

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



KESTANE KABUĞU HİDROLİZATI İÇEREN
FERMANTASYON ORTAMINDA *Candida tropicalis* İLE
KSİLİTOL ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA ERYAŞAR

BOLU, ARALIK - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kübra ERYAŞAR tarafından hazırlanan “KESTANE KABUĞU HİDROLİZATI İÇEREN FERMANTASYON ORTAMINDA *Candida tropicalis* İLE KSİLİTOL ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU” adlı tez çalışması 23.12.2016 tarihinde Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman
Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN

Üye
Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ
Hacettepe Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Hande Selen ERGE
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İmza


.....

.....

.....


.....

Prof. Dr. Duran KARAKAŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Aileme,

ETİK BEYAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Kübra ERYAŞAR

ÖZET

**KESTANE KABUĞU HİDROLİZATI İÇEREN FERMANTASYON
ORTAMINDA *Candida tropicalis* İLE KSİLİTOL ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KÜBRA ERYAŞAR
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SEDA KARASU YALÇIN)
BOLU, ARALIK - 2016**

Bu çalışmada, *Candida tropicalis* ile ksilitol üretimi amacıyla, kestane kabuğundan hazırlanan hemiselülozik hidrolizat kullanılmıştır. Öncelikle iki yerli *Candida tropicalis* suşunun zenginleştirilmiş kestane kabuğu hidrolizatındaki ksilitol üretimleri incelenmiştir. Bu aşamada *C. tropicalis* M2 suşu seçilmiştir. Daha sonra, kestane kabuğu hidrolizati içeren ortamda, bu suşun ksilitol üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. Azot kaynağı olarak amonyum klorür seçilmiş ve bağımsız değişkenler olan ksiloz başlangıç derişimi, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının *C. tropicalis* M2'nin üreme ve ksilitol üretimi üzerine birlikte etkileri araştırılmıştır. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, 18 deney içeren bir tasarım oluşturulmuştur. Maksimum ksilitol derişimi, ksilitol verimi, maksimum ksilitol üretim hızı, substrat dönüşüm yüzdesi ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızı üzerine bu bağımsız değişkenlerin etkisi, yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiştir. Substrat dönüşüm yüzdesi hariç diğer yanıtların bağımsız değişkenler ile değişimi karesel model ile, substrat dönüşüm yüzdesinin değişimi ise lineer model ile ifade edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre; amonyum klorür başlangıç derişiminin ksilitol üretimini en fazla etkileyen bağımsız değişken olduğu ve tüm yanıtlar için önemli olduğu bulunmuştur. Ksiloz başlangıç derişiminin lineer etkisinin ise; sadece maksimum ksilitol derişimi için önemli olduğu bulunmuştur. Çalkalama hızının, maksimum ksilitol derişimi ve substrat dönüşüm yüzdesi yanıtları üzerine olan etkisinin oldukça önemli olduğu görülmüştür. Yapılan nümerik optimizasyon ile; ksiloz başlangıç derişiminin 80 g/L, amonyum klorür başlangıç derişiminin 3.761 g/L ve çalkalama hızının 80 vuru/dak olduğu koşullar, optimum koşullar olarak belirlenmiştir. Optimum koşulların birlikte kullanıldığı deneyde, maksimum ksilitol derişimi, ksilitol verimi, maksimum ksilitol üretim hızı, substrat dönüşüm yüzdesi ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızı değerleri sırasıyla 24.50 g/L, %31.517, 0.497 g/L.sa, %97.35 ve 0.06 g/L.sa.N olarak bulunmuşlardır. Bu değerlerin optimizasyon ile öngörülen değerlere oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Ksilitol, *Candida tropicalis*, Kestane Kabuğu Hidrolizati, Yanıt Yüzey Yöntemi, Modelleme, Optimizasyon

ABSTRACT

**OPTIMIZATION OF XYLITOL PRODUCTION BY *Candida tropicalis* IN
FERMENTATION MEDIUM CONTAINING CHESTNUT SHELL
HYDROLYSATE
MSC THESIS
KÜBRA ERYAŞAR
ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SEDA KARASU YALÇIN
BOLU, DECEMBER 2016**

In this study, a hemicellulosic hydrolysate prepared from chestnut shell was used for xylitol production by *Candida tropicalis*. Firstly, xylitol productions of two indigenous *C. tropicalis* strains were investigated in fortified chestnut shell hydrolysate. *C. tropicalis* M2 was selected at this stage. Then, effects of different nitrogen sources on xylitol production of this strain was investigated in the medium containing chestnut shell hydrolysate. Ammonium chloride was selected as nitrogen source and interactive effects of independent variables -initial xylose concentration, initial concentration of ammonium chloride and shaking rate- on the growth and xylitol production of *C. tropicalis* M2 were investigated. An experimental design including 18 experiments was conducted by using central composite design. Modelling the effects of these independent variables on maximum xylitol concentration, xylitol yield, maximum xylitol production rate, percentage of substrate conversion and specific product formation rate was performed by response surface methodology. Variations of all of the responses with the independent variables were defined by a quadratic model except the percentage of substrate conversion. The variation of percentage of substrate conversion with the independent variables was defined by a linear model. According to the results of variance analysis, initial concentration of ammonium chloride was found to be the most important response affecting xylitol production, which was significant for all of the responses. The linear effect of the initial xylose concentration was found as significant for only maximum xylitol concentration. It was observed that the effect of shaking rate was very significant for the maximum xylitol concentration and percentage of substrate conversion. By the numeric optimization performed; the conditions with 80 g/L initial xylose concentration, 3.761 g/L initial concentration of ammonium chloride and 80 strokes/min of shaking rate were determined as optimum conditions. In the experiment in which optimum conditions were used together, maximum xylitol concentration, xylitol yield, maximum xylitol production rate, percentage of substrate conversion and specific product formation rate were found as; 24.50 g/L, 31.517%, 0.497 g/L.h, 97.35% and 0.06 g/L.h.N, respectively. These values were determined as very similar to the predicted values by the optimization.

KEYWORDS: Xylitol, *Candida tropicalis*, Chestnut Shell Hydrolysate, Response Surface Methodology, Modelling, Optimization

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
TEŞEKKÜR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Mikroorganizma.....	31
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	31
3.1.3 Kestane Kabukları.....	31
3.1.3 Ksilitol Üretiminin İncelendiği Deney Düzeneği	31
3.2 Yöntem.....	32
3.2.1 Fermantasyon Ortamına Aşıl原因an Kültürün Hazırlanması.....	32
3.2.2 Kestane Kabuğuna Asit Hidrolizi Uygulanması ve Hidrolizatın İnhibitör Maddelerden Arındırılması.....	32
3.2.3 Maya Sayısının Belirlenmesi	33
3.2.4 Ksilitol Analizi.....	33
3.2.5 Ksiloz Analizi	33
3.2.6 Glukoz ve Fruktoz Analizi.....	34
3.2.7 Toplam Azot Tayini.....	34
3.2.8 Kuru Madde ve Kül Analizi.....	34
3.2.9 Hemiselüloz, Selüloz ve Lignin Analizi	34
3.2.10 Toplam Fenolik Madde Analizi.....	35
3.2.11 Hidroksimetil furfural (HMF) Analizi	36
3.2.12 pH Ölçümü.....	36
3.2.13 Kestane Kabuğu Hidrolizatında İki Yerli Maya Suşunun Ksilitol Üretimlerinin İncelenmesi	36
3.2.14 Kestane Kabuğu Hidrolizatında Farklı Azot Kaynaklarının <i>C. tropicalis</i> M2 Suşunun Ksilitol Üretimine Etkisinin İncelenmesi.....	37
3.2.15 Deney Tasarımının Oluşturulması ve Çeşitli Parametrelerin Ksilitol Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	37
3.2.16 Bağımlı Değişkenlerin (Yanıtların) Hesaplanması.....	38
3.2.16.1 Ksilitol Üretim Hızı	39
3.2.16.2 Ksilitol Verimi	39
3.2.16.3 Substrat Dönüşüm Yüzdesi	39
3.2.16.4 Ürün Özgöl Oluşum Hızı	40

3.2.17	Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi	40
3.2.18	Optimizasyon	41
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1	Kestane Kabuğu ve Hidrolizatına Ait Bazı Kimyasal Özellikler	43
4.2	Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda <i>C. tropicalis</i> M2 ve <i>C. tropicalis</i> M43 Suşlarının Üreme ve Ksilitol Üretimlerinin İncelenmesi	46
4.3	Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda Farklı Azot Kaynaklarının <i>C. tropicalis</i> M2 Suşunun Üreme ve Ksilitol Üretimi Üzerine Etkisi	50
4.4	Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda <i>C. tropicalis</i> M2 Suşunun Üreme ve Ksilitol Üretimi Üzerine Çeşitli Parametrelerin Etkilerinin İncelenmesi	52
4.4.1	Deney Tasarımı ve Yanıtların Oluşturulması	52
4.4.2	Çeşitli Parametrelerin Bağımlı Değişkenler Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi	60
4.4.2.1	Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi	60
4.4.2.2	Ksilitol Verimi Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi	65
4.4.2.3	Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi	68
4.4.2.4	Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi	72
4.4.2.5	Maksimum Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi	76
4.4.3	Optimizasyon	80
4.4.4	Yanıt Yüzey Yöntemi İle Yapılan Modellemelere ve Optimizasyona İlişkin Değerlendirmeler	83
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	87
6.	KAYNAKLAR	90
7.	EKLER	99
	EK A	
	EK B	
	EK C	
	EK D	
	EK E	
	EK F	
	EK G	
8.	ÖZGEÇMİŞ	116

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mikroorganizmalarda Gerçekleşen Ksilitol Üretim Metabolizması...	9
Şekil 4.1. 49 g/L Ksiloz İçeren Kestane Kabuğu Hidrolizatı Ortamında <i>C. tropicalis</i> M2 ve <i>C. tropicalis</i> M43 Suşları için Maya Sayılarının Zamanla Değişimleri	47
Şekil 4.2. 94 g/L Ksiloz İçeren Kestane Kabuğu Hidrolizatı Ortamında <i>C. tropicalis</i> M2 ve <i>C. tropicalis</i> M43 Suşları için Maya Sayılarının Zamanla Değişimleri	48
Şekil 4.3. 49 g/L Ksiloz İçeren Kestane Kabuğu Hidrolizatı Ortamında <i>C. tropicalis</i> M2 ve <i>C. tropicalis</i> M43 Suşları için Ksilitol Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	48
Şekil 4.4. 94 g/L Ksiloz İçeren Kestane Kabuğu Hidrolizatı Ortamında <i>C. tropicalis</i> M2 ve <i>C. tropicalis</i> M43 Suşları için Ksilitol Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	49
Şekil 4.5. Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda Farklı Azot Kaynaklarının <i>C. tropicalis</i> M2 Suşunun Hücre Sayısı Üzerine Etkisi	51
Şekil 4.6. Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda Farklı Azot Kaynaklarının <i>C. tropicalis</i> M2 Suşunun Ksilitol Üretimi Üzerine Etkisi	52
Şekil 4.7. “1-6” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Ksilitol Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	55
Şekil 4.8. “7-12” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Ksilitol Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	56
Şekil 4.9. “13-18” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Ksilitol Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	56
Şekil 4.10. “1-6” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Maya Sayılarının Zamanla Değişimleri	57
Şekil 4.11. “7-12” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Maya Sayılarının Zamanla Değişimleri	57
Şekil 4.12. “13-18” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Maya Sayılarının Zamanla Değişimleri	58
Şekil 4.13. “1-6” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Ksiloz Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	58
Şekil 4.14. “7-12” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Ksiloz Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	59
Şekil 4.15. “13-18” Numaralı Deneyler için Elde Edilen Ksiloz Derişimlerinin Zamanla Değişimleri	59
Şekil 4.16. Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri	63
Şekil 4.17. Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	63
Şekil 4.18. Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	64
Şekil 4.19. Ksilitol Verimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri	67

Şekil 4.20. Ksilitol Verimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	67
Şekil 4.21. Ksilitol Verimi Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	68
Şekil 4.22. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri.....	70
Şekil 4.23. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	71
Şekil 4.24. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri.....	72
Şekil 4.25. Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri	74
Şekil 4.26. Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	75
Şekil 4.27. Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	76
Şekil 4.28. Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri	78
Şekil 4.29. Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	79
Şekil 4.30. Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	79
Şekil 4.31. Optimum Koşullarda Yapılan Deneyde Elde Edilen Ksilitol ve Ksiloz Derişimleri ile Maya Sayılarının Zamanla Değişimleri	82
Şekil B.1. Gallik asit çalışma doğrusu	101
Şekil C.1. Maksimum Ksilitol Derişimi (Y_1) İçin Deneysel Değerlere Karşı Modele Ait Tahminsel Değerler	102
Şekil C.2. Ksilitol Verimi (Y_2) İçin Deneysel Değerlere Karşı Modele Ait Tahminsel Değerler	103
Şekil C.3. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı (Y_3) İçin Deneysel Değerlere Karşı Modele Ait Tahminsel Değerler	103
Şekil C.4. Substrat Dönüşüm Yüzdesi (Y_4) İçin Deneysel Değerlere Karşı Modele Ait Tahminsel Değerler	104
Şekil C.5. Maksimum Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı (Y_5) İçin Deneysel Değerlere Karşı Modele Ait Tahminsel Değerler.....	104
Şekil D.1. Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkisini Gösteren Kontur Grafiği.....	105
Şekil D.2. Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkisini Gösteren Kontur Grafiği	106
Şekil D.3. Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkisini Gösteren Kontur Grafiği.	106
Şekil D.4. Ksilitol Verimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkisini Gösteren Kontur Grafiği... ..	107
Şekil D.5. Ksilitol Verimi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkisini Gösteren Kontur Grafiği	107
Şekil D.6. Ksilitol Verimi Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkisini Gösteren Kontur Grafiği	108

Şekil D.7. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri.....	108
Şekil D.8. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	109
Şekil D.9. Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri.....	109
Şekil D.10. Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri	110
Şekil D.11. Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	110
Şekil D.12. Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	111
Şekil D.13. Maksimum Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorür Başlangıç Derişiminin Etkileri.....	111
Şekil D.14. Maksimum Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri	112
Şekil D.15. Maksimum Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi ve Çalkalama Hızının Etkileri.....	112
Şekil E.1. Design Expert® 9.0.6 Programında Nümerik Optimizasyonda Elde Edilen Çözümlere Ait Görüntü.....	113
Şekil F.1. İstenen Hedefe Ulaşma Fonksiyonunun, Ksiloz Başlangıç Derişimi ve Amonyum Klorürün Başlangıç Derişimi ile Değişimi	114
Şekil G.1. Design Expert® 9.0.6 Programının Doğrulama Menüsü Yardımı ile Elde Edilen Doğrulama Sonuçlarına Ait Görüntü	115

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Hemiselülozik Hidrolizatlar Kullanılarak Ksilitol Üretiminin Gerçekleştirildiği Çeşitli Çalışmalara Ait Bilgiler	26
Çizelge 3.1. Merkezi Karma Tasarımda Kullanılan Bağımsız Değişkenler	38
Çizelge 4.1. Kestane Kabuğuna Ait Bazı Bileşim Özellikleri	44
Çizelge 4.2. Kestane Kabuğu Hidrolizatına Ait Bazı Bileşim Özellikleri	45
Çizelge 4.3. Hidrolizatın İnhibitör Maddelerden Arındırılması ve Konsantre Edilmesi Sırasında Tespit Edilen Toplam Fenolik Madde Miktarları	46
Çizelge 4.4. Merkezi Karma Tasarım Yöntemine Göre Hazırlanan Deney Tasarımında Bağımsız Değişkenlerin Gerçek Değerleri	53
Çizelge 4.5. Merkezi Karma Tasarım Yöntemine Göre Hazırlanan Deney Tasarımında Bağımsız Değişkenlerin Kodlanmış Değerleri	54
Çizelge 4.6. Deneylerde Hesaplanan Maksimum Ksilitol Derişimleri (Y_1), Ksilitol Verimleri (Y_2), Maksimum Ksilitol Üretim Hızları (Y_3), Substrat Dönüşüm Yüzdeleri (Y_4) ve Maksimum Ksilitol Özgül Oluşum Hızları (Y_5)	60
Çizelge 4.7. Ksiloz Başlangıç Derişimi (X_1), Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi (X_2) ve Çalkalama Hızının (X_3) Maksimum Ksilitol Derişimi (Y_1) Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları ..	62
Çizelge 4.8. Ksiloz Başlangıç Derişimi (X_1), Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi (X_2) ve Çalkalama Hızının (X_3) Ksilitol Verimi (Y_2) Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları	66
Çizelge 4.9. Ksiloz Başlangıç Derişimi (X_1), Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi (X_2) ve Çalkalama Hızının (X_3) Maksimum Ksilitol Üretim Hızı (Y_3) Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları	69
Çizelge 4.10. Ksiloz Başlangıç Derişimi (X_1), Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi (X_2) ve Çalkalama Hızının (X_3) Substrat Dönüşüm Yüzdesi (Y_4) Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları ...	73
Çizelge 4.11. Ksiloz Başlangıç Derişimi (X_1), Amonyum Klorür Başlangıç Derişimi (X_2) ve Çalkalama Hızının (X_3) Ksilitol Özgül Oluşum Hızı (Y_5) Üzerine Etkilerine Ait Varyans Analizi Sonuçları	77
Çizelge 4.12. Ksilitol Üretiminin Optimizasyonunda Kullanılan Değişkenler, Belirlenen Hedefler ve Değişkenlerin Minimum ve Maksimum Değerleri	81
Çizelge 4.13. Ksilitol Üretimi İçin Belirlenen Optimum Koşullar ve Yanıtlar İçin Getirilen Yaklaşımlar	82
Çizelge A.1. Deneylerde Kullanılan YM Agarın Bileşen ve Derişimleri	100
Çizelge A.2. Deneylerde Kullanılan Üreme Ortamının Bileşen ve Derişimleri	100

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

Kısaltmalar

ANOVA	: Varyans analizi
ATP	: Adenozin trifosfat
ADP	: Adenozin difosfat
HMF	: Hidroksimetil furfural
KDH	: Ksilitol dehidrogenaz
KK	: Ksiluloz kinaz
K.O.	: Kareler ortalaması
KR	: Ksiloz redüktaz
NAD⁺	: Nikotinamid adenin nükleotid
NADH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
S.D.	: Serbestlik derecesi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

Semboller

A	: Kül miktarı (%)
C_{km}	: Maksimum ksilitol derişimi (Y ₁ ; g/L)
F	: F değeri
G₀	: Başlangıç kestane kabuğu ağırlığı (g)
G₁	: Ekstraksiyon işleminden sonra kalan kalıntı miktarı (g)
G₂	: Hemiselüloz analizi sonucu tartılan kalıntı miktarı (g)
G₃	: Lignin analizi için gerekli kalıntı miktarı (g)
G₄	: Lignin analizi sonucu tartılan kalıntı miktarı (g)
k	: Bağımsız değişken sayısı
N	: Mikroorganizma sayısı [log (cfu/mL)]
P	: Anlamlılık düzeyi
q_p	: Ürün özgül oluşum hızı (Y ₅ ; g/L.sa.N)

R^2	: Belirtme katsayısı
r_k	: Maksimum ksilitol üretim hızı (Y_3 ; g/L.sa)
S	: Substrat derişimi (g/L)
S_0	: Başlangıç substrat derişimi (g/L)
t	: Zaman (sa)
$\ddot{U}$	: Ürün derişimi (g/L)
W_1	: Ekstrakte edilen madde miktarı (%)
W_2	: Hemiselüloz miktarı (%)
W_3	: Lignin miktarı (%)
W_4	: Selüloz miktarı (%)
X	: Mikroorganizma kuru ağırlığı (g/L)
X_1	: Ksiloz başlangıç derişimi (g/L)
X_1^2	: Ksiloz başlangıç derişiminin karesel etkisi
X_1X_2	: Ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişimi etkileşimi
X_1X_3	: Ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızı etkileşimi
X_2	: Amonyum klorür başlangıç derişimi (g/L)
X_2^2	: Amonyum klorür başlangıç derişiminin karesel etkisi
X_2X_3	: Amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızı etkileşimi
X_3	: Çalkalama hızı (vuru/dak)
X_3^2	: Çalkalama hızının karesel etkisi
x_i	: Bağımsız değişkenin kodlanmış değeri
X_j	: Karesel ve lineer modellerdeki lineer ifadeler için bağımsız değişkenin simgesi
X_j	: Karesel ve lineer modellerdeki karesel ifadeler için bağımsız değişkenin simgesi
X_0	: Bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değeri
y	: Karesel ve lineer modellerdeki yanıt değeri
y_s	: Substrat dönüşüm yüzdesi (Y_4 ; %)
$Y_{\ddot{U}}/S_0$	: Ksilitol verimi (Y_2 ; %)
β_{ij}	: Karesel ve lineer modellerdeki iki terimli etkileşim katsayısı
β_j	: Karesel ve lineer modellerdeki lineer katsayı
β_{jj}	: Karesel ve lineer modellerdeki ikinci dereceden katsayı
β_0	: Karesel ve lineer modellerdeki sabit katsayı

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim süresince bana karşı hep yol gösterici olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında kullanılan *Candida tropicalis* suşlarının sağlanmasındaki katkılarından dolayı, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ'a,

Çalışmada, fermantasyon ortamı hazırlığında kullanılan hammadde olan kestane kabuğunun temin edilmesini sağlayan Kafkas Pasta Şekerleme San. Tic. A.Ş. firmasına,

Çalışma esnasında kestane kabuğu ve hidrolizatının kimyasal analizlerinin yapılması sırasındaki yardımlarından dolayı Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Hande Selen ERGE, Doç. Dr. Erkan YALÇIN ve Doç. Dr. Semra TURAN'a,

BAP – 2011.09.01.466 numaralı araştırma projesi ile bu tez çalışmasını destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına,

Çalışmada, döner buharlaştırıcı kullanılarak yapılan hidrolizat konsantrasyonu işlemine katkı sağlayan Yenilikçi Gıda Teknolojileri Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (YENİGIDAM),

Eğitim hayatımda desteği olan tüm değerli hocalarıma ve tez çalışmam süresince verdikleri destekten dolayı araştırma görevlisi çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmalarımın yoğun bir şekilde devam ettiği dönemde, göstermiş olduğu ilgi ve anlayışı için Ali İzzet ÖRER'e; sonsuz sevgi, fedakarlık ve sabırları ile her zaman yanımda olan değerli anneme, babama ve abime teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Ksilitol, sakkaroz benzer tatlılık derecesi, düşük kalori değeri ve antikariyojenik özellikleri nedeni ile gıda ve eczacılık endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan şeker alkollerinde yer almaktadır (Ur Rehman ve ark., 2015). Ayrıca, glisemik indeks değeri sakkaroz göre oldukça düşük olan ve insülin bağımsız olarak metabolize edilen ksilitol, diyabet hastalarına yönelik ürünlerde kullanılabilen alternatif bir tatlandırıcıdır (Grembecka, 2015; Jain ve Mulay, 2014).

Ksilitole duyulan ihtiyacın dünya çapında yaklaşık 160 bin tonu bulunduğu bildirilmekte ve önümüzdeki yıllarda bu ihtiyacın 240 bin tonlara çıkacağı öngörülmektedir (Rao ve ark., 2016). Türkiye’de de ksilitole duyulan ihtiyacın ve buna bağlı olarak ithal edilen ksilitol miktarının her geçen yıl arttığı bilinmektedir. Son on yılda Türkiye’ye ithal edilen ksilitol miktarının yaklaşık beş kat arttığı, 2015 yılında ise; yaklaşık 5 bin ton ksilitol ithal edildiği bildirilmiştir (TÜİK Dış Ticaret İstatistikleri, 2016).

Büyük ölçekli endüstriyel ksilitol üretiminin günümüzde halen kimyasal proseslerle gerçekleştirildiği bilinmekle beraber, bu süreçte yüksek basınç ve sıcaklık koşullarının sağlanması için gereken enerji maliyetlerinin oldukça yüksek olması, kimyasal yöntemlerle ksilitol üretiminin en büyük dezavantajı olarak gösterilmektedir. Bu nedenle, çeşitli lignoselülozik materyallerden hazırlanan ve ksilitol üretimi için gerekli substrat olan ksiloz açısından zengin hemiselülozik hidrolizatların doğal fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı biyoteknolojik yöntemler ile ksilitol üretimi üzerine yapılan çalışmaların son yıllarda arttığı görülmektedir. Sahip oldukları enzim sistemi sayesinde, pentoz fosfat metabolik yolunu kullanarak ksilozu fermente edebilen mikroorganizmaların ksilitol üretiminde kullanılması ile üretim maliyetlerinin önemli ölçüde azaltılabildiği ve yüksek verimlerde ürün elde edilebildiği bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

Biyoteknolojik proseslerin kullanıldığı ksilitol üretimi çalışmalarında, fermantasyon ortamı hazırlığı için, öncelikle selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşan lignoselülozik materyaller, çeşitli seyreltik asit çözeltilerinin kullanıldığı ve

yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen bir hidrolizasyon işlemine tabi tutulmaktadır. Hidrolizasyon sırasında, materyallerdeki hemiselülozik yapıdan ksilozun açığa çıktığı bilinmektedir. Hidrolizasyon işlemi ile ksilozun yanı sıra, glukoz ve fruktoz gibi basit şekerlerin, ayrıca inhibitör özellik göstererek mikroorganizma gelişimini olumsuz yönde etkileyen furfural, hidroksimetil furfural (HMF), fenolik bileşikler ve asetik asit gibi bazı maddelerin oluştuğu belirtilmektedir. Dolayısıyla, elde edilen ksiloz içeriği yüksek hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanılabilmesi için, öncelikle içerdiği inhibitör bileşenlerinden etkin bir şekilde arındırılması gerekmektedir. Bu amaçla, vakum evaporasyonu, iyon değiştirici reçine kullanımı, aşırı alkalileştirme veya pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele işlemlerinden sıklıkla yararlanıldığı görülmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015).

Mikrobiyel ksilitol üretiminde çeşitli bakteri ve mayaların kullanıldığı bilinmekle beraber, *Candida* cinsi mayalardan oldukça yaygın bir şekilde yararlanıldığı ve yüksek miktarlarda ksilitol üretebildiği bildirilmektedir. Ksilitol üretimi ile ilgili yapılan birçok çalışmada, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* ve *Candida athensensis* suşları ile, çok daha yaygın olarak *Candida tropicalis* türüne ait suşların kullanıldığı bilinmektedir (Cheng ve ark., 2010). *C. tropicalis* suşlarının, tütülenmiş jambon, sosis ve az tuzlu domuz pastırması gibi et ürünleri, ev yapımı peynir ve yoğurt gibi süt ürünleri, bazı işlenmiş meyveler ve ayrıca bazı lignoselülozik kaynaklardan izole edilebildikleri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Çorbacı ve ark., 2012; Guamán Burneo ve ark., 2015; Samelis ve Sofos, 2003; Tornai Lehoczki ve ark., 2003). Bu türe ait suşların, ksilitol üretimi yanında; biyoetanol, biyosürefektan, polihidroksibütirat, tek hücre proteini ve riboflavin gibi farklı biyoürünlerin üretiminde de kullanılabildikleri belirtilmektedir (Amornrattanapan, 2013; Priji ve ark., 2013; Gao ve ark., 2012; Swain ve Krishnan, 2015). Mikrobiyel ksilitol üretimi için, gıdalardan izole edilen bir *C. tropicalis* suşunun kullanıldığı çalışmaların çok sınırlı sayıda olduğu bilinmektedir (Eryaşar ve Karasu Yalçın, 2016). Çeşitli lignoselülozik materyallerden izole edilen *C. tropicalis* suşlarının kullanıldığı bazı çalışmalarda ise, hemiselülozik hidrolizatları içeren doğal fermantasyon ortamlarında veya tanımlı ortamlarda bu suşların oldukça yüksek derişimlerde ksilitol üretebildikleri belirtilmiştir (Guamán Burneo ve ark., 2015; Lourenço ve ark., 2014). Literatür incelendiğinde; mısır koçanı (Li ve ark., 2012; Misra ve ark., 2013a), şeker pancarı posası (Castañón Rodríguez ve ark., 2015) ve

pirinç sapı (Deng ve ark., 2007) gibi çeşitli hemiselülozik artıklardan hazırlanan hidrolizatların, *C. tropicalis* kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol üretimi çalışmalarında fermantasyon ortamı olarak değerlendirildiği görülmektedir. Fermantasyon ortamında bulunan karbon ve azot kaynakları ile bu kaynakların ortamdaki derişimleri, kullanılan havalandırma koşulları, sıcaklık ve pH değerleri ile aş derişimi, mikrobiyel ksilitol üretimini etkileyen faktörler arasında yer almaktadır. Ksilitol üretiminde kullanılan suşlara bağılı olarak etkileri değışebilen tüm bu faktörler optimize edildiğinde, yüksek derişimlerde ksilitol elde edilebildiğı bildirilmektedir (Albuquerque ve ark., 2014; Rao ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında, ksilitol üretiminde doğıal fermantasyon ortamı olarak, kestane şekeri üretim artığı olan kestane kabuğundan hazırlanan hidrolizat kullanılmıştır. Dünyada 2011 yılında yaklaşık 2 milyon ton kestane üretimi yapıldığı ve üretimin oldukça büyük bir çoğunluğunun (yaklaşık 1.7 milyon ton) Çin’de gerçekleştiğı ve Çin’in en büyük kestane üreticisi ülke olduğı rapor edilmektedir. Bunun yanında, ülkemiz yaklaşık 60 bin ton kestane üretimi ile, dünyada ikinci sırada yer almaktadır (OGM Kestane Eylem Planı, 2016). Üretilen kestanenin ağırlıklı olarak haşlama ve kavurma şeklinde taze olarak tüketildiğı, belirli bir kısmının ise işlenerek kestane şekeri üretiminde kullanıldığı bildirilmektedir (GEKA raporları, 2009). Yapılan bu çalışmada; kestane kabuğundan seyreltik asit hidrolizasyonu ile hazırlanan ve detoksifikasyon amacıyla alkalileştirme ve aktif kömür uygulamaları gibi işlemlerden geçirilen hidrolizat, *C. tropicalis* ile ksilitol üretiminde substrat kaynağı olarak kullanılmıştır. Öncelikle, iki yerli *C. tropicalis* suşunun bazı bileşenlerce desteklenen kestane kabuğı hidrolizatında ksilitol üretimleri incelenmiştir. Seçilen *C. tropicalis* M2 suşu ile aynı ortamda farklı azot kaynaklarının, suşun üreme ve ksilitol üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Daha sonra, *C. tropicalis* M2 suşu ile, kestane kabuğı hidrolizatı içeren doğıal fermantasyon ortamında, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, farklı parametrelerin ksilitol üretimi üzerine birlikte etkileri incelenmiştir. Çalışmada, parametreler arasındaki etkileşimin belirlenmesi ve yanıtlar üzerine bu parametrelerin etkilerinin modellenmesi amaçlanmıştır. Kestane kabuğı hidrolizatı içeren ortamda, yüksek miktarlarda ksilitol üretimi gerçekleştirilebilmesi amacıyla optimum fermantasyon koşulları belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Ksilitol, ağırlıklı olarak gıda ve eczacılık endüstrilerinde alternatif bir tatlandırıcı olarak kullanılan beş karbonlu bir şeker alkolüdür (Ur Rehman ve ark., 2015). Kimyasal formülü $C_5H_{12}O_5$ olan ksilitolün yoğunluğu 1520 kg/m^3 , erime noktası $92-96^\circ\text{C}$ arasındadır. Beyaz renkli ve kokusuz olan ksilitol kristallerinin suda çözünürlüğünün yüksek, nem çekme özelliğinin ise zayıf olduğu bilinmektedir. Çözünme ısısının negatif olması nedeni ile (yaklaşık -145 kJ/kg) ağıza alındığında ferahlık hissi oluşturmaktadır (Jain ve Mulay, 2014; Mohamad ve ark., 2015).

Ksilitol tüketiminin güvenilir olduğu ilk kez 1984 yılında Avrupa Ekonomik Topluluğu tarafından onaylanmıştır. 1986 yılında ise, ksilitol Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ‘genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS)’ bileşenler sınıfına dahil edilmiştir (Albuquerque ve ark., 2014). Emülsifiye edici, nem tutucu, kıvam arttırıcı ve tatlandırıcı olma fonksiyonları sayesinde, ksilitol gıdalarda E967 kodlu katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Grembecka, 2015). Özellikle son yıllarda, ksilitolün gıda formülasyonlarında daha sıklıkla kullanıldığı bilinmekte ve buna gerekçe olarak ksilitolün sahip olduğu çeşitli olumlu özellikler gösterilmektedir (Mohamad ve ark., 2015).

Sakkaroz ile aynı tatlılık derecesine sahip olmakla birlikte kalori değeri üçte bir oranında daha az olan ksilitol, düşük kalorili ürünlerin üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Ur Rehman ve ark., 2015). Literatürde kek, kurabiye, çikolata ve sakız gibi çeşitli gıdaların kalorisini düşürmeye yönelik olarak, bu gıdaların üretiminde sakkaroz yerine ksilitolün kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Albuquerque ve ark., 2014). Sağlıklı beslenmeye olan ilginin artması ile beraber toplumlar şekersiz ve düşük kalorili gıda ürünlerini tüketmeye yönelmiş, bu durum ksilitol talebinin artmasına yol açmıştır. Dünya genelinde, 2013 yılında yaklaşık 160 bin ton olduğu belirlenen ksilitol tüketiminin 2020 yılı itibari ile 242 bin tona; piyasadaki ekonomik değerinin ise 670 milyon dolardan milyar dolara yükseleceği tahmin edilmektedir (Rao ve ark., 2016).

Endotermik olarak çözünmesi sayesinde ferahlık hissi sağladığından, ksilitol genel olarak sakız, şekerleme ve çikolata gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Albuquerque ve ark., 2014, Mohamad ve ark., 2015). Üretilen ksilitolün oldukça büyük bir çoğunluğunun sakız endüstrisi tarafından kullanıldığı rapor edilmiştir. 2010 yılında üretilen ksilitolün %80'inin sakız endüstrisi tarafından kullanıldığı bildirilmiştir. Toplam ksilitol talebinin %67'sine karşılık gelen yaklaşık 163 bin ton ksilitolün, 2020 yılı itibari ile sakız üretiminde kullanılacağı öngörülmektedir (Rao ve ark., 2016). Ksilitolün serbest aldehit ve keton grupları taşınamaması nedeni ile enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına (Maillard) katılmadığı, bu sayede gıdaların besinsel değerinin korunmasına katkı sağladığı bilinmektedir. Bu özelliği ile karamel, dondurma, jöle, marmelat, şeker, çikolata ve çeşitli içeceklerin üretim proseslerinde kullanılabilir (Albuquerque ve ark., 2014). Ayrıca, ksilitolün su aktivitesini düşürme potansiyeli sakkarozaya göre daha fazla olduğundan, ürünlerin raf ömrünün uzatılmasına etki ettiği bilinmektedir (Winkelhausen ve ark., 2007).

Glisemik indeks değeri sakkarozaya göre oldukça düşük olan ksilitol, insülin bağımsız olarak metabolize edildiğinden, diyabet hastalarının kullanabileceği alternatif bir tatlandırıcı olup, diyabetik ürünlerde yer alabilmektedir (Grembecka, 2015, Jain ve Mulay, 2014). Sahip olduğu antikariyojenik özelliği nedeni ile, ksilitolün diş çürüğüne yol açan mikroorganizma olan *Streptococcus mutans* bakterisi tarafından fermente edilemediği, bu sayede diş çürüğü ve plak oluşumlarının önlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Ksilitol, ağız içi pH'ını yükselterek diş mineralizasyonuna katkı sağlamaktadır (Ur Rehman ve ark., 2015, Albuquerque ve ark., 2014, Grembecka, 2015). Bu nedenlerle, ksilitol diş macunu, ağız çalkalama suyu gibi kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Ayrıca, ksilitolden kulak iltihabı tedavisinde yararlanılmakta, kulak enfeksiyonu geçiren çocuklara ksilitollü sakız çiğnemeleri önerilmektedir. Ksilitolün kalsiyum ve B vitamini emilimini destekleyerek, kemik erimesi hastalığının önüne geçilmesinde de etkili olduğu bildirilmektedir (Grembecka, 2015, Jain ve Mulay, 2014).

Karbonhidrat metabolizmasının bir ara ürünü olarak, memeli hayvanların vücudunda günde 5-15 g kadar ksilitol üretildiği bilinmektedir (Albuquerque ve ark., 2014). Aynı zamanda ksilitol doğada erik, çilek, karnabahar, patlıcan gibi bazı

meyve ve sebzelerde, ayrıca bazı gıda ve tarım endüstrisi artıklarında (fıstık kabuğu, arpa kepeği, mısır koçanı, şekerpancarı posası vb.) oldukça düşük miktarlarda bulunmaktadır (Jain ve Mulay, 2014). Bu durum ksilitolün, doğal kaynaklardan ekonomik bir ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmesini mümkün kılmamaktadır (Mohamad ve ark., 2015). Ticari olarak ilk büyük ölçekli ksilitol üretimine, 1975 yılında Finlandiya’da başlandığı bildirilmektedir. Ksilitol üretimi; saf ksilozun veya çeşitli lignoselülozik materyallerden asit hidrolizi ile elde edilen ksilozun, saflaştırılma aşamasını takiben, oldukça yüksek basınç (31-40 atm) ve sıcaklık (100-130°C) koşulları altında Raney nikel katalizörü eşliğinde ksilitole indirgenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Devamında ise, elde edilen ksilitol çözeltisinin uygun yöntemler ile saflaştırılması ve kristalize edilmesi gerekmektedir (Albuquerque ve ark., 2014).

Ksilitolün, günümüzde kimyasal veya biyoteknolojik proseslerle üretildiği bilinmektedir. Dünya genelindeki en büyük ksilitol üreticisi olan bir işletmenin, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi artıklarından elde ettikleri ksilozu, kimyasal yolla ksilitol üretiminde kullandığı belirtilmektedir (Albuquerque ve ark., 2014). Asya ülkeleri dünyadaki ksilitol üretiminin yarısını; Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya ise diğer yarısını karşılamaktadır. Asya ülkelerinden Çin, ksilitolün en fazla tüketildiği ülke olarak bilinmektedir (Rao ve ark., 2016). Ülkemizde ise ksilitol ithalat yolu ile sağlanmaktadır. Ülkemize 2008 yılında yaklaşık 2.3 bin ton ksilitolün ithal edildiği, bu rakamın 2014 yılında yaklaşık 6 bin tona çıktığı; ithalat masraflarının da son altı yılda üç kat arttığı rapor edilmiştir (TÜİK Dış Ticaret İstatistikleri, 2016).

Lignoselülozik materyallerden elde edilen ksiloz içeriği bakımından zengin hidrolizatların kimyasal yolla ksilitol üretiminde kullanılabilmesine yönelik çeşitli çalışmaların yapıldığı bildirilmektedir. Hidrolizat hazırlığında talaşların hammadde olarak kullanıldığı bir çalışmada, düşük verim ve saflık değerleri nedeni ile, elde edilen ksilozun ksilitol üretiminde substrat olarak kullanılamadığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise pamuk tohumu kabuklarının hidrolize edilmesi ile elde edilen ksiloz kullanılarak %35-40 verimlerde ksilitol üretimi yapılabildiği rapor edilmiştir. İlgili çalışmada üretim sonrası saflaştırma aşamasının oldukça yüksek maliyet gerektirmesinin, araştırmacıları farklı yöntem arayışlarına yönlendirdiği

belirtilmiş, ancak konu ile ilgili yeterince ekonomik yöntemler bulunamadığı rapor edilmiştir (Jain ve Mulay, 2014). Kimyasal yöntemlerle yapılan ksilitol üretiminin, hem yüksek basınç ve sıcaklık koşullarının sağlanması için gerekli ekipman ve enerji maliyetlerinin fazla olması hem de saflaştırma işlemlerinin oldukça fazla maliyet gerektirmesi nedenlerinden dolayı, pahalı bir süreç olduğu bilinmektedir. Bununla beraber, ksilitol günümüzde halen kimyasal yöntemler ile de üretilebilmektedir (Albuquerque ve ark., 2014).

Ksilitolün kimyasal yöntemlerle üretiminde karşılaşılan zorluklar, son yıllarda araştırmacıları üretim için alternatif proses arayışlarına yöneltmiş ve ksilitolün fermantasyon yolu ile veya enzimatik olarak üretilebileceği iki farklı biyoteknolojik yaklaşım geliştirilmiştir. Biyoteknolojik yöntemlerde, üretimde mikroorganizmaların veya enzimlerinin kullanılması ile üretim maliyetlerinin önemli ölçüde azaltılabildiği ve daha yüksek verimlerde ürün elde edilebildiği bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Literatür incelendiğinde, hemiselülozik hidrolizatlar kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik ksilitol üretimi çalışmaları olduğu görülmektedir (Branco ve ark., 2011; Rafiqul ve ark., 2015a). Ancak, ksilitol üretimi yaygın olarak, lignoselülozik materyalin asit veya enzim aracılığı ile hidrolize edilmesi ve ksiloz kaynağı olarak elde edilen hidrolizatın içerdiği inhibitör bileşenlerden arındırılması aşamalarını takiben fermantasyona tabi tutulması ile gerçekleştirilmektedir. Kimyasal yöntemler ile kıyaslandığında, hidrolizattaki ksilozun saflaştırılmadan ksilitol üretiminde kullanılabilmesi ve üretimde kullanılan düşük sıcaklıkların fazla enerji kullanımını gerektirmemesi, üretim maliyetinin azaltılabilesini sağlayan başlıca etkenlerdendir. Ancak, fermantasyon ortamında üretilen farklı metabolitler dolayısıyla, ksilitolün ortamdan ayrılması aşamasının zahmetli olduğu bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013, Mohamad ve ark., 2015).

