

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ DOĞAL SUBSTRATLARIN YEREL BİR
Aureobasidium pullulans SUŞUNUN PULLULAN
ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

BÜŞRA AKDENİZ

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

**ÇEŞİTLİ DOĞAL SUBSTRATLARIN YEREL BİR
Aureobasidium pullulans SUŞUNUN PULLULAN
ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VARIOUS
NATURAL SUBSTRATES ON THE PULLULAN
PRODUCTION BY A DOMESTIC *Aureobasidium pullulans*
STRAIN**

BÜŞRA AKDENİZ

Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

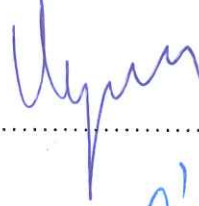
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2019

BÜŞRA AKDENİZ'in hazırladığı "Çeşitli Doğal Substratların Yerel Bir *Aureobasidium pullulans* Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ümran UYGUN
Başkan



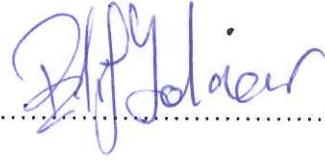
Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ
Danışman



Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Neslihan TAŞ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak/...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Değerli ailem ve Berkin 'ime



ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21/06/2019



BÜŞRA AKDENİZ

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

21./06/2019



BÜŞRA AKDENİZ

ÖZET

ÇEŞİTLİ DOĞAL SUBSTRATLARIN YEREL BİR *Aureobasidium pullulans* SUŞUNUN PULLULAN ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

BÜŞRA AKDENİZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

HAZİRAN 2019, 168 sayfa

Bu tez çalışmasında, çeşitli doğal substratların fermantasyon ortamları olarak kullanılmalarının, yerel bir suş olan; *A. pullulans* AZ-6'nın pullulan üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan doğal substratlar; çeşitli turuncgil kabukları (portakal, limon, greyfurt, turunç), üzüm posaları, fındık ve kestane kabuğundan hazırlanmış olan hidrolizatlar, şeker kamışından pekmez üretimi sırasında ortaya çıkan artık (ŞKPA), kuru ve taze fındık zürüfları ve balkabağı kabuğudur. Fermantasyon deneyleri, çeşitli ön işlemler uygulanarak hazırlanan ve başlangıç pH'ları 6.48'e ayarlanmış ortamlarda, kesikli sistemde, çalkalamalı su banyolarında, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 24.2°C'de, karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamlarından alınan örneklerde; biyokütle, ekzopolisakkarit (EPS), pullulan ve substrat derişimleri tayin edilmiştir. Deneyler sırasında, mikroorganizmanın özgül üreme hızı ve özgül ürün oluşum hızı değerleri de hesaplanmıştır. Doğal substrat kaynaklarından, pullulan üretimini en iyi destekleyen substratlardan; kuru fındık zürufu ile çalışılmasına karar verilmiştir. Kuru fındık zürufu ile hazırlanan fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek EPS ve pullulan derişimleri, sırasıyla; 30.36 ve 30.02 g/L'dir. Bu ortamda en yüksek biyokütle derişimi ise; 3.54 g/L olarak belirlenmiştir. Mikroorganizmanın üssel üreme bölgesinde hesaplanan özgül üreme hızı; 0.016 sa⁻¹, belirlenen maksimum özgül ürün oluşum hızı değeri ise; 1.56 g

pullulan/(g mo.sa)'dir. Kuru fındık zürufu ile hazırlanan fermantasyon ortamında, başlangıç derişimleri sırasıyla; 2.71 ve 8.46 g/L olarak belirlenen ksiloz ve glukoz, fermantasyonun sonunda, çalışılan suş tarafından tamamen tüketilmişlerdir.

Bu araştırmanın ikinci aşamasında ise, kuru fındık zürufundan hazırlanan fermantasyon ortamının, optimizasyonu amacıyla; yanıt yüzey yöntemi kullanılarak bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan program yardımıyla, merkezi karma tasarım yönteminden yararlanılarak, merkez noktada 6 tekrarlı, 20 deneyden oluşan bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Deney tasarımındaki optimizasyon için seçilen bağımsız değişkenler; amonyum sülfat derişimi, derişik sülfürik asit hacmi ve öğütölmüş fındık zürufu miktarı, bağımlı değişkenler ise; maksimum pullulan derişimi, maksimum EPS derişimi ve mikroorganizma özgül üreme hızıdır. Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri, program yardımıyla türetilen model eşitlikler yardımıyla, çoklu regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Oluşturulan modellerin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Optimizasyon deneyleri sonucunda çalışılan fermantasyon ortamı için optimum olarak belirlenen amonyum sülfat derişimi, derişik sülfürik asit hacmi ve öğütölmüş fındık zürufu miktarı sırasıyla; 7.2 g /L, 2.5 mL ve 20 g olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen en yüksek pullulan ve EPS derişimleri ise sırasıyla; 74.39 ve 75.95 g/L olup, optimum koşullarda, *A. pullulans* AZ-6'nın özgül üreme hızı; 0.097 sa⁻¹olarak hesaplanmıştır. Optimum deney koşullarında istenen hedefe ulaşma fonksiyonunun değeri ise; 0.915 olarak bulunmuştur. Bu tez çalışmasında son olarak, üretilen bazı EPS örneklerinin, FT-IR spektrometresi kullanılarak, moleküler yapı analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen spektrumda görölen, pullulan için önemli bazı fonksiyonel gruplara ait piklerin, saf pullulan ile elde edilenlerinkine oldukça benzer oldukları da saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Pullulan, ekzopolisakkarit, *Aureobasidium pullulans*, fermantasyon, doğal substrat, optimizasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VARIOUS NATURAL SUBSTRATES ON THE PULLULAN PRODUCTION BY A DOMESTIC *Aureobasidium pullulans* STRAIN

