


## Tütün Saplarından Kombine Otohidroliz ve Enzimatik Hidroliz ile Ksiloz Üretimi

Fatmagül Halıcı Demir<sup>1</sup> , Özlem Akpınar<sup>2</sup>  <sup>1</sup>Trakya Üniversitesi, Arda Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Programı, Gıda Teknolojisi Bölümü, Edirne<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat

Geliş Tarihi (Received): 27.01.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 15.06.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ozlem.akpinar@gop.edu.tr (Ö. Akpınar)

© 0 356 252 17 29 / 2880-2881  0 356 252 17 29

### ÖZ

Tütün sapları, yaprakları alındıktan sonra geride kalan ksilanca zengin, önemli bir ekonomik değeri bulunmayan ancak ksiloz ve ksilitol üretimi için potansiyel bir kaynak oluşturacak bir atıktır. Ksiloz genellikle kimyasal metotlarla üretilir; bu yöntemle asit gibi korozif kimyasalların kullanılması ya da işlem sırasında istenmeyen bileşiklerin oluşması gibi olumsuzluklar görülmektedir. Alternatif olarak, ksiloz enzim hidroliziyle de üretilebilir. Enzimatik hidroliz daha spesifik olduğu gibi, reaksiyon ılımlı koşullarda gerçekleşir ve hidroliz aşamasında istenmeyen bileşikler oluşmaz. Bu çalışmada tütün sapları 160°C'de 1 saatte ekstrakte edilen ksilanca zengin likörden *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile ksiloz üretilmiştir. Hidrolizasyon işlemi cevap yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimum substrat ve enzim konsantrasyonu 0.28 g atık/mL KOL ve 228 U/mL olarak bulunmuştur. Optimum koşullar altında yapılan hidrolizasyonunda ise ksiloz %79.8 verimle ve 1.9 g/g seçicilikle üretilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ksiloz, Ksilanaz, Otohidroliz, Tütün sapı, Optimizasyon

### Xylose Production By Combined Autohydrolysis and Enzymatic Hydrolysis From Tobacco Stalks

#### ABSTRACT

Tobacco stalk remains after the harvest of leaves and is no important economic value but it is rich in xylan that can serve as a potential source for xylose and xylitol production. Generally, xylose is produced by chemical methods, but this method has several disadvantages such as use of corrosive chemicals like acid or the formation of undesired compounds. Alternatively, xylose can be produced by enzyme hydrolysis. Enzymatic hydrolysis is more specific and the reaction takes place at mild conditions and does not produce undesirable compounds. In this study, xylan rich liquors, extracted at 160°C for 1 h from tobacco stalks, were used to produce xylose with *Trichoderma longibrachiatum* xylanase. The optimum substrate concentrations and enzyme activity were 0.28 g waste/mL CAL and 228 U/mL, respectively. Under the optimum condition, xylose yield and selectivity were 79.8% and 1.9 g/g, respectively.

**Keywords:** Xylose, Xylanase, Autohydrolysis, Tobacco stalk, Optimization

#### GİRİŞ

Tütün (*Nicotiana sp.*), dünyanın birçok bölgesinde ve Türkiye'nin Ege ve Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen

önemli bir endüstriyel bitkidir. Üretime bağlı olarak, yaprakları alındıktan sonra Türkiye'de yıllık 300 000 tondan fazla tütün sapı oluşmaktadır [1, 2]. Oluşan tütün sapları, diğer tarımsal atıklar gibi ya yakılmakta ya da

tarlada çürümeye bırakılmaktadır. Her iki ortadan kaldırma yönteminin de, çevre ve ekosistem için zararı bulunmaktadır. Atıkların yaygın olarak başka bir kullanım şekli hayvan yemi olsa da; bu kullanımın önemli bir ekonomik değeri yoktur. Günümüzde artan çevresel kaygılar, araştırmacıların bu tip tarımsal atıkların gıda ve gıda dışı amaçlar için kullanılarak değerlendirilmesi üzerinde durmasına sebep olmuştur. Bu materyallerin yüksek değerli ürünlere dönüştürülmesiyle, bu atıklar hem doğaya zarar vermeden ortadan kaldırılmış olmasını sağlayacak, hem de kırsal kesimde çiftçiye yeni iş imkanı sunarak çiftçinin ek gelir elde etmesine yardımcı olacaktır [2-9]. Ksilan açısından zengin olan lignoselülozik materyaller, özellikle ksilitol, etanol, 2,3 dibütanol, laktik asit, gibi ürünlerin üretimi için önemli bir ksiloz kaynağıdır [6, 10].

Daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda tütün saplarının ksiloz ve doğal bir tatlandırıcı olan ksilitol üretimi için potansiyel bir kaynak olarak kullanılabileceği görülmüştür [6,7]; ancak söz konusu çalışmalarda; ksiloz, atıklardan seyreltik asit hidrolizi ile üretilmiştir. Asit hidrolizi özellikle fermantasyon sürecinde mayalar için olumsuz etkisi olan furfural gibi ürünlerin fazla oluşmasına neden olmaktadır, dolayısıyla oluşan hidrolizatın doğrudan fermantasyon amacıyla kullanılması uygun değildir. Ayrıca, fermantasyondan önce, hidrolizatın nötralize edilmesi gerekmekte ve bu işlem fazla miktarda alkali gerektirdiği gibi önemli miktarlarda ve fermantasyondan önce uzaklaştırılması gereken nötralizasyon ürünleri oluşturmaktadır. Tüm bu işlemler düşünüldüğünde pahalı bir ürün olan ksilitol üretim maliyetleri daha da artmaktadır [7-9].

Ksiloz asit hidroliziyle üretildiği gibi enzim hidroliziyle de üretilebilir. Enzimatik hidrolizin, daha spesifik olması ve reaksiyonun ılımlı koşullarda gerçekleşmesinden dolayı, son yıllarda daha dikkat çekmektedir. Fazla enerji gerektirmediği gibi, hidrolizasyon amacıyla asit gibi korozif kimyasallara da ihtiyaç duyulmamakta, ayrıca hidrolizasyon sonunda atıklar veya yan ürünlerde oluşturmamaktadır [4,11].