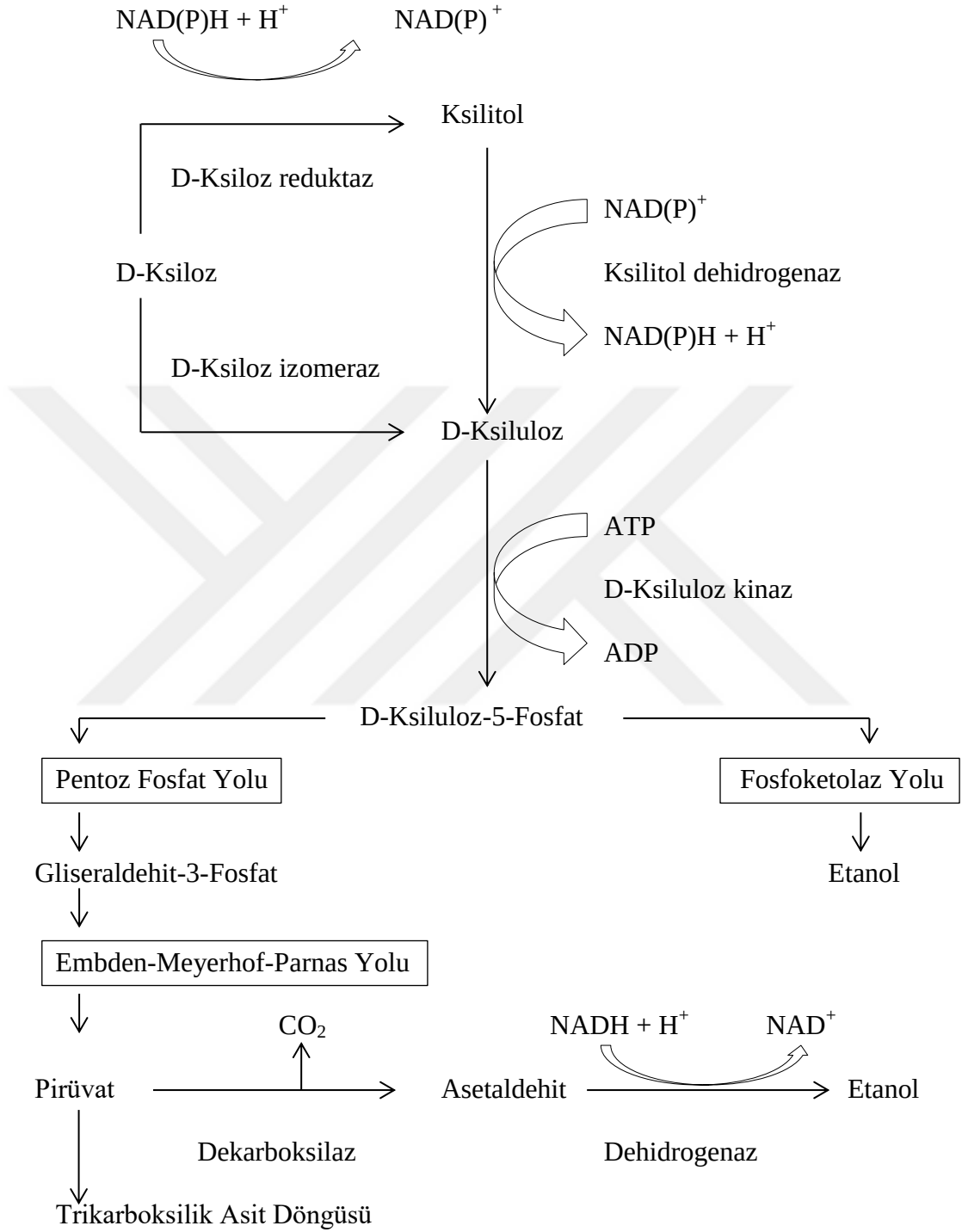
Fermantasyon yolu ile ksilitol üretiminde bakteri, maya ve küflerin kullanılabildiği bilinmekle beraber, yaygın olarak mayaların kullanıldığı rapor edilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Ksilitol ürettiği bilinen mikroorganizmalar arasında *Pichia*, *Debaryomyces*, *Pachysolen* ve *Candida* cinslerine ait maya suşlarının olduğu bildirilmektedir (Cheng ve ark., 2010). Gerçekleştirilen bazı çalışmalarda ise, *C. tropicalis* türüne ait mutant veya

rekombinant suşlar ile (Ahmad ve ark., 2012; Guo ve ark., 2013; Jeon ve ark., 2011), rekombinant *Saccharomyces cerevisiae* (Li ve ark., 2013) ve *Debaryomyces hansenii* (Pal ve ark., 2013) suşlarının ksilitol üretimlerinde kullanıldıkları rapor edilmiştir. Ayrıca, ksilitol üretiminde kullanıldığı bilinen bakteri türleri arasında *Enterobacter liquefaciens*, *Gluconobacter oxydans* ve *Mycobacterium smegmatis* ile rekombinant *Corynebacterium glutamicum* ve *Escherichia coli* bulunmaktadır. Ksilitol üretiminde küflerin kullanıldığı çalışmaların ise oldukça az sayıda olduğu belirtilmektedir (Kim ve ark., 2010; Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013; Su ve ark., 2015).

Ksilitol üreticisi oldukları bilinen mikroorganizmalar incelendiğinde, özellikle *Candida* cinsi mayaların daha yüksek verimlerde ksilitol ürettikleri rapor edilmektedir (Cheng ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada, şeker kamışı filtrasyon kekinden izole edilen *Candida* cinsi 28 adet izolat arasında, *C. tropicalis* MVP 16 suşunun en yüksek verimde ksilitol ürettiği belirtilmiştir (Lourenço ve ark., 2014). Guamán Burneo ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, farklı ağaç artıklarından izole edilen 140 adet maya suşu arasında, *C. tropicalis* türüne ait bir suş kullanılarak en yüksek verim ve verimlilik değerlerinin elde edildiği bildirilmiştir. Aynı zamanda, çalışmada elde edilen izolatlardan olan *Cyberlindnera galapagoensis* suşunun, *C. tropicalis* suşunu takiben oldukça yüksek değerlerde ksilitol ürettiği ve yeni bir suş olması ile ön plana çıktığı belirtilmiştir. Gerçekleştirilen bir başka çalışmada, incelenen 21 adet maya izolatından biri olan *Cyberlindnera saturnus* suşunun en yüksek derişimde ksilitol ürettiği rapor edilmiştir (Kamat ve ark., 2013).

Ksilitol, mikroorganizmaların ksilozu fermente etmeleri sırasında açığa çıkan bir ara üründür (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Şekil 1’de verilen, mayaların ksilozdan ksilitol üretim metabolizmasının, indirgenme ve yükseltgenme basamaklarını içeren bir dizi reaksiyondan oluştuğu görülmektedir. Ksiloz, öncelikle NADPH veya NADH bağımlı ksiloz redüktaz (KR) enzimi varlığında ksilitole indirgenmekte, devamında hücre dışına salınmakta veya ortamda NADP^+ veya NAD^+ bağımlı ksilitol dehidrogenaz (KDH) enziminin olması durumunda ksiluloza okside olmaktadır. Gerçekleşen bu reaksiyonların, ksiloz metabolizmasını belirleyen ve ksilitol üretimini sınırlayan, kritik öneme sahip basamaklar oldukları bilinmektedir. Elde edilen ksiluloz ise, ksiluloz kinaz (KK) enziminin aracılığı ile, fosforilasyona

uğrayarak ksiluloz-5-fosfata dönüşmekte ve oluşan bu bileşen devamında pentoz fosfat metabolik yoluna girmektedir.



Şekil 2.1. Mikroorganizmalarda gerçekleşen ksilitol üretim metabolizması (Winkelhausen ve Kuzmanova, 1998)

Pentoz fosfat yolunun, oksidatif olan ve oksidatif olmayan iki kısımdan oluştuğu belirtilmektedir. Oksidatif pentoz fosfat yolunda, heksoz fosfatlar (glikoz-6-fosfat vb.) pentoz fosfatlara (ribuloz-5-fosfat vb.) okside olarak, metabolizma için gereken NADPH kofaktörünün açığa çıkmasını sağlamaktadır. Pentoz fosfat yolunun oksidatif olmayan kısmında ise, bir önceki reaksiyonda üretilen pentoz fosfatlar heksozlara veya trioz fosfatlara dönüştürülmekte, ksiluloz-5-fosfattan ise fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat üretimi gerçekleşmektedir. Devamında, oluşan tüm ürünlerin glikolitik yola girerek piruvata dönüştüğü bilinmektedir. Oluşan piruvat, ortamda oksijenin bulunduğu durumlarda trikarboksilik asit döngüsüne katılmakta, oksijensiz ortamlarda ise etanole dönüşmektedir (Winkelhausen ve Kuzmanova, 1998).

Ksilozdan fermentasyon yolu ile ksilitol üretimini düzenleyen enzimler olan KR ve KDH enzimleri arasındaki oranın, KR yönünde fazla olması, hücre içerisinde ksilitol birikimini sağlamaktadır. Bu enzimler, çalışılan maya türüne göre değişmekle birlikte, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+/NADH) veya nikotinamid adenin dinükleotit fosfat ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) kofaktörlerine gereksinim duymaktadır. Ortamdaki oksijen derişimi ve oksijenin transfer hızına bağlı olarak, kofaktörlerin etkinliğinin değiştiği bilinmektedir. Oksijen derişiminin yüksek olduğu durumlarda, ksiloz metabolizmasında açığa çıkan NADH elektron taşıma sistemine girerek NAD^{++} 'a okside olmakta, NAD^+ derişiminde gerçekleşen oransal artış biriken ksilitolün ksiluloza dönüşümüne neden olmaktadır. Oksijen derişiminin düşük olduğu ortamlarda gerçekleştirilen üretimlerde ise, ksilitolün okside olmasına neden olan NAD^+ bağımlı KDH enziminin aktivitesi, NADH kofaktöründeki artışa bağlı olarak inhibe olmakta ve bu sayede hücre içerisinde ksilitol birikimi sağlanabilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013; Winkelhausen ve Kuzmanova, 1998).

Fermentasyon yolu ile ksilitol üretimini etkileyen birçok faktörün olduğu bilinmektedir. Bu faktörler arasında; fermentasyon ortamında bulunan karbon ve azot kaynakları ile bu kaynakların ortamdaki derişimleri, kullanılan havalandırma koşulları, sıcaklık ve pH değerleri ile aşı derişimi yer almaktadır. Ksilitol üretiminde kullanılan mayanın türüne bağlı olarak etkileri değişebilen tüm bu faktörlerin

optimize edilmesi ile, yüksek verimlerde ksilitol elde edilebileceği bildirilmektedir (Albuquerque ve ark., 2014; Rao ve ark., 2016).

Doğada bol miktarda bulunan, gıda, tarım ve ormancılık endüstrisi artışı olabilen çeşitli lignoselülozik materyallerin ksilitol üretimi amacı ile değerlendirilebilecek ucuz birer substrat kaynağı olduğu bilinmektedir (Albuquerque ve ark., 2014, Jönsson ve Martín, 2016). Lignoselülozik materyaller selüloz, hemiselüloz ve lignin birimlerinden oluşmaktadır. Selülozik kısım, birbirlerine β -1,4 glikozidik bağları ile bağlanmış D-glukoz birimlerinden meydana gelen, yarı kristal yapı taşıyan bir homopolisakkarittir. Lignoselülozik materyallerdeki selüloz moleküllerinin birbirlerine hidrojen bağı ile bağlanarak selüloz liflerini meydana getirdiği, selüloz liflerinin ise hemiselüloz ile hidrojen bağı, lignin ile kovalent bağ yaparak bir arada tutundukları bilinmektedir. Selüloz moleküllerinin yaklaşık %50-90'ı birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanarak kristal (düzenli) bir yapı oluştururken, geri kalan kısmı düzensiz selüloz yapısını meydana getirmektedir. Lignoselülozik materyallerin yaklaşık olarak %34-50'sinin selülozdan oluştuğu, bu nedenle selülozun doğada en fazla bulunan polisakkarit bileşen olduğu belirtilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

Lignoselülozik materyaldeki hemiselülozik kısım ise, genel olarak pentoz (ksiloz ve arabinoz) ve heksoz (glukoz, galaktoz ve mannoz) şekerlerden, üronik asit (4-O-metilglukuronik ve galakturonik asit vb.) ve asetil yan gruplarından oluşan heteropolisakkarit bir yapıdadır. Hemiselüloz, sahip olduğu düzensiz yapısı ve dallanma yapma özelliği ile, doğrusal bir polimer olan selülozdan ayrılmaktadır. Lignoselülozik materyalin yaklaşık %19-35'ini oluşturan hemiselülozun kimyasal yapısı ve bileşimi farklı bitki ve ağaç türleri arasında değişiklik gösterdiği gibi, tek bir türde de dokudan dokuya değişebilmektedir. Örneğin, yumuşak ağaçlardaki hemiselüloz yapısında glukoz ve mannoz ağırlıkta iken, sert ağaçlarda ksilozun daha fazla olduğu bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Genel olarak, lignoselülozik materyalin uygun yöntemlerle hidrolize edilmesinin ardından, ksilitol üretimi için gerekli karbon kaynağı olan ksiloz açığa çıkmaktadır (Rao ve ark., 2016). Hidrolizasyon sırasında, sert ağaçlardaki hemiselülozik kısımdan elde edilen temel bileşen ksiloz iken, çeşitli tarımsal artık ve otsu bitkilerde ksilozun yanı sıra önemli miktarda arabinozun da açığa çıktığı bilinmektedir. Sert ağaçlardaki

hemiselülozun oldukça büyük bir kısmının (%80-90) ksilan olarak bilinen O-asetil-4-O-metilglukuronoksilandan meydana geldiği bildirilmektedir.

Lignoselülozik materyali oluşturan bir diğer önemli kısım, fenolik maddeler olan sinapil, koniferil ve kumaril alkolün aril-aril, alkil-alkil ve alkil-aril ester bağları ile birbirlerine bağlandıkları aromatik polimer bir madde olan lignindir. Ligninin, bitkilerin hücre duvarlarında bulunarak, bitkiye yapısal destek ve su geçirmeme özelliği sağladığı, ayrıca mikrobiyel tehlikelere karşı direnç kazandırdığı belirtilmektedir. Düzensiz yapıda ve hidrofobik özellikte olan lignin, asit kullanılarak hidrolize edilememektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Heterojen yapıdaki ekstraktif maddeler ise; başlıca terpen, yağ, vaks ve fenolik bileşiklerden oluşmakla beraber; bileşimi, coğrafi konum ve iklim koşulları ile farklı türlere göre değişkenlik gösteren ve lignoselülozik materyallerde oldukça düşük miktarlarda bulunan bir gruptur (Jönsson ve Martín, 2016). Substrat olarak lignoselülozik materyallerden yararlanılacak ksilitol üretimi proseslerinde, öncelikle selüloz ve hemiselülozun şeker birimlerine hidrolize edilerek mikroorganizma veya enzimlerin kullanabileceği duruma getirilmeleri gerekmektedir. Hemiselülozun düzensiz ve dallanmış yapısından dolayı, selüloz ile kıyaslandığında daha kolay hidrolize edilebildiği bilinmektedir. Hemiselülozun hidrolize edilmesinde hedeflenen, ksiloz derişimi mümkün olduğunca yüksek olan hidrolizatlar elde edilebilmesidir. Ayrıca, hazırlanan hemiselülozik hidrolizatlarda, mikroorganizma gelişimi üzerine olumsuz etki gösterebilecek çeşitli inhibitör bileşenlerin oluşumunun en düşük seviyede tutulması istenmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; mısır koçanı (Ramesh ve ark., 2013, Li ve ark., 2012, Misra ve ark., 2013a, Wang ve ark., 2013a), şeker pancarı posası (Silva ve ark., 2015, Castañón Rodríguez ve ark., 2015, Chandel ve ark., 2012), şeker pancarı sapı (Hernández Pérez ve ark., 2016), buğday sapı (Canilha ve ark., 2006), pirinç sapı (Baek ve Kwon, 2007, Deng ve ark., 2007,), çavdar sapı (Franceschin ve ark., 2011), pamuk sapı (Sapçı ve ark., 2016), pirinç kavuzu (Rambo ve ark., 2013), pamuk tohumu kabuğu (Wang ve ark., 2013b), sebze artıkları (Zhang ve ark., 2012b), zeytin çekirdeği (Saleh ve ark., 2014), kaju fıstığı posası (Albuquerque ve ark., 2015, Rocha ve ark., 2014, Lima ve ark., 2014), üzüm posası (Salgado ve ark., 2012), bira ve şarap tortusu (Pérez Bibbins ve ark., 2015), kahve meyvesi kabuğu

(Arrizon ve ark., 2012), muz kabuğu, maş fasulyesi, yer fıstığı ve yulaf kabukları (Ur Rehman ve ark., 2015) ve asma budama artıkları (Rivas ve ark., 2007) gibi farklı gıda ve tarım endüstrisi artıklarından elde edilen, ksiloz içerikleri yüksek hemiselülozik hidrolizatların ksilitol üretiminde substrat olarak kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca, ağaç talaşları (Ko ve ark., 2008), zeytin ağacı budama artıkları (Mateo ve ark., 2014) ile ökaliptus ağacı (Villarreal ve ark., 2006, Silva ve ark., 2003), huş ağacı (Miura ve ark., 2015), bambu ağacı (Miura ve ark., 2013) ve sago ağacı (Mohamad ve ark., 2013) kabuklarını kapsayan ormancılık endüstrisi artıklarının hidrolizat hazırlığında hammadde olarak değerlendirildiği bilinmektedir.

Mikrobiyel ksilitol üretimlerinde iyi sonuçlar alınabilmesi için, ortamdaki ksiloz derişiminin mümkün olduğunca fazla olması gerektiği bilinmektedir. Bununla beraber, çok yüksek derişimlerde ksiloz içeren hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmalarda, mikroorganizmaların ksiloz fermantasyonu metabolizmalarının olumsuz yönde etkilendiği bildirilmektedir. Bu durum, ksilozun yanı sıra, hemiselülozik hidrolizatlarda bulunan diğer şekerlerin ve çeşitli inhibitör bileşenlerin derişimlerinin de yüksek olması ile açıklanmaktadır (Mussatto ve Roberto, 2008). Ayrıca, üretimde kullanılan farklı suşların ksilitol üretimi kapasitelerinin de farklı olması ve hemiselülozik hidrolizatların kimyasal bileşimlerinin değişkenlik göstermesi nedenleri ile, ksiloz içeriği en yüksek olan fermantasyon ortamlarında her zaman en yüksek derişimlerde ksilitol üretimi yapılamadığı bildirilmektedir. Düşük derişimlerde ksiloz içeren ortamlarda gerçekleştirilen çalışmalarda ise, ksilozun belirli bir miktarının da hücre gelişimi için kullanıldığı göz önüne alındığında, oldukça düşük derişimlerde ksilitol üretimi yapılabilmektedir. Tüm bu nedenlerle, mikroorganizmaların metabolizmasını olumsuz etkilemeden, en yüksek derişimlerde ksilitolün elde edilebildiği, optimum ksiloz başlangıç derişiminin belirlenmesi gerekmektedir. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan hidrolizatın kaynağına, kullanılan suşa ve diğer üretim parametrelerine bağlı olarak, optimum ksiloz başlangıç derişimlerinin değiştiği bilinmektedir (Mussatto ve Roberto, 2008).

Ksilitol üretiminde, fermantasyon ortamı olarak bira posası hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada optimum ksiloz derişimi 70 g/L olarak bulunmuştur (Mussatto ve Roberto, 2008). Ksiloz başlangıç derişimi 99.20 g/L olan pirinç sapı

hidrolizatı kullanılarak bir *C. tropicalis* suşu ile gerçekleştirilen ksilitol üretimi çalışmasında ise; 74.08 g/L ksilitol üretilbildiği bildirilmiştir (Deng ve ark., 2007). Mısır koçanı hidrolizatının kullanıldığı ve optimum ksiloz başlangıç derişiminin 80 g/L olarak belirlendiği bir başka çalışmada ise; ksiloz derişiminin 160 g/L'ye kadar çıkarılması ile hücre gelişiminin büyük oranda inhibe olduğu ve bu durumun substratın yanı sıra inhibitör bileşenlerin de derişiminin artmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Li ve ark., 2012). Hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak değerlendirildiği bazı çalışmalarda sırasıyla, 36.44 g/L ksiloz içeren kaju fıstığı posası hidrolizatında 12.73 g/L, ksiloz içeriği 22.3 g/L olan şeker pancarı posası hidrolizatında 14.8 g/L, 49.77 g/L ksiloz içerikli buğday sapı hidrolizatında ise 22.54 g/L ksilitol üretimi yapıldığı belirtilmiştir (Albuquerque ve ark., 2015; Canilha ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2015).

Literatür incelendiğinde, hemiselülozik hidrolizatların yanı sıra, saf ksiloz içeren tanımlı fermantasyon ortamlarında da mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarının gerçekleştirildiği görülmektedir. Ortamdaki ksiloz başlangıç derişimlerinin ksilitol üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda; 100 g/L ksiloz içeren fermantasyon ortamında *C. tropicalis* ile maksimum 54.72 g/L, ksiloz içeriği 60 g/L olan ortamda ise *C. parapsilosis* suşu kullanılarak 28.14 g/L ksilitol üretildiği bildirilmiştir (Misra ve ark., 2013b, Srivani ve Pydi Setty, 2012). Daha yüksek ksiloz başlangıç derişimlerinde yapılan çalışmalarda ise, ortamdaki ksiloz derişiminin 160 g/L ve 250 g/L olduğu durumlarda sırasıyla 102.9 g/L ve 162.66 g/L ksilitol eldesi sağlanmıştır (Cheng ve ark., 2010, Zhang ve ark., 2012b). Doğal ve tanımlı fermantasyon ortamlarında *C. saturnus* suşu kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise, ksiloz içeriği 65 g/L olan mısır koçanı hidrolizatı ve 100 g/L ksiloz içeren tanımlı ortamda elde edilen ksilitol derişimlerinin birbirine çok yakın olduğu belirtilmiştir (Kamat ve ark., 2013).

Fermantasyon yolu ile gerçekleştirilen ksilitol üretimi çalışmalarında, mikroorganizma gelişimini ve ürün üretimini desteklemek için organik veya inorganik azot kaynaklarından yararlanılmaktadır. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan maya özütü, pepton, üre ve kazamino asit organik; amonyum sülfat, amonyum klorür ve amonyum nitrat gibi çeşitli amonyum tuzları ise inorganik azot kaynaklarıdır. Mısır sapı hidrolizatı içeren fermantasyon ortamına azot kaynağı olarak ilave edilen

üre ve amonyum sülfatın ksilitol üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, üre kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Albuquerque ve ark., 2014). Zhang ve ark. (2012b) tarafından *C. athensensis* suşu kullanılarak, sebze artıklarından elde edilen hemiselülozik hidrolizatta gerçekleştirilen bir çalışmada, fermantasyon ortamının 2 g/L üre ile desteklenmesinin, maya gelişimi ve ksilitol derişimini olumlu etkilediği rapor edilmiştir. Ksilitol üretimi için mısır koçanı hidrolizatının kullanıldığı bir diğer çalışmada, ortama ilave edilen farklı azot kaynaklarından (pepton, üre, maya özütü, amonyum nitrat ve amonyum sülfat), amonyum sülfatın ve maya özütünün ksilitol üretimini önemli ölçüde desteklediği belirtilmiştir (Ling ve ark., 2011). Kaju fıstığı posasından hazırlanan hidrolizatta *Kluyveromyces lactis* mayası ile ksilitol üretiminin incelendiği bir başka çalışmada, ortamda azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve maya özütünün kullanıldığı durumlarda maksimum ksilitol derişiminin azaldığı, üre kullanıldığında ise yaklaşık %18 oranında arttığı bildirilmiştir (Albuquerque ve ark., 2015).

Misra ve ark. (2013b) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, çeşitli organik (L-asparajin, et özütü, kazein hidrolizatı, mısır maserasyon sıvısı, pepton, soya posası, tripton, üre, maya özütü) ve inorganik (amonyum klorür, amonyum nitrat, amonyum sülfat, sodyum nitrat) azot kaynaklarının ksilitol üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Fermantasyon ortamında kullanılan inorganik azot kaynaklarının tamamının maya gelişimini ve ksilitol üretimini olumsuz etkilediği, ancak ortamın maya özütü ile desteklenmesi ile yüksek derişimlerde ksilitol üretilebildiği rapor edilmiştir. Bazı çalışmalarda ise, hemiselülozik hidrolizat içeren fermantasyon ortamlarında azot kaynağının kullanılmaması önerilmektedir. Ksilitol üretiminde üzüm posası hidrolizatının substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada fermantasyon ortamlarının şilempe ve mısır maserasyon sıvısı ile maya özütü, pepton ve malt özütünden oluşan karışım olmak üzere çeşitli kaynaklar ile desteklenmesinin maksimum ksilitol derişimini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Salgado ve ark., 2012).

Ksilitol üretimini oldukça önemli ölçüde etkileyen faktörlerden birinin fermantasyon ortamında kullanılan havalandırma koşulları olduğu ve ortamdaki oksijen derişiminin havalandırma koşullarına bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Albuquerque ve ark., 2014). Genellikle, biyoreaktörlerde yürütülen fermantasyon

çalışmalarında, oksijen transfer katsayısı (K_{La}) veya oksijen transfer hızı (OTR) olarak da ifade edilen ve ortamdaki çözünmüş oksijen derişiminin göstergesi olan parametrelerin, hem ksilitol üretiminde rol alan enzimlerin aktiviteleri hem de hücre gelişimi üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Rao ve ark., 2016). Erlenlerde çalkalamalı kültür şeklinde yürütülen fermantasyon çalışmalarında ise havalandırma koşulları için, çalkalama hızı veya çalışma hacminin erlen hacmine oranı ifadeleri kullanılmaktadır. Çalışmalarda kullanılan farklı çalkalama hızları ve oranların, oksijenin fermantasyon ortamına transfer hızını etkilediği bilinmektedir (Rivas ve ark., 2007). Biyoreaktörlerde veya erlenlerde çalkalamalı kültür şeklinde gerçekleştirilen ksilitol üretimi çalışmalarında, fermantasyon ortamındaki oksijen derişiminin düşük seviyelerde tutulması gerektiği bildirilmektedir. Diğer taraftan, yüksek oksijen derişimlerinin hücre gelişimi üzerine olumlu etkisi olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, yüksek verimlerde ksilitol üretimi yapılabilmesi için, uygun havalandırma koşullarının sağlanması gerekmektedir (Mohamad ve ark., 2015).

Bazı fermantasyon çalışmalarında ise, ksilitol üretiminde daha yüksek derişimler elde edilebilmesi için çalışmanın belirli bir kısmında daha yüksek çalkalama hızları kullanılarak hücre gelişiminin teşvik edildiği, devamında ksilitol üretiminin arttırılması amacı ile hız değerlerinin düşürüldüğü belirtilmektedir. *C. athensensis* suşu ile ksilitol üretiminde fermantasyon ortamı olarak sebze artığı hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada, fermantasyonun ilk 24 saatinde ve devamında uygulanan farklı çalkalama hızı değerlerinin (100-250 rpm) hücre gelişimi ve ksilitol derişimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Genel olarak, fermantasyon çalışmasının ilk saatlerinde yüksek çalkalama hızları kullanıldığında hücre gelişimi için yüksek değerlerin elde edildiği ve çalışmanın devamında kullanılan çalkalama hızı en düşük değerde iken daha yüksek derişimlerde ksilitol üretildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, fermantasyon süresince sabit çalkalama hızı değerlerinin de (150 ve 200 rpm) kullanıldığı ve bu durumda, alınan diğer sonuçlarla benzer şekilde, düşük çalkalama hızının ksilitol üretimini olumlu, hücre gelişimini ise olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2012b).

Li ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada ise, fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi düşürüldüğünde daha fazla ksilitol üretildiği

belirtilmiştir. Havalandırma koşullarının ksilitol üretimi üzerine olan etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada, çalkalama hızı ve oksijen transfer hızı için minimum değerler kullanıldığında (sırasıyla 150 rpm ve 56.05 mg O₂/L.sa) en yüksek derişimde ksilitol elde edildiği ve ortamdaki hücre derişiminin oldukça düşük seviyede kaldığı bildirilmiştir (Castañón-Rodríguez ve ark., 2015). Ksiloz içeriği yüksek bir fermantasyon ortamında gerçekleştirilen bir çalışmada, 300 rpm çalkalama hızı kullanıldığında ksilitol verimi için en yüksek değer elde edilirken, en yüksek verimlilik değerine ise 500 rpm hızda ulaşıldığı rapor edilmiştir (Mussatto ve Roberto, 2003). Farklı çalkalama hızlarının ksilitol üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 200 rpm hız değeri kullanıldığında maksimum ksilitol derişimine ulaşıldığı, ayrıca verim ve verimlilik değerleri için en yüksek sonuçların elde edildiği belirtilmiştir (Sampaio ve ark., 2008).

Sabit bir karıştırma hızında ve 100 mL hacmindeki erlende farklı fermantasyon ortamı hacimlerinin (30-60 mL) ksilitol üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, daha yüksek hacimler kullanılarak yapılan üretimlerde, ksilitol verimi için daha iyi sonuçların alındığı bildirilmiştir. Bu durumun, kullanılan ortam hacminin arttırılmasına bağlı olarak oksijen transfer hızında gerçekleşen düşüşten kaynaklandığı belirtilmiştir (Mareczky ve ark., 2016). Benzer şekilde, El Baz ve ark. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada, sabit hacimli bir erlende, kullanılan fermantasyon ortamının hacminin artması ile genel olarak daha yüksek derişimlerde ksilitol elde edildiği ve ksiloz içeriği 50 g/L olan 40 mL hacmindeki ortamda üretilen maksimum ksilitol derişiminin 36.25 g/L'ye ulaştığı bildirilmiştir. Asma budama artıklarının ksilitol üretimi amacıyla değerlendirildiği bir çalışmada ise, ortamdaki çözünmüş oksijen derişiminin azot gazı yardımı ile azaltılması denenmiştir. Sabit bir karıştırma hızının kullanıldığı bu çalışmada, uygulanan yöntemin ksilitol üretimini oldukça olumlu etkilediği, verim ve verimlilik değerlerinin de arttığı rapor edilmiştir (Rivas ve ark., 2007).

Mayalar kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol üretimlerinde kullanılan sıcaklık değerleri incelendiğinde, ağırlıklı olarak 30-37°C aralığında değişen sıcaklıklarda çalışıldığı görülmektedir (Albuquerque ve ark., 2014, Rao ve ark., 2016). Fermantasyon ortamı olarak mısır koçanı hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada, *C. tropicalis* suşu ile ksilitol üretiminde sıcaklık olarak 35°C'nin kullanıldığı

bildirilmiştir (Ping ve ark., 2013). Ksilitol üretiminde *C. tropicalis* mayasının kullanıldığı diğer çalışmalarda ise, genel olarak 30°C’de çalışıldığı görülmektedir (El Baz ve ark., 2011, Misra ve ark., 2013a). *C. parapsilosis* NCIM-3323 kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, 25-35°C aralığındaki sıcaklık değerlerinin ksilitol üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve optimum sıcaklığın 30°C olduğu bildirilmiştir (Srivani ve Pydi Setty, 2012). Ramesh ve ark. (2013) tarafından yapılan ve mısır koçanı hidrolizatının kullanıldığı bir başka çalışmada, *D. hansenii* var *hansenii* suşu için optimum sıcaklık 31.8°C olarak belirlenmiştir. Termotolerant özellikte mayalar kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol üretimlerinde ise daha yüksek sıcaklıklarda çalışılabilmektedir. *Kluyveromyces marxianus* suşu ile farklı sıcaklık koşullarında (30°C, 40°C ve 45°C) yapılan bir çalışmada, en yüksek ksilitol derişiminin 40°C’de elde edildiği rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, *K. marxianus* suşu kullanılarak gerçekleştirilen üretim için optimum sıcaklığın 50°C olduğu bildirilmiştir (Albuquerque ve ark., 2014).

Ksilitol üretiminde mayaların kullanıldığı prosesler için optimum pH değerlerinin 4.5-7 arasında değiştiği bildirilmektedir (Ur-Rehman ve ark., 2015). *C. tropicalis* ile ksilitol üretimi üzerine 3-8 aralığında değişen pH değerlerinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, optimum pH değerinin 4.5 olduğu sonucuna varılmıştır (Misra ve ark., 2013b). Ksilitol üretiminde *C. tropicalis* suşunun kullanıldığı bir başka çalışmada ise, pH değeri 6 olan fermantasyon ortamında üretim yapıldığında ksilitol derişimi için maksimum değerin elde edildiği belirtilmiştir (Ping ve ark., 2013). Cheng ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, pH değerinin 4.5’ten 6’ya yükseltilmesinin ksilitol üretimini oldukça olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, pH’ı sitrat tamponu kullanılarak 5.5’e ayarlanan fermantasyon ortamında en yüksek ksilitol derişimine ulaşıldığı belirtilmiştir (El Baz ve ark., 2011).

Ksilitol üretiminde ksiloz kaynağı olarak hemiselülozik materyallerin kullanıldığı çalışmalarda, üretimi etkileyen en önemli unsurlardan bir diğeri materyalden ksilozun eldesi aşamalarıdır. Bu kapsamda, hammaddeye uygulanan ön işlemlerin türü ve uygulanan hidrolizasyon yönteminin oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Uygulanan ön işlemler ile hidrolizasyonda kullanılan yöntem ve parametreler; ksiloz miktarını ve hidrolizatta bulunabilecek bazı inhibitör

bileşenlerin tür ve miktarını doğrudan etkileyeceği için, ksilitol üretiminde oldukça kritik bir öneme sahiptir. Lignoselülozik materyallerin sahip olduğu yüksek dayanıklılıktan dolayı, bu materyallerdeki fermente edilebilir şekerlerin açığa çıkarılması, ancak birtakım ön işlemlerin uygulanması ile mümkün olmaktadır. Lignoselülozik materyaller, genel olarak fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal yöntemlerin kullanıldığı farklı ön işlemlere tabi tutulmaktadır. Uygulanan ön işlemlerin, lignoselülozik materyallerin yapısal bütünlüğünü bozduğu, lignini ortamdan uzaklaştırarak, selüloz ve hemiselülozu açığa çıkardığı bilinmektedir. Bu sayede, lignoselülozik materyallerdeki hemiselülozdan, mikrobiyel ksilitol üretiminde substrat olarak kullanılacak olan ksiloz elde edilebilmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015). Son yıllarda, hemiselülozik yapıdan hidroliz ile ksilozun elde edilmesine yönelik olarak çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Mohamad ve ark., 2015).

Lignoselülozik materyallere uygulanan fiziksel ön işlemlerden olan boyut küçültmenin, bu materyallerin asit veya enzimler kullanılarak hidrolize edilmesini kolaylaştırdığı belirtilmektedir. Kimyasal yöntemlerden yararlanılan ön işlemlerde ise çeşitli alkali, asit veya amonyak çözeltileri, ayrıca organik çözücüler ve oksitleyici ajanlar kullanılmaktadır. Bu yöntemler, genel olarak kısa sürmekte ve etkili sonuçlar vermektedir. Alkali çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilen ön işlemlerde genellikle sodyum, potasyum, kalsiyum hidroksit, amonyum veya amonyak kullanılmaktadır (Rao ve ark., 2016). Ksilitol üretiminde kullanılacak olan pirinç sapı hidrolizatının hazırlığında materyalin amonyak ile muamele edilmesi sonucunda, pentoz şekerlerin derişiminin arttığı, asetik asitin tamamının, furfural ve fenolik maddelerin ise önemli bir kısmının ortamdan uzaklaştığı ve bu sayede hidrolizatın fermente edilebilirliğinin arttığı belirlenmiştir (Deng ve ark., 2007).

Lignoselülozik materyale uygulanan ön işlemlerde sülfürik, hidroklorik, hidroflorik, nitrik ve fosforik asit gibi çeşitli asit çözeltilerinin kullanıldığı bilinmekle birlikte, oldukça yaygın bir şekilde seyreltik sülfürik asit çözeltilerinden yararlanılmaktadır. Wang ve ark. (2013b) tarafından yapılan bir çalışmada, pamuk tohumu kabuklarının seyreltik sülfürik asit çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından seyreltik asit hidrolizasyonuna tabi tutulduğu rapor edilmiştir. Kaju fıstığı posasının seyreltik sülfürik asit çözeltisi ile ön işleme tabi

tutulduğu bir çalışmada, 0.6 mol/L derişimindeki asit çözeltisine %30 oranında ilave edilen materyalin, 121°C’de 15 dakika süresince bekletildiğı bildirilmiştir (Rocha ve ark., 2014). Ayrıca, son yıllarda hidrolizasyonda maleik, süksinik, oksalik, fumarik ve asetik asit gibi organik asitlerin kullanıldığı çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Rao ve ark., 2016). Ancak, fermantasyon ortamı hazırlamak üzere mısır saplarının sülfürik asit ve bazı organik asitler ile ön işleme tabi tutulduğu bir çalışmada, genel olarak organik asitler kullanıldığında daha düşük derişimlerde ksiloz elde edildiğı rapor edilmiştir (Qin ve ark., 2012).

Alkali peroksit ve ozon gibi oksitleyici ajanlardan yararlanılan ön işlemlerin, genellikle diğer işlemler ile birlikte uygulandığı ve lignoselülozik materyallerdeki ligninin uzaklaştırılmasına katkı sağladığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ligninin yaklaşık %50’sini uzaklaştıran, hemiselülozun ise büyük bir çoğunluğunu parçalayan hidrojen peroksit çözeltisinin sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir. Buğday ve pirinç kepeğinin, ön işlem olarak etkili bir oksitleyici ajan olan ozona tabi tutulduğu bir çalışmada ise, bu materyallerdeki hemiselülozik yapının ozondan oldukça az etkilendiğı, ligninin ise önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Rao ve ark., 2016). Lignoselülozik materyallere başlıca mikrodalga ile ışınlama, ekstrüderlerde muamele ve yüksek basınçlı buhar uygulamalarını içeren fizikokimyasal ön işlemlerin de uygulanabildiğı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, hemiselülozun parçalanmasında kullanılan mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulamasının, kimyasal yöntemlerle kıyaslandığında oldukça etkili, yeni ve çevre dostu bir ön işlem olduğu belirtilmiştir. Ekstrüderler kullanılarak gerçekleştirilen ön işlemlerde ise, lignoselülozik materyalin ekstrüzyon, pişirme, sıvı-katı ekstraksiyonu ve filtrasyon olmak üzere çeşitli uygulamalara tabi tutulduğu ve bu sayede hemiselülozik yapının yaklaşık %90’ının parçalanabildiğı belirtilmektedir (Rao ve ark., 2016).

Materyalin belirli bir süre boyunca yüksek basınç ve sıcaklık koşullarında bekletildiğı basınçlı buhar ile muamele ve sıcak su ekstraksiyonu uygulamaları hidrotermal işlemler olarak da bilinmektedir. Uygulamalar sırasında, hemiselülozun bir kısmının parçalandığı, ligninin yüksek sıcaklığın etkisi ile ortamdan uzaklaştırıldığı bildirilmektedir (Rao ve ark., 2016). Ancak, Wang ve ark. (2013a) tarafından mısır koçanı hidrolizatı hazırlanmak üzere yapılan bir çalışmada, basınçlı

buhar uygulamasına tabi tutularak elde edilen hidrolizatın ksiloz içeriğinin düşük olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada, öncelikle seyreltik asit çözeltisinde bir süre bekletilen materyale basınçlı buhar uygulanması ile daha yüksek derişimde ksilozun açığa çıkarılabildiği rapor edilmiştir.

Hemiselülozik materyallere uygulanan, çeşitli seyreltik veya derişik asitlerin kullanılabildiği hidrolizasyon işlemlerinde, genel olarak seyreltik sülfürik asit çözeltisinden yararlanılmaktadır. Mikrobiyel ksilitol üretiminde substrat kaynağı olarak kullanılan ksiloz, bir çözelti yardımı ile katı materyalden elde edildiğinden, hidrolizasyon işlemi çeşitli basamaklardan oluşmaktadır. Öncelikle, asit çözeltisindeki protonların lignoselülozik materyale etki ederek şekerleri bir arada tutan glikozidik bağlara bağlandığı ve bu bağları birbirinden ayırdığı belirtilmektedir. Devamında ise, reaksiyon sırasında ara bir ürün olarak açığa çıkan karbonyum iyonunun suda çözündüğü, ayrıca basit şeker, oligomer veya polimerlerin üretildiği ve oluşan ürünlerin difüzyon yolu ile asit çözeltisine geçtiği bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

Düşük sıcaklık derecelerinde ($<50^{\circ}\text{C}$), atmosferik basınç altında ve yüksek derişimlerde (%50-70, v/v) asitler kullanılarak gerçekleştirilen derişik asit ile hidrolizasyonun nadiren uygulanan bir yöntem olduğu bilinmektedir. Hidrolizasyonda kullanılan yüksek derişimdeki asitlerin tehlikeli ve aşındırıcı etkilerinden dolayı, hidrolizasyon işlemlerinin aşınmaya dayanıklı özel reaktörlerde gerçekleştirilmesi gerekmekte ve bu durum proses maliyetini oldukça arttırmaktadır. Seyreltik asit hidrolizasyonu ise, lignoselülozik materyallerin tabi tutulduğu ön işlemlerde ve hidrolizasyon aşamasında yaygın olarak uygulanan, ekonomik bir yöntemdir. Genel olarak, %2-5 arasında değişen derişimlerdeki hidroklorik veya sülfürik asit ile, oldukça yüksek sıcaklık ($160-230^{\circ}\text{C}$) ve basınç (yaklaşık 10 atm) koşullarında gerçekleştirilen hidrolizasyon işlemlerinde, hemiselülozik yapıdaki ksilanın hidrolize edilmesi ile ksiloz, arabinoz, glukoz gibi basit şekerlerin ve suda çözünebilir oligomerlerin açığa çıktığı bilinmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

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

başta ksiloz derişimi olmak üzere düşük miktarlardaki diğer şekerlerin derişimlerinin değiştii bildirilmektedir (Rafiqul ve Mimi 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 ve ark., 2013a). Lignoselülozik bir materyal olan buğday sapının hidrolizasyon koşullarının optimize edildiği bir çalışmada, 200 mg sülfürik asit/g derişimindeki çözeltinin karışımında %5 oranında kullanıldığı ve materyalin 140°C'de 30 dakika süresince hidrolize edildiği durumda elde edilen ksiloz derişiminin 15.4 g/L olduğu bildirilmiştir (Canilha ve ark., 2006). 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 ve ark., 2014).

Seyreltik asit hidrolizinin başlıca olumsuz yönü olarak, ksilitol üretimi için gerekli substrat olan ksilozun yanı sıra diğer şekerlerin ve ayrıca inhibitör özellik gösteren bazı maddelerin açığa çıkması gösterilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Rafiqul ve ark., (2015b) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hemiselülozik hidrolizatlardaki çeşitli inhibitörlerin *C. tropicalis* IFO 0618 suşunda bulunan ve ksilitol üretiminde kritik bir önemi olan KR enzimini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu sebeple, ksiloz derişimi mümkün olduğunca yüksek olan, furfural, HMF, asetik asit, lignin parçalanma ürünleri gibi bileşenleri ise en düşük derişimlerde içeren hemiselülozik hidrolizatların elde edilmesi hedeflenerek, hidrolizasyon için uygun koşullarının belirlenmesi gerekmektedir.

Lignoselülozik materyallere uygulanan ön işlemler ile asit hidrolizasyonu sırasında açığa çıkan ve mikroorganizma gelişimi üzerine olumsuz etki gösteren inhibitör bileşenlerin, hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında karşılaşılan en yaygın problem olduğu bilinmektedir. Hidrolizatlardaki derişimleri, kullanılan lignoselülozik materyale ve hidrolizasyon yöntemine bağılı olarak değişebilen inhibitör bileşenlerin, genel olarak furan ve türevleri, zayıf asitler, fenolik maddeler ile çeşitli ağır

metallerden oluştuğu belirtilmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Lignoselülozik materyallerin asit ile muamele edildiği durumlarda, hemiselülozun parçalanması ile elde edilen pentoz şekerler ve üronik asitten furfural (2-furaldehit), heksoz şekerlerden ise HMF açığa çıkmaktadır (Rao ve ark., 2016).

