

**HAŞHAŞ SAPININ ŞEKERLERE ENZİMATİK HİDROLİZİ VE
KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

Nuray UZUNLU
Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Eylül, 2014

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1204F061**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nuray Uzunlu'nun ‘ ‘ Haşhaş Sapının Şekerlere Enzimatik Hidrolizi ve Kinetiğinin İncelenmesi ‘ ‘ başlıklı Kimya Mühendisliği Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 18.09.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisans Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Berrin BOZAN

Üye : Prof. Dr. Nuran AY

Üye : Doç. Dr. Müfide BANAR

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Enstitü Müdürü



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HAŞHAŞ SAPININ ŞEKERLERE ENZİMATİK HİDROLİZİ VE KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Nuray UZUNLU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Berrin BOZAN
2014, 67 sayfa

Bu çalışmada, haşhaş sapına fermente şeker eldesi için alkali ön işlem uygulanmış ve ön işlem parametrelerinin, NaOH konsantrasyonu (% 1,0–3,0 w/v), ön işlem sıcaklığı (60-90 ° C) ve ön işlem süresinin (30-90 dak), glukoz geri kazanımı, lignin giderimi, selüloz geri kazanımı üzerine etkileri Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) kullanılarak incelenmiştir. Selüloz kazanımı başlangıç hammaddesindeki selüloz miktarına göre % 61,02-%99,14 arasında değişmektedir. En yüksek lignin giderimi (% 43,43), 90 °C, % 3,50 NaOH ve 90 dak. ön işlem koşulları altında elde edilmiştir. Maksimum glukoz verimi için optimum ön işlem koşulları % 2,40 w/v NaOH, 70 dak. ve 80 °C olarak bulunmuştur. Bu koşullarda, deneysel glukoz ve ksiloz verimi sırasıyla 499,35 mg /g selüloz ve 498,66 mg ksiloz / g ksiloz olarak bulunmuştur. Bu çalışmada enzimatik hidroliz kinetiği Michaelis-Menten ve difüzyon limitli kinetik yöntemleri ile modellenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Haşhaş sapı, Alkali ön işlem, Enzimatik hidroliz, Biyoetanol

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF POPPY STRAW TO SUGARS AND ANALYSIS OF ITS KINETICS

Nuray UZUNLU

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemical Engineering Program**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Berrin BOZAN
2014, 67 pages**

At this study response surface methodology (RSM) was employed to optimize dilute alkaline pretreatment condition for maximum glucose yield of poppy stalk with respect to NaOH concentration (1.0–3.0%, w/v), pretreatment temperature (60–90°C) and pretreatment time (30–90 min). Recovery of cellulose ranged from 61.02% to 99.14% based on the initial cellulose content in the raw material. The highest lignin removal (43.43 %) was obtained at the pretreatment conditions of 90 °C, 3.50% NaOH for 90 min. The optimum pretreatment conditions for maximum glucose yield after enzymatic hydrolysis were found as 2.40% w/v NaOH, 70 min, and 80 °C. At this condition, experimental glucose and xylose yields were found as 499.35 mg/g glucan, and 498.66 mg xylose/ g xylan, respectively. Enzymatic hydrolysis kinetics of pretreated poppy stalks was also modelled based on the Michaelis-Menten and diffusion limited kinetic models.

Keywords: Poppy Straw, Alkali Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının planlanmasında, araőtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalıőmamı bilimsel temeller ışığında őekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Berrin BOZAN'a,

Çalıőmamda bu kadar kısa sürede sonuç elde edip ilerlememe büyük katkısı olan ve bıkmadan usanmadan benimle ilgilenen sayın hocam Araő. Gör. Zafer HOŐGÜN'e,

Tez çalıőmam boyunca destek ve ilgileriyle her zaman yanımda olduklarını gösteren değerli ailem ve arkadaşlarıma;

Bu çalışmaya katkılarını esirgemeyen Toprak Mahsülleri Ofisine,

Sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Haşhaş (<i>Papaver somniferum</i> L.) Üretimi ve Kullanım Alanları.....	4
2.2. Lignoselülozik Biyokütle	5
2.2.1. Selüloz	6
2.2.2. Hemiselüloz	8
2.2.3. Lignin.....	8
2.3. Lignoselülozik Biyokütleyle Uygulanan Ön İşlemler	9
2.3.1. Mekanik ön işlemler	10
2.3.2. Fizikokimyasal ön işlemler.....	11
2.3.3. Kimyasal ön işlemler	12
2.4. Enzimatik Hidroliz	14
2.3.1. Enzimatik hidrolizi etkileyen faktörler.....	17
2.5. Basit Enzim Kinetiği	24
2.5.1. Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi	27

2.5.2. Enzim reaksiyonlarının inhibisyonu Michaelis-Menten eşitliğinden sapmalar	28
2.6. Selülozun Glukoza Hidroliz Kinetiği Modelleri	29
2.6.1. Deneysel modeller	30
2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1. Materyal.....	36
3.2. Yöntem	36
3.2.1.Hammadde hazırlanması	36
3.2.2. Nem tayini (%)	36
3.2.3. Kül tayini (%).....	36
3.2.4. Ekstraktif madde (%).....	37
3.2.5. Lignin tayini.....	37
3.2.6. HPLC analizi	38
3.2.7. Hammaddeye uygulanan alkali ön işlem.....	38
3.2.8. Enzimatik hidroliz	39
3.2.9. İndirgen şeker analizi.....	39
3.2.10. Ön işlem görmüş ve ön işlem uygulanmamış haşhaş sapı örneklerinin SEM analizi.....	39
3.2.11. Sodyum hidroksit ön işlem parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi optimizasyonu.....	40
3.2.12. Ön işlem görmüş haşhaş saplarının enzimatik hidroliz verilerinin modellenmesi	41
4. DENEYSEL BULGULAR	44
4.1. Haşhaş Sapının Kimyasal Bileşimi	44

4.2. Katı Geri Kazanımı, Lignin Giderimi ve Selüloz ve Ksilozun Kazanımında Ön İşlemin Etkisi.....	44
4.3. Selüloz Ve Ksiloz Kazanımında Ön İşlem Parametrelerinin Etkisi	48
4.4. Glukoz Kazanımının Maksimize Edecek Parametrelerin Optimizasyonu	51
4.5. Ön işlem görmüş ve ön işlem uygulanmamış haşhaş sapı örneklerinin SEM analizleri	52
4.5.1. Ön işlem görmüş haşhaş saplarının enzimatik hidroliz verilerinin modellenmesi	53
5. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER	60
6. KAYNAKLAR	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Lignoselülozik maddenin yapısı.....	5
2.2. Selülozun hammadde olarak kullanım olanakları	7
2.3. Selülozun molekül yapısı	7
2.4. Hemiselüloz zinciri.....	8
2.5. Ligninin kimyasal yapısı	9
2.6. Enzim-Substrat kompleksinin oluşumunda anahtar-kilit modeli	15
2.7. Selülozdan glukoz oluşum reaksiyonu	16
2.8. Enzim katalizörlüğünde substrat ve ürün konsantrasyonunun zamanla değişimi	24
2.9. Substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızının değişimi	27
4.1. Uzaklaştırılan ligninin (%) (A) selüloz kazanımı (%) (B) ve ksiloz kazanımının (%) (C) sıcaklık (°C), zaman (dak.) ve NaOH (%w/v) etkisinin Yanıt-Yüzey Grafiği	47
4.2. Yanıt-Yüzey grafiğinde selüloz kazanımının (mg/g başlangıç selüloz) sıcaklık (°C), zaman (dk) ve NaOH (%w/v) etkileşimli etkisinin Yanıt Yüzey Grafiği	51
4.3. Ön işlem görmemiş (A) ve 3% NaOH, 60 °C ve 30 dak. ön işlem görmüş (B) haşhaş sapının SEM görününtüsü	52
4.4. Alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının başlangıç enzimatik hidroliz hızına (deneysel ve farklı yaklaşımlarla çözülen Michaelis-Menten modelinden hesaplanan) başlangıç enzim konsantrasyonunun etkisi.....	53

4.5. Alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının başlangıç enzimatik hidroliz hızına (deneysel ve farklı yaklaşımlarla çözülen Michaelis-Menten modelinden hesaplanan) başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi	54
4.6. 0,005 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi	56
4.7. 0,010 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi	56
4.8. 0,020 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi	57
4.9. 0,030 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi	57
4.10. 0,040 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi.....	58
4.11. 0,050 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Türkiye'nin yıllık biyokütle potansiyeli	2
2.1. Lignoselülozik maddelerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri	6
3.1. Sodyum hidroksit ön işleminde incelenen parametreler ve seviyeleri	40
3.2. Sodyum hidroksit ön işleminde bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu.....	41
4.1. Hammadde karakterizasyonu	44
4.2. Katı Geri Kazanımı (Katı G.K.), Lignin Giderimi ve Selüloz ve Ksilozun Kazanımının deneysel verileri	45
4.3. Lignin giderimi ve selüloz ve ksilozun kazanımının Yanıt Yüzey- İkili Modeli İçin ANOVA Testi	46
4.4. Deneysel ¹ ve modelden ² bulunan glukoz (mg/g selüloz) ve ksiloz (mg/g ksiloz) verimleri	49
4.5. Selüloz ve ksiloz ikili modelinin yanıt yüzey analizi için Anova	50
4.6. Enzim konsantrasyonu değişimine göre Michaelis-Menten sabitleri.....	53
4.7. Substrat konsantrasyonu değişimine göre Michaelis-Menten sabitleri	54
4.8. Difüzyon limitli kinetik modeli sabitleri	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

E	:Enzim
S	: Subsrat
ES	: Enzim-Subsrat kompleksi
P	: Ürün
t	: Zaman
k	: Hız Sabiti
v_{max}	: Maksimum hız
r	: Reaksiyon hızı
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
NREL	: National Renewable Energy Laboratories
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
n	: Sistemin yapısına bağlı yapısal difüzyon direnç sabiti
YYY	: Yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology,RSM)
CDD	: Merkezi tümleşik istatistiksel tasarım
FPU	: Filtre kağıdı ünitesi (Filter paper unit)
DNS	: Dinitro Salisilik Asit
UV	: Ultraviyole Ölçüm Cihazı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lignoselülozlar, biyokütlenin içinde yaygın olarak bulunan organik bileşiklerdir. Orman atıkları, tarımsal atıklar, evsel ve endüstriyel atıklar öncelikli lignoselülozik biyokütle kaynaklarıdır. Lignoselülozik atıkların değerlendirilerek katma değeri yüksek ürüne dönüştürülmesi çalışmaları özellikle son yıllarda önem kazanmıştır.

Lignoselülozik hammaddeler içermiş olduğu bileşenlerin parçalanma ürünleri olan şekerler (sakkaritler), biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde önemli substrat kaynaklarıdır. Günümüzde enerji darboğazı nedeniyle alternatif enerji kaynaklarına yönelik sonucunda, özellikle petrole bağımlı ürünlerin yerini alabilecek ürünlerin geliştirilmesinde lignoselülozik hammaddeler önemli bir yer tutmaktadır. Bu ürünlerin başında özellikle selülozun hidrolizi ile elde edilen şekerlerin (fermente şekerler) fermantasyonu ile üretilen ve sıvı yakıtlarda katkı maddesi olarak kullanılan biyoetanol gelmektedir.

Bulunduğu biyokütleyle bağlı olarak lignoselülozik biyokütlenin yaklaşık %20-50'sini selüloz, %20-25'ini hemiselüloz, %20-30'unu ise lignin oluşturmaktadır (Lee, 1997; Sun ve Cheng, 2002). Biyokütlede bulunan selülozdan fermente şeker üretimi için zayıf ve kuvvetli asitlerle hidroliz ve enzimatik/mikrobiyolojik hidroliz işlemleri uygulanmaktadır. Asitlerle hidroliz işlemi, kullanılan asitin geri kazanımı ve çevresel faktörlerden dolayı tercih edilmemektedir. Bu teknolojinin yerine, son yıllarda biyoteknolojideki gelişmeye bağlı olarak yeni mikroorganizmaların geliştirilmesi ve yeni enzimlerin üretilmesi ile birlikte, lignoselülozdan şeker üretiminde enzimatik/mikrobiyal hidroliz kullanılmaktadır. Ancak direkt olarak enzimin kullanıldığı işlemlerde hidroliz süresi çok uzun ve şeker verimi ise düşüktür. Lignoselüloz yapısındaki lignin, enzimin selüloza erişimine engel teşkil etmekte ve enzimin kristal haldeki selülozu monomerlere dönüştürme yüzdesini düşürmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal/enzimatik hidroliz işleminden önce hammaddeye bazı ön işlemlerin uygulanması gerekmektedir. Bu işlemlerin temel amacı; lignini ve hemiselülozu uzaklaştırmak, selülozun kristal yapısını bozmak ve lignoselülozik biyokütlenin porozitesini artırmaktır. Mikrobiyal/enzimatik hidroliz işlemi başlıca küf

mantarları ve bakteriler olmak üzere lignoselülotik mikroorganizmalarla ve bunların ürettikleri enzimlerle (selülaz, ksilanaz vb.) gerçekleşmektedir (Cullen ve Kersten, 1992).

Türkiye'nin yıllık biyokütle potansiyeli yaklaşık 30 milyon ton petrol eşdeğeridir (T.C. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı Yenilenebilir Enerji Genel Müdürlüğü Biyokütle Enerjisi Potansiyeli Atlası, <http://bepa.yegm.gov.tr/>). Bu değer yaklaşık olarak %50'sine bitkisel atıkların değerlendirilmesi ile erişilebilmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Türkiye'nin yıllık biyokütle potansiyeli (<http://bepa.yegm.gov.tr/>)

Nüfus :	75.627.384,00
Toplam Hayvan Sayısı (Adet) :	362.734.882,00
Hayvansal Atık Miktarı (ton/yıl) :	156.759.836,61
Hayvansal Atıkların Enerji Değeri (TEP/yıl) :	1.323.714,67
Bitkisel Üretim Miktarı (ton/yıl) :	142.418.566,47
Bitkisel Atık Miktarı (ton/yıl) :	142.441.285,37
Bitkisel Atıkların Enerji Eşdeğeri (TEP/yıl)	15.941.321,26
Kentsel Katı Atık Miktarı (ton/yıl) :	29.618.188,14
Kentsel Organik Atıkların Enerji Değerleri (TEP/yıl) :	2.186.228,09
Orman Atıklarının Enerji Değeri (TEP / yıl) :	855.805,00
Atıkların Toplam Enerji Eşdeğeri (TEP/yıl) :	20.307.069,02
Biyodizel İşleme Lisansı Sahibi Firmaların Sayısı :	24
Biyometanol İşleme Lisansı Sahibi Firmaların Sayısı :	3
Biyokütle Kaynaklı Elektrik Üretim Santral Sayısı :	42

Anavatanı Anadolu olan ve ülkemiz için büyük bir öneme sahip olan haşhaş (*Papaver somniferum* L.) bitkisinden ekonomik değeri olan kapsül ve tohum olmak üzere iki önemli ürün elde edilmektedir. Haşhaş kapsülleri alkaloid üretimi için, tohumları ise yağ üretiminde kullanılmaktadır. Devlet kontrolünde yaklaşık olarak 54911 hektarlık (TÜİK, 2011) yasal yetiştirme alanında üretimi yapılan haşhaş bitkisinin %50 si haşhaş sapından oluşmaktadır (Laughlin 1978); ki bu değer yaklaşık olarak yıllık 100.000 ton haşhaş sapına denk gelmektedir. Haşhaş sapsuları ya direkt olarak tarlada yakılmakta ya da evlerde ısınma amaçlı

kullanılmaktadır. Dolayısı ile haşaş sapları fermente şekerlerin üretimi için uygun bir tarımsal lignoselülozik atıktır.

Bu çalışmada, öncelikle haşaş saplarına sodyum hidroksit ön işlem parametreleri yanıt yüzey yöntemi kullanılarak selülozun glukoz verimi üzerinden optimize edilmiştir. Çalışmada ayrıca enzimatik hidroliz kinetiği incelenmiş ve verilerin basit kinetik modellere uyumluluğu gözlenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Haşhaş (*Papaver somniferum L.*) Üretimi ve Kullanım Alanları

Dünya üretiminin %48'lik gibi büyük bir payına sahip olan ülkemizde Birleşmiş Milletler Teşkilatınca verilen 700.000 dekar limit dahilinde geleneksel olarak tarımı yapılan haşhaş, *Papaver somniferum L.* türü olan tek yıllık bir kültür bitkisidir. Kışlık ve yazlık olarak ekilmekte olup kışlık ekim yörelere göre bazı farklılıklar göstermekle birlikte Ekim ayının ilk haftasında, yazlık ekim ise Mart ayı sonu Nisan ayı başında yapılmaktadır (TÜİK, 2011). Haşhaş bitkisi 700–1200 metre yükseklikte, organik maddece zengin topraklarda en iyi şekilde yetişmektedir. Toprağın yapısı ve besin muhtevasına bağlı olmakla birlikte iyi bir gelişme ve verim için dekara 3 kg saf fosfor ve 8–10 kg saf azot içeren kimyevi gübreleme yeterli olmaktadır.

Haşhaşın milletlerarası ününü sağlayan ihtiva ettiği morfin ve diğer alkaloidlerden kaynaklanan tıbbi özelliğidir. Haşhaş kapsülünün morfin, kodein, tebain, noskapin ve papaverin gibi tıbbi öneme sahip olan ana alkaloidlerin yanı sıra yaklaşık 30 değişik alkaloid ihtiva ettiği bilinmektedir. Bunlardan türevleri olan katma değerleri yüksek, yarı sentetik ilaç aktif hammaddeleri üretilmektedir. Bu alkaloidlerden morfin, kodein ve tebainin uyuşturucu özelliği olmasına rağmen noskapin ve papaverin uyuşturucu özelliğe sahip değildir (Haşhaş Tarımı, www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1003). Tıpta; analjezik (ağrı kesici), anestezi (uyuşturucu) ve antitüssif (öksürük kesici) olarak bu maddelerden yararlanılmaktadır.

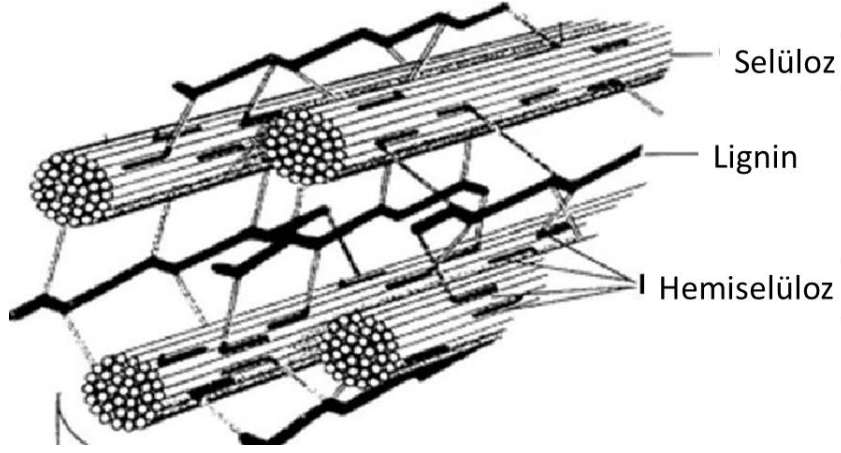
Haşhaş tohumları gri-mavi, sarı, beyaz, çiğ kahve ve pembe renklere olabilmektedir. Türkiye'de en fazla yetiştirilen haşhaşlar sırasıyla beyaz, mavi ve sarı tohumlu çeşitlerdir. Üretilen haşhaş tohumlarından bir kısmı çiftçi ihtiyaçları için ayrılmakta geri kalan kısmı ise serbest piyasada işlem görmektedir. Haşhaş tohumunun en önemli özelliği % 45–54 yağ ve % 20–30 protein içeriğine sahip olmasıdır (Haşhaş Tarımı, www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1003). Tohum geleneksel olarak gıda amaçlı ekmelerde ve ezilerek hamur işlerinde kullanılmaktadır. Tohumun preslenmesi ile elde edilen yağ mutfakta ve gıda

sanayisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik ve boya sanayinde de kullanıldığı bilinmektedir.

