bulunmuş, daha uzun süre kullanıldığında ise en uygun sıcaklık daha düşük olmuştur (Ligero vd., 2011).

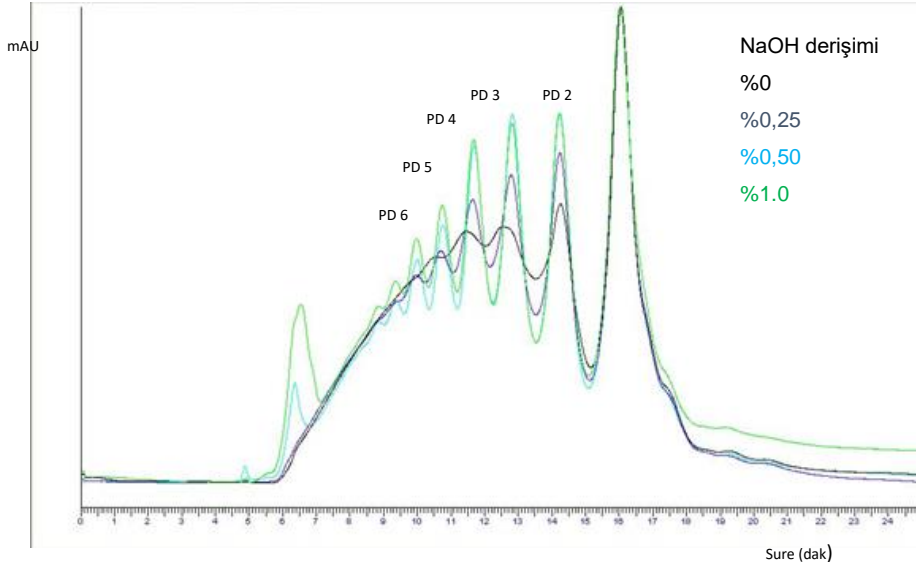


Şekil 4.6. 180 °C ve 190 °C'deki otohizolizlerde uygulama süresinin KOS verimine etkisi.

Bu çalışmada elde edilen KOS verimleri, daha önceki çalışmalarda lignoselülozik atıklardan KOS üretimi için belirtilmiş değerlerle uyumludur. Bazı atıklar ve elde edilen KOS verimleri (% hammaddedeki ksilan) şöyledir: Mısır koçanı (%59,4), badem kabuğu (%61,2), zeytin çekirdeği (%53,5), buğday sapı (%41,2), arpa sapı (%47,1) ve pirinç kavuzu (%42,8) (Nabarlatz vd., 2007); palmye dalları (%63) (Ho vd., 2014); biracılık atığı (%61) (Carvalho vd., 2004); zeytin budama atığı (%55) (Cara vd., 2012).

Oligosakkaritlerin polimerleşme dereceleri (PD) insan sindirim sistemindeki fermentasyonları açısından önemlidir. Örneğin, daha düşük zincir uzunluğundaki KOS, sindirim sistemindeki bakteriler tarafından daha hızlı tüketilmektedir (Gullón vd., 2011; Moura vd., 2008). PD değeri iki ila altı arasındaki KOS "düşük polimerleşme dereceli ksilooligosakkarit (düşük PD KOS)" olarak kabul edilmektedir (Sun vd., 2015; Xiao vd., 2013). Çalışmamızda toplam FK'dan elde edilen toplam KOS içindeki oligomerlerden PD 2 ile 6 arasında olanların derişimleri ayrı ayrı belirlenmiştir. PD 6 üzerinde ticari standart bulunmadığı için daha büyük oligomerleri kantifiye etmek mümkün olmamıştır. HPLC'de Aminex 42A (Biorad, ABD) kolonu ile otohizoliz likörleri doğrudan analiz edildiğinde oligomerlerin yeterince ayrılmadığı görülmüştür (Şekil 4.7, siyah kromatogram). Bu şekilde oligomer derişimlerini hesaplamak mümkün olmamıştır. Bu sebeple, numuneler alkali ile muamele edilerek sabunlaşma sonucu asetil gruplarının ayrılması sağlanmıştır. NaOH %0,25 ile %4,0 arası derişimlerde test edilmiştir. Belirlenen derişimlerdeki NaOH varlığında sıvı numuneler 15 dak oda sıcaklığında bekletildikten sonra HCl kullanılarak pH nötrleştirilmiştir. Santrifügasyon ve filtrasyon sonrası HPLC analizleri başlatılmıştır. %0,25 ve %0,50 NaOH ile kromatogramlarda belirgin bir iyileşme sağlanmıştır (Şekil 4.7). Daha yüksek NaOH derişimlerinde ise ilave bir iyileşme

görülmemiştir. Çalışmamızın bundan sonraki bölümlerinde yapılan tüm KOS analizlerinde numuneler %0,50 NaOH ile muamele edildikten sonra HPLC analizleri yapılmıştır.



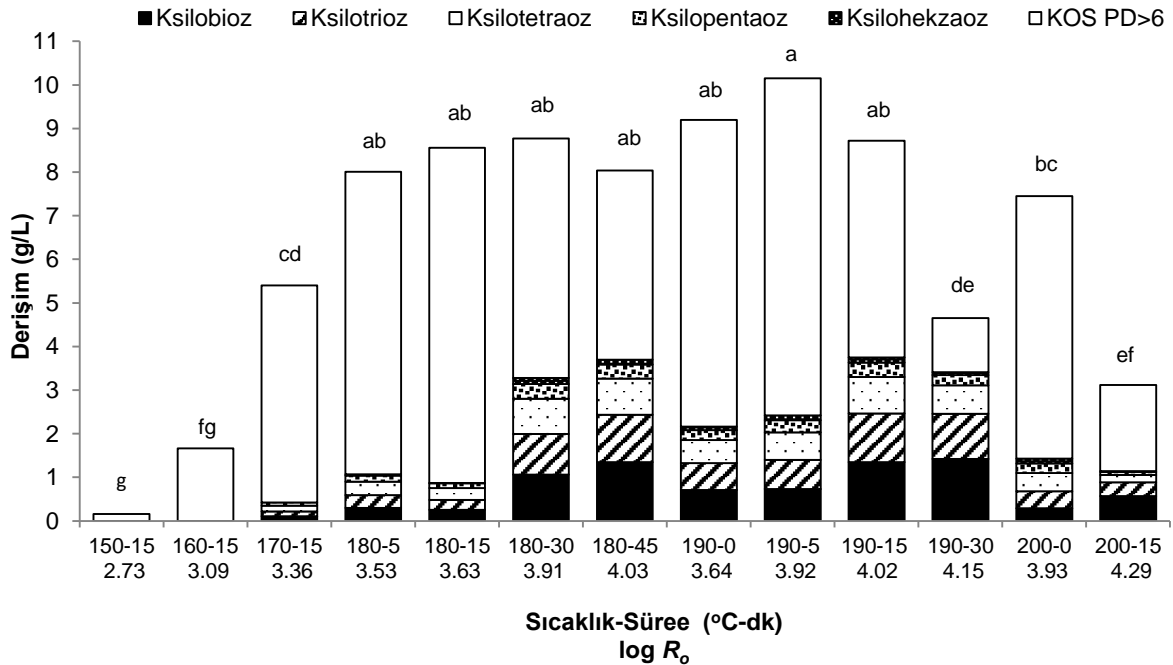
Şekil 4.7. HPLC’de KOS analizi öncesi yapılan alkali uygulamasında kullanılan NaOH derişiminin örnek otohizliz likörünün kromatogramı üzerindeki etkisi. Piklerin hangi polimerleşme derecelerine ait olduğu üzerlerinde gösterilmiştir (PD 2 - PD 6). Derişimler ve o derişime ait kromatogramlar aynı renk ile gösterilmiştir.

FK’dan elde edilen düşük PD KOS büyük oranda ksilobioz, ksilotrioz ve ksilotetraozdan oluşmuştur (Şekil 4.8). 150 ve 160 °C’lerde düşük PD KOS tespit edilmemiştir. Daha yüksek derecelerde (200 °C hariç) toplam düşük PD KOS (PD 2-6 arası) derişimi uygulama şiddeti arttıkça doğrusala yakın bir eğilimle artmıştır (Şekil 4.9 A). Öte yandan düşük PD KOS’un toplam KOS içindeki oranının artışı üstel bir eğilim göstermiştir (Şekil 4.9 B). 200 °C’de ise bunmaların hem toplam derişim hem de toplam KOS içinde oranı beklenenden düşük olmuştur ve eğilimden sapmıştır. Düşük PD KOS’ların her birinin derişimine ayrı ayrı bakıldığında belli bir log R_o değerine kadar doğrusal arttığını daha sonra ise azaldığı görülmektedir (Şekil 4.10). Ksilobiozda doğrusallıktan sapma log R_o 4,15’de, ksilotrioz ve ksilotetraoz log R_o 4,03, ksilopentaoz ve ksiloheksaozda için log R_o 3,9’den itibaren başlamıştır.

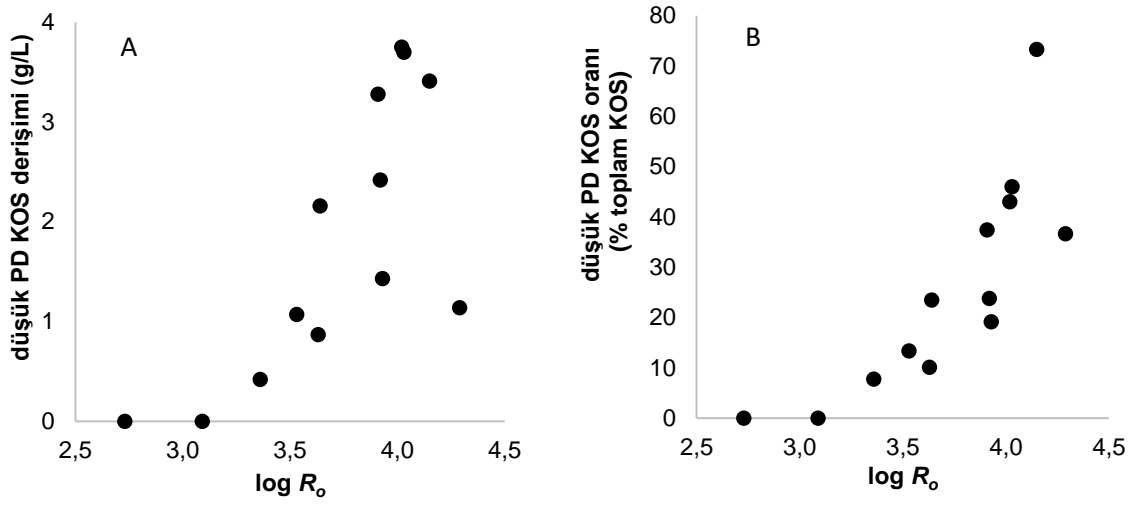
En yüksek düşük PD KOS derişimleri (3,70-3,75 g/L) 180 °C’de 45 dak’da (log R_o =4,03) ve 190 °C’de 15 dak’da (log R_o = 4,02) gerçekleştirilen otohizlizde elde edilmiştir. Bu koşullarda toplam KOS’un yaklaşık %45’i düşük PD KOS olmuştur. 190 °C’de 30 dak’da da (log R_o = 4,15) yüksek miktarda düşük PD KOS (3,41 g/L) elde edilmiştir. Üstelik bu koşulda yüksek PD KOS (PD>6) derişimi de oldukça azdır. Böylece, bu koşulda düşük PD KOS’un toplam KOS içindeki oranı en yüksek seviyeye (%73) çıkmıştır. Ksilobioz, ksilotrioz ve

ksilotetraozun oranları sırasıyla, %30, %22 ve %14 olmuştur. Diğer tüm koşullarda, en büyük fraksiyon yüksek PD KOS'lar olmuştur. Özellikle log R_o 3,64'ün altında olduğunda bu durum daha belirgindir. 190 °C'de 0 ve 5 dak süreyle gerçekleştirilen otohizolizlerde toplam KOS derişimi en üst seviyede olmasına rağmen, bu koşullardaki düşük PD KOS derişimleri (sırasıyla 2,16 g/L ve 2,42 g/L), dolayısıyla da oranları görece azdır.

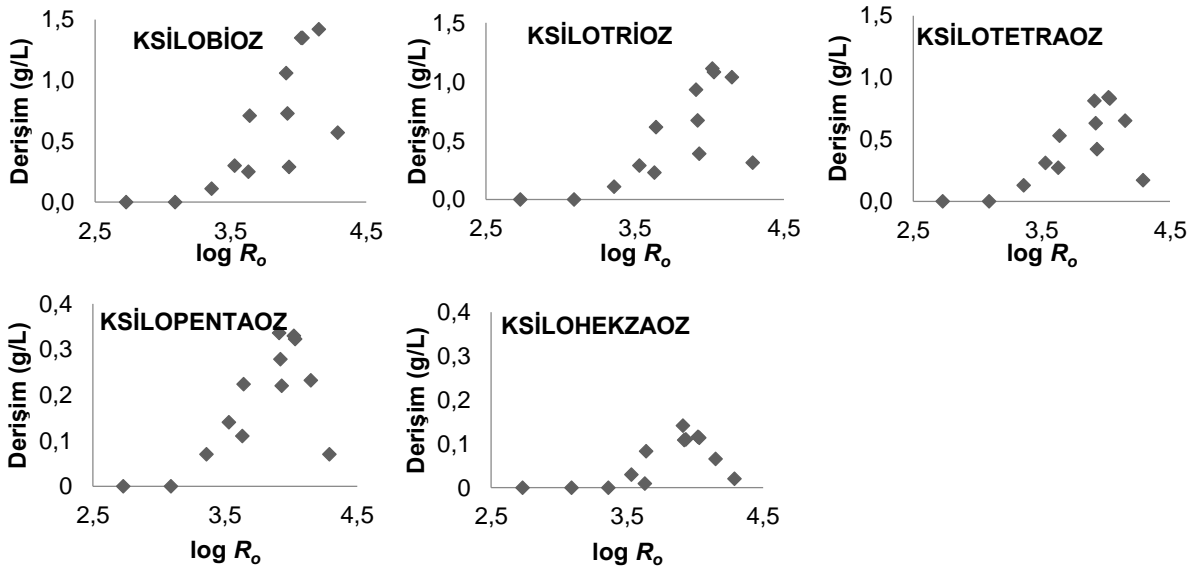
180, 190 ve 200 °C'de süre arttıkça düşük PD KOS yüzdesi artmıştır. 180 °C'de tüm uygulama sürelerinde yakın miktarda toplam KOS elde edilmesine rağmen, 5 ve 15 dak'lık otohizolizlerde elde edilen düşük PD KOS oranı 30 ve 45 dak'lıkda olanlardan oldukça düşüktür (Şekil 4.8). Bu durum 190 °C'de bu kadar belirgin değildir. Carvalho vd. (2004) biracılık atığının otohizolizi için test ettikleri her sıcaklıkta, KOS'un PD'nin artan uygulama süresi ile azaldığını görürken, toplam KOS derişiminin orta seviye uygulama sürelerinde elde etmişlerdir. Karışık baharatlar ve ay çekirdeği kabuklarının otohizolizinde süre arttıkça düşük PD KOS'un oranı çoğunlukla artmış, bunun paralelinde yüksek moleküler ağırlığındaki KOS azalmıştır (Gullon vd., 2009). Tatlı sorgum gövdesi (Sun et.al. 2015) ve bambu sapı (Xiao vd., 2013) otohizoliz için yüksek sıcaklıklarda düşük PD KOS üretiminin arttığı rapor edilmiştir.



Şekil 4.8. Farklı sıcaklık-süre çiftlerinde gerçekleşen otohizolizlerde elde edilen KOS'un PD dağılımı. Farklı harfler istatistiksel olarak farkı ifade eder. ($p < 0,05$, tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi uygulanmıştır.)