Genel olarak, hemiselülozik yapıda heksoz şekerler daha düşük miktarlarda bulunduğundan ve uygulanan hidrolizasyon koşulları heksozların tamamını parçalamak için yetersiz kaldığından, furfural ile kıyaslandığında, elde edilen hidrolizatlarda HMF oluşumunun daha az olduğu bilinmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015). Daha yüksek sıcaklık değerleri ile yüksek derişimdeki asitlerin kullanıldığı ve daha uzun süreli hidrolizasyon işlemlerinde, HMF ve furfural bileşenlerinden levulinik ve formik asitlerin oluştuğu bilinmektedir. Hemiselülozdaki asetil gruplarının yıkımı sonucu oluşan asetik asit ise hidrolizatlarda bulunabilen bir diğer inhibitör bileşendir. Ayrıca, lignin molekülünün yıkımı ile yaygın olarak, sert ağaçlardan 4-hidroksibenzaldehit, vanilin, dihidro-koniferil alkol, koniferil aldehit, siringaldehit, siringik asit; otsu bitkilerden ise *p*-kumarik asit ve ferulik asit gibi fenolik maddeler meydana gelmektedir. Hidrolizasyon hazırlığı sırasında pek çok ekstraktif bileşenin çökelti oluşturarak ortamdan uzaklaştırıldığı, ancak pirogallol ve gallik asit gibi suda çözünebilir fenolik bileşiklerin bir kısmının hidrolizatta kalabildiği bildirilmektedir. Hazırlanan hidrolizatlarda benzoik asit, benzil alkol, sinamik asit ve sinamalaldehit gibi fenolik olmayan yapıdaki aromatik maddeler, aynı zamanda alifatik aldehitler de bulunabilmektedir. Hidrolizasyonda kullanılan asitlerin aşındırıcı özelliğinden dolayı, prosesin gerçekteştirildiği ekipmanlardaki bakır, nikel, krom gibi ağır metallerin hidrolizata geçerek mikroorganizma gelişimini inhibe edebildiği bilinmektedir (Jönsson ve Martín, 2016).

Hemiselülozik hidrolizatlardaki inhibitör bileşenlerin, fermantasyon ortamının pH'ı ve çözünmüş oksijen derişimi, ortamda bulunan diğer inhibitörler ve kullanılan mikroorganizmaların inhibitörlere karşı gösterdikleri direnç gibi parametrelere bağlı olarak, mikroorganizma gelişimini farklı seviyelerde etkiledikleri belirtilmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015, Rao ve ark., 2016). Hemiselülozik hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı ksilitol üretimi çalışmaları, hidrolizasyon sırasında açığa çıkan furfural bileşeninin hücre bölünmesini engellediği ve *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) ve *S. cerevisiae*

gibi bazı mikroorganizmaların gelişimini inhibe eden başlıca bileşen olduğu bilinmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015, Chandel ve ark., 2013). Fermantasyon ortamında 0.5-2 g/L aralığındaki derişimlerde furfural bulunduğu durumlarda mikroorganizma gelişiminin %25-99 oranında azaldığı bildirilmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015). Fermantasyon sürecinde inhibitör etki gösteren bileşenlerden asetik asit ise, düşük pH değerlerinde yağda çözünerek plazma membranına difüze olmakta, hücre içerisindeki nötral pH'larda ise iyonlarına ayrışarak sitoplazmada birirmektedir. Bu sırada açığa çıkan protonların hücre pH'sını düşürerek mikroorganizma aktivitelerini inhibe ettiği ve mikroorganizmaların ölümüne neden olduğu belirtilmektedir. Fermantasyon ortamında 1 g/L'ye kadar bulunan asetik asitin ksilitol üretimini teşvik ettiği, 3 g/L ve üzerindeki derişimlerin ise fermantasyonu olumsuz etkilediği bildirilmiştir. (Chandel ve ark., 2013). Bir başka çalışmada, fermantasyon ortamında 2.6 g/L derişiminde asetik asit bulunduğunda, ksiloz kullanımı, ksilitol üretimi ve hücre gelişiminin sırasıyla %13, %18 ve %30 oranlarında azaldığı rapor edilmiştir (Rao ve ark., 2016). Ayrıca, lignoselülozik materyallerdeki ligninin parçalanması sonucu oluşan başlıca inhibitörlerden olan fenolik maddeler, hücre membranının seçici geçirgenlik özelliğini kaybetmesine yol açarak mikroorganizma gelişimi ve ksilitol üretimini etkilemektedir. *C. guilliermondii* suşu kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, fermantasyon ortamının oldukça düşük miktarlarda (0.1 g/L) fenolik madde içermesi durumunda bile, ksilitol üretiminin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Chandel ve ark., 2013). Ksilitol üretiminde *C. athensensis* suşunun kullanıldığı bir başka çalışmada ise; 1 g/L'den daha düşük derişimde fenolik madde içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen üretimlerde olumsuz sonuçların alınmadığı belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2012a).

Hemiselülozik hidrolizatlardaki inhibitör bileşenlerin ksilitol üretimine etkisinin mümkün olduğunca düşük seviyelerde tutulması için; hidrolizasyonun daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi, inhibitörlere karşı yüksek direnç gösterebilen mikroorganizmaların seçilmesi veya hidrolizatların içerdiği inhibitör bileşenlerden arındırılmasının (detoksifikasyon) ardından fermantasyon ortamı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015). Yapılan bazı mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında ise; fermantasyon ortamı olarak inhibitör bileşenlerden arındırılmamış hemiselülozik hidrolizatlardan yararlanıldığı

belirtilmiştir (Ping ve ark., 2013; Wang ve ark., 2015). Ancak, öncelikle çeşitli fiziksel, kimyasal veya biyolojik yöntemler ile detoksifiye edilen hidrolizatların oldukça yaygın bir şekilde fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Hemiselülozik hidrolizatlara uygulanacak detoksifikasyon yöntemi, fermantasyonda kullanılan mikroorganizma türüne ve hidrolizatın kimyasal bileşimine bağlı olarak değişkenlik gösterebildiğinden, her çalışma için uygun bir yöntem belirlenmelidir. Uygulanan işlemlerin ksilitol üretim maliyetini arttırdığı göz önüne alındığında, bu aşamada ucuz ve etkili yöntemlerin kullanılması oldukça büyük bir önem taşımaktadır (Ur Rehman ve ark., 2015). Çizelge 2.1’de, çeşitli çalışmalarda kullanılan hemiselülozik kaynaklar, hidrolizasyon ve detoksifikasyon yöntemleri ile elde edilen hidrolizattaki ksiloz ve üretilen ksilitol miktarları verilmiştir.

Hemiselülozik hidrolizatların inhibitörlerden arındırılmasında fiziksel yöntemlerden olan vakum evaporasyonu kullanıldığında asetik asit, furfural, HMF ve vanilin gibi uçucu inhibitör bileşenlerin oldukça büyük bir çoğunluğunun uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir. Ancak, bu yöntemin uçucu olmayan inhibitörlerin derişimini arttırdığı ve hidrolizat hacmini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Aşırı alkalileştirme veya pH ayarlama, organik çözücü ekstraksiyonu, iyon değiştirici reçine kullanımı ve aktif kömür ile muamele uygulamaları ise detoksifikasyonda kullanılan kimyasal yöntemlerdendir. Hidrolizatların içerdiği fenolik madde, keton, furfural ve HMF inhibitörlerinden arındırılması amacıyla, genel olarak kalsiyum hidroksit ile sülfürik asit çözeltilerinin bir arada kullanıldığı pH ayarlama yöntemi sıklıkla uygulanan ve düşük maliyet gerektiren yöntemlerdendir. Ancak, pH ayarlama işleminin ardından hidrolizatın vakum evaporasyonuna tabi tutulduğu durumlarda, evaporatör haznesinin çeperlerinde kalsiyum sülfat bileşeninin oluştuğu ve bu bileşenin ısı transferini önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir. Bu nedenle, büyük ölçekli üretimlerde, iyon değiştirici reçineler kullanılarak iyonlarından arındırılan hidrolizatların vakum evaporasyon ile konsantre edilmesi önerilmektedir (Mohamad ve ark., 2015). Düşük maliyetler kullanılarak gerçekleştirilebilen bir diğer uygulama olan aktif kömür ile muamele uygulaması, serbest yağ asitleri, n-hekzan, pigmentler ve diğer inhibitör bileşenlerin uzaklaştırılmasını sağlayan etkili bir yöntem olarak bilinmektedir. Aktif kömür ile muamele uygulamasının etkinliğinin pH, sıcaklık, temas süresi ve hidrolizattaki aktif kömür oranı (w/v) gibi farklı proses parametrelerine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir.

Çizelge 2.1. Hemiselülozik hidrolizatlar kullanılarak ksilitol üretiminin gerçekleştirildiği çeşitli çalışmalara ait bilgiler

Mikroorganizma	Substrat kaynağı	Hidrolizasyon yöntemi	Detoksifikasyon yöntemi	Ksiloz derişimi (g/L)	Maksimum ksilitol derişimi (g/L)	Kaynak
<i>C. magnoliae</i>	Huş ağacı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%3, 120°C, 1 sa, 1:4)	Aktif kömür ile muamele (15 g/L, 160 vuru/dak, 30°C, 1 sa) ve anyon değiştirici reçine ile muamele (80 g/L)	37.6	30	Miura ve ark., 2015
<i>C. magnoliae</i>	Bambu ağacı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%3, 121°C, 1 sa, 1:10)	Aktif kömür ile muamele (20 g/L, 160 vuru/dk, 30°C, 24 sa)	19.4	10.5	Miura ve ark., 2015
<i>C. tropicalis</i>	Şekerpancarı küspesi	Seyreltik H ₂ SO ₄ (100 mg/g, 121°C, 20 dk, 1:10)	pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele (%2.5 w/v, 200 rpm, 30°C, 1sa)	49.7	27.12	Guáman-Burneo ve ark., 2015
<i>C. tropicalis</i>	Mısır koçanı	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%1, 121°C, 40 dk, 1:10)	pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele (1:40 w/v, 200 rpm, 30°C, 1sa)	31.25 ^a 160 ^b	-	Li ve ark., 2012
<i>D. hansenii</i>	Üzüm posası	Seyreltik H ₂ SO ₄ (%3.3, 130°C, 15 dk, 1:8)	Aktif kömür ile muamele (1:10 w/v, oda sıcaklığında, 1sa)	7.8 ^a 50.1 ^b	19.7	Salgado ve ark., 2012
<i>D. hansenii</i>	Asma budama artıkları	Seyreltik H ₂ SO ₄ (30 g/kg, 130°C, 15 dk, 1:8)	Aktif kömür ile muamele (20 g/g, oda sıcaklığında, 1sa)	14.6 ^a 57.3 ^b	23.9	Rivas ve ark., 2007
<i>C. athensensis</i>	Sebze artıkları	25°C'de suda 1 gece ve etanol/ seyreltik H ₂ SO ₄ karışımında bekletme (65°C, 4 sa)	pH ayarlama ve aktif kömür ile muamele (%2 w/v, 200 rpm, 30°C, 1sa)	123.42	100.1	Zhang ve ark., 2012b

^a hidrolizat konsantre edilmeden önce elde edilen ksiloz derişimi

^b hidrolizat konsantre edildikten sonra elde edilen ksiloz derişimi

Düşük pH değerlerinde gerçekleştirilen uygulamalar hidrolizatlarda bulunan iyonlaşmamış yapıdaki fenolik maddelerin, yüksek pH değerleri ise organik bileşiklerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Hidrolizatların arıtılması işlemi, aktif kömürün hidrolizat ile temas süresinin arttırılmasından olumlu yönde etkilenmektedir. Ayrıca, inhibitör bileşenlerin aktif kömür tarafından tutulmasını hızlandırması nedeni ile, genellikle bu işlemin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Ur Rehman ve ark., 2015).

Hidrolizattaki aktif kömür oranı (0.1-0.3 g/g), uygulama süresi (10-70 dak) ve sıcaklığı (30-80°C) olmak üzere farklı parametrelerin mısır koçanı hidrolizatının detoksifikasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada optimum değerler sırası ile 0.2 g/g, 40 dakika ve 80°C olarak rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2013a). Mısır koçanı hidrolizatı ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise, pH ayarlama ve aktif kömür uygulamaları birlikte kullanılmış ve işlemler sonucunda furfural bileşeninin tamamının, fenolik maddelerin ve asetik asitin ise oldukça büyük bir çoğunluğunun ortamdan uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir (Misra ve ark., 2013a). Zeytin ağacı budama artıkları kullanılarak hazırlanan hidrolizat, belirlenen optimum koşullar altında aktif kömür uygulamasına tabi tutulduğunda asetik asitin %46'sı, fenolik maddelerin %81'i, furfural ve HMF'nin ise tamamına yakınının hidrolizattan uzaklaştırıldığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, detoksifikasyon amacı ile pH ayarlama ve organik çözücü ekstraksiyonu yöntemleri uygulandığında, işlemler sonucunda hidrolizatın içerdiği inhibitör derişimlerinin daha yüksek olduğu bildirilmiş ve bu sebeple elde edilen hidrolizatın arıtılmasında aktif kömür uygulaması önerilmiştir (Mateo ve ark., 2013).

Mikrobiyel ksilitol üretimlerinde değerlendirilecek olan hemiselülozik hidrolizatların inhibitörlerden arındırılması işlemlerinde iyon değıştirici reçinelerden de yararlanıldığı, özellikle anyon değıştirici reçineler kullanıldığında hidrolizatlardaki furfural, asetik asit, HMF ve fenolik maddelerin, ayrıca aldehit ve alifatik asitlerin önemli ölçüde uzaklaştırıldığı belirtilmiştir (Ur Rehman ve ark., 2015). Mikrobiyel ksilitol üretiminde kullanılmak üzere hazırlanan ökaliptus ağacı hidrolizatının inhibitörlerinden arındırılması amacı ile hidrolizatın aktif kömür ile muamele edildiği ve iyon değıştirici reçine kullanıldığı bir çalışmada, aktif kömür uygulamasında HMF ve furfural bileşenlerinin, iyon değıştirici reçine kullanımı ile

de asetik asitin ortamdan etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı bildirilmiştir (Villarreal ve ark., 2006).

Hidrolizatların arıtılmasında, mikroorganizmalar veya enzimlerin kullanıldığı biyolojik yöntemlerden yararlanılan çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Hidrolizattaki inhibitör bileşenlerin bazı mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesi ile gerçekleştirilen biyolojik detoksifikasyon yöntemlerinin, enerji gereksinimlerinin daha düşük olması, istenmeyen bazı reaksiyon ürünlerinin açığa çıkmaması ve hidrolizatta hacim kaybı gerçekleşmemesi gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmektedir. Mısır sapı hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak değerlendirildiği bir çalışmada, hidrolizattaki furfural, HMF ve diğer inhibitörlerin ortamdan etkili bir şekilde uzaklaştırılmasında *Coniochaeta ligniaria* suşunun kullanıldığı bildirilmiştir (Rao ve ark., 2016). Hidrolizatların enzimler kullanılarak arındırılmasında ise genellikle lakkaz ve peroksidaz enzimlerinden yararlanılmaktadır. Ayrıca, son yıllarda hidrolizatların detoksifikasyonu ile ilgili olarak gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, nanofiltrasyon, vakum membran distilasyonu ve elektrokimyasal yöntemlerin kullanıldığı bildirilmektedir (Rao ve ark., 2016).

Lignoselülozik materyallerin enzimatik hidrolizasyonu, son yıllarda geliştirilen, çevre dostu olduğu ve daha spesifik ürünlerin elde edilebildiği bilinen alternatif bir yöntemdir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, mısır koçanı (Li ve ark., 2015), zeytin çekirdeği (Saleh ve ark., 2014) ve pirinç sapı (Swain ve Krishnan, 2015) gibi bazı lignoselülozik materyallerin enzimatik yöntemle hidrolize edilmeleri ile hazırlanan hidrolizatların ksilitol üretiminde değerlendirildiği görülmektedir. Genel olarak, hidrolizat hazırlığında hammadde olarak değerlendirilecek materyallerin enzimatik yöntemler ile hidrolize edilebilmesi için, öncelikle bu materyallere bazı ön işlemlerin uygulandığı belirtilmektedir. Hidrolizasyon etkinliğinin; enzimlerin katalizleme özelliği, derişimleri, inkübasyon süresi, kullanılan hammadde kaynağı, proses değişkenleri, uygulanan ön işlemler ve bu işlemler sonrasında açığa çıkan bileşenlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Enzimatik hidrolizasyonda genellikle, ksilan molekülündeki β -1,4 glikozidik bağlarına etki ederek kısa zincirli ksilo oligomerlerin açığa çıkmasını sağlayan ksilanaz enziminin kullanıldığı bilinmektedir. Ancak, lignoselülozik

materyallerin karmaşık yapısı nedeni ile bazı durumlarda, ksilanazın tek başına yeterli olmadığı ve böyle durumlarda, hemiselülozik yapıdan yüksek verimlerde ksiloz eldesi sağlanabilmesi için, ksilanaz enziminin ksilosidaz, arabinofuranosidaz ve glukuronidaz gibi enzimler ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Bu durumlarda, hidrolizat üretiminde kullanılacak her bir materyal için gereken enzimler ve enzimatik reaksiyon koşulları belirlenerek optimize edilmelidir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013).

Lignoselülozik materyallerin enzimatik yöntemler yardımı ile hidrolize edilmesinin çeşitli avantajlarına rağmen, enzimlerin hidrolizatta çözünmeleri nedeni ile ortamdan ayrılarak tekrar kullanılamamaları ve çeşitli ön işlemlerin uygulanmadığı durumlarda enzimlerin lignoselülozik materyallere yeterince etki edememesi gibi bazı olumsuz yönlerinin olduğu belirtilmektedir. Ayrıca asit hidrolizasyonu ile kıyaslandığında, enzimatik hidrolizasyon, işlemin daha uzun sürmesine yol açmaktadır. Bu nedenlerle, lignoselülozik materyallerin enzimatik yöntemler ile hidrolize edilmesi çalışmalarının geliştirilmesi gerektiği bildirilmektedir. Genel olarak daha düşük maliyetlerle, basit ve hızlı bir şekilde sonuç alınabildiğinden, hemiselülozik hidrolizatların elde edilmesinde, seyreltik asit hidrolizasyonu çok daha yaygın olarak uygulanmaktadır (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Ancak işlem sırasında ortaya çıkabilecek inhibitör bileşenlerin etkin bir şekilde uzaklaştırılması veya azaltılması gerekmektedir.

Mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında, hedeflenen ürün miktarına, ayrıca fermantasyon sonrasında ortamda bulunan biyokütle, kalıntı substrat ve açığa çıkan bazı yan ürünlerin derişimine bağlı olarak farklı saflaştırma basamaklarının uygulandığı belirtilmektedir. Genel olarak, öncelikle fermantasyon ortamının santrifüj edilmesi ile biyokütle ortamdan uzaklaştırılmakta, sonrasında uygulanan konsantrasyon ile ortamdaki ksilitol derişimi arttırılmaktadır. Fermantasyon ortamından ksilitolün saflaştırılması aşamasında en uygun yöntem belirlenirken, ortamda bulunan çeşitli safsızlıkların (şeker, şeker alkolü, tuz vb.) ve istenilen ürün özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Saflaştırma işlemlerinde, aktif kömür ile muamele, pH ayarlama, iyon değıştirici reçine kullanımı, membranla ayırma, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve çöktürme yöntemleri ile kromatografik yöntemlerden yaygın olarak yararlanıldığı veya bu yöntemlerin bir arada kullanıldığı

bildirilmektedir. Elde edilen ksilitolün kristalize edilmesi, ancak fermantasyon ortamından çeşitli yöntemler ile saflaştırılmasının ardından mümkün olmaktadır. Lignoselülozik materyallerin hidrolizasyonu sırasında açığa çıkan veya fermantasyonda ortama ilave edilen bazı bileşenlerin ortamda safsızlık oluşturmaları nedeni ile, saflaştırma işlemi uygulanmayan ortamlardan elde edilen ksilitol kristallerinin saf olarak kabul edilmediği rapor edilmektedir. Saf ksiloz içeren ortamlarda kimyasal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen ksilitol üretimi çalışmalarında ise, vakum evaporasyon ile konsantre edilerek veya soğutma, çöktürme, tuz ilavesi uygulamaları ile çözünürlükleri değiştirilerek, ksilitol kristallerinin elde edildiği bildirilmektedir (Martínez ve ark., 2015).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma

Tez çalışmasında kullanılan yerli maya suşları olan *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Z. Yeşim Özbaş'tan sağlanmıştır. Bu maya suşlarının Mihaliç peynirinden izole edildikleri bilinmektedir. Maya suşları, Yeast Extract Malt Extract (YM) agar besiyerinde yatık kültür halinde 4°C'de saklanmış ve belirli zamanlarda, aynı ortam kullanılarak aktiveleştirilmişlerdir.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin bileşimleri, EK A'da verilmiştir.

3.1.3 Kestane Kabukları

Tez çalışmasında lignoselülozik substrat kaynağı olarak kullanılan kestane kabukları, Bursa'da bulunan Kafkas Pasta Şekerleme San. Tic. A.Ş işletmesinden, kestane şekeri üretim prosesi artığı olarak sağlanmışlardır.

3.1.4 Ksilitol Üretiminin İncelendiği Deney Düzeneği

Kestane kabuğu hidrolizatında ksilitol üretiminin incelendiği çalışmalar, kesikli sistemde, sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST-402) yapılmıştır. Deneyler, 300 mL'lik erlenlerde 80 mL çalışma hacmi ile gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Fermantasyon Ortamına Aşıl原因an Kültürün Hazırlanması

Ksilitol üretimlerinin incelendiğı bütün deneylerde maya kültürleri bileşimi EK A'da verilen üreme ortamında, 90 vuru/dak çalkalama hızındaki çalkalamalı su banyosunda, 30°C'de 24 saat süre ile geliştirilmişlerdir. Elde edilen kültürler, fermantasyon ortamlarına %5 oranında, yaklaşık 6 log (cfu/mL) olacak şekilde aşıl原因mıştır.

3.2.2 Kestane Kabuğuna Asit Hidrolizi Uygulanması ve Hidrolizatın İnhibitör Maddelerden Arındırılması

Kestane kabuğundan, asit hidrolizi ile hidrolizat hazırlanması ve hidrolizatın inhibitör maddelerden arındırılması amacıyla modifiye bir yöntem kullanılmıştır (Canilha ve ark., 2005; Baek ve Kwon, 2007; Ramesh ve ark., 2013). Bu yöntem gere; öncelikle kabuklar, 60°C'de 12-15 saat süre ile kurutulmuşlardır. Kurutulan kabuklar, laboratuvar tipi bir öğütücü (Retsch ZM 200) yardımı ile öğütölmüşlerdir. Öğütölmüş kestane kabuğı %1.25 (v/v) sülfürik asit içerisine 10 g/100 mL oranında karıştırılarak, 125°C'deki otoklavda 30 dakika bekletilmiştir. Otoklavdan çıkan karışım, bir tülbent yardımıyla ayrıldıktan sonra, kaba filtre kağıdı ile süzölmüştür. Ardından, 9000 rpm'de 15 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Santrifüjlemeden sonra üstte kalan sıvı kısım ayrılarak, erlenlerde toplanmış ve böylece ham hidrolizat elde edilmiştir.

Elde edilen, oldukça koyu renge sahip olan ham hidrolizatın, otoklavlama sırasında ortaya çıkan başta Maillard reaksiyon ürünleri ve fenolik bileşikler olmak üzere, yüksek düzeyde inhibitör madde içerdiği bilinmektedir (Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013). Bu nedenle, hem maya üremesinin daha iyi düzeyde olması, hem de istenen ürünün alınabilmesi için, hidrolizata ek bazı detoksifikasyon işlemleri uygulanmıştır. Öncelikle, uçucu inhibitör maddelerin uzaklaştırılması için hidrolizat 100°C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Ardından, hidrolizatın pH'ı kalsiyum hidroksit yardımı ile 10'a yükseltilmiş ve bu aşamada oluşan çökelti, kaba filtrasyonla ayrılmıştır. Daha sonra, 13 M H₂SO₄ ile pH 7'ye düşürölmüş ve tekrar oluşan çökelti bu kez 9000 rpm'de 15 dakika santrifüjleme ile ayrılmıştır. Ayrılan

sıvı, toz haldeki 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 hidrolizat, ksiloz derişiminin arttırılması amacıyla, vakum altındaki döner buharlaştırıcıda 75°C’de konsantre edilmiştir. Konsantrasyon, hidrolizatın son hacmi, ilk halinin üçte biri olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen fermantasyon ortamı, pH’ı 6.25’e ayarlandıktan sonra, filtre sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir.

3.2.3 Maya Sayısının Belirlenmesi

Deneyler sırasında, fermantasyon ortamlarından belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak, kültürün serum fizyolojik içerisinde seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan, YM agar besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir. 28°C’de 48 saat inkübasyonun ardından koloni sayımları yapılarak, log (cfu/mL) cinsinden maya sayısı hesaplanmıştır.

3.2.4 Ksilitol Analizi

Fermantasyon süresi boyunca belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamından alınan örnekler santrifüjlenmiş ve üstte kalan sıvı kısım ksilitol analizinde kullanılmıştır. Ksilitol derişiminin tayini, spektrofotometrik olarak, D-sorbitol/ksilitol enzimatik test kitleri (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, Ireland) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5 Ksiloz Analizi

Üretilen hidrolizatlardaki ve fermantasyon ortamlarındaki ksiloz derişimleri, D-ksiloz enzimatik test kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, Ireland) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.6 Glukoz ve Fruktoz Analizi

Üretilen hidrolizattaki glukoz ve fruktoz derişimleri, D-fruktoz/D-glukoz enzimatik test kiti (Megazyme Assay Kits, Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, Ireland) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.7 Toplam Azot Tayini

Öğütölmüş kestane kabuğunda ve hazırlanan hidrolizatta bulunan toplam azot miktarının belirlenmesinde, Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (Chang, 1998).

3.2.8 Kuru Madde ve Kül Analizi

Kestane kabuğundaki kuru madde miktarı Bradley (1998)'e göre, kül miktarı Harbers (1998)'a göre belirlenmiştir.

3.2.9 Hemiselöloz, Selöloz ve Lignin Analizi

Kestane kabuğundaki hemiselöloz, selöloz ve lignin miktarlarını belirleyebilmek amacı ile, öncelikle materyale ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem için, 12 g materyal geri soğutucu altında aseton ile 3 saat süresince karıştırılmıştır. Karışım kaba filtre kağıdından süzölmüş, filtre kağıdındaki kalıntı 100°C'deki etövde 2 saat kurutulmuş ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Ekstrakte edilen madde miktarı eşitlik (3.1) yardımı ile hesaplanmıştır. Eşitlikte; W_1 ekstrakte edilen madde miktarını, G_0 başlangıç materyal ağırlığını (g), G_1 ise ekstraksiyon işleminden sonra kalan kalıntı miktarını (g) ifade etmektedir (Tiftik, 2006).

$$\%W_1 = [(G_0 - G_1) / G_0] \times 100 \quad (3.1)$$

Devamında, materyalin hemiselöloz içeriğini belirlemek için, üzerine 150 mL 0.5 N NaOH çözeltisi ilave edilen 6 g kalıntı geri soğutucu altında 3.5 saat süre ile karıştırıldıktan sonra kalıntı süzölmüş ve su ile yıkanarak nötrleştirilmiştir. Devamında etövde kurutulup, desikatörde soğutulmuş ve tartım alınmıştır.

Hemiselüloz miktarı (3.2) ile gösterilen eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte; W_2 hemiselüloz miktarını, G_0 başlangıç materyal ağırlığını (g), G_1 ekstraksiyon işleminden sonra kalan kalıntı miktarını (g), G_2 ise tartılan kalıntı miktarını (g) göstermektedir.

$$\%W_2 = [(G_1 - G_2) / G_0] \times 100 \quad (3.2)$$

Kestane kabuğundaki lignin miktarının belirlenmesi için, 1 g ağırlığındaki ekstraksiyondan sonra kalan kalıntının üzerine %72'lik sülfürik asit çözeltisinden 30 mL eklenerek 14°C'de 1 gün boyunca bekletilmiştir. Ardından, 300 mL saf su ilave edilerek 1 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatılmış ve süzülerek nötralleşene kadar yıkanmıştır. Etüvde kurutulup, desikatörde soğutulan kalıntı tartılmıştır. Lignin miktarı (3.3) eşitliği yardımı ile hesaplanmıştır. Kullanılan eşitlikteki, W_3 lignin miktarını, W_1 ekstrakte edilen madde miktarını, G_3 lignin analizi için gerekli kalıntı miktarını (1 g), G_4 ise analiz sonucu tartılan kalıntı miktarını (g) ifade etmektedir.

$$\%W_3 = [((1 - W_1) - G_4) / G_3] \times 100 \quad (3.3)$$

Materyaldeki selüloz miktarı ise, (3.4) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlikte; W_1 ekstrakte edilen madde miktarını (%), W_2 hemiselüloz miktarını (%), W_3 lignin miktarını (%), A ise kül miktarını (%) göstermektedir (Tiftik, 2006).

$$\%W_4 = 100 - (A + W_1 + W_2 + W_3) \quad (3.4)$$

3.2.10 Toplam Fenolik Madde Analizi

Kestane kabuğu hidrolizatı hazırlığı sırasında farklı aşamalarda alınan örneklerin toplam fenolik madde analizi, Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilen Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Folin-Ciocalteu yönteminin ilkesi; fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu çözeltisini indirgemesine dayanmaktadır. Bu amaçla, 500 µL örnek, 7 mL saf su ve 500 µL Folin-Ciocalteu çözeltisi ile karıştırılıp 3 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda üzerine 2 mL doymuş sodyum karbonat (%20) ilave edildikten sonra 25°C' de 1 saat inkübatörde bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda indirgenen Folin-Ciocalteu çözeltisinin

oluşturduğu mavi renk, spektrofotometre cihazında (UV 1800, Shimadzu) 720 nm dalga boyunda havaya karşı okunmuştur. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı, mg gallik asit eşdeğeri/L olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan gallik asit çalışma doğrusu EK B’de verilmiştir.

3.2.11 Hidroksimetil furfural (HMF) Analizi

Örnekteki HMF analizi, Zappalá ve ark. (2005) tarafından önerilen metoda göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntem, barbutirik asit, *p*-toluidin ve HMF’nin kırmızı renkli kompleks oluşturması ve oluşan kırmızı rengin yoğunluğunun HMF miktarına bağlı olarak artması prensibine dayanmaktadır. Oluşan kırmızı renge bağlı absorbands 550 nm dalga boyundaki spektrofotometre cihazında (UV 1800, Shimadzu) okunmuştur (Duru ve ark., 2012).

3.2.12 pH ölçümü

Çalışma boyunca fermentasyon ortamındaki pH ölçümleri ve ayarlamaları, Hanna 2211 (Almanya) marka pH metre kullanılarak yapılmıştır.

3.2.13 Kestane Kabuğu Hidrolizatında İki Yerli Maya Suşunun Ksilitol Üretimlerinin İncelenmesi

Çalışmanın başlangıcında, *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 suşlarının, ksiloz ve maya özütü ile desteklenen kestane kabuğu hidrolizatında ksilitol üretimleri incelenmiştir. Bu çalışmada, kestane kabuğu hidrolizatı ksiloz derişimleri 49 g/L ve 98 g/L olmak üzere iki farklı şekilde kullanılmıştır. Belirtilen ksiloz derişimlerine literatürden faydalanılarak karar verilmiştir. Bu ortamlara ayrıca, 1.5 g/L olacak şekilde maya özütü ilave edilmiştir. Deneyler çalkalamalı su banyosunda, 30°C’de ve 100 vuru/dak çalkalama hızında, 300 mL’lik erlenler ve 80 mL çalışma hacmi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.14 Kestane Kabuğu Hidrolizatında Farklı Azot Kaynaklarının *C. tropicalis* M2 Suşunun Ksilitol Üretimine Etkisinin İncelenmesi

Farklı parametrelerin *C. tropicalis* M2 ile ksilitol üretimi üzerine etkilerini incelemekten önce, fermantasyon ortamında kullanılacak olan azot kaynağının belirlenmesi için bir deneme kurulmuştur. Bu denemede, 49 g/L ksiloz içeren kestane kabuğu hidrolizatına 1.5 g/L derişiminde maya özütü, pepton, amonyum klorür ve amonyum sülfat ayrı ayrı eklenmiştir. Deneyler çalkalamalı su banyosunda, 30°C’de ve 100 vuru/dak çalkalama hızında, 300 mL’lik erlenler ve 80 mL çalışma hacmi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.15 Deney Tasarımının Oluşturulması ve Çeşitli Parametrelerin Ksilitol Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Kestane kabuğu hidrolizatı içeren doğal fermantasyon ortamında ksilitol üretiminin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu amacı ile; ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızı (X_3) bağımsız değişken olarak seçilmişlerdir. Tasarımda yer alan deneylerde kullanılan hidrolizatın her deney için aynı bileşimde olması gerektiğinden deneylerin başında büyük miktarda hidrolizat hazırlanmış ve küçük miktarlara bölünerek -18°C’deki derin dondurucuda kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Deney tasarımı X_1 olarak ifade edilen ksiloz derişimine; hazırlanan kestane kabuğu hidrolizatının içerdiği ksiloz miktarı dikkate alınarak, besiyerine ksiloz ilave edilerek ulaşılmıştır.

Parametre etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenebilmesi için, Merkezi Karma Tasarım (Central Composite Design) yöntemine göre bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Bu amaçla, Design Expert® 9.0.6 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı kullanılmıştır. Deney tasarımı -1, 0, +1 olarak kodlanmış 3 düzeyde yapılmış, merkez noktasında 4 tekrar kullanılmıştır. Tasarımda deney sayısı, eşitlik (3.5) temelinde, aynı program yardımı ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikte k , bağımsız değişken sayısını ifade etmektedir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 4 \quad (3.5)$$

Deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri ise, eşitlik (3.6) yardımı ile hesaplanmıştır. Bu eşitlikte; x_i kodlanmış değeri, X_i bağımsız değişkenin gerçek değerini, X_0 bağımsız değişkenin merkez noktasındaki değerini ve ΔX ise, düzeyler arasındaki farkı ifade etmektedir.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad (3.6)$$

Deney tasarımıda kullanılan bağımsız değişkenler ile minimum ve maksimum değerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Merkezi karma tasarımda kullanılan bağımsız değişkenler

Bağımsız değişken	Simge (birim)	Minimum değer	Maksimum değer
Ksiloz başlangıç derişimi	X_1 (g/L)	30	100
Amonyum klorür başlangıç derişimi	X_2 (g/L)	0	4
Çalkalama hızı	X_3 (vuru/dak)	80	200

3.2.16 Bağımlı Değişkenlerin (Yanıtların) Hesaplanması

Hazırlanan deney tasarımı doğrultusunda gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamlarından belirli zaman aralıklarında alınan örneklerdeki ksilitol derişimi, maya sayıları ve ksiloz derişimleri belirlenmiş ve bunların zamanla derişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuştur.

Oluşturulan grafikler kullanılarak, her deney için yanıt olarak seçilen; maksimum ksilitol derişimleri (Y_1), ksilitol verimleri (Y_2), maksimum ksilitol üretim hızları (Y_3), substrat dönüşüm yüzdeleri (Y_4) ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızları (Y_5) hesaplanmıştır. Bütün grafiklerin oluşturulmasında ve hesaplamaların yapılmasında, Origin Pro 8 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılmıştır.

3.2.16.1 Ksilitol Üretim Hızı

Ksilitol üretim hızı (r_k), birim zamanda üretilen ksilitol derişiminin zamanla değişimini ifade etmektedir. Ksilitol derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulduktan sonra, elde edilen eğim değerlerinden, maksimum ksilitol üretim hızları (verimlilik) hesaplanmıştır. Eşitlik (3.7)'de, $\ddot{U}$; ürün derişimini, t ; zamanı ifade etmektedir.

$$r_k = \frac{d\ddot{U}}{dt} \quad (3.7)$$

3.2.16.2 Ksilitol Verimi

Ürün verimi, kullanılan substrat başına oluşan ürün miktarı olarak tanımlanmaktadır. Ksilitol verimi, (3.8) eşitliği ile ifade edilmektedir (Shuler ve Kargi, 2002).

$$Y_{\ddot{U}/S_0} = -\frac{\Delta\ddot{U}}{\Delta S} \quad (3.8)$$

Çalışmada, tasarlanan her deney için ksilitol verim yüzdeleri, (3.9) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte C_{km} ; maksimum ksilitol derişimini, S ; fermantasyon sonundaki ksiloz derişimini, S_0 ise; ksiloz başlangıç derişimini ifade etmektedir.

$$Y_{\ddot{U}/S_0} = -\frac{C_{km}}{S - S_0} 100 \quad (3.9)$$

3.2.16.3 Substrat Dönüşüm Yüzdesi

Substrat dönüşüm yüzdesi (y_s), eşitlik (3.10) ile hesaplanmıştır. Burada S_0 ; başlangıçtaki substrat derişimini ve S ise; fermantasyon sonundaki substrat derişimini göstermektedir.

$$y_s = \frac{S_o - S}{S_o} 100 \quad (3.10)$$

3.2.16.4 Ürün Özgöl Oluşum Hızı

Ürün özgöl oluşum hızı, kesikli sistemlerde birim mikroorganizma derişimindeki ürün oluşum hızı olarak tanımlanmaktadır. Üremenin maya sayısı ile takip edildiğı bu çalışmada, ürün özgöl oluşum hızı, eşitlik (3.11) ile hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi, 2002). Burada N, log (cfu/mL) olarak maya sayısını, Ü ürün derişimini, t zamanı göstermektedir.

$$q_p = \frac{1}{N} \frac{dÜ}{dt} \quad (3.11)$$

Belirli zamanlarda (3.7) eşitliğine göre hesaplanan verimlilik değerlerinin, aynı zamana karşı gelen maya sayısına bölünmesi ile elde edilen ürün özgöl oluşum hızlarından en yüksek olanı, maksimum ürün özgöl oluşum hızını vermektedir.

3.2.17 Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmesi

Hesaplanan bağımlı değişkenlerin; ksiloz başlangıç derişimi, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızı ile değişimlerini gösteren model eşitlikler, çoklu regresyon analizi ile, Design Expert® 9.0.6 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Tez çalışmasında, maksimum ksilitol derişimi, maksimum ksilitol üretim hızı, ksilitol verimi ve ürün özgöl oluşum hızının modellenmesinde, (3.12) eşitliğinde gösterilen; hem lineer modeli, hem de ikinci dereceden polinom modelini içeren karesel model kullanılmıştır. Burada, y; yanıt, X_i ve X_j bağımsız değişkenler, β_o ; sabit katsayı, β_j , β_{jj} ve β_{ij} de sırasıyla; lineer, ikinci dereceden ve iki terimli etkileşim katsayılarını ifade etmektedir.

$$y = \beta_o + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.12)$$

Substrat dönüşüm yüzdesinin modellenmesinde ise; etkileşim terimlerini de içeren lineer model kullanılmıştır. Eşitlik (3.13) ile gösterilen lineer modelde, y ; yanıt, X_i ve X_j bağımsız değişkenler, β_0 ; sabit katsayı, β_j ve β_{ij} de sırasıyla; lineer ve iki terimli etkileşim katsayılarını ifade etmektedir.

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.13)$$

Türetilen her model için aynı program yardımı ile varyans analizi yapılmış; modelin, bağımsız değişkenlerin ve bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimlerin önemlilik dereceleri belirlenmiştir. Ayrıca; bağımsız değişkenlerin ikili etkileşimlerini gösteren yanıt yüzey grafikleri oluşturulmuş ve yorumlanmıştır.

3.2.18 Optimizasyon

Çalışmada, kestane kabuğu hidrolizatı içeren doğal fermantasyon ortamında ksilitol üretimi için optimum koşulların belirlenmesi amacı ile nümerik optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla “istenen hedefe ulaşma fonksiyonu” kullanılmıştır. Belirlenen hedefler doğrultusunda optimizasyon, Design Expert® 9.0.6 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programı yardımı ile yapılmıştır.

Optimizasyonda, yanıtlardan maksimum ksilitol derişimi ve substrat dönüşüm yüzdesinin maksimum olması hedeflenmiş; yapılan deney tasarımı doğrultusunda gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, hesaplanan diğer yanıtlar (ksilitol verimi, maksimum ksilitol üretim hızı ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızı) için hedef belirlenmemesine karar verilmiştir. Bağımsız değişkenlerin arasındaki ikili etkileşimlerin yanıtlar üzerine etkisini gösteren yüzey grafiklerinin yorumlanması sonucunda, bağımsız değişkenler için de hedefler belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerden ksiloz başlangıç derişiminin 80-100 g/L arasında minimum, amonyum klorür başlangıç derişiminin 2-4 g/L arasında, çalkalama hızının ise 80-100 vuru/dak arasında minimum olması hedeflenmiştir.

Hedeflerin belirlenmesinin ardından, elde edilen optimizasyon önerileri arasından, hedef belirtilen yanıt değerlerinin yüksek olması esas alınarak ve istenen

hedefe ulaşma fonksiyonunun mümkün olduğunca 1'e yakın olmasına dikkat edilerek, en uygun olan kombinasyon seçilmiştir.

Optimum koşullar belirlendikten sonra, bu koşulların birlikte kullanıldığı bir deney yapılarak, seçilen optimum koşullar doğrulanmaya çalışılmıştır. Elde edilen deney sonuçlarının %95 güven aralığında doğrulanıp doğrulanmadığı, ilgili programın “doğrulama” menüsü yardımı ile belirlenmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, lignoselülozik bir artık olan kestane kabuğunun *C. tropicalis* ile ksilitol üretiminde kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla, kestane kabuğuna asit hidrolizi uygulanarak, ksiloz içeren hidrolizat hazırlanmış ve inhibitör maddelerin uzaklaştırılması amacıyla çeşitli işlemler uygulanmıştır. Öncelikle, ksiloz ve maya özütü ile desteklenen hidrolizatta, iki yerli *C. tropicalis* suşunun ksilitol üretimi incelenmiştir. Seçilen suş (*C. tropicalis* M2) ile yapılan bir sonraki denemede, farklı azot kaynaklarının ksilitol üretimine etkisi araştırılmıştır. Hidrolizat ortamına eklenecek azot kaynağı da belirlendikten sonra, bu ortamda *C. tropicalis* M2 ile ksilitol üretimine çeşitli parametrelerin etkileri incelenmiş ve yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiştir. Bu amaçla; ksiloz başlangıç derişimi, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızı bağımsız değişken olarak seçilmiş ve merkezi karma tasarım yöntemi ile bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Yanıt olarak hesaplanan bağımlı değişkenlerin parametreler üzerindeki etkileri modellendikten sonra, optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon ile, bazı bileşenlerce desteklenen kestane kabuğu hidrolizatında *C. tropicalis* M2 ile ksilitol üretimi için en uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1. Kestane Kabuğu ve Hidrolizatına Ait Bazı Kimyasal Özellikler

Çalışmada kullanılan kestane kabuğunun, toplam azotlu madde, kuru madde, kül, selüloz, hemiselüloz ve lignin miktarları belirlenmiştir. Hazırlanan ve deneylerde fermentasyon ortamı olarak kullanılan kestane kabuğu hidrolizatında ise; ksiloz, glukoz, fruktoz, toplam azotlu madde, toplam fenolik madde ve HMF analizleri yapılmıştır. Toplam fenolik madde analizi, hidrolizat hazırlığı sırasında uygulanan çeşitli işlem aşamalarından sonra yapılarak, bu aşamaların fenolik madde miktarındaki azalmaya etkisi de belirlenmiştir. HMF, hemiselülozik hidrolizatlarda ortaya çıkan inhibitör maddelerden biri olarak bilinmektedir (Rao ve ark., 2016). Bu nedenle, kestane kabuğu hidrolizatında da bu maddenin varlığı araştırılmıştır. Ancak, hidrolizatın HMF içermediği bulunmuştur.

