

**KİMYASAL ÖN-İŞLEMLERDEN GEÇİRİLMİŞ
LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARIN
STREPTOMYCES SP. AOA40 ENZİMLERİYLE
ŞEKER ŞURUBUNA DÖNÜŞTÜRÜLMESİ**

ALİ OSMAN ADIGÜZEL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
ARALIK – 2012**

**KİMYASAL ÖN-İŞLEMLERDEN GEÇİRİLMİŞ
LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARIN
STREPTOMYCES SP. AOA40 ENZİMLERİYLE
ŞEKER ŞURUBUNA DÖNÜŞTÜRÜLMESİ**

ALİ OSMAN ADIGÜZEL

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Münir TUNÇER**

**MERSİN
ARALIK – 2012**

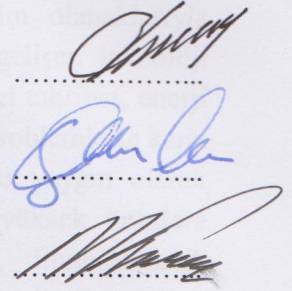
Ali Osman ADIGÜZEL tarafından Doç. Dr. Münir TUNCER danışmanlığında “Kimyasal ön-işlemlerden geçirilmiş lignoselülozik atıkların *Streptomyces sp.* AOA40 enzimleriyle şeker şurubuna dönüştürülmesi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Mustafa ÖZYURT

Prof. Dr. Gökhan CORAL

Doç.Dr. Münir TUNCER



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08.01.2013 tarih ve 2013.01.02 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. A. Murat GİZİR
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

KİMYASAL ÖN-İŞLEMLERDEN GEÇİRİLMİŞ LİGNOSELÜLOZİK ATIKLARIN *STREPTOMYCES SP. AOA40* ENZİMLERİYLE ŞEKER ŞURUBUNA DÖNÜŞTÜRÜLMESİ

Ali Osman ADIGÜZEL

ÖZ

Son 20 yıldır bilim ve teknoloji hızla gelişmiş ve tüm olanaklarıyla insanlığın hizmetine sunulmuştur. İnsanlık birtakım sorunlarını gelişen teknoloji yardımıyla çözebilse de artan nüfus ve tüketimden kaynaklı çevresel tahribat, enerji ve hammadde kıtlığı, besin yetersizliği ve atık yönetimi gibi temel problemlerle karşı karşıyadır. Bundan dolayı çalışmamızın ana temasını Türkiye’de yaygın olarak rastlanan tarımsal, ormansal ve kentsel atıkların katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi oluşturmaktadır. Bu amaçla önce çalışmada, lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi için kullanılacak aktinobakteri üyeleri Mersin il sınırları içerisindeki topraklarından izole edilmiş ve her bir izolatin lignoselülozu parçalama potansiyelleri test edildi. Bu isolatlar arasından en yüksek potansiyele sahip olan ve AOA40 olarak kodlanan izolatin *Streptomyces* sp. olduğu tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. AOA40’ın lignoselülozik degradasyonda rol alan endoglukonaz, endoksilanaz, β -glukosidaz, β -ksilosidaz, α -L-arabinofuranosidaz ve peroksidaz gibi enzimleri en fazla ürettiği inkübasyon koşulları tespit edilmiştir. Optimum koşullarda üretilen ekstrasellüler enzimler ise lignoselülozik materyalin hidrolizinde kullanılmıştır. Lignoselülozik atık olarak kullanılan buğday ve arpa samanı, mısır sapı, muz yaprağı, kavak ve meşe talaşı, pamuk posası ve kâğıt farklı ön-muamele koşullarına tabi tutulmuştur. Denenen ön-muamele koşulları arasında en fazla indirgenmiş şeker üreten kombinasyonun ise buğday samanının NaOH ile ön-muamelesi olduğu tespit edilmiştir. NaOH ile ön-muameleye tutulmuş buğday samanının daha sonraki aşamada *Streptomyces* sp. AOA40 kaynaklı lignoselülozik enzimlerle hidrolizi için optimal koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla muamele sıcaklığı, muamele süresi, kullanılan kimyasal oranı ve hidroliz süresi gibi parametreler optimize edilmiştir. En uygun sonuç %1’lik NaOH ile 50 °C’de 12 saat ön-muamele ve 10 saatlik enzimatik hidroliz olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lignoselüloz, degradasyon, aktinobakteri, ön-muamele, hidroliz

Danışman: Doç. Dr. Münir TUNÇER, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

CONVERSION OF CHEMICAL PRETREATED LIGNOCELLULOSIC WASTES TO SUGAR SYRUP WITH *STREPTOMYCES* SP. AOA40 ENZYMES

Ali Osman ADIGÜZEL

ABSTRACT

Science and technology has rapidly expended and used for human benefits over the last 20 years. Humanity can solve some problems with the help of developing technology. But, they faced with fundemantal problem such as environmental distortion from increasing population and consumption of energy, raw material acarcity, nutrient deficiency, and waste management. Therefore, the main theme in our research covers the conversation of agicultural, forestry and rural wastes that are abundant in Turkey. For this purpose, Actinobakteria members to be used for hydrolysis were isolated from soil in Mersin province and lignocellulose degrading potential of each isolate was tested. İsolate has a maximum lignocellulosic degradation potential and coded as AOA40 were identified as *Streptomyces* sp. Incubation condition of maximum production of the lignocellulose degrading enzymes such as endoglucanase, endoxylanase, β -glucosidase, β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase ve peroxidase from *Streptomyces* AOA40 was determined. Extracellular enzymes produced under optimum conditions were used for hydrolyse to lignocellulosic material. Wheat straw, barley straw, corn stalks, banana leaves, poplar and apsen sawdust, paper, cotton pulp were pretreated different methods. Combination of maximum reducing sugar production among tested pretreatment condition was detected as pretreatment with NaOH of wheat straw. Optimal conditions were determined for hydrolysis of wheat straw pretreated with NaOH. Fort his purpose, parameters such as pretreatment temperature, pretreatment time, chemical rate for pretreatment and hydrolysis time were optimized. Finally, pretreatment with 1% NaOH at 50 °C for 12 hours and hydrolysis for 10 hours were identified as optimum conditions.

Key words: Lignocellulose, degradation, Actinobacteria, pretreatment, hydrolysis.

Supervisor: Doç. Dr. Münir TUNÇER, Mersin University, Biology Department

TEŞEKKÜRLER

Öncelikle tez danışmanım Doç. Dr. Münir TUNCER’e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında MEİTAM’da bulunan ilgili tüm makine ve teçhizatın kullanımında yardımcı olan Uzm. Engin KAPLAN’a, AFM görüntülerinin elde edilmesini sağlayan Ersan HARPUTLU’ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımcı olan Hasan FİDELİ’ye teşekkür ederim.

Bu güne kadar maddi ve manevi beni her yönden destekledikleri için annem Ümmühan ADIGÜZEL ve babam Ahmet ADIGÜZEL’e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında temel motivasyon kaynağım olan e im Ar  G r. Serpil K nen ADIGÜZEL ve oğlum Ahmet Aral ADIGÜZEL’e te ekk rleri borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLERİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1 MİKROBİYAL YOLLA ELDE EDİLEN ENDÜSTRİYEL ÜRÜNLER.....	4
2.1.1. Alkanlar	4
2.1.2. Bütanol	6
2.1.3. Endüstriyel Etanol	8
2.1.4. Hidrojen	8
2.1.5. Elektrik	9
2.1.6. L-Glutamik Asit	9
2.1.7. L-Lizin.....	10
2.1.8. Sitrik Asit	11
2.1.9. Glukonik Asit	12
2.1.10. İtakonik Asit.....	12
2.1.11. Laktik Asit.....	13
2.1.12. Polihidroksialkanatlar	13
2.1.13. Polihidrik Alkoller	13
2.1.14. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler	14
2.2. BİYOKÜTLE.....	15
2.2.1. Nişastalı Hammadde Kaynakları	17
<i>Patates</i>	18
<i>Buğday</i>	19
<i>Pirinç</i>	20
<i>Tritikale</i>	20
<i>Mısır</i>	20
<i>Arpa</i>	21
<i>Manyok</i>	21
<i>Diğer nişasta kaynakları</i>	21
2.2.2. Şekerli Hammadde Kaynakları	22
2.2.3. Mikroalgal Hammadde Kaynakları	24

2.2.4. Lignoselülozik Hammadde Kaynakları	26
2.2.4.1. Selüloz	28
2.2.4.2. Hemiselüloz.....	29
2.2.4.3. Lignin	33
2.3. ÖN-MUAMELE	37
2.3.1. Fiziksel Ön-Muamele.....	38
2.3.2. Kimyasal ön-muamele	39
<i>Ozonolizis</i>	39
<i>Alkali metotlar</i>	40
<i>Asidik metotlar</i>	41
2.3.3. Termal/Fiziko-Kimyasal Ön-Muamele	42
<i>Otohidroliz</i>	43
<i>Buhar patlama metodu</i>	43
<i>AFEX metodu</i>	44
<i>Karbondioksit patlama</i>	45
2.3.4. Biyolojik Ön-muamele Metodları	45
2.4. HİDROLİZ	46
2.4.1. Kimyasal Hidroliz	47
2.4.2. Enzimatik Hidroliz	49
2.4.2.1. Selülaazlar	49
2.4.2.2. Endo-1,4-Ksilanaz	51
2.4.2.3. β -Ksilosidazlar	51
2.4.2.4. α -L-arabinofuranosidaz	52
2.4.2.5. α -D-glukuronosidaz	52
2.4.2.6. Mannanazlar	52
2.4.2.7. Ferulik asit esterazlar (feruloil esterazlar).....	53
2.4.2.8. Lakkazlar	54
2.4.2.9. Yüksek redoks potansiyelli peroksidazlar	54
2.5. AKTİNOBAKTERİLER	55
2.5.1. Aktinobakterilerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması	55
<i>Streptomyces sp</i>	58
2.6. ÇALIŞMANIN AMACI	60
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	61
3.1. MATERYAL	61
3.1.1. Kimyasallar ve Proteinler.....	61
3.1.2. Cam Malzemeler	61
3.1.3. İnkübatörler	61

3.1.4. Otoklav	61
3.1.5. Santrifüjer.....	62
3.1.6. Ultrafiltrasyon Ekipmanları	62
3.1.7. UV/Visible Spektrofotometre	62
3.1.8. pH Ölçer	62
3.1.9. Işık ve Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM)	63
3.1.10. Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy-AFM)	63
3.1.11. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları	63
3.1.12. Kullanılan Besiyerleri	63
<i>Nişasta-Kazein Agar</i>	63
<i>Gause's No:1 Besiyeri</i>	64
<i>ISP-4 Besiyeri</i>	64
<i>ISP-2 Besiyeri</i>	64
<i>CMC Agar</i>	64
<i>Ksilanaz tarama besiyeri</i>	64
<i>MS-YEM Besiyeri</i>	64
<i>Nutrient Agar Besiyeri</i>	64
<i>Plate Count Agar</i>	65
<i>Glukoz Asparajin Agar</i>	65
<i>Gliserol Asparajin Agar (ISP-5)</i>	65
<i>Yeast- Starch Agar</i>	65
3.2. METOD	65
3.2.1. Örneklerin Alınması Ve Hazırlanması	65
3.2.2. Selüla, Ksilanaz, Lakkaz Aktivitesinin Katı Besiyerinde Tespiti	67
3.2.3. İnokulum Hazırlanışı.....	67
3.2.4. Ekstraselüler Toplam Protein Miktarının Tayini	67
3.2.5. Enzimatik Analizler	67
3.2.5.1 Endoglukanaz Analizi	68
3.2.5.2. Endoksilanaz Analizi	70
3.2.5.3. β -D- Glukosidaz Analizi	70
3.2.5.4. β -D- Ksilosidaz Analizi.....	72
3.2.5.5. Mannopiranosidaz Analizi	72
3.2.5.6. A-L-Arabinofuranosidaz Analizi	72
3.2.5.7. Asetil Esteraz Analizi.....	72
3.2.5.8. Peroksidaz Analizi	72
3.2.5.9. Lakkaz Analizi	73
3.2.6. Substratların Hazırlanması	73
3.2.7. Substratların Lignoselülozik İçeriklerinin Gravimetrik Tayini.....	73
3.2.8. Ön-Muamele Uygulamaları	74
3.2.9. Ön-Muamelesi Yapılmış Substratların Hidrolizi	74
3.2.10. NaOH ile Ön-Muamele ve AOA40 ile Hidrolizin Optimizasyonu.....	75
3.2.11. Optimum Ön-Muamele ve Hidroliz Olmuş Solüsyon İçindeki Hidroliz Ürünlerinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Belirlenmesi	75
3.2.12. İzolatın Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	76
3.2.13. İzolatın Kullanabildiği Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi	76
3.2.14. İzolatın Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	76

3.2.15. İzolatın Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi	77
3.2.16. Aktinobakterilerdeki Spor Yapılarının Gösterilmesi	77
3.2.17. Lignoselülozik Materyal Hidrolizinin AFM’de Gösterimi	78
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	79
4.1. KATI BESİYERİNDE ENZİM AKTİVİTELERİNİN GÖSTERİMİ	79
4.2. SIVI KÜLTÜRDE ENZİM ANALİZLERİ	86
4.2.1. Endoglukanaz Aktivitesi	87
4.2.2. Endoksilanaz Aktivitesi	89
4.2.3. β -Glukosidaz Aktivitesi	90
4.2.4. Peroksidaz Aktivitesi	90
4.2.5. β -Ksilosidaz Aktivitesi	91
4.2.6. α -L-Arabinofuranosidaz ve Asetil Esteraz Aktivitesi	92
4.3. SEÇİLEN SUŞLARININ LİGNOSELÜLOZİK MATERYALİ ŞEKERE DÖNÜŞTÜREBİLME KAPASİTELERİNİN TESPİTİ	94
4.4. KULLANILACAK SUBSTRATLARIN LİGNOSELÜLOZİK İÇERİKLERİ	95
4.5. HİDROLİZ SIVISINDAKİ ENZİMLER	97
4.6. FARKLI ÖN-MUAMELE ve <i>STREPTOMYCES</i> SP. AOA40 İLE HİDROLİZ SONUCU ELDE EDİLEN İNDİRGENMİŞ ŞEKER MİKTARLARI	98
4.7. NaOH YÜZDESİNİN, ÖN-MUAMELE SICAKLIĞININ VE SÜRESİNİN OPTİMİZASYONU	104
4.8. HİDROLİZ SONUCU ELDE EDİLEN BAZI SON ÜRÜNLERİN ANALİZİ	120
4.9. <i>STREPTOMYCES</i> SP. AOA40 İZOLATININ KULLANABİLDİĞİ KARBON KAYNAKLARI	121
4.10. <i>STREPTOMYCES</i> SP. AOA40 İZOLATININ KÜLTÜREL ÖZELLİKLERİ	122
4.11. <i>STREPTOMYCES</i> SP. AOA40 İZOLATININ FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	123
4.12. <i>BÜYÜME EĞRİSİ</i>	125
4.13. <i>STREPTOMYCES</i> SP. AOA40’IN SPOR YAPISI	126

4.14. SAMAN YÜZEYİNDEKİ TAHRİBATIN AFM İLE GÖSTERİMİ.....	127
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	131
KAYNAKLAR	133
ÖZGEÇMİŞ.....	158

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Metan, etan ve propan enerji içeriklerinin karşılaştırılması.....	5
Çizelge 2.2. Yakıtların fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması	7
Çizelge 2.3. Biyokütle olarak kullanılan patates ve pirincin yapısında bulunan maddeler ve oranları	18
Çizelge 2.4. Buğdayın bileşenleri ve içerdikleri polimer oranları	19
Çizelge 2.5. Manyok kökü, manyok nişastası ve manyok unu gibi manyok temelli ürünlerin içerikleri	22
Çizelge 2.6. Bazı mikroalg türlerinin içerdiği karbonhidrat oranları	25
Çizelge 2.7. Lignoselülozik materyallerin elde edildiği kaynaklar ve geleneksel kullanım alanları.....	26
Çizelge 2.8. Farklı tarımsal kaynaklardan elde edilen lignoselülozik atık miktarları	27
Çizelge 2.9. Asit ile hidroliz metodlarının avantaj ve dezavantajları	47
Çizelge 3.1. Glukoz standartı hazırlanışı	69
Çizelge 4.1. Enzim aktivitelerinin katı besiyerinde taranması	79
Çizelge 4.2. Hidroliz deneylerinde kullanılan Streptomyces sp. AOA40 suşunun kültür sıvısında bulunan ekstre sellüler enzimlerin aktiviteleri ve özgül aktiviteleri.....	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Metan, etan ve propan üretiminin metabolik yolu	5
Şekil 2.2. Suyun biyofotolizi	9
Şekil 2.3. Karbon döngüsü	16
Şekil 2.4. Hammadde kaynakları	17
Şekil 2.5. Amiloz ve amilopektin	18
Şekil 2.6. Mısır tanesi ve içeriği	20
Şekil 2.7. Biyofotoreaktörler	25
Şekil 2.8. Lignoselülozik biyokütle bileşenleri.....	27
Şekil 2.9. Selülozun yapısı	29
Şekil 2.10. Ksilanın atomik yapısı	30
Şekil 2.11. Sertodunlarda bulunan glukronoksilan	30
Şekil 2.12. Yumuşakodunlarda bulunan arabino-4-O-metilglukronoksilan	30
Şekil 2.13. Glukomannanın yapısı	32
Şekil 2.14. Galaktomannanın yapısı	33
Şekil 2.15. Ligninin yapısı	34
Şekil 2.16. Genel fenilpropanoyid metabolik yolu	35
Şekil 2.17. Monolignollerin oluşumu	35
Şekil 2.18. Ön-muamele işleminin lignoselülozik yapı üzerine etkisi	38
Şekil 2.19. Selülazlar	50
Şekil 2.20. Aktinobakterilerin agar üzerindeki görünümü	56
Şekil 2.21. Aktinobakterilerin belirgin karakterlerine göre Waksman and Henrici tarafından sınıflandırılması	57
Şekil 3.1. Toprak örneklerinin alındığı bölgelerin uydu görüntüsü	66
Şekil 3.2. İzolasyon çalışmaları	66
Şekil 3.3. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın değişik konsantrasyonlarının Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğrisi	68
Şekil 3.4. D-glukozun farklı konsantrasyonlarının Miller metodu ile analizi sonucu elde edilen indirgenmiş şeker standardı	70
Şekil 3.5. D-ksilozun farklı konsantrasyonlarının Miller metodu ile analizi sonucu elde edilen indirgenmiş şeker standardı	71
Şekil 3.6. <i>p</i> -nitrofenol (PNP) standart grafiği	71
Şekil 4.1. CMC Agar' da en iyi zon veren izolatlar	84
Şekil 4.2. Ksilanaz tarama besiyerinde iyi zon veren izolatların gösterimi	85
Şekil 4.3. Sırasıyla RBBR, guaykol ve tannik asitli besiyerinde iyi derecede açılma zone veren izolatların gösterimi	85
Şekil 4.4. Tarama sonucu seçilen izolatların endoglukanaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	88
Şekil 4.5. Tarama sonucu seçilen izolatların endoksilanaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	90
Şekil 4.6. Tarama sonucu seçilen izolatların β -glukoziyadaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	91
Şekil 4.7. Tarama sonucu seçilen izolatların peroksidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	91

Şekil 4.8. Tarama sonucu seçilen izolatların β -ksilozidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	92
Şekil 4.9. Tarama sonucu seçilen izolatların α -L-arabinofuranozidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	93
Şekil 4.10. Tarama sonucu seçilen izolatların asetil esteraz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	93
Şekil 4.11. Tarama sonucu seçilen izolatların mannopiranosidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	93
Şekil 4.12. İzolat AOA39 ve AOA40'ın tek başlarına ve birlikte iken normal buğday samanı ve ön-işleme tabi tutulmuş samandan serbest bıraktıkları toplam şekerin zamana bağlı değişimi	94
Şekil 4.13. Sekiz farklı lignoselülozik substratın gravimetrik olarak belirlenmiş olan içerik oranları (%)	96
Şekil 4.14. <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 izolatından elde edilmiş hidroliz sıvısındaki enzimler ve aktiviteleri.....	98
Şekil 4.15. HCl ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.	99
Şekil 4.16. H ₂ SO ₄ ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları	100
Şekil 4.17. Termal ön-muamele ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları....	100
Şekil 4.18. Kloroform ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları	101
Şekil 4.19. Kireç ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları	102
Şekil 4.20. Sodyum hidroksit ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları....	102
Şekil 4.21. Hidrojen peroksit ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları....	103
Şekil 4.22. Yedi farklı yöntemle muamle edilmiş sekiz ayrı substratın <i>Streptomyces</i> sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki şeker miktarlarının toplu olarak değerlendirilmesi	104
Şekil 4.23. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	105
Şekil 4.24. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	106

Şekil 4.25. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	106
Şekil 4.26. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	107
Şekil 4.27. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	108
Şekil 4.28. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	109
Şekil 4.29. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	109
Şekil 4.30. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	110
Şekil 4.31. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	111
Şekil 4.32. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	112
Şekil 4.33. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	112
Şekil 4.34. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	113
Şekil 4.35. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	114
Şekil 4.36. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	115

Şekil 4.37. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	115
Şekil 4.38. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	116
Şekil 4.39. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	117
Şekil 4.40. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	118
Şekil 4.41. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	118
Şekil 4.42. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.....	119
Şekil 4.43. Optimum ön-muamele ve hidroliz olan substrattan elde edilen ürünlerin ince tabaka kromatografisinde görüntülenmesi	119
Şekil 4.44. AOA40 izolatının üreyebildiği besiyerleri.....	122
Şekil 4.45. AOA40 izolatının farklı besiyerlerinde substrat ve havasal miselyumlarının görüntüsü	123
Şekil 4.46. AOA40 izolatının farklı fiziksel özelliklere sahip besiyerlerindeki görüntüsü	124
Şekil 4.47. AOA40 izolatının kristal viyoleli besiyeri üzerindeki gelişimi	125
Şekil 4.48. AOA40 izolatının büyüme eğrisi	125
Şekil 4.49. AOA40 izolatının spor yapısının SEM'deki görüntüsü	126
Şekil 4.50. Normal saman (a), ön-muameleli saman (b) ve hem ön-muameleye hem de enzimatik hidrolize tabi tutulmuş saman (c) yüzeylerinin AFM görüntülerinin birarada gösterimi	127
Şekil 4.51. Normal samanın AFM görüntüsü	128
Şekil 4.52. %1'lik NaOH ile 40°C'de 12 saat ön muameleli samanınAFM görüntüsü	129
Şekil 4.53. %1'lik NaOH ile 40°C'de 12 saat ön muameleli samanın AOA40 dan elde edilen ekstraselüler sıvıda hidrolizi sonucu kalan samanın AFM görüntüsü	130

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: Yüzde
⁰ C	: Derece santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
2,4-DCP	: 2,4-Diklorofenol
2,4,6- TCP	: 2,4,6-Triklorofenol
4-AAP	: 4-Aminoantipirin
A	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-Azinobis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonat)
CMC	: Karboksimetilselüloz (Carboxymethylcellulose)
DNS	: Dinitrosalisilik asit
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
g	: Gram
ISP	: Uluslararası <i>Streptomyces</i> Projesi
L	: Litre
LiP	: Lignin Peroksidaz
M	: Molar
ml	: mililitre
mM	: Milimolar
MnP	: Mangan-bağımlı Peroksidaz
OD	: Optik yoğunluk
U	: Ünite
UV	: Ultraviole

v/v	: Hacim / hacim
w/v	: Ağırlık / hacim
MSG	: Monosodyum L-glutamat
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç kurumu
WHO	: Dünya sağlık örgütü
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
AFM	: Atomik güç mikroskobu
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaşayan insan popülasyonu 7 milyar nüfusa sahiptir ve bu sayı her geçen yıl daha da artmaktadır. Ülkemizde ise nüfus 70 milyon civarındadır ve büyüme oranı 1,7 ile Avrupa ülkeleri arasında en yüksek değere sahiptir. Dünya ve Türkiye'deki nüfus artışına paralel olarak enerji, gıda, barınma, korunma, iş, tedavi, eğitim ihtiyaçları, tüketim hızla artmaktadır. Artan ihtiyaçlara cevap vermek amacıyla gerçekleştirilen üretim ise gerek hammadde kaynaklarına erişim, gerekse maliyet açısından ciddi sıkıntılar yaşamaktadır.

Fosil yakıt kullanımının sera gazı emisyonu, hava kirliliği, asit yağmurları gibi etmenler üzerinde olan ekolojik dezavantajları ciddi biçimde göze çarpmaktadır. Fosil yakıtlar yakıldığında atmosfere CO₂, SO₂, NO, toz ve kurum salınmaktadır. Bu kirleticiler çevreye zarar verirken bazı türlerin yok oluşuna katkı sağlamakta ve bazıları sera gazı etkisi yaratarak iklim değişikliğine neden olmaktadır. Bunlara ek olarak petrolün 50, doğal gazın 65, kömürün ise 200 yıllık ömrü kaldığına dair çalışmalar araştırmacıları yenilenebilir, çevreye zararsız, fosil olmayan enerji kaynaklarının kullanım olasılıklarının değerlendirilmesine yöneltmiştir. Bu kapsamda rüzgar, güneş, dalga, jeotermal ve özellikle de biyokütle enerjisi oldukça ilgi çekici hale gelmiştir. Biyokütle enerjisinin kullanımı ile çevresel problemlerin kısmen giderilmesi, yerel kaynakların değerlendirilmesi ile dışa bağımlılığın azaltılması ve atıkların değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Biyokütle, enerji üretiminde kullanılmasının yanısıra sitrik asit, laktik asit, fumarik asit, itakonik asit, malik asit, aspartik asit, süksinik asit gibi organik asitlerin üretiminde kullanılır. Alginat, β -1,4 glukoz, kitin, kurdan, gellan, dekstran, pullulan, ksantan gam gibi ekstraselüler polisakkaritlerin üretimi için kullanılır. Gliserol, arabitol, eritritol, mannitol, ksilitol gibi polihidrik alkollerin üretimi için de biyokütle kullanılır. Ek olarak, polihidroksialkanatların üretiminde kullanılmaktadır.

Biyokütle, ışık enerjisini kimyasal enerjide depolayan organik materyallerdir. Odunsu, otsu ya da hayvansal olmak üzere değişik formlarda bulunabilirler. Biyokütlenin insanlığın başlangıcından itibaren temel kullanım biçimi yakmadır.

Biyokütle olarak, özel bir arazide gerekli bakımlar yapılarak belirli bir zaman dilimi içinde üretilen ürünlerin kullanılabileceği gibi sezonluk tüketim için ya da doğada kendiliğinden gelişen bitkiler ya da atıkları da kullanılabilir. Bu amaçla üretim yapılan bitkilerin başlıcalarını buğday ve mısır gibi nişastalı ve şeker kamışı ve şeker pancarı gibi şekerli bitkiler oluşturmaktadır. Biyokütle olarak bazı algler ve tohumuz bitkilerin kullanıldığı bilimsel çalışmalar da mevcuttur. Fakat daha ilgi çekici konu ise tarımsal, ormansal ve kentsel atıkların ürün eldesi için kullanımudur.

Dünya üzerinde tarımsal atıklar ve miktarları karşılaştırıldığında birinci sırayı yılda $317-380 \times 10^6$ ton ile şeker kamışı küspesi almaktadır. Bir yıllık arta kalan mısır samanı 159×10^6 pirinç kabuğu $157-188 \times 10^6$, buğday samanı $54-65 \times 10^6$, yuka samanı $40-48 \times 10^6$, arpa samanı $\times 10^6$, pamuk posası $17-20 \times 10^6$, sorghum samanı $15-18 \times 10^6$, muz atığı $13-15 \times 10^6$ tondur. Türkiye’de ise 2003’de 23.429.907 ton buğday samanı, 8.963.012 ton arpa samanı, 358.040 ton pirinç samanı, 321.236 ton yulaf samanı, 4.970.259 ton mısır sapı, 209.532 pirinç samanı, 21.872 soya fasülyesi samanı atık olarak bulunmaktadır. Bu atık miktarı her yıl giderek artmaktadır. Bu tarımsal atıkların endüstriyel olarak değerlendirilmesi hem yeni bir iş sahası yaratacağı ve öz kaynakların kullanımı ile kırsal ekonomiye katkıda bulunacağı hem de toplumsal amaçla üretilen ürünlerin maliyetinin azaltılmış olacağı düşünülmektedir.

Türkiye’de kırsal arazi toplamı 26,350 milyon ha’dır. Bunun %38,4’ü yumuşak arazi, %44,1’i ormanlık arazi, %10,4 nadasa bırakılan toprak, %7,1 meyve sebze ekimi yapılan araziden meydana gelmektedir [1]. Başka bir çalışmaya göre ise 5 milyon hektar ormanlık arazi bulunan ülkemizde bunun 2,6 milyon hektarında sürekli orman bulunmaktadır[2]. Tarımsal atıklara ek olarak yıllık 18 milyon ton ormansal atık ve 6 ton odun endüstrisi atığının ortaya çıktığı tespit edilmiştir [3]. Yıllık orman kesim artıkları 7 milyon m³’tür [4]. Ormansal alanlarda yaygın olarak bulunan ağaçlar çam, kavak, meşe türleridir. Endüstriyel üretimde en fazla kullanılanları ise sırasıyla kavak ve meşe türleridir. Ormansal ve endüstriyel artık odun ya da talaş potansiyelinin değerlendirilmesi oldukça önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Lignoselülozik hammadde olarak kullanılabilecek diğer bir atık türü ise kentsel katogoride ele alınan kağıttır. Birleşik Devletlerde başta gazete (%3), ofiskağıdı (%2,1), dergi (%0,9), karton kutu (%5,4) olmak üzere toplamda kentsel katı atıkların %28'ini kağıt oluşturmaktadır. Bu oran Singapur'da %21, Birleşik Kırallık'da %19, Almanya'da %10, İspanyada %21 ve Avusturalya'da %10 olarak tespit edilmiştir [5]. Türkiye'de katı atıklar arasında %6-30 oranında kağıt bulunmaktadır [6]. Hacettepe üniversitesinde yapılan bir çalışmada ise nisan ve mayıs ayları arasında 1468,07 gr. kağıt atık olarak elde edilmiştir ve bu rakam hastanedeki tüm katı atıkların %46,79'unu oluşturmaktadır [7]. Buna ilişkin çalışmalar dikkate alındığında hammadde kaynağı olarak atık kağıtların kullanımıyla kentsel katı atık yönetimine de oldukça katkı sağlanılacağı düşünülmektedir.

Lignoselüloz, odunlular başta olmak üzere tüm bitkilerdeki en temel bileşendir. Asıl olarak selüloz, hemiselüloz ve lignininden meydana gelmektedir. Selüloz glukoz birimlerinden meydana gelir. Hemiselüloz heteropolimerdir ve yapısında hem heksoz hem de pentozları bulundurabilir. Lignin ise hücre duvarına dayanıklılık katan en önemli bileşendir ve fenolik maddelerin polimerizasyonundan meydana gelir. Lignoselülozik yapıda bulunan polimerlerin oranı her tür için farklılık göstermektedir. [8]

Selüloz, hemiselüloz ve lignin hücreyi dışarıdan gelen ataklara karşı korumak için sıkıca paketlenmiş olarak bulunmaktadır. Bundan dolayı, enzimlerin etrafı ligninle sarılı selüloz ve hemiselüloza ulaşması oldukça zordur. Bu zorluğun aşılması için ya yapıya zarar verilmeli yada ortamdaki lignin giderilmelidir. Bunun için en basiti mekanik ön-muamele olmak üzere farklı fiziksel, kimyasal, biyolojik ön-muamele yöntemleri geliştirilmekte ve optimize edilmektedir [9]

Ön-muamele ile daha kullanılabilir kılınan lignoselülozik yapının ürüne dönüştürülmesinin ikinci basamağında ise içerdiği polimerleri yapı taşlarına kadar parçalayabilecek enzimlerin elde edilmesi ve uygulanması yeralmaktadır [10]. Hidroliz sonucunda daha sonra fermentasyonda kullanılabilecek glukoz, ksiloz, arabinoz, mannoz, sellobiyoz gibi monomerler meydana gelmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. MİKROBİYAL YOLLA ELDE EDİLEN ENDÜSTRİYEL ÜRÜNLER

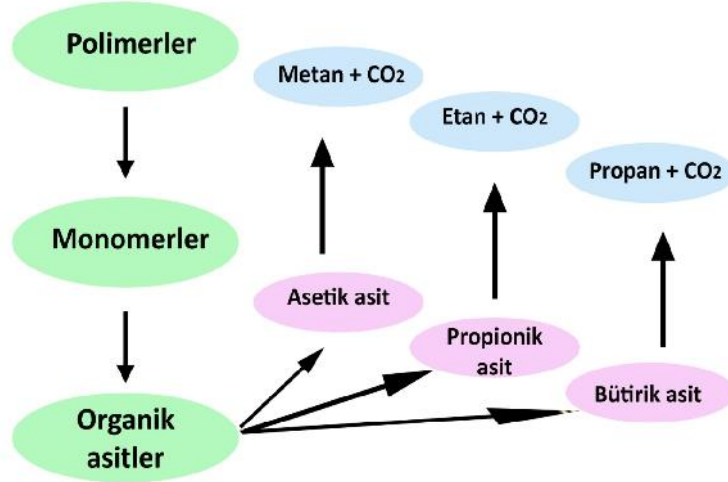
Son 50 yıl içerisinde başta petrol olmak üzere, fosil yakıt kaynakları giderek azalmaktadır. Bu nedenle, şehirlerdeki artan enerji ve ürün talebinden dolayı, farklı enerji ve ham madde kaynaklarının arayışına başlanmıştır [11]. Bu arayış çerçevesince yenilenebilir olmalarından da kaynaklı olarak jeotermal, nükleer, güneş, su ve biyokütle temelli yenilenebilir enerjilere ilgi artmıştır [12]. Özellikle de endüstriyel ve evsel atıkların, açık arazide yetiştiriciliği yapılan tarımsal ürünlerin, orman ve tarım arazilerindeki bitkisel atıkların ham madde olarak değerlendirilebileceği biyorafineriler dikkat çekmektedir [13]. Bu kapsamda, kullanılanbilir en temel mikrobiyal yakıt türü ise metan ve etanoldür. Diğer mikrobiyal yakıtlar arasında ise hidrojen, propan ve metanol sayılabilir. Bu tür enerjilere ilave olarak, bazı mikrobiyal sistemlerle elektrik üretiminin de gerçekleştirildiği çalışmalar mevcuttur [14].

Birçok kimyasal bileşiğin üretimi mikrobiyal fermentasyon ve biyolojik dönüştürme prosesleri ile daha ekonomik ve/veya daha çevreci olabilmektedir. Organik asit, amino asit, endüstriyel çözücü ve değişik biyopolimerler gibi primer metabolitler bu kapsamda değerlendirilmektedir [15]. Bu tür ürünlerin dünya ticaretindeki payı ise %20'dir [16].

2.1.1. Alkanlar

Metan, hem evsel hem de endüstriyel yakıt olarak kullanılmaktadır. Günümüzde metan ya kömürün gazlaştırılmasıyla havagazı olarak, ya da petrolden doğalgaz olarak elde edilmektedir. Fermentasyon yoluyla metan eldesi ise çok küçük ölçeklerde yapılmaktadır. Fakat yenilenemeyen kaynakların giderek tükenmesinden dolayı, fermentasyon yoluyla üretime olan ilgi artmaktadır [17]. Mikroorganizmalar yardımıyla metan üretimi ise oldukça kompleks bir prosestir. Biyolojik metan üretimi ise organik sedimentler, bataklıklar, mide ve geviş getiren hayvanların rumenlerinde bulunan mikroorganizmalar tarafından, anaerobik olarak gerçekleştirilen bir prosestir [18]. Metanın mikrobiyal üretimi tarımsal, endüstriyel ve kentsel atıkların anaerobik

parçalanmasıyla gerçekleştirilmektedir [19]. Bu tarz üretimin dezavantajını atık toplama maliyeti oluştururken, hayvansal atıklarla gerçekleştirilen küçük ölçekli biyogaz üretimi daha verimli olabilmektedir. Üretilen biyogazın içinde ise %50-80 oranında metan, %15-45 oranında CO₂ ve iz miktarda diğer gazlar bulunmaktadır. Biyogaz üretimi sırasında karışık kültürlerin kullanımı, karbon kaynağı olarak kullanılabilen substrat çeşidini arttırabileceğinden dolayı daha çok tercih edilir. Metan üretiminin kendine has 3 fazı mevcuttur. İlk fazda bir grup mikroorganizma yağ, protein ve polisakkaritleri içeren organik polimerlerin hidrolizini gerçekleştirir [20]. İkinci aşamada bu bileşikler anaerobik asidojenik organizmalarca organik asitlere metabolize edilirler. Son aşamada ise organik asitler alkanlara ve karbondioksit'e dönüştürülürler (Şekil 2.1). [21]. Metan; propionat ve bütirattan elde edilen etan ve propan gibi uzun zincirli alkanlarla karşılaştırıldığında daha az enerjiye sahiptir (Çizelge 2.1). Metan üretimi sırasında, asidojenizis aşamasında etan ve propan üretimi çok az miktarda gerçekleştirilir. Bundan dolayı etan ve propan üretimi özel koşullarda gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2.1. Metan, etan ve propan üretiminin metabolik yolu.

Çizelge 2.1. Metan, etan ve propan enerji içeriklerinin karşılaştırılması

Alkan Türü	Enerji (kJ/m ³)
Metan	37
Etan	64
Propan	94

2.1.2. Bütanol

Aseton, bütanol, bütirik asit, izopropanol, diğer organik asitler ve alkol ise nişasta, melas ve selülozik ham materyallerden klostridiyal fermentasyonla üretilmektedir [22]. Her birinin üretimi bakterinin türüne ve fermentasyonun çevresel koşullarına bağlıdır. Üretim için genellikle 3 tip klostridiyal fermentasyon mevcuttur. İlki aseton-bütanol fermentasyonudur. Bu fermentasyonda *Clostridium acetobutylicum* kullanılır ve ilave ürün olarak bütirik asit, asetik asit, asetoin, etanol, CO₂ ve H₂ elde edilir. Bütanol-izopropanol fermentasyonunda *Clostridium butylicum* kullanılır ve ilave olarak bütirik asit, asetik asit, CO₂ ve H₂ elde edilir. Bütirik asit-asetik asit fermentasyonunda *Clostridium butyricum* kullanılır ve ilave ürün olarak CO₂ ve H₂ elde edilir [23].

Clostridium cinsine ait üyeler Gr⁺, çubuk, peritrik flagellaya sahip ve oldukça hızlı hareket etmektedir. Isıya oldukça dirençli sporları ve yüksek fermentatif metabolizmaları ile karakterize edilirler. Tümü anaerobiktir, fakat bazıları bir miktar oksijene toleranslı iken diğerleri zorunlu anaerobiktir [24]. Bazı türleri sitokrom üretebilir. Termofilik olanları bulunsa da genellikle mezofiliktirler. Nötral ve alkalın pH'larda gelişirler.

Aseton-bütanol fermentasyonu 20. yy. başlarında Weizmann'ın çalışmalarıyla *Clostridium acetobutylicum* tarafından gerçekleştirilmiştir [25]. Fermentasyon sonucu üretilen aseton, bütanol ve etanol, I. Dünya Savaşı sırasında kullanılmıştır. Özellikle aseton, patlayıcı yapımında kullanılmaktadır. Aseton, kordit üretiminde nitroselüloz için jelatinizasyon ajanı olarak kullanılır. Weizmanın uyguladığı bu proses aynı zamanda da riboflavin (vitamin B₂) üretmektedir. Birinci Dünya Savaşı'ndan sonra ise plastik, kaplama, deterjan, sentetik kauçuk, çözücü, bütadien gibi endüstriyel ürünlerin üretiminde kullanılması için bütanole olan ilgi artmıştır. Bundan dolayı, 1945'teki üretim miktarı 20.000 tondur. Fakat bu tarihten sonra petrol türevli ürünlerin daha ucuz üretimi ile artan bütanol ihtiyacına göre üretilen fermentatif bütanol miktarı daha azdır. Amerika'daki yıllık üretimi ise günümüzde 500.000 ton/yıl'dır. Bu oran her yıl %3-4 artmaktadır. Bununla birlikte, Rusya, Afrika ve Çin'de hâlâ fermentatif üretim sürmektedir [26]. Üretim sırasında şeker kamışı, şeker pancarı, melas gibi hammadde kaynakları kullanılsa da, maliyetin

düşürülmesi için ormansal, tarımsal, kentsel ve endüstriyel atıkların kullanımına dair çalışmalar sürdürülmektedir [27].

Fermentatif yolla üretilen bütanol farklı kimyasalların üretiminde kullanılabileceği gibi yakıt olarak da kullanılabilmektedir. Yakıt olarak tek başına veya benzinle karıştırılarak kullanımı mevcuttur [28]. Bütanol iyi bir oktan düzenleyicisidir. Görece olarak yüksek yanma ısısına sahip olduğu için metanol ve etanolden daha düşük buhar basıncına sahiptir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Yakıtların fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması

Fiziksel özellik	Metanol	Etanol	Bütanol	Benzin	Dizel
Yanma ısısı (kJ/g)	23,9	30,6	36,7	43,8	42,7
Yakıt değeri: RON	110	108	100	92	15
Oktan değeri: MON	91	90	87	83	-
Karıştırılabilirlik					
Benzin	Az	Orta	İyi	-	-
Dizel	Az	Az	İyi	-	-
Su	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük	Düşük

Bütanol fermentasyonu için genellikle 1.000 m³'lük fermentörler kullanılır. Kesikli üretim yapılır ve fermentörde karıştırma yapılmaz. Substrat olarak genellikle %5-7 karbon kaynağı ilave edilir. Genellikle melas ve nişasta kullanılmasına karşın selülozik atıkların kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Fermentörün aşılmasında kullanılan *C. acetobutylicum* kültürünün oranı %0,03 (v/v) civarındadır. Fermentasyonun ilk 18-24 saatinde bütirik ve asetik asit oluşumu gerçekleştiğinden, ortamın pH'sı 6'dan 5,2 ye düşmektedir. Bunun için 20-24 saat sonra pH tekrar ayarlanmaktadır [29]. Fermentasyon sıvısı içindeki aseton:bütan:etanol oranı 6:3:1'dir. Fermentasyon prosesinin dezavantajı ise fermentörün laktobasillerle kontaminasyonu, bakteriyofaj atakları, ürün inhibisyonu, distilasyon için yüksek enerji giderleri ve karışık fermentatif ürünlerdir.

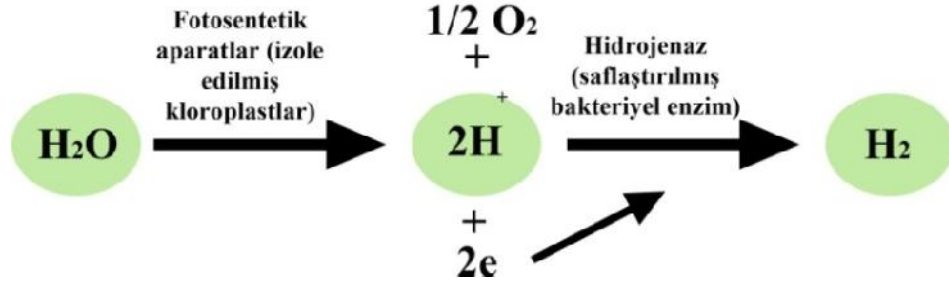
2.1.3. Endüstriyel Etanol

Dünya genelindeki yıllık etanol üretimi 31,2 milyar litredir ve bunun %70 kadarı fermentatif yolla üretilmektedir [30]. Kalanı ise etilenin katalitik hidrasyonu ile üretilmektedir. Fermentatif yolla üretilen etanolün %12'si içeceklerde, %20'si çeşitli endüstriyel alanlarda, %68'i ise yakıt olarak kullanılmaktadır. Etanol yakıt olarak tek başına kullanılabildiği gibi benzinle karıştırılarak da kullanılabilir. ABD'de %10-20 oranında benzinle karıştırılırken, Brezilya'da 1970'lerden süregelen devlet politikasından dolayı %10-90 oranında benzinle karıştırılmaktadır [31]. Dünya genelindeki etanolün %46'sı Brezilya'da üretilmektedir. Fermentasyon sırasında substrat olarak şekerli ürünler, nişastalı yumrular (patates, manyok v.b.), nişastalı taneler (buğday, pirinç, mısır), bitkisel ve gıdasal atıklar kullanılabilir [32].

2.1.4. Hidrojen

Hidrojen, etanolden 4, metandan 2 kat yüksek enerji içeriğine sahiptir (118,7 kJ/g). Hidrojen üretimi için 3 yol vardır. Birinci yol suyun biyofotolizidir. Bu yolda ilave bir substrata gerek kalmadan, su ışık enerjisi yardımıyla parçalanır. Proses, algal kloroplastlardaki gibi fotosentetik sistemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Proses sırasında bakteriyel hidrojenaz ve uygun elektron taşıyıcısına ihtiyaç duyulur (Şekil 2.2).

İkinci yol olan fotoredüksiyon ise ışığa bağımlı anaerobik bir proses olup, organik bileşikler ışığa bağımlı olarak fotosentetik bakteriler tarafından parçalanır. *Chlorobiaceae*, *Chromatiaceae* ve *Rhodospirillaceae* türleri tarafından gerçekleştirilir. Miktar olarak çok düşük olmasına rağmen, hidrojen üretilen üçüncü proses ise fermentatif yoldur. Fermentatif yolla H₂ üretimi, genellikle enterobakteriler tarafından gerçekleştirilir. Fakat bazı çalışmalarda *Clostridium*'lardan da faydalanılmıştır [33]. Fermentasyon için karbonhidratça zengin substratlara ihtiyaç vardır [34]. Teorik olarak bir mol glukozdan 4 mol hidrojen elde edilmektedir.



Şekil 2.2. Suyun biyofotolizi.

2.1.5. Elektrik

Elektik üretimi için enzim temelli sistemler kullanılmaktadır. Mikrobiyal dehidrojenazlar elektrotlara bağlanarak hidrojen ve elektrik üretimi gerçekleştirilmektedir. Buna ilaveten bakteriyorodopsin temelli sistemlerle elektrik üretimi de gerçekleştirilebilmektedir [35].

2.1.6. L-Glutamik Asit

Tüm amino asitler içinde L-glutamik asitin üretimi daha önemlidir. Monosodyum L-glutamat (MSG) şeklinde tat düzenleyici olarak kullanılır [36, 37]. Bu bileşik ilk olarak *Laminaria japonica* olarak adlandırılan yosundan elde edilmiştir. MSG 1959'da FDA (Food and Drug Administration: Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsüne alınmıştır. Vücuda alınacak günlük miktar ise FAO ve WHO tarafından 0-120 mg/kg olarak belirtilmiştir. 1960 Yılı'nın başlarındaki klasik üretim biçimi bitki kaynaklı iken yerini fermentatif prosese bırakmıştır. MSG'nin 2007 yılındaki üretiminin 2 milyon ton ve uluslararası ölçekteki ortalama fiyatı 1,20 \$/kg'dır [38].

Glutamik asit üreten mikroorganizmalar *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* ve *Micrococcus* cinsleriyle yakından ilişkilidir. Endüstriyel üretimi sırasında genellikle *Brevibacterium* ve *Corynebacterium* türleri kullanılmaktadır.

Üretim sırasında kullanılan endüstriyel fermentör paslanmaz çelikten, karıştırıcılı ve 450 m³'tür. Kesikli üretim prosesi aerobiktir. Fermentasyon 30-37 °C'da gerçekleştirilir. Fermentasyon sırasında tercih edilen karbon kaynağı glukoz ya da sukrozdur. Buna ilaveten, besiyerinde inorganik tuzlar, özellikle de bazı vitaminler oldukça önemlidir. Azot kaynağı olarak amonyum tuzları, amonyak ya da üre kullanılır. Fermentasyon pH'sı 7-8 arasındadır. Fermentasyon sonrasında ürünün kazanımı için ise ilk olarak fermentasyon sıvısından hücreleri ayırmak gerekmektedir. Daha sonra hidroklorik asit eklemek suretiyle ortamın pH'sı 3,2'ye düşürülerek kristallenme gerçekleştirilir. Kristal yapıda olan glutamik asit yıkanarak filtreden geçirilir.

2.1.7. L-Lizin

Lizin, insan ve memeliler tarafından doğal olarak sentezlenemez. Bundan dolayı dışarıdan alınmak zorundadır. Yıllık üretim potansiyeli 350.000 tondur [39]. Bunun 90.000 tondan fazlası mikrobiyal fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Kalanı ise kimyasal olarak sentezlenmektedir. Fakat kimyasal sentezin oldukça önemli bir dezavantajı vardır: proses sonunda ortamda D- ve L-izomerlerinin karışık olarak bulunmasıdır. Fermentasyonla üretimin temel avantajı ise oluşan lizinin sadece L-formunda olmasıdır.

C. glutamicum ile L-lizin üretiminin anahtar noktası ise aspartatın aspartokinaz ile aspartil fosfata katalizlendiği basamaktır [40]. Bu basamak geri beslemeli inhibisyonla kontrol edilir. Fermentasyon, kesikli olarak çalkalamalı ya da karıştırıcılı fermentörlerde gerçekleştirilir. Karbon kaynağı olarak genellikle melas kullanılır, fakat asetik asit ya da etanol de tercih edilebilir. Sıcaklık yaklaşık 28 °C, pH ise nötral seviyelerde korunmalıdır. Azot kaynağı olarak amonyak ya da üre kullanılmaktadır. Fermentasyon sırasında ortamdaki biyotin miktarı oldukça önemlidir. Eğer ortamda 30 µg/L'den daha az biyotin bulunursa fermentasyon sonucunda ortamda L-lizin yerine L-glutamat birikimi gerçekleşir. Fermentasyonun başlaması için, üreme döngüsünün lag fazında ortama %10 oranında substrat ilave edilir. Fermentasyonun 60. saatinde 200 g/L melasdan (100 g/L'si sukrozdur) 40-45 g/L L-lizin elde edilir. Elde edilen lizin amonyum formunda katyon değiş-tokuş

kolonuna adsorblanır. Daha sonra seyreltik amonyak çözeltisiyle kolondan elüe edilir ve kristallendirilir [41].

