

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANTEP FISTIĞI KABUĞU HEMİSELÜLOZİK HİDROLİZATLARINDAN  
BİYOTEKNOLOJİK YOLLA KSİLİTOL ÜRETİMİ**

**Şeyma Özkan BÖLÜKBAŞI**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2025**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ANTEP FISTIĞI KABUĞU HEMİSELÜLOZİK HİDROLİZATLARINDAN BİYOTEKNOLOJİK YOLLA KSİLİTOL ÜRETİMİ

Şeyma Özkan BÖLÜKBAŞI

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Simel BAĞDER ELMACI

Bu tez çalışmasında, ülkemiz için önemli bir tarımsal yan ürün olan Antep fıstığı kabuğunun, yüksek katma değerli bir şeker alkolü olan ksilitole biyoteknolojik yöntemlerle dönüştürülmesi amaçlanmıştır. Lignoselülozik yapıya sahip bu atığın değerlendirilmesi kapsamında, ultrason destekli seyreltik asit ön işlemi uygulanarak hemiselülozdan ksiloz eldesi ve fermantasyona uygun bir hidrolizat üretimi hedeflenmiştir. Ön işlemler 80 °C’de; farklı süre (1–3 saat), asit konsantrasyonu (%5–10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve katı:çözücü oranı (0.5:10–1.5:10 g/mL) kombinasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Ön işlem parametrelerinin ksiloz konsantrasyonu ve inhibitör bileşik oluşumu üzerindeki etkileri Yanıt Yüzeyi Yöntemi (RSM) kullanılarak Box–Behnken deneme deseni ile modellenmiştir. Optimizasyon sürecinde, ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi ve toplam fenolik madde içeriğinin minimize edilmesi hedeflenmiş ve bu doğrultuda çoklu yanıt optimizasyonu uygulanmıştır. Çoklu optimizasyon sonucunda en uygun ön işlem koşulları 3 saat süre, %7.92 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 1.5:10 katı:çözücü oranı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda sıvı fazda 17020 ± 1310.1 mg/L ksiloz içeren ve inhibitör düzeyi düşük bir hidrolizat elde edilmiştir. Elde edilen hidrolizat, *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728 suşu ile ksilitol fermantasyonunda değerlendirilmiş; fermantasyon sonunda 9.999 g/L ksilitol, 0.44 g/g ürün verimi, %96.9 substrat dönüşümü, %48.3 teorik verim ve 0.060 g/L.h hacimsel verimlilik elde edilmiştir. Sonuç olarak, ultrason destekli asit ön işlemi ile Antep fıstığı kabuğundan fermantasyona uygun bir hemiselülozik hidrolizat üretilebileceği ve bu yaklaşımın ksilitol üretimi için sürdürülebilir ve etkili bir biyoproses alternatifi sunduğu ortaya konmuştur.

**Kasım 2025, 117 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Lignoselülozik atık; antep fıstığı kabuğu; ksilitol; ultrases destekli asit ön işlemi; *Barnettozyma populi*

## ABSTRACT

Master's Thesis

### BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF XYLITOL FROM HEMICELLULOSIC HYDROLYSATES OF PISTACHIO SHELLS

Şeyma Özkan BÖLÜKBAŞI

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Advisor: Asst. Prof. Dr. Simel BAĞDER ELMACI

In this thesis study, the valorization of pistachio shell, an important agricultural by product in Türkiye, into xylitol, a high value-added sugar alcohol, was investigated using biotechnological approaches. Within this scope, an ultrasound-assisted dilute acid pretreatment was applied to enhance hemicellulose hydrolysis and to obtain a fermentation-compatible hemicellulosic hydrolysate rich in xylose. Pretreatment experiments were carried out at 80 °C by varying processing time (1–3 h), sulfuric acid concentration (5–10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), and solid-to-liquid ratio (0.5:10–1.5:10 g/mL). The effects of these parameters on xylose concentration and inhibitor formation were evaluated using Response Surface Methodology (RSM) based on a Box–Behnken experimental design. During the optimization process, a multi-response optimization strategy was employed to simultaneously maximize xylose concentration and minimize total phenolic content. The optimal pretreatment conditions were determined as 3 h processing time, 7.92% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration, and a solid-to-liquid ratio of 1.5:10. Under these conditions, a hydrolysate containing 17020 ± 1310.1 mg/L xylose with low inhibitor levels was obtained. The optimized hydrolysate was subsequently used for xylitol production by *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728. At the end of fermentation, 9.999 g/L xylitol, a product yield of 0.44 g/g, 96.9% substrate conversion, 48.3% theoretical yield, and a volumetric productivity of 0.060 g/L.h were achieved. Overall, the results demonstrate that ultrasound-assisted dilute acid pretreatment enables the production of a fermentation-compatible hemicellulosic hydrolysate from pistachio shell and represents an effective and sustainable bioprocessing strategy for xylitol production from lignocellulosic residues.

**November 2025, 117 pages**

**Key Words:** Lignocellulosic waste; pistachio shell; xylitol; ultrasound-assisted acid pretreatment; *Barnettozyma populi*

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi ve tamamlanmasında her aşamada kıymetli bilgileriyle, destek ve yönlendirmeleriyle her koşulda yardımlarını esirgemeyen, tezimin şekillenmesinde büyük bir katkı sağlayan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Simel BAĞDER ELMACI'ya içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardım ve katkılarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni daima destekleyen aileme ve sabırlarıyla yanımda olan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 3501 – Kariyer Geliştirme Programı kapsamında desteklenen “Ultrases Destekli Asit Ön İşlemi Uygulanan Antep Fıstığı Hidrolizatlarından Biyoteknolojik Yolla Ksilitol Üretimi” başlıklı (Proje No: 124O078) proje kapsamında yürütülmüştür.

Şeyma Özkan BÖLÜKBAŞI  
Ankara, Kasım 2025

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ETİK .....                                                                                                             | i    |
| ÖZET.....                                                                                                              | ii   |
| ABSTRACT .....                                                                                                         | iii  |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....                                                                                                 | iv   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                                   | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                  | ix   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                                | x    |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                         | 1    |
| 2. KURUMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ .....                                                                          | 4    |
| 2.1 Ksilitol Hakkında Genel Bilgi .....                                                                                | 4    |
| 2.2 Ksilitolün Özellikleri.....                                                                                        | 4    |
| 2.3 Ksilitolün İnsan Sağlığına Etkileri .....                                                                          | 7    |
| 2.4 Ksilitol Kullanım Alanları ve Pazar Analizi.....                                                                   | 10   |
| 2.5 Ksilitol Üretimi.....                                                                                              | 12   |
| 2.5.1 Katı-Sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ksilitol üretimi.....                                                          | 13   |
| 2.5.2 Kimyasal yöntemle ksilitol üretimi.....                                                                          | 14   |
| 2.5.3 Biyoteknolojik yöntem ile ksilitol üretimi.....                                                                  | 14   |
| 2.5.3.1 Biyoteknolojik yolla ksilitol üretiminde kullanılan mikroorganizmalar .....                                    | 19   |
| 2.5.3.2 Ksilitol fermantasyonunu etkileyen faktörler .....                                                             | 20   |
| 2.6 Ksilitol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler.....                                                                    | 23   |
| 2.7 Lignoselülozik Biyokütle ve Yapısal Bileşimi .....                                                                 | 26   |
| 2.7.1 Selüloz .....                                                                                                    | 28   |
| 2.7.2 Hemiselüloz.....                                                                                                 | 30   |
| 2.7.3 Lignin .....                                                                                                     | 31   |
| 2.8 Ön İşlem ve Ön İşlem Türleri .....                                                                                 | 32   |
| 2.8.1 Asit ön işlemi.....                                                                                              | 34   |
| 2.8.2 Ultrases destekli seyreltik asit ön işlemi.....                                                                  | 36   |
| 2.9 Ön İşlem Sonrası Hemiselülozik Hidrolizatların İnhibitörlerden<br>Uzaklaştırılması Amacıyla Yapılan İşlemler ..... | 37   |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                                             | 39   |
| 3.1 Materyal .....                                                                                                     | 39   |

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1 Antep Fıstığı kabuklarının ön işlem için hazırlanması.....                                                                                                                      | 39 |
| 3.2 Yöntem .....                                                                                                                                                                      | 40 |
| 3.2.1 Biyokütle bileşiminin belirlenmesi .....                                                                                                                                        | 40 |
| 3.2.2 Ultrases destekli asit ön işlemi .....                                                                                                                                          | 40 |
| 3.2.3 Ön işlem sonrası elde edilen sıvı fraksiyon analizleri .....                                                                                                                    | 42 |
| 3.2.4 Şeker analizleri (Monosakkaritler) .....                                                                                                                                        | 43 |
| 3.2.5 Toplam fenolik madde analizi.....                                                                                                                                               | 43 |
| 3.2.6 HMF ve furfural analizleri.....                                                                                                                                                 | 44 |
| 3.2.7 Ön işlem sonrası elde edilen katı fraksiyon analizleri .....                                                                                                                    | 44 |
| 3.2.8 Ön işlem koşullarının optimizasyonu .....                                                                                                                                       | 45 |
| 3.2.9 Ön İşlem sonrası elde edilen hidrolizatın hemiselülozik detoksifikasyonu<br>ve ksilitol fermentasyonu .....                                                                     | 46 |
| 3.2.10 Ksilitol analizi.....                                                                                                                                                          | 47 |
| 3.2.11 İstatistiksel analizler .....                                                                                                                                                  | 47 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....                                                                                                                                                          | 48 |
| 4.1 Antep Fıstığı Kabuğunun Ön İşlem Öncesi Kimyasal Bileşimi .....                                                                                                                   | 48 |
| 4.2 Ultrases Destekli Asit Ön İşlemi Koşullarının Optimizasyonu: Antep<br>Fıstığı Kabuğu Hemiselülozik Hidrolizatında Ksiloz Verimi ve<br>İnhibitör Oluşumunun Değerlendirilmesi..... | 49 |
| 4.2.1 Deney tasarımı ve yanıtların oluşturulması.....                                                                                                                                 | 50 |
| 4.2.2 Çeşitli ön işlem parametrelerinin bağımlı değişkenler üzerine<br>etkilerinin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi.....                                                          | 58 |
| 4.2.2.1 Ksiloz konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi .....                                                                                                             | 58 |
| 4.2.2.2 HMF konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi .....                                                                                                                | 60 |
| 4.2.2.3 Furfural konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi.....                                                                                                            | 62 |
| 4.2.2.4 Fenolik madde konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi .....                                                                                                      | 65 |
| 4.2.3 Optimizasyon ve en uygun ön işlem koşullarının belirlenmesi.....                                                                                                                | 67 |
| 4.3 Ön İşlem Sonrasında Elde Edilen Katı Fraksiyonun Bileşimi ve Geri<br>Kazanım Verimi.....                                                                                          | 69 |
| 4.3.1 Katı fraksiyonun kimyasal bileşimi.....                                                                                                                                         | 70 |
| 4.3.2 Katı geri kazanım verimi (Solid recovery).....                                                                                                                                  | 73 |
| 4.3.3 Ön işlem sonrası ksilozun geri kazanım oranları.....                                                                                                                            | 76 |
| 4.3.4 Ön işlem sonrası ligninin uzaklaştırılma oranları .....                                                                                                                         | 77 |
| 4.3.5 Tek yanıtı dayalı ve çoklu yanıtı dayalı optimizasyon koşullarında elde<br>edilen hidrolizat ve katı fraksiyonların karşılaştırılması.....                                      | 79 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.4 Konvansiyonel Asit Ön İşlemi Sonrasında Elde Edilen Katı ve Sıvı Fazın Bileşimi.....</b>                                                                                                                                                                                             | <b>81</b>  |
| <b>4.5 Ksilitol Fermantasyonu .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>82</b>  |
| <b>5. SONUÇ.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>88</b>  |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>90</b>  |
| <b>EKLER.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>109</b> |
| <b>EK 1 İyon Değişim Kromatografisinden Elde Edilen Standart Monosakkarit Kromatogramı Örneği ve Monosakkarit Standart Kurve Örnekleri.....</b>                                                                                                                                             | <b>110</b> |
| <b>EK 2 Gallik Asit Standart Eğrisi .....</b>                                                                                                                                                                                                                                               | <b>111</b> |
| <b>EK 3 HMF ve Furfural Standart Eğrileri.....</b>                                                                                                                                                                                                                                          | <b>112</b> |
| <b>EK 4 Ksilitol Standart Eğrisi .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>113</b> |
| <b>EK 5 Ön İşlem Parametreleri Olan Süre (<math>X_1</math>), Asit Konsantrasyonu (<math>X_2</math>) ve Katı/Sıvı Oranının (<math>X_3</math>), Glukan (%), Ksilan (%), Asitte Çözünmeyen Lignin (%) ve Asitte Çözünen Lignin (%) Üzerindeki Etkilerine Ait Varyans Analiz Tabloları.....</b> | <b>114</b> |
| <b>EK 6 Ön İşlem Parametreleri Olan Süre (<math>X_1</math>), Asit Konsantrasyonu (<math>X_2</math>) ve Katı/Sıvı Oranının (<math>X_3</math>) Katı Geri Kazanım Verimi (%) Üzerine Etkisine Ait Varyans Analiz Tablosu.....</b>                                                              | <b>116</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>117</b> |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                                |                                                                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| °C                             | Santigrat derece                                                                        |
| %                              | Yüzde                                                                                   |
| UV-Vis                         | Ultraviyole – Görünür Spektrofotometri                                                  |
| HPLC                           | High Performance Liquid Chromatography<br>(Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)     |
| HPAEC-PAD                      | High Performance Anion Exchange<br>Chromatography with Pulsed Amperometric<br>Detection |
| RSM                            | Response Surface Methodology (Yanıt Yüzey<br>Yöntemi)                                   |
| CCD                            | Central Composite Design (Merkezi Bileşik<br>Tasarım)                                   |
| LAP                            | Laboratory Analytical Procedure<br>(Laboratuvar Analitik Prosedürü)                     |
| LCB                            | Lignoselülozik Biyokütle                                                                |
| RH                             | Rice Husk (Pirinç Kabuğu)                                                               |
| SCB                            | Sugarcane Bagasse (Şeker Kamışı Posası)                                                 |
| NaOH                           | Sodyum hidroksit                                                                        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sülfürik Asit                                                                           |
| GAE                            | Galik Asit Eşdeğeri                                                                     |
| DO                             | Dissolved Oxygen (Çözülmüş Oksijen)                                                     |
| rpm                            | Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir<br>sayısı)                                     |
| vvm                            | Volume of air per Volume of medium per<br>Minute (Hava akış oranı)                      |
| YP/S                           | Ürün verimi / Substrat tüketimi (g/g)                                                   |
| η (%)                          | Fermantasyon verimliliği (Efficiency)                                                   |
| g/L                            | Gram / Litre                                                                            |
| mg/L                           | Miligram / Litre                                                                        |
| mL                             | Mililitre                                                                               |
| pH                             | Asitlik / bazlık derecesi                                                               |
| MPa                            | Megapascal (Basınç birimi)                                                              |
| GRAS                           | Generally Recognized As Safe (Genel Olarak<br>Güvenli)                                  |
| WHO                            | World Health Organization (Dünya Sağlık<br>Örgütü)                                      |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Ksilitolün yapısı ((2R,3R,4S)-pentan-1,2,3,4,5-pentol) .....                                                                                                                                                                                           | 4  |
| Şekil 2.2 Biyoteknolojik ve kimyasal yöntemle ksilitol üretimi .....                                                                                                                                                                                             | 13 |
| Şekil 2.3 Lignoselülozik biyokütle yapısı .....                                                                                                                                                                                                                  | 28 |
| Şekil 2.4 Selülozun yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                 | 30 |
| Şekil 2.5 Lignoselülozik yapı bileşenleri .....                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| Şekil 2.6 Ön işlem prosesi .....                                                                                                                                                                                                                                 | 33 |
| Şekil 2.7 Ön işlem türleri.....                                                                                                                                                                                                                                  | 34 |
| Şekil 3.1 Öğütülmüş Antep fıstığı iç kabuğu örnekleri (partikül büyüklükleri sırasıyla : ~2.5 mm ve ~500 µm) .....                                                                                                                                               | 39 |
| Şekil 3.2 ELMASONIC P Ultrasonic Cleaning Unit .....                                                                                                                                                                                                             | 41 |
| Şekil 3.3 Ultrases destekli asit ön işlemi akış şeması .....                                                                                                                                                                                                     | 42 |
| Şekil 3.4 Ön İşlem sonrası sıvı fraksiyon .....                                                                                                                                                                                                                  | 43 |
| Şekil 3.5 Ön işlem sonrası katı fraksiyon .....                                                                                                                                                                                                                  | 43 |
| Şekil 4.1 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarından elde edilen sıvı fazın ksiloz konsantrasyonları (mg/L).....                                                                                    | 51 |
| Şekil 4.2 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarından elde edilen sıvı fazın toplam fenolik madde konsantrasyonları (mg GAE/g biyokütle).....                                                        | 54 |
| Şekil 4.3 Ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesine yönelik tek yanıtla dayalı yanıt yüzey optimizasyonu sonucu elde edilen optimizasyon grafiği .....                                                                                                       | 68 |
| Şekil 4.4 Ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi ve toplam fenolik madde içeriğinin minimize edilmesine yönelik çoklu yanıt optimizasyonu sonucu elde edilen optimizasyon grafiği .....                                                                     | 69 |
| Şekil 4.5 Ultrases destekli asit ön işlemi sonrasında katı geri kazanım verimi .....                                                                                                                                                                             | 74 |
| Şekil 4.6 Antep fıstığı kabuğuna farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda ksilozun geri kazanımı .....                                                                                                                                       | 76 |
| Şekil 4.7 Antep fıstığı kabuğuna farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda biyokütleden uzaklaşan lignin oranları .....                                                                                                                                    | 78 |
| Şekil 4.8 Tek yanıtla dayalı optimizasyon koşullarında elde edilen hidrolizat ( $X_1 = 3$ h, $X_2 = 10\%$ , $X_3 = 1.25:10$ ) kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol fermantasyonunda ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumunun zamana bağlı değişimi.....          | 83 |
| Şekil 4.9 Kontrol çözeltisi (20 g/L ksiloz) kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol fermantasyonunda ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumunun zamana bağlı değişimi.....                                                                                            | 83 |
| Şekil 4.10 Çoklu optimizasyon ile elde edilen hidrolizat (optimum ön işlem koşulları: $X_1 = 3$ h, $X_2 = 7.92\%$ ve $X_3 = 1,5:10$ ) kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol fermantasyonunda ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumunun zamana bağlı değişimi ..... | 84 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1 Ksilitolün kimyasal özellikleri .....                                                                                                                                                                       | 5  |
| Çizelge 2.2 Farklı biyokütle kaynaklarından elde edilen hemiselüloz bileşenleri .....                                                                                                                                   | 6  |
| Çizelge 2.3 Ksilitol üretimi için farklı maya türleri ve fermantasyon koşulları<br>kullanarak lignoselülozik atıkların kullanımı .....                                                                                  | 17 |
| Çizelge 3.1 Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonda kullanılan değişkenler .....                                                                                                                                         | 45 |
| Çizelge 3.2 Optimizasyon için kullanılan Box–Behnken deneme deseni .....                                                                                                                                                | 46 |
| Çizelge 4.1 Ön işleme tabi tutulmamış Antep fıstığı kabuğunun bileşimi .....                                                                                                                                            | 48 |
| Çizelge 4.2 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem<br>uygulanan Antep fıstığı kabuklarından elde edilen sıvı fazın HMF ve<br>furfural konsantrasyonları (g/L) .....                          | 56 |
| Çizelge 4.3 Box–behnken deney tasarımı kapsamında uygulanan farklı ön işlem<br>koşullarına ait ksiloz, hmf, furfural ve toplam fenolik madde yanıt<br>değerleri .....                                                   | 57 |
| Çizelge 4.4 Ksiloz konsantrasyonu (mg/L) - Model özeti .....                                                                                                                                                            | 58 |
| Çizelge 4.5 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü<br>oranının ( $X_3$ , g:mL) ksiloz konsantrasyonu ( $Y_1$ ) üzerine etkilerine ait<br>varyans analizi sonuçları .....         | 59 |
| Çizelge 4.6 HMF konsantrasyonu (g/L) - Model özeti .....                                                                                                                                                                | 60 |
| Çizelge 4.7 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü<br>oranının ( $X_3$ , g:mL) HMF konsantrasyonu ( $Y_2$ ) üzerine etkilerine ait<br>varyans analizi sonuçları .....            | 61 |
| Çizelge 4.8 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü<br>oranının ( $X_3$ , g:mL) furfural konsantrasyonu ( $Y_3$ ) üzerine etkilerine ait<br>varyans analizi sonuçları .....       | 63 |
| Çizelge 4.9 Furfural konsantrasyonu (g/L) - Model özeti .....                                                                                                                                                           | 65 |
| Çizelge 4.10 Fenolik madde konsantrasyonu (mg GAE/g biyokütle) - Model özeti .....                                                                                                                                      | 65 |
| Çizelge 4.11 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü<br>oranının ( $X_3$ , g:mL) fenolik madde konsantrasyonu ( $Y_4$ ) üzerine<br>etkilerine ait varyans analizi sonuçları ..... | 66 |
| Çizelge 4.12 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem<br>uygulanan Antep fıstığı kabuklarının kimyasal bileşimi .....                                                                          | 70 |
| Çizelge 4.13 Tek yanıtı dayalı (Optimum koşul–1) ve çoklu yanıtı dayalı (Optimum<br>koşul–2) optimizasyon koşullarında elde edilen katı fraksiyonun bileşimi ..                                                         | 79 |
| Çizelge 4.14 Tek yanıtı dayalı (Optimum koşul–1) ve çoklu yanıtı dayalı (Optimum<br>koşul–2) optimizasyon koşullarında elde edilen hidrolizatların bileşimi ve<br>inhibitör madde konsantrasyonları .....               | 80 |
| Çizelge 4.15 Konvansiyonel asit ön işlemi sonrasında elde edilen katı fraksiyonun<br>bileşimi .....                                                                                                                     | 82 |

## 1. GİRİŞ

Doğal kaynakların azalması, gıda güvenliği ve çevrenin korunmasına ilişkin sorunlar, gıda ve tarım sanayi atıklarının katma değeri yüksek ürünlere biyoproseslerle dönüştürülmesini ve biyorafineri sistemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Her yıl dünya genelinde ürünlerin işlenmesi sonucu büyük miktarlarda ortaya çıkan bitkisel ve tarımsal endüstri atıkları genellikle yakılmakta veya çeşitli yöntemlerle bertaraf edilmektedir. Alternatif olarak, bu atıkların biyoteknolojik proseslerde hammadde olarak değerlendirilmesi, ticari değeri olmayan materyallerin katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesine olanak sağlayan yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır (Pleissner ve Venus 2014). Biyorafineri yaklaşımıyla üretilebilen, umut vaat eden ve ilgi çeken biyokimyasallardan biri de ksilitoldür.

Ksilitol, başta gıda, eczacılık ve kozmetik endüstrileri olmak üzere, alternatif bir tatlandırıcı olarak yaygın şekilde kullanılan beş karbonlu bir şeker alkolüdür. Ksilitolün tatlandırıcı olma fonksiyonu sayesinde gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı vardır (Sapcı 2012). Gıda sanayiinde tatlandırıcı olarak kullanılmasının en önemli sebeplerinden biri; sakkarozla göreceli olarak aynı tatlılığa sahip olmasına rağmen kalori değerinin (2.4 cal/g) sakkarozdan (4.0 cal/g) oldukça düşük olmasıdır. Düşük kalori değerine sahip olan alternatif bir tatlandırıcı olması sebebiyle diyabetli hastalar için üretilen ürünlerde oldukça fazla kullanılmaktadır (Umai vd. 2022). Ksilitol, tatlandırıcı özelliği dışında; emülsifiye edici, nem tutucu, kıvam artırıcı, antikaryojenik gibi birçok özelliğe sahiptir ve bu özellikleri sayesinde gıda endüstrisi harici ilaç ve kozmetik endüstrisinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Örer ve Yalçın 2018). Yüksek çözünürlülüğe sahip olması, düşük glisemik indeksi bulunması ve aldehit ile keton grupları içermediğinden Maillard reaksiyonlarına katılmaması nedeniyle, endüstride birçok avantaj sağlayan ksilitolün kullanım alanı her geçen gün artmakta ve yaygınlaşmaktadır. (Sapcı 2012; de Albuquerque vd. 2014).

Ksilitol, doğal olarak bazı meyve, sebze ve mikroorganizmalarda düşük miktarlarda bulunan beş karbonlu bir şeker alkolüdür ve başta şekerlemeler, karameller, çikolatalar, dondurmalar, jöleler, marmelatlar ve içecekler olmak üzere birçok gıda ürününde doğal

tatlandırıcı olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (de Albuquerque vd. 2014). Çilek, ahududu, muz ve sarı erik gibi meyveler ile karnabahar, ıspanak, havuç, soğan, patlıcan ve marul gibi sebzelerde ksilitol doğal olarak bulunmakla birlikte miktarı sınırlıdır. Sarı erikte ksilitol oranının 935 mg/100 g'a kadar çıkabildiği bildirilmiştir (Ahuja vd. 2020; Kumar vd. 2022; Umai vd. 2022). Ksilitol ayrıca mayalar, likenler, mantarlar ve bazı alg türleri gibi çeşitli mikroorganizmalarda da düşük oranlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte huş, kayın ve bambu gibi bazı ağaç türlerinin sap, gövde ve kabuk dokuları ile çeşitli lignoselülozik biyokütlelerde de doğal olarak yer almaktadır (Rafiqul ve Mimi Sakinah 2013; Umai vd. 2022).

Doğal kaynaklardan ksilitol elde etmek verim açısından yetersiz ve zahmetli olduğundan, ticari üretim için genellikle ksilozun nikel katalizör eşliğinde katalitik hidrojenasyonuna dayanan kimyasal yöntemler tercih edilmektedir (Artık vd. 1993). Bu kimyasal süreç; asidik hidroliz, hidrolizatın saflaştırılması, katalitik indirgeme ve kristalizasyon gibi dört ana adımdan oluşmaktadır (Sapcı 2012; Rafiqul ve Mimi Sakinah 2013). Ancak süreç, yüksek enerji gereksinimi, toksik katalizör kullanımı ve düşük ürün verimi (yaklaşık %8-15) nedeniyle maliyetlidir ve çevresel açıdan sürdürülebilir değildir (Nigam ve Singh 1995; Martínez vd. 2015; Umai vd. 2022). Bu sınırlamalar, alternatif olarak biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesine olan ilgiyi artırmıştır.

Biyoteknolojik üretim yöntemleri, mikroorganizmaların veya izole enzimlerin kullanımıyla hem doğal hem de hidrolizattan elde edilen ksilozun ksilitole dönüşümüne olanak sağlamaktadır. Özellikle *Candida* cinsi mayalar (örneğin *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*) yüksek verimleriyle dikkat çekmekte ve bu suşlar üzerinde genetik iyileştirme çalışmaları sürmektedir (de Albuquerque vd. 2014; Fang ve Qi 2017; Kumar vd. 2022). Mikrobiyal dönüşüm süreci, NAD(P)H bağımlı ksiloz redüktaz (XR) ve NAD<sup>+</sup> bağımlı ksilitol dehidrogenaz (XDH) enzimlerinin koordineli çalışmasına dayanır. Oksijen sınırlı koşullar, NADH/NAD<sup>+</sup> dengesini etkileyerek ksilitol birikimini artırabilir (Hernández-Pérez vd. 2019; Umai vd. 2022).

Biyoteknolojik üretimin en büyük avantajı, daha düşük sıcaklık ve basınçta çalışması, toksik metal kalıntısı içermemesi ve çevreye duyarlı bir yaklaşım sunmasıdır. Ayrıca saf

ksiloz yerine, hemiselülozca zengin lignoselülozik atıkların doğrudan kullanımı sayesinde üretim maliyetleri düşebilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah 2013; Umai vd. 2022). Bu amaçla, buğday samanı, mısır koçanı, şeker kamışı küspesi gibi lignoselülozik materyallerin yanı sıra, Türkiye’de üretimi yüksek olan ve atık miktarı fazla olan antep fıstığı kabuğu, dikkat çeken bir kaynak olarak değerlendirilmektedir (Hazal vd. 2023).

Antep fıstığı kabuğu, yaklaşık %90 oranında ksilan içeren hemiselüloz yapısı sayesinde ksilitol üretimi için uygun bir hammadde niteliğindedir. Ancak lignin ve selülozla kompleks yapıda olması nedeniyle, bu biyokütlenin verimli bir şekilde dönüştürülebilmesi için uygun bir ön işlem gereklidir. Geleneksel ön işlemler (örneğin seyreltik asit) zaman zaman fermentasyonu engelleyici furfural ve HMF gibi toksik bileşikler oluşmasına neden olabilmektedir (Bura vd. 2009; Fang vd. 2017). Bu nedenle, çevre dostu ve enerji açısından daha verimli yöntemler arasında yer alan ultrasonik destekli ön işlem gibi alternatif teknolojiler ön plana çıkmaktadır (Agbor vd. 2011; Hernández-Pérez vd. 2019; Hazal vd. 2023).

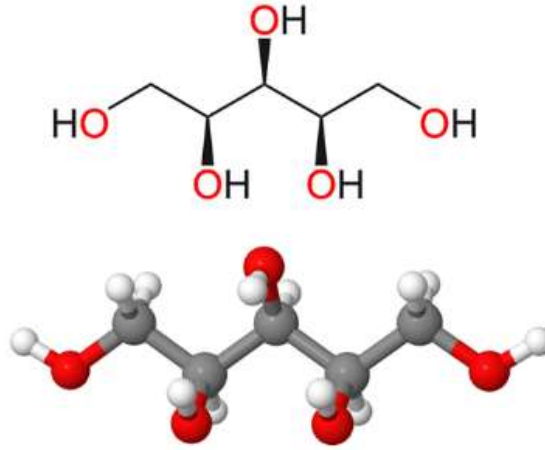
Sonuç olarak, ksilitol üretiminde biyoteknolojik yöntemler; düşük maliyet, çevre dostu yaklaşım ve yüksek verimlilik avantajları ile kimyasal yöntemlerin önüne geçmektedir. Bu doğrultuda, Antep fıstığı kabuğu gibi lignoselülozik atıkların değerlendirilmesi ve uygun ön işlem teknikleri ile ksilitol üretiminin optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, Antep fıstığı kabukları farklı koşullarda (süre, asit konsantrasyonu ve katı/çözücü oranı) ultrases destekli asit ön işlemine tabi tutulmuş ve ön işlemin lignoselülozik yapı üzerindeki etkisi dikkate alınarak, yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile en uygun ön işlem koşulları belirlenmiştir. Optimizasyon amacıyla Box–Behnken deneme deseni kullanılmıştır. Maksimum ksiloz konsantrasyonu elde edilirken aynı zamanda ksilitol fermentasyonunu olumsuz etkileyebilecek inhibitör fenolik bileşiklerin minimum düzeyde olduğu belirlenen optimum ön işlem koşullarında işlenen örnekler, literatürde yalnızca sınırlı sayıda çalışmada kullanılmış olan *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728 maya suşu ile ksilitol fermentasyonuna tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, ülkemiz açısından önemli bir tarımsal atık olan Antep fıstığı kabuğunun, gıda endüstrisinde yaygın biçimde kullanılan doğal bir tatlandırıcı olan ksilitole biyodönüştürülme potansiyeli laboratuvar ölçeğinde değerlendirilmiştir.

## 2. KURUMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Ksilitol Hakkında Genel Bilgi

Ksilitol ( $C_5H_{12}O_5$ ;  $CH_2OH(CHOH)_3CH_2OH$ ), beş karbon atomu ve beş hidroksil grubu içeren doğal bir şeker alkolüdür (Parajó vd. 1998). Gıda ve ilaç endüstrilerinde yapay tatlandırıcı olarak ticari şekilde kullanılan beyaz kristal yapılu bir şekerdir (Umai vd. 2022). İlk kez 1891 yılında Alman ve Fransız bilim insanları tarafından Emil Fischer'in çalışmaları sonucunda sentezlenmiştir (Parajó vd. 1998). Bu bileşik, doğal olarak erik (%0.30), çilek (%0.35) ve ahududu (%0.25) gibi meyvelerde; ayrıca karnabahar, kabak ve ıspanak gibi sebzelerde çok düşük miktarlarda bulunmaktadır (Granström vd. 2007a; Prakasham vd. 2009; Van Reis ve Zydney 2001). Bunun yanı sıra, çeşitli yenilebilir bitkilerde ve mantarlarda da düşük konsantrasyonlarda doğal olarak bulunur. Ksilitolün yetişkin insanlarda günlük olarak yaklaşık 5–15 g arasında üretildiği bildirilmektedir (Salli vd. 2019).



Şekil 2.1 Ksilitolün yapısı ((2R,3R,4S)-pentan-1,2,3,4,5-pentol) (Gasmi Benahmed vd. 2020)

### 2.2 Ksilitolün Özellikleri

Ksilitol ( $C_5H_{12}O_5$ ), beş karbon atomunun her birine bir hidroksil (-OH) grubunun bağlandığı ve aynı zamanda bir tridentat ligand ((H-C-OH)<sub>3</sub>) yapısı içeren bir şeker

alkolü bileşigidir (Mäkinen 2011). Ksilitolün tatlandırıcı gücü sakkarozla eşdeğer olup, enerji değeri sakkarozun 4 cal/g'lık değerine kıyasla yalnızca 2.4 cal/g'dır. Endotermik çözünme ısısına sahip olan ksilitol, suda iyi çözünür ve ağız yoluyla alındığında karakteristik bir soğutma hissi oluşturur (Sarrouh ve Da Silva 2013). Mevcut tatlandırıcılar arasında ksilitol, prebiyotik etkileri ve gıda endüstrisindeki geniş uygulama alanları nedeniyle giderek daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır (Ur-Rehman vd. 2015). Ksilitolün viskozitesi genellikle sıcaklık arttıkça azalmakta olup, suda çözünme davranışı sakkarozunkine benzerdir (Hou vd. 2006).

Çizelge 2.1 Ksilitolün kimyasal özellikleri (Ur-Rehman vd. 2015)

| Formül                            | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>           |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Molekül Ağırlığı                  | 152.15                                                  |
| Görünüm                           | Beyaz Kristal Toz                                       |
| Koku                              | Kokusuz                                                 |
| 20°C'de Çözünürlük                | 169 g/100 g H <sub>2</sub> O                            |
| pH                                | 5-7                                                     |
| Erime Noktası                     | 93-94.5                                                 |
| Kaynama Noktası                   | 216°C                                                   |
| Yoğunluk (bulk density)<br>(15°C) | 1.50 g/L                                                |
| Kalori Değeri                     | 16.88 J/g                                               |
| Tatlılık Miktarı                  | Sakkarozla aynı, sorbitolden ve mannitolden fazla       |
| Moleküler Aktifliği               | Optik inaktif                                           |
| Çözüm Değeri                      | Endotermik 36.61 cal/g                                  |
| Yoğunluk %10                      | 1.03                                                    |
| Yoğunluk %60                      | 1.23                                                    |
| Vizkozite (cP 20°C) %10           | 1.23                                                    |
| Vizkozite (cP 20°C) %40           | 4.18                                                    |
| Vizkozite (cP 20°C) %50           | 8.04                                                    |
| Vizkozite (cP 20°C) %60           | 20.63                                                   |
| Polarize Işığı Çevirme Açısı      | Optikçe Aktif Değil                                     |
| Tatlılık                          | Mannitol ve sorbitolden daha tatlı, Sakkarozdan daha az |

Ksilitol, gıda endüstrisinde şekerlemeler, karameller, çikolatalar, dondurmalar, jöleler, marmelatlar ve içeceklerde tatlandırıcı ve kalori değerinin düşük olmasından dolayı tercih edilmektedir (de Albuquerque vd. 2014). Ayrıca, ksilitol aldehit ve keton grupları içermediğinden Maillard reaksiyonlarına katılmaması sebebiyle renk stabilitesini korumaktadır (Parajó vd. 1998). Ksilitol, 2004 yılında Amerika Birleşik Devletleri Enerji

Bakanlığı (DOE) tarafından en umut verici 12 biyo-bazlı platform molekülünden biri olarak tanımlanmıştır. Ksilitol yalnızca biyokütleden elde edilebilen bir bileşiktir; petrokimyasal bir alternatifi yoktur ve fosil kaynaklı bileşiklerin sürdürülebilir biçimde ikame edilmesinde veya biyo-bazlı ekonomiye yönelik yeni işlevselliklere sahip biyokimyasalların üretiminde yenilenebilir bir hammadde olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Romero-García vd. 2022).

Ksilitol; meyve ve sebzelerin yanı sıra, mayalarda, likenlerde, deniz yosunlarında ve mantarlarda da düşük miktarlarda doğal olarak bulunmaktadır. Ayrıca, çeşitli lignoselülozik biyokütlelerde de doğal olarak yer almaktadır (Rafiqul ve Sakinah 2013). Ksilitol içeren meyveler arasında çilek, ahududu, muz ve sarı erik, sebzeler arasında ise karnabahar, ıspanak, havuç, soğan, patlıcan ve marul sayılabilir. Doğal olarak en yüksek ksilitol içeriğine sahip olan sarı erikte, ksilitol oranı 935 mg/100 g'a kadar ulaşabilmektedir (Ahuja vd. 2020; Kumar vd. 2022; Umai vd. 2022). Bunun yanı sıra, huş ve kayın gibi sert ağaçların ve bambu gibi bazı bitkilerin sap, gövde ve kabuk dokularında da ksilitol doğal olarak bulunmaktadır.

Çizelge 2.1 Farklı biyokütle kaynaklarından elde edilen hemiselüloz bileşenleri (Kumar vd. 2022)

| <b>Biyokütle</b>                     | <b>Ksiloz<br/>(g/L)</b> | <b>Glikoz<br/>(g/L)</b> | <b>Arabinoz<br/>(g/L)</b> | <b>Referanslar</b>         |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <b>Şeker Kamışı<br/>Posası</b>       | 19.0                    | 2.75                    | 2.63                      | (Thancharoen vd. 2016)     |
| <b>Kaju Ağacı<br/>Atığı</b>          | 10.5                    | 5.2                     | 6.1                       | (Medeiros vd. 2017)        |
| <b>Yağ Palmiyesi<br/>Ağacı Atığı</b> | 2.16                    | 0.56                    | -                         | (Kresnowati vd. 2016)      |
| <b>Mısır Koçanı</b>                  | 21.98                   | 3.56                    | 2.17                      | (Misra vd. 2012)           |
| <b>Şeker Kamışı<br/>Samanı</b>       | 18.6                    | 3.7                     | 3.9                       | (Hernández-Pérez vd. 2016) |
| <b>Sorgum<br/>Samanı</b>             | 17.69                   | 2.1                     | 1.81                      | (Sene vd. 2011)            |
| <b>Kolza Samanı</b>                  | 10.30                   | 2.96                    | 1.72                      | (López-Linares vd. 2018)   |



### 2.3 Ksilitolün İnsan Sağlığına Etkileri

Ksilitolün kullanım güvenliği, Avrupa Ekonomik Topluluğu tarafından 1984 yılında resmî olarak tanınmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda ve ilaçları düzenleyen kurum olan FDA (Food and Drug Administration) ise ksilitolu 1986 yılında “Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen” (Generally Recognized as Safe; GRAS) bir bileşik olarak sınıflandırmıştır. Ayrıca 1994 yılında ksilitol, “dişler için güvenli” olarak da tanımlanmıştır (de Albuquerque vd. 2014). Emülsifiye edici, nem tutucu, kıvam arttırıcı ve tatlandırıcı özellikleri sayesinde ksilitol, gıdalarda E967 kodlu katkı maddesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Örer ve Yalçın 2018). Ksilitol, insan vücudu tarafından belirli tüketim sınırları içerisinde iyi tolere edilmektedir. Tek seferde en fazla 20 g olacak şekilde ve günlük toplam tüketim 60 g'ı aşmadığında herhangi bir olumsuz etki göstermemektedir. Ancak daha yüksek miktarlarda alımı laksatif (ishal yapıcı) etkilere neden olabilmektedir (de Albuquerque vd. 2014).

Ksilitol, mannitol, stevia gibi doğal glikoz ikameleri ile aspartam ve sakkarin gibi yapay tatlandırıcılar, hem terapötik hem de terapötik olmayan alanlarda çeşitli uygulamalara sahiptir. Terapötik açıdan, bu tatlandırıcılar kilo kontrolüne yardımcı olmakta, diş sağlığını desteklemekte ve diyabet hastaları tarafından tercih edilmektedir. Terapötik olmayan kullanımlarda ise, tatlandırıcılar gıda işleme endüstrisinde yaygın biçimde kullanılmakta ve farklı gıda ürünlerinin lezzetini artırmak amacıyla tercih edilmektedir. Glikoz yerine kullanılan tatlandırıcıların etkinliği, glisemik indeks değerleri ve gram başına kalori miktarları ile değerlendirilmektedir (Deng vd. 2007).