Çizelge 4.1’de, kullanılan kestane kabuğuna ait bazı bileşim özellikleri verilmiştir. Lignoselülozik yapının içinde bulunan ve ksilozu barındıran hemiselülozun, kestane kabuğunda %20.01 oranında bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kestane kabuğuna ait bazı bileşim özellikleri

Bileşen	Miktar (%)
Toplam azotlu madde	4.78 ± 0.072 ^a
Kuru madde	91.19 ± 0.064
Selüloz	35.90 ± 5.464 ^a
Hemiselüloz	20.01 ± 1.219 ^a
Lignin	42.63 ± 4.036 ^a
Kül	0.99 ± 0.064 ^a

^a Kuru maddedeki miktarlardır

Kestane kabuğundan hazırlanan ve deneylerde fermantasyon ortamı olarak kullanılan hidrolizatın bazı bileşenleri ise; Çizelge 4.2’de verilmiştir. Otoklavlamamanın ardından elde edilen ham hidrolizatta, ksiloz miktarının düşük (7 g/L) olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, hidrolizata uygulanan işlemlerin ardından, son aşamada konsantre edilerek ksiloz miktarı mümkün olduğunca arttırılmaya çalışılmıştır (Bkz. Bölüm 3.2.2). Alkalileştirme ve aktif kömür uygulamalarının ardından hidrolizat, 3 kat konsantre edilmesine rağmen, son hidrolizatta ksiloz miktarı 14 g/L olarak bulunmuştur. Konsantrasyon oranının 3 katın üzerine çıkartılması ile, ortamdaki inhibitör maddelerin miktarı da arttığından, maya üretmesi ve ksilitol üretimi oldukça olumsuz etkilenmiştir. Bu nedenle, çalışmada 3 kattan daha fazla konsantrasyon yapılamamış ve hidrolizatın ksiloz miktarı en fazla 14 g/L’ye kadar çıkarılabilmektedir. Üretilen hidrolizatın önemli ölçüde glukoz ve bir miktar da fruktoz içerdiği görülmektedir. Hidrolizasyon sırasında çoğunlukla selüloz yapısından açığa çıkan glukozun, maya metabolizmasında ksilitole dönüşmediği bilinmesine rağmen, hidrolizatta üremeyi destekleyen önemli bir bileşen olduğu düşünülmektedir. Uygulanan işlemlerin ardından hidrolizatta kalan toplam azotlu madde miktarının da oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Kestane kabuğu hidrolizatına ait bazı bileşim özellikleri

Bileşen	Miktar
Ksiloz (g/L)	14.00 ± 0.000
Glukoz (g/L)	62.69 ± 2.345
Fruktoz (g/L)	8.03 ± 0.946
Toplam azotlu madde (%)	0.03 ± 0.009
Toplam fenolik madde (mg gallik asit eşdeğeri/L)	40.67 ± 0.412
HMF	-

Çizelge 4.2’de verilen toplam fenolik madde miktarı, hidrolizata detoksifikasyon işlemlerinin uygulanması ve konsantrasyonun ardından elde edilen son miktardır. Ham hidrolizata uygulanan çeşitli işlemlerin ardından ölçülen toplam fenolik madde miktarları Çizelge 4.3’te verilmiştir. Başlangıçta 2152.72 mg/L olan toplam fenolik madde miktarı, %98.11 bir azalma ile son hidrolizatta 40.67 mg/L olarak ölçülmüştür. Özellikle alkalileştirme ve pH ayarlama aşamasının, fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında oldukça etkili olduğu görülmektedir. Aktif kömür ile muamelenin ardından ortamda 20.381 mg gallik asit eşdeğeri/L miktarında kalmış olan toplam fenolik madde, ksiloz miktarının artırılması amacıyla yapılan konsantrasyon işlemi ile yaklaşık iki katına çıkmıştır.

Lignoselülozik kaynaklardan asit hidrolizi ile elde edilen hidrolizatlarda, hidrolizasyon sırasında ortaya çıkan inhibitör maddelerin başında fenolik bileşikler gelmektedir. Birçok çalışmada; hemiselülozik hidrolizatın elde edilmesinin ardından, bazı işlemler tek başına veya birlikte uygulanarak; fenolik bileşikler, asetik asit, furfural ve HMF gibi inhibitör maddelerin azaltılması amaçlanmaktadır (Guáman-Burneo ve ark., 2015; Rafiqul ve Mimi Sakinah, 2013; Zhang ve ark., 2012b). Bu çalışmada da; kestane kabuğu hidrolizatından elde edilen ham hidrolizatta maya üremesi ve ksilitol üretimi sağlanamadığı için, bu işlemlerden bazıları kullanılarak, hidrolizattaki inhibitör maddelerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Söz konusu inhibitör maddelerden, HMF ve toplam fenolik madde miktarı takip edilmiştir. Ham hidrolizatın HMF içermediği, ancak yüksek düzeyde fenolik madde içerdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Alkalileştirme ve pH ayarlama ile aktif kömür uygulamaları birlikte kullanılarak, ortamdaki toplam fenolik madde miktarı önemli ölçüde azaltılabilmektedir.

Çizelge 4.3. Hidrolizatın inhibitör maddelerden arındırılması ve konsantre edilmesi sırasında tespit edilen toplam fenolik madde miktarları

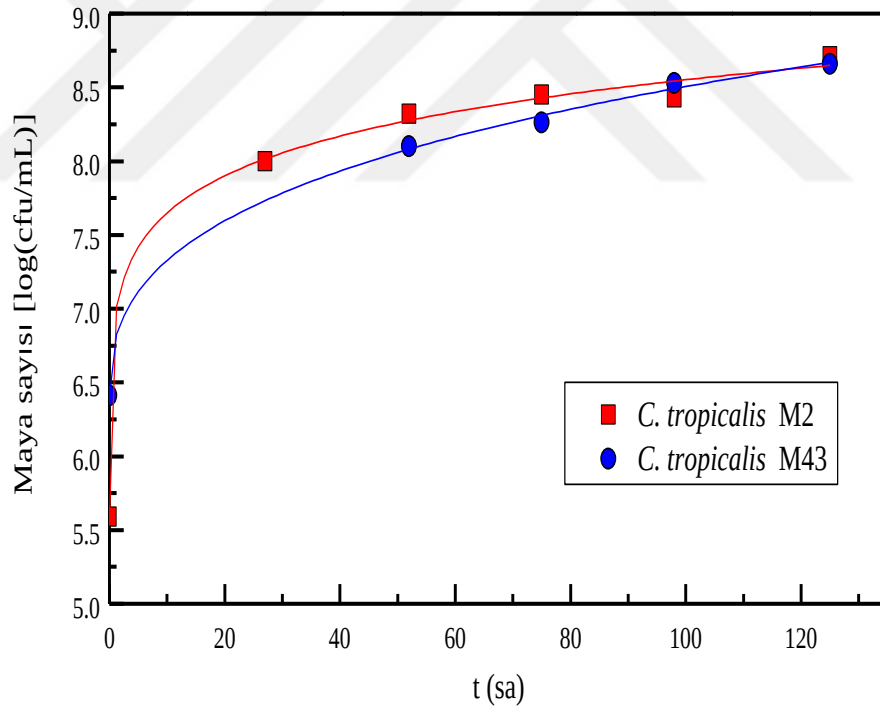
İşlem	Toplam fenolik madde (mg gallik asit eşdeğeri/L)
Ham hidrolizat	2152.72 ± 51.488
Alkalileştirme ve pH ayarlama	288.64 ± 3.432
Aktif kömür ile muamele	20.38 ± 2.471
Konsantrasyon	40.67 ± 0.412

4.2. Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 Suşlarının Üreme ve Ksilitol Üretimlerinin İncelenmesi

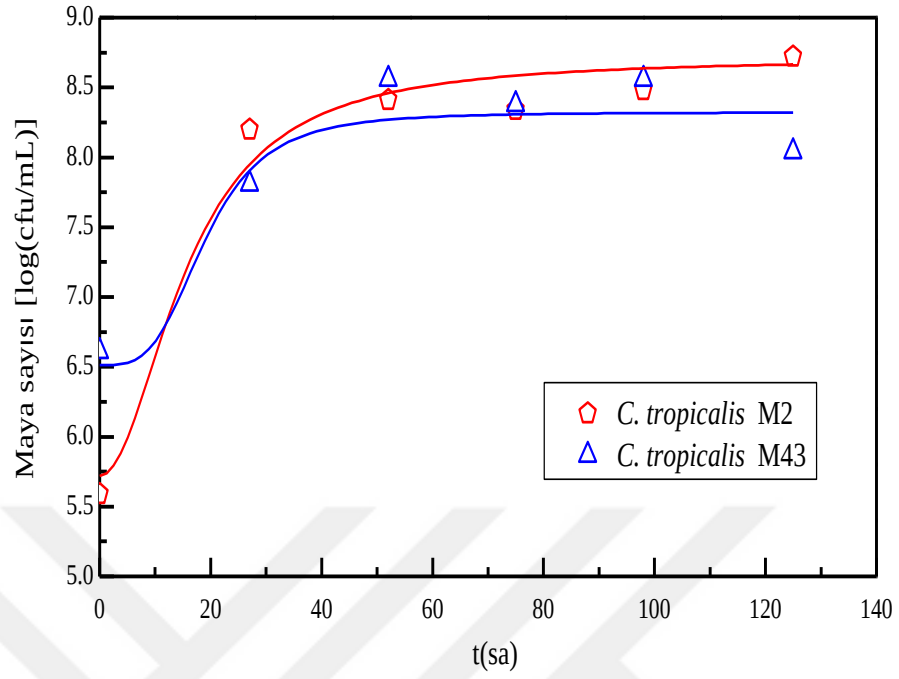
Tez çalışmasında; kestane kabuğu hidrolizatında ksilitol üretimi amacıyla kullanılacak olan maya suşunun belirlenmesi amacıyla, öncelikle iki yerli maya suşu olan *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 bu ortamda denemeye alınmışlardır. Bu suşların, ksilitol üretebildikleri ve ksiloz içeren tanımlı fermantasyon ortamında yüksek verimde ksilitol üretme potansiyeline sahip oldukları, daha önce tarafımızca yapılan bir çalışma kapsamında belirlenmiştir (Eryaşar ve Karasu Yalçın, 2016). Söz konusu çalışmada; incelenen 16 adet maya suşu içerisinde, M2 suşu tanımlı fermantasyon ortamında daha iyi sonuç vermesine rağmen, bunu M43 suşu izlemiş ve her iki suş da potansiyel ksilitol üreticisi olarak öne çıkmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, mikroorganizmaların hemiselülozik hidrolizatlardaki inhibitör maddelere karşı gösterdikleri duyarlılığın suşa bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Mustapa Kamal ve ark., 2011). Tanımlı fermantasyon ortamında ksilitol üreten bir suşun, hidrolizatta üretemeyebildiği veya üretim veriminin düşebildiği rapor edilmiştir. Maya suşlarının tanımlı fermantasyon ortamında ve hidrolizatlarda gösterdikleri bu farklı davranış ve suşların duyarlılığının değişebilmesi nedeniyle, bu çalışmada, potansiyel her iki suşun, kestane kabuğu hidrolizatında üreme ve ksilitol üretimleri araştırılmıştır.

C. tropicalis M2 ve *C. tropicalis* M43 suşlarının kestane kabuğu hidrolizatındaki üreme ve ksilitol üretimlerini incelemek için yapılan çalışmada 49 g/L ve 94 g/L olmak üzere iki farklı ksiloz derişiminde çalışılmıştır. Bu çalışmada

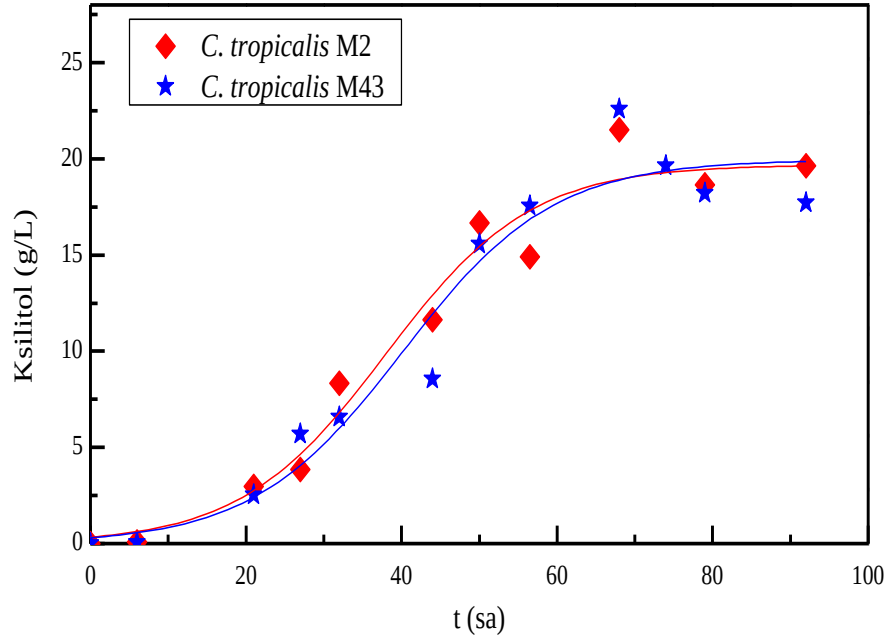
ayrıca; hidrolizata 1.5 g/L olacak şekilde maya özütü ilavesi de yapılmıştır. İki suşun kestane kabuğu hidrolizatı içeren ortamdaki maya sayılarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur. Suşların ksilitol üretimlerinin zamanla değişimleri ise; Şekil 4.3 ve 4.4’te verilmiştir. 49 g/L ksiloz içeren ortamda her iki suşun da sayısında yaklaşık 2 logaritmik birimlik artış olmuştur. Ksiloz derişiminin 94 g/L olduğu ortamda ise; M2 suşunun sayısı yaklaşık 3 logaritmik birim artarken, M43 suşunun sayısının 2 logaritmik birim arttığı bulunmuştur. Bu suşların ksilitol üretimlerinin, 49 g/L ksiloz içeren ortamda birbirlerine çok yakın olduğu bulunmuş ve maksimum ksilitol derişimleri M2 ve M43 suşları için sırasıyla; 19.62 ve 19.85 g/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). Ksiloz derişimi 94 g/L olduğunda ise; M2 suşu için maksimum ksilitol derişimi 27.68 g/L ve M43 suşu için 25.33 g/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



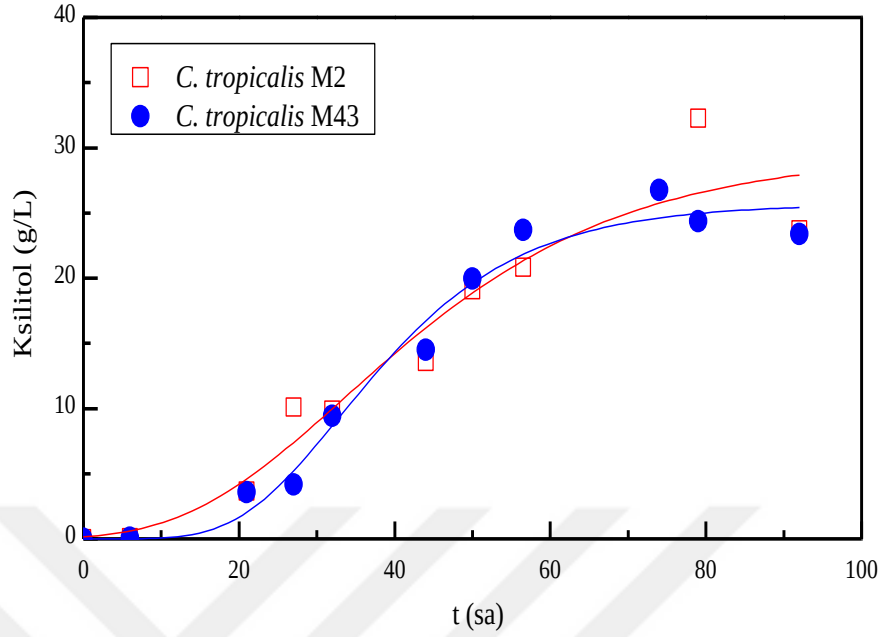
Şekil 4.1. 49 g/L ksiloz içeren kestane kabuğu hidrolizatı ortamında *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 suşları için maya sayılarının zamanla değişimleri



Şekil 4.2. 94 g/L ksiloz içeren kestane kabuğu hidrolizatı ortamında *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 suşları için maya sayılarının zamanla değişimleri



Şekil 4.3. 49 g/L ksiloz içeren kestane kabuğu hidrolizatı ortamında *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 suşları için ksilitol derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.4. 94 g/L ksiloz içeren kestane kabuğu hidrolizatı ortamında *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 suşları için ksilitol derişimlerinin zamanla değışimleri

Hazırlanan kestane kabuğu hidrolizatını içeren doğal fermantasyon ortamında, özellikle 49 g/L ksiloz kullanıldığında, iki suşun ksilitol üretimlerinin birbirine çok yakın olduğu bulunmuştur. 94 g/L ksiloz içeren ortamda ise; M2 suşunun bir miktar daha fazla ksilitol ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca, ksiloz derişiminin daha yüksek olduğu ortamda bu suşun sayısındaki artışın da diğer suştan fazla olduğu bulunmuştur. Bu nedenlerle, tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında *C. tropicalis* M2 suşu ile çalışılmasına karar verilmiştir.

M2 suşunun bir miktar daha fazla ksilitol ürettiği belirlenmesine rağmen, her iki yerli maya suşunun da zenginleştirilmiş kestane kabuğu hidrolizatında ksilitol üretme potansiyeline sahip olduğu ortaya konmuştur. Gıda kaynaklı mayaların hemiselülozik hidrolizatlardan ksilitol üretiminde kullanımına, literatürde sık rastlanmamaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların birçoğunda, orman endüstrisi artıkları, ağaç artıkları veya diğer lignoselülozik kaynaklardan izole edilen mayaların kullanıldığı görülmektedir. Bu ortamlara adapte olmuş suşların ksilozu kullanma ve ksilitole dönüştürme yeteneklerinin daha fazla olacağı öngörülmekte ve lignoselülozik kaynaklardan izole edilen suşların kullanımı önerilmektedir (Guamán

Burneo ve ark., 2015; Lourenço ve ark., 2014). Bu tez çalışmasında ise; izolasyon kaynağı Mihaliç peyniri olan maya suşlarının hemiselülozik hidrolizatta gelişme ve ksilitol üretme potansiyellerinin yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, deniz suyuyla beslendiği bilinen, tuza dirençli ağaçlardan oluşan mangrov ormanlarından izole edilen maya suşlarının (*C. saturnus*) yüksek verimlerde ksilitol ürettiği belirlenmiştir (Kamat ve ark., 2013). Bu ortamdan izole edilen mikroorganizmaların, hücrelerinde gliserol, mannitol, sorbitol ve ksilitol biriktirerek, yüksek tuz içerikli ortama adaptasyon sağladıkları belirtilmiştir. Benzer şekilde, bu tez çalışmasında da, oldukça tuzlu bir peynir olan Mihaliç peynirinden izole edilmiş olan maya suşlarının ksilitol üretme yeteneklerinin tuzlu ortamda gelişebilme özellikleri ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

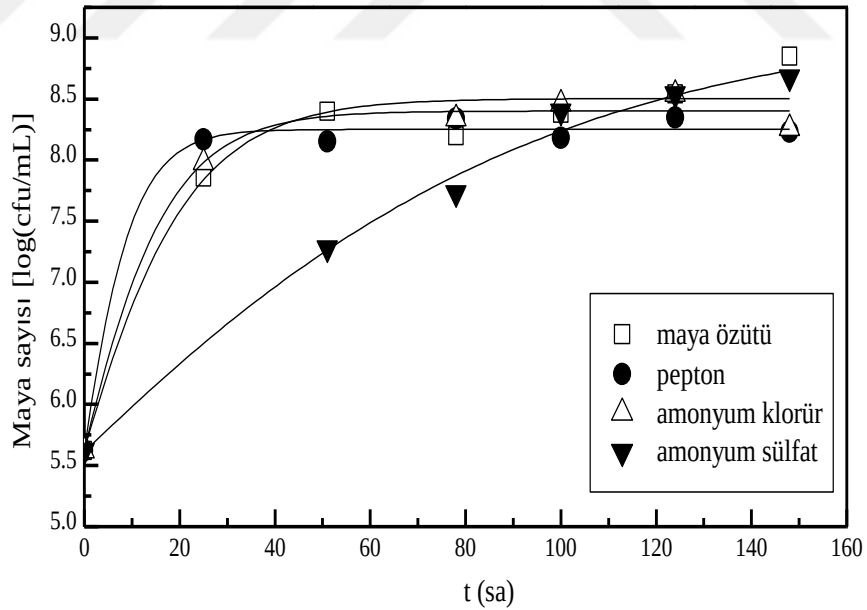
4.3. Kestane Kabuğu Hidrolizatı İçeren Ortamda Farklı Azot Kaynaklarının *C. tropicalis* M2 Suşunun Üreme ve Ksilitol Üretimi Üzerine Etkisi

Çalışmada kullanılan kestane kabuğunun toplam azot miktarı %4.36 olarak belirlenirken, hidrolizasyon aşamalarında bunun büyük bir kısmının uzaklaştığı ve son hidrolizatta çok düşük (%0.03) olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.1 ve 4.2). Bu nedenle hidrolizatın azot kaynağı ile desteklenmesine karar verilmiştir.

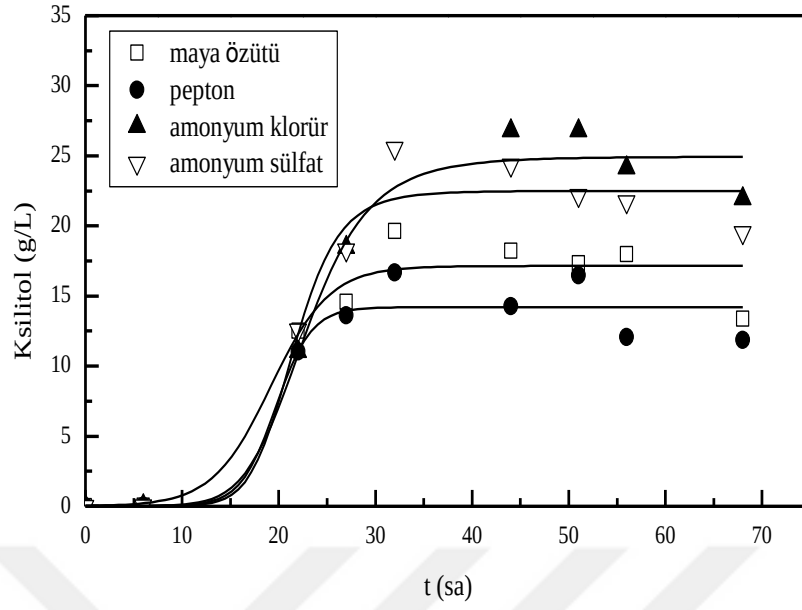
Tez çalışmasının bundan sonraki aşaması olan, çeşitli parametrelerin ksilitol üretimine etkisinin belirleneceği deneylerde ortamda kullanılacak azot kaynağının tespit edilebilmesi için, 49 g/L ksiloz içeren kestane kabuğu hidrolizatına maya özütü, pepton, amonyum klorür ve amonyum sülfat ayrı ayrı eklenmiştir. Farklı azot kaynaklarının *C. tropicalis* M2 suşunun üremesi ve ksilitol üretimi üzerine etkilerini gösteren grafikler, Şekil 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur. Buna göre, kullanılan dört azot kaynağı için de, maya sayısının yaklaşık 3 logaritmik birim arttığı belirlenmiştir. Amonyum sülfat içeren ortamda üreme diğer ortamlara göre daha yavaş olmasına rağmen, çizilen üreme eğrileri incelendiğinde en yüksek maya sayısının [8.73 log (cfu/mL)] bu ortamda elde edildiği görülmektedir. Mayanın ksilitol üretimi incelendiğinde, inorganik azot kaynaklarının organik azot kaynaklarından daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. En yüksek ksilitol derişimi (24.91 g/L) amonyum klorür kullanılan ortamda elde edilmiştir. Pepton içeren ortamda ise, ksilitol üretiminin

oldukça düşük olduğu belirlenmiş ve maksimum ksilitol derişimi 14.20 g/L olarak bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmanın bundan sonraki aşamalarında azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, organik azot kaynaklarının hidrolizatlarda daha olumlu sonuç verdiği belirtilmesine rağmen, bu tez çalışmasında inorganik azot kaynağı öne çıkmıştır. İnorganik azot kaynaklarının daha ekonomik olması nedeniyle, bunun olumlu bir sonuç olduğu düşünülmektedir. Misra ve ark. (2013b) tarafından ksilitol üretiminde kullanılacak en uygun azot kaynağını tespit edebilmek amacı ile çeşitli organik (L-asparajin, et özütü, kazein hidrolizatı, mısır maserasyon sıvısı, pepton, soya küspesi, tripton, üre, maya ekstraktı) ve inorganik (amonyum klorür, amonyum nitrat, amonyum sülfat, sodyum nitrat) azot kaynaklarının ksilitol üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, kullanılan inorganik azot kaynaklarının hem maya gelişimini hem de ksilitol üretimini olumsuz etkilediği, en uygun azot kaynağının ise organik bir kaynak olan maya özütü olduğu belirtilmiştir.



Şekil 4.5. Kestane kabuğu hidrolizatı içeren ortamda farklı azot kaynaklarının *C. tropicalis* M2 suşunun hücre sayısı üzerine etkisi



Şekil 4.6. Kestane kabuğu hidrolizati içeren ortamda farklı azot kaynaklarının *C. tropicalis* M2 suşunun ksilitol üretimi üzerine etkisi

4.4. Kestane Kabuğu Hidrolizati İçeren Ortamda *C. tropicalis* M2 Suşunun Üreme ve Ksilitol Üretimi Üzerine Çeşitli Parametrelerin Etkilerinin İncelenmesi

Kestane kabuğu hidrolizati içeren doğal fermantasyon ortamında *C. tropicalis* M2 suşunun üreme ve ksilitol üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini incelemek amacıyla; merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, ksiloz başlangıç derişimi, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının bağımsız değişken olarak kullanıldığı bir deney tasarımı oluşturulmuştur.

Yapılan deneylerin ardından, optimizasyon için yanıt olabilecek bağımlı değişkenler hesaplanmıştır. Her yanıtın bağımsız değişkenler ile değişimi modellenmiş; elde edilen yanıtlar, optimum koşulların belirlenmesinde kullanılmıştır.

4.4.1. Deney Tasarımı ve Yanıtların Oluşturulması

Merkezi karma tasarım metoduna göre yapılan deney tasarımı, Çizelge 4.4 ve 4.5'te verilmiştir. Tasarımda, 18 farklı deney kombinasyonu elde edilmiştir. Elde edilen deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlere ait gerçek değerler,

Çizelge 4.4'te görülmektedir. Çizelge 4.5'te ise, bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri verilmiştir.

Yapılan dizayna göre uygulanan deneylerde elde edilen ksilitol derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.7-4.9'da görülmektedir. Hesaplanan maya sayılarının zamanla değişimleri Şekil 4.10-4.12'de verilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda bulunan verilerden hesaplanan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri ise; Şekil 4.13-4.15'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Deney no.	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3 (vuru/dak)
1	30	2	140
2	100	4	80
3	100	0	200
4	65	2	140
5	30	0	200
6	65	4	140
7	65	0	140
8	30	4	80
9	100	0	80
10	65	2	80
11	30	0	80
12	100	4	200
13	65	2	140
14	30	4	200
15	100	2	140
16	65	2	140
17	65	2	140
18	65	2	200

X_1 : Ksiloz başlangıç derişimi (g/L), X_2 : Amonyum klorür başlangıç derişimi (g/L), X_3 : Çalkalama hızı (vuru/dak)

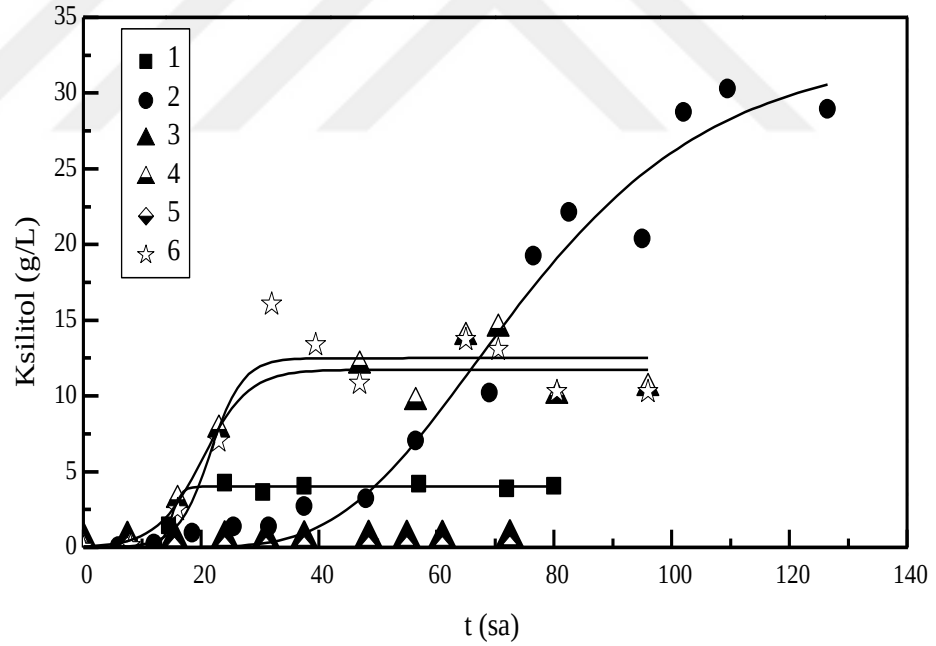
Çizelge 4.5. Merkezi karma tasarım yöntemine göre hazırlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri

Deney no.	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃ (vuru/dak)
1	-1	0	0
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	0	0	0
5	-1	-1	1
6	0	1	0
7	0	-1	0
8	-1	1	-1
9	1	-1	-1
10	0	0	-1
11	-1	-1	-1
12	1	1	1
13	0	0	0
14	-1	1	1
15	1	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	1

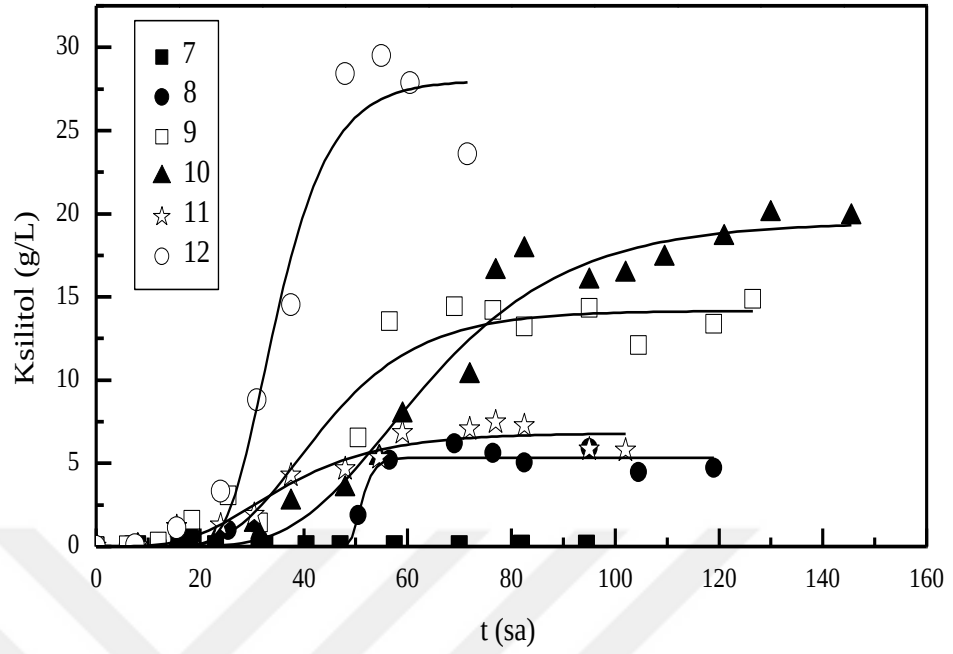
Şekil 4.7-4.15'te verilen grafiklerden, kullanılan parametrelerin maya üremesini, ksilitol üretimini ve ksiloz kullanımını farklı şekillerde etkilediği görülmektedir. Örneğin, genellikle azot kaynağının kullanılmadığı ortamlarda ksilitol üretimi çok düşük düzeylerde olmasına rağmen, 9 numaralı deneyde 14.15 g/L ksilitol üretildiği belirlenmiştir. Bunun yanında, bazı deneylerde fermantasyon sonunda kalan ksiloz miktarının oldukça fazla olduğu bulunmuştur. Örneğin, ksiloz başlangıç derişimi 65 g/L olan 18 numaralı deneyde fermantasyon sonunda kalan ksiloz derişimi 34.63 g/L olarak bulunmuştur. Bazı deneylerde ise, ksilozun tamamına yakını kullanılmıştır. Ayrıca; 3, 5, ve 7. deneylerde ortamdaki ksilozun çok az miktarının kullanıldığı dikkat çekmiş, ancak bu deneylerde maya sayısının yaklaşık 2 logaritmik birim arttığı görülmüştür. Bu nedenlerle, diğer yanıtların

yanında, substrat dönüşüm yüzdesinin de hesaplanmasına karar verilmiştir. Yanıtlar için elde edilen değerlerdeki farklılıkların, parametreler arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu etkileşimler ise, daha sonra yapılan modelleme ve varyans analizi ile ortaya konmuştur.

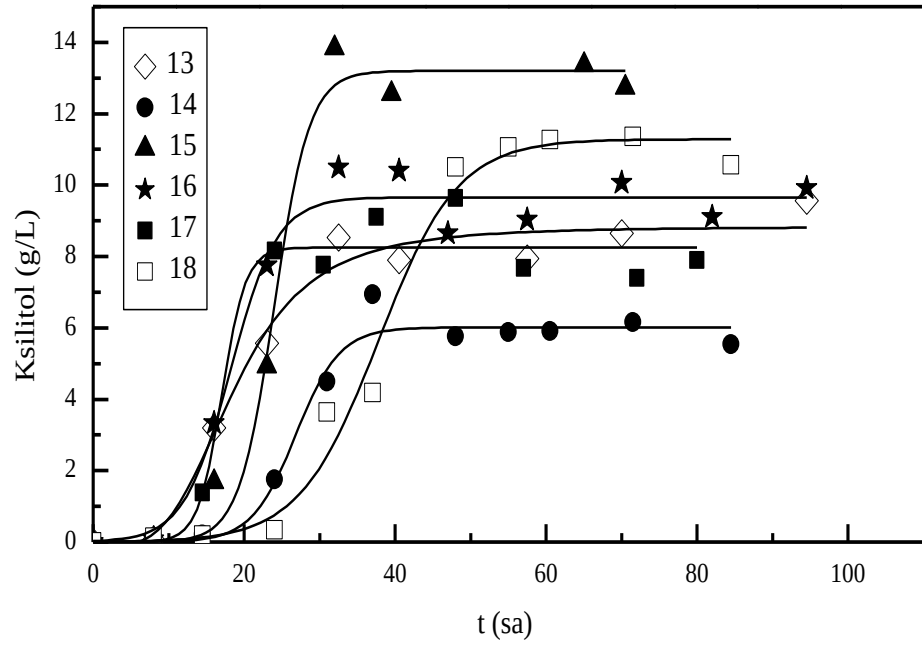
Şekil 4.7-4.15 kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen yanıtlar, Çizelge 4.6’da verilmiştir. Maksimum ksilitol derişimi olan Y_1 ’in en yüksek değeri 30.56 g/L ve en düşük değeri 0.09 g/L olarak bulunmuştur. Ksilitol verimleri (Y_2), %1.65-41.72 aralığında değişirken, ksilitol üretim hızı olan Y_3 0.001-1.453 g/L.sa arasında hesaplanmıştır. Y_4 olarak ifade edilen substrat dönüşüm yüzdesi değerinin %1.64-99.47 aralığında değiştiği saptanmıştır. Mikroorganizmanın maksimum ksilitol özgül oluşum hızı olan Y_5 ise; 0.0001-0.1736 g/L.sa.N arasında bulunmuştur (Çizelge 4.6).



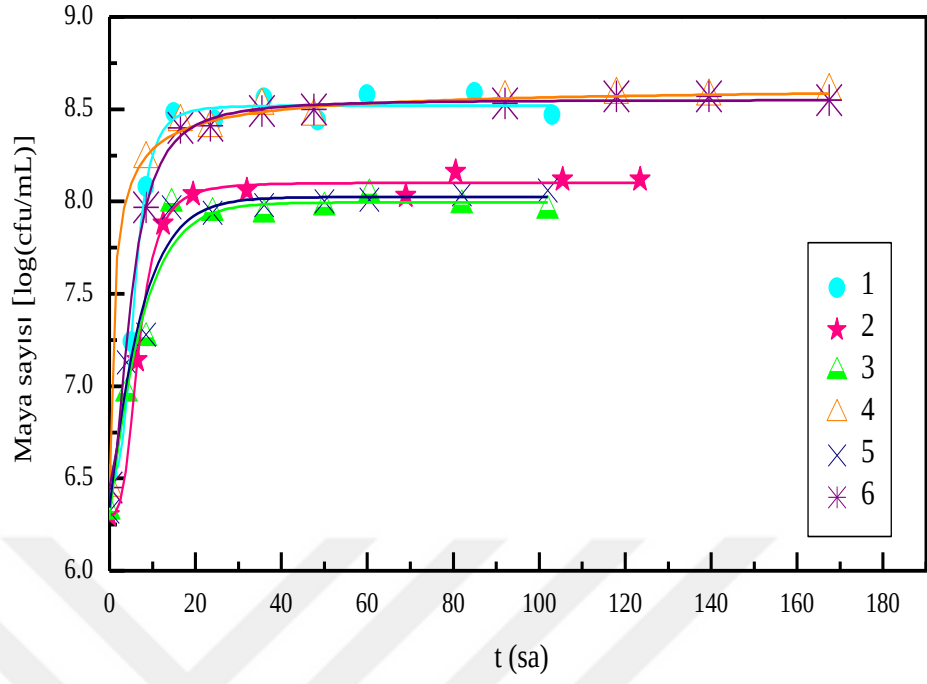
Şekil 4.7. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen ksilitol derişimlerinin zamanla değişimleri



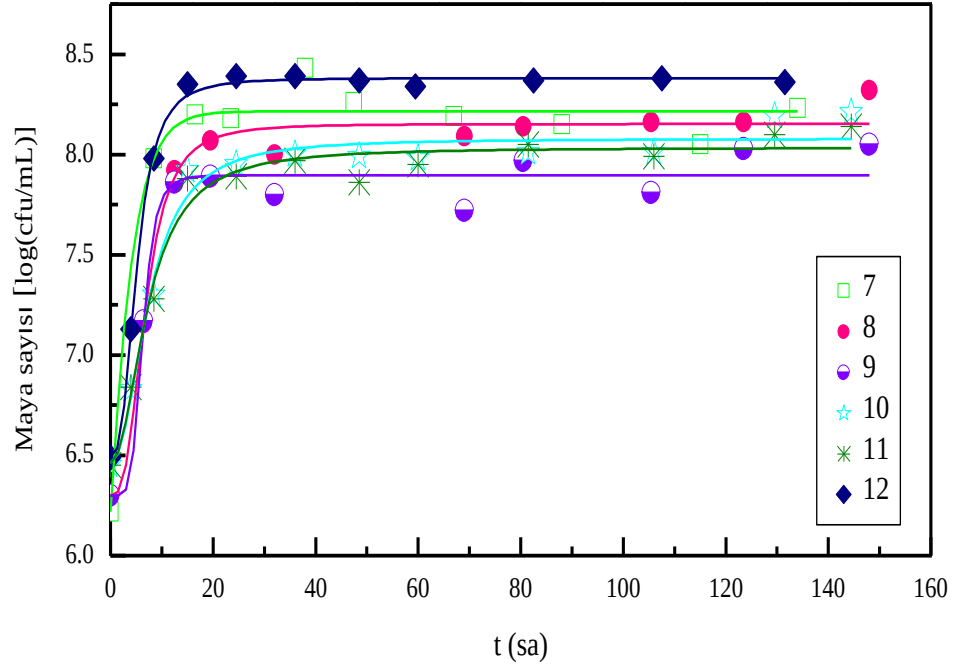
Şekil 4.8. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen ksilitol derişimlerinin zamanla değişimleri



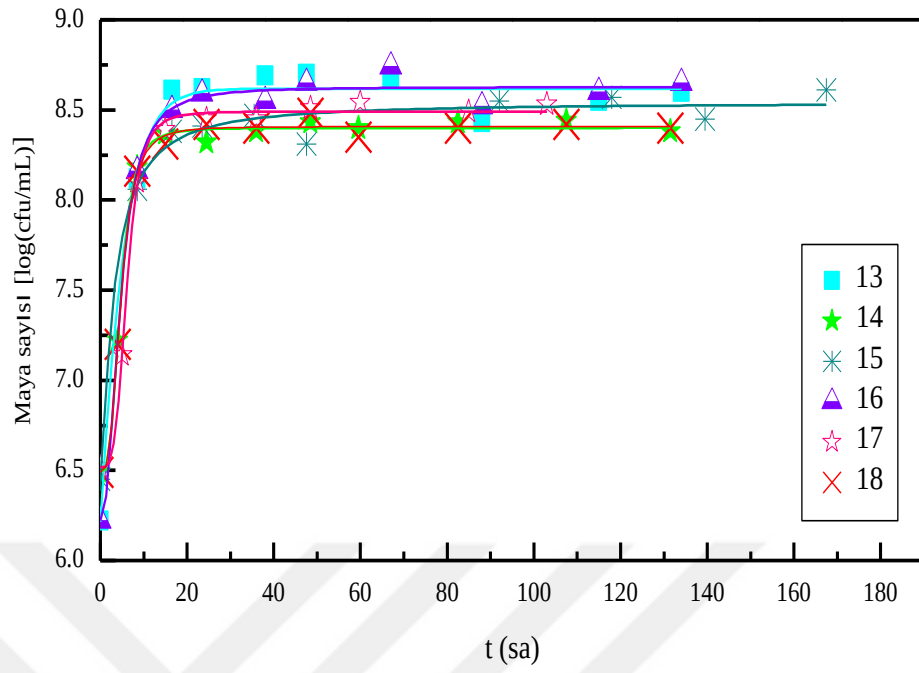
Şekil 4.9. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen ksilitol derişimlerinin zamanla değişimleri



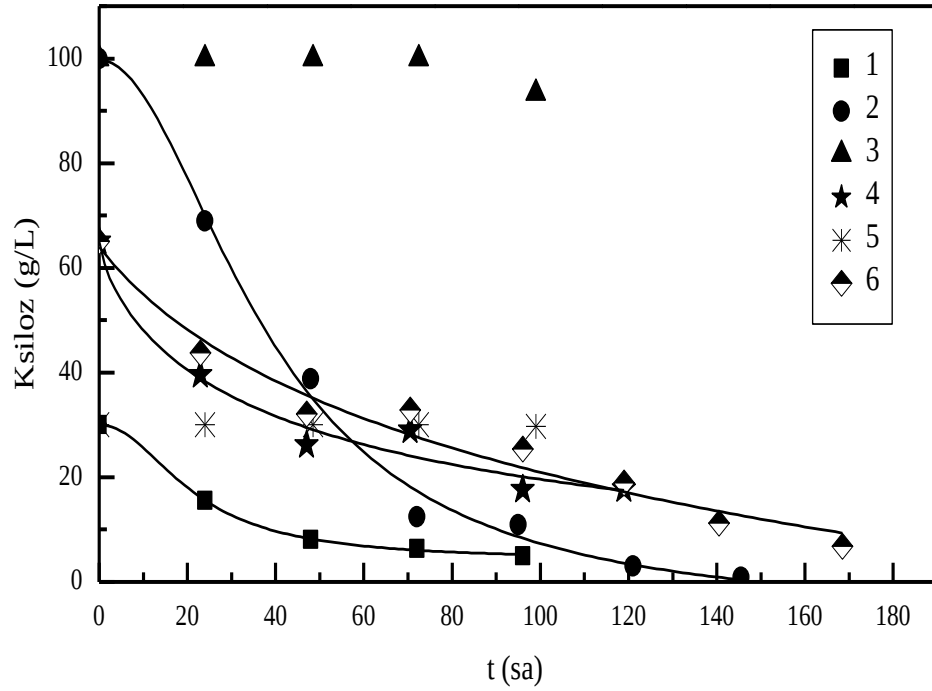
Şekil 4.10. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri



