

ÖZET

ŞEKER SOLÜSYONU İÇİN ÜRETİM YÖNTEMİ

- 5 Bir şeker sıvısı üretim prosesinin tekrarlanmasıyla bir şeker sıvısının sağlanması için bir yöntem ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Bir şeker sıvısı üretim prosesinin tekrarlanmasıyla bir şeker sıvısının sağlanması için bir yöntem olup, şeker sıvısı üretim prosesi, aşağıdaki (1) ila (3) aşamalarından oluşur:

- (1) birincil hidrolizi gerçekleştirmek için filamentöz bir mantardan elde edilen bir selüloza, selüloz eklenmesi;
- (2) ikincil hidrolizi gerçekleştirmek için Aşama (1)'de oluşturulan hidrolizata filamentöz bir mantardan elde edilen taze bir selülaz eklenmesi ve
- (3) Aşama (2)'de oluşturulan hidrolizatın, bir şeker sıvısı elde etmek için katı-sıvı ayrılmasına tabi tutulması ve enzimin, şeker sıvısından geri kazanılması;

burada, birincil ve ikincil hidroliz, iki ayrı aşamada gerçekleştirilir ve

burada Aşama (3)'de elde edilen geri kazanılmış enzim, bir sonraki ve daha sonraki şeker sıvısı üretim proseslerinin (1) aşaması için kullanılır; burada söz konusu selüloz, alkali işleme, hidrotermal işleme veya seyreltik sülfürik asitle işleme ile ön işlemden geçirilir.

2. İstem 1'in bir yöntemi olup, yöntem ayrıca bir nanofiltrasyon ve/veya ters ozmoz membranı kullanılarak şeker sıvısının konsantre edilmesi aşamasını içerir.

3. İstem 1 ya da 2'ye göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada, şeker sıvı üretim prosesi Aşama (1)'deki bir filamentöz mantardan elde edilen söz konusu selülaz olarak, bir filamentöz mantardan elde edilen bir selülaz tarafından üretilen bir selüloz hidrolisattan geri kazanılan bir enzim bileşeni kullanılır.

4. İstem 1 ila 3'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada Aşama (1) veya (2)'de bir filamentöz mantardan elde edilen söz konusu selülaz, Trichoderma cinsine ait mikroorganizmanın bir kültür sıvısından elde edilen bir bileşen içerir.

5. İstem 1 ila 4'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada söz konusu geri kazanılmış enzim, ksilanaz ve/veya ksilosidaz içerir.
6. İstem 1 ila 5'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada söz konusu geri kazanılmış enzim, filamentöz bir mantardan elde edilen suda çözünmeyen bir selülaz içerir.
7. İstem 1 ila 6'dan herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada söz konusu birincil hidrolizde ve söz konusu ikincil hidrolizde eklenen enzim miktarları, şu ilişkiyi sağlar: Aşama (1)'de eklenen söz konusu geri kazanılmış enzimin miktarı > Aşama (2)'de eklenen söz konusu taze enzimin miktarı.
8. İstem 1 ila 7'den herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada Aşama (3)'deki bir filamentöz mantardan elde edilen söz konusu selülazın geri kazanımı, söz konusu şeker sıvısının bir ultrafiltrasyon membranından filtrelenmesiyle ve söz konusu selülazın besleme tarafından geri kazanılmasıyla gerçekleştirilir.

20

25

30

ŞEKER SOLÜSYONU İÇİN ÜRETİM YÖNTEMİ

Tarifname

TEKNİK ALAN

Buluş, selülozdan şeker üretme yöntemi ile ilgilidir.

ARKA PLAN TEKNİĞİ

Ham madde olarak şekerler kullanılarak kimyasal ürünlerin fermantasyon üretim prosesleri, çeşitli endüstriyel malzemelerin üretimi için kullanılmıştır. Şu anda, fermantasyon ham maddesi olarak kullanılacak şekerler olarak, şeker kamışı, nişasta ve şeker pancarı gibi gıda maddelerinden elde edilenler endüstriyel olarak kullanılmaktadır. Ancak, dünya nüfusunun gelecekte artması nedeniyle gıda maddelerinin fiyatlarında artış beklendiği ya da endüstriyel malzemeler için şekerlerin kullanılmasının gıdalar için kullanılan şekerler ile rekabet edebileceği gerçeğinin etik açısı göz önüne alındığında, yenilenebilir bir gıda dışı kaynaktan, yani selüloz içeren bir biyokütleden verimli bir şekilde şeker sıvısı elde etme prosesi veya şeker sıvısını, verimli bir şekilde bir endüstriyel malzemeye dönüştürmek için elde edilen şeker sıvısını, bir fermantasyon ham maddesi olarak kullanma prosesinin gelecekte yapılandırılması gerekmektedir.

Selüloz içeren bir biyokütleden bir şeker sıvısının üretilmesi için açıklanan yöntemlerin örnekleri arasında, selüloz ve hemiselülozun, konsantre sülfürik asit (Patent Belgeleri 1 ve 2) kullanılarak asit hidrolizi ile şeker sıvısı üretme yöntemi ve selüloz içeren bir biyokütlenin, seyreltik sülfürik asit kullanılarak hidroliz işlemine tabi tutulduğu ve sonrasında bir şeker sıvısı üretmek için enzimatik olarak selülaz veya benzerleri ile işleme tabi tutulduğu bir yöntem (Patent Dışı Belge 1) bulunmaktadır. Ayrıca, asit kullanılmayan açıklanan yöntemlerin örnekleri arasında, selüloz içeren bir biyokütlenin, bir şeker sıvısı üretmek için yaklaşık 250 °C ila 500 °C'de subkritik su kullanılarak hidrolize edildiği bir yöntem (Patent Belgesi 3), selüloz içeren bir biyokütlenin, subkritik su işlemine tabi tutulduğu ve ardından şeker sıvısı üretmek için enzimatik olarak işleme tabi tutulduğu bir yöntem (Patent Belgesi 4) ve selüloz içeren bir biyokütlenin, 240 °C ila 280 °C'de basınçlı sıcak su ile hidroliz işlemine tabi tutulduğu ve ardından şeker sıvısı üretmek için enzimatik olarak işlendiği bir yöntem (Patent Belgesi 5) bulunmaktadır.

Son yıllarda, daha az enerji kullanan ve daha az çevresel yüke neden olan ancak yüksek verimde şeker üreten biyokütle hidrolizi yöntemleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ancak, enzimleri kullanan bu yöntemlerin, enzimlerin maliyetlerinin yüksek olması gibi bir dezavantajı bulunmaktadır.

Bu teknik sorunların çözümü için, hidrolizde kullanılan enzimlerin geri kazanılması ve yeniden kullanılmasını içeren yöntemler önerilmiştir. Açıklanan bu yöntemlerin örnekleri arasında, sürekli katı-sıvı ayrışmasının, bir döndürme filtresi ile gerçekleştirildiği ve elde edilen şeker sıvısının, enzimlerin geri kazanılması için bir ultrafiltrasyon membranı içinden filtrelendiği bir yöntem (Patent Belgesi 6), bir sürfaktanın, enzim adsorpsiyonunu baskılamak ve böylece geri kazanma verimliliğini arttırmak için enzimatik sakkarifikasyon aşamasında beslediği bir yöntem (Patent Belgesi 7), enzimatik sakkarifikasyon ile üretilen tortunun, enzim bileşenini geri kazanmak için elektrik işlemine tabi tutulduğu bir yöntem (Patent Belgesi 8) ve bir yöntem enzimatik sakkarifikasyon ile üretilen tortunun, tekrar başka bir biyokütle partisine beslenip enzimlerin bu şekilde tekrar kullanıldığı bir yöntem (Patent Belgesi 9) bulunmaktadır. Patent Belgesi (10), selülozun çözülebilir şekerlere enzimatik hidrolizi için bir prosesi açıklar, burada, şeker solüsyonu, enzimi sistemdeki fazla hidrolize olmamış selüloz üzerinde hareketsiz kılarak herhangi bir önemli çözülebilir enzim kaybı olmaksızın reaktant karışımından geri çekilir. Enzim, 4,0 ila 5,0 pH'da ve 25 °C ile 50 °C aralığındaki sıcaklıklarda fazla hidrolize olmamış selüloz üzerinde güçlü bir şekilde adsorbe edilir.

Patent Belgesi (11), selülaz enzim sisteminin en az iki bileşeninin atık selüloz malzemesinin yeni hazırlanmış bir kısmı üzerine adsorpsiyonunu ve eş zamanlı sakkarifikasyon-fermantasyon reaksiyonunu ilerletmek için beslemenin bir ismi olarak enzim-atık selüloz kombinasyonunun kullanmasını içeren atık selüloz içeren malzemelerin eş zamanlı olarak sakkarifikasyon-fermantasyonunda selülaz bileşenlerinin geri dönüştürülmesi ve yeniden kullanılması için bir yöntemi açıklamaktadır. Patent Belgesi 12, selülozun enzimatik olarak basit şekerlere dönüştürülmesi yöntemini açıklar, burada 150 mikrondan daha küçük partikül boyutuna sahip ince bölünmüş kuru selüloz, yüzde 10 ila 30 selüloz katı madde içeriğine sahip bir bulamaç oluşturmak üzere *Trichoderma viride* QM 9123'den elde edilen konsantre bir selülaz enzim solüsyonu ile kombine edilir, hidrolizin ardından, çözülebilir şeker bileşenleri, atık su içinde herhangi bir enzim olmaksızın bir moleküler elek membranı içinden basınçlı filtrasyon ile uzaklaştırılır.

Patent Dışı Belge 2, buharla patlatılmış mısır yeminin enzimatik sakkarifikasyonunu geliştirmek için üç aşamalı bir hidrolizi açıklar.

ÖNCEKİ TEKNİK BELGELERİ

[Patent Belgeleri]

Patent Belgesi 1: Japonca Çeviri PCT Patent Başvurusu Açıklamalı No. 11-506934
Patent Belgesi 2: JP 2005-229821 A
Patent Belgesi 3: JP 2003-212888 A
Patent Belgesi 4: JP 2001-95597 A
Patent Belgesi 5: JP 3041380 B
Patent Belgesi 6: JP 2006-87319 A
Patent Belgesi 7: JP 63-87994 A
Patent Belgesi 8: JP 2008-206484 A
Patent Belgesi 9: JP 55-144885 A
Patent Belgesi 10: US-A-3,764,475
Patent Belgesi 11: US-A-4,220,721
Patent Belgesi 12: US-A-3,642,580

Patent dışı Belgeler

Patent Dışı Belge 1: A. Aden v.d. "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover" NREL Teknik Raporu (2002) Patent Dışı Belge 2: J. Yang v.d., Bioresouce Technology 101 (2010), 4930-4935

BULUŞUN ÖZETİ

BULUŞ İLE ÇÖZÜLECEK SORUNLAR

Selülozun enzimatik hidroliz yöntemleri, yukarıda tarif edildiği gibi geliştirilmiştir, ancak bu yöntemlerin etkileri, kullanılan enzim miktarının azalması açısından yetersiz kalmıştır. Bu nedenle bu buluş, kullanılan enzim miktarının azaltılmasının etkisinin, geleneksel yöntemlere göre daha yüksek olduğu bir proses geliştirmeyi amaçlamaktadır.

SORUN ÇÖZME ARAÇLARI

Bu buluş, aşağıdaki [1] ila [8] uygulamalarına sahiptir.

[1] (1) ve (2) aşamalarında bir filamentöz mantardan bir selülaz eklenmesini içeren İstem 1 'de tanımlandığı gibi Aşamalar (1) ila (3)'den oluşan şeker sıvısı üretim prosesinin tekrarlanmasıyla şeker sıvısı üretmek için bir yöntemdir, burada, birincil ve ikincil hidroliz iki ayrı aşamada gerçekleştirilir, Aşama (3)'de elde edilen geri kazanılmış enzim, sonraki Aşama (1) ve sonraki şeker sıvısı üretim prosesleri için kullanılır ve söz konusu selüloz, alkali işleme, hidrotermal işleme veya seyreltik sülfürik asitle işlemesi ile ön işlemden geçirilir.

[2] [1]'e göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, yöntem ayrıca bir nanofiltrasyon ve/veya ters ozmoz membranı kullanılarak şeker sıvısının konsantre edilmesi aşamasını içerir.

[3] [1] veya [2]'ye göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada, şeker sıvısı üretim prosesi Aşama (1)'deki bir filamentöz mantardan elde edilen selülaz olarak, bir filamentöz mantardan elde edilen bir selülaz tarafından üretilen bir selüloz hidrolisattan geri kazanılan bir enzim bileşeni kullanılır.

[4] [1] ila [3]'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada Aşama (1) veya (2)'de bir filamentöz mantardan elde edilen selülaz, Trichoderma cinsine ait mikroorganizmanın bir kültür sıvısından elde edilen bir bileşen içerir.

[5] [1] ila [4]'den herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada geri kazanılmış enzim, ksilanaz ve/veya ksilosidaz içerir.

[6] [1] ila [5]'den herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada geri kazanılan enzim, filamentöz bir mantardan elde edilen suda çözünmeyen bir selülaz içerir.

[7] [1] ila [6]'dan herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada birincil hidrolizde ve ikincil hidrolizde eklenen enzim miktarları, şu ilişkiyi sağlar: Aşama (1)'de eklenen geri kazanılan enzimin miktarı > Aşama (2)'de eklenen taze enzimin miktarı.

[8] [1] ila [7]'den herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada Aşama (3)'deki bir filamentöz mantardan elde edilen selülazın geri kazanımı, şeker sıvısının bir ultrafiltrasyon membranından filtrelenmesiyle ve selülazın besleme tarafından geri kazanılmasıyla gerçekleştirilir.

BULUŞUN ETKİLERİ

Selülazın geri kazanıldığı ve yeniden kullanıldığı bir hidroliz yönteminde, hidroliz için kullanılan enzim miktarı, büyük ölçüde azaltılabilir ve selüloz içeren bir biyokütleden şeker üretiminin verimliliği, taze enzim eklemesinden önce birincil hidrolizi gerçekleştirmek için geri kazanılan enzim eklenmesi ve sonrasında ikincil hidrolizi gerçekleştirmek için taze enzim eklenmesiyle büyük oranda artırılabilir.

ÇİZİMLERİN KISA TARİFNAMESİ

- Şekil 1, bu buluşun hidroliz yönteminin prosedürünü gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 2, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 3, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 4, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 5, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 6, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 7, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 8, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 9, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 10, bu buluşta kullanılan bir aparatı gösteren şematik bir diyagramdır.
 Şekil 11, suda çözünmeyen Trichoderma-türevi selülaz bileşeninin SDS-PAGE sonucunu gösteren bir diyagramdır.

BULUŞU GERÇEKLEŞTİRMENİN EN İYİ YOLU

Bagas, dallı darı, Pennisetum purpureum, Erianthus, mısır yemi, pirinç samanı ve buğday samanı gibi otsu biyokütlerde ve ağaçlar ve atık yapı malzemeleri gibi odunsu biyokütlerde büyük miktarlarda selüloz bulunur. Bu selüloz içeren biyokütler, bu buluşta tercihen ham madde olarak kullanılabilir.