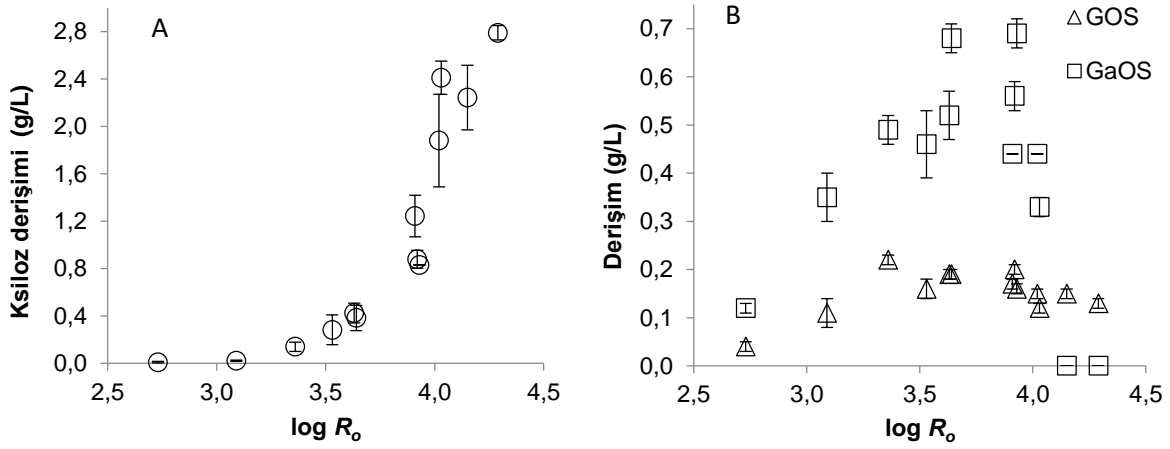
Şekil 4.9. Şiddet faktörünün düşük PD KOS üretimine etkisi. A: Likördeki düşük PD KOS derişimi. B: Düşük PD KOS'un toplam KOS'a oranı.



Şekil 4.10. Şiddet faktörünün düşük PD KOS'larının her birinin derişimine etkisi

FK otohizliz liköründeki ksiloz derişimi $\log R_0$ ile üstel olarak artmıştır (Şekil 4.11). KOS veriminin benzer değerlerde olduğu orta uygulama şiddetlerinde ($3,53 \leq \log R_0 \leq 4,03$), ksiloz şiddetten etkilenmiştir. $\log R_0$ 3,64'ün üzerinde olduğunda ksiloz derişiminde keskin bir artış gözlenmiştir. KOS derişiminin en yüksek olduğu 190 °C'de 5 dak süresiyle ($\log R_0 = 3,92$) yapılan otohizlizde ksiloz derişimi 0,88 g/L olmuştur. FK'da bulunan ksilanın %4,1'ine denk gelen bu değer çeltik sapı (Moniz vd., 2014), buğday sapı (Carvalho vd., 2009), mısır

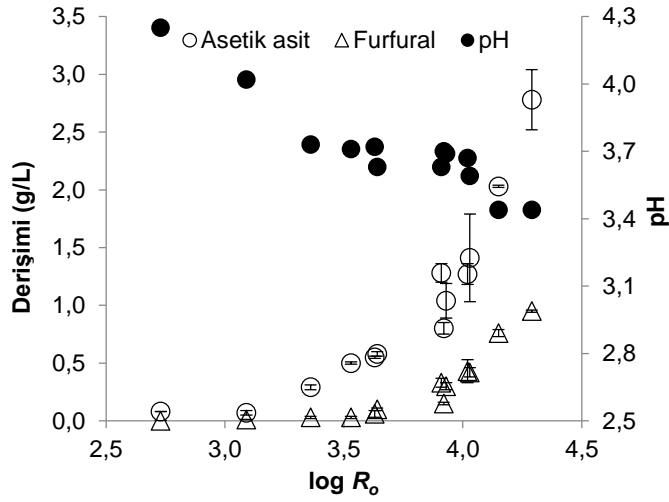
sapı (Moniz vd., 2013), palmye dalı (Ho vd., 2014) ve biracılık atığı (Carvalho vd., 2004) otohırolizi için rapor edilenlerden daha azdır. Öte yandan tatlı sorgum gövdesi (Sun vd., 2015), bambu (Xiao vd., 2013) ve zeytin budama atıkları (Cara vd., 2012) için rapor edilenlere yakındır. 190 °C'de süre 30 dak'ya uzatılarak düşük PD KOS derişimi en üst seviyeye çıkarılmak istendiğinde ksiloz derişimi 2,24 g/L'ye (FK ksilanının %10'u) çıkmıştır. Diğer monosakkaritler galaktoz ve arabinozun miktarı görece düşüktür (Şekil 4.11). Bunların derişimleri, ksilozunkinden farklı olarak, log R_o 3,9-4,0'ün üzerinde keskince azalmıştır. Galaktoz ve arabinozun, ksiloza göre daha düşük log R_o değerlerinde bozulmaya başlamış olması nedeniyle, bu iki monosakkaritin yüksek uygulama şiddetine daha duyarlı olduğu sonucuna varılabilir. Öte yandan, ksiloz da düşük log R_o değerlerinde bozuluyor olsa da bunun paralelinde KOS da hidroliz olarak ksiloza dönüşüyor olabilir (Garrote ve Parajó, 2002; Gullón vd., 2009). Bu durum ksiloz derişimde azalma görülmesini engellemiş olabilir. Otohıroliz likörlerinde glikoza rastlanmamıştır. Glikoz olmaması ve GOS derişiminin çok düşük olması otohıroliz uygulamasının selüloz üzerinde etkili olmadığını göstermektedir (Ho vd., 2014; Parajó vd., 2004).



Şekil 4.11. Uygulama şiddetinin otohıroliz liköründeki monosakkarit derişimlerine etkisi. A: Ksiloz derişimi; B: Glikooligosakkarit (GOS) ve galaktooligosakkarit (GaOS).

Otohıroliz koşullarında, asetil gruplarını ksilana bağlayan ester bağları hidroliz olur ve tepkime ortamında asetik asit birikir. Asetik asit otohıroliz için katalizör görevi yaparak ksilanın KOS'a hidrolizini sağlar. Öte yandan, mikroorganizmalar için toksik etki göstermesi sebebiyle prebiyotik bir üründe bulunması olumsuz sonuç doğurabilir. FK otohırolizinde asetik asit yan ürünlerin başında gelmiştir (Şekil 4.12). Yüksek KOS sağlayan koşullarda ($3,53 \leq \log R_o \leq 4,03$) asetik asit derişimi 0,5 ile 1,5 g/L arasında olurken log R_o 4,29'da 2,78

g/L'ye kadar çıkmıştır. Bu sonuçlar badem kabuğu (Nabarlatz vd., 2005), biracılık atığı (Carvalho vd., 2004), bambu (Xiao vd., 2013) ve tatlı sorgum sapı (Sun vd., 2015) otohırolizi sırasında elde edilen değerlere yakındır. FK su karışımının başlangıç pH'sı 4,9 iken, asetik asit oluşması ile otohıroliz sonunda daha düşük değerlerde olmuştur (Şekil 4.12). $\log R_o$ arttıkça daha düşük likör pH değerleri görülmüştür. FK otohıroliz liköründeki bir diğer yan ürün ksiloz ve arabinoz gibi pentozların bozulma ürünü olan furfuraldır (Nabarlatz vd., 2005). Furfural derişimi görece az olmuştur ve ksiloz ve asetik asit gibi üstel bir eğilimle artmıştır. Hidrotermal uygulamalarda açığa çıkan diğer yan ürünler HMF ve formik asittir (Jönsson ve Martın, 2016). Bu çalışmada HMF seviyesi çok düşük (<0,1 g/L) olmuştur ve formik asit ise tespit edilmemiştir.



Şekil 4.12. Uygulama şiddetinin bozunma ürünleri derişimlerine ve likör pH'sına etkisi.

4.4 Fındık atıklarının alkali kullanılarak özütlenmesi

Lignoselülozik biyokütleden prebiyotik potansiyel taşıyan hemiselülozik oligosakkaritlerin üretimi için bir diğer yol enzimatik hidrolizdir. Hidrolitik enzimler çoğunlukla biyokütle üzerine doğrudan etki gösteremezler. Lignoselülozik ağın sağlam yapısı enzimlerin substratına ulaşarak tepkimesi katalizlemesini engeller. Bunun için hemiselülozun önce lignoselülozik ağdan ayrılması, sonra enzim ile muamele edilerek hidrolizinin sağlanması gerekir.

Ksılanın lignoselülozik biyokütleden izole edilmesi için genellikle alkali çözelti ile muamele kullanılmaktadır. Alkali uygulamasında ksılan çözünerek polimer halde sıvı kısımda toplanır. Selüloz ve lignin içeren katı ayrıldıktan sonra sıvının pH'sı nötrale edilir. Çözeltiye eklenen alkol sayesinde polimer haldeki ksılan çökelti oluşturur. Bu çökelti ayrılır, yıkanır ve tekrar su

veya tampon içinde çözülür. Daha sonra ksilanaz enzimi kullanılarak ksilanın hidroliz sağlanır ve KOS elde edilir.

Fındık atıkları arasında en yüksek ksilan FK'da olduğu için alkali özütleme öncelikle bu atık üzerine uygulanmıştır. Ksilanı ayırmak için önce %5'lik NaOH çözeltisi denenmiştir. FK bu çözelti ile 1:10 oranında karıştırılıp oda sıcaklığında 16 sa bekletilmiştir. HCl kullanılarak çözeltinin pH değeri 5-7 civarına indirildikten sonra soğuk etanol eklenerek çözünmüş polimerlerin çökmesi sağlanmıştır. Çökelti santrifüj yardımı ile sıvıdan ayrılmış ve 60 °C'deki fırında bir gece bekletilerek kurutulmuştur. Kuru katı tartılarak çöken madde miktarı hesaplanmış ve başlangıç maddesinin %6,09 kadarının kazanıldığı görülmüştür. FK'da %18,7 ksilan olduğu göz önüne alındığında çöken miktarın yeterli olmadığı açıktır. Çöken madde miktarının artırılması için farklı koşullarda alkali uygulaması denenmiştir (Tablo 4.4). En yüksek verim %1 NaH₄ ilave edilmiş %10 KOH ile sağlanmıştır (%8,03). Bu katının analizi sonucunda içerdiği ksilan miktarının yalnızca %18,9 olduğu görülmüştür. Bu da FK'daki ksilanın %2'sine denk gelir. Bir başka deyişle alkali uygulaması ile hem özütlenen madde miktarı hem de özütteki ksilan oranı oldukça düşüktür. Bu miktarın da beklenenden az olması sebebiyle ksilanın alkali kullanılarak elde edilmesinin FK için uygulanabilir olmadığı, FK'nın alkali çözeltilerine dayanıklı bir lignoselülozik ağ yapısına sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu dayanıklılığın olası en önemli sebebi FK'nın lignin oranının yüksek olmasıdır.

Tablo 4.4. FK'nın alkali ile muamelesinde kullanılan koşullar ve geri kazanılan madde miktarları

| Alkali çözeltisi | Süre (sa) | Etanol ile çöken katı (% FK) |
|-------------------------------|-----------|------------------------------|
| %5 NaOH | 16 | 6,09 |
| %10 NaOH | 16 | 5,45 |
| %10 KOH + 1% NaH ₄ | 3 | 8,03 |
| %24 KOH + 1% NaH ₄ | 3 | 6,12 |

FK'dan alkali ile ksilanın yeterli verimle ayrılamamasından sonra bu uygulamanın FBA üzerinde de denenmesine karar verilmiştir. FBA %12,8 ksilan içeriği ile KOS üretimi için FK kadar potansiyel taşımasa da yüksek selüloz içeriği de göz önüne alınarak biyorafineri yaklaşımıyla değerlendirilebilecek bir hammaddedir. FBA %1 ile %10 arası NaOH ve %24 KOH +%1 NaH₄ ile muamele edilmiştir. Etanol ile çöken madde miktarları ve çöken maddedeki ksilan oranları ölçülmüştür (Tablo 4.5). %1 ve %2 NaOH ile çöken madde tespit edilmezken, %5 NaOH ile başlangıç maddesinin %9,90'ı katı halde kazanılmıştır. Bu katının ksilan oranı %39,6 olarak ölçülmüş, bu da FBA'daki ksilanın %27,1'i kadar olduğu

hesaplanmıştır. NaOH oranı %10'a çıkarıldığında çöken madde yüzdesi %13,1'e çıksa da, çökteldaki ksilan oranı %22,3'de kaldığı için başlangıçtaki ksilanın geri kazanılma oranında bir iyileşme sağlanamamıştır (Tablo 4.5). Önceki çalışmalarda başarı ile kullanılmış olan %24 KOH ile yüksek miktarda çöken madde olsa da ksilan kazanımı %14,8'de kalmıştır. Bu çalışmada kullanılan koşullar arasında %5 NaOH - 16 sa en iyi sonucu vermiştir.

Tablo 4.5. FBA'nın alkali ile muamelesinde kullanılan koşullar ve geri kazanılan madde miktarları

| Alkali çözeltisi | Süre (sa) | Etanol ile çöken katı (% FBA) | Çöken katıdaki ksilan oranı (%) | Çöken ksilanın FBA ksilanına oranı (%) |
|------------------------------|-----------|-------------------------------|---------------------------------|--|
| %1 NaOH | 16 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| %2 NaOH | 16 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| %5 NaOH | 16 | 9,90 | 39,6 | 27,1 |
| %10 NaOH | 16 | 13,1 | 22,3 | 24,0 |
| %24 KOH +%1 NaH ₄ | 3 | 19,2 | 4,46 | 14,8 |

Çalışmanın bu bölümünde elde edilen sonuçlar FK'nın alkali özütleme ile ksilan elde edilmesi için uygun bir hammadde olmadığını göstermiştir. Farklı alkali tipleri ve derişimleri denense de ksilanın ancak küçük bir kısmı FK'dan ayrılabilmiştir. Elde edilen ksilan ksilanaz ile KOS'a çevrilebilir ancak süreç sonunda elde edilecek ürün az olacak, bu da sürecin düşük bir verimle gerçekleşmesine neden olacaktır. Bu sebeple FK'dan alkali özütleme ve sonrasında enzimatik hidroliz ile KOS üretimine çalışma kapsamında devam edilmemiştir.

FBA'dan özütlenebilen ksilan miktarı FK'dan fazla olmuştur. FBA ksilanının %27'si kazanılmıştır. Fındık atıkları arasında alkali özütleme ile enzimatik yolla KOS üretimi için FBA'nın en uygun hammadde olduğu sonucu çıkmaktadır. Ancak, önceki bölümlerde bahsedilen otohroliz uygulaması ile ksilanın %60'ın üzerinde verimle biyokütleden ayrılmış olduğu görülmüştür. Ayrıca FK'daki ksilan oranı da FBA'dakinden fazladır. Bir başka deyişle; FK'dan otohroliz yöntemi ile ksilan özütlenmesi, FBA'dan alkali ile ksilan özütlenmesinden çok daha fazla verimli bir süreçtir. İki uygulamanın en verimli koşulları kullanıldığında, 1 kg FBA'dan 34 g ksilan elde edilebilirken, 1 kg FK'dan 119 g ksilan elde edilebilir.

Yukarıda bahsedilen durum dikkate alınarak bu çalışmada alkali özütlemenin kullanılmamasına, otohroliz uygulamasının doğrudan KOS üretimi için olduğu kadar, enzimatik hidroliz için önışlem olarak da kullanılmasına karar verilmiştir. Önceki bölümlerde görülebileceği gibi, bazı otohroliz koşullarında ksilan büyük ölçüde FK'dan ayrılırken düşük PD KOS oranı az olmuştur. Örneğin 190 °C'de izotermal olmayan (0 dak) uygulamada

ksilanın %57'si otohizoliz liköründe toplanmış, ancak bunun sadece %23 düşük PD KOS olmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.8). Kısa zincirli oligosakkaritlerin kolon bakterileri tarafından daha kolay metabolize edilmeleri sebebiyle düşük PD KOS oranını artırmak bu çalışmanın hedeflerindedir. Buna dayanarak FK otohizoliz likörlerindeki düşük PD KOS oranını artırmak için ksilanaz uygulaması bu hedefi sağlayabilir. Otohizoliz ve enzim uygulamalarının birleştirilmesi ile hem FK'daki ksilan yüksek verimle lignoselülozik ağdan ayrılabilir, hem de yüksek miktarda düşük PD KOS elde edilebilir. Aşağıdaki bölümde bu hipotezin test edilmesi anlatılmaktadır.