Glisemik indeks, kalorik değer ve tatlandırma gücü, şeker ikamelerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde temel kriterlerdir. Düşük glisemik indeksli tatlandırıcılar özellikle diyabet yönetimi ve kilo kontrolü açısından avantaj sağlamaktadır. Mevcut tatlandırıcılar arasında ksilitolün glisemik indeksi yaklaşık 7, sorbitolün ise yaklaşık 4 olarak bildirilmiştir; bu değerler sakkarozun glisemik indeksinden ( $\approx 65$ ) oldukça düşüktür. Ksilitol ve sorbitolün enerji değerleri yaklaşık 2.4 kcal/g olup, bu yönüyle 4 kcal/g enerji içeren aspartama kıyasla daha düşük kalorilidir. Ksilitol, tatlılık gücü bakımından sakkarozu yaklaşık eşdeğerdir, buna karşılık stevia, aspartam ve sakkarin sırasıyla

sakkarozdan yaklaşık 250, 200 ve 300 kat daha tatlıdır; eritritol ve sorbitol ise sakkarozdan daha düşük tatlılık seviyelerine sahiptir. Ksilitol genel olarak güvenli kabul edilmekle birlikte, yüksek miktarda tüketildiğinde şişkinlik, abdominal rahatsızlık ve laksatif etki gibi gastrointestinal yan etkilere neden olabilir (Jacob ve Stechschulte 2008).

Ksilitolün insan sağlığı üzerindeki etkileri, yalnızca düşük glisemik indeks değeri ile sınırlı değildir; aynı zamanda metabolik, antimikrobiyal ve terapötik açıdan da çeşitli yararlar sunmaktadır. Ksilitolün tıpta öne çıkan en dikkat çekici özellikleri; insülin bağımsız metabolize edilebilmesi, sakkaroz ile eşdeğer tatlılık derecesine sahip olması ve buna karşın daha düşük enerji değerine (2.4 cal/g) sahip olması ile antibakteriyel etkileridir. Ksilitolün tatlandırma gücü, sorbitolün yaklaşık iki katı ve mannitolün üç katı düzeyindedir. Yüksek tatlandırma gücü ve sindirimi için insüline ihtiyaç duyulmaması nedeniyle ksilitol, son yıllarda diyabet tedavisinde ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliğine bağlı hastalıklarda alternatif bir tatlandırıcı olarak dikkat çekmektedir. Ayrıca ksilitol, travma sonrası ya da cerrahi sonrası dönemde stres hormonlarının artışına bağlı insülin direncinin geliştiği durumlarda, glikozun etkin bir şekilde kullanılamamasına karşı enerji metabolizmasını desteklemek amacıyla kullanılabilir. Ksilitolün osteoporozu önleme potansiyeline sahip olduğu, otitis tedavisinde antibiyotiklerin yerine kullanılabileceği ve bu nedenle orta kulak enfeksiyonu geçiren çocuklara ksilitol içeren sakızların verilebildiği bildirilmektedir. Ksilitolün, kistik fibrozis hastalarında enfeksiyonun başlangıç aşamalarına müdahale edebildiği ve *Streptococcus pneumoniae* ile mutans streptokokların patojenitesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca ksilitol, pnömokok ve *Haemophilus influenzae*'nin nazofaringeal hücrelere tutunmasını engellemektedir. Mutans streptokoklar üzerindeki bu etkisi nedeniyle ksilitol, antikaryojenik bir ajan olarak kullanılmaktadır; yalnızca bu türün büyümesini azaltmakla kalmaz, protein sentezini bozarak hücrelerde ultrastrüktürel değişikliklere neden olur (Jain ve Mulay 2014).

Literatürde, ksilitolün kalori azaltımı amaçlanan bazı gıdalarda sakkaroz yerine kullanımına ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır; örneğin kekler, kurabiyeler, çikolatalar ve sakızlarda kullanımı rapor edilmiştir. Ksilitolün farmasötik endüstride kullanımı ise, başta diş çürüğünü %100'e kadar azaltabilen kanıtlanmış antikaryojenik

özellikleri nedeniyle oldukça yaygın hale gelmiştir. Birçok çalışma, bu şeker alkolünün özellikle *Streptococcus mutans* bakterisine karşı ağız içi biyofilm oluşumunu engellemede etkili olduğunu göstermektedir. Bazı araştırmacılar, ksilitolün bu bakteri üzerindeki antikaryojenik etkisinin, mikroorganizmadaki glukoziltransferaz ekspresyonunun azalmasına bağlı olduğunu belirtirken; diğer araştırmacılar ise, ksilitolün bakteriyi çevreleyen polisakkarit tabakasını daha seyrek ve dağınık bir hücre duvarı yapısına dönüştürdüğünü ifade etmektedir. *S. mutans*'ın yanı sıra, başka çalışmalar ksilitolün ağız sağlığı için zararlı olan diğer mikroorganizmalar üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir; bunlar arasında *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bulunmaktadır. Ksilitol, yalnızca diş çürüğüne karşı koruma sağlamakla kalmayıp, çoğunlukla yaşlanmaya bağlı gelişen diş kalsifikasyonuna katkıda bulunma özelliğiyle de tanınmaktadır. Ayrıca ksilitolün diyabet, anemi, akut otitis media ve osteoporoz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde de etkili olabileceği bildirilmiştir (de Albuquerque vd. 2014).

Ksilitol, insan vücuduna alındığında öncelikle karaciğerde metabolize edilir ve insülinin bağımsız olarak glikoz-6-fosfata dönüştürülür. Ksilitolün kana geçişi ve glikoza dönüşümü oldukça yavaş gerçekleştiği için, kan glikoz düzeyini hızlı bir şekilde yükseltmez ve buna bağlı olarak insülin salınımında yalnızca sınırlı bir artış oluşturur (Schröder 1980). Ksilitol, glikoz gibi diğer şekerlerle karşılaştırıldığında, daha düşük enerji içeriğine sahip olması ve kan şekeri düzeyini yalnızca hafifçe yükseltmesi nedeniyle önemli metabolik avantajlar sunar (Natah vd. 1997).

Ksilitolün enflamatuar reaksiyonlar üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğu bildirilmektedir. Enflamasyonla ilişkili önemli süreçlerden biri, tümör gelişimi ve metastaz sırasında gerçekleşen anjiyogenezin kontrolüdür. Enflamatuar yanıtları azaltan veya baskılayan doğal bileşikler üzerine birçok çalışma yapılmış olup, ksilitol de bu bileşikler arasında yer almaktadır. Ksilitolün, lipopolisakkarit (LPS) uyarısıyla indüklenen pro-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe edebildiği gösterilmiştir. Sıçanlarda gerçekleştirilen in vivo çalışmalarda, ksilitol uygulamasının Matrigel plug modelinde anjiyogenezi baskıladığı rapor edilmiştir. Ayrıca ksilitol ile tedavi edilen sıçanlarda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), matris metalloproteinaz-2

(MMP-2) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) mRNA ekspresyon düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (Yi ve Kim, 2013).

Diş çürüğü, özellikle gelişmekte olan ülkelerde okul çağındaki çocukların %60–90'ını ve çok sayıda yetişkini etkileyen; tedavi maliyetleri ve yaşam kalitesi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle yaygın ve önemli bir halk sağlığı sorunudur (Riggs vd. 2019). Diş çürüğünün önlenmesinde profilaktik maddelerin kullanımı, özellikle ksilitolün önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Poliol bileşiklerinin, moleküllerinde bulunan hidroksil (–OH) gruplarının sayısına bağlı olarak çürük oluşumunu engelleyebildiği öne sürülmüştür. Bu etki düzeyi genel olarak eritritol  $\geq$  ksilitol  $>$  sorbitol şeklinde bildirilmektedir (Mäkinen 2010). Ksilitol, bakteriyel metabolizmayı bozmakta ve enerji üretimini engelleyerek bakteriyel hücre ölümüne yol açmaktadır. Ayrıca diş plağının oluşumunu azaltmakta ve diş minesi ile dentinin demineralizasyonunu (mineral kaybını) engellemektedir (Ly vd. 2006). Ksilitol, ağızda bakteriyel yapışmayı ve biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir (Ammons vd. 2011).

Ksilitol ile ilgili diş çürüğü önleme çalışmalarının ilki, 1970'lerde Finlandiya'da hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilmiş; insanlardaki etkisi ise "Turku Sugar Studies" olarak bilinen araştırma ile ortaya konmuştur. Bu çalışma, ksilitol tüketiminin diş plağını azalttığını göstermiştir. Ksilitol, ilk kez Finlandiya'da ağız sağlığını desteklemek ve diş çürüğünü önlemek amacıyla çiğnenebilir sakız formülasyonlarına dâhil edilmiştir (Mäkinen 2011).

## **2.4 Ksilitol Kullanım Alanları ve Pazar Analizi**

Ksilitolün faydalı özellikleri, onun gıda ve ilaç sanayisinde kullanımının artmasını teşvik etmiştir. Ksilitol, 50'den fazla ülkede gıda kullanımına onay almış olup, toplam poliol pazarının yaklaşık %12'sini elinde bulundurmaktadır ve bu pazar payının önümüzdeki yıllarda üç kat artacağı öngörülmektedir (Mussatto 2012; Ravella vd. 2022).

Ksilitol, gıda, farmasötik ve şekerleme sektörleri başta olmak üzere geniş bir kullanım alanına sahiptir. Gıda endüstrisinde ise gıdaların raf ömrünü, rengini ve tadını iyileştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ksilitol, indirgen şeker özelliği göstermediğinden Maillard reaksiyonuna katılmaz; bu nedenle ısı işlemler sırasında non-enzimatik esmerleşmeye ve proteinlerin besin değerinde azalmaya yol açmaz. Ksilitol gıda sektöründe, tek başına ya da diğer şeker ikameleriyle birlikte şekersiz çikolatalar, sakızlar, sert şekerler, gofret dolguları, pastiller ve şekersiz pektin jöleleri gibi diyabetik tüketici grubuna yönelik çeşitli ürünlerde kullanılabilir. Ksilitolün kanser karşıtı özellikleri, nem tutma kapasitesi ve mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesinin güç olması, bu bileşiğin çok çeşitli alanlarda değerli bir gıda bileşeni olmasını sağlamaktadır (Olinger ve Innovations 2001).

Uluslararası ksilitol pazarı, 2015 yılında yaklaşık 750 milyon USD olarak değerlendirilmiş olup, düşük kalorili şeker alternatiflerine yönelik artan tüketici talebi sayesinde önümüzdeki on yıl içinde önemli bir büyüme potansiyeline sahiptir. Ancak sorbitol ve mannitol gibi daha düşük maliyetli alternatiflerin, bu büyüme sürecindeki en önemli zorluklardan birini oluşturduğu unutulmamalıdır. Ksilitol içeren ürünler arasında çiğnenebilir sakızlar küresel pazarın yaklaşık %66'sını oluştururken, ksilitol kullanan en hızlı büyüyen ikinci segment ise ağız bakım ürünleridir. Asya Pasifik ve Latin Amerika'daki gelişmekte olan ülkeler, küresel pazar hacminin %45'inden fazlasını oluşturmaktadır ve bu bölgelerin 2016–2025 yılları arasında gelir bakımından en hızlı büyümeyi göstermesi beklenmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika ise küresel pazarda ikinci sırada yer almaktadır. Uluslararası pazarda faaliyet gösteren başlıca şirketler arasında Dupont Danisco, DFI Corporation, Shandong Futaste Co., Ltd., Xylitol Canada Inc., Zuchem Inc. ve Roquette Frères bulunmaktadır. Ayrıca araştırma ve yenilik yatırımlarının arttığı görülmekte olup, özellikle Thompson Biotech (Xiamen) Co. Ltd. ve Zuchem Inc. gibi bazı üreticiler mikrobiyal fermantasyon süreçleri üzerine yoğunlaşmaktadır (Yadav vd. 2023).

## 2.5 Ksilitol Üretimi

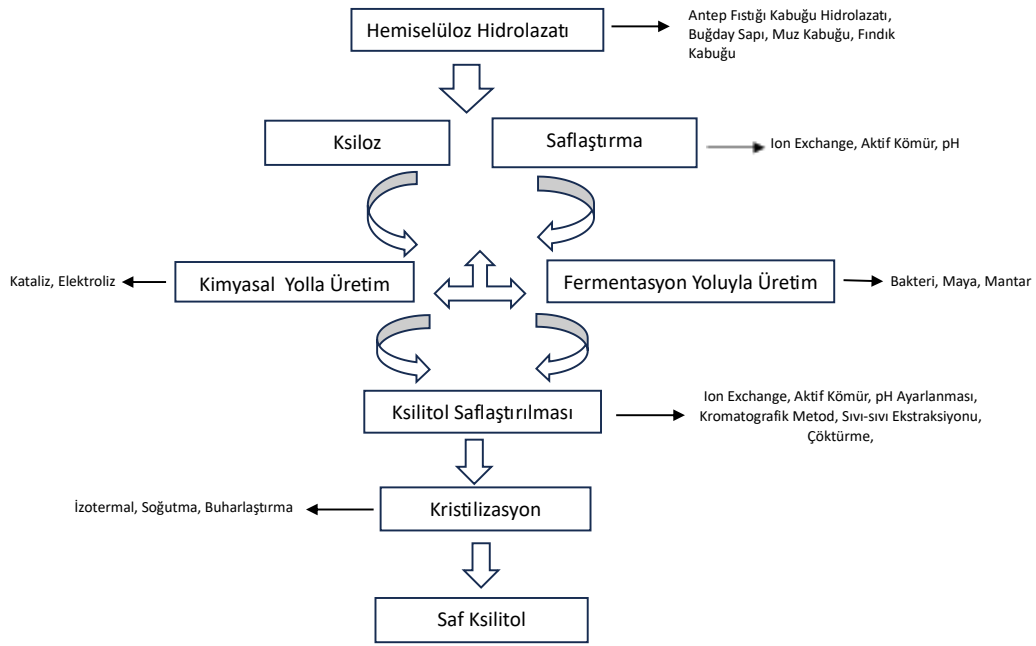
Ksilitol, sağlık ve gıda sektörlerinde geniş kullanım potansiyeline sahip olmasına karşın, üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle ticari olarak sınırlı miktarda üretilmektedir. Ksilitol üretim maliyetinin, sakkaroz veya sorbitol gibi yaygın tatlandırıcılara kıyasla yaklaşık 10 kat daha yüksek olması, tatlandırıcı pazarındaki payını kısıtlayan temel faktörlerden biridir. Bu nedenle, üretim maliyetlerinin azaltılmasına yönelik yeni ve daha verimli üretim stratejilerinin geliştirilmesi gereklidir. Güncel yaklaşımlar içinde, ksiloz içeren çözeltilerden mikrobiyal fermantasyonla ksilitol üretimi, kimyasal senteze göre daha çevreci olması, yenilenebilir lignoselülozik kaynakların kullanılabilmesi ve yan ürün oluşumunun sınırlı olması nedeniyle dikkat çekici bir alternatif olarak öne çıkmaktadır (Parajó vd. 1998).

Literatürde ksilitol üretiminin üç temel yöntemle gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Sapci, 2012):

1. Katı-sıvı ekstraksiyonu
2. Kimyasal üretim (hidrojenasyon)
3. Biyoteknolojik (mikrobiyal fermantasyon) üretim

Bu yöntemler arasında özellikle biyoteknolojik üretim, sürdürülebilirlik gereksinimlerine uyumu ve hammadde çeşitliliği nedeniyle endüstriyel ölçekte giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Ksilitol üretiminde kimyasal hidrojenasyon yöntemi, biyoteknolojik yöntemle kıyasla zor ve maliyetli bir işlemdir. Diğer alternatif yöntem ise yenilenebilir biyokütle kaynaklarının biyodönüşüm yöntemidir (T. B. Granström vd. 2007). Bu süreçte ksilozun ham hidrolizatlarının ksilitole dönüşümü için fermantasyon aşamasında belirlenen mikroorganizma suşlarının kullanıldığı hidroliz ve farklı biyodönüşüm aşamalarından oluşan (ön işlem, enzimatik hidroliz ve fermantasyon) yöntemdir. Biyoteknolojik yöntemde öncelikli olarak ksiloz, tarımsal atıklardan enzimatik veya kimyasal hidroliz yoluyla üretilir ve çoğunlukla maya suşları kullanılarak ksilitole dönüştürülür. Bu yöntem, kimyasal üretimle karşılaştırıldığında kullanılması gereken enerjiyi azaltarak daha ekonomik üretim imkânları sunmaktadır. Hammadde olarak

kullanılan biyokütle farklı koşullarda ön işleme tabii tutulur ve çeşitli süreç parametrelerinden geçirilip ksilitol eldesi yapılmaktadır. Fermentasyon sırasında, ksilozdan ksilitol üretimini azaltan çeşitli mikroorganizma büyüme inhibitörleri üretilir; bu nedenle, detoksifikasyon aşaması oldukça önemlidir. Tarımsal atıklar, ucuz ham madde olarak, biyoteknolojik üretim için potansiyel kaynaklar olarak değerlendirilir (Sreenivas vd. 2006).



Şekil 2.2 Biyoteknolojik ve kimyasal yöntemle ksilitol üretimi

### 2.5.1 Katı-Sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ksilitol üretimi

Ksilitol doğal olarak marul, karnabahar, sarı erik, ahududu, çilek, üzüm ve muz gibi çeşitli meyve ve sebzelerde; ayrıca maya, liken, deniz yosunu ve mantar gibi biyolojik kaynaklarda bulunmaktadır. Ksilitolün bu kaynaklardan geri kazanılması katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile mümkün olmakla birlikte, hammaddelerdeki doğal ksilitol miktarının oldukça düşük olması (100 g taze madde başına 900 mg'dan daha az) bu yöntemin ekonomik uygulanabilirliğini büyük ölçüde sınırlamaktadır (Parajó vd. 1998). Başka bir ifadeyle, ksilitolün doğal kaynaklardan doğrudan ekstraksiyon yoluyla elde edilmesi, düşük verim nedeniyle endüstriyel ölçekte uygun bir yöntem olarak

değerlendirilmemektedir. Bu nedenle güncel çalışmalar, ksilitolün lignoselülozik biyokütlenin hidroliziyle elde edilen ksilozun mikrobiyal dönüşümü gibi daha sürdürülebilir ve yüksek verimli üretim yöntemlerine odaklanmaktadır.

### **2.5.2 Kimyasal yöntemle ksilitol üretimi**

Ksilitolün kimyasal yöntemle üretimi ilk olarak 1970’li yıllarda Finlandiya’da gerçekleştirilmiştir (Chen vd. 2010). Bu yöntemde D-ksiloz, nikel, palladyum veya rutenyum (Ni, Pd, Ru) gibi metal katalizörler eşliğinde hidrojenasyonla ksilitole dönüştürülmekte; ardından reaksiyon ortamında oluşan yan ve toksik bileşenlerin uzaklaştırılması için çok aşamalı saflaştırma işlemleri uygulanmaktadır. Sürecin sonunda ksilitol kristalizasyon yoluyla yoğunlaştırılarak %98’in üzerinde saflıkla geri kazanılmaktadır (Arcaño 2018). Ancak ksilitolün kimyasal üretim süreci oldukça sert koşullar gerektirmektedir (80–140 °C, 31–40 atm basınç, 3–5 saat reaksiyon süresi). Ayrıca yüksek enerji tüketimi, kapsamlı saflaştırma adımları ve sadece orta düzeyde bir dönüşüm verimi sağlaması (toplam ksilozun %50–60’ının ksilitole dönüşmesi) nedeniyle, daha ekonomik ve sürdürülebilir alternatif üretim yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Vallejos ve Area 2017). Buna ek olarak, yüksek sıcaklık ve basınç gereksinimi nedeniyle süreç hem yüksek maliyetlidir hem de enerji yoğun bir yapı sergilemektedir (Zhang vd. 2012; López-Linares vd. 2020; Kaur vd. 2024).

### **2.5.3 Biyoteknolojik yöntem ile ksilitol üretimi**

Biyoteknolojik yöntem ile ksilitol üretimi, sayısız avantajı nedeniyle kimyasal işlemlere kıyasla daha yaygın bir şekilde tercih edilmektedir (Misra vd. 2013). Kimyasal üretime kıyasla atmosferik basınç ve ortam sıcaklığı gibi daha ılımlı fermantasyon koşulları gerektirmesi, bu yöntemi endüstriyel uygulamalar açısından daha avantajlı bir seçenek hâline getirmektedir (Rao vd. 2006). Mikrobiyal üretim süreçleri, değerli bileşenlerin üretimini teşvik etmek amacıyla suş iyileştirme çalışmalarına geniş bir olanak sağlamaktadır; bu süreçler, adaptasyon, mutasyon ve genetik rekombinasyon gibi yöntemlerle gerçekleştirilerek verimlilik artırılmaktadır (Misra vd. 2013).



*Candida. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces nepalensis*, *Candida guilliermondii* ve *Candida subtropicalis* gibi çeşitli maya türleri, ksilozu verimli bir şekilde ksilitole dönüştürme kapasitesine sahiptir (Kumdam vd. 2012; Zhang vd. 2014). *Candida* cinsinin tercih edilmesinin nedeni, ksilitol üretiminde yüksek verim sağlamak ve sınırlı oksijen koşullarında bile verimli olmalarıdır. Bu mikroorganizmalar, ksilozun ara metaboliti olan ksilitolü üretebilirler. Örneğin, ksilitol elde etmek için en yaygın kullanılan mayalardan biri olan *Candida guilliermondii*'nin ksilitol metabolizmasında iki anahtar enzimi bulunmaktadır:

- (1) NADPH-bağımlı ksiloz redüktaz ve
- (2) NADP+ bağımlı ksilitol dehidrogenaz.

İlk enzim, ksilozu ksilitole indirgerken, ikinci enzim ksilitolü ksilüloza oksitler ve her ikisi de ksiloz tarafından indüklenir (Silva vd. 2004).

Mikrobiyal yolla ksilitol üretiminde en çok verim alınan türler. *Xyloz*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Pachysolen*, rekombinant *Escherichia coli*, rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida* türleridir. Bu mikroorganizmalar arasında, *Candida* türleri, ksilozu yüksek verim ve üretkenlikle ksilitole dönüştürme kapasitesine sahiptir (Kim vd. 2010).

Biyoteknolojik yöntem ile ksilitol üretiminde yapılan araştırmalar, yalnızca çevre dostu olmasıyla değil, aynı zamanda fermantasyon süreçlerinin mevcut kimyasal yolların yerine geçebilecek bir alternatif haline gelme potansiyeli nedeniyle de yoğunlaşmıştır. Ksilitolün mikrobiyal üretimi için en yaygın bildirilen substratlar, mısır koçanının asidik hidrolizatları (Ping vd. 2013) , şeker kamışı posası (Unrean ve Ketsub, 2018), yulaf kabuğu (Cortivo vd. 2018), pirinç ve soya kabuğu (Cunha-Pereira vd. 2017; Sehnem vd. 2017) olarak sıralanmıştır.

Mikrobiyal ksilitol üretiminde, fermantasyon ortamı olarak kullanılacak hidrolizatların, mümkün olduğunca yüksek ksiloz içeriğine sahip olması ve mikroorganizma gelişimini olumsuz etkileyebilecek inhibitör bileşenleri en düşük düzeyde içeren hemiselülozik

hidrolizatlar şeklinde elde edilmesi hedeflenmektedir (Rafiqul ve Sakinah, 2013). Ancak, çok yüksek derişimlerde ksiloz içeren hemiselülozik hidrolizatların ksilitol üretimde kullanıldığı bazı çalışmalarda, mikroorganizmaların ksiloz fermantasyonu metabolizmalarının olumsuz yönde etkilendiğı bildirilmektedir ve bu durumun ksilozun yanısıra, hemiselülozik hidrolizatlarda bulunan inhibitör bileşenlerin derişimlerinin de daha yüksek olması ile açıklanmaktadır (M. Li vd. 2012). Ayrıca, üretimde kullanılan farklı suşların ksilitol üretimi kapasitelerinin de farklı olması nedeniyle ve hemiselülozik hidrolizatların kimyasal bileşimlerinin değışkenlik göstermesi sebebiyle, ksiloz içeriğı yüksek olan fermantasyon ortamlarında her zaman en yüksek derişimlerde ksilitol üretimi yapılamadığı bildirilmektedir. Tüm bu nedenlerle, mikrobiyal ksilitol üretimi çalışmaları için, lignoselülozik materyallerden hemiselülozik hidrolizat hazırlığı aşamalarının uygun yöntemler kullanılarak optimum koşullar altında gerçekleştirilmesi ve hazırlanan fermantasyon ortamlarında ksilitol üretme kapasitesi yüksek suşların seçilmesi oldukça büyük bir önem taşımaktadır (Mussatto ve Roberto, 2008). Çizelge 2.3'te, ksilitol üretimi amacıyla farklı maya türlerinin çeşitli lignoselülozik atıklar üzerinde uygulanmış fermantasyon koşulları ve bu koşullar altında elde edilen ksilozdan ksilitole dönüşüm oranları ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Çizelge 2.3 Ksilitol üretimi için farklı maya türleri ve fermentasyon koşulları kullanarak lignoselülozik atıkların kullanımı  
(Örer ve Yalçın, 2018)

| Mikroorganizma                                               | Kullanılan Substrat   | Fermentasyon Koşulları                                                                                                         | Ksilozdan Ksilitle Dönüşüm Oranı | Referanslar              |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| <i>C. shehatae</i> HM 52.2                                   | Pirinç Kabuğu         | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 228 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 180 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 30 °C <b>Havalandırma Hızı:</b> 0.33 vvm | 0.11                             | (Hickert vd. 2013)       |
| <i>C. tropicalis</i> CCTCC M2012462                          | Mısır Koçanı          | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 100 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 200 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 35 °C <b>Havalandırma Hızı:</b> 0.4 vvm  | 0.71                             | (Ping vd. 2013)          |
| <i>C. tropicalis</i>                                         | Mısır Koçanı          | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 66 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 200 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 30 °C <b>pH:</b> 4.5                      | 0.58                             | (Misra vd. 2013)         |
| <i>C. tropicalis</i> CICC1779                                | Mısır Koçanı          | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 24 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 210 rpm<br><b>pH:</b> 6                                               | 0.77                             | (Jia vd. 2016)           |
| <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037                           | Şeker Kamışı Posası   | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 144 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 450 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 30 °C <b>Havalandırma Hızı:</b> 0.7 vvm  | 0.69                             | (Vaz de Arruda vd. 2017) |
| <i>W. anomalus</i> WA-HF5.5                                  | Pirinç ve Soya Kabuğu | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 72 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 180 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 30 °C <b>Havalandırma Hızı:</b> 0.33 vvm  | 0.86                             | (Sehnem vd. 2017)        |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> ve <i>C. guilliermondii</i>     | Kanola Bitkisi Samanı | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 72 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 200 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 30 °C                                     | 0.45 - 0.55                      | (López-Linares vd. 2018) |
| <i>C. guilliermondii</i> BL 13                               | Soya Kabuğu           | <b>Reaksiyon Süresi:</b> 72 saat <b>Karıştırma Hızı:</b> 180 rpm<br><b>Sıcaklık:</b> 23-33 °C                                  | 0.46                             | (Cunha-Pereira vd. 2017) |
| <i>S. cerevisiae</i> YRH 396 ve <i>S. cerevisiae</i> YRH 400 | Soya Kabuğu           | <b>Karıştırma Hızı:</b> 180-300 rpm <b>Sıcaklık:</b> 28 °C<br><b>Havalandırma Hızı:</b> 1 vvm <b>pH:</b> 5.5                   | 0.45                             | (Cortivo vd. 2018)       |

Ksilitol üretiminde kullanılan lignoselülozik substratlar, ön işlem ve fermantasyon aşamalarında furfural, asetik asit ve hidroksimetilfurfural (HMF) gibi çeşitli inhibitör bileşiklerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu bileşikler, mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini olumsuz etkileyerek fermantasyon hızını ve ksilitol verimini düşürmektedir. Özellikle asetik asit, ksilozu ksilitole dönüştüren maya hücrelerinde metabolik baskı oluşturarak inhibitör etki göstermekte olup, etkisi hem konsantrasyona hem de fermantasyon süresine bağlıdır. Bu inhibitörlerin etkisini azaltmak amacıyla literatürde çeşitli detoksifikasyon yöntemleri önerilmiştir. Aktif karbon adsorpsiyonu (Pereira vd. 2011), kireçle nötralizasyon (Mohagheghi vd. 2006) ve iyon değişim reçineleri (Kumar vd. 2018) bu yöntemler arasında yer almaktadır. Ancak bu uygulamalar çoğu zaman süreç maliyetlerini artırmakta ve ksilitol veriminde kayıplara yol açmaktadır (Fehér vd. 2018). Bu nedenle, inhibitörlere toleranslı mikroorganizmaların kullanımı, biyoteknolojik ksilitol üretimi açısından daha etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Örneğin, *Debaryomyces hansenii*'nin asetik asit ve furfural varlığında dahi ksilozu metabolize edebildiği bildirilmiştir (Ledezma-Orozco vd. 2018).

Lignoselülozik biyokütleden ksilitol üretimi, kimyasal üretim süreçlerine alternatif oluşturmaktadır. Bu yaklaşımın avantajı, ksiloza yüksek sıcaklık ve basınç altında saflaştırma gerektiren kimyasal hidrojenasyon süreçlerinden farklı olarak, daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilmesi ve çevresel etkilerinin daha düşük olmasıdır (Domínguez vd. 2012). Biyoteknolojik ksilitol üretimi, temelde hemiselülozdan elde edilen ksilozun maya, bakteri veya mantar gibi mikroorganizmalar aracılığıyla indirgenmesine dayanmaktadır. Bu mikroorganizmalar arasında en yüksek verimlilik mayalarda gözlenmiştir (López-Linares vd. 2018). Pentozların asimilasyonu sırasında NAD(P)H bağımlı ksiloz redüktaz (XR; EC 1.1.1.21) enzimi aktif rol oynar ve ksilitol ara ürün olarak oluşur. Literatürde, ksilitol birikiminin NADH/NAD<sup>+</sup> dengesindeki değişimle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Canilha vd. 2013). Özellikle sınırlı oksijen koşullarında NAD<sup>+</sup> düzeylerinin azalması ve NADH birikmesi, ksilitolün NAD<sup>+</sup> bağımlı ksilitol dehidrogenaz (XDH; EC 1.1.1.9) tarafından ksiluloza oksitlenmesini engeller (Hou-Rui vd. 2012). Bu durum ksilitolün hücre içinde birikmesine ve pentoz fosfat yolu aracılığıyla metabolizmaya katılmasına neden olmaktadır (Granström 2002). NADH/NADPH kullanım mekanizmaları farklı mayalarda değişiklik gösterebilmektedir.

*Candida guilliermondii* gibi bazı türlerin XR enzimini yalnızca NADPH'ye bağımlı olarak kullandığı, dolayısıyla ksilitol üretimi için daha uygun adaylar olduğu belirtilmiştir (Yablochkova vd. 2004). Ayrıca, lignoselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanılabilmesi için ek besin maddelerine duyulan ihtiyaç önemli bir faktördür (Granström vd. 2007b). Hidrolizat bileşimi kullanılan ham maddeye göre değiştiğinden, mikroorganizma büyümesi için gerekli mineraller, vitaminler veya proteinler düşük seviyede olabilir. Fermantasyon verimliliği açısından sınırlı oksijen koşullarının sağlanması kritik önem taşımakta olup, laboratuvar ölçekli kesikli kültürlerde oksijen transferi karıştırma hızı ve şişe-hacim oranına bağlı olarak değişmektedir (Somerville ve Proctor 2013).

Ksilitol üretiminde meyve artıkları, muz kabuğu, huş ağacı, şeker kamışı posası ve Antep fıstığı kabuğu gibi çeşitli lignoselülozik materyaller kullanılmaktadır. Bu biyokütleler selüloz, hemiselüloz, lignin ve minerallerden oluşan kompleks yapılar olup (Harmsen vd. 2010), biyolojik ksilitol üretiminin ilk adımı hemiselüloz fraksiyonunun seyreltik asitlerle hidrolize edilerek ksiloza dönüştürülmesidir. Elde edilen pentoz zengini hidrolizat, uygun mikroorganizmalarla fermantasyona tabi tutularak ksilitol üretimi için kullanılabilir (Ramesh vd. 2013; Tizazu vd. 2018).

#### **2.5.3.1 Biyoteknolojik yolla ksilitol üretiminde kullanılan mikroorganizmalar**

Endüstriyel ksilitol üretimi genellikle kimyasal yollarla ksilozdan elde edilse de, biyoteknolojik üretim yöntemleri çevre dostu ve sürdürülebilir alternatifler olarak öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, ksilitol üretiminde çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Abril vd. 1982).

Ksilitol üretiminde en yaygın kullanılan mikroorganizmalar maya türleridir. *Candida*, *Pichia* ve *Debaryomyces* cinsleri, ksilozu ksilitole dönüştürme kapasiteleri nedeniyle literatürde geniş yer bulmaktadır (Bruinenberg vd. 1984). Özellikle *Candida tropicalis* ve *Candida guilliermondii*, NAD(P)H bağımlı ksiloz redüktaz enzimi sayesinde ksilozu doğrudan ksilitole dönüştürerek yüksek verim sağlamaktadır (Barbosa vd. 1988). *Pichia stipitis*, hem aerobik hem de mikraerobik koşullarda çalışabilen bir tür olup, ksilitol

üretiminin oksijen seviyesine duyarlı olmasıyla bilinmektedir (du Preez vd. 1989). Tuz toleransı yüksek *Debaryomyces hansenii* ise farklı lignoselülozik hidrolizatlarda üretim yapabilmesi nedeniyle önemli bir maya türüdür (Jeffries vd. 1981).

Bakteriler daha az kullanılmakla birlikte, özellikle genetik olarak modifiye edilmiş türler önemli potansiyel taşımaktadır. *Escherichia coli*, metabolik mühendislik uygulamalarıyla ksilitol üretiminde sık tercih edilen bir model organizmadır (Gong vd. 1981). Ayrıca *Corynebacterium* türleri de ksilitol üretimi için optimize edilmiştir (Dominguez, Gong vd. 1997). Bu bakterilerde metabolik akışların düzenlenmesi ile ksiloz–ksilitol dönüşüm verimi artırılabilir (Dahiya 1991).

Filamentöz mantarlar, özellikle lignoselülozik biyokütleden ksiloz eldesinde rol oynayan enzimatik aktiviteleri nedeniyle değerlidir. *Aspergillus niger*, hemiselülaz enzimleri ile ksiloz üretimine katkı sağlarken (Hasumi vd. 1996), *Trichoderma reesei* selülaz ve hemiselülaz üretimi ile hidroliz sürecini desteklemektedir (Furlan 1991). Bu türler doğrudan ksilitol üretiminde değil, ksilitol fermantasyonuna uygun ksilozun açığa çıkarılmasında kritik rol oynamaktadır (Girio vd. 1989; Roca vd. 1996).

Mikroorganizma seçiminde yalnızca ksilitol üretim kapasitesi değil, aynı zamanda oksijen gereksinimi, besin ihtiyaçları, inhibitörlere dayanıklılık ve büyüme kinetikleri de dikkate alınmalıdır (Yüksel ve Yüksel 2019). Bu nedenle, lignoselülozik hidrolizatların içerdiği furfural, HMF ve asetik asit gibi inhibitörlere karşı tolerans gösterebilen mayalar endüstriyel uygulamalar için daha uygun kabul edilmektedir.

#### **2.5.3.2 Ksilitol fermantasyonunu etkileyen faktörler**

Ksilitol üretiminde fermantasyon koşulları büyük önem taşımaktadır. Fermantasyon süreci, kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak farklı sıcaklık, pH ve oksijen seviyelerinde gerçekleştirilir (Örer ve Yalçın 2018).

Ksilitol fermantasyonunda pH değeri, fermantasyon sürecinin verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ksilitol üretiminde en verimli pH aralığı 5.0 ile 7.0 arasında değişmektedir. Bu değer *Candida* türleri için pH 5.5 civarında maksimum verim elde edilirken, bazı bakteri türleri pH ortamı 7.0'a kadar tolere edebilmektedir (Jeffries 1981; J. Du Preez vd. 1989;). Aşırı asidik ve bazik koşullar, mikroorganizmaların metabolizma hızını olumsuz etkileyebilmekte ve bu durum da ksilitol veriminin düşmesine yol açmaktadır. Örneğin; pH seviyesinin 4.0'ın altına düşmesi, birçok bakteri ve maya türleri bakımından zararlı olabilir, bu sebeple pH düzeyinin dikkatli bir şekilde ayarlanması gerekmektedir (Mareczky vd. 2016). Fermantasyon süresince değişen pH, fermantasyon sırasında oluşan yan ürünlerin ve inhibitörlerin birikimine sebep olabilir. Oluşan toksik maddeler ve mikroorganizmaların metabolizmalarını büyük ölçüde olumsuz etkileyerek fermantasyon verimini düşürür (Mohamad vd. 2009).

Fermantasyon süresince sıcaklık, mikroorganizmaların aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Çoğu maya ve bakteri için optimum sıcaklık 30-37°C arasındadır. Örneğin, *Pichia stipitis* için optimum sıcaklık 30°C iken, *Candida tropicalis* için 35°C civarında daha yüksek ksilitol verimi gözlemlenmiştir (Gong vd. 1981; Furlan vd. 1991). Yüksek sıcaklıklar, mikroorganizmaların hızla çoğalmasına yardımcı olsa da, aşırı ısınma durumunda zararlı metabolitlerin birikmesi ve enzim aktivitesinin azalması gibi olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (McCullough vd. 2021). Bunun yanı sıra, düşük sıcaklıklar fermantasyon verimini azalmasına ve fermantasyon sürecinin uzamasına neden olmaktadır. Her iki durumda da fermantasyon ve mikroorganizmanın verimliliği düşmekte ve ksilitol verimi azalmaktadır (Morsy vd. 2016). Bu nedenle, sıcaklık kontrolü, fermantasyon verimliliği açısından kritik bir aşama olarak değerlendirilmektedir. Fermantasyon sıcaklığının sürekli olarak izlenmesi ve ayarlanması, istenilen ksilitol veriminin elde edilmesi açısından esastır (Rashmi vd. 2021). Oluşan sıcaklık değişimlerinin mikroorganizmalar üzerinde verimi etkileyen değişikliklere yol açmasından ötürü, fermantasyon sistemlerine sıcaklık kontrol sistemleri eklenmektedir. Sıcaklık koşullarının optimize edilmesi, üretim maliyetlerinin düşürülmesine, ürün kalitesinin artmasına ve ürün veriminin artmasına yol açmaktadır (Winkelhausen ve Kuzmanova 1998).

Fermantasyon süresince oksijen seviyesi, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri üzerinde pH ve sıcaklık kadar önemli bir etkiye sahiptir. Ksilitol üretiminde genel olarak anaerobik koşullar tercih edilmektedir. Anaerobik fermantasyon, maya ve bakterilerin daha yüksek verimle ksilitol ürettikleri gözlemlenmiştir. *Pichia stipitis* gibi bazı türler, düşük oksijen seviyelerinde ksilitol üretimini artırırken, tam aerobik koşullarda ksilitol yerine etanol üretimine yönelmektedir (Horitsu vd. 1992).

Ksilitol üretimi için temel karbon kaynağı ksilozdur. Lignoselülozik biyokütleden elde edilen ksiloz, enzimatik hidroliz veya asidik hidroliz yöntemleriyle fermantasyon ortamına kazandırılmaktadır (Maloney ve Ambudkar 1989; Kim vd. 1997).

Literatürde, ksilitol üretiminde en yüksek verimi elde etmek için farklı stratejiler uygulanmıştır. Örneğin, *Candida tropicalis* kullanılarak yapılan bir çalışmada, fermantasyon ortamındaki karbon/nitrojen oranının optimize edilmesiyle %85 oranında ksilitol dönüşüm verimi elde edilmiştir (Canilha vd. 2006). *Pichia stipitis* ile yapılan bir diğer çalışmada ise mikroaerobik koşullar sağlanarak ksilitol verimi %90'a kadar yükseltilmiştir (Silva vd. 2010). Genetik mühendisliği ile modifiye edilen *E. coli* suşlarında ise heterolog ksiloz metabolizması optimize edilerek %95'e varan ksilitol üretim verimi rapor edilmiştir (Zhang vd. 2015).

Endüstriyel ölçekte ksilitol üretimini artırmak amacıyla genetik mühendisliği teknikleri ve biyoreaktör tasarımları kullanılmaktadır (Gurimand vd. 2019). Bu yöntemler arasında, optimizasyon teknikleri, genetik modifikasyon ve fermantasyon koşullarının iyileştirilmesidir. Optimizasyon teknikleri, substrat besleme, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşulların kontrolü ile başlar (Jolayemi vd. 2022). Özellikle farklı karbon kaynaklarının kullanımı, ksilitol üretimini arttırmada önemli bir rol oynamaktadır. Substrat türleri arasında glikoz, fruktoz ve diğer monosakkaritlerin haricinde, lignoselülozik biyokütlerinde kullanılması, hammadde maliyetini düşürmekte olup üretim verimini arttırmaktadır (Jolayemi vd. 2022; Saravanan vd. 2023).