Lignoselülozik biyoküttele ksilan genellikle ksilan-lignin kompleksi şeklinde bulunduğundan hidrolizasyona karşı dirençlidir; bu nedenle ilk önce ksilanın lignoselülozik biyokütleden izole edilmesi ve bunu takiben ksilanın enzimatik hidrolizinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir [11-13]. Ksilan kimyasal olarak izole edildiği gibi (alkali ekstraksiyon), alternatif olarak hidrotermal olarak da izole edilebilir. Otohizoliz olarak da bilinen yöntemde, biyokütle yüksek sıcaklıklarda (130°C–230°C) su eşliğinde muamele edilmekte, bu esnada suyun otoiyonizasyonu ve ksilan deasetilasyonu (asetik asit üretimi ile ortamdaki hidronyum iyonunun artmasına), ksilanı kısmen parçalayarak çözünür hale geçirmekte ve biyokütleden ayrılmasını sağlamaktadır [14]. Otohizoliz yöntemi ile ksilan hidrolizinde geniş polimerizasyon derecesi aralığında ksilan, ksilan parçalanma ürünleri (ksilooligosakkaritler) ve molekül ağırlığı çok küçük moleküller (monosakkarit) oluşmaktadır [5]. Üretilen ksilan parçalanma ürünlerinin polimerizasyon dereceleri oldukça büyük olduğundan (polimerizasyon derecesi>10); ksilanın yüksek sıcaklıklarda

suyla/buharla ekstraksiyonu ya da otohizoliz yöntemi olarak da bilinir [13, 15].

Literatürde enzimatik hidrolizle bazı atıklardan ksiloz üretimi ile ilgili çalışmalar mevcuttur; fakat tütün saplarından enzimatik olarak ksiloz üretimi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada tütün saplarından önce ksilan, sıcak su (otohizoliz) yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve oluşan ürünler karakterize edildikten sonra konsantre edilen hidrolizat, ksiloz üretim amacıyla *Trichoderma longibrachiatum*'dan elde edilen ksilanazlarla hidrolize edilmiştir. Enzimatik hidrolizasyon koşulları, substrat miktarı ve enzim aktivitesi bakımından optimize edilmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Araştırmalarda kullanılacak tütün sapları, Tokat ili ve bağlı yerleşim birimlerinden temin edilerek, işlem öncesi kurutulmuş ve boyutları 0.2-1 cm'ye kadar küçültülmüştür. Endoksilanaz kökeni *Trichoderma longibrachiatum* Danisco (Finlandiya) dan temin edilmiştir. Diğer kullanılan bütün kimyasallar Sigma (Sigma Chemical Company, MO, ABD), Merk (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ya da Alfa Aesar (Alfa Aesar GmbH & Cı KG, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Aminex HPX87H kolonu Biorad'dan (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) alınmıştır.

### Yöntem

#### Otohizoliz

Atıklar tamamı 8:1 (g su/g atık) oranında distile su ile karıştırılmış, 160°C'de yüksek basınç (PARR, ABD) reaktöründe 60 dakika hidrolize edilmiştir. Hidrolizasyon işlemi sonucunda elde edilen materyal, filtre edilmiş ve 3 defa her seferinde 6:1 (g su/g atık) oranında su ile yıkanmış ve yıkama suları ve filtrat birleştirildikten sonra, oluşan ksiloz miktarı HPLC'de belirlenmiştir. Daha sonra, hidrolizattan 10 mL alınarak, %4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 100°C'de 3 saat hidrolize edildikten sonra ksiloz miktarındaki artış hesaplanarak, ekstrakte edilen ksilan miktarı bulunmuştur [16]. Hazırlanan hidrolizat evaporatörde (<50°C'de) konsantre edilmiş ve elde edilen konsantrat, ksiloz üretim için kullanılmıştır.

#### Analitik Yöntem

Hidrolizasyon sonucu elde edilen katı kısmın lignin, ksilan, nem, kül ve selüloz içeriği kimyasal olarak karakterize edilmiş ve miktarları hesaplanılmıştır. Nem ve kül gravimetrik olarak, lignin miktarı ise; atıkların iki aşamalı sülfürik asit hidrolizasyonuna (%72 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve %4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) tabi tutulmasından sonra gravimetrik olarak belirlenmiştir [17]. Filtratın absorbansı 205 nm'de (absorptivite katsayısı, 110 l/g-cm) spektrofotometrede (Perkin Elmer UV/Vis spectrometer, Lambda EZ 201) ölçülerek asitte çözünür lignin bulunmuştur. İki aşamalı hidrolizasyon işlemi sonucu elde edilen hidrolizat, HPLC'de aşağıda belirtilen yöntem ile analiz edilerek atıkların polisakkarit kompozisyonu bulunmuştur [18].

Üronik asit içeriği m-fenilfenol metodu ile D-glukoronik asit standardı kullanılarak hesaplanmıştır [19]. Furfural miktarı, AOAC Official Method 960,16'ya göre furfural standardı kullanılarak belirlenmiştir. Hidrolizasyon ve konsantrasyon sonunda elde edilen örnekler 1:1 oranında etil alkol ile karıştırılarak spektrofotometrede 277 nm'de okunmuştur [20].

### Enzimatik Hidrolizasyon

Kullanılan ezimlerin protein içeriği Bradford metodu ile bovin serum albumun standardı kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [21]. Ksilanaz aktivitesini belirlemek amacıyla farklı dilusyonlarda hazırlanan enzim çözeltisi (0.1 mL) ticari bir ksilan olan huş ağacı (Birchwood xylan) (%1 konsantrasyonda 1 mL) ile pH 4.6'da 50°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve oluşan indirgen şeker miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Bir ünite (U) enzim aktivitesi 1 dakikada 1 µmol ksiloz eşdeğeri üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır [22].

Otohidroliz sonucu elde edilen likör, öncelikle enzim hidrolizasyonu için uygun pH'ya (pH 4.6) ayarlamıştır. Farklı konsantrasyonlarda 10 mL otohidroliz likörlerine, farklı aktivitelere 1 mL *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı eklenip 50°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu hidrolizasyon süresi boyunca belli zamanlarda örnekler alınmış ve 5 dakika kaynatılarak enzim inaktive edilmiştir. Hidrolizasyon reaksiyonunun sonucu Dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile indirgen şeker ölçülerek bulunmuştur. Reaksiyon kantitatif olarak HPLC ile analiz edilerek bulunmuştur.

Hidrolizasyonla elde edilen ksiloz, glukoz, arabinoz ve asetik asit miktarları refraktometrik dedektöre (Perkin Elmer Model 200) ve kolon fırınına (Perkin Elmer) sahip Perkin Elmer yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminde analiz edilmiştir. Kolon olarak Aminex HPX87H (Biorad) kullanılmıştır. Örnekler enjeksiyon öncesi 0.20 µm boyutlu filtreden geçirilerek, hareketli faz olarak 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılmıştır ve 45°C'de ve 0.5

mL/dk akış hızı ile 45 dakikalık bir süre zarfında kolondan elüt edilmiştir [23].

### Deneysel Tasarım ve Tepki Yüzey Metodu (RSM) ile Hidrolizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Hidrolizasyon koşulları substrat ve enzim konsantrasyonu bakımından optimize edilmiştir (Tablo 1). Optimizasyon ile ilgili detaylar aşağıda çıkarılmıştır.