Önceki çalışmalarda alkali hidrolizi çeşitli bitki biyokütlerine başarı ile uygulanmıştır. Zilliox ve Debeire (1998) buğday sapının endo-ksilanaz ile hidrolizini araştırdıkları bir çalışmada, buğday sapını 16 sa boyunca 60 °C suda sürekli karıştırarak bekletmişlerdir. Daha sonra, 2 g buğday sapını 20 °C' de ağırlıkça %24 KOH ve %1 NaBH₄ içeren çözeltide 3 sa ekstrakt etmişlerdir. Filtrasyonla ayırdıkları sıvı faza hacimce %10 asetik asit içeren soğuk etanol çözeltisi ekleyerek ksilanı çöktürmüşlerdir. Bu yöntem pamuk sapı (Akpınar vd., 2007), tütün sapı, ayçiçeği sapı, buğday sapı (Akpınar vd. 2009), mısır koçanı (Bahcegul vd., 2013) için alkali ile ksilan ekstraksiyonunun yapıldığı birçok çalışmada kullanılmıştır.

Chapla vd. (2012) mısır koçanını 1,25 M NaOH ile 3 sa özütlemişlerdir. 179 g ksilan /kg mısır koçanı elde edilmiştir (ksilan miktarı toplam şeker ölçümü ile belirlenmiştir). Faryar vd. (2015), 50 g buğday sapından %2 NaOH ile 80 °C'de 90 dak sonunda 4,25 g ksilan elde etmişlerdir. Rabetafika vd. (2014) armut posasını 4 M NaOH ile 60 °C'de 18 sa ekstrakt etmişlerdir. Bian vd. (2013) şeker kamışı küspesini 25 °C'de 10 sa 10% KOH ile ekstrakt etmişlerdir.

Jayapal vd. (2013) şeker kamışı küspesindeki ksilanı farklı oranlarda (%2, 4, 8 ve 12) sodyum hidroksit veya potasyum hidroksitle 25 °C'de 16 sa boyunca katı/sıvı oranı 10 olacak şekilde ekstrakt etmişlerdir. Filtrasyonla ayırdıkları alkalide çözülmüş ksilanı 3 hacim %95 soğuk etanol çözeltisiyle çöktürmüş ve 60 °C'de kurutmuşlardır. Her iki alkali çözeltisiyle ekstraksiyonda alkali seviyesinin artması ksilan ekstraksiyonunu etkili şekilde arttırmıştır. Çalışmalarında alkali ile çözünme sonrası alkolle çöken katıyı ksilan olarak kabul etmişlerdir. %12 sodyum hidroksit ve potasyum hidroksit ile ekstraksiyon sonucunda çöken katı yüzdesi sırasıyla %11,91 ve %8,87 olarak hesaplanmıştır (Jayapal vd., 2013). Bulunan değerler fındık kabuğuna alkali hidrolizi sonucu elde edilen oranlara göre çok daha yüksektir.

4.5 FK otohizoliz likörünün enzimatik hidrolizi

Yukarıdaki bölümlerde görüldüğü üzere otohizoliz uygulaması ksilanın FK'dan büyük oranda ayrılmasını sağlamaktadır. Orta uygulama şiddetlerinde ($3,53 \leq \log R_0 \leq 4,03$) toplam KOS

verimi oldukça yüksektir. Bu koşullarda düşük PD KOS verimi log R_o ile değişmektedir ancak tüm koşullarda yüksek PD KOS'un oranı daha fazladır. Yüksek molekül ağırlıklı KOS ksilanaz ile muamele edildiğinde PD'nin düşürülmesi mümkündür. Böylece sindirim sistemi bakterilerinin daha kolay ve hızlı kullanabileceği düşük PD KOS'un oranı artırılabilir.

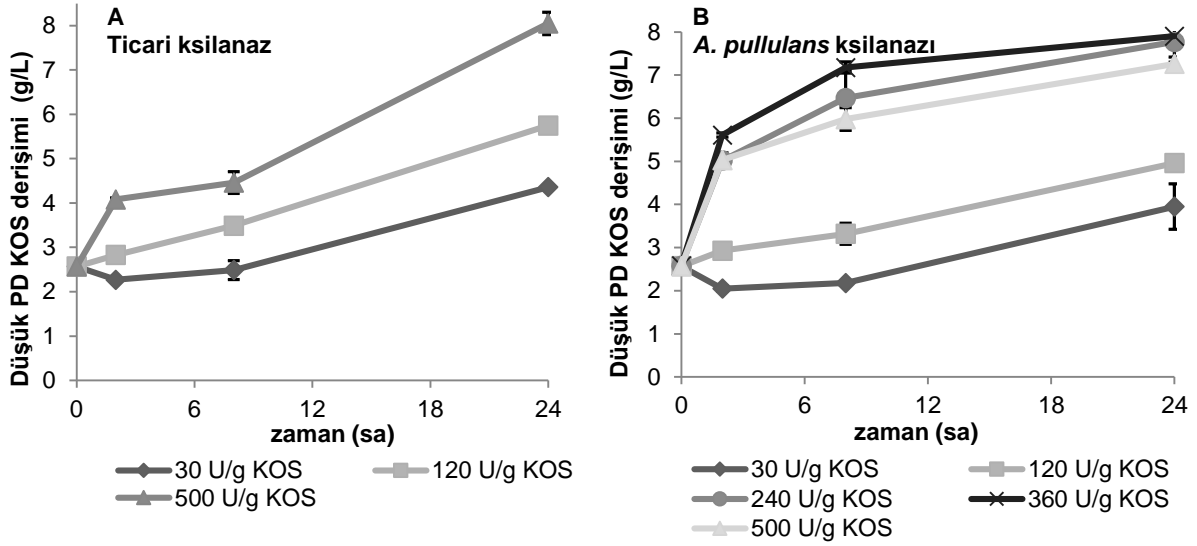
Çalışmanın bu bölümünde seçilen otohizoliz likörü ticari bir ksilanaz ve fermantasyon ile laboratuvarlarımızda ürettiğimiz bir ham ksilanaz kullanılarak muamele edilmiştir. Seçilen likör KOS miktarı yüksek ancak düşük PD KOS oranı düşük olan 190 °C'de izotermal olmayan koşulda (0 dak) elde edilen otohizoliz likörüdür. Enzimatik KOS üretimi denemeleri için katı:sıvı oranı yükseltılarak 1:6 olarak kullanılmıştır. Ayrıca otohizoliz likörü aktif karbon ile muamele edilmiştir (Aktif karbon muamelesi ile ilgili ayrıntılar aşağıdaki bölümlerde verilmiştir). Bu şartlarda elde edilen likör 18,9 g/L toplam KOS içermektedir.

İlk aşama olarak enzimatik hidrolizde toplam KOS'un ağırlığı başına kullanılacak en uygun ksilanaz aktivitesi (U/g KOS) belirlenmiştir. Otohizoliz likörüne önce 30, 120 ve 500 U/g KOS ksilanaz eklenmiştir. Ticari ksilanaz kullanıldığında aktivite arttıkça düşük PD KOS derişiminin de arttığı görülmüştür (Şekil 4.13 A). 30 ve 120 U/g aktivite değerlerinde gerçekleştirilen hidrolizlerin yeterli olmadığı ancak 500 U/g ksilanaz kullanıldığında düşük PD KOS derişiminde önemli bir artış sağlandığı görülmektedir. Çalışılan tüm enzim aktivitesi değerlerinde 8 saatte yeterli bir hidroliz sağlanmadığı, 24 saate kadar düşük PD KOS miktarında artış sağlandığı görülmektedir.

Benzer şekilde, AP ksilanazı kullanıldığında da 30 ve 120 U/g aktivite değerlerinde üretilen düşük PD KOS miktarlarının 500 U/g değerine göre daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.13 B). Her iki enzim için de substrat başına denk gelen enzim aktivitesi arttıkça düşük PD KOS miktarında artış olduğu açıkça göze çarpmaktadır. 500 U/g aktivite ile gerçekleştirilen çalışmalarda AP ksilanazı için ve ticari ksilanaz için elde edilen düşük PD KOS miktarları sırasıyla 7,26 g/L ve 8,05 g/L'dir. Her iki enzimin de benzer verimlilik sağlamaları nedeniyle çalışmanın bundan sonraki aşamasında ekibimiz tarafından üretilen AP ksilanazının kullanılmasına karar verilmiştir.

AP ksilanazı kullanıldığında 500 U/g aktivite değerine 24 saatte elde edilen 7,26 g/L düşük PD KOS değeri oldukça önemli bir miktardır. Proses maliyetlerinin düşürülmesi açısından kazanım sağlayacağı düşünülerek çalışmanın bundan sonraki aşamasında kullanılan AP ksilanazının miktarının azaltılması hedeflenmiştir. Bu sebeple daha düşük aktivite değerlerinde de (240 ve 360 U/g KOS) hidroliz gerçekleştirilmiş ve kinetik takip edilmiştir (Şekil 4.11 B). Bu iki aktivite değerinde de yüksek sonuç alınmış, 24 saatte 240 ve 360 U/g için sırasıyla 7,77 g/L ve 7,90 g/L düşük PD KOS üretilmiştir. Bu sonuçlar göze önüne

alınarak yapılan değerlendirme sonucunda bundan sonraki çalışmalarda 240 U/g AP ksilanazı kullanılmasına karar verilmiştir.

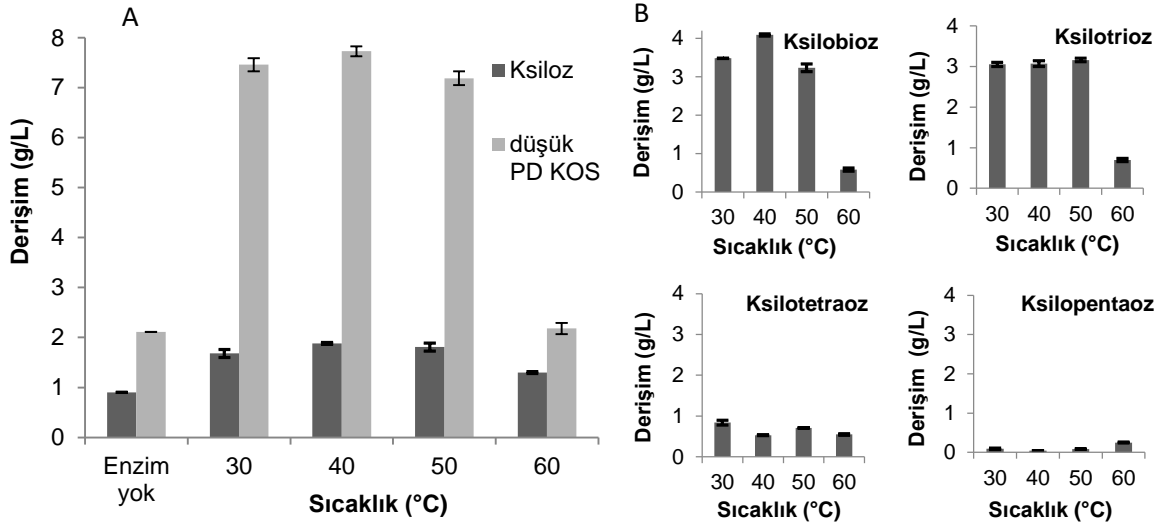


Şekil 4.13. Ksilanaz aktivitesinin düşük PD KOS üretimine etkisi. A: Ticari ksilanaz (hidroliz koşulları: T=60 °C, başlangıç pH'sı=6,0), B: AP ksilanazı (hidroliz koşulları: T=50 °C, pH=5,0)

AP ksilanazının karakterizasyonu substrat olarak kayın ağacı ksilanı kullanılarak önceki çalışmalarda yapılmış olup enzimin optimum sıcaklık, pH ve stabilite gibi pek çok özelliği ortaya konmuştur (Yegin, 2017a; Yegin, 2017b). Bu çalışmada yüksek molekül ağırlıklı FK kaynaklı KOS'dan düşük PD KOS üretimi için optimum koşulların bulunması için söz konusu çalışmalar göz önüne alınmıştır. Substrat olarak KOS bulunması ve otohizliz likörünün karmaşık içeriği sebebiyle bu değerlerin daha önce bulunan optimum değerlerden farklı olması olasıdır. Bu nedenle, sırasıyla sıcaklık, pH ve KOS derişiminin düşük PD KOS üretimine etkisi incelenmiş, hidrolizatlardaki KOS dağılımı ve ksiloz miktarları belirlenmiştir.

En uygun sıcaklığı bulmak için 30-60 °C arası sıcaklıklar 10 °C aralıklarla denenmiştir. 30, 40 ve 50 °C'de düşük PD KOS derişimleri arasında belirgin bir fark bulunmamış, 7,2-7,7 g/L düşük PD KOS elde edilmiştir (Şekil 4.14 A). Yegin (2017a) ve Yegin (2017b) tarafından yapılan çalışmalarda da enziminin geniş bir optimum sıcaklık aralığına sahip olduğu ve 30–50°C arasında aynı düzeyde aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Otohizlizden sonra, yani enzimatik hidrolizden önce düşük PD KOS derişiminin 2,1 g/L olduğu göz önüne alındığında enzim etkisi ile oluşan düşük PD KOS oranındaki artış oldukça belirgindir. 60 °C 'de ise söz konusu enzim aktivite göstermemiş ve KOS hidrolizi gerçekleşmemiştir. Ulaşılan en yüksek toplam düşük PD KOS derişimi olan 7,73 g/L'dir. 30-50 °C arasında düşük PD KOS büyük

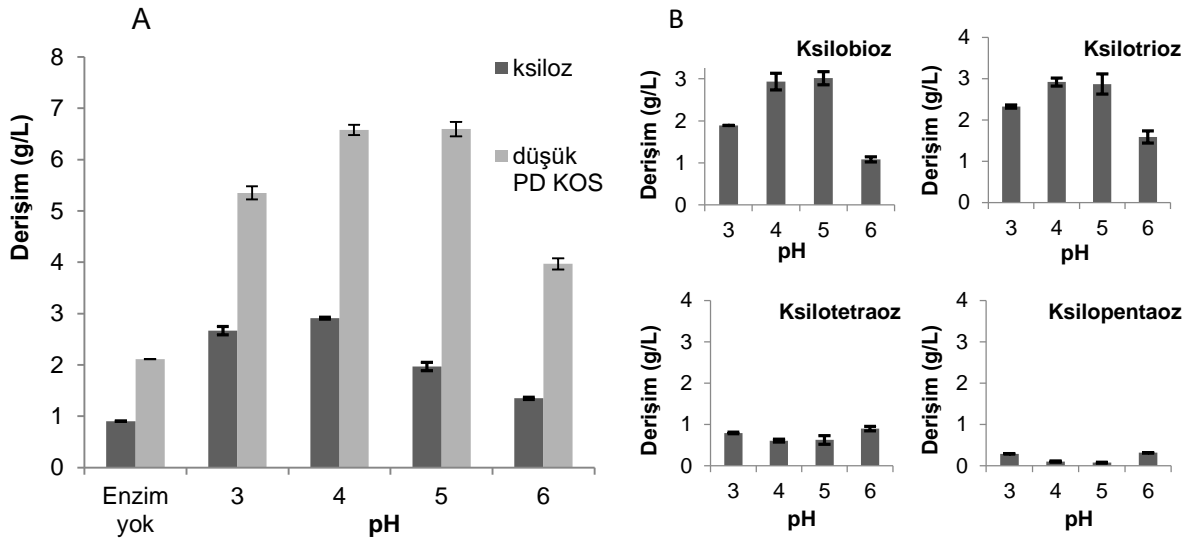
ölçüde ksilobioz (3,2-4,1 g/L) ve ksilotriozdan (3,0-3,2 g/L) oluşmaktadır (Şekil 4.14 B). Bunların yanında az miktar da ksilotetraoz (0,53-0,84 g/L) ölçülmüştür. KOS'un bir kısmı ksilani oluşturan monosakkarit olan ksiloza kadar hidroliz olmuştur. Ksiloz derişimi enzim uygulamasından önce 0,90 g/L iken 50 °C'ye kadar uygulamalarda yaklaşık iki katına çıkmıştır (Şekil 4.14 A). Bu sonuçlara dayanarak AP enziminin ana ürünlerinin ksilobioz ve ksilotrioz olduğu söylenebilir. Bu da enzimatik KOS üretiminin hedefine uygun olarak seyrettiğini göstermektedir. Ksiloz dönüşümün yüksek olmaması da KOS üretimi için olumludur.