Selüloz içeren biyokütle, selüloz ve hemiselülozun yanı sıra (bundan sonra selüloz ve hemiselüloz için genel bir terim olarak "selüloz" olarak anılacaktır), aromatik makromoleküller olan lignin içerir. Bu nedenle, bir biyokütleden elde edilen selülozun, bir şeker sıvısı üretmek için bu buluşun yönteminde bir şeker sıvısı için bir ham madde olarak kullanıldığı durumlarda, enzimatik hidrolizin etkinliği, ön-işlem ile artırılabilir. Selüloz içeren bir biyokütlenin ön-işleme yönteminin örnekleri arasında asitle işleme, sülfürik asitle işleme, seyreltik sülfürik asitle işleme, alkali ile işleme, kostik soda ile işleme, hidrotermal işleme, subkritik su ile işleme, pulverizasyon ile işleme ve buğulama ile işleme yer almaktadır. Bu buluşta, ön işleme yöntemi, alkali ile işleme, hidrotermal işleme veya seyreltik sülfürik asitle işlemedir.

Alkali ile işlemenin örnekleri arasında, sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit veya amonyak gibi bir alkali kullanılan yöntemler bulunmaktadır ve amonyak özellikle tercihen kullanılabilir. Bu amonyakla işleme, JP 2008-161125 A ve JP 2008-535664 A'da açıklanan yöntemler ile gerçekleştirilebilir. Örneğin, amonyum, ağırlıkça %0,1 ile %15 aralığında bir konsantrasyonda biyokütleye eklenir ve işleme, 4 ila 200 °C'de, tercihen 90 ila 150 °C'de gerçekleştirilir. Eklenecek amonyak, sıvı veya gaz halinde olabilir. Ayrıca eklenecek olan amonyak formu, saf amonyak veya sulu amonyak olabilir. İşleme sayısı sınırlı değildir ve 1 veya daha fazla kez işleme gerçekleştirilebileceği. Özellikle, işlemenin 2 veya daha fazla gerçekleştirildiği durumlarda, ilk işleme koşulları, ikinci ve sonraki işleme koşullarından farklı olabilir. Amonyakla işlemeyle elde edilen işlenmiş ürün, enzimatik hidroliz reaksiyonunu tekrar gerçekleştirmek için amonyak nötralizasyonuna veya amonyak uzaklaştırılmasına tabi tutulmalıdır. Amonyak nötralizasyonu, katı maddelerin sıvı-sıvı ayrıştırma yoluyla hidrolisattan uzaklaştırılması sonrasında ya da katı maddelerin içinde bulunduğu durumda gerçekleştirilebilir. Nötralizasyon için kullanılacak asit reaktif kısıtlanmamıştır. Amonyak, amonyakla işlenmiş ürünü düşük basınç altında tutarak, amonyakın gaz haline buharlaşmasına izin vermek suretiyle uzaklaştırılabilir. Uzaklaştırılan amonyak geri kazanılabilir ve yeniden kullanılabilir.

Hidrotermal işleme durumunda, selüloz içeren biyokütlenin konsantrasyonu ağırlıkça %0,1 ila %50 olacak şekilde su eklenir ve elde edilen karışım 1 ile 60 dakika boyunca 100 °C ile 400 °C arasında bir sıcaklıkta işlenir. Bu sıcaklık koşulları altında işleme ile selülozun hidrolizi gerçekleşir. İşleme sayısı sınırlı değildir ve 1 veya daha fazla kez işleme gerçekleştirilebileceği. Özellikle, işlemenin 2 veya daha fazla gerçekleştirildiği durumlarda, ilk işleme koşulları, ikinci ve sonraki işleme koşullarından farklı olabilir.

Seyreltik sülfürik asitle işleme durumunda, sülfürik asidin konsantrasyonu tercihen ağırlıkça %0,1 ila %15, daha tercihen ağırlıkça %0,5 ila %5'tir. Reaksiyon sıcaklığı 100 ile 300 °C arasında ayarlanabilir ve tercihen 120 ile 250 °C arasında ayarlanır. Reaksiyon süresi 1 saniye ile 60 dakika arasında ayarlanabilir. İşleme sayısı sınırlı değildir ve 1 veya daha fazla kez işleme gerçekleştirilebileceği. Özellikle, işlemenin 2 veya daha fazla gerçekleştirildiği durumlarda, ilk işleme koşulları, ikinci ve sonraki işleme koşullarından farklı olabilir. Seyreltik sülfürik asitle işleme ile elde edilen hidrolizat, asit içerdiğinden, selüloz ile hidroliz reaksiyonunu tekrar gerçekleştirmek veya hidrolizati bir fermantasyon ham maddesi olarak kullanmak için nötralizasyon gereklidir.

Bu buluş, selülozun, filamentöz bir mantardan bir selüloz ile hidrolize edilmesiyle karakterize edilmektedir. Selülozun hidrolizi, selülozun monosakkaritleri ve/veya oligosakkaritleri üretmek için selülazın etkisi ile düşük moleküler ağırlıkta parçalara dönüştürüldüğü anlamına gelir. Hidroliz için reaksiyon koşulları, reaksiyon, selülazın tercih ettiği koşullar altında gerçekleştirildiği sürece kısıtlı değildir ve genel olarak reaksiyon sıcaklığı tercihen 15 °C ile 100 °C, daha tercihen 40 °C ile 60 °C aralığındadır ancak 50 °C olması daha da tercih edilir. Hidroliz için pH tercihen 3 ile 9, daha tercihen 4 ile 5.5 aralığındadır ancak 5 olması daha da tercih edilir. pH, istenen bir pH'a ulaşılacak şekilde bir asit veya alkali eklenerek ayarlanabilir. Ayrıca, uygun şekilde bir tampon da eklenebilir. Hidrolizde, selülozun enzimle temas ettirilmesini teşvik etmek ve tek biçimli hidrolizatta şeker konsantrasyonunu yapmak için karışımı karıştırmak tercih edilir. Selülozun katı madde konsantrasyonunun ağırlıkça %1 ile %25 aralığında olması ve katı maddelerin konsantrasyonunun daha tercihen ağırlıkça %8 ile %20 aralığında olması için su ilave edilmesi tercih edilir.

Filamentöz bir mantardan elde edilen selüloz örnekleri arasında, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Humicola*, *Acremonium*, *Irpex*, *Mucor*, *Talaromyces*, *Phanerochaete*, beyaz çürükçül fungus ve kahverengi çürükçül fungustan türetilenler yer almaktadır. Filamentöz bir mantardan elde edilen bu tür selülazlar arasında, yüksek selüloz degrades etme aktivitesine sahip olan *Trichoderma*'dan elde edilen selüloz tercihen kullanılır.

Trichoderma'dan elde edilen selüloz, ana bileşen olarak *Trichoderma* cinsine ait bir mikroorganizmadan türetilmiş selüloz içeren bir enzim bileşimidir. *Trichoderma* cinsine ait mikroorganizma kısıtlanmamıştır ve *Trichoderma reesei* tercih edilir. *Trichoderma reesei*'nin spesifik örnekleri arasında *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma reesei* QM9123, *Trichoderma reesei* Rut C-30, *Trichoderma reesei* ATCC68589, *Trichoderma reesei* PC3-7, *Trichoderma reesei* CL-847, *Trichoderma reesei* MCG77, *Trichoderma reesei* MCG80 ve *Trichoderma viride* QM9123 (*Trichoderma viride* 9123) bulunmaktadır. Selüloz, aynı zamanda, selüloz üretkenliğini arttırmak için mutant suşun, bir mutagen, UV ışınması veya benzerleri kullanılarak mutagenез ile hazırlandığı, *Trichoderma* cinsine ait mikroorganizmadan türetilen bir mutant suştan türetilir.

Bu buluşta kullanılan bir filamentöz mantarın selülazı, enzim bileşiminin selülozu hidrolize etme ve sakkarifiye etme aktivitesine sahip olduğu, sellobiyohidrolaz, endoglukanaz, eksoglukanaz, β -glukosidaz, ksilanaz ve ksilosidaz gibi birçok enzim bileşenini içeren bir enzim bileşimidir. Filamentöz bir mantardan elde edilen selülazın, selülozun degrades edilmesi için kullanıldığı durumlarda, çok sayıda enzim bileşeni ile uyumlu bir etki veya tamamlayıcı etki, selülozun etkili hidrolizini sağlar.

Sellobiyohidrolaz, selülozun terminal kısımlarından hidrolize edildiği selülazlar için genel bir terimdir. Sellobiyohidrolaza ait enzim grubu, AT Numarası 3.2.1.91 olarak tanımlanmıştır:

Endoglukanaz, selüloz moleküler zincirlerini merkezi kısımlarından hidrolize eden selülazlar için genel bir terimdir. Endoglukanaz grubuna ait enzimler grubu, AT numaraları AT 3.2.1.4, AT 3.2.1.6, AT 3.2.1.39 ve AT 3.2.1.73 olarak tanımlanmaktadır.

Eksoglukanaz, selüloz moleküler zincirlerini terminlerinden hidrolize eden selülazlar için genel bir terimdir. Eksoglukanaz grubuna ait enzimler grubu, AT numaraları AT 3.2.1.74 ve AT 3.2.1.58 olarak tanımlanmaktadır.

β -glukosidaz, sellooligosakkaritler veya sellobiyoz üzerinde etkili olan selülazlar için genel bir terimdir. β -glukozidaza ait enzimler grubu, AT numarası AT 3.2.1.21 olarak tanımlanmaktadır.

Ksilanaz, hemiselüloz veya özellikle ksilan üzerinde etkili olan selülazlar için genel bir terimdir. Ksilanaza ait enzimler grubu, AT numarası AT 3.2.1.8 olarak tanımlanmaktadır.

Ksilosidaz, ksiloligosakkaritler üzerinde etkili olan selülazlar için genel bir terimdir. Ksilosidaza ait enzimler grubu, AT numarası AT 3.2.1.37 olarak tanımlanır.

Trichoderma'dan elde edilen selüloz olarak ("*Trichoderma* türevli selüloz" olarak da bilinir), tercihen *Trichoderma* cinsine ait bir mikroorganizmanın bir kültür sıvısından türetilen bir bileşen(ler) içeren kullanılır. *Trichoderma* türevli bir kültür sıvısından türetilen bileşen(ler)in örnekleri arasında, mikroorganizmanın selüloz üreteceği şekilde hazırlanan bir besiyerinde *Trichoderma* cinsine ait bir mikroorganizmanın kültürlenmesiyle elde edilen bir kültür sıvısında bulunan selüloz dışındaki tüm bileşenler yer alır. Yani, bileşen(ler)in örnekleri arasında, selüloz dışındaki enzim bileşenleri, *Trichoderma* cinsine ait mikroorganizma hücreleri ve kültür için kullanılan besiyeri bileşenleri bulunmaktadır. Kültür için kullanılan besiyeri bileşenlerinin spesifik örnekleri arasında, glikoz ve ksiloz gibi monosakkaritler; mısır maserasyon sıvısı, maya ekstraktı ve selüloz gibi selüloz üretim indükleyicileri; mineraller ve vitamin bileşenleri bulunmaktadır. *Trichoderma* cinsine ait bir mikroorganizmanın hücreleri, *Trichoderma* cinsine ait bir mikroorganizmanın kültür sıvısından türetilen bir bileşen olarak bulunabilir.

Bunun nedeni, Trichoderma türevli selülozün bir bileşeni olarak Trichoderma cinsine ait bir mikroorganizmanın hücrelerinin dahil edilmesinin, geri kazanılan enzimin aktivitesini artırabilmesidir.

Trichoderma türevli selülozdaki enzim bileşenlerinin ağırlık oranları sınırlandırılmamıştır ve örneğin, Trichoderma reesei'den türetilen bir kültür sıvısı, ağırlıkça %50 ila %95 oranında sellobiyostrolaz içerir ve ayrıca, diğer bileşenler olarak endoglukanaz; glikozidaz, ekzo-1,4-β-D-glukosamidaz, ksilanaz, ksilosidaz, endo-1,4-mannosidaz, 1,2-α-mannosidaz, α-glukuronidaz, kitosanaz, kitinaz, 1,4-α-glikozidaz, α-galaktosidaz, β-galaktosidaz, arabinofuranosidaz, ksilan esteraz, swollenin, hidrofobin ve/veya benzerlerini de içerebilir. Trichoderma'ya ait mikroorganizmalar, kültür sıvısı içine güçlü selüloz bileşenleri üretirken, β-glikozidaz, hücrelerde veya hücre yüzeylerinde tutulduğundan kültür sıvısındaki β-glukosidaz aktivitesi düşüktür. Bu nedenle, içsel Trichoderma türevli selüloz bileşenlerine ek olarak, farklı bir türden veya aynı türden β-glukosidaz eklenebilir. Farklı bir türden β-glukosidaz olarak, tercihen Aspergillus'dan türetilen β-glukosidaz kullanılabilir. Aspergillus'tan türetilen β-glukosidaz örnekleri arasında Novozyme'den piyasaya sürülmüş olan Novozyme 188 bulunmaktadır. Farklı bir türden veya aynı türden β-glikozidaz eklemesi yöntemi, bir genin, β-glikozidazın, kültür sıvısına üretileceği şekilde mikroorganizmanın genetik rekombinasyonunu gerçekleştirmek üzere Trichoderma'ya ait bir mikroorganizmaya sokulduğu ve Trichoderma'ya ait mikroorganizmanın sonrasında kültürlendiği, ardından da kültür sıvısının izole edildiği bir yöntem olabilir.

Bu buluşta selülozun filamentöz bir mantardan elde edilen selüloz ile hidrolizi, iki ayrı aşamada, yani birincil hidroliz ve ikincil hidroliz aşamalarında gerçekleştirilir. Aşamalar, aşağıda sırayla açıklanmaktadır.

Bu buluşta birincil hidroliz, filamentöz bir mantardan elde edilen bir selülozün, hidrolizi gerçekleştirmek için enzim işlemine tabi tutulmamış selüloza ilave edilmesi anlamına gelir. Birincil hidroliz için kullanılan enzim ya daha sonra bahsedilen taze enzim ya da geri kazanılmış enzim olabilir ve geri kazanılmış enzimin kullanılması, şeker üretiminin verimliliğini artırabildiğinden, tercihen geri kazanılmış enzim kullanılır. Birincil hidrolizde geri kazanılmış enzim kullanılarak şeker üretiminin etkinliğinin arttığı mekanizmalar aşağıdaki gibidir. Geri kazanılan enzimde, hidroliz sırasında ısı nedeniyle yapıları kısmen denatüre edilen enzim bileşenleri bulunur ve bu enzim bileşenleri, selüloz yüzeyleri üzerinde bulunan adsorpsiyon alanlarına özellikle güçlü bir adsorpsiyon sergiler. Sonuç olarak, enzim bileşenleri selülozda, örneğin lignin gibi adsorptif yüzeye spesifik olarak adsorbe edilmez. Bu nedenle, daha sonra beslenen taze enzim bileşeninin spesifik olmayan adsorpsiyonu bastırılabilir. Genel olarak, selüloz ile degrede etmenin spesifik aktivitesi (protein ağırlığı başına enzimatik aktivite), geri kazanılan enzimde taze enzime göre daha yüksektir. Yani, daha yüksek spesifik aktiviteye sahip olan taze enzim bileşeninin spesifik olmayan adsorpsiyonunun bastırılmasının bir sonucu olarak, şeker verimliliği ve enzim geri kazanımı verimi artırılabilir. Bunun bir başka sebebi ise, bu buluşun geri kazanılan enziminin geri kazanım sayısı arttıkça, daha yüksek ksilan degrede etme aktivitesinin elde edilebilmesidir. Geri kazanılmış enzimde bulunan ksilan degrede etme aktivitesi, huş ağacı ksilan gibi bir reaktif ksilanının degrede edilmesi için bir substrat olarak ölçülebilir. Ksilan degrede etme aktivitesine katılan filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen selüloz örnekleri arasında ksilanaz ve ksilosidaz bulunur. Ksilanaza yönelik genlerin örnekleri arasında, xyn1 (GH11), xyn2(GH11), xyn3(GH10), xyn4(GH5), xyn5b(GH5) ve xyn11(GH11) bulunmaktadır. Ksilosidaza yönelik genlerin örnekleri arasında bxl1/bxl3a(GH3), bxl3b(GH3) ve bxl3c(GH3) bulunmaktadır. Yukarıdaki genlerin her biri, ksilanaz veya ksilosidazı kodlar ve filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen bir selüloz olarak bulunur. Geri kazanılan enzimdeki aktiviteleri artırılabilen ksilan-degrede edici enzimlerin örnekleri arasında ksilanaz 3 (moleküler ağırlık, 38 kDa; xyn3), endo-β-1,4-ksilanaz (moleküler ağırlık,

25 kDa;

xyn1) ve β-ksilosidaz (moleküler ağırlık, 88 kDa; bxl1/bxl3a) bulunmaktadır. Ksilan-degrede edici aktivitesi yukarıda tarif edildiği gibi güçlendirilmiş olan geri kazanılan enzimin birincil hidroliz için eklenmesiyle, selülozu çevreleyen ksilan bileşenleri, tercihen hidrolize edilir ve bu nedenle birincil ve ikincil hidrolizdeki şeker verimliliği artırılabilir.