2.1.8. Sitrik Asit

Sitrik asit gıdalarda ortamın asitliği arttırıcı, tatlandırıcı, oksiditeyi giderici, başka mikrobiyal gelişimlere karşı koyucu, emilsülfiyer, stabilizatör, antioksidan olarak kullanılır [42]. Bir trikarboksilik asit olan sitrik asitin toksisitesi az, emilimi kolaydır. Sitik asit üretimi 1920'lere kadar limon suyundan gerçekleştirilmiştir [43]. ABD'li Pfizer 1923'te sitrik asit üretimini fermentasyonla gerçekleştirmiştir. Üretimde kullanılan organizma kültür kabının yüzeyinde gelişim gösteren, zorunlu aerob olan filamentli funguslardan *Aspergillus niger*'dir [44]. Üretim sırasında substrat olarak sukroz kullanılmıştır. Sitrik asit yıllık 550.000 ton ile dünyada en fazla üretilen fermentatif ürünlerdendir. Üretilen sitrik asitin değeri ise yıllık 800 milyon dolardır. Sitrik asit üretimi sırasında ilk olarak yüzey kültür metodu kullanılmıştır. Fakat daha sonra üretim batık kültür yöntemiyle gerçekleştirilmiştir [45]. Sitrik asit, Embden Meyerhof Parnas (EMP) metabolik yolu ve Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) ile ilişkilidir. Sitrik asit üretiminde 2 farklı fermentasyon tipi kullanılabilir: yüzey kültür ve derin kültür tekniği.

Yüzey kültür tekniği daha basittir ve enerji gideri düşüktür. Fakat fermentasyon sonucu elde edilen ürün miktarı derin kültüre göre daha azdır. Bundan dolayı sitrik asit üretiminin %80'i 40-200 m³ ya da 200-900 m³ kapasiteli karıştırmalı, aşınmaya dirençli paslanmaz çelikten yapılmış derin kültür tanklarında gerçekleştirilmektedir. Karbon kaynağı olarak genellikle pancar ya da melas kullanılır. Fermentasyon sırasında sürekli iyi bir sitrik asit üretimi için kültürdeki şeker oranı 140 g/L olmalıdır. Böylece hem glikolitik enzimler hem de pürivat dekarboksilaz enzimlerinin aktiviteleri korunur. Azot kaynağı olarak kullanılan amonyum tuzlarının oranı ise 0,1-0,4 g/L olmalıdır. Fermentör içindeki demir oranının minumun düzeyde tutulması oldukça önemlidir. Güzelce havalandırılan fermentörün sıcaklığı 30 °C olmalıdır. Büyüme fazından önce 6-7 olan pH, daha sonra 2'ye kadar düşer. Fermentasyon sonucunda ise teorik olarak kullanılan her 1

gram şekere karşı 0,7-0,9 g ya da 100 g substrat için ortalama 17 g sitrat elde edilir [46].

Sitrik asitin ortamdan saflaştırılması için önce fermentördeki fungal miselyumlar ortamdan uzaklaştırılır ya da oksalat ile çöktürülür. Berraklaştırılan solüsyon ise ısıtılır ve CaO eklenerek kalsiyum sitrat meydana getirilir. Daha sonra filtrasyonla elde edilen kalsiyum sitrat sülfürik asit ile muamele edilerek sitrik asit ve kalsiyum sülfat çökeltisi (gypsum) elde edilir. Elde edilen sitrik asit aktif karbonla renksizleştirilir ve sitrik asit kristalleri oluşturulur. Santrifüjlenerek daha da yoğunlaştırılan kristaller kurutulur ve paketlenir.

2.1.9. Glukonik Asit

Glukonik asitin kalsiyum glukonat ve demir glukonatın, kalsiyum ve demir eksikliklerinde kullanılan teröpotik ajanların üretiminde ve gıdalarda kullanımı yaygındır. Her yıl derin kültür tekniği ile *A. niger*'den 50.000 tondan fazla üretilmektedir [47]. Fosfat ve azot sınırlamasıyla birlikte karbon kaynağı olarak glukoz ya da corn step liquor kullanılmaktadır. Fermentasyon yüksek derece aerobiktir, 30 °C, pH 6-7, 20 saat gerçekleştirilir.

2.1.10. İtakonik Asit

Doymamış dikarbonik organik asit olan itakonik asit yapıştırıcı ve kâğıt ürünleri yapımında, tekstilde kullanılır [48]. Aynı zamanda akrilik asit, metil akrilat ve stirenin kopolimeri olarak plastik yapımında da yer almaktadır. Ticari olarak *Aspergillus terreus* ve *Aspergillus itanicus* kullanılarak batık kültürde üretilir. Substrat olarak genellikle melas ya da corn step liquor kullanılarak %65 kadar verim elde edilir. Fermentasyon süresi 3 gündür ve fermentasyon boyunca fermentör oldukça iyi havalandırılmalıdır.

2.1.11. Laktik Asit

Gıda endüstrisinde kullanılır ve gıda koruyucusu, asitliği arttırıcı, hamur düzeltici olarak yılda hemen hemen 30.000 ton üretilir [49]. Laktik asit, 20-100 m³'lük fermentörlerde anaerobik fermentasyon ile *Lactobacillus delbruckii* ya da *L. bulgaricus* gibi diğer homolaktik bakteriler kullanılarak üretilir [50]. Fermentör içinde belli bir miktar azot kaynağı ve vitamin desteği bulunmalıdır. Genellikle karbon ve enerji kaynağı olarak %12 oranında sukroz ya da glukoz kullanılır. Fermentasyon 45-60 °C'de 4-6 gün boyunca gerçekleştirilir.

2.1.12. Polihidroksialkanatlar

Polihidroksialkanatlar (PHA) petrol türevli plastiklere karşı, biyolojik olarak parçalanabilen önemli bir alternatiftir [51]. PHA'lar lineer homokiral termoplastik polyester yapıya sahiptir. Bu biyopolimerler özellikle *Pseudomonas*'larda olmak üzere ilgili mikroorganizmalarda besin kıtlığına karşı mikroorganizmanın cevap olarak oluşturduğu 0,2-0,7 µm çapındaki granüler inklüzyon cisimciklerinin birikmesiyle meydana gelir. En çok karşılaşılan PHA'lar hidroksibütirik asit, laktik asit monomerlerinden meydana gelen poli-β-hidroksibütirat (PHB) ve poli-laktik asitlerdir (PHL) [52, 53]. Bunlar mikrobiyal türevli plastiklerin hammaddeleri olarak kullanılır. Ticari olarak kullanılan PHB'ler *Ralstonia eutropa* tarafından düşük oksijen yoğunluğunda ve fosfat, magnezyum ya da sülfat gibi iz maddelerin belirli bir sınırdan olduğu fermentörlerde üretilir [54]. PHB'ler monomerlerine kolay ve hızlıca ayrışır. Fakat maliyeti 15-30 \$/kg'dır.

2.1.13. Polihidrik Alkoller

Mayalar gliserol, arabitol, eritritol, mannitol ve ksilitol gibi polihidrik alkoller üretir. Ksilitol düşük kalorili tatlandırıcı olarak diyabetik ürünlerde kullanılır [55]. Üretimi ise 5 karbonlu şekerleri (pentoz) fermente edebilen *Candida* türleri, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* tarafından gerçekleştirilir [56]. Gliserol ise medikal, gıda ve endüstriyel uygulamalarda çözücü, yumuşatıcı, tatlandırıcı olarak kullanılabilir. Ticari olarak en fazla kullanımı ise patlayıcı yapımındadır. Gliserol

üretimi ilk olarak Louis Pasteur tarafından tespit edilmiştir. Pasteur alkolik fermentasyon sonunda yan-ürün olarak çok az miktar gliserolün de oluştuğunu gözlemiş, oranını ise her 100 g şekerin fermentasyonu için 2,5 g gliserol olarak belirlemiştir. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarla bu oran %20-25'lere kadar ilerletilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda ise gliserol üretimi için kullanılan besiyeri bileşenleri %10 (w/v) sukroz, %0,5 (w/v) amonyum nitrat, %4 (w/v) sodyum bisülfid, %0,075 (w/v) potasyum fosfattan oluşmaktadır. Fermentör içine %1 (v/v) *Saccharomyces cerevisiae* inoküle edilerek 30 °C'de 48-60 saat fermentasyon gerçekleştirilir.

2.1.14. Mikrobiyal Ekzopolisakkaritler

Birçok mikroorganizma hücre dışında ya kapsül olarak ya da ince bir tabakadan ibaret, çözünebilir salgılardan oluşan bir tabaka meydana getirir. Genel olarak ekzopolisakkarit olarak adlandırılan bu tabaka ya homopolimer ya da heteropolimerdir. Bu tabaka mikroorganizmaları kurumaya karşı korur, hayvan patojenlerinde konakçının immün sistemini atlatmaya yarar, kimyasal ajanlar ve virüslere karşı bariyer görevi görür, yüzeylere tutunmayı sağlar, ihtiyaç duyulduğunda karbon ve enerji deposu olarak kullanılabilir. Ekzopolisakkaritlerden mikrobiyal ekolojide, mandıracılıkta, ilaç ve tutkal sanayisinde sıkça faydalanılır [57]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekzopolisakkaritler yüksek bitkiler ve algler tarafından üretilen polisakkaritlerin yerini almaya başlamıştır.

Alginatlar, L-glukuronik asit ve D-mannuranik asit içeren lineer heteropolimerlerdir. O-asetil grupları içerirler. Bu polimerler *Pseudomonas* türleri ve *Azotobacter vinlandii* tarafından oluşturulur [58]. Kâğıt ve tekstilde haşıl maddesi ya da gıdalarda stabilizatör olarak kullanılır.

β -1,4-glukan birimlerinden meydana gelen selüloz *Acetobacter xylinum* tarafından yüzey ya da batık kültürde üretilir [59].

Kitin, N-asetilglukozamin birimlerinden meydana gelir. Kitosan ise kitinin de-asetillenmiş halidir [60]. Ticari olarak kabuklu deniz hayvanlarından elde edilmektedir. Fakat endüstriyel olarak gıda koruyucusu, berraklaştırıcı ajan,

şelatlama ajanı gibi amaçlar için kullanılan kitin ve kitosan mantarlardan elde edilmesine ilişkin çalışmalar sürmektedir.

Kurdlan, β -1,3-glukan yapıda bir maddedir. *Alcanigenes* ve *Agrobacterium* türleri tarafından meydana getirilir. Sert, geri dönüşümsüz jel yapıda olabilen ve gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan bu materyalin üretimi Japonya'da gerçekleştirilmektedir [61].

Dekstranlar, dallanmış α -1,6-glikozidik bağla bağlı kısa glukan zincirlerinden meydana gelir. Bu glukanlar α -1,3 bağlı dallanma noktalarına sahiptir. Endüstriyel olarak üretimi daha çok *Leuconostoc mesenteroides* tarafından gerçekleştirilir.

Gellan gam, 2:1:1 oranında glukoz:ramnoz:glukronik asit içeren heteropolimerdir. *Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas elodea*)'in aerobik fermentasyonu ile üretilir [62]. Özellikle gıdalarda agar ve karragenan gibi algal ürünlerin yerine kullanılır.

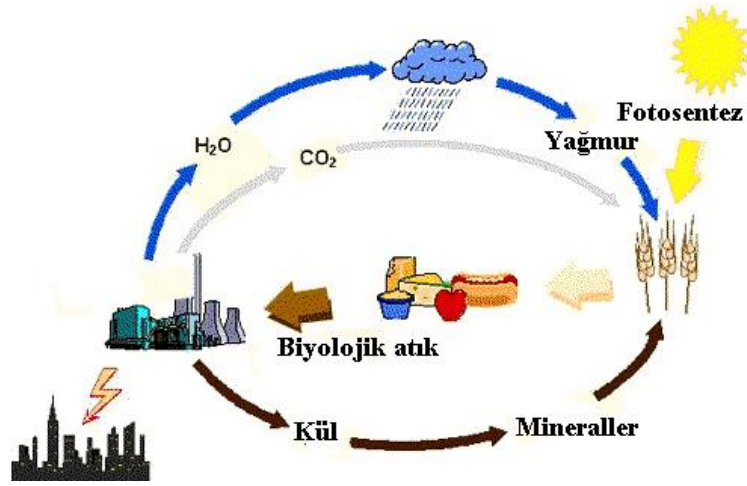
Pullulan, α -1,6 bağlı dallanma noktası içeren, lineer, α -1,4 bağlı glukan birimlerinden oluşan bir yapıdır. *Agrobasidium pullulans* tarafından üretilir [63].

Ksantan gam, yapısal olarak selüloza oldukça benzer [64]. Temel yapı β -1,4 glukopiranosidden meydana gelmiştir. $1-2 \times 10^6$ Da'luk moleküler ağırlığa sahip D-glukoz, D-mannoz, D-glukronik asit içeren heteropolimerdir. Özellikle *Xanthomonas compestris*, *X. carotea*, *X. malvacearum* ve *X. phaseoli* gibi *Xanthomonas* türlerinden elde edilir. Üretim sırasında karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, nişasta 30-40 g/L oranında kullanılır [65].

2.2. BİYOKÜTLE

Biyokütle tüm vejetatif materyallerin genel tanımıdır. Genellikle bitkisel ya da hayvansal kaynaklı materyaller biyokütle olarak ifade edilir. Biyokütle; fosil-olmayan, bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilen, yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilir maddelerdir. Odun, odunsu ürünler, tarımsal atıklar, otsul ürünler, odunsal atıklar, endüstriyel atıklar, atık kâğıt, kentsel katı atıklar, talaş,

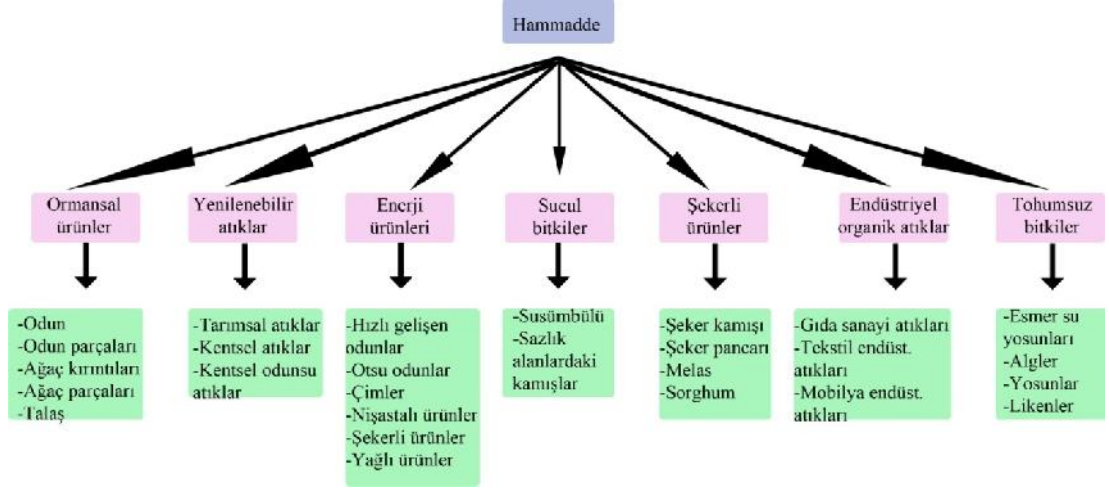
biyolojik polimerler, çim, gıda endüstrisi atıkları, yiyecek atıkları, bitkisel, algal ve hayvansal atıklar biyokütle kaynağı olarak görülmektedir [66]. Yeryüzündeki ilk biyokütle kaynağı odun ile kuru otlardır ve bunlar uzunca yıllardan beri pişirme ve ısınma için kullanılmaktadır [67]. Biyokütle, ışıktaki kimyasal enerjiyi depolayarak saklayan organik materyallerdir (Şekil 2.3). Kimyasal enerji ve organik karbon direkt ya da dolaylı olarak organizmalar tarafından ışık enerjisinin fotosentetik dönüşümü yoluyla elde edilir. Bu mikroorganizmaların metabolik süreçleri, karbondioksitin organik maddelere fotokimyasal redüksiyonunu sağlar. Karasal bitkiler tarafından biyokütleyle katılan CO₂ miktarı, 56 x 10⁹ ton/yıldır [68].



Şekil 2. 3. Karbon döngüsü.

Farklı mikrobiyal ürünlerin eldesi için hammadde kaynağı olarak kullanılabilen biyokütle ormansal ürünleri, yenilenebilir atıkları, enerji ürünlerini, sucul bitkileri, şeker ürünlerini, endüstriyel organik atıkları ve bazı ökaryotları kapsamaktadır (Şekil 2.4).

Endüstriyel olarak kullanılabilen hammadde kaynakları oldukça çeşitlilik gösterse de fermentasyonda direkt ya da dolaylı olarak kullanılabilen organik yapıya göre: (i) nişasta içeren, (ii) şeker içeren, (iii) mikroalgal ve (iv) lignoselülozik (tarımsal, ormansal atık kökenli) hammadde kaynakları olarak sınıflandırılır [69, 70].



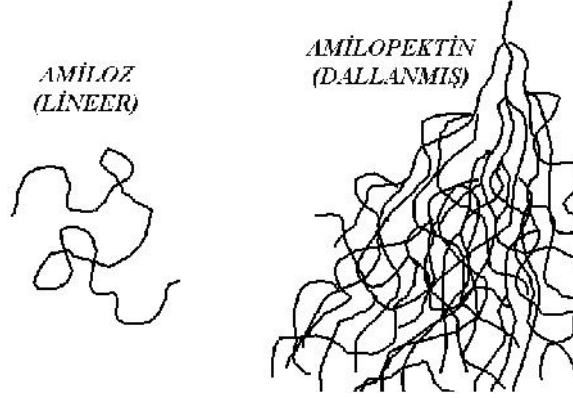
Şekil 2.4. Hammadde kaynakları.

2.2.1. Nişastalı Hammadde Kaynakları

Nişasta fotosentezin karanlık evresi süresince özellikle yapraklardaki plastitlerde olmak üzere amiloplast, yumru, tohum ve köklerde depo materyali olarak sentezlenir [71]. Ticari olarak önemli olan nişasta granülleri 2-100 μm 'dir [72]. Nişasta glukoz birimlerinin glikozidik bağla bağlanmasından meydana gelen bir polimerdir. Bu glikozidik bağlar yüksek pH'larda kararlı iken düşük pH'larda parçalanabilmektedir. Polimerik zincirin sonunda latent bir aldehit grubu bulunmaktadır. İki tip glukoz birimleri içerir; amiloz ve amilopektin [73] (Şekil 2.5).

Amiloz yaklaşık 6.000 glukoz biriminin α -1,4 glikozidik bağla bağlanmasından meydana gelir. Amilozun dallanma uzunluğu nişastalı bitki türlerinin hepsinde farklılık gösterir. Örneğin patates ve tropikal bitkilerde 1.000-6.000 uzunluğunda bulunurken buğday ve mısırdaki 100-200'dür [74].

Amilopektin ise α -1,4 bağlı 10-60 glukoz biriminden meydana gelen kısa lineer zincirlere ek olarak 10-45 glukoz birimli α -1,6 bağlanma yapısında yan-zincirler içermektedir. Nişastanın değişik yöntemlerle parçalanması sonucunda farklı mikroorganizmaların fermentasyonda kullanabileceği monomerler meydana gelmektedir.



Şekil 2. 5. Amiloz ve amilopektin.

Patates, buğday, pirinç, tritikale, mısır, arpa, manyok, başlıca nişasta içeren hammaddeler arasında yer almaktadır [75]. Bunların arasında en çok kullanılan patatestir.

i. Patates: Patates, özellikle Almanya ve Doğu Avrupa’da etanol üretimi için kullanılmaktadır. Ortalama bir patatesin %75’i su %25’i kuru maddedir (Çizelge 2.3). Nişastaya ek olarak sukroz, glukoz ve furukoz gibi şekerler de ihtiva etmektedir. Şeker ve nişasta içeriği patatesin olgunlaşmasına, iklime, depolama koşullarına bağlıdır. Depolama sırasındaki nişasta kaybı ise 6 ay sonunda %6; 8 ay sonunda ise %16,5 dir.

Çizelge 2.3. Biyokütle olarak kullanılan patates ve pirincin yapısında bulunan maddeler ve oranları

Patates	Yüzde (%)	Pirinç	Yüzde(%)
Su	72-80	Su	13,7
Nişasta	12-21	Saf protein	11,6
Şeker (indirgenmiş)	0,07-1,5	Saf yağ	1,7
Dekstrin ve pektin	0,2-1,6	Karbonhidrat	69
Beş karbonlu bileşikler	0,75-1	Saf fiber	2,1
Azotlu bileşikler	1,2-3,2	Kül	1,9
Yağ	0,1-0,3		
Saf fiber	0,5-1,5		
Kül	0,5-1,5		

Patatesteki pektin içeriği, üretilen alkollü karışımdaki metanol miktarına etki eder. Patatesin küçük boyutlara mekanik olarak ayrılması sırasında pektin esteraz enzimi aktif hale gelerek pektindeki metil ester bağlarını yıkar. Parçalanmış patatese yüksek basınçta ısıtma uygulandığında pektin esteraz aktivitesini kaybeder. Böylece patatesin fermentasyonu ile elde edilen ham distilasyon ürünündeki metanol miktarı korunur.

Patates yumruları sonbahar sonunda tarladan kaldırılır ve yıl içinde kullanılabilmesi için depolanır. Depolama süresi birkaç aydan bir yıla kadar uzayabilir. Bu esnada patatesin nem oranının yüksekliği, canlı oluşu ve bundan dolayı oksijene gereksinim duyduğu, bunun sonucu olarak ortama su ve CO₂ verdiği göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte depodaki yumrulardaki kayıpların genellikle bakteriyel ya da fungal kökenli olduğu unutulmamalıdır. Yumruların çürümeye yol açan bakterilerin başında *Erwinia*, *Corynebacterium* türleri ve *Streptomyces scabies* gelmektedir [76]. Fungal patates zararlıları ise *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora infestans*, *Phoma* ve bazı *Fusarium* türleridir [77].

ii. Buğday: Buğday tanesinin nişasta içeriği %60-61'dir [78]. Teorik olarak 100 kg buğdaydan 38 L etanol elde edilir. Buğdayın %15'i tohum zarfı, %83'ü endosperm, %2'si embriyodan meydana gelir. Bu bileşenlerin bulundurduğu protein, yağ, karbonhidrat ve kül miktarı farklıdır (Çizelge 2.4). Eğer kullanılan buğdaydaki ham protein oranı %13'ün üstündeyse fermentasyon problemi yaşanabilir. Buğdaydaki yüksek protein miktarı köpük oluşumuna neden olur. Bunun giderilmesi için ilave bir proses olarak köpük kırıcılar kullanılır.

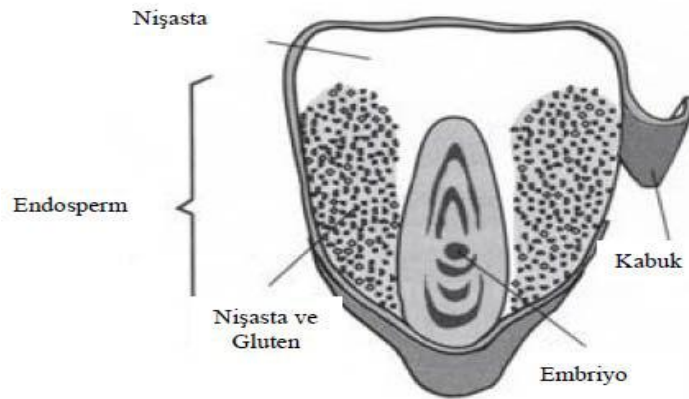
Çizelge 2.4. Buğdayın bileşenleri ve içerdikleri polimer oranları (%)

Bileşen	Protein	Kül	Yağ	Karbonhidrat
Tohum zarfı	7-12	5-8	1	80-88
Alevron tabaka	24-26	10-12	18-10	52-58
Endosperm	10-14	0,4-0,6	1,8-1,2	83-87
Germ	24-28	4-5	8-12	55-64

iii. Pirinç: Pirincin nişasta içeriği buğdayla kıyaslandığında yalnızca %2-4 kadar azdır. Yani kuru materyalin %90'a yakını nişastadan oluşmaktadır [79]. Fermentasyon sonucunda 100 kg pirinçten 37 L alkolün elde edilebileceği belirlenmiştir. Pirinç yapısında pentosanları da bulundurur. Pentosanlar parçalama sırasında viskoziteyi arttıracak için fermentasyonu etkiler. Bundan dolayı içerdiği pentosanların miktarının en düşük olacağı koşullarda ekimi ve toplanması yapılmalıdır.

iv. Triticale: Triticale, buğday ve pirincin hibritidir ve birkaç yıldır değişik kimyasalların üretiminde kullanılan oldukça önemli bir hammadde kaynağıdır. Nişasta içeriği neredeyse %60'dır. Triticale ununun içerdiği polisakkarit oranı %68,4 tür [80]. Fakat 100 kg'dan ancak 38-40 L alkol elde edilmektedir. Pentosanları içermediği için fermentasyon sırasında viskozite problemi yaşanmamaktadır. Triticalenin yüksek verimliliği ve kısmen kurak bölgelere adaptasyonu makarnalık buğdaydan, düşük verim fakat ekstrem soğuk, kuraklık, asit topraklara adaptasyonu ve farklı coğrafya ve iklimler de yetiştirilme özelliği çavdardan gelmektedir.

v. Mısır: Mısır daha çok ABD ve Güney Amerika'da kullanılan hammadde kaynağıdır [81]. Mısırın hammadde olarak kullanımı nişasta ve endosperme bağlıdır (Şekil 2.6). Yüksek içerikli endosperm, parçalama sırasında problemlere sebep olmaktadır. Mısırın nişasta içeriği çoğunlukla %62-65'dir. Mısırın 100 kg'ından 40 L alkol elde edilebilmektedir. Mısır, 4-5 ay içinde 2,5-4 m uzayabilen, bir mısır bitkisinden 6.000-10.000 tohum elde edilebilen bir bitkidir [82]. Mısır, dünyanın en çok üretilen tahılı iken ekili alan bakımından 2. sırada gelmektedir.



Şekil 2.6. Mısır tanesi ve içeriği [82].

vi. Arpa: Arpa genellikle maltlama amaçlı kullanılmaktadır. Dünyanın en eski kültür bitkisi [83]. Nişasta içeriği ortalama %55 dir. Kabukla sarılmış tohumlar bulundurur. Tohum içindeki glukan sayısı oldukça yüksektir. Genellikle pH 5,3-8 olan topraklarda yetiştirilir [84]. Teorik olarak 100 kg arpadan 35 L alkol elde edilir. Ekiliş alanı açısından dünyada 3. sırada yer almaktadır. Türkiye'de ise buğdaydan sonra en fazla ekim alanına sahip olan üründür [85].

vii. Manyok: Manyok, köklerinde nişasta bulunduran tropikal bir bitki olup, %58-63 oranında nişasta ve şeker, %9-12 ham protein, %11-12 oranında su içerir. Azot içeriği oldukça düşüktür [86]. Manyok kökü, manyok nişastası ve manyok unu gibi manyok temelli ürünlerin içerikleri farklıdır (Çizelge 2.5). Manyok toksik seviyede siyanojenik glukozidler içerir. Örneğin siyanid asit içeriği fazladır [87]. Bu madde fermentasyon mikroorganizmasının gelişimini engelleyeceğinden bu etkiyi ortadan kaldırmak için ortama sodyum tiyosülfat ilave edilir. Ek olarak, manyok unu ve manyok nişastası %20 oranında kum bulundurabilir. Bu durumda bu kumlar çökerek dipte mikrobiyal (özellikle maya gelişimi) büyümeye olanak sağlar ve bu kontrolsüz büyüme neticesinde fermentasyon tankı zarar görür.

viii. Diğer nişasta kaynakları: Yukarıda bahsi geçen nişasta içeren hammaddelerin dışında insan eli ile ekimi yapılmayan, fakat doğada bulunabilen nişasta içeriği bol olan hammaddeler de mevcuttur. Bunlara örnek olarak *Asphodelus aestivus* (çiriş otu) verilebilir. Çiriş otu ise zambakgillerden olup, köklerinden çiriş elde edilen çok yıllık iki ayrı bitkinin ortak adıdır (*Eremurus spectabilis* ve *Asphodelus aestivus/Asphodelus microcarpus*). Güneşte kurutulan kökler toz haline getirilerek elde edilen çiriş, tutkal olarak veya tekstilde apreleme amacıyla kullanılır. Akdeniz ekosistemine uygun bir yayılım gösterir [88]. *Asphodelus aestivus* Anadolu'da çok yaygındır. Yaklaşık 1 m yükseklikteki bitkinin şerit yaprakları ve pembemsi beyaz renkli çiçeklerin oluşturduğu çiçek salkımları vardır. Çiriş otunun hayat döngüsünde iki önemli evre vardır. Yaprakların meydana geldiği zamandan senesense kadarki aktif faz, kurak dönemlerdeki dormant faz. Çiriş otunun kökü toprak altında 10-20 cm uzunluğundadır ve nişasta, lipid, çözünebilir şekerler (glukoz, sukroz, fruktoz) içerir [89].

Çizelge 2.5. Manyok kökü, manyok nişastası ve manyok unu gibi manyok temelli ürünlerin içerikleri

Bileşen	Manyok kökü	Manyok nişastası	Manyok unu
Su	70,3	12,6	14
Protein	1,1	0,6	1,2
Yağ	0,4	0,2	0,4
Fiber	1,1	0,2	2
Niştasta	21,5	-	74,3
Kül	0,5	0,3	1,4
Azotsuz bileşikler (niştasta dâhil)		86,1	81

Yaygın adı *sago palmiyeleri* olarak bilinen 2 tropikal tür *Metroxylon sagu* ve *Metroxylon rumphii* niştasta temelli hammadde olarak kullanılabilir [90]. İçerdiği niştasta oranı %20'dir. Güneydoğu Asya'da yaygın olarak bulunan bu iki türün kültüvasyonu ise en fazla Endonezya'da yapılmaktadır [91]. Bir hektar ekili araziden 15 ağaç gövdesi elde edilmekte, elde edilen her ağaçta ise 150 kg niştasta bulunmaktadır. Bir hektardan elde edilecek potansiyel alkol 1.350 L dir. Güney batı Etiyopya ve Kuzey Uganda'da ise niştasta temelli hammadde olarak yalancı muz ismiyle anılan *Musa esnete* yetiştirilmektedir.

2.2.2. Şekerli Hammadde Kaynakları

Şeker kamışı, şeker pancarı, beyaz süpürge (*Sweet sorghum*), melas ve çeşitli meyveler bu grupta sınıflandırılır. Dünya üzerindeki şeker üretiminin 2/3'ü şeker kamışından 1/3'ü ise şeker pancarından sağlanmaktadır [92]. Bu iki ürün coğrafik olarak farklı bölgelerde üretilmektedir. Şeker kamışı tropikal ve yarı-tropikal bölgelerde üretilirken, şeker pancarı ise yalnızca ılıman iklime sahip bölgelerde üretilmektedir.

Brezilya dünya genelinde %27'lik pay ile şeker kamışı üretimini en fazla yapan ülkedir. Brezilya, yıllık 495 milyar ton şeker kamışı üretimiyle bu sektörde dünyadaki en büyük üreticidir. Sektörde çalışan sayısının 0,8-1 milyon oluşu

istihdam sorununun çözümüne de yardımcı olmaktadır. Yıllık etanol üretim kapasitesi 13 milyar litredir [93]. Bu rakamın 2025 yılında 25 milyar litreye ulaşacağı tahmin edilmektedir [94]. Brezilya'nın güney bölgeleri üretimin %80'ini karşılamaktadır. Brezilya'yı %18'lik üretim ile Peru takip etmektedir. Bu iki ülke, hektar başına 32×10^3 kg kuru ağırlıkta şeker kamışı üretmektedir. Brezilya'da şeker kamışından biyoetanol üretimi oldukça ekonomiktir [95].

Şeker kamışı küspesi %19-24 lignin, %27-32 hemiselüloz, %32-44 selüloz ve %4,5-9 oranında ise kül maddeler içermektedir. Brezilya'da elde edilen yıllık şeker kamışı küspesi miktarı 186 milyon tondur. On milyon ton kuru biyokütleden 2 milyar litre etanol üretimi yapılabilmektedir [96]. Şeker kamışından elde edilen alkolik fermentasyonda özellikle mayalar tercih edilir. Mayalar hem hücre içine hem de hücre dışına invertaz enzimi salgılar. Bu enzim sukrozu daha sonra fermente olacak olan glukoz ve fruktoza parçalar.

Avrupa ülkelerinde ise en çok kullanılan sukroz içeren hammadde kaynağı pancar melasıdır [97]. Şeker pancarı ürünleri hemen hemen tüm Avrupa ülkelerinde bol miktarda yetiştirilmektedir. Şeker pancarının gelişim evresi kısa sürede tamamlanmaktadır. Yüksek ürün verimi, iklim toleransı, düşük su ve gübre gereksinimi gibi avantajları mevcuttur. Şeker kamışı ve şeker pancarı karşılaştırıldığında şeker pancarının su ve gübre ihtiyacı %35-40 daha azdır. Bir hektar şeker kamışından elde edilen monosakkarit miktarı, bir hektar şeker pancarından elde edilenden daha fazladır [98]. Fakat iyi yetiştirilen şeker kamışından şeker pancarının 3 katı daha fazla şeker elde edilebileceğine ilişkin çalışmalar ve uygulamalar sözkonusudur. Örneğin, Hollanda'da iyi bakılan bir şeker kamışı tarlasının 10^4 m²'sinden 5 ton şeker elde edilmiştir. Buna benzer diğer bir örnek ise Java'da 10^4 m²'lik alanda 18 ton şekerin eldesidir.

Beyaz süpürge (*Sweet sorghum*), kuraklığa karşı dirençlilik, aşırı tuzlu ve sulu çevrelere tolerans gibi önemli özelliklere sahiptir. Yüksek fotosentetik etkiye sahip bir C4 bitkisidir [99]. Sorgum tohumlarında temel olarak monosakkaritlerden glukoz ve fruktoz, disakkaritlerden sukroz ve maltoz, trisakkaritlerden rafinoz bulunmaktadır. Sorgum ise sapında bulunan şekerlere göre 2 tipe ayrılmaktadır: sakarin tip sorgum ve şurup tip sorgum [100]. Sakarin tip sorgumtemel olarak sukroz

içerir ve kristal şeker rafinerisinde kullanılırken; şurup tip sorgumglukoz içerir ve şurup üretiminde kullanılır. Sorgumsapı suyunda ise glukoz, fruktoz, maltoz ve ksiloza rastlanmakla birlikte mannoz, galaktoz ve arabinoza rastlanmamaktadır [101]. Sorghum, gelişmekte olan ülkelerde daha çok biyoetanol üretiminde tercih edilmeye başlamıştır.

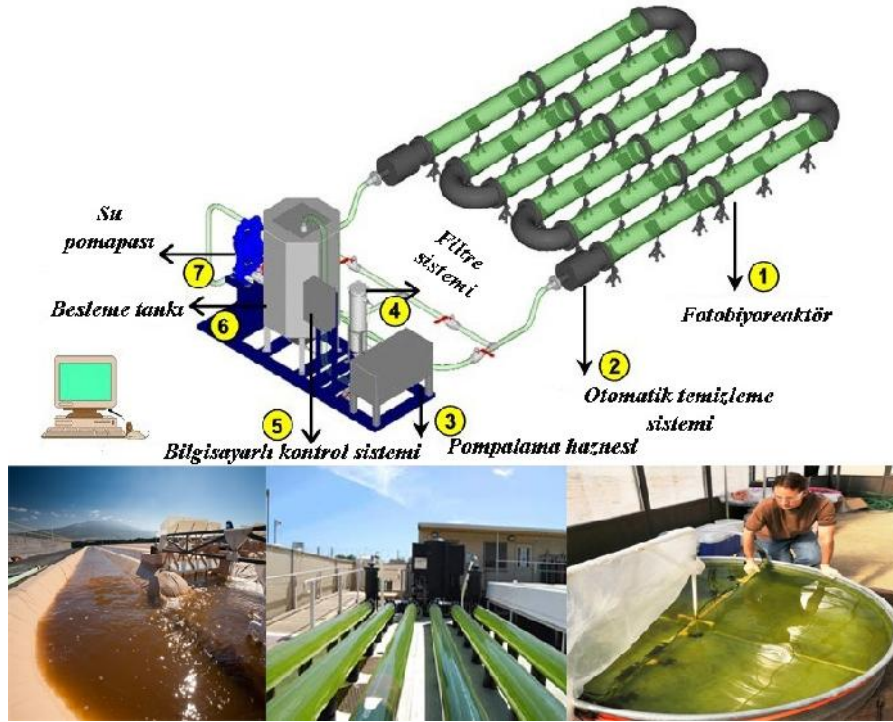
2.2.3. Mikroalgal Hammadde Kaynakları

Mikroalgler, toprak dışındaki her yerde gelişebilirler, ürün elde etme süreleri diğer hammadde kaynakları ile karşılaştırıldığında daha kısadır (yaklaşık 1-10 gün) ve yıl içerisinde çok sayıda ürün elde edilebilir. İçerdikleri karbonhidrat %10-25, yağ ise %15-77'dir (Çizelge 2.6). Bu özelliklerinden dolayı hammadde kaynağı olarak kullanılmaya çok elverişlidir. Buna ilaveten, mikroalgler büyüme için CO₂'ye ihtiyaç duyar ve atmosfere salınan gazların bazılarını ise absorblar [102]. Mikroalglerden etanol elde etme prosesi lignoselülozik hammaddenin dönüştürme prosesi ile benzerdir. Fakat mikroalgler lignin içermediğinden, proseteki ön-muamele; lignoselülozik hammaddelere uygulanan ön-muamele işlemine oranla daha basittir.

Mikroalgleri hammadde kaynağı olarak kullanmanın bazı avantajı mevcuttur. Bunlar; hızlı büyüme oranı, kısa ürün elde etme zamanı, CO₂ absorblama potansiyelidir. Bir ton alg büyötmek için gerekli CO₂ ihtiyacı 1,8 tondur.

Mikroalg üretim sistemleri genel olarak dış mekan ve iç mekan sistemleri olarak ikiye ayrılır. Dış mekan üretim sistemleri olarak doğal gölet, havuz ve tanklar kullanılırken; iç mekan sistemleri olarak küçük ölçekli torbalar, tübiler ve düz levha fotobiyoreaktörleri kullanılmaktadır [103]. Bazı tübüler fotobiyoreaktörlerin dış mekan sistemleri olarak kullanımı da söz konusu olabilmektedir (Şekil 2.7).

Mikroalg üretimi ile ilgili çalışmalar Türkiye'de de mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde evsel atık su arıtma tesisinden elde edilen arıtım deşarz suyu ile hem ham madde olarak kullanılmak üzere alg üretimi, hem de azot, fosfat giderimiyle deşarz suyunun verildiği alıcı ortamlarda ötrofikasyon olasılığının azalmasına çalışmaktadır.



Şekil 2. 7. Biyofotoreaktörler.

Çizelge 2. 6. Bazı mikroalg türlerinin içerdiği karbonhidrat oranları

Alg Türü	Karbonhidrat içeriği (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Spirogyra</i> sp.	33-64
<i>Dunaliella bioculata</i>	4
<i>Dunaliella salina</i>	32
<i>Euglena gracilis</i>	14-18
<i>Prymnesium parvum</i>	25-33
<i>Tetraselmis maculate</i>	15
<i>Porphyridium cruentum</i>	40-57
<i>Spirulina platensis</i>	8-14
<i>Spirulina maxima</i>	13-16
<i>Synechococcus</i> sp.	15
<i>Anabaena cylindrical</i>	25-30

2.2.4. Lignoselülozik Hammadde Kaynakları

Lignoselülozik materyaller etanol ve endüstriyel kimyasalların üretimi için kullanılabilen dünyanın en yaygın hammadde kaynağıdır. Yıllık kuru lignoselülozik biyokütle üretimi 1,4 milyar tondur. Elde edildikleri yer, içerik ve yapılarına göre kategorilendirilebilirler. Örneğin %35'i ormanlık alanlardan, %27'si otlak ve çayırılık alanlardan, %19'u tarımsal ürünlerden, kalanı ise kırsal, kentsel ve endüstriyel atıklardan elde edilmektedir (Çizelge 2.7).

Ormanlık alanlardan elde edilenleri odunlar, ağaç kabukları ve talaş oluşturmaktadır. İki tip odun bulunur: sert ve yumuşak odun [104]. Yumuşak odunlar gimnospermiler ve koniferlerden köken almışlardır. Sert odunların aksine, düşük yoğunlukludurlar ve hızlı büyürler. Çam, sedir, ladin, selvi, köknar, kızılçam gibi herdem yeşil türler gimnosperm ağaçlara örnek verilebilir. Sert odunlar angiospermilerden oluşur ve herdem yeşil değildirler. Sarı kavak, söğüt, meşe, titrek kavak, kanada kavağı gibi türler ise sert odunlara örnek olarak gösterilebilir. Kırsal atıklar ise mısır sapı ve yaprağı, pirinç ve buğday samanı, şeker kamışı küspesinden oluşur [105, 106, 107, 108] (Çizelge 2.8).

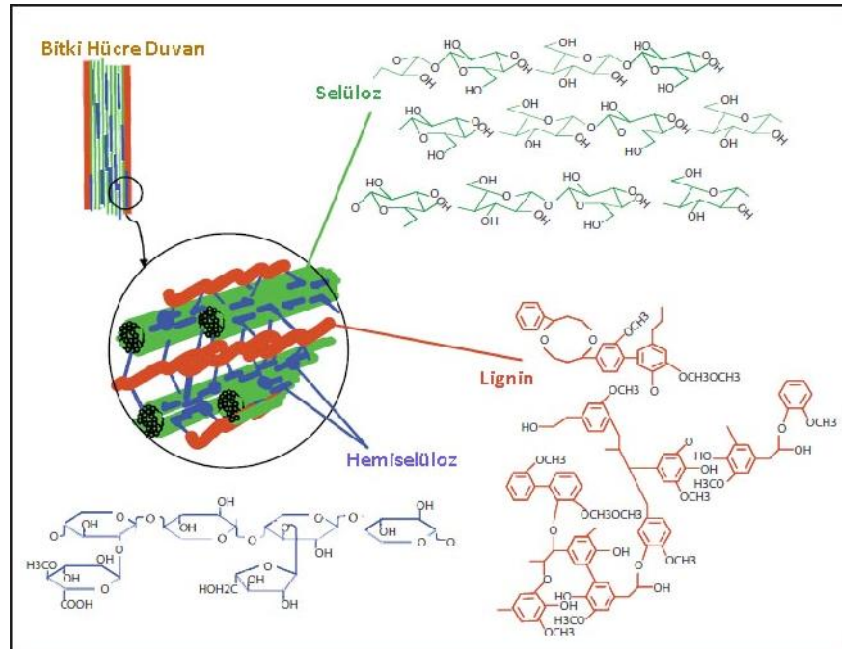
Çizelge 2.7. Lignoselülozik materyallerin elde edildiği kaynaklar ve geleneksel kullanım alanları

Lignoselülozik materyalin elde edildiği alanlar	Atığı	Geleneksel kullanım alanı
Buğday, pirinç, arpa, mısır üretimi	Saman, koçan, sap, kabuk	Hayvan yemi, yakma, kompostlama, gübreleme
Meyve ve sebze üretimi	Tohum, kabuk, tüm meyve yada suyu	Hayvan yada balık yemi, yağ ekstraktı
Şeker kamışı ve şekerli ürünlerin üretimi	Küspe	Yakma
Yağlar yada yağlı tohumlar	Pirina, atık su, lif, posa	Yakıt, hayvan yemi, gübre
Hayvansal atıklar	Proteinli atıklar, karbonhidratlı atıklar	Gübre
Ormansal ürünler ve kağıt sanayi atıkları	Odun, odun parçaları, yapraklar, talaşlar	Yakma, gübre
Toplumsal üretimler	Eski gazete kağıdı, mobilya parçaları, kartonlar	Yakma
Çim	Biçilmiş çim	Yakma

Lignoselülozik materyal kimyasal olarak 3 temel parçadan meydana gelir: selüloz (%30-50), hemiselüloz (15-35) ve lignin (%10-20) (Şekil 2. 8) Selüloz ve hemiselüloz tüm biyokütlenin %70'ini meydana getirirken, lignin kovalent ve hidrojenik bağlarla selüloz ve hemiselüloza bağlanarak yapıya sertlik ve direnç katar. Yumuşak odunlardaki lignin oranı diğer lignoselülozik kaynaklara göre oldukça fazladır [109].

Çizelge 2. 8. Farklı tarımsal kaynaklardan elde edilen lignoselülozik atık miktarları

Lignoselülozik atık	Ton x 10 ⁶ /yıl	Lignoselülozik atık	Ton x 10 ⁶ /yıl
Şeker kamışı küspesi	317-380	Sorgum samanı	15-18
Mısır samanı	159-191	Muz atığı	13-15
Pirinç kabuğu	157-188	Ayçiçeği samanı	7,5-9
Buğday samanı	154-185	Fasülye samanı	4,5-5,9
Soya samanı	54-65	Pirinç samanı	4,3-5,2
Yuka samanı	40-48	Çam atığı	3,8-4,6
Arpa samanı	35-42	Kahve samanı	1,6-1,9
Pamuk lifleri	17-20	Badem samanı	0,4-0,49
Fındık kabuğu	0,2-0,24		

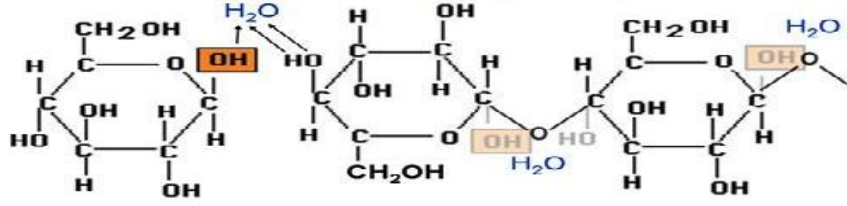


Şekil 2. 8. Lignoselülozik biyokütle bileşenleri.

Lignoselüloz içerisinde bulunan diğer maddeler (ekstraktifler) ise organik çözültüler ya da suda çözünebilen maddelerdir. Bunlar lignoselülozik maddenin çok küçük bir parçasını oluşturmaktadır (%1-5). Bu maddeler hem lipofilik hem de hidrofilik bileşenlerdir. Ekstraktif maddeler 4 büyük sınıfa ayrılır: terpenoidler ve steroidler, yağlar ve mumlar, fenolik bileşikler, inorganik bileşenler [110].

2.2.4.1. Selüloz

Bitkiler tarafından sentezlenen ve doğada en fazla bulunan karbonhidrattır [111]. Fotosentezle yıllık üretimi 10^{11} - 10^{12} ton'dur. Yılda 1×10^8 ton'u kağıt sanayinde kullanılmak üzere yaklaşık $1,5 \times 10^{12}$ ton selüloz ham fibriler materyal formunda tüketilmektedir [112]. Genel olarak 2 amaç için kullanılır. Birincisi odun üretimi ve kumaş yapımı gibi selülozik ürünlerin üretimi, ikincisi ise başlangıç materyali selüloz olan insan yaşamını kolaylaştırıcı, biyolojik olarak kolay parçalanan plastik benzerleri gibi araçların üretimidir. Bu maddeye selüloz ismi Payen tarafından 1838'de verilmiştir. Bitki hücre duvarının temel bileşeni olan selüloz bitkiler haricinde birkaç organizma tarafından da sentezlenebilmektedir. Ökaryotlardan bir deniz hayvanı olan tunikatlar ve su küfleri olan *Oomycetes*'ler, bazı protistler ve algler (*Valonia*) selüloz sentezleyebilir [113]. Bunun yanında, *Acetobacter* gibi bakteri türleri de selüloz üretebilmektedir. Selüloz doğada çoğunlukla tek başına bulunmaz, başka polimerlerle iç içedir [85]. Büyük olasılıkla evrimsel süreçte birkaç kez birbirinden bağımsız olarak ortaya çıkmıştır. Selülozun fonksiyonu mekaniktir ve doğada ya pamukta olduğu gibi saf halde ya da lignin ve hemiselülozla birlikte bulunmaktadır. Birincil yapısı β -glukopiranosid birimlerinin lineer biçimde β -1,4 glikozidik bağlanması ile meydana gelir (Şekil 2.9). Polimerizasyon derecesi oldukça yüksektir. Yapısında 15.000 birimin bulunduğu zincirlere dahi rastlanılmaktadır [114]. β anomer formundaki glukopiranoz birimleri polisakkarite sıkılık ve genişlik sağlamaktadır. Yapısındaki moleküllerarası hidrojen bağları selülozun levha benzeri doğasını oluşturmaktadır. Selülozlar glukan zincirlerinin yapısına göre 2'ye ayrılırlar: Glukan zincirleri paralel uzanırsa selüloz I, zincirler paralel olmazsa selüloz II olarak ifade edilir [115]. Selüloz zinciri içerisinde kaynağın türüne bağlı olarak değişik oranlarda kristalin ya da amorf bölgeler mevcuttur [116].



Şekil 2. 9. Selülozun yapısı.

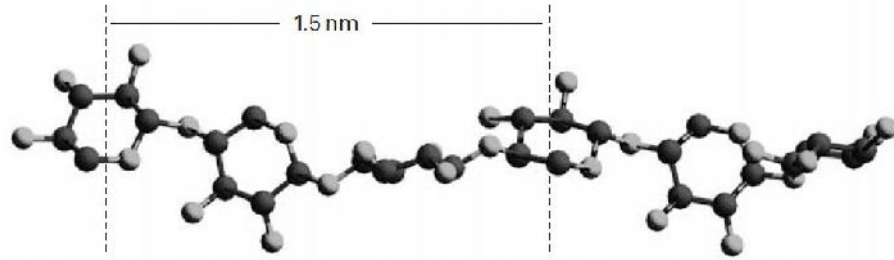
2.2.4.2. Hemiselüloz

Bazı hemiselülozlar homopolisakkarit yapıda olsa da genel olarak heteropolisakkarittirler. Hemiselüloz, heksoz ve pentozlardan meydana gelmektedir [117]. Heksoz olarak sıklıkla D-glukoz, D-galaktoz, D-mannoz bulunurken pentozlardan D-ksiloz ve L-arabinoz oldukça yaygındır. Bu iki temel bileşenin yanı sıra bazı hemiselülozlarda çok az miktarda L-ramnoz ve L-fukoz gibi deoksiheksozlar, 4-metil-D-glukuronik asit, D-galaktronik asit ve D-glukuronik asit gibi bazı uronik asitler bulunur [118]. Hemiselülozun kimyasal ve termal kararlılığı selüloza göre daha düşüktür.