Şekil 4.14. Sıcaklığın KOS hidrolizine etkisi. A: Xsiloz ve KOS derişimleri; B: Düşük PD KOS derişimleri. (pH=5,0, başlangıç KOS derişimi = 18,9 g/L, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=24 sa)

Sonraki aşamada ortam pH değerinin KOS hidrolizi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Otohidrolik likörünün pH değeri 1,0-5,0 M NaOH ve HCl kullanılarak hedef değer olan 3,0, 4,0, 5,0 ve 6,0'a getirilmiştir. pH denemeleri sırasında sıcaklık 50 °C'de tutulmuştur. Bu şartlar altında en yüksek düşük PD KOS derişimi pH 4,0 ve 5,0'da elde edilmiştir (6,6 g/L) (Şekil 4.15 A). Bunları sırasıyla pH 3,0 ve 6,0 takip etmiştir. Yegin (2017a) ve (Yegin 2017b) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da enzimin optimum pH'sı 4,0 olarak tespit edilmiştir. Xsiloz üretimi pH'dan farklı şekilde etkilenmiş, en yüksek derişim pH 4,0 ve 3,0'da görülmüştür. pH 5,0'da hem yüksek seviyede düşük PD KOS elde edilmiş, hem de ksiloz derişimi görece daha az olmuştur; buna göre pH 5,0'ın kısa zincirli KOS üretimi için en uygun pH değeri olduğu sonucu çıkmaktadır. Xsiloz ve KOS derişimlerinin pH'dan farklı şekilde etkilenmesi A. pullulans ham enzim karışımındaki farklı enzimlerin faaliyetiyle açıklanabilir. Ham enzim preparatının endo-ksilanaz aktivitesini pH 4,0 ve 5,0'da, ekzo-ksilanaz aktivitesini ise pH 3,0

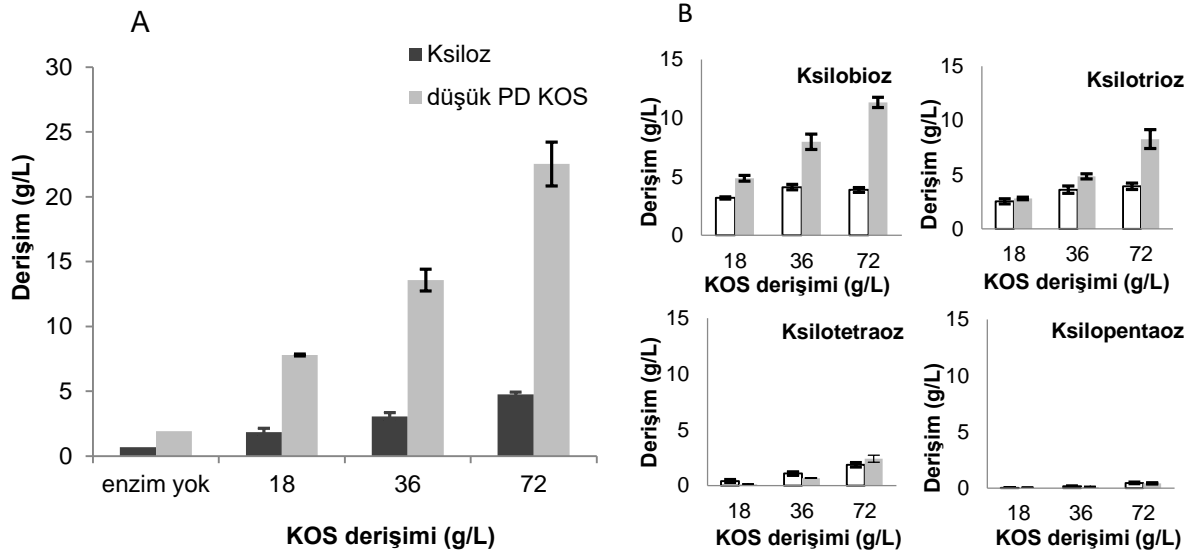
ve 4.0'da daha fazla göstermiş olması söylenebilmektedir. Endo-ksilanaz aktivitesi sonucu otohizliz liköründeki büyük moleköl ağırlıklı KOS zinciri içerden hidrolize uğrayarak daha düşük moleköl ağırlıklı oligomerlerin oluşumuna neden olurken, ekzo-ksilanaz aktivitesi sonucu söz konusu büyük moleköl ağırlıklı KOS zinciri uç kısmından hidrolize uğrayarak ksiloz moleküllerinin oluşmasına sebep olduğu ifade edilebilmektedir (Motta vd., 2015). KOS'un PD dağılımına bakıldığında sıcaklık testinde olduğu gibi baskın moleküller ksilobioz ve ksilotrioz olmuştur (Şekil 4.15). Bunların derişimleri de pH'dan toplam düşük PD KOS ile aynı şekilde etkilenmiş, en yüksek derişimler pH 4,0 ve 5,0'da görülmüştür. Ksilotetraoz ise pH'dan belirgin şekilde etkilenmemiştir.



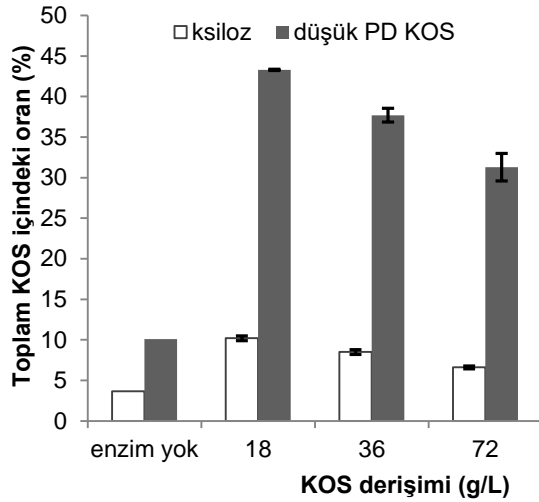
Şekil 4.15. pH'nın KOS hidrolizine etkisi. A: Ksiloz ve KOS derişimleri; B: Düşük PD KOS derişimleri. (T=50 °C, başlangıç KOS derişimi = 18,9 g/L, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=24 sa)

Süreç sonunda ortamdaki ürün derişiminin yüksek olmasını sağlamak için başlangıçtaki substrat derişimini yüksek tutmak gerekir. Bu çalışmada başlangıçtaki toplam KOS derişiminin düşük PD KOS üretimine etkisi incelenmiştir. Önceki aşamalarda otohizliz likörü aktif karbon uygulamasından sonra doğrudan kullanılmıştır. Likördeki toplam KOS miktarı 18,9 g/L'dir. Çalışmanın bu aşamasında likör önce dondurularak kurutulmuş (liyofilizasyon), sonra tekrar suda çözündürülerek daha yüksek KOS derişimleri sağlanmıştır. Likördeki normal seviyeye yakın bir değer olan 18 g/L ile birlikte 36 ve 72 g/L başlangıç KOS derişimi ile enzimatik hidrolizler başlatılmıştır. Önceki aşamalarda belirlenen en uygun değerler olan sıcaklık (40 °C) ve pH'da (5,0) hidroliz gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç substrat miktarı artıkça düşük PD KOS derişimi de artmıştır (Şekil 4.16 A). En yüksek başlangıç derişimi olan 72 g/L'de 24 sa'de 10,20 g/L, 48 sa'de 22,5 g/L düşük PD KOS'a ulaşılmıştır. Ortamdaki ksiloz derişimi de aynı eğilimi göstermiştir. Başlangıç derişimini artırarak ürün derişimini artırabiliyor olmak olumlu bir sonuç olarak değerlendirilebilmekle beraber derişim kadar dönüşüm verimi değeri de önemlidir. Bu nedenle her başlangıç KOS derişimi değeri için hidroliz sonunda (48 sa) elde edilen düşük PD KOS'un toplam KOS'a oranı hesaplanmıştır. 18 g/L başlangıç derişiminde hidroliz sonunda düşük PD KOS'un toplam KOS'a oranı %43 olurken, 36 g/L'de %38, 72 g/L'de ise %31 seviyesinde kalmıştır (Şekil 4.17). Buna göre başlangıç KOS derişimindeki artışın dönüşüm verimini olumsuz etkilediği söylenebilir.



Şekil 4.16, Başlangıç substrat miktarının düşük PD KOS üretimi üzerine etkisi. A: Ksiloz ve KOS derişimleri; B: Düşük PD KOS derişimleri. (T=40 °C, pH=5,0, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=48 sa, küçük şekillerde içi boş barlar 24 sa, içi dolu barlar 48 sa'de alınan sonuçları göstermektedir.)



Şekil 4.17. Enzimatik hidrolizin başlangıcında ortamdaki KOS derişiminin düşük PD KOS ve ksilozun toplam KOS içindeki oranlarına etkisi. Koyu renkli barlar: ksiloz, Açık renkli barlar: düşük PD KOS. (T=40 °C, pH=5,0, enzim dozu=240 U/g KOS, süre=48 sa, küçük şekillerde içi boş barlar 24 sa, içi dolu barlar 48 sa'de alınan sonuçları göstermektedir.)

Otohidroliz likörlerinin ksilanaz ile muamele edilerek KOS hidrolizi sağlanması önceki birkaç çalışmada da uygulanmıştır. AKPINAR VD. (2010b) buğday sapı ve ayçiçeği sapını 160 °C'de 1 sa otohidrolize tabi tutmuşlar, daha sonra da likörü *Trichoderma reseei* ve *Aspergillus niger* ksilanazları ile hidroliz etmişlerdir. İndirgen şekerdeki artışı kullanarak hidrolizi takip etmişlerdir. Ksiloz eşdeğeri derişimin 4-6 g/L kadar arttığını gözlemişlerdir. VEGAS VD. (2008) çeltik kavuzunun otohidrolizi sonucu elde edilen 11,57 g/L KOS içeren likörü üç farklı ticari ksilanaz ile hidrolize etmişlerdir. 41-59 U/g KOS enzim kullanmışlar ve en fazla ksiloz eşdeğeri derişimde 4 g/L artış görmüşlerdir. Boyut eleme kromatografisi sonuçlarına göre PD dağılımı enzime göre farklılık gösterse de düşük PD KOS oranı tüm hidrolizatlarda %80'den fazla olmuştur. Vazquez vd. (2002) 14,23 g/L KOS içeren okaliptüs ağacı otohidroliz likörünü ksilanaz ile hidroliz ettiklerinde %50-58 ksilobioz ve %16,7-8,8 ksilotrioz içeren hidrolizatlar elde etmişlerdir. Bu iki oligomerin toplam derişimi 10,5 g/L olmuştur. Teng vd. (2010) buhar patlatma yönetimiyle mısır koçanından elde ettikleri likörü 7,5 U/mL ksilanaz kullanarak 70 °C'de hidroliz etmişlerdir. Enzimatik hidroliz sonunda hammaddedeki ksilanın %28,6'sı KOS olarak elde edilmiş, bunun da %90'ı ksilobioz olmuştur. Yazarlar optimum hidroliz süresini 2,5 sa olarak belirlemişler ve buna dayanarak kullandıkları sıcaklığa dayanıklı enzimin mezofilik enzimlere göre daha üstün olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmaya ve yukarıda bahsedilen çalışmalara dayanarak enzimatik hidrolizin performansının kullanılan bitki biyokütlesine ve ksilanaza göre değiştiği söylenebilir.

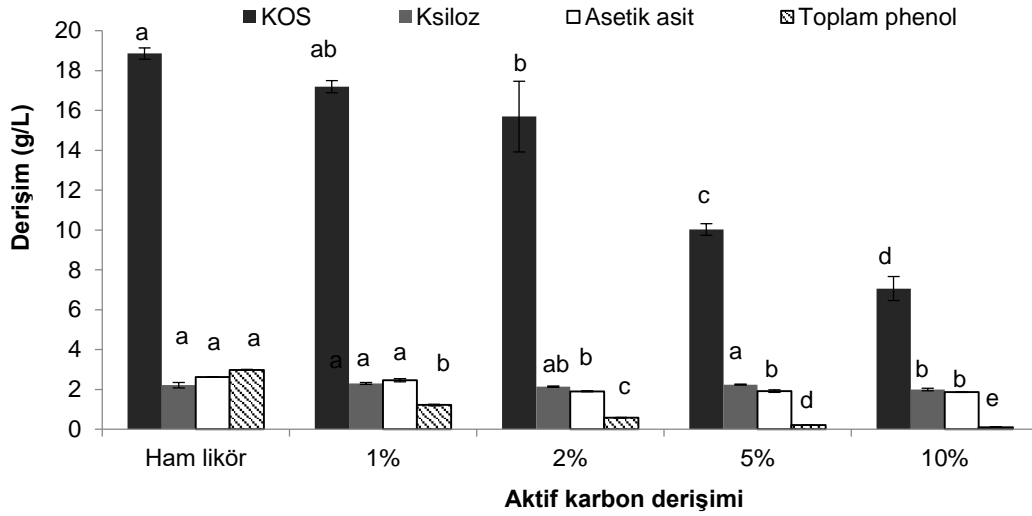
Otohidroliz sırasında biyokütleden özütlenen diğer bileşenler (ekstraktifler, protein vb.) ve furfural, asetik asit, HMF gibi termal bozunma ürünleri de enzimin çalışmasında etkili olmuş olabilir.

4.6 Saflaştırma çalışmaları

4.6.1 Aktif karbon uygulaması

Likörlerde bulunan karbonhidrat olmayan maddelerin bazılarının uzaklaştırılması için aktif karbon uygulanmıştır. Otohidroliz likörüne ağırlıkça %1, %2, %5 ve %10 aktif karbon eklenip bekleme sonrası katı ve sıvı kısım ayrılmıştır. Sıvı kısımda kalan fenolik maddelerin ve asetik asit ile ksiloz ve KOS'un derişimleri ölçülerek uygulamanın etkinliği belirlenmiştir (Şekil 4.18). Aktif karbon uygulaması özellikle fenolik maddeler üzerinde etkili olmuştur. %1 aktif karbon varlığında sadece fenolik madde derişiminde anlamlı bir fark olmuş, derişimde 2,5 kat azalma ölçülmüştür. Aktif karbon derişimi arttıkça fenolik madde derişimleri daha da azalmıştır. Asetik asit derişimi %2 aktif karbon uygulaması ile az da olsa değişim göstermiş, daha yüksek aktif karbon miktarlarında ise azalma görülmemiştir. Ksiloz da aktif karbon uygulamasından etkilenmemiş, ancak %10 aktif karbondaki ksiloz derişiminde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Aktif karbon miktarı arttıkça daha fazla KOS'un bu maddeye tutunduğu görülmektedir. %1 aktif karbonun derişiminin üzerindeki değerlerde KOS miktarı anlamlı seviyede azalmıştır. Başlangıçta 18,9 g/L olan KOS miktarı %10 aktif karbon varlığında 7,1 g/L'ye kadar düşmüştür. %1 aktif karbon kullanıldığında KOS'daki azalma azdır ve fenolik maddelerde anlamlı bir azalma vardır; buna göre bu aktif karbon derişiminin çalışma şartlarındaki en uygun derişim olduğu sonucuna varılmıştır.

Montane vd. (2006) aktif karbonun badem kabuğu otohidroliz likörü üzerinde test etmiş ve bu malzemenin lignin kaynaklı maddelerin ve diğer çözünen maddelerin tutunması konusunda etkili olduğunu tespit etmiştir. Pellerin vd. (1991) farklı bir yol izlemişler; yüksek aktif karbon derişimi kullanarak KOS'un tutunmasını sağladıktan sonra artan etanol derişiminde yıkama sayesinde KOS'un PD derecesine göre fraksiyonlarını elde etmişlerdir. Çalışmamızdaki sonuçlar bu iki rapordaki yaklaşımla da uyumludur. Her ne kadar biz çalışmamızda KOS'un tutunmadığı ve fenolik maddelerin tutunduğu aktif karbon uygulamasını tercih ettiysek de yüksek aktif karbon derişimlerinde gözlediğimiz KOS'un tutunma özelliğinden de yararlanmak mümkündür.



Şekil 4.18. Aktif karbon uygulamasının likör kompozisyonuna etkisi. Farklı harfler istatistiksel olarak farkı ifade eder ($p < 0,05$, tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi uygulanmıştır).