Birincil hidrolizdeki reaksiyon süresi tercihen 15 dakika ile 6 saat arasındadır. Reaksiyon süresinin 15 dakikadan az olduğu durumlarda, şeker üretiminin etkinliğinin artırılma derecesi düşük olabilirken, reaksiyon süresinin 6 saatten az olmadığı durumlarda, birim zaman başına şeker üretiminin etkinliği düşük olabilir. Selüloz konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı ile pH kısıtlanmamıştır ve hidroliz için yukarıda tarif edilen şartlarda olabilir.

Birincil hidroliz için enzim, tercihen, ön işlemde geçirilmiş selülozun ağırlığına göre 1/1000 ila 1/50 ağırlık oranında eklenir. Ön işlenmiş selülozun ağırlığı, ön işlemde geçirilmiş selülozda bulunan katı madde içeriğinin ağırlığının ölçülmesiyle hesaplanabilir. Katı maddelerin ağırlığı, ön işlemde geçirilmiş ürünü, santrifüjleme, membran ayırma ya da benzeri ile katı-sıvı ayrıştırmasına tabi tutarak ve elde edileni, suda çözülebilen bileşikleri ayırmak ve uzaklaştırmak için su ile yıkayarak, ardından su içeren katı maddeleri, ağırlık sabit bir değere ulaşana kadar kurutup katı maddelerin ağırlığını ölçerek hesaplanabilir. Eklenen enzim miktarı, taze enzim içeren solüsyondaki protein konsantrasyonunun ölçülmesi ve eklenen taze enzimin solüsyonunun miktarı ile protein konsantrasyonunun çarpılmasıyla hesaplanabilir.

Birincil hidroliz ile elde edilen birincil hidrolizatta, hidroliz tarafından üretilen monosakkarit bileşenleri biriktirilir. Ksilan-degrede edici aktivite, özellikle geri kazanılmış enzimin birincil hidroliz için kullanıldığı durumlarda yüksek olma eğilimindedir. Yani birincil hidrolizde geri kazanılmış enzim kullanılarak elde edilen birincil hidrolizatta, büyük miktarda ksiloz üretilir.

Bu buluşun birincil hidroliziyle elde edilen birincil hidrolizat, olduğu gibi veya degrade edilmemiş katı maddelerin konsantrasyonunu arttırmak için katı-sıvı ayırma gibi bir işlem gerçekleştirildikten sonra daha sonra sözü edilecek olan ikincil hidroliz işlemine olduğu gibi tabi tutulabilir. Ayrıca, katı-sıvı ayırmasının birincil hidrolizden sonra gerçekleştirildiği durumlarda, ayırma ile elde edilen solüsyon bileşeni bir şeker sıvısı olarak kullanılabilir.

Bu buluşta ikincil hidroliz, hidrolizin gerçekleştirilmesi için yukarıda tarif edilen birincil hidroliz ile elde edilen hidrolizata ayrıca taze enzimin eklendiği anlamına gelir. Birincil hidrolizat için katı-sıvı ayırma işleminin gerçekleştirilmesine gerek yoktur. Ayrıca gerektiği kadar su eklenebilir, ancak su eklenmesi zorunlu değildir.

Bu buluşta taze enzim beslenir ve ikincil hidroliz için kullanılır. Bu, 1) birincil hidrolizde beslenen enzim miktarı (taze enzim veya geri kazanılmış enzim) ile yeterli bir selüloz degradasyon verimi elde edilememesi nedeniyle, yeterli selüloz degradasyon verimi elde etmek için taze enzimin ek olarak beslenmesi gerektiğinden ve 2) şeker üretim verimliliği ve enzim geri kazanımı verimliliği, taze enzimin iki ayrı aşamada, yani birincil hidrolizde ve ikincil hidrolizde beslenmesiyle artırılabilirinden gerçekleştirilir.¹⁵ Ayrıca, özellikle sadece geri kazanılmış enzimin kullanıldığı birincil hidrolizin gerçekleştirildiği durumlarda, ikinci ve sonraki işlemlerde şeker verimi azalır, bu da tercih edilmez. Bu nedenle, ikincil hidroliz için geri kazanılmış enzime ek olarak taze enzim besleyerek şeker verimi, birinci işlemde veya önceki işlemdeki değere eşit olabilir. Yani, bir şeker sıvısı üretmeye yönelik mevcut yöntemde, şeker üretiminin önceden belirlenmiş bir değerden daha az olmayan bir konsantrasyonda tekrarlanması mümkündür. İkincil hidroliz için taze enzimin eklenmesi, çok kez bölünmüş olarak (bölünmüş besleme) gerçekleştirilebilir. Örneğin, birincil hidrolizden sonra, ikincil hidroliz için eklenecek olan taze enzimin yarısı, birkaç saat boyunca hidroliz gerçekleştirmek için beslenebilir, ardından taze enzimin kalan yarısının beslenmesi gerçekleştirilebilir. Bu buluşta, taze enzimin ikincil hidrolizde birkaç kez bölünmüş olarak beslendiği durumlarda bile, bu işlemler ikincil hidrolize de dahil edilir.

İkincil hidrolizin reaksiyon süresi tercihen birincil hidrolizden daha uzundur. Daha spesifik olarak, ikincil hidrolizin reaksiyon süresi tercihen 1 ile 200 saat, daha tercihen 6 ile 72 saat, daha da tercihen 12 ile 24 saat aralığındadır. Reaksiyon süresi, kullanılan enzim miktarına, reaksiyon sıcaklığına, ilgili şeker konsantrasyonuna ve benzerlerine bağlı olarak kontrol edilmekle birlikte, 200 saatten uzun bir reaksiyon süresi, selülazın ısıtma yoluyla biyolojik aktivitesinin yok edilmesine neden olabilir, bu da geri kazanım ve selülazın yeniden kullanılması açısından tercih edilmez. Diğer taraftan, reaksiyon süresinin 1 saatten az olduğu durumlarda, elde edilen hidrolizatın şeker konsantrasyonu yetersiz olabilir.

İkincil hidroliz için enzim, tercihen, ön işlemden geçirilmiş selülozun ağırlığına göre 1/1000 ila 1/50 ağırlık oranında eklenir. Ön işlenmiş selülozun ağırlığı, birincil hidrolizden önce ön işlemde geçirilmiş edilmiş selülozun katı madde içeriğinin ağırlığından hesaplanabilir.

Birincil hidrolizde ve ikincil hidrolizde eklenen enzim miktarları, tercihen şu ilişkiyi sağlar: birincil hidroliz için eklenen enzim miktarı > ikincil hidroliz için eklenen enzim miktarı. Buradaki ekleme miktarı, taze enzimin veya geri kazanılmış enzimin protein konsantrasyonunun, beslenecek olan enzim solüsyonunun miktarı ile çarpılmasıyla hesaplanabilir. Protein konsantrasyonunun ölçümü açısından, geri kazanılmış enzimin ve taze enzimin protein konsantrasyonu, yukarıda açıklanan bilinen yöntemle hesaplanabilir. Buradaki protein konsantrasyonu, proteinin bir selülaz türevli bileşen veya başka bir bileşen olup olmadığına bakılmaksızın sadece protein konsantrasyonu anlamına gelir. Bu buluşta, ekleme bu ilişkiyi karşıladığında, daha yüksek bir şeker üretimi elde edilebilir ve enzimin geri kazanımı da artırılabilir.

Bu buluş, ikincil hidrolizatı, sonrasında bir filamentöz mantardan elde edilen bir selülazın geri kazanıldığı şeker sıvısı elde etmek için katı bir sıvı ayırmaya tabi tutma aşamasını ve birincil hidrolizde filamentöz bir mantardan elde edilen geri kazanılmış selülazın yeniden kullanılması aşamasını içerir. Aşamalar, aşağıda sırayla açıklanmaktadır.

İkincil hidrolizatın katı-sıvı ayrılması, şeker sıvısının ve ikincil hidroliz ile elde edilen hidroliz tortusunun ayrılması amacıyla gerçekleştirilir. Şeker sıvısı, yukarıda açıklanan selüloz hidrolizi ile elde edilen şeker solüsyonunu ifade eder. Şekerler genellikle monosakkaritlerin, glikoz ve ksiloz gibi monosakkaritlere; 2 ila 9 monosakkaritin dehidrasyon yoğunlaşması ile üretilen oligosakkaritlere ve en az 10 monosakkaridin dehidrasyon yoğunlaşması ile üretilen polisakkaritlere polimerizasyon derecesine göre sınıflandırılır. Bu buluşla elde edilen şeker sıvısı, ana bileşenler olarak glikoz ve ksiloz ve küçük miktarlarda olsa da, sellobiyoz gibi oligosakkaritler ile arabinoz ve mannoz gibi monosakkaritler içerir. Daha spesifik olarak, su içinde çözülmüş monosakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritlerin analiz yöntemi, standart bir örnekle karşılaştırmaya dayanarak nicelleştirmenin gerçekleştirilebildiği HPLC olabilir. Katı-sıvı ayırma yöntemi kısıtlanmamıştır ve katı-sıvı ayırma yönteminin örnekleri arasında bir vida dekanteri veya benzeri kullanılarak santrifüjleme, bir filtre presi veya benzeri kullanılarak filtrasyon ve bir mikrofiltasyon membranı veya benzerleri kullanılarak membran ayırma bulunmaktadır.

İkincil hidrolizatta, bir filamentöz mantardan elde edilen selüloz, bir şeker sıvısında çözünen veya katkısız bir materyal olarak katı tortuya adsorbe edilen bir halde bulunur. Filamentöz bir mantardan elde edilen böyle bir selüloz, şeker sıvı tarafındaki katı-sıvı ayrımı ile geri kazanılabilir. Selülazın, şekerli sıvıdan bir filamentöz mantardan geri kazanılmasına yönelik yöntemin tercih edilen örnekleri arasında, şeker sıvısının bir ultrafiltrasyon membranından filtre edildiği ve selülazın besleme tarafından geri kazanıldığı bir yöntem bulunmaktadır. Kullanılabilen ultrafiltrasyon membranının örnekleri arasında, polieter sülfon (PES), poliviniliden florür (PVDF) ve rejener selüloz gibi malzemelerden yapılmış membranlar yer almaktadır, ancak rejener selüloz, selüloz ile degrade edildiğinden, tercihen PES veya PVDF gibi sentetik bir polimer materyalden yapılmış bir ultrafiltrasyon membranı kullanılır. Ultrafiltrasyon membranının moleküler ağırlık kesimi, kullanılacak olan selülazın verimli bir şekilde geri kazanılabildiği ölçüde kısıtlanmamıştır ve ultrafiltrasyon membranı tercihen 1000 ile 50000 aralığında bir moleküler ağırlık kesimi değerine sahiptir. Geri kazanılan enzim miktarı, ikincil hidroliz için eklenen taze enzimin miktarına bağlı olarak değişir ve bu nedenle kısıtlanmamıştır.

Bu buluşta geri kazanımın ve yeniden kullanımın tekrarlanması işleminde, özellikle de bir ultrafiltrasyon membranı kullanılarak geri kazanılmış enzimin ayrılması işleminde, filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen suda çözünmeyen bir selüloz, bazı durumlarda geri kazanılmış bir enzim olarak elde edilebilir. Filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen bu tür suda çözünmeyen bir selüloz, hidroliz işlemi sırasında veya bir ultrafiltrasyon membranı ya da benzeri kullanılarak enzimin geri kazanımı sırasında üretilen bir enzim bileşenidir. Filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen bu tür suda çözünmeyen bir selüloz, tercihen, geri kazanılmış bir enzim bileşeni olarak katı-sıvı ayırma, filtrasyon veya benzeri ile uzaklaştırılmadan kullanılır. Filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen suda çözünmeyen selüloz, esas olarak sellobiyohidrolaz tarafından oluşturulur. Suda çözünmeme, bileşenin geri kazanılmış enzim sıvısında, geri kazanılmış enzimin bir tüpe yerleştirilip çöktüler halinde filamentöz bir mantar bileşeninden suda çözünmeyen selülazın elde edilmesi için tüpün santrifüjlenmesiyle ayrılabilen çöktüler, floklar veya mikropartiküller olarak var olduğu anlamına gelir. Çöktü olarak geri kazanılan filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen suda çözünmeyen selüloz, açık beyaz, açık sarı, kahverengi veya benzerleri olabilen rengine bağlı olarak tanımlanabilir. Suda çözünmeyen selülazın filamentöz bir mantar bileşeninden ayrılması ve suyun içinde yeniden süspansiyon edilmesiyle, bileşenin bir kısmı çözülebilir. Ancak, bileşenin tamamen çözünmesi için, üre veya bir sürfaktanın eklenmesi (sodyum dodesil sülfat, Tween 80, Triton X veya benzeri) gereklidir. Birincil hidroliz için filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen böyle bir suda çözünmeyen selüloz içeren geri kazanılmış enzimin yeniden kullanılmasıyla, daha yüksek şeker üretkenliği elde edilebilir.

İkincil hidrolizattan geri kazanılan filamentöz bir mantardan elde edilen selüloz (bundan sonra geri kazanılan enzim olarak anılacaktır), birincil hidroliz için yeniden kullanılır. Geri kazanılmış enzimin birincil hidrolizde kullanımının avantajları, yukarıda tarif edildiği gibidir. Geri kazanılmış enzimin yeniden kullanım sayısı kısıtlanmamıştır.

Bu buluşta, birincil hidroliz için ikincil hidrolizattan geri kazanılan enzimin yeniden kullanılması üzerine eklenen enzim miktarı, tercihen ikincil hidroliz için eklenen taze enzim miktarından daha yüksektir. Enzimin eklenme miktarı, yukarıda tarif edildiği gibi protein miktarı açısından ölçülür. Genel olarak, geri kazanılmış enzimin selüloz aktivitesi (protein miktarı başına enzim aktivitesi), taze enzimin selüloz aktivitesinden daha düşüktür ancak, bu buluşta, birincil hidroliz için geri kazanılan enzimin ilave edilme miktarı > ikincil hidroliz için taze enzimin ilave edilme miktarı ilişkisinin karşılandığı durumlarda, taze enzim miktarına göre şeker üretiminin etkinliği artar.