- *Optimizasyon için kullanılan yöntem:* RSM (response surface methodology) (tepki yüzey yöntemi)
- *Kullanılan program:* Design Expert istatistiksel bilgisayar programı
- *Bağımsız değişkenler:* Enzim aktivitesi ve substrat konsantrasyonu doğrudan ksiloz üretimini etkilediğinden bağımsız değişkenler olarak kullanılmıştır. Substrat konsantrasyonu 1 mL konsantrasyon otophidroliz likörü elde etmek için kullanılan atık miktarı olarak (g atık/mL KOL) ifade edilmiştir. Enzim konsantrasyonu ise hidrolizasyon için kullanılan 1 mL de bulunan ünite cinsinden enzim aktivitesi (U/mL) olarak ifade edilmiştir.
- *Bağımlı değişkenler:* Ksiloz verimi (100x Ksi/Ksi<sub>max</sub>) ve seçicilik (ksiloz/glukoz) ise bağımlı değişkenler olarak alınmıştır. Ksiloz verimi, enzimatik hidrolizasyon sonucu elde edilen ksiloz miktarı enzimatik hidrolizasyon için kullanılan substratta bulunan maksimum ksiloz miktarına (substratın %4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 100°C'de 3 saat süresince hidroliz edilmesi ile hesaplanan ksiloz miktarı) oranı olarak hesaplanmıştır. Seçicilik ise hidrolizasyon sonucunda hidrolizatta bulunan ksilozun yine hidrolizatta bulunan glukoz miktarına oranı olarak hesaplanmıştır.

Ksiloz verimi ve seçiciliğin yüksek olduğu koşullar optimum hidrolizasyon koşulları olarak seçilmiştir. Optimum koşullar için seçilen model aşağıdaki eşitlikle (Eşitlik 1) açıklanmıştır:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (\text{Eş. 1})$$

Eşitlik 1'de Y bağımlı değişkenleri (ksiloz verimi ve hidrolizasyon koşullarının seçiciliği) b<sub>0</sub> sabit, b<sub>1</sub> ve b<sub>2</sub> lineer terimleri, b<sub>11</sub> ve b<sub>22</sub> kuadratik terimleri ve X<sub>1</sub> ve X<sub>2</sub> bağımsız değişkenleri temsil etmektedir.

Design Expert v. 7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) programı elde edilen dataların regresyon ve grafiksel analizi için kullanılmıştır. Fischer's testi model eşitliğini elde etmek için Student's t-testi, regresyon katsayılarının istatistiksel önemini bulmak için kullanılmıştır.

Tablo 1. Otophidroliz likörünün enzimle hidrolizasyonunda denenen bağımsız değişkenlerin değerleri

Bağımsız Değişkenler	Sembol	-α	-1	0	+1	+α
Substrat Miktarı (g atık/L likör)	X <sub>1</sub>	0.04	0.1	0.25	0.4	0.46
Enzim (U/mL)	X <sub>2</sub>	22.74	60	150	240	277.26

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Tütün Sapı Otohıdrolizi

Tarımsal atıkların kimyasal kompozisyonları; yetiştirildikleri bölgeye, mevsime, hasat zamanı ve şekline bağlı olarak değişiklik gösterir. Tütün saplarının bileşiminde, glukoz (selüloz) %33 oranı ile ilk sırada bulunmaktadır. Bunu hemiselülozun ana bileşeni olan ksilan (%21), klason lignin (%23) ve diğer bileşenler (üronik asit, kül, asetil gruplar, protein ve asitte çözünür lignin) takip etmektedir [6]. Ksilan oranının yüksek olması, tütün saplarını ksiloz üretimi için ideal bir substrat haline getirmektedir.

Lignoselülozik materyallere sulu ortamda, belli bir süre sıcaklık uygulandığında, suyun otoiyonizasyonundan ve hammaddede bulunan asidik türlerin iyonizasyonundan meydana gelen hidronyum iyonları, hemiselüloz bileşiklerini parçalayarak; ksilan parçalanma ürünleri, monosakkaritler, serbest ve bağlı asetik asitler, diğer şeker oligomerleri, üronik asit oligomerleri, furfural ve diğer bileşenleri oluşturur [24, 25]. Daha önceki çalışmalarda, otohıdroliz işleminin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesiyle enzimatik hidrolizi olumsuz yönde etkileyebilen toksik bileşikler (furfural, lignin parçalanma ürünleri) oluşturduğundan, toksik bileşiklerin oluşumunu azaltmak için, otohıdroliz yöntemi ile ksilan üretilirken reaksiyon sıcaklığı 160°C olarak seçilmiştir [15, 26]. Toplam 100 g tütün sapının 160°C'de 1 saat otohıdrolizasyonu sonucu, 42 g çözünmüş substrat elde edilmiştir. Otohıdroliz likörü çoğunluğu ksilooligosakkaritler olmak üzere çeşitli selüloz ya da heteropolimer olan hemiselülozdanın hidrolizasyonun kaynaklanan monosakkaritler ve asetik asitten oluşmuştur. Ortaya çıkan likör konsantre edilmiş ve bileşimi Tablo 2'de sunulmuştur. Konsantre otohıdroliz liköründe (KOL) 15.17 mg/mL ksilooligomerin yanında, arabinooligomerler ve asetil grubu bağlı oligomerler ve selülozun parçalanma ürünlerinde ileri gelen glukooligomerler bulunmaktadır. Furfural gibi şekerlerin dehidrasyon ürünleri, asit hidrolizle üretime göre düşük seviyede kalmıştır [6].

Tablo 2. Tütün otohıdroliz sonucu elde edilen likörün konsantre edildikten sonra bileşimi

Bileşenler	İçerik (g/L)
Glukoz	10.00±0.75
Ksiloz	13.28±0.74
Arabinoz miktarı	0.94±0.09
Asetik asit	1.68±0.26
Glukooligomer	3.43±0.53
Ksilooligomer	15.17±0.94
Arabinooligomer	1.70±0.00
Bağlı asetil	2.05±0.00
Furfural	0.77±0.09
Üronik asit	0.02±0.00

Otohıdroliz işleminin ardından ksilan ve ksilan parçalanma ürünleri açısından zengin likör alındıktan sonra arta kalan lignince zengin katı kısım elde edilmiş ve kompozisyonu Tablo 3'te verilmiştir. Lignin ön işlemlere karşı stabil olduğundan, ligninin parçalanıp

liköre geçmediği ve işlem sonunda kalan yapının çoğunluğunun lignin ve selülozundan oluşturduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Önışlem görmüş hammaddenin kompozisyonu

Bileşenler	İçerik (g/100 g önışlem görmüş tütün sapı)
Glukoz	41.44±2.21
Ksilan	15.90±0.74
Arabinan	0
Asetil grupları	1.40±0.02
Üronik asit	5.32±0.80
Klason lignin	29.08±0.16
Asitte çözünür lignin	2.41±0.27
Kül	3.25±0.05
Diğerleri	1.2