BÜŞRA AKDENİZ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

June 2019, 168 pages

In this thesis, effects of the usage of various natural substrates as fermentation media on production of pullulan by domestic *A. pullulans* AZ-6 strain were investigated. For this purpose various citrus peels (orange, lemon, grapefruit, bitter orange), grape pomaces, the hydrolysates of hazelnut and chestnut shells, sugarcane molasses residue, dried and fresh hazelnut husks and pumpkin peel were used. The batch fermentations were performed in a dark place at shaking water bath having temperature of 24.2°C and 100 rpm constant agitation speed. The fermentation media prepared from natural substrates were preprocessed and pH of the media were adjusted to 6.48. At specific time intervals, cultures were taken from the fermentation media and the concentrations of biomass, exopolysaccharide (EPS), pullulan and substrates were determined. During the experiments, the values of the specific growth rate of microorganism and maximum specific product formation rate were calculated. Among the natural substrates, the dried hazelnut husk promoting the best pullulan production were chosen. In the fermentation medium prepared from dried hazelnut husk, the maximum EPS and pullulan concentrations were found as 30.36 and 30.02 g/L, respectively. In this medium, the maximum biomass concentration was 3.54 g/L. Furthermore, in logarithmic phase of the growth curve, the specific growth rate of microorganism was calculated as 0.016 h⁻¹, and the maximum specific product formation rate was found as 1.56 g pullulan/(g mo.h).

In the hazelnut husk medium, the initial concentrations of the xylose and glucose were 2.71 ve 8.46 g/L. These substrates in the medium were totally consumed by *A. pullulans* AZ-6 at the end of the fermentation.

At the second part of this research, a study was performed by response surface methodology for the optimization of the fermentation medium prepared from dried hazelnut husk. By the help of central composite design method in optimization software, an experimental design consisting of 20 experiments with 6 runs at the center point, was created. In the experimental design, while the independent variables were $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, the volume of concentrated H_2SO_4 and the amount of ground hazelnut husk; the dependent variables were maximum pullulan concentration, maximum EPS concentration and specific growth rate of microorganism. The effects of independent variables on the dependent ones were evaluated by multi-response regression analysis by using the model equations derived from software. The convenience of the models was analysed by variance analysis (ANOVA). As a result of the optimization experiment, the optimal conditions for $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, the volume of H_2SO_4 and the amount of ground hazelnut husk were determined as 7.2 g /L, 2.5 mL and 20 g, respectively. In optimal conditions, the maximum pullulan concentration, maximum EPS concentration and specific growth rate of *A. pullulans* AZ-6 were found as in order of 74.39 g/L, 75.95 g/L and 0.097 h^{-1} . In addition, the desirability function was 0.915. Lastly, molecular structure of produced EPS samples were analysed by FT-IR spectrometer. At the spectrum obtained for the EPS samples, the representative peaks for the functional groups of pullulan molecule were similar with those of pure pullulan sample.

Keywords: Pullulan, exopolysaccharides, *Aureobasidium pullulans*, fermentation, natural substrate, optimization

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarına yön veren ve bana desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ'a,

Tez süresince ilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Tijen BOZDEMİR'e,

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarını tedarik ettiğimiz Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (AİBÜ), Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Doç. Dr. Seda KARASU YALÇIN'a ve Gıda Y. Müh. Kübra ERYAŞAR'a

Doğal substrat kaynaklarından turuncgil kabukları ve şeker kamışı pekmezi artığını temin ettiğimiz, Afra Tarım Ürünleri Şirketi ve Ahmet KUTLU'ya,

Fındık zürüflarını temin eden Düzce Üniversitesi'nde görevli Gıda Y. Mühendisi A. Elvan Bellici'ye

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde elek analizinin gerçekleştirilmesinde bize kapılarını açan Prof. Dr. Zümriye AKSU ve analiz sırasında yardımcı olan Dr. Çiğdem KİP'e,