Haşhaş sapları evlerde yakacak olarak ya da hayvansal yem olarak kullanılmaktadır. Bunun yerine katma değeri yüksek, çevre için emisyon nedeni olmayacak biyoetanol üretiminin hammaddesi olması olasıdır.

2.2. Lignoselülozik Biyokütle

Bütün lignoselülozik biyokütlelerin temel yapısı üç temel polimerden oluşmaktadır: Bunlar selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Şekil 2.1'de bu üç temel bileşiğin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Lignoselülozik maddenin yapısı (Li ve Liu, 2010)

Bu üç temel yapı her bitkide farklı oranlarda olacağı gibi, aynı zamanda aynı bitkinin farklı toprak ve iklim koşullarına göre de değişmektedir. Çizelge 2.1.'de bu değişim, bitki çeşidine göre gösterilmiştir.

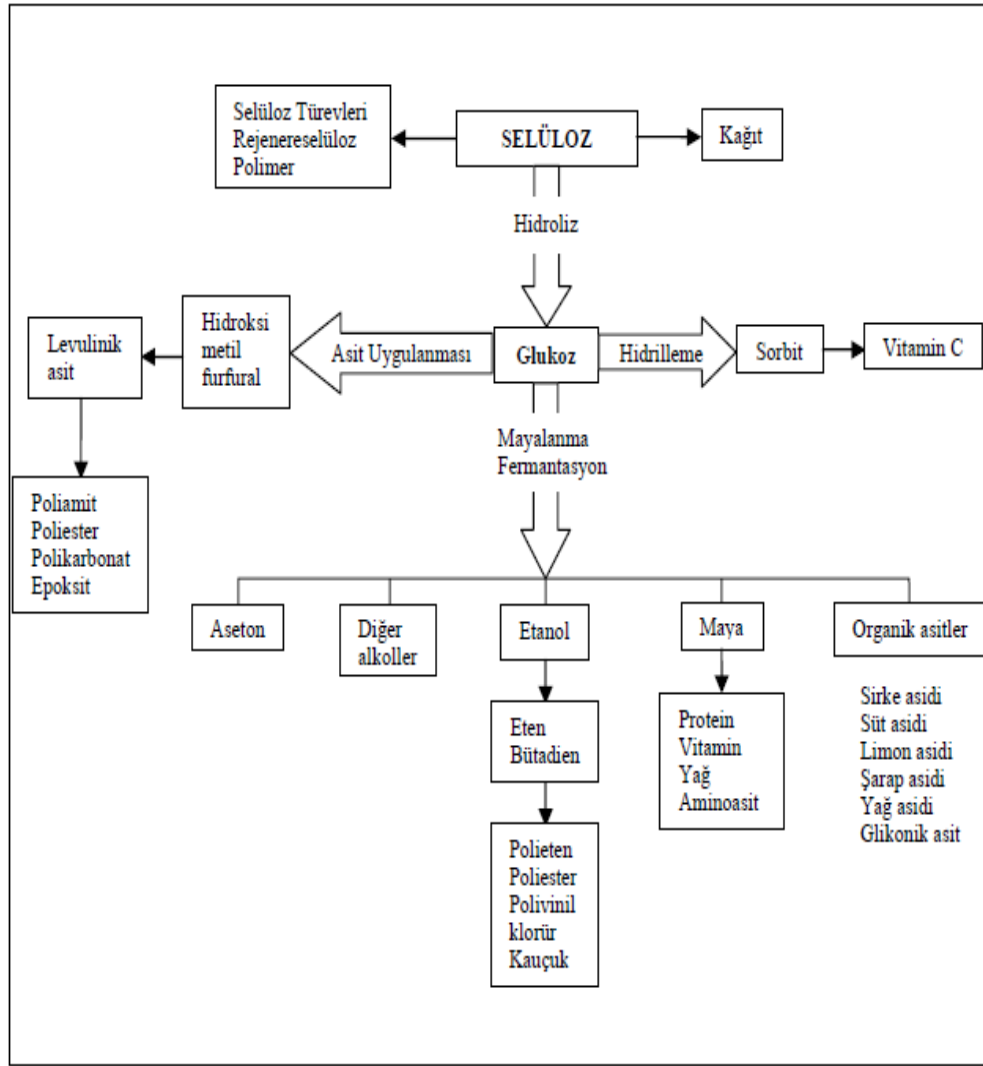
Çizelge 2.1. Lignoselülozik maddelerin selüloz, hemiselüloz ve lignin içerikleri (Sun ve Cheng, 2002)

Lignoselülozik Biyokütle	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Sertsı Yapılar	40–55	24–40	18–25
Yumuşak Yapılı	45–50	25–35	25–35
Fındık Kabuğu	25–30	25–30	30–40
Mısır Koçanı	45	35	15
Otlar	25–40	35–50	10–30
Kağıt	85–99	0	0–15
Buğday Samanı	30	50	15
Evsel Atıklar	60	20	20
Yapraklar	15–20	80–85	0
Pamuk Tohumu	80–95	5–20	0
Gazete	40–55	25–40	18–30
Kimyasal Hamurların Atık Kağıtları	60–70	10–20	5–10
Çimler	45	31,4	12,0

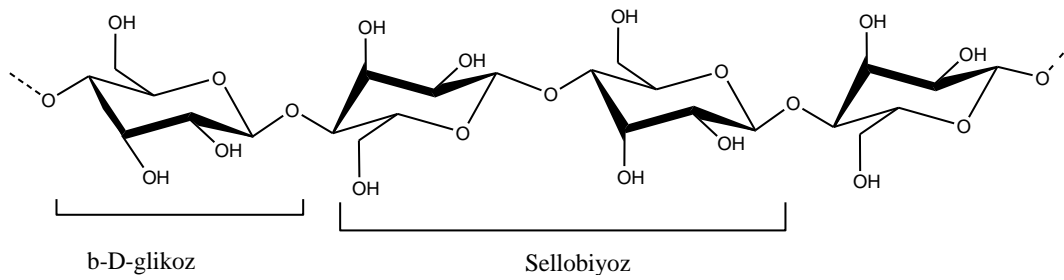
2.2.1. Selüloz

Selüloz, makromoleküler iskelet yapısıyla bütün bitkisel hücrelerden elde edilebilen önemli bir doğal üründür. Krassing, 1993'te bitki dünyasındaki toplam selüloz miktarının 26,5x10¹¹ ton olduğunu belirtmiştir. Selüloz bir çok alanda kullanılmaktadır. Hidroliz işlemi sonucunda kendi yapıtaşı olan glukozun elde edilmesinin yanı sıra lif maddesi ve kağıt fabrikasyonu hammaddesi olarak kullanılmasıyla önem taşımaktadır (Tanrıverdi, 2004). Şekil 2.2'de selülozun hammadde olarak kullanım yerleri gösterilmiştir.

Doğrusal yapı gösteren selüloz molekül zinciri birbiriyle (1,4)-glukozidik bağlanmış β -D-Glukoz birimlerinden oluşmaktadır (Dinçtürk, 2007). Şekil 2.3'de bu yapı gösterilmiştir. Selüloz bulunduğu bitkiye bağlı olmaksızın aynı kimyasal yapıya (D-glukopironoz ünitelerinin doğrusal polimerleri) sahiptir (Mengeloğlu ve Alma, 2002).



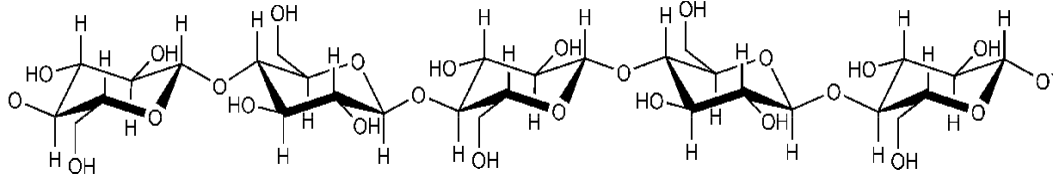
Şekil 2.2. Selülozun hammadde olarak kullanım olanakları (Tanrıverdi, 2004).



Şekil 2.3. Selülozun molekül yapısı

2.2.2. Hemiselüloz

Polyozlar olarak da adlandırılan hemiselülozlar çoğunlukla ağaçlar ve kara bitkilerinde büyük miktarlarda sentezlenen kompleks bitki polisakaritlerinin bir grubudur (Dinçtürk, 2007). Hemiselülozlar farklı şeker gruplarından oluşmaları, düşük polimerizasyon dereceleri, dallanmışlıkları, kristal olmayışları, hidroksil gruplarının çokluğu gibi özellikleri ile selülozlardan farklıdır.



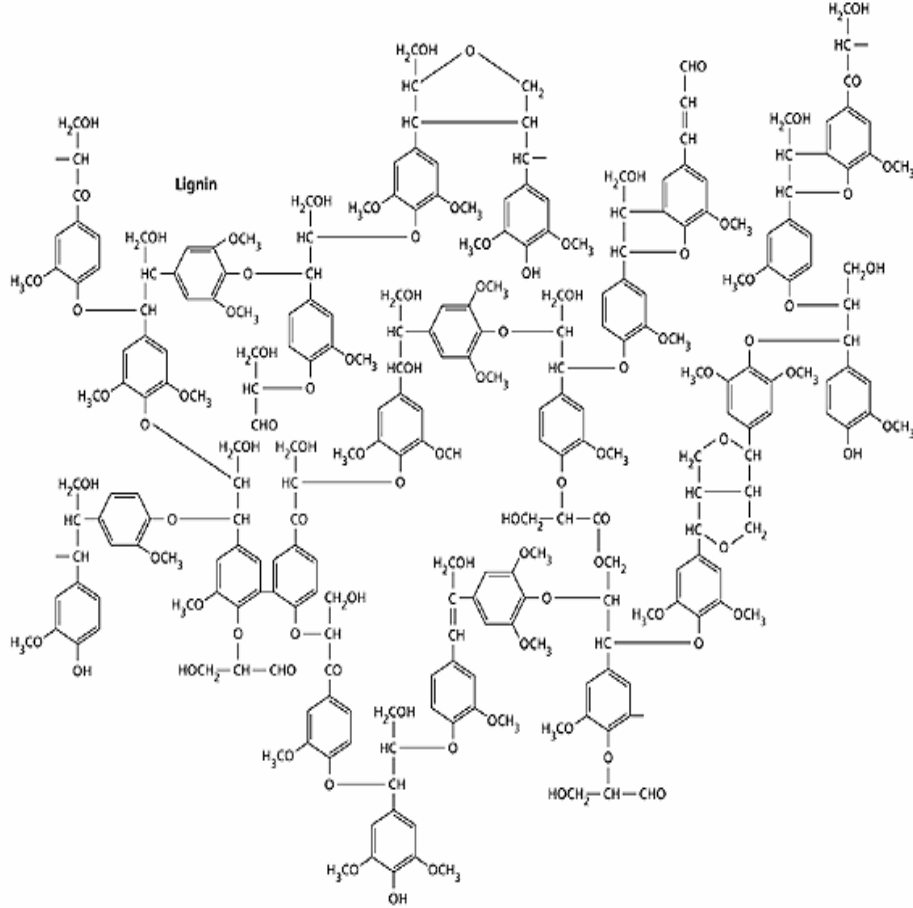
Şekil 2.4. Hemiselüloz zinciri

Hemiselülozlardan ksilozlar, yapraklı ağaç odunlarında en fazla miktarda bulunan selülozik olmayan polisakaritlerdir. Ksilozlar; lineer homoksilanlar, arabinoksilanlar, glukouronoksilanlar ve glukouronoarabinoksilanlar olarak karakterize edilirler. İğne yapraklı ağaçlarda ise galaktoglukomannanlar ve glukomannanlar ana hemiselüloz bileşenleri olup ksilozlar az miktarda bulunmaktadır. Çoğu sert odun hemiselülozlarında en baskın pentoz şekeri ksiloz iken, enerji ürünleri olarak ifade edilen otsul bitkiler ve tarımsal atık hemiselülozlarında ise en baskın şeker arabinoz olabilmektedir. Bu ise biyoetanol üretimi için kullanılan hammadde ve bu hammadde içeriğinin önemini göstermektedir (Çöpür ve ark., 2011).

2.2.3. Lignin

Selülozdan sonra bitki dünyasında en fazla bulunan doğal polimer lignindir. Hücre çeperindeki esas görevi, yapıştırıcı özelliğinden dolayı selüloz liflerini bir arada tutmak olarak özetlenebilir. Ligninin polimerik yapısının büyük kısmını; sinapil, p-kumaril ve koniferil alkollerini oluşturur. Bu yapıtaşlarındaki reaktif gruplar, alifatik veya aromatik hidroksil gruplarının reaksiyonu ile oldukça karmaşık üç boyutlu kompleks bir fenilpropan polimeri şeklinde lignin makro

molekülünü oluşturmaktadır. Lignin yapısındaki ve miktarındaki farklılıklar bitki grupları ve türleri arasında farklılık arz etmekte olup ayrıca bitkinin yaşı, hücre tipi ve tek bir hücrenin farklı kısımlarında da farklılık göstermektedir (Çöpür ve ark., 2011).

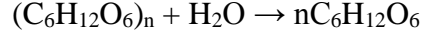


Şekil 2.5. Ligninin kimyasal yapısı (Kireççi, 2006)

2.3. Lignoselülozik Biyokütleğe Uygulanan Ön İşlemler

Lignoselülozun fermente şekerlere hidrolizini sınırlayan selülozun sindirilebilirliği başlıca fiziko-kimyasal, yapısal ve kompozisyon faktörleriyle engellenmesi nedeniyle problemlidir. Yapısal karakteristiklere bağlı olarak, hidroliz adımıyla fermente şeker elde etmek için en önemli adım olan ön işlem, lignin yapısını ve hidroliz sırasında enzimlerin selüloza daha kolay ulaşabilmesi için selülozun kristal yapısını bozar (Alvira ve ark., 2010).

Ön işlemin ardından biyokütlenin fermente edilebilir şekerlere dönüşümünde gerekli olan ikinci adım su molekülünün ilavesiyle ana molekülün koparılmasını ifade eden hidroliz işlemidir.



reaksiyonunda gösterildiği gibi selüloz seyreltik asit, konsantre asit veya selüloz enzimi yoluyla katalizlenir (Çöpür ve ark., 2011). Seyreltik asit hidrolizi, şeker üretimini takip eden selülozun konsantre asit dekristalizasyonuna dayanır. Daha sonra fermentasyon işlemi ile şeker etanole dönüştürülür (Mielenz, 2001).

Lignoselülozik biyokütleyle uygulanan ön işlemler mekanik, fizikokimyasal, kimyasal ve biyolojik ön işlemler olmak üzere dört grup altında değerlendirilebilir.

2.3.1. Mekanik ön işlemler

Mekanik ön işlemin amacı: lignoselülozun tanecik boyutunu ve kristalizesini azaltmak, diğer bir deyişle spesifik yüzey alanını arttırmak ve polimerizasyon derecesini azaltmaktır. Bu, materyalin boyutuna bağlı olarak doğrama (10-30 mm) ve öğütmenin (0.2-2 mm) kombinasyonlarıyla yapılır (Sun ve Cheng, 2002). Farklı öğütme prosesleri (bilyeli, iki merdaneli, darbeleri, kolloit öğütücülü, vibrasyon enerjili öğütücü) lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizinin geliştirilmesinde kullanılabilir (Taherzadeh ve Karimi, 2008). Bu ön işlemin güç gereksinimi, son tanecik boyutuna ve biyokütlenin karakteristiğine bağlıdır. Öğütmenin yüksek enerji ihtiyacı ve sürekli artan enerji fiyatları gözönünde bulundurulduğunda bu prosesin ekonomik açıdan uygun olmadığı söylenebilir (Hendriks ve Zeeman, 2009).

2.3.2. Fizikokimyasal ön işlemler

2.3.2.1. Buhar patlatmalı

Buhar patlatmalı metodu lignoselülozik materyalin ön işlemleri için en yaygın kullanılan metotlardan biridir. Bu metotla, ufalanmış biyokütle yüksek basınçta doygun buharla işlem görür ve daha sonra basıncı hızla azaltılır; diğer bir ifadeyle, atmosferik basınçta birkaç dakika işlem gördükten sonra genellikle 160-260 °C sıcaklıkta (sıkıştırma basıncı 0.69-4.83 MPa) birkaç saniye işlem görmesidir. Bu proses yüksek sıcaklık sayesinde hemiselülozun ayrışmasına ve ligninin transformasyonuna neden olur; böylece selüloz hidrolizinin verimi artar (Sun ve Cheng, 2002). Bu ön işlemleri etkileyen faktörler: kalma zamanı, sıcaklık, partikül boyutu ve nem içeriğidir. Optimal hemiselüloz çözünürlüğü ve hidrolizi ya yüksek sıcaklık ve kısa kalma zamanı (270 °C, 1 dak.) ya da daha düşük sıcaklık ve daha uzun kalma zamanı (190 °C, 10 dak.) ile elde edilebilir. Son çalışmalar düşük sıcaklık ve uzun kalma zamanının daha avantajlı olduğunu göstermektedir (Sun ve Cheng, 2002).

2.3.2.2. Amonyak fiber patlatmalı (AFEX)

Bu ön işlemler, buhar patlatmalı tekniğine benzemekte olup tipik AFEX prosesindeki parametreler: 1-2 kg sıvı amonyak/kg kuru biyokütle, sıcaklık 90 °C ve kalma zamanı 30 dakikadır. AFEX ön işlemleri özellikle çeşitli otsu bitkiler ve otların sakkarifikasyon hızını iyileştirebileceği için tercih edilmektedir (Sun ve Cheng, 2002).

2.3.2.3. Karbondioksit patlatmalı

Bu ön işlemler buhar patlatmalı ve amonyak fiber patlatmalı ön işlemlere benzer şekilde yapılmaktadır. Burada, karbondioksitten karbonik asit oluşur ve hidroliz hızını artırır. Bu metot, alfalfa (4 kg CO₂/kg fiber, 5.62 MPa'da) bitkisinde kullanılmış ve 24 saatlik enzimatik hidroliz sonunda teorik glukozun

%75'ini elde etmiştir. Bu verim buhar ve amonyak patlatmalı ön işlemlere göre düşük; fakat ön işlemsiz enzimatik hidrolize göre yüksektir (Sun ve Cheng, 2002).

2.3.3. Kimyasal ön işlemler

2.3.3.1. Ozonlama

Ozon, lignin ayırımında kullanılan güçlü oksitleyici bir kimyasaldır. Ligninin hammaddeden ayrılması enzimatik hidrolizi artırır. Bu ön işlem oda sıcaklığında ve normal basınç altında gerçekleşir ve bu yöntemle hiçbir şekilde fermantasyonu ya da hidrolizi etkileyecek inhibitör oluşmaz. Buğday ve çavdar sapı gibi birkaç tarımsal atıkta, ozonlama ön işleminden sonra enzimatik hidrolizin verimi arttırmada etkili olduğu görülmüştür (Alvira ve ark., 2010).

2.3.3.2. Asit hidrolizi

Hemiselüloz ile selüloz arasındaki bağları koparabilmek amacıyla uygulanan asit ön işlem, lignoselülozik malzeme içerisindeki rijit yapıların seyreltik veya derişik asit kullanılarak ayrıştırılmasını içerir (Brodeur ve ark., 2011). Bir çok lignoselülozik hammadde için en geniş ve yaygın bir biçimde kullanılan ön işlem seyreltik asit hidrolizidir. Seyreltik asit hidrolizinde, lignoselülozik materyal H_2SO_4 (Sülfürik Asit) gibi seyreltik asit ve suyla karıştırılır, istenilen sıcaklığa gelebilmesi için buharla ısıtılır ve daha sonra atmosferik basınca getirilir. Bu, aslında buhar ön işlemine çok benzerdir ve literatürde iki metot arasında açık bir ayrım yoktur. Genellikle, materyal buhar ön işleminde nemli; seyreltik asit hidrolizinde ise %5'den daha az kuru maddeyle kullanılır. Ayrıca, seyreltik asit hidrolizinde partikül boyutu daha küçüktür. Genellikle; asit konsantrasyonu, ön işlem sıcaklığı ve reaktörde kalma zamanı ön işlem verimini etkileyen parametrelerdir (Jørgensen ve ark., 2007).