### Enzimatik Hidroliz

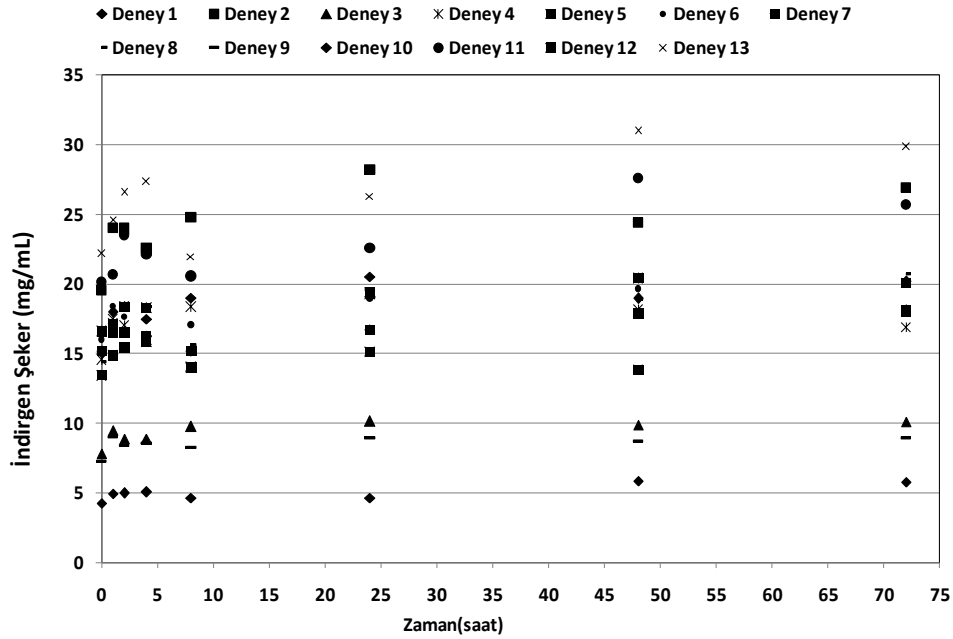
Maksimum oranda ksiloz elde etmek için, tütün sapı KOL'ünün ya asit ya da enzim gibi hidrolitik bir ajanla muamele edilmesi gerekir. Otohıdroliz işlemi hemiselülozu oligomerler halinde çözünür forma geçirdiğinden dolayı, tütün sapı KOL'ü ksilazlarla ksiloz üretimi için ideal bir substrattır. Elde edilen bu substrat *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile pH 4.6'da 50°C sıcaklıkta 72 saat hidrolizasyona tabi tutulmuştur. Bu çalışmada, son ürün olarak ksiloz açığa çıkardığından dolayı GH 10 ailesine ait *Trichoderma longibrachiatum*'dan elde edilen ksilanaz kullanılmıştır. GH 11 ksilanazları son ürün olarak ksilobiyoz ve ksilotrioz açığa çıkarır iken, GH 10 ailesi ksilanazları son ürün olarak ksiloz açığa çıkartmaktadır [27, 28].

Yüksek konsantrasyonda substrat kullanımının, safsızlıklar bakımından zengin olması ve/veya reaksiyon karışımının artan viskozitesi ve yoğunluğu nedeniyle verimi düşürme olasılıkları olması, bununla beraber yüksek oranda enzim kullanımının da maliyetleri artırmasından dolayı; ideal substrat ve enzim konsantrasyonunu bulmak için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda tütün KOL'ü, farklı oranlarda *T. longibrachiatum* ksilanazı ile muamele edilmiştir. Optimizasyonda kullanılan deneysel tasarım ile enzim aktiviteleri ve substrat konsantrasyonları Tablo 1'de verilmiştir.

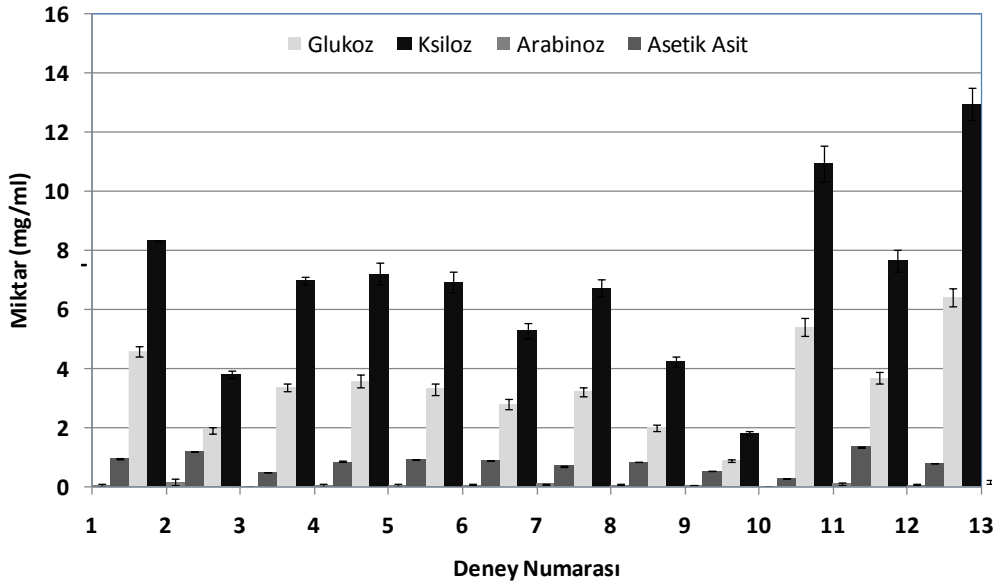
Tütün sapı konsantre otohıdroliz likörlerinden hazırlanmış deneme planına (Tablo 1) göre, *T. longibrachiatum* ksilanazları ile hidrolizasyonu sırasında farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde, bulunan indirgen şeker miktarları Şekil 1'de gösterilmiştir. Hidrolizasyon grafiklerinden de görüldüğü gibi, enzimin hidrolizasyon hızı 24. saate kadar hızla ilerlemiş daha sonra yavaşlamış ya da azalmaya başlamıştır. Enzim hidrolizinin 24. saaten sonra yavaşlamasının ya da azalmasının nedeni ise; bulunan substrat miktarın tükenmiş olması veya enzimlerin belli süre sonra aktivitelerini yitirmiş olması veya substratla ürünlerin yarışmalı inhibisyona girerek substratların bağlanmasını engellemesi veya ortamda bulunan başka bileşiklerin hidrolizi engellemesi veya substrat miktarının tükenmiş olması olarak yorumlanmıştır [5, 29]. Bu nedenle 24 saatlik reaksiyon süresinin daha uygun olduğuna karar

verilmiştir. Ayrıca substrat miktarının çok fazla olmasının üretilen indirgen şeker miktarında 24. saatte çok yüksek olacağı anlamına gelmediği, substrat miktarının enzim miktarı ile süresinde birlikte düşünülmesi gerektiği görülmüştür. Tütün sapı KOL'unun *T. longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizinde ise indirgen şeker miktarı en yüksek 31.0 mg/mL ile 13. deneyde (0.34 g atık/mL substrat konsantrasyonu ve 150 U/mL enzim aktivitesi), en düşük indirgen şeker ise deney 10 (0.059 g atık/mL substrat konsantrasyonu ve 150 U/mL enzim aktivitesi) da ölçülmüştür.