Deneyler sırasında laboratuvar imkanlarını kullanmamıza müsaade eden Dr. Öğr. Üyesi Ceyda DUDAK ŞEKER'e,

Tez süresince bana hep destek olan sevgili oda arkadaşım Araş. Gör. Seda YILDIRIM ELİKOĞLU'na, büyük emeklerinden ve sabrından dolayı sevgili Uzman Meltem YILDIRIM'a, desteği ile hep yanımda olup bana moral veren değerli arkadaşım Araş. Gör. Kamil URGUN'a, araştırma görevlisi arkadaşlarım Özlem ŞAHİN ve Dilay KÜTÜK AYHAN'a,

Emeklerinden ve sabırlarından ötürü sevgili laboratuvar arkadaşlarım Gamze Nur MÜJDECİ, Buket SOLAK ve Fazilet MIDİK'a

Doğduğum ilk günden beri beni cesaretlendiren, bana koşulsuz sevgi gösteren ve desteğini hiç eksik etmeyen sevgili annem Meliha AKDENİZ, babam Kutlay AKDENİZ, ve canımdan öte kardeşim Beren AKDENİZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca gece gündüz her anımda yanımda olan, umutsuz olduğum anlarda bana hep cesaret ve güç veren sevgili hayat arkadaşım Berkin OKTAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Büşra AKDENİZ

Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xx
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Kesikli fermantasyon sistemlerinde kullanılan kinetik eşitlikler	17
2.1.1. Özgül Üreme Hızı	17
2.1.2. Özgül ürün oluşum hızı	18
2.1.3. Substrat Tüketim Hızı	18
2.2. Yanıt Yüzey Yöntemi	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Mikroorganizma.....	26
3.1.2. Besiyeri.....	26
3.1.3. Fermantasyon ortamında kullanılan doğal substratlar	26
3.1.4. Deney düzeneği.....	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Doğal substrat kaynaklarından fermantasyon ortamlarının hazırlanmaları..	32
3.2.1.1. Turunçgil kabukları	32
3.2.1.2. Üzüm posası.....	34
3.2.1.3. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları.....	34
3.2.1.4. Şeker kamışı pekmezi artığı.....	35
3.2.1.5. Kuru ve taze fındık zürüfları.....	35
3.2.1.6. Balkabağı kabuğu	37
3.2.2. <i>A. pullulans</i> AZ-6 kültürünün başlangıç inokülasyon derişiminin belirlenmesi	38
3.2.3. Biyokütle derişiminin tayini	38
3.2.4. Ekzopolisakkarit derişiminin tayini	39

3.2.5. Pullulan derişiminin tayini	40
3.2.6. Toplam şeker derişiminin tayini	41
3.2.7. İndirgen şeker derişiminin tayini	41
3.2.8. Glukoz derişimi tayini.....	41
3.2.9. Glukoz/Fruktoz derişimlerinin tayinleri.....	41
3.2.10. Ksiloz derişiminin tayini	42
3.2.11. pH ölçümü	42
3.2.12. EPS örneklerine uygulanan moleküler yapı analizi	42
3.2.13. Farklı doğal substratlardan hazırlanan fermantasyon ortamlarının, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi.....	43
3.2.14. Kuru fındık zürufu kullanılan fermantasyon ortamında, fermantasyon ortamını etkileyen koşulların Yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile incelenmesi ve deney tasarımı oluşturulması.....	44
3.2.15. Bağımlı değişkenlerin (yanıtların) hesaplanmaları.....	45
3.2.16. Bağımlı değişkenlerin (yanıtların) yanıt yüzey yöntemi ile modellenmeleri	46
3.2.17. Optimizasyon.....	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan çeşitli doğal substrat kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması	48
4.1.1. Çeşitli turuncgil kabukları ile yapılan çalışmalar	48
4.1.2. Üzüm posası özütleri ile yapılan çalışmalar	59
4.1.3. Kestane ve fındık kabuğu özütleri ile yapılan çalışmalar	67
4.1.4. Şeker kamışı pekmezi artığı ile yapılan çalışmalar	74
4.1.5. Kuru / taze fındık zürufları ve balkabağı kabukları ile yapılan çalışmalar ..	78
4.2. Pullulan üretimi amacıyla en uygun fermantasyon ortamının seçimi için sonuçların değerlendirilmeleri	85
4.3. <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kuru fındık zürufu hidrolizatının kullanıldığı fermantasyon ortamının optimizasyonu için deney tasarım planının oluşturulması.....	87
4.4. Merkezi karma tasarım yöntemi ile planlanan deneylerin gerçekleştirilmesi.....	90
4.5. Araştırmada seçilen bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmeleri.....	113
4.6. <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kuru fındık zürufu hidrolizatının kullanıldığı fermantasyon ortamının optimizasyonu.....	134
4.7. EPS örneklerine uygulanan moleküler yapı analizinin sonuçları.....	143