Genetik modifikasyon, mikroorganizmaların metabolik yolunun değiştirilmesi ve bu amaçla ksilitol üretimini arttırmaktadır (Su vd. 2015). Özellikle, genetik mühendislik



sayesinde, mikroorganizmaların ksilitol üretiminde yer alan enzim aktivitelerinin artırılması hedeflenmektedir (Li vd. 2025). Örneğin, metabolik mühendislik yoluyla modifiye edilen *E. coli* suşlarında ksilitol üretim verimi önemli ölçüde artırılmıştır (Hinfrey vd. 1995; Lee vd. 1996). Ayrıca, biyoreaktörlerde kesikli (batch), beslemeli (fed-batch) ve sürekli (continuous) fermantasyon stratejileri uygulanarak üretim verimliliği artırılmaktadır (Kruse ve Schügerl 1996).

Modern biyoreaktör sistemlerinde, substratın kontrollü beslenmesi ve metabolik yan ürünlerin uzaklaştırılması, ksilitol verimini artıran kritik faktörlerdir. Membran biyoreaktörler ve çok aşamalı fermantasyon sistemleri, ksilitol üretimini maksimize etmek için geliştirilen en yeni teknolojiler arasında yer almaktadır (Vaz de Arruda vd. 2017).

Ksilitol fermantasyonu, sürdürülebilir ve çevre dostu üretim süreçleri açısından büyük bir öneme sahiptir. Kullanılan mikroorganizma türü, fermantasyon ortamı ve reaktör koşulları, üretim verimi üzerinde belirleyici faktörlerdir (Novy vd. 2014). Literatürde yapılan çalışmalar, optimum pH, sıcaklık ve oksijen seviyelerinin ksilitol üretiminde kritik rol oynadığını göstermektedir. Gelecekte, genetik mühendisliği ve biyoreaktör teknolojilerindeki ilerlemeler ile daha yüksek verim ve düşük maliyetle ksilitol üretiminin sağlanması beklenmektedir (Queiroz vd. 2022).

## **2.6 Ksilitol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler**

Ksilitol üretim yöntemleri, lignoselülozik ve hemiselülozik hammaddelerin kullanımıyla daha çevre dostu üretim yöntemleriyle uygulanmaktadır (Kang vd. 2016). Ksilitol üretim süreci, lignoselülozun ön işlem ile parçalanıp, hemiselülozun hidrolizi ve ardından, elde edilen ksilozun katalitik indirgenmesi aşamalarını içermektedir (Kapu ve Trajano 2014). Sert odunsu hammaddelerin kullanımı, zengin hemiselüloz içeriği ile ksilitol üretimine uygun bir madde olanağı olma potansiyeli tanımaktadır. Bu tür materyallerin işlenmesi sırasında, ilk olarak lignoselülozik yapı parçalanarak yapıda lignin uzaklaştırılıp, monosakkaritlerin ayrılması amacıyla asidik veya enzimatik hidroliz yöntemleri kullanılmakta olup, yapıda bulunan pentoz ve heksoz şekerlerinin açığa çıkması

amaçlanmaktadır (Qiang vd. 2010). Ayrıca tarım atıkları, özellikle mısır koçanları, meyve sebze atıkları gibi hammaddeler de ksilitol üretiminde kullanılabilir. Özellikle bu atıklar, ksiloz içeriği bakımından zengin içeriği sayesinde düşük maliyetli ksilitol üretiminde kullanılmaktadır (Tada vd. 2012).

Günümüzde ksilitol, genellikle sert odunların hemiselüloz hidrolizatlarından ya da tarımsal endüstri atıklarından, özellikle mısır koçanlarından, meyve sebze artıklarından ve tarımsal küspe ve kabuklardan elde edilen ksilozun katalitik indirgenmesi yoluyla üretilmektedir (Balakrishnaraja vd. 2015). Sert odunlar ve tarım atıkları, arabinoz, galaktoz, glikoz ve mannoz gibi diğer monosakkaritleri içerebileceği için, kimyasal indirgeme işlemine başlamadan önce ksilitol eldesini engelleyecek maddeler olan lignoselülozik materyallerden ayrılması ve saflaştırılması gerekmektedir (Nigam ve Singh 1995).

Mevcut ksiloz hazırlama yöntemleri, lignoselülozik materyallerden ksiloz elde edilmesinde düşük verim ve yüksek maliyet gibi önemli zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Ksilitol verimi, kullanılan ham maddelerdeki ksilan miktarının yalnızca %50-60'ına denk gelmektedir (Gufe vd. 2023), bu da geleneksel ksilitol üretim süreçlerini ekonomik açıdan pahalı hale getirmektedir (Nigam ve Singh 1995). Bu olumsuzluklara alternatif olarak, ksilitol üretimi için lignoselüloz hidrolizatlarında bulunan ksilozun mikrobiyal dönüşümü önerilmektedir (Winkelhausen ve Kuzmanova 1998).

Ülkemizin tarımsal potansiyelinin yüksek olmasından dolayı, temel tarım alanını oluşturan buğday, arpa, ayçiçeği, tütün, antep fıstığı kabuğu, pirinç gibi ekinlerin tipi ve miktarı büyük oranda tarımsal atıkların oluşumuna neden olmaktadır (Başçetinçelik vd. 2006). Dünyada her yıl büyük miktarlarda tarımsal bitki atıkları oluşmakta ve bu atıklar potansiyellerine uygun olarak kullanılmamaktadır (Özçimen 2007). Özellikle, hasat sonrası oluşan sert kabuklu yemişlerin kabukları ve meyve çekirdekleri gibi yüksek atık potansiyeli olan biyokütleler tarımsal atık oluşumunun başında gelmektedirler (Özçimen 2007). En çok bilinen kabuklu atıklar, şeker kamışı küspesi, pirinç kabukları, hindistan cevizi kabukları, yer fıstığı kabukları, antep fıstığı kabukları ve samandır (Çağlar ve Demirbaş 2001).

Ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde Antep fıstığı gıda olarak kullanılan büyük ekonomik öneme sahip bir tarım ürünüdür. Antep fıstığı, sert bir iç kabuk ve antep fıstığının iç kısmını ve sert kabuğu çevreleyen yumuşak bir dış kabuktan oluşmaktadır. Türkiye'de 296.376 ton üretilerek yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. 2021 Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı verilerine göre dünya genelinde üretimin toplamda 981.671 ton olduğu kaydedilmiştir. Bu veriler, yıllık olarak dünya genelinde oldukça yüksek miktarda Antep fıstığı kabuğunun açığa çıktığını göstermektedir. Bu tarımsal atık, Antep fıstığının antep fıstığı çekirdeğine dönüştürülmesi sırasında oluşur ve hemen hemen %90'ı ksilan olan hemiselüloz fraksiyonu içeren benzersiz bir lignoselülozik hammaddedir (Çağlar ve Demirbaş 2001). Ancak lignoselülozik biyokütlelerin dirençli yapısı, parçalanmalarını zorlaştırmakta; bu nedenle biyokütleden değerli ürünlerin verimli bir şekilde üretilmesi için ön işlem basamağı, biyokütlenin etkin dönüştürülmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Lignoselülozik biyokütlenin parçalanması için geliştirilen çeşitli ön işlem yöntemleri biyolojik, kimyasal, fiziksel veya fizikokimyasal olarak kategorize edilmiştir (Hazal vd. 2023).

Bu atıkların yönetimi, çoğunlukla, depolama, yakma veya gübre üretiminde kullanıma şeklindedir, ancak bu uygulamaların tamamının yüksek maliyetli olma gibi dezavantajları bulunmaktadır. Antep fıstığı meyvesi genel olarak çerez şeklinde tüketilmekte olup, bu meyve ayrıca şekerleme, hamur işi ve pastacılık sektöründe kullanılmaktadır. İşleme sonucu oluşan meyve kabuğu, antep fıstığının en büyük atık ürünü olarak (meyvenin yaklaşık %35-45 kısmı) açığa çıkmaktadır. Bu durumda üreticiye ek masraf çıkaran ve ticari değeri olmayan büyük miktarda atık oluşur. Ortaya çıkan bu yan ürünün değerlendirilmesi ve ekonomiye katkı sağlayacak şekilde farklı ürünlere dönüştürülmesi ekonomik bir kazanım olarak düşünülebilir (Barreca vd. 2016). Bu bağlamda, Antep fıstığı kabuğu, büyük miktarlarda biriken lignoselülozik biyokütle örneklerinden biridir. 2018 yılında dünya genelinde Antep fıstığı üretimi kabuklu bazda 813.724 ton olarak gerçekleşmiştir (Perez 2016). Dolayısıyla, Antep fıstığı kabuğunun değerlendirilmesi, bu tür büyük ölçekli atıkların sürdürülebilir şekilde yönetilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Perez 2016).

Antep fıstığı dış kabuğu incelendiğinde, lignoselülozik bileşenler yapısından zengin bir tarımsal atıktır. Antep fıstığı kabuğunun selüloz (%40–45), hemiselülozdan (%20–30), ligninden (%25–30) ve trigliseritler (%1–5) gibi diğer ekstraktiflerden oluştuğunu göstermiştir (Peters 2011). Mikroskopik koşullarda incelendiğinde, lifli ve gözenekli bir dokuya sahip olup, bu özellikler sayesinde biyoteknolojik uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Çelik ve Demirel 2015). Selüloz, bitkinin hücre duvarında yer alan polisakkaritlerden biri olup, bitkinin yapısal bütünlüğünü sağlar, Hemiselüloz ve selüloz birlikte hücre duvarının yapı taşlarını oluşturarak, bitkiye sertlik ve dayanıklılık vermektedir. Yapıda bulunan bir diğer önemli lignoselülozik madde olan lignin ise, bitkinin su ve besin maddelerini taşıma işlevinde önemli rol oynamaktadır (Peters 2011).

Fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından, Antep fıstığı dış kabuğu atığı, yüksek yüzey alanı, uzun lif yapısı ve gözenekli yapısıyla, biyokütle üretimi, biyoenerji ve biyopolimer üretimi gibi biyoteknolojik yolla üretim alanlarında kullanılmaktadır. Özetle, Antep fıstığı dış kabuğu hammaddesi, hem çevresel uygulamalar, hem de biyoteknolojik proses alanındaki yüksek potansiyeli ile önemli bir lignoselülozik – tarımsal atık maddedir (Taghizadeh-Alisaraei vd. 2017).

## **2.7 Lignoselülozik Biyokütle ve Yapısal Bileşimi**

Lignoselülozik biyoküteller, dünya genelinde hammadde olarak kullanılabilecek en büyük yenilenebilir kaynaklardan biridir. Lignoselülozik biyokütle, 4 kategoriye ayrılabilir; sert odunsu, yumuşak odunsu, tarımsal atıklar ve otlardır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde, lignoselülozik materyallerden biyokütle üretiminin yıllık yaklaşık 1.4 milyar kuru ton civarında olduğu ve bunun %30'unun orman biyokütlesinden sağlandığı tahmin edilmektedir (Perlack 2005). Lignoselülozik hammaddeler, kaynağı, bileşimi ve yapısı doğrultusunda farklı kategorilere ayrılabilir. ABD'deki işlenebilir arazilerin büyük bir kısmı, yaklaşık 2.25 milyar dönüm (9.0 milyon km<sup>2</sup>) üzerinde %35 ormanlık alan, yaklaşık %27 mera alanı ve %19 ekili tarım arazilerinden oluşmaktadır (Searchinger vd. 2008). Lignoselülozik biyokütelleri sınıflandırdığımızda, orman kaynaklı materyaller, başlıca sert ve yumuşak odunlar ile talaş, budama ve kabuk inceltme atıkları gibi odunsu biyokütleyi içerir. Otlak ve çayır alanları ise, tarımsal atıkların

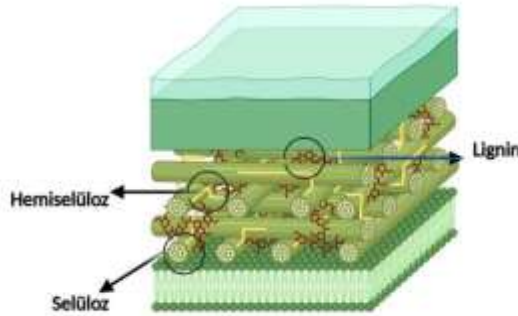
bulunduğu, gıda ve gıda dışı bitkilerle birlikte switchgrass (deve diken) ve yonca gibi otları içeren alanları kapsamaktadır (Z.-H. Hu vd. 2008). Ayrıca, belediye ve sanayi atıkları da geri dönüştürülebilir lignoselülozik materyaller olarak potansiyel taşıır. Bu atıklar, konut ve ticari kaynaklardan türeyebilen gıda atıkları ve kağıt fabrikası çamurları gibi materyalleri içerebilir (Carlos A Cardona vd. 2009).

Lignoselülozik biyokütle bileşenleri temel olarak, selüloz, hemiselüloz, lignin, ekstraktlar, protein, pektin ve kül bileşenlerinden oluşmaktadır (Bajpai 2020). Bu materyaller genel olarak selülozik kısım (%35-50)  $\beta$ -1,4 glikozidik bağıları ile bağlanmış D-glikoz birimlerinden meydana gelen, yarı kristal (düzenli) yapı taşıyan bir homopolisakkarittir. Lignoselülozik materyallerin yaklaşık olarak %34-50'sinin selülozdan oluştuğu belirtilmektedir. Lignoselülozik materyaldeki hemiselülozik kısım ise, genel olarak pentoz ve heksoz şekerlerden, üronik asit ve asetil yan gruplarından oluşan heteropolisakkarit bir yapıdadır. Mikrobiyal ksilitol üretimi için gerekli substrat olan ksilozun pentoz bir şeker olduğu ve hemiselülozik kısımda yer aldığı bilinmektedir. Hemiselüloz, sahip olduğu düzensiz yapısı ile doğrusal bir polimer olan selülozdan ayrılmaktadır. Lignoselülozik materyalin yaklaşık %19-35'ini oluşturan hemiselülozun kimyasal yapısı ve bileşimi, bulunduğu bitki ve ağaç türlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Lignoselülozik materyallerdeki bir diğer önemli kısım, fenolik maddelerin ester bağıları ile birbirlerine bağlandıkları aromatik polimer bir madde olan lignindir (%10-25) (Rafiqul vd. 2021).

Bu bileşenler, bir arada hücre duvarına sertlik ve dayanıklılık gibi önemli özellikler kazandırır (McCann ve Carpita 2015). Bu yapıların miktarsal bileşimi, bitki türlerine göre farklılık gösterebilir. Örneğin, sert odun daha fazla miktarda selüloz içerirken, buğday samanı ve yapraklar daha fazla hemiselüloz içerir (Sun ve Cheng 2002). Genel olarak, tahıl atıkları (örneğin, pirinç samanı, buğday samanı, mısır sapı ve şeker kamışı posası) büyük bir lignoselülozik madde oranına sahip olup, biyorafineriler için tercih edilen hammaddeleri temsil ederken, otlar, meyve ve sebze atıkları daha düşük lignoselülozik içeriğe sahiptir. Ayrıca, tek bir bitki içindeki çeşitli bileşiklerin oranları, bitkinin yaşı, gelişim aşaması ve diğer çevresel koşullara bağılı olarak değışiklik gösterebilir.

Biyokütlenin verimli bir şekilde kullanılabilmesi, üç ana aşamaya dayanır: ön işlem, enzimatik hidroliz ve son olarak fermantasyon aşamalarıdır (Rebello vd. 2020)

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; mısır koçanı (Li vd. 2012; Misra vd. 2013; Wang vd. 2013a), şeker pancarı posası (Silva vd. 2015, Castañón Rodríguez vd. 2015), şeker pancarı sapı (Hernández Pérez vd. 2016), pirinç sapı (Deng vd. 2007), pirinç kavuzu (Rambo vd. 2013), pamuk tohumu kabuğu (Wang vd. 2013b), sebze artıkları (Zhang vd. 2012b), kaju fıstığı posası (Rocha vd. 2014; Albuquerque vd. 2015), üzüm posası (Salgado vd. 2012), bira ve şarap tortusu (Pérez Bibbins vd. 2015), kahve meyvesi kabuğu (Arrizon vd. 2012), muz kabuğu, maş fasulyesi, yer fıstığı ve yulaf kabukları (Ur Rehman vd. 2015), asma budama artıkları (Rivas vd. 2007) ve kestane kabuğu (Eryaşar ve Karasu Yalçın, 2016) elde edilen, ksiloz içerikleri yüksek hemiselülozik hidrolizatların ksilitol üretiminde substrat olarak kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca, zeytin ağacı budama artıkları (Mateo vd. 2013) ile ökaliptus ağacı (Villarreal vd. 2006), huş ağacı (Miura vd. 2015) ve bambu ağacı (Miura vd. 2013) kabuklarını kapsayan ormancılık endüstrisi artıklarının hidrolizat hazırlığında hammadde olarak değerlendirildiği bilinmektedir (Karasu Yalçın vd. 2018).



Şekil 2.3 Lignoselülozik biyokütle yapısı

### 2.7.1 Selüloz

Selüloz, bitkilerdeki hücre duvarlarının ana bileşenlerinden biri olup, doğal bir polisakarit olarak tanımlanır. Selüloz, yeryüzünde en fazla bulunan doğal polimerdir ve genel olarak bitki ve bakterilere tarafından üretilen bir polimerdir (Fengel ve Wegener 1984).

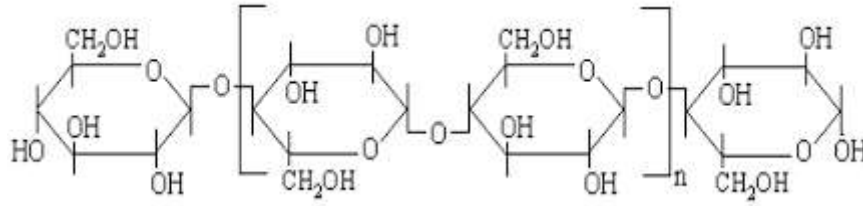
Selülozun yapısı, D-glikoz monomerlerinin  $\beta$ -(1,4)-glikozidik bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşur. Bu bağlar, uzun doğrusal zincirlerin oluşmasına yol açar ve her bir zincir, moleküller arası hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Selülozun bu özellikleri, ona yüksek mekanik güç ve dayanıklılık sağlar (Bajpai 2021). Selüloz zincirleri, bitkilerin hücre duvarında mikro fibriller şeklinde organize olur ve bu yapılar, bitkinin yapısal bütünlüğünü ve dayanıklılığını sağlar (McCann ve Carpita 2015).

Selüloz, biyolojik olarak en yaygın bulunan organik polimerlerden biridir ve doğada genellikle kristal yapı gösterir. Selüloz en fazla ve saf halde yaklaşık %95 oranında pamuk bitkisinde bulunmaktadır. Ağaç, ot gibi bitkilerde lignin ve hemiselüloz %30-70 oranında; yosun, alg gibi bitkilerde ise toplam %10-40 oranında bulunmaktadır (Şahin 2002).

Selüloz sebzeler ve tahıl ürünleri gibi lifli gıdaların ise kuru ağırlığının %20-50'sini oluşturur (Varqani ve Bastian 2023). Selülozun kristalin yapısı, moleküller arasındaki hidrojen bağları ile sıkıca paketlenmiş olup, bu durum onun suya karşı dirençli olmasını sağlar (Perlack 2005). Bu yapının bir diğer sonucu ise, selülozun biyolojik olarak bozunmasının zorluğudur. Ancak, amorf formdaki selüloz daha kolay hidrolize edilebilir ve bu, biyolojik dönüşüm süreçlerinde önemli bir faktördür (Rebello vd. 2020).

Selülozun hidrojen bağları sayesinde yüksek su emme kapasitesi ve biyolojik bozulabilirlik gibi özellikleri, onu çevre mühendisliği alanında, su arıtma ve atık yönetimi gibi uygulamalarda kullanımı için uygun hale getirir (Bajpai 2021). Selüloz, glikoz ünitelerinin  $\beta$ -1,4 bağlarının bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Moleküller arası bağlar selüloz zincirlerini bir araya getirerek kristal yapıyı oluşturur. Genellikle doğal selüloz %70 kristallik derecesine sahiptir. Kristallik derecesi en fazla olan Valonia selüloz, kristallik derecesi en az olan ise asitle muamele edilmiş selülozdur. Kristal bölgeler birbirinden daha az kristal, amorf bölgelerle ayrılmıştır (Akpınar vd. 2012). Amorf selüloz suyu hızlı bir şekilde absorbe ettiğinden bitkiye yapısal dayanıklılık, esneklikte artış ve kırılmalara karşı direnç sağlar. Selüloz, higroskopik (nem çekici) bir materyaldir. Suda çözünmez; su, zayıf asit ve birçok çözücülerde şişebilir (Shelton ve Lee 2000).

Selüloz, bitkisel biyokütlede bulunan en önemli polisakkaritlerden biri olup, özellikleri ve biyolojik fonksiyonları bakımından geniş bir uygulama yelpazesi sunar. Yapısal gücü, biyolojik bozulabilirliği ve çevre dostu özellikleri, onu yenilenebilir enerji üretimi, malzeme bilimi ve çevre mühendisliği gibi birçok farklı alanda tercih edilen bir bileşen haline getirmektedir. Hem endüstriyel hem de biyoteknolojik uygulamalarda selüloz, büyük bir potansiyel taşımaktadır (Rebello vd. 2020).



Şekil 2.4 Selülozun yapısı (Mahjoub vd. 2014)

### 2.7.2 Hemiselüloz

Hemiselüloz, bitkisel hücre duvarlarında önemli bir yapı taşı olarak yer alan polisakaritlerden biridir. Hemiselülozlar, selüloz ve ligninle birlikte bitki hücre duvarının temel bileşenlerini oluşturur. Lignoselülozik materyallerinin %20-35'ini oluşturan hemiselüloz doğada en çok bulunan ikinci polisakkarittir. Hemiselüloz pentoz şekerlerden (ksiloz, arabinoz), heksoz şekerlerden (mannoz, glikoz, galaktoz) ve şeker asitlerden (üronik asit, ferulik asit ve kumarik asit) oluşan heterojen bir polimerdir (Girio vd. 2010).

Genellikle hücre duvarlarından alkali ile ekstrakte edilen polisakkarit olarak tanımlanmaktadır (Burdurlu ve Karadeniz 2003). Selülozdan farklı olarak, hemiselülozlar daha kısa, dallanmış yapıda moleküllerden meydana gelir. Bu özellik, hemiselülozların bitkilerin mekanik dayanıklılığını sağlamakta ve hücre duvarlarının esnekliğini artırmaktadır (Bajpai 2020). Bu yapı, hemiselülozun farklı bitki türlerinde ve bitkinin gelişim aşamalarına göre değişkenlik göstermesini sağlar (Bajpai 2020).  $\beta$ -1,4 bağı ile birbirine bağlanmış şekerlerden oluşan hemiselüloz,  $\beta$ -1,2,  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,6 noktalarında dallanma göstermektedir ve yapısında içerdiği glukomannan, glukuronoksilan, arabinoksilan, galaktoglukomannan şekerleri içermektedir (Obembe vd. 2006).



Hemiselülozların yapısal farklılıkları, onları biyoteknolojik uygulamalar için oldukça değerli kılmaktadır. Hemiselülozlar, hemiselülozik hidroliz ve biyolojik yollarla kolayca parçalanabilir ve monosakaritlere dönüşebilir. Bu süreç, özellikle biyoyakıt üretimi için önemli bir aşama olan fermantasyon için gerekli olan şekerlerin elde edilmesinde kritik rol oynamaktadır (Perlack 2005). Bununla birlikte, hemiselülozların bu özellikleri, onları biyoplastik ve biyolojik malzeme üretimi gibi endüstriyel uygulamalar için değerli kılmaktadır. Örneğin, hemiselüloz esaslı biyopolimerler, biyobozunur malzemeler üretmek için kullanılmaktadır (Carlos Ariel Cardona vd. 2009).

Hemiselülozun yapısı, bitkinin türüne bağlı olarak sert odunsu ve yumuşak odunsu bitkilerde belirgin farklılıklar gösterebilir ve kaynağına göre ya glukomannan ya da ksilan formunda bulunur (Fengel vd. 1989).

Ksilan, özellikle tarımsal ve orman atıklarında yüksek miktarda bulunur. Hemiselülozun büyük bir kısmını oluşturan ksilan, bitki hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlamakta önemli bir görev üstlenir (Beg vd. 2001; Saha 2003).

### **2.7.3 Lignin**

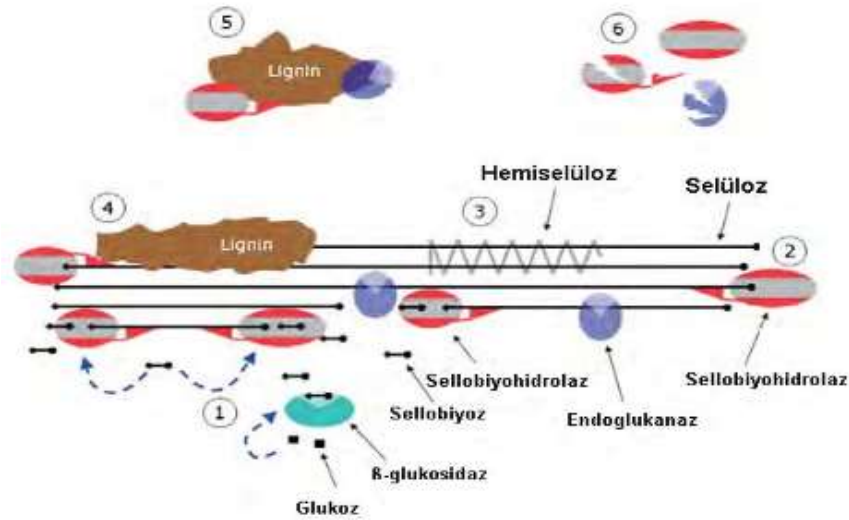
Lignin, bitkilerdeki hücre duvarlarının önemli bileşenlerinden biri olup, özellikle odunsu bitkilerde yoğun olarak bulunur. Lignin, fenilpropanoid bileşenlerden oluşan karmaşık bir polimerdir ve bu polimer, fenilpropanoid birimlerinin (özellikle p-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit) birbirine bağlanmasıyla oluşur. Lignin, genellikle lignanlar, guaiacil, syringil ve p-hidroksi fenil birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan bir üçlü yapı sergiler (McCann ve Carpita 2015).

Lignin, doğada sıklıkla heterojen bir yapıya sahip olup, bitkinin türüne, gelişim aşamasına ve çevresel faktörlere bağlı olarak yapısal bileşenleri değişebilir. Genellikle, lignin yapısındaki bağlar  $\alpha$ -(1,5)-glikozidik ve  $\alpha$ -(1,4)-glikozidik bağlardan oluşur ve lignin molekülleri arasındaki çapraz bağlar, bu polimerin üç boyutlu ağ şeklinde oluşmasına neden olur (Bajpai 2020). Lignin polimerleri, biyolojik olarak hidrolizi zor, son derece

dirençli ve karmaşık moleküller oldukları için, selüloz ve hemiselüloz ile karşılaştırıldığında daha az reaktif ve hidrolize karşı daha dirençlidir (Perlack 2005).

Lignin, bitkilerdeki hücre duvarında hücrelerin mekanik dayanıklılığını artırarak, bitkilerin dik durmasını sağlar ve onları çevresel etmenlere karşı korur. Ligninin fiziksel özellikleri, suya karşı yüksek direnç göstermesi ve bu nedenle su emme kapasitesinin düşük olmasıdır. Ayrıca, lignin, UV ışınına karşı koruyucu bir bariyer görevi görerek bitkilerin ultraviyole ışınlarından korunmasına yardımcı olur. Lignin, polifenolik yapıları sayesinde yüksek antioksidan özelliklere sahiptir ve bu özellik, bitkilerin oksidatif stresle mücadele etmelerini sağlar (Sarkar vd. 2014).

Ligninin biyolojik olarak bozunma direnci oldukça yüksektir, çünkü moleküller arasındaki çapraz bağlar, mikroorganizmaların lignini hızlıca bozmasını zorlaştırır. Bu nedenle lignin, bitki materyalinde uzun süre dayanabilir. Ancak, belirli enzimler ve aşırı sıcaklık gibi koşullar altında lignin, biyolojik olarak bozunabilir (Rebello vd. 2020)



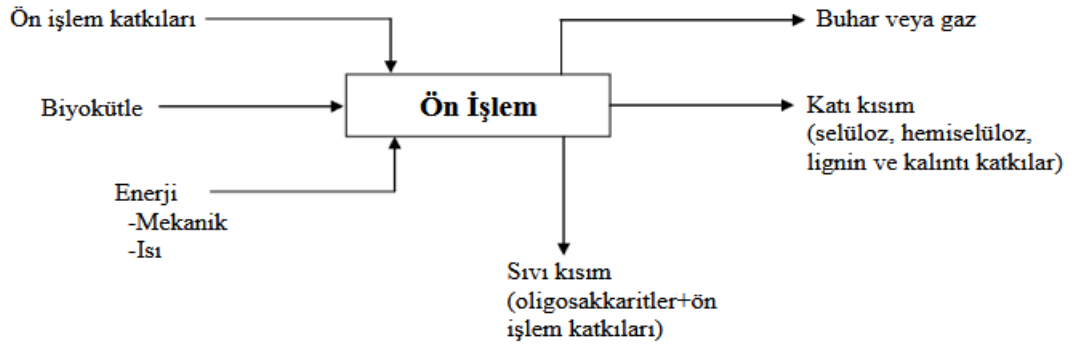
Şekil 2.5 Lignoselülozik yapı bileşenleri (Jørgensen vd. 2007)

## 2.8 Ön İşlem ve Ön İşlem Türleri

Ön işlemin amacı, lignoselülozik biyokütlede bulunan lignin ve hemiselülozu uzaklaştırıp, selülozun kristalliğini azaltmak ve lignoselülozik materyallerin porozitesini

artırmaktır. Ön işlem seçiminde hammaddelerin, enzimlerin ve organizmaların uyumluluğu göz önüne alınmalıdır (Monlau vd. 2013). Ön işlem, aşağıdaki gereksinimleri karşılamalıdır:

- (1) Şekerlerin oluşumunu veya hidroliz yoluyla şeker oluşumunu artırmak,
- (2) Karbonhidratların bozulmasını veya kaybını önlemek,
- (3) Sonraki hidroliz ve fermantasyon süreçlerini engelleyen yan ürünlerin oluşumunu engellemek, ve
- (4) Maliyet etkin olmalıdır.

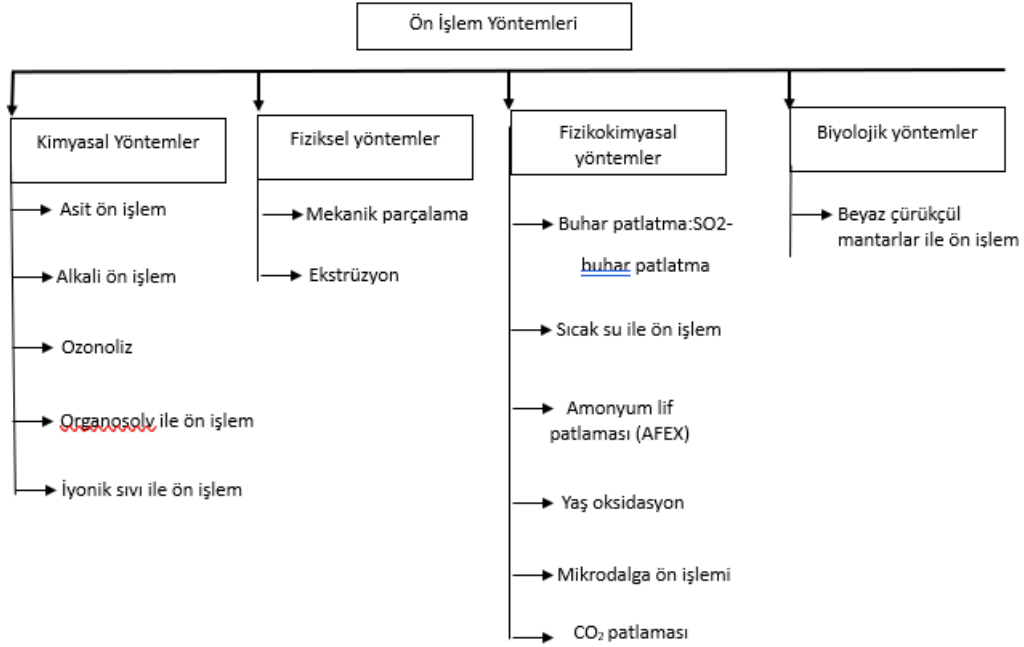


Şekil 2.6 Ön işlem prosesi (Mosier vd. 2005)

Ön işleme yöntemleri genel olarak farklı kategorilere ayrılabilir: fiziksel (öğütme ve öğütme), fizikokimyasal (buhar ön işlemi/oto-hidroliz, hidrotermoliz ve ıslak oksidasyon), kimyasal (alkali, seyreltik asit, oksitleyici ajanlar ve organik çözücüler), biyolojik, elektriksel veya yenilikçi yeşil süreçleri (iyonik sıvılar ve süb/süperkritik sıvılar) kapsayan ön işlem yöntemleri olarak ayrılmaktadır (Şekil 2.7) (Sankaran vd. 2020).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, ksilitol üretimi amacıyla lignoselülozik materyallere uygulanan fizikokimyasal veya kimyasal ön işlemlerin, bu materyallerin yapısal bütünlüğünü bozduğu, ligninin ortamdan uzaklaştırılmasını sağladığı, hemiselülozik yapının parçalanarak açığa çıkmasını kolaylaştırdığı ve dolayısıyla ksiloz derişimlerinin artırılabilirdiği bildirilmektedir (Ur-Rehman vd. 2015; H. Chen vd. 2017). Kimyasal

yöntemlerden yararlanılan ön işlemlerde çeşitli alkali, amonyak ve asit çözeltilerinin, organik çözücülerin veya oksitleyici ajanların kullanıldığı rapor edilmektedir (Rao vd. 2016).



Şekil 2.7 Ön işlem türleri

### 2.8.1 Asit ön işlemi

Asit ön işlemi diğer ön işlemler arasında en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Lignoselülozik biyokütlenin asidik ön işlem yöntemi, lignoselülozik biyokütleye uygulanacak olan enzimatik hidrolizi iyileştirmek amacıyla ön işlemde asit kullanılmasıdır. Bu işlemde kullanılan asit, selüloz ve hemiselüloz zincirlerini şeker parçalarına ayırır ve yapıda bulunan basit şekerleri açığa çıkarır (Veluchamy, Raju, vd. 2018). Bu yöntemle gerçekleştirilen ön işlemlerde en yaygın kullanılan asitler arasında sülfürik asit, hidroklorik asit ve fosforik asit ( $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $H_3PO_4$ ) yer almakta; ayrıca konsantre asit ve seyreltik asit yöntemleri uygulanmaktadır. (Rezania vd. 2020).

Asidik ön işlem, seyreltik asit (0.1%) ile yüksek sıcaklıklarda ( $>200^\circ C$ ) veya yoğun asit (30–70%) ile düşük sıcaklıklarda ( $<50^\circ C$ ) yapılabilir (Den vd. 2018). Seyreltik asit

kullanımında, daha düşük asit tüketimi sağlanmaktadır, ancak yüksek sıcaklıklar nedeniyle işlem için daha fazla enerji gerektirmektedir. Ayrıca yoğun asit kullanımı enerji tüketimini azaltırken, yüksek asit kullanımı fermantasyon engelleyicilerinin (furfural, 5-hidroksimetilfurfural) üretimine yol açar, bu da mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etkilere sebep olur (Woiciechowski vd. 2020). Seyreltik asit ön işlemi, alkali ön işlemiden daha faydalı olarak kabul edilmektedir, ancak bu yöntemin dezavantajı, toksik asitlerin geri kazanımını ve asit etkilerinin azaltılmasını gerektirmesidir (Sahoo vd. 2018).

Sülfürik asit, hidroklorik asit ve nitrik asit gibi inorganik asitler asidik ön işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak bu asitlerin aşındırıcı ve toksik özellikleri, hammaddenin pH seviyesini aşırı derecede asidik aralığa düşürmekte ve bu durum, özellikle biyokömür üretiminde kullanılan hidrotermal sıvılaştırma (HTL) süreçlerinde verimli hidroliz mekanizmalarını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle, söz konusu asitlerin geri kazanılması, termokimyasal süreçlerin daha verimli ve sürdürülebilir hale getirilmesi açısından gereklidir (Den vd. 2018; Rezania vd. 2020)

Ksilitol üretimi amacıyla literatürde yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda, hidrolizasyon işlemlerinde seyreltik sülfürik asit çözeltisinden yararlanılmaktadır. Seyreltik asit hidrolizasyonunun, genel olarak düşük derişimlerde asit çözeltileri kullanılarak, yüksek sıcaklık ve basınç koşullarında gerçekleştirildiği ve bu sayede, substrat kaynağı olarak hemiselülozik yapıdaki ksilozun açığa çıkarılmasının sağlandığı belirtilmektedir. Hidrolizat hazırlığında hammadde olarak değerlendirilen lignoselülozik materyalin cinsine, kullanılan asite ve derişimine, uygulanan sıcaklık ve süreye, ayrıca katı materyal ve çözelti oranına bağlı olarak, elde edilen hidrolizatlardaki ksiloz derişimlerinin değiştiği bildirilmektedir (Rafiqul ve Sakinah 2013). Mısır koçanı hidrolizatı hazırlamak üzere materyalin 1:10 (w/v) oranında %1'lik sülfürik asit çözeltisi ile karıştırıldığı ve 121°C'de 60 dakika süresince hidrolize edildiği durumda 16.36 g/L ksilozun açığa çıktığı, hidrolizasyon işlemi belirlenen optimum koşullarda (%1'lik sülfürik asit çözeltisi, 1:8, 121°C, 30 dakika) gerçekleştirildiğinde ise 21.98 g/L ksiloz elde edildiği rapor edilmiştir (Misra vd. 2013). Zeytin ağacı budama artıkları, %2'lik sülfürik asit çözeltisi kullanılarak ve 120°C'de 90 dakika süresince hidrolize edildiğinde,

hidrolizasyon işlemi için optimum koşulların sağlandığı ve bu durumda en yüksek 17.97 g/L ksiloz elde edildiği rapor edilmiştir (Mateo vd. 2015).

### **2.8.2 Ultrases destekli seyreltik asit ön işlemi**

Ultrases destekli seyreltilmiş asit ön işlemi, asidik ön işleme kıyasla kullanılan asit miktarını azaltırken, daha düşük asit konsantrasyonu ile daha yüksek fermantasyon verimli şeker elde edilmesini sağlar (Kunaver vd. 2012). Bu yöntem, fermantasyona tabii tutulacak şeker verimini artırmanın yanı sıra detoksifikasyon aşamasına duyulan ihtiyacı da ortadan kaldırmaktadır (A. Ranjan, vd. 2016).

Ultrasonik uygulama sırasında oluşan kavitasyon etkisi, biyokütlenin fiziksel ve kimyasal yapısında değişikliklere neden olarak hidroliz verimliliğini artırabilmektedir. Kavitasyon sonucu sulu ortamda lokal olarak yüksek sıcaklık ve basınç oluşmakta; bu durum lignin ile hemiselüloz arasındaki bağların kırılmasını hızlandıran serbest radikallerin oluşumunu teşvik etmektedir (Ashokkumar, 2011).

Ultrases destekli asidik ön işlem, biyokütledeki hemiselüloz fraksiyonunun daha etkin bir şekilde çözünmesini sağlarken, lignin yapısının bozulmasına da katkıda bulunmaktadır (Luo vd. 2014). Bu kombinasyonun başlıca avantajları; asidik reaktif tüketiminin azaltılması, işlem süresinin kısaltılması ve daha düşük sıcaklıklarda yüksek verim elde edilmesi olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, ultrasonun sağladığı mekanik etkiler sayesinde biyokütlenin yüzey alanı artmakta ve enzimlerin biyokütleyle etkili bir şekilde erişimi kolaylaşmaktadır (Cho vd. 2011).

Ultrason, ultrasonik banyo ve ultrasonik prob olmak üzere iki farklı sistemle uygulanmaktadır. Ultrasonik banyolar ise genellikle çözeltilerdeki çözünmüş havanın uzaklaştırılması veya küçük cam malzemelerin temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ultrasonik banyolar; kimyasal reaksiyonların tekrarlanabilirliği çok az olduğu ve aktarılan enerjinin yoğunluğu düşük olduğu için gıda işleme akışlarında çok az kullanılmaktadır (Wen C, vd. 2018). Bir diğer yöntem ise, ultrasonun ultrasonik probalar

aracılığıyla uygulanmasıdır. Bu yöntemde prob, örneğin içine daldırıldığı için ultrasonik yoğunluk daha küçük bir yüzeye (sadece prob ucuna) aktarılmaktadır. Bu yöntem, ultrasonik banyolara göre daha etkili olup, küçük hacimli üretimlerde kullanılmaktadır (Chemat F. vd. 2011).