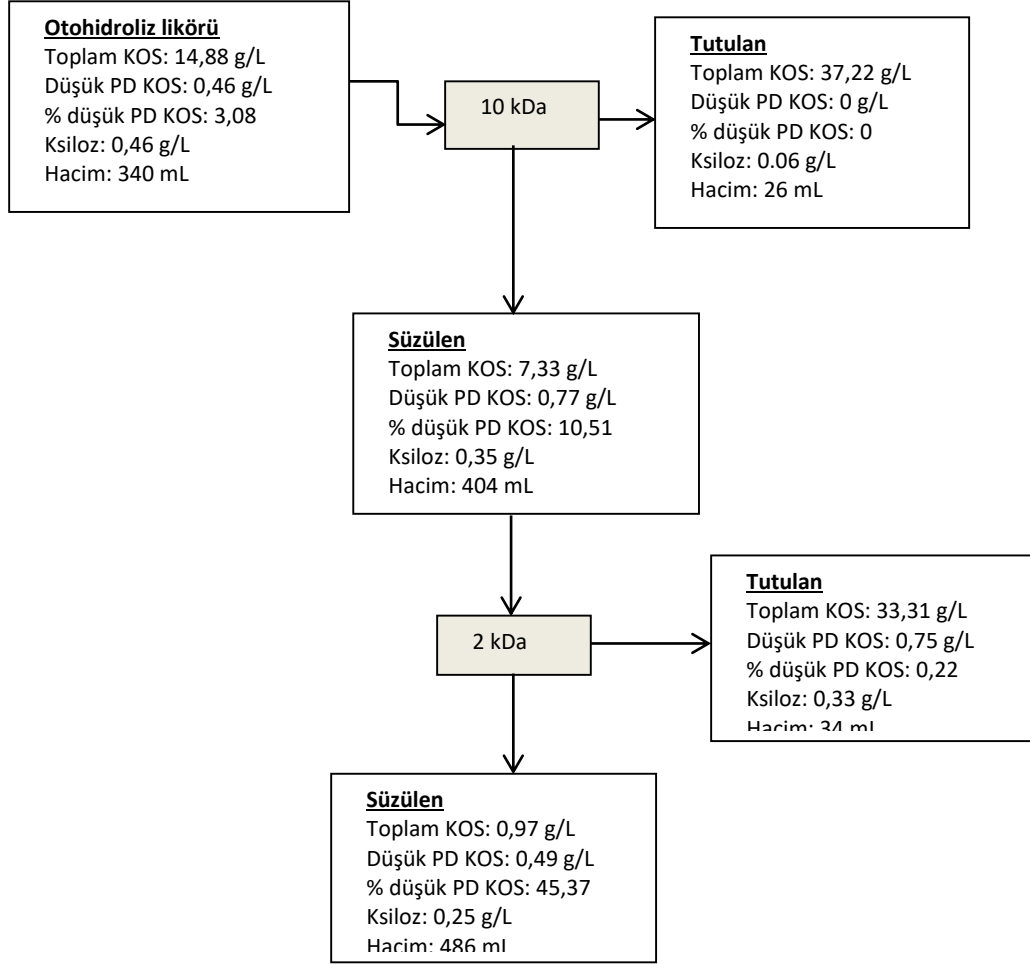
4.6.2 Ultrafiltrasyon (UF)

KOS'un saflaştırması ve fraksiyonlarına ayrılması için önerilen uygulamaların başında membran filtrasyon gelmektedir (Aachary ve Prapulla, 2011) Bu uygulamada KOS çözeltileri çeşitli molekül büyüklüğü limitli ultrafiltrasyon ya da nanofiltrasyon membranlarından geçirilir ve oligomerlerin molekül büyüklüklerine (PD) göre birbirlerinden ayrılabilir. Yanı sıra yüksek molekül ağırlıklı proteinler ve karbonhidratlar ile düşük molekül ağırlıklı monosakkaritler ve asetik asit, furfural, HMF gibi bozunma ürünleri de hedef KOS'dan uzaklaştırılabilir.

Çalışmamızda 190 °C'de izotermal olmayan koşulda (0 dak) elde edilen otohizoliz likörü ve aynı likörün enzimatik otohizoliz ile muamele edilmiş hali çapraz akışlı filtrasyon yöntemi ile 10 kDa ve sonrasında 2 kDa'luk membran filtreden süzölmüştür. Sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de bu likörlerin membran filtrelerden geçen ve süzölen kısımlarının toplam KOS, düşük PD KOS ve ksiloz derişimleri gösterilmiştir.

Ham otohizoliz likörü büyük oranda yüksek molekül ağırlığında KOS'dan ($PD > 6$) oluşmaktadır (%97). 10kDa'luk filtreden büyük KOS'ların yaklaşık %50'si süzölmüş, geri kalanı tutulan sıvıda ya da fitre üzerinde kalmıştır. Az miktardaki düşük PD KOS ise bu filtreden tamamen süzölmüştür. Bu filtreden süzölen likör daha sonra 2kDa'luk filtreden geçirilmiştir. Büyük KOS'un yaklaşık %10'u ve düşük PD KOS'un tamamı bu filtreden geçmiştir. Süzölen sıvının toplam KOS derişimi 0,97 g/L olurken, bunun yaklaşık %45'i düşük PD KOS'dan oluşmaktadır. Ksiloz da düşük molekül ağırlığına sahip olduğundan filtrelerden süzölmüştür ve 2kDa'dan süzölen sıvıdaki derişimi 0,25 g/L olmuştur. Otohizoliz likörünün bu iki filtreden geçirilmesinin en önemli sonucu fitrelerde tutulan KOS'un ksilozdan, düşük PD

KOS'dan arınmış olarak elde edilmesidir. Yüksek molekül ağırlığına sahip bu KOS bu haliyle kullanım alanı bulabilir ya da enzimatik hidroliz ile düşük PD KOS elde etmek için substrat olarak da değerlendirilebilir.

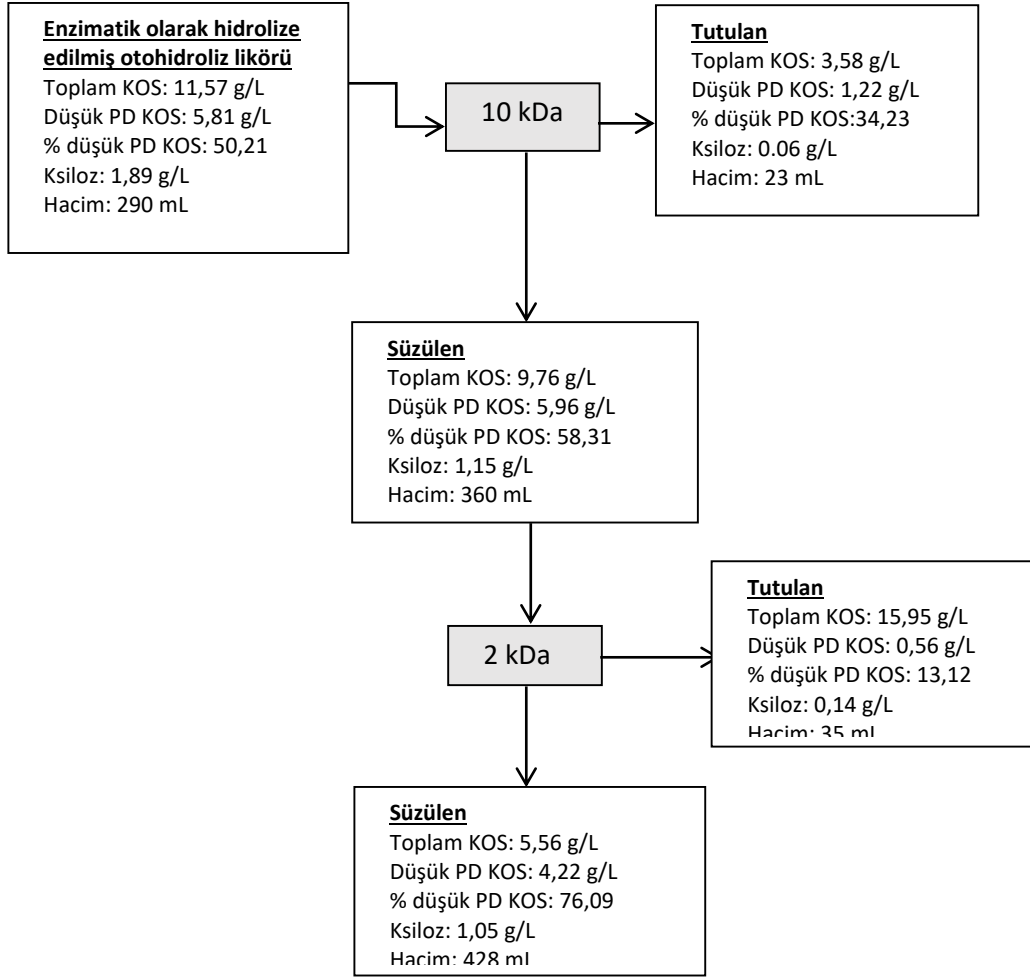


Şekil 4.19. Otophidroliz likörünün ultrafiltrasyonu sırasında filtrelerde tutulan ve süzülen sıvıların bileşimi.

Ham otophidroliz liköründeki büyük molekül ağırlıklı KOS üstteki bölümlerde optimize edilen şartlarda ksilanaz ile hidroliz edilmiş ve düşük PD KOS oranı %50'ye kadar çıkarılmıştır. Bu likör de 10 kDa ve 2 kDa'luk membran filtrelerden geçirilmiştir. KOS'un molekül ağırlığı dağılımı önceki örnekten farklı olduğundan UF'nin performansı da farklı olmuştur. KOS'un neredeyse tamamı (%97-98) 10 kDa'luk fitreden süzüldüğünden elde edilen sıvının bileşimi başlangıçtakine yakın olmuştur. 2 kDa'luk fitreden büyük KOS'un üçte biri ve düşük PD KOS'un tamamı süzüldüğünden geçen sıvıdaki düşük PD KOS'un oranı %76'ya çıkmıştır. Toplam KOS derişimi başlangıçta 11,57g/L iken filtreleme sonunda 5,57'ye inmiştir. Ksiloz da

düşük PD KOS gibi büyük oranda filtrelerden süzölmüştür. UF enzimatik olarak hidrolize edilmiş likördeki düşük PD KOS oranını artırması açısından kısmen saflaştırma sağlamıştır. Çalışmada kullanılan şartlarda ksilozun uzaklaştırılması mümkün değildir. Ksiloz ve asetik asit ve furfural gibi diğer küçük moleküllerin de KOS'dan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için nanofiltrasyon yönteminin kullanılması önerilebilir (Akpınar vd., 2010a).

Önceki çalışmalarda KOS'un saflaştırılması için UF ve nanofiltrasyon uygulandığında çalışmamızda elde ettiğimize benzer sonuçlar alınmıştır. (Akpınar vd., 2007) pamuk sapından elde ettikleri KOS'u 3 kDa ve 1 kDa'luk membran filtrenin performansını karşılaştırmışlar ve her iki filtre için benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ksiloz ve düşük PD KOS %90'ın üzerinde süzölen kısım da geri kazanılırken PD 5'den büyük olan KOS'un %57-62 kadarı kazanılmıştır. Aynı grup tütün sapı ksilanının enzimatik hidrolizatını 10 kDa ve ardından 3 kDa'luk filtreden geçirdiklerinde, büyük KOS oranın %21'den %8'e inmiş, düşük PD KOS oranı ise %34'den %43'e çıkmıştır (Akpınar vd., 2010a). Ayrıca yazarlar ksiloz derişimi yüksek olan asit hidroliz ile elde ettikleri ksilan hidrolizatını 1 kDa'luk filtreden geçirdiklerinde KOS ile ksilozu birbirlerinden ayıramadıklarını bildirmişlerdir. (Zhao ve Dong, 2016) buğday kepeğinden elde ettikleri KOS içeren enzimatik hidrolizatı 20 kDa ve sonrasında 1kDa'luk filtrelerden geçirdiklerinde %57,55'i PD 2-4 KOS olan bir ürün elde etmişlerdir.



Şekil 4.20. Enzimatik olarak hidrolize edilmiş otophidroliz likörünün ultrafiltrasyonu sırasında filtrelerde tutulan ve süzülen sıvıların bileşimi.

4.7 Stabilite testleri

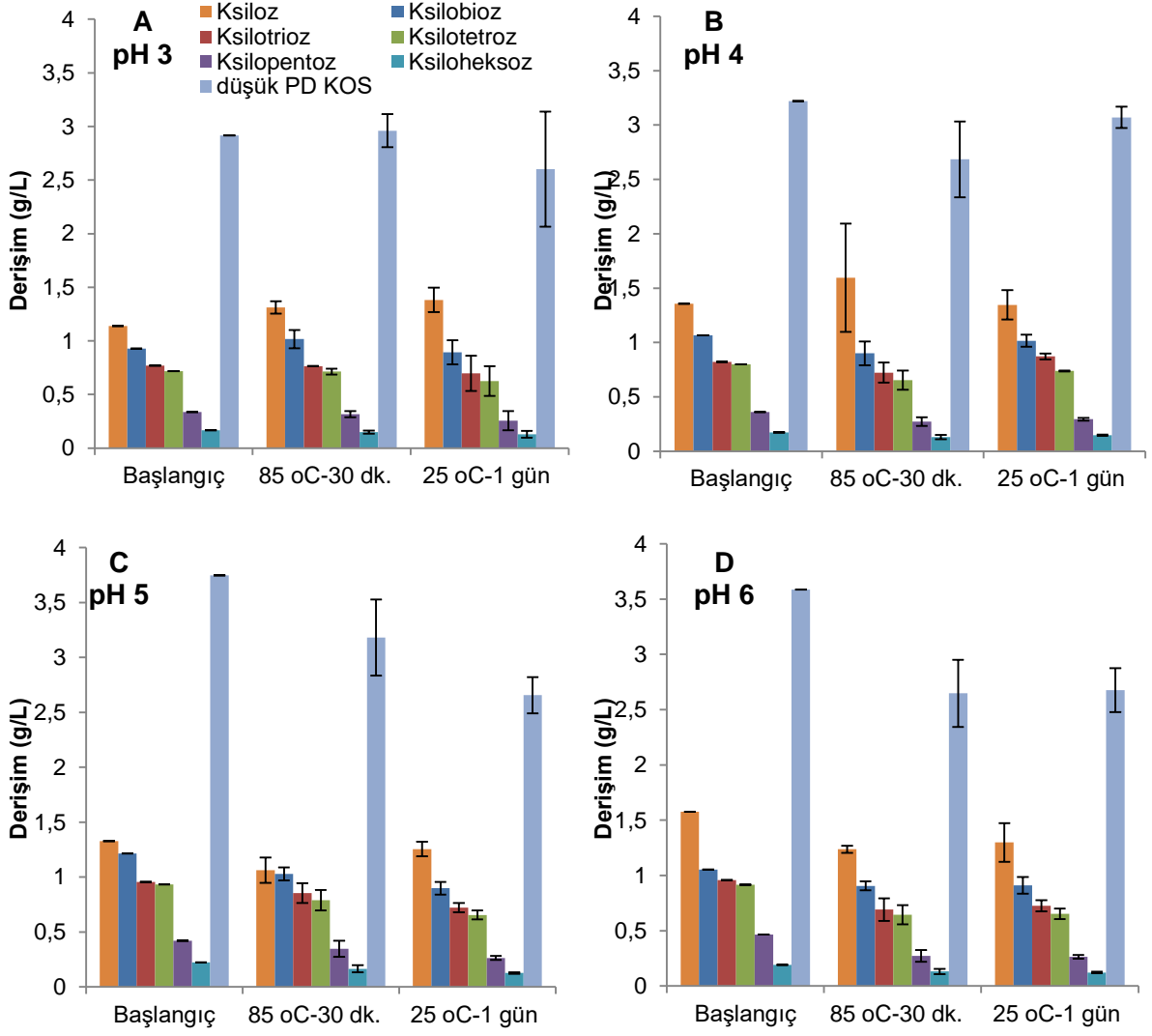
Prebiyotikler tek başlarına veya probiyotiklerle birlikte doğrudan tüketilebilse de gıdalara eklenerek, gıda ile birlikte tüketilmeleri tüketiciler tarafından daha fazla tercih edilebilir. Bu şekilde kullanımı prebiyotik özellikli materyalin gıda üretim koşullarına dayanıklı olmasını gerektirir. Örneğin bir süt ürününde kullanılacağı zaman pastörizasyon sıcaklığına dayanmalıdır. Yoğurt içinde kullanılabilmesi için ortamın düşük pH değerinde bozulmamalıdır. İster doğrudan, isterse gıda içinde tüketilsin prebiyotikler üst sindirim sistemi koşullarına da dayanmalı ve bozulmadan kolona ulaşmalıdır. Bu takdirde kolon bakterileri tarafında tüketilerek sağlık açısından fayda sağlayabilir.