5. SONUÇLAR	145
KAYNAKLAR	148
EK 1- FERMANTASYON ORTAMI OLARAK KULLANILAN KESTANE VE FINDIK KABUĞU HİDROLİZATLARININ HAZIRLANMASI	157
EK 2- ÖĞÜTÜLMÜŞ KURU FINDIK ZÜRUFU ÖRNEĞİNİN TANE BOYUTU DAĞILIM GRAFİĞİ.....	158
EK 3- FOSFAT SİTRİK ASİT TAMPONU (pH 5.0) HAZIRLAMA	158
EK 4- GLUKOZ VE SAKKAROZ STANDART ÇALIŞMA DOĞRULARI VE DENKLEMLERİ.....	159
EK 5- FENOL SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİNİN UYGULANIŞI.....	160
EK 6- DNS YÖNTEMİNİN UYGULANIŞI.....	160
EK 7- DİNİTROSALİSİLİK ASİT (DNS) ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI	161
EK 8. İSTENEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU KULLANILARAK YAPILAN OPTİMİZASYONDA, BAĞIMLI DEĞİŞKENLER İÇİN BELİRLENEN HEDEFLER VE SONUCUNDA ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER.....	161
EK 9-OPTİMİZASYON DENEYLERİNDEN ELDE EDİLEN EPS ÖRNEKLERİ VE SAF PULLULAN ÖRNEĞİNE AİT FT-IR SPEKTRUMLARI.....	164
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	166
ÖZGEÇMİŞ	167

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Merkezi karma yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin seviyeleri.....	45
Çizelge 3.2. Bağımlı değişkenler (yanıtlar) ve simgeleri.....	46
Çizelge 3.3.Optimizasyon aşamasında kullanılan yanıt değişkenleri ve bu yanıt değişkenleri için belirlenen hedefler.....	47
Çizelge 4.1.Fermantasyon ortamı olarak kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatlarının kullanıldığı deneylerde, ortamda bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	84
Çizelge 4.2.Fermantasyon ortamı olarak balkabağı kabuğu hidrolizatının kullanıldığı deneyde, ortamda bulunan şeker derişimlerinin zamanla değişimler.....	85
Çizelge 4.3.Çeşitli doğal substratlardan hazırlanan fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek biyokütle, EPS, pullulan derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme hızları ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri.....	88
Çizelge 4.4. Deney tasarımıında seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri.....	89
Çizelge 4.5. Deney tasarımıında seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri.....	90
Çizelge 4.6. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarında bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	95
Çizelge 4.7. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarında bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	100
Çizelge 4.8. “11-14” numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarında bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	106

Çizelge 4.9. Merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinde elde edilen maksimum pullulan derişimleri (y1), maksimum EPS derişimleri (y2) ve özgül üreme hızları (y3)	113
Çizelge 4.10. x1, x2 ve x3 bağımsız değişkenlerinin maksimum pullulan derişimi (y1) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları.....	115
Çizelge 4.11. x1, x2 ve x3 bağımsız değişkenlerinin maksimum EPS derişimi (y2) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları.....	122
Çizelge 4.12. x1, x2 ve x3 bağımsız değişkenlerinin mikroorganizmanın özgül üreme hızı (y3) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları.....	128
Çizelge 4.13. Bağımlı değişkenlerin program kullanılarak hesaplanan teorik değerleri ile program çıktısından elde edilen minimum ve maksimum değerleri ve deneysel değerleri.....	140
Çizelge 4.14. Optimizasyon deneylerinden elde edilen EPS örnekleri ile saf pullulan örneğine yapılan FT-IR analizi sonuçları	143

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. <i>A. pullulans</i> tarafından pullulan üretimi yol izi.....	6
Şekil 2.2. Üç bağımsız değişkenli merkezi karma sistemi modeli; (●) faktöriyel nokta, (○) yıldız nokta, (□) merkez nokta.....	21
Şekil 3.1. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan kurutulmuş turunçgil kabuğu örnekleri; (a) Portakal, (b) Limon, (c) Greyfurt, (d) Turunç.....	27
Şekil 3.2. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan farklı cins üzümlerin posaları; (a) Chardonnay cinsi üzüm posası, (b) Çalkarası cinsi üzüm posası.....	28
Şekil 3.3. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları.....	29
Şekil 3.4. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan şeker kamışı pekmezi artığı (ŞKPA).....	30
Şekil 3.5. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan ; (a) kuru fındık zürufü, (b) taze fındık zürufü.....	31
Şekil 3.6. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan balkabağı kabuğu.....	32
Şekil 3.7. Asit hidrolizi uygulanan turunçgil kabukları.....	33
Şekil 3.8. Kuru fındık zürufü hidrolizatı besiyeri.....	37
Şekil 3.9. Balkabağı kabuğu hidrolizatı ortamı.....	38
Şekil 4.1. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	49