Tütün sapı KOL'lerinin farklı enzim ve substrat konsantrasyonlarında *T. longibrachiatum* ksilanazı 24. saatlerdeki hidroliz ürünleri (glukoz, ksiloz, arabinoz, asetik asit) Şekil 2'de sunulmuştur. 24. saatlik hidrolizasyon süresi sonunda ise 12.9 mg/mL ksiloz, 6.4 mg/mL glukoz, 1.6 mg/mL asetik asit, 0.2 mg/mL arabinoz miktarıyla en fazla parçalanma ürünü deney 13'de tespit edilmiştir.



Şekil 1. Tütün sapı konsantre otohizoliz likörü deneme planının *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu



Şekil 2. Tütün sapı konsantre otohizoliz likörünün *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu

### İstatistiksel Modelleme

Bağımsız değişkenler X1 substrat (g atık/L likör), X2 enzim (U/mL) bağımsız değişkenler ve deneysel veri aralığı Materyal ve Yöntem bölümünde Tablo 1'de

verilmiştir. Bağımlı değişken Y1 ksiloz verimi (%) ve Y2 hidrolizasyon koşullarının seçiciliği (g/g) Tablo 4'de verilmiştir. Ksiloz üretiminde verim ve seçiciliğin yüksek olması istenmektedir. Otohizoliz liköründe bulunan ksilanın ksiloza dönüştürülmesi oranı, ksiloz verimini

ifade ederken; seçicilik ise hidrolizasyon koşullarının (otohidroliz+enzimatik hidroliz) ksilanı ksiloza dönüştürme yeteneğidir. Verim ve seçiciliğin yüksek olması, ksilan dışındaki diğer bileşiklerin parçalanma oranının düşük, ksilanın ise etkili bir şekilde parçalanarak maksimum düzeyde ksiloz oluşturma yeteneğini ifade etmektedir.

Tütün sapı KOL'ünün deneysel tasarımı ve *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu sonucu elde edilen değerler Tablo 4'de gösterilmiştir. Ksiloz verimi en yüksek deney 12'de (substrat miktarı 0.20 g atık/mL KOL, 150 U/mL enzim aktivitesi) %69.76 olarak, seçicilikte 2.10 g/g ile en yüksek deney 6'da (substrat

miktarı 0.20 g atık/mL KOL, 150 U/mL enzim aktivitesi) bulunmuştur. Tablo 4 incelendiğinde, substrat miktarının tek başına yüksek olmasının (deney 2'de) (substrat miktarı 0.30 g atık/mL KOL, 60 U/mL enzim aktivitesi) ksiloz verimini ve seçiciliğini (%50.58, seçicilik 1.82 g/g) artırmada yeterli olmadığı gözlenmiştir. Enzimatik hidroliz öncesinde tütün sapı KOL'ünde glukoz (10.00 g/L) ve gluklan (3.43 g/L) oranının yüksek olması (Tablo 2) seçicilik değerini düşürmüştür.

Kodlanmış değişkenlere göre kuadratik model eşitlik 2 ve 3'de gösterilmiştir. Y1 ksiloz verimi, Y2 hidrolizasyon koşulları, substrat miktarı (X1) ve enzim (X2) fonksiyonu olarak verilmiştir.

$$Y_1 = 66.2 - 1.3X_1 + 6.2X_2 + 0.9X_1^2 - 5.0X_2^2 + 1.7X_1X_2 \quad \text{Eş.2}$$

$$Y_2 = 2.1 - 0.02X_1 + 0.04X_2 - 0.03X_1^2 - 0.07X_2^2 + 0.06X_1X_2 \quad \text{Eş.3}$$

Tütün KOL'ünün *T. longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu sonucu elde edilen ksiloz verimi ve seçicilik ANOVA ile değerlendirilerek; Tablo 5'de sunulmuştur. Ksiloz verimi ve seçicilik regresyon

katsayıları 0.90 ve 0.92 olarak bulunmuştur ve her iki model de uyum eksikliği göstermemiş ve regresyon %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Tablo 4. Deneysel tasarım ve tütün sapı konsantrasyon otoidroliz likörünün *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu sonucu elde edilen değerler

Deney	Bağımsız Değişkenler		Bağımlı Değişkenler	
	X <sub>1</sub> (g atık/mL KOL)	X <sub>2</sub> (U/mL)	Y <sub>1</sub> (%)	Y <sub>2</sub> (g/g)
1	0.20	150	68.47	2.04
2	0.30	60	50.58	1.82
3	0.10	240	69.09	1.98
4	0.20	150	63.53	2.07
5	0.20	277.26	65.61	2.01
6	0.20	150	63.07	2.10
7	0.20	22.74	48.21	1.89
8	0.20	150	66.36	2.09
9	0.10	60	60.13	2.02
10	0.06	150	67.97	2.02
11	0.30	240	66.31	2.02
12	0.20	150	69.76	2.08
13	0.34	150	69.22	2.02

X<sub>1</sub>: Substrat (g atık/mL KOL); X<sub>2</sub>: Enzim (U/mL); Y<sub>1</sub> (ksiloz verimi)= 100 x (Ksi/Ksi<sub>max</sub>); Y<sub>2</sub> (seçicilik) = Ksi/Glu, Ksi= hidrolizasyon sonucu elde edilen ksiloz miktarı Ksi<sub>max</sub>= Kullanılan substratta bulunan maksimum ksiloz miktarı (substratın %4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 100°C'de 3 saat süresince hidroliz edilmesi ile hesaplanan ksiloz miktarı), Glu = hidrolizasyon sonucu elde edilen glukoz miktarı

## Optimizasyon

Optimum substrat ve enzim konsantrasyonu yanıtların kontur eğrilerinin üst üste yerleştirilmesi ile elde edilmiştir (Şekil 4). Ksiloz veriminin %50'den fazla, seçiciliğin 2 g/g (ksiloz/glukoz)'dan fazla olması için program tarafından önerilen veriler arasından, optimum substrat konsantrasyonu olarak 0.28 g atık/mL KOL ve enzim aktivitesi olarak da 228 U/mL seçilmiştir. Seçilen optimum koşullarda (substrat konsantrasyonu ve enzim aktivitesinde) üç tekerrürlü halde yapılan hidrolizasyon sırasında üretilen ksiloz, glukoz, asetik asit, arabinoz miktarları ile ksiloz verimi ve ksiloz/glukoz oranının (seçicilik) zamana göre değişimi Şekil 5'de gösterilmiştir. Arabinoz miktarı en yüksek 8. saatte 0.6 mg/mL, asetik asit miktarı en yüksek 72. saatte 1.5 mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 5A). 24. saatten sonra ksiloz verimin ve seçiciliğin çok fazla değişmediği görülmüştür.