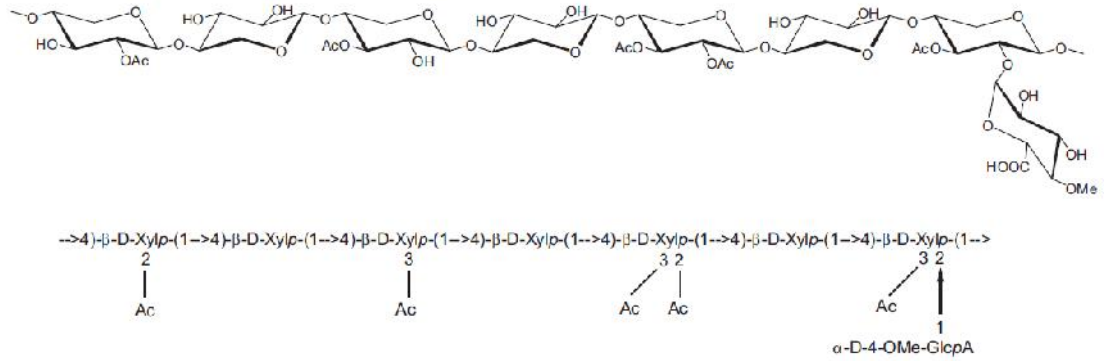
Hemiselüloza sert odunlar, yumuşak odunlar, otsu bitkiler, tahıllar ve tahıl atıklarında yoğun olarak rastlanmaktadır. Sert odunlar ve yumuşak odunlar arasındaki temel fark, hemiselülozun yapısal bileşenlerinin farkına dayanmaktadır. Sert odunlarda baskın hemiselüloz bileşeni asetilenmiş (4-O-metilglukrono) ksilan ve az miktarda glukomannandır. Yumuşak odunlarda bulunan baskın hemiselüloz bileşeni ise asetillenmiş glukomannandır [119]. Buna ilaveten bir miktar arabino (4-O-metil-glukurono) ksilan da bulunmaktadır. Yumuşak odunlardan karaçam hemiselülozunun baskın bileşeni arabinogalakttir. Özetle, bitkilerdeki hemiselüloz içeriği mevsime, dokuya, türe, sıcaklık, yetiştirildiği toprağın özellikleri gibi etmenlerin tümüne bağlıdır.

Hemiselülozun ana bileşenini oluşturan ksilanlar ise hemen hemen bitkinin tüm dokularında mevcuttur ve β -1,4-D-ksilopiranozil kalıntılarından oluşan bir iskelete sahiptir (Şekil 2.10). Bitki ksilanları tek bir şeker kalıntısı içeren kısa yan zincirlere sahiptir. Lineer yapıda bir polisakkarittir [120]. Odunlarda bulunan

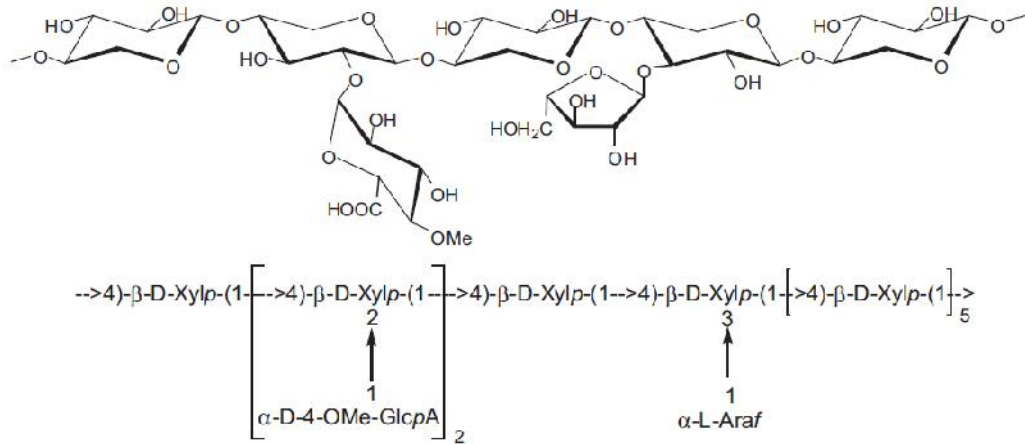
ksilanlar α -1,2 bağıyla ksilan zincirine bağlı 4-*O*-metil-D-glukuronik asit (MeGlcA) yan zincirler bulundurur [121] (Şekil 2.12). Yumuşak odunlarda MeGlcA içeriği sert odunlara göre fazla olduğu için daha asidiktirler. Ksilan zincirindeki uronik asit yan gruplarının dağılımı da sert odunlar ve yumuşak odunlarda farklılık gösterir. Sert odunların yan zincirlerinde asetil grupları bulunurken yumuşak odunlarda L-arabinoz mevcuttur. Farklı bitkilerden elde edilen ksilanların içerikleri ilgili bitkinin familyasının evrimsel süreciyle oldukça ilgilidir.



Şekil 2.10. Ksilanın atomik yapısı.



Şekil 2.11. Sertodunlarda bulunan glukronoksilan.



Şekil 2.12. Yumuşakodunlarda bulunan arabino-4-*O*-metilglukronoksilan

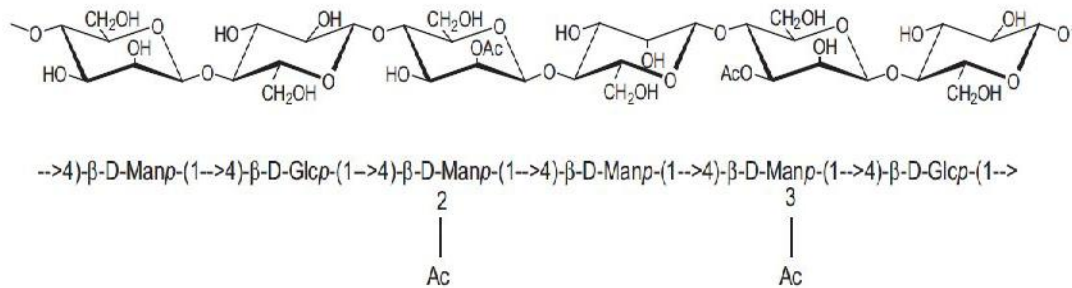
Ketenden elde edilen *O*-asetil-(4-*O*-metilglukurono) ksilan ile odunsu olmayan ksilanlar benzer yapıya sahiptir. Otlardaki ksilanlar yumuşak odunlardaki ksilana ek olarak arabinoz ve metilglukuronik asit yan grupları içerirler. Bununla birlikte arabinoz, galaktoz, ksiloz, esterleşmiş ferulik ve *p*-kumarik asit içeren kısa yan zincirlerde bulundurulabilirler [122].

Sert odunlarda en çok rastlanan hemiselüloz bileşeni glukuronoksilan olarak da adlandırılan *O*-asetil-(4-*O*-metilglukurono) ksilandır (Şekil 2.11) [123]. Ortalama her 8-20 ksilopiranozil kalıntısında bir MeGlcA yan grupları bulunur. Glukuronoksilanlar doğal koşullarda asetillenmiş olarak bulunurlar. Bu değerler odun türüne ve tipine göre değişse de ortalama molar kütleleri 6.600-40.000 ve ortalama polimerizasyon dereceleri 100-200 dür.

Yumuşak odunların %5-10 (w/w)'sinde arabinoglukuronoksilan bulunur. Her 5-6 ksiloz kalıntısında bir 4-*O*-metilglukuronik asit kalıntısı bulunur. MeGlcA'ya ilaveten ksilan zincirinin C3 pozisyonunda α -L-arabinofuranoz bulunmaktadır. Bir arabinoz her 8-9 ksiloz ünitesinde bir görülmektedir. Sert odunların aksine yumuşak odunlarda asetil grupları bulunmaz. Yumuşak odunlardaki ksilanların molar kütleleri biraz daha yüksektir. Sert odunlardaki ksilanın ise polimerizasyon derecesi daha fazladır [124]. Ksilanlar bazı koşullarda kristallenebilir. Fakat bitki hücre duvarında doğal halde iken kristalin yapı göstermez.

Bitkiler aleminde mannanlara oldukça sık rastlanılır. Yumuşak odunlar ve sertodunlardan 3 tip glukomannan izole edilmiştir. Glukomannanlar 1,4 bağlı lineer β -D-mannopiranozil ve β -D-glukopiranozil kalıntılarından meydana gelmektedir. Glukozil ve mannozil kalıntıları arasındaki oran 1:1 ve 1:4'tür. Yumuşak odunlardaki glukomannanların bazı mannozil kalıntıları α -1,6 bağlı tek galaktopiranozil kalıntıları içerir [125]. Doğal durumunda glukomannanlar mannozil kalıntıları üzerine asetillenir. *O*-asetil grupları düzensiz dağılmıştır. Yumuşak odunlarda glukomannanlar kabaca mannoza 1,6 bağlı 2 farklı α -D-galaktopiranozil birimleri içerir. Galaktozil birimleri daha az olan fraksiyonda bulunan galaktoz, glukoz, mannoz oranı 1:1:3-4'dür. Galaktoz birimleri daha azdır ve suda çözünürlüğü galaktomannanlardan daha düşüktür (Şekil 2.14). Yumuşak odunlardan elde edilen

glukomannanlar mannoz kalıntılarının 2. yada 3. pozisyonlarında *O*-asetil grupları bulundurur [126]. Sert odunlar %3-5 (w/kuru ağırlık) glukomannan içerir. Glukoz:mannoz oranı ilgili odunun türüne bağlı olarak 1:2 ve 1:1 olabilir. Sert odunlardan izole edilen doğal glukomannanların 2. yada 3. pozisyonlarındaki mannopiranozil kalıntıları *O*-asetillenmiştir (Şekil 2.13). Glukomannan için ortalama polimerizasyon derecesi 60-70'tir. Glukomannanların yan grupları çıkarıldığında kristalize olurlar.

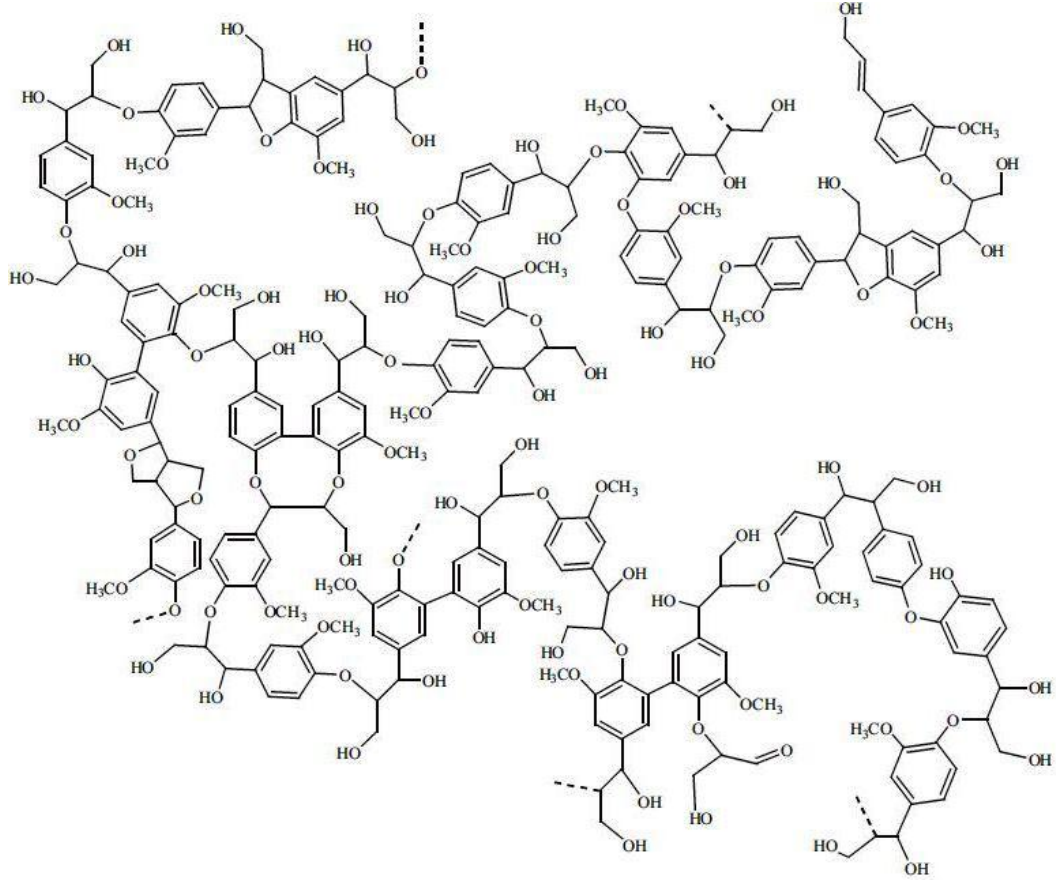


Şekil 2. 13. Glukomannanın yapısı.

Galaktanlar ve arabinogalaktanlar β -D-galaktopiranozil kalıntıları içerir. Orta lamel ve primer hücre duvarındaki pektik maddeleri ile hemiselülozların yapılarında bulunur. Nötral suda çözünebilir arabinogalaktanlar karaçamların kuru ağırlığının %10-25 oranında bulunurlarken diğer yumuşak odunlarda %1 oranındadır. Omurgası 1,3 bağlı β -D-galaktozil kalıntılarında meydana gelir ve yüksek derecede dallanma gösterir [126]. Çeşitli uzunluklarda 1,6- β -D galaktopiranoz birimleri yan zincir olarak bağlanır. Yaklaşık olarak 1/3'ü arabinoz birimlerinden 2/3'ü piranoz birimlerinden meydana gelir. İlâveten D-glukuronik asit yan grupları da bulunabilir. Galaktoz ve arabinoz birimlerinin oranı 3/10'dur. Arabinogalaktanlar moleküler ağırlıklarına göre iki bileşikten meydana gelir; arabinogalaktan A ve B. Arabinogalaktan B'nin molar kütlesi 11.000 iken arabinogalaktan A'nın 70.000'dir. Arabinogalaktan B'nin değredasyon ürününün arabinogalaktan A olduğu düşünölmektedir.

Ksiloglukan yüksek yapılı bitkilede primer hücre duvarı hemiselülozunun büyük bir parçasıdır. Hemen hemen primer hücre duvarı ağırlığının %20'sini oluşturur. Temel zincir selülozdaki gibi β -1,4-D- glukopiranozil kalıntılarından

Lignin monolignoller olarak adlandırılan 3 temel monomer olan *p*-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolün polimerizasyonundan meydana gelir [132]. Bu monomerler propilfenol türevleridir ve aromatik halkaya bağlı metoksi grupları farklıdır. İçerdikleri monolignollere göre lignin tipleri 3'e ayrılmaktadır: guaikil lignin (yumuşak odunlardaki lignin), şiringil-guaikil lignin (sert odunlardaki lignin) ve HGS-lignin (HGS: hidroksifenol, guaikil, şiringil; otsulardaki lignin).

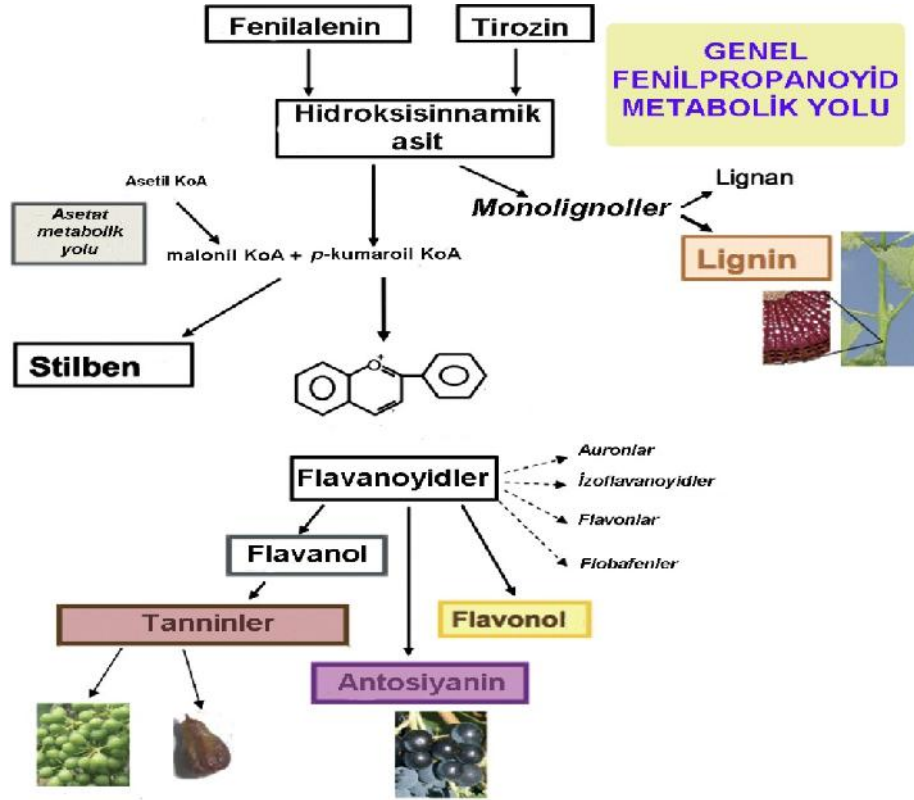


Şekil 2. 15. Ligninin yapısı.

Lignin sadece odunsu bitkilerde değil aynı zamanda damarlı bitkilerde, yabani otlar, eğreltiotları ve yenilebilir otlarda da mevcuttur. Bununla birlikte yapısında lignin bulunan tek hücreli algler ve yosunlar bilinmektedir [133].

Monolignoller lignan ve ligninin yapı taşları olmasının yanı sıra monolignol biyosentezinin bazı ara ürünleri hidroksinnamik asit ve sinapoil esterlerin öncül maddelerini meydana getirir. Monolignoller *p*-kumaroil-KoA'dan şikimat ve genel

fenilpropanoyid metabolik yoluyla sentezlenir [134, 135] (Şekil 2. 16). Monolignol biyosentezinin bir parçası olarak *p*-kumaroil-KoA iki tip modifikasyona maruz kalır. Birincisinde propan yan zincirleri üzerindeki karboksil grupları alkole indirgenirken içerdiği fenil halkalarının yapısı değiştirilir. En fazla bulunan monolignol koniferil alkol ve sinapil alkoldür (Şekil 2.17). *p*-Kumaril alkol ve 5-hidroksikoniferil alkol daha az, hatta bazı tür yada dokularda iz miktarda bulunur.



Şekil 2. 16. Genel fenilpropanoyid metabolik yolu.

Lignin polimerizasyonu bitki hücre duvarında meydana gelir ve monolignoller hücre duvarının sentezlendiği bölgeye taşınmalıdır. *Arabidopsis* ve bazı koniferlerde taşınma için monolignollerin glikozillendiği düşünülmektedir. Aynı zamanda, monolignoller glikozillenerek daha az toksik veya daha az inaktif hale dönüşürler. Glikolizasyon reaksiyonundan sorumlu enzim UDP-glukozil transferaz (UGT) dır. Enzim, sırasıyla koniferil alkol ve sinapil alkolden koniferin (koniferil alkol-4-*O*-glukozid) ve şiringin (sinapil-4-*O*-glukozid) meydana getirir. Bu

ve *p*-kumaril alkoller her biri yüksek derecede aktif rezonans yapıda fenoksi radikallerine dönüştürülür [137]. Oluşan bu radikaller rastgele eşleşerek suyun ilavesi ya da benzil karbonları üzerindeki primer alkol veya kuinon gruplarının ataklarıyla methid türevleri meydana getirir [138].

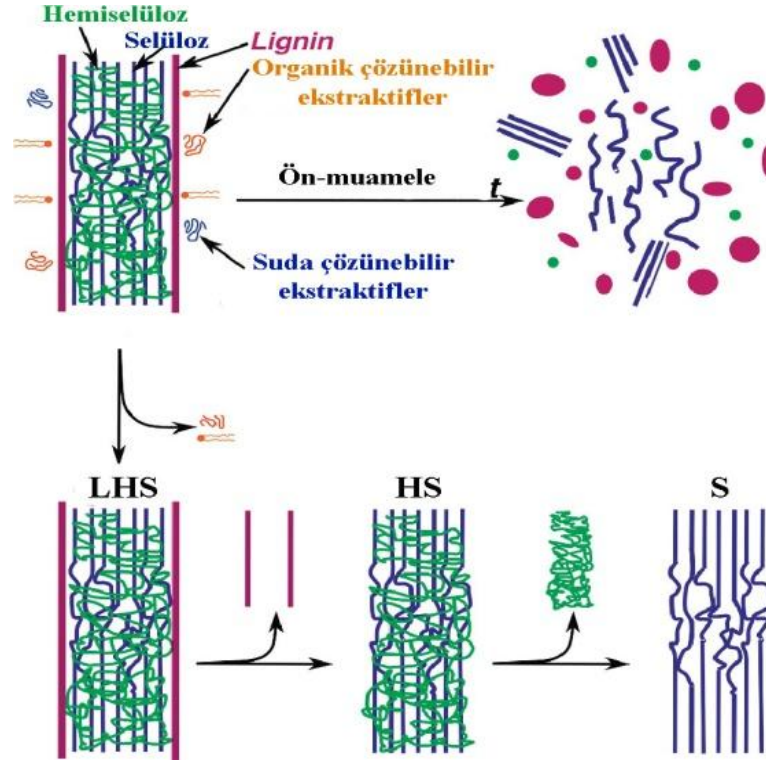
Dilignollerin peroksidazlarla dehidrojenasyonu daha sonra eşleşerek lignin polimerlerini oluşturacak olan radikalleri meydana getirir. Buna paralel olarak, hücre duvarı polisakkaritlerindeki şeker kalıntılarının hidroksil grupları tarafından gerçekleştirilen nükleofilik ataklarla lignin-hemiselüloz çapraz bağları meydana gelir. Her 40 fenilpropan birimi için bir bağ bulunur. Buna ilaveten, lignin hücre duvarı polisakkaritleriyle kovalent bağ da oluşturabilir.

2.3. ÖN-MUAMELE

Çeşitli organik asitler, fermentatif yakıtlar ya da ürünlerin üretimi için kullanılan biyokütle, sıcak hava ile kurutma, güneşte kurutma, vakumla kurutma gibi işlemlerden geçirilerek depolanmasından sonra ön-muamelesi tercih edilir [139]. Ön-muamele teknolojilerinin temel amacı, hidroliz işlemi için yapısal ve içeriksel engelleyicileri biyokütleden ayırmak ve böylece enzim hidroliz oranını ve selüloz ya da hemiselülozdan fermente edilebilir şeker oluşumu miktarını arttırmaktır. Bu metodlar bu amacı başarmak için bitki biyokütlesinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler gerçekleştirirler (Şekil 2. 18).

Ön-muamele işlemi sırasında dikkat edilmesi gerekenler şunlardır:

- biyokütlenin kullanılabilirliğini arttırmak,
- selülazların enzimatik hidroliz için selüloz yüzey alanına ulaşılabilirliğinin arttırılması,
- karbonhidrat kaybının en düşük seviyede tutulması,
- hidroliz ve fermantasyon işlemi sırasında mikroorganizmalara ya da enzimlere karşı inhibitör etki yaratan yan-ürünlerin oluşumundan kaçınmak,
- maliyeti düşürmektir [141, 142].



Şekil 2. 18. Ön-muamele işleminin lignoselülozik yapı üzerine etkisi [140].

Ön-muamele, elde edilen ürün miktarının artırılması için önemli bir basamaktır. Ortalama olarak proses maliyetinin %18'e yakını bu basamak için harcanmaktadır. Ön-muamele metodları ise fiziksel, kimyasal, biyolojik ve termo/fiziko kimyasal olarak 4 sınıfa katagorize edilebilir [143]. Tercihen, bu ön-muamele yöntemlerinden herhangi biri ya da birkaç tanesi beraberce kullanılabilir. Buna ek olarak, ön-muamele metodları asidik, bazik ve nötral ön-muameleler olarak da sınıflandırılabilir.

2.3.1. Fiziksel Ön-Muamele

Yaygın olarak fiziksel ön-muamele iki şekilde gerçekleştirilir. Birincisi çeşitli araçlar yardımıyla öğütme şeklinde mekanik olarak, diğeri ise pirolizis ile gerçekleşir. Ön-muamele adına yapılan ilk işlem genellikle parçacık küçültme ya da mekanik ezmedir (parçalama) [144]. Mekanik ezme, çeşitli şekillerde yapılan öğütme ve parçalama işlemi yardımıyla biyokütleyi ince bir toz haline dönüştürmedir.

Sonuçta oluşan parçalar kullanılan öğütme metoduna göre genellikle ya 10-30 mm ya da 0,2-2 mm arasında olmaktadır. Bu metod ulaşılabilen yüzey alanı oranını arttırmakta, polimerizasyonu azaltmakta, biyokütlenin parçalara ayrılmasını sağlamaktadır [145]. Piroliz daha çok biyokütleden ikincil yakıtların ve kimyasal ürünlerin üretiminde başvurulan bir yöntemdir ve nikel dolamit ve toprak alkali, toprak alkali ve geçiş metali tuzları katalizör olarak kullanılır [146]. Pirolizisde, materyaller 300 °C'den daha yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığında selüloz gaz şeklinde ürünler ve atık kömür oluşturmak için hızla parçalanır [147]. Şayet bu işlem düşük sıcaklıkta gerçekleştirilirse, parçalanma daha yavaş olur ve buharlaşabilen ürün miktarı azalır. Pirolizis uygulamasından sonra atıklar seyreltik asit ile hidrolize olurlarsa selülozun glukoza dönüşüm oranı %80-85 oranındadır [148]. Bu proses oksijen varlığında gerçekleştirilir. Eğer proses sırasında çinko klorit veya sodyum karbonat ilave edilirse, saf selülozun yıkımı daha düşük sıcaklıklarda da gerçekleştirilebilir [149]. Sıklıkla olmasa da fiziksel ön-muamele işlemlerinde kullanılan bir diğer metod da “sıkma” dır. Bu yöntemle inhibitörlerin karıştırılması amaçlanmaktadır. Metodun sonunda yıkama işlemiyle birlikte bu inhibitörlerin bir kısmı fermentasyondan önce süzülür. Bu yöntem daha çok lignoselülozik biyokütlelerde kullanışlıdır [150].

2.3.2. Kimyasal Ön-Muamele

Kimyasal metod, ön-muamele için kullanılan en yaygın metodlardandır. Proses maliyeti düşük ve etkili bir uygulama şeklidir. Alkali ve asidik metodlar olarak 2 sınıfa ayrılır. Ayrıca, ozon ile ön-muamele (ozonolizis) de bu başlıkta incelenebilir.

i. Ozonolizis: Ozon, suda çözünebilir ve hızla kullanılabilir güçlü bir oksidanttır. Ozonolizis son 10 yıldır lignin degradasyonu ve hemiselülozun yavaşça ayrışmasını sağlamak amaçlı, kağıt üretiminde beyazlatma ajanı olarak kullanılmıştır [151]. Bu prosesle ilgili temel avantaj hidroliz ve fermentasyon basamaklarında ara ürün oluşumunun çok az olması ve prosesin oda sıcaklıklarında gerçekleşebilmesidir [152]. Ozon ile ligninin parçalanma çalışmalarından birinde ise şu sonuçlar elde edilmiştir. α -Karbonil yapılar ozon karşısında benzil alkol yapılarına karşı daha

kararlıdır. Guaykil çekirdekler veratril asitlere göre ozon ile daha hızlı reaksiyona girerler. Bifenil ve fenilkumaranlar ozon ile hızlı reaksiyona girerler. Fakat, veratril çekirdeğin bifenil yapısı ozon karşısında daha kararlıdır [153].

ii. Alkali metotlar: Bu metotta, biyokütle sodyum hidroksit gibi bazik çözelti içerisinde ısıtılır [154]. Bu proses sırasında çözünme ve sabunlaşma reaksiyonları meydana gelir. Bu reaksiyonlar ise hemiselülozlar ve diğer bileşenler arasındaki çapraz bağların koparılmasını sağlar. Materyalin gözenekliliği artırılır ve böylece ulaşılabilen yüzey alanı genişletilmiş olur. Bu proses ile selülozun kristalinitesi ve polimerizasyon derecesi azaltılır. Bu yöntem daha çok yapısında lignin içeren hammaddeler için kullanılır [155].

Hidrojen peroksit ile ön-muamelede biyokütlenin dirençlilik sağlayan lignoselülozik yapısı açılarak enzimatik hidrolize uygun hale gelir [156].

Alkali ön-muamelelerin bir çeşiti ise kireç muamelesidir. Kireçle ön-muamele işleminin temeli, lignoselülozik biyokütleden önemli derecede karbonhidrat kaybı olmadan lignini ayrıştırmaktır [157]. Yani amaç, seçici olarak lignini azaltmaktır [158]. Bu ön-muamele yönteminde biyokütle kalsiyum hidroksit ve çeşitli sıcaklık ve basınçtaki suya maruz bırakılır. Genel olarak kireçle ön-muamele 3 şekilde yapılır: (a) kısa süreli ön-muamele (6 saat, 100-160 °C, oksijensiz, 200 psi basınç), (b) uzun süreli ön-muamele (8 hafta, 55-65 °C, havasız) ve (c) basit ön-muamele (biyokütle hava basıncı ya da oksijensiz ortamda bir saat kaynamış suyun içinde bekletme). Kireç ile ön-muamele işlemi diğer ön-muamele işlemleri ile karşılaştırılacak olursa; daha az şiddetli olması, selüloz ve hemiselüloz kaybını ciddi oranda azaltması, maliyetin az olması, güvenli ve başaçıkılabilir olması açısından önemlidir [159].

Bir başka alkali muamele metodu ise sulu amonyak (amonyum hidroksit) ile ön-muameledir. Biyokütle yapıları amonyak uygulamasının temel etkisi biyokütlenin delignifikasyonu, yani lignoselülozun fraksiyonlanmasıdır [160]. Biyokütlerdeki lignin içeriği istenilen seviyeye düşürülür. Ayrılan lignin daha sonra yakıtlara ve polimerlere ilave olarak, yapıştırıcı olarak ve asfalt yapımında kullanılmak amaçlı pazarlanabilir. Delignifikasyon ile biyokütlenin yapısı açılır,

enzimatik hidroliz için selüloz kullanılabilir hale getirilir. Bu uygulama, özellikle tarım atıkları ve otsu hammaddeler gibi düşük lignin içerikli substratlar açısından oldukça etkilidir. Amonyak temelli ön-muamele kendiliğinden sakkarifikasyon ve ko-fermantasyon için çok uygundur. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bu ön-muamele yönteminin diğer biyoetanol üretim prosesleriyle kullanılmasıyla mısır sapından %75 oranında biyoetanol elde edilmiştir. Sulu amonyak temelli ön-muamele işleminin 2 tipi mevcuttur: ARP (yüksek yoğunluk, düşük temas zamanı), SAA (düşük yoğunluk, yüksek muamele zamanı) [161, 162].

Sulu amonyak ön-muamelesi önemli derecede karbonhidrat kaybına neden olmaz. Sulu amonyak, diğer delignifikasyon yöntemlerine göre biyokütle içerisinde önemli morfolojik değişiklikler meydana getirmede uygun bir kimyasal etkinleştiricidir. Amonyakın oldukça uçucu oluşu, sıvı karışımlardan ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Buharlaştırma yoluyla elde edilen kullanılmış amonyak ise daha sonra tekrar tekrar kullanılabilir. Amonyak, pahalı değildir ve akut sağlık sorunlarına sebep olmaz. Genellikle endüstriyel bir kimyasal olarak kullanılır ve lignoselülozik biyokütle ile kullanıldığında herhangi bir zararlı yan-ürün oluşumuna sebep olduğu gözlenmemiştir.

iii. Asidik metotlar: Asit ile ön-muamele işleminde biyokütle, hem derişik hem de seyreltilmiş şekilde asit ile muamele edilebilir [163]. Derişik asit ile ön-muamele yönteminin avantajı prosesin düşük sıcaklıklarda gerçekleşebilmesidir. Bu durum prosesin maliyetini de düşürmektedir. Derişik asit ile muamele sonucunda ek bir enzimatik hidroliz basamağına gerek kalmayabilir. Fakat, sülfirik asit ve hidroklorik asit gibi derişik asitler genellikle toksik, zarar verici ve aşındırıcıdır. Aşındırıcı özelliğinden dolayı ilave ekipmanlara ihtiyaç duyulur. Bu ilave ekipmanlar ise prosesin maliyetini arttırmaktadır. Derişik asit, prosesten sonra iyileştirilerek kullanılabilir.

Yoğun inorganik asitler (sülfirik asit, hidroklorik asit, nitrik asit gibi) selülozu glukoza dönüştürebilirler [164]. Örneğin selüloz yoğun sülfirik asit ve fosforik asit ile muamele edildiğinde, kristalin yapısını kaybeder. Bu yöntemin uygulanmasında 3 adet sınırlayıcı etmen bulunmaktadır. Bunlar; asitle çözünür

şekerlerin ayrıştırılması, asitlerin tekrar kullanımı ve asitin yeniden yoğunlaştırılmasıdır.

Hemiselülozlarda bulunan şeker oranı %70-90 arasında değişmektedir. Özellikle mikroalglerde bulunan hemiselülozlardaki şekerlerin parçalanabilmesi için kullanılan en verimli metotlardan biri seyreltilmiş asit ile ön-muameledir. Asit derişimi genellikle %1-10 arasında olmaktadır. Isı miktarı ise ılımlı olup, genellikle 100-110 °C'dir. Asit ile ön-muamele diğer hidroliz tipleri ile kıyaslandığında birkaç avantaja sahiptir. Örneğin, hidroliz hızı daha fazladır ve glukozun parçalanmasına öncülük edebilir. Bununla birlikte, proses fermentasyon basamağında inhibitör etki yaratabilecek maddelerin ortaya çıkmasını da sağlayabilir. Yüksek sıcaklık ve yüksek asit derişimlerinde bu inhibitör maddelerin ortaya çıkma oranı artar. Asitlerle muamele yöntemlerinde bir diğer önemli nokta ise asitin nötralizasyonu ve fermentasyondan önce uzaklaştırılmasıdır [165].

Yapılan çalışmalar sonunda %81'lik fosforik asitin de ideal selüloz çözücülerinden olduğu bulunmuştur. Çünkü; fosforik asitle çözünme düşük sıcaklıkta meydana gelmekte, su bulunan ortamda selülozu çözebilmekte, muamele edilen selüloz hidroliz işlemi için uygun bir amorf yapı oluşturmakta, fosforik asit atığı ise hidroliz ve fermentasyon basamaklarında inhibitör etki yapmamaktadır. Muamele edilmiş selülozun yüksek derecede reaktif olduğu belirtilmiştir. Benzer sonuçlar iyonik sıvılarda da gözlemlenmiştir [166].

2.3.3. Termal/Fiziko-Kimyasal Ön-Muamele

Termokimyasal dönüşüm proseslerinin 2 temel prensibi mevcuttur. Birincisi, biyokütlenin gazlaştırılması ve hidrokarbona dönüşümünü sağlamaktır. İkincisi yüksek sıcaklık, yüksek basınç sıvılaştırması, ultra sıvılaştırma ya da süperkritik ekstraksiyon ile direkt olarak sıvılaştırmadır [167].

Fiziksel ve kimyasal metotların bir tür kombinasyonu ile oluşan metotlardır. Bu tür metotlardaki temel avantaj ise proste yoğun kimyasal kullanımının olmamasıdır [168]. Bu durum proste kullanılacak olan ekipman sayısında ve proses için yapılacak masrafta düşüşe neden olmaktadır. Ayrıca çevresel açıdan da etkili

metotlardır. Otohizroliz, buhar patlama, AFEX, karbondioksit patlaması metotları bu tip ön-muamele işlemlerinin en önemlilerine örnek oluşturmaktadır.

i. Otohizroliz: Otohizroliz prosesinde, biyokütle basınçlı su ile muamele edilir. Proses, seyreltik asit ile muamele metoduna benzer şekilde gerçekleştirilir. Hidronyum (H_3O) iyonu proses içerisinde katalist olarak kullanılır ve uygulama sıcaklığı ise $150-230\text{ }^{\circ}C$ arasında değişmektedir. Proses sırasında, seçici olarak hemiselülozlar hidrolize olur. Dönüşüm, %55-84 arasında sağlanır ve oluşan inhibitör madde ise çok azdır.

ii. Buhar patlama metodu: Bu metod ticari ürünlerin elde edilmesi için hemiselülozun hidrolizini gerçekleştirmek amacıyla uygulanmaktadır (Masonite prosesi). Odun parçaları geniş bir tanka taşınır ve herhangi bir kimyasal eklenmeksizin yüksek basınçlı buhar ile muamele edilir. Uygun bir zaman sonra, basıncın azaltılması için reaktör/tank hızlıca havalandırılır ve içeriği başka bir tanka konularak soğutulur. Buhar patlama yöntemi herhangi bir kimyasal kullanmadan lignoselülozik biyokütlenin yüksek-basınçlı buhar ile hızlı bir şekilde ısıtılmasına dayanmaktadır. Biyokütlenin yüksek basınçlı buhara maruz kalması selüloz, lignin ve hemiselülozun hidrolizini sağlar [169]. Hemiselülozun bu ön-muamele işlemi esnasında salınan asetik asit ve diğer bazı asitlerce hidrolize olduğu düşünülmektedir. Bu işlem biyokütle üzerinde dolaylı da olsa kimyasal bir etki içermektedir. Bu işlem sırasında lignoselülozik parçaların boyutlarındaki azalma ise dikkate değer bir oranda değildir. Proses sırasında H_2SO_4 (ya da SO_2) ya da CO_2 ilavesi, enzimatik hidrolizi etkili bir şekilde artırır, ket vurucu etki yaratan bileşiklerin oluşumunu azaltır ve hemiselülozun tamamen uzaklaştırılmasına olanak sağlar [170].

Buhar patlama ön-muamele yönteminin enerji gereksinimi mekanik ön-muamele yöntemiyle karşılaştırıldığında daha düşüktür. Geleneksel mekaniksel metodlar buhar patlama metoduyla karşılaştırıldığında %70 daha fazla enerji gereksinimine ihtiyaç duyar [171]. Buhar patlama yöntemi daha çok sert odunlar ve tarımsal atıklar üzerinde etkilidir. Yumuşak odunlar üzerindeki etkisi ise daha azdır [172]. Dezavantajları ise ksilan fraksiyonlarının yıkımının az olması, lignin-karbonhidrat matriksinin kısmi yıkımı, etanol prosesinde kullanılan mikroorganizmalara olumsuz etki eden ürünlerin oluşabilmesidir [173].

Proses sırasında mikrobiyal büyümeyi, enzimatik hidrolizi, fermentasyonu engelleyen ürünlerin oluşabilmesinden kaynaklı olarak ön-muamele yapılmış biyokütle su ile yıkanır. Böylece istenmeyen bileşikler su ile uzaklaştırılır. Su ile yıkamanın dez avantajı ise istenmeyen ürünlerle birlikte, suda çözünebilen hemiselüloz parçalarının da uzaklaşmasıdır. Tipik olarak kuru maddenin %20-25'i su ile yıkama sırasında kaybedilir [174]. Maksimum şeker kazanımı amacı ile bazı araştırmacılar buhar patlama metodunu iki adımlı şekilde önermektedirler. Buna göre, ilk adım düşük sıcaklıkta gerçekleştirilirken, ikinci adım ise 210 °C'den daha yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir [175]. Buna benzer şekilde daha değişik metotlar da buhar patlama metoduyla eşleştirilerek kullanılabilir. Alkalın peroksit uygulaması sonrası buhar patlama ön-muamele metodu, iyonik sıvılarla birlikte buhar patlama ön-muamele metodu, organik çözücü ekstraksiyonu ile birlikte buhar patlama ön-muamele metodu, buhar patlama metodu öncesi öğütme metodu, buhar patlama metodu sonrası taraklama metodları bunlara örnek olarak verilebilir.

iii. AFEX metodu: AFEX (Ammonia Fiber Explosion: Amonyak Lif Patlaması), lignoselülozik ultra ve makro yapıda fizikokimyasal değişiklik yaratır. AFEX, lignoselülozik materyalin yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı amonyağa maruz bırakılıp ardından basıncın hızlıca azaltıldığı fizikokimyasal ön-muamelelerin bir biçimidir. Proses yaklaşık olarak 1-2 kg amonyak/ kg kuru biyokütle, 90 °C sıcaklık ve 30 dk süre koşullarında yapılır [176]. AFEX uygulamasının temel avantajı proses sırasında kullanılan amonyağın geri dönüştürülebilir ve yeniden kullanılabilir olmasıdır. Diğer bir avantajı ise proses sonucunda hidroliz ve fermentasyon basamakları sırasında kullanılacak olan mikroorganizmaların gelişimine ket vurucu madde oluşmamasıdır [177]. AFEX ön-muamelesi lignoselülozik biyokütlerde enzimatik sindirimi artırır. AFEX ön-muamelesi selülozun dekristalizasyonu ile sonuçlanır, hemiselülozun depolimerizasyonu sağlanır. AFEX ile hemiselüloz üzerindeki asetil grupları çıkarılır ve lignin lignoselülozdan ayrıştırılır. AFEX, yapısal parçalanmadan dolayı lignoselülozik yüzeye erişimi kolaylaştırır. AFEX yönteminde, amonyak biyokütleye sulu ortamda nüfuz ettiği zaman reaksiyon sonucunda amonyum hidroksit oluşmaktadır. Bu hidroksil iyonları ise lignoselülozik materyal içerisinde birkaç termokimyasal reaksiyonu katalizlemektedir. AFEX ön-muamelesindeki anahtar değişkenler; uygulama zamanı, sıcaklık, amonyak/biyokütle

oranı ve nem içeriğidir. Bu değişkenlerin optimum kombinasyonu ise lignoselülozun dirençliliğine bağlı olarak değişmektedir. Herhangi bir biyokütle için optimum koşulları bulabilmenin yolu ise tüm değişkenleri farklı değerlerde denemekten geçmektedir. Her biyokütlenin lignin, hemiselüloz, selüloz içerikleri farklı olmasından kaynaklı olarak ön-muamele süresi ve amonyakda bekleme süresi farklıdır. Ön-muamele sırasında furanlar, fenolik bileşikler, organik asitler gibi biyolojik inhibitörler oluşabilir.

iv. Karbondioksit patlama: Bu yöntemde ise karbondioksit ile karboksilik asit oluşumu gerçekleştirilir ve lignoselülozik yapının parçalanabilirliği artırılır. Bir çok ön-muamele metodları ile karşılaştırıldığında çok zayıf kalmaktadır [178]. Aynı zamanda, diğer termo/fiziko kimyasal ön-muamele metodlarına oranla da daha fazla maliyet gerektirmektedir.

2.3.4. Biyolojik Ön-muamele Metodları

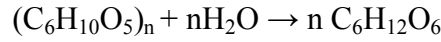
Organizma ile yapılan biyolojik ön-muamele herhangi bir kimyasal kullanılmadığı için oldukça çevre dostudur. Bu metodların ise endüstriyel uygulamaları çok azdır. Biyolojik ön-muamelenin avantajı düşük enerji gerektirmesi ve çevreye zararlı etki bırakmamasında yatmaktadır. Dezavantajı ise ön-muamele sonrası hidroliz oranının düşük olmasıdır.

Biyolojik ön-muamele işlemlerinde kahverengi, beyaz ve yumuşak çürükçül mantarlar gibi mikroorganizmalar lignin ve hemiselülozun parçalanması için kullanılabilir [179]. Kahverengi çürükçül funguslar selüloza etki ederken, beyaz çürükçüller hem selüloza hem de lignine etki etmektedir. Beyaz çürükçül mantarlardan en etkilisi ise Basidiomisetlerdir. Bunlar lignini tamamen mineralize edebilirler [180]. Değişik çalışmaların sonuçlarına göre *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida* 37 ve *Pycnoporus cinnabarinus* 115 gibi mikroorganizmaların samanı 4-5 haftada %30-50 oranında şekere parçalayabildiği ortaya çıkmıştır. Diğer bir çalışmada ise odun parçalarındaki ligninin daha fazla parçalanarak selüloz eldesini arttırmak için değişik mutant suşlar geliştirilmiştir. Bermuda çimeninin biyolojik parçalanması ise 6 haftada *Ceriporiopsis subvermispora* ile %29-32

oranında, *Cyathus stercoreus* ile ise %63-77 oranında gerçekleştirilmiştir [181]. Beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* karbon ve azotun olmadığı koşullarda sekonder metabolit olarak lignin degradasyon enzimi, lignin peroksidazlar ve manganaz bağımlı peroksidazlar üretirler [182,183]. Bu enzimler odunlarda hücre duvarının parçalanmasını sağlar. Bunların dışında polifenol oksidazlar, lakkazlar, hidrojen peroksit üretici enzimler gibi lignini parçalayabilen başka enzimler de vardır [184].

2.4. HİDROLİZ

Ön-muamele işlemi bittikten sonraki aşama hidrolizdir. Hidroliz, bir molekülün su ekleyerek parçalanması anlamına gelmektedir ve aşağıdaki formül ile ifade edilebilir.



Lignoselülozik materyal içerisindeki karbonhidrat polimerleri fermantasyon işleminden önce, hidroliz olarak adlandırılan bir prosesle basit şekerlere dönüştürülmelidir. Lignoselülozun hidrolizi için ise birkaç olası proses mevcuttur. Bu hidroliz metodlarını kimyasal hiroliz ve biyolojik hidroliz olarak ikiye ayırabiliriz. Reaksiyon sonunda lignin yan-ürün olarak kalırken selüloz ve hemiselüloz ise hidroliz ve fermantasyon prosesleri ile biyoetanole dönüştürülebilir. Yukarıdaki iki hidroliz yöntemine ilaveten, gama ya da elektron ışıma ve mikrodalga ışıma gibi başka hidroliz metodları da bulunmaktadır. Fakat bu proseslerin ticari açıdan uygulaması bulunmamaktadır. Selülozun tamamen hidrolizi glukoz eldesi ile sonuçlanırken, hemiselülozun hidrolizi ile pentoz ve heksoz şekerler elde edilir. Yumuşak odunlu materyallerdeki hemiselülozlar temel olarak mannoz içerirken, sert odunlularda ise baskın bileşen ksilozdur [186].

2.4.1. Kimyasal Hidroliz

Asitlerin selülozu parçalaması, derişime bağı olarak genellikle iki aşamada olur. İlk aşamada asitler, kolayca ulaşabildiği amorf bölgeleri parçalarlar ve uzaklaştırırlar. Amorf bölgesi uzaklaşan selüloz, hidroselüloz olarak isimlendirilir. Bu nedenle, bozulmadan kalan selülozun kristallik derecesi artar. Derişik asitlerin kullanılması ve reaksiyon süresinin uzatılması sonucu selüloz monomerik yapıtaşı olan glikoza dönüşebilir.

Asit ile hidroliz yöntemi ikiye ayrılır: derişik asit ile hidroliz ve seyreltik asit ile hidroliz. Hidroliz işlemi için genellikle seyreltik asit ile hidroliz yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, genellikle ya fermentasyonu destekleyen bir basamak olarak ya da direkt lignoselülozik materyalden şekerlerin eldesi için gerçekleştirilir. Derişik yada seyreltik asit ile ön-muamelenin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.9'da belirtilmiştir. Fakat enzimatik hidroliz ile karşılaştırıldığında seyreltik asit ile hidrolizin verimliliği daha düşüktür [187]. Asitler ile hidroliz kesikli bir prosestir. İstenmeyen yan-ürünlerin oluşumundan kaçınmak için ise genellikle iki basamaklı bir yöntem tercih edilir. Buna göre, ilk basamakta ılımlı koşullar uygulanırken, ikinci basamakta ağır koşullar uygulanır. Birinci basamakta düşük sıcaklıkta hemiselülozdan maksimum ürün elde edilirken, ikinci basamakta ise daha çok selülozun hidrolizi gerçekleştirilir [188].

Çizelge 2.9. Asit ile hidroliz metodlarının avantaj ve dezavantajları

Hidroliz Metodu	Avantajlar	Dezavantajlar
Derişik asitle hidroliz	İşlem düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir. Yüksek şeker ürünü elde edilir.	Asit tüketimi fazladır. Ekipmanlarda paslanma meydana gelebilir. Kullanılan asidi tekrar döngüye katmak için yüksek oranda enerji sarf edilir. Daha uzun bekleme süresi.
Seyreltik asit ile hidroliz	Düşük asit tüketimi. Kısa direnç zamanı	İşlem yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilir. Düşük şeker ürünü elde edilir. Ekipmanlarda paslanma meydana gelebilir.. İstenmeyen yan-ürünler oluşabilir.

Lignoselülozik materyalin asit ile hidrolizini etkileyen parametreler ise kullanılan substratın özelliği, sistemin asiditesi ve hidroliz sırasında ürünlerin ayrışma oranıdır. Kullanılan substratın özelliklerini; nötralizasyon kapasitesi, selüloz ve hemiselülozun kolay hidrolize olma özelliği, zor hidroliz edilen materyallerin oranı, makromoleküllerin uzunluğu, selülozun polimerizasyon derecesi, selüloz zincirlerinin konfigürasyonu ve selülozun lignin, pektin, hemiselüloz, proteinler, mineraller, elementler gibi bitki hücre duvarı içinde bulunan diğer koruyucu polimerik yapılarla ilişkisi belirler. Sistemin asiditesi kullanılan asit derişimi, asit çözeltisinin miktarı, hidroliz sırasında biyokütleden salınan asit miktarı, lignoselülozun nötralleşme kapasitesi, sıvı-katı oranı ve ısıtma sırasında çözeltinin hareketine bağlıdır [189]. Hidroliz sırasında ürünlerin parçalanma oranı ise sıcaklık, asidite, reaksiyon zamanı ve şeker derişimine bağlıdır.

Hidrolizatlar, içerisinde birçok inhibitör madde barındırırlar. Bu maddelerin oluşumu lignoselülozik materyalin tipine ve içeriğine, ön-muamele ve hidroliz yöntemlerine bağlıdır. Hemiselülozlardan elde edilen hidrolizatlarda ise sadece heksozlar yoktur. Aynı zamanda ksiloz gibi pentozlar da bulunurlar. Ksiloz sert odunlu hammaddelerde hemiselülozun baskın parçalanma ürünüdür. *S. cerevisiae* etanol üretimi için ticari olarak en çok kullanılan mikroorganizmadır. Fakat ksilozu fermente edemez [190].