Şekil 4.2. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri.....	50
Şekil 4.3. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri.....	51
Şekil 4.4. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....	52
Şekil 4.5. Portakal kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	54
Şekil 4.6. Limon kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkarozun (▲) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	55
Şekil 4.7. Greyfurt kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	57
Şekil 4.8. Turunç kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	58
Şekil 4.9. Chardonnay ve Çalkarası cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	60

- Şekil 4.10. Çalkarası cinsi üzüm posasından hazırlanan özütün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri.....61
- Şekil 4.11. Chardonnay ve Çalkarası cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri.....62
- Şekil 4.12. Chardonnay ve Çalkarası cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....63
- Şekil 4.13. Chardonnay cinsi üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde (a) glukoz (■) ve fruktoz (●) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■) ve fruktozun (●) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....64
- Şekil 4.14. Çalkarası cinsi üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde (a) glukoz (■) ve fruktoz (●) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■) ve fruktoz (●) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....66
- Şekil 4.15. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....68
- Şekil 4.16. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri.....69
- Şekil 4.17. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri.....70

- Şekil 4.18. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.....71
- Şekil 4.19. Kestane kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde (a) glukoz (■) ve ksiloz (●) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■) ve ksiloz (●) tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....72
- Şekil 4.20. Fındık kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ksiloz derişimlerinin ve ksiloz tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....74
- Şekil 4.21. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.....75
- Şekil 4.22. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ln X değierlerinin zamanla değışimleri.....75
- Şekil 4.23. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri.....76
- Şekil 4.24. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.....77
- Şekil 4.25. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde sakkaroz derişimlerinin ve sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....78
- Şekil 4.26. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.....79
- Şekil 4.27. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, ln X değierlerinin zamanla değışimleri.....80

Şekil 4.28. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri.....	81
Şekil 4.29. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.....	82
Şekil 4.30. Kuru fındık zürufu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....	83
Şekil 4.31. Taze fındık zürufu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....	84
Şekil 4.32. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.....	92
Şekil 4.33. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde, biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değışimleri.....	93
Şekil 4.34. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri.....	94
Şekil 4.35. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.....	94
Şekil 4.36. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....	96
Şekil 4.37. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.....	97
Şekil 4.38. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde, biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değışimleri.....	98
Şekil 4.39. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri.....	99

Şekil 4.40. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....	99
Şekil 4.41. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	101
Şekil 4.42. “11-14” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	103
Şekil 4.43. “11-14” numaralı deneylerde, biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	103
Şekil 4.44. “11-14” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri.....	104
Şekil 4.45. “11-14” numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....	105
Şekil 4.46. “11-14” numaralı deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	107
Şekil 4.47. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	108
Şekil 4.48. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	109
Şekil 4.49. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri.....	109
Şekil 4.50. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....	110
Şekil 4.51. “15-20” numaralı merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde; (a) ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) ksiloz tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	111

Şekil 4.52. “15-20” numaralı merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....	112
Şekil 4.53. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve DSA hacminin (x2); maksimum pullulan derişimi (y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x3= 12 g).....	116
Şekil 4.54. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve ÖFZ miktarının (x3); maksimum pullulan derişimi (y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x2= 1.5 mL).....	118
Şekil 4.55. DSA hacminin (x2) ve ÖFZ miktarının (x3); maksimum pullulan derişimi (y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x1= 3.6 g/L).....	119
Şekil 4.56. En yüksek pullulan derişimlerinin (y1); deneysel değeri ile Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değeri karşılaştırılması ($y = 0.9975x + 0.1029$, $R^2=0.9976$).....	121
Şekil 4.57. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve DSA hacminin (x2); maksimum EPS derişimi (y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x3= 12 g).....	123
Şekil 4.58. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve ÖFZ miktarının (x3); maksimum EPS derişimi (y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x2= 1.5 mL).....	124
Şekil 4.59. DSA hacminin (x2) ve ÖFZ miktarının (x3); maksimum EPS derişimi (y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x1= 3.6 g/L).....	126
Şekil 4.60. En yüksek EPS derişimlerinin (y2); deneysel değeri ile Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değeri karşılaştırılması ($y = 0.9971x + 0.1284$, $R^2= 0.9971$).....	127