Selülozik maddeyi çözmek için %40 derişiminde HCl (Hidroklorik Asit) ile soğuk kullanılan Bergius prosesi gibi ikinci bir yöntem konsantre asit

hidrolizidir. Suyla seyreltme ve ısıtmadan sonra selülozun şekere hidrolizi gerçekleşir. Konsantre asit prosesi genellikle seyreltik asit prosesinden daha fazla şeker ve etanol verimine sahiptir, fakat çevre sıcaklığında konsantre asidin aşındırıcılığı, asidin seyreltilmesi ve çözünen selülozun şekere hidrolizi için ısıtılması gibi durumlar daha fazla korozyon etkiye neden olmaktadır. Bu etki nedeniyle pahalı alaşımlara ya da seramik gibi non-metalik yapılara ihtiyaç duyulması maliyeti artırmaktadır (Madson, 2004).

2.3.3.3. Alkali hidrolizi

Alkali ön işleme için ana kimyasallar: sodyum hidroksit, amonyak, etilen diamin ve kalsiyum hidroksittir. Derişik sodyum hidroksit, odunun delignifikasyonu için genellikle soda ve kraft hamurunda kullanılır. Seyreltik NaOH'un (Sodyum Hidroksit) lignin ve hemiselülozu parçaladığı, yüzey alanını arttırdığı ve polimerizasyonu azalttığı gösterilmiştir. Meşe ve tarımsal atıklar gibi lignin oranı düşük materyallerin hidroliz hızını arttırmada etkili olduğu bulunmuştur (Bjerre ve ark., 1996). Çam gibi yüksek lignin içeriği olan materyallerde ise seyreltik NaOH etkili değildir. Holtzapfel ve ark. kalsiyum hidroksidi, mısır koçanı ve kavağa birkaç gün boyunca düşük sıcaklıkta uygulamışlar ve diğer alkali ön işleme benzer olan bu metotla delignifikasyonun büyük bir miktarına ve hidroliz hızının artmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Amonyak çözeltisi ise mısır koçanı ve darının delignifikasyonu ve hidrolizin geliştirilmesinde çok etkili olduğu görülmüştür (Alvira ve ark., 2010).

Alkali ön işleme lignin, yapısal değişikliklere uğrayarak içerisindeki ester ve glukozit bağları bozunur ve bunun yanı sıra selülozun şişmesi ve parçaları kristalizasyonunu sağlamasıyla da bir miktar hemiselülozun da çözünmesi gerçekleşir. Lignin yapısını bozundurma ile selüloza ve hemiselüloza erişimin daha kolay olması ve yapı içerisindeki selüloz konsantrasyonunu artırması nedeniyle bu yöntem tercih edilir (Alvira ve ark., 2010).

2.3.3.4. Organik çözücü hidrolizi

Metanol, etanol, aseton, etilen glikol gibi organik çözücüler lignini çözmek ve selülozu enzimatik hidrolize hazırlamak için kullanılırlar. Diğer kimyasal ön işlemlere göre en önemli avantajı yan ürün olarak saf lignin elde edilmesidir. Bazı çalışmalarda hemiselüloz bağlarını kırmak için HCl, NaOH, oksalik ya da salisilik asit katalizör olarak kullanılmaktadır. Ksilozun yüksek verimi genellikle asit eklenmesiyle elde edilir. Bunun yerine 185 °C gibi yüksek sıcaklıklara çıkılarak asit kullanılması önenebilir. Bu prosesin, iki adımlı ayırmada hemiselüloz ve lignini ayırmak için önce asit hidroliziyle kombine edilmesi önerilir. Bu sayede ligninin yüksek miktarda uzaklaştırılması (%70) ve minimum selüloz kaybı (%2'den daha az) sağlanmış olur (Alvira ve ark., 2010).

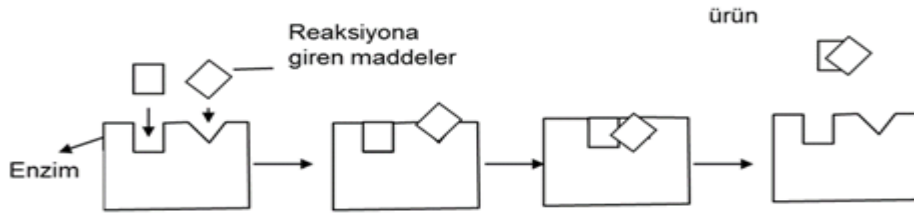
2.3.3.5. İyonik sıvılar ile hidrolizi

İyonik sıvılar, biyokütlenin içerdiği selülozun kolayca çözüldüğü kimyasallardır. Oda sıcaklığında sıvı halde bulunan iyonik sıvılar 300 °C'ye kadar bozunmazlar. İyonik sıvılar biyokütlenin yüzey alanını enzimatik hidroliz için arttırıp lignin miktarını azaltırlar. Ayrıca; biyokütlenin kristal indeksini azaltması, toksit veya patlayıcı gazlar oluşturmadıkları için çevre dostu çözücü olmaları ve de geniş bir sıcaklık aralığında çalışabildikleri için kullanılırlar (Li ve ark., 2010).

2.4. Enzimatik Hidroliz

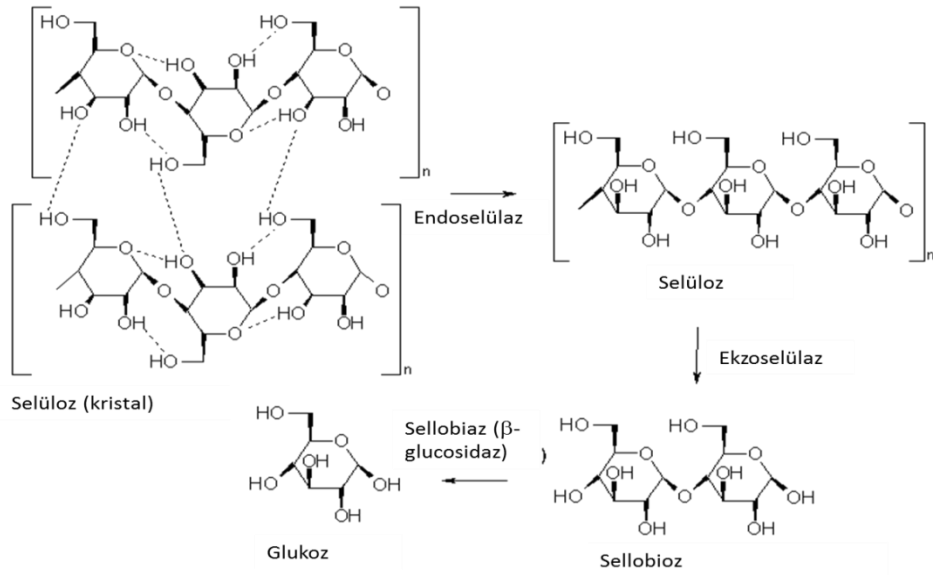
Enzimler doğada protein yapısında bulunan biyolojik katalizörlerdir. Canlı hücreler tarafından (hayvan, bitki veya mikroorganizma) tarafından üretilirler. Bir canlı hücrede hemen hemen tüm reaksiyonlar spesifik bir enzim tarafından gerçekleştirilir. Canlı sistemdeki enzimlerin ana görevi kimyasal bağların kırılması veya yeni kimyasal bağların oluşum reaksiyonlarını katalize etmektir. Yani diğer kimyasal katalizörler gibi reaksiyon hızını arttırırlar. Enzimle katalize olan reaksiyonda bu olay enzimin aktif bölgesi denen bir özel kısımda gerçekleşir. Enzimin aktif bölgesine bağlanan ve islenen moleküle substrat (reaktant, S) denir.

Enzim substrat molekülünü bağlayarak, parçalanacak bağın aktif merkezdeki katalitik gruba çok yakın durmasını ve ara ürünün kolayca oluşmasını sağlar (Anahtar kilit modeli, Şekil 2.6). Bazı enzimler substratla dayanıksız kovalent bağlı ara ürünler oluştururlar; böylece reaksiyonun kolayca gerçekleşmesini sağlarlar. Proton verici veya proton alıcı olarak fonksiyon gören bazı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla bir enzim genel bir asit veya baz katalizini gerçekleştirebilir. Enzim, substrat molekülündeki parçalanacak olan bağın gerilmesi veya deformasyonunu sağlayarak, bağın parçalanmasını kolaylaştırır.



Şekil 2.6. Enzim-Substrat kompleksinin oluşumunda anahtar-kilit modeli

Selülozun glukoza enzimatik hidrolizinde genel olarak endoglukonazlar veya endo-1,4- β -glukanazlar (EG), ekzoglukanazlar veya sellobio hidrolazlar (CBH) ve β -glukosidazlardır (BGL) kullanılırlar. Bu enzim türleri içinde EG, selüloz zincirinde rastgele kopmalara neden olarak degradasyon etkisini artıran en etkin türdür. EG selüloz zincirinin duyarlı olan intra moleküler β -1,4 glukosidik bağlarını hidrolizlerken, ekzo-glukanazlar çözülebilir sellobioz veya glukoz kısımlarını serbest bırakarak selüloz zincirlerini uç noktalarında koparır. BGL ise sellobioz inhibisyonunu engelleyerek sellobiozun glukoza hidrolizini katalizleyip hidroliz işlemini tamamlar (Coughlan, 1989) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Selülozdan glukoz oluşum reaksiyonu

Selülozun enzimatik hidrolizi yüksek spesifikliğe sahip olan selülaz enzimi ile gerçekleştirilir. Hidroliz ürünleri genellikle glukoz içeren indirgen şekerlerdir. Hem bakteri hem de fungi lignoselülozik maddenin hidrolizi için selülaz üretebilir. Bu mikroorganizmalar aerobik ya da anaerobik , mezofilik ya da termofilik olabilir (Sun ve Cheng, 2002). *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* ve *Streptomyces* gibi bakteriler selülaz üretebilir. *Cellulomonas fimi* ve *Thermomonospora fusca* selülaz üretimi için oldukça çok çalışılmış olanlarıdır. *Clostridium thermocellum* ve *Bacteroides cellulosolvens* gibi özellikle selülotik anaerobikler olan birçok selülotik bakterilerin yüksek spesifikli aktiviteyle selülaz üretmelerine rağmen, bunlar yüksek enzim titresi üretmezler. Anaerobikler çok düşük büyüme hızına sahip ve anaerobik büyüme koşullarına ihtiyaç duydukları için selülaz üretimindeki çoğu araştırmalar funguslar üzerine yoğunlaşmıştır (Sun ve Cheng, 2002).

Selülaz ve hemiselülaz enzimlerinin asıl kaynağını filamentli mantarlar oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Trichoderma* sp. (*T. viride*, *T. reesei*, *T. logibrachiatum*) türlerinin kristalin selülozu degrade etme kapasitesine sahip en üretken tür oldukları belirlenmiştir (Coughlan, 1989).

Ksilozların biyodegradasyonunda endo-β-1,4 ksilanaz, β- ksilozidaz ve dallanmış yapıya sahip ksilozların hidrolizinde kullanılan α-Larabinofuranosidaz,

asetil ksilan esteraz, ferulik asit esteraz ve p-kumarik asit esteraz gibi enzimler kullanılır (Çöpür ve ark., 2011) .

Penicillium capsulatum ve *Talaromyces emersoni* gibi bir çok mikroorganizma ksilozu tamamıyla parçalayan enzim sistemlerine sahiptir (Coughlan, 1989). Ksilozlardan çoğu dallanmış ksiloz üniteleri arasındaki glikosidik bağları koparamaz ve bu nedenle ana zincirinin tamamıyla hidrolizinden önce yan zincirlerin koparılması gerekmektedir ki bunu yapabilen birkaç enzim türü ksilooligosakkaritlerden yan zincirleri koparabilmektedir. Bu enzimler yan dalların koparılmasından önce ksiloz ana zincirinin kısmi hidrolizine gerek duymaktadırlar. Ksiloz, selülozla kıyaslandığında daha kompleks bir yapıya sahip olmasına rağmen, selüloz gibi kristal bir yapı göstermediği için enzimatik hidrolize çok daha fazla yatkındır (Coughlan, 1989).

Arabinanlar ise arabonizden elde edilmektedir ve arabinozlar enzim üretiminde daha çok indüklenmektedir. Dolayısıyla arabinozca zengin hemiselüloz hidrolizatları enzim üretimi için kullanılabilir (Coughlan, 1989).

2.4.1. Enzimatik hidrolizi etkileyen faktörler

Selülozik substratın enzimatik hidrolizi süresince çeşitli faktörler selülaz karışımının katalitik aktivitesini sınırlamaktadır. Bu sınırlamaların enzim- substrat ilişkili faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.1. Ön işlemin enzimatik hidrolize etkisi

Hemiselüloz ve selülozun fermente monomerik şekerlere etkili hidrolizi için ön işlemin herhangi bir formu gereklidir. Lignoselülozun kimyasal, fiziksel ve morfolojik karakteristikleri substratın sindirilebilirliği için önemlidir. Ön işlem bu karakteristikleri değiştirir ve maddeyi sakkarifikasyon için daha uygun hale getirir. Bundan dolayı, dönüşüm prosesindeki diğer bütün adımları büyük miktarda etkileyen ön işlem biyoetanol üretiminde en önemli adımdır. Genelde

enerjiye ihtiyaç duyan ve maliyeti büyük ölçüde etkileyen ön işlem metotları: fiziksel (ör: kesme, öğütme vb.), kimyasal (ör: seyreltik asit, alkali vb.), termal (ör: buhar patlatması vb.) ve biyolojik (ör: ağaç çürütücü mantar vb.) metotlar olarak sınıflandırılır. Sık sık bu yöntemlerin kombinasyonu kullanılır. Ön işlem metotları geliştiğinde ve kıyaslandığında sıcaklık, zaman ve pH gibi faktörler hesaplanabilir. Ancak, empirik yolla bu şekilde bir değerlendirme bize tam olarak hücre duvarının yapısını ve kimyasını açıklayamaz (Kristensen, 2009). Yapılan bir çalışmada, buğday sapının hidrotermal ön işleminin yapısının değiştiği belirtilmiştir. Bu keşfin arkasındaki sebep, ön işlemin mekanizmasının ve etkisinin daha iyi anlaşılmasıyla ön işlem için enerji tüketiminin optimize edilmesini sağlamaktır (Kristensen, 2009).

2.4.1.2. Selüloz kristalitesi

Polimerizasyon derecesi ve selüloz kristalitesinin selülozik substratları ayırtırmayla ilgili hidroliz hızını belirlemede önemli bir faktör olduğu düşünülmüştür, fakat bazı bağımsız araştırmalar bu parametrelerin lignoselülozik substratların aksiliğini açıklamadığını göstermiştir. Yani, sadece kristal selülozu hidrolize edebilen selüloz kompleksleri tanımlanabilmiştir (Alvira ve ark., 2010). Lignoselülozik ön işlemin hidroliz işlemini geliştirmesine karşın bazılarında selüloz fraksiyonunun kristalitesini arttırdığı elde edilmiştir. Bu sonucun buhar patlatması gibi ön işlemlerden sonra amorf selülozun daha kolay uzaklaştırılmasına ya da indirgenmesine bağlı olduğu önerilir. Buna karşın, yüksek pH'lı ön işlemlerin daha az etkili ve bazı maddelerdeki biyokütle kristalitesini azalttığı gösterilmiştir (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.3. Selülozun polimerizasyon derecesi

Polimerizasyon derecesi, özellikle kristalite gibi diğer substrat karakteristikleriyle ilgilidir. Selülozun uzun zincirinin rolü belli olmamasına rağmen, selüloz hidrolizinde etkili olduğu bilinmektedir. Depolimerizasyon selülozik substratın yapısına bağlıdır. Enzimatik hidrolizde, endoglukanlar

selülotik substratların polimerizasyon derecesini azaltmak için selüloz zincirini iç kısımda koparırlar. Ancak, substratların etkisine bakmaksızın, burada artık kristalin selülozun aksiliğini artırmasıyla ilgili selüloz polimerizasyon derecesinin bir düzeltme seviyesi olduğu görülmüştür (Alvira ve ark., 2010). Farklı ön işlemlerin etkisinin, ksiloz uzaklaştırılmasının selülozun zincir uzunluğunda lignin gideriminden daha fazla etkiye sahip olduğunu ve polimerizasyon derecesini azalttığını göstermesi üzerine çalışmalara devam edilmektedir (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.4. Substrat yüzey alanı

Enzimin substrata ulaşabilirliği, hidroliz sürecini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bundan dolayı, ön işlemlerin ana amacından biri enzimatik hidrolizdeki verimliliği artırmak için yüzey alanını artırmaktır (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.5. Lignin bariyeri (içeriği ve dağılımı)

Lignin ve hemiselüloz varlığında selülaz enziminin selüloza dönüşümü zordur ve bu yüzden hidrolizin etkinliği azalır. Lignin, enzimatik hidrolizin hızını hidrolize olmuş substratların sindirilebilir parçasına fiziksel açıdan engelleyerek sınırlar. Aynı zamanda, selüloz hidrolizini azalttığı görülmüştür. Alkali ekstraksiyonu ve protein eklemesi ya da polietilen glukol vb. diğer eklemeler gibi selülozun lignine verimsiz adsorpsiyonunu önlemesi için çalışılmaktadır. Ek malzemelerin kullanımı etanol üretim prosesinin maliyetini artırmaya karşın enzimatik hidroliz adımının geliştirmesiyle önemli yararlar sağlanabilir.

Enzimlerin lignine düzensiz bağlanması substratın yapısıyla ilgilidir. Çeşitli selülazlar ligninle inhibizasyonunda farklı olurken, ksilozlar ve glukozidazlar daha az etkilenir. Bazı ön işlemlerin erime ve ligninin tekrar yerleşmesi (buhar patlatması) ya da lignin karbonhidratların mekanizmasının (AFEX) bozunması gibi farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Ligninin enzimatik hidrolize büyük bir etkisinin olmasının yanı sıra, biyorafineri prosesinde daha yüksek değerde

ürün elde etme potansiyeline sahip olması nedeniyle de şu sıralar ana araştırma alanlarından birisidir (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.6. Hemiselüloz içeriği

Hemiselülozların uzaklaştırılması, substratın gözenek boyutunu artırır ve böylece selülozun hidrolize olma olasılığı ve enzime ulaşabilirliği artar. Bir diğer deyişle, ön işlemden geçirilmiş katılardaki hemiselülozik şekerlerin geri kazanımı daha yüksek toplam fermente şeker elde etmek için araştırılmıştır. Bu sebeple, hemiselülozik modifikasyonun enzimatik gereksinimleri hesaba katılmalıdır. Hemiselülozdaki asetilasyonun derecesi bir diğer önemli faktördür, çünkü lignin ve asetil gruplar hemiselüloz matriksine bağlıdır ve polisakkarit bozunumuna engel olabilir (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.7. Gözeneklilik

Önceki çalışmalar, substratın gözenek büyüklüğünün lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizinde ana sınırlayıcı faktör olduğunu göstermiştir. Selülazlar; birçok lignoselülozik materyalin bulunduğu iç alanın dış alandan daha büyük olduğunda gözeneklerde hapsolabilir. Ön işlem prosesinde gözenekliliği artırma özellikle hidrolizi geliştirebilir (Alvira ve ark., 2010).

2.4.1.8. Hücre duvarı kalınlığı

Ot kutikülü ve ağaç kabuğundan oluşan mumsu bariyerler enzim penetrasyonunu engellemektedir; hatta öğütülen bitki sapları ve odunsu dokular doğaları gereği sıvı penetrasyonu sınırlar (Ruiz ve ark., 2006). Bu yüzden enzimatik hidroliz için hücre duvarı kalınlığı önemlidir.

2.4.1.9. Dönüşüme ulaşılabilirlikteki değişim

Selüloz ulaşılabilirliğinin rolü ve dönüşümdeki değişimi, selülozun ulaşılabilirliğinin dönüşümle limitli olduğunu gösteren ve dönüşümdeki ulaşılabilirliğinin azalması ya da hiçbir değişme olmadığını gösteren birkaç çalışma mevcuttur (Alvira ve ark., 2010). Ancak, bugünkü çalışmalarla dönüşüme ulaşılabilirlikteki değişimin etkisi tam olarak bilinmemektedir.