Asetik asit ve levulinik asit ise hidrolizatlar içerisinde en bol bulunan karboksilik asitlerdir. Asetik asit, sadece hidroliz için değil aynı zamanda fermantasyon prosesi için de iyi bilinen bir yan-üründür. Bununla birlikte, proses sırasında asetik asitin 10 g/L oranında var oluşu doğal karşılanmaktadır. Genel olarak fermantasyon sırasında mayalardaki asetik asit tolerans oranı ise 5 g/L'dir [187]. Fenolik/aromatik bileşiklerin birçoğu seyreltik asit hidrolizatları arasında bulunmuştur [191]. Bunların hidroliz esnasında ligninin parçalanma ürünü olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, aromatik bileşiklerin şeker yıkımının bir sonucu olarak da oluşabileceği düşünülmektedir. Fenolik bileşikler arasından vanilin ve şiringaldezin en önemli inhibitör maddelerdendir. Fakat bunlar fermantasyon işlemi esnasında *S. cerevisiae* tarafından asimile edilebilirler. Yayınlanan bir rapora göre, fenolik/aromatik bileşiklerin miktarının litrede birkaç miligram olabileceği

söylenmiştir. Bu ise fenolik bileşiklerin suda çözünürlüğü ile ya da hidroliz prosesinde lignin parçalanmasının sınırlandırılmasıyla giderilebilir.

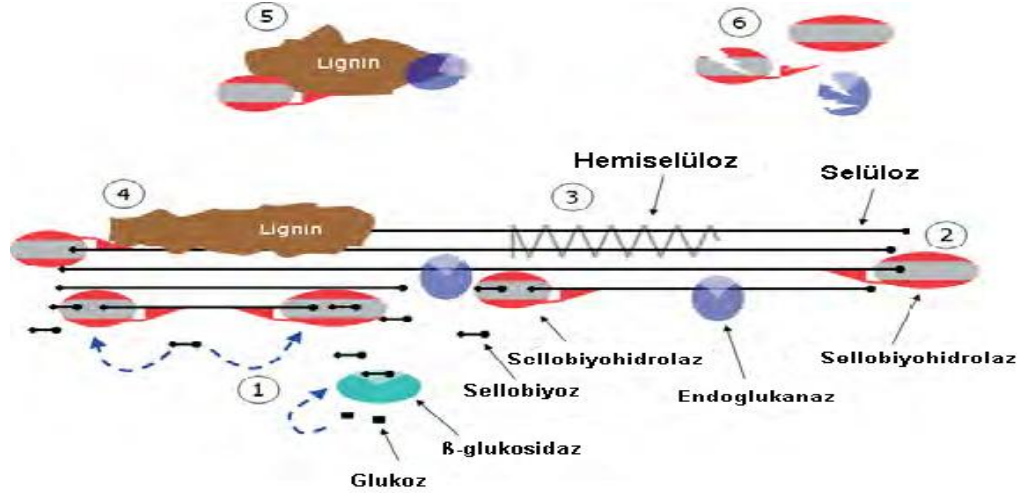
Bir diğer kimyasal hidroliz yöntemi de alkali hidrolizdir. Bu tür hidrolizde ön-muameleden geçmiş/geçmemiş biyokütle bazik maddelerle reaksiyona sokulur. Kullanılan kimyasal ise genellikle NaOH'tır.

2.4.2. Enzimatik Hidroliz

Lignoselüloz doğada bakteri ve funguslar tarafından parçalanır. Lignoselülozun degradasyonunda temel olarak selüloz, ksilanaz, peroksidaz ve lakkazlar rol oynarken β -ksilozidazlar, α -L-arabinofuranosidazlar, α -D-glukuronosidaz, asetil ksilan esteraz ve hidroksisinnamil asit esteraz gibi aksesuar enzimlerde rol almaktadırlar.

2.4.2.1 Selülozlar

Selülozun glukoza enzimatik olarak parçalanmasında 3 farklı sınıf enzimin sinerjistik etkisi rol oynamaktadır [192, 193, 194] (Şekil 2.19). Endo-1,4- β -glukanaz ya da 1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolazlar (E.C. 3.2.1.4) çözünür ya da çözünmez 1,4- β glukan substratlar üzerine etkilidir (β -1,4-glikozidik bağlara etki eder) [195]. Aktivitesi CMC (karboksimetilselüloz)'den salınan redükte gruplar yardımıyla tespit edilir. Ekzo-1,4- β -D-glukanazlar ise hem 1,4- β -D-glukanlardan 1,4- β -D-glukoza serbest bırakan 1,4- β -D-glukan glikohidrolazları (E.C.3.2.1.74) hem de 1,4- β -glukanlardan D-sellobiyoza koparan 1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolazları (E.C.3.2.1.91) içerir. 1,4- β -D glukan glikohidrolazlar aynı zamanda D-sellobiyozun yavaşça hidrolizini de katalizler. β -D-glukozid glikohidrolazlar (E.C. 3.2.1.21) glikozid dizileri, çözünür sellodekstrinler ve sellobiyozdan D-glukoz birimlerini koparır. β -glukosidaz ise sellobiyozu glukoza parçalar [195].



Şekil 2. 19. Selülazlar.

Günümüzde glikozil hidrolazlara (GH) ait 90 enzim ailesi belirlenmiştir. Sınıflandırma sistemi enzim mühendisliği çalışmaları için glikozil hidrolazların kullanımını kolaylaştırmaktadır. Selüloz degradasyonunda rol oynayan önemli GH aileleri 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 61 ve 74'tür. Bu selülitik enzimler protein sekans dizi algoritmalarının Hidrofobik Cluster Analizi ile gerçekleştirilmektedir. Selülozların bulunduğu GH aileleri oldukça farklı katlanmalara sahip üyeler içerir. Bu katlanma biçimleri TİM-fıçı, β/α -fıçı, β sandöviç ve α -heliks şeklinde olabilir [196].

Selülazlar genel olarak β -1,4-glikozidik bağları hidroliz eder. “Gerçek selülaz” olarak adlandırılan enzimler yalnızca çözünmeyen selüloz üzerine aktivite gösterirler. GH7 ve GH61 aileleri yalnızca funguslarda, GH44 ailesi yalnızca bakterilerde bulunur. GH7 (sellobiyohidrolaz) en aktif ekzoglukanaz olarak bilinmektedir ve tek selüloz zinciri üzerine aktivite göstermektedir. GH7 ve GH6 ailesi hem endo- hem de ekzo-glukanazları içermektedir. GH9, GH48 ve GH74 aileleri yalnızca bakterilerde gözlemlenen ekzoglukanazları da içermektedir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler selülitik enzimlerin tümü **selülozomlar** olarak adlandırılan çoklu-protein kompleksleri şeklinde bulunabilir. Selülozomlar selülazların substrat üzerinde birikmesi ve pozisyon alması ile meydana gelmektedir. Selülozomun fonksiyonel birimlerine **scaffoldin** denir.

Koenzimleri içeren, katalitik olmayan proteinlerdir. Koenzimler ise **dockerin** olarak adlandırılan diğer protein domainleriyle özgün bağlantı kurmaktadır. Selülozomal enzimler bir katalitik bir de bağlanma (dockerin) bölgesi içerir. Scaffoldinler karbonhidrat bağlayan modül bulundurur. İlk scaffoldin *Clostridium cellulovorans*'dan sekanslanmıştır. Bugün, birçok scaffoldin geni *Clostridium thermocellum*, *Clostridium josui*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Acidothermus cellulolyticus* ve *Ruminococcus flavefaciens*'ten izole edilmiş, sekanslanmış ve karakterize edilmiştir.

2.4.2.2. Endo-1,4-Ksilanaz

Temel olarak ksilan zincirindeki β -1,4 bağlarının kırılmasında rol oynar. Çoğu ksilanaz ekstraselülerdir ve Sec bağımlı metabolik yol ile üretilir. Fakat periplazmik olan ksilanalara da rastlanılmıştır. Bu tür ksilanazlar *Cellvibrio mixtus* gibi bakterilerde görülmektedir [197]. Ksilanaz enzimlerinin periplazmik olarak lokasyonu proteazlardan korunmak amaçlı olabilir. Bir başka ksilanaz ise *Paenibacillus barcinonensis*'te stoplazmik olarak tanımlanmıştır [198].

Ksilanazlarla ilişkili yapılan genetik çalışmalar ksilanaz enzimlerinin çoklu olarak ifade edildiği ve buradan yola çıkarak birbiriyle ilişkili gen bölgelerinin olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalara göre *Fibrobacter succinogenes*'ten 4, *Cellovibrio japonicus*'tan ise 6 ksilanaz geni izole edilmiştir.

Fizikokimyasal özelliklerine göre düşük moleküler ağırlıklı (≤ 30 kDa), bazik ve yüksek moleküler ağırlıklı, asidik olarak 2 gruba ayrılırlar. Yaygın olarak glikozid hidrolaz ailesinin 10. ve 11. ailesinde bulunurlar [199]. Farklı mikroorganizmalardan izole edilen enzimlerin optimum pH, sıcaklık ve tuzluluk istekleri farklıdır.

2.4.2.3. β -Ksilosidazlar

Ksilanların etkin şekilde degradasyonunda endo-1,4-ksilanazla birlikte β -ksilosidazlar da rol oynamaktadır [200]. β -ksilosidazlar (β -1,4-ksilosidaz, EC 3.2.1.37) ksilanazlar tarafından üretilen ya da ksilanların indirgenmemiş uçlarından

salınan ksilobiyoza ya da kısa ksilooligosakkaritlerin hidrolizini sağlar [201]. β -glikosidazların afinitesi oligosakkaritlerin polimerizasyon derecesinin artışını azaltır. Bu enzimler direkt olarak ksilanın hidrolizi için kullanılmaz fakat *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosid gibi yapay substratların hidrolizinde kullanılır [202]. Bu gibi substratlar β -ksilosidaz aktivitesinin rutin kolorimetrik analizinde kullanılır. Bu enzimler glikozid hidrolazların 3., 39., 43. ve 52. ailelerinde sınıflandırılır. Birçok β -ksilosidaz transksilosidaz aktivitesi de gösterir, başlangıç substratlarından yüksek moleküler ağırlıklı ürünler oluşturabilirler. Bu özellikten faydalanılarak özgül oligosakkaritlerin üretimi gerçekleştirilir. Bu enzimlerin çoğunun ekstraselüler olduğu düşünülmektedir.

2.4.2.4. α -L-arabinofuranosidaz

α -L-arabinofuranosidaz (E.C. 3.2.1.55) ekzo enzim olup, ksilan ve diğer arabinoz içeren polisakkaritlerin yan zincirlerinden arabinoz kalıntılarının kesilmesini katalizler [203]. Glikozid hidrolazlar arasında 43., 51., 54. ve 62. aileler içinde sınıflandırılırlar. Kolorimetrik tayini için substrat olarak *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosid kullanılır. Ksinolitik reaksiyon sonucu ortamda bulunan arabinozların aslında ksilanazdan değil α -L-arabinofuranosidazlardan kaynaklandığı nettir.

2.4.2.5. α -D-glukuronosidaz

α -D-glukuronosidaz (E.C. 3.2.1.131) glukuronoksilanda bulunan ksiloz kalıntıları ve 4-*O*-metil glukuronik asit arasındaki bağları koparır [204]. GH67 ailesi içerisinde sınıflandırılır. Bazıları yalnızca kısa ksilooligomerler ya da küçük model moleküller üzerine aktivite gösterirlerken diğerleri polimerik ksilandan glukuronik asitin salınımını sağlayabilir.

2.4.2.6. Mannanazlar

β -Mannanazlar glikozid hidrolazların 5. ve 26. ailelerinde sınıflandırılırlar. Yumuşak odunlardan elde edilen hemiselülozların degradasyonunda önemli rol

oyunlar. Mannan degrade eden enzimler β -mannanaz (1,4- β -D-mannan mannohidrolaz, E.C. 3.2.1.78), β -mannosidaz (1,4- β -D-mannopiranosid hidrolaz, E.C. 3.2.1.2) ve β -glukosidazdır (1,4- β -D-glukosid glikohidrolaz, E.C. 3.2.1.21). Mannan degradasyonuna yardımcı enzimler ise asetil manan esteraz (E.C. 3.1.1.6) ve α -glukosidaz (1,6- α -D-galaktosid galaktohidrolaz, E.C. 3.2.1.22) dir.

β -mannanaz endo enzimdir ve mannan omurgasındaki β -1,4 bağlarını koparır [205]. Doğada endo-1,4- β -mannanaz, galaktomannan ana zincirini parçalayarak oligosakkaritleri ve mannobiyozu meydana getirir [206]. Daha sonra ise 1,4- β -mannosidaz (E.C. 3.2.1.25) aktivitesi ile mannoz serbest kalır. β -mannosidaz ise ekso tip enzimdir ve mannosidler arasındaki β -1,4 bağlarını kopararak mannan ya da manno oligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarından mannozun serbest kalışını katalizler. β -glukosidaz ise ekso tip enzimdir ve glukomannan ve galaktoglukomannandan β -mannanaz aktivitesi sonucu salınan oligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarında 1,4- β -D-glukopiranoz hidrolizi yapar. α -Galaktosidaz, galaktomannan ve galaktoglukomannanların α -1,6 bağlı D-galaktopiranosil yan zincirlerinin hidrolizini katalizler. Asetil mannan esterazlar galaktoglukomannanlardan asetil gruplarının serbest kalmasını sağlar [207].

2.4.2.7. Ferulik asit esterazlar (Feruloil esterazlar)

Ferulik asit esterazlar (FAE, E.C. 3.1.1.73) karboksilik ester hidrolazların alt grubudur ve ksilan ya da pektinlerin temel zinciri içindeki polisakkaritlerle monomerik ve dimerik ferulik asit arasındaki ester bağlarını koparır. Feruloil esterazlar fenolik şeker esterlerinin enzimatik sentezi için kilit moleküldür. Ferulik asit ester bağları arabinoksilanlar ile lignin arasında kurulan temel köprüdür. Ferulik asit ve arabinoz arasındaki bağları kopardığı için hemiselülozların ligninden ayrıştırılmasını sağlamak suretiyle bitki hücre duvarı degradasyonunda dolaylı rol oynar [208]. FAE'ler hem tek katalitik modüle sahip proteinler olarak hem de çok modüllü protein yapılarının bir parçası olarak bulunurlar.

2.4.2.8. Lakkazlar

Lakkazlar (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.2) ekstraselüler, çoklu bakır enzimleridir [209]. Çeşitli aromatik ya da aromatik olmayan bileşikler moleküler oksijen kullanılarak radikal katalizleyen reaksiyon mekanizması ile okside edilir. Reaksiyon sırasında moleküler oksijen suya indirgenir [210]. Lakkaz terimi, Japon vernik ağacı *Rhus vernicifera*'dan köken almaktadır. Lakkazlar bitki, böcek ve bakteriler tarafından sentezlenebilse de funguslarda daha yaygın üretilmektedir [211]. Şimdiye kadar yaklaşık 60 fungal türde lakkaz aktivitesi analiz edilmiştir.

Moleküler oksijenin 4 elektronunun suya redüksiyonu ile redükte substratın 1 elektronunun oksidasyonunu katalizler [212]. *O*- ve *p*-difenoller, aminofenoller, metoksifenoller, benzenetioller, polifenoller, poliaminler, hidroksiindoller, bazı aril daiminler ve başka bileşikler lakkazlar tarafından dönüştürülebilir [213]. Fakat tirozini okside edemezler [214]. Bilinen tüm lakkazlar askorbik asit ve fenolik substratların oksidasyonunu katalizler [215]. Kateşol ve hidrokuinon gibi basit difenoller oksidasyon için uygun substratlardır fakat guaikol ve 2,6 dimetoksifenol çok daha iyi okside edilir. Bununla birlikte; lakkazlar substrat olarak *p*-fenilenediamin, şiringaldezini [SGZ: N, N'-bis(3,5-dimetoksi-4-hidroksibenzilidin hidrozin; ϵ_{525} : $65000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de okside edebilirler [216, 217]. Lakkazlar 4 bakır atomu içerir ve bu bakır atomları T1, T2 ve T3 olarak adlandırılan 3 redoks bölgesinde bulunur. Bu bölgeler spektroskopik ve paramagnetik özelliklere göre belirlenmiştir. Azid, halid, siyanid, tiyosiyanid, florid, hidroksid, yağ asitleri, bazı metal iyonları, sülfidril ajanları, hidroksiglisin, kojik asit ve katyonik amonyum deterjanları tarafından inhibe edilebilirler.

2.4.2.9. Yüksek redoks potansiyelli peroksidazlar

Daha çok bazidiyomisetler tarafından salınan yüksek redoks potansiyelli peroksidazlar lignin degradasyonunda merkezi rol oynar [218]. Enzimatik yıkım olarak adlandırılan bu proseste lignini meydana getiren aromatik birimler, hidrojen peroksitin salınımıyla mangan (MnP) peroksidaz, lignin peroksidaz (LiP) gibi

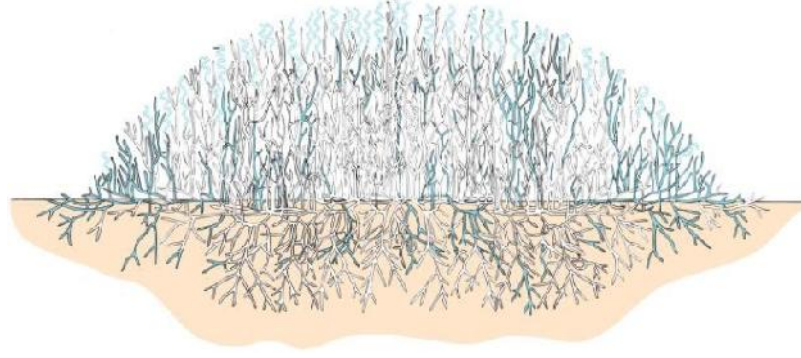
peroksidazlar tarafından okside edilir [219]. Lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz 1983-84'te *Phanerochaete chrysosporium*'dan izole edilmiştir ve dimerik lignin model bileşiklerini okside edebildikleri için bu enzimlere genel olarak ligninaz denilmiştir.

2.5. AKTİNOBAKTERİLER

2.5.1. Aktinobakterilerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Aktinobakteri isminin kökenleri “lumpy jaw” (aktinomikosis) olarak adlandırılan hastalığa sebep olan bir mikrobun gözlemlendiği 1877'lere kadar uzanmaktadır. Bu mikrop kemiklerde çoğalarak dokuya zarar vermektedir. Sonuç olarak, bu mikrobun yayılması sonucu yüzün yan tarafında şişme ve iltihap meydana gelmekte, hayvanın gıda tüketebilmesini engellemektedir. Carl Otto Harz (1842-1906) hastalık etmeni olan bu mikrobu incelemiş ve infektif dokunun merkezinde ince filamentlerin bulunduğunu, dışta ise konidiya olarak adlandırılan yuvarlak ya da oval yapıları tespit etmiştir. Konidiyaların bazı mantarlarda üreme biçimi olmasından ve filamentlerin fungal hiflere benzemesinden dolayı, bu mikroba ineklerde bulunan ışınsal (ipliksi) fungus anlamında *Actinomyces bovis* denilmiştir [220].

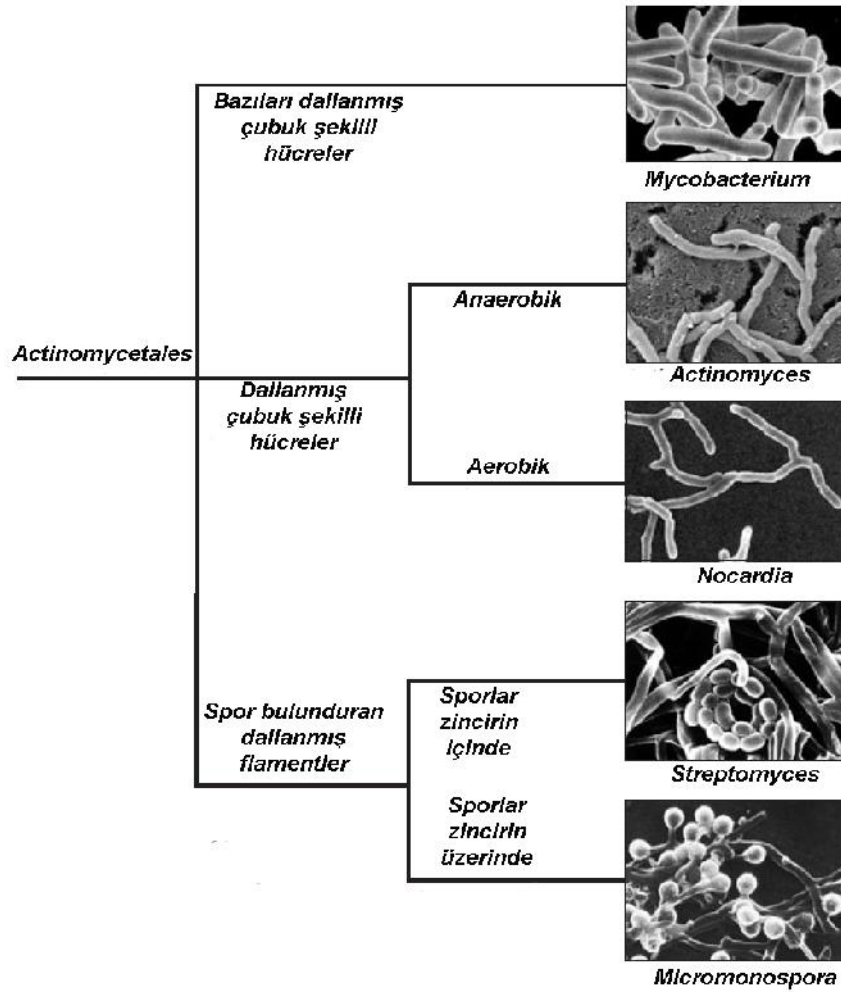
Aktinobakteriler mantar benzeri filamentli bakterilerdir [221]. Gram pozitiflerdir [211, 222]. İpliğimsi ya da yuvarlak şekilli dallanmalar gösterirler ve hif olarak adlandırılan bu yapılar miselyumları meydana getirir (Şekil 2. 20). Hifler genellikle septasızdır fakat üreme gibi bazı koşullarda gözlemlenebilir. Vejetatif büyüme sırasında havasal ve substrat hifleri gelişir. Üremeleri sporlanma ile gerçekleşir. Aktinobakteriler; prokaryot olmaları, filament uzunluklarının 1 µm'yi geçmemesi, hücre duvarında kitin ve glukan gibi maya ve küflerde bulunan polimerlerin olmayışı, anti-fungal ilaçlardan etkilenmemesi, anaerobik formlarının bulunabilmesi gibi nedenlerden dolayı bakteri olarak sınıflandırılmaktadır [220].



Şekil 2. 20. Aktinobakterilerin agar üzerindeki görünümü[223].

Orlo-Jensen tarafından 1909'da Actinomycetes familyasının 4 cins içerdiği, bunların *Mycomonas*, *Corynemonas*, *Actinomyces* ve *Rhizomonas* olduğu tezi ortaya atılmıştır. 1918'de Buchanan tarafından Actinomycetales ordosuna ait tek familyanın Actinomycetaceae olduğunu, *Actinobacillus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces* ve *Nocardia* cinslerini içerdiği tespit edilmiştir. S.A.B Bergeys ve arkadaşlarının oluşturduğu komite tarafından Actinomycetales 2 familyaya ayrılmıştır. Bunlardan birincisi Actinomycetaceae'dır ve *Actinobacillus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, *Erysipelothrix*, *Mycobacterium* ve başka 8 cins bu gruba aittir. Lehmann ve Neumann ise Actinomyces Ordosunu 2 familyaya ayırdı. Protoactinomycetaceae olarak adlandırılan familyada *Corynebacterium* ve *Mycobacterium* cinslerine; Actinomycetaceae familyasında ise sadece *Actinomyces*'e yer verilmiştir. 1932'de ise Kluyver ve Van Niel *Mycobacterium* cinsinin Actinomycetales'ten çıkarılarak Mycobacteriaceae familyası olarak başka bir ordoda sınıflandırılması gerektiğini belirtilmiştir. Krainsky 1914'te aktinobakterileri koloni boyutlarına göre *Macroactinomyces* ve *Microactinomyces* olarak 2 gruba ayırmıştır. Pinory (1913), Chalmes ve Christophersen (1916) oksijen kullanımına göre bir ayırım yaparak anaerobik formları *Cohnistreptothrix*, aerobik formları *Nocardia* olarak belirledi. Benzer bir sistem 1922'de Langeron tarafından önerilerek aerobik formlar Euactinomyces olarak sınıflandırıldı. Wollenweber tarafından 1921'de havasal miselyum oluşturanlar *Aerothrix*, oluşturmayanlar *Pionnothrix* olarak sınıflandırılmıştır. Liqnieres 1924'de 3 cins önermiştir. Aerobik ve flamentsiz miselyumlu *Actinomyces*, anaerobik ve segmentli filamentli *Brevistreotothrix*,

miselyum oluşturmeyen yuvarlak hücrelere sahip *Actinobacillus*. Qrskov 1923'te Actinomycetes'i 3 cinse ayırmıştır; septasız miselyumlara sahip ve sporlanabilen *Cohnistreptothrix*, havasal miselyumlu ve sporlanma gözlemlenemeyen *Actinomyces*, dalların sonunda tek bir spor bulunduran *Micromonospora*. Jensen 1931'de bu görüşü modifiye ederek 3 genusu aynı bıraktı. Fakat birinci genus *Actinomyces*, ikinci genusu ise *Proactinomyces* olarak belirlendi. Krossilnikov 1938'de Buchanan'ın Actinomycetales ordosunu 2 familyaya ayırdı. Actinomycetaceae'da *Actinomyces*, *Proactinomyces*, *Mycobacterium* ve *Mycococcus* iken Micromonosporaceae familyasında ise tek bir genus *Micromonospora* kabul edildi. Waksman and Henrici 1943'te tekrar sınıflandırma yaparak Actinobakterileri oksijen ihtiyaçları, spor yapıları ve dallanma şekilleri gibi faktörlere göre ayırmıştır (Şekil 2. 21)



Şekil 2. 21. Aktinobakterilerin belirgin karakterlerine göre Waksman and Henrici tarafından sınıflandırılması. [224].

Streptomyces sp.

Streptomyces üyeleri toprakta bolca bulunarak sporlanabilen havasal lifleri olan, bir kısmı çifte-arjinin taşıma sistemi ile oldukça fazla protein salgılayan bakteri grubudur. Toprakta en çok bulunan aktinobakteri grubu bunlardır [225]. Üremeleri havasal miselyumlardaki sporlarla sağlanmaktadır. Hayat evreleri spor, miselyum, spor şeklindedir. LL-diaminopimelik asit (LL-A₂ pm) içeren peptidoglikan hücre duvarına sahiptir [226]. Birçok türü büyük oranda doymuş, izo ve anti izo yağ asitleri bulundurur. Fakat mikolik asit içermez. GC oranı %70-80'dir [227]. Modern *Streptomyces*'lerin en son ortak atasının 440 milyon yıl önce yeşil bitkilerin yaygın olduğu topraklarda yaşadığı düşünülmektedir.

Birçok *Streptomyces* pigmentli sporlara sahiptir ve renkleri o organizmanın taksonomik yerini belirlemede kullanılır [228].

Karasal habitatlarda organik materyallerin parçalanması açısından oldukça önemli bakterilerdir. Çünkü ksilanaz, selüloz, ligninaz ve kitinaz gibi enzimler üretebilir [219]. Saprofitik oldukları için bazı köklerde, köklü sebzelerde gözle görülebilir tabakalar meydana getirebilirler. Bitki patojeni olanlarda, virülanslık bitkilerdeki selüloz sentezinin inhibisyonu üzerinedir.

Streptomyces'lerin salgıladıkları primer metabolitlerin yanı sıra sekonder metabolitler tarihsel olarak oldukça önemlidir [229]. Terapötik olarak kullanılan streptomisin 1945'te Waksman tarafından *Streptomyces*'lerden izole edilmiştir. *Streptomyces*'ler antibiyotiklere ek olarak fungusit, sitostatikler, immün cevap düzenleyicileri, bitki büyüme etkileyicileri sentezleyebilmektedir [219, 230]. Şimdiye kadar *Streptomyces*'lerin 7.000 farklı metabolit salgıladıkları tespit edilmiştir. Genlerinin 20-30 tanesi sekonder metabolizma ile bunların %30'u da antibiyotik üretimi ile ilgilidir.

Birkaç miligram substrat miselyumu, milyonlarca spor oluşturabilir. Antibiyotiklerin ve diğer sekonder metabolitlerin bol miktarlarda üretimi bu prosesle ilişkilidir. Ticari antibiyotik üretimi için kullanılan ilk *Streptomyces* türü *Streptomyces griseus* iken laboratuvar çalışmalarında en çok kullanılan türü ise

Streptomyces coelicolor A3(2)'dir. Endüstriyel öneme sahip diğer türü ise *S. avermitilis*'tir.

Yapılan çalışmalarda *S. coelicolor* genomunun tahmini olarak 60 tanesi proteaz, 13'ü kitinaz/kitosanaz, 8'i selüloz/endoglukanaz, 3'ü amilaz ve 2'si pektat liyaz olmak üzere 819 protein salgıladığı bilinmektedir. *Streptomyces* genomu 3 farklı tip genel protein salgı sistemi kodlar:

i. Sec metabolik yolağı: Bu yolak prokaryotlardaki protein salgı yolları ile analogdur. Temel rota içinde proteinler stoplazmik membranı boydan boya geçer. *S. coelicolor* genomunda Sec bileşenleri olarak SecY, SecE, SecD, SecF proteinleri bulunur. *S. lividans*'tan izole edilen SecA proteininin ise α -amilazın salgılanmasında rol aldığı düşünülmektedir.

ii. Esx ya da tip-7 salgı sistemi: Gram pozitiflere özgü olan Esx ya da tip-7 salgı sistemi ilk olarak *Mycobacterium tuberculosis*'te keşfedilmiştir. Salgilama sırasında 2 ekstraselüler proteine ihtiyaç duyar; ESAT-6 ve CFP-10. *Staphylococcus aureus*'ta da benzer proteinlerin olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin *Streptomyces* 'lerdeki fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte *Mycobacterium* ve *Staphylococcus* 'larda bulunan bu sistemin virulansı ile ilişkili olabileceği yorumu yapılmıştır. Fakat bu proteinlerin patojen olmayanlarda da bulunması, bu teori için soru işaretleri oluşturmaktadır.

iii. Tat metabolik yolağı: Bu sistemde stoplazmadan geçiş sırasında proteinlere redoks aktif kofaktörler bağlanır. Fakat bu durum *Streptomyces* türlerinde söz konusu olmayabilir. Tat sistemi hidrolitik enzimlerin salgılanmasında önemli rol oynadığı gibi farklı besinlerin farklı kaynaklardan alınması sırasında da aktiftir. Örneğin fosfat kazanımı sırasında birkaç fosfataz enziminin salgılanmasını sağlar. *S. lividans* tarafından üretilen ksilanazlar Tat sisteminden salgılanır [231, 232].

Selüloz degradasyon ürünleri olan sellobiyoz ve sellotriozun hücre içine alınması sellobiyoz-bağlayan lipoprotein (CebE) ve 2 integral membran proteini (CebF ve CebG) içeren ABC taşıma sistemi ile gerçekleştirilir. CebE sellobiyoz ile

büyüme sırasında özgül olarak sentezlenir ve düzenleyici protein CebR tarafından kontrol edilir.

2.6. ÇALIŞMANIN AMACI

Günümüzde fosil yakıt kaynaklarındaki azalma sonucunda lignoselülozik biyokütlenin yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülmesi konusunda dünya genelinde önemli bir yöneliş gözlenmektedir. Ülkemizde ise bu konudaki araştırmalar henüz istenilen seviyede değildir. Bu tez çalışmasının temel amacı, tarım ve orman atıklarının endüstriyel ölçekte, biyolojik metodlarla organik asitler ve biyoetanol gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesinde kullanılabilirliğini sağlayan uygun metotların araştırılmasıdır. Bu amaçla lignoselülozik materyallerin enzimatik hidroliz verimliliklerini artırmaya yönelik ön-muamele yöntemlerinin araştırılarak, bu yöntemlerin optimizasyonunun sağlanmasının yanı sıra, lignoselülozu etkin bir şekilde hidrolize edebilen mikrobiyal suşların izolasyonları da gerçekleştirilecektir. Hidroliz verimi yüksek olan izolatlar ise ön-muameleden geçirilen lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizi için enzim kaynağı olarak kullanılacaktır. Hidroliz sonucunda elde edilecek şeker şurupları ise etanol ve organik asit üretimi amacıyla fermentasyonda kullanılacaktır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Kimyasallar ve Proteinler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar aksi belirtilmediği sürece Sigma (Sigma Chemical Co., Louis, USA), Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ve Alfa Easer (A Johnson Matthey Company, Ward Hill, USA) firmalarından mevcut olan en yüksek saflık derecesinde temin edilmiştir.

3.1.2 Cam Malzemeler

Kullanılan bütün cam malzemeler deterjanla yıkandıktan sonra, önce şehir şebeke suyu ile sonra distile su ile durulanmıştır. Besiyeri içeren erlenler ve mikropipet tipleri otoklavda 121°C’de 0,124 MPa basınç altında 15 dk süre ile steril edilmiştir. Petri kapları ise besiyeri dökülmeden önce Pasteur fırınında 200°C’de 2 saat süre ile steril edilmiştir.

3.1.3. İnkübatörler

Streptomyces sp. NT508 suşunun kültürünün yapılması amacıyla kullanılan katı ortamların inkübasyonu, Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) bir inkübatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmanın ekstraselüler enzim üretimleri için kullanılan sıvı kültür ortamlarının inkübasyonunda ise J.P. Selecta marka Rotabit model (J.P. Selecta, Barcelona, İspanya) orbital çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.4. Otoklav

Besiyerleri içeren erlenlerin buhar basıncı temelli sterilizasyonu için J.P. Selecta marka Presoclave II 80 model otoklav kullanılmıştır. Besiyerleri cihaz içinde 121 °C, 15 psi (1,02 kg/cm³) basınçta 15 dakika tutulur.

3.1.5. Santrifüjer

Streptomyces sp. AOA40 suşunun kültür sıvısından hücrelerin ayrılarak süpernatantın (döküntü) elde edilmesinde ve enzim analizleri sırasındaki santrifüjleme işlemlerinde Eppendorf marka 5804 model (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) ve Hettich marka Universal 32R model (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Almanya) soğutmasız, Sigma marka -30 K model soğutmalı santrifüjler kullanılmıştır. Eppendorf marka santrifüj F45-30-11 katalog kodlu mikro tüp rotor ile, Sigma marka santrifüj 1271 (15 mL'liktüpler için) ve 19776 (50 mL'lik tüpler için) tip rotor ile kullanılmıştır.

3.1.6. Ultrafiltrasyon Ekipmanları

Ultrafiltrasyon üniteleri olarak Amicon marka 8010 (10 mL) ve 8200 (200 mL) model (Millipore Corporation, Bedford, ABD) sistemler kullanılmıştır. 200 mL hacme sahip olan hücre, rutin olarak fermentasyon sıvısının deriştirilmesinde kullanılırken; 10 mL hacme sahip olan ünite daha çok deriştirilmiş küçük hacimli örneğe ihtiyaç duyulduğunda kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon üniteleri ile birlikte kullanılan 10 kDa moleküler kütle seçiciliğindeki Diaflo PM10 membranlar da Amicon'dan sağlanmıştır. Amicon hazneleri ile yürütülen deriştirme süreçlerinin tümü azot basıncı altında ve 4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

3.1.7. UV/Visible Spektrofotometre

Enzimatik aktivitelerin belirlenmesi sırasında, dalga boyu taramaları ve absorbans değerlerinin elde edilmesi için Perkin Elmer marka Lambda EZ 210 serisi bir UV/Visible spektrofotometre (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, ABD) kullanılmıştır.

3.1.8 pH Ölçer

Hazırlanan besiyerlerinin, tamponların ve çözeltilerin pH'sı Hanna marka HI 2210 model (Hanna Instruments, Washington, ABD) pH ölçerle hesaplanmıştır.

3.1.9. Işık ve Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM)

Çalışmada kullanılan Aktinobakteri izolatının spor yapısının gözlemlenebilmesi için Zeiss marka Supra 55 model Taramalı Elektron Mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) kullanılmıştır. Örneğin görüntülenmesi sırasında yüksek vakum sputter platin kaplama cihazı ve Emitech marka K850 model kritik nokta kurutucusu (Emitech, Chenggong, Taiwan) kullanılmıştır. Kullanılan kritik nokta kurutucusunun basınç vanası 32 x 42 mm çaplıdır.

3.1.10. Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy- AFM)

Ön-muamele ve enzimatik hidrolize uğramış lignoselülozik materyalin yüzey taraması için Park System marka XE-100E model AFM kullanılmıştır.

3.1.11. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

Tez hazırlanırken metin düzenleyicisi olarak Word (v12, Microsoft Corporation, Washington, ABD), kimyasal formül düzenleyicisi olarak da ISIS Draw (v2.5, Symyx Technologies, California, ABD) yazılımları kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında elde edilen verilerin grafiklere dönüştürülmesi için ise Excel (v12, Microsoft Corporation, Washington, ABD) ve SigmaPlot (v11, Systat Software, Illinois, ABD) yazılımlarından yararlanılmıştır.

Çalışma sırasında kullanılan bazı görüntülerdeki düzenlemeler Photoshop CS3 (CS3, Adobe, California, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.12. Kullanılan Besiyerleri

Otoklavlanmadan önce tüm besiyerlerinin pH'sı NaOH ve HCl kullanılarak 7-7,5'e ayarlanmıştır.

i. Nişasta-Kazein Agar

Nişasta 10 g, kazein 0,3 g, KNO₃ 2 g, NaCl 2 g, MgSO₄. 7H₂O 0,05 g, CaCO₃ 0,02 g, FeSO₄. 7H₂O 0,01 g, K₂HPO₄(%20'lik stok solüsyon) 10 mL, Agar 12 g, Distile su 1000 mL, Sikloheksimit 50 µg/mL.

ii. Gause's No:1 Besiyeri

Nişasta 20 g, KNO₃ 1 g, NaCl 0,5 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄. 7H₂O 0,5 g, FeSO₄. 7H₂O 0,01 g, Distile su 1000 mL.

iii. ISP-4 Besiyeri

Nişasta 10g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄. 7H₂O 1 g, NaCl 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, CaCO₃ 3 g, Agar 20 g, Distile su 10000 mL.

İz element solüsyonu; FeSO₄. 0,1 g, MnCl₂.4H₂O 0,1 g, ZnSO₄. 7H₂O 0,1 g, distile su 100 mL.

iv. ISP-2 Besiyeri

Maya özütü 4 g, malt özütü 10 g, glukoz 4 g, agar 10 g, distile su 1000mL.

v. CMC Agar

Karboksi metil selülaz 10 g, pepton 5 g, maya özütü 5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄. 7H₂O 0,2 g, NaCl 1 g, agar 15 g, distile su 1000 mL.

vi. Ksilanaz tarama besiyeri

Oat spelt ksilan 10 g, pepton 5 g, maya özütü 5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄. 7H₂O 0,2 g, NaCl 1 g, agar 15 g, distile su 1000 mL.

vii. MS-YEM Besiyeri

Karbon kaynağı 0-12, maya özütü 6 g, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g, NaCl 0,3 g, MgSO₄. 7H₂O 0,1 g, CaCO₃ 0,02 g, iz element solüsyonu 1mL, distile su 1000mL.

İz element solüsyonu; FeSO₄. 1 g, MnCl₂.4H₂O 0,9 g, ZnSO₄. 7H₂O 0,2 g, distile su 1000 mL.

İnokulasyondan sonra kültürler 30 °C'de, amaca uygun olarak 48-96 saat süre ile, 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilmişlerdir.

viii. Nutrient Agar Besiyeri

Pepton (from meat) 5 g, et özütü 3 g, agar 12 g, 1000 mL distile su.

ix. Plate Count Agar

pepton (from casein) 5 g, maya özütü 2,5 g, glukoz 1 g, agar 14 g, distile su 1000 mL.

x. Glukoz Asparajin Agar

K₂HPO₄ 0,5 g, asparajin 0,5 g, agar 15 g, glukoz 10 g distile su 1000 mL.

xi. Gliserol Asparajin Agar (ISP-5)

Asparajin 1 g, K₂HPO₄ 1g, iz element solüsyonu 1 mL, gliserol 10 g, agar 20 g, distile su 1000 mL.

xii. Yeast- Starch Agar

Maya özütü 4 g, nişasta 15 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄. 7H₂O 0,5 g, agar 15 g, distile su 1000 mL.

3.2. METOD

3.2.1. Örneklerin Alınması Ve Hazırlanması

Çalışma sırasında kullanılan aktinobakterilerin izolasyonu için toprak örnekleri Mersin'in Kale, Tarsus, Evcı, Çiftlikköy, Kuyuluk, Davultepe bölgelerinden alınmıştır (Şekil 3.1).

Örnekler, tespit edilen bölgelerdeki organik maddece zengin, hayvan gübresince yoğun, lignoselülozik atığın bol bulunduğu topraklar, kompost, aktif çamur ve küflü yemlerden alınmıştır. Tespit edilen nokta steril bir spatula ile yüzeyden 5 cm derinliğe kadar kazılarak her bir noktadan 100 g'dan fazla toprak örneği alınmıştır. Alınan topraklara 1/10 - 1/100 – 1/1 (w/w) oranında CaCO₃ eklenerek 1 hafta bekletilmiştir. Bekletilen örnekler 45 dk boyunca 50 °C' ye ayarlı etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra, aseptik koşullarda fizyolojik tuzu su içinde homojenize edilmiş, steril tüplerde 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ seyreltmeleri hazırlanmıştır. Tüplerden alınan 100 µl örnek Nişasta-Kazein Agar, Gause's No:1, ISP-4 besiyerine yayılmış ve petriler 30 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.2).

3.2.2. Selülaaz, Ksilanaz, Lakkaz Aktivitesinin Katı Besiyerinde Tespiti

Selülaaz ve ksilanaz aktivitesinin tespiti için CMC Agar ve ksilanaz tarama besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar bu besiyerlerine nokta ekim yapıldıktan sonra petriler 30 °C’de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petriler 10 dk %0,1’lik Kongo Red çözeltisi ile boyanmıştır. Boyama sonrasında besiyeri yüzeyi 1M NaCl ile yıkanmıştır. Kırmızıya boyanan besiyeri üzerinde nokta ekim yapılan yerlerde gelişen kolonilerin etrafında açık renkli bir zon oluşuyorsa bu izolatların potansiyel selülaaz ve ksilanaz üreticisi olduğu düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak iki enzim için çapı en büyük olan zonları meydana getiren izolatlar çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir. Lakkaz aktivitesinin tespiti için ise MS-YEM besiyeri modifiye edilmiştir. Besiyeri içeriğindeki glukoz yerine karbon kaynağı olarak RBBR, Tannik asit ve Guaikol kullanılmıştır. Besiyerine nokta ekim yapılmış 7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonundaki açık renkli zonlar gözlemlenmiştir.

3.2.3. İnokulum Hazırlanışı

İzole edilen aktinobakterilerin spor ve/veya hif fragmentlerinin 10 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içerisinde, aseptik koşullar altında süspansiyonları hazırlanmış ve bu süspansiyon inokulum olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu örnek süspansiyonu her bir erlene, erlendeki besiyeri hacminin %2’sine denk gelen hacim kadar ilave edilmiştir. İnokulum sıvısından katı besiyerlerine de ekimler yapılarak, inokulumdaki kob hesaplanmıştır. Buna göre, kullanılan inokulumların mikrobiyal yükü ortalama $1,5 \times 10^5$ kob mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

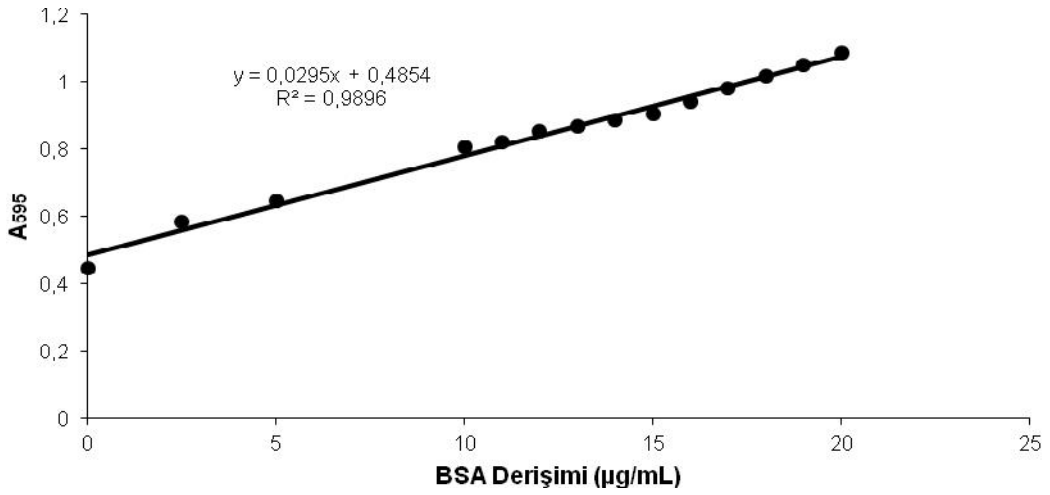
3.2.4. Ekstraselüler Toplam Protein Miktarının Tayini

Enzimatik analizler için kullanılacak preperatların toplam protein derişimlerinin belirlenmesi Bradford protein analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.3).

Bradford stok solüsyonu için 100 mL %95 etanol, 200 mL %88’lik fosforik asit, 350 mg Coomassive Blue G-150 ile çözelti hazırlanır. Bradford çalışma solüsyonu için 425 mL suya 15 mL %95’lik etanol, 30 mL %88 fosforik asit, 30 mL

bradford stok solüsyonu konularak solüsyon Whatman No 1 filtre kağıdından geçirilir.

Ekstraselüler sıvıdaki toplam protein miktarının tayini için önce miktarı bilinen bovin serum albumin (BSA) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir. Kalibrasyon eğrisi için; 100 µL standart, 100 µL tampon (pH 7,2 fosfat tamponu), 1 mL Bradford çalışma solüsyonu karıştırılarak vortekslenir. 2 dk sonra reaksiyon karışımının 595 nm dalga boyundaki absorbansı okunur. Kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra aynı reaksiyon karışımında 100 µL standart yerine 100 µL örnek ilave edilerek ölçüm yapılır ve protein miktarı grafikteki formüle göre hesaplanır.



Şekil 3.3. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın farklı derişimlerinin Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğrisi.

3.2.5. Enzimatik Analizler

3.2.5.1. Endoglukanaz analizi

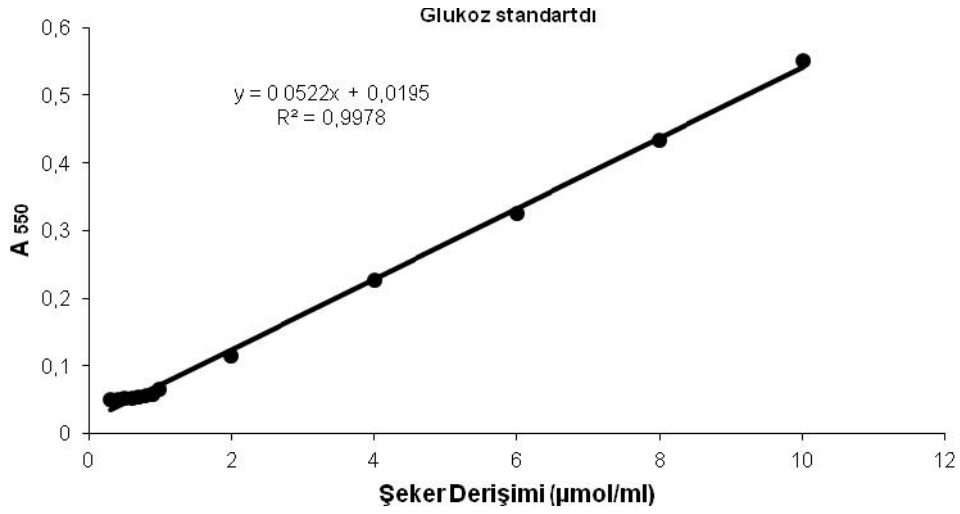
Endoglukanaz enzim aktivitesi CMC'den indirgenen şekerlerin miktarının tespit edilmesi ile belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin tespiti için reaksiyon karışımı içinde miktarı bilinen şekerlerin bulunmasıyla bir glukoz standartı oluşturulmuştur (Şekil 3.4). Ölçüm için önce tüp içindeki 200µL standart üzerine 400 µL DNS çözeltisi ilave edilerek 100 °C'de 5 dk kaynatılır. Soğuk su banyosuna alınarak (çeşme suyu altında) soğutulan örnek üzerine 1 mL distile su ilave edilir. 550nm'deki absorbansına bakılır (DNS metodu). Standart hazırlanırken stok solüsyon olarak 0,018 g glukoz 10 mL distile su (1 mol) içinde çözündürülmüştür (Çizelge 3.1.).

Bir ünite (U) endoglukanaz aktivitesi analiz koşulları altında mililitre başına 1 dakikada 1 μmol (1 L’de 1 mmol) indirgenmiş şeker salınmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Glukoz standardı oluşturulduktan sonra analizi yapılacak örnek santrifüjlenir. Daha sonra standart yerine 100 μL %1’lik substrat ve 100 μL süpernatant konularak 5 dk bekletilerek reaksiyona devam ettirilir. Enzimsiz ve enzimli yapılan ölçümler sonucunda çıkan sonuçlar glukoz standardında karşılaştırılarak enzim aktivitesi hesaplanır. DNS solüsyonu 4,5 g 3,5-dinitrosalisilik asit, 90,9 g sodyum potasyum tartarat, 7,3 g sodyum hidroksitin 1 litre suda çözünmesi ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Glukoz standartı hazırlanışı

mmol	mol	Litredeki miktarı (g)	10 mL’deki miktarı (g)	Stoktan alınan miktar (μL)	Eklenen su miktarı (μL)
0,1	0,0001	0,018	0,00018	100	9900
0,2	0,0002	0,036	0,00036	200	9800
0,4	0,0004	0,072	0,00072	400	9600
0,8	0,0008	0,144	0,00144	800	9200
1	0,001	0,18	0,0018	1000	9000
2	0,002	0,36	0,0036	2000	8000
4	0,004	0,72	0,0072	4000	6000
8	0,008	1,44	0,0144	8000	2000
10	0,01	1,8	0,018	10000	0000



Şekil 3.4. D-glukozun farklı derişimlerinin analizi sonucu elde edilen indirgenmiş şeker standardı.