Şekil 4.61. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve DSA hacminin (x2); mikroorganizma özgül üreme hızı (y3) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x3= 12 g).....	129
Şekil 4.62. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve ÖFZ miktarının (x3); mikroorganizma özgül üreme hızı (y3) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x2= 1.5 mL).....	131
Şekil 4.63. DSA hacminin (x2) ve ÖFZ miktarının (x3); mikroorganizma özgül üreme hızı (y3) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x1= 3.6 g/L).....	132
Şekil 4.64. Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (y3); deneysel değerleri ile Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.7992x + 0.0091$, $R^2=0.7991$).....	134
Şekil 4.65. Optimum koşullarda <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	136
Şekil 4.66. Optimum koşullarda <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimi.....	136
Şekil 4.67. Optimum koşullarda <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri.....	137
Şekil 4.68. Optimum koşullarda <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....	138
Şekil 4.69. Optimum koşullarda ortamda bulunan; (a) glukoz (■) ve ksiloz (●) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■) ve ksiloz (●) tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	139
Şekil 4.70. İstenen hedefe ulaşma fonksiyonunun; (a) x1 ve x2 (x3= 20 g), (b) x1 ve x3 (x2= 2.5 mL) (c) x2 ve x3 (x1= 7.2 g/L) bağımsız değişkenlerine göre değişimi.....	141
Şekil Ek 2- Öğütülmüş kuru fındık zürufu örneğinin tane boyu dağılım grafiğı.....	158
Şekil Ek 4.1. Glukoz çalışma doğrusu ($y=3.232x-0.0583$, $R^2= 0.98999$).....	159

Şekil Ek 4.2. Sakkaroz çalışma doğrusu ($y = 8.4235x + 0.0234$; $R^2 = 0.9924$).....	159
Şekil Ek 9.1. (a) EPS 1. örnek (b) EPS 2. örnek (c) saf pullulan örneğine ait FT-IR spektrumları.....	164



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

d	İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu
F	F değeri
k	Bağımsız değişken sayısı
n	Döndürülebilir merkezi karma tasarımı ile oluşturulan deney tasarımındaki deney sayısı
n_0	Merkez noktadaki tekrar edilen deney sayısı
p	p değeri
P	Ürün derişimi (g/L)
$-r_s$	Substrat tüketim hızı (g substrat/sa)
R^2	Regresyon katsayısı
S	Substrat derişimi (g substrat/L)
t	Zaman (sa^{-1})
x	Bağımsız değişken
X	Kuru ağırlık cinsinden biyokütle derişimi (g mo/L)
X_0	Üssel üreme evresinin başladığı anda fermentasyon ortamdaki biyokütle derişimi (g mo/L)
y	Bağımlı değişken
ϵ	İstatistiksel hata
σ^2	Varyans değeri
α	Yıldız nokta değeri
μ	Özgöl üreme hızı (sa^{-1})
v	Özgöl ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
v_m	En yüksek özgöl ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]

Kısaltmalar

BKH	Balkabağı kabuğu hidrolizatı
DSA	Derişik sülfürik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
KFZH	Kuru fındık zürufu hidrolizatı
KO	Kareler ortalaması
ÖFZ	Öğütölmüş fındık zürufu
RSM	Response Surface Methodology (Yanıt yüzey yöntemi)
SD	Serbestlik derecesi
ŞKPA	Şeker kamışı pekmezi artığı
TFZH	Taze fındık zürufu hidrolizatı
ÜPÖ	Üzüm posası özütü
DNS	Dinitrosalisilik asit
YM	Yeast Extract Malt Extract
PNH	Patates nişastası hidrolizatı

1. GİRİŞ

Pullulan α -1,6 ve α -1,4 glikozidik bağları ile bağlanmış olan maltotrioz ünitelerinden oluşmuş, mikrobiyel kaynaklı bir ekzopolisakkarittir. Mikrobiyel kaynaklı ekzopolisakkaritler, nispeten daha kısa sürede üretilibilmeleri ve üretim prosesi sonunda daha kolay saflaştırılmaları gibi nedenlerle, diğer doğal kaynaklı ekzopolisakkaritlere bir alternatif olarak kabul edilmektedirler. Mikrobiyel ekzopolisakkaritler, çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle birçok endüstri alanında yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar (Yıldız ve Karataş, 2018). Bunlardan birisi olan pullulanın, suda çok iyi çözünebildiği, tadı ve kokusunun olmadığı belirtilmektedir (Yang ve ark., 2018). Bunların yanı sıra pullulanın, oksijen geçirgenliğini ortadan kaldırabilen bir film oluşturabilme, kıvam artırma, enkapsülasyon ajanı olarak kullanılabilme, düşük derişimde dahi, yüksek viskoziteli çözelti oluşturabilme ve yüksek lif oranı içermesi gibi özelliklerinden ötürü gıda endüstrisinde sıkça kullanıldığı da ifade edilmektedir (Yatmaz ve Turhan, 2012). Pullulan molekülünün toksik, mutajenik ve karsinojenik olmaması nedeniyle; gıda endüstrisi dışında eczacılık, tıp ve kozmetik gibi endüstrilerde de yaygın kullanım alanları bulunduğu da bildirilmektedir (Prasongsuk ve ark., 2018).