Yukarıdaki koşullar dikkate alınarak çalışmamızda ürettiğimiz KOS çeşitli ortamlarda test edilmiştir. 190 °C'de 5 dak otophidroliz ile elde edilen likör ve 190 °C'de izotermal olmayan koşulda elde edilen ve daha sonra ksilanaz ile muamele edilen liköre stabilite testleri

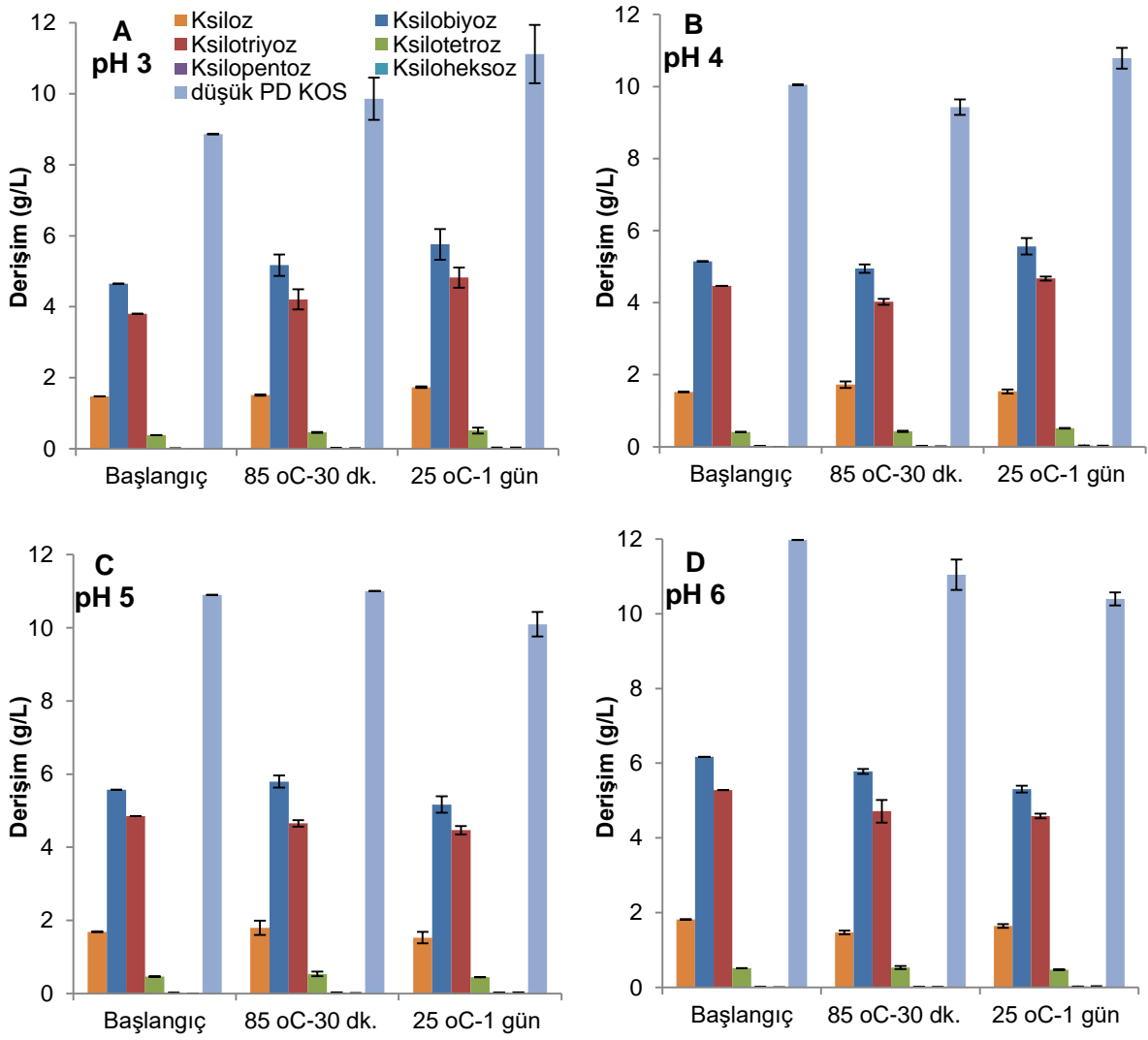
uygulanmıştır. Gıda üretim koşullarına benzeşen ortam sağlamak için likörlerin pH değeri 3, 0, 4,0, 5,0, 6,0 yapılmış ve yüksek sıcaklıkta (85 °C) 30 dak ve ayrıca oda sıcaklığında (25 °C) 24 sa bekletilmiştir.

Şekil 4.21'da dört pH değerinde yüksek sıcaklık-kısa süre ve oda sıcaklığı-uzun süre koşullarının otohizroliz liköründeki toplam düşük PD KOS'un ve PD 2-6 arası KOS'ların derişimlerinin uygulama ile nasıl değiştii görölmektedir. pH 3 ve 4 iken uygulama öncesi başlangıç düşük PD KOS derişimi pH 5 ve 6'ya nazaran daha düşük olmuştur. Buradan düşük pH'nın henüz test başlamadan olumsuz bir etki yarattığı sonucuna varabilir. pH 3'de yüksek sıcaklık-kısa süre koşulunda düşük PD KOS değişmezken düşük sıcaklık-uzun süre koşulunda azalma belirgindir. pH 4'de ise tersi bir eğilim olmuş, yüksek sıcaklık-kısa sürede toplam derişim bir miktar düşmüştür. pH 5 ve 6'da ise gerek yüksek gerek de düşük sıcaklığın toplam düşük PD KOS derişimi üzerinde olumsuz bir etkisi olmuştur.

Şekil 4.22 yukarıdaki test otohizroliz ve sonrasında enzimatik hidroliz uygulanan liköre yapıldığında elde edilen sonuçları göstermektedir. Başlangıç toplam KOS derişimlerinde yukarıdakine benzer bir eğilim göze çarpmakta, pH değeri arttıkça derişim daha yüksek olmaktadır. pH 3'de uygulamalar sırasında düşük PD KOS derişimi az da olsa yükselmiştir. pH 4'de yüksek sıcaklığın olumsuz etkisi görölmektedir. pH 5'de düşük sıcaklık-uzun süre'nin, pH 6'da ise hem yüksek sıcaklık-kısa süre, hem de düşük sıcaklık-uzun süre koşullarının derişimi bir miktar düşürdüğü göze çarpmaktadır.



Şekil 4.21. Gıda üretim koşullarının otohidrolyz ile elde edilen KOS'un stabilitesine etkisi. Toplam düşük PD KOS ve her bir oligomer ayrı renkle gösterilmiştir. Başlangıç pH değerleri: A: pH 3, B: pH 4, C: pH 5, D: pH 6. Bar renklerinin açıklaması için A'ya bakınız.



Şekil 4.22. Gıda üretim koşullarının otohizoliz sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen KOS'un stabilitesine etkisi. Toplam düşük PD KOS ve her bir oligomer ayrı renkle gösterilmiştir. Başlangıç pH değerleri: A: pH 3, B: pH 4, C: pH 5, D: pH 6. Bar renklerinin açıklaması için A'ya bakınız.

Wang vd. (2009) buğday kepeğinden elde ettikleri PD 2-7 olan KOS'un stabilitesini test etmişlerdir. Pastörizasyon sıcaklıklarında KOS'un termal stabilitesinin FOS'a göre yüksek olduğunu görmüşlerdir. Özellikle düşük pH değerlerinde KOS'un stabilitesi FOS'a göre üstün olmuştur.

Otohidroliz sırasında FK'dan liköre geçen çözünen maddelerden ötürü likörlerin rengi koyu kahverengi olmuştur. Aktif karbon uygulaması ile rengin açılması kısmen sağlanmıştır. Aktif karbonden sonra liyofilize edilmiş olan KOS içeren katılar sitrat tamponunda (20 mM, pH 7,0) %10 derişimde çözülmüş ve %1 glisin varlığında 85 °C'de 3 sa bekletilerek esmerleşme derecesi (Maillard reaksiyonları) ölçülmüştür. KOS çözeltilerinin ve glüköz çözeltilisinin

(kontrol) başlangıçta ve 1,2, ve 3 sa sonraki esmerleşme dereceleri Tablo 4.6'da görülmektedir. Başlangıçta KOS'un esmerliği glikoza göre çok daha yüksek olmuş ve esmerlik zamanla artmıştır. Otohizoliz ile elde edilen KOS'un esmerliği enzimatik hidroliz ile elde edilenden daha yüksek olmuştur. Glikoz çözeltisi baz alınarak hesaplanan esmerleşme derecelerine bakıldığında da KOS çözeltilerinin sıcaklıkla yüksek oranda esmerleştiği görülmektedir (Tablo 4.6).

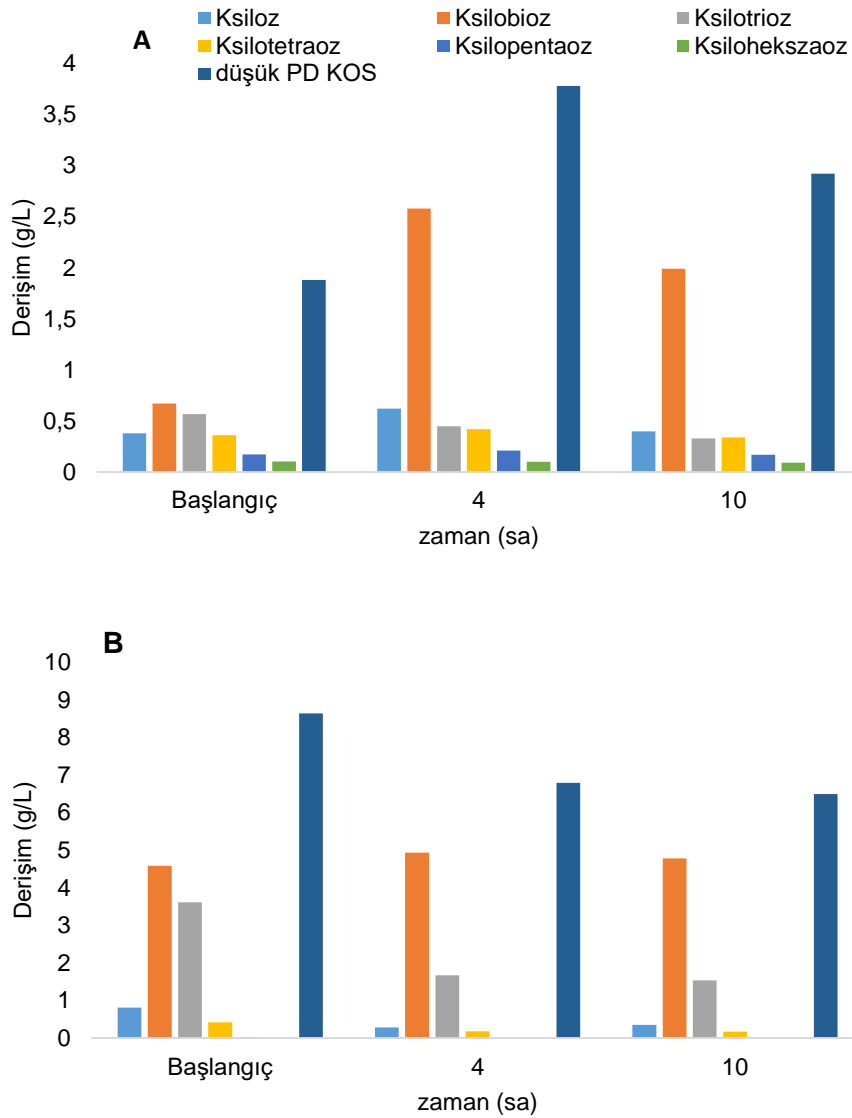
KOS'un ve benzeri diğer katkı maddelerin prebiyotik aktivite göstermeleri için gıdalara eklendiğinde gıdaların doğal rengini değiştirmemesi beklenir. Buna göre bu çalışmada elde edilen KOS bu haliyle bazı gıdalarda kullanılmaya uygun olmayabilir. Özellikle renksiz ya da hafif renkli içeceklerde ortamın rengini koyulaştırabilir. Pastörizasyon ya da pişirme sıcaklıklarında karbonhidratlar ile amino asitler arasındaki Maillard reaksiyonları da üründe beklenenden fazla koyulaşmaya neden olabilir.

Tablo 4.6. KOS çözeltilerinin esmerlik dereceleri (420 nm'deki absorbansları) ve esmerleşme oranları. Kontrol olarak glikoz çözeltisi kullanılmıştır. % esmerleşme derecesi glikoz çözeltisinin 3 sa sonundaki esmerliğine göre hesaplanmıştır. (OH: otohizoliz, EH: enzimatik hidroliz)

| Süre (sa) | Esmerlik (A ₄₂₀) | | | % Esmerleşme | | |
|--------------|---------------------------------|-----------------------------|--------|------------------------|-----------------------------|--------|
| | OH ile elde edilen KOS | OH + EZ ile elde edilen KOS | Glikoz | OH ile elde edilen KOS | OH + EZ ile elde edilen KOS | Glikoz |
| 0 | 6,0 | 4,8 | 0,0 | 408.11 | 258.35 | 2.14 |
| 1 | 8,4 | 8,2 | 0,3 | 570.53 | 441.49 | 14.23 |
| 2 | 10.1 | 8,3 | 1,0 | 683.17 | 446.48 | 54.85 |
| 3 | 14.8 | 10,6 | 1,9 | 1000.00 | 570.05 | 100.00 |

Sindirim sistemi koşullarının düşük PD KOS stabilitesine etkisi incelenmiştir. Bunun için KOS içeren örnekler önce mide ortamına sonra ince bağırsak ortamına benzeşen koşullarda 37 °C'de sırasıyla 4 sa ve 6 sa bekletilmişlerdir. Düşük PD KOS'ların derişimlerindeki değişimler ölçülmüştür. Otohizoliz ile elde edilen KOS mide koşullarında beklediğinde ksilobioz derişiminde yaklaşık 4 kat artış olmuş, diğer KOS'ların ve ksilozun derişiminde çok az değişiklikler görülmüştür (Şekil 4.23 A). Toplam düşük PD KOS derişimi 1,88 g/L'den 3,78 g/L'ye yükselmiştir. Buna göre mide koşulundaki düşük pH değerini sağlayan HCl'nin büyük molekül ağırlıklı KOS'ların hidrolizini sağladığı ve ksilobioz oluştuğu sonucu çıkmaktadır. İnce bağırsak koşullarında bekleme sırasında ksilobioz derişiminde bir azalma olmuş bu da toplam düşük PD KOS değerini 2,92 g/L'ye düşürmüştür. Otohizoliz sonrasında enzimatik

muamele sonucu elde edilen KOS'un testinde yukarıdakinden farklı bir eğilim görülmüştür (Şekil 4.23 B). Mide koşullarında düşük PD KOS'da belirgin bir azalma gözlenirken, ince bağırsak koşulunda belirgin bir değişiklik olmamıştır. Midedeki düşük pH ksilotriozun derişiminde bir azalmaya sebep olmuştur. İki aşama sonunda düşük PD KOS yaklaşık %75 oranında korunmuştur. Bu sonuçlara göre çalışmamızda elde ettiğimiz KOS'ların sindirim sistemi koşullarına dayanıklılığının yüksek olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.23. Sindirim sistemi koşullarının KOS stabilitesine etkisi. A: Otohidroliz ile elde edilen KOS, B: Otohidroliz sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen KOS.