Bu buluşla elde edilen şeker sıvısı, glikoz, ksiloz, arabinoz ve selüloz ve hemiselülozdan türetilen mannoz (ksilan ve arabinan) gibi monosakkaritler içerir. Şeker sıvısındaki monosakkaritlerin oranları kısıtlanmamıştır ve ana monosakkarit bileşenleri glikoz ve ksilozdur. Bu buluşla elde edilen şeker sıvısı ayrıca miktarları monosakkaritlerin miktarlarına kıyasla çok küçük olmasına rağmen, sellobiyoz ve benzerleri gibi oligosakkaritler de içerebilir. Şeker sıvısında bulunan monosakkaritlerin konsantrasyonu kısıtlanmamıştır ve tercihen ağırlıkça %0,1 ile %20, daha tercihen ağırlıkça %5 ile %20 arasındadır.

Şeker sıvısındaki konsantrasyonun ağırlıkça %5 ile %20 aralığında olduğu durumlarda, şeker sıvısı konsantre edilmeden mikroorganizmalar için bir fermantasyon ham maddesi olarak kullanılabilir.

Bu buluşla elde edilen şeker sıvısı, bir nanofiltrasyon membranı ve/veya ters ozmoz membranı kullanılarak konsantre edilebilir. Bu buluşta kullanılabilen nanofiltrasyon membranı veya ters ozmoz membranının malzemesinin örnekleri arasında, selüloz asetat polimerleri, poliamidler, poliesterler, polimidler, vinil polimerler ve polisülfonlar gibi polimer malzemeleri bulunmaktadır. Membran, malzemelerin sadece bir tanesinden oluşan bir membran ile sınırlı değildir ve çok sayıda membran malzemesi içeren bir membran olabilir.

Bu buluşta kullanılacak olan nanofiltrasyon membranı olarak, bir spiral sarımlı membran elemanı tercih edilir. Tercih edilen nanofiltrasyon membran elemanının spesifik örnekleri arasında, GE Osmonics tarafından üretilen selüloz asetat nanofiltrasyon membran elemanı GE Sepa; Alfa-Laval tarafından üretilen, poliamid fonksiyonel tabakalarına sahip nanofiltrasyon membran elemanları NF99 ve NF99HF; FilmTec Corporation tarafından üretilen, çapraz bağlanmış piperazin poliamid fonksiyonel tabakalarına sahip nanofiltrasyon membran elemanları NF-45, NF-90, NF-200, NF-270 ve NF-400 ile Toray Industries, Inc. tarafından üretilen ve ana bileşen olarak çapraz bağlanmış piperazin poliamid fonksiyonel tabakalarına sahip aynı imalatçı tarafından üretilen bir nanofiltrasyon membranı UTC60 içeren nanofiltrasyon membranı elemanları SU-210, SU-220, SU-600 ve SU-610 bulunmaktadır. Nanofiltrasyon membran elemanı daha tercihen NF99 veya NF99HF; NF-45, NF-90, NF-200 ya da NF-

400 veya SU-210, SU-220, SU-600 ya da SU-610'dur. Nanofiltrasyon membran elemanı daha da tercihen SU-210, SU-220, SU-600 veya SU-610'dur.

Bu buluşta kullanılacak ters ozmoz membranı olarak, nanofiltrasyon membranında olduğu gibi spiral-sarımlı membran elemanı tercih edilmektedir. Tercih edilen ters ozmoz membran elemanının spesifik örnekleri arasında TORAY INDUSTRIES, INC. tarafından üretilen poliamid ters ozmoz membran modülleri bulunur. Düşük basınçlı tip modüller olan SU-710, SU-720, SU-720F, SU-710L, SU-720L, SU-720LF, SU-720R, SU-710P ve SU-720P ile yüksek basınçlı tip modüller olan, ters ozmoz membranı olarak UTC70 içeren SU-810, SU-820, SU-820L ve SU-820FA; aynı üretici tarafından üretilen selüloz asetat ters ozmoz membranları, Nitto Denko Corporation tarafından üretilen SC-L100R, SC-L200R, SC-1100, SC-1200, SC-2100, SC-2200, SC-3100, SC-3200, SC-8100 ve SC-8200; NTR-759HR, NTR-729HF, NTR-70SWC, ES10-D, ES20-D, ES20-U, ES15-D, ES15-U ile LF10-D, Alfa-Laval tarafından üretilen RO98pHt, RO99, HR98PP ile CE4040C-30D; GE tarafından üretilen GE Sepa ve FilmTec Corporation tarafından üretilen BW30-4040, TW30-4040, XLE-4040, LP-4040, LE-4040, SW30-4040 ve SW30HRLE-4040.

Selülozun enzimatik hidrolizi ile bir şeker sıvısı üretmek amacıyla bu buluşun yönteminin gerçekleştirilmesi için bir aparat, ekli çizimlere atıfla daha spesifik olarak tarif edilmiştir.

Bir şeker sıvısı üretmeye yönelik yöntemi gerçekleştirmek için bir aparat mekanizması olarak, bu buluşun aparatı aşağıdakileri içeren bir aparata sahiptir: 1. geri kazanılmış enzim besleme borusunun ve bir taze enzim besleme borusunun bağlandığı bir hidroliz tankı; 2. hidrolizatın katı-sıvı ayrımı için bir cihaz; 3. ultrafiltrasyon membranının yıkanması ve/veya bir sirkülasyon borusunda tutulan geri kazanılmış enzimin uzaklaştırılması için bir su besleme borusuna sahip bir şeker sıvı tutma tankı ve 4. enzim ve bir şeker sıvısının ayrılması için bir ultrafiltrasyon membran cihazı; bunların hepsi, işlevsel olarak birbirine bağlıdır. Yani, bir şeker sıvısı üretmeye yönelik bu buluşun yönteminde, birincil hidroliz, geri kazanılmış enzim kullanılarak gerçekleştirilir. Bunu gerçekleştirmek için, geri kazanılmış enzim besleme borusunun ve taze karbohidraz besleme borusunun bağlandığı 1. hidroliz tankı sağlandı. Ayrıca, hidrolizatta bulunan geri kazanılmış enzimin ayrılması için, bir hidrolizatın katı-sıvı ayrılması için 2. cihaz ve enzim ve bir şeker sıvısının ayrılması için 4. ultrafiltrasyon membran cihazı sağlandı. Ayrıca, geri kazanılmış enzim sıvısının uzaklaştırılması ve aynı anda ultrafiltrasyon membranının yıkanması için, bir sirkülasyon boru borusunda tutulan bir ultrafiltrasyon membranının yıkanması ve/veya bir geri kazanılmış enzimin uzaklaştırılması için bir su besleme borusuna sahip olan 3. şeker sıvı tutma tankı sağlandı. Aparatın spesifik örnekleri, aşağıda Şekil 2 ile Şekil 10'a referansla açıklanmaktadır. [0052] Şekil 2, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın bir örneğini göstermektedir. Yani, Şekil 2'deki aparat, bileşenler olarak şunları içerir:

şunları içeren bir hidroliz tankı (1): hidroliz tankına (1) bağımsız olarak bağlı olan, geri kazanılmış enzimi hidroliz tankına bağımsız olarak besleyebilen ve gerektiğinde beslenmeyi kontrol edebilen bir geri kazanılmış enzim besleme borusu (4) ve taze enzimi hidroliz tankına bağımsız olarak besleyebilen ve gerektiğinde beslenmeyi kontrol edebilen bir taze enzim besleme borusu (6);

hidrolizatın katı-sıvı ayrımı için bir pres filtrasyon cihazı (9);
bir ultrafiltrasyon membranının yıkanması ve/veya bir sirkülasyon borusu (15) içinde tutulan geri kazanılmış enzimin uzaklaştırılması için bir su besleme borusuna (11) sahip bir şeker sıvı tutma tankı (12) ve enzim ile şeker sıvısının ayrılması için bir ultrafiltrasyon membran cihazı (14).

Ayrıca hidroliz tankı (1) için hidroliz sırasında sıcaklığın korunması amacıyla bir termostat (2); karıştırılarak lignoselülozun karıştırılması için bir karıştırma bıçağı (3) ve bir selüloz girişi (7) sağlandı. Geri kazanılmış enzim besleme borusu (4) ve taze enzim besleme borusu (6), vanalar aracılığıyla sırasıyla geri kazanılmış bir enzim tutma tankına (5) ve bir taze enzim tutma tankına (8) bağlanır. Tercihen, vanalar, ayrı ayrı esnek vanalar ile elektronik olarak kontrol edilir.

Hidroliz tankı (1), hidrolizatın, pres filtrasyon cihazına (9) aktarılmasını sağlamak için hidrolizatın, bir vana ve bir hava pompası veya benzeri yoluyla ayrıldığı pres filtrasyon cihazına (9) bağlanır. Pres filtrasyon cihazına (9), filtrasyon basıncı sağlamak için bir kompresör (10) bağlanır.

Pres filtrasyon ile elde edilen şeker sıvısı, şeker sıvı tutma tankında (12) tutulur. Şeker sıvı tutma tankı (12), bir sirkülasyon pompasından (13) bir ultrafiltrasyon membran cihazına (14) bağlanır. Ultrafiltrasyon membranının membran tarafından (besleme tarafı) geçen geri kazanılmış enzim, bir sirkülasyon borusundan (15) şeker sıvı tutma tankına (12) döndürülür. Enzimin uzaklaştırılmasından sonra şeker solüsyonu, bir filtrat halinde ikincil tarafta (süzüntü tarafı) toplanır. Şeker sıvı tutma tankında (12) toplanan geri kazanılmış enzim, geri kazanılmış enzim borusu (16) ve bir pompa vasıtasıyla geri kazanılmış enzim tutma tankına (5) gönderilir. Su, su besleme borusundan (11) şeker sıvı tutma tankına (12) beslenir ve su, sirkülasyon pompası (13) ile ultrafiltrasyon membran cihazı (14) ve sirkülasyon borusundan (15) ile sirküle edilir. Bu şekilde, geri kazanılmış enzim bileşeni ultrafiltrasyon membranının yüzeyinde tutulur ve bir solüsyon olarak sirkülasyon borusunda (15) tekrar geri kazanılabilir, bu da işlemi daha verimli bir hale getirir. Ayrıca, ultrafiltrasyon membran yüzeyine ve benzerlerine yapışan filamentöz bir mantar bileşeninden elde edilen suda çözünmeyen selüloz da geri kazanılabilir. Ayrıca, suyun bu sirkülasyonu, ultrafiltrasyon membran cihazında (14) sağlanan ultrafiltrasyon membranının yıkanmasını sağlar ve membran kirlenmesinin bastırılması için yararlıdır. Bu işlemle, şeker sıvı tutma tankında (12) tutulan su, geri kazanılmış enzim borusu (16) yoluyla geri kazanılmış

enzim tutma tankına (5) gönderilir. Bu nedenle, su besleme borusu (11) aracılığıyla sağlanan su, hidroliz tankı (1) içinde liginoselüloz hidrolizi için kullanılır.

Şekil 3, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın başka bir örneğini göstermektedir. Yani, Şekil 3'te gösterilen aparat, bileşenler olarak şunları içerir:

birincil hidrolizi gerçekleştirmek için geri kazanılmış enzim selüloz ile karıştırmak amacını taşıyan bir selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazı (18);
bağımsız olarak hidroliz tankına (1) bağlanan, bir selüloz/geri kazanılmış enzim karışımı besleme borusu (17) ve bir taze enzim besleme borusu (6) içeren bir hidroliz tankı (1);
hidrolizatın katı-sıvı ayrımı için bir pres filtrasyon cihazı (9);
bir ultrafiltrasyon membranının yıkanması ve/veya bir sirkülasyon borusu (15) içinde tutulan geri kazanılmış enzimin uzaklaştırılması için bir su besleme borusuna (11) sahip bir şeker sıvısı tutma tankı (12) ve enzim ile şeker sıvısının ayrılması için bir ultrafiltrasyon membran cihazı (14).

Bu aparat, selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazı (18) ve cihaz için sağlanan giriş (17) açısından Şekil 2'de gösterilen aparattan farklıdır. Selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazı (18), selülozun geri kazanılmış enzim ile karıştırılması için bir cihazdır ve geri kazanılan enzim, bir iç vida kullanılarak selüloz ile karıştırılır. Selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazında (18), Aşama (1)'in birincil hidrolizi gerçekleştirilir. Selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazı (18), birincil hidroliz için uygun bir sıcaklıkta tutulabilir. Ayrıca, geri kazanılmış enzim, ön inkübasyona tabi tutulabilir, ardından, birincil hidrolizi gerçekleştirmek için selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazında (18) selüloz ile karıştırılabilir. Geri kazanılan enzimin selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazında (18) selüloz ile ön karıştırılması sayesinde, karışımın hidroliz tankı (1) içinde karıştırılması için gerekli olan gücün maliyeti azaltılabilir. Ayrıca, geri kazanılan enzimin selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazında (18) selüloz ile ön karıştırılması sayesinde, selülozun hidroliz tankında (1) dengeli bir şekilde dağıtılması için gerekli olan zaman da kısaltılabilir ve bu da, hidroliz için gerekli zamanın kısaltılmasıyla sonuçlanır. Selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazında (18) de edilen birincil hidrolizat, hidroliz cihazına (1) selüloz/geri kazanılmış enzim karışımı besleme borusu (17) içinden beslenir. Daha sonra, Aşama (2)'deki filamentöz bir mantardan elde edilen selülaz içeren taze enzim, ikincil hidrolizi gerçekleştirmek için taze enzim besleme borusundan (6) eklenir. Sonraki katı-sıvı ayrımı ve enzim geri kazanımı işlemi, Şekil 2'de gösterilen aparat için olanlarla aynıdır.

[0056] Şekil 4, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın başka bir örneğini göstermektedir. Şekil 4'te gösterilen aparat, Şekil 2'de gösterilen yukarıda tarif edilen aparat için bir filtre presi içeren bir katı-sıvı ayırma cihazının (19) kullanıldığı duruma karşılık gelmektedir. Şekil 2'de açıklanan geri kazanılmış enzim tutma tankı (5), taze enzim tutma tankı (8) ve karıştırma bıçağı (3), gerektiği gibi temin edilebildiğinden Şekil 4'te gösterilmemiştir. Katı-sıvı ayırma cihazı (19) ile ayrılan katı maddeler, bir katı madde boşaltma borusundan (20) çıkarılır. Katı-sıvı ayırma cihazı (19), yukarıdaki Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterildiği gibi bir filtre presi olabilir ve diğer katı-sıvı ayırma cihazlarının örnekleri arasında, bir sürekli santrifüj, vida dekantörü, De Laval santrifüj, vidalı pres, kayış filtre ve tambur filtre bulunmaktadır. Aparatın temel özellikleri açısından, hidroliz tankı, buraya bağımsız olarak bağlı olan bir geri kazanılmış bir enzim besleme borusu (4) ve bir taze enzim besleme borusuna (6) sahiptir ve bu sayede, geri kazanılmış enzimin ilavesi ile taze enzimin ilavesinin bağımsız kontrolü sağlanır ve şeker sıvısı tutma tankı (12), kendisine bağlı şekilde, su besleme borusundan (11) beslenen suyun bir ultrafiltrasyon membran cihazına (14) sirküle edilebildiği ve geri kazanılmış enzim borusu (16) yoluyla hidroliz tankına (1) beslenebildiği bir su besleme borusuna (11) sahiptir. Bu özellikler, Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilen aparatlar ile aynıdır.

Şekil 5, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın başka bir örneğini göstermektedir. Şekil 5'te gösterilen aparat temel olarak yukarıda açıklanan Şekil 4'teki aparat ile aynıdır, ancak ultrafiltrasyon membranının (14) geçirimsiz tarafı geri kazanılmış enzim tutma tankına (5) bağlıdır. Bu aparat özellikle, ultrafiltrasyon membranı olarak, lineer olarak veya ağaç şeklinde bağlanan spiral elemanları kullanır.