2.4.1.10. Yüzey aktif maddeler

Lignoselülozun fermente şekerlere enzimatik hidrolizi biyoetanol üretimi için selülazın yüksek dozajda kullanımına gereksiniminden dolayı pahalı adımlardan biridir. Enzim miktarını azaltmak bu yüzden istenir. Yüzey aktif maddelerin kısmen de olsa enzimatik hidrolize pozitif etkisi kanıtlanmıştır. Yüzey aktif maddeler amfilik bileşiklerdir. Yüzey aktif maddeler taneciklerin içine kendiliğinden toplanabilirler ve yüzeye adsorbe olurlar. Adsorbe derecesi ve toplanması yüzey aktif maddenin yapısına ve yüzeyin polaritesine bağlıdır. Doğrusal polimer (polietilen glikol) (PEG) tıbbi ve endüstriyel alanda kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden biridir (Kristensen, 2009).

İyonik olmayan yüzey aktif madde ve katalik olmayan proteinin enzimatik hidrolizdeki etkisi son 20 yılda keşfedilmiştir. Yüzey aktif maddeler, özellikle hidroliz etkinliğini artırır ve hem daha hızlı hidroliz hızı hem de daha az enzim kullanımına olanak sağlar. Buna ek olarak, selülazın daha iyi geri dönüşümünü sağlar. Yüzey aktif maddelerin pozitif etkisi şu şekilde kategorize edebilir:

- 1) Enzim stabilizörleri olarak hareket ederler ve denatürasyonu önlerler.
- 2) Substrat yapısını etkilerler. Örneğin; enzim geçirgenliğini artıran bozulma ya da yüzey yapısının modifikasyonu.
- 3) Enzim adsorpsiyonundaki verimsizliği kısmen de olsa etkilemesiyle enzim-substrat ilişkisini etkileyebilir (Kristensen, 2009).

Saf selülaz kullanımının hidrolizde hiç etkisi olmadığını ya da biraz etkilediğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Ancak, lignin içermesine karşın

özellikle yüzey aktif madde eklenmiş substratların bazı spesifik durumlarda hidroliz verimini neredeyse ikiye katladığını göstermiştir.

Daha spesifik olarak, ligninin yüzeyi ve yüzey aktif madde arasındaki hidrofobik etkileşime bağlı hidrolizin etkinliğini arttıran primer mekanizma mevcuttur. Sulu bir çözelti içindeki yüzey aktif maddenin bağlı hidrofilik kısımları çöküntü yapar ve selülozların üretken olmayan adsorpsiyonunu engelleyip bu yolla selüloz dönüşümünün artmasına yardımcı olur. Bu teoriye uygun olarak, (BSA) sığır serum albümini gibi katalitik olmayan proteinin ve iyonik olmayan yüzey aktif maddenin eklenmesi selüloz dönüşümünün artmasına yardımcı olur. BSA lignin yüzeyinin kenarlarında adsorpsiyonu ile belirsiz bağlayıcıyı azaltarak yüzeyi adsorbe ettiği bilinmektedir. Bu nedenle, yüzey aktif maddelerin kullanımı, enzim geri dönüşümünü ve hidroliz etkinliğini artıracak için biyoetanol üretimin endüstriyel uygulamasında maliyet açısından iyi planlanıp yapılması gereken en önemli adımlardan biridir (Kristensen, 2009).

2.4.1.11. Yüksek katı içerikli enzimatik hidroliz

Yüksek katı konsantrasyonu, biyokütlenin etanole dönüşüm sürecinde enerji ve ekonomi açısından önemlidir. Katı yüklemesinin artması, şeker konsantrasyonu ve buna bağlı olarak etanol dönüşümünü artırır. Ne yazık ki, substrat konsantrasyonunun arttırılmasının dezavantajı vardır. Son ürün ve inhibitörlerin konsantrasyonu enzim ve fermente organizmaların fonksiyonunun azalması nedeniyle artacaktır. Yüksek katı yüklemesi etkisiz karışma ya da reaktörlerde fazla enerji tüketimine neden olur (Kristensen, 2009). Yüksek katıyla çalışma katı konsantrasyonunu arttırdığı için enzimatik dönüşümü lineer olarak azalttığı bulunmuştur. Bu, yüksek katıyla çalışmanın avantajlarını azaltır. Olası mekanizmalar bu durum için dörde ayrılmıştır.

➤ Substrat ve kompozisyon etkisi

Substratın lignin, hemiselüloz ve selüloz vb. içeriği enzimatik hidrolizi doğrudan etkiler ve bu, substrat miktarının enzimin maksimum verimde çalışmasına olanak verecek ve maliyeti minimum yapacak şekilde optimize

edilmesini gerektirmektedir. Substrat yoğunluğu artırıldığında enzimatik hidrolizin hızı bir süre artar, fakat daha sonra tepkime hızının sabit kaldığı gözlenir. Substrat miktarı ne kadar artırılırsa artırılınsın bu durum değişmez. Bunun sebebi ortamda bulunan enzimlerin bir süre sonra substrata doymuş hale gelmeleridir. Yani enzim moleküllerinin hepsi bir substrata bağlı durumda bulunurlar, birini bıraktıkları anda diğerine bağlanırlar (Pınar, 2008).

➤ **Ürün inhibisyonu**

Son ürün inhibisyonu glukoz, sellübioz gibi enzimatik hidrolizde önemli bir rol oynadığı ve etanolün özellikle endoglukinaz, sellobihidrolazlar ve β -glukidazları inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Ancak, çözünmeyen substratlarla ve kinetiğiyle çalışıldığında Michaelis-Menten modeli kullanılamayabilir ve inhibisyonun tam çeşidine karar vermek zor olabilir. Zamanla, hidroliz hızındaki azalma birikmiş son ürünler tarafından inhibisyonu atfedilmiştir. Doğal lingosellülozik substratlar hidrolize olduğunda ise sellülazlar amorf referans materyalinkinden ürün inhibisyonu için daha dayanıklı ve ürün inhibisyonu için erken adımda hidroliz hızındaki azalmaya neden olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, katı konsantrasyonu arttığında ürün inhibisyonu katı etkisine karar vermede önemli bir etken olduğu bulunmuştur. Ancak, katı içeriğinin fazla olması lineerliği, ürün inhibisyonunun geçerli modeliyle uygunluk göstermez. Aynı şekilde, transglükosilasyon yüksek katı düzeyinde daha belirgin hale gelebilecektir ve bunun katı etkisi önemli ölçüde etkilediği düşünülmez (Kristensen, 2009).

➤ **Su konsantrasyonu**

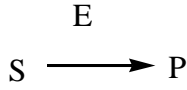
Düşük su içeriği direkt enzim performansını etkiler. Su, enzim ve substrat arasındaki bağlantıyı sağlar ve ürün transferi için önemlidir. Su içeriği daha büyük partiküllerin boyut dağılımını sağlayan mekanik karıştırmayı ve difüzyonu etkiler. Sonuç olarak, substrat olarak su ya da enzimatik hidrolizin difüzyon ajanı ne katı etkisi için sınırlayıcı faktördür ne de substrat inhibisyonu içerir (Kristensen, 2009).

➤ Selülaz adsorpsiyonu

Selülaz adsorpsiyonu, dönüşüm hızı ve veriminde belirleyici ve kontrol edici faktör olarak bilinir. Bazı hidroliz ürünleri selülaz adsorpsiyonunu inhibe edebilirler. Glukoz ve özellikle sellobioz lineere yakın bir şekilde selülaz adsorpsiyonunu inhibe ettikleri son zamanlarda gösterilmiştir. Adsorpsiyon, çözünmeyen substratın hidrolizinin bir gereksinimi olduğu için bu, artan katı konsantrasyonlarında daha düşük dönüşüme neden olur (Kristensen, 2009) .

2.5. Basit Enzim Kinetiği

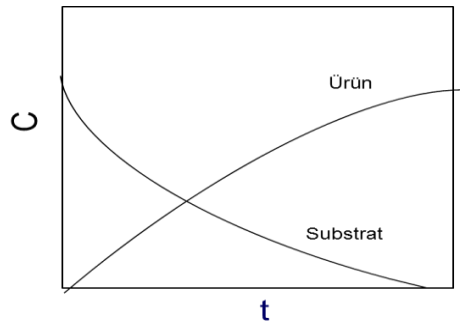
Bir reaktörde substratın (S) enzim katalizörlüğünde ürüne (P) dönüştüğü varsayılır. Zamanla substrat veya ürün konsantrasyonları ölçüldüğünde ürün konsantrasyonunun artarak maksimuma ulaşacağı ve substrat miktarının da azalacağı görülür (Şekil 2.8).



Reaksiyon hızları substrat (S) ve ürün (P) cinsinden Denklem 2.1 ve 2.2’de gösterilmiştir.

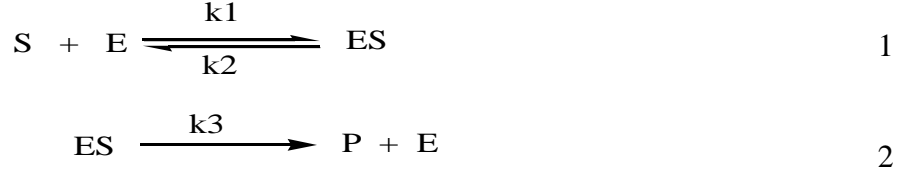
$$r_s = - \frac{dC_s}{dt} \quad (2.1)$$

$$r_p = \frac{dC_p}{dt} \quad (2.2)$$



Şekil 2.8. Enzim katalizörlüğünde substrat ve ürün konsantrasyonunun zamanla değişimi

Basit enzim kinetiğinde enzimin substrat ile bir kompleks oluşturduğu varsayılmıştır. Bu kompleks daha sonra ürün ve enzime tekrar parçalanacaktır



(Reaksiyon 1. ve 2). Bu teorideki Enzim-Substrat (ES) kompleksinin varlığı daha sonra spektroskopik yöntemlerle kanıtlanmıştır.

Bu teoride yapılan varsayımlar:

- 1) Reaksiyon boyunca toplam enzim konsantrasyonu $[E_0]$ sabit kalır.
 $[E_0]=[ES]+[E]$
- 2) Substrat miktarına oranla kullanılan enzim miktarı çok azdır. Böylece enzim-substrat oluşumunda ne substrat ne de enzim tükenmez.
- 3) Oluşan ürün konsantrasyonu çok azdır.

Bu varsayımlar ışığı altında hız eşitliğinin mekanizması Michaelis-Menten yaklaşımı geliştirilmiştir.

Bu yaklaşımda 2. reaksiyonlarındaki ürün oluşum basamağı denge reaksiyonuna (1. reaksiyon) kıyasla çok yavaştır ve böylece reaksiyonun hızını bu basamak (2.3) belirler. Bu kimyasal kinetikte heterojen katalizlere uygulanan yaygın bir varsayımdır.

$$r = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_3[ES] \quad (2.3)$$

Reaksiyon 1 dengededir. Yani dengede reaksiyon hızları birbirine eşittir (2.4).

$$k_1[S][E] = k_2[ES] \quad (2.4)$$

Başlangıçtaki enzim konsantrasyonu Reaksiyon 1 ve 2 deki $[ES]$ ve $[E]$ konsantrasyonlarının toplamına eşittir (2.5).

$$[E_0]=[ES]+[E] \quad (2.5)$$

Konsantrasyonlar Denklem 2.2'deki hız ifadesinde yerine konulursa Michaelis-Menten hız ifadesi elde edilir (Fogler, 2005).

$$r = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_3[ES] \quad (2.6)$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_2}{k_1} + [S]} \quad (2.7)$$

$$r = k_3[ES] = k_3 \frac{[E_0][S]}{\frac{k_2}{k_1} + [S]} = \frac{\vartheta_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.8)$$

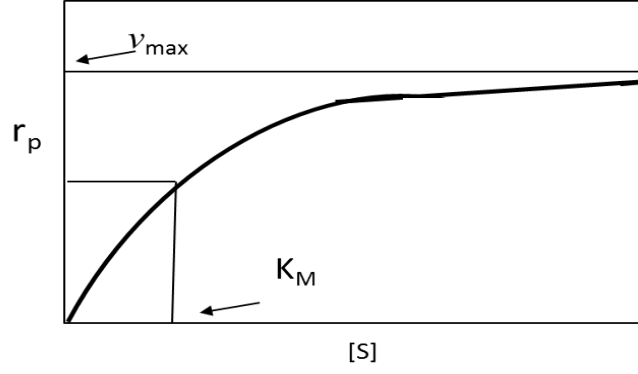
$$r = \frac{\vartheta_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte $K_M = k_2/k_1 = 1/K_{eq}$, K_{eq} : Birinci reaksiyonun denge sabitidir.

$$K_M = \frac{k_2}{k_1} = K_1 = \frac{[S][E]}{[ES]} = \frac{1}{K_{eq}} \quad (2.10)$$

$$\vartheta_{max} = k_3[E_0] \quad (2.11)$$

Denklem 2.11 kullanılarak C_s konsantrasyonuna karşı reaksiyon hızı (r_p) grafiğe geçirilecek olursa Şekil 2.9 elde edilmektedir. Bu şekilden de görüleceği gibi düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (birinci mertebe) substrat konsantrasyonu çok yüksek olduğunda reaksiyon hızı substrat konsantrasyondan bağımsızdır (0. mertebe). Maksimum konsantrasyon hızı (V_{max}) kullanılan enzim konsantrasyonu ile orantılıdır. Maksimum reaksiyon hızının yarısında K_M substrat konsantrasyonuna ($[S]$) eşittir.



Şekil 2.9. Substrat konsantrasyonu ile reaksiyon hızının değişimi

2.5.1. Michaelis-Menten kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

$$r_p = -r_s = v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.12)$$

Michaelis-Menten eşitliğinde K_M ve v_{max} sabitleri Şekil 2.9 $[S]$ - r_p grafiğinden bulunabilir. Ancak şekilde asimtotun tam olarak gözlenemediği durumlarda v_{max} doğru olarak bulunamaz. Bu nedenle Michaelis-Menten eşitliği tekrar düzenlenir ve lineerleştirilir. Denklem 2.13-2.15'te bazı izoterm eşitlikleri verilmiştir.

Lineweaver-Burk Eşitliği:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2.13)$$

Eadie-Hofstee Eşitliği:

$$v = v_{max} - \frac{K_m}{[S]} v \quad (2.14)$$

Langmuir Eşitliği:

$$\frac{S_o}{V_o} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{S_o}{v_{max}} \quad (2.15)$$

2.5.2. Enzim reaksiyonlarının inhibisyonu Michaelis-Menten eşitliğinden sapmalar

a) Yarışmalı inhibisyon

Rekabetli inhibitörde substrat yapısına çok benzeyen inhibitör ve substrat enzimin aynı aktif ucuna bağlanmak için yarışır. Dolayısıyla reaksiyon hızı azalır. Enzim-inhibitör kompleksinin oluşumu substrata etki edecek enzim miktarını azaltacaktır. Rekabetli inhibitör enzimle tersinirdir. Dolayısı ile inhibitörün etkisi substrat konsantrasyonunu artırarak azaltılabilir (Lee, 2002).

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S]+K_{MI}} \quad (2.16)$$

$$K_{MI} = K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \quad (2.17)$$

$K_{MI} \gg K_S$ ise inhibitör etkisiyle reaksiyon hızı azalır. Maksimum reaksiyon hızı inhibitörden etkilenmemekte ancak bu hıza ulaşmak için çok miktarda substrat kullanılmalıdır (Lee, 2002).

b) Yarışmasız inhibisyon

Yarışmasız inhibisyonda inhibitörler enzimlerle farklı şekillerde bağlanabilirler. Enzimin aktif bölgesine veya herhangi bir yerine tersinir veya tersinmez olarak bağlanabilir.

$$v_p = \frac{v_{I,max}[S]}{[S]+K_S} \quad (2.18)$$

$$v_{I,max} = \frac{v_{max}}{1 + \frac{[I]}{[K_I]}} \quad (2.19)$$

2.6. Selülozun Glukoza Hidroliz Kinetiği Modelleri

Selülozun heterojen yapısından dolayı, selülozun glukoza enzimatik hidrolizi, klasik enzimatik hidroliz reaksiyonlarına göre daha kompleksdir. Selülozun glukoza hidrolizi basamakları temel olarak altı maddede özetlenebilir (Şekil 2.7).

1. Selülaz enziminin selüloz üzerine adsorpsiyonu
2. Substrat yüzeyinde hidroliz edilecek moleküle ulaşma
3. Enzim-substrat kompleksinin oluşumu
4. β -glukozidik bağın hidrolizi
5. Selülaz enziminin substrattan desorpsiyonu
6. β -glukosidaz ile sellobiyozun glukoza hidrolizi.

Selülozun heterojen yapısı nedeniyle selülozun kinetik modelinin geliştirilmesinde aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (Gan ve ark., 2003):

- Selülaz enzim sisteminin farklı merkezleri ve kompozisyonu
- Farklı selülaz komponentlerinin mekanizması ve sinerjik hareketi
- Enzim adsorbilitesinin azalması
- Lignoselülozik materyalin kompozisyonundaki değişiklikler
- Lignoselülozik materyalin yapısal değişimi (substratın kristinalitesinin artması ve yapısının değişmesi)
- Enzimin selülozik materyale bağlanması ve selülozik materyalden desorpsiyonu
- Enzim inhibisyonu ve deaktivasyonu

- Endo ve ekzo glukanazın, sellobioz (β -glukozidazın) ve glukoz inhibisyonu
- Ürün inhibisyonu mekanizması (yarışmalı ve yarışmasız) ve kayma gerilimi gibi diğer faktörlerden kaynaklı enzim deaktivasyonu
- Dış kütle transfer direnci
- Enzim iç difüzyon direnci

Bu faktörler temel alınarak selülozun selülaz enzimi ile glukoz hidrolizi kinetiği dört ana başlıkta; deneysel, Michaelis-Menten tabanlı, adsorpsiyon yaklaşımı ve çözülebilir substratlar için geliştirilen diğer modeller olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca literatürde yer alan sıkıştırma ve fraktal kinetik yaklaşım modeller de mevcuttur (Bansal ve ark., 2009).

2.6.1. Deneysel modeller

Deneysel modeller hidroliz reaksiyonunda enzim ve substrat özelliğindeki değişimi anlamaya yardım eder. Deneysel modeller genellikle ya zamanla ya da substratın yapısal özellikleriyle hidroliz arasındaki ilişkiyi göstermek için kullanılır. Bu, prosesin mekanistik detayları hakkında bilgi vermezken;

- Substratın özellikleri arasındaki kristalize, lignin içeriği gibi ilişkiyi anlamada,
- Başlangıç hızını; diferansiyel yaklaşım veya substrat-zaman ilişkisinden yararlanarak hesaplamada,
- pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonu gibi reaksiyon parametrelerini optimize etmede,
- FT-IR gibi spektroskopik yöntemle kristalize ve lignin içeriği bağımsız değişken olarak kullanılarak istatistiksel metotla ilk hızı hesaplamada kullanılır (Bansal ve ark., 2009).

Selülozun selülaz enzimi ile hidroliz kinetiğinin deneysel model uygulamaları pek çok çalışmanın konusu olmuştur (Bansal ve ark., 2009). Örnek olarak, Ohmine ve arkadaşlarının (1983) geliştirdikleri (2.20), mikrokristal selülozun asidik hidrolizi ve kağıdın selülaz enzimi ile hidrolizi verilerinde kullanılmıştır.

$$P = \left(\frac{S_0}{k} \right) \ln(1 + v_0 k t / S) \quad (2.20)$$

2.6.1.1. Michaelis-Menten yaklaşımı

Menten kinetik modeli Bölüm 2.5 de anlatılmıştır.

$$r_p = -r_s = v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.21)$$

Teorik olarak Menten modeli tek başına selülozik substratın selülaz enzimi ile hidrolizini açıklamamaktadır. Bunun nedenlerinden biri substrat konsantrasyonunun enzim konsantrasyonundan ($[S] \gg [I]$) çok büyük olduğu duruma erişmek zordur. Adsorpsiyon basamağında enzimin selüloza erişim oranı çok düşüktür (0,002-0,04). Yeterli substrat olsa bile substratın dönüşümü düşüktür. Selülozun hidrolizinde, Menten için varsayılan uniform dağılım söz konusu değildir. Ancak sellobiozun β -glukosidaz enzimi ile glukoza hidroliz reaksiyonu homojen olduğundan, Menten modeli kullanılabilir. Deneysel olarak ise Menten kinetik modeli temeline dayalı pek çok model geliştirilmiştir (Bezerra ve Dias, 2004; Bansal ve ark., 2009).