## **2.9 Ön İşlem Sonrası Hemiselülozik Hidrolizatların İnhibitörlerden Uzaklaştırılması Amacıyla Yapılan İşlemler**

Lignoselülozik biyokütleyle uygulanan seyreltik asit hidrolizi sırasında furfural, hidroksimetilfurfural (HMF), asetik asit ve fenolik türevler gibi çeşitli inhibitör bileşikler açığa çıkmakta ve bu bileşiklerin varlığı hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanılmasını güçleştirmektedir (Rao vd. 2016; Gupta ve Shukla 2017). Bu maddelerin türü ve miktarı, kullanılan hammaddeye, asit derişimine, hidrolizasyon sıcaklığına ve işlem süresine göre önemli ölçüde değişiklik göstermektedir.

Rafıqul vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, hemiselülozik hidrolizatlardaki inhibitör bileşenlerin *Candida tropicalis* IFO 0618 suşunda ksilitol üretimi için kritik öneme sahip olan ksiloz redüktaz (KR) enzimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Hidroliz sırasında pentozların ve heksozların parçalanmasıyla sırasıyla furfural ve HMF oluşmakta; daha şiddetli hidroliz koşullarında bu bileşikler levulinik ve formik aside dönüşebilmektedir (Ur-Rehman vd. 2015; Rao vd. 2016). Ayrıca hemiselülozdaki asetil gruplarının hidrolizi sonucu ortamda asetik asit birikirken, ligninin parçalanması 4-hidroksibenzaldehit, vanilin, ferulik asit ve siringaldehit gibi fenolik bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır (Jönsson ve Martín 2016).

Bu inhibitörlerin etkisi, fermantasyon ortamının pH'sı, çözünmüş oksijen seviyesi ve kullanılan mikroorganizmanın tolerans kapasitesine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, furfural ve HMF'nin *Scheffersomyces stipitis* ve *S. cerevisiae* üzerinde hücre bölünmesini engellediği ve 0.5–2 g/L aralığındaki furfural derişimlerinde büyümenin %25–99 oranında baskılandığı rapor edilmiştir (Chandel vd. 2013; Rao vd. 2016). Asetik asit ise, düşük pH koşullarında hücre içerisine difüze olarak iyonlaşmakta, hücre içi pH'yı düşürerek metabolik aktiviteleri inhibe etmektedir (Çam ve Yıldırım 2018). Fenolik

bileşikler ise, hücre membranının geçirgenliğini bozarak ksilitol üretimini olumsuz etkilemektedir; nitekim *C. guilliermondii* ile yapılan çalışmalarda 0.1 g/L gibi düşük fenolik seviyelerinde bile üretimin baskılandığı belirtilmiştir (Chandel vd. 2013).

Bu nedenle hemiselülozik hidrolizatların detoksifikasyonu, ksilitol fermantasyonundaki en kritik basamaklardan biridir. Literatürde aktif kömür adsorpsiyonu (Pereira vd. 2011), pH ayarlaması ve kireçleme (Mohagheghi vd. 2006), iyon değişim reçineleri (Kumar vd. 2018) gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak detoksifikasyon, çoğu zaman işlem maliyetini artırmakta ve şeker kayıplarına neden olarak fermentatif verimi azaltabilmektedir (Ur-Rehman vd. 2015; Vallejos vd. 2016). Bu nedenle son yıllarda inhibitörlere dirençli mikroorganizmaların kullanımı odak noktası hâline gelmiştir.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Antep fıstığı kabuklarının ön işlem için hazırlanması

Yapılan çalışmada lignoselülozik hammadde olarak kullanılan Antep fıstığı kabukları, Gaziantep ili Nizip ilçesinde bulunan yerel bir üreticiden temin edilmiştir. Kullanılan Antep fıstığı iç kabukları üretim sırasında atık olarak çıkmaktadır. Antep fıstığı iç kabuk örnekleri, 45 °C'lik inkübatörde nem oranı % 10'un altına düşünceye kadar kurutulmuş ve daha sonra yaklaşık 2.5 mm partikül boyutunda (elek açıklığı: 0.097 inç) olacak şekilde değirmende (APEX Communiting Mill, Model 314) öğütülmüştür. 2.5 mm partikül boyutunda olacak şekilde öğütülmüş antep fıstığı iç kabuk örnekleri, değirmende (Perten Laboratory Mill, Model 3303) ikinci bir öğütme işleminden geçirildikten sonra, yaklaşık 500 µm gözenek çapına sahip elekler yardımıyla elenmiş ve böylece belirli bir partikül boyutuna sahip biyokütle örnekleri ön işlem için uygun hale getirilmiştir (Şekil 3.1). Biyokütlenin % nem içeriği, otomatik infrared nem tayin cihazı ile % 4.37 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Öğütülmüş Antep fıstığı iç kabuğu örnekleri (partikül büyüklükleri sırasıyla: ~2.5 mm ve ~500 µm)

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Biyokütle bileşiminin belirlenmesi

Biyokütlenin bileşimi, NREL (National Renewable Energy Laboratory) LAP standart analitik yöntemlerine dayanarak belirlenmiştir (Sluiter vd. 2005; Sluiter vd. 2008). Bu bağlamda, glukana, ksilana, arabinana, mannan, galaktana, asitte çözünmeyen lignin ve asitte çözünmeyen lignin analizleri gerçekleştirilmiş ve tüm bileşim analizleri üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Selüloz (glukana) ve hemiselüloz (ksilana, arabinana, galaktana ve mannan) içeriklerinin belirlenmesinde, NREL LAP standart metodlarına göre monosakkarit analizleri genellikle HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak bu çalışmada, bileşim analizi sonrasında elde edilen ve 0.45 µm PES (polieter sülfon) filtreden geçirilen sıvı örneklerin monosakkarit içerikleri, iyon kromatografisi sistemi (HPAEC-PAD; Dionex ICS-6000, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak yüksek hassasiyetle belirlenmiştir. Glikoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve galaktoz şekerlerinin ayrılması, 30 °C’de CarboPac PA200 (Thermo Scientific, ABD) kolonunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak, 0.35 mL/dakika akış hızında 2 mM sodyum hidroksit (0.5 bar azot basıncı altında) kullanılarak izokratik koşullarda işlem yapılmış ve örneklerdeki monosakkarit miktarları (mg/L) standart eğrilerle belirlenmiştir. Enjeksiyon öncesinde, CarboPac PA200 kolonunda analiz edilecek örnekler, CaCO<sub>3</sub> ile pH 5-6 seviyesine nötralize edilmiş ve 1 gece boyunca +4 °C’de bekletildikten sonra filtre edilip HPAEC-PAD cihazına enjekte edilmiştir. Tüm örnekler, iyon kromatografi analizleri öncesinde 0.2 µm’lik filtreler kullanılarak filtre edilmiştir. İyon değişim kromatografisinden elde edilen standart monosakkarit kromatogramı örneği ve monosakkaritlerin standart eğrileri EK 1’de verilmiştir. Asitte çözünmeyen lignin, ağırlıkça tayin edilmiştir, asitte çözünmeyen lignin ise Shimadzu UV-1208 marka UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 320 nm’de ölçülmüştür.

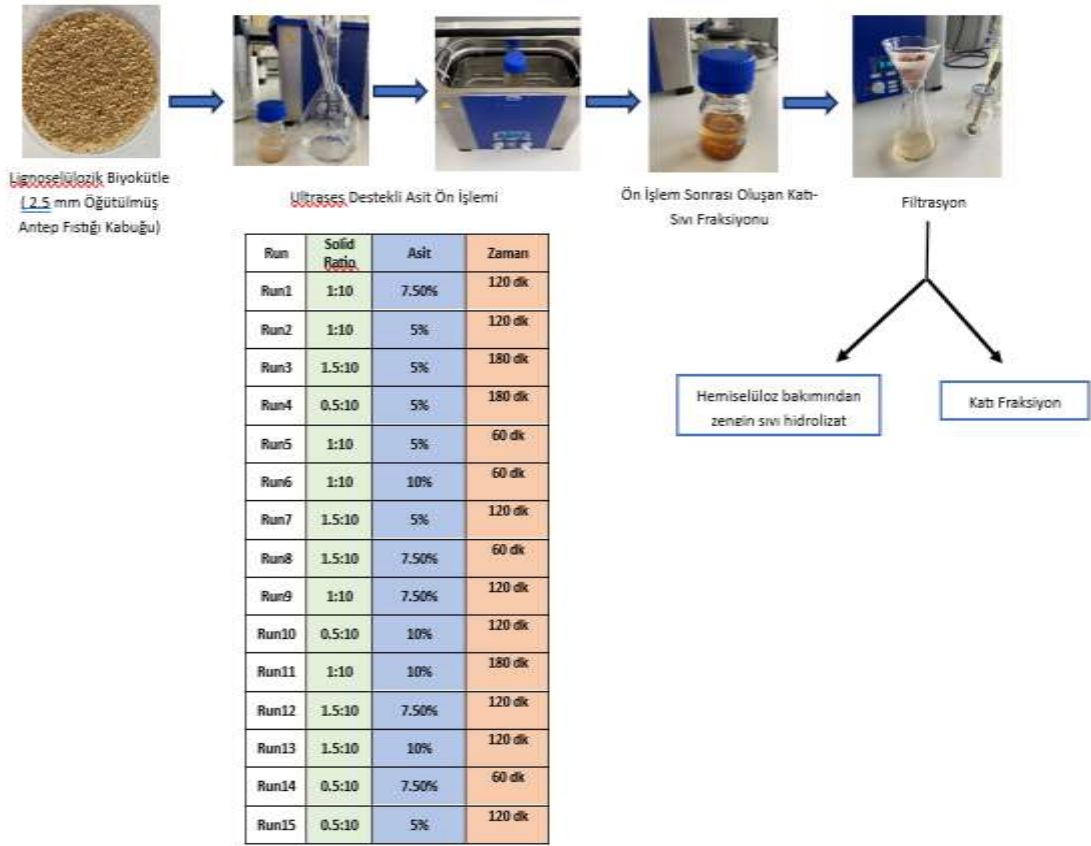
### 3.2.2 Ultrases destekli asit ön işlemi

Ultrases destekli asit ön işlemi, ELMASONIC P Ultrasonic Cleaning Unit marka ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Ön işlem sırasında sıcaklık

kontrolü, cihaz aracılığıyla sağlanmıştır. Öğütülen hammadde örnekleri %5, %7.5 ve %10  $H_2SO_4$  ile karıştırılarak katı-sıvı oranı 0.5:10, 1:10 1.5:10 (g/mL) olarak ayarlanmıştır. Sabit sıcaklıkta (80 °C), farklı sürelerde (1, 2 ve 3 saat) gerçekleştirilen ön işlem uygulamaları, ultrason frekansı 80 kHz ve ultrason gücü %100 olacak şekilde yürütülmüştür. Ön işlem koşulları, literatürde belirtilen parametrelere uygun şekilde seçilmekle birlikte, yapılan ön denemelerle, ultrases destekli asit ön işlemi için belirlenen bağımsız değişken aralıklarının uygunluğu test edildikten sonra asıl deneylere geçilmiştir. Ön işlem tamamlandıktan sonra, örnekler buzlu suda 20 dk sürede oda sıcaklığına getirilmiştir. Ön işleme tabi tutulmuş katı kısmı ayırmak için, çözelti kaba filtre kâğıdı ile süzölmüştür. Elde edilen katı kısım, 500 mL saf su ile yıkanarak kalıntı çözücünün uzaklaşması sağlanmıştır. Yıkama aşamasının ardından, örnekler 45 °C’de 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulan katı örnekler tartılarak not edilmiş ve ilk başta kullanılan hammadde miktarına oranlanarak geri kazanılan katı biyokütle miktarı (% solid recovery) yüzdesel olarak hesaplanmıştır. Filtrasyon işlemi sonrasında elde edilen hemiselülozca zengin sıvı kısım (hidrolizat), monosakkarit, toplam fenolik madde, HMF ve furfural analizlerine tabi tutulmuştur (Şekil 3.3). Tüm ön işlem denemeleri, iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 ELMASONIC P Ultrasonic Cleaning Unit



Şekil 3.3 Ultrases destekli asit ön işleme akış şeması

Konvansiyonel Ön İşlem (Asit hidrolizi): Biyokütle, literatür çalışmaları baz alınarak asit (%2.5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ile katı sıvı oranı 1:10 (g/mL) olacak şekilde konvansiyonel olarak 120 °C’de 1 saat ön-işleme tabi tutulmuştur (Miura vd. 2015; Dalli vd. 2017).

### 3.2.3 Ön işlem sonrası elde edilen sıvı fraksiyon analizleri

Ultrases destekli asit ile yapılan ön işlem sonrasında iki ana fraksiyon elde edilmiştir:

**Çözünen sıvı kısım (hidrolizat)**: Bu fraksiyon, ksiloz, glikoz ve diğer şekerler (arabinoz, galaktoz ve mannoz) içermektedir. Şekerlerin miktarları, reaksiyon koşullarına ve biyokütle tipine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.



Şekil 3.4 Ön İşlem sonrası sıvı fraksiyon

**Çözünmeyen katı kısım:** Bu fraksiyon, lignin ve selüloz gibi bileşenleri içermektedir



Şekil 3.5 Ön işlem sonrası katı fraksiyon

#### 3.2.4 Şeker analizleri (Monosakkaritler)

Ön işlem sonrasında elde edilen sıvı fraksiyonunda bulunan monosakkaritler (glikoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz) “Bölüm 3.2.1” de detaylı bir şekilde anlatıldığı üzere, iyon kromatografisi cihazı (HPAEC-PAD; Dionex ICS-6000 system, Thermo Scientific, ABD) ile hassas bir şekilde belirlenmiştir.

#### 3.2.5 Toplam fenolik madde analizi

Sıvı fraksiyonun toplam fenolik bileşik miktarı, Singleton ve Rossi, (1965) tarafından geliştirilen metodun, modifiye edilmiş haline göre yapılmıştır. 1 mL uygun şekilde

seyreltilmiş örnek, 5 mL 2N Folin-Ciocalteu ayracı (1:10 v/v) ile bir tüpte karıştırılmış ve 3-4 dakika sonra üzerine 4 mL sodyum karbonat çözeltisi ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - %7.5) eklenmiştir. Tüp vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin spektrofotometre ile 765 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Gallik asit referans madde olarak kullanılmıştır ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde şeklinde verilmiştir. Gallik asit standardına ait konsantrasyon eğrisi EK 2’de verilmiştir.

### 3.2.6 HMF ve furfural analizleri

Furfural ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF) analizleri, Li vd. (2017) tarafından önerilen yöntemle göre yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC; Agilent 1260 Infinity) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Analiz için C18 kolon (Inertsil ODS-3) kullanılmıştır. Mobil faz olarak su ve %20 metanol (v/v) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 0.8 mL/dakika olarak belirlenmiş olup, kolon sıcaklığı 35 °C’de sabit tutulmuştur. 277 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Mobil fazın degazlanması, analiz öncesinde 15 dakika süreyle ultrasonik cihazla gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin tanımlanması, standartların alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. HMF ve furfural standart eğrileri, EK 3’te verilmiştir.

### 3.2.7 Ön işlem sonrası elde edilen katı fraksiyon analizleri

Ön işlem sonrasında uygulanan kaba filtrasyon işlemi ile elde edilen katı kısım (işlenmiş biyokütle), yaklaşık 500 mL saf su ile yıkanmıştır. Yıkanan katı örnekler, 45 °C’de etüvde bir gece süreyle kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrasında, örnekler tartılmış ve katı geri kazanım verimi, ön işlem sonrası elde edilen biyokütlenin ağırlığı ile ön işleme tabi tutulan biyokütlenin başlangıçtaki ağırlığına göre hesaplanmıştır.

Katı geri kazanım verimi (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Katı geri kazanım verimi (\%)} = (\text{Ön işlem sonrası katı kütlesi} / \text{Başlangıç katı kütlesi}) \times 100$$

Ön işleme tabi tutulan biyokütlenin (katı fraksiyon) bileşimi, Bölüm 3.2.1’de ayrıntılı olarak açıklanan NREL (National Renewable Energy Laboratory) LAP standart analitik metotları ile belirlenmiştir (Sluiter vd. 2005; Sluiter ve Sluiter, 2008). Bu analizler kapsamında, glukan, ksilan, asitte çözünen lignin ve asitte çözünmeyen lignin analizleri gerçekleştirilmiş olup, tüm bileşim analizleri üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

### 3.2.8 Ön işlem koşullarının optimizasyonu

Ön işlem sonrasında elde edilen sıvı fraksiyondaki ksiloz konsantrasyonu (mg/L) ve sıvı fraksiyondaki fenolik madde konsantrasyonu göz önünde bulundurularak, ön işlem parametreleri (ön işlem süresi ( $X_1$ ), asit konsantrasyonu ( $X_2$ ), katı:çözücü oranı ( $X_3$ )) Response Surface Methodology (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon sürecinde ksiloz konsantrasyonun maksimize edilmesi hedeflenirken, sıvı fraksiyonda bulunan toplam fenolik madde (TPC) miktarının minimize edilmesi hedeflenmiştir. Bu optimizasyon sürecinde kullanılan bağımlı ve bağımsız değişkenler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonda kullanılan değişkenler

| Değişkenler                                   |                                                             |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Bağımsız                                      | Bağımlı                                                     |
| Ön işlem süresi (1, 2, 3 h)                   | Ksiloz konsantrasyonu (mg/L)                                |
| Asit konsantrasyonu (% 5, 7.5, 10)            | Sıvı fraksiyonda toplam fenolik madde (mg GAE/g kuru madde) |
| Katı:çözücü oranı (0.5:10, 1:10, 1.5:10 g/ml) |                                                             |

Çizelge 3.2 Optimizasyon için kullanılan Box–Behnken deneme deseni

| Deney no. | Kodlanmış Bağımsız Değişkenler |                    |                       | Kodlanmamış Bağımsız Değişkenler |                    |                       |
|-----------|--------------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------|
|           | X <sub>1</sub> (h)             | X <sub>2</sub> (%) | X <sub>3</sub> (g:mL) | X <sub>1</sub> (h)               | X <sub>2</sub> (%) | X <sub>3</sub> (g:mL) |
| 1         | 0                              | 0                  | 0                     | 2                                | 7.5                | 1:10                  |
| 2         | 1                              | -1                 | 0                     | 3                                | 5                  | 1:10                  |
| 3         | 1                              | 0                  | 1                     | 3                                | 7.5                | 1.5:10                |
| 4         | 0                              | 0                  | -1                    | 2                                | 7.5                | 0.5:10                |
| 5         | -1                             | -1                 | 0                     | 1                                | 5                  | 1:10                  |
| 6         | 0                              | 1                  | 0                     | 2                                | 10                 | 1:10                  |
| 7         | 0                              | -1                 | 1                     | 2                                | 5                  | 1.5:10                |
| 8         | -1                             | 0                  | 1                     | 1                                | 7.5                | 1.5:10                |
| 9         | 1                              | 0                  | -1                    | 3                                | 7.5                | 0.5:10                |
| 10        | 0                              | 0                  | 0                     | 2                                | 7.5                | 1:10                  |
| 11        | 1                              | 1                  | 0                     | 3                                | 10                 | 1:10                  |
| 12        | 0                              | 1                  | 1                     | 2                                | 10                 | 1.5:10                |
| 13        | -1                             | 0                  | -1                    | 1                                | 7.5                | 0.5:10                |
| 14        | 0                              | -1                 | -1                    | 2                                | 5                  | 0.5:10                |
| 15        | 0                              | 0                  | -1                    | 2                                | 7.5                | 0.5:10                |

X<sub>1</sub>: Ön işlem süresi (h), X<sub>2</sub>: Asit konsantrasyonu (%), X<sub>3</sub>: Katı:çözücü oranı (g:mL)

### 3.2.9 Ön İşlem sonrası elde edilen hidrolizatın hemiselülozik detoksifikasyonu ve ksilitol fermentasyonu

Optimum koşullarda ön işleme tabi tutulan hidrolizat, literatürde sınırlı sayıda çalışmada rapor edilen *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728 maya suşu kullanılarak ksilitol fermentasyonunda değerlendirilmiştir. Bu amaçla, ön işlemin optimizasyonu sonrası elde edilen hidrolizat, CaCO<sub>3</sub> ile nötralize edilerek pH değeri 6.0'ya ayarlanmıştır. Oluşan çökelti 15.500 rpm'de 15 dakika santrifüjleme ile ayrılmıştır. Daha sonra, ayrılan sıvı konsantre aktif kömür ile, 5 g/100 mL oranında, 30°C'de ve 200 vuru/dak çalkalama hızındaki su banyosunda 1 saat muamele edilmiştir. Kaba filtre kağıdından süzildükten sonra elde edilen berraklaştırılmış sıvı, fermentasyon öncesi filtre sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir. Hidrolizata son konsantrasyonları 4.75 g/L yeast extract, 3 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ve 0.4 g/L MgSO<sub>4</sub> olacak şekilde bileşenler ilave edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde, 30°C'de 200 rpm karıştırma hızında fermentasyon deneyleri yürütülmüştür. Fermentasyon deneyi için besiyeri hazırlığı şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Optimum koşullarda elde edilen hemiselülozik hidrolizattan 40 mL alınmış ve besin



takviyelerinin son derişimleri 4.75 g/L yeast extract, 3 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0.4 g/L MgSO<sub>4</sub> olacak şekilde gerekli bileşen çözeltileri ilave edilmiştir. Bu amaçla, besiyerine 5 mL 10 kat konsantre (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi ile 5 mL 10 kat konsantre yeast extract–MgSO<sub>4</sub> çözeltisi eklenmiş ve toplam hacim 50 mL olacak şekilde tamamlanmıştır. 10 kat konsantre (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi otoklavlanarak, 10 kat konsantre yeast extract–MgSO<sub>4</sub> çözeltisi ise filtre sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir. Kontrol olarak, hidrolizat yerine 20 g/L ksiloz (steril filtrelenmiş) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiştir. *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728'in başlangıç inokülasyon oranı, fermentasyon öncesi ölçülen optik yoğunluk (OD600) değeri 1.25 olacak şekilde standardize edilmiştir. Fermentasyon süresince belirli aralıklarla alınan örneklerde ksiloz ve ksilitol konsantrasyonları belirlenmiştir.

### **3.2.10 Ksilitol analizi**

Fermentasyon sonrasında elde edilen ksilitol miktarları, iyon kromatografisi cihazı (HPAEC-PAD; Dionex ICS-6000 System, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Ksilitol, 30 °C'de CarboPac PA100 (Thermo Scientific, ABD) kolonu ile ayrılmıştır. Mobil faz olarak, 0.25 mL/dakika akış hızında 150 mM sodyum hidroksit kullanılarak izokratik koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir (Dionex CarboPac PA100 Column Product Manual, 2013). Ksilitol standardına ait konsantrasyon eğrisi EK 4'te verilmiştir.

### **3.2.11 İstatistiksel analizler**

Yanıt yüzey metodu regresyonu ve optimizasyonu dâhil olmak üzere tüm istatistiksel analizler, Minitab istatistiksel yazılımı (Sürüm 17; Minitab Inc., State College, PA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 Antep Fıstığı Kabuğunun Ön İşlem Öncesi Kimyasal Bileşimi

Bu çalışmada analiz edilen Antep Fıstığı kabuğu lignoselülozik örneklerinin kimyasal bileşimi, NREL LAP standart analitik yöntemlerle belirlenmiş ve üç tekerrürlü analizlerle doğrulanmıştır. HPAEC-PAD yöntemi ile yapılan yüksek hassasiyetli kromatografik analizler sonucunda, glikoz (glukan), ksiloz (ksilan), arabinoz (arabinan), mannoz ve galaktoz gibi temel yapısal monosakkaritlerin miktarları kesin olarak saptanmıştır. Ayrıca, asitte çözünmeyen ve çözünür lignin içerikleri ile kül miktarları da ayrı ayrı hesaplanarak biyokütlenin genel yapısı detaylı biçimde ortaya konmuştur.

Çizelge 4.1 Ön işleme tabi tutulmamış Antep fıstığı kabuğunun bileşimi

| Bileşen                  | % Kuru Madde Cinsinden* |
|--------------------------|-------------------------|
| Glukan                   | 22.69±0.08              |
| Ksilan                   | 27.61±0.44              |
| Galaktan                 | N.D.**                  |
| Arabinan                 | N.D.**                  |
| Mannan                   | N.D.**                  |
| Asitte Çözünmeyen Lignin | 21.41±3.03              |
| Asitte Çözünen Lignin    | 2.20±0.06               |

\*Değerler, aritmetik ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

\*\* ND: Not Detected

Antep fıstığı kabuğunun ön işlem öncesi bileşimi, çizelge 4.1’de verilmiştir. Antep fıstığı kabuğunun bileşimine bakıldığında, karbohidratların toplam bileşimin yaklaşık % 50’sini oluşturduğu görülmektedir. Genel olarak, bu çalışmada kullanılan antep fıstığı kabuğu bileşim oranlarının, literatürde rapor edilen aralıklarda olduğu belirlenmiştir. Özbek vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, kuru madde bazında Antep fıstığı kabuğunun %25.15 ± 0.88 oranında selüloz (glukan cinsinden), %35.04 ± 1.12 ksilan, %8.24 ± 0.72 asetil grubu, %1.84 ± 0.12 asitte çözünür lignin ve %24.11 ± 1.29 asitte çözünmeyen

lignin içerdiği bildirilmiştir. Ayrıca, bizim çalışmamıza benzer şekilde örnekte arabınan tespit edilemediği rapor edilmiştir.

Özbek vd. (2018) çalışmasında ise, toplam polisakkarit içeriği %59.27 olarak belirlenmiş; bunun %35.90±0.27'si ksilan, %23.37±0.17'si selüloz (glukan olarak) olarak raporlanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca %8.73±0.35 asetil grupları, %25.42±1.32 asitte çözünmeyen lignin, %1.94±0.27 asitte çözünür lignin, %0.97±0.09 protein ve %0.47±0.03 kül içerikleri belirlenmiştir. Çalışmamızda Antep fıstığı kabuğuna ait asitte çözünmeyen lignin içeriği % 21.41±3.03 olarak ölçülmüştür. Bu değer, her iki çalışmada bildirilen asitte çözünmeyen lignin oranlarından daha düşük olmakla birlikte, genel aralıkla uyumlu olduğu görülmektedir. Aynı şekilde karbonhidrat bileşimi de literatürdeki değerlerle örtüşmektedir. Bitki hücre duvarlarında lignin ve hemiselülozlar, selüloz mikrofibrillerini çevreleyerek, lignoselülozik yapının kimyasal ve biyolojik bozunmaya karşı direnç kazanmasına neden olmaktadır (Canilha vd. 2012). Lignin, aynı zamanda hücre duvarına mekanik dayanıklılık ve geçirimsizlik özelliği kazandıran önemli bir bileşendir (Pérez vd. 2002; Agbor vd. 2011). Bu polimer, lignoselülozik biyokütlerdeki farklı bileşenleri birbirine bağlayan bir “doğal yapıştırıcı” görevi görmekte olup, bu sayede biyokütlenin suda çözünmezliğini artırır. Selüloz mikrofibrilleriyle olan güçlü etkileşimleri nedeniyle lignin, lignoselülozik materyalin enzimatik ve mikrobiyal hidrolizini zorlaştıran başlıca engelleyici faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Agbor vd. 2011). Bu nedenle, çalışmada kullanılan Antep fıstığı kabuğunun düşük asitte çözünmeyen lignin içeriği, bu lignoselülozik materyalin fermentatif ksilitol üretimi açısından uygun ve değerlendirilebilir bir hammadde olduğunu ortaya koymaktadır.

#### **4.2 Ultrases Destekli Asit Ön İşlemi Koşullarının Optimizasyonu: Antep Fıstığı Kabuğu Hemiselülozik Hidrolizatında Ksiloz Verimi ve İnhibitör Oluşumunun Değerlendirilmesi**

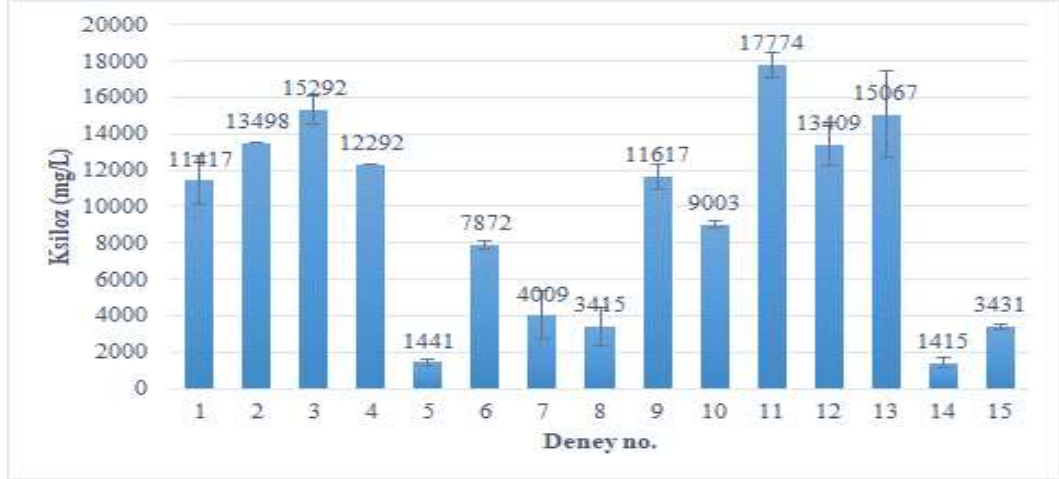
Bu çalışmada, Antep fıstığı kabuğundan elde edilen hemiselülozik hidrolizatta ksilozun maksimum konsantrasyonda açığa çıkarılmasını sağlamak ve inhibitör bileşiklerin (HMF, furfural, fenolik madde) oluşumunu minimize etmek amacıyla ultrasonik destekli asit ön işlemi optimize edilmiştir. Bu amaçla, süre, asit konsantrasyonu ve katı:çözücü oranı bağımsız değişken olarak ele alınmış ve ön işlem koşullarının lignoselülozik yapı

üzerindeki etkileri yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile değerlendirilmiştir. Deneysel tasarım Box–Behnken deneme deseni kullanılarak oluşturulmuş ve elde edilen veriler regresyon analizleri ile modellenerek en uygun ön işlem koşulları belirlenmiştir.

#### 4.2.1 Deney tasarımı ve yanıtların oluşturulması

Bu çalışmada, ön işlem koşullarının optimizasyonu amacıyla Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM) kullanılmıştır. Optimizasyon kapsamında üç bağımsız değişken olan ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranı ( $X_3$ , g:mL) ele alınmış ve bu parametrelerin hem ksiloz konsantrasyonu (mg/L) hem de inhibitör bileşik oluşumu (HMF (g/L), furfural (g/L) ve toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/g biyokütle) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla Box–Behnken deneme deseni uygulanmış ve üç faktörün üç seviyeli kombinasyonları ile toplam 15 deney koşulu oluşturulmuştur (Çizelge 3.2). Her deneyde, Antep fıstığı kabukları ultrasonik banyoda ultrases destekli asit ön işlemine tabi tutulmuş ve işlem sonucunda elde edilen sıvı fazda ilgili bileşenler analitik olarak belirlenmiştir. Böylece, proses süresi, asit yükü ve biyokütle miktarının hem hemiselülozdan ksiloz eldesi hem de inhibitör bileşik oluşumu üzerinde nasıl bir etki oluşturduğu sistematik olarak ortaya konmuştur. Elde edilen deneysel yanıtlar, ilerleyen bölümde RSM kapsamında modellenmiş ve optimum ön işlem koşulları istatistiksel olarak belirlenmiştir.

Yapılan Box–Behnken deney tasarımı kapsamında uygulanan ön işlem koşulları sonucunda elde edilen ksiloz konsantrasyonlarının değişimleri şekil 4.1’te sunulmuştur. Aynı ön işlem koşulları altında sıvı fazda oluşan HMF ve furfural konsantrasyonları ise, çizelge 4.2’de verilmiş olup, toplam fenolik madde içerikleri şekil 4.2’de gösterilmiştir. Böylece, süre, asit konsantrasyonu ve katı:çözücü oranının hem ksiloz verimi hem de inhibitör bileşik oluşumu üzerindeki etkileri birlikte değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarından elde edilen sıvı fazın ksiloz konsantrasyonları (mg/L)

Şekil 4.1’deki veriler değerlendirildiğinde, ön işlem parametrelerinin (süre, asit konsantrasyonu ve katı:çözücü oranı) ksiloz konsantrasyonu üzerindeki etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Box–Behnken tasarımı kapsamında yürütülen 15 deney sonucunda ksiloz konsantrasyonları yaklaşık 1.4 g/L ile 17.8 g/L arasında değişim göstermiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda, 3 saat işlem süresi, %10 asit konsantrasyonu ve 1:10 katı:çözücü oranı ile gerçekleştirilen Deney 11 koşullarında yaklaşık 17.774 mg/L ile maksimum ksiloz konsantrasyonuna ulaşılmış olup, bu parametre kombinasyonunun hemiselülozun etkin çözünmesi açısından elverişli olduğu ortaya konmuştur. Bu koşullar altında lignoselülozik yapının daha etkin parçalandığı ve hemiselülozdan ksilozun daha yüksek oranda açığa çıktığı gözlenmiştir. Katı:çözücü oranının 1.5:10 olduğu koşullarda (örneğin Deney 3 ve Deney 13), çözeltide elde edilen ksiloz konsantrasyonlarının  $\approx 15$ –15.3 g/L seviyelerine ulaştığı görülmektedir. Bu sonuç, çözelti içerisindeki katı yükünün artırılmasının, hemiselülozik yapının asit ve ultrasonik etkilere daha fazla maruz kalmasına olanak sağlayarak ksilozun sıvı fazda daha yüksek konsantrasyonlarda birikmesine katkı sağladığını göstermektedir. Ancak, bazı deneylerde katı yükünün artmasına rağmen ksiloz konsantrasyonunun sınırlı kaldığı gözlenmiş olup, bu durum yüksek katı yüklerinde karışım viskozitesinin artması ve kütle transferi sınırlamalarının devreye girmesiyle ilişkilendirilebilir. Buna karşılık, düşük işlem süresi (1 saat) ve düşük asit konsantrasyonu (%5) uygulanan deneylerde (örneğin Deney 5 ve Deney 14), ksiloz konsantrasyonlarının 1.4–3.4 g/L aralığında kaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular,

hemiselülozik yapının etkin bir şekilde hidrolize edilebilmesi için yeterli süre ve asit yükünün gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Genel olarak değerlendirildiğinde, ksiloz konsantrasyonunun artırılmasında işlem süresi ve asit konsantrasyonunun belirleyici olduğu, katı:çözücü oranının ise bu etkiyi destekleyici veya sınırlandırıcı bir rol üstlendiği görülmektedir. Bu nedenle, ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi amacıyla ön işlem parametrelerinin dengeli bir şekilde optimize edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, lignoselülozik hammaddelerden şeker eldesi için en çok tercih edilen ön işlem yöntemi asit ön işlem yöntemi olduğu tespit edilmiştir. Lignoselülozik biyokütlelerin asit ön işlemi, yapıda bulunan hemiselülozu uzaklaştırarak, biyokütle yapısını geçirgen hale getirip, enzimlerin selüloza ulaşmasını kolaylaştırmaktır (Veluchamy, Kalamdhad vd. 2018). Asidik ön işlem yönteminde en çok tercih edilen asitler, sülfirik asit, asetik asit, ve fosforik asittir (Rezania vd. 2020).

Box–Behnken tasarımı kapsamında yürütülen 15 deney sonucunda elde edilen ksiloz verimi (%) aşağıda belirtilen eşitlik ile hesaplanmıştır:

$$\text{Ksiloz verimi (\%)} = \frac{C_{xyl}}{1.136 \times m_{xln} \times C_{shell}} \times 100$$

$C_{xyl}$ : Ön işlem sonrası elde edilen hidrolizattaki ksiloz konsantrasyonu (g/L)

$m_{xln}$ : Antep fıstığı kabuğunun ksilan içeriği (g ksilan/g biyokütle)

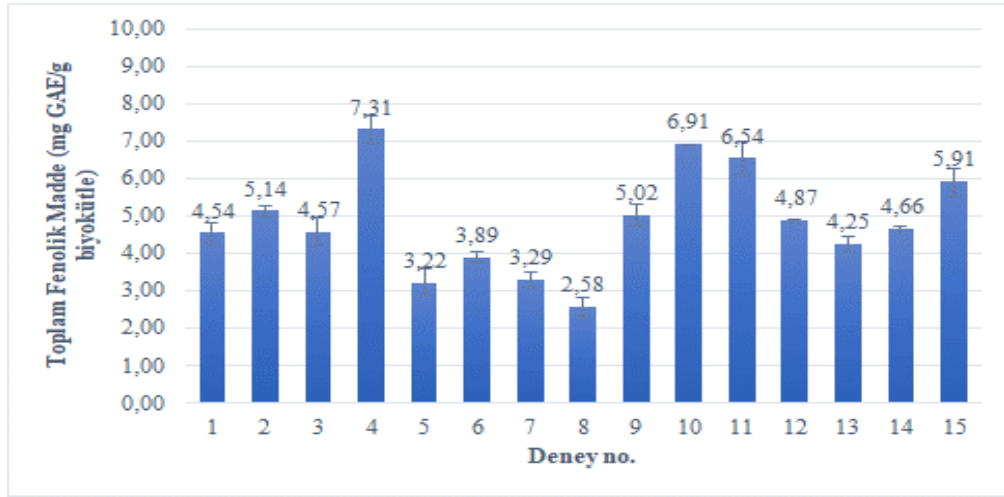
$C_{shell}$ : Ön işlemde kullanılan biyokütlenin başlangıç derişimi (g/L)

Box–Behnken deney tasarımı kapsamında yürütülen ön işlem çalışmaları sonucunda, her bir deney için hesaplanan ksiloz verimleri sırasıyla Deney 1’de %36.39, Deney 2’de %43.02, Deney 3’te %32.49, Deney 4’te %78.36, Deney 5’te %4.59, Deney 6’da %25.09, Deney 7’de %8.52, Deney 8’de %7.26, Deney 9’da %37.03, Deney 10’da %57.39, Deney 11’de %56.65, Deney 12’de %42.74, Deney 13’te %32.01, Deney 14’te %9.02 ve Deney 15’te %21.87 olarak belirlenmiştir. Elde edilen ksiloz verimleri genel olarak

değerlendirildiğinde, işlem süresi ve katı:çözücü oranının ksiloz verimi üzerinde belirleyici olduğu görülmektedir. Özellikle 3 saat işlem süresi ve düşük katı yükü (0.5:10) uygulanan koşullarda (Deney 4) ksiloz veriminin %78.36 ile en yüksek değere ulaştığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, orta–yüksek asit konsantrasyonu (%10) ve düşük katı:çözücü oranı (0.5:10) kullanılan Deney 10’da da ksiloz veriminin %57.39 seviyesine çıktığı gözlenmiştir. Buna karşılık, kısa işlem süresi (1 saat) ve yüksek katı yükü (1.5:10) uygulanan deneylerde (Deney 7 ve Deney 8) ksiloz verimlerinin %7–9 aralığında kaldığı belirlenmiştir. Orta düzey katı:çözücü oranının (1:10) kullanıldığı deneylerde ise ksiloz verimlerinin genellikle %36–43 aralığında daha dengeli bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Ksiloz konsantrasyonu ile ksiloz verimi arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda pozitif ve orta–yüksek düzeyde bir ilişki ( $r = 0.7353$ ) belirlenmiş olup, bu durum çözeltide ksiloz konsantrasyonu arttıkça ksiloz veriminin de genel olarak artma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Ancak korelasyon katsayısının 1’e eşit olmaması, ksiloz veriminin yalnızca çözeltide ölçülen ksiloz konsantrasyonuna değil, aynı zamanda başlangıçtaki katı yükü ve biyokütlenin ksilan içeriğine de bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, yüksek ksiloz verimi elde edilebilmesi için katı yükü ve işlem süresinin birlikte optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Hazal vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Antep fıstığı sert kabuğunun mikrodalga–CO<sub>2</sub> destekli hidrolizi ile ksiloza dönüştürülmesi incelenmiş ve en yüksek ksiloz veriminin %56,52 olarak 200 °C sıcaklık, 20 dk işlem süresi ve 20 mL/g su:fıstık kabuğu oranında elde edildiği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, sıcaklık ve işlem süresinin artışıyla ksiloz veriminin belirli bir seviyeye kadar yükseldiği, ancak daha şiddetli koşullarda ksilozun furfural ve HMF gibi bozunma ürünlerine dönüşmesinin hızlandığı vurgulanmıştır. Mevcut çalışmada ise ultrases destekli asit ön işlem kullanılarak yürütülen Box–Behnken deneyleri sonucunda ksiloz veriminin %4,59 ile %78,36 arasında değiştiği belirlenmiştir. Özellikle uzun işlem süreleri ve düşük katı:çözücü oranlarının uygulandığı bazı koşullarda, literatürde bildirilen maksimum değerlere yakın veya daha yüksek ksiloz verimlerine ulaşılabildiği görülmüştür. Bu durum, ultrasonik etkinin lignoselülozik yapının parçalanmasını kolaylaştırarak hemiselülozun hidrolizine katkı sağladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, iki çalışmada kullanılan ön işlem yöntemleri, proses koşulları ve enerji girdileri farklı

olduğundan, elde edilen sonuçların doğrudan karşılaştırılması sınırlıdır. Ancak genel olarak değerlendirildiğinde, ultrases destekli asit ön işleminin, uygun koşullar altında, mikrodalga-CO<sub>2</sub> destekli hidrolize benzer düzeyde ksiloz verimleri elde edilebilen alternatif bir yaklaşım sunduğu söylenebilir.