Bu aparatta, Şekil 2 ila 4'de gösterilen aparatlara benzer olarak bir su besleme borusu (11) bir şeker sıvısı tutma tankına (12) bağlanır. Su besleme borusundan (11) beslenen su, üç yollu bir vana (21) kullanılarak boruların anahtarlanmasıyla ultrafiltrasyon membran cihazına (14) sirküle edilebilir ve üç yollu vana (21) kullanılarak tekrar anahtarlama, suyun geri kazanılmış bir enzim tutma tankına (5) beslenmesini sağlar. Ayrıca, bir geri kazanılmış enzim borusu (16), bir geri kazanılmış enzim tutma tankına (5) bağlıdır ve bu boru vasıtasıyla su, hidroliz tankına (1) beslenebilir. Benzer şekilde, Şekil 2 ila 4'de gösterilen aparatlara benzer olarak bir geri kazanılmış bir enzim besleme borusu (4) ve bir taze enzim besleme borusu (6), hidroliz tankına bağımsız olarak bağlanıp geri kazanılmış enzimin ilavesinin ve taze enzim ilavesinin bağımsız kontrolüne izin verir.

Şekil 6, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın başka bir örneğini göstermektedir. Şekil 6'da gösterilen aparatta, bir mikro filtrasyon membran cihazı (22), bir katı-sıvı ayırma cihazının (19) akış yönünde yerleştirilir. Katı-sıvı ayırma cihazında (19) katıların yeterince uzaklaştırılmadığı durumlarda, mikrofiltrasyon membran cihazı (22) ile sonraki işleme, katı maddelerden neredeyse tamamen arınmış bir sıvının üretilmesini sağlar. Bu sayede, ultrafiltrasyon membran cihazının (14) membran kirlenmesi sonraki bir aşamada azaltılabilir.

Şekil 7, Şekil 6'da gösterilen mikrofiltrasyon membran cihazının (22) ayrıntılı bir çizimidir ve çapraz akışlı filtrasyon gerçekleştirmek için cihazın bir yapısını göstermektedir. Bu cihazda, katı-sıvı ayırma cihazı (19) ile ayrılan filtrat, bir katı-sıvı ayırma filtrat tankında (23) tutulur ve çapraz akışlı bir filtrasyon, bir pompa (24) vasıtasıyla bağlanan bir mikrofiltrasyon membranında (25) gerçekleştirilir. Mikrofiltrasyon membranı (25) düz bir membran veya içi boş fiber membran şeklinde olabilir. İçi boş fiber membran, iç basınç tipi membran veya dış basınç tipi membran olabilir.

Şekil 8, Şekil 6'da gösterilen mikrofiltrasyon membran cihazının (22) ayrıntılı bir çizimidir ve mikrofiltrasyon membran cihazında (22) kör uç filtrasyonun gerçekleştirilmesi için cihazın bir yapısını göstermektedir. Katı-sıvı ayırma cihazı (19) ile ayrılan filtrat, katı-sıvı bir ayırma filtratı tutma tankı (23) içinde tutulur ve bir mikrofiltrasyon membranı (25) içinden filtrelenir. Kör uç filtrasyon durumunda, membran yüzeyinin hava kabarcığı ile yıkanması için bir basınçlı hava besleme cihazı (26) sağlanabilir ve ters yıkama için bir ters yıkama pompası (27) yerleştirilebilir. Ters yıkama, sıvılaştırılmış sıvı depo tankına (12) ya geri kazanılmış filtrat ile ya da ortak bir membran yıkama sıvısı veya sıvı madde ile gerçekleştirilebilir. Mikrofiltrasyon membranı (25) düz bir membran veya içi boş fiber membran şeklinde olabilir. İçi boş fiber membran, iç basınç tipi membran veya dış basınç tipi membran olabilir.

Şekil 9, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın başka bir örneğini göstermektedir. Bir şeker sıvısı üretmek için bu buluşu gerçekleştirmeye yönelik aparat ayrıca şeker sıvısını konsantre etmek için bir ters ozmoz membranı ve/veya nanofiltrasyon membranı içerebilir. Şekil 9, bir nanofiltrasyon membranı veya ters ozmoz membranı cihazının (30) bağlandığı Şekil 4'te gösterilen aparata karşılık gelen bir aparatı göstermektedir. Ultrafiltrasyon membran cihazının (14) filtrat tarafına, bir şeker sıvı yoğunlaşma tankı (28) bağlıdır ve filtrasyon, bir yüksek basınçlı pompa (29) vasıtasıyla bir ters ozmoz membranı ve/veya nanofiltrasyon membranı (30) ile gerçekleştirilir. Şeker sıvısı, ters ozmoz membranı ve/veya nanofiltrasyon membranı tarafından bloke edilir ve bu nedenle şeker sıvısı yoğunlaşma tankında (28) yoğunlaştırılır. Öte yandan, fazla su, filtrat olarak uzaklaştırılabilir. Ters ozmoz membranı ve/veya nanofiltrasyon membranı cihazı (30), Şekil 2 ila 6'da gösterilen aparatlardan herhangi birinde ultrafiltrasyon membran cihazının (14) filtrat tarafına bağlanarak yerleştirilebilir.

Şekil 10, bu buluşun yöntemini gerçekleştirmek için aparatın başka bir örneğini göstermektedir. Geri kazanılmış enzim besleme borusu (4) ve taze enzim besleme borusu (6), tercihen hidroliz tankına (1) bağlıdır, ancak boru (4) ve boru (6), her bir enzim bileşeninin beslenmesi bu şekilde kontrol edilebildiği sürece üç yollu vana (31) veya benzerinde şekilde birleştirilerek hidroliz tankına (1) bağlı tek bir boru (taze enzim veya geri kazanılmış enzim besleme borusu) oluşturulabilir.

Su besleme borusundan (11) beslenen su, ılık su olabilir. Ilık suyun sıcaklığı, enzimin inaktivasyonunun önlenmesi açısından tercihen 60 °C'den yüksek değildir. Su besleme borusundan ılık su besleyerek ve ılık suyun, ultrafiltrasyon membranı cihazına (14) sirkülasyonunu sağlayarak, ultrafiltrasyon membranı için yüksek bir yıkama etkisi elde edilebilir. Daha yüksek bir yıkama etkisi için, ılık suyun sıcaklığı tercihen 30 °C ila 60 °C'dir.

ÖRNEKLER

Bu buluş, Örnekler yoluyla aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmaktadır. Ancak, bu buluş, bu Örneklerle sınırlı değildir.

(Referans Örnek 1) Selülazın Hazırlanması (Trichoderma türevli Selülaz Enzim Kompozisyonu)

Trichoderma'nın bir kültür sıvısından türetilen bir enzim bileşimi, aşağıdaki yöntemle hazırlandı.

[Önkültür]

%5 mısır maserasyon sıvısı (ağırlık/hacim), %2 glikoz (ağırlık/hacim), %0,37 amonyum tartarat (ağırlık/hacim), 0,14 (ağırlık/hacim) amonyum sülfat, %0,2 (ağırlık/hacim) potasyum dihidrojen fosfat, %0,03 (ağırlık/hacim) kalsiyum klorür dihidrat, %0,03 (ağırlık/hacim) magnezyum sülfat heptahidrat, %0,02 (ağırlık/hacim) çinko klorür, %0,01 (ağırlık/hacim) demir (III) klorür heksahidrat, %0,004 (ağırlık/hacim) bakır (II) sülfat pentahidrat, %0,0008 (ağırlık/hacim) manganez klorür tetrahidrat, %0,0006 (ağırlık/hacim) borik asit ve %0,0026 (ağırlık/hacim) heksamonyum heptamolibdat tetrahidrat, damıtılmış su içinde hazırlandı ve bu karışımın 100 mL'si, bölmeli bir 500 mL'lik Erlenmeyer şişesine yerleştirildi, ardından 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavlama yoluyla sterilize edildi.

Karışımı soğumaya bıraktıktan sonra, her biri, karışımdan ayrı olarak 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavlama ile sterilize edilen PE-M ve Tween 80, her biri %0,01 (ağırlık/hacim) ilave edildi. Bu önkültür besiyerine *Trichoderma reesei* ATCC68589, 1310⁵ hücre/mL'de inoküle edildi ve hücreler, 180 rpm'de çalkalanarak çalkalanarak 72 saat boyunca 28°C'de kültürlendi (shaker: TAITEC CORPORATION tarafından üretilen BIO-SHAKER BR-40LF).

[Ana Kültür]

%5 mısır maserasyon sıvısı (ağırlık/hacim), %2 glikoz (ağırlık/hacim), 510 (ağırlık/hacim) selüloz (Avicel), %0,37 amonyum tartarat (ağırlık/hacim), 0,14 (ağırlık/hacim) amonyum sülfat, %0,2 (ağırlık/hacim) potasyum dihidrojen fosfat, %0,03 (ağırlık/hacim) kalsiyum klorür dihidrat, %0,03 (ağırlık/hacim) magnezyum sülfat heptahidrat, %0,02 (ağırlık/hacim) çinko klorür, %0,01 (ağırlık/hacim) demir (III) klorür heksahidrat, %0,004 (ağırlık/hacim) bakır (II) sülfat pentahidrat, %0,0008 (ağırlık/hacim) mangan klorür tetrahidrat, %0,0006 (ağırlık/hacim) borik asit ve %0,0026 (ağırlık/hacim) heksamonyum heptamolibdat tetrahidrat, damıtılmış su içinde hazırlandı ve bu karışımın 100 L'si, 5 L karıştırma kavanozuna (ABLE tarafından üretilen DCP-2A) yerleştirildi, ardından 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavlama yoluyla sterilize edildi. Karışımı soğumaya bıraktıktan sonra, her biri, karışımdan ayrı olarak 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavlama ile sterilize edilen PE-M ve Tween 80, her biri %0,1 ilave edildi. Elde edilen karışıma, yukarıda tarif edilen yöntemle bir sıvı besiyeri ile önceden hazırlanmış 250 mL *Trichoderma reesei* ATCC68589 ön kültürü inoküle edildi. Hücreler, 1 vvm'lik bir havalandırma hızında 300 rpm'de 87 saat boyunca 28 °C'de kültürlendi. Santrifüjlemeden sonra, süpernatant, membran filtrasyonuna (Millipore tarafından üretilen Stericup-GV, materyal: PVDF) tabi tutuldu. Yukarıda tarif edilen koşullar altında hazırlanan kültür sıvısına, β-glukosidaz

(Novozyme 188), 1/100'lük bir protein ağırlığı oranında ilave edildi ve elde edilen karışım, aşağıdaki Örneklerde *Trichoderma* türevli selüloz olarak kullanıldı.

(Referans Örnek 2) Ön İşlemden Geçirilmiş Selülozun Hazırlanması

[Ön İşlemden Geçirilmiş Selülozun Hazırlanması 1]

Piyasada mevcut olan Avicel (Merck tarafından üretilmiştir), aşağıdaki Örneklerde, herhangi bir işlem yapılmadan ön işlemden geçirilmiş selüloz (1) olarak kullanıldı.

[Ön İşlemden Geçirilmiş Selülozun Hazırlanması 2]

Selüloz içeren bir biyokütle olarak pirinç samanı kullanıldı. Selüloz içeren biyokütle, %1 sulu sülfürik asit solüsyonuna batırıldı ve 30 dakika boyunca 150 °C'de bir otoklav (Nitto Koatsu Co., Ltd. tarafından üretilmiştir) kullanılarak işleme tabi tutuldu. Ardından, sulu sülfürik asit solüsyonundan (bundan sonra "seyreltik-sülfürik-asitle işleme sıvısı" olarak anılacaktır) sülfürik asitle işlenmiş selüloz ³⁵i ayırmak için katı-sıvı ayrıştırması gerçekleştirildi. Daha sonra, sülfürik asitle işlenmiş selüloz, katı içeriğin konsantrasyonu ağırlıkça %10 olacak şekilde seyreltik sülfürik asitle işleme sıvısı ile karıştırıldı ve pH, sodyum hidroksit ile yaklaşık 5'e ayarlandı. Elde edilen karışım, aşağıdaki örneklerde ön işlemden geçirilmiş selüloz (2) olarak kullanıldı.

[Ön İşlemden Geçirilmiş Selülozun Hazırlanması 3]

Selüloz olarak pirinç samanı kullanıldı. Selüloz içeren biyokütle, bir kompakt reaktöre (Taiatsu Techno Corporation tarafından üretilen TVS-N2 30 ml) beslendi ve sıvı nitrojen ile soğutuldu. Bu reaktöre, amonyak gazı akıtıldı ve numune, tamamen sıvı amonyak içinde ıslatıldı. Reaktörün kapağı kapatıldı ve reaktör oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika beklemeye bırakıldı. Ardından reaktör, 1 saat boyunca 150 °C'de bir yağ banyosunda işlendi. Daha sonra reaktör, yağ banyosundan çıkarıldı ve amonyak gazı bir çeker ocakta sızdırıldı, ardından reaktörün iç kısmı, vakumlu pompa ile 10 Pa'ya vakumlandı, böylelikle selüloz kurutuldu. Sonuç, aşağıdaki Örneklerde ön işlemden geçirilmiş selüloz (2) olarak kullanıldı.

[Ön İşlemden Geçirilmiş Selülozun Hazırlanması 4]

Selüloz içeren bir biyokütle olarak pirinç samanı kullanıldı. Selüloz içeren biyokütle, suya batırıldı ve 20 dakika boyunca 180°C'de bir otoklav (Nitto Koatsu Co., Ltd. tarafından üretilmiştir) kullanılarak karıştırma altında işleme tabi tutuldu. İşlem, 10 MPa'lık bir basınçta gerçekleştirildi. İşlemden sonra, işlenmiş biyokütle bileşeninin solüsyon bileşeninden (bundan böyle "hidrotermal olarak işlenmiş sıvı" olarak anılacaktır) ayrılması için santrifüj (3000 G) ile katı-sıvı ayrımı gerçekleştirildi. Bu, aşağıdaki Örneklerde ön işlemden geçirilmiş selüloz (4) olarak kullanıldı.

(Referans Örnek 3) Şeker Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Sulu şeker solüsyonundaki glikoz ve ksiloz konsantrasyonları, standart numunelerle karşılaştırmaya dayalı olarak aşağıda tarif edilen HPLC koşulları altında ölçüldü.

Kolon: Luna NH₂ (Phenomenex, Inc. tarafından üretilen)
Mobil faz: MilliQ:asetonitril = 25:75 (akış hızı, 0.6 mL/dakika)
Reaksiyon solüsyonu: Yok
Algılama yöntemi: RI (diferansiyel refraktif endeksi)
Sıcaklık: 30°C

(Referans Örnek 4) Trichoderma türevli Selülazın Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Trichoderma türevli selülazın enzim aktivitesi, aşağıdaki prosedürle ölçüldü.

1) Kristalin selüloz degrede edici Aktivite

Bir enzim sıvısına (önceden belirlenen koşullar altında hazırlanmış), Avicel (Merck tarafından üretilen bunun doğrulanması gerekiyor), 1 g/L'de eklendi ve sodyum asetat tamponu (pH 5.0) 100 mM'de eklendi, ardından elde edilen karışım, 24 saat boyunca 50 °C'de reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyon sıvısı, 1 mL'lik bir tüpte hazırlandı ve reaksiyon, yukarıda tarif edilen koşullar altında döndürülerek karıştırmaya bırakıldı. Daha sonra, tüp santrifüje tabi tutuldu ve süpernatant bileşenindeki glikoz konsantrasyonu ölçüldü. Glikoz konsantrasyonunun ölçümü, Referans Örnek 3'te açıklanan yöntemle göre gerçekleştirildi. Üretilen glikozun konsantrasyonu (g/L), Avicel degrede edici aktivitenin aktivite değeri kadar kullanıldı.