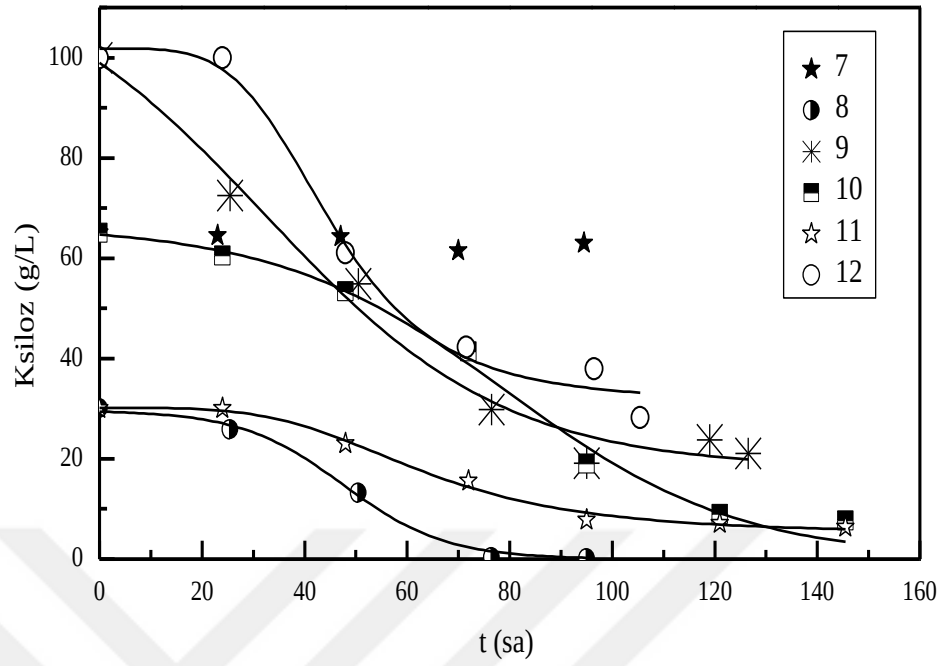
Şekil 4.11. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri



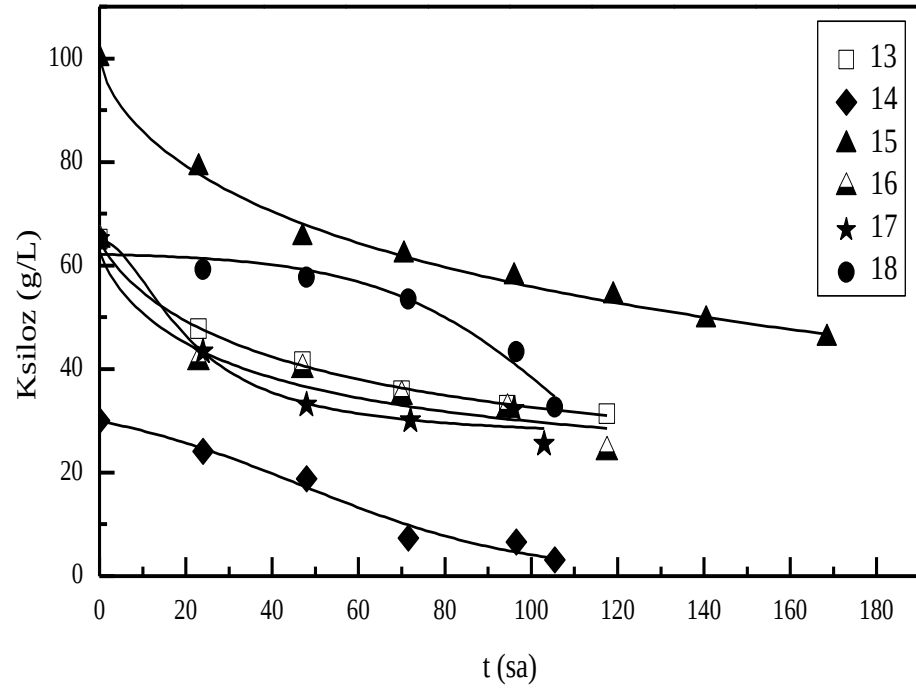
Şekil 4.12. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen maya sayılarının zamanla değişimleri



Şekil 4.13. “1-6” numaralı deneyler için elde edilen ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri



Şekil 4.14. “7-12” numaralı deneyler için elde edilen ksiloz derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.15. “13-18” numaralı deneyler için elde edilen ksiloz derişimlerinin zamanla değışimleri

Çizelge 4.6. Deneylerde hesaplanan maksimum ksilitol derişimleri (Y_1), ksilitol verimleri (Y_2), maksimum ksilitol üretim hızları (Y_3), substrat dönüşüm yüzdeleri (Y_4) ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızları (Y_5)

Deney no.	Y_1 (g/L)	Y_2 (%)	Y_3 (g/L.sa)	Y_4 (%)	Y_5 (g/L.sa.N)
1	4.07	16.3	1.066	83.25	0.1262
2	30.56	30.72	0.528	99.47	0.0652
3	0.17	1.65	0.001	6.6	0.0003
4	11.73	24.80	0.750	72.76	0.0892
5	0.17	16	0.001	1.64	0.0003
6	12.5	22.45	1.127	85.65	0.1338
7	0.09	1.63	0.001	5.38	0.0001
8	5.33	17.99	1.134	98.75	0.1391
9	14.15	17.66	0.406	80.1	0.0514
10	19.29	31.32	0.379	94.76	0.0470
11	6.78	28.23	0.190	80.06	0.0239
12	27.88	41.72	1.453	66.82	0.1736
13	8.81	26.21	0.470	51.72	0.0551
14	6.01	22.72	0.511	88.19	0.0609
15	13.2	24.79	1.405	53.24	0.1673
16	9.66	26.52	0.775	56.05	0.0909
17	8.25	22.63	1.270	56.09	0.1501
18	11.28	37.15	0.537	46.72	0.0639

4.4.2 Çeşitli Parametrelerin Bağımlı Değişkenler Üzerine Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmesi

4.4.2.1 Maksimum Ksilitol Derişimi Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi

Maksimum ksilitol derişimi (Y_1) üzerine; ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) etkileri, Eşitlik (4.1) ile gösterilen karesel model ile ifade edilmiştir.

$$\begin{aligned}
Y_1 = & +33.27691 + 0.21716X_1 - 1.10811X_2 - 0.50100X_3 + 0.07095X_1X_2 \\
& - 6.38690 \times 10^{-4} X_1X_3 + 0.01937X_2X_3 - 6.76288 \times 10^{-4} X_1^2 \\
& - 0.79211X_2^2 + 1.61710 \times 10^{-3} X_3^2
\end{aligned} \tag{4.1}$$

Eşitlik (4.1) ile oluşturulan modele ait varyans analizi sonuçları, Çizelge 4.7’de sunulmuştur. Eşitliğe göre türetilen model oldukça önemli bulunmuş ($P < 0.01$), modelin belirtme katsayısı, $R^2 = 0.984$ olarak elde edilmiştir. Maksimum ksilitol üretimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının lineer etkileri oldukça önemli bulunmuştur. Çizelge 4.7’de bu üç parametrenin birbirleriyle ikili etkileşimlerinin de önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının karesel etkileri önemli iken, ksiloz başlangıç derişiminin karesel etkisinin önemsiz olduğu bulunmuştur ($P > 0.05$). Türetilen modele ait, deneysel değerlere karşı tahminsel değerleri gösteren grafik, EK C’de sunulmuştur.

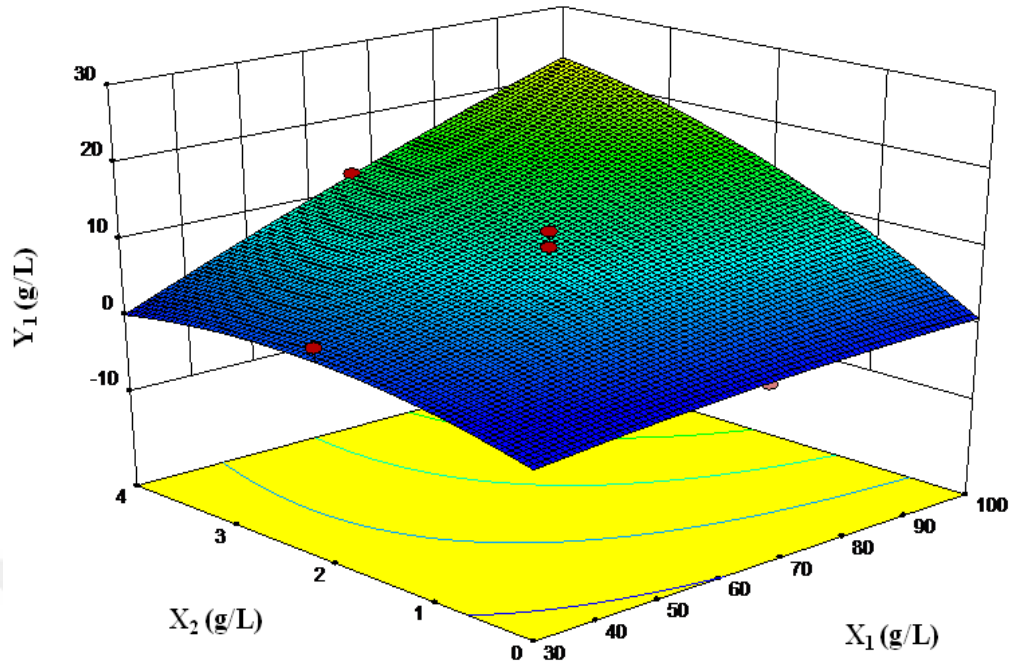
Şekil 4.16-4.18’de, maksimum ksilitol derişimi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri verilmiştir. Oluşturulan grafiklerde kullanılan parametreler dışındaki bağımsız değişken için merkez noktasındaki değerler kullanılmıştır. Bu yanıtı ait kontur grafikleri ise; EK D’de sunulmuştur. Şekil 4.16’da, ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin maksimum ksilitol derişimi üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği görülmektedir. Grafiğe göre, amonyum klorürün başlangıç derişimi çok düşük olduğunda, ksiloz başlangıç derişiminin artırılması ile ksilitol derişiminin fazla değişmediği ve çok düşük değerlerde kaldığı belirlenmiştir. Amonyum klorürün yüksek derişimlerinde ise; ksiloz başlangıç derişiminin artması ile, ksilitol derişiminin belirgin şekilde arttığı görülmektedir. Aynı grafiğe göre, ksiloz başlangıç derişiminin 30-40 g/L aralığında olduğu durumlarda, amonyum klorür derişiminin artmasının, ksilitol derişimine fazla bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ortamdaki ksiloz derişimi yüksek olduğunda ise, azot kaynağının artırılmasının maksimum ksilitol derişimini oldukça olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Azot kaynağının düşük olduğu durumda, yüksek substrat derişimlerinde bile ksilitol derişiminin sıfıra yakın olması, bu çalışmada azot kaynağının önemli bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.7. Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum ksilitol derişimi (Y_1) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

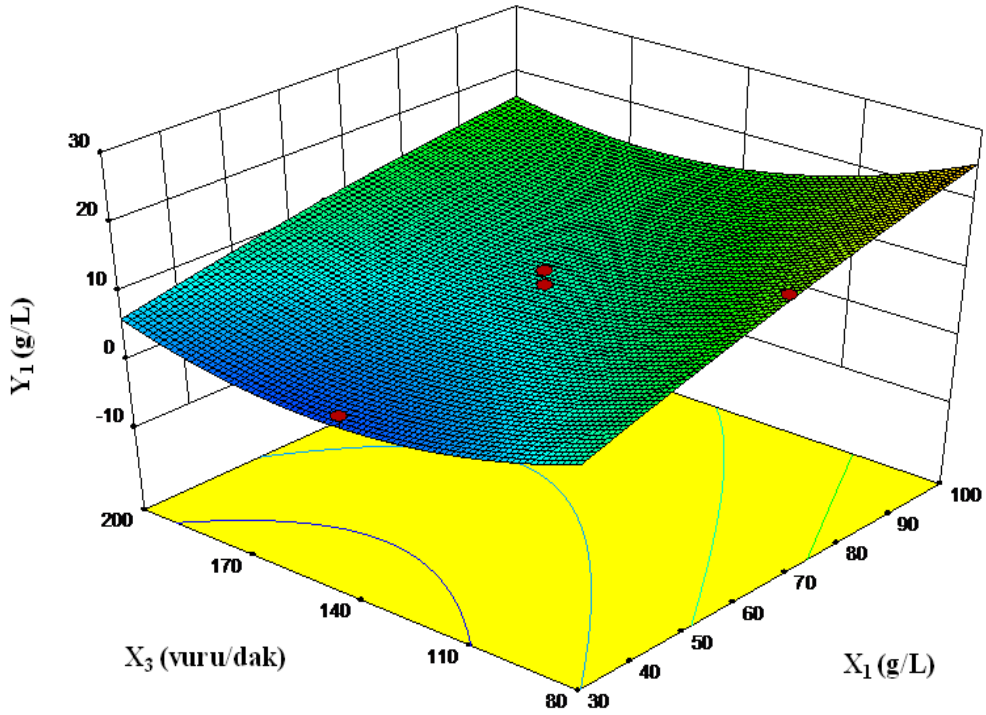
Varyasyon kaynağı	S.D	K.O.	F
Model	9	135.73	56.04**
X_1	1	404.50	167.02**
X_2	1	371.12	153.24**
X_3	1	93.64	38.66**
X_1X_2	1	197.31	81.47**
X_1X_3	1	14.39	5.94*
X_2X_3	1	43.20	17.84**
X_1^2	1	1.86	0.77
X_2^2	1	27.20	11.23*
X_3^2	1	91.83	37.92**
Uyum eksikliği	5	2.48	1.06
Hata	3	2.33	
Genel	17		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Şekil 4.17’de, maksimum ksilitol derişimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri verilmiştir. Kullanılan çalkalama hızı aralığında ksiloz başlangıç derişiminin artması ile, maksimum ksilitol derişiminin arttığı görülmektedir. Özellikle düşük çalkalama hızlarında (yaklaşık 80-100 vuru/dak), Y_1 yanıtındaki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bu yanıt için en yüksek değer, çalkalama hızının minimum (80 vuru/dak), ksiloz başlangıç derişiminin ise maksimum (100 g/L) olduğu durumda elde edilmiştir. Tüm ksiloz başlangıç derişimleri için çalkalama hızının artması ile maksimum ksilitol derişiminin azaldığı bulunmuştur. Bu azalma, düşük ksiloz derişimlerinde düşük düzeyde iken, yüksek ksiloz derişimlerinde çok daha belirgin gözlenmiştir.

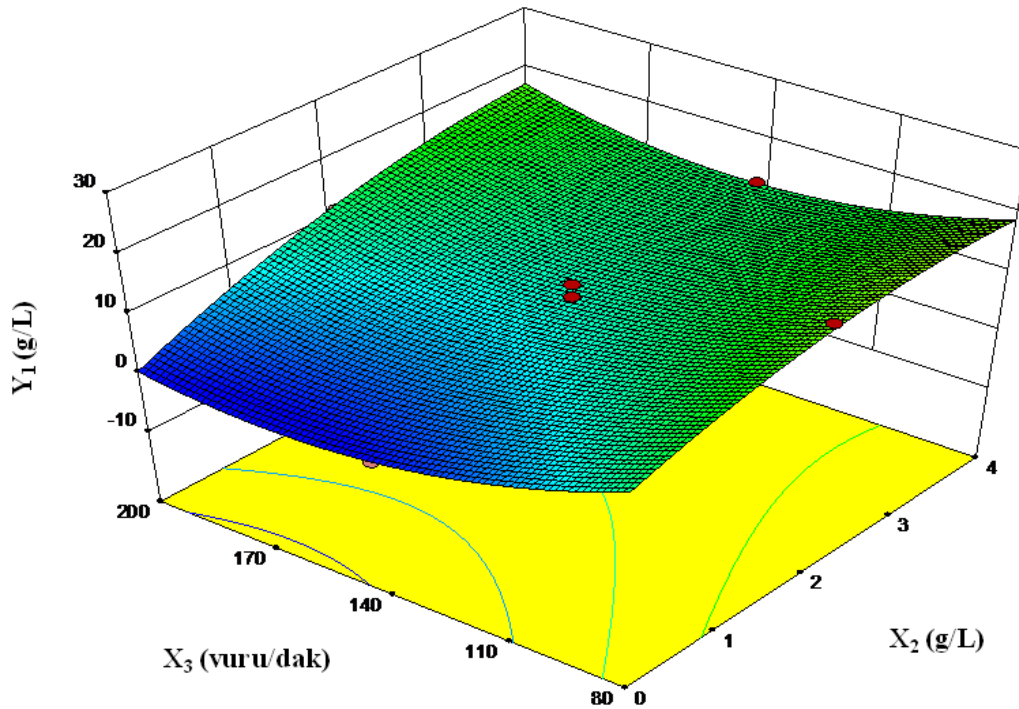


Şekil 4.16. Maksimum ksilitol derişimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkileri ($X_3 = 140$ vuru/dak)



Şekil 4.17. Maksimum ksilitol derişimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_2 = 2.00$ g/L)

Amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının, maksimum ksilitol derişimi üzerine etkileri, Şekil 4.18'deki grafikte verilmiştir. Kullanılan bütün çalkalama hızları için, amonyum klorür derişiminin artması ile maksimum ksilitol derişiminin arttığı bulunmuştur. Bu artış, en fazla çalkalama hızının 80 ve 200 vuru/dak değerlerine yakın olduğu durumlarda görölmüştür. Kullanılan bütün amonyum klorür derişimleri için, çalkalama hızının artması ile ksilitol derişiminin azaldığı bulunmuştur. Ancak belirli bir amonyum klorür derişimi için, en düşük ksilitol derişimi değerleri, çalkalama hızının 110-140 vuru/dak olduğu durumda elde edilmiştir. Kullanılan alkalama hızı maksimum (200 vuru/dak), amonyum klorürün başlangıç derişimi sıfır olduğunda yanıt için sıfıra yakın bir değer hesaplanmış; buna karşın çalkalama hızı minimum, amonyum klorürün başlangıç derişimi maksimum (4.00 g/L) iken Y_1 'in en yüksek değerine ulaştığı bulunmuştur. Genel olarak amonyum klorür başlangıç derişimi sıfıra çok yakın iken, herhangi bir çalkalama hızında maksimum ksilitol derişimleri de oldukça düşük olmasına rağmen, yalnızca en düşük çalkalama hızlarında (yaklaşık 80-90 vuru/dak) daha yüksek bir yanıt değerinin elde edilmiş olması çalışmanın dikkat çekici sonuçlarından biridir.



Şekil 4.18. Maksimum ksilitol derişimi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_1 = 65$ g/L)

4.4.2.2 Ksilitol Verimi Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi

Ksilitol verimi (Y_2) üzerine; ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) etkileri, Eşitlik (4.2) ile gösterilen karesel model ile ifade edilmiştir. Türetilen modele ait belirtme katsayısı $R^2 = 0.938$ olarak bulunmuştur. Bu model için elde edilen, deneysel değerlere karşı tahminsel değerleri gösteren grafik, EK C’de sunulmuştur.

$$\begin{aligned} Y_2 = & +84.72824 + 0.08153X_1 + 1.49710X_2 - 0.98595X_3 + 0.10116X_1X_2 \\ & + 1.48214 \times 10^{-4} X_1X_3 + 0.04580X_2X_3 - 2.00680 \times 10^{-3} X_1^2 \\ & - 2.74083X_2^2 + 3.11991 \times 10^{-3} X_3^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

Kullanılan bağımsız değişkenlerin ksilitol verimi üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre türetilen model oldukça önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. Ksilitol verimi için amonyum klorür başlangıç derişiminin hem lineer ve karesel etkilerinin, hem de ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızı ile etkileşimlerinin oldukça önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0.01$). Ksilitol verimi üzerine çalkalama hızının lineer etkisi önemsiz ($P > 0.05$), karesel etkisi ise önemli bulunmuştur. Ksilitol verimi üzerine, ksiloz başlangıç derişiminin lineer etkisi ve karıştırma hızı ile olan etkileşiminin ise önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.19-4.21’de, ksilitol verimi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri görülmektedir. Bu yanıt için elde edilen kontur grafikleri ise; EK D’de verilmiştir. Oluşturulan grafiklerde kullanılan parametreler dışındaki bağımsız değişkenler için, merkez noktasındaki değerler kullanılmıştır. Ksilitol verimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafiği, Şekil 4.19’da verilmiştir. Grafiğe göre, amonyum klorür başlangıç derişimi çok düşük değerlerde iken ksiloz başlangıç derişiminin arttırılmasından ksilitol verimi olumsuz etkilenmektedir. Yine aynı grafikten, kullanılan azot kaynağının yüksek derişimlerinde, ksiloz başlangıç derişiminin artması ile Y_2 değerinin arttığı görülmektedir. Tüm ksiloz başlangıç derişimleri için, amonyum klorür başlangıç derişiminin yaklaşık 3 g/L’ye kadar artması ile ksilitol verimlerinin arttığı, sonrasında ise sabit kaldığı belirlenmiştir.

Özellikle yüksek ksiloz başlangıç derişimlerinde (90-100 g/L) Y_2 'deki artış belirgin bir şekilde görölmektedir. Grafiğe göre, en yüksek verim değerlerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişimi maksimum olduğu durumda ulaşılmıştır.

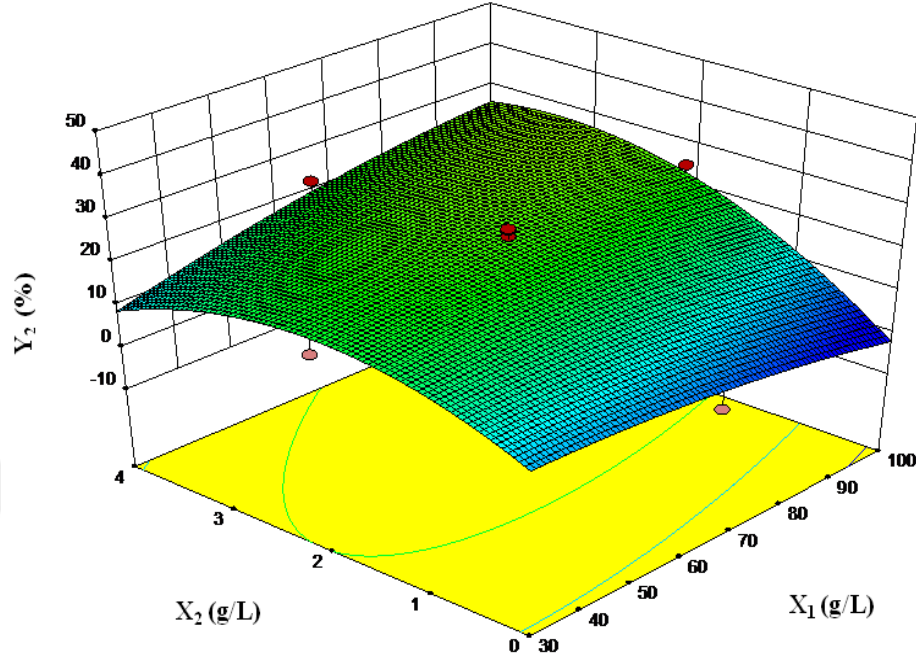
Çizelge 4.8. Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum ksilitol verimi (Y_2) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D	K.O.	F
Model	9	187.11	13.39**
X_1	1	23.41	1.68
X_2	1	496.04	35.49**
X_3	1	4.46	0.32
X_1X_2	1	401.15	28.70**
X_1X_3	1	0.78	0.055
X_2X_3	1	241.67	17.29**
X_1^2	1	16.38	1.17
X_2^2	1	325.69	23.30**
X_3^2	1	341.83	24.46**
Uyum eksikliği	5	20.48	6.52
Hata	3	3.14	
Genel	17		

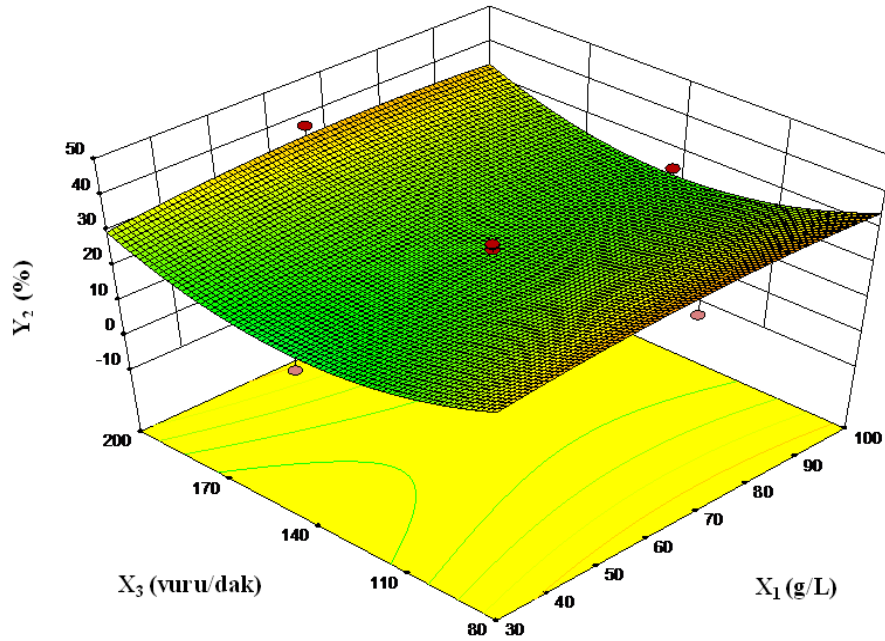
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Ksilitol verimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkilerini gösteren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.20'de sunulmuştur. Grafik incelendiğinde, ksilitol veriminin maksimum değerlerine çalkalama hızının 80 ve 200 vuru/dak değerlerine yakın olduğu durumlarda ulaşılmıştır. Kullanılan çalkalama hızı aralığında, ksiloz başlangıç derişiminin arttırılmasının ksilitol verimi üzerine etkisinin fazla olmadığı görölmektedir. Herhangi bir ksiloz derişiminde, çalkalama hızının değiştirilmesinin bu yanıtı fazla etkilemediği bulunmuştur. Yapılan varyans

analizi sonuçlarına göre ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızı etkileşiminin önemsiz ($P>0.05$) bulunması ise bu durumu doğrulamaktadır.

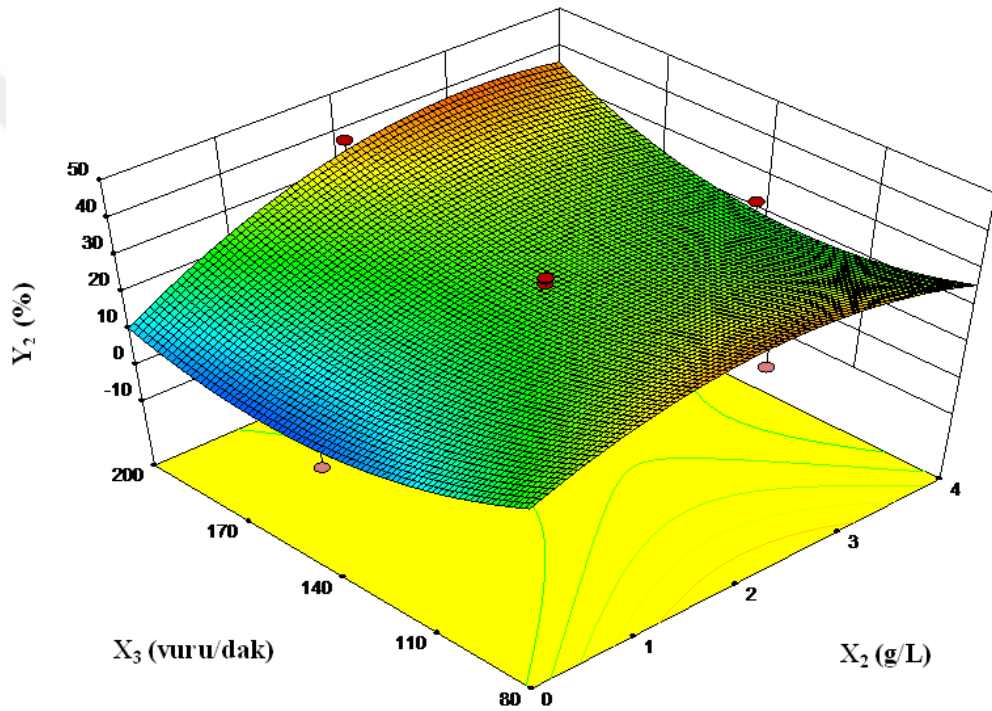


Şekil 4.19. Ksilitol verimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkileri ($X_3 = 140$ vuru/dak)



Şekil 4.20. Ksilitol verimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_2 = 2$ g/L)

Şekil 4.21’de, ksilitol verimi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkilerini gösteren yanıt yüzey grafiğı görölmektedir. Kullanılan bütün çalkalama hızı değerlerinde, amonyum klorür başlangıç derişiminin artması ile ksilitol verimi artmaktadır. Yüksek çalkalama hızlarında (140-200 vuru/dak) Y_2 ’deki artış daha belirgin bir şekilde görölmektedir. Yüksek amonyum klorür derişimlerinde, bu bileşenin miktarının düşük olduğı ortamlara göre verim değerlerinin daha yüksek olduğı bulunmuştur. Amonyum klorür derişimi için çalışılan aralıkta, verim için en düşük değerler, çalkalama hızının 120-130 vuru/dak olduğı aralıkta elde edilmiştir.



Şekil 4.21. Ksilitol verimi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_1 = 65$ g/L)

4.4.2.3 Maksimum Ksilitol Üretim Hızı Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi

Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum ksilitol üretim hızı üzerindeki etkileri yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiş ve Eşitlik (4.3) ile gösterilen karesel model elde edilmiştir. Belirtme katsayısı $R^2 = 0.865$ olarak bulunan modele ait varyans analizi sonuçları

Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Türetilen model için oluşturulan, deneysel değerlere karşı tahminsel değerleri gösteren grafik, EK C’de verilmiştir.

$$Y_3^{1/2} = +0.71293 - 0.02912X_1 + 0.34180X_2 + 9.03719 \times 10^{-3}X_3 - 8.74782 \times 10^{-5}X_1X_2 + 3.73529 \times 10^{-5}X_1X_3 + 1.18598 \times 10^{-3}X_2X_3 + 1.96251 \times 10^{-4}X_1^2 - 0.08047X_2^2 - 5.39654 \times 10^{-5}X_3^2 \quad (4.3)$$

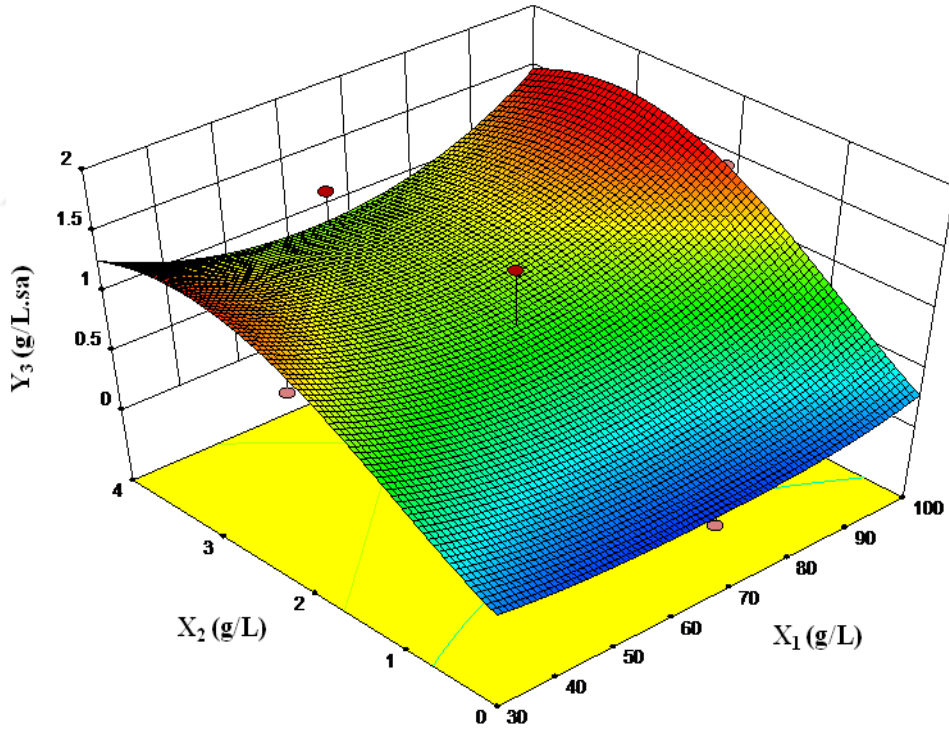
Çizelge 4.9. Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) maksimum ksilitol üretim hızı (Y_3) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D	K.O.	F
Model	9	0.24	5.71*
X_1	1	0.026	0.60
X_2	1	1.30	30.65**
X_3	1	0.058	1.38
X_1X_2	1	3.0×10^{-4}	7.073×10^{-3}
X_1X_3	1	0.049	1.16
X_2X_3	1	0.16	3.82
X_1^2	1	0.16	3.69
X_2^2	1	0.28	6.62*
X_3^2	1	0.10	2.41
Uyum eksikliği	5	0.048	1.46
Hata	3	0.033	
Genel	17		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Varyans analizi sonuçlarına göre, türetilen model önemli bulunmuştur. Kullanılan azot kaynağı başlangıç derişiminin lineer ve karesel etkilerinin maksimum ksilitol üretim hızı için önemli olduğu belirlenmiştir. Ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızlarının lineer ve karesel etkilerinin, ayrıca amonyum klorür başlangıç derişimi ile olan etkileşimlerinin ise önemsiz ($P > 0.05$) olduğu görülmektedir.

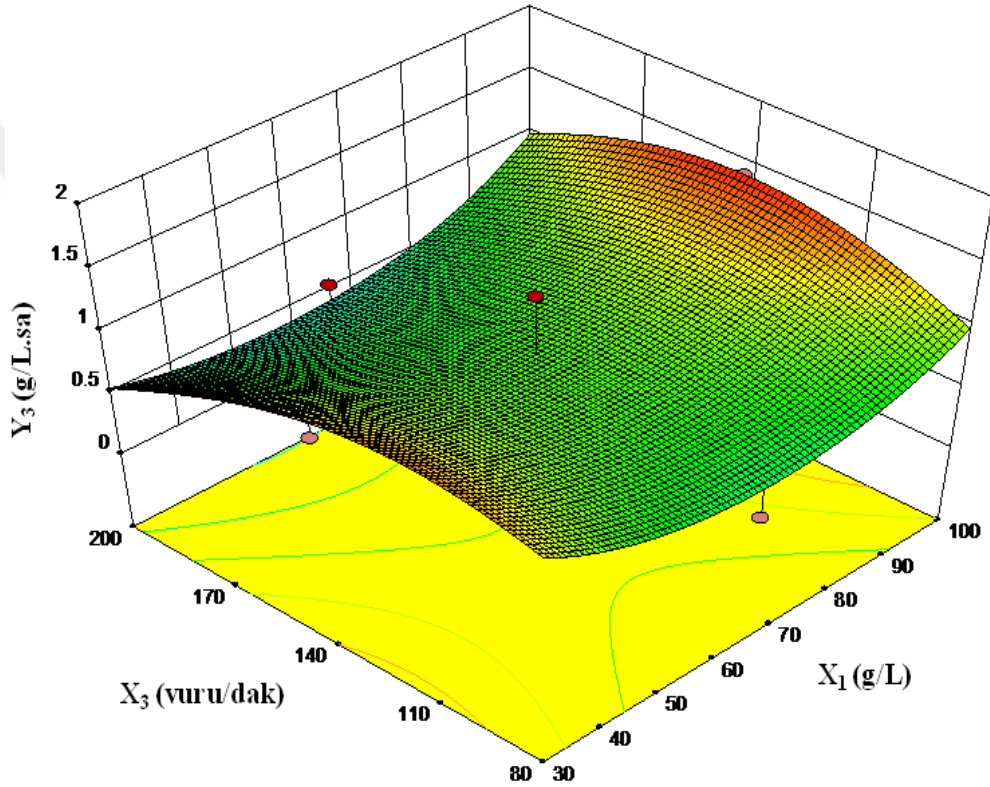
Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.22-4.24'te görülmektedir. Bu yanıtla ilgili kontur grafikleri ise; EK D'de sunulmuştur. Oluşturulan grafiklerde kullanılan parametreler dışındaki bağımsız değişken için, merkez noktasındaki değer kullanılmıştır. Kullanılan azot kaynağı çok düşük derişimlerde iken, ksiloz başlangıç derişiminin Y_3 üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.22). Çalışılan ksiloz derişimi aralığında, amonyum klorür başlangıç derişiminin artması ile maksimum ksilitol üretim hızları artmaktadır. Yüksek ksiloz başlangıç derişimlerinde bu artışın daha fazla olduğu görülmektedir. Substrat derişiminin çok düşük olduğu ortamlarda (30-40 g/L) azot kaynağının en yüksek değeri kullanıldığında ksilitol üretim hızı için oldukça yüksek değerler elde edilmiştir. Ancak, azot kaynağının kullanılmadığı ortamda, substrat derişimi 100 g/L olduğunda bile, ksilitol üretim hızının sıfıra yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 4.22. Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkileri ($X_3 = 140$ vuru/dak)

Şekil 4.23'de, ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının maksimum ksilitol üretim hızı üzerine etkisi görülmektedir. Maksimum ksilitol üretim hızının, düşük ksiloz başlangıç derişimlerinde çalkalama hızının artmasından olumsuz

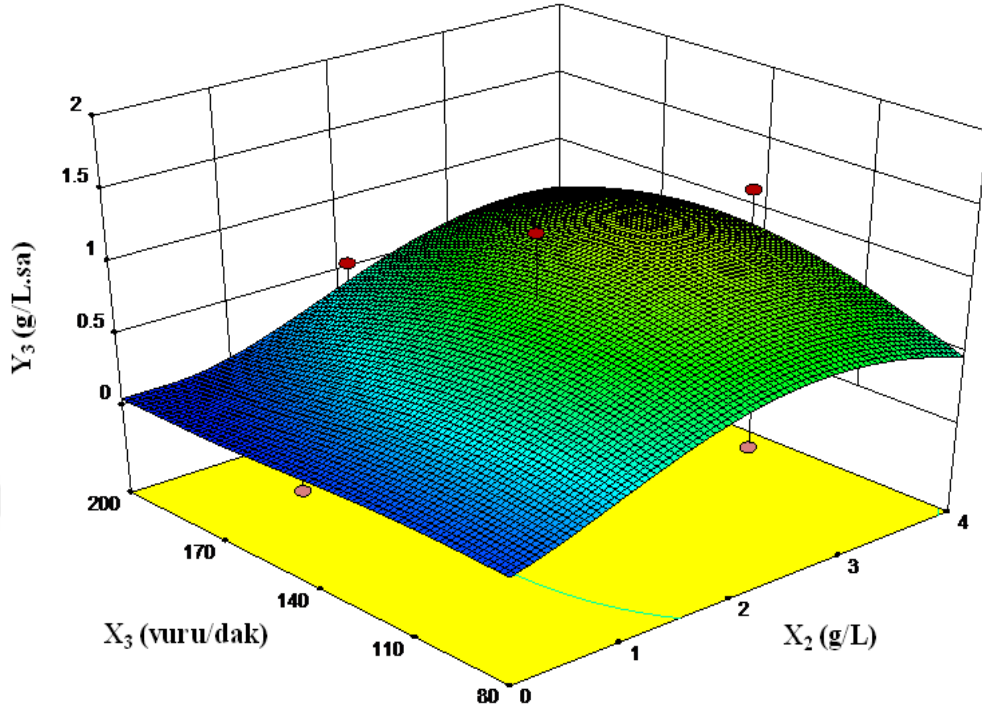
etkilendiği belirlenmiştir. Yüksek ksiloz derişimlerinde (80-100 g/L) ise, çalkalama hızındaki artış, belirli bir bölgeye kadar Y_3 'ü olumlu etkilemektedir. Kullanılan bütün ksiloz derişimlerinde, Y_3 için en yüksek değerler 140 vuru/dak çalkalama hızında elde edilmiştir. En yüksek hız değeri, 100 g/L ksiloz derişiminde 1.381 g/L.sa olarak belirlenmiştir. Çalkalama hızları daha fazla arttırıldığında, genel olarak maksimum ksilitol üretim hızları bir miktar azalmıştır. Çalkalama hızının en yüksek, ksiloz başlangıç derişiminin 55 g/L olduğu durumda ise yanıt için en düşük değer (0.418 g/L.sa) bulunmuştur.



Şekil 4.23. Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_2 = 2$ g/L)

Amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının verimlilik üzerine olan etkileri Şekil 4.24'te gösterilmektedir. Grafik incelendiğinde, amonyum klorür derişiminin sıfıra yakın değerlerinde çalkalama hızındaki artışın Y_3 'ü etkilemediği görülmektedir. Azot kaynağı derişiminin yüksek değerlerinde ise (3-4 g/L), çalkalama hızının artması ile verimlilik artmakta, 140 vuru/dak çalkalama hızından sonra ise, bir miktar azalmaktadır. Çalkalama hızları için çalışılan aralıkta, amonyum klorür başlangıç derişiminin yaklaşık 3 g/L'ye kadar artması maksimum ksilitol

üretim hızını olumlu etkilemekte, daha yüksek azot kaynağı derişimlerinde ise Y_3 değerleri bir miktar azalmaktadır.