Pullulan molekülü esas olarak maya benzeri bir fungus olan *Aureobasidium pullulans* tarafından üretilmektedir. Polimorfik bir fungus olan *A. pullulans*'ın, pullulan molekülü dışında lipaz, amilaz, selüloz, proteaz gibi bazı önemli enzimleri ve gıda endüstrisinde yaygın kullanım alanı bulunan; polimalik asit ve ağır yağ adı verilen çeşitli metabolitleri üretebildiği de rapor edilmektedir (Price ve ark., 2013; Tu ve ark., 2014; Prasongsuk ve ark., 2018). Fermantasyon yoluyla pullulan üretiminde *A. pullulans*'ın çeşitli sentetik karbon kaynaklarını kullanabildiği belirtilmektedir. Bir fermantasyon prosesinde, kullanılan fermantasyon ortamının maliyeti, toplam üretim maliyetinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Fermantasyon ortamı bileşiminde kullanılan; sentetik karbon kaynakları nispeten pahalı girdileri oluşturdıklarından, fermantasyon ortamlarında alternatif karbon kaynakları olarak, bazı doğal atık / artık maddelerin kullanılmasının son yıllarda yaygın olarak araştırılan konular arasında olduğu belirtilmektedir (Göksungur, Uzunoğulları ve Dağbağlı, 2011; Sharma, Prasad, ve Choudhury, 2013; An ve ark., 2017; Singh ve ark., 2018). Gıda endüstrisinde, kullanılan hammaddelere uygulanan çeşitli prosesler sonucunda, tonlarca atık madde çıktığı bilinmektedir. Örnek olarak; Türkiye'de yılda

500.000 ile 650.000 ton arasında fındık yetiştirildiği ve bu fındıkların çeşitli şekillerde işlenmesi ile yaklaşık; 200.000 ton kadar fındık zürufunun açığa çıktığı rapor edilmiştir (Güney, 2013). Turunçgil endüstrisinde ise; meyve işlendikten sonra hammaddenin yaklaşık olarak; %50-60'lık kısmının, atık madde olarak ayrıldığı ifade edilmektedir (López, Li ve Thompson, 2010). Şarap endüstrisinde, üzümün şaraba işlenmesi sonrasında, bileşiminde fenolik madde içeriği ve şeker miktarı yüksek olan üzüm posasının atık olarak kaldığı bilinmektedir (Arvanitoyannis, Ladas ve Mavromatis, 2006). Genel olarak bakıldığında; çeşitli bileşenler açısından zengin olan bu atık maddelerin değerlendirilmelerinin, ekolojik ve ekonomik açıdan önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bu amaçla son zamanlarda atık maddelerin değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Yanıt yüzey yöntemi (RSM); bir prosesin performansını artırıp ondan maksimum seviyede yarar sağlamak için, proses koşullarının istatistiksel ve matematiksel yöntemler kullanılarak optimize edilmesini sağlayan bir modelleme yöntemi olarak tanımlanmaktadır (Uzunoğulları, 2010). Bu yöntemde; elde edilen deneysel sonuçlar kullanılarak, değişkenlerin matematiksel modelleri oluşturulmaktadır. RSM yönteminde; birden fazla değişkenin ve bu değişkenlerin interaksiyonlarının, yanıtlar üzerindeki etkilerinin, aynı anda incelenebilmesi ile, prosesin optimum koşullarının belirlenebildiği ifade edilmektedir (Baş ve Boyacı, 2007).

Bu tez çalışmasında ilk olarak; *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde, çeşitli tarımsal atık/artık maddelerin bazı ön işlemlerden geçirilerek fermantasyon ortamı olarak kullanılmaları amaçlanmıştır. Bu şekilde çevre dostu bir üretimin yapılmasının yanısıra, katma değeri yüksek ve gıda endüstrisinin yanısıra, pek çok endüstride geniş kullanım alanlarına sahip, biyoteknolojik bir ürün olan pullulanın, daha ekonomik bir prosesle üretilmesi de hedeflenmiştir. Araştırmanın ikinci aşamasında ise; pullulan üretimini destekleyen, kuru fındık zürufundan hazırlanmış olan fermantasyon ortamının, yanıt yüzey yöntemi ile matematiksel modelinin türetilerek optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece yerel bir suş olan; *A. pullulans* AZ-6'nın seçilen bir doğal substrat ortamında, yüksek miktarda pullulan üretmesi de hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Aureobasidium pullulans polimorfik formda, su, hava, toprak, ağaç gibi doğal ortamlardan kolaylıkla izole edilebilen, önemli bir ekzopolisakkarit kabul edilen; pullulanı üretebilen maya benzeri bir fungus olarak tanımlanmaktadır (Price ve ark., 2013). Besiyeri içeriği, suş ve ortam koşullarına göre değişken olmakla birlikte, yoğun olarak ürettiği melanin pigmentinden dolayı bu küf; siyah maya olarak da adlandırılmaktadır (Chi ve ark., 2009). İlk gelişme evresinde sarı, krem rengi, açık pembe veya açık kahverengi olan koloniler, bu küfün ileri gelişme evrelerinde klamidospor formunu oluşturmamasından dolayı, karakteristik siyah rengini almaya ve melanin pigmenti üretmeye başlarlar (Prasongsuk ve ark., 2017). *A. pullulans*'ın; kültürün yaşına, ortamdaki oksijen konsantrasyonuna, kültür koşullarına (pH, sıcaklık vb.) ve besiyeri içeriğine göre değişkenlik gösterebilen beş farklı hücre morfolojisi olup bunlar; genç blastosporlar, şişkin blastosporlar, eliptik maya benzeri hücreler, miselyumlar ve klamidosporlar olarak rapor edilmektedir (Sugumaran ve ark., 2013; Singh ve ark., 2015b).