4.8 Prebiyotik aktivite testi

Otohidroliz ile elde edilen KOS'un seçilmiş bakterilerin (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*) gelişmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bakteriler %1 KOS içeren bazal ortamda oksijensiz koşullarda 24 sa inkübe edilmiş ve optik yoğunluğu (OD₆₀₀) ölçülmüştür. Test edilen bakterilerden yalnızca *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ve *B. bifidum* bu karbonhidrat üzerinde gelişme göstermiştir. Bu durum KOS'un seçimli olarak sadece bazı bakteriler tarafından kullanıldığını desteklemektedir (SCOTT 2014). Bu özelliği sayesinde KOS'un fruktan oligosakkaritlerden daha üstün olduğu düşünülmektedir. Bu iki bakterinin gelişme miktarı (OD₆₀₀) birbirlerine yakın olmuştur (Tablo 4.6). Bu iki organizma daha sonra otohidroliz likörünün ksilanaz ile muamelesi sonucu elde edilen düşük PD KOS oranı daha fazla olan KOS üzerinde büyütülmüştür. İki bakteri de 24 sa'de bu karbonhidratta daha fazla büyüebilmişlerdir (Tablo 4.6). *B. animalis* subsp. *lactis* öncekine göre 1,42 kat, *B. bifidum* ise 2,3 kat daha yüksek OD₆₀₀ değerine ulaşmışlardır. Bu sonuçlar düşük PD KOS'un *Bifidobacterium* türleri için daha iyi bir karbon kaynağı olduğunu göstermektedir. Gullon vd. (2011) malt endüstrisi atıklarından otohidroliz yolu ile elde ettikleri KOS'u ve bu KOS'un enzimatik hidroliz ile PD'ni düşürdükleri halini fekal kültürde test etmişlerdir. Bizim çalışmamıza uyumlu şekilde, PD düşük olduğunda daha hızlı bir fermantasyon gözlemişlerdir. Wang vd. (2010) buğday kepeğinden elde edilmiş KOS karışımını çeşitli *Bifidobacterium* türleri üzerinde test ettiklerinde en iyi gelişmeyi *B. adolescentis* ile elde etmişlerdir. Bu organizmanın önce PD 3, sonra PD 2, en son da PD 4-7 arası olan KOS'u kullandığını tespit etmişlerdir. İnülin ve fruktooligosakkarit formundaki prebiyotikler için de benzer eğilim gözlenmiştir (Scott vd., 2014). Aynı çalışmada çeşitli bakteriler KOS üzerinde büyütüldüğünde fruktanlarla kıyasla daha az bakterinin büyüebildiği görülmüştür. İki *B. longum* suşundan birinin KOS üzerinde büyürken, diğerinin gelişmemesi ilginç bir sonuçtur (Scott vd., 2014).

Enterik bir bakteri olan *E. coli*'nin de çalışmada elde edilen KOS'ları kullanabilmesi aynı gelişme ortamında (bazal ortam), ancak oksijenli (aerobik) koşullarda, test edilmiştir. Bu organizma otohidroliz ile elde edilen büyük PD KOS üzerinde çok az büyüebilmiştir. OD₆₀₀ değeri *Bifidobacterium*'lara göre düşüktür. Enzimatik hidroliz ile PD azaltılmış KOS (düşük PD KOS) üzerinde ise *Bifidobacterium* türlerinden daha yüksek OD₆₀₀ değerlerine ulaşmıştır (Tablo 4.7).

Bu sonuçlara dayanarak düşük PD KOS her ne kadar *Bifidobacterium* türleri için iyi bir kaynak olsa da *E. coli*'nin de gelişmesine izin verdiği için prebiyotik açıdan olumsuz olarak değerlendirilebilir. Nitekim, düşük PD KOS negatif PAS değeri vermekte, sadece otohidroliz ile üretilmiş KOS ile daha yüksek pozitif bir değer elde edilebilmektedir. Ancak *in vitro*

koşullarda elde edilen sonuçları değerlendirirken *in vivo*'da farklı bir eğilim görülebileceği de göz önüne alınmalıdır. Prebiyotiklerin kullanımı konusunda suşa özel farklar da olabilir. İnsan kolon ortamında hem fiziki ve kimyasal şartlardan dolayı hem de bakterilerin mikrobiyotadaki diğer bakterilerle ilişki içerisinde bulunmaları sebebiyle prebiyotiklerin etkisi farklı olabilir. Daha güvenilir çıkarımlar için prebiyotiklerin *in vitro* fekal kültürlerde, hayvanlarda *in vivo* ve en önemlisi insanlar üzerinde klinik çalışmalarda test edilmesi gerekir.

Tablo 4.7. Bazı *Bifidobacterium* türlerinin ve *E. coli*'nin KOS ve glikoz üzerinde gelişme miktarı ve prebiyotik aktivite skoru (PAS). (OH: otohizoliz, EH: enzimatik hidroliz)

| Bakteri | Glikozda gelişme (OD ₆₀₀) | OH ile üretilen KOS'da gelişme (OD ₆₀₀) | OH ile üretilen KOS'un PAS'ı | OH+EH ile üretilen KOS'da gelişme (OD ₆₀₀) | OH+EH ile üretilen KOS'un PAS'ı |
|---|---------------------------------------|---|------------------------------|--|---------------------------------|
| <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> | 0,918 | 0,158 | 0,107 | 0,225 | -0,647 |
| <i>B. bifidum</i> | 0,860 | 0,142 | 0,100 | 0,327 | -0,512 |
| <i>E. coli</i> | 0,908 | 0,060 | | 0,838 | |

5. SONUÇ

Dünya çapında, kısıtlı miktardaki petrol, kömür gibi kaynaklar yerine, yenilenebilir ve temiz kaynakların kullanılmasına dair yoğun bir çaba vardır. Tarım ve gıda süreçlerinde açığa çıkan lignoselülozik atıklar ve bazı yan ürünler biyo-temelli ürünler için önemli bir kaynaktır. Fındık Türkiye'nin önemli bir ürünüdür ve fındık endüstrisi atıklarının değerlendirilmesi biyo-temelli ürünler için uygun bir kaynak yaratabilir. Buna yönelik olarak, bu çalışmada FK'nin hemiselülozik içeriğinden katma değeri yüksek bir ürün olan KOS elde edilmiştir. Bu lignoselülozik atığın selüloz, lignin ve olası diğer bileşenlerinin de değerlendirilmesiyle ekonomik açıdan uygun bir süreç geliştirmek mümkündür. Örneğin, selüloz enzimlerle hidroliz edilerek fermantasyonlar için karbon kaynağı olarak kullanılabilir, lignin de malzeme endüstrisinde değerlendirilebilir. Türkiye'de tarım endüstrisinin ve dolayısıyla açığa çıkan atıkların miktarının büyüklüğü göz önüne alındığında, bunların ülkemizde biyo-temelli ürün endüstrisi yaratmaktaki potansiyeli görülebilmektedir. Nitekim, bu projede hedef ürün olan KOS'un üretiminde kullanılan hammaddenin tarımsal bir atık olmasının yanında, üretimde kullanılan enzim de önceki bir TÜBİTAK destekli projede (TÜBİTAK-TOVAG 1120521 "Tarımsal Yan Ürünler Kullanılarak *Aureobasidium pullulans* ile Ksilanaz Üretimi İçin Biyoproses Stratejilerinin Geliştirilmesi") ülkemizin tarımsal atıklarının değerlendirilmesiyle elde edilmiştir.

Çalışmamızda fındık üretimi ve işlenmesi sırasında açığa çıkan atıklardan FK, FZ, FBA'nın değerlendirilmesi konu edilmiştir. Atıkların potansiyelini belirlemek için öncelikle bileşimleri ayrıntılı olarak incelenmiştir. Projenin hedef ürünü olan KOS için substrat olan ksilan en fazla

FK'da saptanmıştır. FZ'nin, çözünen maddeler ve protein, FBA'nın ise selüloz açısından zengin olduğu tespit edilmiştir. KOS üretimi için kullandığımız yöntemlerden ilki olan otohizoliz FK'daki ksilanı büyük oranda çözüerek katıdan ayırabilmiş, aynı zamanda ksilanı kısmen hidroliz ederek KOS açığa çıkarmıştır. Otohizolizde kullanılan sıcaklık ve süre KOS üretimi üzerinde önemli bir etki yapmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, FK'dan ksilanının yüksek verimle ayrılması, belirli PD'ye sahip KOS elde edilmesi için otohizoliz şiddetinin dikkatle ayarlanması gerektiği sonucuna varılmıştır. KOS üretimi için uzun yıllardır kullanılan bir diğer yöntem olan enzimatik hidroliz için öncelikle alkali ile ksilanın özütlenmesi denenmiştir. Ancak bu yöntem ile ksilanın yeterli miktarda özütlenememesi, FK'nin lignoselülozik ağının alkaliye çok dirençli olduğunu göstermiştir. Alternatif olarak büyük molekül ağırlığına sahip KOS içeren otohizoliz likörlerinin enzimatik olarak hidroliz edilmesi denenmiştir. Ticari bir ksilanaz ve daha önceki bir proje kapsamında *Auerobasidium pullulans* kullanılarak üretilmiş ksilanaz bu amaçla kullanılmıştır. Yine tarımsal atıklar kullanılarak üretilmiş olan AP ksilanazı ile daha etkili bir hidroliz sağlanmış ve KOS'un PD düşürülmüştür. Bu sonuçlara göre otohizolizin FK'dan KOS elde etmek için etkili bir yöntem olduğu, kısa zincirli KOS elde etmek için ise otohizoliz sonrasında enzimatik hidrolizin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Elde edilen KOS'ların prebiyotik aktivitesini tahmin etmeye yönelik testlerde çeşitli *Bifidobacterium* türleri arasında sadece iki tanesinin KOS'lar üzerinde gelişebildiği, otohizoliz sonrası enzimatik hidroliz ile elde edilen KOS'un gelişmeyi daha fazla desteklediği görülmüştür. KOS'un prebiyotik özelliği konusunda daha fazla fikir edinebilmek için bunların *in vitro* fekal kültürlerde, hayvanlarda ve insanlarda test edilmesi gerekmektedir. Otohizoliz liköründeki yan ürünlerden olan fenolik bileşikler aktif karbona tutundurularak ortamdaki uzaklaştırılabilmiştir. Aktif karbon miktarı artırılarak fenoliklerin tamamına yakını uzaklaştırılabilmiş ancak bu koşulda KOS da bir miktar tutunmuştur. Hedef ürünümüz olan KOS'u kaybetmemek için aktif karbon miktarı sınırlı tutulmuştur. KOS içeren likörleri saflaştırmak için kullanılan ultrafiltrasyon yöntemi büyük molekül ağırlıklı KOS'ları filtrede tuttuğu için filtrasyon sonrası düşük PD KOS oranı yüksek bir KOS çözeltisi elde edilebilmiştir. Ancak küçük molekül ağırlıklı ksilozun ve ayrıca asetik asit ve furfuralın da ortamdaki uzaklaştırılması için ilave süreçlere ihtiyaç vardır. KOS'ların düşük pH ve sıcaklık dayanıklılıklarının yüksek olması ve ayrıca sindirim sistemi koşullarında bozunmadan kalabilmesi FK'dan elde edilen KOS'un gıdalarda kullanılabilmesi açısından ümit vericidir. Hammadde olarak FK kullanıldığından elde edilen ürün koyu renkte olmuştur. KOS'un renkli olması gıdadaki kullanımını kısıtlayabilir. Bu nedenle, bazı gıda uygulamaları için ilave saflaştırma yöntemleriyle rengin giderilmesi gerekebilir.

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(2), 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., Erdogan, K., Bostanci, S. 2009. "Enzymatic production of Xylooligosaccharide from Selected Agricultural Wastes", *Food and Bioproducts Processing*, 87(C2), 145-151.
- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., Yilmaz, L., 2007. "Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Cotton Stalks", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5544-5551.
- Akpinar, O., Erdogan, K., Bakir, U., Yilmaz, L. 2010a. "Comparison of Acid and Enzymatic Hydrolysis of Tobacco Stalk Xylan for Preparation of Xylooligosaccharides", *Lwt-Food Science and Technology*, 43(1), 119-125.
- Akpinar, O., Gunay, K., Yilmaz, Y., Levent, O., Bostanci, S. 2010b. "Enzymatic Processing and Antioxidant Activity of Agricultural Waste Autohydrolysis Liquors", *Bioresources*, 5(2), 699-711.
- Alasalvar C., Hoffman, A. M., Shahidi, F. 2008. "Antioxidant Activities and Phytochemicals in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut by-Products". *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals and Health Effects*. Editörler: Shahidi, F., Alasalvar, C. NW: CRC Press.
- Alasalvar, C., Karamac, M., Amarowicz, R., Shahidi, F. 2006. "Antioxidant and Antiradical Activities in Extracts of Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Green Leafy Cover", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4826-4832.
- Alkaya, E., Akarsoy Altay, T., Başak Ata, A. Ölmez Çakar ,S., Durtaş, P. 2010. "Tarımsal Atıklardan Yüksek Katma Değerli Biyoürün Üretimi". TTGV İleri Teknoloji Projeleri (İtep) Destek Programı Raporu, Hazırlayan: Anonim. Ankara.
- 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.
- Arslan Y., Eken-Saracoglu, N. 2010. "Effects of Pretreatment Methods for Hazelnut Shell Hydrolysate Fermentation with *Pichia stipitis* to Ethanol", *Bioresource Technology*, 101(22), 8664-8670.

- Aydinli, B., Caglar, A. 2012. "The Investigation of the Effects of Two Different Polymers and Three Catalysts on Pyrolysis of Hazelnut Shell", *Fuel Processing Technology*, 93, 1–7.
- Bahcegul, E., Akinalan, B., Toraman, H.E., Erdemir, D., Ozkan, N., Bakir, U. 2013. "Extrusion of xylans extracted from corn cobs into biodegradable polymeric materials", *Bioresource Technology*, 149, 582-585.
- Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K. 1992. "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity". *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.
- Bian, J., Peng, F., Peng, X. P., Peng, P., Xu, F., Sun, R. C. 2013. "Structural Features and Antioxidant Activity of Xylooligosaccharides Enzymatically Produced from Sugarcane Bagasse", *Bioresource Technology*, 127, 236-241.
- Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J. A. 2011. "Prebiotic and Other Health-Related Effects of Cereal-Derived Arabinoxylans, Arabinoxylan-Oligosaccharides, and Xylooligosaccharides", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(2), 178-194.
- Buruiana, C.T., Gomez, B., Vizireanu, C., Garrote, G. 2017. "Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health", *LWT - Food Science and Technology*, 77, 449-459.
- Cara C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E., Girio, F. 2012. "Production, Purification and Characterisation of Oligosaccharides from Olive Tree Pruning Autohydrolysis", *Industrial Crops and Products*, 40, 225-231.
- Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Girio, F. M. 2008. "Hemicellulose Biorefineries: A Review on Biomass Pretreatments", *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67(11), 849-864.
- Carvalheiro, F., Esteves, M. P., Parajo, J. C., Pereira, H., Girio, F. M. 2004. "Production of Oligosaccharides by Autohydrolysis of Brewery's Spent Grain", *Bioresource Technology*, 91(1), 93-100.
- Carvalheiro, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L.C., Girio, F.M. 2009. "Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153, 84–93.
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. d. O., da Silva, D. F., Pastore, G. M. 2013. "Xylo-Oligosaccharides from Lignocellulosic Materials: Chemical Structure, Health Benefits and Production by Chemical and Enzymatic Hydrolysis", *Food Research International*, 51(1), 75-85.

- Celebioglu, H. Y., Cekmecioglu, D., Dervisoglu, M., Kahyaoglu, T. 2012. "Effect of extraction conditions on hemicellulose yields and optimization for industrial processes", *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2597-2605.
- Chapla, D., Pandit, P., Shah, A. 2012. "Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics", *Bioresource Technology*, 115, 215-221.
- Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. 2012. "Prebiotics in Foods", *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 187-191.
- Chen, M.H., Bowman, M.J., Cotta, M.A., Dien, B.S., Iten, L.B., Whitehead, T.R., Rausch, K.D., Tumbleson, M.E., Singh, V. 2016. "Miscanthus x giganteus xylooligosaccharides: Purification and fermentation", *Carbohydrate Polymers*, 140, 96-103.
- Chung, Y. C., Hsu, C. K., Ko, C. Y., Chan, Y. C. 2007. "Dietary Intake of Xylooligosaccharides Improves the Intestinal Microbiota, Fecal Moisture, and pH Value in the Elderly", *Nutrition Research*, 27(12), 756-761.
- Cimino, G., Passerini, A., Toscano, G. 2000. "Removal of Toxic Cations and Cr(VI) from Aqueous Solution by Hazelnut Shell", *Water Research*, 34(11), 2955-2962.
- Conde, E., Moure, A., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2011. "Production of Antioxidants by Non-Isothermal Autohydrolysis of Lignocellulosic Wastes", *Lwt-Food Science and Technology*, 44(2), 436-442.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G. 2008. "Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature", *Food Chemistry*, 110: 659-669.
- Çepelioğullar, Ö., Pütün, A.E., 2014. "Products characterization study of a slow pyrolysis of biomass-plastic mixtures in a fixed-bed reactor", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 110, 363–374.
- Çöpür, Y., Güler, C., Taşçioğlu, C., Tozluoğlu, A. 2008. "Incorporation of Hazelnut Shell and Husk in Mdf Production", *Bioresource Technology*, 99(15), 7402-7406.
- Çöpür, Y., Tozluoğlu, A., Özkan, M. 2013. "Evaluating Pretreatment Techniques for Converting Hazelnut Husks to Bioethanol", *Bioresource Technology*, 129(0), 182-190.
- Demirbas A. 2006. "Furfural Production from Fruit Shells by Acid-Catalyzed Hydrolysis", *Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects*, 28(1-3), 157-165.