2.6.1.2. Adsorpsiyon modeli

Selülaz enziminin adsorpsiyonu ve enzim-substrat kompleksinin oluşumu selülozun enzimatik hidrolizinde kritik adım olduğu düşünülür (Walker ve Wilson, 1991). Çözülmeyen selülozik materyalinin üzerinde selülaz

adsorpsiyonu tersinir, tersinmez ve yarı tersinir olarak tarif edilir; ancak enzim adsorpsiyonunun farklı içeriklerdeki farklı substrat yüzeylerindeki selüloza bağlanmasını içeren mekanizma ve sonrasındaki selüloz hidrolizi tam olarak anlaşılammıştır (Gan ve ark., 2003).

2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi

Mühendislikte deney, yeni ürün tasarlamakta, üretim sürecinin geliştirilmesinde ve sürecin iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Çoğu durumda amaç, dış kaynaklı değişkenlerden en az ölçüde etkilenen, sağlam bir süreç geliştirmektir (Montgomery, 2000).

Deneysel çalışmalarda geleneksel yaklaşım tek-zamanda tek-faktörü değiştirmeyi gerektirmektedir. Bu süreçte biri hariç tüm değişkenler sabit tutularak o değişken için optimum düzey belirlenmektedir. Bu optimum kullanılarak ikinci değişkenin optimumu bulunmaktadır. Fakat, bu yaklaşım kimyasal süreçlerde olması muhtemel, faktörler arasındaki etkileşimler için veri sağlamamaktadır. Tek değişken tek zamanlı yaklaşımda, iki faktör arasındaki etkileşimlerden dolayı gerçek optimum bulunamamaktadır. Optimum koşulların bulunabilmesi için, tek değişken tek zaman süreci doğru optimum yakaladığına emin olunana kadar her basamakta tekrarlanmalıdır. Bu özellikle de optimize edilmesi gereken birçok değişken olduğunda, birçok peş peşe deney, süre tüketimi ve etkin olmayan bir strateji doğurmaktadır (Anderson ve Whitcomb, 1996).

Alternatif bir yaklaşım olan iki seviyeli faktöriyel tasarım, kritik etkileşimleri açığa çıkartmaktadır. Bu istatistik temelli metot, deneysel faktörlerin sadece iki düzeyde (yüksek ve alçak) aynı anda düzenlemelerini içermektedir. İki dereceli tasarım, tek zaman tek değişkendeki seri yaklaşımdan çok daha verimli olan paralel deneme planı sunmaktadır (Anderson ve Whitcomb, 1996).

Yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology, RSM), ilgilenilen cevabın birkaç parametre tarafından etkilendiği problemlerin modellenmesi ve analizi için kullanılan matematik ve istatistik tekniklerinin birleşimidir ve amacı cevabı optimize etmektir. Örneğin, bir kimya mühendisi sürecin verimini (y)

maksimize eden sıcaklığın (x_1) ve basıncın (x_2) seviyesini bulmak istiyor. Sürecin verimi, sıcaklık ve basıncın seviyesinin bir fonksiyonudur;

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (2.22)$$

ε , y cevabında gözlenen gürültü veya hatadır. Eğer beklenen cevap $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ile gösterilirse, yüzey $\eta = f(x_1, x_2)$ olarak ifade edilir ve yanıt yüzeyi olarak adlandırılır (Montgomery, 2000).

Çoğu YYY probleminde cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmemektedir. Bu sebepten dolayı, YYY'de ilk basamak, y ve bağımsız değişkenler arasındaki gerçek fonksiyonel ilişki için uygun yaklaşımı bulmaktır. Eğer cevap, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonu ile iyi modelleniyorsa, yaklaşım fonksiyonu birinci derecedir;

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2.23)$$

Eğer sistemde bir eğim açısı varsa, yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır, örneğin ikinci derece model;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.24)$$

Tüm YYY problemleri, bunlardan birini ya da tümünü kullanır. Elbette polinom modelinin, tüm bağımsız değişkenlerin gerçek fonksiyonel ilişkisine makul bir yaklaşım oluşturması olanaksızdır; fakat oldukça küçük bir bölgede iyi çalışmaktadır (Montgomery, 2000).

Optimum noktalar; durağan noktaların yerleşimi için genel bir matematiksel çözüm ile elde edilebilir. Matris gösteriminde ikinci dereceden model yazılarak,

$$y = \beta_0 + x'b + x'Bx \quad (2.25)$$

elde edilir.

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix}, b = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix} \text{ ve } B = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \beta_{12}/2 & \cdot & \cdot & \cdot & \beta_{1k}/2 \\ & \beta_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & \beta_{2k}/2 \\ & & \cdot & & & \\ & & & \cdot & & \\ & & & & \cdot & \\ \text{sym.} & & & & & \beta_{kk} \end{bmatrix}$$

şeklindedir.

Burada;

b: birinci dereceden regresyon katsayılarını içeren (k x 1) bir vektör.

B: ana köşegen elemanları saf kuadratik katsayıları olan (β_{ii}) ve köşegen dışı elemanları karışık kuadratik katsayıların yarısı olan (β_{ij} , $i \neq j$) (kxk) tipinde simetrik bir matristir.

X vektörünün elemanlarına göre 'y' türevi sıfıra eşittir.

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x} = b + 2Bx = 0 \quad (2.26)$$

Durağan nokta yukarıdaki Denklem 2.26'nın çözümü ya da

$$x = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (2.27)$$

şeklindedir.

Polinom yaklaşımlarında parametrelerin tahmini için en küçük kareler yöntemi kullanılmaktadır. Daha sonra, oluşturulmuş yüzey kullanılarak, yüzey cevap analizi gerçekleştirilmektedir. Eğer oluşturulmuş yüzey, gerçek yüzey fonksiyonuna uygun bir yaklaşımdaysa; oluşturulmuş yüzeyin analizi, asıl sistemin analizine yaklaşık olarak eşit olacaktır. Model parametreleri, en etkin veri toplamak için doğru deney tasarımları kullanıldığında tahmin edilebilmektedir. Yanıt yüzeylerine uygun tasarımlar yüzey cevap tasarımlarıdır (Montgomery, 2000).

YYY ardışık bir prosedürdür. Çoğunlukla, yüzey cevabında optimumdan uzak bir noktada bulunulduğunda, sistemde küçük bir eğim açısı olur ve birinci derece model daha uygundur. Burada amaç, deney yapanın optimumun çevresine

doğru gelişen bir yolda hızlı ve verimli olmasını sağlamaktır. Bir kez optimum bölgesi bulunduğu anda, ikinci derece gibi daha ayrıntılı bir model uygulanabilir ve analizler optimum bölgesinde gerçekleştirilebilir (Montgomery, 2000).

YYY'nin en kapsamlı uygulaması, endüstride özellikle cevap denen performans ölçümü veya kalite karakteristiklerini etkileyebilecek bazı girdiler olduğunda yapılmaktadır. YYY'nin gerçek uygulamalarının çoğu birden fazla cevap içermektedir (Demirekler, 2004).

YYY dört basamaklı bir süreçtir. İlk olarak, ürün veya süreç için önemli olan kritik faktörler belirlenir. İkinci olarak, örneklerin fiziksel özelliklerini kapsayan faktörlerin seviye aralığı belirlenir. Üçüncü olarak, deney tasarımı ile spesifik test örnekleri belirlenir ve test yapılır. Dördüncü olarak ise, deneylerden elde edilen veriler YYY ile analiz edilir ve yorumlanır (Demirekler, 2004).

YYY etkin kullanmak için beş adet varsayım vardır:

- Ürün için kritik faktörler bilinmektedir.
- Ürünü etkileyen faktör düzeylerinin bulunduğu ilgilenilen aralık bilinmektedir.
- Deney test aralığında faktörler devamlı değişmektedir.
- Faktörleri, ölçülen cevapla ilişkilendiren bir matematiksel eşitlik vardır.
- Bu eşitlik ile ifade edilen cevap, düzgün bir yüzeydir (Demirekler, 2004).

Bu varsayımların yanı sıra, deney yapan kişi YYY kullanırken, bu beş kısıtlamanın farkında olmalıdır.

YYY'nin sonuç olarak amacı; sistem için optimum çalışma koşullarını belirlemek veya çalışma gerekliliklerini karşılayan bir faktör bölgesini belirlemektir (Montgomery, 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Toprak Mahsülleri Ofisi (TMO) Afyon Alkoloid Fabrikası'ndan alınan haşhaş sapları kullanılmıştır. Sülfürik asit, sodyum hidroksit, etil alkol ve Dinitro Salisilik Asit (DNS) analitik saflıktadır. Selüloz (Celluclast 1.5 L) enzimi Novozymes firmasından (Danimarka) sağlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hammadde hazırlanması

Haşhaş sapları oda sıcaklığında birkaç ay kurutulmuş olup kurutulan hammadde 1-2 cm uzunluğunda kesildikten sonra öğütülmüştür. Hammaddenin elek analizi yapıldıktan sonra 0,224 - 0,850 mikrometre aralığındaki haşhaş sapları deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere cam kavanozlarda buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. Nem tayini (%)

100-105 °C'de etüvde kurutulup, desikatörde sabit tartıma gelen numunenin nem miktarı,

$$\% \text{ NemMiktarı} = \frac{\text{NemAğırlığı}(g)}{\text{ÖrnekAğırlığı}(g)} \times 100 \quad (3.1)$$

Denklem 3.1 ile hesaplanmıştır.

3.2.3. Kül tayini (%)

650 °C'lik kül fırınında 24 saat boyunca yakılan numunenin kül miktarı,

$$\% \text{KülMiktarı} = \frac{\text{KülAğırlığı}(g)}{\text{ÖrnekAğırlığı}(g)} \times 100 \quad (3.2)$$

Denklem 3.2 ile hesaplanmıştır.

3.2.4. Ekstraktif madde (%)

Kuru hammadde (m_0) tartılıp 8 saat boyunca Hekzan çözücüsü ile ekstre edilip kalan katı (m_1) tartılarak ekstraktif yüzdesi ile Denklem 3.3 ile belirlenmiştir.

$$\% W_1 (\text{yüzde ekstraktif}) = ((m_1 - m_2) / m_0) \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.5. Lignin tayini

NREL (National Renewable Energy Laboratories) metoduna göre lignin analizi yapılmıştır. Bunun için; 300 mg'lık hammadde üzerine 3 mL %72'lik sülfürik asit çözeltisi eklenerek 1 dakika boyunca kapaklı tüp içerisinde karıştırılmıştır. 30 °C'lik su banyosunda 60 dakika boyunca her 5 dakikada bir karıştırılmış ve bu işlem sonunda saf su ile %4'e seyreltilmiştir. Seyreltilen numune 121 °C'de 1 saat boyunca otoklavlanıp tüpler oda sıcaklığına geldikten sonra vakumlu filtre kağıdıyla süzölmüştür. Alınan ilk sıvı HPLC analizi için buzdolabında saklanmıştır. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan katı pH nötr olana kadar saf su ile yıkanmış 105 °C'lik etüvde 24 saat kurutulmuş (m_1) ve sonrasında 650 °C'deki kül fırınında 24 saat yakılmıştır (m_2). Lignin miktarı, m_0 başlangıçtaki hammaddeyi göstermek üzere Denklem 3.4 ile hesaplanmıştır (Sluiter ve ark. 2008).

$$\% \text{LigninMiktarı} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \quad (3.4)$$

Ön işlem sonucunda yüzde lignin giderimi; x_1 ön işlem görmemiş hammaddeki lignin miktarını, x_2 de ön işlem görmüş hammaddedekini göstermek üzere; % lignin giderimi Denklem 3.5 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Lignin Giderimi} = \frac{x_1 - x_2}{x_1} * 100 \quad (3.5)$$

3.2.6. HPLC analizi

Lignin tayininde buzdolabında saklanan sıvı faz, filtre kağıdıyla süzöldükten sonra HPLC (Agilent 1100) cihazında selöloz analizi yapılmıştır. Biorad marka Aminex HPX 87P kolonu (300 mm × 7,8 mm) 80 °C'ye ve mobil faz olarak kullanılan saf suyun akış hızı da 0,6 mL/dak.'ya set edilmiştir. Selöloz miktarı glukoz ve sellobiyoz eşdeğeri olarak Denklem 3.6 ile hesaplanmıştır (Sluiter ve ark. 2008).

$$\% \text{ Selöloz} = \frac{\text{glukoz} + \text{sellobiyoz}}{0,3} * 100 \quad (3.6)$$

Hemiselöloz tayininde ise parametreler aynı olup ksiloz, arabinoz, galaktoz, mannoz eşdeğeri olarak Denklem 3.7 ile hesaplanmıştır (Sluiter ve ark. 2008).

$$\% \text{ Hemiselöloz} = \frac{\text{Ksiloz} + \text{Arabinoz} + \text{Galaktoz} + \text{Mannoz}}{0,3} * 100 \quad (3.7)$$

3.2.7. Hammaddeye uygulanan alkali ön işlem

Nem etkisini bertaraf etmek için; nem içeriği % 10 olarak sabit tutulan hammaddeye %0,4 - %2,25 ve %4'lük konsantrasyonlardaki sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Bu işlemler, katı sıvı oranı 1/20 olarak sabit olup 60 ve 90 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca su banyosunda ön işlem uygulanmıştır. Ön işlem sonrasında numuneler filtre kağıdıyla süzöldükten sonra elde edilen katı, saf su ile nötrleştirildikten sonra kurutulmuş ve Denklem 3.8'deki gibi yüzde toplam gravimetrik geri kazanım hesaplanmıştır. Ayrıca ön işlem gören tüm haşhaş saplarına lignin, selöloz ve hemiselöloz miktar tayini yapılmıştır. Tüm analizler en

az dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama sonuçlar verilmiştir (Uzunlu ve ark., 2014).

$$\% \text{ Toplam Grav. Kazanım} = \frac{\text{Ön işlem Sonrasında Kalan Katı (gr)}}{\text{Başlangıçtaki Kuru Madde Miktarı (gr)}} * 100 \quad (3.8)$$

3.2.8. Enzimatik hidroliz

Enzimatik hidroliz deneyleri Shelab marka çalkalamalı inkübatör içerisinde 50 °C sıcaklıkta ve 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Enzim olarak Celluclast 1,5 L (Novazym) enzimi kullanılmıştır. Sabit aktivitede hazırlanan selülozlar (30 FPU/g kuru biyokütle, Celluclast 1.5 L) sodyum asetat-asetik asit tampon çözelti ile pH=4,8'e getirilerek toplam hacim 20 mL olacak şekilde substrata eklenmiştir. Katı sıvı oranı 1/20 olarak sabit olup 3, 6, 12, 24, 36, 48 ve 72 saat sonunda numuneler enzim aktivitesinin durması için 15 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiş ve ardından 5000 rpm ile 5 dakika santrifüjlenerek numune şişelerine alınıp buzdolabında DNS ve HPLC analizi için saklanmıştır (Uzunlu ve ark., 2014).

3.2.9. İndirgen şeker analizi

Enzimatik hidroliz sonucunda DNS metodu ile sıvıda çözünen indirgen şeker miktarı belirlenmiştir. 2/1 oranında DNS çözeltisi ile şeker içeren numuneler karıştırılmış ve kaynar su banyosunda 5 dakika kadar bekletilmiştir. Kaynar su banyosundan alınan çözeltiler hemen soğuk su banyosunda soğutulmuş ve 540 nm dalga boyunda Optima SP3000 marka UV ile absorbans değerleri okunmuştur.

3.3.10. Ön işlem görmüş ve ön işlem uygulanmamış haşhaş sapı örneklerinin SEM analizi

Ön işlem görmüş ve ön işlem uygulanmamış haşhaş sapı örneklerinin SEM görüntüleri Anadolu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Malzeme Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan EVO 50 marka taramalı elektron

mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Görüntü alınmadan önce hammaddeler karbon bandı üzerine yerleştirilmiş ve AGAR marka kaplama cihazı ile altın ve paladyum kaplanmıştır.

3.2.11. Sodyum hidroksit ön işlem parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi optimizasyonu

Sodyum hidroksit ön işlem parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi optimizasyonu deneylerinde toplam 20 deneysel noktadan iki tekrarlı ve altı merkez noktalı, 3 değişkenden oluşan merkezi tümleşik istatistiksel tasarım (CDD) kullanılmıştır. İncelenen sıcaklık (°C) (X_1), NaOH konsantrasyonu (% a/v) (X_2) ve ön işlem zamanı (dak) (X_3) parametrelerin seviyeleri Çizelge 3.1’de, bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Cevap (Y) değerini belirlemek için önerilen ikinci derece polinom model eşitliği Denklem 3.9’da gösterilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3.9)$$

Verilerin istatistiki olarak modele uygunluk analizleri %95 güven aralığında ANOVA testi ile Minitab 16 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Sodyum hidroksit ön işleminde incelenen parametreler ve seviyeleri

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	1
X_1 : Sıcaklık(°C)	60	75	90
X_2 : NaOH konsantrasyonu (a/v)	1,0	2,25	3,50
X_3 : Ön işlem zamanı (dk)	30	60	90

Çizelge 3.2. Sodyum hidroksit ön işleminde bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu

Deney No.	T (°C)	NaOH (% a/v)	Zaman (dak)
1	75	0,99	60
2	75	2,25	60
3	60	3,00	30
4	49,77	2,25	60
5	90	3,00	90
6	75	2,25	60
7	75	2,25	60
8	75	2,25	60
9	60	1,50	90
10	60	3,00	90
11	75	3,50	60
12	75	2,25	9,55
13	90	1,50	90
14	75	2,25	110,45
15	100,23	2,25	60
16	60	1,50	30
17	90	1,50	30
18	75	2,25	60
19	90	3,00	30
20	75	2,25	60

3.2.12. Ön işlem görmüş haşhaş saplarının enzimatik hidroliz verilerinin modellenmesi

3.2.12.1. Michaelis-Menten kinetik model parametrelerinin belirlenmesi

Michaelis-Menten kinetik modeli sabit enzim derişiminde farklı substrat yüzdelerinde ve sabit substrat yüzdesinde farklı enzim derişimleri kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir deney sonucundan elde edilecek maksimum hız (ϑ_{max}) ve yarı doygunluk sabiti (K_m) enzim miktarına ve substrat miktarına bağılı olarak hesaplanmış olup enzim ve substratın enzimatik hidrolizdeki etkisi gözlemlenmiştir.

$$V_o = \frac{\vartheta_{max}[S_o]}{K_m + [S_o]} \quad (3.10)$$

Her bir substrat miktarında başlangıç hızları indirgen şeker miktarlarının zamana karşı grafiklerinden ilk 30 dakikada elde edilen veriler dikkate alınarak hesaplanmıştır. Deneysel verilerin lineer regresyonu ile Denklem 3.10'da sabit enzim miktarında elde edilecek maksimum hızın (ϑ_{max}) ve yarı doyumluk sabitinin (K_m) bulunması için kullanılmıştır. Ayrıca non-lineer eşitlik Excel çözümleyicisi ile analiz edilerek bu parametreler belirlenmiştir. Lineer regresyon için üç farklı yaklaşım uygulanmıştır. Bunlar;

- **Langmuir izotermi**

$$\frac{S_0}{V_0} = \frac{K_m}{\vartheta_{max}} + \frac{S_0}{\vartheta_{max}} \quad (3.11)$$

S_0/V_0 'a karşı S_0 grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi $1/\vartheta_{max}$, kesim noktası ise K_m/ϑ_{max} dır. Lineer grafikten elde edilen veriler ile maksimum hız (ϑ_{max}) ve yarı doyumluk sabiti (K_m) hesaplanmıştır.