2) Sellobiyoz degrede edici Aktivite

Bir enzim sıvısına, 500 mg/L'de sellobiyoz (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) eklendi ve 100 mM'de sodyum asetat tamponu (pH 5.0) eklendi, ardından elde edilen karışım, 50 °C'de 0,5 saat boyunca reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyon sıvısı, 1 mL'lik bir tüpte hazırlandı ve reaksiyon, yukarıda tarif edilen koşullar altında döndürülerek karıştırmaya bırakıldı. Daha sonra, tüp santrifüje tabi tutuldu ve süpernatant bileşenindeki glikoz konsantrasyonu ölçüldü. Glikoz konsantrasyonunun ölçümü, Referans Örnek 3'te açıklanan yöntemle göre gerçekleştirildi. Üretilen glikozun konsantrasyonu (g/L), sellobiyoz degrede edici aktivitenin aktivite değeri kadar kullanıldı.

3) Ksilan degrede edici Aktivite

Bir enzim sıvısına, 500 mg/L'de ksilan (Huş ağacı ksilan, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) eklendi ve 100 mM'de sodyum asetat tamponu (pH 5.0) eklendi, ardından elde edilen karışım, 50 °C'de 0,5 saat boyunca reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyon sıvısı, 1 mL'lik bir tüpte hazırlandı ve reaksiyon, yukarıda tarif edilen koşullar altında döndürülerek karıştırmaya bırakıldı. Daha sonra, tüp santrifüje tabi tutuldu ve süpernatant bileşenindeki ksiloz konsantrasyonu ölçüldü. Ksiloz konsantrasyonunun ölçümü, Referans Örnek 3'te açıklanan yöntemle göre gerçekleştirildi. Üretilen ksilozun konsantrasyonu (g/L), ksiloz degrede edici aktivitenin aktivite değeri kadar kullanıldı.

(Karşılaştırmalı Örnek 1)

Karşılaştırmalı Örnek olarak, birincil hidroliz veya ikincil hidroliz gerçekleştirilmeden, aşağıda tarif edildiği gibi selülozdan bir şeker sıvısı üretilmiştir.

[Aşama 1: Hidroliz]

Önceden işleminden geçirilmiş selülozlardan 1 ila 4'e (her biri 1 g), Referans Örnek 1'de tarif edilen 0.2 mL (protein miktarı, 10 mg) taze enzim (protein konsantrasyonu, 50 mg/mL) eklendi ve sonrasında, Aşama 2'de tarif edilen prosedür ile geri kazanılan enzim solüsyonu ilave edildi. Elde edilen solüsyonun ağırlığı 10 g olacak şekilde damıtılmış su eklendi. Kompozisyon bir yan kol reaktörüne (φ30 NS14/23, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilmiştir) aktarıldı, ardından inkübasyon ve karıştırma (kompakt mekanik karıştırıcı CPS-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilen, dönüşüm adaptörü, üç yollu vanalı besleme girişi, inkübatör MG-2200) ile 19 saat boyunca 50 °C'de hidroliz gerçekleştirildi.

[Aşama 2: Şeker Sıvısından Katı-Sıvı Ayrımı ve Enzimin (Geri Kazanılmış Enzim) Geri Kazanımı]

Aşama 1'deki hidrolizat, santrifülemeyle (4500 G, 10 dakika) katı-sıvı ayrışmasına tabi tutuldu ve şeker sıvısı ile kalıntıya ayrıldı. Şeker sıvısındaki glikoz ve ksiloz konsantrasyonları, Referans Örnek 3'te tarif edilen yöntemle ölçüldü ve üretilen şekerler olarak hesaplandı.

Şeker sıvısı ayrıca, membran filtrasyonuna tabi tutuldu (Steriflip-GP, Millipore tarafından üretilmiştir, malzeme: PES). Elde edilen süpernatant, 10000'lük bir moleküler ağırlık kesim değerine sahip bir ultrafiltrasyon membranına (VIVASPIN 20, Sartorius stedim biotech tarafından üretilmiştir, malzeme: PES) uygulandı ve membran fraksiyonu 1 mL'ye düşene kadar 4500 G'de santrifüjlendi. Membran fraksiyonuna, 10 mL damıtılmış su eklendi ve elde edilen karışım, membran fraksiyonu 1 mL'ye düşene kadar tekrar 4500 G'de santrifüjlendi. Daha sonra, geri kazanılmış bir enzim elde etmek için enzim, membran fraksiyonundan geri kazanıldı. Geri kazanılan enzim, yukarıda tarif edildiği gibi Aşama 1'deki hidroliz için yeniden kullanıldı.

Bu Karşılaştırmalı Örnekte, Aşama 1 ve Aşama 2, selülozun geri kazanılması ve yeniden kullanılması için rotasyonda gerçekleştirildi. Aşama 1 ve Aşama 2'de oluşturulan döngü, geri kazanımı ve yeniden kullanımı gerçekleştirmek için toplamda 6 kez tekrarlandı. Geri kazanım ve yeniden kullanımın gerçekleştirilmediği 0. reaksiyon, aşağıdaki prosedürle gerçekleştirildi.

[Aşama 0: 0. Hidroliz]

Önceden işleminden geçirilmiş selülozlardan 1 ila 4'e (her biri 1 g), 0,3 mL (protein miktarı, 15 mg) taze enzim (protein konsantrasyonu, 50 mg/mL) eklendi (bu, 0. hidroliz olduğundan geri kazanılmış enzim eklenmedi).

Elde edilen solüsyonun ağırlığı 10 g olacak şekilde damıtılmış su eklendi. Kompozisyon bir yan kol reaktörüne (ϕ 30 NS14/23, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilmiştir) aktarıldı, ardından inkübasyon ve karıştırma (kompakt mekanik karıştırıcı CPS-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilen, dönüşüm adaptörü, üç yollu vanalı besleme girişi, inkübatör MG-2200) ile 19 saat boyunca 50 °C'de hidroliz gerçekleştirildi. Elde edilen hidrolizatın yukarıdaki Aşama 2'de tarif edilen yöntemle ayrılmasıyla geri kazanılmış bir enzim elde edildi. Bu sırada şeker sıvısındaki glikoz ve ksiloz konsantrasyonları ölçüldü.

Tablo 1, Aşama 0 ve 2'nin bir kez gerçekleştirildiği ve Aşama 1 ve 2'nin toplamda 6 kez gerçekleştirildiği reaksiyonlarla elde edilen şeker sıvısındaki glikoz konsantrasyonlarını (Glc, g/L) ve ksiloz konsantrasyonlarını (Xly, g/L) özetlemektedir. Geri kazanım ve yeniden kullanım sayısı arttıkça, glikoz (Glc) ve ksiloz (Xyl) azaldı. Ayrıca, yeniden kullanım sayısı (N) arttıkça, şeker üretim verimliliğinin azaldığı ortaya çıkmıştır.

EP 2 548 966 B1

[Tablo 1]

		0. hidroliz	1. hidroliz	2. hidroliz	3. hidroliz	4. hidroliz	5. hidroliz	6. hidroliz
Ön işlemde geçirilmiş selüloz 1	Glc	42	39	37	35	31	30	27
	Xyl	1	0.8	0.7	0.6	0.4	0.4	0.3
Ön işlemde geçirilmiş selüloz 2	Glc	32	30	28	27	25	23	20
	Xyl	7	4	3	2	0.9	0.6	0.3
Ön işlemde geçirilmiş selüloz 3	Glc	40	35	31	28	25	24	22
	Xyl	12	10	9	7	6	4	4
Ön işlemde geçirilmiş selüloz 4	Glc	25	23	22	20	18	18	15
	Xyl	4	2	2	1	0.4	0.2	0.1

(Örnek 1)

Örnek olarak, selüloz, bir şeker sıvısı üretmek için, aşağıda tarif edildiği gibi birincil hidrolize ve ikincil hidrolize tabi tutuldu.

[Aşama 1: Birincil Hidroliz]

Ön işlemden geçirilmiş selülozlardan 1 ila 4'e (her biri 1 g) damıtılmış su eklendi ve Aşama 3'ün daha sonra sözü edilen prosedürü ile geri kazanılan bir geri kazanılmış enzim ilave edildi, ardından toplam ağırlık 10 g olacak şekilde damıtılmış su eklendi. Kompozisyon bir yan kol reaktörüne (ϕ 30 NS14/23, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilmiştir) aktarıldı, ardından inkübasyon ve karıştırma (kompakt mekanik karıştırıcı CPS-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilen, dönüşüm adaptörü, üç yollu vanalı besleme girişi, inkübatör MG-2200) ile 1 saat boyunca 50 °C'de hidroliz gerçekleştirildi.

[Aşama 2: İkincil Hidroliz]

Aşama 1'deki birincil hidrolizata, Referans Örnek 1'de tarif edilen 0.2 mL (protein miktarı, 10 mg) taze enzim (protein konsantrasyonu, 50 mg/mL) eklendi ve reaksiyon, 50 °C'de 18 saat boyunca devam ettirildi.

[Aşama 3: Şeker Sıvısından Katı-Sıvı Ayrımı ve Enzimin (Geri Kazanılmış Enzim) Geri Kazanımı]

Aşama 3'deki ikinci hidrolizat, santrifüjlemeyle (4500 G, 10 dakika) katı-sıvı ayrışmasına tabi tutuldu ve şeker sıvısı ile kalıntıya ayrıldı. Şeker sıvısındaki glikoz ve ksiloz konsantrasyonları, Referans Örnek 3'te tarif edilen yöntemle ölçüldü ve N. üretilen şekerler olarak hesaplandı. Şeker sıvısı ayrıca, membran filtrasyonuna tabi tutuldu (Steriflip-GP, Millipore tarafından üretilmiştir, malzeme: Elde edilen süpernatant, 10000'lük bir moleküler ağırlık kesim değerine sahip bir ultrafiltrasyon membranına (VIVASPIN 20, Sartorius stedim biotech tarafından üretilmiştir, malzeme: PES) uygulandı ve membran fraksiyonu 1 mL'ye düşene kadar 4500 G'de santrifüjlendi. Membran fraksiyonuna, 10 mL damıtılmış su eklendi ve elde edilen karışım, membran fraksiyonu 1 mL'ye düşene kadar tekrar 4500 G'de santrifüjlendi. Daha sonra, geri kazanılmış bir enzim elde etmek için enzim, membran fraksiyonundan geri kazanıldı. Geri kazanılan enzim, yukarıda tarif edildiği gibi Aşama 1'deki hidroliz için yeniden kullanıldı.

Bu Örnekte, Aşama 1 ila Aşama 3, selülazın geri kazanılması ve yeniden kullanılması için rotasyonda gerçekleştirildi. Aşama 1 ila Aşama 3'de oluşturulan döngü, geri kazanımı ve yeniden kullanımı gerçekleştirmek için toplamda 6 kez tekrarlandı. Geri kazanım ve yeniden kullanımın gerçekleştirilmediği 0. reaksiyon, aşağıdaki prosedürle gerçekleştirildi.

[Aşama 0: 0. Hidroliz]

Önceden işlemden geçirilmiş selülozlardan 1 ila 4'e (her biri 1 g), 0,3 mL (protein miktarı, 15 mg) taze enzim (protein konsantrasyonu, 50 mg/mL) eklendi (bu, 0. hidroliz olduğundan geri kazanılmış enzim eklenmedi). Elde edilen solüsyonun ağırlığı 10 g olacak şekilde damıtılmış su eklendi. Kompozisyon bir yan kol reaktörüne (ϕ 30 NS14/23, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilmiştir) aktarıldı, ardından inkübasyon ve karıştırma (kompakt mekanik karıştırıcı CPS-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. tarafından üretilen, dönüşüm adaptörü, üç yollu vanalı besleme girişi, inkübatör MG-2200) ile 19 saat boyunca 50 °C'de hidroliz gerçekleştirildi. Elde edilen hidrolizatın yukarıdaki Aşama 3'de tarif edilen yöntemle ayrılmasıyla geri kazanılmış bir enzim elde edildi. Bu sırada şeker sıvısındaki glikoz ve ksiloz konsantrasyonları ölçüldü.

Tablo 2, Aşama 0 ve 3'ün bir kez gerçekleştirildiği ve Aşama 1 ila 3'ün toplamda 6 kez gerçekleştirildiği reaksiyonlarla elde edilen şeker sıvılarındaki glikoz konsantrasyonlarını (Glc) (g/L) ve ksiloz konsantrasyonlarını (Xly) (g/L) özetlemektedir. Geri kazanım ve yeniden kullanım sayısı arttıkça, glikoz (Glc) ve ksiloz (Xyl) azaldı. Ancak, şeker üretimi miktarının, Referans Örnek 1'deki (Tablo 1) durumlara zıt olarak kademeli olarak arttığı teyit edilebilir.

EP 2 548 966 B1

[Tablo 2]

		0. hidroliz	1. hidroliz	2. hidroliz	3. hidroliz	4. hidroliz	5. hidroliz	6. hidroliz
Ön işlemde geçirilmiş selülozda (1) şeker konsantrasyonu (g/L)	Glc	42	42	43	45	47	48	49
	Xyl	1	1	1	1	1.1	1.1	1.2
Ön işlemde geçirilmiş selülozda (2) şeker konsantrasyonu (g/L)	Glc	32	32	33	33	34	36	39
	Xyl	7	6	6	7	8	9	10
Ön işlemde geçirilmiş selülozda (3) şeker konsantrasyonu (g/L)	Glc	32	30	33	34	35	38	40
	Xyl	7	6	6	7	8	10	11
Ön işlemde geçirilmiş selülozda (4) şeker konsantrasyonu	Glc	25	24	24	25	25	26	26
	Xyl	4	3	3	3	3	5	5

Bu Örnekte, geri kazanılmış enzimle birincil hidroliz, 1 saat boyunca gerçekleştirildi ve taze enzim eklendikten sonra ikincil hidroliz, 18 saat boyunca gerçekleştirildi; bu şekilde hidroliz reaksiyonu, Karşılaştırmalı Örnek 1'deki gibi, 19 saat boyunca gerçekleştirildi. Ayrıca, taze enzimin ilave miktarı, Karşılaştırmalı Örnek 1'deki ile aynıydı. Bu nedenle, bu Örnekte, aşağıdaki aşamaları rotasyon halinde gerçekleştirerek geri kazanım ve yeniden kullanım ile elde edilen şekerin konsantrasyonunun, yani şeker üretim verimliliğinin, Karşılaştırmalı Örnekte verileden daha yüksek olabildiğini göstermiştir: 1. birincil hidrolizi gerçekleştirmek için geri kazanılmış enzimin ön işlemde geçirilmiş selüloza eklenmesi; 2. ikincil hidrolizi gerçekleştirmek için hidrolizata taze enzim eklenmesi; ve 3. elde edilen şeker sıvısından, geri kazanılmış enzim elde edilmesi için hidrolizatın, katı-sıvı ayrılmasına tabi tutulması.