3.2.5.2. Endoksilanaz analizi

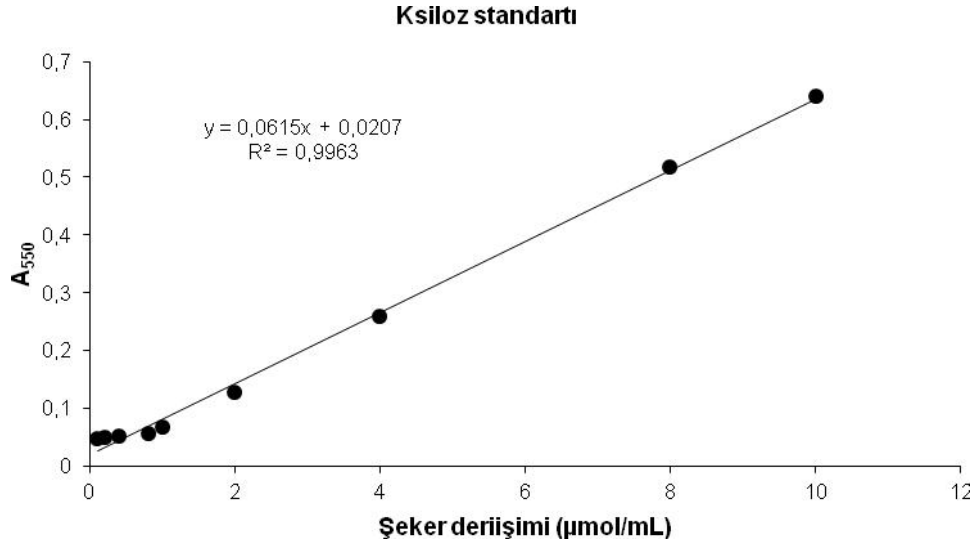
Endoglukanaz enzim aktivitesi oat spelt ksılan'dan indirgenen şekerlerin miktarının tespit edilmesi ile belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin tespiti için reaksiyon karışımı içinde miktarı bilinen şekerlerin bulunmasıyla bir ksiloz standartı oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Reaksiyon karışımındaki şekerin tayini endoglukanaz aktivitesinin tayinindeki gibidir. Tek farkı standart olarak glukoz yerine ksiloz, substrat olarak CMC yerine oat spelt ksılanın kullanılmasıdır.

Bir ünite (U) endoksilanaz aktivitesi analiz koşulları altında mililitre başına 1 dakikada 1 µmol (1 L'de 1 mmol) indirgenmiş şeker salınmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

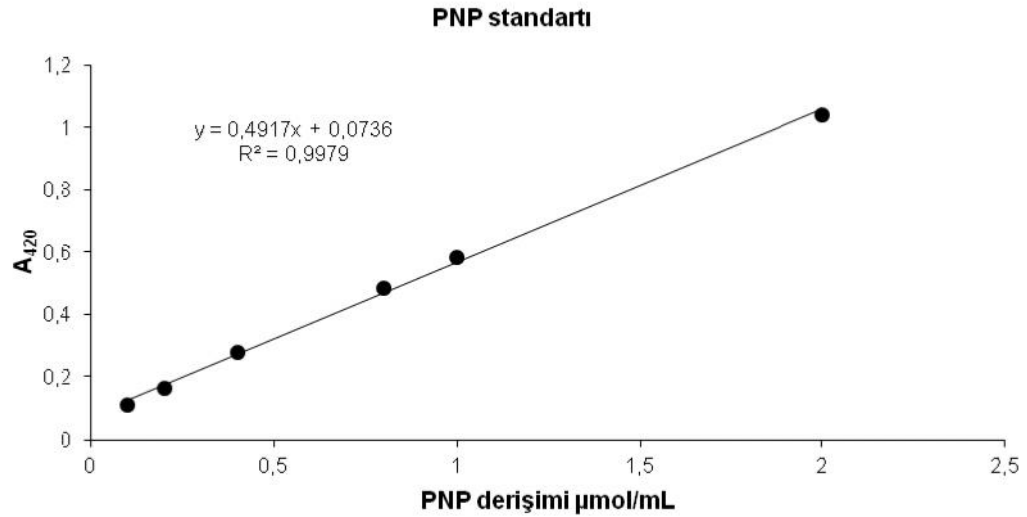
3.2.5.3. β-D- Glukosidaz analizi

β-D-glukosidaz analizi için *p*-nitrofenol (PNP) standardı hazırlanır (Şekil 3.6). Enzim analizi sırasında substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosid üzerine etki eden enzim aktivitesi sonucu ortamdaki PNP yoğunluğu artar. Bundan dolayı bir ünite (U) β-D-glukosidaz aktivitesi analiz koşulları altında

mililitre başına 1 dakikada 1 μ mol (1 L’de 1 mmol) *p*-nitrofenol salınmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.5. D-ksilozun farklı farklı derişimlerinin analizi sonucu elde edilen indirgenmiş şeker standardı.



Ş

ekil 3.6. *p*-nitrofenol (PNP) standart grafiğı

PNP standardı hazırlanırken 100 μ L derişimi bilinen PNP, 400 μ L pH 7,2 fosfat tamponu karıştırılarak 10 dk beklenir. Daha sonra 2 mL 1M’lık sodyum karbonat karışıma eklenerek 420 nm’deki absorbans değeri okunur. Enzim

aktivitesinin tespiti sırasında ise ilk olarak pH'sı 7,2 fosfat tamponu içinde 100 µL 5mM *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosid ile 300 µL tampon karıştırılır. Karışım üzerine 100 µL süpernatant ilave edilerek 10 dk beklenir. Reaksiyonu durdurmak için 2 mL 1M'lık sodyum karbonat eklenir ve 420 nm'deki absorbans değerine göre PNP standardı yardımıyla aktivitesi hesaplanır.

3.2.5.4. β-D- Ksilosidaz analizi

β-D-glukosidaz analizindeki gibi PNP standardı yardımıyla hesaplanır. Substrat olarak *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosid yerine *p*-nitrofenil-β-D-ksilopiranosid kullanılır.

3.2.5.5. Mannopiranosidaz analizi

β-D-glukosidaz analizindeki gibi PNP standardı yardımıyla hesaplanır. Substrat olarak *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosid yerine *p*-nitrofenil-α-D-mannopiranosid kullanılır.

3.2.5.6. α-L-Arabinofuranosidaz analizi

β-D-glukosidaz analizindeki gibi PNP standardı yardımıyla hesaplanır. Substrat olarak *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosid yerine *p*-nitrofenil-α-L-arabinofuranosid kullanılır.

3.2.5.7. Asetil esteraz analizi

β-D-glukosidaz analizindeki gibi PNP standardı yardımıyla hesaplanır. Substrat olarak *p*-nitrofenil-β-D-glukopiranosid yerine *p*-nitrofenol asetat kullanılır.

3.2.5.8. Peroksidaz Analizi

Peroksidaz aktivitesi, 2,4-diklorofenol'ün (2,4-DCP) substrat olarak kullanılması ile belirlenmiştir. Ramachandra ve ark. [228] tarafından uygulanan bu metod, modifiye edilerek kullanılmıştır. Son reaksiyon karışımı 200 mL sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0); 200 mL 16 mM 4-aminoantipirin (4-AAP); 200 mL 25 mM 2,4-DCP; 200 mL enzim preperatı ve 200 mL 50 mM hidrojen peroksit

içermektedir. Reaksiyon, hidrojen peroksitin (200 mL ve 50 mM) ilavesi ile başlatılmıştır. Bu nedenle hidrojen peroksit, karışımın en son eklenen bileşenidir. Hidrojen peroksitin eklenmesinin ardından örnekler su banyosu içerisinde 30 °C’de 1dk inkübe edilmişlerdir. 4-AAP’nin oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen artış 510 nm’de spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Bir ünite (U) peroksidaz aktivitesi, absorbansta 1 birim dk⁻¹ artış meydana getirmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.5.9. Lakkaz Analizi

Lakkaz enziminin analizi için 2 farklı metod kullanılmıştır. Birincisinde substrat olarak kullanılan 0,5 mmol/L SGZ den 200 µL alınarak 700 µL tampona eklenmiş ve ardından 100 µL süpernatant ilave edilmiştir. Bir dakikada 525 nm’deki absorbans değerindeki değişim hesaplanmıştır [233]. Bir ünite (U) lakkaz aktivitesi, absorbansta 1 birim dk⁻¹ artış meydana getirmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. SGZ 40 °C’da alkol içinde çözündürülebilmisti. İkinci metoda ise substrat olarak SGZ yerine 0,5 mmol/L ABTS kullanılmış 420 nm’deki absorbans değerindeki değişim hesaplanmıştır.

3.2.6. Substratların Hazırlanması

Buğday samanı, arpa samanı, mısır sapı, muz ağacı yaprağı, pamuk posası blender ile iyice parçalanarak toz haline getirildikten sonra 0,5 mm gözenek çaplı elekten (Alfa Laboratuvar Malzemeleri, Ankara, Türkiye) geçirilmiştir. Kavak ve mısır talaş olarak elde edilmiştir. Ofis kağıdı sadece blender ile olabildiğince küçük parçalara ayrılmıştır.

3.2.7. Substratların Lignoselülozik İçeriklerinin Gravimetrik Tayini

Lignoselülozik materyallerden hemiselüloz, lignin ve selülozun ayrıştırılması için seyreltik asit ve seyreltik alkali solüsyonlar kullanılır [234]. İlk olarak materyal %3 (v/v) H₂SO₄ solüsyonuna katılarak 120 °C’de 1 saat bekletilir. Bu koşullar altında sadece hemiselüloz hidrolize olacaktır. Materyal yıkandıktan sonra 55 °C’de etüvde 1 gece kurutulur. Tartım yapılır. Tartılan miktar lignoselülozik

materyaldeki selüloz ve ligninin toplam ağırlığını verir. Kalan materyal 1/10 katı/sıvı oranında %10'luk (w/w) NaOH çözeltisinde 120 °C'de 90 dk ısıtılır. Kalan materyal yıkanır, santrifüjlenir ve kurutulur. Tartım yapılır. Tartılan miktar selülozun toplam ağırlığını verir.

3.2.8. Ön-Muamele Uygulamaları

Termal ön muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında distile suya katılır ve 190 °C'de 15 dakika ısıtılır.

Seyreltik H₂SO₄ ile ön muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında %1'lik H₂SO₄ çözeltisine eklenerek 121°C'de 1saat ısıtılır.

Seyreltik HCl ile ön muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında %3'lük HCl çözeltisine eklenerek 3 saat oda sıcaklığında bekletilir.

Kloroform ile ön muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında %99'luk kloroform içinde 3 saat oda sıcaklığında bekletilir.

Hidrojen peroksit ile ön muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında %2,5'lük H₂O₂ çözeltisinde 24 saat bekletilir.

Kireç ile ön muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında %1'lik kireç çözeltisine eklenerek 121°C'de 1saat ısıtılır.

Sodyum hidroksit ile ön-muamele için hazırlanmış substratlar 1/10 (katı/sıvı) oranında %1'lik sodyum hidroksit çözeltisine eklenerek 121°C'de 30 dk ısıtılır.

Substratlar filtrasyonla (Whatman no 1) çözeltiden ayrılır ve 55 °C'de etüvde 1 gece kurutularak analize hazır hale getirilir. pH'ları ise kontrol edilir ve gerekirse 1M'lık NaOH ile ayarlanır.

3.2.9. Ön-Muamelesi Yapılmış Substratların Hidrolizi

Hidroliz işlemi için kalitatif ve kantitatif enzim analizleri sonucu lignoselüloz degradasyonunda rol oynayan enzimleri en yüksek düzeyde üretebilen aktinobakteri izolatu seçilmiştir. Seçilen izolatu maksimum enzim ürettiği süre tespit

edilmiştir. İzolat karbon kaynağı olarak lignoselülozik materyal kullanılan MS-YEM besiyerinde 30 °C’de, tespit edilen sürede 150 rpm çalkalanarak inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerleri 250 mL’lik erlenlerde 50 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. İnkübasyon sonrasında kültür sıvısı 50 mL’lik falkon tüplerde santrifüjlenerek süpernatant alınır, çöküntü atılır. Hidroliz işlemi için 1/100 (katı/sıvı) oranında süpernatant ile substrat birbirine karıştırılır ve değişik zaman dilimlerinde alınan örneklerin indirgenmiş şeker miktarı DNS metodu ile analiz edilir.

3.2.10. NaOH ile Ön-Muamele ve AOA40 ile Hidrolizin Optimizasyonu

Optimize edilecek parametreler ön-muamelenin yapıldığı sıcaklık, uygulanacak kimyasalın oranı (%), ön-muamele süresi, hidroliz süresidir. Sıcaklık için 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C denenmiştir. Uygulanacak kimyasalın oranı olarak %0,5, %1,0, %1,5, %2,0, %2,5 denenmiştir. Ön-muamele süresi olarak 4, 8, 12, 18, 24 denenmiştir. Hidroliz süresi olarak 2, 5, 10, 24 saat denenmiştir.

NaOH ile ön muamelenin optimizasyonu gerçekleştirilirken kullanılan metod diğer ön-muamelesi yapılmış substratların analizindeki ile aynıdır.

3.2.11. Optimum Ön-Muamele ve Hidroliz Olmuş Solüsyon İçindeki Hidroliz Ürünlerinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Belirlenmesi

Ön-muamele ve hidroliz sonucunda oluşan ürünlerin analizi için TLC’den yararlanılmıştır. Kromatografi sırasında Merck (1.05730) marka 5 cm x 20 cm boyutlarında selüloz (0,1 mm) tabanlı kromatografi plakaları tercih edilmiş ve solvent olarak da 15:30:40:15 oranında formik asit [%100 (v/v)]:butanone [%99,5 (v/v)]:tert-butanol [%99,5 (v/v)]:su karışımı kullanılmıştır.

Örnekten 10 µL alınarak plaka üzerine uygulanmıştır. Standart olarak D-ksiloz, ksilobiyoz, D-glukoz, sellobiyoz, D-mannoz ve L-arabinoz’un 1 mg mL⁻¹’lik solusyonları hazırlanmış ve bu solusyonlardan plaka üzerine, ikili gruplar halinde, 10 µL uygulanmıştır. Kromatografi sürecinin tamamlanmasının ardından plakaların yüzeyine suya doyurulmuş butanol içerisinde %3,25 (w/v) fitalik asit çözeltisi ile hazırlanan %2 (v/v) anilin solusyonu spreylene ve plakalar renk gelişimi için etüv içerisinde 90 °C’de 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Renk gelişiminin

tamamlanmasını takiben plaka üzerinde oluşan kahverengi (heksoz) ve pembe (pentoz) renkli alanlar için Rf değerleri hesaplanmıştır.

3.2.12. İzolatın Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan izolatın kültürel özelliklerinin belirlenebilmesi için Nutrient Agar, Plate Count Agar, Glukoz Asparajin Agar, Gliserol Asparajin Agar, Gause's No:1, Yeast Starch Agar, ISP-1, ISP-2, ISP-4 besiyerlerine çizgi ekim yapılarak 30 °C'de 7 gün inkübasyon bırakılır.

3.2.13. İzolatın Kullanabildiği Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan izolatın kullanabildiği karbon kaynaklarının tespiti ISP-4 besiyerine nişasta yerine istenilen karbon kaynağı ilave edilerek gerçekleştirilir. Hazırlanan besiyerine ekim yapıldıktan sonra petri ler 30 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılır.

3.2.14. İzolatın Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolatın değişik sıcaklık, tuz yoğunluğu, pH'lardaki gelişimleri ISP-4 besiyerine eki yapmak suretiyle gözlemlenmiştir. Bununla birlikte izolatın ortamdaki sodyum azid, kristal viyole, bazı inhibitörlerin varlığındaki gelişimleri belirlenmiştir. Mikroorganizmanın gram boyaması yapılmıştır. Katalaz, oksidaz, indol, metil red testi yapılmıştır. Kazein ve jelatin hidrolizi ile melanin pigmenti üretimi de kontrol edilmiştir.

Katalaz aktivitesi için ilgili izolatın geliştirildiği besiyerinden bir öze dolusu mikroorganizma lam üzerine aktarılıp üzerine birkaç damla H₂O₂ damlatılmıştır.

Oksidaz testinde bir parça filtre kağıdı %1 'lik tetrametil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür veya oksalat ile ıslatılmıştır.. Temiz bir platin öze yardımıyla petri kutusu veya yatık agardaki aktif kültürden bir miktar alınarak filtre kâğıdının üzerine yayılmıştır.

İndol testinde mikroorganizmalar sıvı besi yerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37 °C de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Kültürlerin üzerine kovacs (veya Ehrlich) ayıracından 0.5 mL ilave edilir ve iyice karıştırılır. Kovacs ayracı için 75 mL n-amil alkol, 25 mL hidroklorik asit, 5 g *p*-dimetilamin-benzaldehit ile yapılmıştır.

Metil red testinde üremiş kültürlerden, besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakılmıştır. Üzerine metil kırmızısı solusyonunun 4-5 damla damlatılıp iyice karıştırılmış, sonuç yorumlanmıştır.

Jelatin hidroliz testi için organizma Nutrient Jelatin besiyerine ekilmiştir. Sıvılaşma gözlemlenmiştir.

Kazein testi için nutrient agar besiyerine steril inek sütü ilave edilmiştir. Organizma ekimi yapıldıktan sonra şeffaf zon oluşumu gözlemlenmiştir.

Melanin pigmenti üretim üretmediği ise ISP-4 besiyerinde gözlemlenmiştir.

3.2.15. İzolatın Büyüme Eğrisinin Belirlenmesi

MSYEM besiyerinde pH 7, 30 °C, 150 rpm'de geliştirilen izolatın günlere bağlı olarak kuru hücre ağırlıkları ölçülmüştür. Hücre ağırlığının belirlenmesi için alınan örnekler filtreden geçirilip filtre üzerinde kalan hücreler kurutularak tartım yapılmıştır.

3.2.16. Aktinobakterilerdeki Spor Yapılarının Gösterilmesi

Çalışmada kullanılan izolatın spor yapılarının gösterilmesi için FE-SEM kullanılmıştır. Bir öze dolusu havasal miselyum fosfat tamponu çözeltisinde hazırlanan %2,5'lik glutaraldehit ile 3 saat bekletilerek 1mm² boyutlarında kesilmiş bir cam parçasına fiske edilmiştir. Sonra örnek yükselen alkol sırasında (%10, 20, 30, 50, 70, 90, 100'lük etanol) 10'ar dakika bekletilmiş ve kritik nokta kurutmasına geçilmiştir.

Kritik nokta kurutması için kullanılacak cihazın tüm gaz çıkış vanaları kapatılır. CO₂ vanası açılıp küvetin sıcaklığı 4 °C'ye düşürüldükten sonra gaz kapatılır, gazın dışarı çıkmasını sağlayan siyah vana yavaşça açılır. Gaz tamamen

çıktıktan sonra küvete örnekler yerleştirilip siyah vana kapatılıp CO₂ tekrar açılır. Küvetin içindeki kırmızı çizgiye çok dikkat edilip, hep çizgide kalması sağlanır. Streepere düğmesine basıp 4 dakika beklendikten sonra küvet ısısı kontrol edilip 4 °C olması sağlanır. CO₂ kapatılıp Healter düğmesine basılıp, küvet sıcaklığı 35 °C ve 1000 bar basınca gelince Healter düğmesi kapatılıp gazın dışarı çıkmasını sağlayan kırmızı vana yavaşça açılır. Dikkatlice küvetten dışarı çıkarılan örnekler, üzerlerine üst tarafı yapışkanlı metallerin yüzeyine yapıştırılır. Sonra örnek platin ile kaplanarak SEM ile görüntülendirilir [235].

3.2.17. Lignoselülozik Materyal Hidrolizinin AFM’de Gösterimi

Kontrol olarak sadece blender ile parçalanmış saman kullanılmıştır. Optimum ön-muameleli saman, optimum ön-muamele ve hidrolize uğramış saman görüntülenmiştir. Görüntüleme öncesinde örnekler kurutulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. KATI BESİYERİNDE ENZİM AKTİVİTELERİNİN GÖSTERİMİ

Saflaştırılan izolatların enzim tarama besiyerlerine nokta ekiminden sonra elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiş olup, önemli derecede zon oluşumu gözlenenler Şekil 4.1 – Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Enzim aktivitelerinin katı besiyerinde taranması. 0: organizma geliştirilemedi, -: zon oluşumu gözlenemedi, +: düşük seviyede zon oluşumu, ++: orta seviyede zon oluşumu, +++: iyi seviyede zon oluşumu

İzolatin Kodu	CMC Agar	Ksilanaz Tarama Besiyeri	RBBR’li Besiyeri	Guaikollü Besiyeri	Tannik Asitli Besiyeri
AOA1	+	-	-	-	-
AOA2	+	-	-	-	-
AOA3	-	-	-	-	-
AOA4	0	-	-	-	-
AOA5	-	-	-	-	-
AOA6	-	-	-	-	-
AOA7	-	-	-	-	-
AOA8	-	+	0	-	-
AOA9	-	-	-	0	0
AOA1A	0	-	-	-	-
AOA11	-	-	-	-	-
AOA12	+	-	-	-	-
AOA13	-	-	-	-	-
AOA14	++	-	-	-	-
AOA15	-	-	-	-	-
AOA16	-	-	-	-	0
AOA17	-	-	-	-	-
AOA18	-	-	0	-	-
AOA19	-	-	-	-	-
AOA20	-	-	-	0	-
AOA21	-	-	-	-	-
AOA22	-	-	-	-	0
AOA23	-	-	-	-	-

Çizelge 4.1. (devam)

İzolatin Kodu	CMC Agar	Ksilanaz Tarama Besiyeri	RBBR'li Besiyeri	Guaikollü Besiyeri	Tannik Asitli Besiyeri
AOA24	-	-	-	-	0
AOA25	-	-	0	0	-
AOA26	-	-	-	-	-
AOA27	-	-	-	-	-
AOA28	-	-	-	-	-
AOA29	-	-	-	0	-
AOA30	-	-	-	-	-
AOA31	-	-	0	0	0
AOA32	-	-	-	-	-
AOA33	+	-	-	-	-
AOA34	-	-	-	-	-
AOA35	-	-	-	-	-
AOA36	-	+	-	-	-
AOA37	-	-	-	-	-
AOA38	-	-	-	-	-
AOA39	-	+++	-	-	-
AOA40	+	+++	++	++	-
AOA41	-	-	-	-	-
AOA42	-	-	-	-	-
AOA43	-	+	-	-	-
AOA44	+	-	-	-	-
AOA45	-	+	-	-	-
AOA46	+	-	-	0	-
AOA47	-	-	-	-	-
AOA48	+	-	0	-	-
AOA49	-	+	-	0	-
AOA50	+	-	-	-	0
AOA51	-	-	+	-	-
AOA52	-	++	-	-	-
AOA53	-	-	+	-	-
AOA54	-	-	-	-	0
AOA55	-	-	-	-	-
AOA56	-	+	-	-	-
AOA57	-	-	-	-	-
AOA58	-	-	-	0	0

Çizelge 4.1. (devam)

İzolatin Kodu	CMC Agar	Ksilanaz Tarama Besiyeri	RBBR'li Besiyeri	Guaikollü Besiyeri	Tannik Asitli Besiyeri
AOA59	-	-	-	-	-
AOA60	+	-	+	-	-
AOA61	-	-	-	-	-
AOA61	-	+	0	-	0
AOA62	-	-	-	0	0
AOA64	-	-	-	-	-
AOA65	+	-	0	0	0
DAV01	-	-	-	-	-
DAV02	-	+	0	0	0
DAV03	-	-	-	0	-
DAV04	-	-	-	-	-
DAV05	-	-	-	0	0
DAV06	-	-	-	-	0
DAV07	-	-	-	-	-
DAV08	-	-	-	-	-
DAV09	-	-	-	-	-
DAV10	-	-	-	-	-
DAV11	-	-	-	-	-
DAV12	-	-	-	-	-
DAV13	-	-	-	-	-
DAV14	++	-	-	-	-
DAV15	-	-	-	-	-
DAV16	-	-	-	-	-
DAV17	-	-	-	-	0
DAV18	-	-	0	0	0
DAV20	-	-	0	0	0
ÇAM001	-	-	0	0	0
ÇAM002	-	-	-	-	-
ÇAM003	++	++	-	-	-
ÇAM004	+	-	-	-	-
ÇAM005	-	-	-	-	-
ÇAM006	-	-	-	0	-
ÇAM007	-	-	-	0	-
ÇAM008	-	-	-	-	0
ÇAM 009	-	-	-	-	0

Çizelge 4.1. (devam)

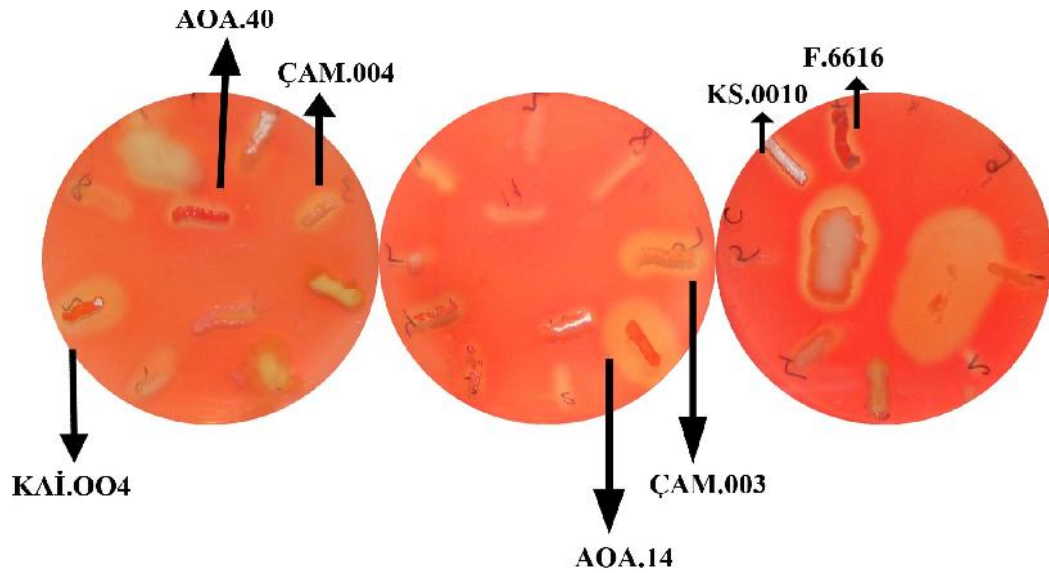
İzolatin Kodu	CMC Agar	Ksilanaz Tarama Besiyeri	RBBR'li Besiyeri	Guaikollü Besiyeri	Tannik Asitli Besiyeri
ÇAM010	-	-	-	-	-
KAİ001	-	-	-		-
KAİ002	-	-	-	0	-
KAİ003	-	-	-		-
KAİ004	+++	++	-	-	-
KAİ005	-	-	-	-	-
KAİ006	-	-	-	-	-
KAİ007	-	+	-	0	0
KAİ008	-	-	-	-	-
KAİ009	-	-	0	-	-
KAİ010	+	-	-	-	0
KAİ011	-	-	-	0	-
KAİ012	-	+	-	-	0
KAİ013	-	-	-	0	-
KAİ014	-	-	0	0	0
KAİ015	+	-	-	-	-
KAİ016	-	-	-	-	-
KAİ017	-	-	-	0	0
KAİ018	+	-	0	-	-
KAİ019	-	-	-	-	0
KAİ020	-	-	-	-	
KAİ021	-	-	-	-	-
KAİA22	-	-	-	-	-
KS001	-	-	-	-	-
KS002	-	-	0	-	0
KS003	-	++	-	-	-
KS004	-	-	-	-	-
KS005	-	-	0	0	-
KS006	++	-	-	-	-
KS007	-	-	-	-	-
KS008	-	-	-	0	-
KS009	-	-	-	-	-
KS0010	+	++	-	-	-
KS0011	-	-	-	-	-
KS002	-	-	-	-	-

Çizelge 4.1. (devam)

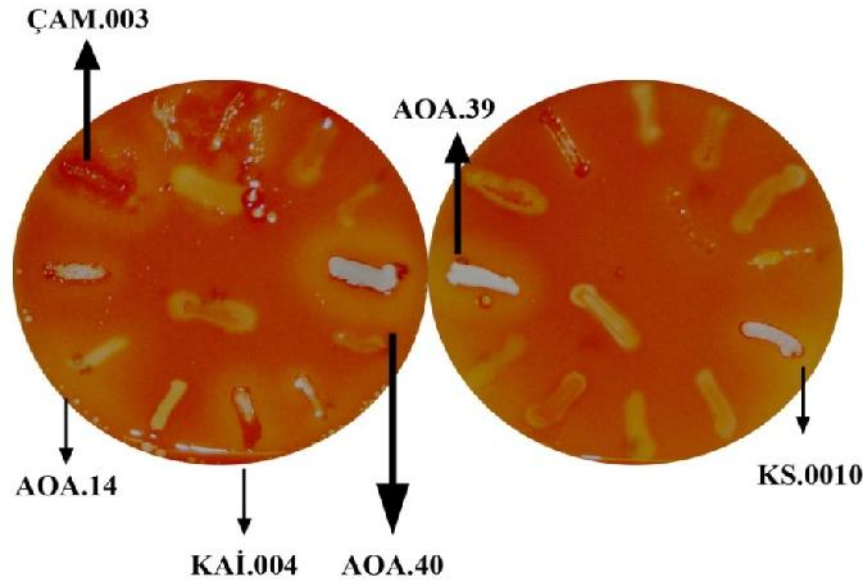
İzolatin Kodu	CMC Agar	Ksilanaz Tarama Besiyeri	RBBR'li Besiyeri	Guaikollü Besiyeri	Tannik Asitli Besiyeri
KS0013	-	-	-	-	-
KS0014	-	-	-	-	-
KS0015	+	-	-	-	-
KS0016	-	-	-	-	-
KS0017	-	+	-	-	-
KS0018	-	-	-	-	-
KS0019	-	-	-	-	-
KS002A	-	-	-	-	-
KS0021	0	0	0	0	0
KS0022	-	-	-	-	-
KS0023	-	-	-	-	-
KS0024	-	-	-	-	-
KS0025	-	-	-	0	-
KS0026	+	-	-	-	-
KS0027	-	-	-	-	-
KS0028	-	-	0	-	-
KYS 01	-	-	-	-	0
KYS 02	-	-	-	-	-
KYS 03	0	0	0	0	0
KYS 04	-	-	-	-	-
KYS 05	-	-	-	-	-
KYS 06	-	-	-	0	-
KYS 07	-	-	-	-	-
KYS 08	-	-	0	0	0
KYS 09	-	-	-	-	-
KYS 10	-	-	-	-	0
KYS 11	-	-	-	-	-
KYS 12	-	-	0	-	-
KYS 13	-	-	-	-	-
KYS 14	-	-	-	-	-
KYS 15	-	-	-	-	-
KYS 16	-	-	-	-	-
KYS 17	-	-	-	-	-
KYS 18	-	-	-	-	-
KYS 19	-	-	-	-	-

Çizelge 4.1. (devam)

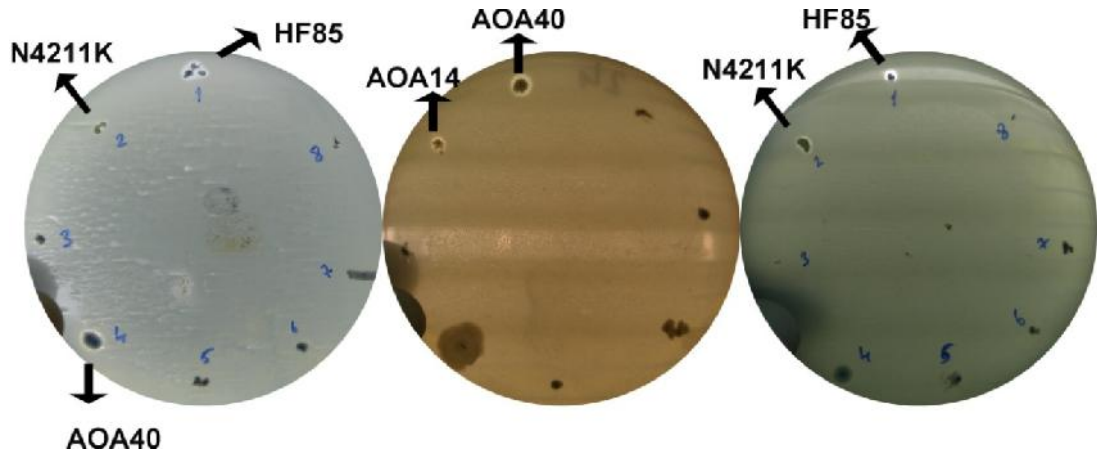
İzolatin Kodu	CMC Agar	Ksilanaz Tarama Besiyeri	RBBR'li Besiyeri	Guaikollü Besiyeri	Tannik Asitli Besiyeri
KYS 20	-	-	-	-	-
KYS 21	-	-	-	-	-
N4211K	-	-	-	-	-
HF85	-	-	-	-	-
F6616	+	-	-	-	-
M 38	-	-	-	-	-
M1247	+	-	-	0	0
M1345	-	-	0	0	0
M1351	-	-	-	0	-
M1444	-	+	-	-	-
M1470	-	-	0	0	0
M1491	+	-	0	-	-
M24	-	-	-	0	0
M25	-	+	0	-	-
M27	-	-	-	-	-
M28	-	-	0	-	-
M31	-	-	-	-	-



Şekil 4.1. CMC Agar’ da en iyi zon oluşturan izolatlar.



Şekil. 4.2. Ksilanaz tarama besiyerinde iyi zon oluşturan izolatlar.



Şekil 4.3. Sırasıyla RBBR, guaikol ve tannik asitli besiyerinde iyi derecede açılma zonu veren izolatlar.

Selülaz aktivitesince etkin olan izolatlar AOA1, AOA2, AOA12, AOA14, AOA33, AOA33, AOA40, AOA46, AOA50, AOA60, AOA65, ÇAM004, KAİ004, KAİ010, KAİ015, KAİ018, KS006, KS0010, KS0015, KS0026, F6616, M1491 olarak tespit edilmiştir. Ksilanaz aktivitesi gözlemlenen izolatlar ÇAM003, KAİ004, KAİ007, KAİ012, KS003, KS0010, KS0017, M1444, M25 olarak belirlenmiştir. RBBR, guaikol ve tannik asitli besiyerinde açılma zonu veren izolatlar ise sırasıyla AOA40, AOA53, AOA60 olarak belirlenmiştir.

Genel olarak, izolatlar selüloz ve ksilanaz tarama besiyerlerinde açılma zonu meydana getirmeseler de normal üremelerine devam etmişlerdir. Fakat RBBR, guaikol ve tannik asitli besiyerlerinde çok fazla açılma zonu gözlemlenemediği gibi izolatlar ya gelişmemiş ya da çok az gelişmiştir.

Tarama besiyerlerine yapılan nokta ekim sonucunda lignoselülozik materyalleri etkili biçimde parçalayabileceği düşünülen KS0010, KAİ004, ÇAM003, AOA40, AOA39 ve AOA14 izolatlarının hidroliz için enzim kaynağı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Bu izolatların seçiminde, tek başına bir tarama besiyerinde iyi açılma zonu vermesi değil, en az iki farklı tarama besiyerinde aktivitesinin gözlemlenmesi önemli rol oynamıştır.

4.2. SIVI KÜLTÜRDE ENZİM ANALİZLERİ

Enzim aktivitesinin belirlenmesi sırasında daha önce oluşturulmuş standartlara dayanarak aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} = \frac{A \times V_t}{T_i \times V_e} \times \text{Seyreltme faktörü}$$

A: Dönüştürülen ürün miktarı (μmol/mL)

V_t: Toplam reaksiyon hacmi (mL)

T_i: İnkübasyon süresi (dk)

V_e: Enzim hacmi (mL).

Tarama deneyleri sonucunda lignoselülozik materyalleri etkili biçimde parçalayabileceği belirlenen KS0010, KAİ004, ÇAM003, AOA40, AOA39 ve AOA14 izolatlarının 5 günlük inkübasyonları süresince üretmiş oldukları endoglukanaz, endoksilanaz, β-glukosidaz, mannopiranosidaz, β-ksilosidaz, α-L-arabinofuranosidaz, asetil esteraz, peroksidaz ve lakkaz enzimlerinin analizleri yapılmıştır (Şekil 4.4 - Şekil 4.11). Bu enzimler lignoselülozik degradasyonda rol oynamaktadırlar. Endoglukanaz selülozlara etki ederken, endoksilanaz, β-glukosidaz, mannopiranosidaz, β-ksilosidaz, α-L-arabinofuranosidaz ve asetil esterazın etkisi ise hemiselülozlaradır. Lakkaz ve peroksidaz ise lignine etki eder.

Enzimatik analizler sonucunda izolatlar arasında en iyi endoglukanaz üreticisinin AOA39, endoksilanaz üreticisinin AOA40, peroksidaz üreticisinin AOA40, β -glukosidaz üreticisinin KS0010, mannopiranosidaz üreticisinin KS0010, β -ksilosidaz üreticisinin AOA40 ve α -L-arabinofuranosida üreticisinin ise AOA40 izolatları olduğu belirlenmiştir. Lakkaz aktivitesi ise kantitatif olarak hiçbir izolatta belirlenememiştir. Hidroliz için kullanılacak izolatın seçiminde ise endoglukanaz ve endoksilanaz enzimlerini görece daha fazla üretenler üzerinde durulmuştur. Çünkü diğer enzimler lignoselülozik parçalamada ikincil olarak rol oynamaktadırlar.

AOA40 ve AOA39 izolatlarının lignoselülozik degradasyonda rol oynayan enzimleri diğerlerine nazaran daha fazla ürettiği tespit edilmiştir. AOA40 izolatının endoglukanaz, endoksilanaz, β -glukosidaz, mannopiranosidaz, β -ksilosidaz, α -L-arabinofuranosidaz, asetil esteraz, peroksidaz ve lakkaz aktivitelerini en iyi ürettiği gün sırasıyla 3, 3, 3, 2, 3, 4, 3, 3'dür. AOA39 izolatının endoglukanaz, endoksilanaz, β -glukosidaz, mannopiranosidaz, β -ksilosidaz, α -L-arabinofuranosidaz, asetil esteraz, peroksidaz ve lakkaz aktivitelerini en iyi ürettiği günler ise sırasıyla 3, 3, 2, 2, 3, 2, 4, 4'dür.

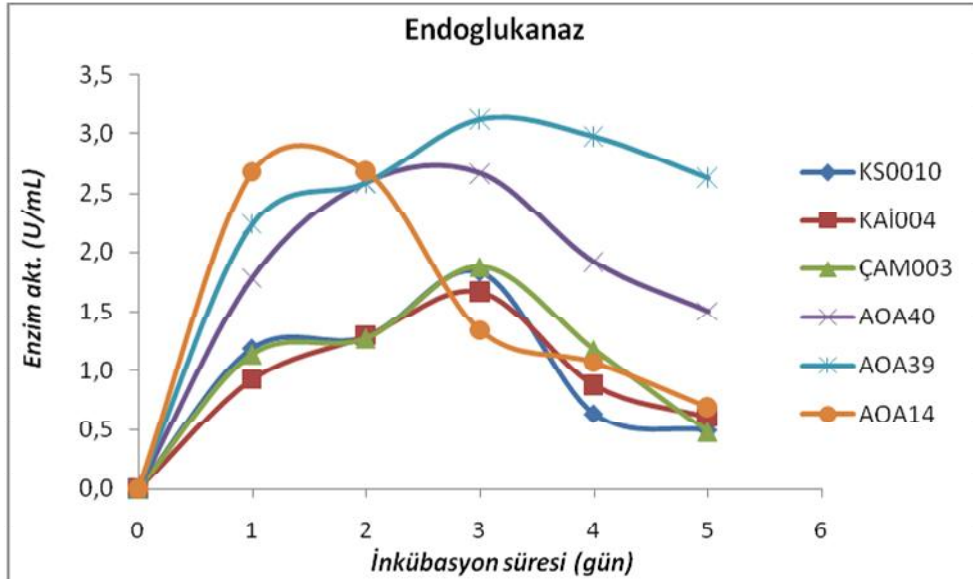
Katı besiyerinde lakkaz aktivitesi tespit edilen izolatların sıvı kültürdeki analizleri sonucunda aktivite tayin edilememiştir. Bundan dolayı katı besiyerlerinde gözlemlenen aktiviteler ya başka enzimlere aittir ya da bu izolatlardaki lakkaz enzimleri hücre zarına bağımlı ve/veya hücre içidir.

4.2.1. Endoglukanaz Aktivitesi

Selüloz enzimleri ile ilgili çalışmalarda genellikle funguslardan *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* cinslerine ait bazı türler kullanılırken, bakterilerden *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *Pseudomonas cellulose* ve *Rhodolhermus* sıklıkla kullanılmaktadır. Aktinobakterilerle ilgili çalışmalarda ise daha çok *Cellulomonas*, *Streptomyces* ve *Thermomonospora*'ya ait türler kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda *Trichoderma reesei*'nin 13 U/mL [236] ve *Trichoderma citrioviride*'nin 14,61 U/mL; karbon kaynağının oat spelt ksilan olduğu koşullarda *Penicillium verruculosum* COKE4E'nin 6,5 U/mL [237], karbon

kaynağının talaş olduğu koşullarda ise *Aspergillus niger*'in 0,1813 U/mL [238], karbon kaynağı olarak pirinç samanı ve pamuk posasını kullanıldığı koşullarda *Rhizopus oryzae*'nn sırasıyla 1,3 U/mL ve 1 U/mL [239]; karbon kaynağı olarak buğday samanının kullanıldığı koşullarda *Irpex lacteus* 'un 0,14 U/mL [240]; karbon kaynağının buğday samanı olduğu koşullarda *Aspergillus feotidus* MTCC 4898'in 0,10 U/mL [241] endoglukanaz ürettiği tespit edilmiştir.

Bakteriyel endoglukanaz çalışmalarında substrat olarak CMC'nin kullanıldığı koşullarda *Streptomyces* sp'nin 0,99 U/mL [228], karbon kaynağının oat spelt ksilan olduğu koşullarda *Streptomyces* sp AMT-3'ün 0,09 U/mL [242]; karbon kaynağının selüloz olduğu koşullarda *Streptomyces* sp'nin 12 U/mL [243] endoglukanaz ürettiği tespit edilmiştir. Tarama deneyleri sonucunda seçilen 6 izolattan birisi olan AOA40 izolatından karbon kaynağının buğday samanı olduğu koşullarda inkübasyonun 3. gününde 2,67 U/mL endoglukanaz elde edilmiştir (Şekil 4.4). Çalışmadan elde edilen sonuç, karbon kaynağı olarak selüloz ya da CMC kullanılan daha önceki çalışmalardan daha düşük bulunmuştur. Fakat özellikle buğday samanı gibi lignoselülozik atıkların karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarla karşılaştırıldığında elde edilen sonuç daha yüksek bulunmuştur.

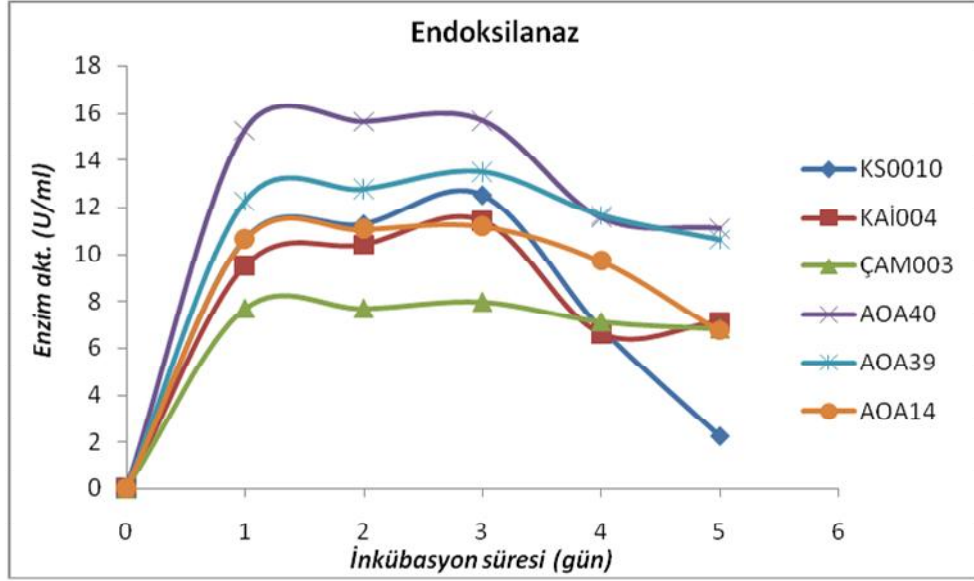


Şekil 4.4. Tarama sonucu seçilen izolatların endoglukanaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

4.2.2. Endoksilanaz Aktivitesi

Bu güne kadar rapor edilen çalışmalarda substrat olarak buğday kullanarak *Aspergillus niger*'den 6,47 U/mL [244], substrat olarak buğday samanı kullanarak *Aspergillus fumigatus*'dan 20 U/mL [245], substrat olarak şeker kamışı küspesi kullanılarak *Aspergillus tamarai*'den 16,68 U/mL [246], substrat olarak buğday samanı kullanarak *Aspergillus foetidus* MTCC 4898'den 20,1 U/mL [241], substrat olarak buğday samanı kullanarak *Penicillium chrysogenum*'dan 10,4 U/mL [247], substrat olarak buğday samanı kullanarak *Chaetomium thermophilum* IMI 291753'den 31 U/mL [248], substrat olarak oat spelt ksilan kullanarak *Holorhabdus utahensis*'den 0,33 U/mL [200] fungal endoksilanaz elde edilmiştir.

Bocchini ve ark. [249] substrat olarak ksilan kullanarak *Bacillus circulans*'tan 19,1 U/mL, substrat olarak buğday samanı kullanarak *Cellulomonas* sp.'den 1,5 U/mL [250], substrat olarak ksilan kullanarak *Streptomyces* sp. QG-11-3'den 16,6 U/mL [251], substrat olarak buğday samanı kullanarak *Thermoactinomyces thalophilus*'dan 8,6 U/mL [252] endoksilanaz elde edilmiştir. Tarama deneyleri sonucunda seçilen 6 izolattan birisi olan AOA40 izolatının kullanıldığı bu çalışmadan elde edilen sonuç ise substrat olarak buğday samanının kullanıldığı koşullarda 15,689 U/mL'dır (Şekil 4.5). AOA40 izolatından elde edilen endoksilanazlar buğday samanının substrat olarak kullanıldığı bir çok çalışma ile benzerlik gösterirken bir kısmından ise daha fazla aktivite göstermektedir. Bazı funguslarla yapılan çalışmalar sonucunda daha yüksek verim elde edildiği görülmektedir. Fakat bu funguslardan elde edilen endoksilanaz enzimleri çoğunlukla sekonder metabolitlerin yoğun olarak salgılandığı zaman olan inkübasyonun 10. gününde en üst düzeye ulaşmaktadır. Bu çalışmada kullanılan AOA40 izolatının endoksilanaz enzimlerini en fazla salgıladığı zaman ise inkübasyonun 3. günüdür. Ek olarak, AOA40'ın endoksilanaz ve endoglukanaz aktivitesi birlikte değerlendirildiğinde literatürde önemli bir boşluğu doldurduğu görülmüştür. Çünkü genelde yüksek değerler elde edilen çalışmalarda ya endoksilanaz ya da endoglukanaz birbirinden bağımsız üretilmiştir ve dolayısıyla üretim koşulları birbirinden farklıdır.



Şekil 4.5. Tarama sonucu seçilen izolatların endoksilanaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

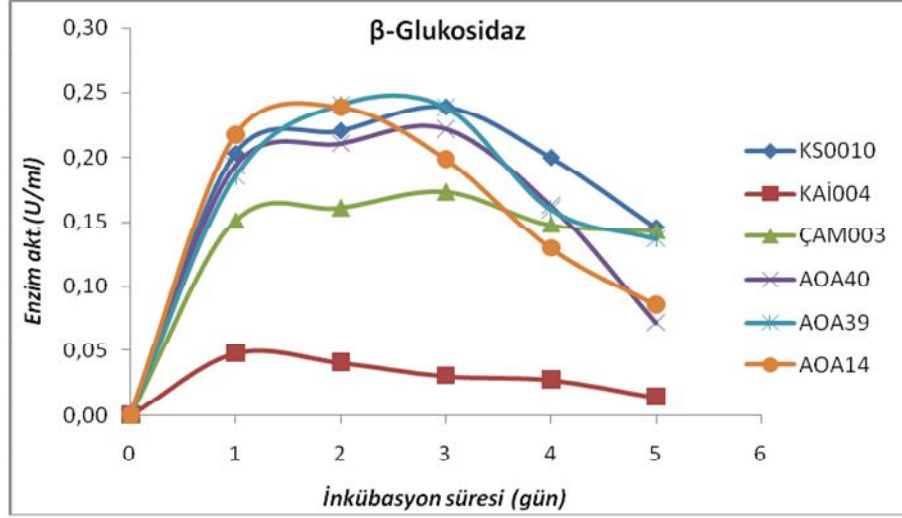
4.2.3. β -Glukosidaz Aktivitesi

Maheswari ve ark. [253] substrat olarak buğday tanesi kullanarak *Streptomyces cuspidosporus*' dan 0,026 U/mL; substrat olarak buğday samanı kullanarak *Chaetomium thermophile*'den 1,3 U/mL [254]; *A. niger*'den 1,17 U/mL, *Penicillium funiculosum*'dan 2,74 U/mL, *Trichoderma reesei*'den 0,76 U/mL [255] β -glukosidaz elde edilmiştir. Tarama deneyleri sonucunda seçilen 6 izolattan birisi olan AOA40 izolatından elde edilen β -glukosidaz aktivitesi 0,222 U/mL'dir (Şekil 4.6). Daha önceki çalışmalarla benzer sonuç elde edilmiştir.