- **Lineweaver-Burk yaklaşımı**

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{\vartheta_{max}} + \frac{K_m}{\vartheta_{max}S_0} \quad (3.12)$$

Denklem 3.12'de $1/V_0$ 'a karşı $1/S_0$ grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi K_m/ϑ_{max} , kesim noktası ise $1/\vartheta_{max}$ dır. Lineer grafikten elde edilen veriler ile maksimum hız (ϑ_{max}) ve yarı doyumluk sabiti (K_m) hesaplanmıştır.

- **Eadie-Hofstee yaklaşımı**

$$V_0 = \vartheta_{max} - V_0 \frac{K_m}{S_0} \quad (3.13)$$

V_0 'a karşı V_0/S_0 grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi K_m , kesim noktası ise ϑ_{max} 'dır. Lineer grafikten elde edilen veriler ile maksimum hız (ϑ_{max}) ve yarı doyumluk sabiti (K_m) hesaplanmıştır.

Deneysel sonuçlardan elde edilen v_{max} ve K_m değerleri ile başlangıç hızları hesaplanmıştır. Hesaplanan başlangıç hızları ile deneysel başlangıç hızları arasındaki farklar ortalama mutlak sapma (OMS) olarak hesaplanmıştır.

$$OMS(\%) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{V_{o\text{deneysel}} - V_{o\text{hesaplanan}}}{V_{o\text{deneysel}}} \quad (3.14)$$

3.2.12.2. Difüzyon limitli kinetik model

$$P = P_{\infty} (1 - \exp(-kE_0t))^n \quad (3.15)$$

Bu eşitlikte P ve P_{∞} sırasıyla herhangi bir t ve sonsuz zamanda elde edilen ürün konsantrasyonları, k difüzyon katsayısına bağlı hız sabiti, E_0 başlangıç enzim derişimi, n sistemin yapısına bağlı yapısal difüzyon direnç sabitini göstermektedir. Bu non-lineer eşitlik (3.15) Excel çözümleyicisi ile analiz edilerek k (difüzyon katsayısına bağlı hız sabiti) ve n (sistemin yapısına bağlı yapısal difüzyon direnç sabiti) sabitleri her bir farklı enzim derişimi için hesaplanmıştır.

Deneysel sonuçlardan elde edilen k ve n değerleri ile ürün konsantrasyonları hesaplanmıştır. Hesaplanan ürün konsantrasyonları ile deneysel ürün konsantrasyonları arasındaki farklar ortalama mutlak sapma (OMS) olarak hesaplanmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1.Haşhaş Sapının Kimyasal Bileşimi

Haşhaş sapının nem miktarı %5.0 olup Bölüm 3’de bahsedilen ön işlem uygulanmamış hammaddeye yapılan ekstraktif, lignin ve HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hammadde Karakterizasyonu

Haşhaş Sapı Bileşeni	Yüzde (%)
Holoselüloz	44,81±2,72
Selüloz	24,36±1,29
Ksiloz	7,41±0,45
Mannoz	5,33±0,19
Arabinoz	4,73±0,56
Galaktoz	2,98±0,22
Lignin	19,79±0,95
Ekstraktif madde	14,21±0,55
Kül	9,01±0,37
Diğer	13,69

Bu sonuçlara göre, toplam selüloz ve hemiselüloz (ksiloz+mannoz+arabinoz+galaktoz) haşhaş sapının yaklaşık olarak %45’ini oluşturmaktadır. Bu değer daha önce yapılan bir başka çalışmaya göre daha düşük bulunmuştur (Cengiz ve ark., 2010). Bu farklılık haşhaş bitkisinin yetiştirme yeri, mevsim şartları ve analizlerde kullanılan yöntemler gibi nedenlerden ileri gelebilmektedir.

4.2.Katı Geri Kazanımı, Lignin Giderimi ve Selüloz ve Ksilozun Kazanımında Ön İşlemin Etkisi

İlk biyokütle ağırlığı baz alındığında çözülme katı geri kazanımını % 71,86’den (50°C, % 2,25 NaOH, 60 dak.) % 45,50’e (90°C, % 3 NaOH, 90 dak) özellikle ön işlem durumları artarken azalmıştır. Katı kaybının en önemli nedeni

ligninin uzaklaşması ve hemiselüloz degradasyonudur (Karunanithy ve Muthukumarappan, 2011). Benzer durumda farklı bioatıklara uygulanan ön işlem sonucu katı geri dönüşüm miktarları minimum ve maksimum olarak sırasıyla % 45,4'den % 67,2'e pirinç sapı (Kim ve Han, 2012), % 37'den % 70'e sorgum sapı (McIntosh ve Vancov, 2010) ve % 43'den % 75'e buğday sapında (McIntosh ve Vancov, 2011) bulmuşlardır.

Çizelge 4.2. Katı Geri Kazanımı (Katı G.K.), Lignin Giderimi ve Selüloz ve Ksilozun

Kazanımının deneysel verileri

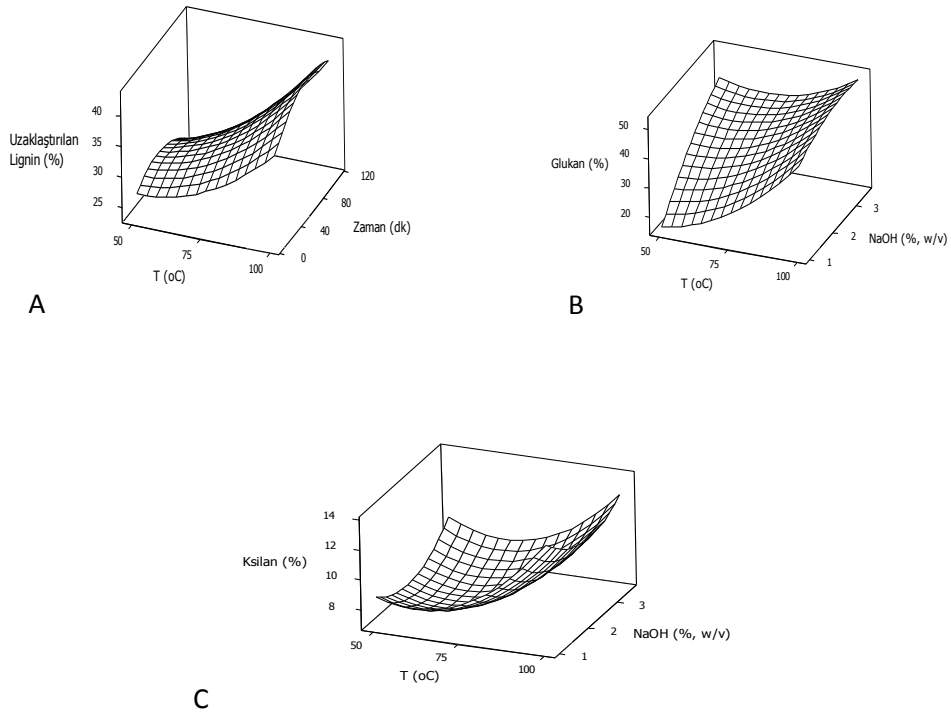
T (°C)	NaOH (%)	Zaman (dak.)	Katı G.K	Lig. Giderimi (%)	Selüloz Kazanımı (%)	Ksiloz Kazanımı (%)
75	0,99	60	61,66	30,22	62,89	80,17
75	2,25	60	63,17	32,10	92,00	63,50
60	3,00	30	61,39	31,15	97,73	70,34
49,77	2,25	60	71,86	27,56	98,12	72,08
90	3,00	90	45,50	43,43	92,61	53,79
75	2,25	60	64,32	31,64	96,38	70,32
75	2,25	60	61,60	34,12	95,21	64,72
75	2,25	60	63,79	30,00	89,61	63,38
60	1,50	90	67,95	22,04	77,12	59,57
60	3,00	90	61,21	34,00	97,48	56,54
75	3,50	60	56,71	36,44	99,14	56,58
75	2,25	9,55	66,74	28,57	89,34	35,83
90	1,50	90	50,47	31,69	89,37	65,17
75	2,25	110,45	52,98	30,07	95,76	38,58
100,23	2,25	60	46,42	42,83	98,61	69,56
60	1,50	30	64,63	27,01	61,02	54,56
90	1,50	30	55,50	35,29	84,46	68,33
75	2,25	60	62,00	34,50	96,44	70,28
90	3,00	30	49,17	36,52	85,75	73,66
75	2,25	60	64,00	33,09	95,76	60,63

En yüksek lignin giderimi (% 43.43), çözülmeyen katı geri kazanımının en düşük olduğu (% 45.50) 90°C, % 3.5 NaOH ve 90 dak. koşullarında elde edilmiştir. Lignin giderimiyle ilgili benzer sonuçlar pirinç sapı (Kim ve Han 2012), buğday sapı (Kumar ve ark., 2009) ve arpa sapı (Duque ve ark., 2013) gibi diğer biyoatıklarla da elde edilmiştir. Lignin giderimini en çok etkileyen faktör (Çizelge 4.2) lineer olarak sıcaklık ve alkali konsantrasyonudur ($p < 0,05$), bunu

takiben sıcaklık ve zamanın birlikte etkisi ($p<0,05$) ve alkali konsantrasyonu ve zaman ($p<0,05$) arasındaki etkileşimdir. Beklenildiği gibi sıcaklık ve alkali konsantrasyonu (Şekil 4.1) ile lignin giderimi artmıştır. Ancak, ön işlem zamanı daha düşük olduğunda sıcaklığın önemli etkisi varken ($p<0,05$), alkali konsantrasyonunun bozunmaya pozitif etkisi görülmemiştir.

Çizelge 4.3. Lignin Giderimi ve Selüloz ve Ksilozun Kazanımının Yanıt Yüzey-İkili Modeli İçin ANOVA Testi

Terim	Lignin Giderimi (%)		Selüloz Kazanımı (%)		Ksiloz Kazanımı (%)	
	Tahmin	<i>p</i> -Değeri	Tahmin	<i>p</i> -Değeri	Tahmin	<i>p</i> -Değeri
Sabit	32,58	0,000	94,39	0,000	65,33	0,000
X1: T (°C)	4,31	0,000	1,44	0,270	1,15	0,543
X2: NaOH (%. w/v)	2,85	0,000	8,96	0,000	-2,42	0,215
X3:Zaman (dak.)	0,23	0,615	2,81	0,046	-1,99	0,301
X1*X1	0,10	0,042	0,46	0,710	2,81	0,145
X2*X2	0,23	0,597	-5,67	0,001	1,94	0,300
X3*X3	-1,19	0,020	-1,59	0,214	-9,08	0,000
X1*X2	-0,47	0,437	-6,57	0,002	-2,35	0,348
X1*X3	0,60	0,318	-0,51	0,759	-1,78	0,473
X2 X3	2,22	0,003	-1,80	0,291	-4,44	0,092
Uyum Eksikliği	0,554		0,064		0,056	
R-Sq	94,43		91,02		80,33	
R-Sq-Adj	89,42		82,93		62,63	



Şekil 4.1. Lignin Giderimi (%) (A), Glukan (Selüloz) Kazanımı (%) (B) ve Ksiloz Kazanımının (%) (C) Sıcaklık (°C), Zaman (dk) ve NaOH (%w/v) etkisinin Cevap-Yüzey Grafiği

Ön işlem görmüş katıda selüloz içeriği %23'den (60°C , % 1,50 NaOH, 30 dak.) % 51,75'e ($100,23^{\circ}\text{C}$, % 2,25 NaOH, 60 dak.) değişmiştir. Maksimum selüloz kazanımı (% 99.14), 75°C , % 3.50 NaOH ve 60 dak. koşullarında elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Bütün parametrelerin pozitif etkisi olmasına rağmen, en etkili değişken NaOH konsantrasyonu ve ön işlem zamanıdır. Sıcaklık ve ön işlemin ikili etkisi Çizelge 4.3'te gösterilmiştir ve bu etkilerin lineer etkisi vardır. Daha yüksek sıcaklıkta ve alkali konsantrasyonunda katı geri kazanımındaki azalmaya bağlı olarak (Şekil 4.1) selüloz kazanım hızı azalmıştır.

Ksiloz içeriği ön işlem görmüş saplarda %3,98'den (75°C , % 2,25 NaOH, 9,55 dak.) % 11.11 ($100,23^{\circ}\text{C}$, % 2,25 NaOH, 60 dak.) aralığında değişmiştir. Ksiloz kazanımı (ön işlem görmemiş hammaddekine göre % 35.83 - % 80.17'i), alkali ortamda hemiselülozun çözünürlüğüne bağlı olarak glukoz kazanımıyla (Egües, 2012) kıyaslandığında daha düşüktür. Benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da elde edilmiştir (McIntosh ve Vancov 2011; Egües 2012).

Ksiloz kazanımı oldukça az artmıştır. Ksiloz kazanımı için, ön işlem zamanı ikili etki göstermiş ve önemli bir lineerlik ve değişkenlerin ikili etkisi görülmemiştir.

4.3.Selüloz Ve Ksiloz Kazanımında Ön İşlem Parametrelerinin Etkisi

Değişik ön işlem kombinasyonlarında selüloz ve ksiloz kazanımı için deneysel ve istatistiksel olarak öngörülen veriler Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Ön işlem görmüş proseslerde merkezi tümleşik istatistiksel tasarım uygulaması genellikle selüloz ve ksiloz faktörleriyle kodlanmış ikinci derece polinom eşitlikleri aşağıdaki gibidir;

$$Y_{\text{Glukoz (mg/g selüloz)}} = -418.544 + 15.02 X_1 + 128.12 X_2 + 4.76 X_3 - 0.11 X_1 X_1 - 36.94 X_2 X_2 - 0.0289 X_3 X_3 + 0.95 X_1 X_2 + 0.003 X_1 X_3 - 0.43 X_2 X_3 \quad (4.1)$$

$$Y_{\text{Ksiloz (mg/g Ksiloz)}} = 855.55 - 8.35 X_1 - 233.13 X_2 + 13.21 X_3 + 0.03 X_1 X_1 - 1.32 X_2 X_2 - 0.013 X_3 X_3 - 4.78 X_1 X_2 - 0.073 X_1 X_3 - 3.32 X_2 X_3 \quad (4.2)$$

Selüloz ve ksiloz kazanımının varyans analizi (ANOVA) modeli Çizelge 4.5'te verilmiştir. Öngörülen modeller hem selüloz hem de ksiloz kazanımı için ($p < 0,05$) önemlidir. Ancak, özellikle selüloz modeli ($p < 0,0001$) ksilozunkinden ($p < 0,016$) daha yüksektir. Uyum eksikliği ve kararlılık (R^2) katsayıları sırasıyla selüloz için % 90,59 (R^2 -ayarlanmış: % 82,13) ve 0,059 ve ksiloz için % 79,61 (R^2 -ayarlanmış: % 63,08) ve 0,266'tir.

Çizelge 4.4. Deneysel ¹ ve modelden ² bulunan glukoz (mg/g selüloz) ve ksiloz (mg/g ksiloz) verimleri

T (°C)	NaOH (% , w/v)	Zaman (dak.)	Glukoz verimi ¹	Glukoz verimi ²	Ksiloz verimi ¹	Ksiloz verimi ²
75	0,99	60	421,48	425,83	754,77	743,38
75	2,25	60	509,43	494,03	665,79	645,24
60	3,00	30	399,21	397,61	578,31	567,30
49,77	2,25	60	384,68	398,93	517,88	600,17
90	3,00	90	457,75	461,39	491,22	527,52
75	2,25	60	492,46	494,03	605,04	645,24
75	2,25	60	485,28	494,03	626,83	645,24
75	2,25	60	470,29	494,03	655,96	645,24
60	1,50	90	455,78	436,18	795,94	785,14
60	3,00	90	407,05	406,73	487,36	409,06
75	3,50	60	458,09	444,69	516,61	542,89
75	2,25	9,55	411,51	394,45	686,31	675,17
90	1,50	90	440,07	448,06	687,94	688,42
75	2,25	110,45	438,03	446,04	524,09	550,12
100,23	2,25	60	474,34	451,04	795,82	728,42
60	1,50	30	385,77	388,52	691,66	644,83
90	1,50	30	389,10	395,83	611,12	678,89
75	2,25	60	485,62	494,03	581,93	645,24
90	3,00	30	421,69	447,69	816,25	816,53
75	2,25	60	491,56	494,03	738,46	645,24

Çizelge 4.5. Glukoz Ve Ksiloz İkili Modelinin Yanıt Yüzey Analizi İçin Anova

Terim	Glukoz Kazanımı (mg/g Başlangıçtaki Selüloz)	Ksiloz Kazanımı (mg/g Başlangıçtaki Ksiloz)
	<i>p</i> -Değeri	<i>p</i> -Değeri
X1: T (°C)	0,008	0,056
X2: NaOH (%. w/v)	0,262	0,007
X3: Time (dak.)	0,009	0,062
X1*X1	0,000	0,703
X2*X2	0,001	0,966
X3*X3	0,000	0,518
X1*X2	0,113	0,042
X1*X3	0,856	0,187
X2 X3	0,149	0,009
Uyum Eksikliği	0,059	0,266
R-Sq (%)	90,59	79,61
R-Sq-Adj (%)	82,13	61,26

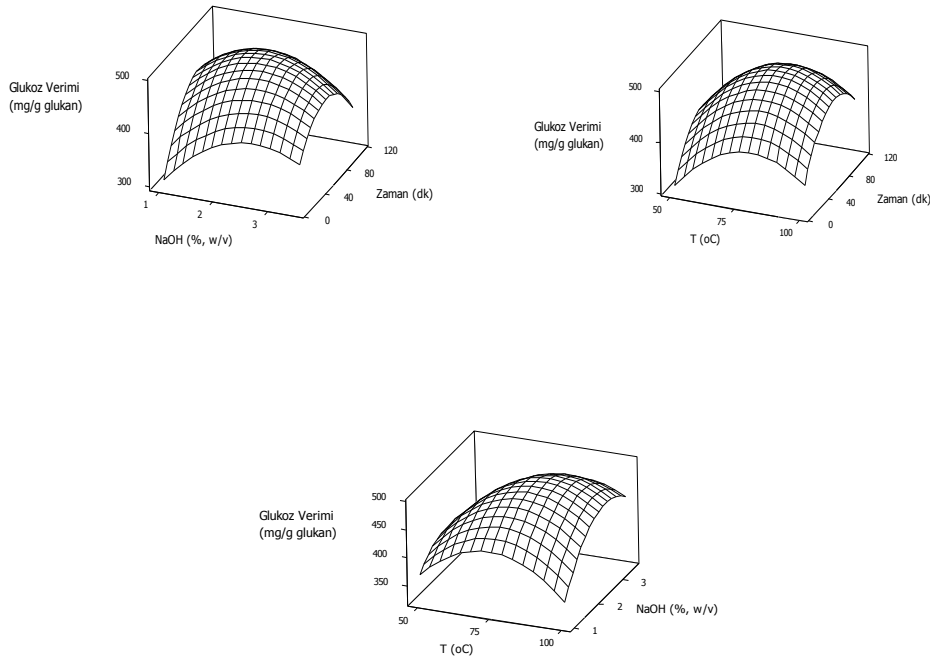
Sıcaklık ve zaman selülozda güçlü lineer etkiye sahipken, bütün parametrelerin ikili etkisinin önemli ve etkileşim etkisinin olmadığı görülmüştür. Ksiloz kazanımı için, sadece alkali konsantrasyonunun önemli derecede lineer etkisi görülmüştür ve alkali konsantrasyonu ve hidroliz zamanı arasında etkileşim etkisi elde edilmiştir. Hem sıcaklık hem de % NaOH'nin merkez nokta değerinin sabit zamanda olduğunda selüloz verimine etkisi Şekil 4.1.'de (B) gösterilmiştir.

Glukoz verimi sıcaklık ve alkali konsantrasyonun artmasıyla artmıştır; ancak, bu iki değişkenin daha fazla artması glukoz verimini azaltmıştır. Benzer sonuç, diğer parametrelerin etkisinde de görülmüştür. Diğer bir deyişle; ön işlem koşullarının gittikçe artması veya azalmasının glukoz veriminde negatif etkisi vardır.