Hidrolizasyon süresini uzatmanın maliyeti artıracığı için, 24 saatlik hidrolizasyonun yeterli olduğuna karar verilmiştir (Şekil 5B). Tütün saplarının otoidrolizi takiben enzimatik hidrolizi ile; elde edilen ksiloz verimi %79.8, seçicilik ise 1.9 g/g'dır. Tütün sapı KOL'ünde bulunan ksilooligomer/ksilan etkili bir şekilde ksiloza dönüştürülmüştür. Seçicilik değeri çok yüksek değerlere çıkamamıştır, bunun nedeni ise otoidroliz esnasında kullanılan sıcaklık ve süre ile sellülozun kısmen hidrolize olmasıdır. Optimizasyon için kullanılan istatistik programı (Design Expert) tarafından önerilen optimum hidroliz koşullarlarında yapılan deneylerden bulunan ksiloz verimi ve hidrolizasyon koşullarının seçiciliğinin, program tarafından tahmin edilen veriler (Şekil 4) ile karşılaştırıldığında, ksiloz verimi tahmin edilen verilerden daha yüksek bulunurken, seçicilik değerlerinin ise tahmin edilen verilerden çok da farklı olmadığı bulunmuştur.

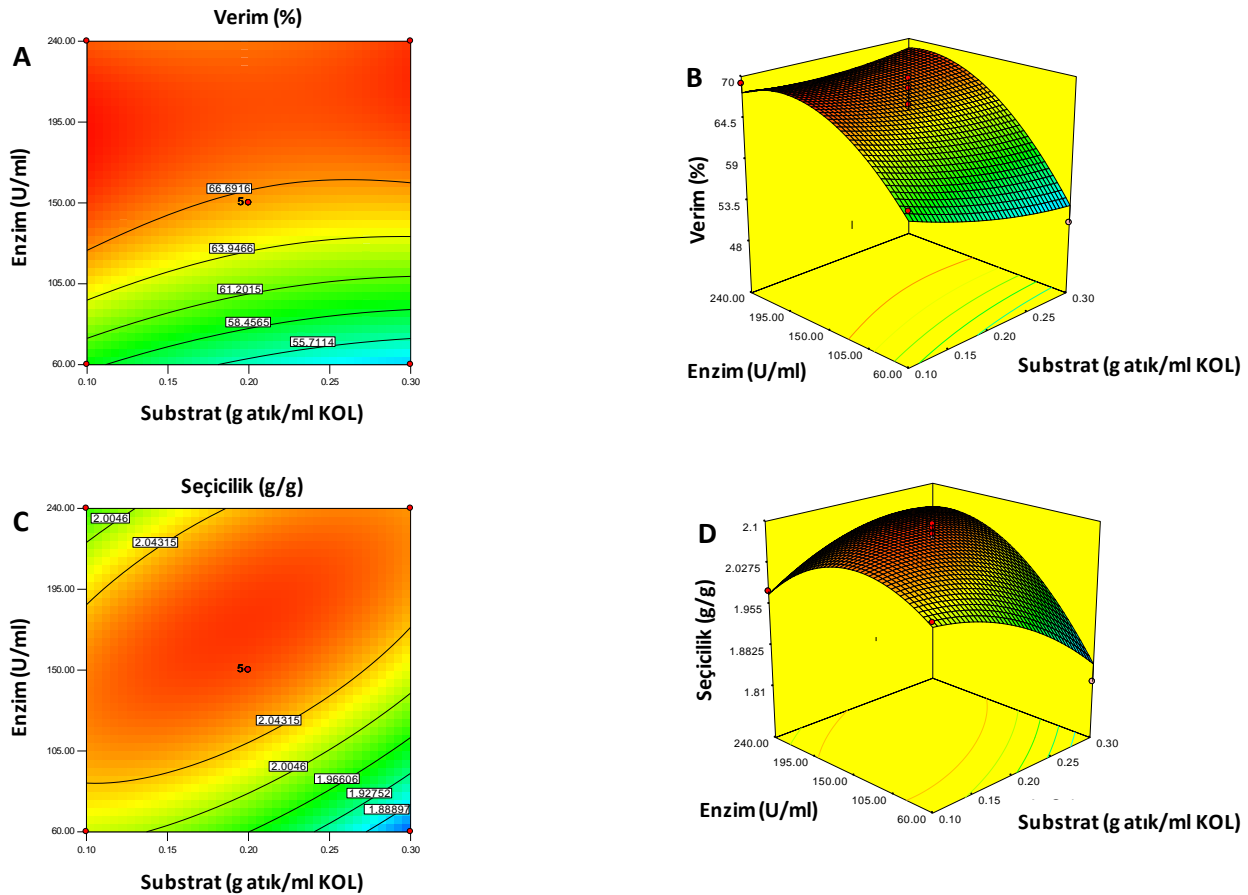
Tablo 5. Konsantre tütün saplarının *T. longibrachiatum* ksilanazı ile ksiloza hidrolizasyonu sonucu elde edilen ksiloz verimi ve seçicilik için ANOVA Tablosu

Kaynak	Kareler toplamı		Serbestlik derecesi		Karelerin ortalaması		F-değeri		P-değeri	
	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
Model	517.43	0.068	5	5	103.49	0.014	11.57	15.26	0.0028	0.0012
Residual	62.63	0.0063	7	7	8.95	0.00089				
Uyum eksikliği	27.87	0.0047	3	3	9.29	0.0017	1.07	3.95	0.4561	0.1090
Saf hata	34.77	0.0016	4	4	8.69	0.00040				
Toplam	580.06	0.075	12	12						
R <sup>2</sup>	0.90	0.92								

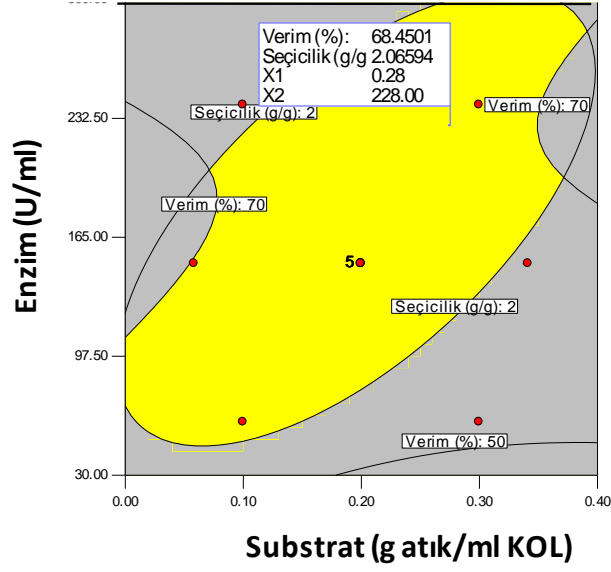
Şekil 3 ksiloz verimi ve seçiciliğini tahmin etmede kullanılan cevap yüzey ve kontur grafiklerini sunmaktadır. Maksimum ksiloz verimi (%69) 0.10 g atık/mL KOL konsantrasyonu ve 194 U/mL enzim aktivitesinde (Şekil 3A ve 3B), maksimum seçicilikte (2.1 g/g) 0.20 g atık/mL KOL konsantrasyonu ve 185 U/mL enzim aktivitesinde (Şekil 3C ve 3D) bulunmuştur.