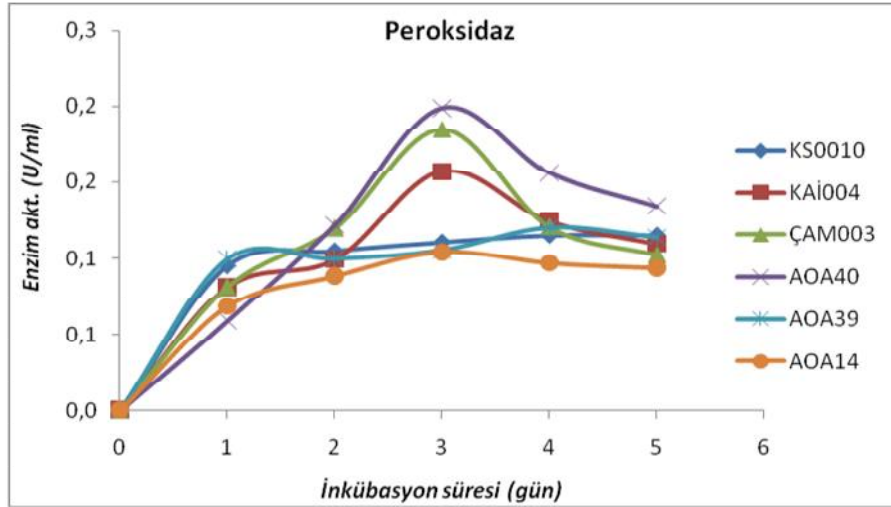
4.2.4. Peroksidaz Aktivitesi

Tarama deneyleri sonucunda seçilen 6 izolattan birisi olan AOA40 izolatından elde edilen peroksidaz aktivitesi 0,199 U/mL olup, daha önceki bazı çalışmalardan daha düşük olsa da genel olarak yüksektir (Şekil 4.7). Tuncer ve ark. [256] substrat olarak buğday samanı kullandıklarında *Streptomyces* F2621'den 0,29 U/mL, Rob ve ark. [257] *Streptomyces avermitilis* UAH 30'dan 0,12 U/mg, Rob ve

ark. [258] *Termomonospora fusca* BD25’den 0,04 U/mg, Ball ve ark. [259] *Streptomyces viridosporus*’dan 0,3 U/mg peroksidaz aktivitesi elde etmişlerdir.



Şekil 4.6. Tarama sonucu seçilen izolatların β-glikozidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

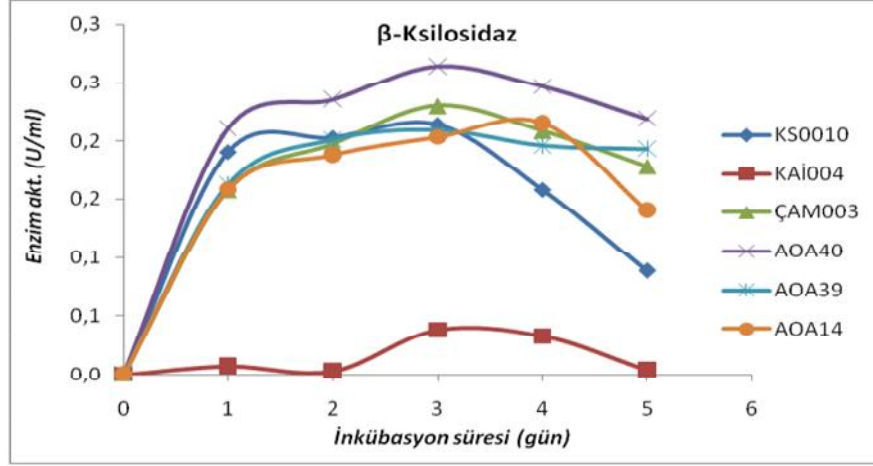


Şekil 4.7. Tarama sonucu seçilen izolatların peroksidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

4.2.5. β-Ksilosidaz Aktivitesi

Wainø ve ark. [200] *Holorhabdus utahensis*’den 0,1 U/mL, *A. niger*’den 0,95 U/mL, *Penicillium funiculosum*’dan 0,95 U/mL, *Trichoderma reesei*’den 1,07 U/mL [255]; *Aspergillus tamarii*’den 0,28 U/mL [246] β-ksilosidaz elde etmişlerdir.

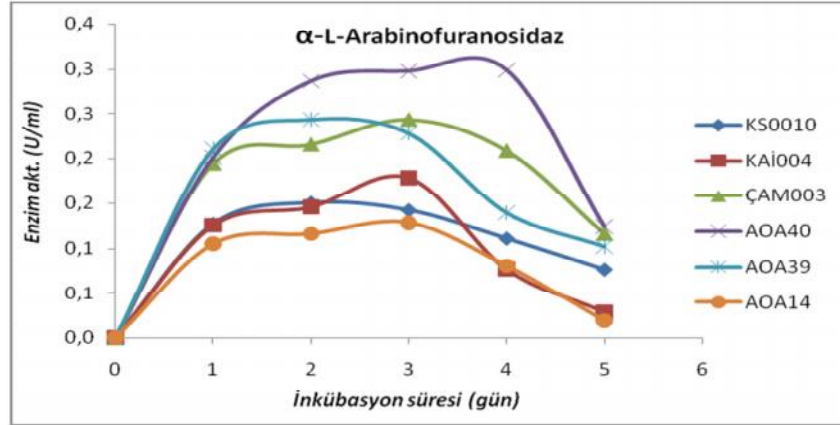
Tarama deneyleri sonucunda seçilen 6 izolattan birisi olan AOA40 ile elde edilen sonuç (0, 264 U/mL) ise mantarlardan elde edilenleri ile karşılaştırıldıklarında çok verimli olmasa da bakteriyel β -ksilozidazlar arasında oldukça iyi sayılabilir (Şekil 4.8).



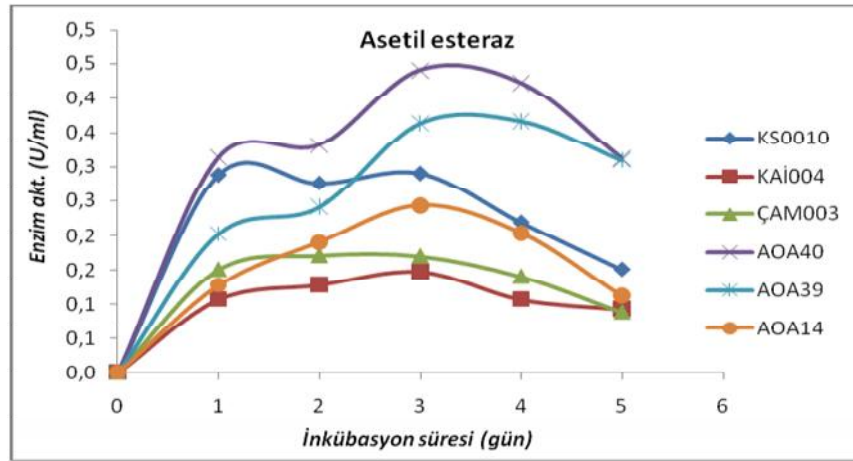
Şekil 4.8. Tarama sonucu seçilen izolatların β -ksilozidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

4.2.6. α -L-Arabinofuranosidaz ve Asetil Esteraz Aktivitesi

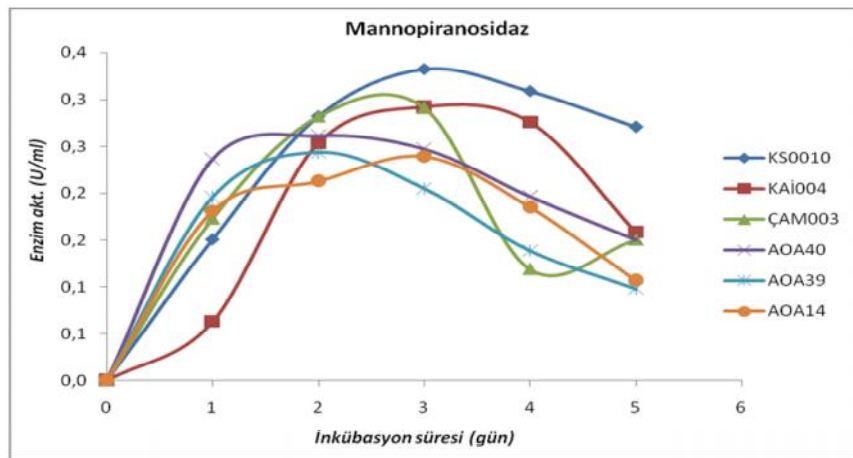
Bachmann ve ark. [260] yaptıkları çalışmada *Thermomonospora fusca*'nın α -L-arabinofuranosidaz 0,065 U/mL, asetil esteraz aktivitesini 0,006 U/mL olarak belirlemişlerdir. Wallace ve ark. [255] *A. niger*'den 0,05 U/mL, *Penicillium funiculosum*'dan 0,12 U/mL, *Trichoderma reesei*'den 0,02 U/mL α -L-arabinofuranosidaz aktivitesi elde etmişlerdir. Tarama deneyleri sonucunda seçilen 6 izolattan birisi olan AOA40 izolatından elde edilen α -L-arabinofuranosidaz aktivitesi inkübasyonun 4. gününde 0,299 U/mL (Şekil 4.9), asetil esteraz aktivitesi inkübasyonun 3. gününde 0,441 U/mL (Şekil 4.10), mannopiranosidaz aktivitesi ise inkübasyonun 2. gününde 0,262 U/mL (Şekil 4.11) olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında oldukça iyi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.9. Tarama sonucu seçilen izolatların α -L-arabinofuranosidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.



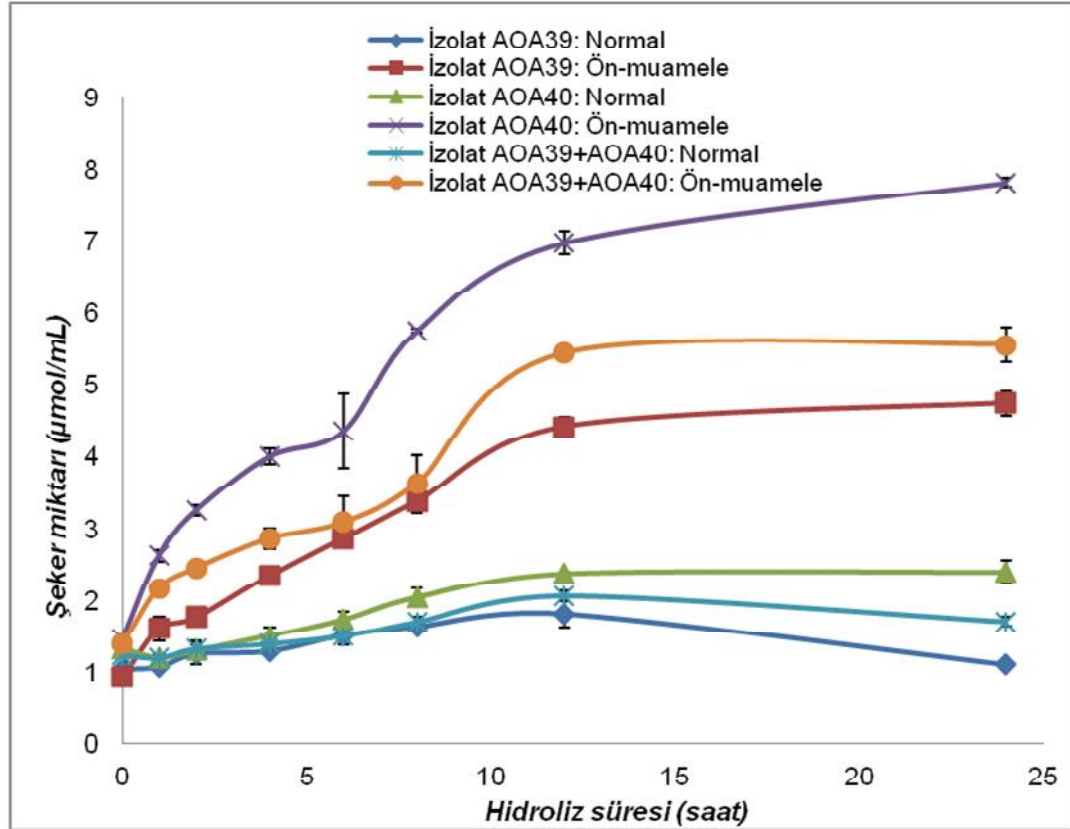
Şekil 4.10. Tarama sonucu seçilen izolatların asetil esteraz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.



Şekil 4.11. Tarama sonucu seçilen izolatların mannopiranosidaz üretimlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

4.3. SEÇİLEN SUŞLARININ LİGNOSELÜLOZİK MATERYALİ ŞEKERE DÖNÜŞTÜREBİLME KAPASİTELERİNİN TESPİTİ.

AOA40 izolatının sıvı kültüründen elde edilen kültür sıvısı ile ön-muamelesiz samanın 24 saatlik hidrolizi sonucunda, 2,40 mmol/L indirgenmiş şeker elde edilmiştir. Ön-muameleli samanın hidrolizinden ise 7,82 mmol/L şeker elde edilmiştir (Şekil 4.12). Samanın ön-muameleye tabii tutulması ise ürün miktarını yaklaşık 3-kat artırmıştır. Bundan dolayı AOA40 izolatının kültür sıvısı, ön-muameleli samanı, ön-muamelesiz samana göre daha etkin şekilde parçaladığı söylenebilmektedir. Kristensen ve ark [168], Rosgaard ve ark [261], Wang ve ark [262] tarafından ön-muamelenin buğday samanının hidrolizini kolaylaştırdığına dair bulgular yayımlanmıştır.



Şekil 4.12. İzolat AOA39 ve AOA40'ın tek başlarına ve birlikte iken normal buğday samanı ve ön-ışleme tabii tutulmuş samandan serbest bıraktıkları toplam şekerin zamana bağıli değışimi.

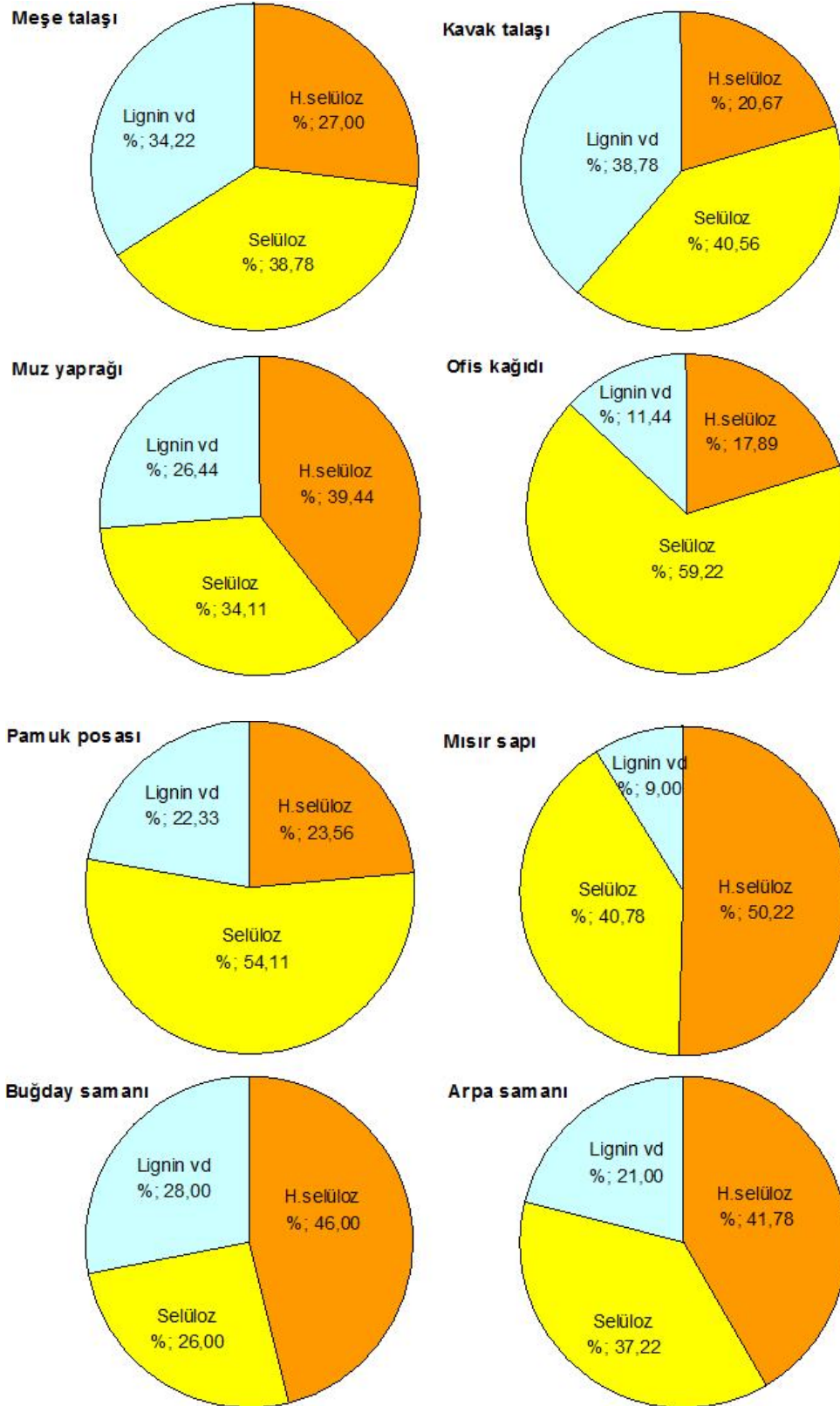
Endoglukanaz aktivitesince daha başarılı olan AOA39 izolatu ile endoksilanaz aktivitesince daha başarılı AOA40 izolatının birlikte samanı daha verimli şekilde hidroliz edebileceği düşünülerek, birlikte hidrolize tabii tutulmuştur. Sonuçta iki izolatın ayrı ayrı hidroliz oranlarının neredeyse yarısı kadar bir hidroliz ürünü elde edilmiştir.

AOA40 izolatının ön-muameli ve ön-muamelesiz saman hidroliz veriminin maksimum artış gösterdiği saat ise 4-12 saat aralığıdır. Hidroliz işlemi için enzim kaynağı olarak *Streptomyces sp. AOA40* suşu seçilmiştir.

4.4.KULLANILACAK SUBSTRATLARIN LİGNOSELÜLOZİK İÇERİKLERİ

Çalışma sırasında kullanılan substratlardan hemiselüloz oranı en yüksek olanı %50,22 ile mısır sapıdır. Bunu sırasıyla buğday samanı (%46), arpa samanı (%41,78), muz yaprağı (%39,44), meşe talaşı (%27,00), pamuk posası (%23,56), ofis kağıdı (%17,89) izlemektedir. Selüloz oranı en yüksek substrat ise ofis kağıdı (%59,22) olup, bunu pamuk posası (%54,11), mısır sapı (%40,78), kavak talaşı (%40,56), meşe talaşı (%37,78), arpa samanı (%37,22), muz yaprağı (%34,11) ve buğday samanı (%26) takip etmektedir. En yüksek lignin içeriğine sahip substrat ise kavak talaşıdır (%38,78). Kavak talaşını sırasıyla meşe talaşı (%34,22), buğday samanı (%28), muz yaprağı (%26,44), pamuk posası (%22,33), arpa samanı (%21), ofis kâğıdı (%11,00) ve mısır samanı (%9,00) takip etmektedir (Şekil 4.13).

Sánchez ve ark. [132] tarafından kağıttaki ligninin %0-15, hemiselülozun %0 ve selülozun %85-99 olduğu; buğday samanında bulunan ligninin %16-21, hemiselülozun %26-32 ve selülozun %29-35 olduğu; arpa samanındaki ligninin %14-15, hemiselülozun %24,29 ve selülozun ise %31-34 olduğu belirtilmiştir. Howard ve ark. [198] tarafından sert odunlarda selülozun %40-55, hemiselülozun %24-40 ve ligninin %18-25; yumuşak odunlarda ise selülozun %45-50, hemiselülozun %25-35 ve ligninin %25-35; kağıtta selülozun %85-99, hemiselülozun %0, ligninin %0-15; buğday samanında selülozun %30, hemiselülozun %50 ve ligninin %15 oranında bulunduğu belirtilmiştir. Lavoie ve ark. [254] tarafından yapılan çalışmada ise buğday samanında %39,7 selüloz, %36,5



Şekil 4.13. Sekiz farklı lignoselülozik substratın gravimetrik olarak belirlenmiş olan içerik oranları (%).

hemiselüloz ve %17,3 lignin; mısır sapında %38 selüloz, %26 hemiselüloz ve %19 lignin; arpa samanında %42 selüloz, %28 hemiselüloz; meşede ise %38 selüloz, %29 hemiselüloz ve %25 lignin bulunduğu rapor edilmiştir. Elde ettiğimiz substrat içerikleri daha önce elde edilenlerle genel olarak paralellik göstermektedir. Fakat çalışmamızda yer alan substratların bazılarında (meşe talaşı, kavak talaşı, buğday samanı) lignin oranı literatürdekilerden yüksek çıkmıştır. Bunun sebebi çalışmada kullanılan substratın türünden kaynaklanabileceği gibi ölçüm sırasında kül ve diğer maddelerin lignin ile birlikte yer almasından da kaynaklanabilmektedir.

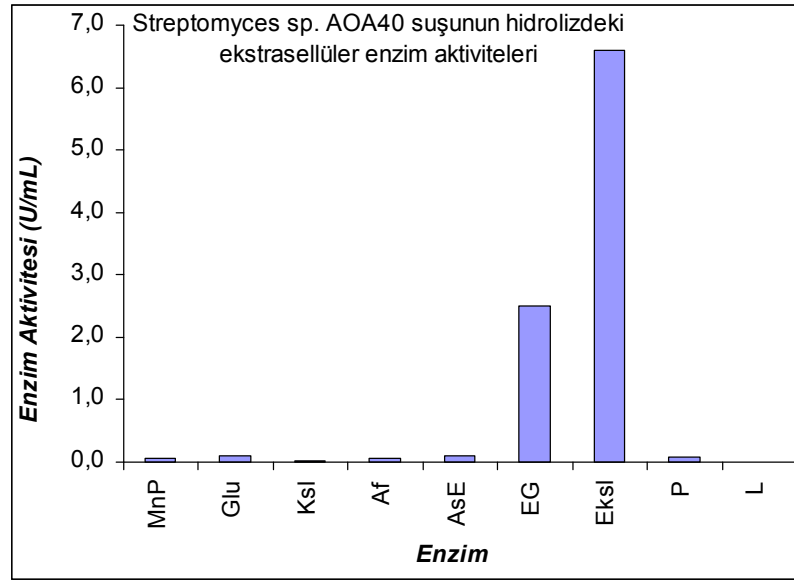
4.5. HİDROLİZ SIVISINDAKİ ENZİMLER

Hidroliz çalışmalarında kullanılan AOA40 suşunun sıvı kültüründen elde edilen ve Amicon sistemle deriştirilen hidroliz sıvısında en yüksek aktiviteye sahip enzim endoksilanaz olmuştur (Şekil 4.14.). Bunu endoglukanaz, asetil esteraz, β -glukosidaz, peroksidaz, mannopiranosidaz, α -L-arabinofuranosidaz, β -ksilosidaz ve lakkaz takip etmiştir (Şekil 4.14). Özgül aktivitesi (U/mg protein) en yüksek olandan düşüğe doğru enzimler, sırasıyla endoksilanaz (343,273), endoglukanaz (130,006), asetil esteraz (5,719), β -glukosidaz (5,507), peroksidaz (4,663), mannopiranosidaz (3,319), α -L-arabinofuranosidaz (3,319), β -ksilosidaz (1,553) ve lakkazdır (0,017) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Hidroliz deneylerinde kullanılan *Streptomyces sp. AOA40* suşunun kültür sıvısında bulunan ekstreselellüler enzimlerin aktiviteleri ve özgül aktiviteleri

Enzim	Aktivite (U/mL)	St. Sapma	Özgül Aktivite (U/mg protein)
Mannopiranosidaz	0,064	0,014	3,319
β -Glukosidaz	0,106	0,027	5,507
β -Ksilosidaz	0,030	0,006	1,553
α -L-Arabinofuranosidaz	0,064	0,006	3,319
Asetil esteraz	0,110	0,021	5,719
Endoglukanaz	2,500	0,371	130,006
Endoksilanaz	6,601	0,233	343,273
Peroksidaz	0,090	0,006	4,663
Lakkaz	0,000	0,001	0,017

Hidroliz çalışmalarında kullanılan *Streptomyces* sp. AOA40 suşunun sıvı kültürdeki 5 günlük inkübasyonu sırasında üretmiş oldukları ekstrasellüler enzimlerin günlük üretimleri ile değiştirilmiş olan hidroliz sıvısının deriştirme kat sayısı arasında her bir enzim için ayrı ayrı değerlendirildiğinde 2-3 kat aktivite kaybı görülmektedir. Bu aktivite kaybı hidroliz için üretilen süpernatantın biriktirilmesi amacıyla dondurucuda uzun süre bekleyerek deneye başlanmasından, süpernatant içindeki çözünabilir şeker miktarının azalması için yapılan ultrafiltrasyon işleminden ya da uygun olmayan sıcaklıkta santrifüjlemeden kaynaklanabilir.

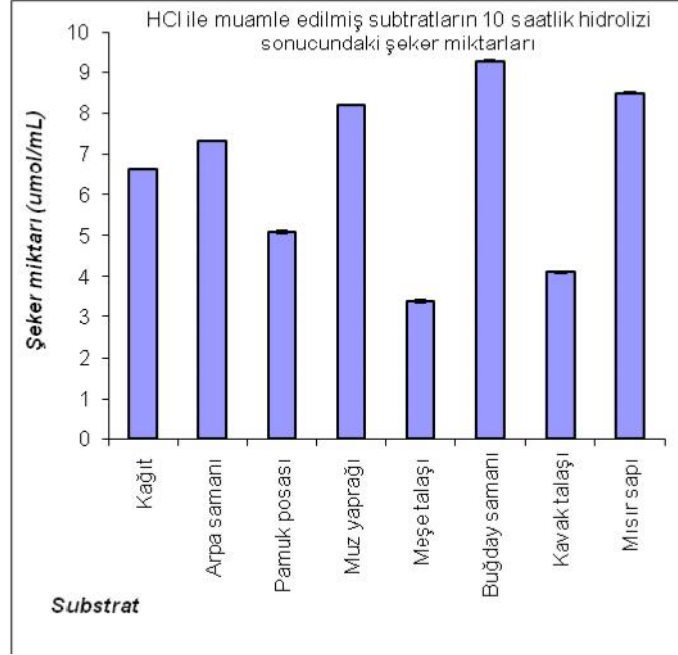


Şekil 4.14. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilmiş hidroliz sıvısındaki enzimler ve aktiviteleri. **MnP**: mannopiranosidaz; **Glu**: β -Glukosidaz; **Ksl**: β -Ksilosidaz; **Af**: α -L-Aabinofuronosidaz; **AsE**: asetil esteraz; **EG**: Endoglukonaz; **Eksl**: Endoksilanaz; **P**: perokidaz ve **L**:Lakkaz.

4.6. FARKLI ÖN-MUAMELE ve *STREPTOMYCES* SP. AOA40 İLE HİDROLİZ SONUCU ELDE EDİLEN İNDİRGENMİŞ ŞEKER MİKTARLARI.

HCl ile ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek şeker miktarı 9,27 μ mol/mL ile buğday samanından elde edilmiştir. Mısır sapı (8,49 μ mol/mL) ve muz yaprağından (8,19 μ mol/mL) elde edilen sonuçlar buğday samanınıninkine en yakın

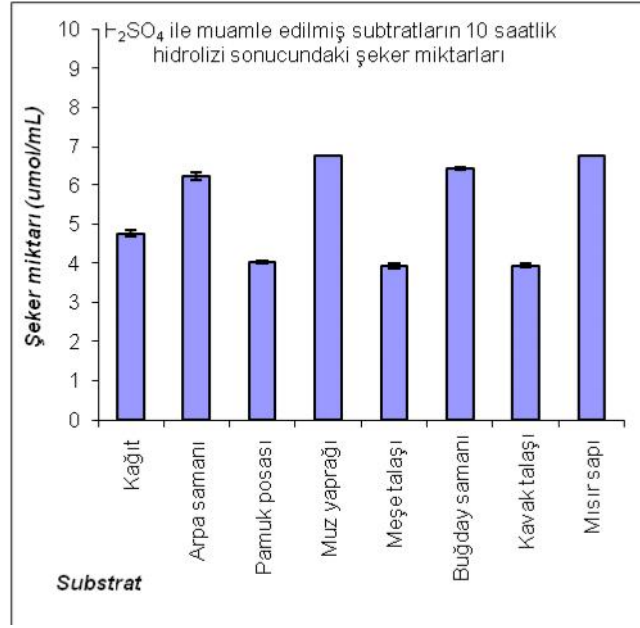
olanlardır. En düşük indirgenmiş şeker miktarı ise meşe talaşında (3,37 $\mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



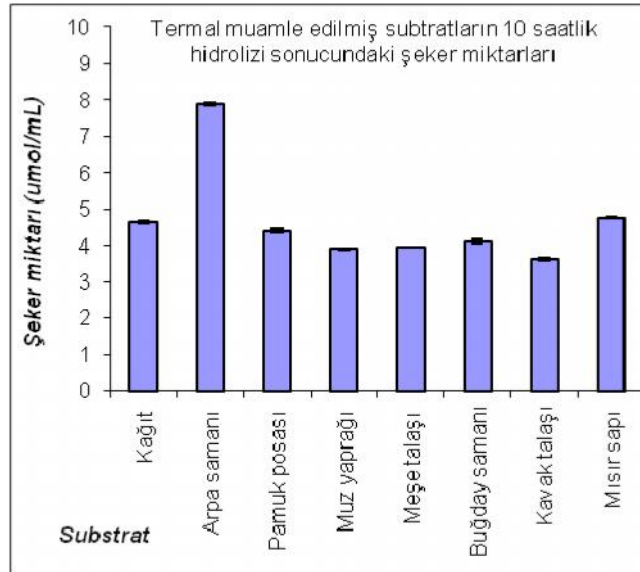
Şekil 4.15. HCl ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.

H_2SO_4 ile ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek şeker miktarı 6,75 $\mu\text{mol/mL}$ ile muz yaprağı ve mısır sapından elde edilmiştir. Buğday samanı (6,40 $\mu\text{mol/mL}$) ve arpa samanından (6,21 $\mu\text{mol/mL}$) elde edilen sonuçlar muz yaprağı ve mısır sapınıninkine en yakın olanlardır. En düşük indirgenmiş şeker miktarı ise meşe talaşında (3,92 $\mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.16).

Termal ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek şeker miktarı 7,88 $\mu\text{mol/mL}$ ile arpa samanından elde edilmiştir. Mısır sapı (4,76 $\mu\text{mol/mL}$) ve kağıttan (4,65 $\mu\text{mol/mL}$) elde edilen sonuçlar arpa samanınıninkine en yakın olanlardır. En düşük indirgenmiş şeker miktarı ise kavak talaşında (3,92 $\mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



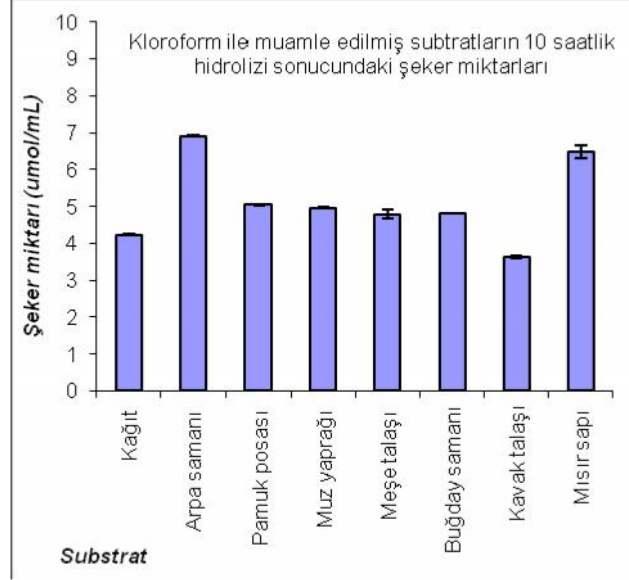
Şekil 4.16. H₂SO₄ ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.



Şekil 4.17. Termal ön-muamele ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.

Kloroform ile ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek şeker miktarı 6,91 µmol/mL ile arpa samanından elde edilmiştir. Mısır sapı (6,48 µmol/mL) ve

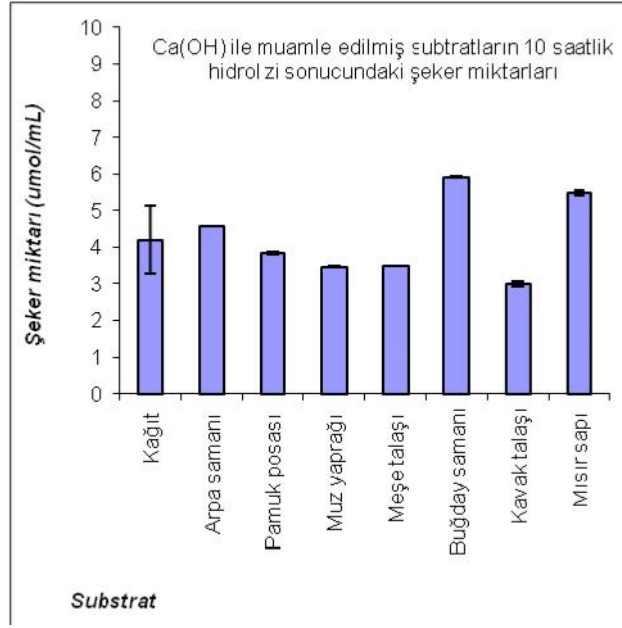
pamuktan (5,05 $\mu\text{mol/mL}$) elde edilen sonuçlar arpa samanınıninkine yakındır. En düşük indirgenmiş şeker miktarı ise kavak talaşında (3,63 $\mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).



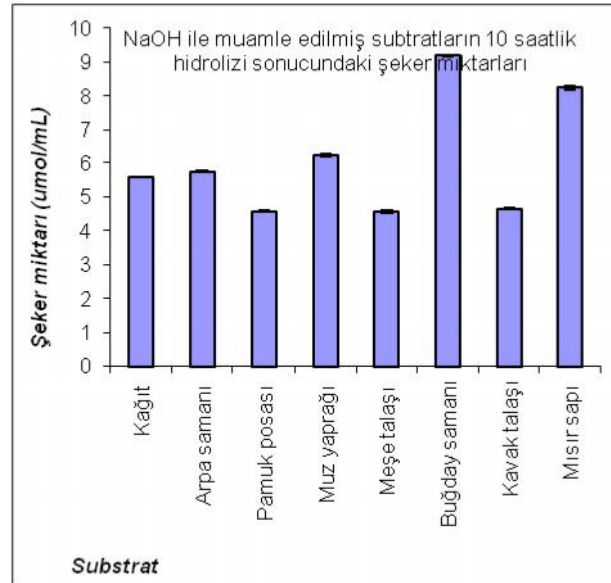
Şekil 4.18. Kloroform ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgenmiş şeker miktarları.

Kireç ile ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek şeker miktarı 5,90 $\mu\text{mol/mL}$ ile buğday samanından elde edilmiştir. Mısır sapı (5,48 $\mu\text{mol/mL}$) ve arpa samanından (4,57 $\mu\text{mol/mL}$) elde edilen sonuçlar buğday samanınıninkine en yakın olanlardır. En düşük indirgenmiş şeker miktarı ise kavak talaşında (3 $\mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).

Sodyum hidroksit ile ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek şeker miktarı 9,18 $\mu\text{mol/mL}$ ile buğday samanından elde edilmiştir. Mısır sapı (8,24 $\mu\text{mol/mL}$) ve muz yaprağından (4,57 $\mu\text{mol/mL}$) elde edilen sonuçlar buğday samanınıninkine en yakın olanlardır. En düşük sonuç kavak talaşında (4,64 $\mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir.



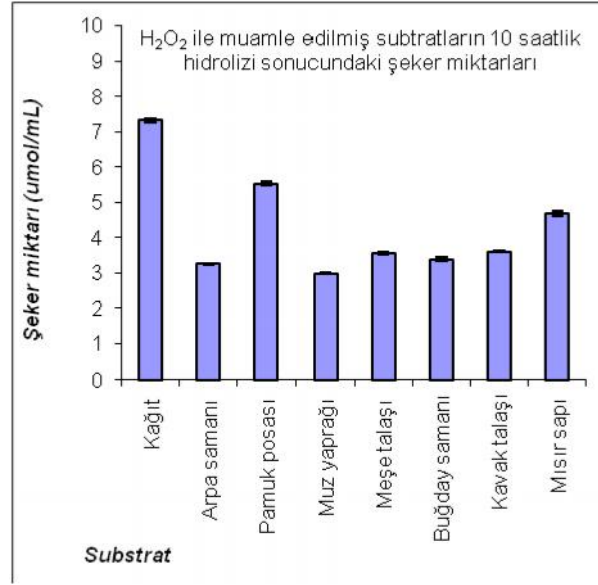
Şekil 4.19. Kireç ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.



Şekil 4.20. Sodyum hidroksit ile muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.

Hidrojen peroksit ile ön-muamele ve AOA40 izolatından elde edilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizden sonra en yüksek miktar 7,32 µmol/mL ile kağıttan elde edilmiştir. Pamuk posası (5,53 µmol/mL) ve mısır samanından (4,67

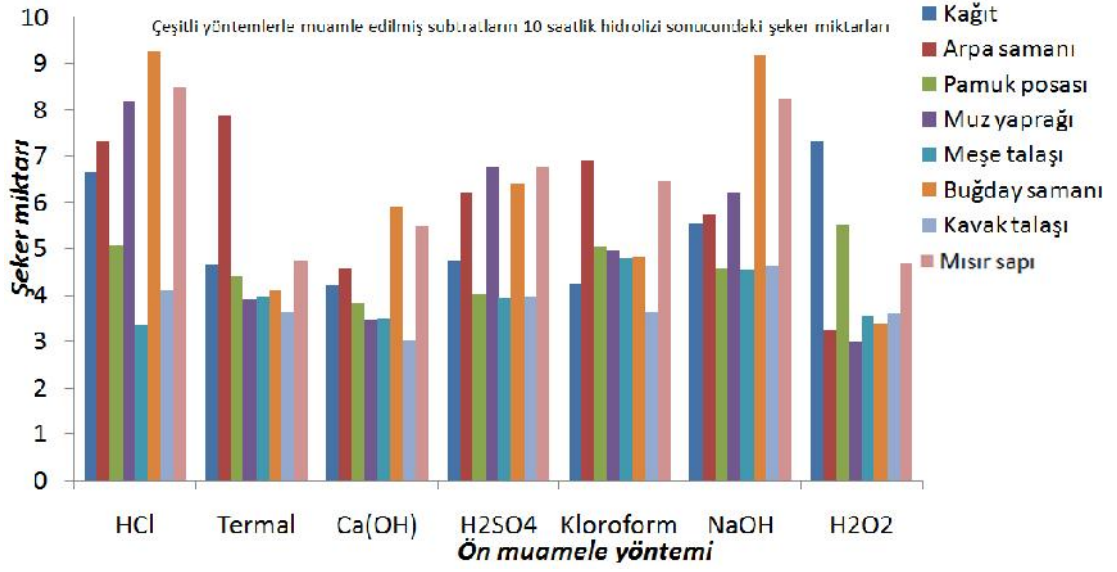
$\mu\text{mol/mL}$) elde edilen sonuçlar kağıta en yakın olanlardır. En düşük indirgenmiş şeker miktarı ise muz yaprağında ($2,92 \mu\text{mol/mL}$) gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Hidrojen peroksit ile muamele edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces* sp. AOA40 suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki indirgen şeker miktarları.

Genel olarak bakıldığında ön-muamele metodları daha çok buğday samanı, muz yaprağı, mısır sapı, arpa samanı ve kağıt üzerine etkili olmuştur (Şekil 4.22). Meşe talaşı, kavak talaşı ve pamuk posası üzerine çok az etki etmiştir. Asit ile ön-muameleler (HCl ve H_2SO_4) sonucu elde edilen sonuçların ortalaması alkali ön-muamelelerin (Ca(OH) , NaOH) sonuçlarının ortalamalarından daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 4.22).

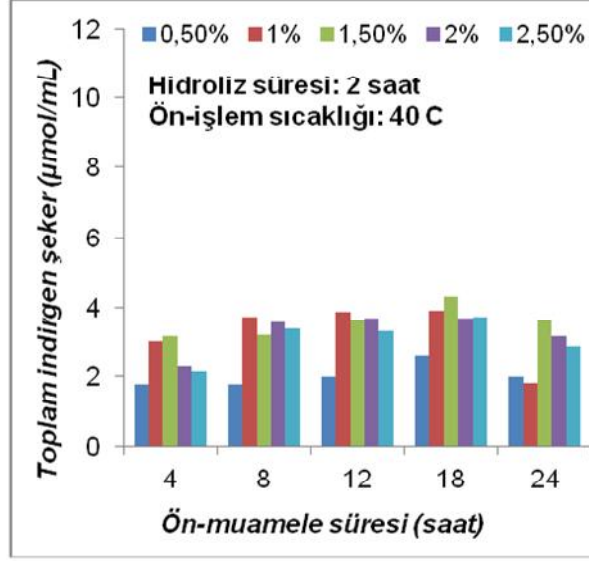
Sonuç olarak, indirgenmiş şeker miktarının en iyi elde edildiği substrat buğday samanı, en iyi ön-muamele ise NaOH olarak belirlenmiştir. Aynı ön-muamele nin diğer substratlara olan etkisi bu kadar yüksek görülmemektedir. Fakat HCl ile ön- muamele den elde edilen sonuçlar substratların 3 tanesinde (mısır sapı, buğday samanı, muz yaprağı) diğerleri ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Fakat HCl 'nin prodesteki dezavantajı kullanılan ekipmanları yıpratıcı oluşu ve ekolojik olmayışıdır.



Şekil 4.22. Yedi farklı yöntemle muamle edilmiş sekiz ayrı substratın *Streptomyces sp. AOA40* suşu tarafından üretilen ekstrasellüler enzimlerle 10 saatlik hidrolizi sonucundaki şeker miktarlarının toplu olarak değerlendirilmesi.

4.7. NaOH YÜZDESİNİN, ÖN-MUAMELE SICAKLIĞININ VE SÜRESİNİN OPTİMİZASYONU

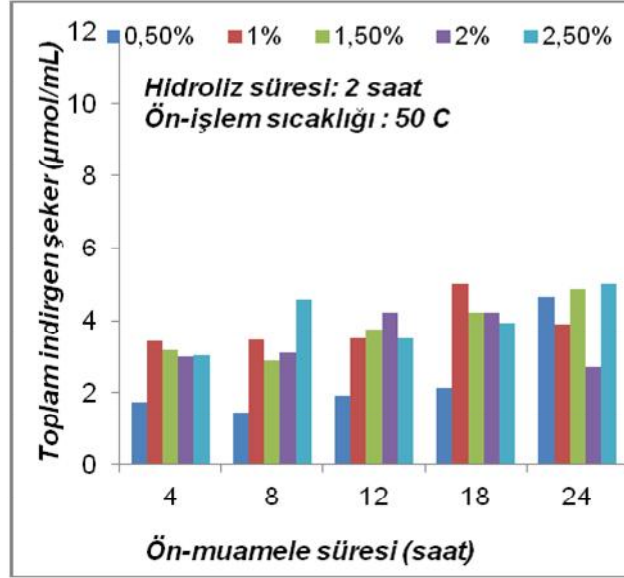
Hidroliz süresinin 2 saat, ön-muamele sıcaklığının 40 °C, ön-muamele süresinin ise 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1-1,5'lik NaOH (3,14 µmol/mL) ile; ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda ise en iyi verim %1'lik NaOH (3,74 µmol/mL) ile; ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1'lik NaOH (3,88 µmol/mL) ile; ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'lik NaOH (4,31 µmol/mL) ile; ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda ise en iyi verim %1,5'lik NaOH (3,63 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 2 saatlik hidroliz ve 40 °C ön-işlem sıcaklığında optimum ön-muamele süresi 18 saat ve NaOH oranı %1,5'dir (Şekil 4.23).



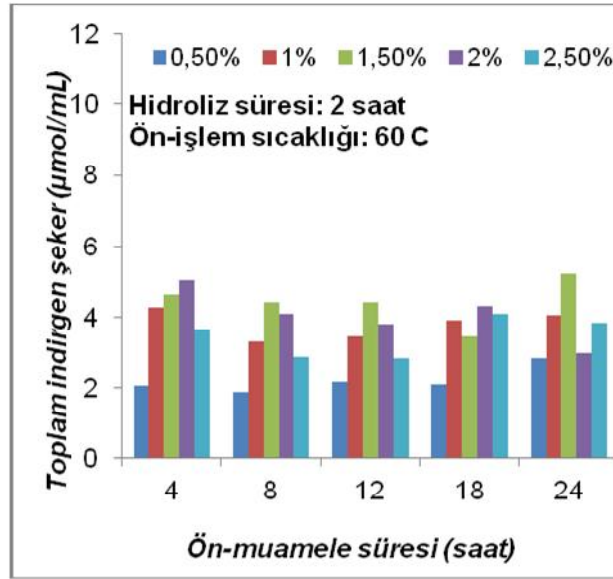
Şekil 4. 23. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

Hidroliz süresinin 2, ön-muamele sıcaklığının 50 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5’lik NaOH (3,38 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %2,5’luk NaOH (4,56 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (4,21 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (4,99 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2,5’luk NaOH (4,98 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 2 saatlik hidroliz ve 50 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamele süresi 18 saat ve NaOH oranı %1’dir (Şekil 4.24).

Hidroliz süresinin 2, ön-muamele sıcaklığının 60 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %2’lik NaOH (5,02 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (4,39 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (4,42 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (4,31 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (5,19 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 2 saatlik hidroliz ve 60 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 24 saat ve NaOH oranı %1,5’dir (Şekil 4.25).



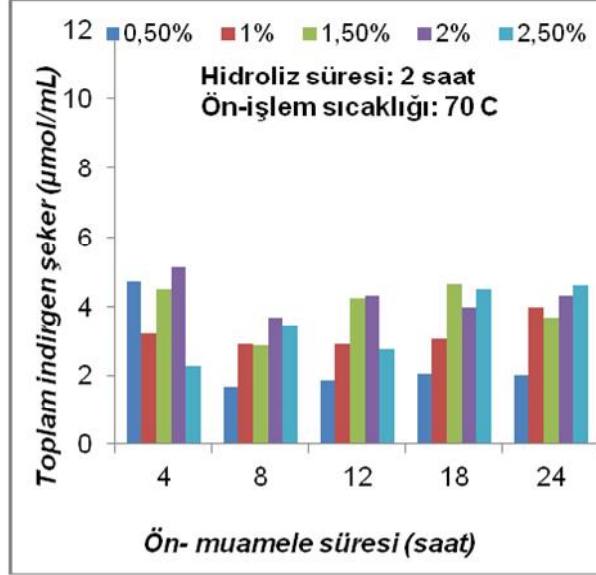
Şekil 4. 24. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.



Şekil 4. 25. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

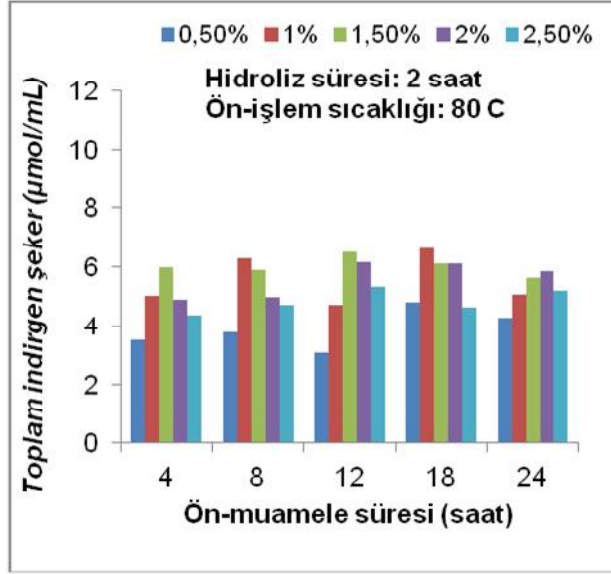
Hidroliz süresinin 2, ön-muamele sıcaklığının 70 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %2’lik NaOH (5,12 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %2’luk NaOH (3,62 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (4,29 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu

koşullarda %1’lik NaOH (4,63 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2,5’luk NaOH (4,59 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 2 saatlik hidroliz ve 70 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 4 saat ve NaOH oranı %2’dir (Şekil 4.26).



Şekil 4. 26. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 $^{\circ}\text{C}$ ’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelерinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

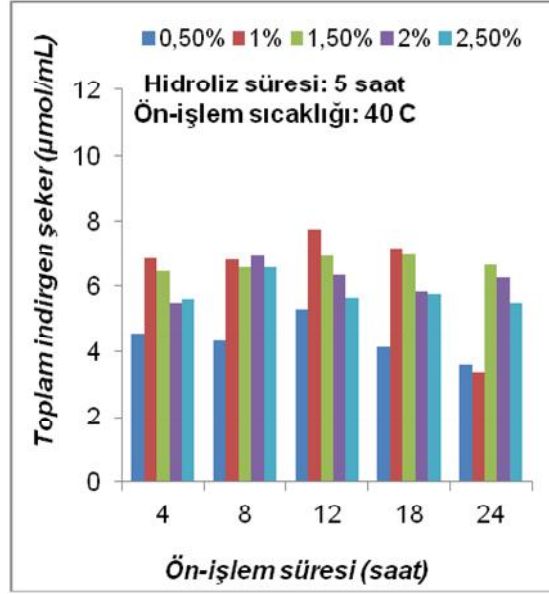
Hidroliz süresinin 2, ön-muamele sıcaklığının 80 $^{\circ}\text{C}$, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5’luk NaOH (5,96 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1’luk NaOH (6,29 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (6,47 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (6,6 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (5,84 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 2 saatlik hidroliz ve 70 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 12 saat ve NaOH oranı %1,5’dur (Şekil 4.27).



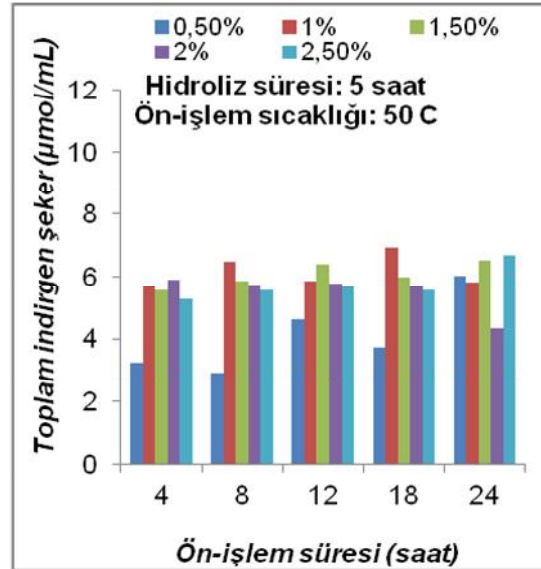
Şekil 4. 27. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 2 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

Hidroliz süresinin 5, ön-muamele sıcaklığının 40 °C, önmuamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1'lik NaOH (6,81 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (6,77 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (7,74 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (6,95 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (6,63 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 5 saatlik hidroliz ve 40 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 12 saat ve NaOH oranı %1'dir (Şekil 4.28).