DeneySEL olarak, maksimum glukoz verimi 75oC, % 2,25 NaOH ve 60 dak. merkez nokta durumunda 489,11 mg glukoz /g selüloz olarak elde edilmiştir. Ksiloz verimi, glukoz veriminden daha farklı bir fenomene sahiptir. Daha düşük alkali konsantrasyonlarında sıcaklık ve hidroliz zamanının artmasıyla ksiloz kazanımı artarken, ksiloz veriminde ise daha yüksek alkali konsantrasyonlarında bu parametrelerin negatif etkisi vardır. Bu fenomen, ksiloz hemiselozlarının moleküller arası çapraz ester bağlarının sabunlaştırılmasını baz alan alkali hidroliz mekanizması açıklanmıştır (Sun and Cheng, 2002).

4.4. Glukoz Kazanımının Maksimize Edecek Parametrelerin Optimizasyonu

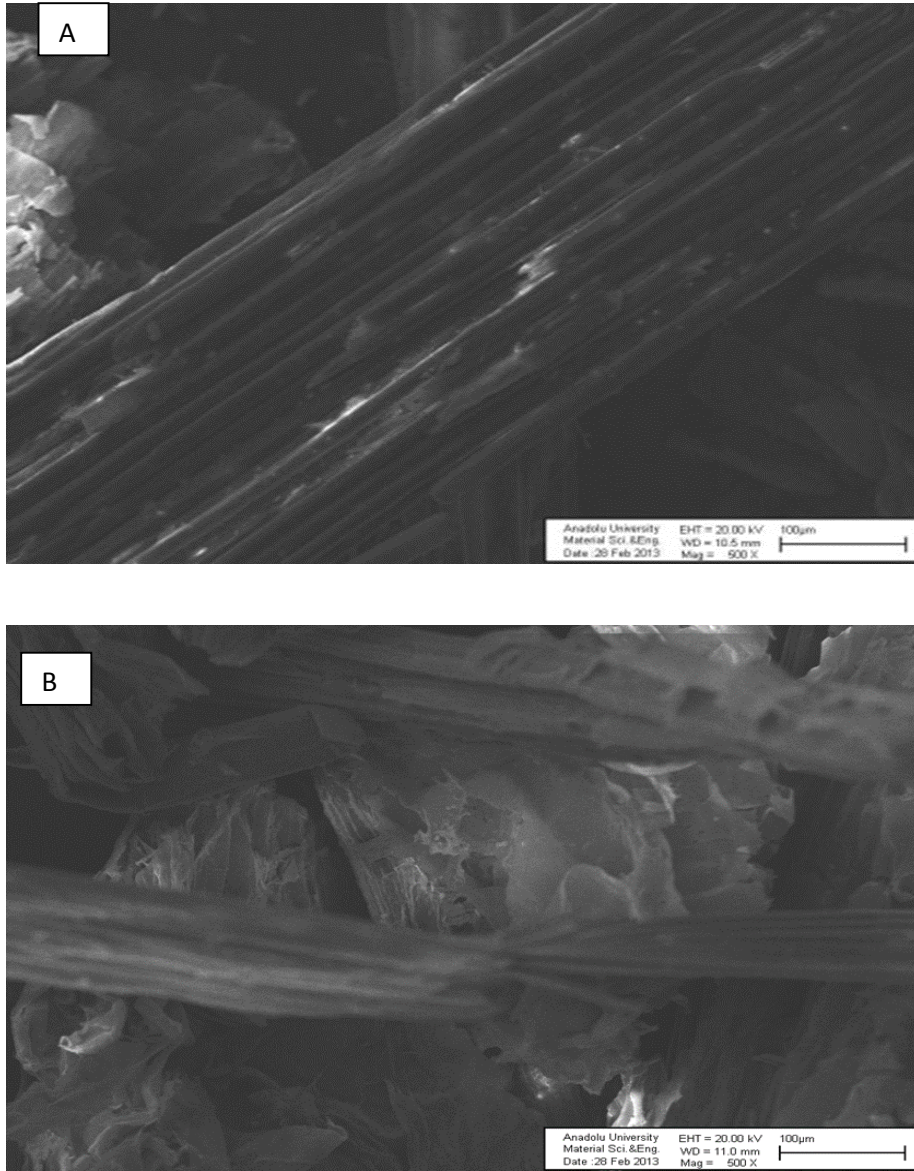
Öngörülen optimum proses değişkenleri glukoz miktarında maksimum verimi elde etmek için Minitab 16 yazılımının yüzey optimizeri kullanılmıştır. Optimum ön işlem koşulları % 2,40 w/v alkali konsantrasyonu, 70 dak. hidroliz zamanı ve 80°C sıcaklıktır. Optimum koşulda, öngörülen maksimum glukoz verimi 524,86 mg/g selülozdur. Beklenen değer sonucunu doğrulamak için deneyler, glukoz verimi 499,35 mg / g selüloz olan en uygun koşullarda yürütülmüştür. Maksimum glukoz kazanımının aksine, bu koşullarda, önemli ölçüde ($p < 0,05$) daha düşük ksiloz kazanımı (498,66 mg ksiloz / g ksiloz) elde edilmiştir. Optimum koşullarda, lignin giderimi deneysel verilerde yaklaşık % 99'dur; ancak, selüloz ve ksilozun kazanımı maksimum kazanımlarından daha düşüktür (sırasıyla % 79,17 ve % 35,82).



Şekil 4.2. Cevap-Yüzey Grafiğinde Glukoz Kazanımının (mg/g başlangıç selüloz) Sıcaklık (°C), Zaman (dak) ve NaOH (% w/v) Etkileşimli Etkisinin Yanıt Yüzey Grafiği

4.5.Ön İşlem Görmüş Ve Ön İşlem Uygulanmamış Haşhaş Sapı Örneklerinin SEM Analizleri

Şekil 4.3 A’da gösterilen ön işlem görmemiş ve B’de ön işlem görmüş hammaddenin SEM analizi görülmekte olup buna göre ön işlem görmemiş hammadde düzenli bir yapıya sahipken bu yapının ön işlem etkisiyle bozulduğu özellikle gözlenmektedir.



Şekil 4.3. Ön işlem görmemiş (A) ve 3% NaOH, 60⁰ C ve 30 dak. ön işlem görmüş (B) haşhaş sapının SEM görüntüsü

4.5.1. Ön işlem görmüş haşhaş saplarının enzimatik hidroliz verilerinin modellenmesi

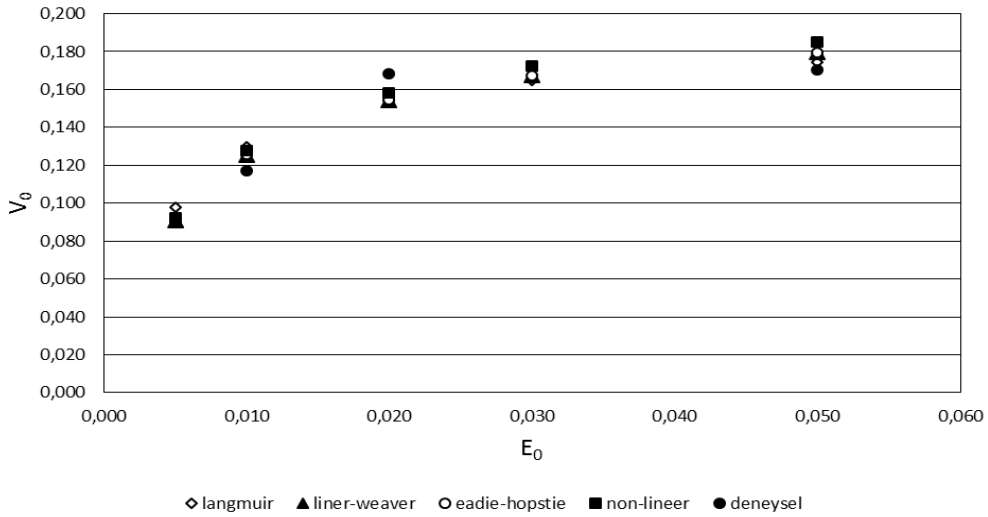
4.5.1.1. Michaelis-Menten kinetik model parametrelerinin belirlenmesi

Enzim konsantrasyonu değişimine göre, 4 farklı şekilde hesaplanan Michaelis-Menten sabitleri Çizelge 4.6'da, enzim derişimi ile başlangıç enzimatik hidroliz hızlarının değişimini gösteren grafik ise Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Enzim konsantrasyonu değişimine göre Michaelis-Menten sabitleri

	langmuir	liner-weaver	eadie-hopstie	non-lineer
V_{max}	0,191	0,201	0,201	0,209
K_e	0,005	0,006	0,006	0,006
R²	0,968	0,966	0,967	0,966
OMS (%)	6,399	4,903	4,830	4,483

Hesaplanan V_{max} (mg/mL*dak) ve K_e 'ler (mg/mL) birbirine yakın değerler olup OMS'ler kıyaslandığında da en iyi sonucun non-linear çözüm metoduyla bulunduğu görülmektedir (%4,483). Burada zaman ve enzim miktarının artmasıyla enzimin ilk hızı artmaktadır.



Şekil 4.4. Alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının başlangıç enzimatik hidroliz hızına (deneyisel ve farklı yaklaşımlarla çözülen Michaelis-Menten modelinden hesaplanan) başlangıç enzim konsantrasyonunun etkisi

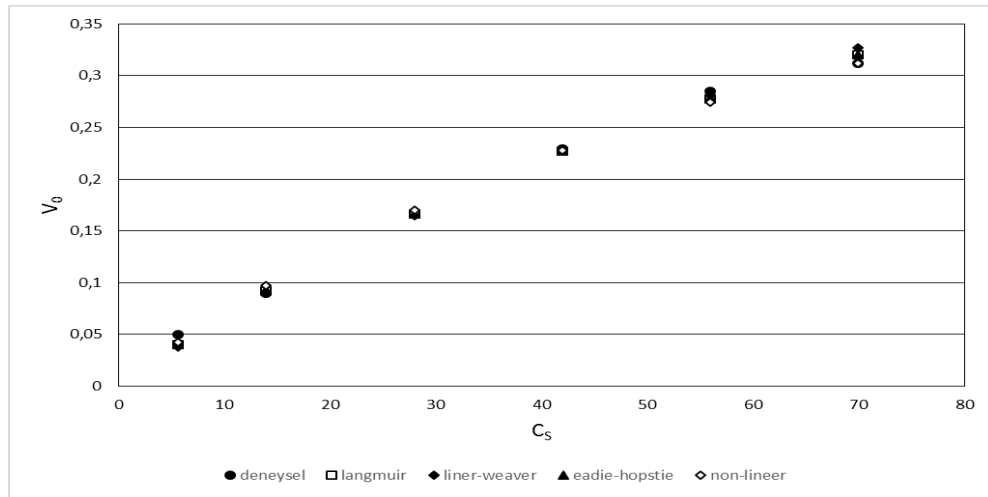
Şekil 4.4’de deneysel olarak elde edilen başlangıç hızlarının modelden elde edilen başlangıç hızlarına çok yakın değerler olduğu görülmektedir. Enzim miktarınının 0,03’e kadar yükseltilmesi ile başlangıç hızının arttığı görülmektedir, ancak enzim miktarının 0,03’den (mL enzim /mL çözelti) 0,05’e yükseltilmesi ile başlangıç hızının değişmediği görülmektedir.

Başlangıç substrat miktarının değişimine göre, 4 farklı şekilde hesaplanan Michaelis-Menten sabitleri Çizelge 4.7’de başlangıç substrat miktarı ile başlangıç enzimatik hidroliz hızlarının değişimini gösteren grafik ise Şekil 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Substrat konsantrasyonu değişimine göre Michaelis-Menten sabitleri

	langmuir	liner-weaver	eadie-hopstie	non-linear
V_{max}	0,833	0,936	0,839	0,704
K_e	112,077	130,479	113,150	87,818
R²	0,998	0,998	0,998	0,998
OMS(%)	5,007	5,249	5,023	2,548

Hesaplanan V_{max} (mg/mL*dak) ve K_e ’ler (mg/mL) birbirine yakın değerler olup OMS’ler kıyaslandığında da en iyi sonucun non-linear çözüm metoduyla bulunduğu görülmektedir (%2,548).



Şekil 4.5. Alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının başlangıç enzimatik hidroliz hızına (deneysel ve farklı yaklaşımlarla çözülen Michaelis-Menten modelinden hesaplanan) başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi.

Şekil 4.5’de deneysel olarak elde edilen başlangıç hızlarının modelden elde edilen başlangıç hızlarına çok yakın değerler olduğu görülmektedir. Substrat miktarının artması ile elde edilen başlangıç enzimatik hidroliz hızlarının arttığı görülmektedir.

4.5.1.2. Difüzyon limitli kinetik model

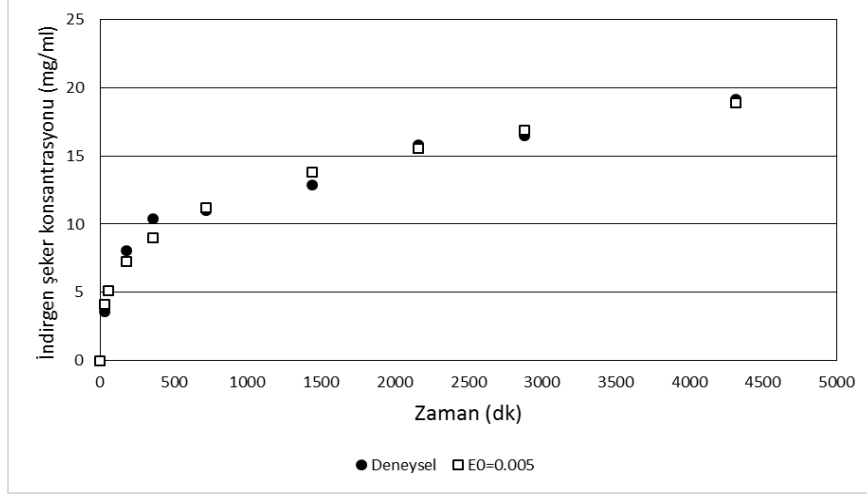
Çizelge 4.8’de farklı enzim konsantrasyonlarından elde edilen difüzyon limitli kinetik model sabitleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Difüzyon limitli kinetik modeli sabitleri

Enzim miktarı (mL enzim /mL çözelti)	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
k	0,016	0,021	0,014	0,008	0,010	0,008
n	0,318	0,349	0,279	0,264	0,263	0,294
R²	0,994	0,989	0,993	0,996	0,990	0,996
Vo	1,888	2,357	2,923	2,705	2,987	2,873
OMS (%)	5,806	5,556	4,692	3,269	4,941	2,759

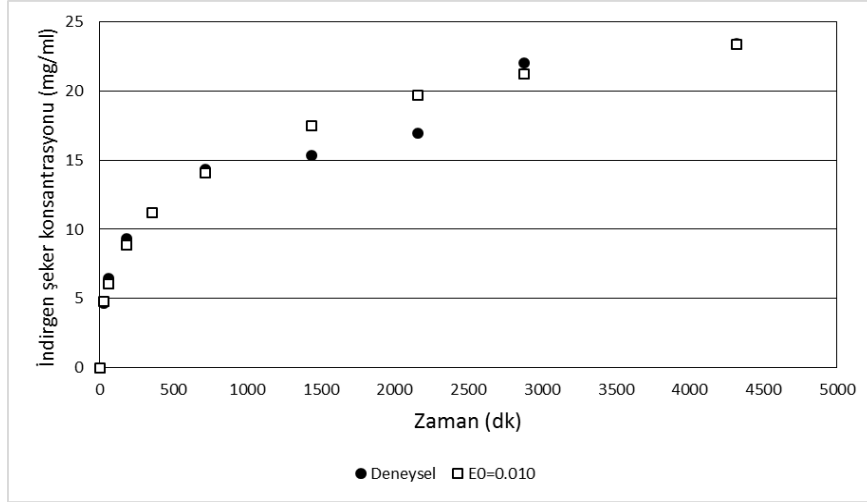
$n = 0,9-1,0$ ise reaksiyon 1. derece bir reaksiyondur ve difüzyon direnci küçüktür (Carrillo ve ark., 2005). Sistemin yapısına bağlı yapısal difüzyon direnç sabiti (n) 0,263 ile 0,318 aralığında olup (yüksek difüzyon direnci) enzim derişimi artıkça azalmaktadır. Difüzyon katsayısına bağlı hız sabiti ($k=mL/mg*s$) enzim miktarının artmasıyla azalmaktadır.

Şekil 4,6’da 0,005 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarına zamanla etkisi görülmektedir.



Şekil 4.6. 0,005 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi

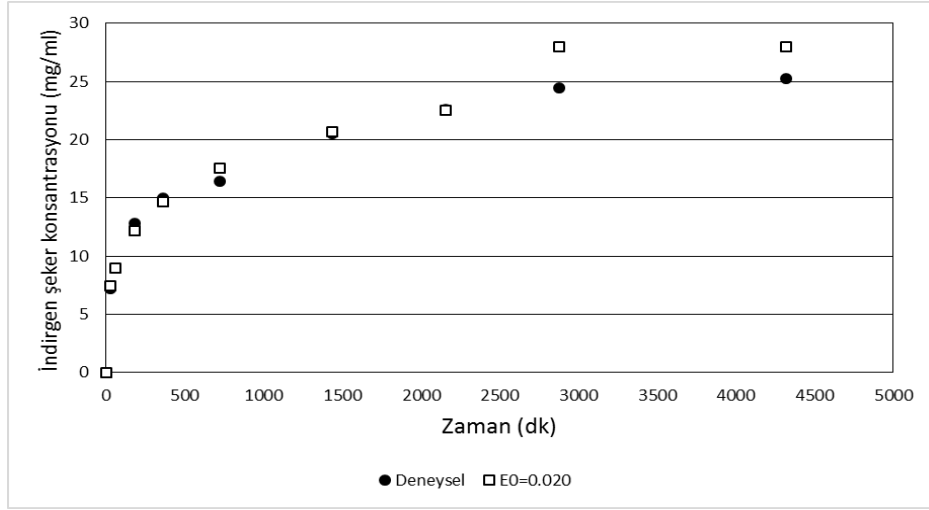
Şekil 4.6'ya göre modelden elde edilen veriler ile deneysel verilerin birbirine oldukça uyumlu olduğu görülmektedir (OMS %5,806). Şekil 4,7'de 0,010 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarına zamanla etkisi görülmektedir.



Şekil 4.7. 0,010 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi

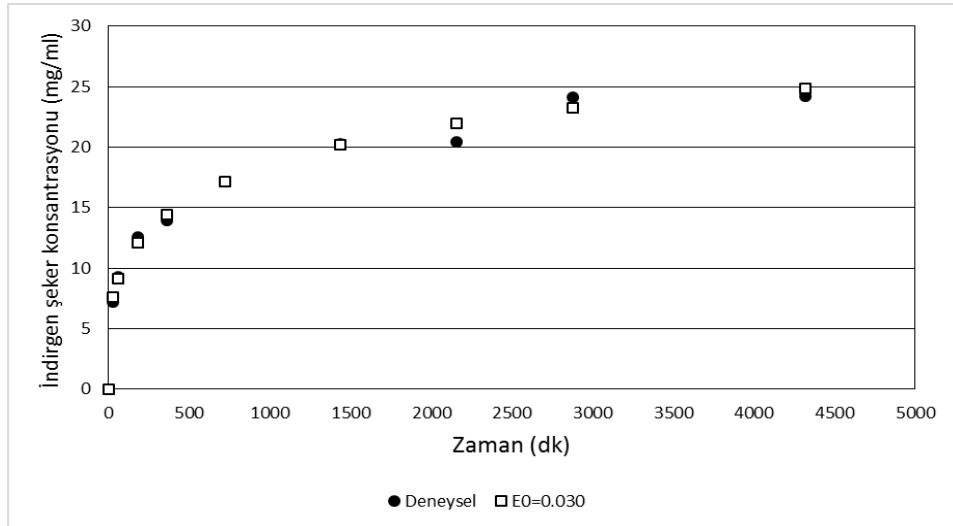
Şekil 4.7'ye göre modelden elede edilen veriler ile deneysel verilerin 24 saatten sonra saptığı gözlemlenmektedir. Şekil 4.8'de 0,020 (mL enzim /mL

çözelti) başlangıç enzim derişiminin enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarına zamanla etkisi görülmektedir.