Şekil 4.2 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarından elde edilen sıvı fazın toplam fenolik madde konsantrasyonları (mg GAE/g biyokütle)

Antep fıstığı kabuklarına uygulanan farklı asitli ön işlemlerin ardından ultrasonik ekstraksiyonla elde edilen toplam fenolik madde konsantrasyonları (mg GAE/g biyokütle) 2.58 ile 7.31 arasında değişmektedir (Şekil 4.2).

Tez çalışmasının ana hedeflerinden biri, lignoselülozik bir atık olan Antep fıstığı kabuğunun daha önce uygulanmamış bir yöntem olan ultrason destekli asit ön işlemi ile değerlendirilmesidir. Bu yaklaşım sayesinde, düşük seviyede inhibitör madde (özellikle HMF ve fenolik bileşikler) oluşumu ile yüksek verimde ksiloz eldesi hedeflenmektedir. Elde edilen ksiloz, ksilitol üretimi için seçilmiş spesifik bir maya suşu ile fermente edilerek yüksek verimde ksilitole dönüştürülecektir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, Farrokhi vd. (2025) antep fıstığı kabuğundan toplam fenolik madde elde etmek amacıyla geleneksel maserasyon (CNE), ohmik ısıtma destekli ekstraksiyon (OHE) ve soğuk plazma destekli ekstraksiyon (CAP) gibi üç farklı ön işlem



yöntemi uygulanmıştır. Bu üç farklı yöntemde de 18 gram antep fıstığı kabuğu 360 ml %50 etanol-su çözeltisi ile ön işleme tabii tutulmuştur. Ohmik ısıtma ile yapılan ön işlem yöntemi sonucunda, 10.874 mg/kg GAE en yüksek toplam fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Ayrıca, elde edilen ekstraktların fenolik bileşik içerikleri LC-DAD-ESI-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiş ve galik asit, kateşin, rutin, kuersetin gibi antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklerin özellikle OHE yöntemiyle daha yüksek oranda ekstrakte edildiği belirlenmiştir (Farrokhi vd. 2025).

Azadedel vd. (2020) tarafından *Pistacia vera* L. türüne ait Ohadi ve Kallehghuchi alt grup antep fıstığı kabukları kullanılarak toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan madde aktiviteleri analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada ön işlem yöntemi olarak ultrasonik ekstraksiyon ve maserasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemlerde asetat, metanol, su ve etanol çözücülerini kullanılmıştır. Ultrasonik yöntemle elde edilen ekstrakta; en yüksek fenolik içeriği Ohadi türü ve asetat çözücüsü kombinasyonunda  $17.4 \pm 0.04$  mg GAE/g kuru madde, en düşük değer ise Kallehghuchi kùltürü ve metanol çözücüsünde  $16.26 \pm 0.04$  mg GAE/g kuru madde olarak raporlanmıştır. Yapılan çalışmada maserasyon yöntemi verimi incelendiğinde, en yüksek fenolik içerik, Kallehghuchi kùltürü ve asetat çözücüsünde  $17.26 \pm 0.1$  mg GAE/g kuru madde, en düşük değer ise Ohadi kùltürü ve su çözücüsünde  $16.35 \pm 0.15$  mg GAE/g kuru madde olarak ölçülmüştür. Özetle, elde edilen değerler antep fıstığı kabuğunun zengin fenolik bileşik içerdii ve doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Azadedel vd. 2021).

Furfural ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF) analizleri, Li vd. (2017) tarafından bildirilen yöntemle göre yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde C18 kolon kullanılmış, bileşiklerin tanımlanması ise standartların alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Farklı ön işlem koşullarında elde edilen sıvı fraksiyonlara ait HMF ve furfural konsantrasyonları Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarından elde edilen sıvı fazın HMF ve furfural konsantrasyonları (g/L)

| Deney no. | HMF (g/L)     | Furfural (g/L) |
|-----------|---------------|----------------|
| 1         | 0.0041±0.0011 | 0.0144±0.0048  |
| 2         | 0.0051±0.0000 | 0.0169±0.0016  |
| 3         | 0.0075±0.0008 | 0.0204±0.0031  |
| 4         | 0.0061±0.0014 | 0.0323±0.0002  |
| 5         | 0.0003±0.0006 | 0.0012±0.0002  |
| 6         | 0.0027±0.0002 | 0.0078±0.0008  |
| 7         | 0.0026±0.0006 | 0.0024±0.0011  |
| 8         | 0.0019±0.0005 | 0.0022±0.0001  |
| 9         | 0.0054±0.0012 | 0.0191±0.0004  |
| 10        | 0.0021±0.0001 | 0.0149±0.0012  |
| 11        | 0.0101±0.0001 | 0.0634±0.0004  |
| 12        | 0.0056±0.0003 | 0.0176±0.0019  |
| 13        | 0.0109±0.0009 | 0.0374±0.0014  |
| 14        | 0.0018±0.0002 | 0.0011±0.0000  |
| 15        | 0.0004±0.0003 | 0.0024±0.0002  |

Ön işlem sürecinde açığa çıkan heksoz ve pentozların parçalanma ürünleri olan 5-hidroksimetilfurfural (HMF) ve furfural, zayıf organik asitler ile ligninin parçalanması sonucunda oluşan fenolik bileşiklerin, enzimler ve mayalar üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği bilinmektedir (Erdei vd. 2010). Seyreltik asit ile hidroliz işlemi, ucuz, kolay ve verimli olmasına rağmen, sıcaklık ve asitlerin etkisiyle istenmeyen bileşiklerin, özellikle furfural ve HMF'nin oluşması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu bileşikler, biyokütlenin parçalanma süreçlerini olumsuz yönde etkileyebilir ve mikroorganizmaların gelişimini engelleyebilir.

Çizelge 4.2’de verilen sonuçlara göre, ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda gerçekleştirilen asit ön işlemi sonrasında sıvı fazda belirlenen HMF ve furfural konsantrasyonlarının genel olarak düşük seviyelerde kaldığı gözlemlenmiştir. Literatürde, HMF ve furfural gibi parçalanma ürünlerinin hem enzimatik hidroliz

verimini azaltabildiği hem de maya gelişimi üzerinde baskılayıcı etki göstererek fermantasyon süreçlerini olumsuz yönde etkileyebildiği bildirilmektedir. Bu nedenle, ön işlem sonrasında sıvı fraksiyonda bu bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda bulunması, ksilitol fermantasyonu açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır. Elde edilen sonuçlar, uygulanan ön işlem yönteminin inhibitör oluşumunu sınırlaması bakımından süreç verimliliğini desteklediğini ve seçilen koşulların fermantatif dönüşüm için uygun nitelikte olduğunu göstermektedir.

Box–Behnken deney tasarımı doğrultusunda gerçekleştirilen ön işlem koşulları sonucunda elde edilen ksiloz, HMF, furfural ve toplam fenolik madde sonuçları birlikte değerlendirilmiş ve yanıt değerleri Çizelge 4.3'te toplu olarak sunulmuştur. Ksiloz konsantrasyonunun ( $Y_1$ ) farklı deney koşulları arasında 1415 mg/L ile 17774 mg/L aralığında değiştiği belirlenmiştir. HMF konsantrasyonu ( $Y_2$ ) 0.0003–0.0109 g/L, furfural konsantrasyonu ( $Y_3$ ) ise 0.0011–0.0634 g/L aralığında ölçülmüştür. Toplam fenolik madde içeriği ( $Y_4$ ), 2.58–7.31 mg GAE/g biyokütle arasında değişiklik göstermiştir. Bu sonuçlar, ön işlem süresi, asit konsantrasyonu ve katı:çözücü oranının sıvı fraksiyon bileşimi üzerinde belirgin ve birbirine bağlı etkiler oluşturduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3 Box–behnken deney tasarımı kapsamında uygulanan farklı ön işlem koşullarına ait ksiloz, hmf, furfural ve toplam fenolik madde yanıt değerleri

| Deney no. | $Y_1$<br>(mg/L) | $Y_2$<br>(g/L) | $Y_3$<br>(g/L) | $Y_4$<br>(mg GAE/g<br>biyokütle) |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|----------------------------------|
| 1         | 11417           | 0,0041         | 0,0144         | 4,54                             |
| 2         | 13498           | 0,0051         | 0,0169         | 5,14                             |
| 3         | 15292           | 0,0075         | 0,0204         | 4,57                             |
| 4         | 12292           | 0,0061         | 0,0323         | 7,31                             |
| 5         | 1441            | 0,0003         | 0,0012         | 3,22                             |
| 6         | 7872            | 0,0027         | 0,0078         | 3,89                             |
| 7         | 4009            | 0,0026         | 0,0024         | 3,29                             |
| 8         | 3415            | 0,0019         | 0,0022         | 2,58                             |
| 9         | 11617           | 0,0054         | 0,0191         | 5,02                             |
| 10        | 9003            | 0,0021         | 0,0149         | 6,91                             |
| 11        | 17774           | 0,0101         | 0,0634         | 6,54                             |
| 12        | 13409           | 0,0056         | 0,0176         | 4,87                             |
| 13        | 15067           | 0,0109         | 0,0374         | 4,25                             |
| 14        | 1415            | 0,0018         | 0,0011         | 4,66                             |
| 15        | 3431            | 0,0004         | 0,0024         | 5,91                             |

$Y_1$ : Ksiloz konsantrasyonu (mg/L),  $Y_2$ : HMF konsantrasyonu (g/L),  $Y_3$ : Furfural konsantrasyonu (g/L),  $Y_4$ : Toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/g biyokütle)

#### 4.2.2 Çeşitli ön işlem parametrelerinin bağımlı değişkenler üzerine etkilerinin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmesi

##### 4.2.2.1 Ksiloz konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Ksiloz konsantrasyonu ( $Y_1$ ) üzerine; ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) etkileri, Eşitlik (4.1)'de verilen karesel (ikinci dereceden) model ile ifade edilmiştir.

$$Y_1 = -32396 + 10256 \cdot X_1 + 3374 \cdot X_2 + 18933 \cdot X_3 - 888 \cdot X_1^2 - 178 \cdot X_2^2 - 12626 \cdot X_3^2 - 216 \cdot X_1 \cdot X_2 + 500 \cdot X_1 \cdot X_3 + 1097 \cdot X_2 \cdot X_3 \dots\dots\dots (4.1)$$

Çizelge 4.4 Ksiloz konsantrasyonu (mg/L) - Model özeti

| S       | R-kare | Düzeltilmiş R-kare | Tahmini R-kare |
|---------|--------|--------------------|----------------|
| 1200.64 | 98.27% | 95.16%             | 80.29%         |

Eşitlikten türetilen modelin istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.01$ ). Modelin belirtme katsayısı  $R^2 = 98.27\%$  olup, bağımlı değişken olan ksiloz konsantrasyonundaki değişimin büyük bir kısmının model tarafından açıklandığını göstermektedir. Modelin düzeltilmiş belirtme katsayısı ( $\text{Adj. } R^2 = 95.16\%$ ) modelin gereksiz terimler içermediğini ve uyumunun yüksek olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca tahmini belirtme katsayısı ( $\text{Pred. } R^2 = 80.29\%$ ), modelin yeni deney koşullarını da kabul edilebilir düzeyde tahmin edebileceğini göstermektedir (Çizelge 4.4). Bu sonuçlar, oluşturulan matematiksel modelin hem istatistiksel olarak anlamlı, hem de ön işlem koşullarının optimizasyonunda kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.5 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) ksiloz konsantrasyonu ( $Y_1$ ) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

| Varyasyon Kaynağı   | SD | Düzeltilmiş Kareler Toplamı | Düzeltilmiş Kareler Ortalaması | F      | P     |
|---------------------|----|-----------------------------|--------------------------------|--------|-------|
| Model               | 9  | 410069661                   | 45563296                       | 31.61  | 0.001 |
| Doğrusal            | 3  | 360262513                   | 120087504                      | 83.30  | 0.000 |
| $X_1$               | 1  | 249906546                   | 249906546                      | 173.36 | 0.000 |
| $X_2$               | 1  | 93413946                    | 93413946                       | 64.80  | 0.000 |
| $X_3$               | 1  | 16942021                    | 16942021                       | 11.75  | 0.019 |
| Kare Terimleri      | 3  | 40872093                    | 13624031                       | 9.45   | 0.017 |
| $X_1 * X_1$         | 1  | 2909635                     | 2909635                        | 2.02   | 0.215 |
| $X_2 * X_2$         | 1  | 4579740                     | 4579740                        | 3.18   | 0.135 |
| $X_3 * X_3$         | 1  | 36787308                    | 36787308                       | 25.52  | 0.004 |
| Etkileşim (2-Yönlü) | 3  | 8935055                     | 2978352                        | 2.07   | 0.223 |
| $X_1 * X_2$         | 1  | 1161006                     | 1161006                        | 0.81   | 0.411 |
| $X_1 * X_3$         | 1  | 250000                      | 250000                         | 0.17   | 0.694 |
| $X_2 * X_3$         | 1  | 7524049                     | 7524049                        | 5.22   | 0.071 |
| Hata                | 5  | 7207707                     | 1441541                        |        |       |
| Uyumsuzluk          | 3  | 4801265                     | 1600422                        | 1.33   | 0.456 |
| Saf Hata            | 2  | 2406443                     | 1203221                        |        |       |
| Toplam              | 14 | 417277368                   |                                |        |       |

Ksiloz konsantrasyonu üzerine kurulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P = 0.001$ ) (Çizelge 4.5). Doğrusal terimlerin tamamının ( $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$ ) ksiloz konsantrasyonu üzerinde yüksek derecede anlamlı etki gösterdiği tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). Özellikle ön işlem süresi ( $X_1$ ), modelde en baskın etkili değişken olup, en yüksek F değeri ( $F = 173.36$ ) ile ksiloz verimi üzerinde en belirleyici işlem parametresi olarak öne çıkmıştır. Ön işlem süresini, asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı:çözücü oranı ( $X_3$ ) izlemiştir.

Karesel terimler incelendiğinde, katı:çözücü oranının karesel etkisinin ( $X_3^2$ ) anlamlı olduğu ( $P = 0.004$ ) ve bu değişkenin optimum değerden sapıldığında ksiloz verimini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Buna karşılık, süre ( $X_1^2$ ) ve asit konsantrasyonu ( $X_2^2$ ) terimlerinin karesel etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup ( $P > 0.05$ ), bu iki parametrede doğrusal etkinin baskın olduğu anlaşılmaktadır.

İkili etkileşim terimleri değerlendirildiğinde,  $X_1-X_2$ ,  $X_1-X_3$  ve  $X_2-X_3$  etkileşimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ). Bu durum, bağımsız değişkenlerin ksiloz konsantrasyonu üzerindeki etkilerinin çoğunlukla birbirinden bağımsız olduğunu ve modelde doğrusal terimlerin asıl belirleyici bileşenler olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar, ön işlem süresinin artırılmasının ve asit konsantrasyonu ile katı:çözücü oranının uygun seviyelerde seçilmesinin ksiloz verimini maksimize etmek için kritik olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2.2 HMF Konsantrasyonu Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi

HMF konsantrasyonu ( $Y_2$ ) üzerine; ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) etkileri, oluşturulan ikinci dereceden regresyon modeli ile tanımlanmaktadır (Eşitlik (4.2)).

$$Y_2 = -0,0018 + 0,00059 \cdot X_1 + 0,00001 \cdot X_2 - 0,00285 \cdot X_3 - 0,000088 \cdot X_1^2 - 0,000065 \cdot X_2^2 - 0,00258 \cdot X_3^2 + 0,000254 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,00063 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,001317 \cdot X_2 \cdot X_3 \dots\dots\dots (4.2)$$

Çizelge 4.6 HMF konsantrasyonu (g/L) - Model özeti

| S         | R-kare | Düzeltilmiş R-kare | Tahmini R-kare |
|-----------|--------|--------------------|----------------|
| 0,0016851 | 90.39% | 73.08%             | 0.00%          |

Model Özeti sonuçlarına göre;  $R^2 = 90.39\%$ , Düzeltilmiş  $R^2 = 73.08\%$  olarak bulunmuştur. Bu durum, modelin HMF varyasyonunun büyük bir kısmını açıkladığını, ancak tahmin edilebilirliğin sınırlı olduğunu göstermektedir (Pred.  $R^2 = 0.00\%$ ) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.7 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) HMF konsantrasyonu ( $Y_2$ ) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

| Varyasyon Kaynağı   | SD | Düzeltilmiş Kareler Toplamı | Düzeltilmiş Kareler Ortalaması | F     | P     |
|---------------------|----|-----------------------------|--------------------------------|-------|-------|
| Model               | 9  | 0.000133                    | 0.000015                       | 5.22  | 0.042 |
| Doğrusal            | 3  | 0.000119                    | 0.000040                       | 13.93 | 0.007 |
| $X_1$               | 1  | 0.000062                    | 0.000062                       | 21.69 | 0.006 |
| $X_2$               | 1  | 0.000038                    | 0.000038                       | 13.22 | 0.015 |
| $X_3$               | 1  | 0.000019                    | 0.000019                       | 6.87  | 0.047 |
| Kare Terimleri      | 3  | 0.000002                    | 0.000001                       | 0.24  | 0.868 |
| $X_1 * X_1$         | 1  | 0.000000                    | 0.000000                       | 0.01  | 0.924 |
| $X_2 * X_2$         | 1  | 0.000001                    | 0.000001                       | 0.21  | 0.664 |
| $X_3 * X_3$         | 1  | 0.000002                    | 0.000002                       | 0.54  | 0.495 |
| Etkileşim (2-Yönlü) | 3  | 0.000013                    | 0.000004                       | 1.51  | 0.320 |
| $X_1 * X_2$         | 1  | 0.000002                    | 0.000002                       | 0.57  | 0.485 |
| $X_1 * X_3$         | 1  | 0.000000                    | 0.000000                       | 0.14  | 0.724 |
| $X_2 * X_3$         | 1  | 0.000011                    | 0.000011                       | 3.82  | 0.108 |
| Hata                | 5  | 0.000014                    | 0.000003                       |       |       |
| Uyumsuzluk          | 3  | 0.000013                    | 0.000004                       | 6.89  | 0.129 |
| Saf Hata            | 2  | 0.000001                    | 0.000001                       |       |       |
| Toplam              | 14 | 0.000148                    |                                |       |       |

Ön işlem süresi ( $X_1$ ), asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ ) HMF konsantrasyonu ( $Y_2$ ) üzerine etkileri Çizelge 4.7’de verilen varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P = 0.042$ ), bu da modelin HMF oluşumundaki değişimleri yeterli düzeyde açıklayabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.7 incelendiğinde, doğrusal terimlerin tamamının ( $X_1$ ,  $X_2$  ve  $X_3$ ) HMF konsantrasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu görülmektedir

( $P < 0.05$ ). Özellikle ön işlem süresi ( $X_1$ ) en yüksek F değerine ( $F = 21.69$ ) sahip olup HMF oluşumu üzerinde en güçlü belirleyici parametre olarak öne çıkmaktadır. Bunu sırasıyla asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı:çözücü oranı ( $X_3$ ) izlemektedir. Bu durum, hem artan süre hem de artan asit yükünün hemiselüloz parçalanmasını hızlandırarak şeker bozunması sonucu HMF oluşumunu artırabildiğini göstermektedir.

Karesel terimlerin ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$ ) tamamının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ). Bu sonuç, HMF oluşumunun büyük ölçüde doğrusal etkiye bağlı olduğunu, yani işlem parametrelerinde artış veya azalışın HMF konsantrasyonunu daha öngörülebilir şekilde etkilediğini göstermektedir.

İkili etkileşim terimleri ( $X_1 \cdot X_2$ ,  $X_1 \cdot X_3$  ve  $X_2 \cdot X_3$ ) de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ). Bu durum, parametrelerin HMF oluşumu üzerinde birbirleriyle belirgin bir sinerjik etkisinin bulunmadığını ve her bir değişkenin HMF oluşumunu çoğunlukla bağımsız şekilde etkilediğini ortaya koymaktadır.

Genel olarak, HMF konsantrasyonunun düşük aralıkta seyretmesi (0.0003–0.0109 g/L) ön işlemden elde edilen sıvı fraksiyonun fermantasyon açısından uygun nitelikte olduğunu göstermektedir. Literatürde HMF'nin mayaların büyümesini ve ksilitol üretim hızını inhibe edebildiği bildirildiğinden, bu çalışmada düşük HMF seviyeleri, *Barnettozyma populi* ile gerçekleştirilecek ksilitol fermantasyonu için önemli bir avantaj oluşturmaktadır.

#### **4.2.2.3 Furfural konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi**

Ön işlem süresi ( $X_1$ ), asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ ) furfural konsantrasyonu ( $Y_3$ ) üzerindeki etkileri, Çizelge 4.8'de verilen varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Furfural konsantrasyonu ( $Y_3$ ) üzerine; ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) etkileri, Eşitlik 4.3'te verilen ikinci dereceden (karesel) regresyon modeli ile ifade edilmiştir.



$$Y_3 = 0,0397 - 0,0184 \cdot X_1 - 0,01411 \cdot X_2 + 0,0265 \cdot X_3 + 0,00252 \cdot X_1^2 + 0,000444 \cdot X_2^2 - 0,0221 \cdot X_3^2 + 0,00399 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,00653 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,00449 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.3)$$

Çizelge 4.8 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) furfural konsantrasyonu ( $Y_3$ ) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

| Varyasyon Kaynağı   | SD | Düzeltilmiş Kareler Toplamı | Düzeltilmiş Kareler Ortalaması | F     | P     |
|---------------------|----|-----------------------------|--------------------------------|-------|-------|
| Model               | 9  | 0.003847                    | 0.000427                       | 9.91  | 0.011 |
| Doğrusal            | 3  | 0.003101                    | 0.001034                       | 23.97 | 0.002 |
| $X_1$               | 1  | 0.001823                    | 0.001823                       | 42.27 | 0.001 |
| $X_2$               | 1  | 0.001261                    | 0.001261                       | 29.26 | 0.003 |
| $X_3$               | 1  | 0.000017                    | 0.000017                       | 0.40  | 0.555 |
| Kare Terimleri      | 3  | 0.000178                    | 0.000059                       | 1.38  | 0.351 |
| $X_1 \cdot X_1$     | 1  | 0.000024                    | 0.000024                       | 0.55  | 0.493 |
| $X_2 \cdot X_2$     | 1  | 0.000028                    | 0.000028                       | 0.66  | 0.454 |
| $X_3 \cdot X_3$     | 1  | 0.000113                    | 0.000113                       | 2.62  | 0.167 |
| Etkileşim (2-Yönlü) | 3  | 0.000567                    | 0.000189                       | 4.38  | 0.073 |
| $X_1 \cdot X_2$     | 1  | 0.000398                    | 0.000398                       | 9.24  | 0.029 |
| $X_1 \cdot X_3$     | 1  | 0.000043                    | 0.000043                       | 0.99  | 0.366 |
| $X_2 \cdot X_3$     | 1  | 0.000126                    | 0.000126                       | 2.92  | 0.148 |
| Hata                | 5  | 0.000216                    | 0.000043                       |       |       |
| Uyumsuzluk          | 3  | 0.000204                    | 0.000068                       | 11.47 | 0.081 |
| Saf Hata            | 2  | 0.000012                    | 0.000006                       |       |       |
| Toplam              | 14 | 0.004062                    |                                |       |       |

Modelin genel olarak istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P = 0.011$ ), bu da modelin furfural oluşumundaki varyasyonu iyi düzeyde açıklayabildiğini göstermektedir. ANOVA sonuçlarına göre doğrusal terimler ( $X_1$  ve  $X_2$ ) furfural konsantrasyonu üzerinde yüksek derecede anlamlı etkiler göstermiştir ( $P < 0.05$ ). Özellikle ön işlem süresi ( $X_1$ ) en yüksek F değerine ( $F = 42.27$ ) sahip olup, furfural oluşumu üzerinde en baskın işlem parametresi olarak öne çıkmaktadır. Asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) da önemli bir etki göstermiş ( $F = 29.26$ ,  $P = 0.003$ ) olup, artan asit yükünün furfural miktarını artırdığı görülmüştür. Buna karşın katı:çözücü oranı ( $X_3$ ) doğrusal terimde anlamlı bulunmamıştır ( $P = 0.555$ ), bu da bu değişkenin furfural oluşumunda doğrudan belirleyici olmadığını göstermektedir.

Karesel terimlerin tamamı ( $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$ ) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ). Bu durum, furfural oluşumunun parametrelerdeki değişime çoğunlukla doğrusal şekilde tepki verdiğini ve optimumdan sapma durumlarında keskin değişimler göstermediğini ifade etmektedir.

İkili etkileşimler incelendiğinde, ön işlem süresi ve asit konsantrasyonu etkileşiminin ( $X_1 \cdot X_2$ ) furfural konsantrasyonu üzerinde anlamlı düzeyde etkili olduğu görülmüştür ( $P = 0.029$ ). Bu bulgu, sürenin artışı ile asit konsantrasyonunun birlikte yükselmesinin şeker bozunmasını hızlandırarak furfural oluşumunu önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir. Diğer etkileşim terimleri ( $X_1 \cdot X_3$  ve  $X_2 \cdot X_3$ ) anlamlı değildir.

Modelin belirtme katsayısı  $R^2 = 94.69\%$ , furfural konsantrasyonundaki değişimin büyük bir kısmının model tarafından açıklandığını göstermektedir (Çizelge 4.9). Düzeltilmiş  $R^2$  değerinin  $85.14\%$  olması, modelin gereksiz terimler içermediğini ve uyumunun iyi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tahmini  $R^2 = 19.09\%$  oldukça düşüktür. Bu durum modelin, yeni deney koşullarını tahmin etme gücünün sınırlı olduğunu göstermektedir. Başka bir ifadeyle, model mevcut veri setine iyi uyum sağlasa da, modelin genellenebilirliğinin düşük olduğu ve özellikle furfural oluşumunun sistemde dış etkiler ve mikroyapısal bozulma kinetiği gibi deneysel faktörlere daha duyarlı olabileceği

anlaşılmaktadır. Bu, literatürde de sıklıkla rapor edilen ve furfural oluşumunun şeker bozunma kinetiğine bağlı olarak doğrusal olmayan davranış göstermesi ile uyumludur.

Çizelge 4.9 Furfural konsantrasyonu (g/L) - Model özeti

| S         | R-kare | Düzeltilmiş R-kare | Tahmini R-kare |
|-----------|--------|--------------------|----------------|
| 0,0065665 | 94.69% | 85.14%             | 19.09%         |

Genel olarak, furfural konsantrasyonlarının 0.0011–0.0634 g/L aralığında değiştiği belirlenmiş olup, bu değerlerin literatürde bildirilen toksisite eşik değerlerinin altında olması, *Barnettozyma populi* ile gerçekleştirilecek ksilitol fermantasyonu açısından olumlu bir sonuçtur. Böylece, uygulanan ultrases destekli asit ön işleminin, yüksek şeker eldesi sağlarken inhibitör oluşumunu sınırlayabilen uygun ve etkili bir yöntem olduğu görülmektedir.

#### 4.2.2.4 Fenolik madde konsantrasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi

Toplam fenolik madde konsantrasyonu ( $Y_4$ ) üzerine; ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranı ( $X_3$ , g:mL) etkileri, Eşitlik (4.4)'te verilen ikinci dereceden model ile ifade edilmiştir.

$$Y_4 = 4,66 + 1,773 \cdot X_1 - 0,172 \cdot X_2 - 3,251 \cdot X_3 - 0,2102 \cdot X_1^2 + 0,0157 \cdot X_2^2 + 0,722 \cdot X_3^2 + 0,0731 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,329 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,0083 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.4)$$

Çizelge 4.10 Fenolik madde konsantrasyonu (mg GAE/g biyokütle) - Model özeti

| S        | R-kare | Düzeltilmiş R-kare | Tahmini R-kare |
|----------|--------|--------------------|----------------|
| 0.171867 | 99.44% | 98.42%             | 97.16%         |

Ön işlem süresi ( $X_1$ ), asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ ) toplam fenolik madde içeriği ( $Y_4$ ) üzerine etkileri Çizelge 4.11’de verilen varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Bu modelin istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.01$ ). Modelin belirtme katsayısının  $R^2 = 99.44\%$  olması, toplam fenolik madde değişkenliğinin neredeyse tamamının model tarafından açıklandığını göstermektedir. Düzeltilmiş  $R^2 = 98.42\%$ , modelin gereksiz terim içermediğini ve uyumunun güçlü olduğunu doğrulamaktadır. Tahmini  $R^2 = 97.16\%$ , modelin yeni deney koşullarını tahmin etmede oldukça güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.11 Ön işlem süresi ( $X_1$ , h), asit konsantrasyonu ( $X_2$ , %) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ , g:mL) fenolik madde konsantrasyonu ( $Y_4$ ) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

| Varyasyon Kaynağı   | SD | Düzeltilmiş Kareler Toplamı | Düzeltilmiş Kareler Ortalaması | F      | P     |
|---------------------|----|-----------------------------|--------------------------------|--------|-------|
| Model               | 9  | 26.0071                     | 2.8897                         | 97.83  | 0.000 |
| Doğrusal            | 3  | 25.4203                     | 8.4734                         | 286.86 | 0.000 |
| $X_1$               | 1  | 10.6040                     | 10.6040                        | 358.99 | 0.000 |
| $X_2$               | 1  | 2.0398                      | 2.0398                         | 69.06  | 0.000 |
| $X_3$               | 1  | 12.7765                     | 12.7765                        | 432.54 | 0.000 |
| Kare Terimleri      | 3  | 0.3444                      | 0.1148                         | 3.89   | 0.089 |
| $X_1 * X_1$         | 1  | 0.1631                      | 0.1631                         | 5.52   | 0.066 |
| $X_2 * X_2$         | 1  | 0.0356                      | 0.0356                         | 1.20   | 0.322 |
| $X_3 * X_3$         | 1  | 0.1204                      | 0.1204                         | 4.08   | 0.100 |
| Etkileşim (2-Yönlü) | 3  | 0.2425                      | 0.0808                         | 2.74   | 0.153 |
| $X_1 * X_2$         | 1  | 0.1337                      | 0.1337                         | 4.53   | 0.087 |
| $X_1 * X_3$         | 1  | 0.1084                      | 0.1084                         | 3.67   | 0.114 |
| $X_2 * X_3$         | 1  | 0.0004                      | 0.0004                         | 0.01   | 0.908 |
| Hata                | 5  | 0.1477                      | 0.0295                         |        |       |
| Uyumsuzluk          | 3  | 0.0298                      | 0.0099                         | 0.17   | 0.909 |
| Saf Hata            | 2  | 0.1179                      | 0.0590                         |        |       |
| Toplam              | 14 | 26.1548                     |                                |        |       |

Fenolik madde konsantrasyonuna ilişkin model sonuçları değerlendirildiğinde, ön işlem süresi ( $X_1$ ) ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ ) fenolik bileşiklerin çözünmesi üzerinde istatistiksel olarak en güçlü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.01$ ). Ayrıca, asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) da fenolik maddelerin salınımını anlamlı düzeyde artırmış olup ( $P < 0.01$ ), bu durum hemiselüloz ve lignin yapısının asidik koşullarda parçalanmasıyla ilişkilendirilebilir. Modelde kare ve etkileşim terimlerinin istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması ( $P > 0.05$ ), fenolik madde eldesinin bağımsız değişkenlere karşı çoğunlukla doğrusal bir yanıt verdiğini göstermektedir. Katı:çözücü oranının artması durumunda fenolik madde konsantrasyonunun azalması ise, çözeltideki seyreltme etkisinin fenolik bileşiklerin birim biyokütle başına düşen yoğunluğunu azaltmasından kaynaklanmaktadır. Bu bulgular, ultrason destekli asit ön işleminin, hemiselülozun parçalanması ile eş zamanlı olarak lignine bağlı fenolik bileşiklerin serbestleşmesini teşvik ettiğini ve böylece sıvı fazda fenolik madde varlığının arttığını göstermektedir.

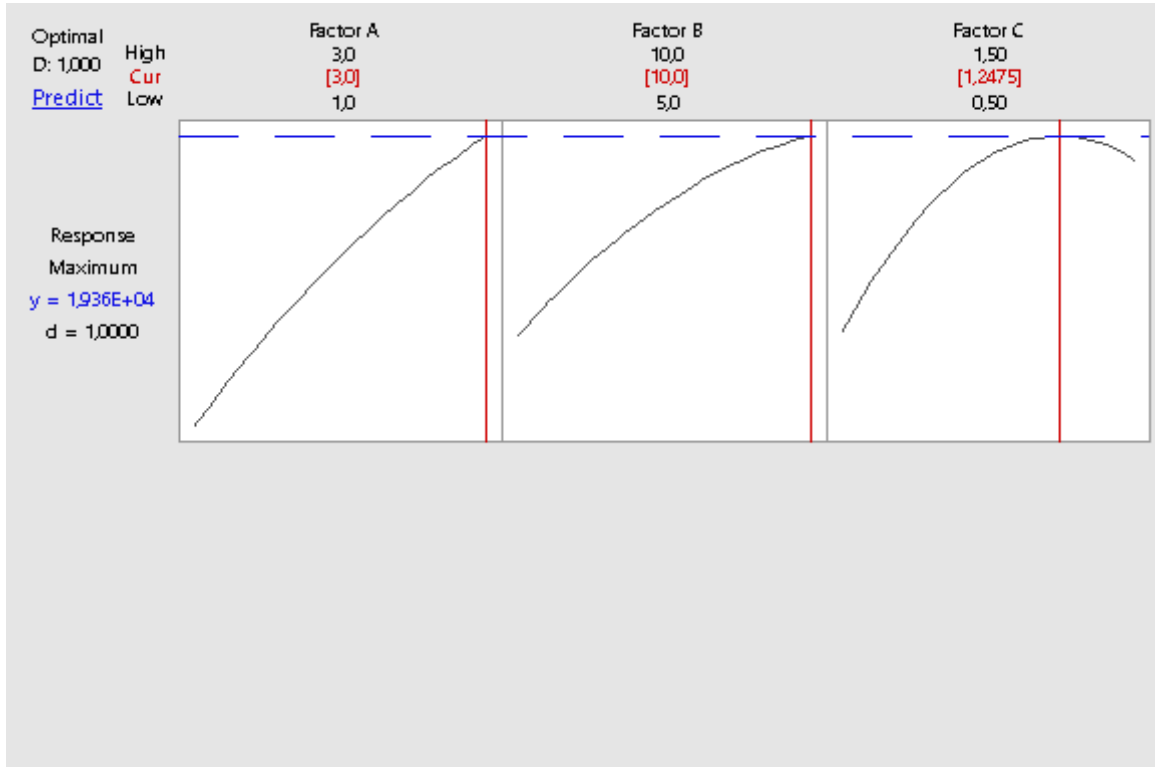
#### **4.2.3 Optimizasyon ve en uygun ön işlem koşullarının belirlenmesi**

Bu çalışmada ön işlem koşullarının optimizasyonu iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada yalnızca hemiselülozik hidrolizatta elde edilen ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi hedeflenmiş ve bu amaçla tek yanıt dayalı optimizasyon uygulanmıştır. Tek yanıt dayalı optimizasyon sonucunda, en uygun ön işlem koşulları; 3 saat işlem süresi ( $X_1 = 3$  h), %10 asit konsantrasyonu ( $X_2 = 10\%$ ) ve 1.24747:10 katı:çözücü oranı ( $X_3 = 1.24747$  g biyokütle/10 mL çözücü) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). Bu koşullarda model tarafından 19363 mg/L ksiloz elde edilebileceği öngörülmüş olup, desirability değeri 1,00 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, ksiloz veriminin öncelikli olarak süre ( $X_1$ ) ve asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) tarafından belirlendiğini ve katı:çözücü oranının ( $X_3$ ) optimum aralık dışına çıkıldığında verimi sınırladığını göstermektedir.

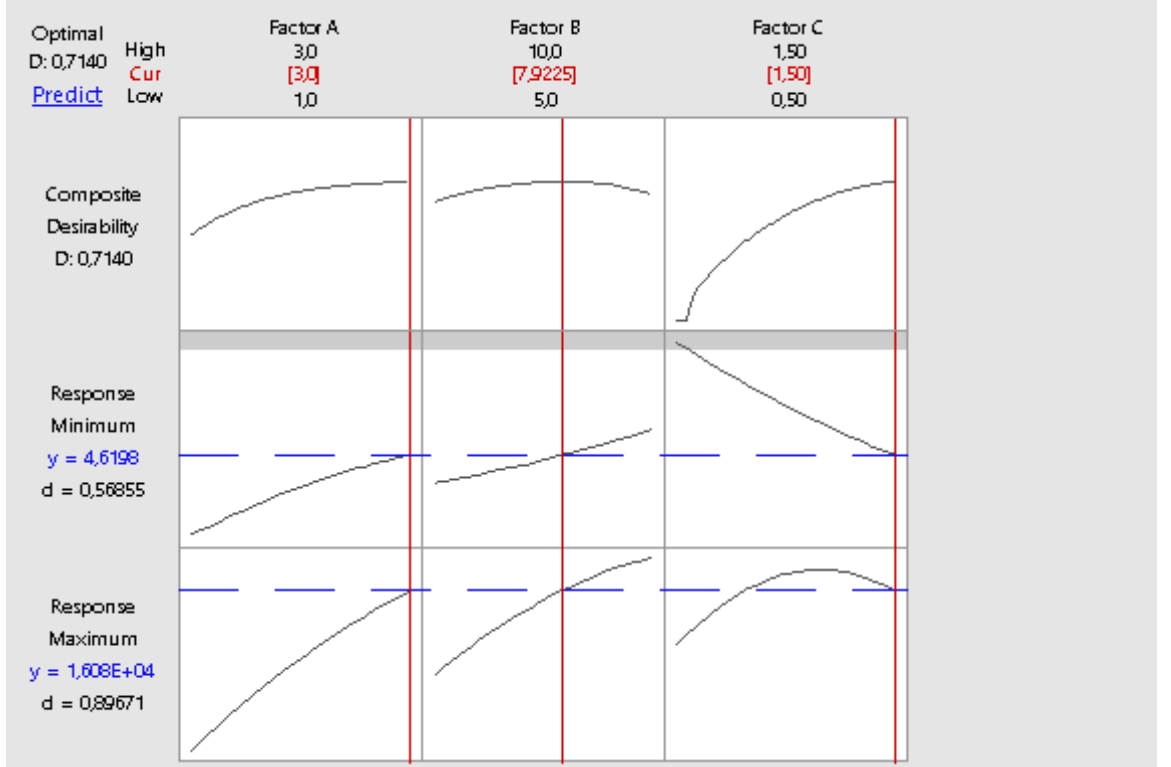
İkinci aşamada ise yalnızca ksiloz konsantrasyonunun artırılması, HMF, furfural, fenolik madde gibi inhibitör bileşiklerin fermantasyon üzerinde olumsuz etki gösterebilme potansiyeli nedeniyle yeterli görülmemiştir. Bu nedenle, çoklu yanıt optimizasyonu uygulanmış ve hem ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi ( $Y_1$ ) hem de toplam fenolik madde içeriğinin minimize edilmesi ( $Y_4$ ) eş zamanlı olarak hedeflenmiştir. Çoklu

optimizasyon sonucunda desirability değeri 0.71 olan optimum koşullar; 3 saat süre, %7.92246 asit konsantrasyonu ve 1.5:10 katı:çözücü oranı olarak belirlenmiş (Şekil 4.4) ve bu koşullarda 16084 mg/L ksiloz ve 4.62 mg GAE/g biyokütle fenolik madde içeriği öngörülmüştür. Bu yaklaşım, ön işlem koşullarının yalnızca şeker verimine değil, aynı zamanda fermentasyon uyumluluğuna göre optimize edildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, tek yanıtla dayalı optimizasyon, ham ksiloz konsantrasyonunu teorik olarak en üst düzeye çıkarmış; ancak çoklu yanıt optimizasyonu, ksilitol üretimi açısından daha dengeli ve fermentasyona uygun hidrolizat elde edilmesini sağlamıştır. Bu nedenle, ilerleyen ksilitol fermentasyonu aşamasında çoklu optimizasyon ile belirlenen koşullar tercih edilmiştir.