Hidroliz süresinin 5, ön-muamele sıcaklığının 50 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %2,'lik NaOH (5,93 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (6,48 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5'lik NaOH (6,41 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (6,93 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2,5'luk NaOH (6,62 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 5 saatlik hidroliz ve 50 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 18 saat ve NaOH oranı %1'dir (Şekil 4.29).



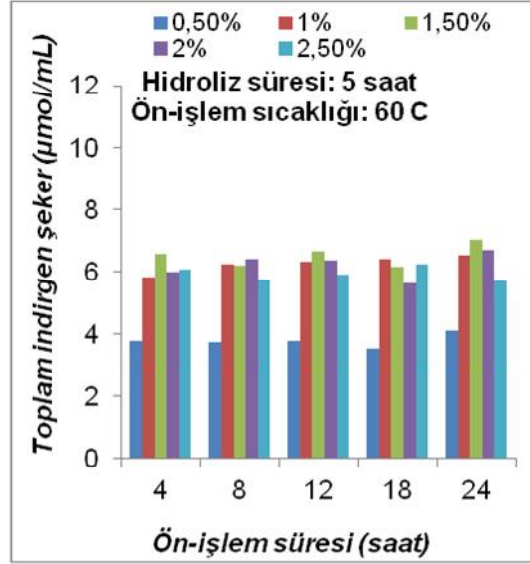
Şekil 4.28. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.



Şekil 4.29. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

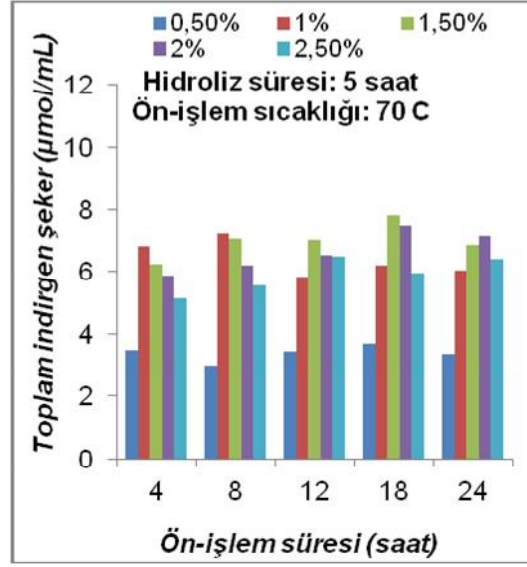
Hidroliz süresinin 5, ön-muamele sıcaklığının 60 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5’luk NaOH (6,5 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (6,42 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (6,67 µmol/mL), ön-

muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (6,42 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (7,03 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 5 saatlik hidroliz ve 60 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 24 saat ve NaOH oranı %1,5'dur (Şekil 4.30)



Şekil 4.30. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 $^{\circ}\text{C}$ 'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelерinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

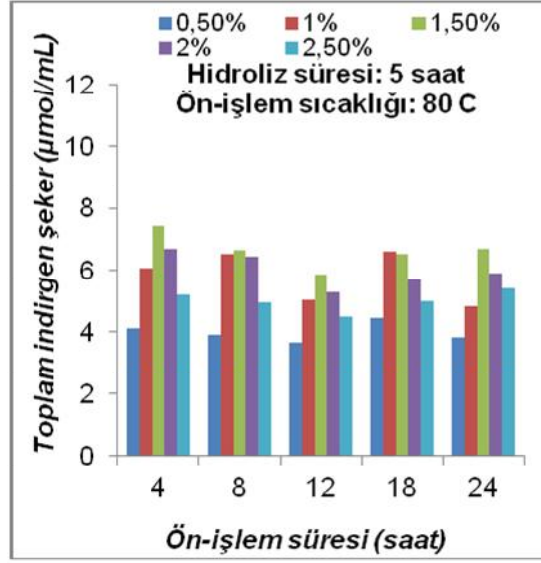
Hidroliz süresinin 5, ön-muamele sıcaklığının 70 $^{\circ}\text{C}$, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1'lik NaOH (6,81 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (7,25 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (7,03 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (7,82 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (7,13 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 5 saatlik hidroliz ve 70 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 18 saat ve NaOH oranı %1,5'dur (Şekil 4.31).



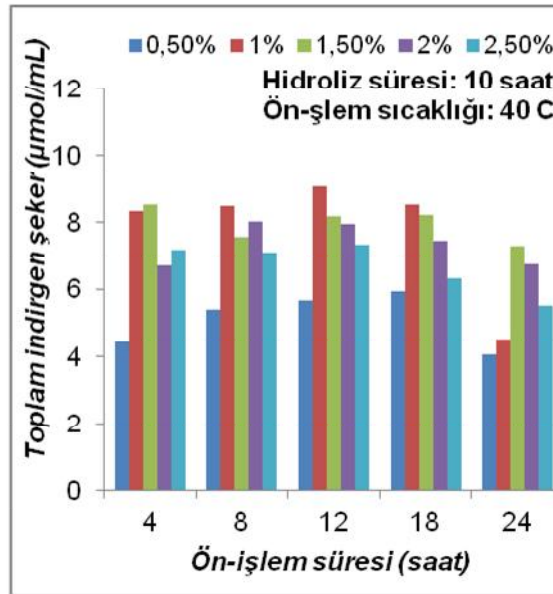
Şekil 4.31. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

Hidroliz süresinin 5, ön-muamele sıcaklığının 80 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5’luk NaOH (7,43 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (6,63 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5’lik NaOH (5,87 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (6,6 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (6,62 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 5 saatlik hidroliz ve 80 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 18 saat ve NaOH oranı %1,5’dur (Şekil 4.32)

Hidroliz süresinin 10, ön-muamele sıcaklığının 40 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5’luk NaOH (8,54 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (8,51 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (9,07 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (8,53 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5’lik NaOH (7,32 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 10 saatlik hidroliz ve 40 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 12 saat ve NaOH oranı %1’dir (Şekil 4.33).



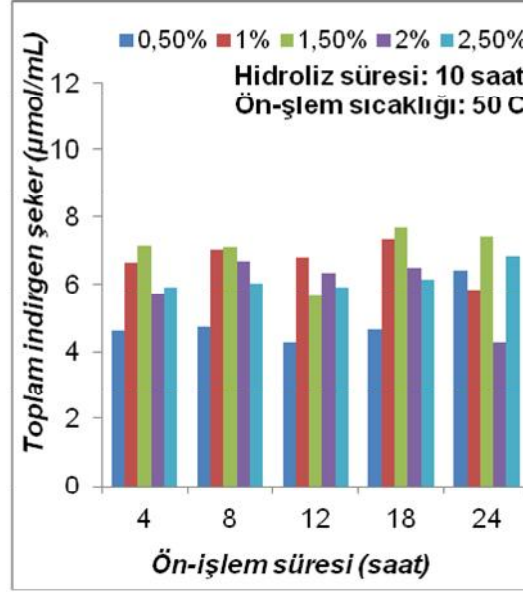
Şekil 4.32. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 5 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.



Şekil 4.33. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

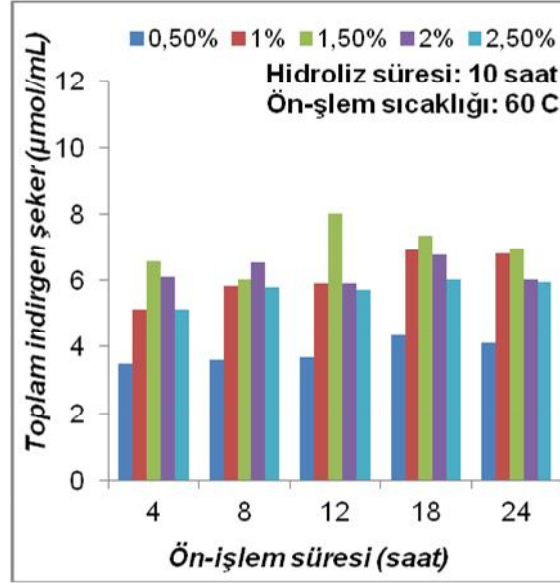
Hidroliz süresinin 10, ön-muamele sıcaklığının 50 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5’luk NaOH (7,14 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (7,1 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (6,78 µmol/mL), ön-

muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (7,66 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (7,38 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 10 saatlik hidroliz ve 50 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 18 saat ve NaOH oranı %1,5'dur (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 $^{\circ}\text{C}$ 'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelерinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

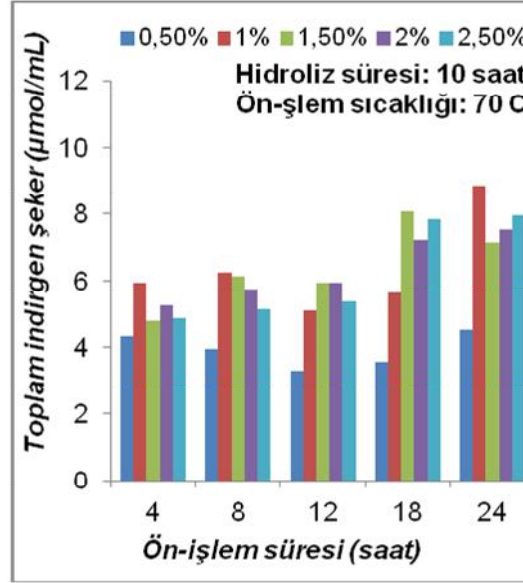
Hidroliz süresinin 10, ön-muamele sıcaklığının 60 $^{\circ}\text{C}$, ön-muamelesüresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'lik NaOH (6,55 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (6,52 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH 8,02 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (7,37 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (6,96 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 10 saatlik hidroliz ve 60 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 12 saat ve NaOH oranı %1,5'dur (Şekil 4.35).



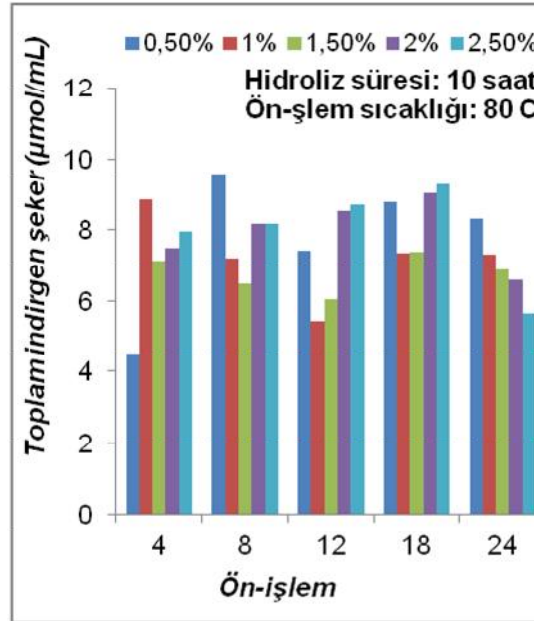
Şekil 4.35. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C’deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelерinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

Hidroliz süresinin 10, ön-muamele sıcaklığının 70 °C, ön-muamelesüresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1’lik NaOH (5,94 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (6,26 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (5,95 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1,5’luk NaOH (8,05 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1’lik NaOH (8,87 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 10 saatlik hidroliz ve 70 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 24 saat ve NaOH oranı %1 dir (Şekil 4.36).

Hidroliz süresinin 10, ön-muamele sıcaklığının 80 °C, ön-muamelesüresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1’lik NaOH (8,87 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %0,5’lik NaOH (9,56 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (8,52 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %2’lik NaOH (9,03 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %0,5’lik NaOH (8,3 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 10 saatlik hidroliz ve 80 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 8 saat ve NaOH oranı %0,5’ dir (Şekil 4.37).



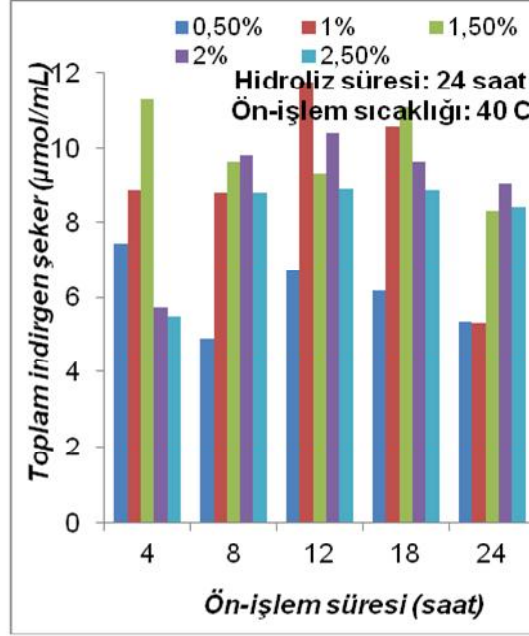
Şekil 4.36. NaOH ile muamele yönteminde ön-ışlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C'deki ön-ışlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.



Şekil 4.37. NaOH ile muamele yönteminde ön-ışlem sıcaklığının optimizasyonu: 10 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-ışlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

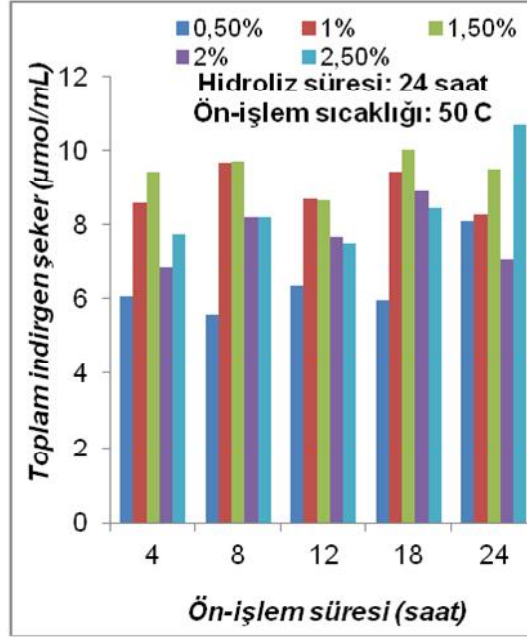
Hidroliz süresinin 24, ön-muamele sıcaklığının 40 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'luk NaOH (11,26 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (9,79 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (11,74 µmol/mL), ön-

muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (11,08 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (9,02 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 24 saatlik hidroliz ve 40 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 12 saat ve NaOH oranı %1'dir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 40 $^{\circ}\text{C}$ 'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sürelerinin indirgen şeker verimine etkisi.

Hidroliz süresinin 24, ön-muamele sıcaklığının 50 $^{\circ}\text{C}$, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'luk NaOH (9,44 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (9,72 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (8,68 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (10,02 $\mu\text{mol/mL}$), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2,5'luk NaOH (10,67 $\mu\text{mol/mL}$) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 24 saatlik hidroliz ve 50 $^{\circ}\text{C}$ ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 18 saat ve NaOH oranı %2,5'dur (Şekil 4.39).

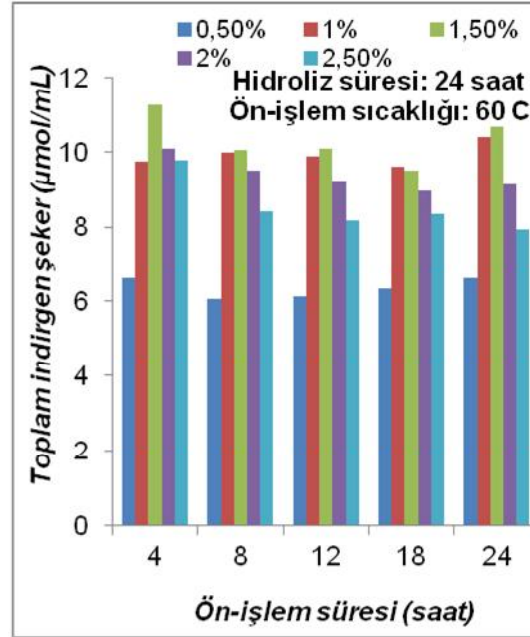


Şekil 4.39. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 50 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

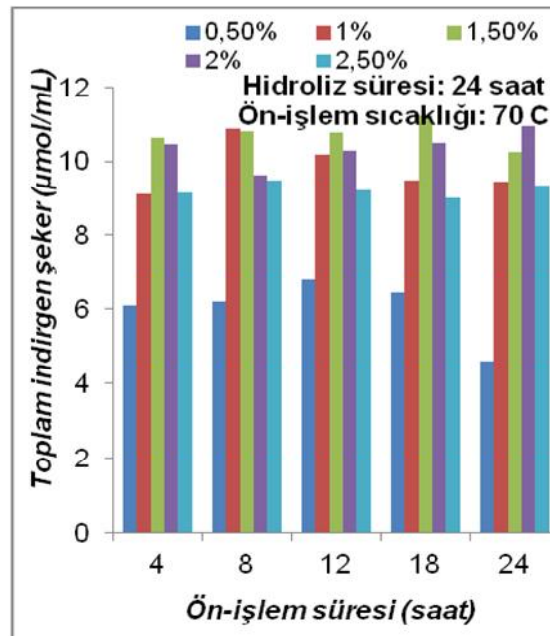
Hidroliz süresinin 24, ön-muamele sıcaklığının 60 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'lik NaOH (11,27 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (10,08 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (10,1 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (9,63 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (10,68 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 24 saatlik hidroliz ve 60 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 4 saat ve NaOH oranı %1,5'dur (Şekil 4.40).

Hidroliz süresinin 24, ön-muamele sıcaklığının 70 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'luk NaOH (10,61 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (10,88 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (10,76 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (10,48 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (10,95 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 24 saatlik hidroliz ve 70 °C ön-muamele

sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 18 saat ve NaOH oranı %1,5 dur (Şekil 4.41).

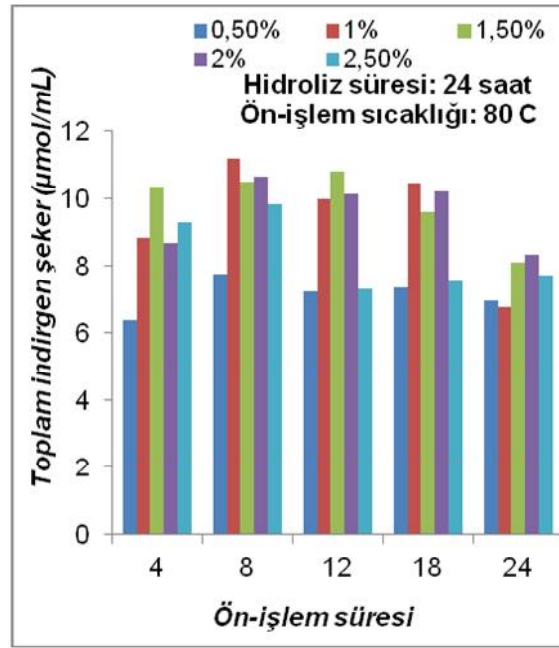


Şekil 4.40. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 60 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelерinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.



Şekil 4.41. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 70 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelерinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

Hidroliz süresinin 24, ön-muamele sıcaklığının 80 °C, ön-muamele süresinin 4 saat olduğu koşullarda en iyi verim %1,5'luk NaOH (10,35 µmol/mL), ön-muamelenin 8 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (11,19 µmol/mL), ön-muamelenin 12 saat olduğu koşullarda %1,5'luk NaOH (10,82 µmol/mL), ön-muamelenin 18 saat olduğu koşullarda %1'lik NaOH (10,47 µmol/mL), ön-muamelenin 24 saat olduğu koşullarda %2'lik NaOH (8,33 µmol/mL) ile gerçekleştirilmiştir. Genel olarak, 10 saatlik hidroliz ve 80 °C ön-muamele sıcaklığında optimum ön-muamelesüresi 8 saat ve NaOH oranı %1'dir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. NaOH ile muamele yönteminde ön-işlem sıcaklığının optimizasyonu: 24 saatlik enzimatik hidroliz ve 80 °C'deki ön-işlem sıcaklığında, farklı NaOH yüzdelerinin ve farklı ön-muamele sıcaklıklarının indirgen şeker verimine etkisi.

Herbir hidroliz süresi ayrı ayrı ele alındığında 2 saatlik hidroliz sonucunda en iyi sonuç %1'lik NaOH ile 80 °C'de 18 saat ön-muameleyle, 5 saatlik hidroliz sonucunda en iyi sonuç %1,5'luk NaOH ile 80 °C'de 18 saat ön-muameleyle, 10 saatlik hidroliz sonucunda en iyi sonuç %0,5'luk NaOH ile 80 °C'de 8 saat ön-muameleyle ve 24 saatlik hidroliz sonucunda en iyi sonuç %1,5'luk NaOH ile 60 °C'de 4 saat ön-muameleyle elde edilmiştir.

Herbir hidroliz süresi için ayrı ayrı koşullar değerlendirildiğinde indirgenmiş şeker miktarı açısından elde edilen yüksek sonuçlar daha çok ön-muamele sıcaklığının 80 °C, sürenin ise 18 ve 24 saat olduğu koşullarda elde edilmiştir. Bu sonuç, kimyasalın etkisinin yüksek sıcaklıklarda ve uzun sürelerde daha etkileyici olacağını düşündüğümüzde oldukça normaldir. Fakat diğer ön-muamele parametreleri ile karşılaştırıldığında 50-60 °C ve 8-12 saat ön-muamele ile elde edilen sonuçlarda oldukça önemli ve uygulama açısından tercih edilebilir. Çünkü proses sıcaklığının düşük olması hem maliyet hem de prosesin kontrolü açısından oldukça önemlidir. Ön-muamele ve hidroliz süresinin azaltılması ile de aynı sürede belki de 2-kat daha fazla iş yapmaya olanak sağlanmış olacaktır. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak tercih edilecek optimum ön-muamele ve hidroliz koşulu ise %1'lik NaOH ile 50 °C'de 12 saat ön-muamele ve 10 saat hidroliz olarak belirlenmiştir.

4.8. HİDROLİZ SONUCU ELDE EDİLEN BAZI SON ÜRÜNLERİN ANALİZİ

Optimum ön-muamele ve hidroliz sonucu elde edilen ürünün ince tabaka kromatografisi (TLC) sonucunda son ürün olarak glukoz, sellobiyoz, ksiloz, arabinoz ve mannoz gözlemlenmiştir. Söz konusu şekerler için R_f değerleri sırasıyla D-glukoz 0,47; ksiloz 0,6; sellobiyoz 0,53; arabinoz 0,74 ve mannoz 0,72'dir. Örneğin yürütülmesi sonucunda içerisinde glukoz, sellobiyoz, ksiloz, arabinoz, mannoz bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.43).

Kromatogramdaki sonuçlar değerlendirildiğinde R_f değerlerinin birbirine oldukça yakın oluşu dikkati çekmektedir. Bu durum son ürünün tespitini ve kesin sonuç vermemizi zorlaştırmıştır. Bunun iyileştirilmesi için TLC plaklarında örnek yürütülürken hareketli faz sona geldiğinde plaka kurutma cihazı ile kurutulup tekrar baştan yürütme gerçekleştirilmiştir. Fakat bu sırada standartların bazılarında R_f değerleri daha belirgin hale gelmiş olsa da (ksiloz, arabinoz) diğer standartlar ve örneğin görüntülenmesinde sorun yaşanmıştır.



Şekil 4.43. Belirlenen optimal koşullarda hidrolize tabii tutulan substrattan elde edilen ürünlerin ince tabaka kromatografisinde görüntülenmesi. **X** hattı görüntülenmek istenen örnek; **K** hattı ksiloz standartını, **G** hattı glukoz standartını, **C** hattı sellobiyoz standartını, **MA** hattı mannoz ve arabinoz standartını ifade etmektedir. Kromatogram üzerinde pembe lekeli yerler pentozları, kahverengi lekeli bölgeler ise heksozları göstermektedir.

4.9. *STREPTOMYCES* SP. AOA40 İZOLATININ KULLANABİLDİĞİ KARBON KAYNAKLARI

Streptomyces sp. AOA40 izolatının glukoz, laktoz, selüloz, ksilan, mannoz, fruktoz, maltoz, trehaloz, gliserol, sodyum asetat, ksiloz, sodyum sitratı oldukça iyi kullandığı belirlenmiştir. Nişasta, rafinoz, ramnoz, galaktoz, melibiyoz, melezitozu orta ölçekte kullanabilmektedir. L-asparajinin olduğu besiyerinde ise gelişimin diğerlerine göre daha yavaş gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.44).

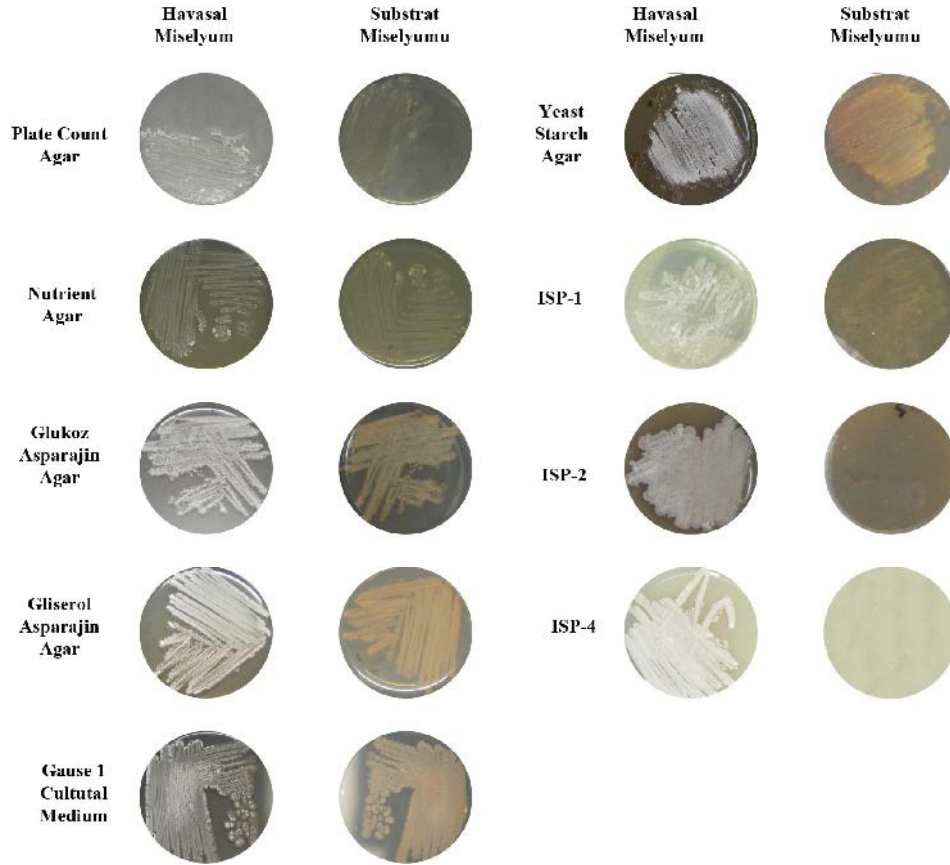


Şekil 4.44. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatının üreyebildiği besiyerleri.

4.10. *STREPTOMYCES* SP. AOA40 İZOLATININ KÜLTÜREL ÖZELLİKLERİ

Streptomyces sp. AOA40 izolatının PCA'da gelişimi sırasında havasal miselyumunun beyaz, substrat miselyumunun sarı-turuncu olduğu belirlenmiştir. Nutrient Agar'daki gelişimi sırasında havasal miselyumun beyaz ve substrat miselyumunun sarı olduğu, Glukoz Asparajin Agar'da havasal miselyumun beyazımsı gri ve substrat miselyumunun turuncu, Gliserol Asparajin Agar'da havasal miselyumun beyaz substrat miselyumunun turuncu, Gause No:1 Besiyeri'nde beyazımsı gri ve substrat miselyumunun turuncu, Yeast-Starch Agar'da havasal miselyumun beyaz ve substrat miselyumunun turuncu, ISP-1'de havasal miselyumun

beyaz ve substrat miselyumunun sarı, ISP-2’de havasal miselyumun gri ve substrat miselyumunun koyu gri, ISP-4’de havasal miselyumun beyaz-gri ve substrat miselyumunun gri olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.45).

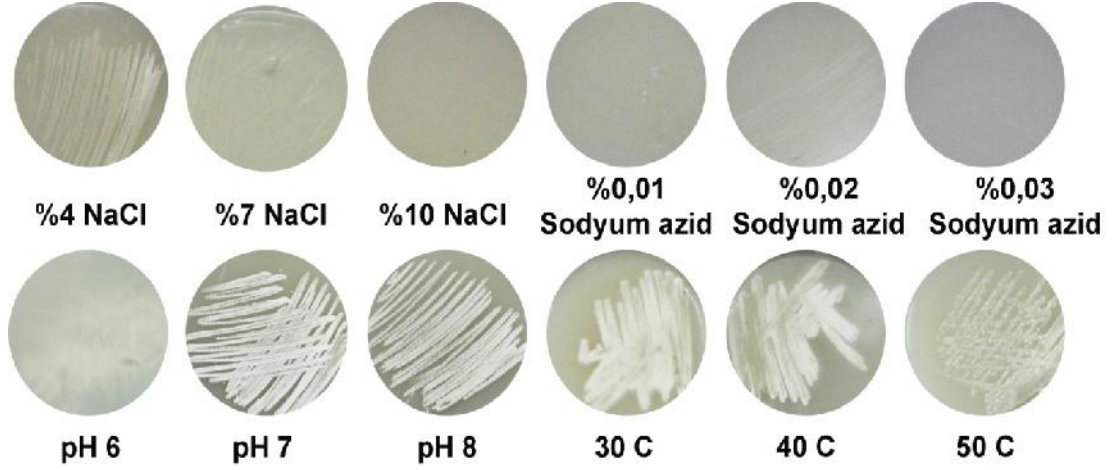


Şekil 4.45. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatının farklı besiyerlerinde substrat ve havasal miselyumlarının görüntüsü.

4.11. *STREPTOMYCES* SP. AOA40 İZOLATININ FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Streptomyces sp. AOA 40 izolatının %4 NaCl içeren besiyerinde gelişimi iyidir, %7 NaCl li besiyerindeki gelişimi azdır ve %10 NaCl içeren besiyerinde gelişimi gözlenmemiştir. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatının %0,01 sodyum azildi besiyerindeki gelişimi çok azdır, %0,02 ve %0,03 sodyum azidli besiyerinde gelişimi gözlenmemiştir. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatı pH 7 ve 8’de oldukça iyi gelişim

gösterirken pH 6'da çok az gelişme göstermiştir. İzolatın en iyi gelişim gösterdiği sıcaklık aralığı 30-40 °C'dir. Fakat 50 °C'de de gelişebildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.46).

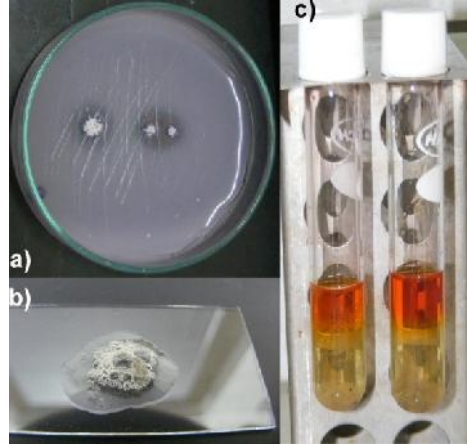


Şekil 4.46. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatının farklı fiziksel özelliklere sahip besiyerlerindeki görüntüsü.

İzolatın %0,0001'lik kristal viyole içeren besiyerindeki gelişimi sırasında boyalı besiyerinde 10 gün sonunda gelişen koloni etrafında renk giderim zonu meydana gelmiştir (Şekil 4.47).

Streptomyces sp. AOA40 izolatının NaCl'ye ve sıcaklığa olan toleransı olumlu bir özelliktir. Fakat organizmadan elde edilen enzimlerin bu tuzluluk ve sıcaklıklaraki aktiviteleri de ayrıca kontrol edilerek kesin bir yargıya varılmalıdır.

İzolatın biyokimyasal testleri sonucunda katalaz, oksidaz indol, metil red testi pozitif çıkmıştır. Jelatin hidrolizini oldukça az miktarda, kazeini ise iyi şekilde hidroliz ettiği tespit edilmiştir. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatı melanin pigmenti üretmemektedir.



Şekil 4.47. AOA40 izolatının kristal viyoleli besiyeri üzerindeki gelişimi.

4.12. BÜYÜME EĞRİSİ

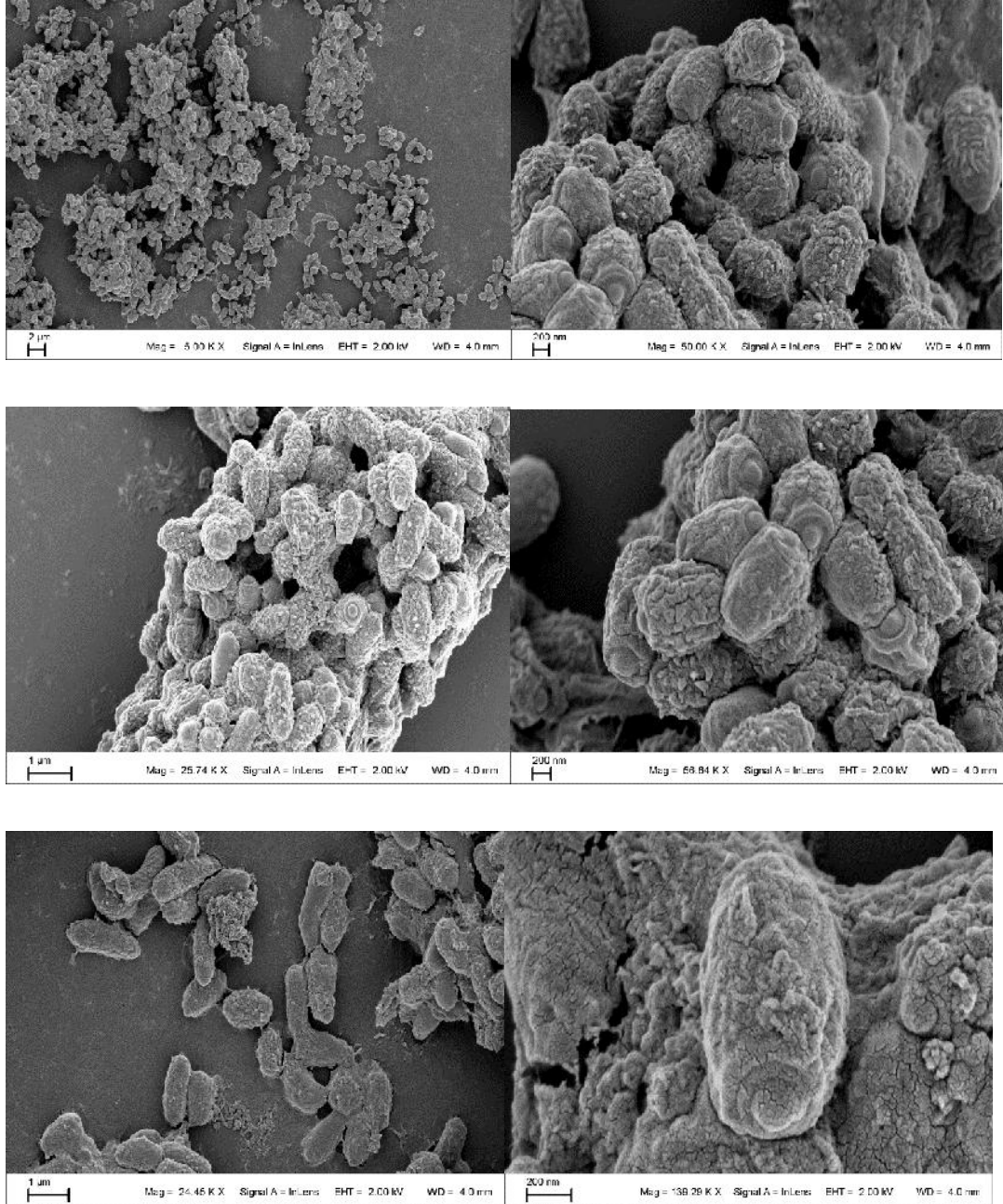
Streptomyces sp. AOA40 izolatının kuru ağırlık bakımından en yoğun bulunduğu zaman 108. saattir (Şekil 4.48). Büyüme eğrisinin çizimi genel bakteriyolojik büyüme eğrisine uygundur. Lignoselülozik degradasyonda rol alan enzimler primer metabolit oldukları için organizmanın 24-108 saatlik inkübasyonu sırasında oldukça yüksek düzeyde salgılanmıştır. Enzimatik çalışmalarla tespit edilen sonuçlarda lignoselülozik degradasyonda rol alan enzimlerin aktivitelerinin en yüksek olduğu zaman inkübasyonun üçüncü günü olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.48. *Streptomyces* sp. AOA40 izolatının büyüme eğrisi.

4.13. *STREPTOMYCES* SP. AOA40'IN SPOR YAPISI

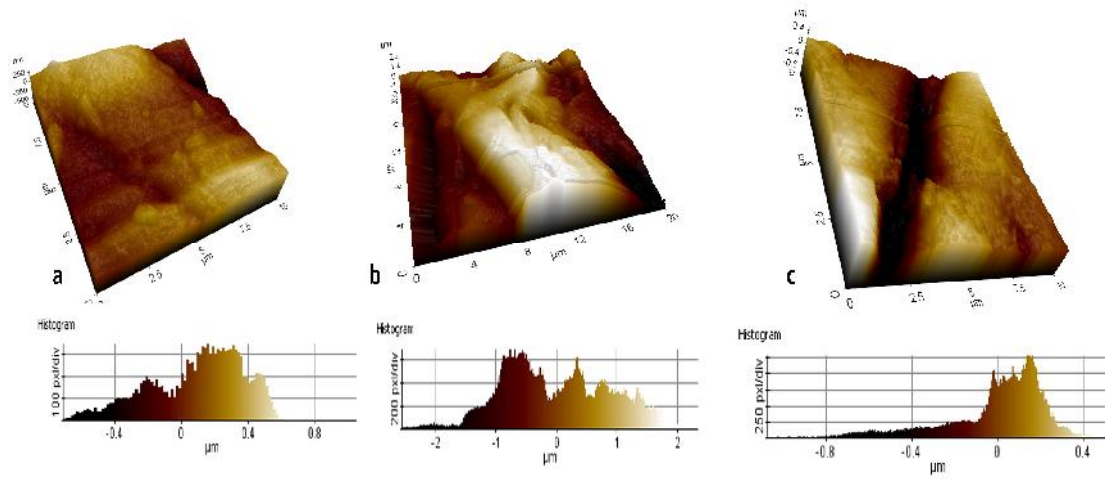
Streptomyces sp. AOA40'ın spor yapısı SEM ile incelenmiştir. Buna göre sporların genel yapısının yuvarlak olduğu tespit edilmiştir. Ardarda filament oluşturmuş yada tek tek görülmüşlerdir (Şekil 4.49).



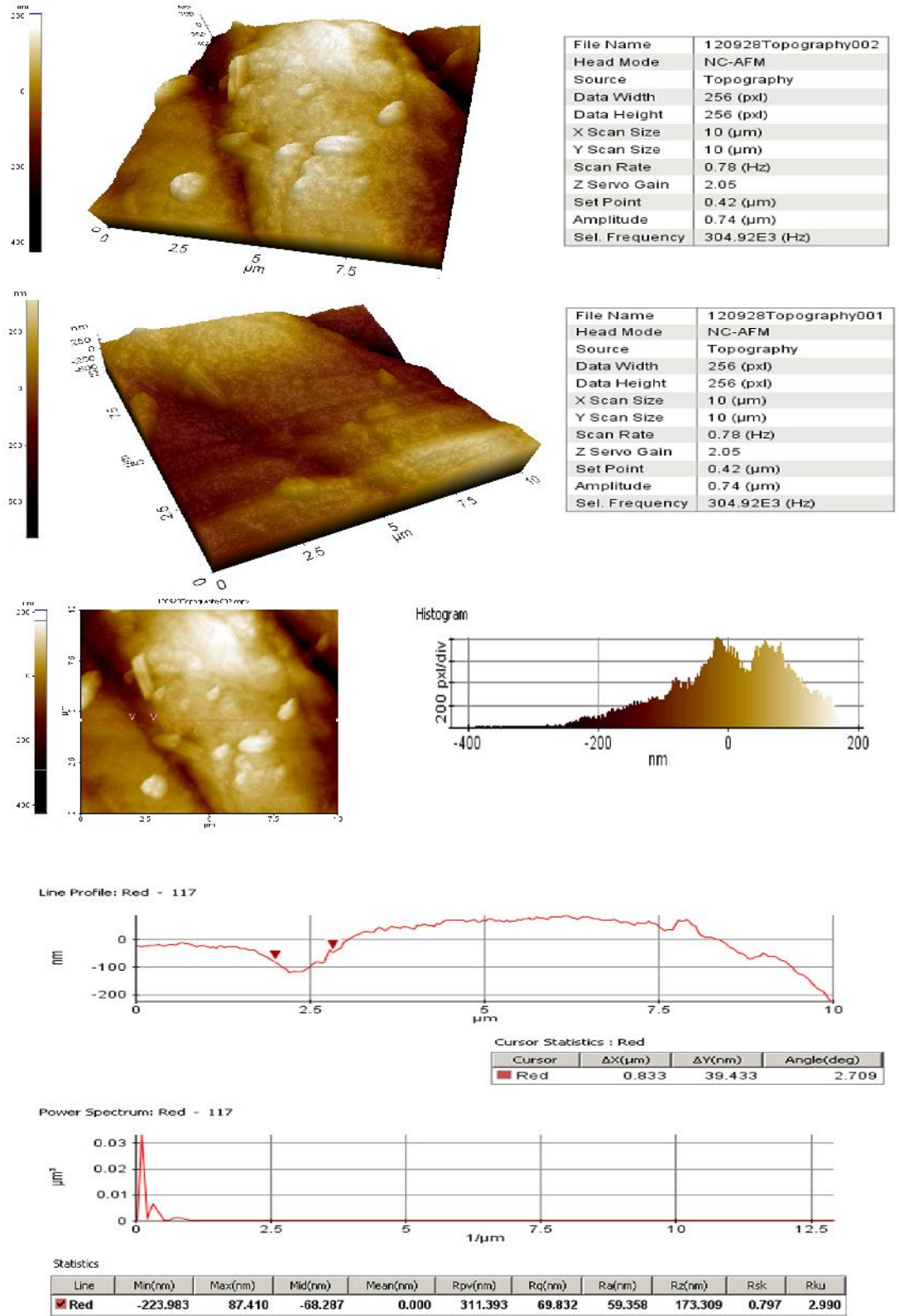
Şekil 4.49. AOA40 izolatının spor yapısının SEM'deki görüntüsü

4.14. SAMAN YÜZEYİNDEKİ TAHRİBATIN AFM İLE GÖSTERİMİ

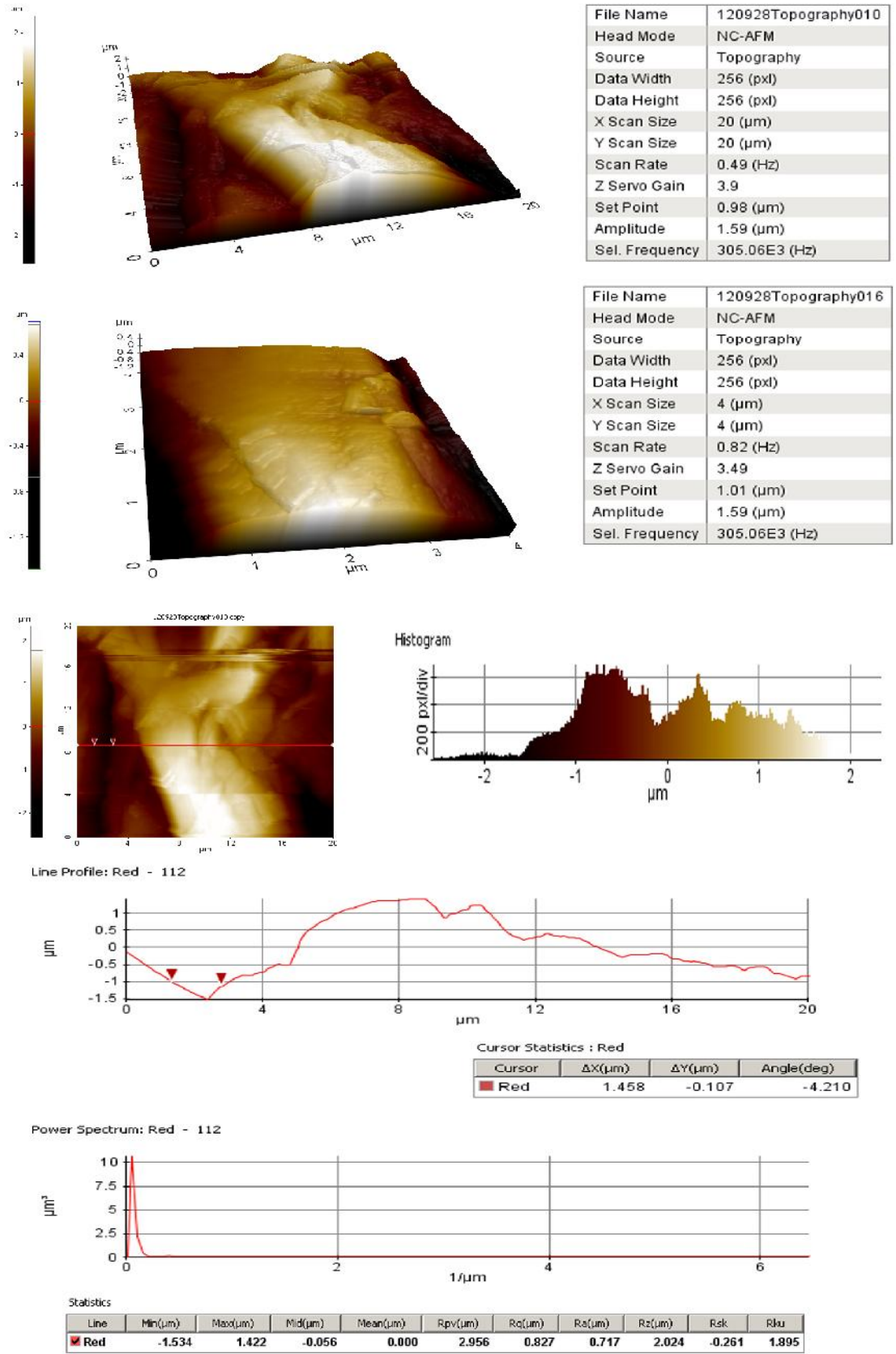
Samandan elde edilen AFM görüntüleri sonucunda saman yüzeyindeki tahribat sadece ön-muameleli ve hem ön-muamele hemde hidroliz olmuş samana göre daha azdır. Hiçbir işlem uygulanmamış samandaki tahribat mekanik parçalanma sırasında meydana gelmiştir. Normal saman üzerindeki grinti çıkıntıların en yüksek olduğu noktadaki değer 200 nm'dir (Şekil 4.50). %1'lik NaOH ile 40 °C'de 12 saat ön muameleli samanın AFM görüntüsü sonucu saman yüzeyindeki tahribatın normal samaninkine oranla daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 4.51). Ön-muameleli samanın yüzeyindeki tahribatın en fazla olduğu noktadaki yükseklik farkı 0,3 µm'dir. En fazla tahribat ise samanın %1'lik NaOH ile 40 °C'de 12 saat ön-muamele ve *Streptomyces* sp. AOA40 izolatının ekstraselüler sıvısında hidrolizinden elde edilmiştir (Şekil 4.52). Ön-muamele ve hidroliz olmuş samandaki tahribat sonucu oluşan yarıklar 0,4 µm ye kadar yükselmektedir. Tahribatın boyutu üç örneğin histogramındaki 0 – 0,4 µm lik aralıktaki topografik hareketlerin karşılaştırılmasıyla da anlaşılabilmektedir (Şekil 4.50 - Şekil 4.53).



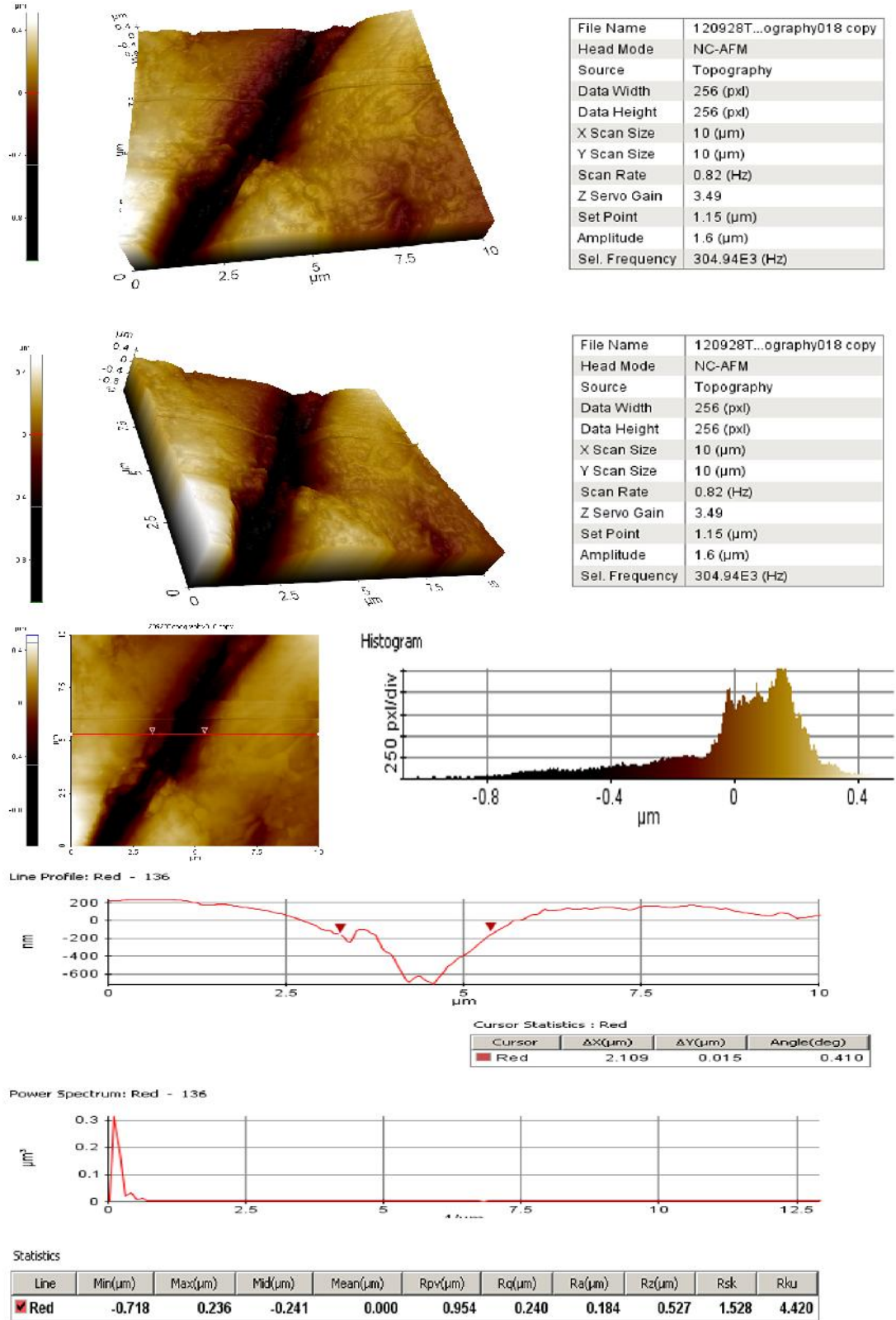
Şekil 4.50. Normal saman (a), ön-muameleli saman (b) ve hem ön-muameleye hem de enzimatik hidrolize tabi tutulmuş saman (c) yüzeylerinin AFM görüntülerinin birarada gösterimi.