Şekil 4.24. Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_1 = 65$ g/L)

4.4.2.4 Substrat Dönüşüm Yüzdesi Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi

Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine (Y_4), ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) etkileri, Eşitlik (4.4) ile gösterilen etkileşim terimlerini de içeren lineer model ile ifade edilmiştir. Türetilen modelin belirtme katsayısı $R^2 = 0.872$ olarak bulunmuş, varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.10'da sunulmuştur. Modele ait tahminsel değerlere karşı deneysel verileri gösteren grafik, EK C'de verilmiştir.

$$Y_4^{1/2} = +12.88317 + 3.64010 \times 10^{-3} X_1 - 0.28656 X_2 - 0.05666 X_3 - 4.41268 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 1.98943 \times 10^{-6} X_1 X_3 + 0.01219 X_2 X_3 \quad (4.4)$$

Çizelge 4.10. Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) substrat dönüşüm yüzdesi (Y_4) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

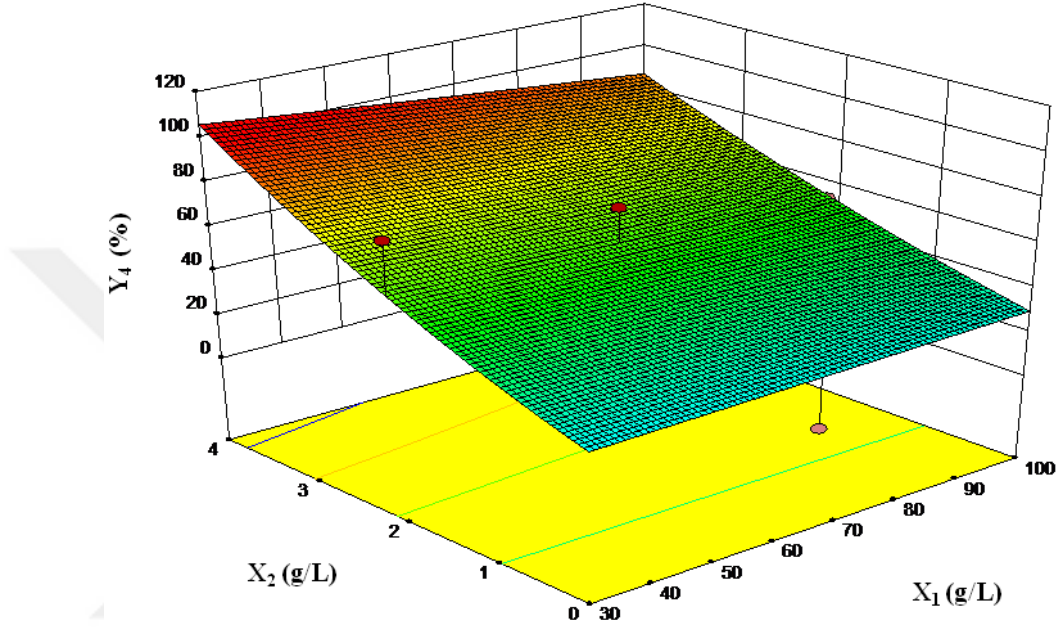
Varyasyon kaynağı	S.D	K.O.	F
Model	6	17.79	12.47**
X_1	1	0.29	0.21
X_2	1	51.37	36.01**
X_3	1	37.22	26.09**
X_1X_2	1	0.76	0.54
X_1X_3	1	1.396×10^{-4}	9.789×10^{-5}
X_2X_3	1	17.12	12.00**
Uyum eksikliği	8	1.83	5.31
Hata	3	0.34	
Genel	17		

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Çizelge 4.10’da sunulan varyans analizi sonuçlarına göre, model oldukça önemli ($P < 0.01$) bulunmuştur. Amonyum klorür başlangıç derişimi ile çalkalama hızının lineer etkileri ve bu parametrelerin birbirleriyle etkileşimi substrat dönüşüm yüzdesi için oldukça önemlidir ($P < 0.01$). Ksiloz başlangıç derişiminin lineer etkisi, ayrıca amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızı ile olan etkileşimlerinin ise önemsiz olduğu ($P > 0.05$) görülmektedir.

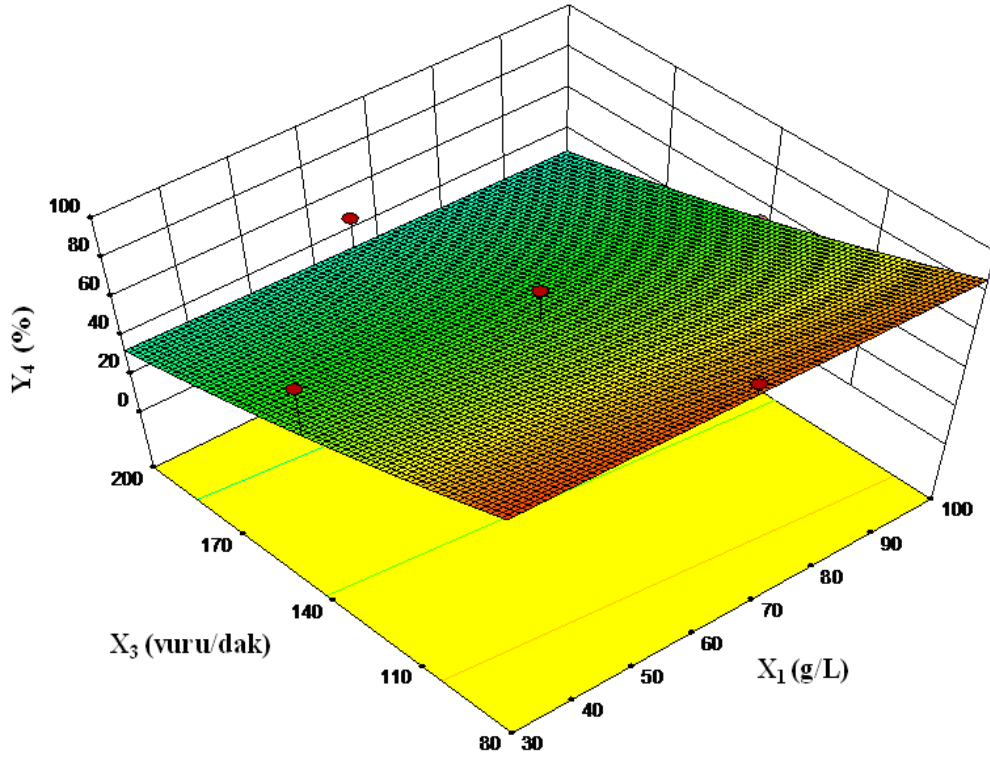
Şekil 4.25-4.27’de substrat dönüşüm yüzdesi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri görülmektedir. Bu yanıt için oluşturulan kontur grafikleri de EK D’de verilmiştir. Oluşturulan grafiklerde kullanılan parametreler dışındaki bağımsız değişken için, merkez noktasındaki değer kullanılmıştır. Substrat dönüşüm yüzdesinin etkisi lineer model ile ifade edildiğinden, elde edilen yanıt yüzeylerinin düzlemsel olduğu görülmektedir. Ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin substrat dönüşüm yüzdesi üzerine etkileri Şekil 4.25’teki grafikte verilmiştir. Grafiğe göre, çalışılan ksiloz derişimi aralığında, amonyum klorür başlangıç derişiminin artması ile Y_4 ’ün

arttığı belirlenmiştir. Ksiloz başlangıç derişiminin düşük değerlerinde bu artışın daha fazla olduğu görülmektedir. Azot kaynağı derişimi sifıra yakın iken substrat dönüşüm yüzdesinin de oldukça düşük değerlerde olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu koşullarda ksiloz başlangıç derişimi arttığında Y_4 etkilenmemekte, yüksek amonyum klorür derişimlerinde ise azalmaktadır.



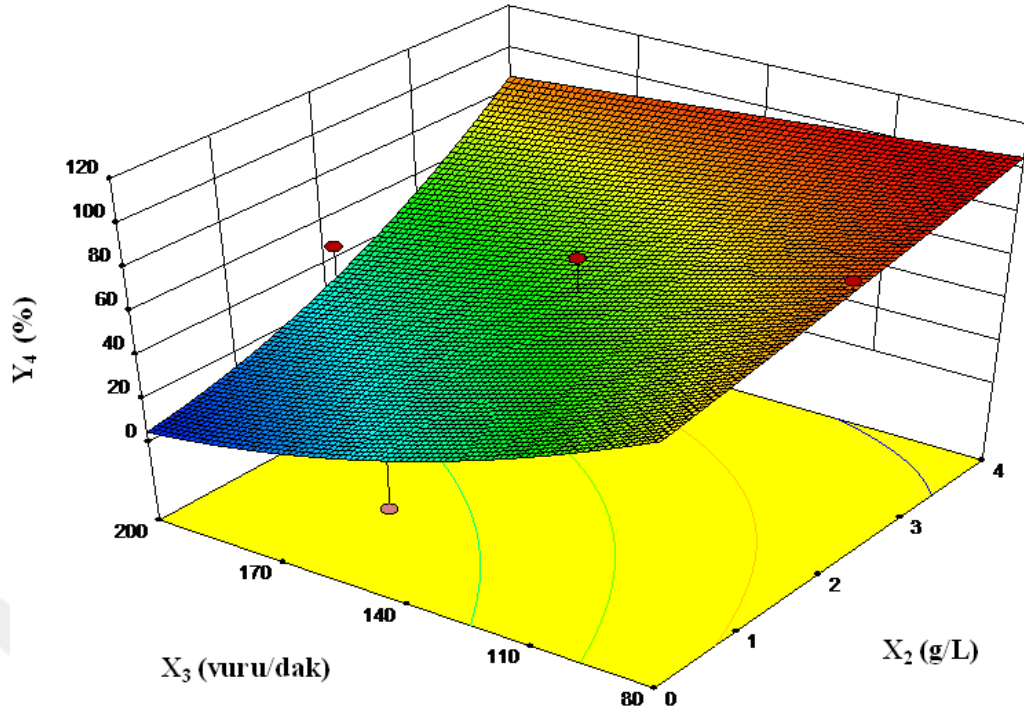
Şekil 4.25. Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkileri ($X_3 = 140$ vuru/dak)

Şekil 4.26’da ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının substrat dönüşüm yüzdesi üzerine etkileri görülmektedir. Kullanılan bütün ksiloz başlangıç derişimlerinde, çalkalama hızı arttığında substrat dönüşüm yüzdeleri azalmaktadır. Herhangi bir çalkalama hızı değerinde, ksiloz derişiminin arttırılmasının substrat dönüşüm yüzdesinde düşük düzeyde azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Y_4 için en iyi sonuçlar, ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızlarının düşük değerlerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.26. Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_2 = 2$ g/L)

Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri Şekil 4.27'deki grafikte verilmiştir. Bütün çalkalama hızı değerlerinde, amonyum klorür başlangıç derişiminin artmasının Y_4 'ü arttırdığı belirlenmiştir. Özellikle yüksek çalkalama hızı değerlerinde bu artış çok daha belirgindir. Kullanılan herhangi bir amonyum klorür derişiminde ise Y_4 , çalkalama hızının arttırılmasından oldukça olumsuz etkilenmektedir. Azot kaynağı derişiminin düşük değerlerinde (0-2 g/L) bu azalış daha belirgin şekilde görülmektedir. Çalkalama hızının düşük, başlangıç amonyum klorür derişiminin yüksek değerlerinde ise Y_4 için maksimum değerler elde edilmiştir.



Şekil 4.27. Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_1 = 65$ g/L)

4.4.2.5 Maksimum Ksilitol Özgöl Oluşum Hızı Üzerine Bağımsız Değişkenlerin Etkisi

Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) ksilitol özgöl oluşum hızı (Y_5) üzerine etkileri, yanıt yüzey yöntemi ile modellenmiş ve (4.5) eşitliğindeki karesel model ile ifade edilmiştir. Deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerleri gösteren grafik, EK C’de sunulmuştur.

$$Y_5^{1/2} = +0.26884 - 0.01014X_1 + 0.11835X_2 + 2.83120 \times 10^{-3}X_3 - 3.54707 \times 10^{-5}X_1X_2 + 1.28198 \times 10^{-5}X_1X_3 + 3.97708 \times 10^{-4}X_2X_3 + 6.86521 \times 10^{-5}X_1^2 - 0.02754X_2^2 - 1.75684 \times 10^{-5}X_3^2 \quad (4.5)$$

Varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiş olan model önemli bulunmuş, modelin belirtme katsayısı $R^2 = 0.860$ olarak elde edilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi, amonyum klorür başlangıç derişiminin lineer ve karesel etkilerinin ksilitol özgöl oluşum hızı için önemli olduğu bulunmuştur. Ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızlarının lineer ve karesel etkileri ise bu yanıt için önemsizdir

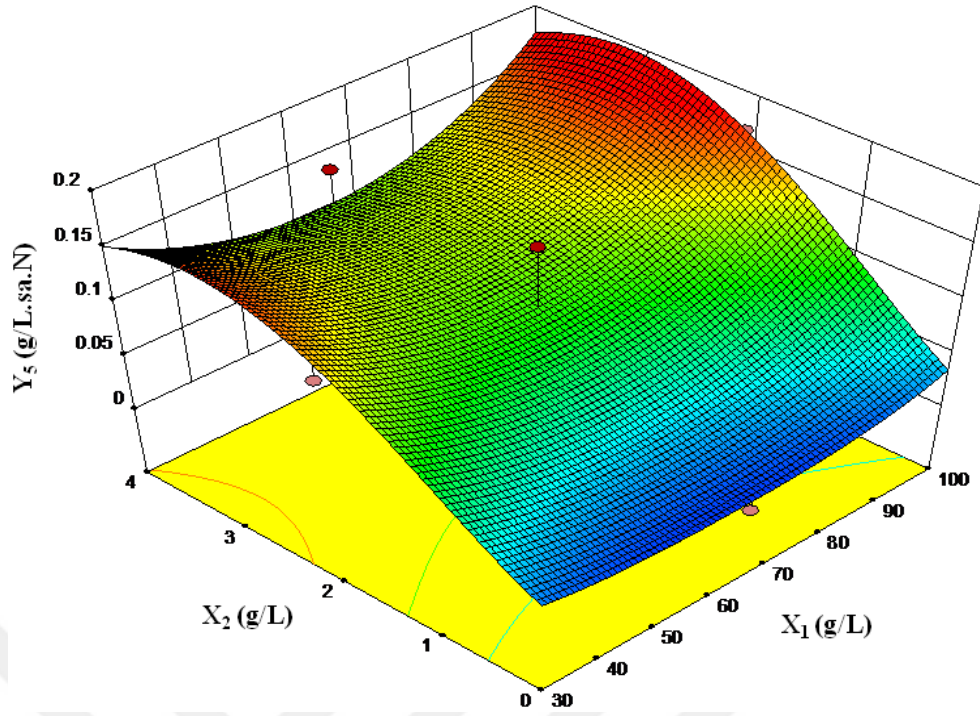
($P>0.05$). Ayrıca, bu üç parametrenin birbirleriyle ikili etkileşimlerinin de önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) ksilitol özgül oluşum hızı (Y_5) üzerine etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	S.D	K.O.	F
Model	9	0.028	5.47*
X_1	1	3.174×10^{-3}	0.62
X_2	1	0.15	29.61**
X_3	1	7.593×10^{-3}	1.48
X_1X_2	1	4.932×10^{-5}	9.628×10^{-3}
X_1X_3	1	5.798×10^{-3}	1.13
X_2X_3	1	0.018	3.56
X_1^2	1	0.019	3.74
X_2^2	1	0.033	6.42*
X_3^2	1	0.011	2.12
Uyum eksikliği	5	5.839×10^{-3}	1.49
Hata	3	3.928×10^{-3}	
Genel	17	0.028	5.47*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

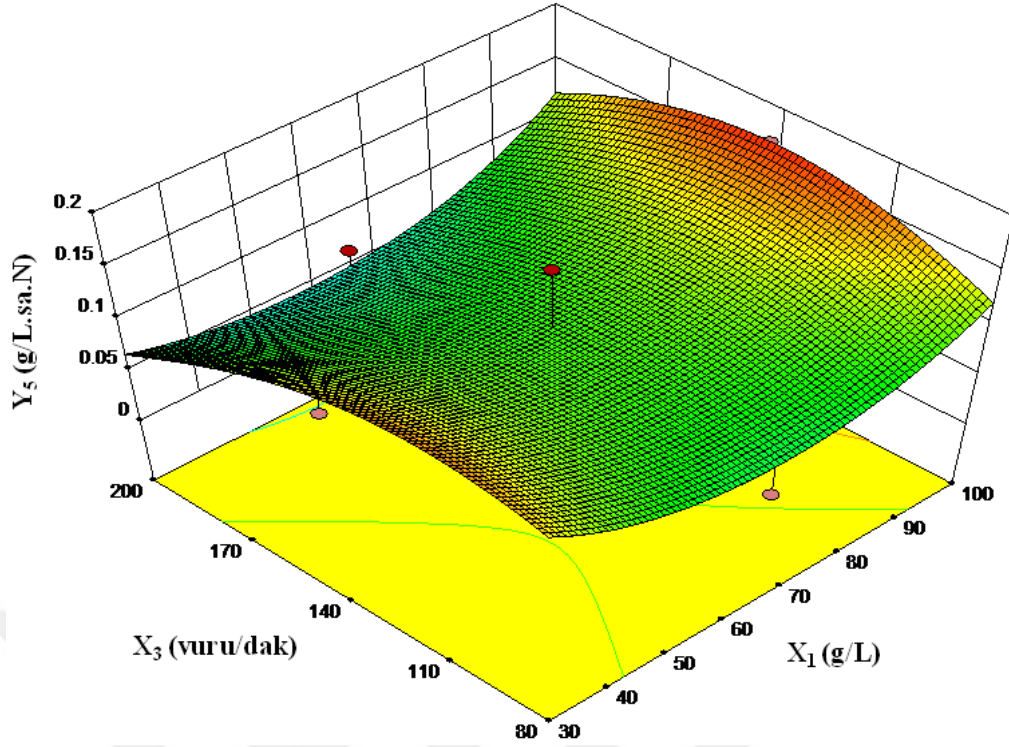
Ksilitol özgül oluşum hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi (X_1), amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2) ve çalkalama hızının (X_3) etkileri Şekil 4.28-4.30'daki yanıt yüzey grafiklerinde görülmektedir. İlgili yanıtı ait kontur grafikleri de EK D'de verilmiştir. Şekil 4.28'e göre, amonyum klorürün düşük derişimlerinde, substrat derişiminin artmasının ürün özgül oluşum hızını etkilemediği bulunmuştur. Azot kaynağının yüksek olduğu durumlarda ise; Y_5 için en iyi sonuç, ksiloz derişimi 100 g/L olduğunda elde edilmiştir. Yüksek amonyum klorür derişimlerinde ve substrat derişiminin 50-70 g/L olduğu aralıkta elde edilen ürün özgül oluşum hızı değerlerinin düşük olduğu görülmektedir.



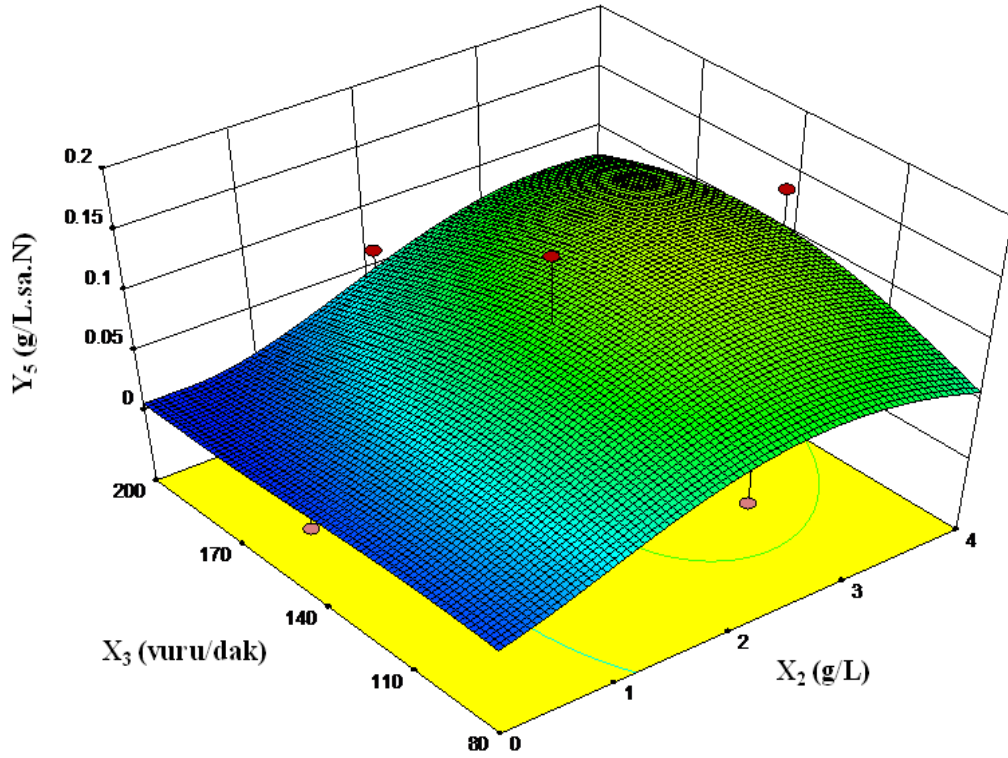
Şekil 4.28. Ksilitol özgül oluşum hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkileri ($X_3 = 140$ vuru/dak)

Çalkalama hızı ve ksiloz başlangıç derişimlerinin birlikte etkileri incelendiğinde; Y_5 için en iyi sonuçların ksiloz derişiminin 100 g/L, çalkalama hızının ise; 130-150 vuru/dak aralığında iken elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.29). Ayrıca, bütün ksiloz derişimleri için, maksimum ürün özgül oluşum hızının en yüksek değerlerine çalkalama hızı için aynı aralıkta ulaşılmıştır. Belirli bir çalkalama hızında, substrat derişiminin artması ile Y_5 'in önce bir miktar azaldığı, ancak yaklaşık 70 g/L ksiloz derişiminin üzerinde ise, arttığı belirlenmiştir.

Şekil 4.30'da, amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının ürün özgül oluşum hızı üzerindeki etkileri görülmektedir. Buna göre, bütün çalkalama hızlarında, azot kaynağının 0-1 g/L aralığında olduğu durumlarda ürün özgül oluşum hızının oldukça düşük olduğu ve değişmediği görülmektedir. Azot kaynağının 1-3 g/L aralığındaki artışı ile Y_5 'in de arttığı bulunmuştur. 3 g/L'nin üzerindeki amonyum klorür derişimlerinde; 130-150 vuru/dak çalkalama hızı aralığında bu yanıtın sabit kaldığı, bu aralığın dışındaki çalkalama hızlarında ise azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.29. Ksilitol özgül oluşum hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_2 = 2$ g/L)



Şekil 4.30. Ksilitol özgül oluşum hızı üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkileri ($X_1 = 65$ g/L)

4.4.3 Optimizasyon

Bağımsız değişkenlerin seçilen yanıtlar üzerindeki etkilerinin modellenmesinin ardından, optimum deney koşullarının belirlenebilmesi amacı ile, nümerik optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla, “istenen hedefe ulaşma fonksiyonu” kullanılmıştır.

Bu çalışmada öncelikle, elde edilen ksilitol derişiminin fazla olması ve fermantasyon sonunda kalan ksiloz miktarının mümkün olduğunca düşük olmasına önem verilmiştir. Deney dizaynındaki deneylerin yürütülmesi sırasında, bazı deneylerde fermantasyon sonunda kalan substrat miktarının oldukça fazla olduğu görülmüş ve bu nedenle substrat dönüşüm yüzdesinin de hesaplanmasına karar verilmiştir. Kullanılan kestane kabuğu hidrolizatı 14 g/L ksiloz içerdiği ve istenen ksiloz derişimi ksiloz eklenerek sağlandığı için, substratın gereğinden fazla kullanılmaması konusu önemsenmiştir. Ayrıca, saf ksilozun pahalı bir substrat olması da ortamdaki substrat kullanım yüzdesinin önemsenmesinde bir etken olmuştur. Diğer yanıtlar olan; ksilitol verimi, maksimum ksilitol üretim hızı ve maksimum ürün özgül oluşum hızı ise Y_1 ve Y_4 'e göre ikinci derecede önemli kabul edilmiştir. Ancak, hesaplanan bütün yanıtlar optimizasyona dahil edilip, hepsi için hedefler belirtildiğinde, istenen hedefe ulaşma fonksiyonunun düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, bütün yanıtları esas alarak ideal bir optimizasyon yapılamayacağına karar verilmiştir. Y_1 ve Y_4 dışındaki, verim ve hızı temsil eden yanıtların optimizasyonu olumsuz etkilemesinin bazı nedenlere bağlı olduğu düşünülmüştür. Örneğin, ksilitol üretiminin sıfıra yakın olduğu ve ksilozun çok az miktarının kullanıldığı 5 numaralı deneyde, ksilitol verimi %16 olarak hesaplanmıştır. Bu olumsuz koşullarda verim için kayda değer bir sonuç alınmasının tek nedeni, ksilitol miktarının yanında kullanılan substrat miktarının da oldukça düşük olmasıdır. Bunun gibi durumlar, ürün üretimi için aslında olumsuz olan koşulların, olumlu gibi yorumlanmasına neden olabilmektedir. Verimlilik için elde edilen sonuçların yüksek ya da düşük olması, her zaman en önemli yanıt kabul edilen maksimum ksilitol derişimi ile uyumlu olmamaktadır. Örneğin, substrat derişiminin düşük olduğu 1 numaralı deneyde ksilitol derişimi çok düşük olmasına rağmen, ürün üretim hızı yüksek bulunmuştur. Bunun tersine yüksek substrat derişimi içeren 2 numaralı deneyde, ksilitol derişimi çok yüksek iken, hız değeri

düşüktür. Hem ksilitol derişimi hem verimlilik değerlerinin maksimum olması hedeflendiğinde optimizasyonda karşılaşılan zorlukların bunlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ürün özgül oluşum hızında ise; verimliliğe benzer bir etkiye ek olarak, hücre sayısı da hesaplamaya dahil olmaktadır. Bu da aynı şekilde, ksilitol üretimi için olumsuz olan koşulların olumlu gibi yorumlanmasına neden olabilmektedir. Bütün bu nedenlerden dolayı ve istenen hedefe ulaşma fonksiyonunun 1'e mümkün olduğunca yakın olması gerekliliğinden, optimizasyonda sadece Y_1 ve Y_4 için hedefler belirtilmiştir. Yapılan optimizasyona ilişkin detaylar, Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Ksilitol üretiminin optimizasyonunda kullanılan değişkenler, belirlenen hedefler ve değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri

Değişken	Hedef	Minimum değer	Maksimum değer
Ksiloz başlangıç derişimi (X_1 ; g/L)	Minimum	80	100
Amonyum klorür başlangıç derişimi (X_2 ; g/L)	Çalışılan aralıkta	2	4
Çalkalama hızı (X_3 ; vuru/dak)	Minimum	80	100
Maksimum ksilitol derişimi (Y_1 ; g/L)	Maksimum	0.09	30.56
Ksilitol verimi (Y_2 ; %)	Hedef belirtilmedi	1.63	41.72
Ksilitol üretim hızı (Y_3 ; g/L.sa)	Hedef belirtilmedi	0.001	1.453
Substrat dönüşüm yüzdesi (Y_4 ; %)	Maksimum	1.64	99.47
Ürün özgül oluşum hızı (Y_5 ; g/L.sa.N)	Hedef belirtilmedi	0.0001	0.1736

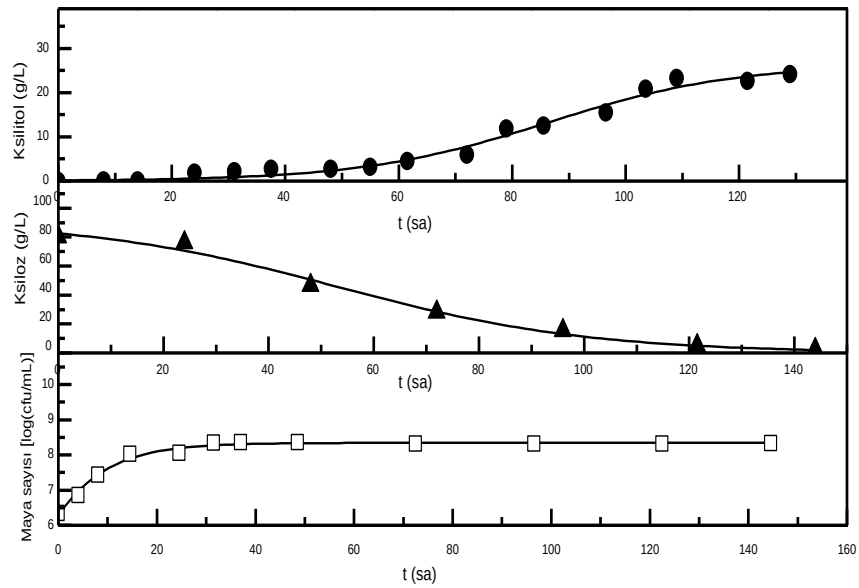
Optimizasyon yapılırken, bağımsız değişkenler için de hedefler belirlenmiştir. Kestane kabuğu hidrolizatına eklenen ksilozun mümkün olduğunca azaltılması ve kalan ksiloz miktarının da az olması, bu çalışmanın en önemli hedeflerinden birini oluşturmaktadır. Bu nedenle, ksiloz başlangıç derişiminin 80-100 g/L aralığında minimum olması hedeflenmiştir. Yanıtların modellenmesi sırasında elde edilen

verilere dayanarak, amonyum klorür başlangıç derişimi 2-4 g/L arasında kullanılmış, çalkalama hızının ise 80-100 vuru/dak aralığında minimum olması hedeflenmiştir. Belirlenen hedefler doğrultusunda, elde edilen 19 optimizasyon önerisi arasından, ksiloz başlangıç derişiminin 80 g/L, amonyum klorür başlangıç derişiminin 3.761 g/L ve çalkalama hızının 80 vuru/dak olduğu koşullar optimum koşullar olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve EK E). Yapılan optimizasyonda istenen hedefe ulaşma fonksiyonuna ait grafik ise, EK F’de sunulmuştur. Bu koşullarda maksimum ksilitol derişiminin 24.303 g/L, ksilitol veriminin %31.527, maksimum ksilitol üretim hızının 0.538 g/L.sa, substrat dönüşüm yüzdesinin 99.758 ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızının 0.072 g/L.sa.N olması öngörülmüştür (EK E ve EK G).

Çizelge 4.13. Ksilitol üretimi için belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için getirilen yaklaşımlar

X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃ (vuru/dak)	Y ₁ (g/L)	Y ₂ (%)	Y ₃ (g/L.sa)	Y ₄ (%)	Y ₅ (g/L.sa.N)
80	3.761	80	24.303	31.527	0.538	99.758	0.072

Belirlenen optimum koşullar kullanılarak bir deney daha oluşturulmuş ve yapılan optimizasyon sonucunda öngörülen yanıt değerlerine ne ölçüde ulaşılabileceği araştırılmıştır. Bu deneye ait sonuçlar Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31. Optimum koşullarda yapılan deneyde elde edilen ksilitol ve ksiloz derişimleri ile maya sayılarının zamanla değişimleri

Buna göre optimum koşullarda maksimum ksilitol derişimi 24.50 g/L, ksilitol verimi %31.517, maksimum ksilitol üretim hızı 0.497 g/L.sa, substrat dönüşüm yüzdesi %97.35 ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızı 0.06 g/L.sa.N olarak hesaplanmıştır. Kullanılan programın doğrulama menüsü yardımı ile yapılan kontrolde, elde edilen deney sonuçlarının %95 güven aralığında doğrulandığı bulunmuştur (EK G).

4.4.4. Yanıt Yüzey Yöntemi ile Yapılan Modellemelere ve Optimizasyona İlişkin Değerlendirmeler

Merkezi karma tasarıma göre yapılan deneylerde hesaplanan beş yanıtta dört tanesinin (maksimum ksilitol derişimi, ksilitol verimi, maksimum ksilitol üretim hızı ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızı) bağımsız değişkenler ile değişimi karesel model ile ifade edilmiştir. Diğer bir yanıt olan substrat dönüşüm yüzdesinin modellenmesinde ise etkileşim terimlerini de içeren lineer model kullanılmıştır. Türetilen modellere ilişkin R^2 değerlerinin 0.860-0.984 aralığında değiştiği saptanmıştır. Bu değerler, türetilen modellerin deneysel veriler ile uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. R^2 değerinin 0.75'in üzerinde olmasının, modelin uygunluğunu ifade ettiği belirtilmektedir (Misra ve ark., 2013b). EK C'de verilmiş olan, elde edilen deneysel verilere karşı modele ait tahminsel değerleri içeren grafiklerden de, türetilen modellerin parametre etkilerini ifade etmede kullanılabileceği görülmektedir.

Deney tasarımında kullanılan üç bağımsız değişkenden biri olan amonyum klorür başlangıç derişimi, ksilitol üretimi ile ilgili yanıtların tamamı için en önemli parametre olarak ön plana çıkmaktadır. Çalışmadaki diğer bir bağımsız değişken olan ksiloz başlangıç derişiminin, elde edilen maksimum ksilitol derişimi değerleri üzerine etkisinin oldukça önemli olduğu belirlenmiştir. Maksimum ksilitol derişimini önemli ölçüde etkileyen diğer parametre ise çalkalama hızı olarak ifade edilen bağımsız değişken olmuştur. Çalkalama hızından belirgin bir şekilde etkilenen diğer yanıtın ise substrat dönüşüm yüzdesi olduğu tespit edilmiştir.

30-100 g/L aralığındaki ksiloz başlangıç derişiminin kullanıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde, genel olarak yüksek substrat derişimlerinin

ksilitol üretimini olumlu etkilediği görülmektedir. Yapılan optimizasyon ile, en uygun ksiloz derişiminin 80 g/L olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, bira posasından hazırlanan fermantasyon ortamında *C. guilliermondii* ile gerçekleştirilen bir çalışmada, maksimum ksilitol derişimi, verim ve verimlilik değerleri için en yüksek sonuçların optimum 70 g/L ksiloz içeren ortamda alındığı rapor edilmiştir (Mussatto ve Roberto, 2008). Silva ve Roberto (2001) tarafından, pirinç kepeği hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı bir çalışmada, ortamdaki ksiloz başlangıç derişiminin (48-132 g/L) ksilitol üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve optimum ksiloz derişimi 82.5 g/L olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen deneylerde ise, elde edilen maksimum ksilitol derişiminin 52 g/L ve verimin 0.65 g/g olduğu bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında en önemli bulgulardan birisi, kestane kabuğu hidrolizatının mutlaka bir azot kaynağı ile desteklenmesi gerektiğidir. Azot kaynağı olarak kullanılan ve inorganik bir azot kaynağı olan amonyum klorürün derişiminin çok düşük olduğu ortamlarda, ksiloz derişiminin arttırılması ksilitol üretiminin sağlanması için yeterli olmamıştır. Literatürde son yıllarda yapılan çalışmalarda, çeşitli hemiselülozik hidrolizatların bazı azot kaynakları ile desteklendiği görülmektedir. Ağaç artıklarından hazırlanan hidrolizatın maya özütü ile zenginleştirilmesi (Ko et al., 2008), buğday kepeği hidrolizatına pirinç kepeği ekstraktı eklenmesi (Canilha et al., 2005), kaju fıstığı posası hidrolizatının üre ile desteklenmesi (Albuquerque et al., 2015), mısır koçanı hidrolizatının maya özütü ile zenginleştirilmesi (Ramesh et al., 2013) ve çimen hidrolizatının maya özütü ve amonyum sülfat ile desteklenmesi (West, 2009) bu konudaki bazı örneklerdendir. Fermantasyon ortamı olarak kaju fıstığı posasından hazırlanan hidrolizatın kullanıldığı bir çalışmada, ortama azot kaynağı olarak ilave edilen üre, maya özütü ve amonyum sülfatın maksimum ksilitol derişimi, verim ve verimlilik değerleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Tez çalışmasında elde edilen sonuçların aksine, ortamın organik bir azot kaynağı olan üre ile desteklenmesi durumunda, incelenen değerler için en yüksek sonuçların alındığı, maya özütü veya amonyum sülfat kullanıldığında ise ürün derişimi ve verim değerlerinin azaldığı rapor edilmiştir (Albuquerque ve ark., 2015). Fasulye kabuğundan hazırlanan hemiselülozik hidrolizatın fermantasyon ortamı olarak değerlendirildiği bir çalışmada, ortama ilave edilen tüm organik (üre) ve inorganik (amonyum klorür, amonyum nitrat, amonyum

sülfat ve sodyum nitrat) azot kaynaklarının ksilitol üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Mushtaq ve ark., 2014). Ayrıca, literatürde hemiselülozik hidrolizatların azot kaynakları ile desteklenmemesini öneren çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, ksilitol üretiminde üzüm posası hidrolizatının substrat olarak kullanıldığı bir çalışmada fermantasyon ortamlarının çeşitli organik azot kaynakları (şilempe ve mısır maserasyon sıvısı ile maya özütü, pepton ve malt özütünden oluşan karışım) ile desteklenmesinin maksimum ksilitol derişimini, verim, verimlilik değerlerini ve substrat dönüşüm yüzdesini olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Salgado ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında yapılan optimizasyon sonucunda, ksilitol üretimi için en uygun çalkalama hızının 80 vuru/dak olduğu tespit edilmiştir. Ksilitol üretimini oldukça önemli ölçüde etkileyen faktörlerden birinin, fermantasyon ortamında kullanılan havalandırma koşullarına bağlı olarak değişen oksijen derişimi olduğu bildirilmektedir (Albuquerque ve ark., 2014). Erlenlerde çalkalamalı kültür şeklinde yürütülen çalışmalarda, havalandırma koşulları genel olarak çalkalama hızı değerleri ile ifade edilmektedir. Kullanılan farklı çalkalama hızlarının, oksijenin fermantasyon ortamına transfer hızını ve dolayısıyla ortamdaki çözünmüş oksijen derişimini etkilediği belirtilmektedir (Rivas ve ark., 2007). Düşük çalkalama hızlarında oksijen transferinin yavaşladığı bilinmekte ve mikrobiyel ksilitol üretimi çalışmalarında, ortamdaki oksijen derişiminin düşük seviyelerde tutulması gerektiği bildirilmektedir (Mohamad ve ark., 2015). Bu çalışmada, önerilen optimum koşulların hiçbirinde yüksek karıştırma hızlarının olmamasının, bu ortamlardaki oksijen transferinin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, Li ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen ve fermantasyon ortamı olarak mısır koçanı hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada, ortamdaki çözünmüş oksijen derişiminin düşürülmesi ile daha yüksek miktarlarda ksilitol üretildiği belirtilmiştir.

Havalandırma koşullarının ksilitol üretimi üzerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, düşük çalkalama hızlarında oksijenin transfer hızı değerlerinin azaldığı ve en düşük çalkalama hızı olan 150 rpm kullanıldığında maksimum ürün derişimi, verim ve verimlilik değerlerine ulaşıldığı bildirilmiştir (Castañón-Rodríguez ve ark., 2015). Fermantasyon ortamı olarak sebze artığı hidrolizatının kullanıldığı bir başka çalışmada da, 150 rpm hızında çalkalama uygulandığında, ksilitol üretimi için en yüksek sonuçların alındığı belirtilmiştir. Ayrıca, bu tez

çalışması ile benzer şekilde, düşük çalkalama hızlarında substrat dönüşüm yüzdesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2012b). Farklı karıştırma hızlarının (100-300 rpm) ksilitol üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, 200 rpm hız değeri kullanıldığında maksimum ksilitol derişimine ulaşıldığı, ayrıca verim ve verimlilik değerleri için en yüksek sonuçların elde edildiği belirtilmiştir (Sampaio ve ark., 2008). Pirinç sapı kullanılarak hazırlanan hidrolizatta gerçekleştirilen ve fermentördeki karıştırma hızlarının 200-500 rpm arasında değiştiği bir çalışmada ise; 300 rpm karıştırma hızında ortamdaki substrat dönüşüm yüzdesi düşük olmasına rağmen, en yüksek değerde (0.84 g/g) verim alındığı belirtilmiştir. 500 rpm karıştırma hızının kullanıldığı ortamda ise, substrat dönüşüm yüzdesinin daha yüksek, ancak elde edilen verim değerinin çok daha düşük (0.44 g/g) olduğu rapor edilmiştir (Mussatto ve Roberto, 2003). Genel olarak incelendiğinde, gerçekleştirilen bu çalışmada, kullanılan düşük çalkalama hızlarında (80 vuru/dak) ksilitol üretimi için daha iyi sonuçların elde edildiği görülmektedir.

Bu tez çalışmasında optimizasyonun ardından, optimum koşullarda yapılan çalışmada, en önemli yanıtlar olarak kabul edilen maksimum ksilitol derişimi ve substrat dönüşüm yüzdesi değerleri sırasıyla 24.50 g/L ve %97.35 olarak hesaplanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda, maksimum ksilitol derişimi için bulunan değerlerin 10.5-100.1 g/L aralığında değiştiği (Miura ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2012b), substrat dönüşüm yüzdesi için hesaplanan değerlerin ise %55.50-99.22 arasında olduğu görülmektedir (Guamán Burneo ve ark., 2015). Ayrıca, optimum koşullarda gerçekleştirilen çalışmada ksilitol verimi (%31.517), maksimum ksilitol üretim hızı (0.497 g/L.sa) ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızı (0.06 g/L.sa.N) yanıtları da hesaplanmıştır. Literatürdeki sonuçlar incelendiğinde; ksilitol verimi değerlerinin 0.11-0.84 g/g aralığında (Arrizon ve ark., 2012; Mussatto ve Roberto, 2003), maksimum ksilitol üretim hızının ise 0.07-2.01 g/L.sa değerleri arasında değiştiği belirtilmektedir (Albuquerque ve ark., 2015; Wang ve ark., 2013a). Maksimum ksilitol özgül oluşum hızı için bulunan değerlerin ise 0.014-0.22 g/g.sa aralığında olduğu görülmektedir (Kamat ve ark., 2013; Sampaio ve ark., 2008). Yapılan çalışmadaki sonuçlar, literatürde yer alan ve farklı lignoselülozik kaynakların kullanıldığı diğer çalışmalarla da kıyaslandığında, bazı bileşenlerce desteklenen kestane kabuğu hidrolizatının ksilitol üretimi amacı ile değerlendirilebilecek alternatif bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada öncelikle; yeni bir lignoselülozik kaynak olarak, kestane kabuğunun mikrobiyel ksilitol üretiminde kullanılabilirliği ortaya konmuştur. Seyreltik asit hidrolizi ile hazırlanan ham hidrolizatın yüksek miktarda fenolik madde içerdiği belirlenmiştir. Aşırı alkalileştirme, pH ayarlama ve aktif kömür uygulaması gibi detoksifikasyon işlemlerinin ardından, hidrolizattaki toplam fenolik madde miktarının %98 oranında azaldığı bulunmuştur. Hazırlanan hidrolizatın karbon kaynağı olarak 14 g/L ksilozun yanısıra, toplam yaklaşık 70 g/L olmak üzere, glukoz ve fruktoz da içerdiği belirlenmiş, azotlu madde miktarının ise; oldukça düşük olduğu bulunmuştur.

Çalışmanın ilk aşamasında, *C. tropicalis* M2 ve *C. tropicalis* M43 yerli suşlarının, maya özütü ve ksiloz ile desteklenmiş kestane kabuğu hidrolizatında ksilitol üretimleri araştırılmış ve sonraki aşamalarda *C. tropicalis* M2 suşu ile çalışılmasına karar verilmiştir. Literatürden farklı olarak, bu çalışmada lignoselülozik kaynaklar yerine gıdadan izole edilen bir yerli maya suşunun ksilitol üretiminde kullanılması önerilmiştir.

Hidrolizat ortamına ilave edilen farklı azot kaynaklarının *C. tropicalis* M2 suşunun ksilitol üretimine etkisini belirlemek üzere yapılan çalışma sonucunda da, ortamın inorganik bir azot kaynağı olan amonyum klorür ile desteklenmesine karar verilmiştir.

Amonyum klorür ve ksiloz ile desteklenen kestane kabuğu hidrolizatında *C. tropicalis* M2 suşunun ksilitol üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkilerinin incelendiği deneylerde maksimum ksilitol derişimi, ksilitol verimi, maksimum ksilitol üretim hızı ve maksimum ksilitol özgül oluşum hızlarının bağımsız değişkenler (ksiloz başlangıç derişimi, amonyum klorür başlangıç derişimi, çalkalama hızı) ile değişimleri karesel model ile ifade edilmiştir. Substrat dönüşüm yüzdesinin parametreler ile değişiminin modellenmesinde ise; etkileşimleri içeren lineer model kullanılmıştır.