(Örnek 2) Birincil Hidrolizde Geri Kazanılmış Enzimin İlave Miktarının Ölçülmesi

Örnek 1'deki birincil hidroliz için ilave edilecek olan geri kazanılmış enzimin protein konsantrasyonu, standart numune olarak bovin albümin (2 mg/mL) kullanılarak BCA ölçüm kiti (PIERCE tarafından üretilen BCA Protein Tahlil Reaktifi kiti) ile, kolorimetri gerçekleştirmek için 562 nm'de absorpsiyon ölçümü ile gerçekleştirildi. Tablo 3, ön işlemde geçirilmiş selüloz (2) için enzimin geri kazanımı/yeniden kullanımı açısından, N. geri kazanım ile elde edilen geri kazanılmış enzim miktarı ile taze enzim ilavesi miktarının arasındaki ilişkiyi özetlemektedir. Örnek 1 Tablo 2'de özetlenen glikoz üretim miktarı göz önünde bulundurulduğunda, bu Örnekle, glikoz üretim miktarının, birincil hidrolizde enzim ilavesinin miktarı > ikincil hidrolizde enzim ilavesinin miktarı ilişkisinin yerine getirilmesiyle artırılabilirliğini, ayrıca birincil hidroliz için yeniden kullanılmış olan geri kazanılmış enzim miktarı > ikincil hidroliz için eklenen taze enzim miktarı ilişkisinin yerine getirilmesiyle daha da artırılabilirliği gösterilmiştir; bu durum, 4. ve sonraki geri kazanım/yeniden kullanım durumlarında olduğu gibidir.

[Tablo 3]

	0. hidroliz	1. hidroliz	2. hidroliz	3. hidroliz	4. hidroliz	5. hidroliz	6. hidroliz
Geri kazanılmış enzimdeki protein miktarı (mg)	-	7	8,4	9,3	11	12	14
Taze enzimdeki protein miktarı (mg)	15	10	10	10	10	10	10
Ön işlemde geçirilmiş selülozdaki (2) glikoz konsantrasyonu (g/L)	32	32	33	33	34	36	39

(Örnek 3) Geri Kazanılmış Enzimin Enzim Aktivitesi

Geri kazanılmış enzimin aktivitesi, ön işlemde geçirilmiş edilmiş selüloz (3) durumları için ölçüldü (Karşılaştırmalı Örnek 1: geri kazanılmış enzimin taze enzimle aynı zamanda beslendiği durum, Örnek 1: geri kazanılmış enzimin, birincil hidrolizi gerçekleştirmek için eklendiği, ardından taze enzimin beslendiği durum). Enzim aktivitesi, Referans Örnek 3'e göre, 3 tip degrade etme aktivitesi için, yani, 1) kristalin selüloz degrade edici aktivite, 2) sellobiyoz degrade edici aktivite ve 3) ksilan-degrade edici aktivite için ölçüldü. Her bir degrade edici aktivite, geri kazanılmış enzimdeki taze enzimin (10 mg) enzim aktivitesinin nispi değeri (%) olarak ifade edildi, burada taze enzimin (10 mg) enzim aktivitesi, 100 (%) olarak alındı. Geri kazanılmış enzimlerin, 2. geri kazanım ve 4. geri kazanımdan sonraki aktiviteleri Tablo 4'te (Örnek 1) ve Tablo 5'te (Karşılaştırmalı Örnek 1) gösterilmiştir.

[Tablo 4]

	Taze enzim (10 mg)	Geri kazanılmış enzim
		2. hidroliz 4. hidroliz
Kristalin selüloz degrade edici aktivite	100	84 110
Sellobiyoz degrade edici aktivite	100	94 114
Ksilan degrade edici aktivite	100	154 250

[Tablo 5]

	Taze enzim (10 mg)	Geri kazanılmış enzim	
		2. hidroliz	4. hidroliz
Kristalin selüloz degrede edici aktivite	100	74	80
Sellobiyoz degrede edici aktivite	100	80	84
Ksılan degrede edici aktivite	100	114	106

Birincil hidrolizin sayısının çoğalmasıyla, kristalin selüloz degrede edici aktivitenin, sellobiyoz degrede edici aktivitenin ve ksılan degrede edici aktivitenin artma eğilimde olduğu ve böyle bir eğilimin, ksılan degrede edici aktivitede özellikle dikkate değer olduğu ortaya çıkarılmıştır. Özellikle *Trichoderma* türevli ksılanaz ve ksilosidazın, ksılan degrede edici aktiviteye dahil olması nedeniyle, bu enzimlerin geri kazanım verimliliğinin, birincil hidrolizin sayılarının artmasıyla arttığı düşünülmektedir.

(Örnek 4) Geri Kazanılmış Enzimdeki Toplu *Trichoderma* türevli Selülaz Bileşeni

4. ve daha sonraki geri kazanımlarda, ultrafiltrasyon membranının geçirimsiz bir sıvısı olarak geri kazanılan geri kazanılmış enzim bileşeninde suda çözünmeyen bir bileşenin üretildiği bulunmuştur. Bu suda çözünmeyen *Trichoderma* türevli selülaz bileşeni, aşağıdaki prosedürle analiz edildi.

Ön işlemde geçirilmiş selüloz (3) kullanarak, birincil hidroliz ve ikincil hidroliz, Örnek 1'deki prosedür ile gerçekleştirildi ve 4. geri kazanım ile geri kazanılmış enzim bileşeni, analiz edildi. Geri kazanılmış enzim (100 mL), 1,5 mL'lik bir santrifüj tüpüne yerleştirildi ve 5 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüjlendi. Ardından, supernatant tüpün alt kısmında bir pelet elde etmek için çıkarıldı. Pelet, saf 100 mL ilave edilerek yıkandı ve bir numune hazırlama tamponu (EZ Apply, ATTO Corporation), tüpe beslendi, ardından SDS-PAGE (e-PAGEL; jel konsantrasyonu, %15; ATTO Corporation) gerçekleştirildi. Boyama, Coomassie parlak mavi (BioSafecoomassie Stain, Bio-Rad Laboratories) ile gerçekleştirildi. Moleküler ağırlığı ölçmek için bir moleküler ağırlık işaretçisi (PrecisionPlus Protein Standardı, Kaleidoscope, Bio-Rad Laboratories) kullanıldı.

SDS-PAGE ile analizin elde edilen sonucu, Şekil 11'de gösterilmektedir. Bileşen, yaklaşık 50 ila 60 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğundan, *Trichoderma* türevli sellobiyohidrolazın ana bileşen olarak içerildiği ortaya çıkmıştır (Şekil 11).

(Örnek 5) Suda Çözünmeyen *Trichoderma* türevli Selülaz Bileşeninin Kurtarılmış Enzim Bileşeni Olarak Etkisi

Enzim, geri kazanılmış bir enzim elde etmek için Örnek 1 Aşama 3'teki (ön işlemde geçirilmiş selüloz 3) membran fraksiyonundan geri kazanıldı, ardından 5 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüjlendi. Sadece elde edilen süpernatant, geri kazanılmış enzim olarak yeniden kullanıldı ve sonuç olarak gözlemlenen şeker verimi, Örnek 1'deki sonuçlarla karşılaştırıldı. Yani, Örnek 5, suda çözünmeyen *Trichoderma* türevli selülaz bileşeninin uzaklaştırıldığı geri kazanılmış enzimin yeniden kullanımını tarif etmektedir.

EP 2 548 966 B1

[Tablo 6]

		0. hidroliz	1. hidroliz	2. hidroliz	3. hidroliz	4. hidroliz	5. hidroliz	6. hidroliz
Ön işlemde geçirilmiş selüloz 3 (Örnek 1)	Glc	32	30	33	34	35	38	40
	Xyl	7	6	6	7	8	10	11
Ön işlemde geçirilmiş selüloz 3	Glc	32	32	32	31	31	30	30
	Xyl	7	6	6	7	6	6	6

Yani, geri kazanılmış bir enzim olarak ihtiva edilen suda çözünmeyen Trichoderma türevli selüloz bileşeninin uzaklaştırılmadığı durumlarda, enzimin bir sonraki yeniden kullanımında daha yüksek bir şeker üretim oranının elde edilebileceği ortaya çıkmıştır.

ENDÜSTRİYEL UYGULAMA

Bu buluşla bir şeker sıvısı, selülozdan verimli bir şekilde üretilebilir ve elde edilen selüloz, çeşitli fermantasyon ürünleri için bir şeker malzemesi olarak kullanılabilir.

ŞEMBOLLERİN AÇIKLAMASI

1. Hidroliz tankı
2. Termostat
3. Karıştırma bıçağı
4. Geri kazanılan enzim besleme borusu
5. Kurtarılan enzim tutma tankı
6. Taze enzim besleme borusu
7. Selüloz girişi
8. Taze enzim tutma tankı
9. Pres filtrasyon cihazı
10. Kompresör
11. Su besleme borusu
12. Şeker sıvısı tutma tankı
13. Sirkülasyon pompası
14. Ultrafiltrasyon membran cihazı
15. Sirkülasyon borusu
16. Geri kazanılan enzim borusu
17. Selüloz/geri kazanılmış enzim karışımı besleme borusu
18. Selüloz/geri kazanılmış enzim karıştırma cihazı
19. Katı-sıvı ayırma cihazı
20. Katı madde boşaltma borusu
21. Üç yönlü vana
22. Mikrofiltrasyon membran cihazı
23. Katı-sıvı ayırma filtrat tankı
24. Pompa
25. Mikrofiltrasyon membranı
26. Basıncılı hava besleme cihazı
27. Ters yıkama pompası
28. Şeker sıvısı yoğunlaşma tankı
29. Yüksek basınç pompası
30. Ters ozmos membranı ve/veya nanofiltrasyon membran cihazı
31. Üç yönlü vana

İstemler

1. Bir şeker sıvısı üretim prosesinin tekrarlanmasıyla bir şeker sıvısının sağlanması için bir yöntem olup, şeker sıvısı üretim prosesi, aşağıdaki (1) ila (3) aşamalarından oluşur:

(1) birincil hidrolizi gerçekleştirmek için filamentöz bir mantardan elde edilen bir selüloza, selüloz eklenmesi;

(2) ikincil hidrolizi gerçekleştirmek için Aşama (1)'de oluşturulan hidrolizata filamentöz bir mantardan elde edilen taze bir selüloz eklenmesi ve

(3) Aşama (2)'de oluşturulan hidrolizatın, bir şeker sıvısı elde etmek için katı-sıvı ayrılmasına tabi tutulması ve enzimin, şeker sıvısından geri kazanılması;

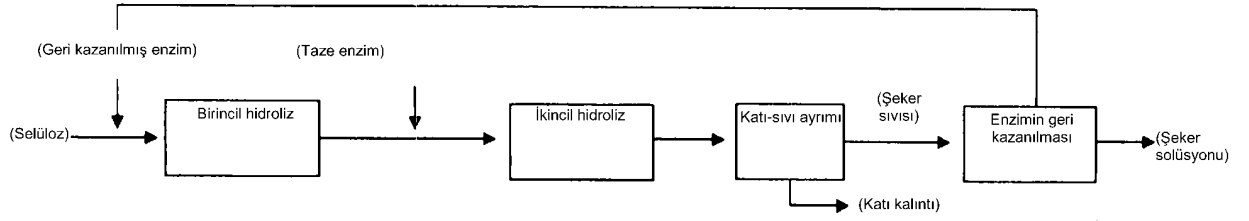
burada, birincil ve ikincil hidroliz, iki ayrı aşamada gerçekleştirilir ve

EP 2 548 966 B1

burada Aşama (3)'de elde edilen geri kazanılmış enzim, bir sonraki ve daha sonraki şeker sıvısı üretim proseslerinin (1) aşaması için kullanılır;
burada söz konusu selüloz, alkali işleme, hidrotermal işleme veya seyreltik sülfürik asitle işleme ile ön işleminden geçirilir.

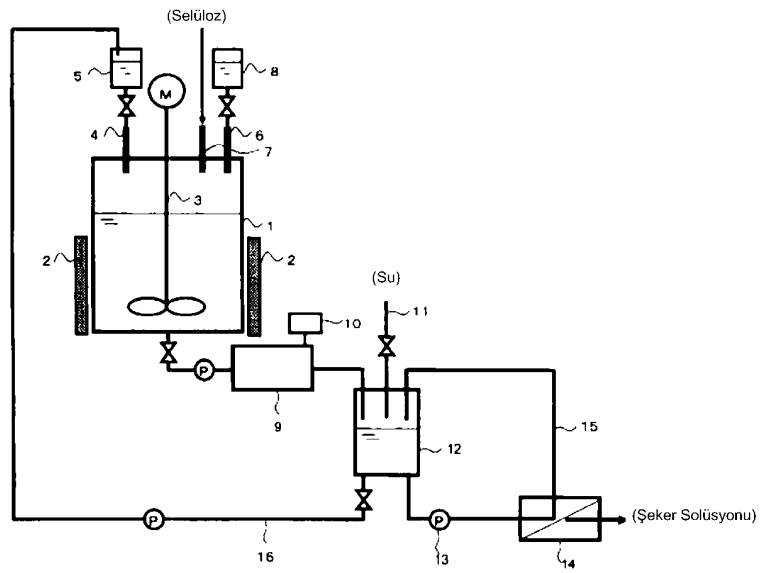
2. İstem 1'in bir yöntemi olup, yöntem ayrıca bir nanofiltrasyon ve/veya ters ozmoz membranı kullanılarak şeker sıvısının konsantre edilmesi aşamasını içerir.
3. İstem 1 ya da 2'ye göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada, şeker sıvı üretim prosesi Aşama (1)'deki bir filamentöz mantardan elde edilen söz konusu selülaz olarak, bir filamentöz mantardan elde edilen bir selülaz tarafından üretilen bir selüloz hidrolisattan geri kazanılan bir enzim bileşeni kullanılır.
4. İstem 1 ile 3'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada Aşama (1) veya (2)'de bir filamentöz mantardan elde edilen söz konusu selülaz, Trichoderma cinsine ait mikroorganizmanın bir kültür sıvısından elde edilen bir bileşen içerir.
5. İstem 1 ile 4'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada söz konusu geri kazanılmış enzim, ksilanaz ve/veya ksilosidaz içerir.
6. İstem 1 ile 5'ten herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada söz konusu geri kazanılmış enzim, filamentöz bir mantardan elde edilen suda çözünmeyen bir selülaz içerir.
7. İstem 1 ile 6'dan herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada söz konusu birincil hidrolizde ve söz konusu ikincil hidrolizde eklenen enzim miktarları, şu ilişkiyi sağlar: Aşama (1)'de eklenen söz konusu geri kazanılmış enzimin miktarı > Aşama (2)'de eklenen söz konusu taze enzimin miktarı.
8. İstem 1 ile 7'den herhangi birine göre bir şeker sıvısı üretme yöntemi olup, burada Aşama (3)'deki bir filamentöz mantardan elde edilen söz konusu selülazın geri kazanımı, söz konusu şeker sıvısının bir ultrafiltrasyon membranından filtrelenmesiyle ve söz konusu selülazın besleme tarafından geri kazanılmasıyla gerçekleştirilir.