Şekil 4.3 Ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesine yönelik tek yanıtla dayalı yanıt yüzey optimizasyonu sonucu elde edilen optimizasyon grafiği



Şekil 4.4 Ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi ve toplam fenolik madde içeriğinin minimize edilmesine yönelik çoklu yanıt optimizasyonu sonucu elde edilen optimizasyon grafiği

#### 4.3 Ön İşlem Sonrasında Elde Edilen Katı Fraksiyonun Bileşimi ve Geri Kazanım Verimi

Ultrases destekli asit ön işlemleri sonucunda Antep fıstığı kabuğu biyokütlesi, çözünür hemiselüloz türevlerinin sıvı faza geçtiği hidrolizat fraksiyonu ve selüloz ile ligninin yoğunlaştığı katı fraksiyon olmak üzere iki temel faza ayrılmıştır. Önceki bölümde (Bölüm 4.2) sıvı fraksiyonun şeker profili, inhibitör bileşik oluşumu ve optimizasyon sonuçları ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Bu bölümde ise ön işlem sonrası elde edilen katı fraksiyonun kimyasal bileşimi ile katı geri kazanım verimi (solid recovery) ele alınmıştır.

#### 4.3.1 Katı fraksiyonun kimyasal bileşimi

Ultrasonik banyo destekli asit ön işlemi, katı fraksiyonda lignoselülozik yapının bileşen dağılımını anlamlı biçimde değiştirerek özellikle hemiselülozun belirgin şekilde uzaklaştırılmasına neden olmuştur. Hemiselüloz fraksiyonunun asidik ortamda çözünerek sıvı faza geçmesi, katı fazda glukan ve ligninin göreceli olarak daha yüksek oranlarda bulunmasına neden olmuştur. Bu değişim, ultrasonik destekli asit ön işleminin lignin–hemiselüloz bağlarını zayıflatarak hemiselülozun selektif hidrolizini hızlandırdığı bilinen mekanizma ile uyumludur. Ön işlem sonrasında elde edilen katı fraksiyonun bileşimi, NREL standart yöntemine göre belirlenmiş olup sonuçlar çizelge 4.12’de sunulmuştur. Ayrıca, ön işlem parametreleri olan süre ( $X_1$ ), asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı/sıvı oranının ( $X_3$ ), glukan (%), ksilan (%), asitte çözünmeyen lignin (%) ve asitte çözünen lignin (%) üzerindeki etkileri istatistiksel olarak ANOVA yöntemiyle incelenmiş ve sonuç tabloları EK 5’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarının kimyasal bileşimi

| Deney no.          | Glukan (%)  | Ksilan (%) | Asitte<br>Çözünmeyen<br>Lignin (%) | Asitte Çözünen<br>Lignin (%) |
|--------------------|-------------|------------|------------------------------------|------------------------------|
| Ön İşlem<br>Öncesi | 22.69±0.08  | 27.61±0.44 | 21.41±3.03                         | 2.20±0.06                    |
| 1                  | 32.86±4.560 | 19.15±4.40 | 20.49±1.71                         | 1.66±0.69                    |
| 2                  | 31.92±3.32  | 20.49±3.28 | 22.06±0.41                         | 1.36±0.23                    |
| 3                  | 30.31±3.91  | 20.44±3.69 | 22.53±0.12                         | 0.95±0.02                    |
| 4                  | 35.64±4.31  | 21.41±3.62 | 23.19±1.21                         | 1.25±0.47                    |
| 5                  | 31.27±2.34  | 29.55±1.15 | 18.88±0.60                         | 1.26±0.38                    |
| 6                  | 38.32±0.45  | 30.25±1.15 | 20.63±2.09                         | 1.41±0.66                    |
| 7                  | 29.67±7.72  | 25.57±7.61 | 18.37±2.68                         | 1.75±1.06                    |
| 8                  | 29.22±2.59  | 25.58±2.85 | 18.88±1.72                         | 0.33±0.11                    |
| 9                  | 34.74±0.45  | 23.64±0.66 | 22.00±1.27                         | 0.36±0.08                    |



Çizelge 4.12 Ultrasonik banyo kullanılarak farklı koşullarda asit ile ön işlem uygulanan Antep fıstığı kabuklarının kimyasal bileşimi (devam)

| Deney no. | Glukan (%) | Ksılan (%) | Asitte<br>Çözünmeyen<br>Lignin (%) | Asitte Çözünen<br>Lignin (%) |
|-----------|------------|------------|------------------------------------|------------------------------|
| 10        | 38.26±3.15 | 23.22±2.68 | 20.70±1.96                         | 1.90±0.88                    |
| 11        | 34.44±2.07 | 24.92±1.99 | 23.61±1.70                         | 1.35±0.81                    |
| 12        | 33.99±1.47 | 22.02±1.96 | 22.56±0.68                         | 1.15±0.23                    |
| 13        | 39.41±0.08 | 26.73±1.20 | 20.28±0.93                         | 2.48±0.18                    |
| 14        | 31.29±0.83 | 26.57±0.57 | 19.57±0.72                         | 1.17±0.29                    |
| 15        | 32.36±0.83 | 24.76±0.68 | 19.15±2.40                         | 2.05±0.96                    |

Çizelge 4.12’de verilen ham Antep fıstığı kabuğunun kimyasal bileşimi ile ultrasonik banyo destekli asit ön işlem sonrası elde edilen katı fraksiyonun bileşim sonuçları karşılaştırıldığında, ön işlemin lignoselülozik matris üzerinde belirgin yapısal değişikliklere yol açtığı görülmektedir. Uygulanan ön işlem koşulları, özellikle hemiselüloz fraksiyonunun seçici olarak hidrolize edilmesini sağlamış ve ksılan içeriğinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. ANOVA sonuçlarına göre ksılan üzerinde sürenin etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.008 < 0.05$ ) ve bu bulgu, ultrasonik destekli asit hidrolizinin hemiselülozun depolimerizasyonunda güçlü bir belirleyici olduğunu doğrulamaktadır.

Bilindiği gibi, seyreltik asit hidrolizi, hemiselüloz fraksiyonunun yüksek düzeyde depolimerizasyonuna yol açtığından en etkili kimyasal hidroliz yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Hemiselülozun selüloza kıyasla termal olarak daha az kararlı olması, pentoz dönüşümünün heksoz dönüşümüne göre çok daha yüksek olmasına neden olmaktadır (Thomsen ve Schmidt 1999). Bu çalışmada, ham biyokütlede %27.61 olan ksılan oranının ön işlem sonrası %19–30 aralığına düşmesi, hemiselülozun asidik koşullara karşı daha duyarlı olduğunu ve ultrasonik kavitasyonun etkisiyle hızla sıvı faza taşındığını göstermektedir. Literatürde de ultrason destekli asit ön işleminin lignin–

hemiselüloz bağlarını kırarak ksilanın çözünebilir ksiloz formuna dönüşümünü artırdığı bildirilmiştir (Velmurugan ve Muthukumar 2011). Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, söz konusu mekanizma ile tamamen uyumludur ve pentozca zengin hidrolizat elde edilmesi hedefi açısından başarıya işaret etmektedir. Çizelge 4.12’de sunulan katı fraksiyon bileşim sonuçları ile sıvı fazda elde edilen ksiloz konsantrasyonları birlikte değerlendirildiğinde, hemiselülozun çözünme davranışının yalnızca monomerik ksiloz oluşumu ile açıklanamayacağı görülmektedir. Örneğin Deney 1 koşullarında, katı fraksiyondaki ksilan içeriğinin %27.61’den %19.15’e belirgin şekilde azalmasına rağmen, sıvı fazda ölçülen ksiloz konsantrasyonunun diğer bazı deneylere kıyasla daha sınırlı kaldığı belirlenmiştir. Bu durum, söz konusu koşullarda ksilanın tamamen ksiloz monomerlerine hidrolize olmak yerine, kısmi depolimerizasyon sonucu ksilooligosakkarit (XOS) formunda sıvı faza geçmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Glukan oranının ham örnekteki %22.69’dan ön işlem sonrası %30–39 aralığına yükselmesi ise selülozun asidik hidrolize karşı daha dirençli olduğunu ve hemiselülozun ve ligninin çözünmesiyle katı fazda göreceli bir zenginleşme gerçekleştiğini göstermektedir. ANOVA sonuçlarına göre glukan üzerinde asit konsantrasyonunun etkisi anlamlıdır ( $p=0.007 < 0.05$ ) ve daha yüksek asit varlığında lignin–hemiselüloz komplekslerinin çözünmesiyle glukan yüzdesinde artış gözlenmesi beklenen bir durumdur. Bu bulgu, ön işlemin selüloz iskeletini koruyarak hemiselülozu hedef seçici şekilde uzaklaştırdığını teyit etmektedir.

Lignin fraksiyonuna bakıldığında, asitte çözünmeyen lignin oranının 18–23% aralığında seyretmesine karşın, bu durum ligninin tam olarak korunduğu anlamına gelmemektedir. Aksine, ANOVA sonuçlarına göre hem süre hem asit konsantrasyonu lignin üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahiptir ( $p=0.001$  ve  $p=0.019 < 0.05$ ). Asitte çözünen lignin miktarının ham numunedeki %2.20’den bazı koşullarda %0.33’e kadar düşmesi, lignin ağ yapısında parçalanma ve çözünme gerçekleştiğini göstermektedir. Ultrasonik kaviteasyonun yarattığı kesme kuvvetleri, lignin–karbonhidrat komplekslerinin parçalanmasını hızlandırarak asidin nüfuzunu artırmış ve bu etki ANOVA ile de doğrulanmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, ultrasonik destekli asit ön işleminin ksilanı büyük ölçüde sıvı faza taşıyarak ksiloz açısından zengin bir hidrolizat oluşturduğu; glukanın önemli ölçüde korunmasını sağlayarak selüloz matrisinin yapısal bütünlüğünü sürdürdüğü ve lignin yapısının parçalanmasıyla biyokütlenin enzimatik olarak daha erişilebilir bir forma dönüştüğü görülmektedir. Bu üçlü etki, ön işlemin hem hemiselüloz ayrışması hem de biyodönüşüm basamaklarının genel verimliliği açısından son derece uygun bir yaklaşım olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, çalışmanın temel amacı olan ksiloz veriminin artırılması ve bunun devamında ksilitol üretimi için uygun bileşime sahip bir hidrolizat elde edilmesi hedefiyle doğrudan örtüşmektedir. Özetle, ön işlem sırasında hemiselülozun önemli bir bölümünün hidroliz edilerek sıvı faza geçtiği; selüloz ve ligninin ise kompleks yapısında kalarak katı fraksiyonda göreceli olarak yoğunlaştığı görülmektedir. Lignin yüzdesindeki bu nispi artış eğilimi, literatürde ultrason destekli asit ön işlem çalışmalarında da benzer şekilde rapor edilmiş olup, lignin engelinin azaltılması ve hemiselülozun seçici hidrolizi ile ilgili bulgularla uyumludur (Velmurugan ve Muthukumar 2011).

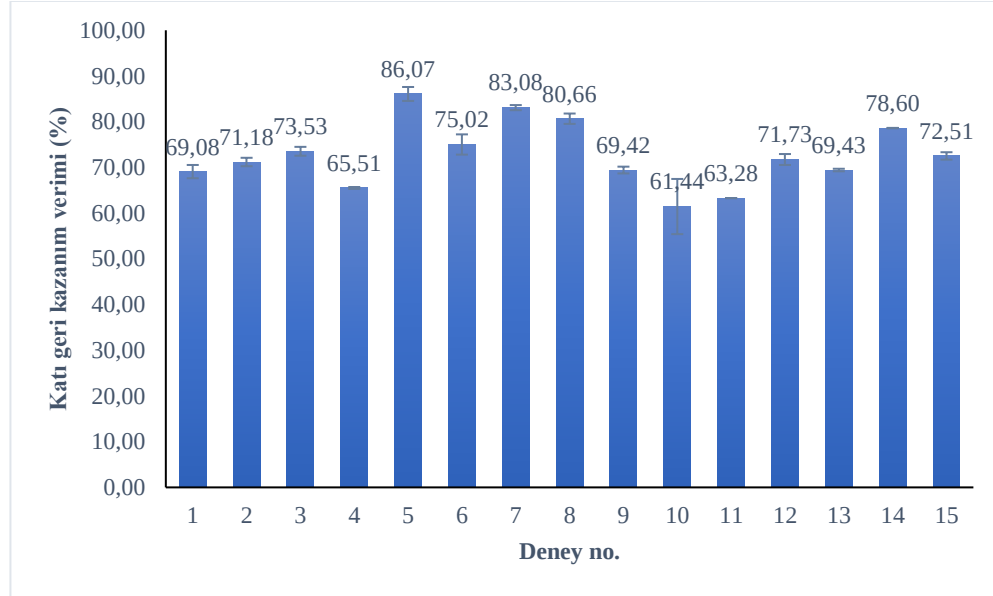
#### **4.3.2 Katı geri kazanım verimi (Solid recovery)**

Katı geri kazanım verimi, ön işlem sonunda başlangıç biyokütlesinin ne kadarının katı fazda tutulabildiğini gösteren temel bir parametredir. Bu değer, uygulanan ön işlemin şiddeti, biyokütlenin yapısal parçalanma düzeyi ve sonrasında elde edilecek şeker verimi üzerinde doğrudan belirleyici olduğu için süreç değerlendirmesinde kritik öneme sahiptir. Katı geri kazanım verimi (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Katı geri kazanım verimi (\%)} = \left( \frac{\text{Ön işlem sonrası katı kütlesi}}{\text{Başlangıç katı kütlesi}} \right) \times 100$$

Uygulanan ultrasonik destekli asit ön işlem koşullarına bağlı olarak değişen katı geri kazanım verimi değerleri şekil 4.5'te sunulmuştur. Ayrıca, ön işlem parametreleri olan süre ( $X_1$ ), asit konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve katı/sıvı oranının ( $X_3$ ) katı geri kazanım verimi (%)

üzerine etkisi istatistiksel olarak ANOVA yöntemiyle incelenmiş ve sonuç tabloları EK 6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5 Ultrases destekli asit ön işlemleri sonrasında katı geri kazanım verimi

Şekil 4.5'te görüldüğü üzere, katı geri kazanım verimi %61.44–%86.07 aralığında değişmektedir. Bu aralık, ultrases desteğiyle birlikte uygulanan asitli ortamın özellikle hemiselüloz fraksiyonunu çözerek sıvı faza taşıdığını göstermektedir. Genel eğilim olarak, asit konsantrasyonu ve işlem süresi arttıkça katı geri kazanımının azaldığı görülmüştür; bu durum hemiselüloz çözünmesiyle uyumludur ve Bölüm 4.2'de detaylandırılan artan ksiloz salınımı ile paralellik göstermektedir.

ANOVA sonuçları da bu eğilimleri desteklemektedir. Modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p=0.003 < 0.05$ ) ve özellikle lineer etkilerin tamamı anlamlı çıkmıştır ( $p<0.05$ ). Faktörlerin tekil etkileri incelendiğinde; süre ( $X_1$ ) ve asit konsantrasyonunun ( $X_2$ ) katı geri kazanım verimi üzerinde en belirgin etkiye sahip olduğu görülmektedir ( $p=0.001$ ). Bu bulgular, işlem süresi ve asit derişimindeki artışla birlikte biyokütlede daha güçlü bir çözünme gerçekleştiğini ve bunun katı faz oranını azalttığını göstermektedir. Ayrıca katı:çözücü oranının ( $X_3$ ) etkisinin de anlamlı olduğu ( $p=0.005 < 0.05$ ) görülmüş;  $A^2$  teriminin anlamlı bulunması ( $p=0.028 < 0.05$ ) ise özellikle uç asit

konsantrasyonlarında, yani çok yüksek veya çok düşük asit seviyelerinde, tepkimenin doğrusal olmayan bir davranış gösterebildiğine işaret etmektedir.

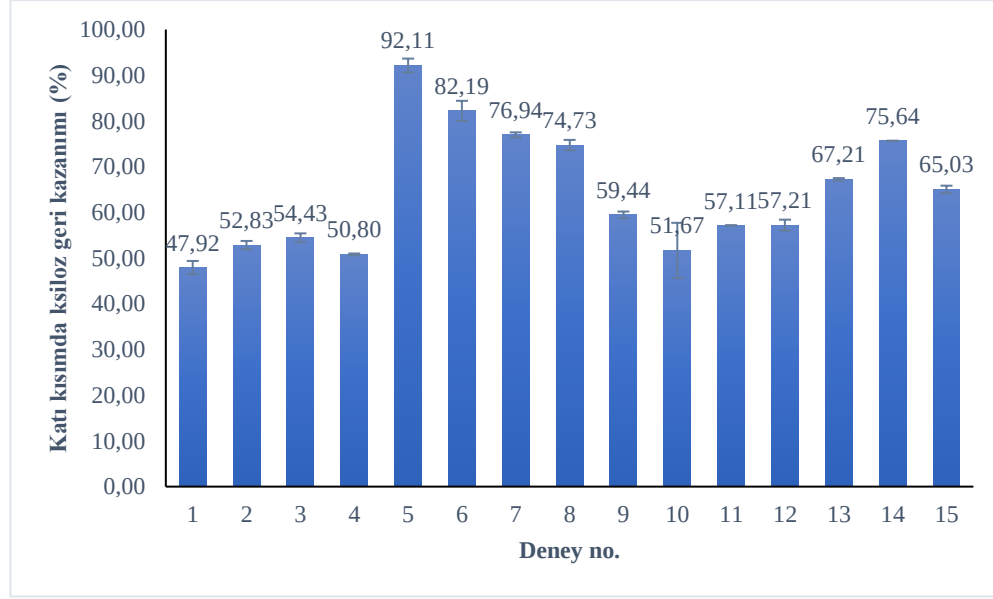
Modelin  $R^2$  değeri %96.78, düzeltilmiş  $R^2$  değeri ise %90.97 olup, modelin katı geri kazanımındaki değişimi büyük ölçüde açıkladığını göstermektedir. Bu yüksek uyum, ön işlem parametreleri ile katı faz davranışı arasında güçlü bir ilişki olduğunu desteklemektedir.

Genel olarak, asit konsantrasyonunun ve işlem süresinin artması, hemiselülozun çözünmesini hızlandırdığı için katı geri kazanım oranının azalmasına neden olmuştur. Katı fraksiyonun azalması, sıvı fazdaki ksiloz salınımının arttığı koşullarla uyumludur (Bölüm 4.2). Bu durum, şeker eldesi için etkili hemiselüloz ayrışmasının gerçekleştiğini göstermektedir.

Özbek ve ark. (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ultrason destekli alkali ön işlem (UAAP) ve kombine mikrodalga–ultrason alkali ön işlem (SUMAAP) süreçleri uygulanmış ve bu yöntemlerin pistachio shell biyokütlesi üzerindeki etkileri detaylı biçimde değerlendirilmiştir. UAAP işleminde katı geri kazanım oranlarının %55.28–83.30 aralığında değiştiği; SUMAAP işleminde ise bu aralığın %48.95–76.55’e kadar düştüğü bildirilmiştir. Katı geri kazanımındaki bu düşüş, hemiselüloz ve ligninin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasına bağlanmış ve selüloz içeriğinin ham örneğe kıyasla belirgin biçimde artmasına neden olmuştur. Nitekim SUMAAP işleminde selüloz içeriği %46.74’e kadar yükselmiş, hemiselüloz ve lignin ise önemli ölçüde azalmıştır. Her iki çalışmada da, ultrason enerjisinin kimyasal ön işlemleri güçlendirerek lignin–hemiselüloz bağlarını kırdığı, böylece ligninin çözünmesini ve hemiselülozun sıvı faza geçişini hızlandırdığı görülmektedir. Özbek ve ark. (2020)’nın sıvı fazda yüksek seviyelerde ksilo-oligosakkarit (XOS) rapor etmesi, ultrasonun özellikle hemiselülozdan XOS üretimini teşvik ettiğini göstermektedir. Benzer şekilde, bu tez çalışmasında da katı geri kazanım oranındaki azalma yüksek ksiloz salınımı ile paralellik göstermiştir.

#### 4.3.3 Ön işlem sonrası ksilozun geri kazanım oranları

Ön işlem uygulanmamış Antep fıstığı kabuğu ile farklı koşullarda ön işleme tabi tutulmuş biyokütlenin ksiloz miktarları dikkate alınarak kütle dengliği hesaplamaları yapılmış ve katı fazda kalan ksiloz miktarları Şekil 4.6’da sunulmuştur.



Şekil 4.6 Antep fıstığı kabuğuna farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda katı kısımda ksilozun geri kazanımı

Şekil 4.6’da gösterildiği üzere, katı fazda ksiloz geri kazanım oranları %47.92 ile %92.11 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar, uygulanan farklı ön işlem koşullarının hemiselülozun parçalanma derecesi ve ksilozun fazlar arasındaki dağılımı üzerinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermektedir. En yüksek ksiloz geri kazanım oranı Deney 5’te (%92.11) elde edilmiştir. Aynı koşulda katı geri kazanım veriminin de yüksek olması (%86.07), hemiselülozun büyük ölçüde yapıda korunduğunu göstermektedir. Bu durum sıvı fazdaki düşük ksiloz içeriği ile de tamamen uyumludur (Deney 5: 1441 mg/L) (Şekil 4.1). Dolayısıyla Deney 5, hemiselülozun çözünmesinin sınırlı kaldığı, ön işlemin daha hafif seyrettiği koşulu temsil etmektedir. Nitekim, sıvı fazdaki ksiloz konsantrasyonları ile katı fazda kalan ksilan miktarı arasındaki ilişki incelendiğinde, iki değişken arasında güçlü ve negatif yönlü bir korelasyon olduğu görülmüştür ( $r = -0.719$ ). Bu değer, hemiselülozun çözünme davranışının oldukça belirgin bir şekilde faz dağılımını etkilediğini göstermektedir. Başka bir ifadeyle, katı fazda ksilan miktarı azaldıkça sıvı

fazda ölçülen ksiloz miktarı artmakta, yani hemiselülozun hidrolizi ve çözünmesi doğrudan ksiloz salınımına karşılık gelmektedir. Bu eğilim, hem katı fazdaki ksiloz geri kazanım oranları (Şekil 4.6) hem de sıvı fazdaki ksiloz konsantrasyonları (Şekil 4.1) ile tamamen uyumludur.

Ayrıca Deney 1’ de ksiloz geri kazanımının diğer koşullara kıyasla düşük çıkmasının temel nedeni, uygulanan ön işlem parametrelerinin yapıdaki hemiselüloz yapısının bütünlüğünü parçalayabilecek kadar güçlü olmamasıdır. Deney 1’de asit konsantrasyonu düşük, işlem süresi kısa ve katı:çözücü oranı fazla olduğundan, hemiselülozun parçalanma ve çözünme derecesi sınırlı kalmıştır. Bu koşullar altında hemiselülozun önemli bir kısmı hidrolize uğraamamış ve ksiloz monomerlerine dönüşmemiştir. Dolayısıyla hem sıvı faza geçen ksiloz miktarı düşük olmuş, hem de katı fazda ölçülen geri kazanım düşük kalmıştır.

Dolayısıyla, ultrasonik destekli asit ön işlemi hemiselülozun çözünme derecesini belirleyen kritik bir adım olup, koşulların şiddetlenmesi ksilozun katı fazdan uzaklaşarak sıvı fazda birikmesine, daha ılımlı koşullar ise yapıdaki hemiselülozun korunmasına yol açmaktadır.

#### **4.3.4 Ön işlem sonrası ligninin uzaklaştırılma oranları**

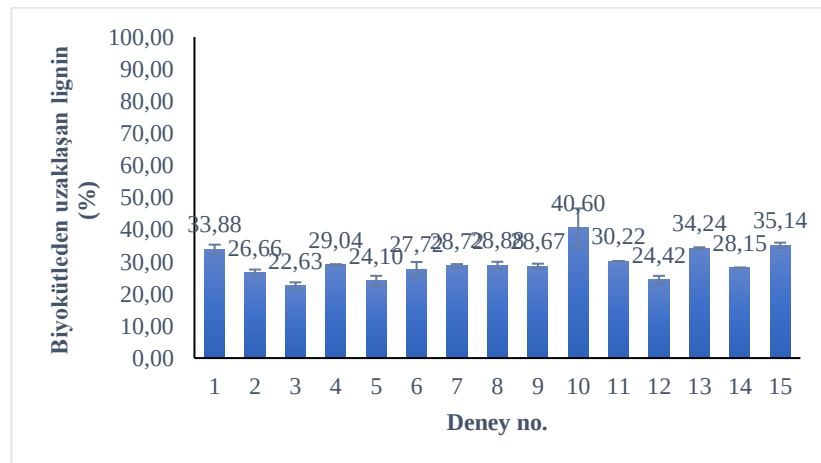
Şekil 4.7’de gösterildiği üzere, ultrasonik destekli asit ön işlemi sonrasında biyokütleden uzaklaştırılan lignin oranları %22.63 ile %40.60 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar, uygulanan ön işlem şiddetinin lignin çözünürlüğü ve lignoselülozik matrisin parçalanma derecesi üzerinde belirgin etkileri olduğunu göstermektedir.

En yüksek lignin uzaklaştırma oranı Deney 10’da (%40.60) elde edilmiştir. Bu koşul, asidik ortamın hemiselülozla birlikte lignin–karbonhidrat komplekslerinin de parçalanmasını hızlandığını ve ligninin önemli bir kısmının çözünerek sıvı faza geçtiğini göstermektedir. Aynı deneyde katı geri kazanımının düşük olması (%61.44), biyokütledeki yapısal çözünmenin ileri seviyede olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.5).

Bu durum, hem lignin hem de hemiselülozun yüksek oranda çözünebilen fraksiyonlara ayrıldığı şiddetli bir ön işlem koşulunu temsil etmektedir.

Buna karşılık, en düşük lignin uzaklaştırma oranı Deney 2’de (%22.63) gözlenmiştir. Benzer şekilde Deney 5 (%24.10) ve Deney 6 (%27.72) de düşük lignin uzaklaştırma değerleri sergilemiştir. Bu deneylerde katı geri kazanım verimlerinin yüksek olması (özellikle Deney 5: %86.07), ligninin yapıda büyük ölçüde korunduğunu ve ön işlemin daha hafif gerçekleştiğini göstermektedir. Bu eğilim, aynı deneylerde katı fazda yüksek ksiloz geri kazanımının bulunmasıyla da uyumludur; hemiselüloz ve lignin sınırlı ölçüde çözülmüş, biyokütle matrisinin büyük kısmı katı fazda kalmıştır.

Şekil 4.7 genel olarak değerlendirildiğinde, lignin uzaklaştırma oranlarının hem işlem süresi hem de asit konsantrasyonu ile ilişkili olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, ultrasonik destekli asit ön işleminin lignin üzerinde etkili bir çözündürme davranışı gösterdiği; ancak bu etkinin işlem şiddetine bağlı olarak geniş bir aralıkta değişebildiği görülmüştür. Lignin uzaklaştırma oranlarının artması, hemiselülozun da daha yüksek oranda çözünebilir fraksiyonlara dönüştüğü deneylerle örtüşmekte; buna karşılık düşük lignin çözünmesi ise daha yüksek katı faz korunumuyla ilişkilendirilmektedir. Bu bulgular, ön işlem şiddetinin hem ligninin hem hemiselülozun yapısal bütünlüğü üzerinde belirleyici olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7 Antep fıstığı kabuğuna farklı koşullarda uygulanan ön işlemler sonunda biyokütleden uzaklaşan lignin oranları



#### 4.3.5 Tek yanıtı dayalı ve çoklu yanıtı dayalı optimizasyon koşullarında elde edilen hidrolizat ve katı fraksiyonların karşılaştırılması

Çizelge 4.13 Tek yanıtı dayalı (Optimum koşul-1) ve çoklu yanıtı dayalı (Optimum koşul-2) optimizasyon koşullarında elde edilen katı fraksiyonun bileşimi

|                 | Glukan (%) | Ksilan (%) | Asitte Çözünmeyen Lignin (%) | Asitte Çözünen Lignin (%) | Katı geri kazanım verimi (%) |
|-----------------|------------|------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Optimum koşul-1 | 36.34±1.06 | 21.58±0.57 | 22.66±1.23                   | 1.56±0.56                 | 65.86±0.7                    |
| Optimum koşul-2 | 32.72±1.21 | 20.39±0.54 | 24.69±1.06                   | 1.23±0.37                 | 68.26±3.4                    |

Optimum ön işlem koşullarında elde edilen katı fraksiyonlara ait glukan, ksilan ve lignin içerikleri Çizelge 4.13'te sunulmuştur. Tek yanıtı dayalı optimizasyonda (Optimum koşul-1) glukan içeriği %36.34'e yükselirken, çoklu yanıtı dayalı optimizasyonda (Optimum koşul-2) bu değer %32.72 olarak belirlenmiştir. Her iki koşulda da, ham Antep fıstığı kabuğundaki (%22.69) glukan oranına kıyasla belirgin bir artış söz konusudur; bu durum, hemiselüloz fraksiyonunun önemli ölçüde çözünerek sıvı faza geçmesi sonucunda selülozun katı fazda göreceli olarak zenginleştiğini göstermektedir.

Ksilan içerikleri incelendiğinde, Optimum koşul-1'de %21.58, Optimum koşul-2'de ise %20.39 değerleri elde edilmiş olup, her iki durumda da ham biyokütledeki %27.61'lik başlangıç değerine göre azalma gözlenmiştir. Bu bulgu, ultrases destekli asit ön işleminin hemiselüloz fraksiyonunu seçici biçimde hidrolize ederek sıvı faza taşıdığını göstermektedir.

Asitte çözünmeyen lignin içeriği Optimum koşul-1'de %22.66, Optimum koşul-2'de ise %24.69 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, ham örnekteki %21.41'lik lignin oranı ile aynı mertebede olup, lignin fraksiyonunun ön işlem sırasında kısmen çözünebilir türevlerine dönüştüğünü, ancak matrisin tamamen ligninden arınmadığını göstermektedir. Asitte çözünen lignin oranlarının her iki koşulda da %1-2 aralığında seyretmesi, ultrasonik kaviteasyonun lignin-karbonhidrat komplekslerini kısmen parçaladığını, ancak esas etkinin hemiselüloz fraksiyonunun hidrolizi üzerinde yoğunlaştığını düşündürmektedir.

Katı geri kazanım verimi değerlendirildiğinde, tek yanıtı dayalı optimizasyon koşulunda (Optimum koşul-1) katı fazın %65.86 oranında korunduğu, çoklu yanıtı dayalı optimizasyon koşulunda ise bu oranın %68.26'ya yükseldiği belirlenmiştir. Her iki değer de ön işlem sırasında hemiselüloz fraksiyonunun önemli ölçüde çözünerek sıvı faza geçtiğini teyit etmekle birlikte, Optimum koşul-1'in daha düşük katı geri kazanım verimi sunması, bu koşulun hemiselüloz ve kısmen lignin uzaklaştırılması açısından daha “şiddetli” bir ön işlem profili sergilediğini göstermektedir. Buna karşılık, Optimum koşul-2'de katı geri kazanımının daha yüksek olması, hemiselüloz çözünmesinin etkili şekilde gerçekleşmesine rağmen biyokütlenin yapısal bütünlüğünün bir miktar daha fazla korunduğunu ve ön işlemin daha dengeli bir çözünme davranışı sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu durum, çoklu optimizasyon koşulunun hem şeker verimi hem de inhibitör oluşumu açısından daha kontrollü ve fermantasyona uygun bir matris sağladığını desteklemektedir.

Çizelge 4.14 Tek yanıtı dayalı (Optimum koşul-1) ve çoklu yanıtı dayalı (Optimum koşul-2) optimizasyon koşullarında elde edilen hidrolizatların bileşimi ve inhibitör madde konsantrasyonları

|                                                 | Ksiloz (mg/L) | Toplam fenolik madde konsantrasyonu (mg GAE/g biyokütle) | HMF (g/L)     | Furfural (g/L) |
|-------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------|---------------|----------------|
| Optimum koşul-1                                 | 16030±292.6   | 6.43±0.129                                               | 0.0148±0.0016 | 0.0798±0.0021  |
| Aktif kömür ile muamele sonrası optimum koşul-1 | 23885±249.8   | 0.94±0.026                                               | -             | 0.0002±0.000   |
| Optimum koşul-2                                 | 17020±1310.1  | 5.75±0.107                                               | 0.0122±0.0003 | -              |
| Aktif kömür ile muamele sonrası optimum koşul-2 | 18079±1158.5  | 1.04±0.043                                               | -             | -              |

Çizelge 4.14'te görüldüğü üzere, her iki optimum ön işlem koşulunda da hidrolizatlar yüksek ksiloz içerikleri sunmuştur. Tek yanıtı dayalı optimizasyonda ksiloz derişimi 16030 mg/L, çoklu optimizasyonda ise 17020 mg/L olarak belirlenmiştir. Ancak çoklu optimizasyonda toplam fenolik madde miktarı (5.75 mg GAE/g) ve HMF–furfural

seviyeleri daha düşük olduğundan, bu hidrolizatın fermentasyon açısından daha elverişli bir bileşim sunduğu anlaşılmaktadır.

Aktif kömür uygulaması her iki hidrolizatta da fenolik madde ve inhibitörleri önemli ölçüde azaltmış; özellikle Optimum koşul-1’de toplam fenolik madde 6.43 mg GAE/g seviyesinden 0.94 mg GAE/g’e düşmüştür. Ayrıca inhibitörlerin giderilmesiyle ksiloz konsantrasyonları her iki hidrolizatta da artış göstermiştir. Çoklu optimizasyon koşulunda inhibitörlerin başlangıç düzeyi zaten düşük olduğundan, aktif kömür sonrası elde edilen hidrolizat fermentasyon için en uygun bileşim profiline ulaşmıştır.

#### **4.4 Konvansiyonel Asit Ön İşlemi Sonrasında Elde Edilen Katı ve Sıvı Fazın Bileşimi**

Konvansiyonel asit ön işlemi ile elde edilen katı ve sıvı fraksiyonlara ait bileşim değerleri Çizelge 4.15’te sunulmuştur. Katı fazda glukan oranı %25.76, ksilan oranı %30.95 ve asitte çözünmeyen lignin oranı %31.54 olarak belirlenmiş olup, yüksek katı geri kazanım verimi (%87.38) ile birlikte değerlendirildiğinde, hem hemiselülozun hem de ligninin büyük ölçüde katı fazda korunduğu anlaşılmaktadır.

Sıvı faz bileşimi incelendiğinde (Çizelge 4.16), ksiloz derişiminin yalnızca 1383 mg/L olduğu görülmekte; bu düşük değer hemiselülozun hidrolizinin etkin olmadığını göstermektedir. Toplam fenolik madde içeriği (3.18 mg GAE/g) ile HMF ve furfural seviyelerinin düşük olması inhibitör oluşumunun sınırlı olduğunu ortaya koysa da, yapısal bileşenlerin çözünme yetersizliği nedeniyle ksiloz verimi oldukça düşük kalmıştır.

Bu sonuçlar, konvansiyonel asit ön işleminin Antep fıstığı kabuğunun parçalanmasında sınırlı bir etki gösterdiğini ve ksiloz üretimi açısından uygun bir ön işlem profili sunmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.15 Konvansiyonel asit ön işlemleri sonrasında elde edilen katı fraksiyonun bileşimi

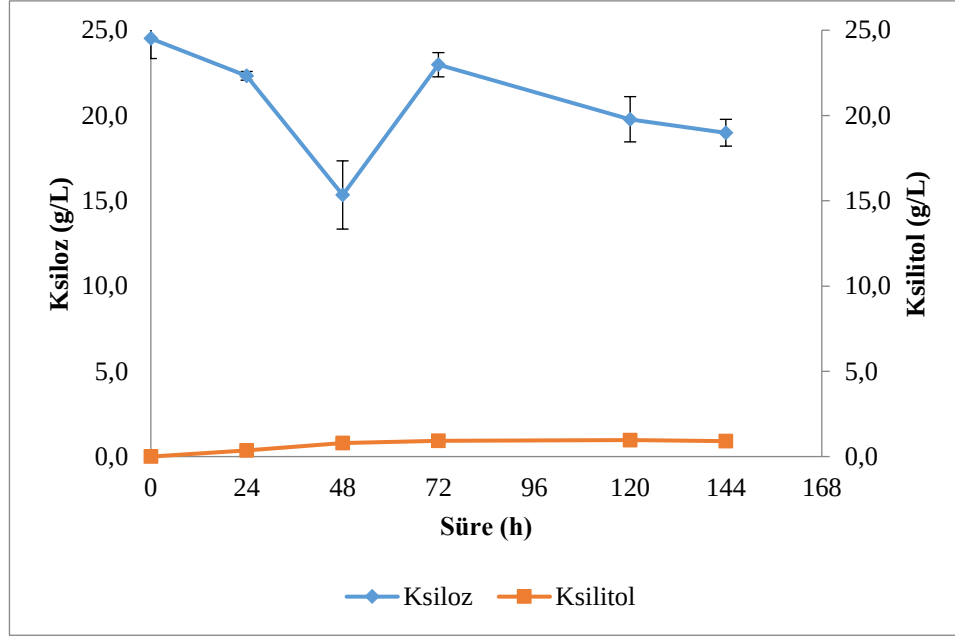
|                              | Glukan (%)  | Ksilan (%)  | Asitte Çözünmeyen Lignin (%) | Asitte Çözünen Lignin (%) | Katı geri kazanım verimi (%) |
|------------------------------|-------------|-------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Konvansiyonel asit hidrolizi | 25.76±1.168 | 30.95±2.111 | 31.54±3.894                  | 1.88±1.287                | 87.38±2.7                    |

Çizelge 4. 1 Konvansiyonel asit ön işlemleri sonrası elde edilen hidrolizatın ksiloz, toplam fenolik madde ve inhibitör bileşen (HMF ve furfural) konsantrasyonları

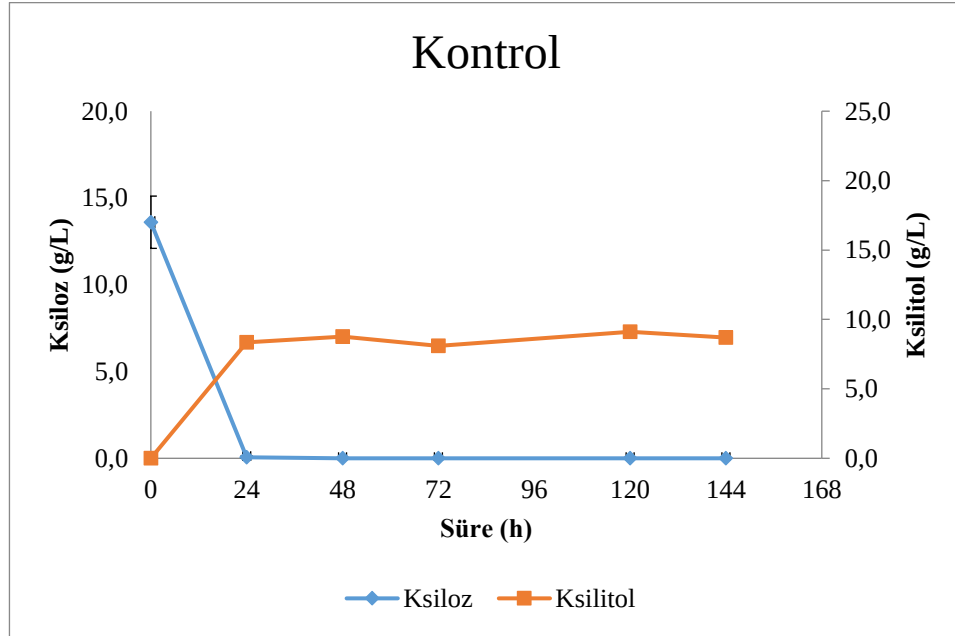
|                              | Ksiloz (mg/L) | Toplam fenolik madde konsantrasyonu (mg GAE/g biyokütle) | HMF (g/L)     | Furfural (g/L) |
|------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------|---------------|----------------|
| Konvansiyonel asit hidrolizi | 1383±349.5    | 3.18±0.177                                               | 0.0020±0.0007 | 0.0047±0.0004  |

#### 4.5 Ksilitol Fermantasyonu

Bu çalışmada gerçekleştirilen ultrases destekli asit ön işlemleri sonrasında elde edilen hidrolizatların fermantasyona uygunluğu, ksilitol üretimi denemeleri ile değerlendirilmiştir. Tek yanıtı dayalı optimizasyon ile belirlenen koşullarda Şekil 4.8’de ( $X_1 = 3$  h,  $X_2 = 10\%$ ,  $X_3 = 1.25:10$ ) elde edilen hidrolizat kullanılarak yapılan fermantasyon sürecinde, ksiloz tüketiminin gerçekleşmediği ve fermantasyon süresince ksiloz derişiminin hemen hemen sabit kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, ksilitol oluşumu da gözlenmemiş olup, maya metabolik aktivitesinin baskılandığı anlaşılmıştır. Bu durum, ilk optimizasyon koşullarında hidrolizatta bulunan inhibitör bileşiklerin (özellikle fenolik maddeler ve parçalanma ürünleri) maya metabolizmasını baskıladığına işaret etmektedir. Dolayısıyla, tek yanıtı dayalı optimizasyon ile elde edilen hidrolizat fermantasyona uygun bulunmamıştır.