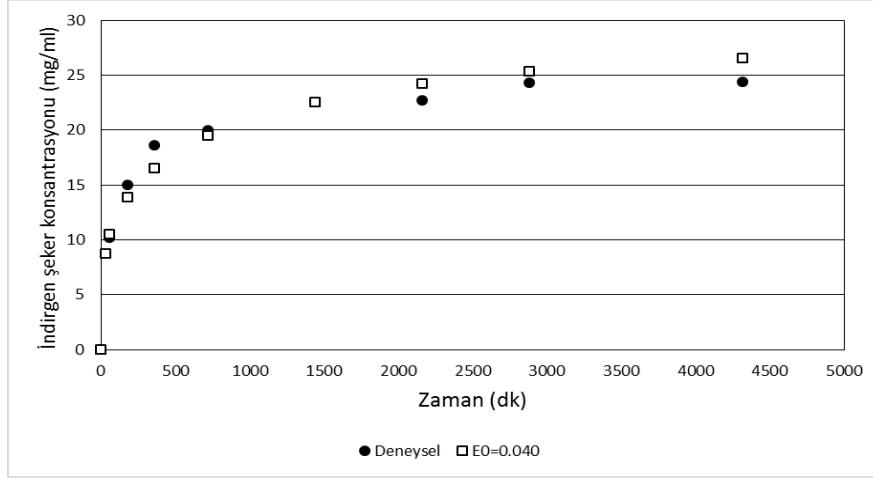
Şekil 4.8. 0,020 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi

Şekil 4.8'e göre modelden elde edilen veriler ile deneysel verilerin 48 saatten sonra saptığı gözlemlenmektedir. Şekil 4.9'da 0,030 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarına zamanla etkisi görülmektedir.



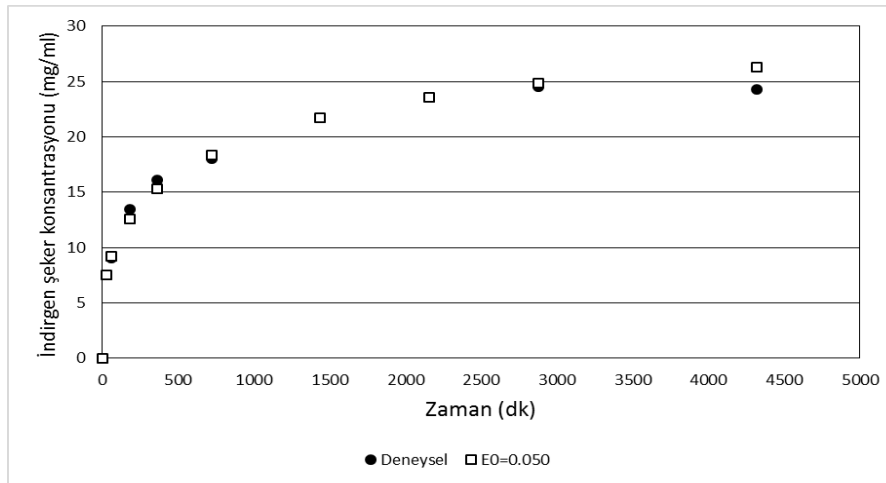
Şekil 4.9. 0,030 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi

Şekil 4.9'a göre modelden elde edilen veriler ile deneysel verilerin birbiri ile uyumlu oldukları gözlemlenmektedir (OMS %3,269). Şekil 4,10'da 0,040 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarına zamanla etkisi görülmektedir.



Şekil 4.10. 0,040 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi

Şekil 4.10'a göre modelden elde edilen veriler ile deneysel verilerin birbiri ile uyumlu oldukları gözlemlenmektedir (OMS %4,941). Şekil 4,11'da 0,050 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen indirgen şeker miktarına zamanla etkisi görülmektedir.



Şekil 4.11. 0,050 (mL enzim /mL çözelti) başlangıç enzim derişiminin alkali ön işlem uygulanmış haşhaş sapının enzimatik hidrolizine etkisi

Şekil 4.11'e göre modelden elde edilen veriler ile deneysel verilerin birbiri ile uyumlu oldukları gözlemlenmektedir (OMS %2,759).

Difüzyon limitli kinetik modele göre enzim miktarının artması ile model ile deneysel verilerden elde edilen sonuçlarının birbiri ile uyumlarının arttığı gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Haşhaş sapının karakterizasyonunda Çizelge 4.1'de ekstraktifsiz yüzdelere göre holoselüloz % 52,23, hemiselüloz miktarı % 23,84 ve lignin miktarı % 23,06'dır. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışma ile kıyaslandığında (Dinçtürk, 2007) paralellik göstermektedir. Ancak ekstraktif ve kül miktarları birbirinden farklıdır. Bu da hammaddenin farklı yer ve zamanlarda iklime ve de tohuma bağlı olarak değişkenlik göstermesinin sonucudur. Aslında bitki morfolojisinde lignin, hemiselüloz ve selüloz miktarı bitkiden bitkiye, yaşa, toprağa, iklime vs. göre değişmektedir. Çizelge 4.1'deki verilerde bakılması gereken diğer bir husus da lignin içeriğidir. Lignin içeriği enzimatik hidrolizde sınırlayıcı bir faktör iken diğer bileşenler de aynı derecede önemli bir etkiye sahip olabilir (Kristensen ve ark. 2007).

Lignin etkisini azaltmada enzimatik hidrolizden önce uygulanabilecek etkili yol ön işlem uygulamaktır. Ön işlemin lignin çeperini parçalayarak enzimin selülozo ulaşabilirliğini arttırdığını (Li ve Liu, 2010; Sun ve Cheng, 2002; Taherzadeh ve Karimi, 2008; Alvira, 2010 vb.) daha önceki çalışmalar da desteklemiştir.

Çizelge 4.2'te; sıcaklık, alkali konsantrasyonu ve zamanın; katı geri kazanımında, uzaklaştırılmaya çalışılan ligninde, selüloz ve ksiloz miktarındaki değişimlerde önemli derecede bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkiler göz önünde bulundurulduğunda maksimum verim, katı geri kazanımında düşük alkali miktarı, düşük sıcaklık ve minimum zamanda; uzaklaştırılan lignin: yüksek sıcaklık, maksimum alkali konsantrasyonu ve optimum zamanda; selüloz kazanımında: maksimum değerlerdeki alkali konsantrasyonu, sıcaklık ve zamanda; ksiloz kazanımında da düşük alkali konsantrasyonu, optimum zaman ve yüksek sıcaklıkta elde edilmiştir.

Çizelge 4.4'te en yüksek glukoz verimi 509,43 mg/g selüloz (124,10 mg/g hammadde) 75 °C, % 2,25 NaOH, 60 dakikada; ksiloz verimi 816,25 mg/g ksiloz (60,48 mg/g hammadde) 90 °C, % 3,00 NaOH, 30 dakikada elde edilmiştir. Burada glukoz verimi yanıt yüzey metodolojisinin merkez noktasında maksimum

olurken, ksiloz verimi ise yüksek sıcaklık ve alkali konsantrasyonu ve düşük zamanda maksimum olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4'te öngörülen değerler yanıt yüzey analizinden elde edilen uzaklaştırılan lignin % 94,4 , katı geri kazanımı %93,23, selüloz (mg/mg hammadde) %97,98, ksiloz (mg/g hammadde) %80,57, glukoz (mg/g selüloz) %88,89 ve ksiloz (mg/g ksiloz) %79,61 R² değerlerine göre hesaplanmıştır. Burada ksiloz değerleri düşük olup ancak kabul edilebilir degerdedir. Sırasıyla p değeri uyum eksikliğine baktığımızda 0,554; 0,012; 0,439; 0,098; 0,120 ve 0,266'dır ve bu saf hataya göre önemli değildir ve modeller cevaplardaki varyasyonu açıklamaya yeterlidir denilebilir.

Maksimum glukoz geri kazanımının ortalama değeri 489,11 (mg/g selüloz) yanıt yüzey metodolojisinin merkez noktasında (75 °C, %2,25 NaOH ve 60 dak.) elde edilmiştir. Ksiloz verimi ise düşük alkali konsantrasyonunda sıcaklık ve hidroliz zamanının artmasıyla artarken, parametrelerin bu etkisi daha yüksek alkali konsantrasyonlarında negatiftir. Bu, ksiloz moleküller arası çapraz bağlama ester bağlarının yarı selülozlar saponifikasyonunu baz alan alkali hidroliz mekanizmasıyla açıklanabilir (Sun ve Cheng, 2002).

Yanıt yüzey analiziyle optimum koşullar; %2,40 alkali konsantrasyonu, 70 dakika hidroliz zamanı ve 80 °C reaksiyon sıcaklığı olarak bulunmuştur. Optimum bu koşullarda öngörülen maksimum glukoz verimi 524,86 (mg/g selüloz)'dır. Optimal bu koşullar, deneysel veriye göre uyarlandığında verim 499,35 mg/g selülozdur. Maksimum glukoz geri kazanımındaki koşullarda ksiloz geri kazanımı 498,66 (mg/g ksiloz) olarak bulunmuştur. Kısacası, optimum koşulda deneysel olarak maksimum %99 lignin giderimi sağlanırken, % 79,17 selüloz ve % 35,82 ksiloz geri kazanımları maksimum kazanımlarından daha düşük olarak elde edilmiştir.

Enzim konsantrasyonunun artması selüloz dönüşümünü doygunluk noktasına kadar artıracaktır, bu noktadan sonra daha fazla enzim yüklemesi enzimin birleşeceği substrat yeterli olamayacağından dolayı dönüşüme pozitif etkisi olmayacaktır. Çizelge 4.6'da 180. dakikada 0,04'lük (mL enzim/mL çözelti) enzim yüklemesinde 14,97 iken 0,05'de 13,48 olması substratın bu noktada doygunluğa ulaştığını göstermektedir. OMS'ler kıyaslandığında da en iyi sonucun

non-linear çözüm metoduyla bulunduğu görülmektedir (%4,483) (V_{max} : 0,209 ve K_e : 0,006). Burada zaman ve enzim miktarının artmasıyla enzimin ilk hızı artmaktadır (Şekil 4.5).

Çizelge 4.7’de substrat miktarının artmasının selüloz dönüşümünü azalttığı görülmektedir. En yüksek dönüşümün elde edildiği 1/10 katı sıvı oranı, bu deney için en uygun çalışma koşulu olarak elde edilmiştir. Hesaplanan V_{max} (mg/mL*dak) ve K_e ’ler (mg/mL) birbirine yakın değerler olup OMS’ler kıyaslandığında da en iyi sonucun non-linear çözüm metoduyla bulunduğu görülmektedir (%2,548) (V_{max} : 0,704 ve K_e : 87,818).

Çizelge 4.8’da gösterilen difüzyon direnç sabitinin enzim yüklemesi arttıkça azalmasının nedeni; enzim molekülleri tarafından üretilen molüküler sterical faktörüne bağlı olabilir (Carrillo ve ark., 2005). Hız sabitinin azalması ise enzim sisteminde katalitik aktiviteyi azaltan yüksek enzim konsantrasyonunda ürün oluşumu için ürün inhibisyonunun önemine bağlı olmalıdır (Carrillo ve ark., 2005). Difüzyon limitli kinetik modele göre enzim miktarının artması ile model ile deneysel verilerden elde edilen sonuçlarının biribiri ile uyumlarının arttığı gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros ve M., Negro, M.J., “Pretreatment Technologies For An Efficient Bioethanol Production Process Based On Enzymatic Hydrolysis: A Review”, *Bioresource Technology*, 101 4851–4861, 2010.
- Anderson, M.J. ve Whitcomb, P.J., *Optimize Your Process-Optimization Efforts*, Chemical Engineering Progress, December, 1996.
- Bansal P., Hall M., Realf M.J., Lee J. H. ve Bommarius A.S., “Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates”, *Biotechnology Advances*, Volume 27, Issue 6, 833–848, 2009.
- Bezerra, R.M.F. ve Dias, A.A., “Discrimination among eight modified Michaelis–Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios”, *Appl. Biochem. Biotech.*, 112, 173–84, 2004.
- Bjerre, A.B., Olesen, A.B., Fernqvist, T., Plöger, A. ve Schmidt, A.S., “Pretreatment Of Wheat Straw Using Combined Wet Oxidation And Alkaline Hydrolysis Resulting In Convertible Cellulose And Hemicellulose”, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 568-577, 1996.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B. ve Ramakrishnan S., *Chemical And Physicochemical Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass*, Department of Chemical and Biomedical Engineering, FAMU-FSU College of Engineering, USA; Department of Biotechnology, Indian of Technology, Hindistan, 2011.
- Carrillo F., Lis M.J. ve Colom X., M. Lo’pez-Mesas ve J. Valldeperas, “Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study”, *Process Biochemistry*, 40 3360–3364, 2005.
- Cengiz, M., Dinçtürk, O.D. ve Şahin, H.T., “Fractional extraction and structural characterization of opium poppy and cotton stalks hemicelluloses,” *Pharmacogn. Mag.* 6(24), 315–319, 2010.
- Chenlin Li ve arkadaşları, “Comparison Of Dilute Acid And Ionic Pretreatment Of Switchgrass: Biomass Recalcitrance, Delignification And Enzymatic Saccharification”, *Bioresource Technology*, 101 4900–4906, 2010.
- Coughlan, M.P., “Enzyme systems for lignocellulose degradation”, *Elsevier Applied Science*, London, 1989.

- Cullen D. ve Kersten P., *Fungal Enzymes For Lignocellulose Degradation*, Applied Molecular Genetic Of Filamentous Fungi; Edited By J.R. Kinghorn ve G. Turner; Blackie Academic & Professional, 1992.
- Çöpür, Y., Tozluoğlu, A., Özyürek ve Ö., “Selülozik Biyoetanol Üretim Teknolojisi”, *Ormancılık Dergisi*, Düzce, 2011.
- Demirekler P., *Optimization of Microwave-halogen Lamp Baking of Bread*, Ortadoğu Teknik Üniveristesi, Doğal ve Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Ankara, 2004.
- Dinçtürk, O.D., *Haşhaş Sapı Ve Pamuk Sapı Hemiselülozların Alkali H2O2 İle Fraksiyonel Ekstraksiyonu Ve Bileşim Karakterizasyonu*, Süleyman Demirel Üniversitesi, FBE, Kimya A.B.D. Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F. Ve Ballesteros, M., “Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis”, *Process Biochem.* 48, 775–781, 2013.
- Egües, I., Sanchez, C., Mondragon, I. ve Labidi, J., “Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks.”, *Bioresour. Technol.* 103(1), 239-248, 2012.
- Fogler H.S., *Elements Of Chemical Reaction Engineering*, Fourth Edition, ISBN 0-13-047394-4, 2005.
- Gan, Q, Allen S.J. ve Taylor G., “Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling”, *Process Biochemistry*, Volume 38, Issue 7, 1003–1018, 2003.
- Hendriks, A.T: ve Zeeman, G. “Pretreatment To Enhance The Digestibility Of Lignocellulosic Biomass”, *Bioresource Technology*, 100 10–18, 2009.
- İşler N., *Haşhaş Tarımı*, M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1003
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B. ve F., C. “Enzymatic Conversion Of Lignocellulose Into Fermentable Sugars: Challenges And Opportunities”, DOI: 10.1002/bbb.4; *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 1:119–134, 2007.
- Karunanithy, C. ve Muthukumarappan, K., “Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass”, *Biochem. Eng., J.* 54, 71–82, 2011.

- Kim, I. and Han, J.-I. "Optimization of 252 alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology", *Biomass Bioenerg.*, 46, 210-217, 2012.
- Kireççi, M., *Farklı Ortamlardan İzole Edilen Bakterilerle Lignin Biyodegradasyonunun Araştırılması*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 2006.
- Kristensen J. B. ve arkadaşları, "Use Of Surface Active Additives İn Enzymatic Hydrolysis Of Wheat Straw Lignocellulose", *Enzyme and Microbial Technology*, 40 888–895, 2007.
- Kristensen, J. B., "Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: substrate interactions and high solids loadings", *Forest & Landscape*, University of Copenhagen, 2009.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. ve Stroeve, P., "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48(8), 3713-3729, 2009.
- Laughlin, J. C., "The effect of band placed nitrogen and phosphorus fertilizer on the yield of poppies (*Papaver somniferum* L.) grown in Krasnozem soil," *Acta Hort.*, 73, 165-169, 1978.
- Lee, J., "Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol", *Journal of Biotechnology*, 56, 1-24, 1997.
- Lee, J.M., *Biochemical engineering*, Washington State University, Prentice Hall Inc., 2002.
- Li, M. ve Liu, Y. "Fermentation Of Hemicellulose Rich Liquid Fraction Derived From Steam Pretreatment Softwoods", *British Columbia University*, 2010.
- Madson, P. W., "Lignocellulosic Feedstocks For Ethanol Production: The Ultimate Renewable Energy Source", 2004, <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/aiche-2004/pdf/papers/035a.pdf> , AICHE Annual Meeting, Austin, Texas
- McIntosh, S. ve Vancov, T., "Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment", *Bioresour. Technol.*, 101, 6718-6727, 2010.
- McIntosh, S. ve Vancov, T., "Optimization of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw", *Biomass Bioenerg.*, 35, 3094-3103, 2011.

- Mengeloğlu, F., Alma, M.H., “Buğday Saplarının Kompozit Levha Üretiminde Kullanılması”, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (2), 2002.
- Mielenz, J. R, “Ethanol Production From Biomass: Technology And Commercialization Status”, *Elsevier Science Ltd.* 4:324–329, 2001.
- Montgomery D.C., *Design and Analysis of Experiments*, Wiley Publisher, A.B.D. 2000.
- Ohmine K, Ooshima H, Harano Y., “Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from *Trichoderma viride*”. *Biotechnol Bioeng.*, 25, 2041–53, 1983.
- Pınar, B., *Enzim Kinetiğinin Modellenmesi*, Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalürji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, 2008.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M. ve Castro, E., *Ethanol Production From Pretreated Olive Tree Wood And Sunflower Stalks By An SSF Process*, Department of Chemical, Environment and Material Engineering, University of Jaen, İspanya, 2006.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. ve Crocker, D. (2008a). “Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass,” *Technical Report NRE*, TP-510-42618 Revised, April 2008.
- Sun, Y. ve Cheng, J., “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production”, *Bioresource Technology*, 83, 1–11, 2002.
- Taherzadeh, M.J. ve Karimi, K. “Pretreatment Of Lignocelulosic Wastes To Improve Ethanol And Production: A Review”, *Int. J. Mol. Sci*, 9, 1621-1651, 2008.
- Tanrıverdi, H., *Karaçam (Pinus Nigra Arnold.) Ve Kızılçam (Pinus Brutia Ten.) Odunundaki Polisakkarit Karakterizasyonu Ve Miktarı İle Lignin Miktarı Üzerine Kromatografik Ve Spektrofotometrik Araştırmalar*, Süleyman Demirel Üniversitesi FBE.2004.
- T.C. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı Yenilenebilir Enerji Genel Müdürlüğü Biyokütle Enerjisi Potansiyeli Atlası, 2014, <http://bepa.yegm.gov.tr/>
- Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK), 2011, Zirai İstatistik Verileri.
- Uzunlu, N.; Hosgun, E.Z.; Bozan, B., Optimization of Alkaline Pretreatment for Enzymatic Saccharification of Poppy Stalks, *BIORESOURCES*, 9(2) 2824-2834 (2014)
- Walker L.P. ve Wilson D.B., “Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview”, *Bioresource Technology*, Volume 36, Issue 1, 3–14, 1991.

Yu Zhang, Jing-Liang Xu, Hui-Juan Xu, Zhen-Hong Yuan ve Ying Guo,
“Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of
steam-exploded wheat straw”, *Bioresource Technology*, 101 8261–8266,
2010.