Bu çalışmada tütün sapı konsantre otohizliköründe teorik olarak bulunabilecek maksimum ksilozun,

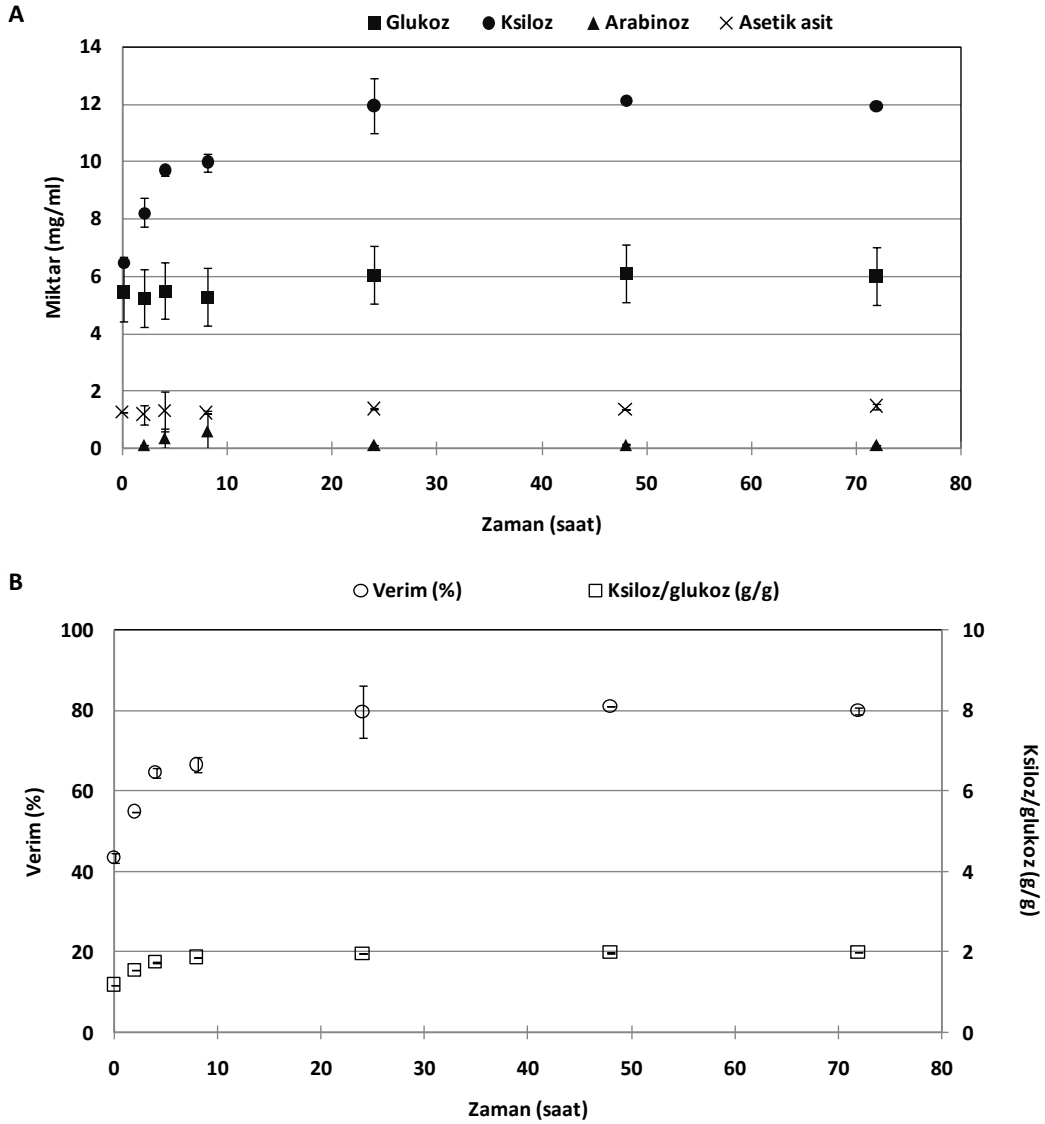
%79.8 serbest ksiloza çevrilmiştir. Hammaddede, tütün sapında, teorik olarak bulunabilecek maksimum ksiloz miktarı düşünüldüğünde, bir başka ifade ile verim başlangıçtaki hammaddeye göre hesaplandığında, ksiloz verimi %21'dir. Lignoselulozik materyallerin yapılarının farklı olması, kullanılan enzim kaynakları, ön işlemlerde ki farklılıklar veya verim hesaplamalarındaki farklılıklardan dolayı, sonuçların literatürde yapılan çalışmalarla karşılaştırılması kolay değildir.



Şekil 3. Tütün sapı konsantre otohizlikörünün *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu sırasında enzim aktivitesi ve substrat konsantrasyonunun ksiloz verimi ve seçiciliğine etkisi. A: Verim için kontur grafiği; B: Verim için yüzey grafiği; C: Seçicilik için kontur grafiği; D: Seçicilik için yüzey grafiği



Şekil 4. Optimizasyon için kullanılan her iki modelin yanıtlarının üst üste çizilmiş kontur eğrileri



Şekil 5. Otohırolize edilen tütün sapı konsantre otohıroliz likörünün optimum koşullarda *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı ile hidrolizasyonu