İncelenen parametrelerden amonyum klorür başlangıç derişiminin bütün yanıtlar için önemli olduğu bulunmuştur. Azot kaynağının çok düşük olduğu durumlarda ksilitol üretiminin oldukça olumsuz etkilendiğı belirlendiğinden, kestane kabuğu hidrolizatının ksilitol üretiminde kullanılabilmesi için mutlaka azot kaynağı ile desteklenmesi gerektiğı sonucuna varılmıştır.

Ksiloz başlangıç derişimi, sadece maksimum ksilitol derişimi için önemli bulunmuştur. Çalkalama hızı ise; maksimum ksilitol derişimi ve substrat dönüşüm yüzdesi için önemli bulunmuştur. Parametre etkileşimleri, oluşturulan yanıt yüzey grafikleri ile de incelenmiştir. Genellikle çalkalama hızının düşük, ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin yüksek olduğu ortamlarda daha yüksek miktarlarda ksilitol üretildiğı gözlenmiştir.

Yapılan nümerik optimizasyon sonucunda, belirlenen hedefler doğrultusunda optimum koşullar; ksiloz başlangıç derişimi için 80 g/L, amonyum klorür başlangıç derişimi için 3.761 g/L ve çalkalama hızı için 80 vuru/dak olarak verilmiştir. Bu koşullarda, maksimum ksilitol derişiminin 24.303 g/L, ksilitol veriminin %31.527, maksimum ksilitol üretim hızının 0.538 g/L.sa, substrat dönüşüm yüzdesinin %99.758 ve ksilitol özgül oluşum hızının 0.072 g/L.sa.N olacağı öngörülmüştür.

Optimum koşullar kullanılarak yapılan deneyde, maksimum ksilitol derişimi 24.50 g/L, ksilitol verimi %31.517, maksimum ksilitol üretim hızı 0.497 g/L.sa, substrat dönüşüm yüzdesi %97.35 ve ksilitol özgül oluşum hızı 0.060 g/L.sa.N olarak hesaplanmıştır. Kullanılan program yardımı ile, optimum koşulların deneysel olarak %95 güven aralığında doğrulandığı belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen ksilitol derişimleri dikkate alındığında, ksiloz ve amonyum klorür ile desteklenen kestane kabuğu hidrolizatının *C. tropicalis* M2 ile ksilitol üretiminde kullanılabileceğı ortaya konmuştur. Literatürde, ksilitol üretimi için kestane kabuğunun substrat olarak kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan, çalışmanın bilimsel bilgi birikimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu araştırmada, hidrolizattaki ksiloz başlangıç derişiminin artması ile genel olarak ksilitol üretiminin arttığı bulunmasına rağmen, optimizasyonda bu parametrenin 80-100 g/L aralığında minimum olması istenmiştir. Hidrolizatın saf

ksiloz ile desteklenmesi zorunluluğu ve ksilozun pahalı bir şeker oluğu, m¼mk¼n olan en d¼ř¼k başlangıç substrat derişiminde en y¼ksek ksilitol derişiminin alınacağı koşulların sorgulanmasını gerektirmiştir. Ancak, ksilozun tamamının veya b¼y¼k çoğunluğunun hidrolizattan sağlanması durumunda daha y¼ksek ksiloz derişimleri ile de çalışılabileceği ve daha y¼ksek ksilitol verimlerine ulaşılabileceği ¼ng¼r¼lmektedir. Ancak, bunun sağlanabilmesi için, hidrolizata uygulanan konsantrasyon oranının arttırılması gerekmektedir. Vakum evaporasyon aşamasında y¼ksek konsantrasyon oranlarının kullanılamaması, hidrolizatın hazırlık aşamalarının da optimize edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada; hidrolizatın y¼ksek oranlarda konsantre edilmesiyle, ksilitol ¼retimi açısından olumsuz sonuçlar alınmasının, ksilozun yanısıra, hidrolizatta kalan az miktardaki inhibit¼rlerin derişimlerinin de artmasından kaynaklanmış olabileceği d¼ř¼n¼lmektedir. Kestane kabuğu hidrolizatının hazırlanması ve inhibit¼rlerden arındırılması aşamalarında kullanılan işlem parametrelerinin (seyrelik asit oranı, otoklavlama s¼re ve sıcaklığı, aktif k¼m¼r uygulamalarında kullanılan oran, sıcaklık, s¼re ve çalkalama hızı) konsantrasyon oranı ile birlikte optimize edilmesinin bu konuda faydalı olacağı d¼ř¼n¼lmektedir. B¼ylece, konsantrasyon oranının arttırılarak, daha y¼ksek derişimde ksiloz içeren hidrolizatların elde edilebileceği ¼ng¼r¼lmektedir. Bunun yanında, bu çalışmada hidrolizat ksiloz ve amonyum klor¼r eklenerek kullanılmasına rağmen, hem hidrolizasyon aşamasında, hem de inhibit¼rlerin giderilmesi aşamalarında kullanılan y¼ntemlerin literat¼rde ekonomik y¼ntemler arasında g¼sterilmesi, proses maliyetinin d¼ř¼k olması açısından ¼nem taşımaktadır.

6. KAYNAKLAR

Ahmad I, Shim WY, Jeon WY, Yoon BH, Kim JH (2012) “Enhancement of Xylitol Production in *Candida tropicalis* by Co-expression of Two Genes Involved in Pentose Phosphate Pathway”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35:199-204.

Albuquerque TLd, Gomes SDL, Marques JE, Silva IJd, Rocha MVP (2015) “Xylitol Production from Cashew Apple Bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510”, *Catalysis Today*, 255:33-40.

Albuquerque TLd, Silva IJd, Macedo GRd, Rocha MVP (2014) “Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Wastes: A Review”, *Process Biochemistry*, 49(11):1779-1789.

Amornrattanapan P (2013) “Riboflavin Production by *Candida tropicalis* Isolated from Seawater”, *Scientific Research and Essays*, 8(1): 43-47.

Arrizon J, Mateos JC, Sandoval G, Aguilar B, Solis J, Aguilar MG (2012) “Bioethanol and Xylitol Production from Different Lignocellulosic Hydrolysates by Sequential Fermentation”, *Journal of Food Process Engineering*, 35(3):437-454.

Azuma M, Ikeuchi T, Kiritani R, Kato J, Ooshima H (2000) “Increase in Xylitol Production by *Candida tropicalis* Upon Addition of Salt”, *Biomass and Bioenergy*, 19(2):129-135.

Baek SC ve Kwon YJ (2007) “Optimization of the Pretreatment of Rice Straw Hemicellulosic Hydrolyzates for Microbial Production of Xylitol”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12:404-409.

Bradley RL (1998) *Moisture and Total Solid Analysis, Food Analysis*, Nielsen SS (Ed), Aspen Publishers Inc., USA, 119-139.

Branco RFd, Santos JCd, Silva SS (2011) “A Novel Use for Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Fraction: Xylitol Enzymatic Production”, *Biomass and Bioenergy*, 35(7): 3241-3246.

Canilha L, Carvalho W, Silva JBA (2005) “Influence of Medium Composition on Xylitol Bioproduction from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate”, *World Journal of Microbiology&Biotechnology*, 21:1087-1093.

Canilha L, Carvalho W, Silva JBA (2006) “Xylitol Bioproduction from Wheat Straw: Hemicellulose Hydrolysis and Hydrolyzate Fermentation”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9):1371-1376.

Castañón Rodríguez JF, Portilla Arias JA, Aguilar Uscanga BR, Aguilar Uscanga MG (2015) “Effects of Oxygen and Nutrients on Xylitol and Ethanol Production in

Sugarcane Bagasse Hydrolyzates”, Food Science and Biotechnology, 24(4):1381-1389.

Chandel AK, Silva SSd, Carvalho W, Singh OV (2012) “Sugarcane Bagasse and Leaves: Foreseeable Biomass of Biofuel and Bio-products”, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87(1):11-20.

Chandel AK, Silva SSd, Singh OV (2013) “Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology”, BioEnergy Research, 6(1):388-401.

Chang SKC (1998) Protein Analysis, Food Analysis, Nielsen SS (Ed), Aspen Publishers Inc., USA, 237-249.

Cheng KK, Ling HZ, Zhang JA, Ping WX, Huang W, Ge JP, Xu JM (2010) “Strain Isolation and Study on Process Parameters for Xylose-to-Xylitol Bioconversion”, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24(1):1606-1611.

Cheng KK, Zhang JA, Ling HZ, Ping WX, Huang W, Ge JP, Xu JM (2009) “Optimization of pH and Acetic Acid Concentration for Bioconversion of Hemicellulose from Corncobs to Xylitol by *Candida tropicalis*”, Biochemical Engineering Journal, 43(2):203-207.

Çorbacı C, Uçar FB, Yalçın HT (2012) “Isolation and Characterization of Yeasts Associated with Turkish-style Homemade Dairy Products and Their Potential as Starter Cultures”, African Journal of Microbiology Research, 6(3):534-542.

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.

Duru N, Karadeniz F, Erge HS (2012) “Changes in Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and HMF Formation in Rosehip Nectars During Storage”, Food and Bioprocess Technology, 5(7):2899-2907.

El Baz AF, Shetaia YM, Elkhoul RR (2011) “Xylitol Production by *Candida tropicalis* Under Different Statistically Optimized Growth Conditions”, African Journal of Biotechnology, 10(68):15353-15363.

Eryaşar K ve Karasu Yalçın S (2016) “Evaluation of Some Lignocellulosic Byproducts of Food Industry for Microbial Xylitol Production by *Candida tropicalis*”, 3 Biotech, 6:202.

Franceschin G, Sudiro M, Ingram T, Smirnova I, Brunner G, Bertucco (2011) “Conversion of Rye Straw into Fuel and Xylitol: A Technical and Economical Assessment Based on Experimental Data”, Chemical Engineering Research and Design, 89(6):631-640.

Gao Y, Li D, Liu Y (2012) “Production of Single Cell Protein from Soy Molasses Using *Candida tropicalis*”, Annals of Microbiology, 62(3):1165-1172.

Güney Ege Kalkınma Ajansı (GEKA) Raporları (2009) Aydın İli Kestane Yatırım Raporu, Yayın No:6, Aydın.

Grembecka M (2015) “Sugar Alcohols-Their Role in Modern World of Sweeteners: A Review”, *European Food Research and Technology*, 241(1):1-14.

Guamán Burneo MC, Dussán KJ, Cadete RM, Cheab MAM, Portero P, Carvajal Barriga EJ, Silva SS, Rosa CA (2015) “Xylitol Production by Yeasts Isolated from Rotting Wood in the Gálapagos Islands, Ecuador, and Description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(4):919-931.

Guo X, Zhang R, Li Z, Dai D, Li C, Zhou X (2013) “A Novel Pathway Construction in *Candida tropicalis* for Direct Xylitol Conversion from Corncob Xylan”, *Bioresource Technology*, 128:547-552.

Harbers LH (1998) *Ash Analysis, Food Analysis*, Nielsen SS (Ed), Aspen Publishers Inc., USA, 119-139.

Hernández Pérez AF, Costa IAL, Silva DDV, Dussán KJ, Villela TR, Canettieri EV, Carvalho JA, Neto TGS, Felipe MGA (2016) “Biochemical Conversion of Sugarcane Straw Hemicellulosic Hydrolyzate Supplemented with Co-substrates for Xylitol Production”, *Bioresource Technology*, 200:1085-1088.

Jain H ve 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.

Jeon YJ, Shin HS, Rogers PL (2011) “Xylitol Production from a Mutant Strain of *Candida tropicalis*” *Letters in Applied Microbiology*, 53(1):106-113.

Jönsson LJ ve Martín C (2016) “Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory By-products and Strategies for Minimizing Their Effects”, *Bioresource Technology*, 199:103-112.

Kamat S, Gaikwad S, Ravi Kumar A, Gade WN (2013) “Xylitol Production by *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a Tropical Mangrove Yeast from Xylose and Corn Cob Hydrolysate”, *Journal of Applied Microbiology*, 115(6):1357-1367.

Kim SH, Yun JY, Kim SG, Seo JH, Park JB (2010) “Production of Xylitol from D-Xylose and Glucose with Recombinant *Corynebacterium glutamicum*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 46(5):366-371.

Ko CH, Chiang PN, Chiu PC, Liu CC, Yang CL, Shiau IL (2008) “Integrated Xylitol Production by Fermentation of Hardwood Wastes”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(4):534-540.

Kumar S, Dheeran P, Singh SP, Mishra IM, Adhikari DK (2015) “Bioprocessing of Bagasse Hydrolysate for Ethanol and Xylitol Production Using Thermotolerant Yeast”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38:39-47.

Kurtzman CP, Boekhout T, Robert V, Fell JW, Deak T (2003) Methods to Identify Yeasts, Yeasts in Food, Boekhout T, Robert, V (Ed), B.Behr's Verlag, GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany, 209-237.

Li Z, Guo X, Feng X, Li C (2015) "An Environment Friendly and Efficient Process for Xylitol Bioconversion from Enzymatic Corncob Hydrolysate by Adapted *Candida tropicalis*", Chemical Engineering Journal, 263:249-256.

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 and Biotechnology, 87(3):387-392.

Li Z, Qu H, Li C, Zhou X (2013) "Direct and Efficient Xylitol Production from Xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through Transcriptional Level and Fermentation Processing Optimizations", Bioresource Technology, 149: 413-419.

Lima FCS, Silva FLH, Gomes JP, Muniz MB, Santiago AM, Silva CG (2014) "Biotechnological Production of Xylitol: Evaluation of Detoxification Process with Residual Lignin Using Response Surface Methodology", Chemical Engineering Transactions, 38:415-420.

Ling H, Cheng K, Ge J, Ping W (2011) "Statistical Optimization of Xylitol Production from Corncob Hemicellulose Hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02", New Biotechnology, 28(6):673-678.

Lourenço MVM, Dini Andreote F, Aguilar Vildoso CI, Basso LC (2014) "Biotechnological Potential of *Candida* spp. for the Bioconversion of D-Xylose to Xylitol", African Journal of Microbiology Research, 8(20):2030-2036.

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", Periodica Polytechnica Chemical Engineering, 60(1):54-59.

Martínez EA, Canettieri EV, Bispo JAC, Giulietti M, Almeida e Silva JB, Converti A (2015) "Strategies for Xylitol Purification and Crystallization: A Review" Separation Science and Technology, 50(14):2087-2098.

Mateo S, Puentes JG, Roberto IC, Sánchez S, Moya AJ (2014) "Optimization of Acid Hydrolysis of Olive Tree Pruning Residue. Fermentation with *Candida guilliermondii*", Biomass and Bioenergy, 69:39-46.

Mateo S, Roberto IC, Sánchez S, Moya AJ (2013) "Detoxification of Hemicellulosic Hydrolyzate from Olive Tree Pruning Residue", Industrial Crops and Products, 49: 196-203.

Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK (2013a) "Evaluation of Corncob Hemicellulosic Hydrolysate for Xylitol Production by Adapted Strain of *Candida tropicalis*", Carbohydrate Polymers, 92(2):1596-1601.

Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK (2013b) “Statistical Approach to Study the Interactive Effects of Process Parameters for Enhanced Xylitol Production by *Candida tropicalis* and Its Potential for the Synthesis of Xylitol Monoesters”, Food Science and Technology International, 19(6):535-548.

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 Hydrolyzate to Xylitol”, Wood Science and Technology, 47:515-522.

Mohamad NL, Mustapa Kamal SM, Abdullah N, Ismail I (2013) “Evaluation of Fermentation Conditions by *Candida tropicalis* for Xylitol Production from Sago Trunk Cortex”, BioResources, 8(2):2499-2509.

Mohamad NL, Mustapa Kamal SM, Mokhtar MN (2015) “Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies”, Food Reviews International, 31(1):74-89.

Mushtaq Z, Imran M, Ur Rehman S, Zahoor T, Ahmad RS, Arshad MU (2014) “Biochemical Perspectives of Xylitol Extracted from Indigenous Agricultural By-product Mung Bean (*Vigna Radiata*) Hulls in a Rat Model” Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(5):969-974.

Mussatto SI ve Roberto IC (2003) “Xylitol Production from High Xylose Concentration: Evaluation of the Fermentation in Bioreactor Under Different Stirring Rates”, Journal of Applied Microbiology, 95(2):331-337.

Mussatto SI ve Roberto IC (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.

Mustapa Kamal SM, Mohamad NL, Abdullah AGL, Abdullah N (2011) “Detoxification of Sago Trunk Hydrolysate Using Activated Charcoal for Xylitol Production”, Procedia Food Science, 1:908-913.

Orman Genel Müdürlüğü (OGM), Kestane Eylem Planı 2013-2017, <http://www.ogm.gov.tr/Lists/Haberler/Attachments/457/KESTANE%20EYLEM%20PLANI.pdf>, 12 Kasım 2016.

Pal S, Choudhary V, Kumar A, Biswas D, Mondal AK, Sahoo DK (2013) “Studies on Xylitol Production by Metabolic Pathway Engineered *Debaryomyces hansenii*”, Bioresource Technology, 147: 449-455.

Pérez Bibbins B, Torrado Agrasar A, Pérez Rodríguez N, Aguilar Uscanga MG, Domínguez JM (2015) “Evaluation of the Liquid, Solid and Total Fractions of Beer, Cider and Wine Lees as Economic Nutrient for Xylitol Production”, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 90(6):1027-1039.

Ping Y, Ling HZ, Song G, Ge JP (2013) “Xylitol Production from Non-detoxified Corncob Hemicellulose Acid Hydrolysate by *Candida tropicalis*”, Biochemical Engineering Journal, 75:86-91.

Priji P, Unni KN, Sajith S, Benjamin S (2013) “*Candida tropicalis* BPU1, A Novel Isolate from the Rumen of the Malabari Goat, is a Dual Producer of Biosurfactant and Polyhydroxybutyrate”, Yeast, 30:103-110.

Qin L, Liu ZH, Li BZ, Dale BE, Yuan YJ (2012) Mass Balance and Transformation of Corn Stover by Pretreatment with Different Dilute Organic Acids”, Bioresource Technology, 112:319-326.

Rafiqul ISM ve Mimi Sakinah AM (2013) “Processes for the Production of Xylitol- A Review”, Food Reviews International, 29(2):127-156.

Rafiqul ISM, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW (2015a) “Enzymatic Production of Bioxylitol from Sawdust Hydrolysate: Screening of Process Parameters”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 176:1071-1083.

Rafiqul ISM, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW (2015b) “Inhibition by Toxic Compounds in the Hemicellulosic Hydrolysates on the Activity of Xylose Reductase from *Candida tropicalis*”, Biotechnology Letters, 37:191-196.

Rambo MKD, Bevilaqua DB, Brenner CGB, Martins AF, Mario DN, Alves SH, Mallmann CA (2013) “Xylitol from Rice Husks by Acid Hydrolysis and *Candida* Yeast Fermentation”, Quimica Nova, 36(5):634-639.

Ramesh S, Muthuvelayudham R, Rajesh Kannan R, Viruthagiri (2013) “Statistical Optimization of Process Variables for Corncob Hemicellulose Hydrolysate to Xylitol by *Debaryomyces hansenii* var *hansenii*”, International Journal of ChemTech Research, 5(1):186-196.

Rao LV, Goli JK, Gentela J, Koti S (2016) “Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Xylitol: An Overview”, Bioresource Technology, 213:299-310.

Rivas B, Torrado A, Rivas S, Moldes AB, Domínguez JM (2007) “Simultaneous Lactic Acid and Xylitol Production from Vine Trimming Wastes”, Journal of the Science of Food and Agriculture, 87(8):1603-1612.

Rocha MVP, Rodrigues THS, Albuquerque TLd, Gonçalves LRB, Macedo GRd (2014) “Evaluation of Dilute Acid Pretreatment on Cashew Apple Bagasse for Ethanol and Xylitol Production”, Chemical Engineering Journal, 243:234-243.

Saleh M, Cuevas M, García JF, Sánchez S (2014) “Valorization of Olive Stones for Xylitol and Ethanol Production from Dilute Acid Pretreatment via Enzymatic Hydrolysis and Fermentation by *Pachysolen tannophilus*”, Biochemical Engineering Journal, 90:286-293.

Salgado JM, Rodríguez N, Cortés S, Domínguez JM (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.

Samelis J ve Sofos JN (2003) Yeast in Meat and Meat Products, Yeasts in Food, Boekhaut T, Robert V (Ed), B.Behr's Verlag, GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany, 239-265.

Sampaio FC, Chaves Alves VM, Converti A, Passos FML, Coelho JLC (2008) "Influence of Cultivation Conditions on Xylose-to-Xylitol Bioconversion by a New Isolate of *Debaryomyces hansenii*", Bioresource Technology, 99(3): 502-508.

Sapçı B, Akpınar Ö, Bölükbaşı U, Yılmaz L (2016) "Evaluation of Cotton Stalk Hydrolysate for Xylitol Production" Preparative Biochemistry and Biotechnology, 46(5): 474-482.

Shuler ML ve Kargi F (2002) Bioprocess Engineering, Basic Concepts Prentice Hall, Inc., USA.

Silva DDV, Arruda PVd, Vicente FMCF, Sene L, Silva SSd, Felipe MGAd (2015) "Evaluation of Fermentative Potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in Cellulosic and Hemicellulosic Sugarcane Bagasse Hydrolysates on Xylitol and Ethanol Production", Annals of Microbiology, 65:687-694.

Silva JBA, Canilha L, Canettieri EV, Felipe MGA, Solenzal AIN (2003) "Use of Response Surface Methodology to Evaluate the Optimum Environmental Conditions for the Bioconversion of Xylose into Xylitol in Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78(9):945-948.

Silva CJSM ve Roberto IC (2001) "Optimization of Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 Using Response Surface Methodology", Process Biochemistry, 36(11):1119-1124.

Singleton, VL ve Rossi J.J (1965) "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents", American Journal of Enology and Viticulture, 16(1):44-58.

Srivani K ve Pydi Setty Y (2012) "Parametric Optimization of Xylitol Production from Xylose by Fermentation", Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 7:280-284.

Su B, Wu M, Zhang Z, Lin J, Yang L (2015) "Efficient Production of Xylitol from Hemicellulosic Hydrolysate Using Engineered *Escherichia coli*", Metabolic Engineering, 31:112-122.

Swain MR ve Krishnan C (2015) "Improved Conversion of Rice Straw to Ethanol and Xylitol by Combination of Moderate Temperature Ammonia Pretreatment and Sequential Fermentation Using *Candida tropicalis*", Industrial Crops and Products, 77:1039-1046.

Tiftik BE (2006) Çay Fabrikası Atığının Pirolizi ve Piroliz Ürünlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tornai Lehoczki J, Péter G, Dlačny D (2003) “CHROMagar *Candida* Medium as a Practical Tool for the Differentiation and Presumptive Identification of Yeast Species Isolated from Salads”, International Journal of Food Microbiology, 86(1-2):189-200.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Dış Ticaret İstatistikleri, <https://biruni.tuik.gov.tr/disticaretapp/disticaret.zul?param1=25¶m2=4&sitcrev=0&isicrev=0&sayac=5802>, 10 Şubat 2016.

Ur Rehman S, Mushtaq Z, Zahoor T, Jamil A, Murtaza MA (2015) “Xylitol; A Review on Bio-production, Application, Health Benefits and Related Safety Issues”, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55(11):1514-1528.

Villarreal MLM, Prata AMR, Felipe MGA, Almeida e Silva JB (2006) “Detoxification Procedures of Eucalyptus Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*”, Enzyme and Microbial Technology, 40(1):17-24.

Wang L, Fan X, Tang P, Yuan Q (2013a) “Xylitol Fermentation Using Hemicellulose Hydrolysate Prepared by Acid Pre-impregnated Steam Explosion of Corncob”, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88(11):2067-2074.

Wang W, Ling H, Zhao H (2015) “Steam Explosion Pretreatment of Corn Straw on Xylose Recovery and Xylitol Production Using Hydrolysate Without Detoxification”, Process Chemistry, 50(10):1623-1628.

Wang L, Wu D, Tang P, Yuan Q (2013b) “Effect of Organic Acids Found in Cottonseed Hull Hydrolysate on the Xylitol Fermentation by *Candida tropicalis*” Bioprocess and Biosystems Engineering, 36(8):1053-1061.

West TP (2009) “Xylitol production by *Candida* species grown on a grass hydrolysate”, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(5):913-916.

Winkelhausen E, Jovanovic Malinowska R, Velickova E, Kuzmanova S (2007) “Sensory and Microbiological Quality of a Baked Product Containing Xylitol as an Alternative Sweetener”, International Journal of Food Properties, 10(3):639-649.

Winkelhausen E ve Kuzmanova S (1998) “Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol”, Journal of Fermentation and Bioengineering, 86(1):1-14.

Zappalà 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 J, Geng A, Yao C, Lu Y, Li Q (2012a) “Effects of Lignin-derived Phenolic Compounds on Xylitol Production and Key Enzyme Activities by a Xylose Utilizing Yeast *Candida athensensis* SB18”, Bioresource Technology, 121:369-378.

Zhang J, Geng A, Yao C, Lu Y, Li Q (2012b) “Xylitol Production from D-Xylose and Horticultural Waste Hemicellulosic Hydrolysate by a New Isolate of *Candida athensensis* SB18”, Bioresource Technology, 105: 134-141.





EKLER

7. EKLER

EK A Açıklama

Tez çalışmasında, kültürlerin geliştirildiği ve saklandığı Yeast Extract Malt Extract (YM) agar besiyeri ve kullanılan üreme ortamı aşağıda yer almaktadır (Çizelge A.1, Çizelge A.2).

Çizelge A.1 Deneylerde kullanılan YM agarın bileşen ve derişimleri (Kurtzman ve ark., 2003)

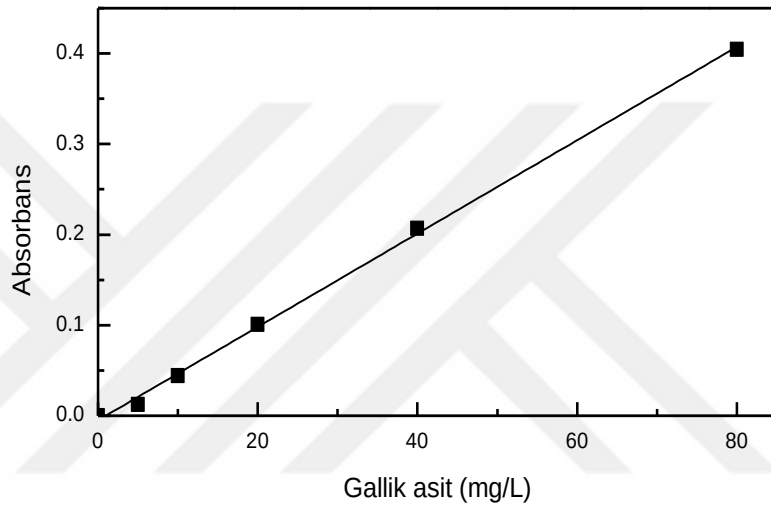
Bileşen	Derişim (g/L)
Glukoz	10.0
Maya özütü	3.0
Malt özütü	3.0
Pepton	5.0
Agar	15.0

Çizelge A.2 Deneylerde kullanılan üreme ortamının bileşen ve derişimleri (Azuma ve ark., 2000)

Bileşen	Derişim (g/L)
Ksiloz	50.0
Maya özütü	3.0
Pepton	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0

EK B Açıklama

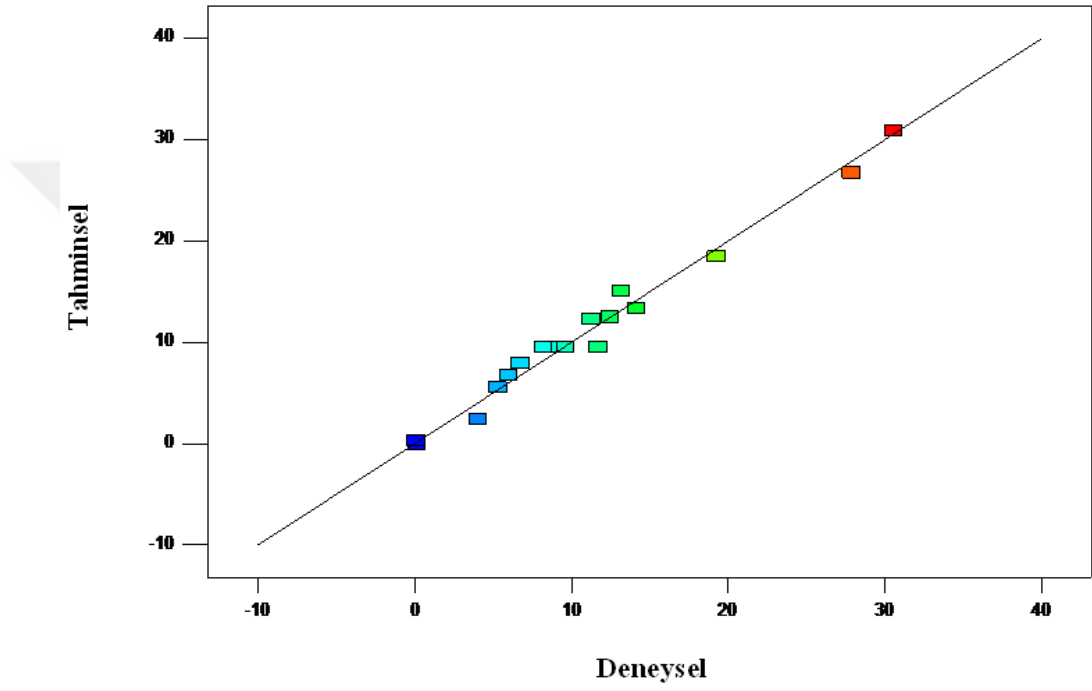
Çalışmada, kestane kabuğu hidrolizatı hazırlığı sırasında farklı aşamalarda alınan örneklerin toplam fenolik madde miktarının hesaplanması sırasında, Şekil B.1’de verilen çalışma doğrusundan yararlanılmıştır.



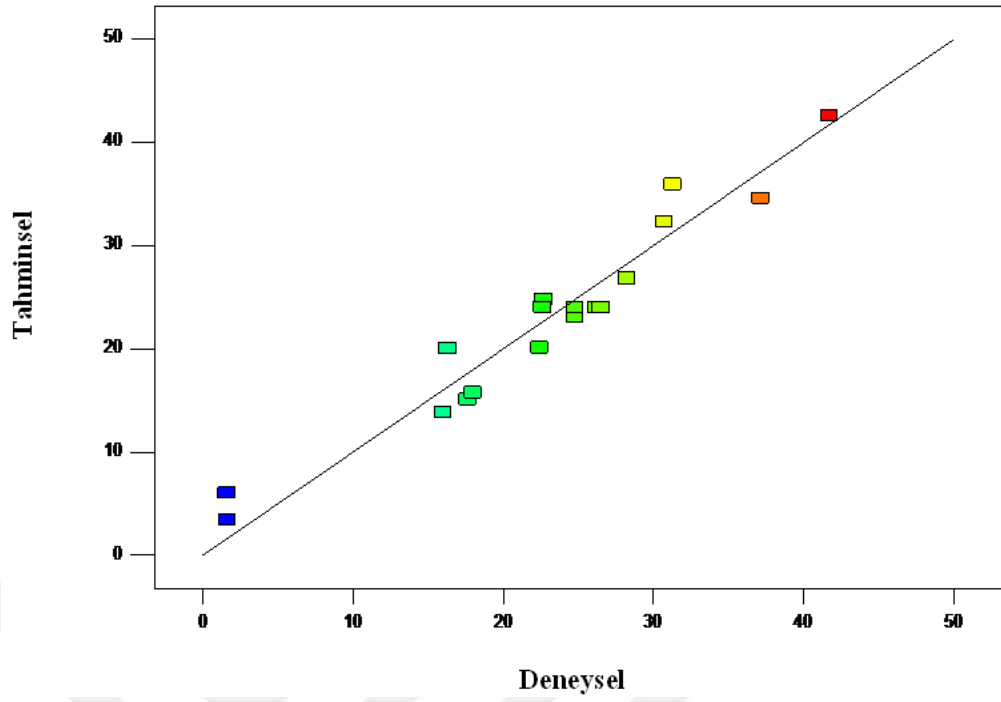
Şekil B.1 Gallik asit çalışma doğrusu ($y = 0.00515x - 0.00496$; $R^2 = 0.9984$)

EK C Açıklama

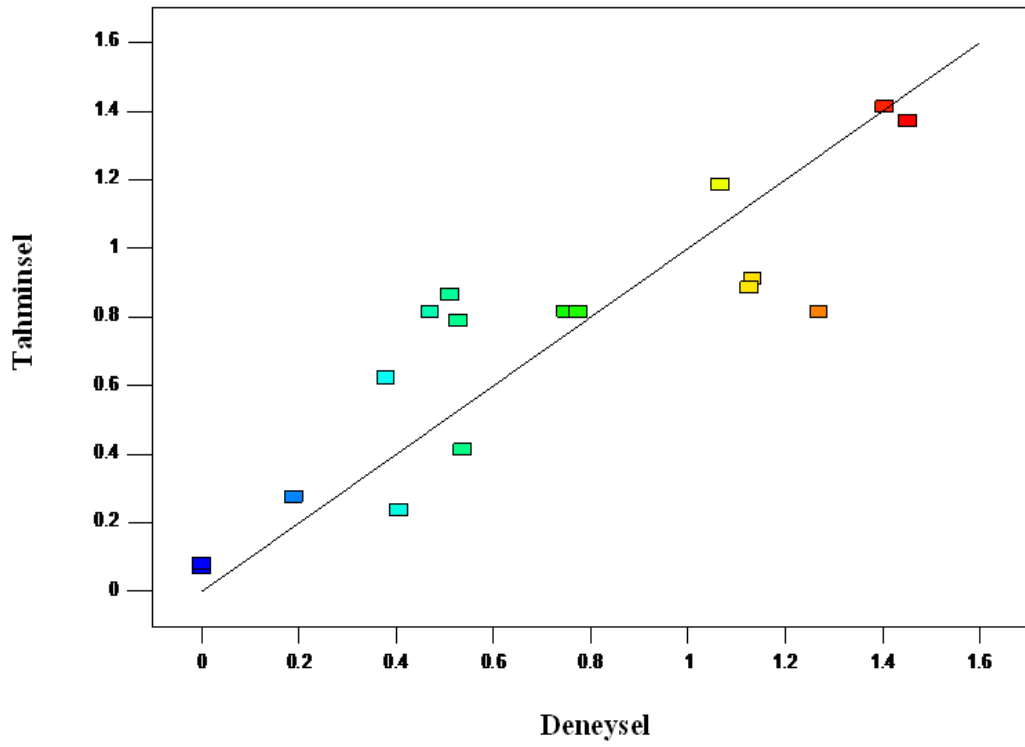
Her bir yanıt için deneysel değerlere karşı tahminsel değerleri gösteren grafikler
Şekil C.1 - C.5'te sunulmuştur.



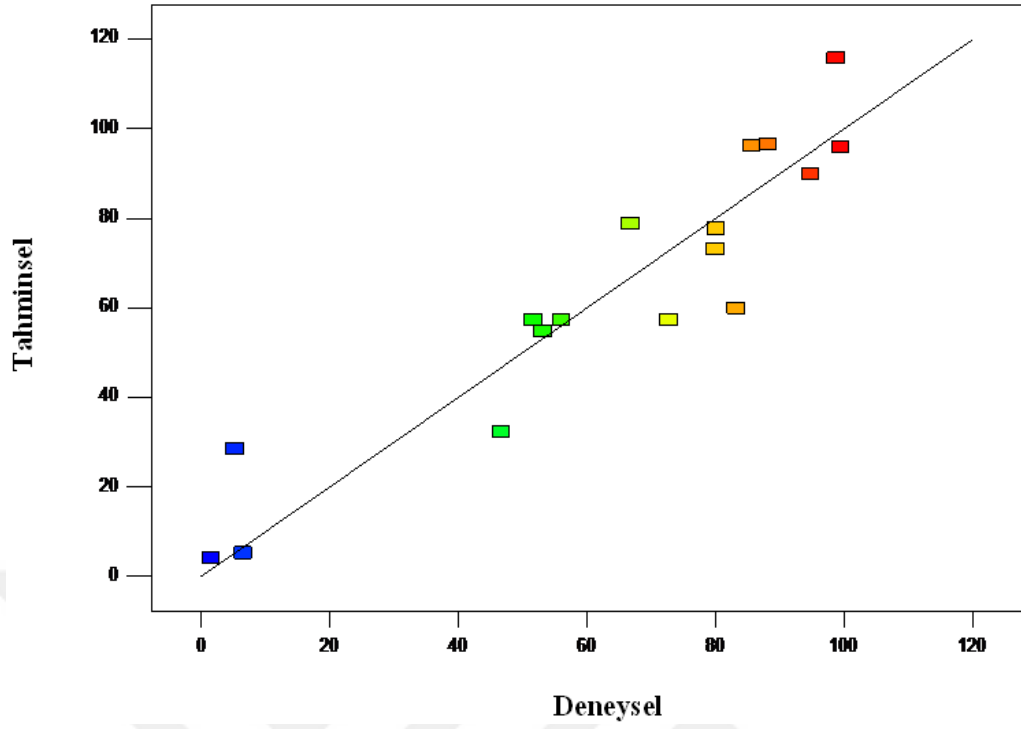
Şekil C.1 Maksimum ksilitol derişimi (Y_1) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler ($R^2 = 0.984$)



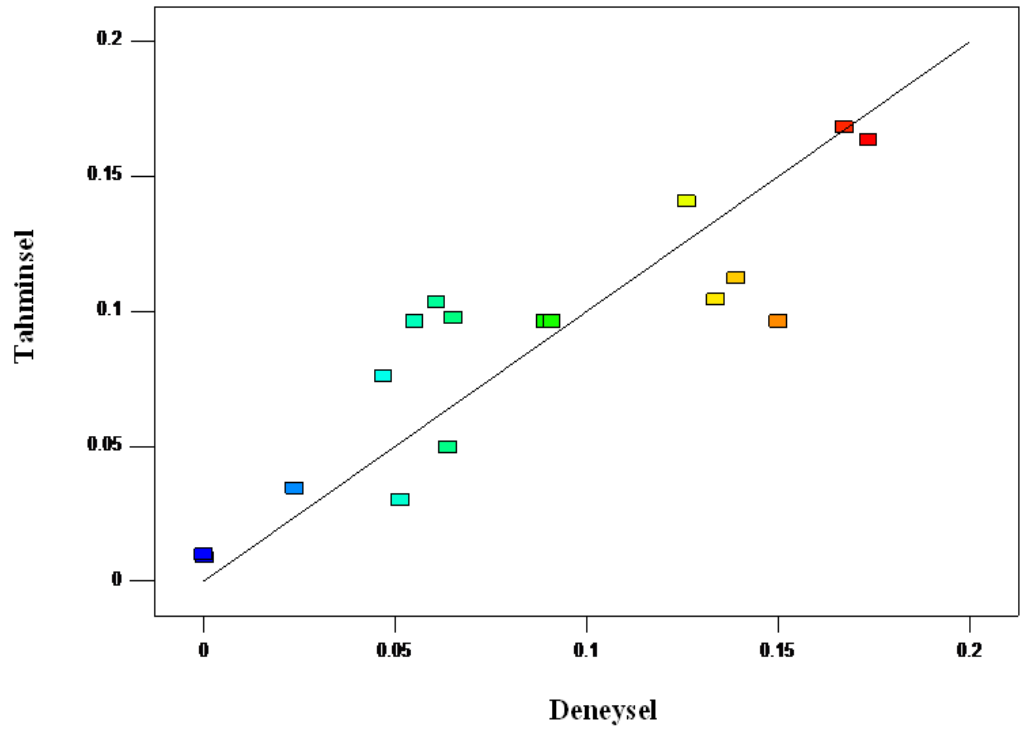
Şekil C.2 Ksilitol verimi (Y_2) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler ($R^2 = 0.938$)



Şekil C.3 Maksimum ksilitol üretim hızı (Y_3) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler ($R^2 = 0.865$)



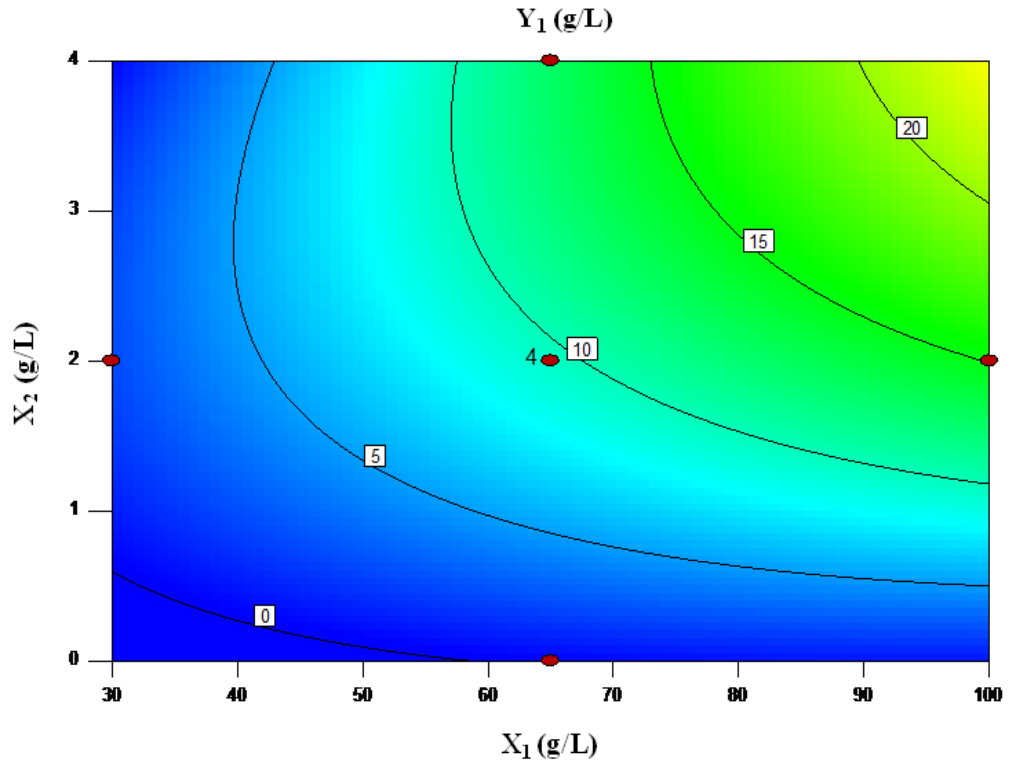
Şekil C.4 Substrat dönüşüm yüzdesi (Y_4) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler ($R^2 = 0.872$)



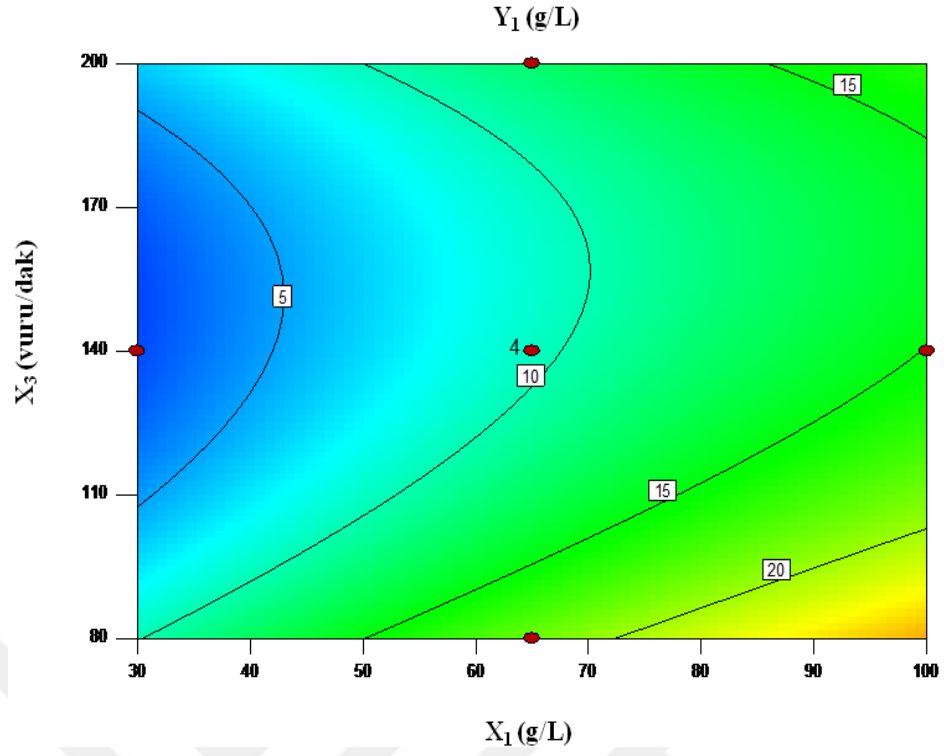
Şekil C.5 Maksimum ksilitol özgül oluşum hızı (Y_5) için deneysel değerlere karşı modele ait tahminsel değerler ($R^2 = 0.860$)

EK D Açıklama

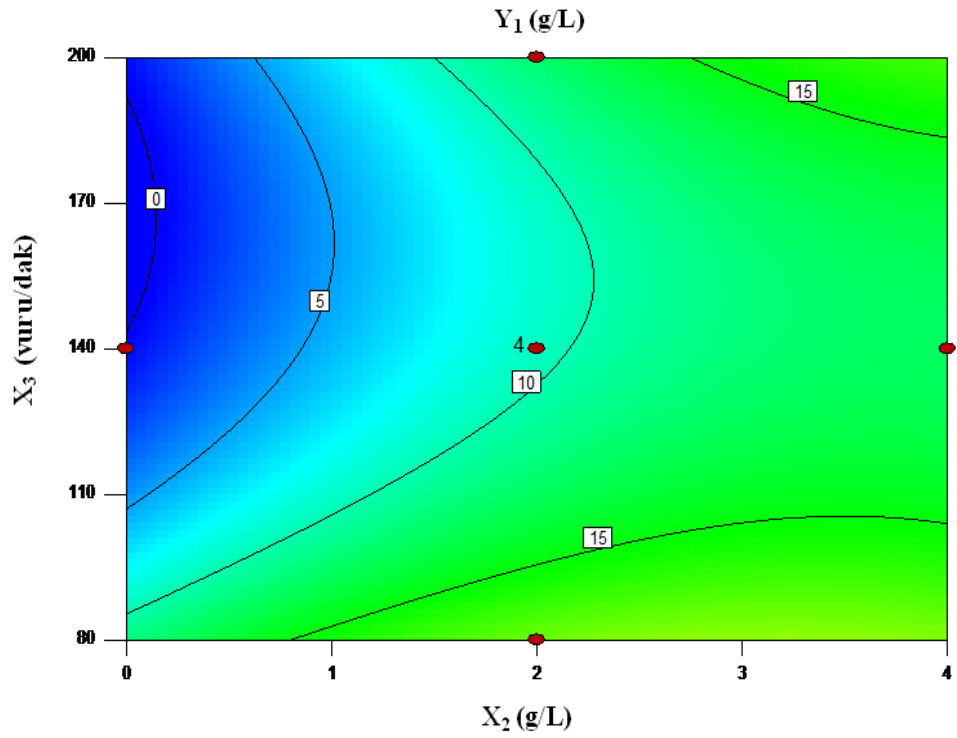
Yapılan deney tasarımında hesaplanan yanıtlara ait kontur grafikleri Şekil D.1 - D.15'te görülmektedir.