Şekil 4.51. Normal samanının AFM görüntüsü.



Şekil 4.52. %1'lik NaOH ile 40°C'de 12 saat ön muameleli samanınınAFM görüntüsü.



Şekil 4.53. %1'lik NaOH ile 40°C'de 12 saat ön muameleli samanının *Streptomyces sp. AOA40* dan elde edilen ekstraselüler sıvıda hidrolizi sonucu kalan samanının AFM görüntüsü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tarımsal, ormansal ve kentsel lignoselülozik atıkların değerlendirilmesi artan enerji, ürün, gıda ihtiyacı ve çevresel problemlerden dolayı oldukça önemlidir. Bu kapsamda, çalışmamızda atık kağıt, artık buğday samanı, arpa samanı, mısır sapı, muz ağacı yaprağı, meşe ve kavak talaşı, pamuk posasının daha az maliyetli ve çevreye daha az zarar vererek endüstriyel proseslerde substrat olarak ya da başlangıç materyali olarak kullanılabilecek karbonhidratlara dönüşüm olanakları araştırılmıştır.

Hidroliz için en uygun izolatin AOA40 olduğu belirlenmiştir. AOA40 izolatinın günlük enzim analizleri sonucunda en yüksek enzim aktivitelerinin inkübasyonun üçüncü ve dördüncü günü gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Büyüme eğrisi sonuçlarına bakıldığında mikroorganizmanın lignoselülozik degradasyonda rol alan enzimlerin en fazla elde edilen değeri 6-8 g/L'lik biyokütlede elde edildiği zamanda gerçekleştirilmiştir.

AOA40 izolatinın ön-muamele lignoselülozik atığı, ön-muamelesize göre daha kolay hidroliz ettiği tespit edilmiş ve bunun için daha önceki çalışmalarda kısmi olarak optimize edilmiş farklı ön-muamele metodları uygulamalı olarak karşılaştırılmıştır.

Farklı ön-muamele metodlarının karşılaştırılması sonucunda en yüksek verim lignoselülozik materyalin buğday samanı ve ön-muamele kimyasalının NaOH olduğu koşullarda elde edilmiştir.

NaOH ile ön-muamele ve AOA40'dan elde edilen ekstraselüler enzimler ile hidroliz işleminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonucunda en uygun koşulun %1'lik NaOH ile 50 °C'de 12 saat ön-muamele ve 10 saatlik hidroliz olduğu belirlenmiştir.

Hidroliz sonucunda son ürün olarak ksiloz, glukoz, sellobiyoz, mannoz, arabinozun meydana geldiği tespit edilmiştir.

Hidroliz sırasında kullanılan mikroorganizmanın farklı besiyerlerindeki morfolojik yapısı, ışık mikroskobu görüntüsü ve elektron mikroskobundaki spor yapısı, biyokimyasal ve fizyolojik testleri, kullanabildiği karbon kaynakları göz önünde bulundurulduğunda *Streptomyces* taksonuna ait bir tür olabileceği belirlenmiştir.

Mikroorganizmanın tuzluluk ve sıcaklık gibi görece farklı koşullara karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın ışığında ortaya çıkan önerilerin başında AOA40 izolatından elde edilen enzimlerin daha kapsamlı şekilde (sıcaklık, pH, inkübasyon süresi, kullanılan karbon ve azot kaynakları) optimizasyonu gerçekleştirilerek elde edilen sonuca göre üretim yapılması gelmektedir.

Ekstarselüler enzim aktivitelerini arttıracak kimyasal maddeler araştırılmalıdır.

Çalışma sırasında kullanılan farklı ön muamele koşulları ve farklı substratlar ayrı ayrı optimize edilmelidir.

Çalışmadakilerden farklı ön-muamele koşulları araştırılmalı, kıyaslanmalı ve gerekirse optimize edilmelidir.

Kullanılan mikroorganizmanın karakterizasyonunun daha net yapılabilmesi için ilgili analizlere ek olarak faj duyarlılığı, protein örnekleri, seroloji ve moleküler genetiği çalışılmalıdır.

Çalışma sırasında AOA40 izolatının kristal viyole gibi boyaları ağarttığı tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak farklı boyalar üzerindeki etkileri belirlenmeli ve verim elde edilebilenlerde koşulların optimizasyonu yapılarak hangi faktörlerin ağartma da rol oynadığı tespit edilmelidir.

Elektroforetik analizi yapılabilen enzimler elektroforezde gösterilerek moleküler ağırlıkları tespit edilmelidir.

Optimize edilen ön-muamele ve hidroliz işlemi sonunda elde edilen son ürünün HPLC yada GC ile analiz edilmelidir. Böylelikle çalışma daha kapsamlı ve ayrıntılı sonuç elde edilebilir hale getirilmelidir.

Tespit edilemeyen lakkaz aktivitesinin tayininde gerek elektroforetik gerek se kolorimetrik olarak farklı tekniklere başvurulmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Kar, Y. and Tekeli, Y. “The potential of biomass residues in Turkey and their importance as energy sources”, *Energy Sources*, 30: 483-493, (2008).
- [2] Kaygusuz, K. and Türker, M. F. “Biomass energy potential in Turkey”, *Renewable energy*, 26: 661-678, (2002).
- [3] Gokcol, C., Dursun, B. Alboyacı, B. and Sunan, E. “İmpotance of biomass energy as alternatişve to other sources in Turkey”, *Energy Policy*, 37: 424-431, (2009).
- [4] Ateş, S., Akyıldız, M. H., Vurdu, H. and Akgül. M. “Türkiye’de orman kesim artıkları ve değ erlendirilmesi”, *Kastamonu Uni. Journal of Forestry Faculty*, 7(1): 93-103, (2007).
- [5] Barlaz, M. A. “Forest products decomposition in municipal solid waste landfills”, *Waste Menegement*, 26: 321-333, (2006).
- [6] Erdoğan, N. and Baris, E. “Environmental protection programs and conservation practices of hotels in Ankara, Turkey”, *Tourism Management*, 28: 604-614, (2007).
- [7] Ozbek, M. and Sanin, F. D. “A study of the dental solid waste produced in a school of dentistry”, *Waste Menegement*, 24: 339-345, (2003).
- [8] Menon, V. and Rao, M. “trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemical & biorefinery concept”, *Progress İn Energy Combustion Science*, 38: 522-550, (2012).
- [9] Galbe, M. and Zacchi, G. “Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials”, *Biomass And Bioenergy*, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953412001626 (10.03.2012).
- [10] Saritha, M. Arora, A. and Lata, “Biologycal pretreatment of lignocelluloseic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility”, *İ ndian J. Microbiol.* 52(2): 122-130, (2012).
- [11] Demirbas, A., “Biofuels”, Springer, Germany, 336 s., (2009).
- [12] Scragg, A. H., “Biofuels: Production, Application And Development”, CAB International, Cambridge, 237 s., (2009).
- [13] Demirbas, A., “Biorefineries”, Springer, Germany, 240 s., (2010).

- [14] Yu, E. H. and Scott, K. “Enzymatic biofuel cells—fabrication of enzyme electrodes”, *Energies*, 3: 23-42, (2010).
- [15] Papendiek, F., Ende, H., Steinhardt, U. and Wiggering, H. “Biorefineries: relocating biomass refineries to the rural area”, *The Official Journal of Internatioanl Association for Landscape Ecology*, 27: 1-9, (2012).
- [16] Lucia, L. A. “Lignocellulosic biomass: a potential feedstock to replace petroleum”, *Bioresources*, 3(4): 981-982, (2008).
- [17] Dincer, I. “Renewable energy and sustainable development: a crucial review”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4: 157-175, (2000).
- [18] Chynoweth, D. P., Owens, J. M. and Legrand, R. “Renewable methane from anaerobic digestion of biomass”, 22: 1-8, (2001).
- [19] Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Hopfner-Sixt, K., Bodiroza, V., Hrbek, R., Friedel, J., Pötsch, E., Wagentristl, H., Schreiner, M. and Zollitsch, W. “Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations”, *Bioresource Technology*, 98: 3204–3212, (2007).
- [20] Bryant, M. P. “Microbial methane production- theoretical aspects”, *Journal of Animal Science*, 48: 193-201, (1979).
- [21] Themelis, N. J. and Ulloa, P. A. “Methane generation in landfills”, *Renewable Energy*, 32: 1243–1257, (2007).
- [22] Dürre, P. “Fermentative butanol production bulk chemical and biofuel”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1125: 353–362 (2008).
- [23] Dürre, P., “New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 49: 639-648, (1998).
- [24] Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. and Jung, K. S. “Fermentative butanol production by *Clostridia*”, *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2): 209-228, (2008).
- [25] Jones, D. T. and Woods, D. R. “Acetone-butanol fermentation revisited”, *Microbiological Reviews*, 50(4): 484-524, (1986).

- [26] Ni, Y. and Sun, Z. “Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83: 415-423, (2009).
- [27] Qureshi, N., Saha, B. D., Dien, B., Hector, R. E. and Cotta, M. A. “Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate”, *Biomass and Bioenergy*, 34: 559-565, (2010).
- [28] Qureshi, N. and Blaschek, H. P. “ABE production from corn: a recent economic evaluation”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27: 292–297, (2001).
- [29] Lin, Y-L. and Blaschek, H. P. “Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(3):966- 973, 1983.
- [30] Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L. “Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:17–34, (2001).
- [31] Goldemberg, J., Coelho, S. H. and Guardabassi, P. “The sustainability of ethanol production from sugarcane”, *Energy Policy*, 36: 2086– 2097, (2008).
- [32] Pokhrel, C. P., Yadav, R. K. P. and Ohga, S. “Agricultural waste residues as potential sources of bioethanol”, *Scientific World*, 6(6): 19-23, (2008).
- [33] Chen, W-M., Tseng, Z-J., Lee, K-S. and Chang, J-S. “Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 1063 – 1070, (2005).
- [34] Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. and Hussy, I. “Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation”, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1339 – 1347, (2002).
- [35] Johnson, E. T., Baron, D. B., Naranjo, B., Bond, D. R., Schmidt-Dannert, C. and Gralnick, J. A. “Enhancement of Survival and Electricity Production in an Engineered Bacterium by Light-Driven Proton Pumping”, *Applied And Environmental Microbiology*, 76(13): 4123–4129, (2010)
- [36] Kusumoto, I. “Industrial production of L-glutamine”, *The Journal of Nutrition*, 2552-2555, (2012).

- [37] Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. And Drauz, K. “Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69: 1–8, (2005).
- [38] Sano, C. “History of glutamate production”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90: 728–32, (2009).
- [39] Peters-Wendisch, P. G., Schiel, B., Wendisch, V. F., Katsoulidis, E., Möckel, B., Sahm, H. and Eikmanns, B. J “Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*”, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3(2): 295-300, (2001).
- [40] Eggeling, L. and Sahm, H. “L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 146-153, (1999).
- [41] Umerie, S. C., Ekwealor, I. A. and Nwagbo, I. O. “Lysine production by *Bacillus laterosporus* from various carbohydrates and seed meals”, *Bioresource Technology*, 75: 249-252, (2000).
- [42] Smith, J. E. “Biotechnology, 5nd ed”, Cambridge University Press, New York, 266 s., (2009).
- [43] Matthey, M. and Kristiansen, B., “Citric acid biotechnology, 1nd ed, (Editör: Kristiansen, B., Matthey, M., Linden, J.), Taylor Francis, Philadelphia, 1-9, (2002).
- [44] Acourene, S. and Ammouche, A. “Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*”, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39:759–766, (2012).
- [45] Papagianni, M. “Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling”, *Biotechnology Advances*, 25: 244–263, (2007).
- [46] Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G. and Srivastava, A. “Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse”, *Process Biochemistry*, 38: 1731-1738, (2003).

- [47] Roukas, T., “Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation”, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 25: 298-304, (2000).
- [48] Willke, T. and Vorlop, K-D. “Biotechnological production of itaconic acid”, Appl Microbiol Biotechnol, 56: 289–295, (2001).
- [49] Okafor, N., “Modern industrial microbiology and biotechnology, 1nd ed”, Science Publishers, India, 530 s., (2007).
- [50] Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. and Shimizu, S. “Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria”, J.A.O.C.S., 79(2): 159-163, (2002).
- [51] Gürtekin, E. and Şekerdağ, N. “Biyolojik parçalanabilir plastik: Polihidroksialkanatlar”, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 1-6, (2008).
- [52] Rasal, R. M., Janorkar, A. M. and Hirt, D. E. “Poly(lactic acid) modifications”, Progress in Polymer Science, 35: 338–356, (2010).
- [53] Petersen, K., Nielsen, P. V. and Olsen, M. B. “Physical and mechanical properties of biobased materials – starch, polylactate and polyhydroxybutyrate” Starch, 53: 356-361, (2001).
- [54] Khanna, S. and Srivastava, A. K. “Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*”, Process Biochemistry, 40: 2173–2182, (2005).
- [55] Parajo, J. C., Dominguez, H. And Dominguez, J. M. “Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis”, Bioresource Technology, 65: 191-2111, (1998).
- [56] Rao, R. S., Prakasham, R. S., Prasad, K. K., Rajesham, S., Sarma, P. N. and Raoa, L. V. “Xylitol production by *Candida sp.*: parameter optimization using Taguchi approach”, Process Biochemistry 39: 951–956, (2004).
- [57] Bhaskar, P. V. and Bhosle, N. B. “Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes”, Current Science, 88(1): 45-53, (2005).
- [58] Sabra, W., Zeng, A. P. and Deckwer, W. D. “Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects”, Appl. Microbiol. Biotechnol., 56: 315–325, (2001).

- [59] Jonas, R. and Farah, L. F. “Production and application of microbial cellulose”, *Polymer Degradation and Stability*, 59: 101-106, (1998).
- [60] Dahiya, N., Tewari, R. and Hoondal, G. S. “Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 773–782 (2006).
- [61] McIntosh, M., Stone, B. A. and Stanisich, V. A. “Curdlan and other bacterial (1→3)-β-D-glucans”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68: 163–173, (2005).
- [62] Xu, X. W. P., Yuan, Y., Liu, C., Zhang, D., Yang, Z., Yang, C. and Ma, C. “Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium”, *Applied And Environmental Microbiology*, 72(5): 3367–3374, (2006).
- [63] Leathers, T. D. “Biotechnological production and applications of pullulan”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 468–473, (2003).
- [64] Katzbauer, B. “Properties and applications of xanthan gum”, *Polymer Degradation and Stability*, 59: 81 -84, (1998).
- [65] Garcia-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A. and Gomez, E. “Xanthan gum: production, recovery, and properties”, *Biotechnology Advances*, 18: 549-579, (2000).
- [66] Khalil, H. P. S. A., Alwani, M. S. and Omar, A. K. M. “Chemical composition, anatomy, lignin distribution, and cell wall structure of malaysian plant waste fibers”, *Bioresources*, 1(2): 220-232, (2006).
- [67] Horn, G. M., “Biofuels”, Chelsea house, New York, 48., (2010).
- [68] Pauly, M. and Keegstra, K. “Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels”, *The Plant Journal*, 54: 559–568, (2008).
- [69] Deirbaş, A. “Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass”, *Energy Sources*, 27: 327-337, (2005).
- [70] Hong, Y. S. and Yoon, H. H. “Ethanol production from food residues”, *Biomass and Bioenergy*, 35: 3271-3275, (2011).
- [71] Ölçer, H. and Akin, B. “Starch: biosynthesis, granule structure and genetic modifications”, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16: 1-12, (2008).

- [72] Robyt, J.F., “Essentials of Carbohydrate Chemistry”, Springer, New York, 399 s., (1998).
- [73] Yamada, R., Bito, Y., Adachi, T., Ogino, C., Fukuda, H. and Konodo, A. “Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated α -amylase and glucoamylase genes”, Enzyme and Microbial Technology, 44: 344–349, (2009).
- [74] Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. “Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family”, Journal of Biotechnology, 94: 137–155, (2002).
- [75] Mabee, W. E. and Saddler, J. N. “Bioethanol from lignocellulosics: status and perspectives in Canada”, Bioresource Technology, 101: 4806–4813, (2010).
- [76] Xu, G.-W. and Gross, D. C. “Selection of fluorescent Antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay”, Phytopathology, 76(4): 414-422, (1986).
- [77] Atallah, Z. K. and Stevenson, R. “A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction”, Phytopathology, 96(9): 1037-1045, (2008).
- [78] Morris, P. C. and Bryce, J. H., “Cereal Biotechnology”, CRC Press, Cambridge, 1-16, (2000).
- [79] Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchard, C. “Composition and functional properties of rice”, International Journal of Food Science and Technology, 37: 849–868, (2002).
- [80] Doxastakis, G., Zafiriadis, I., Irakli, M., Marlani, H. and Tananaki, C. “Lupin, soya and triticale addition to wheat flour doughs and their effect on rheological properties”, Food Chemistry, 77: 219–227, (2002).
- [81] Angenent, L. T. “Energy biotechnology: beyond the general lignocellulose-to-ethanol pathway”, Current Opinion in Biotechnology, 18: 191–192 (2007).
- [82] Özcan, M. “Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2(2): 01-34, (2009).

- [83] Altan, A., Yağcı, Sibel., Maskan, M. and Göğüş, F. “Arpanın ürün bazında değerlendirilmesi”, Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildir Özetleri Kitabı, Bolu, 496-498, (2006).
- [84] Valenzuela, H. and Smith, J. “Barley”, Sustainable Agriculture Green Manure Crops, 3: 1-3, (2002).
- [85] Yılmaz, N. “Arpa”, T.E.A.E-Bakış, 9(2): 1-4, (2007).
- [86] Lin, Y. and Tanaka, S. “Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects”, Appl. Microbiol. Biotechnol., 69: 627-642, (2006).
- [87] Meryandini, A., Melani, V. and Sunarti, T. C. “Addition of cellulolytic bacteria to improved the quality of fermented cassava flour”, African Journal of Food Science and Technology, 2(2): 030-035, (2011).
- [88] Sawidis, T., Kalyva, S. and Delicopoulos, S., “The root-tuber anatomy of *Asphodelus aestivus*”, Flora 200, 332–338, (2005).
- [89] Polycarpou, P. “Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*”, Renewable Energy, 34: 2525–2527, (2009).
- [90] Kaya, M., Kammesheidt, L. and Weidelt, H. J. “The forest garden system of Saparua island, Central Maluku, Indonesia, and its role in maintaining tree species diversity”, Agroforestry Systems, 54: 225–234, (2002).
- [91] Kuroda, K.-I., Ozawa, T. and Ueno, T. “Characterization of sago palm (*Metroxylon sagu*) lignin by analytical pyrolysis”, J. Agric. Food Chem., 49: 1840-184, (2001).
- [92] Linoj, K.N.V., Dhavala, P., Goswami, A. and Maithel, S., “Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies.”, Asian Biotechnol. Develop. Rev., 8: 31–49, (2006).
- [93] Rosillo-Calle, F. and Cortez, L. A. B. “Towards proalcohol II- review of the Brazilian bioethanol programme”, Biomass and Bioenergy, 14(2): 115-124, (1998).
- [94] Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Bon, E. P. S., de Moraes, L. M. P., Araújo, J. A. and

- Torres, F. A. G. “Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil”, *Bioresource Technology*, 101: 4820–4825, (2010).
- [95] Balat, M., Balat, H. and Öz, C., “Progress in bioethanol processing” *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551–573, (2008).
- [96] Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.D.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Leitão, V.F., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bon, E.P.D.S., Moraes, L.M.P.D., Araújo, J.D.A. and Torres, F.A.G., , “Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil” *Bioresource Technology*, 101: 4820–4825, (2010).
- [97] Balat M., “Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review”, *Energy Conversion and Management*, (2010)
- [98] Renouf M.A., Wegener M.K. and Nielsen L.K., “An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugars for fermentation.”, *Biomass And Bioenergy*, 32: 1144-1155, (2008).
- [99] Almodares A. and Hadi M.R., Production of bioethanol from sweet sorghum: A review”, *African Journal of Agricultural Research*, 4 (9): 772-780, (2009).
- [100] Anglany, C. “Sorghum carbonhydrates. a rev.” *Plant Food Human Nutr.*, 52: 77-83, (1998).
- [101] Han, K.-J., Pitman, W. D., Kim, M., Day, D. F., Alison, M. W., McCormick, M. E. and Aita, G. “Ethanol production potential of sweet sorghum assessed using forage fiber analysis procedures”, *GCB Bioenergy*, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1757-1707.2012.01203.x/pdf>, (24. 06.2012)
- [102] Singh, A., Nigam, P. S. and Murphy, J. D. “Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels”, *Bioresource Technology*, 102: 10–16, (2011).
- [103] Gouveia, V. and Oliveira, C. “Microalgae as a raw material for biofuels production”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 269–274, (2009).

- [104] Limayem, A. and Ricke, S. C. “Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects”, *Progress in Energy and Combustion Science*, 38: 449-467, (2012).
- [105] Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K. and Pandey, A. “Bioethanol production from rice straw: an overview”, *Bioresource Technology*, 101: 4767–4774, (2010).
- [106] Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., González, A., Ballesteros, I. and Ballesteros, M. “Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process”, *Fuel*, 88: 2142–2147, (2009).
- [107] Samsuri, M., Gozan, M., Prasetya, B. and Nasikin, M. “Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic bagasse for bioethanol production”, *Journal Of Biotechnology Research in Tropical Region*, 2(2): 2009, 1-5, (2009).
- [108] Chen, W-H., Lin, T-S., Guo, G-L. and Huang, W-S. “Ethanol production from rice straw hydrolysates by *Pichia stipitis*”, *Energy Procedia*, 14: 1261-1266, (2012).
- [109] Galbe, V. and Zacchi, G. “A review of the production of ethanol from softwood”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 618–628, (2002).
- [110] Cruz, J. M., Dominguez, J. M., Dominguez, H. and Parajo, J. C. “Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials”, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2459-2464, (2001).
- [111] Winger M., Christen M. and van Gunsteren W.F., “On the conformational properties of amylose and cellulose oligomers in solution”, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, doi:10.1155/2009/307695, (2009).
- [112] Tolonen L.K., Zuckerstatter G., Penttila P.A., Milacher W., Habicht W., Serimaa R. and Sixta H., “Structural changes in microcrystalline cellulose in subcritical water treatment”, *Biomacromolecules*, 12: 2544-2551, (2011).
- [113] Fugelstad, J., “Functional Characterization Of Cellulose and Chitin Synthase Genes In *Oomycetes*”, *School of Biotechnology Royal Institute of Technology AlbaNova University* , Doktora tezi, 86 s., (2011).

- [114] Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U. and Dostbil, N. “Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları”, KSU. Journal of Science and Engineering, 9(1): 12-19, (2006).
- [115] Dinand, M., Vignon, M., Chanzy, H. and Heux, L. “Mercerization of primary wall cellulose and its implication for the conversion of cellulose I→cellulose II”, Cellulose 9: 7–18, 2002.
- [116] Ciolacu, D., Ciolacu, F. and Popa, V. I. “Amorphous cellulose – structure and characterization” 45(1-2): 13-21, (2011).
- [117] Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A. and del Río, J. C. “Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin”, International Microbiology, 8: 195-204, (2005).
- [118] Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H. and Zheng, C. “Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis”, Fuel 86: 1781–1788, (2007).
- [119] Maki, M., Leung, K. T. and Qin, W. “The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass”, Int. J. Biol. Sci., 5(5): 500-516, (2009).
- [120] Choct, M. “Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance”, Feed Milling International, 13-26, (1997).
- [121] Teleman, A., Larsson, P. T. and Iversen, T. “On the accessibility and structure of xylan in birch kraft pulp”, Cellulose, 8: 209–215, (2001).
- [122] Li, Kaichang, Azadi, Parastoo., Collins, R. Tolan, J., Kim, J. S. and Ericsson, K.-E. “Relationships between activities of xylanases and xylan structures”, Enzyme and Microbial Technology, 27: 89–94, (2000).
- [123] Jørgensen, H., Kristensen, J. B. and Felby, C. “Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities”, Biofuels, Bioprod. Bioref., 1: 119–134, (2007).
- [124] Saha, B. C. “Hemicellulose bioconversion”, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30: 279–291, (2003).
- [125] Cervero, J. M. Skovgaard, P. A., Felby, C., Sorensen, H. R. and Jorgensen, H. “Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for

- production of bioethanol”, *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 177–184, (2010)
- [126] Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, and Bogel-Lukasik, S. “Hemicelluloses for fuel ethanol: a review”, *Bioresource Technology*, 101(13): 4775–4800, (2010).
- [127] Hayashi, T. and MacLachlan, G. “Pea Xyloglucan and Cellulose”, *Plant Physiol.*, 75: 596-604, (1984).
- [128] Kuru, A., “Termofilik *Streptomyces sp.* NT508 Suşundan İzole Edilen Peroksidaz Ve Endoksilanaz Enzimlerinin Endoksilanaz Enzimlerinin Karakterizasyonu”, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 142 s., (2009).
- [129] Cosgrove D.J., “Growth of the plant cell wall”, *Nature Reviews/ Molecular Cell Biology*, 6: 850-861, (2005).
- [130] Uraki, Y., Nakamura, A., Kishimoto, T. and Ubukata, M. “Interaction of hemicelluloses with monolignols”, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27: 9–21, (2007).
- [131] Erbil, J. D., Coruk, G. and Dıǧrak, M. “Kahraman Maraş civarındaki ekstrem ortamlardan izole edilen bakterilerde lignin biyodegradasyonunun araştırılması”, *Fırat Ün. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 18(4): 485-492, (2006).
- [132] Sánchez, C. “Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi”, *Biotechnology Advances*, 27: 185–194, (2009).
- [133] Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C. and Ralph, J. “Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture”, *Current Biology*, 19: 169–175, (2009).
- [134] Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S. S. and Wang, L. “The phenylpropanoid pathway and plant defence— a genomics perspective”, *Molecular Plant Pathology*, 3(5): 371–390, (2002).
- [135] Humphreys, J. M. and Chapple, C. “Rewriting the lignin roadmap”, *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 224–229, (2002).
- [136] Whetten, R. and Sederoff, R. “Lignin Biosynthesis”, *The Plant Cell*, 7: 1001-1013, (1995).

- [137] Gavnholt, B. and Larsen, K. “Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation”, *Physiologia Plantarum*, 116: 273–280. (2002).
- [138] Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. “Lignin engineering”, *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 278–285, (2008).
- [139] “Üçgül. İ. and Akgül. G., “Biomass technology”, *Journal of Yekarum*, 1(1): 3-11, (2010).
- [140] Pingali, S. V., Urban, V. S., Heller, W. T., McGaughey, J., O’Neill, H., Foston, M., Myles D. A., Ragauskas, A. and Evans, B. R. “Breakdown of cell wall nanostructure in dilute acid pretreated biomass”, *Biomacromolecules*, 11: 2329–2335, (2010).
- [141] Dien, B. S., Cotta, M. A. and Jeffries, T. W. “Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 258–266, (2003).
- [142] Sanchez, O. J. and Cardona, C. A. “Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks”, *Bioresource Technology*, 99: 5270–5295, (2008).
- [143] Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. and Aikat, K. “Bioethanol production from agricultural wastes: an overview”, *Renewable Energy*, 37: 19-27, (2012).
- [144] Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Liden, G. and Zacchi, G. “Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today”, *TRENDS in Biotechnology*, 24(2): 549-556, (2006).
- [145] Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T. and Danquah, M.K., “Microalgal Biomass As A Cellulosic Fermentation Feedstock For, Bioethanol Production”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (2010).
- [146] Sultan. D., Kelleher. B. and Ross. J.R.H., “ Review of literature on catalysts for biomass gasification”, *Fuel Processing Technology*, 73: 155-173, (2001).
- [147] Kilzer, F.J. and Broido, A., “Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. pyrodynamics”, 2: 151–163, (1965).
- [148] Fan, L.T., Gharpuray, M.M., and Lee, Y.-H., “Cellulose hydrolysis biotechnology monographs”. Springer, 110(11): 211-230, (1987).

- [149] Shafizadeh, F. and Lai, Y.Z.,. “Thermal degradation of 2-deoxy-darabino-hexonic acid and 3-deoxy-d-ribo-hexono-1,4-lactone”, Carbohydr. Res., 42: 39–53, (1975).
- [150] Hodge, D. B., Karim, M. N., Schell, D. J. and McMillan, J. D. “Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose”, Bioresource Technology, 99: 8940–8948, (2008).
- [151] Mvula. E., Naumov. S. and Sonntag. C.V., “Ozonolysis of lignin models in aqueous solution: anisole, 1,2-dimethoxybenzene and 1,3,5-trimethoxybenzene”, Environ. Sci. Technol., 43: 6275-6282, (2009)
- [152] Garcia-Cubero M. T., Gonzalez-Benito G., Indacochea I., Coca M. and Bolado S., “Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw”, Bioresource Technology, 100: 1608-1613, (2009).
- [153] Kaneko H., Hosoya S., Iyama K. and Nakano J., “ Degredation of lignin with ozone”, Journal Of Wood Chemistry and Technology, 3 (4), (1983).
- [154] Wu L., Arakane M., Ike M., Wada M. Takai T., Gau M. and Tokuyasu K., “Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production”, Bioresource Technology, 102: 4793-4799, (2011).
- [155] Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Anna, L. M. M. S., de Castro, A. M., Driemeier, C. E., Pereira Jr, N. and Polikarpov, I. “Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases”, Process Biochemistry, 46: 1196–1201, (2011).
- [156] Doner, L. W. and Hicks, K. B. “Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction”, Cereal Chem., 74(2): 176–181, (1997).
- [157] Park, J., Shiroma, R., Al-Haq, M. I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M. and Tokuyasu, K. “A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw – Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process”, Bioresource Technology, 101: 6805-6811, (2010).

- [158] Rabelo S.C., Filho R.M. and Costa A.C., “Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production”, Appl. Biochem. Biotechnol., 153: 139--150, (2009).
- [159] Mielenz J.R., “Biofuels: Methods and Protocols”, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, ISBN: 978-1-60761-214-8.
- [160] Kim, T. H., Taylor, F. and Hicks, K. B. “Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment”, Bioresource Technology, 99: 5694–5702, (2008).
- [161] Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D. B. “Biomass pretreatment: Fundamentals toward application”, Biotechnology Advances, 29: 675–685, (2011).
- [162] Ko, J. K., Bak, J. S., Jung, M. W., Lee, H. J., Chol, I-G., Kim, T. H. and Kim, K. H. “Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes”, Bioresource Technology, 100: 4374–4380, (2009).
- [163] Talebnia, F., Karakashev, D. and Angelidaki, I. “Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation”, Bioresource Technology, 101: 4744–4753, (2010).
- [164] Wyman, C. E. “Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities”, Bioresource Technology, 50: 3-16, (1994).
- [165] Ferreira, S., Gil, N, Queiroz, J. A., Duarte, A. P. and Domingues, F. C. “Bioethanol from the Portuguese forest residue *Pterospartum tridentatum* – An evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation”, Bioresource Technology, 101: 7797–7803, (2010).
- [166] Hsu, W-H., Lee, Y-Y., Peng, W-H. and Wu, K.C-W. “Cellulosic conversion in ionic liquids (ILs): Effects of H₂O/cellulose molar ratios, temperatures, times, and different ILs on the production of monosaccharides and 5-hydroxymethylfurfural (HMF)”, Catalysis Today, 174: 65– 69, (2011).
- [167] Kurtuluş M., “Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşlemlerle Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi” Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. (2010).

- [168] Kristensen, J. B., Thygesen, L. G., Felby, C., Jørgensen, H., and Elder, T. “Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production”, *Biotechnology for Biofuels*, 1(5): 1-9, (2008).
- [169] Zhang, Y., Lu, C., Tang, J., Yu, X., Lu, J., Meng, Q., Liu, D., Zheng, X. and Lin, F. “Enhanced saccharification of steam explosion pretreated corn stover by the supplementation of thermoacidophilic β -glucosidase from a newly isolated strain, *Tolypocladium cylindrosporum* syzx4”, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(17): 2413-2421, (2011).
- [170] Morjanoff, P.J. and Gray, P.P., “Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification”, *Biotechnol. Bioeng.*, 29: 733–741, (1987).
- [171] Holtzapple, M.T., Humphrey, A.E. and Taylor, J.D., “Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood”, *Biotechnol. Bioeng.*, 33: 207–210, (1989).
- [172] Clark, T.A. and Mackie, K.L., “Steam explosion of the soft-wood pinus radiata with sulphur dioxide addition”, *J. Wood Chem. Technol.*, 7: 373–403, (1987).
- [173] Mackie, K.L., Brownell, H.H., West, K.L. and Saddler, J.N., “Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood” *J. Wood Chem. Technol.*, 5: 405–425, (1985).
- [174] Dale, B.E. and Moreira, M.J., “A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis”, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12: 31–43, (1982).
- [175] Sun Y. and Cheng J., “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review”, *Bioresource Technology*, 83: 1-11, (2002).
- [176] Vlasenko. E. Yu., Ding. H., Labovitch. J.M. and Shoemaker. S.P., “Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw” *Bioresource Technology*, 59: 109-119, (1997).
- [177] Dale, B.E., Henk, L.L. and Shiang, M., “Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion”, *Dev. Ind. Microbiol.*, 26: 223-233, (1984).
- [178] Zheng Y.Z., Lin H.M. and Tsao G.T., “Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion”, *Biotechnol. Prog.*, 14: 890-896, (1998).

- [179] Temp, U., Eggert, C. and Eriksson, K. L. “A small-scale method for screening of lignin-degrading microorganisms”, *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4): 1548–1549, (1998).
- [180] Henriksson, G., Johansson, G. and Pettersson, G. “A critical review of cellobiose dehydrogenases”, *Journal of Biotechnology*, 78: 93-113, (2000).
- [181] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple M. and Ladisch M., “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, 96: 673–686 (2005).
- [182] Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold M.H., “Manganese peroxidase from the *Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle”, *Biochemistry*, 27: 5365-5370, (1988).
- [183] Sayadı S. and Ellouz R., “Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters”, *Applied And Environmental Microbiology*, 61(3): 1098–1103, (1995).
- [184] Blanchette, R.A.,. “Delignification by wood-decay fungi”. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29: 381–398, (1991).
- [185] Kalia V.C. and Purohit H.J., “Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy”, *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 403-419, (2008).
- [186] Karimia, K., Kheradmandiniaa, S. and Taherzadeh, M.J., “Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis”, *Biomass and Bioenergy*, 30: 247–253, (2006).
- [187] Taherzadeh, M.J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C. and Liden, G., “Characterization and fermentation of dilute acid hydrolyzates from wood”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36(11): 4659-4665, (1997).
- [188] Balat, M., Balat, H. and Öz, C., “Progress in bioethanol processing” *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551–573, (2008).
- [189] Kosaric, N., Wieczorirek, A., Cosentono, G.P., and Magee, R.J., “Ethanol fermentation in biotechnology: a comprehensive treatise”, *Verlag. Chemie.*, 257-386, (1983).

- [190] Björling, T., and Lindman, B., “Evaluation of xlose-fermenting yeastfor etanol production from spent sulfite liquor”, *Enzyme Microb. Technol.*, 11(4): 240-246, (1989).
- [191] Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P. and Singh, A. “Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation”, *Bioresource Technology*, 101: 8348–8354, (2010).
- [192] Ziegler, M. T., Thomas, S. R. and Danna, K. J. “Accumulation of a thermostable endo-1,4 -D-glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves”, *Molecular Breeding*, 6: 37–46, (2000).
- [193] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas’ - Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M. and Rogalski, J. “Biodegradation of lignin by white rot fungi”, *Fungal Genetics and Biology*, 27, 175–185, (1999).
- [194] Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C. and Qin, W. “Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-8, (2010).
- [195] Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. F. “Bacterial cellulase and xylanases”, *Journal of General Microbiology*, 139: 187-194, (1993).
- [196] Xu, Q., Adney, W. S., Ding, S.-Y. and Himmel, M. E. “Cellulases for Biomass Conversion”, *Industrial Enzymes*, (Editör: Polaina. J., MacCabe, A. P.), Springer, Dordrecht, 35-50, (2007)
- [197] Fontes, C. M. G. A., Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P., Clarke, J. H., Prates, J. A. M., McKie, V. A., Nagy, T., Fernandes, T. H. and Ferreira, M. A. “A novel *Cellvibrio mixtus* family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions”, *Microbiology*, 146: 1959–1967, (2000).
- [198] Gallardo, O., Pastor, F. I. J., Polaina, J., Diaz, P., Tysek, R., Vogel, P., Isorna, P., Gonzales, B. and Sanz-Aparicio, J. “Structural Insights into the Specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and Its Improved Stability by Forced Protein Evolution” *The Journal Of Biological Chemistry* 285(4): 2721–2733, (2010).

- [199] Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M. and Kluepfel, D. “Endo-P - 1,4-xylanase families: differences in catalytic properties”, *Journal of Biotechnology* 57: 151-166, (1997).
- [200] Wainø, M. and Ingvorsen, K. “Production of b-xylanase and b-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*”, *Extremophiles*, 7: 87–93, (2003)
- [201] Martínez, G. A., Chaves, A. R. and Civello, P. M. “b-xylosidase activity and expression of a b-xylosidase gene during strawberry fruit ripening”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 89–96, (2004).
- [202] Tuncer. M., “Characterization of β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase Activities From *Thermomonospora Fusca* BD25”, *Turk. J. Biol.*, 24: 753–767, (2000).
- [203] Gilead, S. and Shoham, Y. “Purification and characterization of a-l-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6”, *Applied And Environmental Microbiology*, 60(1): 170–174, (1995).
- [204] Bronnenmeier, K., Meissner, H., Stocker, S. and Staudenbauer, W. L. “a-D-glucuronidases from the xylanolytic thermophiles *Clostridium stercorarium* and *Thermoanaerobacterium saccharoticum*”, *Microbiology*, 141: 2033-2040, (1995).
- [205] Shallom, D. and Shoham, Y. “Microbial hemicellulases”, *Current Opinion in Microbiology*, 6: 219–228, (2003).
- [206] Zakaria, M. M., Ashiuchi, M. and Yamamoto, S. “Optimization for β mannanase production of a psychrophilic bacterium, *Flavobacterium sp.*”, *Biosci. Biotechnol, Biochem.*, 62(4): 655-660, (1998).
- [207] Howard, R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S. “Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production”, *African Journal of Biotechnology*, 2 (12): 602-619, (2003).
- [208] Tabka, M. G., Herpoel-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M. And Sigoillot, J. C. “Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 897–902, (2006).

- [209] Fang, Z., Li, T., Wang, Q., Zhang, X., Peng, H., Fang, W., Hong, Y., Ge, H. and Xiao, Y. “A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability”, Appl. Microbiol. Biotechnol., 89: 1103-1110, (2011).
- [210] Ruijsenaars, H. J. and Hartmans, S. “A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity”, Appl. Microbiol. Biotechnol., 65: 177-182, (2004).
- [211] Lakshmipathy, D. T. and Kannabiran, K. “A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic *Streptomyces sp.* Isolated from Saltpan Environment”, American Journal of Infectious Diseases, 5(3): 200-206, (2009).
- [212] Reiss, R., Ihssen, J. and Thöny-Meyer, L. “*Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum”, B.M.C. Biotechnology, 11(9): 1-11, (2011).
- [213] Liu, Z., Zhang, D., Hua, Z., Li, J., Du, G. and Chen, J. “A newly isolated *Paecilomyces sp.* WSH-L07 for laccase production: isolation, identification, and production enhancement by complex inducement”, J Ind Microbiol Biotechnol, 36: 1315–1321, (2009).
- [214] Durán, N., Rosa, M. A., D’Annibale, A. and Gianfreda, L. “Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review”, Enzyme and Microbial Technology, 31: 907-931, (2002).
- [215] Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P. “Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor”, Process Biochemistry, 36: 51–58, (2000).
- [216] Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo H., Miyomoto, K. and Inamorí, Y. “A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN7: purification, characterization, nucleotide sequence, expression”, Biosci. Biotechnol. Bioschem., 67(10): 2167-2175, (2003).
- [217] Suresh, P. S., Kumar, A., Kumar, R. and Singh, V. P. “An Insilco approach to bioremediation: Laccase as a case study”, Journal of Molecular Graphics and Modelling, 26: 845–849, (2008).

- [218] Ramachandra, M., Crawford, D. L. and Hertel, G. “Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*”, Applied And Environmental Microbiology, 54(12): 3057-3063, (1988).
- [219] Narayana, K. J. P., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, V., Venkateswarlu, Y. and Krishna, P. S. J. “Biological activity of phenylpropionic acid isolated from a terrestrial *Streptomyces*”, Polish Journal of Microbiology, 56(3): 191-197, (2007).
- [220] KAYA, D., Demirezen, Ş. and Beksaç, M. S. “Actinomyces türlerinin biyolojik özellikleri”, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 2 (2): 25-28, (2009).
- [221] Kafilzadeh, F., Dehdari, F., Kadivar, E. and Shiraz, O. B. “Isolation of amylase producing aquatic actinomycetes from the sediments of mangrove forests in south of Iran”, African Journal of Microbiology Research, 6(33): 6281-6285, (2012).
- [222] Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S. and Bogatzevska, N. “ Characteristics of soil actinomycetes from antarctica”, Journal Of Culture Collections, 3: 3-14, (2002).
- [223] Wanbanjob, A. “Investigation Of Bioactive Compounds From Endophytic Actinomycete”, Silpakorn University Department of Chemistry, Yüksek lisans tezi, 82 s., (2008).
- [224] Hopwood, D. A. "*Streptomyces* in Nature and Medicine", Oxford University Press, New York, 250 s., (2007).
- [225] Balkar, N., Korcan, S. E. and Konuk, M. “Afyonkarahisar ilinden izole edilen actinomycet izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi”, BiyoTeknoloji Elektronik Dergisi, 1(1): 21-26, (2010).
- [226] Anderson, A. S. and Wellington, M. H. “The taxonomy of *Streptomyces* and related genera”, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2001), 51, 797–814
- [227] Arai, T. and Mikami, Y. Chromogenicity of *Streptomyces*”, Applied Microbiology, 23(2): 402-406, (1972).

- [228] Ramachandra, M., Crawford, D. L. And Pometto, A. L. “ Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: a comparative study of wild-type and genetically manipulated strains”, Applied And Environmental Microbiology, 53(12): 2754-2760, (1987).
- [229] Ye, L., Zhou, Q., Liu, C., Luo, X. and Xi, G. N. T. “Identification and fermentation optimization of a marine-derived *Streptomyces griseorubens* with anti-tumor activity”, Indian Journal of Marine Sciences, 38(1): 14-21, (2009).
- [230] Brooks, M. S., Burdock, T. J., Ghaly, A. E. and Dave, D. “Changes in cell structure, morphology and activity of *Streptomyces venezuelae* during the growth, shocking and jadomycin production stages”, Microbial & Biochemical Technology, 4(3): 063-075, (2012).
- [231] Madigan, M. T., Martinko, J. and Parker, J. “Brock Biology of Microorganisms, 10th Edition”, Prentice Hall, New York, 1104 s., (2002).
- [232] Palmer, T., Sargent, F. and Berks, B.C. “Export of complex cofactor containing proteins by the bacterial tat pathway”, TRENDS in Microbiology, 10(4): 175- 180, (2005).
- [233] Niladevi, K. N., Jacob, N. and Prema, P. “Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization”, Process Biochemistry, 43: 654-660, (2008).
- [234] Pierre, G., Maache-Rezzoug, Z., Sannier, F. and Rezzoug, S.-A. “High-performance hydrolysis of wheat straw using cellulose and thermomechanical pretreatment”, Process Biochemistry, 46: 2194-2200, (2011).
- [235] Temel, B. D. “Doğal Ve sentetik biomateriyallerde, osteogenic (rhbm-7) ve angiogenic (bfgf) büyüme faktörleri ile insan osteoblast hücrelerinin gelişiminin incelenmesi”, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 54 s., (2006).
- [236] Chandra, M., Kalra, A., Sharma, P. K. and Sangwan, R. S. “Cellulase production by six *Trichoderma* spp. Fermented on medicinal plant processing”, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36: 605-609, (2009).
- [237] Kim, S. and Kim, C. H. “Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber”, Bioprocess. Biosyst. Eng., 35(1-2): 61-67, (2012).

- [238] Acharya, P. B., Acharya, D. K. and Modi, H. A. "Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate", African Journal of Biotechnology, 7(22): 4147-4152, (2008).
- [239] Karmaker, M. and Ray, R. R. "Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes", Asian Journal of Biotechnology, 1-10, (2010).
- [240] Dras, A. A., Freitas, G. S., Marques, G. S. M., Sampaio, A., Fraga, I. S., Rodrigues, M. A. M., Evtuguin, D. V. and Bezerra, R. M. F. "Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white rot fungi", Bioresource Technology, 101: 6045-6050, (2010).
- [241] Shah, A. R. And Madamwar, D. "Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization", Process Biochemistry, 40: 1763-1771, (2005).
- [242] Nascimento, R. P., Coelho, R. R. R., Marques, S., Alves, L., Grino, F. M., Bon, E. P. S. and Amaral-Collaco, M. T. "Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil", Enzyme and Microbial Technology, 31: 549-555, (2002).
- [243] Alani, F., Anderson, W. A. and Moo-Young, M. "New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases", Biotechnol. Let., 30: 123-126, (2008).
- [244] Okafor, U. A. and Okochi, V. I., Onyogeme-okerinta, B. M. and Nwodo-Chinedu, S. "Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes", African Journal of Biotechnology, 6(14): 1710-1714, (2007).
- [245] Anthony, T., Raj, K. C., Rajendran, A. and Gunasekaran, P. "High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1", Enzyme and Microbial Technology, 32: 647-654, (2003).
- [246] Kadowaki, M. K., Souza, C. G. M., Simao, R. C. G. and Peralta, R. M. "Xylanase production by *Aspergillus tamaritii*", Applied biochemistry and Biotechnology, 66: 97-106, (1997).

- [247] Oliveira, L. A., Porto, A. L. F. and Tambourgi, E. B. “Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes”, *Bioresource Technology*, 97: 862-867, (2006).
- [248] Katapodis, P., Christakopoulou, V., Kekos, D. and Christakopoulos, P. “Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology”, *Biochemical Engineering*, 35: 136-141, (2007).
- [249] Bocchini, D. A., Alves-Prado, H. F., Baida, L. C., Roberto, I. C., Gomes, E. and Da Silva, R. “Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using responsesurface methodology”, *Process Biochemistry*, 38: 727-731, (2002).
- [250] Emtiazi, G. and Nahvi, I. “Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw”, *Biomass and Bioenergy*, 19: 31-37, (2000).
- [251] Beg, Q. K., Bhushan, b., kapoor, m. and hoondal, g. S. “production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from streptomyces sp. QG-11-3”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24: 396-402, (2000).
- [252] Kohli, U., Nigam, P., Singh, D. AND Chaudhary, K. “Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C”, *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 606-610, (2001).
- [253] Maheswari, M. U. and Chandra, T. S. “Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16: 257-263, (2000).
- [254] Hayat, K., Nawaz, H., Latif, F., and Asghar, M. “Kinetics of cellulase and xylanase of *Chaetomium thermophile* with respect to aeration”, *Pakistan Journal Of Biological Science*, 4(7): 875-876, (2001).
- [255] Wallace, R. J., Wallace, S. J. A., McKain, N., Nsereko, V. L. and Hartnell, G. F. “Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed ruminal microorganisms in vitro”, *J. Anim. Sci.*, 79:1905–1916, (2001).

- [256] Tuncer, M., Kuru, A., Isikli, M., Sahin, N. and Çelenk, F. G. “Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey”, Journal of Applied Microbiology, 97: 783–791, (2004).
- [257] Rob, A., Hernandez, M., Ball, A.S., Tuncer, M., Arias, M.E. and Wilson, M.T. “Production and partial characterization of extracellular peroxidase produced by *Streptomyces avermitilis* UAH30”, Appl. Biochem. Biotechnol., 62:159-174, (1997).
- [258] Rob, A., Ball, A.S., Tuncer, M. and Wilson, M.T. “Thermostable novel nonhaem extracellular glycosylated peroxidase from *Thermomonospora fusca* BD25”, Biotechnol. Appl. Biochem., 24:161-170, (1996).
- [259] Ball, A.S. and McCarthy, A.J. “Production and properties of xylanases from actinomycetes”, J. Appl. Bacteriol., 66:439–44, (1989)
- [260] Bachmann, S. L. And McCarthy, A. J. “Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*”, Applied and Environmental Microbiology, 57(8): 2121-2130, (1991).
- [261] Rosgaard, L., Pedersen, S. and Meyer, A.S. “Comparison of different pretreatment strategies for enzymatic hydrolysis of wheat and barley straw”, Appl. Biochem. Biotechnol., 143: 284-296, (2007).
- [262] Wang, Y., Spratling, B. M., ZoBell, D. R., Weiedmeier, R. D. and McAllister, T. A. “Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes”, Journal of Animal Science, 82: 198-208, (2004).
- [263] Lavoie, J. M., Beauchet, R., Berberi, V. and Chornet, M. “Biorefining Lignocellulosic Biomass via the Feedstock Impregnation Rapid and Sequential Steam Treatment”, Biofuel's Engineering Process Technology, 1st ed. (Editör Bernardes, M. A. A. S.), InTech., 685-714, (2011).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Ali Osman ADIGÜZEL

Doğum Tarihi: 02/11/1984

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen	Mehmet Akif Ersoy Çok Programlı Lisesi	1999-2003
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniv.	2004-2009
Yüksek Lisans	Biyoloji Ana Bilim Dalı	Mersin Üniv.	2009-2013

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş . Gör.	Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010-

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- Adıgüzel. A. O., Fideli, H. And Tuncer, M. “Yaygın kullanımı olan bazı tekstil boyaalarının aerobik renk giderimlerinde kullanılabilecek bakterilerin taranması”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, İzmir, (2012), (Poster Sunumu)
- Adıgüzel. A. O. And Tuncer. M. “Lignoselülozik biyokütleden şeker şurubu elde etmek için ön-muamele ve hidroliz koşullarının optimizasyonu”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, İzmir, 148-149, (2012), (Sözlü Sunum)