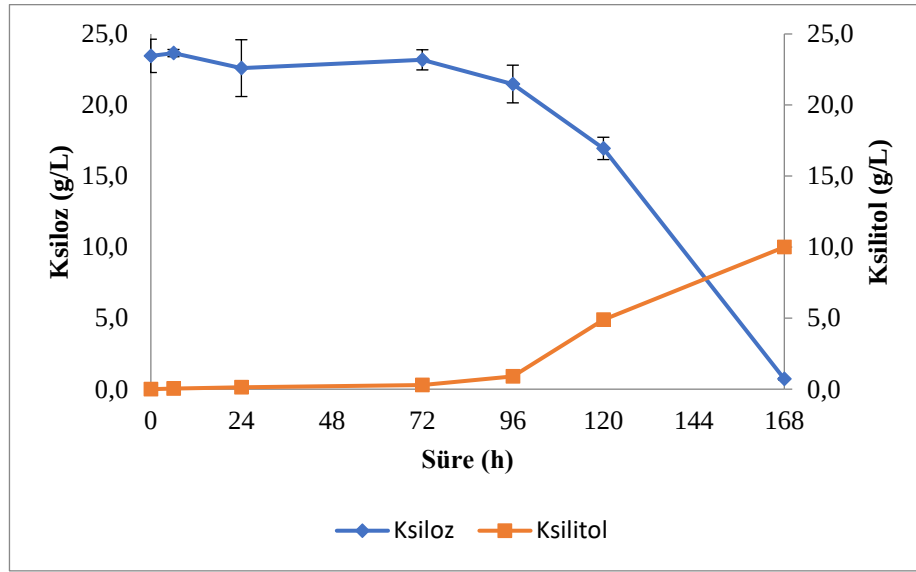


Şekil 4.8 Tek yanıtla dayalı optimizasyon koşullarında elde edilen hidrolizat ( $X_1 = 3$  h,  $X_2 = 10\%$ ,  $X_3 = 1.25:10$ ) kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol fermantasyonunda ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumunun zamana bağlı değişimi



Şekil 4.9 Kontrol çözeltisi (20 g/L ksilitol) kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol fermantasyonunda ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumunun zamana bağlı değişimi

Bu bulgunun ardından Şekil 4.10’da gerçekleştirilen çoklu yanıt optimizasyonu ile hem ksiloz veriminin artırılması hem de inhibitör bileşiklerin azaltılması hedeflenmiş ve optimum koşulların  $X_1 = 3$  h,  $X_2 = \%7.92$  ve  $X_3 = 1.5:10$  olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen hidrolizatla yürütülen fermantasyon deneylerinde ise ksiloz tüketiminin gerçekleştiği ve ksilitol üretiminin başladığı gözlenmiştir. Böylece, çoklu optimizasyon ile seçilen koşulların maya fermantasyonu için uygun olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 4.10 Çoklu optimizasyon ile elde edilen hidrolizat (optimum ön işlem koşulları:  $X_1 = 3$  h,  $X_2 = \%7.92$  ve  $X_3 = 1,5:10$ ) kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol fermantasyonunda ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumunun zamana bağlı değişimi

Sonuç olarak, tek yanıtla dayalı optimizasyon, teorik olarak yüksek ksiloz verimi sağlamış olsa da fermantasyon açısından uygun değildir. Şekil 4.10’da çoklu yanıt optimizasyonu ise, ksilitol üretimi için gerekli olan daha düşük inhibitör seviyelerine sahip, dengeli ve biyoprosese uygun bir hidrolizat elde edilmesini sağlamıştır. Bu nedenle, çalışmanın fermentatif ksilitol üretim aşamasında çoklu optimizasyon ile belirlenen ön işlem koşulları kullanılmıştır.

Ksilitol fermantasyon denemeleri, ön işlem optimizasyonu ile elde edilen hidrolizatların mikrobiyal dönüştürülebilirliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Tek yanıtla dayalı optimizasyon koşullarında Şekil 4.8’de ( $X_1 = 3$  h,  $X_2 = \%10$ ,  $X_3 =$

1.24747:10) elde edilen hidrolizat kullanılarak yürütülen fermantasyonda, ksiloz konsantrasyonunun süre boyunca değişmediği ve ksilitol üretiminin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Bu durum, söz konusu hidrolizatın fenolik bileşikler ve furfural gibi inhibitörleri belirgin düzeyde içermesi nedeniyle maya metabolizmasının baskılandığını göstermektedir. Saf ksiloz içeren kontrol fermantasyonunda ise Şekil 4.9, ksilozun düzenli olarak tüketildiği ve ksilitol sentezinin zamana bağlı olarak arttığı gözlenmiş, böylece kullanılan *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728 suşunun ksilitol üretim kapasitesi ve fermantatif etkinliği doğrulanmıştır.

Çoklu yanıt optimizasyonu ile belirlenen koşullarda Şekil 4.10 ( $X_1 = 3$  h,  $X_2 = \%7.92$ ,  $X_3 = 1.5:10$ ) elde edilen hidrolizatla gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde ise ksiloz tüketiminin gerçekleştiği ve ksilitol üretiminin başladığı tespit edilmiştir. Ksiloz tüketim hızı ve ksilitol birikimi kontrol ortamına göre daha düşük olmakla birlikte, tek yanıt dayalı optimizasyon koşullarında elde edilen hidrolizattan çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, yalnızca ksiloz konsantrasyonuna odaklı optimizasyonun fermantasyon açısından yeterli olmadığını, ön işlem koşullarının inhibitör oluşumunu minimize edecek şekilde çoklu yanıt yaklaşımıyla optimize edilmesinin zorunlu olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, çalışmanın devam eden fermantasyon aşamalarında çoklu optimizasyon ile belirlenen koşullar tercih edilmiştir.

Fermantasyon süreci sonunda, ksilitol üretimi değerlendirilmiş ve elde edilen veriler üzerinden çeşitli fermantasyon kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Bu kapsamda; ürün verimi ( $Y_{P/S}$ , g/g), substrat dönüşüm oranı (%), teorik verim yüzdesi (%) ve hacimsel verimlilik ( $g/L \cdot h$ ) gibi önemli parametreler hesaplanmıştır (Bağder 2008). Hesaplamalarda, 1 mol ksilozdan (150 g/mol) teorik olarak 0.9 mol ksilitol (152 g/mol) oluşabileceği dikkate alınarak, maksimum teorik verimin 0.91 g ksilitol/g ksiloz olduğu referans alınmıştır.

Tek yanıt göre optimize edilen koşullarda elde edilen hidrolizat, inhibitör içeriğinin yüksek olması nedeniyle maya tarafından metabolize edilememiş ve ksilitol üretimi gerçekleşmemiştir; oysa saf ksiloz kontrolünde düzenli ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumu gözlenerek suşun üretim kapasitesi doğrulanmıştır. Çoklu yanıt

optimizasyonu ile elde edilen hidrolizatta ise inhibitör seviyeleri azaldığından ksiloz tüketimi ve ksilitol üretimi başlamış, bu da fermantasyon için yalnızca ksiloz verimine değil inhibitör oluşumuna da odaklanan çoklu optimizasyonun gerekliliğini göstermiştir.

Çoklu yanıt optimizasyonu ile belirlenen koşullarda Şekil 4.10 ( $X_1 = 3$  h,  $X_2 = \%7.92$ ,  $X_3 = 1.5:10$ ) elde edilen hidrolizatla gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde, 168. saat sonunda ksilitol konsantrasyonu 9.999 g/L olarak belirlenmiştir. Bu değer, teorik verimle karşılaştırıldığında % 48.3 verim seviyesine karşılık gelmektedir. Hesaplanan ürün verimi ( $Y_{P/S}$ ) 0.44 g ksilitol/g ksiloz, substrat dönüşüm oranı %96.9, hacimsel verimlilik ise 0.060 g/L·h olarak bulunmuştur. Bu değerler, *Barnettozyma populi* suşunun hidrolizat üzerinde ksilitol üretim kapasitesinin orta düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu değerler, Saha vd. (2021) tarafından bildirilen yaklaşık %50 düzeyindeki verimle uyumlu olup, kullanılan *Barnettozyma populi* suşunun lignoselülozik hidrolizat ortamında ksilitol üretimi açısından uygun bir biyokatalizör olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Canatar ve ark. (2024) tarafından saf veya düşük inhibitörlü sentetik ortamlarda elde edilen 0.40–0.47 g/g aralığındaki verimlerle uyumludur. Dolayısıyla bu çalışma, *B. populi* suşunun verimli ksilitol üretiminin yalnızca yüksek ksiloz konsantrasyonu ile değil, aynı zamanda inhibitör seviyelerinin minimize edilmesiyle mümkün olabileceğini göstermektedir.

Canatar ve ark.'nın (2024) farklı lignoselülozik hidrolizatlarda elde ettiği en yüksek ksilitol değerinin 2.26 g/L ile sınırlı kalması, lignoselülozik kaynaklardan doğrudan ksilitol üretiminin inhibitör baskısı nedeniyle zor olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında çoklu optimizasyon ile 10 g/L seviyesine yaklaşan ksilitol üretimi gerçekleştirilmiş olması, uygun ön işlem ve inhibitör azaltma stratejilerinin süreci önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu sonuçlar, *B. populi*'nin diğer çalışmalarla kıyaslandığında Antep fıstığı kabuğu hidrolizatını da verimli bir şekilde değerlendirebildiğini ortaya koymaktadır.

Rambo vd. (2013) yılında yaptığı çalışmada pirinç kabuğu hemiselülozik hidrolizatından elde edilen ksiloz (90g/L) kullanılarak *Candida guilliermondii* ve *Candida tropicalis* suşlarıyla farklı ön işlem koşulları altında ksilitol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir.



Fermantasyon ortamı pH değeri; 4.5'e ayarlanmış, 30 °C sıcaklıkta ve 200 rpm'de çalkalanarak 106 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen en yüksek ksilitol üretimi, %10 amonyum hidroksit çözeltisi ile ön işlem uygulanmış örnekte 526 mg/L ksilitol, %64 fermantasyon verimliliği ( $\eta$ ) ve 0.60 g/g YP/S değeri ile raporlanmıştır. Hidrojen peroksit ile ön işlemde ise verim %66, YP/S 0.62 g/g, sonikasyonla yapılan ön işlemde %62 verim ve 0.59 g/g  $Y_{P/S}$  elde edilmiştir. Ön işlem uygulanmamış kontrol örneklerinde ise bu değerler belirgin şekilde düşmüş; *Candida guilliermondii* suşu ile sadece 89.2 mg/L ksilitol (%40 verim), *Candida tropicalis* suşu ile ise 13.1 mg/L ksilitol (%7.7 verim) üretilebilmiştir (Rambo vd. 2013).

Hazal ve ark. (2024) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Candida tropicalis* ATCC 13803 maya suşu kullanılarak, bioreaktörde ksilozdan ksilitol üretimi gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmada, öncelikle maya kültürü uygun besiyerinde (%5 yeast extract, %5  $(NH_4)_2SO_4$ , %2  $KH_2PO_4$ , %0.5  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ve %1 pepton) 48 saat boyunca 30 °C'de, 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde üretilmiş ve ardından santrifüj ile hücreler ayrılarak fermantasyona hazır hale getirilmiştir. Ksilitol üretimi amacıyla hazırlanan ortam, 100 g/L ksiloz içeren hidrolizatla zenginleştirilmiş ve 750 mL çalışma hacmine sahip, 2 L hacimli bir biyoreaktörde yürütülmüştür. Kültür ortamına antifoam (Sixin SX-48-C) eklenmiş, pH sterilizasyon öncesinde hedef değere göre ayarlanmış ve ortam 121 °C'de sterilize edilmiştir (Hazal vd. 2025). Çalışmada, Box–Behnken deneysel tasarımına göre sıcaklık (25–35 °C), pH (4–6) ve havalandırma oranı (0.4–1.2 vvm) değişkenleri kullanılarak toplam 17 deneme gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek ksilitol verimi %92.63, 35 °C sıcaklık, pH 5.0 ve 1.2 vvm havalandırma oranında elde edilmiştir. Bununla birlikte, 30 °C ve pH 5.0'da yapılan merkezi koşullarda da %88.77–89.29 arasında oldukça yüksek ksilitol verimleri raporlanmıştır. Genelde, sıcaklığın artırılması ve uygun havalandırma koşulları ile birlikte, fermantasyon veriminin anlamlı düzeyde yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *Candida tropicalis* suşunun uygun fermantasyon parametreleri altında oldukça yüksek ksilitol verimi sağlayabildiğini göstermektedir. Ayrıca, Response Surface Methodology (RSM) kullanılarak yapılan deneysel optimizasyon sayesinde, proses değişkenlerinin etkisi istatistiksel olarak modellenmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir (Hazal vd. 2025).

## 5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- Antep fıstığı kabuğunun yaklaşık %50 oranında karbonhidrat içermesi ve nispeten düşük lignin seviyesine sahip olması, bu biyokütleyi hemiselülozik şeker eldesi ve ksilitol üretimi açısından uygun bir hammadde hâline getirmiştir.
- Ultrases destekli seyreltik asit ön işleminde süre, asit derişimi ve katı:çözücü oranının etkileri Box–Behnken tasarımı ile değerlendirilmiş; ksiloz konsantrasyonu, HMF, furfural ve toplam fenolik madde için istatistiksel olarak anlamlı modeller oluşturulmuştur ( $R^2$  değerleri  $\geq$  %90).
- Ön işlem süresi, ksiloz konsantrasyonu üzerinde en belirleyici parametre olurken; asit konsantrasyonu ve katı:çözücü oranı hem şeker eldesini hem de inhibitör oluşumunu önemli ölçüde etkilemiştir. Ksiloz konsantrasyonu 1.4–17.8 g/L aralığında değişmiş, HMF ve furfural düzeyleri ise genel olarak düşük kalmıştır.
- Tek yanıt dayalı optimizasyonda yalnızca ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi hedeflenmiş ve 3 saat süre, %10  $H_2SO_4$  ve 1.247:10 katı:çözücü oranı optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Ancak bu koşullarda fenolik bileşikler ve parçalanma ürünlerinin yüksek olması nedeniyle hidrolizat fermantasyona uygun bulunmamıştır.
- Çoklu yanıt optimizasyonunda ksiloz konsantrasyonunun maksimize edilmesi ve inhibitör oluşumunun minimize edilmesi birlikte ele alınmış; 3 saat, %7.92  $H_2SO_4$  ve 1.5:10 katı:çözücü oranı en uygun koşullar olarak belirlenmiş ve fermantasyona daha uygun bir hidrolizat elde edilmiştir.
- Aktif kömür ile gerçekleştirilen arıtma işlemi sonucunda, her iki hidrolizatta da inhibitör bileşikler önemli ölçüde azaltılmış; özellikle tek yanıt dayalı koşullarda toplam fenolik madde içeriği 6.43'ten 0.94 mg GAE/g seviyesine düşmüştür.

- Konvansiyonel asit ön işleminde yüksek katı geri kazanım (%87.38) ve düşük ksiloz konsantrasyonu (1.383 g/L) elde edilmiş; bu durum yöntemin hemiselüloz hidrolizi açısından yetersiz olduğunu göstermiştir.
- Fermantasyon denemelerinde tek yanıtı dayalı hidrolizatla ksiloz tüketimi ve ksilitol oluşumu gözlenmemiş; inhibitör bileşiklerin maya metabolizmasını baskıladığı belirlenmiştir. Saf ksiloz içeren kontrol denemelerinde ise yüksek ksilitol üretimi elde edilmiştir (8.689 g/L, YP/S = 0.641 g/g).
- Çoklu optimizasyonla elde edilen hidrolizat kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyonda 9.999 g/L ksilitol, 0.44 g/g ürün verimi, %96.9 substrat dönüşümü ve %48.3 teorik verim elde edilmiştir.
- Sonuç olarak, yalnızca ksiloz konsantrasyonuna odaklanan optimizasyonun fermantasyon açısından yeterli olmadığı; hem şeker eldesi hem de inhibitör baskılanmasını birlikte ele alan çoklu yanıt optimizasyonunun zorunlu olduğu ortaya konmuştur. Ultrason destekli seyreltik asit ön işlemi, uygun şekilde optimize edildiğinde ksilitol üretimi için etkili ve sürdürülebilir bir ön işlem stratejisi sunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abril, J. R., Stull, J. W., TAYLOR, R. R., ANGUS, R. C., & DANIEL, T. C. (1982). Characteristics of frozen desserts sweetened with xylitol and fructose. *Journal of Food Science*, 47(2), 472–475.
- Adıgüzel, A. O. (2013). Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Sakarya University Journal of Science*, 17(3), 381–397.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29 (6), 675-685.
- Ahuja, V., Macho, M., Ewe, D., Singh, M., Saha, S., & Saurav, K. (2020). Biological and pharmacological potential of xylitol: a molecular insight of unique metabolism. *Foods*, 9(11), 1592.
- Ak, B., Karadag, S., & Sakar, E. (2016). Pistachio production and industry in Turkey: current status and future perspective.
- Akpınar, O., Sabancı, S., Levent, O., & Sayaslan, A. (2012). Evaluation of antioxidant activity of dilute acid hydrolysate of wheat straw during xylose production. *Industrial Crops and Products*, 40, 39–44.
- Álvarez del Castillo-Romo, A., Morales-Rodriguez, R., & Román-Martínez, A. (2018). Multiobjective optimization for the socio-eco-efficient conversion of lignocellulosic biomass to biofuels and bioproducts. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20, 603–620.
- Ammons, M. C. B., Ward, L. S., & James, G. A. (2011). Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *International wound journal*, 8(3), 268–273.
- Arcaño, D. (2018). Y. Delgado Arcaño, OD Valmaña García, D. Mandelli, WA Carvalho, LA Magalhães Pontes Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catal. Today*.
- Artık, N., Velioglu, S., & Kavalcı, B. (1993). Şeker alkollerden ksilitol; özellikleri üretimi ve gıdalarda kullanımı. *Gıda*, 18(2).
- Ashokkumar, M. (2011). The characterization of acoustic cavitation bubbles—an overview. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 864–872.
- Azadedel, S., Hanachi, P., & Saboor, A. (2021). Antioxidant activity and phenolic compound profile of pistachio skins (*Pistacia vera* L., cultivars Kallehghuchi and Ohadi). *Hormozgan Med. J.*, 25(4), 180–186.
- Bağder Elmacı, S., & Özçelik, F. (2018). Ionic liquid pretreatment of yellow pine followed by enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnology Progress*, 34(5), 1242–1250.
- Bajpai, P. (2020). *Developments in bioethanol*. Springer Nature.
- Bajpai, P. (2021). *Lignocellulosic Biomass in Biotechnology*. Elsevier.

- Balakrishnaraja, R., Ramalingam, P., Nithiyaa, J. S., & Nithya, S. (2015). Comparison of xylitol production from the isolated strain of *Candida Se*, in statistically optimized modified minimal medium and corncob hydrolyzate medium [Article]. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 17, 45–49.
- Barbosa, M. F., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H., & Lee, H. (1988). Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 3(4), 241–251.
- Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., & Bellocco, E. (2016). Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) hulls. *Food chemistry*, 196, 493–502.
- Başçetinçelik, A., Öztürk, H., Kaya, D., Kaçira, K., Ekinci, K., & Karaca, C. (2006). Türkiye’de biyokütle enerjisi kullanımını geliştirme olanakları. VI: *Ulusal Temiz Enerji Sempozyumu*, 25–26.
- Beckers, H. (1988). Influence of xylitol on growth, establishment, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* in dental plaque of rats. *Caries Research*, 22(3), 166–173.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56, 326–338.
- Bhatia, L., Chandel, A. K., Singh, A. K., & Singh, O. V. (2018). Biotechnological advances in lignocellulosic ethanol production. *Sustainable biotechnology-Enzymatic resources of renewable energy*, 57–82.
- Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1984). NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, 19, 256–260.
- Bura, R., Chandra, R. and Saddler, J. 2009. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnology Progress*, 25(2), 315-322.
- Burdurlu, H. S., & Karadeniz, F. (2003). Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. *Food chemistry*, 80(1), 91–97.
- Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R., & Bridgwater, A. V. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and sustainable energy reviews*, 76, 309–322.
- Canatar, M., Yatmaz, H. A., Turhan, I., & Yatmaz, E. (2024). Xylitol production by *Barnettozyma populi* Y-12728 with different immobilization strategies [Article]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 97, Article 103847. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103847>
- Canilha, L., Carvalho, W., Batista, J., & Silva, A. e. (2006). Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9), 1371–1376.
- Canilha, L., Rodrigues, R. d. C. L. B., Antunes, F. A. F., Chandel, A. K., dos Santos Milessi, T. S., Felipe, M. d. G. A., & da Silva, S. S. (2013). Bioconversion of

- hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. In *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-Techniques, applications and commercialization*. IntechOpen.
- Carciochi, R., D'Alessandro, L., Vauchel, P., Rodriguez, M., Nolasco, S., Dimitrov, K., Grumezescu, A., & Holban, A. (2017). Ingredients extraction by physicochemical methods in food. *London: Academic Press*, 4, 191–228.
- Cardona, C. A., Orrego, C. E., & Paz, I. C. (2009). The potential for production of bioethanol and bioplastics from potato starch in Colombia. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 3(1), 102–114.
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Sánchez, O. (2009). Challenges in fuel ethanol production. *International Review of Chemical Engineering*, 1(6), 581–597.
- Chandel, A. K., Da Silva, S. S., & Singh, O. V. (2013). Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *BioEnergy Research*, 6, 388–401.
- Chaudhary, A., Hussain, A., Ahmad, Q.-u.-A., Manzoor, M., Tahira, S. A., & Karita, S. (2022). Statistical optimization of alkaline treatment of pomegranate peel waste for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–13.
- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., & Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160, 196–206.
- Chen, W., Chen, Y., Yang, H., Xia, M., Li, K., Chen, X., & Chen, H. (2017). Co-pyrolysis of lignocellulosic biomass and microalgae: products characteristics and interaction effect. *Bioresource technology*, 245, 860–868.
- Chen, X., Jiang, Z.-H., Chen, S., & Qin, W. (2010). Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), 834.
- Cho, H. M., Gross, A. S., & Chu, J.-W. (2011). Dissecting force interactions in cellulose deconstruction reveals the required solvent versatility for overcoming biomass recalcitrance. *Journal of the American Chemical Society*, 133(35), 14033–14041.
- Choi, J.-A., Hwang, J.-H., Dempsey, B. A., Abou-Shanab, R. A., Min, B., Song, H., Lee, D. S., Kim, J. R., Cho, Y., & Hong, S. (2011). Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent. *Energy & Environmental Science*, 4(9), 3513–3520.
- Chukhray, N. (2018). Substantiation of dental caries prevention in children based on associated risk factors and their influence on the formation of enamel resistance. [in Ukrainian]. *DScD manuscript, University of Lviv*
- Cortivo, P. R. D., Hickert, L. R., Hector, R., & Ayub, M. A. Z. (2018). Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. *Industrial Crops and Products*, 113, 10–18.
- Cunha-Pereira, F. d., Hickert, L., Rech, R., Dillon, A., & Ayub, M. Z. (2017). Fermentation of hexoses and pentoses from hydrolyzed soybean hull into ethanol

- and xylitol by *Candida guilliermondii* BL 13. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(4), 927–936.
- Çağlar, A., & Demirbaş, A. (2001). Conversion of cotton cocoon shell to liquid products by supercritical fluid extraction and low pressure pyrolysis in the presence of alkalis. *Energy Conversion and Management*, 42(9), 1095–1104.
- Çam, T., & Yıldırım, H. K. (2018). Üzümsü meyvelerdeki fenolik bileşiklerin fermantasyon ile değişimi. *Akademik Gıda*, 16(1), 101–108.
- Çelik, İ., & Demirer, G. N. (2015). Biogas production from pistachio (*Pistacia vera* L.) processing waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 767–772.
- Dahiya, J. S. (1991). Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(1), 14–18.
- Dalli, S. S., Da Silva, S. S., Uprety, B. K., & Rakshit, S. K. (2017). Enhanced production of xylitol from poplar wood hydrolysates through a sustainable process using immobilized new strain *Candida tropicalis* UFMG BX 12-a. *Applied biochemistry and biotechnology*, 182, 1053–1064.
- Daneshmandi, M. S., & Seyyedi, S. M. (2019). Nutrient availability and saffron corms growth affected by composted pistachio residues and commercial poultry manure in a calcareous soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(12), 1465–1475.
- Dasgupta, D., Ghosh, D., Bandhu, S., & Adhikari, D. K. (2017). Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IIPE453. *Microbiological research*, 200, 64–72.
- de Albuquerque, T. L., da Silva Jr, I. J., de Macedo, G. R., & Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. *Process Biochemistry*, 49(11), 1779–1789.
- De Caprariis, B., De Filippis, P., Petrullo, A., & Scarsella, M. (2017). Hydrothermal liquefaction of biomass: Influence of temperature and biomass composition on the bio-oil production. *Fuel*, 208, 618–625.
- Demir, F. H., & Akpınar, Ö. (2018). Tütün Saplarından Kombine Otohıroliz ve Enzimatik Hidroliz ile Ksiloz Üretimi. *Akademik Gıda*, 16(1), 1–10.
- Den, W., Sharma, V. K., Lee, M., Nadadur, G., & Varma, R. S. (2018). Lignocellulosic biomass transformations via greener oxidative pretreatment processes: access to energy and value-added chemicals. *Frontiers in chemistry*, 6, 141.
- Deng, L., Wang, Y., Zhang, Y., & Ma, R. (2007). The enhancement of ammonia pretreatment on the fermentation of rice straw hydrolysate to xylitol. *Journal of Food Biochemistry*, 31(2), 195–205.
- Díez, D., Urueña, A., Piñero, R., Barrio, A., & Tamminen, T. (2020). Determination of hemicellulose, cellulose, and lignin content in different types of biomasses by thermogravimetric analysis and pseudocomponent kinetic model (TGA-PKM method). *Processes*, 8(9), 1048.
- Ditzelmüller, G., Kubicek, C., Wöhrer, W., & Röhr, M. (1984). Xylitol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus*. *FEMS microbiology letters*, 25(2-3), 195–198.

- Dominguez, J. M., Cao, N., Gong, C., & Tsao, G. (1997). Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource technology*, 61(1), 85–90.
- Dominguez, J. M., Gong, C. S., & Tsao, G. T. (1997). Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Eighteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 5–9, 1996, at Gatlinburg, Tennessee*,
- Domínguez, J. M., Salgado, J. M., Rodríguez, N., & Cortés, S. (2012). Biotechnological production of xylitol from agro-industrial wastes. *Food additive*, 139–156.
- Du Preez, J., Van Driessel, B., & Prior, B. (1989). D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnology Letters*, 11, 131–136.
- du Preez, J. C., Van Driessel, B., & Prior, B. A. (1989). Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. *Archives of microbiology*, 152, 143–147.
- Erdei, B., Barta, Z., Sipos, B., Réczey, K., Galbe, M. and Zacchi, G. 2010. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. *Biotechnology for Biofuels*, 3(16), 1-9.
- Esfahani, M. R., & Azin, M. (2012). Pretreatment of sugarcane bagasse by ultrasound energy and dilute acid. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7(2), 274–278.
- Fang, Z., & Qi, X. (Eds.). (2017). *Production of platform chemicals from sustainable resources*. Singapore: Springer.
- Farrokhi, H., Eskandari, M. H., Shakerardekani, A., Golmakani, M. T., & Niakousari, M. (2025). Pistachio hull extract as a natural antioxidant incorporated into pistachio paste: Antioxidant activity and oxidative stability. *Applied Food Research*, 100907.
- Fehér, A., Fehér, C., Rozbach, M., Rácz, G., Fekete, M., Hegedűs, L., & Barta, Z. (2018). Treatments of lignocellulosic hydrolysates and continuous-flow hydrogenation of xylose to xylitol. *Chemical Engineering & Technology*, 41(3), 496–503.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure. *Reactions*, 613, 1960–1982.
- Fengel, D., Wegener, G., & Greune, A. (1989). Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using SEM-EDXA and TEM. *Wood Science and Technology*, 23, 123–130.
- Furlan, S., Bouilloud, P., Strehaiano, P., & Riba, J. (1991). Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnology Letters*, 13, 203–206.
- Furlan, S. A. (1991). *Contribution à l'étude de la bioconversion du xylose par les levures Toulouse*].



- Gasmi Benahmed, A., Gasmi, A., Arshad, M., Shanaida, M., Lysiuk, R., Peana, M., Pshyk-Titko, I., Adamiv, S., Shanaida, Y., & Bjørklund, G. (2020). Health benefits of xylitol. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(17), 7225-7237.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775–4800.
- Gírio, F. M., Peito, M. A., & Amaral-Collaco, M. (1989). Enzymatic and physiological study of D-xylose metabolism by *Candida shehatae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 32, 199–204.
- Gong, C.-S., Chen, L. F., & Tsao, G. T. (1981). Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnology Letters*, 3, 125–130.
- Granström, T. (2002). *Biotechnological production of xylitol with Candida yeasts*. Helsinki University of Technology.
- Granström, T. B., Izumori, K., & Leisola, M. (2007a). A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied microbiology and biotechnology*, 74, 277–281.
- Granström, T. B., Izumori, K., & Leisola, M. (2007b). A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Applied microbiology and biotechnology*, 74, 273–276.
- Granström, T. B., Izumori, K., & Leisola, M. (2007). A rare sugar xylitol. Part II: Biotechnological production and future applications of xylitol [Short survey]. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(2), 273–276. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0760-4>
- Gufe, C., Thantsha, M. S., & Malgas, S. (2023). Recovery of xylan from *Acacia mearnsii* using ultrasound-assisted alkaline extraction [Article]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 17(4), 976–987. <https://doi.org/10.1002/bbb.2491>
- Guirimand, G. G. Y., Bamba, T., Matsuda, M., Inokuma, K., Morita, K., Kitada, Y., Kobayashi, Y., Yukawa, T., Sasaki, K., Ogino, C., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2019). Combined Cell Surface Display of  $\beta$ -d-Glucosidase (BGL), Maltose Transporter (MAL11), and Overexpression of Cytosolic Xylose Reductase (XR) in *Saccharomyces cerevisiae* Enhance Cellobiose/Xylose Coutilization for Xylitol Bioproduction from Lignocellulosic Biomass [Article]. *Biotechnology Journal*, 14(9), Article 1800704. <https://doi.org/10.1002/biot.201800704>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2017). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review. *Frontiers in pharmacology*, 8, 419.
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., & Prior, B. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and microbial technology*, 16(11), 933–943.
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic. *Report number:*

ECN-E—10-013. *Energy Research Centre of The Netherlands, Petten, The Netherlands*. [Google Scholar].

- Hasumi, F., Teshima, C., & Okura, I. (1996). Synthesis of xylitol by reduction of xylulose with the combination of hydrogenase and xylulose reductase. *Chemistry letters*, 25(8), 597–598.
- Hazal, F., Özbek, H. N., Göğüş, F., & Yanık, D. K. (2023). Fıstık sert kabuğunun mikrodalga-CO<sub>2</sub> destekli hidroliz sistemi ile ksiloza hidrolizi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*(29), 38–45.
- Hazal, F., Özbek, H. N., Yılmaztekin, M., Göğüş, F., & Koçak Yanık, D. (2025). A sustainable approach for xylitol production from pistachio shell using *Candida tropicalis*. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 19(1), 151–162.
- Hernández-Pérez, A. F., de Arruda, P. V., & de Almeida Felipe, M. d. G. (2016). Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 489–496.
- Hernández-Pérez, A.F., de Arruda, P.V., Sene, L., da Silva, S.S., Chandel, A.K., das Graças de Almeida Felipe, M. 2019. “Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 39, 7, 924–943.
- Hickert, L. R., de Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. (2013). Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource technology*, 143, 112–116.
- Hinfray, C., Jouenne, T., & Junter, G.-A. (1995). Simultaneous fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* coimmobilized in a double-chambered bioreactor. *Proceedings of the 8th European Biomass Conference*,
- Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T., & Watanabe, N. (1992). Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotechnology and bioengineering*, 40(9), 1085–1091.
- Hou, B. H., Wang, J. K., Hao, H. X., Hu, S. H., & Liu, Y. (2006). Crystallization thermodynamics of xylitol [Article]. *Tianjin Daxue Xuebao (Ziran Kexue yu Gongcheng Jishu Ban)/Journal of Tianjin University Science and Technology*, 39(4), 404–407.
- Hu, G., Heitmann, J. A., & Rojas, O. J. (2008). Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *BioResources*, 3(1), 270–294.
- Hu, W., Chen, S., Yang, J., Li, Z., & Wang, H. (2014). Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. *Carbohydrate polymers*, 101, 1043–1060.
- Hu, Z.-H., Liu, S.-Y., Yue, Z.-B., Yan, L.-F., Yang, M.-T., & Yu, H.-Q. (2008). Microscale analysis of in vitro anaerobic degradation of lignocellulosic wastes by rumen microorganisms. *Environmental science & technology*, 42(1), 276–281.
- Huang, Y.-F., Chiueh, P.-T., & Lo, S.-L. (2016). A review on microwave pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Sustainable Environment Research*, 26(3), 103–109.

- Jacob, S. E., & Stechschulte, S. (2008). Formaldehyde, aspartame, and migraines: a possible connection. *Dermatitis*, 19(3), E10.
- Jagtap, S. S., Dhiman, S. S., Jeya, M., Kang, Y. C., Choi, J.-H., & Lee, J.-K. (2012). Saccharification of poplar biomass by using lignocellulases from *Pholiota adiposa*. *Bioresource technology*, 120, 264–272.
- Jain, H., & Mulay, S. (2014). A review on different modes and methods for yielding a pentose sugar: Xylitol. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(2), 135–143.
- Jeffries, T. W. (1981). Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*, 3, 213–218.
- Jeffries, T. W., Choi, S., & Kirk, T. K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 290–296.
- Jia, H., Shao, T., Zhong, C., Li, H., Jiang, M., Zhou, H., & Wei, P. (2016). Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. *Carbohydrate polymers*, 151, 676–683.
- Jolayemi, O., Oke, M. A., Rocha-Meneses, L., & Omojasola, P. F. (2022). Utilization of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia kudriavzevii* for the production of xylitol on undetoxified corn cob hydrolysates [Article]. *Agronomy Research*, 20(1), 188–199. <https://doi.org/10.15159/AR.22.026>
- Jørgensen, H., Kristensen, J. B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2), 119–134.
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103–112.
- Kallsen, C. E., Parfitt, D. E., Maranto, J., & Holtz, B. A. (2009). New pistachio varieties show promise for California cultivation. *California Agriculture*, 63(1).
- Kang, T. Z., Mohammad, S. H., Murad, A. M. A., Illias, R. M., & Jahim, J. M. (2016). Fermentative production of xylitol: A first trial on xylose bifurcation [Article]. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(21), Article 95234. <https://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i21/95234>
- Kapu, N. S., & Trajano, H. L. (2014). Review of hemicellulose hydrolysis in softwoods and bamboo [Review]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(6), 857–870. <https://doi.org/10.1002/bbb.1517>
- Kaur, G., Kaur, P., Kaur, J., Singla, D., & Taggar, M. S. (2024). Xylanase, xylooligosaccharide and xylitol production from lignocellulosic biomass: Exploring biovalorization of xylan from a sustainable biorefinery perspective. *Industrial Crops and Products*, 215, 118610.
- Khan, A. S., Man, Z., Bustam, M. A., Nasrullah, A., Ullah, Z., Sarwono, A., Shah, F. U., & Muhammad, N. (2018). Efficient conversion of lignocellulosic biomass to levulinic acid using acidic ionic liquids. *Carbohydrate polymers*, 181, 208–214.

- Kim, J. S., Lee, Y., & Kim, T. H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 199, 42–48.
- Kim, S.-H., Yun, J.-Y., Kim, S.-G., Seo, J.-H., & Park, J.-B. (2010). Production of xylitol from D-xylose and glucose with recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme and microbial technology*, 46(5), 366–371.
- Kim, S.-Y., Kim, J.-H., & Oh, D.-K. (1997). Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 83(3), 267–270.
- Kresnowati, M., Setiadi, T., Tantra, T. M., & Rusdi, D. (2016). Microbial production of xylitol from oil palm empty fruit bunch hydrolysate: effects of inoculum and pH. *Journal of Engineering and Technological Sciences*, 48(5), 523–533.
- Kruse, B., & Schügerl, K. (1996). Investigation of ethanol formation by *Pachysolen tannophilus* from xylose and glucose/xylose co-substrates. *Process Biochemistry*, 31(4), 389–408.
- Kuglarz, M., Alvarado-Morales, M., Dąbkowska, K., & Angelidaki, I. (2018). Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from rapeseed straw after dilute-acid pretreatment. *Bioresource technology*, 265, 191–199.
- Kumar, K., Singh, E., & Shrivastava, S. (2022). Microbial xylitol production. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(3), 971–979.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb. prot095497.
- Kumdam, H. B., Murthy, S. N., & Gummadi, S. N. (2012). A statistical approach to optimize xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. *Food and Nutrition Sciences*, 3(8), 1027–1036.
- Kunaver, M., Jasiukaitytė, E., & Čuk, N. (2012). Ultrasonically assisted liquefaction of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, 103(1), 360–366.
- Ledezma-Orozco, E., Ruíz-Salazar, R., Bustos-Vázquez, G., Montes-García, N., Roa-Cordero, V., & Rodríguez-Castillejos, G. (2018). Producción de xilitol a partir de hidrolizados ácidos no detoxificados de bagazo de sorgo por *Debaryomyces hansenii*. *Agrociencia*, 52(8), 1095–1106.
- Lee, H., Sopher, C. R., & Yau, K. Y. (1996). Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 65(4), 375–379.
- Lee, J. W., Hawkins, B., Day, D. M., & Reicosky, D. C. (2010). Sustainability: The capacity of smokeless biomass pyrolysis for energy production, global carbon capture and sequestration [Article]. *Energy and Environmental Science*, 3(11), 1695–1705. <https://doi.org/10.1039/c004561f>
- Li, J., Xu, Y., Zhang, M., & Wang, D. (2017). Determination of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural in Biomass Hydrolysate by High-Performance Liquid Chromatography. *Energy & Fuels*, 31, 13769–13774.

- Li, J., Zhang, L., Li, C., He, Z., Yan, X., & Yang, S. (2025). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Xylitol Production [Article]. *Fermentation*, 11(3), Article 131. <https://doi.org/10.3390/fermentation11030131>
- Li, M., Meng, X., Diao, E., & Du, F. (2012). Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(3), 387–392.
- Li, Q., Gao, Y., Wang, H., Li, B., Liu, C., Yu, G., & Mu, X. (2012). Comparison of different alkali-based pretreatments of corn stover for improving enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, 125, 193–199.
- Liu, Y., Guo, L., Wang, L., Zhan, W., & Zhou, H. (2017). Irradiation pretreatment facilitates the achievement of high total sugars concentration from lignocellulose biomass. *Bioresource technology*, 232, 270–277.
- López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., & Mussatto, S. I. (2018). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource technology*, 247, 736–743.
- López-Linares, J. C., Ruiz, E., Romero, I., Castro, E., & Manzanares, P. (2020). Xylitol production from exhausted olive pomace by *Candida boidinii*. *Applied Sciences*, 10(19), 6966.
- Luo, J., Fang, Z., & Smith Jr, R. L. (2014). Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 41, 56–93.
- Ly, K. A., Milgrom, P., & Rothen, M. (2006). Xylitol, sweeteners, and dental caries. *Pediatric dentistry*, 28(2), 154–163.
- Mahjoub, R., Yatim, J. M., Sam, A. R. M., & Hashemi, S. H. (2014). Tensile properties of kenaf fiber due to various conditions of chemical fiber surface modifications. *Construction and Building materials*, 55, 103–113.
- Mäkinen, K. K. (2010). Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review. *International journal of dentistry*, 2010(1), 981072.
- Mäkinen, K. K. (2011). Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. *Medical Principles and Practice*, 20(4), 303–320.
- Maloney, P. C., & Ambudkar, S. V. (1989). Functional reconstitution of prokaryote and eukaryote membrane proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 269(1), 1–10.
- Mareczky, Z., Fehér, A., Fehér, C., Barta, Z., & Réczey, K. (2016). Effects of pH and aeration conditions on xylitol production by *Candida* and *Hansenula* yeasts [Article]. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 60(1), 54–59. <https://doi.org/10.3311/PPch.8116>
- Martínez, E. A., Canettieri, E. V., Bispo, J. A., Giulietti, M., De Almeida e Silva, J. B., & Converti, A. (2015). Strategies for xylitol purification and crystallization: a review. *Separation Science and Technology*, 50(14), 2087–2098.
- Mateo, S., Puentes, J. G., Moya, A. J., & Sánchez, S. (2015). Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. *Bioresource technology*, 190, 1–6.