Bununla beraber, yapılan çalışmalar incelendiğinde, 121°C'de 20-80 dakika otohüroliz edilen yağlık palm bitkisi otohüroliz likörünün *T. viride* endo ksilanazı ile 24 saatlik hürolizi sonucu ksiloz veriminin %25.64 [30], mısır kepeğinin 190°C'de 10 dakikalık hürolizinden elde edilen likörünün enzim kokteyli (endoksilanaz, beta ksilobiaz ve arabinofuranozidaz) ile 24 saatlik hürolizi sonucu, yaklaşık %35 oranında ksiloz elde edilmiştir [31]. Her ne kadar ksiloz verimini hammaddenin yapısı büyük oranda etkilese de, burada kullanılan yöntemde gerek elde edilen ksiloz verimi, literatürdeki çalışmalara yakın bulunmuştur. Burada önerilen yöntemle yapılan çalışma, klasik seyreltik asit yöntemi ile ksiloz üretimi ile karşılaştırıldığında ise; ksiloz verimi tütün sapının asit hürolizi ile yapılan çalışmadan (%4.9 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 133°C ve 27 dakikalık hürolizasyonu sonucu %52 verim) [6] daha düşüktür. Diğer atıkların asit hürolizasyonu çalışmaları incelendiğinde, yağlık palm meyvesi atıklarından (%1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonda, 121°C'de 27 dakikalık hürolizasyonu) ksiloz verimi %77.32, aynı atığın %2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konsantrasyonunda 119°C'de 60 dakikalık hürolizasyonu sonucunda da ksiloz verimi %91.27 olarak bulunmuştur [33]. Deve dikeninde (*Cynara cardunculus* L.) maksimum ksiloz üretimi için 138.5°C'de %1.28'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 52 dakikalık hürolizasyon işleminde; %86 verimle ksiloz üretilmiştir [34]. Pamuk sapından asit hüroliziyile yapılan çalışmada (140°C'de, %6'lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 dakika) ksiloz verimi %47.8 olarak tespit edilmiştir [35]. Ayçiçeği sapının %4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 120°C ve 30 dakika hürolizasyonu sonucunda ksiloz verimi %36 [6] olarak bulunmuştur [31]. Bu çalışmada, bulunan sonuçlar, enzimatik hürolizasyonla elde edilen ksiloz verimine yakın, literatürde asit hürolizi ile yapılan çalışmalarda bulunan ksiloz veriminden ise düşüktür.

## SONUÇ

Tarlalar da çürümeye bırakılan ya da yakılarak çevreye zarar vererek ortadan kaldırılan tütün saplarının; bu çalışma ile bu atıkların çevreye zarar vermeden daha değerli bir ürün olan ksiloza dönüştürülebileceği gösterilmiştir. Önerilen otohüroliz ve takiben enzimatik hürolizasyon yöntemi; ksilan izolasyonu ve hürolizasyonu herhangi bir kimyasala ihtiyaç duymaması açısından çevreye dost bir yöntemdir, süre bakımından uzun olmasına rağmen, nötralizasyon gerektirmemesi (asit hürolizasyonu sonucu oluşan hürolizatın nötralize edilmesi gerekmektedir) ve nötralizasyon ürünleri oluşturulmaması bakımından, ksilozun asit ile üretim yöntemine karşı avantajları bulunmaktadır. Sonuçlar kombine otohüroliz ve enzimatik hüroliz yönteminin, ksiloz üretimi için alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu proje Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 2013/46) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Anonim, 2007. <http://www.agrowaste-tr.org/abife/index.php> (11.08.2013).
- [2] Erdoğın, K., 2007. Tütün Saplarından Ksilooligosakkarit Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- [3] Öztürk, H.H., Başçetinçelik, A., 2006. Energy exploitation of agricultural biomass potential in Turkey. *Energy Exploration and Exploitation* 24(1): 95-112.
- [4] Bostancı, Ş., 2009. Tarımsal Atıklardan Enzimatik Yolla Ksilooligosakkarit Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- [5] Günay, K., 2010. Lignoselülozik Materyallerden Otohüroliz ve Enzimatik Hürolizle Ksilooligosakkarit Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- [6] Akpınar, O., Levent, O., Sabancı, S., Uysal, R.S., Sapcı, B., 2011. Optimization and comparison of dilute acid pretreatment of selected agricultural residues for recovery of xylose. *Bioresources* 6(4): 4103-4116.
- [7] Uysal, R.S., 2011. Tütün ve Ayçiçeği Sapından Ksilitol Üretimini Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- [8] Sabancı, S., 2012. Buğday Tarlası Atıklarından Ksilitol Üretim Koşullarının Optimizasyonu ve Ksilitolün Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- [9] Sapcı, B., 2012. Pamuk Saplarından Antioksidan ve Ksilitol Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- [10] Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 279-291.
- [11] Erdoğın, K., Akpınar, Ö., 2008. Ksilooligosakkaritlerin önemi, üretimi ve kullanım alanları. *Akademik Gıda* 6(4): 14-20.
- [12] Vazquez, M.J., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology* 11: 387-393.
- [13] Moure, A., Gullon, P., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 41: 1913-1923.
- [14] Vegas, R., Luque, S., Alvarez, R., Alonso, J.L., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2006. Membrane-assisted processing of xylooligosaccharide-containing liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5430-5436.
- [15] Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C., 2002. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering* 52: 211-218.
- [16] Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J.C., 1999. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical and Biotechnology* 74: 1101-1109.

- [17] ASTM, 1993. Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials (04.09). Philadelphia, PA
- [18] Browning, L., 1967. Determination of sugars, Methods of Wood Chemistry, Inter-Science Publishers, New York.
- [19] Melton, L.D., Smith, B.G., 2001. Determination of the Uronic Acid Content of Plant Cell Walls Using a Colorimetric Assay. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Edited by R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F., Shoemaker, D. Smith and P Sporns, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [20] William, S., 1997. Furfural in Distilled Liquors (9.097). In AOAC official methods of analysis Arlington, VA.
- [21] Bradford, M.A., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of micro gram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- [22] Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23: 257-270.
- [23] Canettieri, E.V., Moraes Rocho, G.J., Carvalho, Jr, K.A., Almeida e Silva, J.B., 2007. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology* 98: 422-428.
- [24] Parajo, J.C., Garrote, G., Cruz, J.M. Dominguez, H., 2004. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science and Technology* 15 (3-4): 115-120.
- [25] Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, L.C., Duarte, S., Marques, R., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol. *Bioresource Technology* 101: 4775-4800.
- [26] Yuan, Q.P., Zhang, H., Qian, Z.M., Yang, X.J., 2004. Pilot-plant production of xylooligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79: 1073-1079.
- [27] Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23.
- [28] Berrin, J.G., Juge, N., 2008. Factors affecting xylanase functionality in the degradation of arabinoxylans. *Biotechnology Letters* 30 (7): 1139-1150.
- [29] Akpınar, Ö., Ak, Ö., Kavas, A., Bakır, U., Yılmaz, L., 2007. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5544-5551.
- [30] Sabiha- Hanim, S., Noor, M.A.M., Rosma, A., 2011. Effect of autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) frond fibres for xylose and xylooligosaccharides production. *Bioresource Technology* 102: 1234-1239.
- [31] Agger J, Vikso-Nielsen, A, Meyer, A.S., 2010. Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58: 6141-6148.
- [32] Roberto, C.I., Mussatto, I.S. Rodrigues , C.L.B.R., 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crop and products* 17: 171-176.
- [33] Rahman, S.H.A., Choudhury, J.P., Ahmad, A.L., Kamaruddin, A.H., 2007. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresource Technology* 98: 554-559.
- [34] Shatalov, A.A., Pereira, H., 2012 Xylose production from giant reed (*Arundo donax* L.): modeling and optimization of dilute acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers* 87: 210-217.
- [35] Akpınar, Ö., Erdoğan, K., Bostancı, Ş., 2009. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing* 87: 145-151.