EP 2 548 966 B1



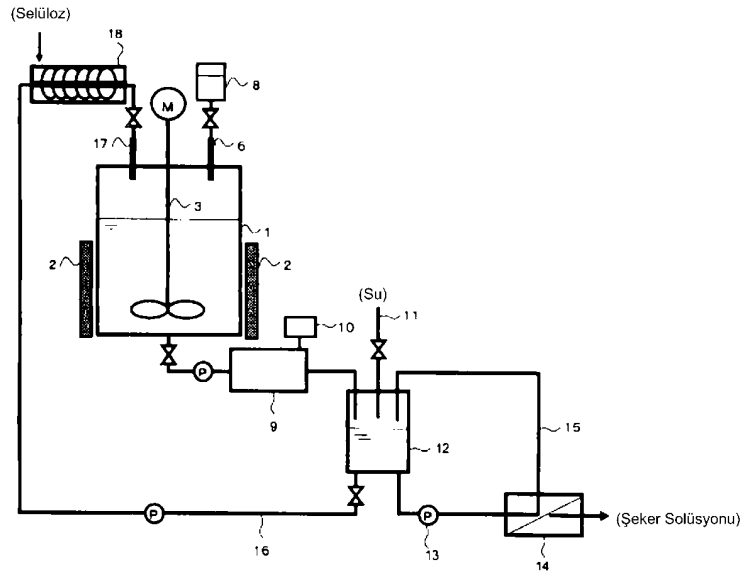
Şekil 1

EP 2 548 966 B1



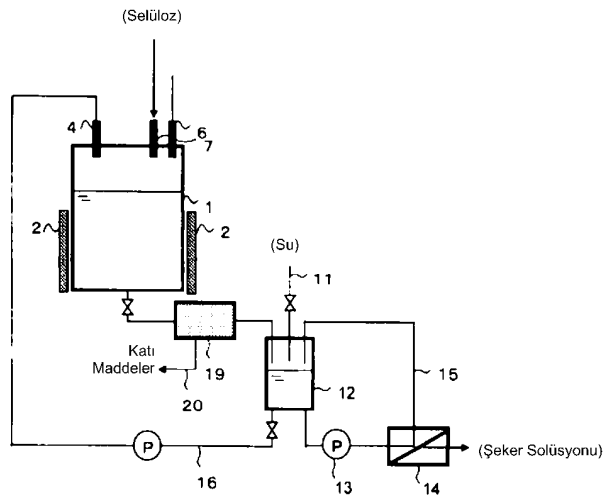
Şekil 2

EP 2 548 966 B1



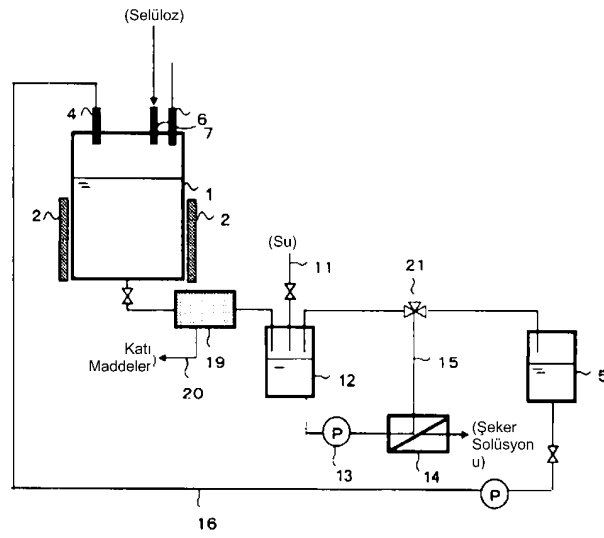
Şekil 3

EP 2 548 966 B1



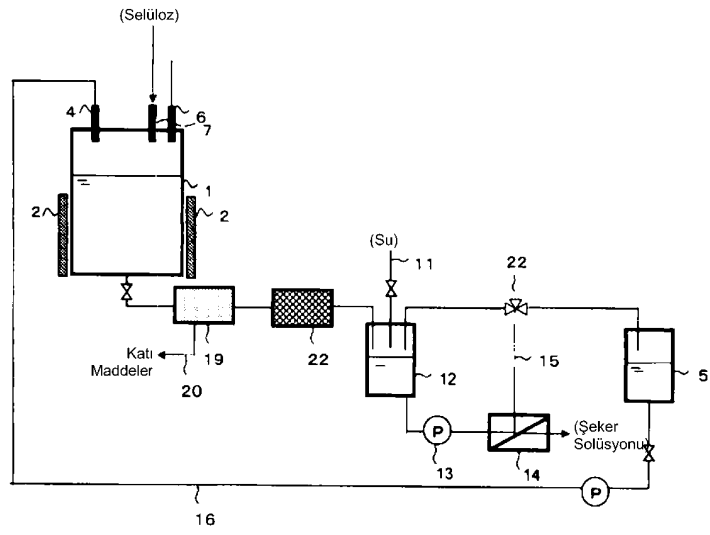
Şekil 4

EP 2 548 966 B1

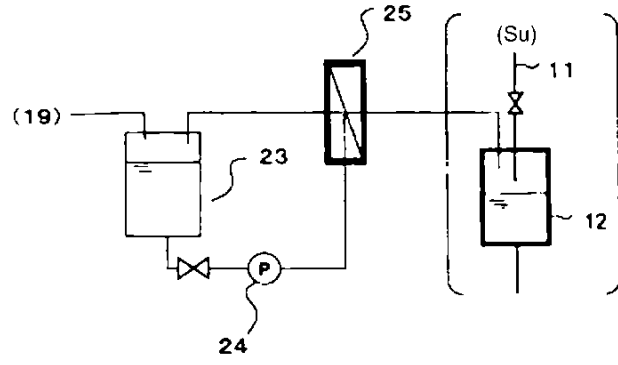


Şekil 5

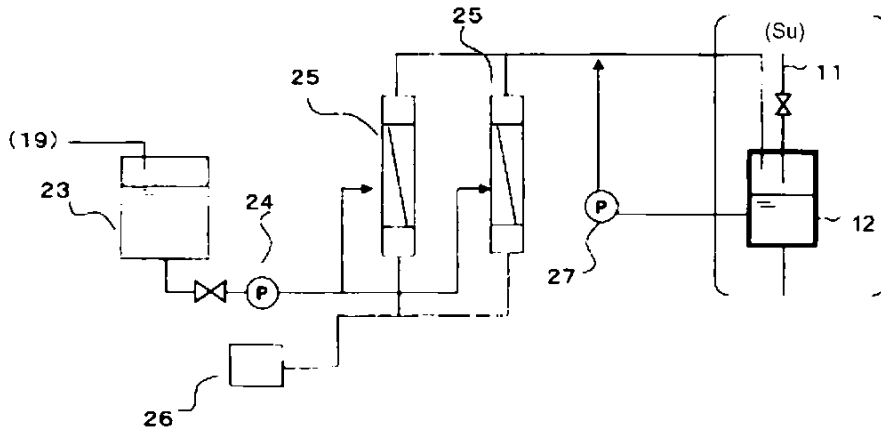
EP 2 548 966 B1



Şekil 6

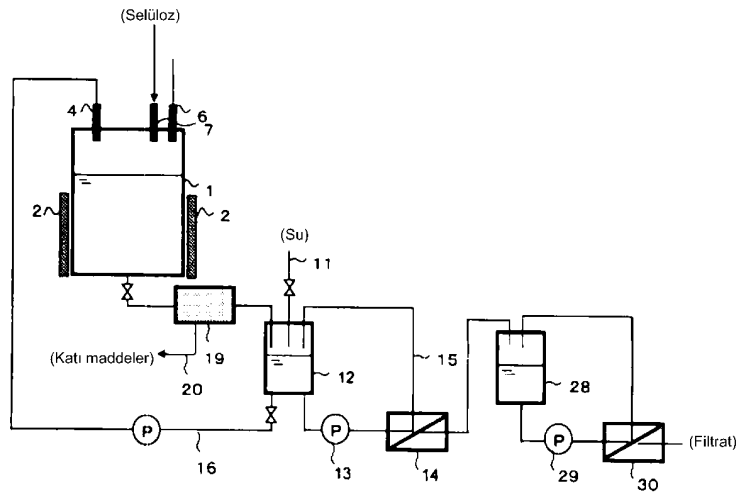


Şekil 7

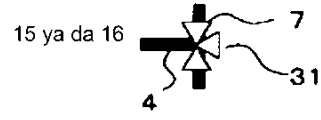


Şekil 8

EP 2 548 966 B1



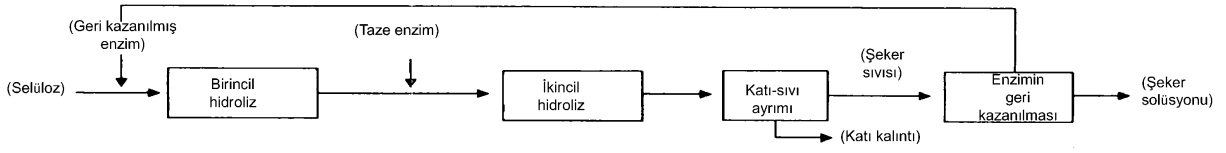
Şekil 9



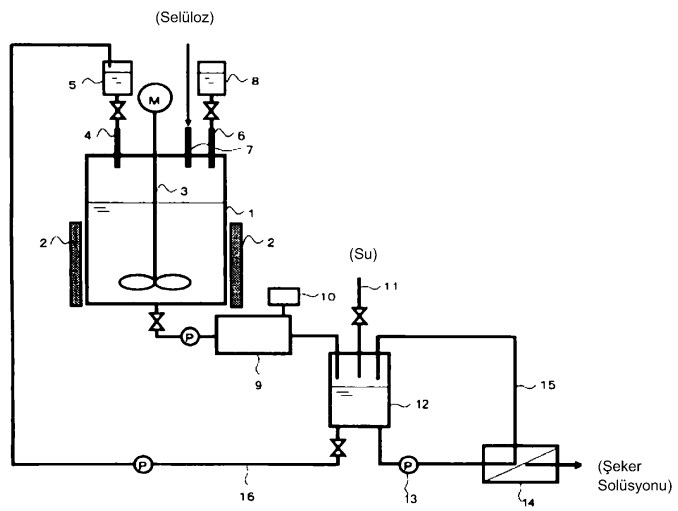
Şekil 10



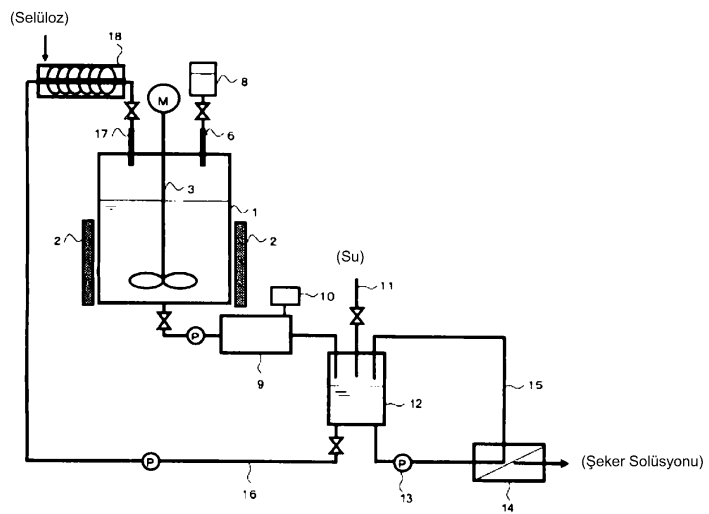
Şekil 11

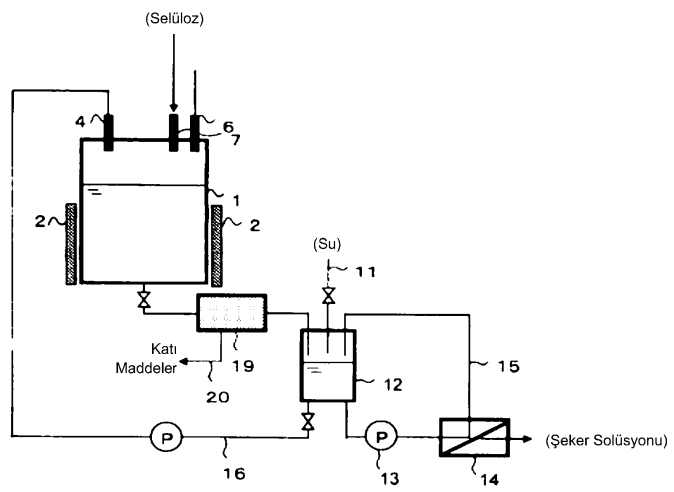


Şekil 1

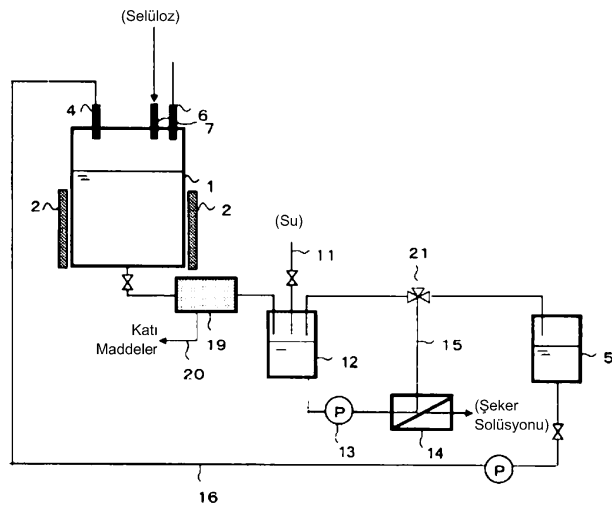


Şekil 2

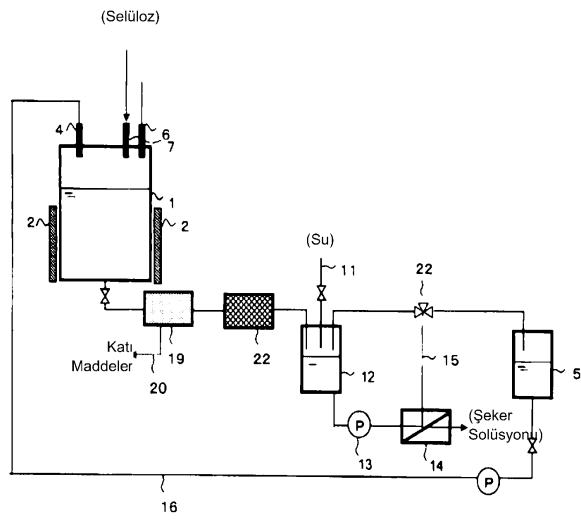




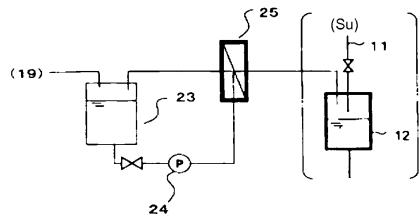
Şekil 4



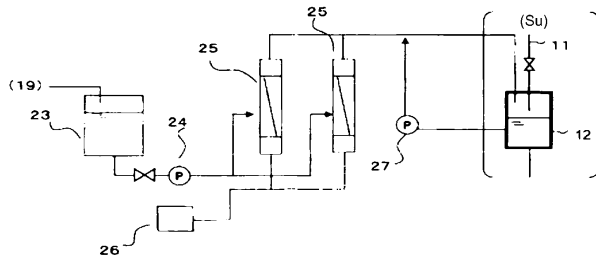
Şekil 5



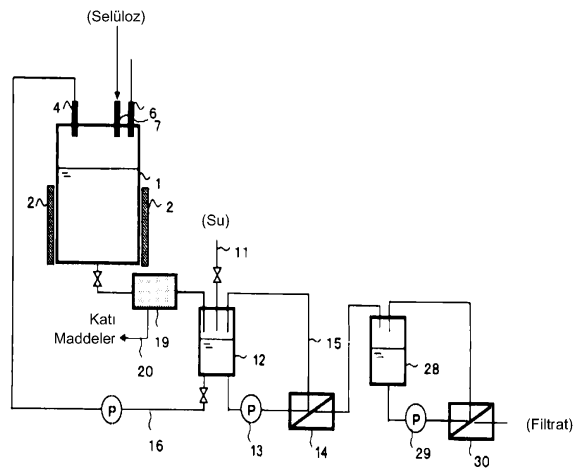
Şekil 6



Şekil 7



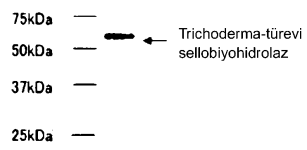
Şekil 8



Şekil 9



Şekil 10



Şekil 11