Demirbas A. 2008. "Oils from Hazelnut Shell and Hazelnut Kernel Husk for Biodiesel Production", *Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects*, 30(20), 1870-1875.

Egues I., Sanchez, C., Mondragon, I., Labidi, J. 2012. "Effect of Alkaline and Autohydrolysis Processes on the Purity of Obtained Hemicelluloses from Corn Stalks", *Bioresource Technology*, 103(1), 239-248.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. "FAOSTAT".
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Son erişim tarihi: 5 Şubat 2017.

Faryar, R., Linares-Pasten, J.A., Immerzeel, P., Mamo, G., Andersson, M., Stalbrand, H., Mattiasson, B., Karlssona, E.N. 2015. "Production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase", *Food and Bioproducts Processing*, 93, 1-10.

Garrote, G., Parajó, J.C. 2002. "Non-isothermal autohydrolysis of Eucalyptus wood", *Wood Science and Technology*, 36, 111–123.

Garrote G., Cruz, J. M., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2008. "Non-Isothermal Autohydrolysis of Barley Husks: Product Distribution and Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Soluble Fractions", *Journal of Food Engineering*, 84(4), 544-552.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C. 1999. "Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 1101–1109.

Garrote G., Falque, E., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2007. "Autohydrolysis of Agricultural Residues: Study of Reaction Byproducts", *Bioresource Technology*, 98(10), 1951-1957.

Ghaffar, S. H. and Fan, M. 2014. "Lignin in straw and its applications as an adhesive", *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 48: 92-101.

Gibson G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., Roberfroid, M. B. 2004. "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics", *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.

Goksu, E. I., Karamanlioglu, M., Bakir, U., Yilmaz, L., Yilmazer, U. 2007. "Production and characterization of films from cotton stalk xylan". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10685-10691.

Gullon P., Moura, P., Esteves, M. P., Gtrio, F. M., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2008. "Assessment on the Fermentability of Xylooligosaccharides from Rice Husks by Probiotic Bacteria", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7482-7487.

- Gullón, P., Pereiro, G., Alonso, J.L., Parajó, J.C. 2009. "Aqueous pretreatment of agricultural wastes: Characterization of soluble reaction products". *Bioresource Technology*, 100, 5840–5845.
- Gullón, P., Salazar, N., Jesús, M., Muñoz, G., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Parajó, J.C. 2011. "Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks", *BioResources*, 6, 3096–3114.
- Hendriks, A., Zeeman, G. 2009. "Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass", *Bioresource Technology*, 100(1), 10-18.
- Ho, A.L., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Roseiro, L.B., Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. 2014. "Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process", *Bioresource Technology*, 152, 526–9.
- Hongpattarakere, T., Chernong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., Rastall, R. A. 2012. "In Vitro Prebiotic Evaluation of Exopolysaccharides Produced by Marine Isolated Lactic Acid Bacteria", *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Hutkins, R. W. 2007. "Functional Activity of Commercial Prebiotics", *International Dairy Journal*, 17(7), 770-775.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, A., Hutkins, R. W. 2008. "Effect of Processing Conditions on the Prebiotic Activity of Commercial Prebiotics", *International Dairy Journal*, 18(3), 287-293.
- 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.
- Jayapal, N., Samanta, A.K., Kolte, A.P., Senani, S., Sridhar, M., Suresh, K.P., Sampath, K.T. 2013. "Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production", *Industrial Crops and Products*, 42, 14-24.
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. "Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects", *Bioresource Technology*, 199, 103–112.
- Kabel, M.A., Kortenoeven, L., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2002. "In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6205-6210.
- Korakli, M., Gänzle, M. G., Vogel, R. F. 2002. "Metabolism by Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria of Polysaccharides from Wheat and Rye, and Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*", *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 958-965.

- Kumar, R., Hu, F., Hubbell, C. A., Ragauskas, A. J., Wyman, C. E. 2013. "Comparison of Laboratory Delignification Methods, Their Selectivity, and Impacts on Physicochemical Characteristics of Cellulosic Biomass", *Bioresource Technology*, 130, 372-381.
- Kumar, R., Wyman, C. E. 2008. "The Impact of Dilute Sulfuric Acid on the Selectivity of Xylooligomer Depolymerization to Monomers", *Carbohydrate Research*, 343(2), 290-300.
- Ligero, P., van der Kolk, J.C., de Vega, A., van Dam, J.E.G. 2011. "Production of xylo-oligosaccharides from *Miscanthus x giganteus* by autohydrolysis". *BioResources*, 6, 4417–4429.
- Limayem, A., Ricke, S.C. 2012. "Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects", *Progress in Energy and Combustion Science*, 38: 449-467.
- Lin, Y. S., Tseng, M. J., Lee, W. C. 2011. "Production of Xylooligosaccharides Using Immobilized Endo-Xylanase of *Bacillus halodurans*", *Process Biochemistry*, 46(11), 2117-2121.
- Makelainen, H., Juntunen, M., Hasselwander, O. 2009a. "Prebiotic Potential of Xylo-Oligosaccharides". *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Editörler: Charalampopoulos, D., Rastall, R. A. New York: Springer.
- Makelainen H., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., Ouwehand, A. C. 2010b. "Xylo-Oligosaccharides and Lactitol Promote the Growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* Species in Pure Cultures", *Beneficial Microbes*, 1(2), 139-148.
- Melton, L. D., Smith, B. G. 2001. "Determination of the uronic acid content of plant cell walls using a colorimetric assay". *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Editörler: Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. E., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. M., Sporns, P. Wiley.
- Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., Carvalheiro, F. 2013. "Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses", *Industrial Crops and Products*, 50, 145–153.
- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L.C., Carvalheiro, F. 2014. "Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw". *Industrial Crops and Products*, 62, 460–465.
- Montane, D., Nabarlantz, D., Martorell, A., Torne-Fernandez, V., Fierro, V. 2006. "Removal of lignin and associated impurities from xylo-oligosaccharides by activated carbon adsorption", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(7), 2294-2302.

- Montella R., Coisson, J. D., Travaglia, F., Locatelli, M., Bordiga, M., Meyrand, M., Barile, D., Arlorio, M. 2013a. "Identification and Characterisation of Water and Alkali Soluble Oligosaccharides from Hazelnut Skin (*Corylus avellana* L.)", *Food Chemistry*, 140(4), 717-725.
- Montella R., Coisson, J. D., Travaglia, F., Locatelli, M., Malfa, P., Martelli, A., Arlorio, M. 2013b. "Bioactive Compounds from Hazelnut Skin (*Corylus avellana* L.): Effects on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631", *Journal of Functional Foods*, 5(1), 306-315.
- Moura, P., Cabanas, S., Lourenço, P., Gírio, F., Loureiro-Dias, M.C., Esteves, M.P. 2008. "In vitro fermentation of selected xylo-oligosaccharides by piglet intestinal microbiota", *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1952–1961.
- Mussatto S. I., Mancilha, I. M. 2007. "Non-Digestible Oligosaccharides: A Review", *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 587-597.
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P., & Santana, M.H.A. 2015. "A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications". Sustainable degradation of lignocellulosic biomass -techniques, applications and commercialization. Editörler: Chandel, A. K., da Silva, S. S. InTech.
- Nabarlatz D., Farriol, X., Montane, D. 2005. "Autohydrolysis of Almond Shells for the Production of Xylo-Oligosaccharides: Product Characteristics and Reaction Kinetics", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(20), 7746-7755.
- Nabarlatz, D., Ebringerová, A., Montané, D., 2007. "Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides", *Carbohydrate Polymers*, 69, 20–28.
- Nitsos C. K., Matis, K. A., Triantafyllidis, K. S. 2013. "Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass in the Bioethanol Production Process", *ChemSusChem*, 6(1), 110-122.
- Otieno D. O., Ahring, B. K. 2012. "The Potential for Oligosaccharide Production from the Hemicellulose Fraction of Biomasses through Pretreatment Processes: Xylooligosaccharides (XOS), Arabinooligosaccharides (AOS), and Mannooligosaccharides (MOS)", *Carbohydrate Research*, 360, 84-92.
- Parajó, J., Garrote, G., Cruz, J., Dominguez, H. 2004. "Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials", *Trends in Food Science & Technology*, 15, 115–120.

- Pellerin, P., Gosselin, M., Lepoutre, J.P., Samain, E., Debeire, P. 1991. "Enzymatic Production of Oligosaccharides from Corncob Xylan", *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 617-621.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R. 2012. "Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses", *Biotechnology Advances*, 30: 879-903.
- 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.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview", *Renewable Energy*, 37: 19-27.
- Scott, K. P., Martin, J. C., Duncan, S.H., Flint, H. J. 2014. "Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro", *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 30-40.
- Shahidi F., Alasalvar, C., Liyana-Pathirana, C. M. 2007. "Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1212-1220.
- Shen, R., Li, H.Q., Zhang, J., Xu, J. 2016. "Effects of Impurities in Alkali-Extracted Xylan on Its Enzymatic Hydrolysis to Produce Xylo-Oligosaccharides", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(5), 740-752
- Sluiter J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D., Templeton, D. W. 2010. "Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9043-9053.
- 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.
- Sun, S., Wen, J., Sun, S., Sun, R.-C. 2015. "Systematic evaluation of the degraded products evolved from the hydrothermal pretreatment of sweet sorghum stems", *Biotechnology and Biofuels*, 8, 37.
- Teng, C., Yan, Q.J., Jiang, Z.Q., Fan, G.S., Shi, B. 2010. "Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase", *Bioresource Technology*, 101(19), 7679-7682.

- Uçkun Kiran 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, 565-574.
- Vazquez M. J., Alonso, J. L., Dominguez, H., Parajo, J. C. 2000. "Xylooligosaccharides: Manufacture and Applications", *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 387-393.
- Vázquez, M.J., Alonso, J.L., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. "Enhancing the potential of oligosaccharides from corncob autohydrolysis as prebiotic food ingredients", *Industrial Crops and Products*, 24, 152–159.
- Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C. 2002. "Enzymatic processing of crude, xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of Eucalyptus wood", *Food Biotechnology*, 16(2), 91-105.
- Vegas, R., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C., Alvarez, J. R., Luque, S. 2008. "Evaluation of ultra- and nanofiltration for refining soluble products from rice husk xylan", *Bioresource Technology*, 99(13), 5341-5351.
- Wang, J., Sun, B.G., Cao, Y.P., Tian, Y. 2009. "Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH", *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 816-821.
- Wang, J., Sun, B. G., Cao, Y. P., Wang, C. T. 2010. "In vitro fermentation of xylooligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber by Bifidobacteria", *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 419-423.
- Xiao, X., Bian, J., Peng, X.P., Xu, H., Xiao, B., Sun, R.C. 2013. "Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides". *Bioresource Technology*, 138, 63–70.
- Xu Y. X., Sismour, E. N., Parry, J., Hanna, M. A., Li, H. W. 2012. "Nutritional Composition and Antioxidant Activity in Hazelnut Shells from Us-Grown Cultivars", *International Journal of Food Science and Technology*, 47(5), 940-946.
- Zhao, X., Dong, C. 2016. "Extracting xylooligosaccharides in wheat bran by screening and cellulase assisted enzymatic hydrolysis", *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 748-752.
- Zilliox, C., Debeire, P. 1998. "Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies", *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1), 58-63.

Yegin, S. 2017a. "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.

Yegin, S. 2017b. "Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization, and application in saccharification of lignocellulosic biomass", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI: 10.1080/10826068.2016.1224245.

Yegin, S., Buyukkileci, A. O., Sargin, S., Goksungur, Y. 2017. "Exploitation of Agricultural Wastes and By-Products for Production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 Xylanase: Screening, Bioprocess Optimization and Scale Up", *Waste and Biomass Valorization*, 8(3), 999-1010.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

| | |
|---|--|
| Proje Yürütücüsü: | Yrd. Doç. Dr. ALİ OĞUZ BÜYÜKKİLECI |
| Proje No: | 213O126 |
| Proje Başlığı: | Otohidroliz Ve Enzimatik Hidroliz Kullanarak Fındık Atıklarından Prebiyotik Olarak Kullanılabilecek Ksilooligosakkarit Üretimi |
| Proje Türü: | Uluslararası |
| Proje Süresi: | 36 |
| Araştırmacılar: | SIRMA YEĞİN |
| Danışmanlar: | AHMET YEMENİCİOĞLU |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B. |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: | 15/03/2014 - 15/03/2017 |
| Onaylanan Bütçe: | 327870.0 |
| Harcanan Bütçe: | 274297.44 |
| Öz: | <p>Fındık Türkiye'nin en önemli tarım ürünlerinden biridir ve Türkiye fındık üretiminde dünya lideridir. Fındığın üretimi ve işlenmesi sırasında çeşitli lignoselülozik atıklar açığa çıkmaktadır ve ancak bu atıklar ekonomik olarak değerli ürünlere dönüştürülmemektedir. Bu çalışmada, fındık kabuğu (FK), züruf ve budama atığı dalların yapısal bileşimi belirlenmiş ve çalışmanın hedef ürünü olan ksilooligosakkarit (KOS) üretimi için en uygun atık olarak FK seçilmiştir. FK'deki hemiselülozik polisakkarit ksilan, otohidroliz yöntemiyle hidroliz edilerek KOS elde edilmiştir. Otohidroliz sıcaklığı ve süresi FK'den ayrılan ksilan miktarını, elde edilen KOS'un verimini, polimerleşme derecesini (PD) ve termal bozunma ürünlerinin miktarını önemli derecede etkilemiştir. KOS veriminin yüksek olduğu koşulda elde edilen otohidroliz liköründeki büyük molekül ağırlıklı KOS, ksilanaz ile hidroliz edilerek düşük PD'ye sahip KOS (PD küçüktür 6) elde edilmiştir. Likörlere aktif karbon uygulanarak fenolik maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Ultrafiltrasyon ile likördeki büyük molekül ağırlıklı KOS uzaklaştırılmış, böylece düşük PD'ye sahip KOS'un oranı artırılmıştır. KOS'lar çalışmada test edilen gıda üretim koşullarına ve sindirim sistemi ortamına dayanıklılık göstermiş ve yapısını büyük oranda koruyabilmiştir. Bifidobacterium animalis subsp. lactis ve Bifidobacterium bifidum hem otohidroliz ile elde edilen hem de enzimatik olarak elde edilen KOS üzerinde gelişebilmişlerdir. Enzimatik hidrolizat ile daha yüksek bir büyüme görülmüştür. Proje kapsamında yapılan çalışmalar FK'nin prebiyotik olarak kullanılma potansiyeli olan KOS üretimi için uygun bir hammadde olduğunu göstermiştir. Ksilan ile birlikte FK'nin selüloz, lignin, fenolik maddeler gibi diğer bileşenleri de biyofineri yaklaşımıyla değerlendirilebilir, böylece bu atık biyo-temelli ürünlerin üretimi açısından sürdürülebilir bir hammadde olarak kabul edilebilir.</p> |
| Anahtar Kelimeler: | fındık atıkları, fındık kabuğu, ksilooligosakkarit, prebiyotikler, otohidroliz, ksilanaz, ksilan |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?: | Hayır |
| Projeden Yapılan Yayınlar: | 1- Prebiotic oligosaccharide production from hazelnut (Corylus avellana L.) wastes (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 2- AUTOHYDROLYSIS OF HAZELNUT SHELL FOR XYLOOLIGOSACCHARIDE PRODUCTION (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 3- Enzymatic Processing Of Hazelnut Shell Autohydrolysis Liquor For Production Of Prebiotic Xylooligosaccharides (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), 4- Valorization Of Hazelnut Wastes By Production Of Prebiotic Oligosaccharide And Bioethanol (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum), |