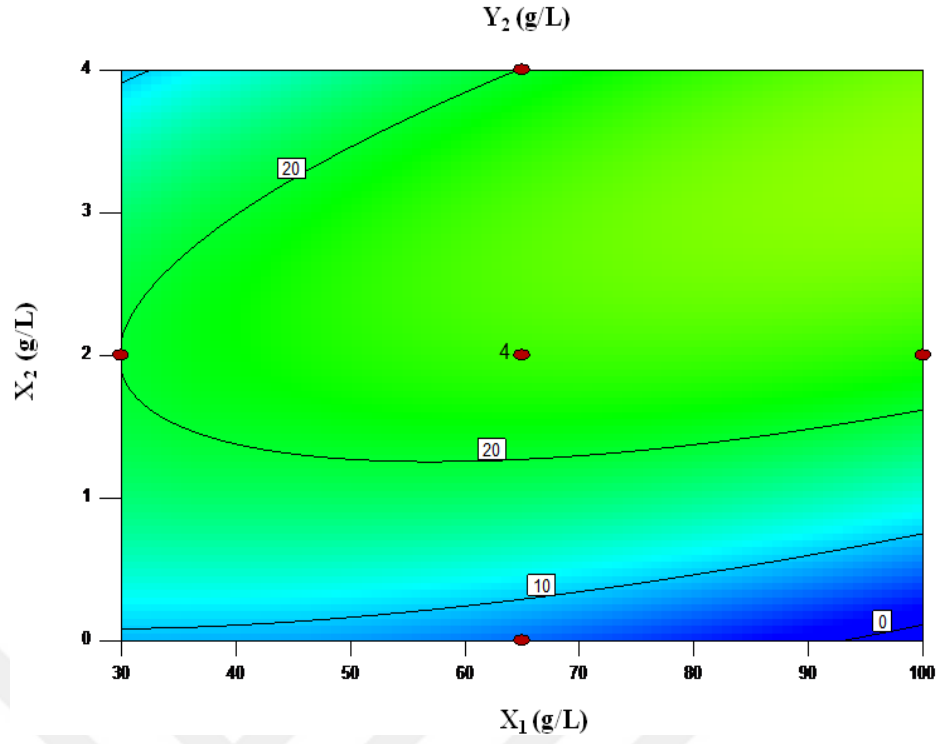
Şekil D.1 Maksimum ksilitol derişimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkisini gösteren kontur grafiğı



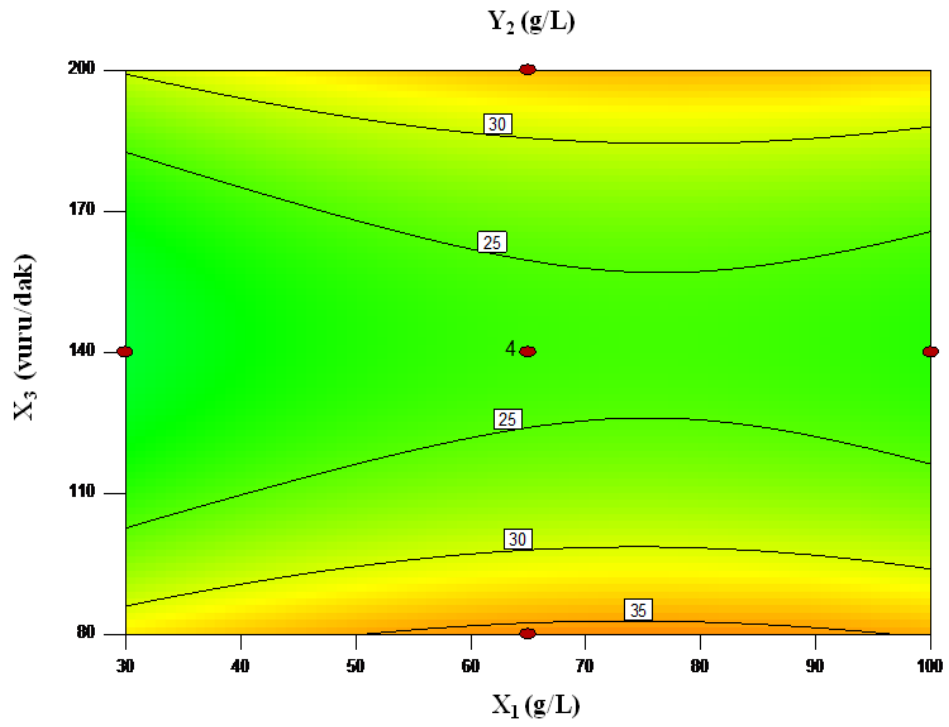
Şekil D.2 Maksimum ksilitol derişimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



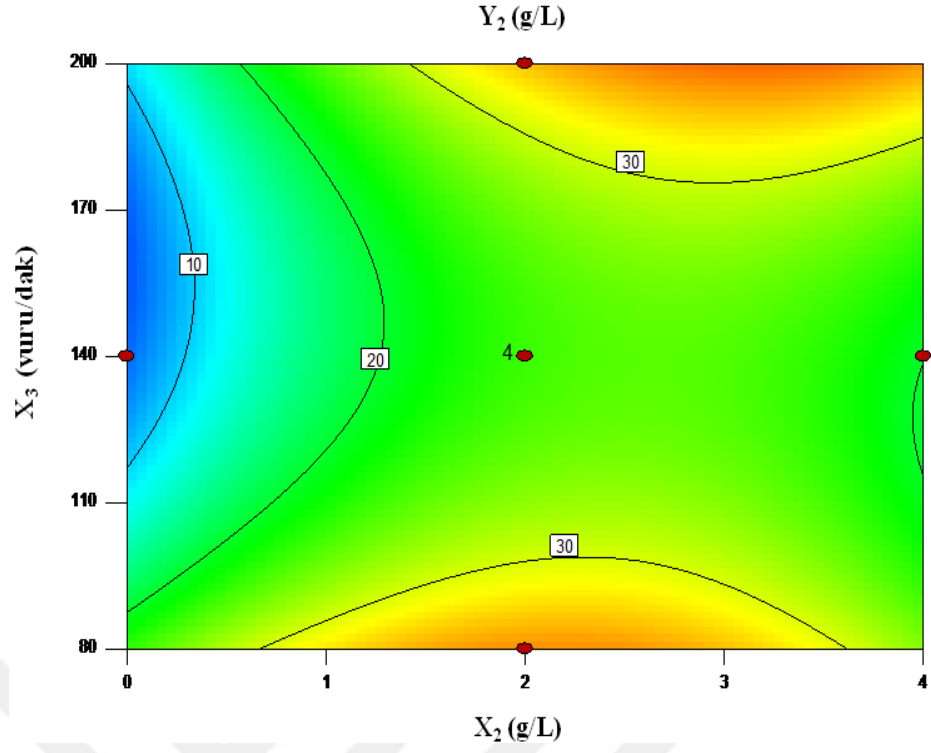
Şekil D.3 Maksimum ksilitol derişimi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



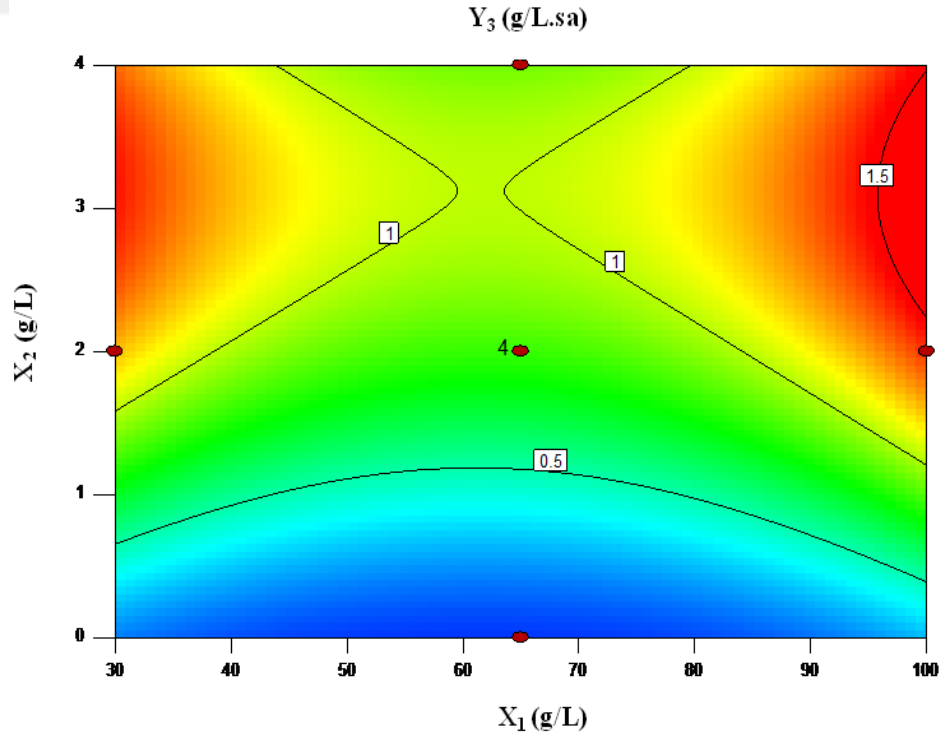
Şekil D.4 Ksilitol verimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkisini gösteren kontur grafiğı



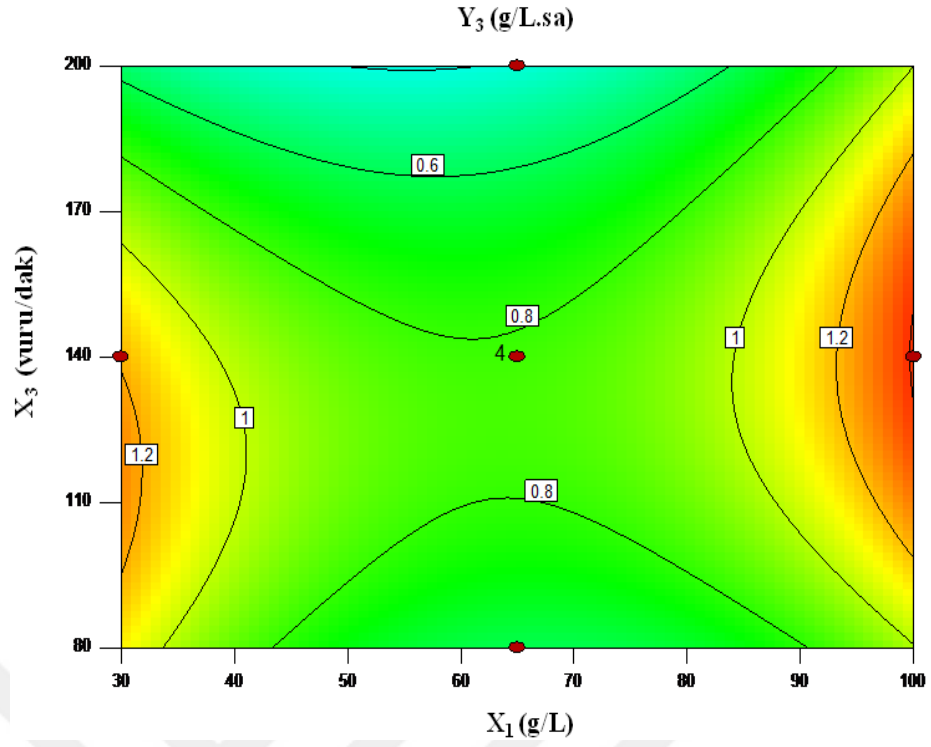
Şekil D.5 Ksilitol verimi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



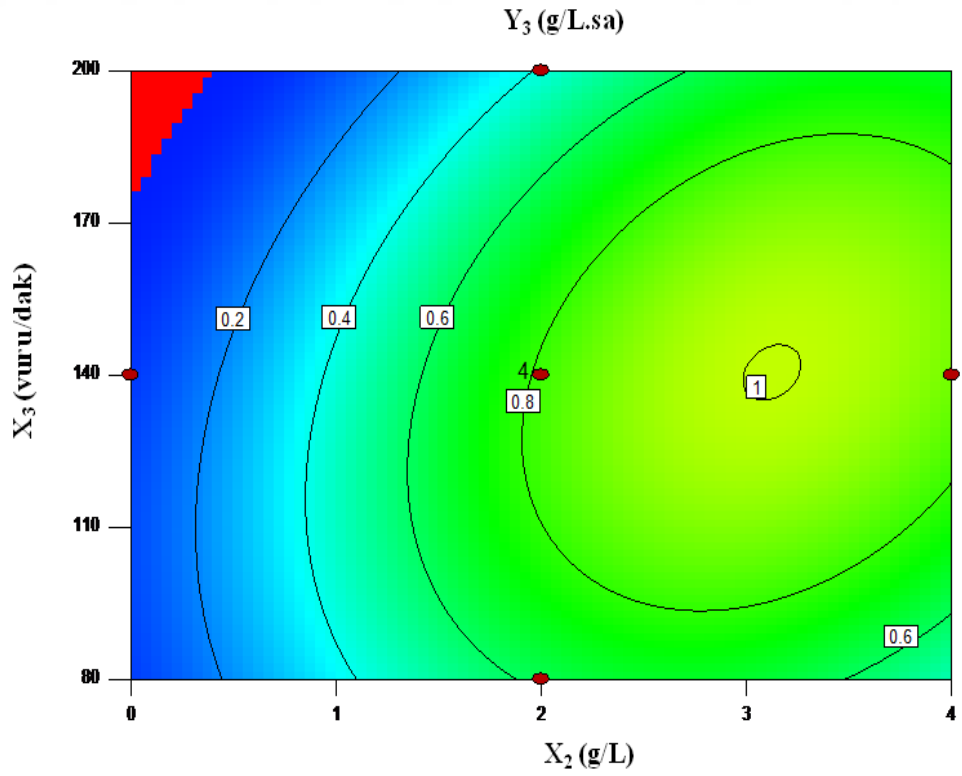
Şekil D.6 Ksilitol verimi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



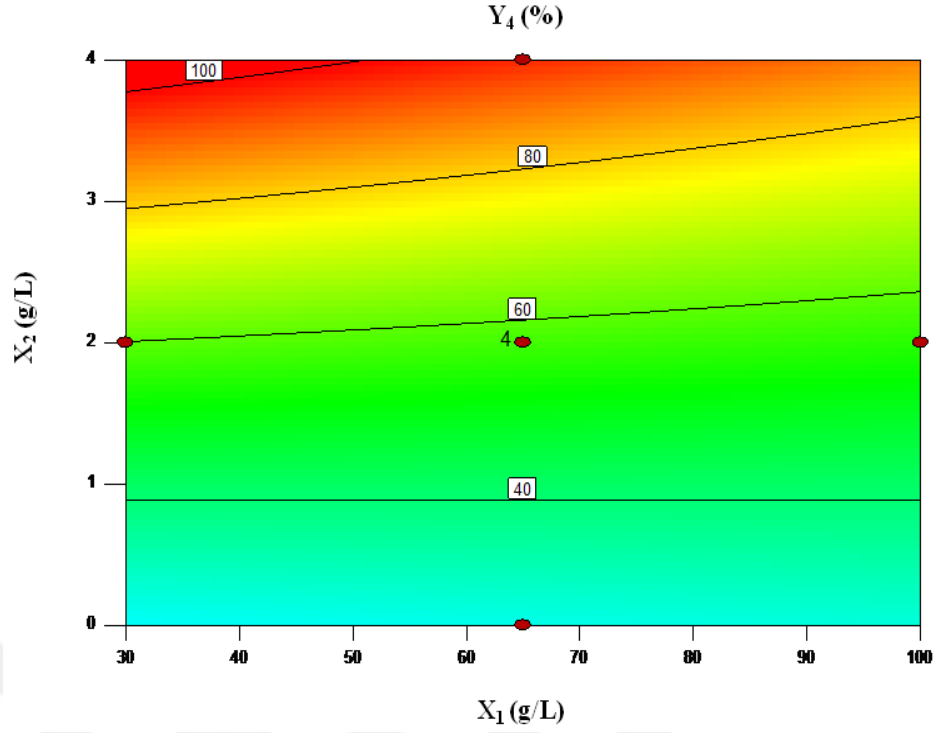
Şekil D.7 Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkisini gösteren kontur grafiğı



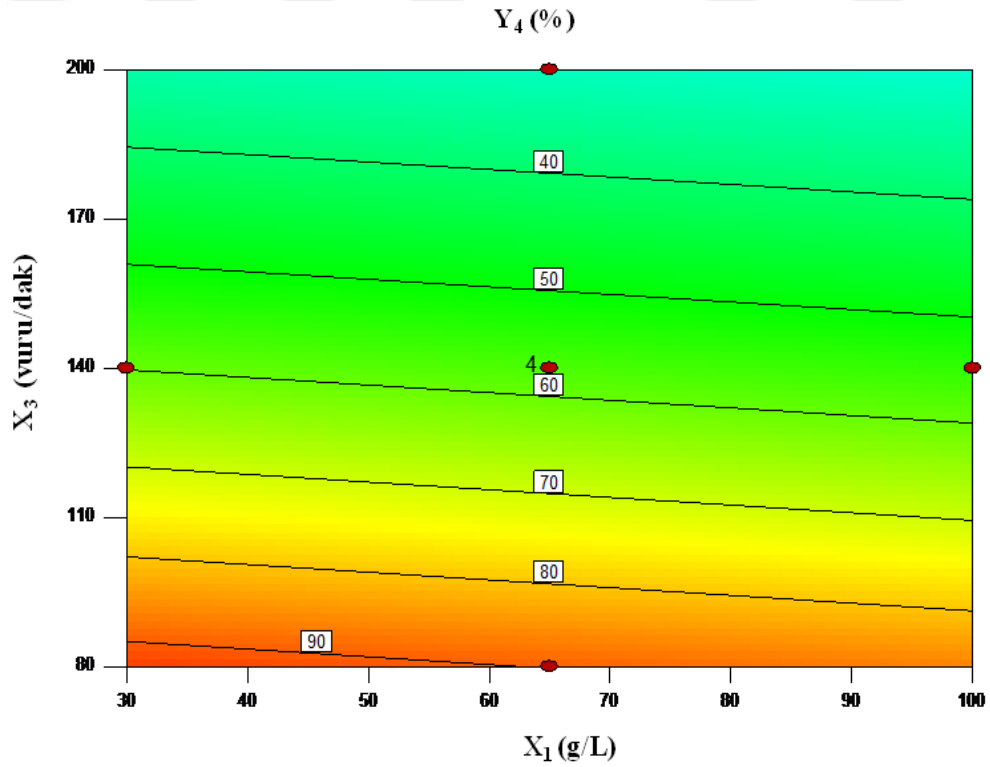
Şekil D.8 Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



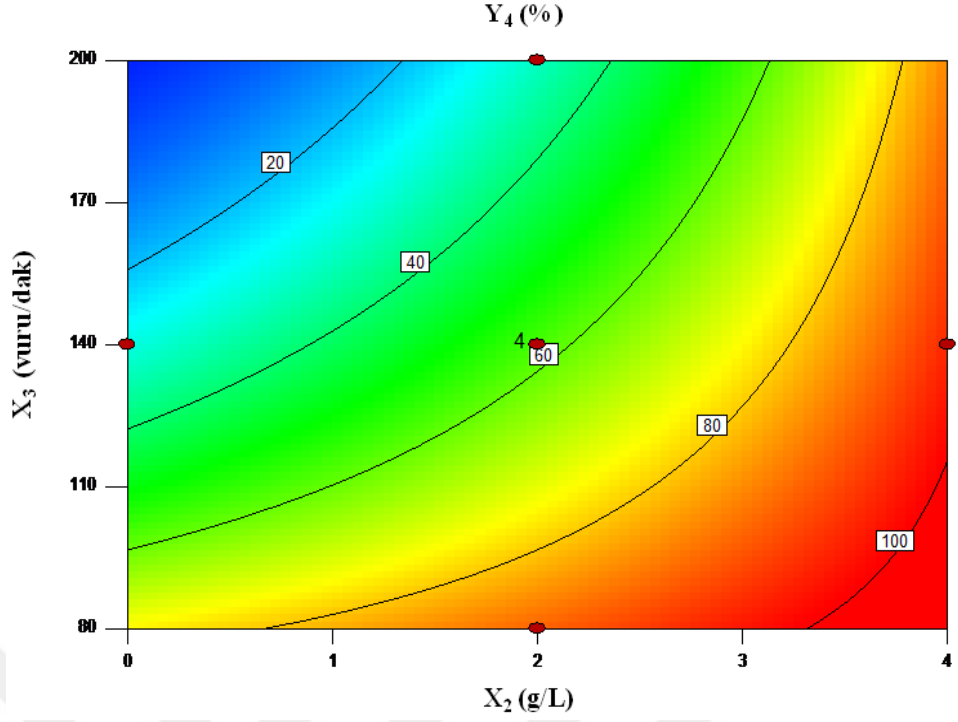
Şekil D.9 Maksimum ksilitol üretim hızı üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



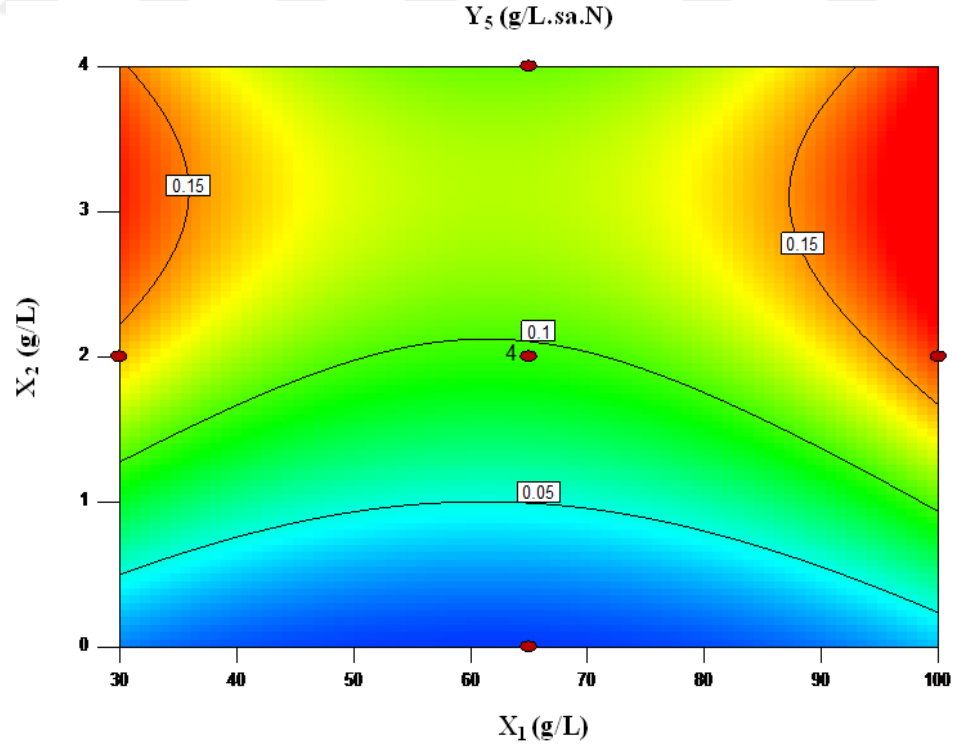
Şekil D.10 Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkisini gösteren kontur grafiğı



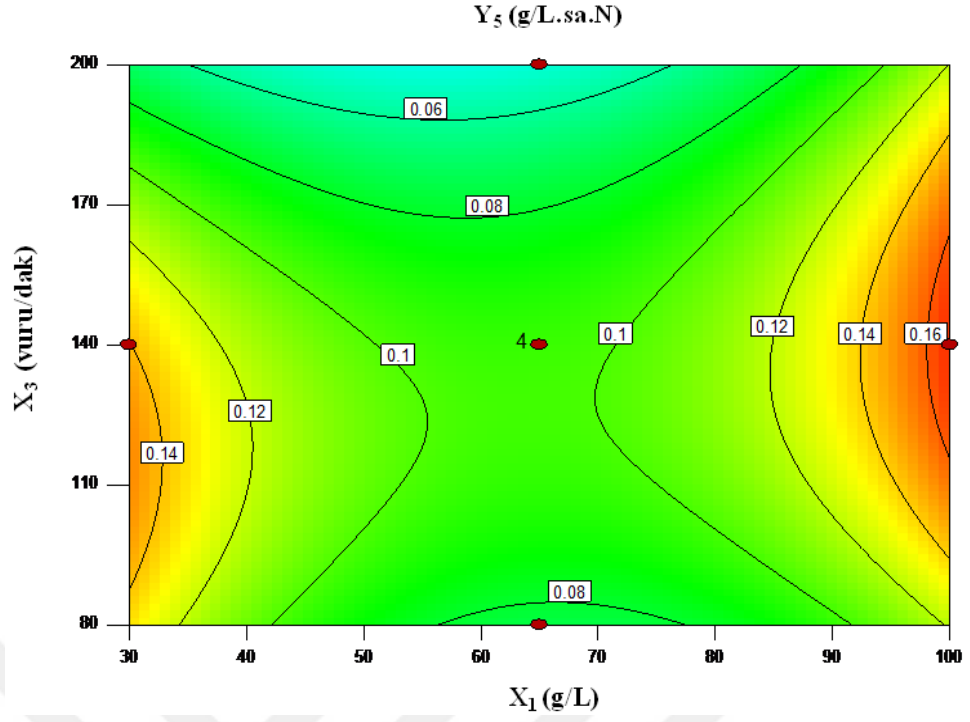
Şekil D.11 Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



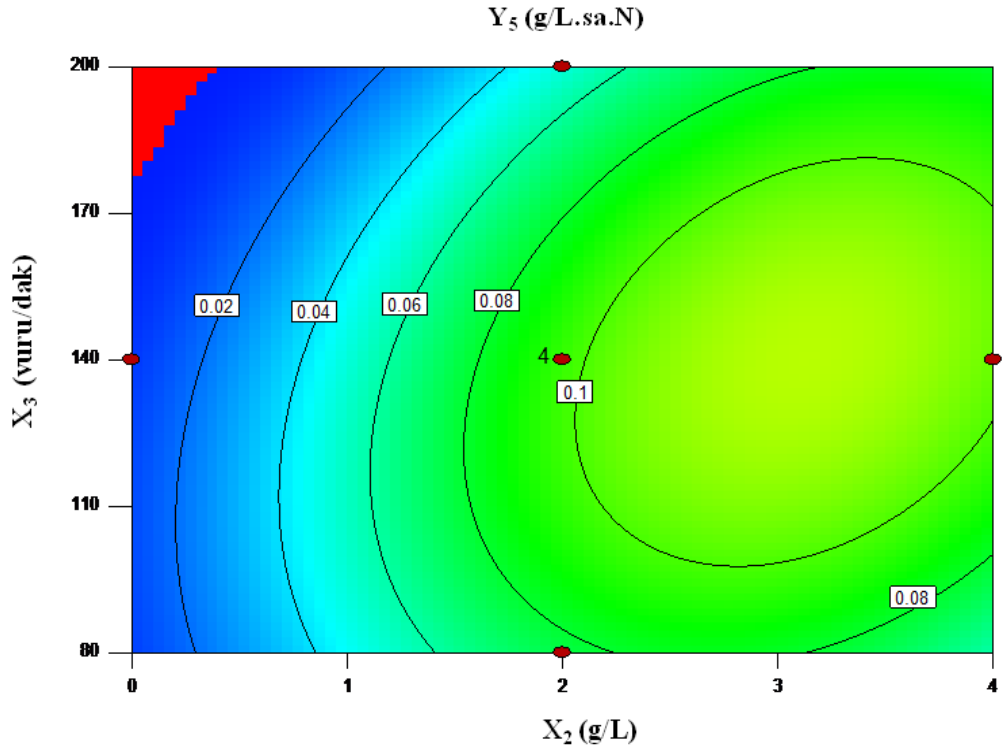
Şekil D.12 Substrat dönüşüm yüzdesi üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



Şekil D.13 Maksimum ksilitol özgül oluşum hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorür başlangıç derişiminin etkisini gösteren kontur grafiğı



Şekil D.14 Maksimum ksilitol özgül oluşum hızı üzerine ksiloz başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı



Şekil D.15 Maksimum ksilitol özgül oluşum hızı üzerine amonyum klorür başlangıç derişimi ve çalkalama hızının etkisini gösteren kontur grafiğı

EK E Açıklama

İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu ile yapılan optimizasyonda elde edilen çözümler Şekil E.1’de sunulmuştur.

Design-Expert 9.0.6

File Edit View Display Options Design Tools Help Tips

Notes for KUBRA-SON DIZ

Design (Actual)
Summary
Graph Columns
Evaluation
Analysis
R1:R1 (Analyzed)
R2:R2 (Analyzed)
R3:R3 (Analyzed)
R4:R4 (Analyzed)
R5:R5 (Analyzed)
R6:R6
Optimization
Numerical
Graphical
Post Analysis
Point Prediction
Confirmation
Coefficients Table

Solutions Tool
Report
Ramps
Bar Graph
Pop-Out View

Criteria Solutions Graphs

Solutions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:S	minimize	80	100	1	1	3
B:N	is in range	2	4	1	1	3
C:karistirma	minimize	80	100	1	1	3
R1	maximize	0.09	30.56	1	1	5
R4	maximize	1.64	99.47	1	1	5

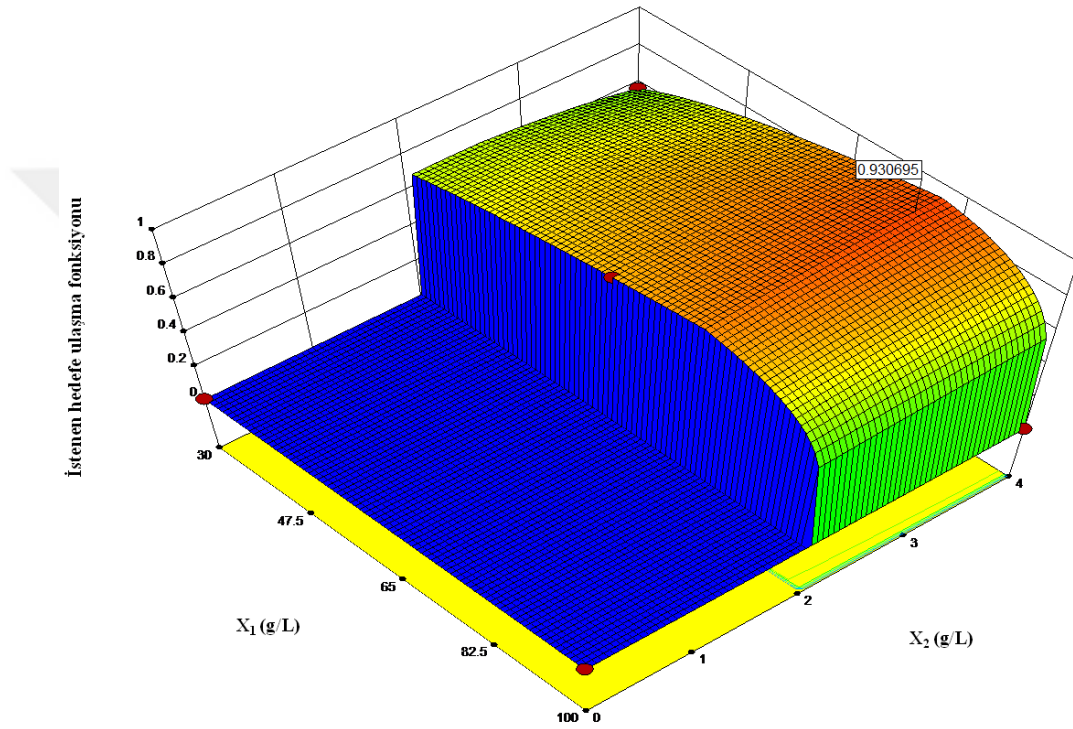
Solutions						
Number	S	N	karistirma	R1	R4	Desirability
1	80.000	3.862	80.000	24.311	100.433	0.931
2	80.000	3.822	80.000	24.310	100.167	0.931
3	80.000	3.761	80.000	24.303	99.758	0.931
4	80.000	3.985	80.000	24.299	101.254	0.931
5	80.000	3.946	80.023	24.301	100.994	0.930
6	80.000	3.553	80.000	24.236	98.377	0.927
7	80.000	3.490	80.000	24.202	97.964	0.925
8	81.455	3.963	80.000	24.795	100.710	0.923
9	80.000	3.369	80.000	24.119	97.165	0.922
10	80.000	3.255	80.000	24.021	96.422	0.918
11	80.000	3.210	80.000	23.976	96.126	0.917
12	80.000	3.151	80.000	23.912	95.743	0.915
13	80.000	3.053	80.000	23.794	95.100	0.911
14	80.000	3.018	80.003	23.747	94.874	0.910
15	83.895	4.000	80.000	25.616	100.281	0.909
16	82.520	3.199	80.000	24.678	95.552	0.900
17	80.000	2.586	80.000	23.024	92.094	0.893
18	80.000	2.253	80.000	22.263	89.977	0.877
19	80.001	2.101	80.000	21.859	89.023	0.869

19 Solutions found

Şekil E.1 Design Expert® 9.0.6 programında nümerik optimizasyonda elde edilen çözümlere ait görüntü

EK F Açıklama

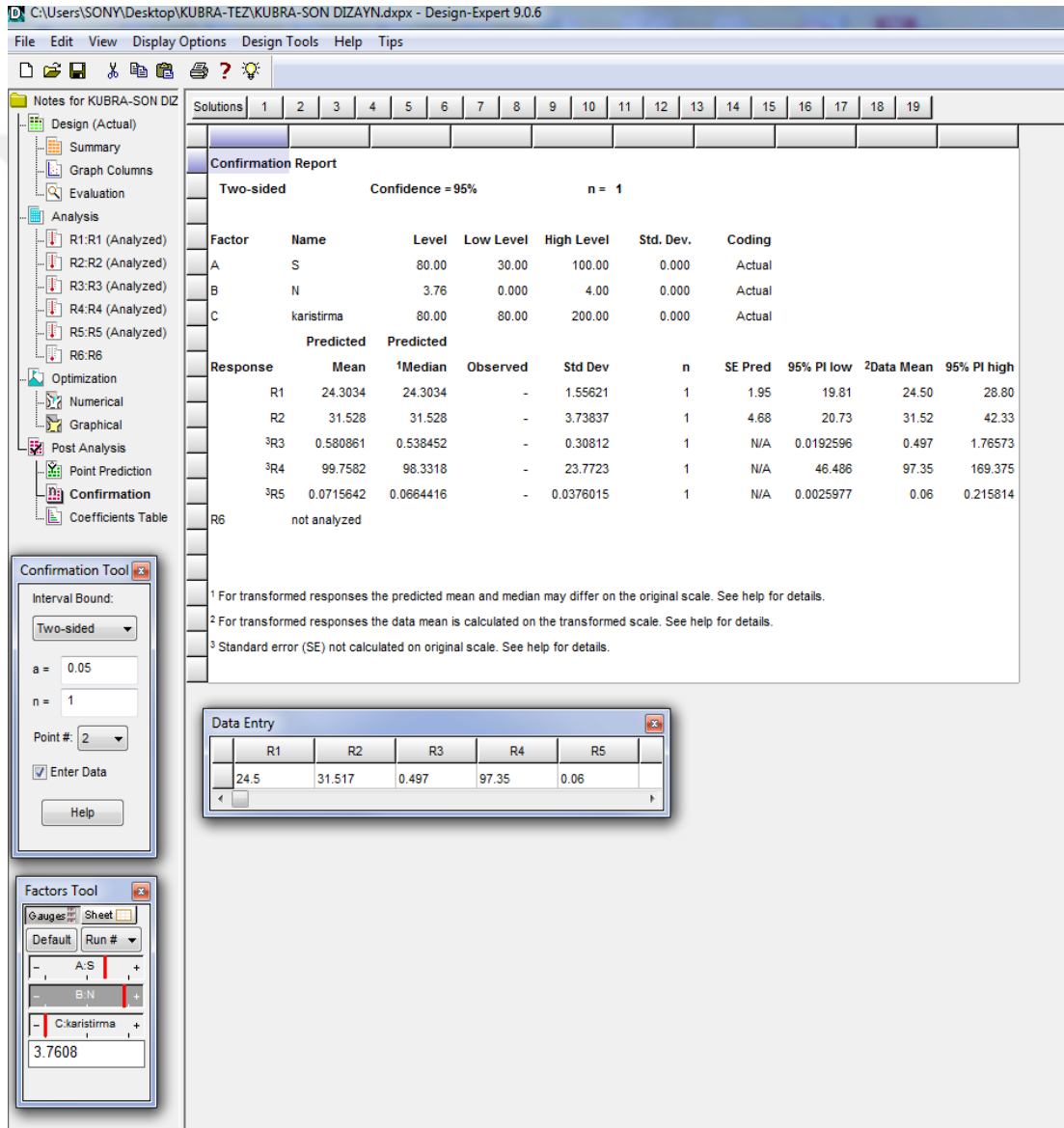
İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu ile yapılan optimizasyonda elde edilen grafik Şekil F.1’de görülmektedir.



Şekil F.1 İstenen hedefe ulaşma fonksiyonunun, ksiloz başlangıç derişimi ve amonyum klorürün başlangıç derişimi ile değışimi ($X_3 = 80$ vuru/dak)

EK G Açıklama

Design Expert® 9.0.6 programının doğrulama menüsü yardımı ile elde edilen, her yanıt için %95 güven aralığında kabul edilebilir aralıklar Şekil G.1’de gösterilmiştir.



Şekil G.1 Design Expert® 9.0.6 programının doğrulama menüsü yardımı ile elde edilen doğrulama sonuçlarına ait görüntü

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kübra ERYAŞAR

Doğum Yeri ve Tarihi : SİNOP - 31.07.1990

Lisans Üniversite : Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

Elektronik posta : kubaeryasar@ibu.edu.tr

İletişim Adresi : Abant İzzet Baysal Üniversitesi Mühendislik
Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği
Bölümü, Bolu

Yayın Listesi :

SCI Expanded Kapsamındaki Makaleler

- 1- Eryaşar K ve Karasu Yalçın S (2016) “Evaluation of Some Lignocellulosic Byproducts of Food Industry for Microbial Xylitol Production by *Candida tropicalis*”, 3 Biotech, 6:202.

Uluslararası Bildiriler

- 1- Eryaşar K ve Karasu Yalçın S (2015) “Utilization of Chestnut Shell Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida tropicalis*”, VI. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 28-30 October 2015, Barcelona, Spain, p 233.
- 2- Eryaşar K ve Karasu Yalçın S (2016) “Xylitol Production from Chestnut Shell Hydrolysate by *Candida tropicalis*: Modelling the Effects of Fermentation Parameters on Maximum Xylitol Production”, 17th European Congress on Biotechnology, 3-6 July 2016, Krakow, Poland, New Biotechnology, p 121.
- 3- Karasu Yalçın S, Eryaşar K, Güler B, Özdemir M, Bağgöl Ş (2016) “Pretreatment of Olivemill Wastewater for Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*”, 17th European Congress on Biotechnology, 3-6 July 2016, Krakow, Poland, New Biotechnology, p 116.

Ulusal Bildiriler

- 1- Eryaşar K ve Karasu Yalçın S (2016) “Hemiselüloz İçeren Gıda Endüstrisi Artıklarının Mikrobiyel Ksilitol Üretiminde Kullanımı”, 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016, Edirne, s 269.
- 2- Eryaşar K, Güler B, Özdemir, Bağgöl Ş, Karasu Yalçın S (2016) “Zeytin Karasuyunun Mikrobiyel Sitrik Asit Üretiminde Kullanılabilmesi Amacıyla Aktif Karbon ve Alkalileştirme Uygulamaları”, 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016, Edirne, s 267.