- McCann, M. C., & Carpita, N. C. (2015). Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4109–4118.
- McCullough, H., Vallecilla-Yopez, L., Wu, Z., & Vakilzadian, H. (2021). Reproduction, Optimization, and Translation of a Dynamic Model of High Biomass Ethanol Fermentation to Support Variable Temperature. IEEE International Conference on Electro Information Technology,
- Medeiros, L. L. d., Silva, F. L. d., Santos, S. F., Madruga, M. S., Melo, D. J. d., & Conrado, L. d. S. (2017). Bioconversion of hydrolyzed cashew peduncle bagasse for ethanol and xylitol production. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21(7), 488–492.
- Misra, S., Raghuwanshi, S., Gupta, P., Dutt, K., & Saxena, R. (2012). Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, 393–402.
- Misra, S., Raghuwanshi, S., & Saxena, R. (2013). Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1596–1601.
- Miura, M., Shimotori, Y., Nakatani, H., Harada, A., & Aoyama, M. (2015). Bioconversion of birch wood hemicellulose hydrolyzate to xylitol. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, 947–955.
- Miura, M., Watanabe, I., Shimotori, Y., Aoyama, M., Kojima, Y., & Kato, Y. (2013). Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Wood Science and Technology*, 47, 515–522.
- Mohagheghi, A., Ruth, M., & Schell, D. J. (2006). Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*, 41(8), 1806–1811.
- Mohamad, N. L., Mustapa Kamal, S. M., & Gliew, A. (2009). Effects of temperature and pH on xylitol recovery from oil palm empty fruit bunch hydrolysate by *Candida tropicalis* [Article]. *Journal of Applied Sciences*, 9(17), 3192–3195. <https://doi.org/10.3923/jas.2009.3192.3195>
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J.-P., & Carrère, H. (2013). Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical reviews in environmental science and technology*, 43(3), 260–322.
- Morsy, F. M., Ismail, I. A., & Ibrahim, S. H. (2016). A cost-effective, temperature dependent, control of H<sub>2</sub> production period by *Escherichia coli* and using waste culture to detoxify the carcinogenic Cr<sup>6+</sup> [Article]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(48), 22775–22785. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.10.085>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673–686.



- Muranaka, Y., Nakagawa, H., Hasegawa, I., Maki, T., Hosokawa, J., Ikuta, J., & Mae, K. (2017). Lignin-based resin production from lignocellulosic biomass combining acidic saccharification and acetone-water treatment. *Chemical Engineering Journal*, 308, 754–759.
- Mussatto, S. I. (2012). Application of xylitol in food formulations and benefits for health. In *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization* (pp. 309–323). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_14)
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, 43(5), 540–546.
- Natah, S. S., Hussien, K. R., Tuominen, J. A., & Koivisto, V. A. (1997). Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men. *The American journal of clinical nutrition*, 65(4), 947–950.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Processes of fermentative production of xylitol—a sugar substitute. *Process Biochemistry*, 30(2), 117–124.
- Novy, V., Krahulec, S., Wegleiter, M., Müller, G., Longus, K., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2014). Process intensification through microbial strain evolution: Mixed glucose-xylose fermentation in wheat straw hydrolyzates by three generations of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [Article]. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), Article 49. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-49>
- Obembe, O. O., Jacobsen, E., Visser, R. G., & Vincken, J.-P. (2006). Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(3), 76–86.
- Olinger, P. M., & Innovations, P. (2001). Tammy Pepper. *Alternative Sweeteners, Revised and Expanded*, 112, 335.
- Örer, K. E., & Yalçın, S. K. (2018). MİKROBİYEL KSİLİTOL ÜRETİMİNDE HEMİSELÜLOZİK HİDROLİZATLARIN KULLANIMI. *Gıda*, 43(1), 151–162.
- Özçimen, D. (2007). Çeşitli bitkisel atıkların karbonizasyon yoluyla değerlendirilmesi.
- Parajó, J. C., Domínguez, H., & Domínguez, J. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource technology*, 65(3), 191–201.
- Patel, M., Patel, H. M., & Dave, S. (2019). Determination of bioethanol production potential from lignocellulosic biomass.
- Pereira, R. S., Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2011). Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*,
- Perez, A. (2016). Fruit and Tree Nuts Outlook: Economic Insight: US Fresh-Market Apples. *FTS-361SA, US Department of Agriculture, Economic Research Service, March*.

- Perlack, R. D. (2005). *Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply*. Oak Ridge National Laboratory.
- Peters, B. (2011). Prediction of pyrolysis of pistachio shells based on its components hemicellulose, cellulose and lignin. *Fuel Processing Technology*, 92(10), 1993–1998.
- Ping, Y., Ling, H.-Z., Song, G., & Ge, J.-P. (2013). Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochemical engineering journal*, 75, 86–91.
- Pleissner, D., Venus, J. 2014. “Agricultural residues as feedstocks for lactic acid fermentation”. Sayfa 247-263. Green Technologies for the Environment. ACS Symposium Series, Washington, DC: American Chemical Society.
- Prakasham, R., Rao, R. S., & Hobbs, P. J. (2009). Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 3(1), 8–36.
- Prasad, S., Malav, M. K., Kumar, S., Singh, A., Pant, D., & Radhakrishnan, S. (2018). Enhancement of bio-ethanol production potential of wheat straw by reducing furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF). *Bioresource Technology Reports*, 4, 50–56.
- Qiang, J., Hongman, Z., Lishi, Y., & He, H. (2010). Dilute acid hydrolysis reaction of biomass hemicellulose [Article]. *Progress in Chemistry*, 22(4), 654–662.
- Queiroz, S. S., Jofre, F. M., Mussatto, S. I., & Felipe, M. D. G. A. (2022). Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess [Article]. *Renewable and sustainable energy reviews*, 154, Article 111789. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111789>
- Rafiqul, I., Sakinah, A., & Zularisam, A. (2015). Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose reductase from *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*, 37, 191–196.
- Rafiqul, I., & Sakinah, A. M. (2013). Processes for the production of xylitol—a review. *Food Reviews International*, 29(2), 127–156.
- Rafiqul, I. S., Mimi Sakinah, A. M., & Zularisam, A. W. (2021). Improvement of enzymatic bioxylitol production from sawdust hemicellulose: optimization of parameters. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(10), 1060–1070.
- Rambo, M. K., Bevilaqua, D. B., Brenner, C. G., Martins, A. F., Mario, D. N., Alves, S. H., & Mallmann, C. A. (2013). Xylitol from rice husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. *Quimica Nova*, 36, 634–639.
- Ramesh, S., Muthuvelayudham, R., Kannan, R. R., & Viruthagiri, T. (2013). Response surface optimization of medium composition for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* var *hansenii* using corncob hemicellulose hydrolysate. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 19(3), 377–384.
- Rao, L. V., Goli, J. K., Gentela, J., & Koti, S. (2016). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Bioresource technology*, 213, 299–310.



- Rao, R. S., Jyothi, C. P., Prakasham, R., Sarma, P., & Rao, L. V. (2006). Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource technology*, 97(15), 1974–1978.
- Rashmi, N., Vishal, A., & Kumar, B. A. (2021). Optimization of Xylose Reductase production from *Citrobacter* sp [Article]. *Research Journal of Biotechnology*, 16(8), 90–97.
- Raud, M., Olt, J., & Kikas, T. (2016). N<sub>2</sub> explosive decompression pretreatment of biomass for lignocellulosic ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 90, 1–6.
- Ravella, S. R., Warren-Walker, D. J., Gallagher, J., Winters, A., & Bryant, D. N. (2022). Addressing key challenges in fermentative production of xylitol at commercial scale: a closer perspective. In *Current Advances in Biotechnological Production of Xylitol: Fermentative Production of Xylitol* (pp. 181–204). Springer.
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2017). Evaluation of ultrasound assisted potassium permanganate pre-treatment of spent coffee waste. *Bioresource technology*, 224, 680–687.
- Rebello, S., Anoopkumar, A., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2020). Sustainability and life cycle assessments of lignocellulosic and algal pretreatments. *Bioresource technology*, 301, 122678.
- Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhosani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., & Mohammadi, A. A. (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199, 117457.
- Riggs, E., Kilpatrick, N., Slack-Smith, L., Chadwick, B., Yelland, J., Muthu, M., & Gomersall, J. C. (2019). Interventions with pregnant women, new mothers and other primary caregivers for preventing early childhood caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(11).
- Rivas, B., Torrado, A., Rivas, S., Moldes, A. B., & Domínguez, J. M. (2007). Simultaneous lactic acid and xylitol production from vine trimming wastes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(8), 1603–1612.
- Roca, E., Meinander, N., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Xylitol production by immobilized recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a continuous packed-bed bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 51(3), 317–326.
- Rocha, M. V. P., Rodrigues, T. H. S., de Albuquerque, T. L., Gonçalves, L. R. B., & de Macedo, G. R. (2014). Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Journal*, 243, 234–243.
- Romero-García, J. M., Fehér, C., Cara, C., Ruiz-Ramos, E., & Castro, E. (2022). Improved xylitol production from olive stones hydrolysates by biological detoxification. *Journal of Cleaner Production*, 336, 130408. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130408>.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279–291.

- Saha, B. C., & Kennedy, G. J. (2021). Optimization of xylitol production from xylose by a novel arabitol limited co-producing *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(8), 761–768.
- Sahoo, D., Ummalyma, S. B., Okram, A. K., Pandey, A., Sankar, M., & Sukumaran, R. K. (2018). RETRACTED: Effect of dilute acid pretreatment of wild rice grass (*Zizania latifolia*) from Loktak Lake for enzymatic hydrolysis. In: Elsevier.
- Saini, J. K., Patel, A. K., Adsul, M., & Singhania, R. R. (2016). Cellulase adsorption on lignin: a roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renewable Energy*, 98, 29–42.
- Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., & Domínguez, J. M. (2012). Effect of nutrient supplementation of crude or detoxified concentrated distilled grape marc hemicellulosic hydrolysates on the xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(1), 1–14.
- Salli, K., Lehtinen, M. J., Tiihonen, K., & Ouwehand, A. C. (2019). Xylitol's health benefits beyond dental health: A comprehensive review [Review]. *Nutrients*, 11(8), Article 1813. <https://doi.org/10.3390/nu11081813>
- Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W.-H., & Tao, Y. (2020). Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: a comprehensive review. *Bioresource technology*, 298, 122476.
- Santos, C. C., de Souza, W., Sant'Anna, C., & Brienzo, M. (2018). Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 111, 193–200.
- Sapci, B. (2012). *Pamuk saplarından antioksidan ve ksilitol üretimi* Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Saravanan, P., Ramesh, S., Jaya, N., & Jabasingh, S. A. (2023). Prospective evaluation of xylitol production using *Dabaryomyces hansenii* var *hansenii*, *Pachysolen tannophilus*, and *Candida guilliermondii* with sustainable agricultural residues [Article]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(4), 2813–2831. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01221-y>
- Sarkar, S., & Adhikari, B. (2000). Lignin-modified phenolic resin: synthesis optimization, adhesive strength, and thermal stability. *Journal of adhesion science and technology*, 14(9), 1179–1193.
- Sarkar, S., Alvarez, V. H., & Saldana, M. D. (2014). Relevance of ions in pressurized fluid extraction of carbohydrates and phenolics from barley hull. *The Journal of Supercritical Fluids*, 93, 27–37.
- Sarrouh, B., & Da Silva, S. S. (2013). Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169, 2101–2110.
- Schröder, R. (1980). Disorders of oxalic acid metabolism in parenteral feeding using xylitol. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 105(28), 997–1001.
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R. A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., & Yu, T.-H. (2008). Use of US croplands for biofuels increases

greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science*, 319(5867), 1238–1240.

- Sehnm, N. T., Hickert, L. R., da Cunha-Pereira, F., de Moraes, M. A., & Ayub, M. A. Z. (2017). Bioconversion of soybean and rice hull hydrolysates into ethanol and xylitol by furaldehyde-tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, and their cofermentations. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7, 199–206.
- Sene, L., Arruda, P., Oliveira, S., & Felipe, M. (2011). Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1141–1146.
- Serna, L. D., Alzate, C. O., & Alzate, C. C. (2016). Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 199, 113–120.
- Seyman, Y. (2023). Farklı Salep Türlerinde Doku Kültürü, Sera ve Tarla Koşullarında Üretim Çalışmaları.
- Shelton, D. R., & Lee, W. J. (2000). Cereal carbohydrates. In *Handbook of cereal science and technology, revised and expanded* (pp. 385–415). CRC Press.
- Silva, A. F. d., Silva, S. S. d., Oliveira, M. G., & Raposo, N. R. B. (2010). Inibição in vitro da aderência de enteropatógenos pelo xilitol.
- Silva, D. D., Felipe, M. G., Mancilha, I. M., Luchese, R. H., & Silva, S. S. (2004). Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 248–254.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass. *Laboratory analytical procedure (LAP)*, 1617(4), 1–16.
- Sluiter, A., & Sluiter, J. (2008). *Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC*. National Renewable Energy Laboratory.
- Somerville, G. A., & Proctor, R. A. (2013). Cultivation conditions and the diffusion of oxygen into culture media: the rationale for the flask-to-medium ratio in microbiology. *BMC microbiology*, 13, 1–2.
- Sreenivas, R. R., Pavanna, J. C., Shetty, P. R., Subba, R. C., Nageshwara, S. P., & Venkateswar, R. L. (2006). Strain improvement of *Candida tropicalis* for the production of xylitol: biochemical and physiological characterization of wild-type and mutant strain CT-OMV5. *Journal of Microbiology*, 44(1), 113–120.
- Steinbach, D., Kruse, A., & Sauer, J. (2017). Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production-a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7, 247–274.
- Su, B., Wu, M., Zhang, Z., Lin, J., & Yang, L. (2015). Efficient production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate using engineered *Escherichia coli* [Article]. *Metabolic Engineering*, 31, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.07.003>

- Subhedar, P. B., Ray, P., & Gogate, P. R. (2018). Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*, 40, 140–150.
- Sun, J.-X., Sun, R., Sun, X.-F., & Su, Y. (2004). Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*, 339(2), 291–300.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1–11.
- Şahin, H. (2002). ODUN VE SELÜLOZDA MEYDANA GELEN RENK DEĞİŞMELERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR. *Turkish Journal of Forestry*, 3(2), 57–70.
- Tada, K., Kanno, T., & Horiuchi, J. I. (2012). Enhanced production of bioxylitol from corn cobs by *Candida magnoliae* [Article]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(30), 10008–10014. <https://doi.org/10.1021/ie202800h>
- Taghizadeh-Alisaraei, A., Assar, H. A., Ghobadian, B., & Motevali, A. (2017). Potential of biofuel production from pistachio waste in Iran. *Renewable and sustainable energy reviews*, 72, 510–522.
- Thancharoen, K., Deeseenthum, S., & Vichitphan, K. (2016). Potential of xylose-fermented yeast isolated from sugarcane bagasse waste for xylitol production using hydrolysate as carbon source. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 38(5).
- Thapa, S. S., Shrestha, S., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2022). Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Through Ultrasound-Assisted Alkaline Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis Followed by Fermentation [Article]. *Sugar Tech*, 24(4), 1135–1146. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-01066-3>
- Thomsen, A. B., ve Schmidt, A. S. (1999). Further development of chemical and biological processes for production of bioethanol: Optimisation of pre-treatment processes and characterisation of products (Risø-R-1110(EN)). Risø National Laboratory.
- Tizazu, B. Z., Roy, K., & Moholkar, V. S. (2018). Mechanistic investigations in ultrasound-assisted xylitol fermentation. *Ultrasonics sonochemistry*, 48, 321–328.
- Umai, D., Kayalvizhi, R., Kumar, V., & Jacob, S. (2022). Xylitol: bioproduction and applications-a review. *Frontiers in Sustainability*, 3, 826190.
- Ur-Rehman, S., Mushtaq, Z., Zahoor, T., Jamil, A., & Murtaza, M. A. (2015). Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(11), 1514–1528.
- Vallejos, M. E., & Area, M. C. (2017). Xylitol as bioproduct from the agro and forest biorefinery. In *Food Bioconversion* (pp. 411–432). Elsevier.
- Vallejos, M. E., Chade, M., Mereles, E. B., Bengoechea, D. I., Brizuela, J. G., Felissia, F. E., & Area, M. C. (2016). Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 91, 161–169.

- Van Reis, R., & Zydney, A. (2001). Membrane separations in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 208–211.
- Varqani, N. A., & Bastian, F. (2023). Review: Utilization of cellulose in food products. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Vaz de Arruda, P., dos Santos, J. C., de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues, R., da Silva, D. D. V., Yamakawa, C. K., de Moraes Rocha, G. J., Júnior, J. N., da Cruz Pradella, J. G., Vaz Rossell, C. E., & das Graças de Almeida Felipe, M. (2017). Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037 [Article]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 47, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.046>
- Velmurugan, R., ve Muthukumar, K. (2011). Ultrasound-assisted acid hydrolysis of biomass: A review. *Bioresource Technology*, 102(3), 2764–2770.
- Velmurugan, R., & Muthukumar, K. (2011). Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. *Bioresource technology*, 102(14), 7119–7123.
- Veluchamy, C., Kalamdhad, A. S., & Gilroyed, B. H. (2018). Advanced pretreatment strategies for bioenergy production from biomass and biowaste. *Handbook of environmental materials management*, 1–19.
- Veluchamy, C., Raju, V. W., & Kalamdhad, A. S. (2018). Electrohydrolysis pretreatment for enhanced methane production from lignocellulose waste pulp and paper mill sludge and its kinetics. *Bioresource technology*, 252, 52–58.
- Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2018). Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 453–461.
- Wannawilai, S., Lee, W.-C., Chisti, Y., & Sirisansaneeyakul, S. (2017). Furfural and glucose can enhance conversion of xylose to xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. *Journal of biotechnology*, 241, 147–157.
- Winkelhausen, E., & Kuzmanova, S. (1998). Microbial conversion of D-xylose to xylitol [Review]. *Journal of fermentation and Bioengineering*, 86(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80026-3](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80026-3)
- Woiciechowski, A. L., Neto, C. J. D., de Souza Vandenberghe, L. P., de Carvalho Neto, D. P., Sydney, A. C. N., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Torres, L. A. Z., & Soccol, C. R. (2020). Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance—Conventional processing and recent advances. *Bioresource technology*, 304, 122848.
- Yablochkova, E., Bolotnikova, O., Mikhailova, N., Nemova, N., & Ginak, A. (2004). The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium. *Microbiology*, 73, 129–133.
- Yadav, J., Ray, S., Soni, M., & Kashyap, B. K. (2023). Microbial Fermentation System for the Production of Biopolymers and Bioenergy from Various Organic Wastes and By-Products. In *Current Research Trends and Applications in Waste Management* (pp. 307–339). [https://doi.org/10.1007/978-981-99-3106-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-99-3106-4_12)

- Yi, E.-Y., & Kim, Y.-J. (2013). Xylitol inhibits in vitro and in vivo angiogenesis by suppressing the NF- $\kappa$ B and Akt signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 43(1), 315–320.
- Yu, J., Paterson, N., Blamey, J., & Millan, M. (2017). Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Fuel*, 191, 140–149.
- Yüksel, M., & Yüksel, A. K. (2019). Katil Mayalar ve Williopsis spp.'nin Bozucu Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkisi, Katil Toksinlerin Kullanım Olanakları. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 12(1), 170–184.
- Zappala, M., Fallico, B., Arena, E., & Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food control*, 16(3), 273–277.
- Zhang, C., Zong, H., Zhuge, B., Lu, X., Fang, H., & Zhuge, J. (2015). Production of xylitol from D-xylose by overexpression of xylose reductase in osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, 1511–1527.
- Zhang, H., Xu, X., & Jin, Z. (2012). Fermentation characteristics of resistant starch from maize prepared by the enzymatic method in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1185–1188.
- Zhang, J., Geng, A., Yao, C., Lu, Y., & Li, Q. (2012). Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. *Bioresource technology*, 105, 134–141.
- Zhang, J., Zhang, B., Wang, D., Gao, X., & Hong, J. (2014). Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource technology*, 152, 192–201.
- Zheng, Y., Yu, X., Zeng, J., & Chen, S. (2012). Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for biofuels*, 5, 1–10.

## **EKLER**

**EK1 İyon Değişim Kromatografisinden Elde Edilen Standart Monosakkarit Kromatogramı Örneği ve Monosakkarit Standart Kurve Örnekleri**

**EK 2 Gallik Asit Standart Eğrisi**

**EK 3 HMF ve Furfural Standart Eğrileri**

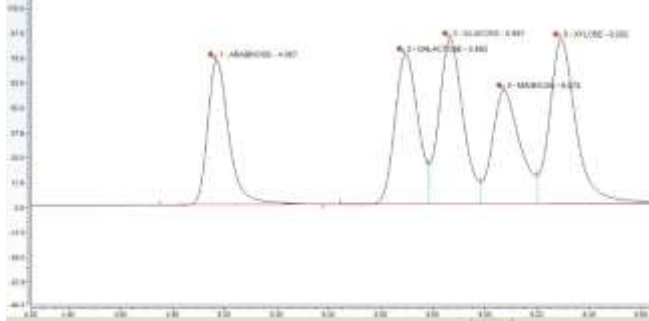
**EK 4 Ksilitol Standart Eğrisi**

**EK 5 Ön İşlem Parametreleri Olan Süre ( $X_1$ ), Asit Konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve Katı/Sıvı Oranının ( $X_3$ ), Glukan (%), Ksilan (%), Asitte Çözünmeyen Lignin (%) ve Asitte Çözünen Lignin (%) Üzerindeki Etkilerine ait Varyans Analiz Tabloları**

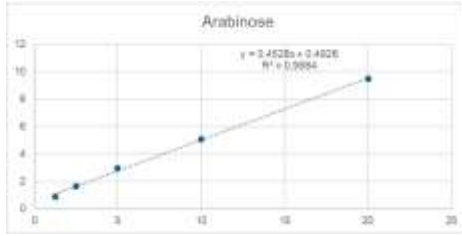
**EK 6 Ön İşlem Parametreleri Olan Süre ( $X_1$ ), Asit Konsantrasyonu ( $X_2$ ) ve Katı/Sıvı Oranının ( $X_3$ ) Katı Geri Kazanım Verimi (%) Üzerine Etkisine Ait Varyans Analiz Tablosu**



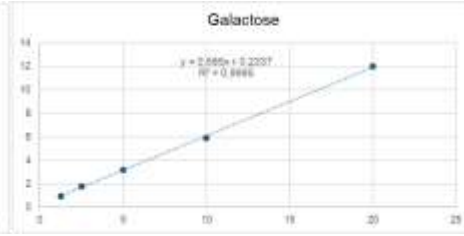
## EK 1 İyon Değişim Kromatografisinden Elde Edilen Standart Monosakkarit Kromatogramı Örneği ve Monosakkarit Standart Kurve Örnekleri



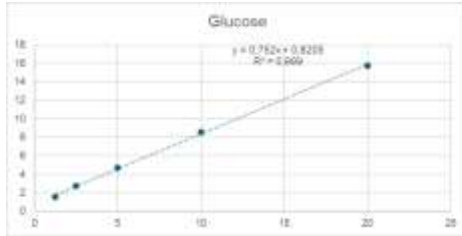
İyon değişim kromatografisi standart monosakkarit kromatogramı



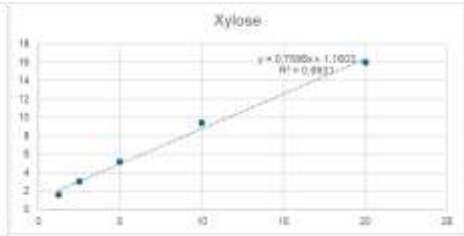
(a)



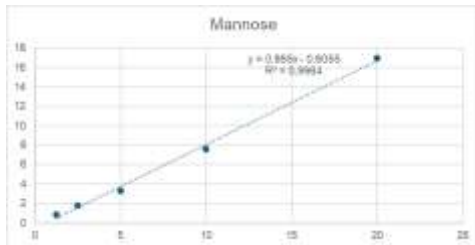
(b)



(c)



(d)

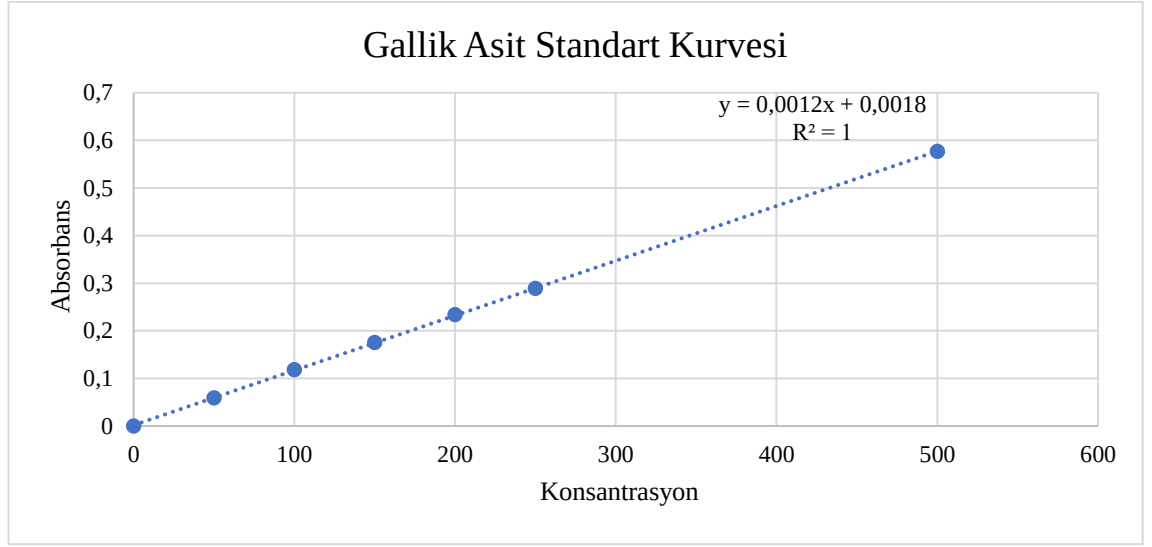


(e)

(a-e) Monosakkarit standart kurve örnekleri

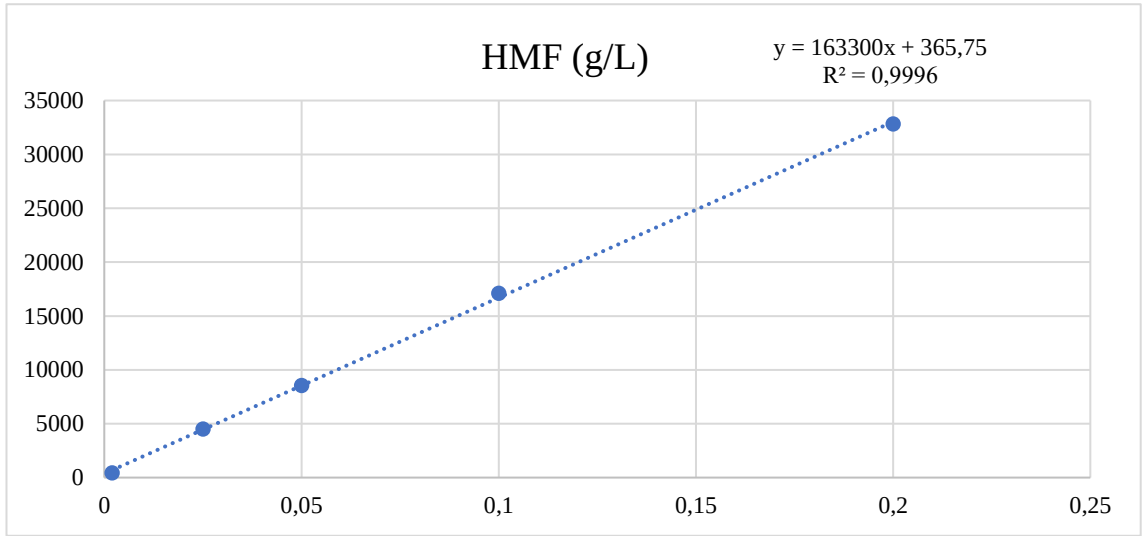


## EK 2 Gallik Asit Standart Eğrisi

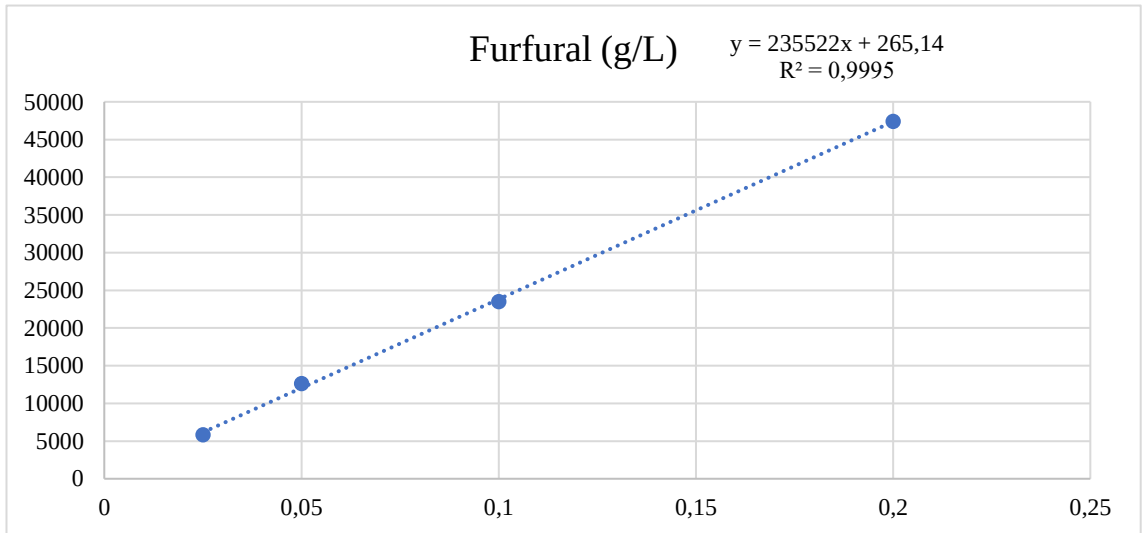


Gallik asit standart eğrisi

### EK 3 HMF ve Furfural Standart Eğrileri

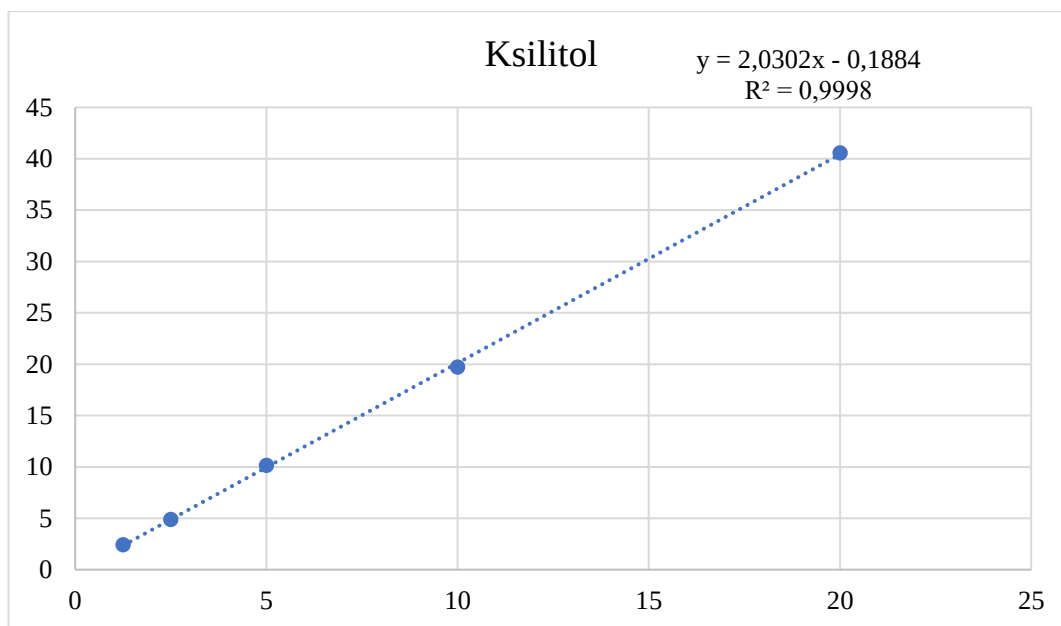


HMF standart eğrisi (g/L)



Furfural standart eğrisi (g/L)

#### EK 4 Ksilitol Standart Eğrisi



Ksilitol standart eğrisi (mg/L)

**EK 5 Ön İşlem Parametreleri Olan Süre (X<sub>1</sub>), Asit Konsantrasyonu (X<sub>2</sub>) ve Katı/Sıvı Oranının (X<sub>3</sub>), Glukan (%), Ksilan (%), Asitte Çözünmeyen Lignin (%) ve Asitte Çözünen Lignin (%) Üzerindeki Etkilerine ait Varyans Analiz Tabloları**

**Glukan (%) ANOVA**

| Source      | DF | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|-------------|----|---------|---------|-------|-------|
| Model       | 9  | 125.104 | 13.9004 | 3.46  | 0.093 |
| Linear      | 3  | 90.044  | 30.0147 | 7.47  | 0.027 |
| Factor A    | 1  | 0.611   | 0.6105  | 0.15  | 0.713 |
| Factor B    | 1  | 79.443  | 79.443  | 19.78 | 0.007 |
| Factor C    | 1  | 9.990   | 9.9905  | 2.49  | 0.176 |
| Square      | 3  | 23.586  | 7.8620  | 1.96  | 0.239 |
| A*A         | 1  | 9.369   | 9.3688  | 2.33  | 0.187 |
| B*B         | 1  | 10.886  | 10.8863 | 2.71  | 0.161 |
| C*C         | 1  | 1.586   | 1.5861  | 0.39  | 0.557 |
| Interaction | 3  | 11.474  | 3.8245  | 0.95  | 0.483 |
| A*B         | 1  | 5.130   | 5.1302  | 1.28  | 0.310 |
| A*C         | 1  | 2.657   | 2.6569  | 0.66  | 0.453 |
| B*C         | 1  | 3.686   | 3.6864  | 0.92  | 0.382 |
| Error       | 5  | 20.085  | 4.0171  |       |       |
| Lack-of-Fit | 3  | 18.294  | 6.0981  | 6.81  | 0.131 |
| Pure Error  | 2  | 1.791   | 0.8956  |       |       |
| Total       | 14 | 145.189 |         |       |       |

**Ksilan (%) ANOVA**

| Source      | DF | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|-------------|----|---------|---------|-------|-------|
| Model       | 9  | 127.802 | 14.2002 | 3.36  | 0.098 |
| Linear      | 3  | 79.716  | 26.5720 | 6.28  | 0.038 |
| Factor A    | 1  | 76.200  | 76.1995 | 18.01 | 0.008 |
| Factor B    | 1  | 2.820   | 2.8203  | 0.67  | 0.451 |
| Factor C    | 1  | 0.696   | 0.6962  | 0.16  | 0.702 |
| Square      | 3  | 42.785  | 14.2617 | 3.37  | 0.112 |
| A*A         | 1  | 9.038   | 9.0385  | 2.14  | 0.204 |
| B*B         | 1  | 36.279  | 36.2792 | 8.57  | 0.033 |
| C*C         | 1  | 0.407   | 0.4072  | 0.10  | 0.769 |
| Interaction | 3  | 5.301   | 1.7669  | 0.42  | 0.748 |
| A*B         | 1  | 3.478   | 3.4782  | 0.82  | 0.406 |
| A*C         | 1  | 0.000   | 0.0001  | 0.00  | 0.996 |
| B*C         | 1  | 1.823   | 1.8225  | 0.43  | 0.541 |
| Error       | 5  | 21.156  | 4.2313  |       |       |
| Lack-of-Fit | 3  | 10.816  | 3.6053  | 0.70  | 0.634 |
| Pure Error  | 2  | 10.340  | 5.1702  |       |       |
| Total       | 14 | 148.958 |         |       |       |

**Asitte Çözünmeyen Lignin (%) ANOVA**

| Source      | DF | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|-------------|----|---------|---------|-------|-------|
| Model       | 9  | 38.1379 | 4.2375  | 8.64  | 0.014 |
| Linear      | 3  | 29.0706 | 9.6902  | 19.75 | 0.003 |
| Factor A    | 1  | 22.5456 | 22.5456 | 45.96 | 0.001 |
| Factor B    | 1  | 5.7122  | 5.7122  | 11.64 | 0.019 |
| Factor C    | 1  | 0.8128  | 0.8128  | 1.66  | 0.254 |
| Square      | 3  | 9.0247  | 3.0082  | 6.13  | 0.040 |
| A*A         | 1  | 0.9777  | 0.9777  | 1.99  | 0.217 |
| B*B         | 1  | 3.0102  | 3.0102  | 6.14  | 0.056 |
| C*C         | 1  | 4.9292  | 4.9292  | 10.05 | 0.025 |
| Interaction | 3  | 0.0426  | 0.0142  | 0.03  | 0.993 |
| A*B         | 1  | 0.0100  | 0.0100  | 0.02  | 0.892 |
| A*C         | 1  | 0.0002  | 0.0002  | 0.00  | 0.984 |
| B*C         | 1  | 0.0324  | 0.0324  | 0.07  | 0.807 |
| Error       | 5  | 2.4529  | 0.4906  |       |       |
| Lack-of-Fit | 3  | 0.1600  | 0.0533  | 0.05  | 0.983 |
| Pure Error  | 2  | 2.2929  | 1.1464  |       |       |
| Total       | 14 | 40.5908 |         |       |       |

**Asitte Çözünen Lignin (%) ANOVA**

| Source      | DF | Adj SS  | Adj MS  | F    | P     |
|-------------|----|---------|---------|------|-------|
| Model       | 9  | 3.40927 | 0.37881 | 1.59 | 0.316 |
| Linear      | 3  | 0.22570 | 0.07523 | 0.32 | 0.814 |
| Factor A    | 1  | 0.06845 | 0.06845 | 0.29 | 0.615 |
| Factor B    | 1  | 0.06480 | 0.06480 | 0.27 | 0.624 |
| Factor C    | 1  | 0.09245 | 0.09245 | 0.39 | 0.560 |
| Square      | 3  | 2.91067 | 0.97022 | 4.08 | 0.082 |
| A*A         | 1  | 0.63846 | 0.63846 | 2.69 | 0.162 |
| B*B         | 1  | 1.83083 | 1.83083 | 7.70 | 0.039 |
| C*C         | 1  | 0.29816 | 0.29816 | 1.25 | 0.314 |
| Interaction | 3  | 0.27290 | 0.09097 | 0.38 | 0.771 |
| A*B         | 1  | 0.00640 | 0.00640 | 0.03 | 0.876 |
| A*C         | 1  | 0.07290 | 0.07290 | 0.31 | 0.604 |
| B*C         | 1  | 0.19360 | 0.19360 | 0.81 | 0.408 |
| Error       | 5  | 1.18877 | 0.23775 |      |       |
| Lack-of-Fit | 3  | 0.33070 | 0.11023 | 0.26 | 0.853 |
| Pure Error  | 2  | 0.85807 | 0.42903 |      |       |
| Total       | 14 | 4.59804 |         |      |       |

**EK 6 Ön İşlem Parametreleri Olan Süre (X<sub>1</sub>), Asit Konsantrasyonu (X<sub>2</sub>) ve Katı/Sıvı Oranının (X<sub>3</sub>) Katı Geri Kazanım Verimi (%) Üzerine Etkisine Ait Varyans Analiz Tablosu**

**SR (%) ANOVA**

| Source      | DF | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|-------------|----|---------|---------|-------|-------|
| Model       | 9  | 673.197 | 74.800  | 16.68 | 0.003 |
| Linear      | 3  | 615.136 | 205.045 | 45.72 | 0.000 |
| Factor A    | 1  | 274.257 | 274.257 | 61.15 | 0.001 |
| Factor B    | 1  | 238.465 | 238.465 | 53.17 | 0.001 |
| Factor C    | 1  | 102.413 | 102.413 | 22.83 | 0.005 |
| Square      | 3  | 45.014  | 15.005  | 3.35  | 0.113 |
| A*A         | 1  | 42.277  | 42.277  | 9.43  | 0.028 |
| B*B         | 1  | 0.664   | 0.664   | 0.15  | 0.716 |
| C*C         | 1  | 4.570   | 4.570   | 1.02  | 0.359 |
| Interaction | 3  | 13.047  | 4.349   | 0.97  | 0.476 |
| A*B         | 1  | 2.481   | 2.481   | 0.55  | 0.490 |
| A*C         | 1  | 8.894   | 8.894   | 1.98  | 0.218 |
| B*C         | 1  | 1.672   | 1.672   | 0.37  | 0.568 |
| Error       | 5  | 22.425  | 4.485   |       |       |
| Lack-of-Fit | 3  | 18.282  | 6.094   | 2.94  | 0.264 |
| Pure Error  | 2  | 4.143   | 2.071   |       |       |
| Total       | 14 | 695.622 |         |       |       |