A. pullulans tarafından üretilen önemli bir polisakkarit olan pullulanın, üretim veriminin en yüksek olduğu hücre morfolojisi konusunda çeşitli görüşler olmasına rağmen blastospor formunun, hem ekzopolisakkarit üretimi açısından hem de pullulan üretimi açısından en verimli hücre morfolojisi olduğu belirtilmektedir (Campbell ve ark., 2004; Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011).

Ekzopolisakkaritler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Homopolisakkaritler; tek tip glukoz molekülü içerirlerken, heteropolisakkaritlerin yapısında glukoz molekülünün yanısıra, farklı moleküller de bulunabilmektedir. *A. pullulans* tarafından üretilen pullulan molekülü; α (1→4) ve α (1→6) glikozidik bağlarıyla bağlı, maltotrioz ünitelerinden oluşan, dallanmamış lineer yapıda bir mikrobiyel homopolisakkarittir (Singh, Kaur ve Kennedy, 2015a). Maltotrioz ünitesinin büyüklüğüne bağlı olarak pullulanın moleküler formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olarak ifade edilmektedir (Farris ve ark., 2014).

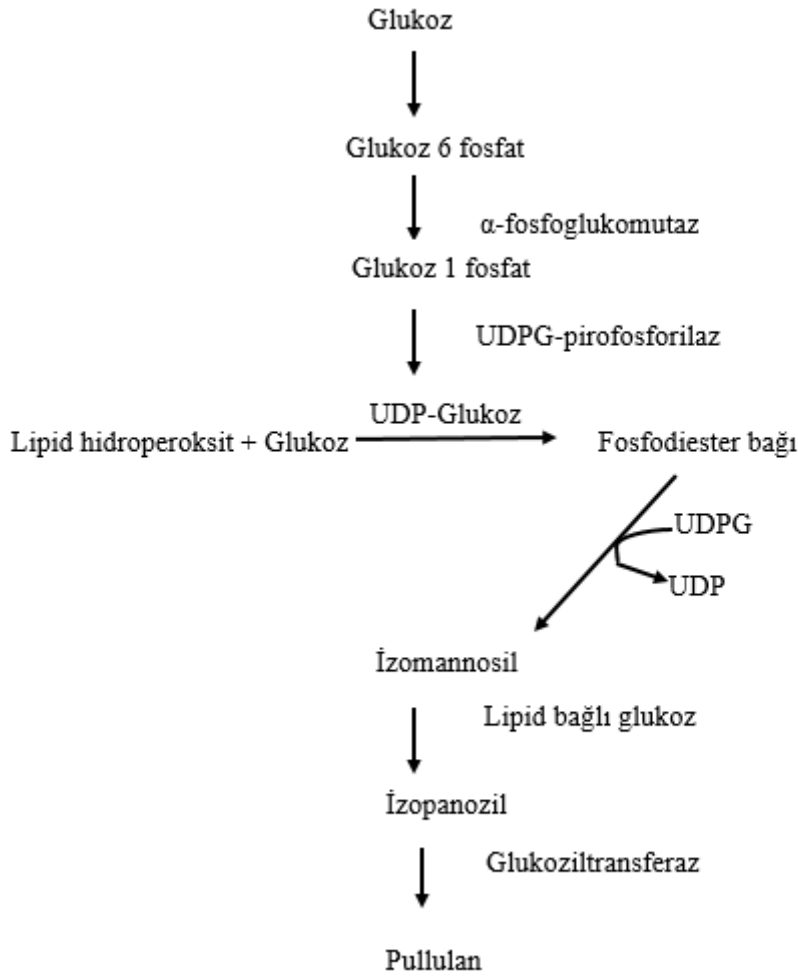
A. pullulans'ın, pullulan biyosentezi mekanizmasının halen tam olarak anlaşılamadığı ifade edilmektedir. Pullulan üretim mekanizması, pullulan molekülüne benzer diğer bir mikrobiyel ekzopolisakkarit olan dekstran üretim mekanizmasından farklılık göstermektedir. Diğer mikrobiyel dextranların hücre dışına salınan glukansukraz enzimi ile üretildiği bilinirken, *A. pullulans* tarafından üretilen pullulanın, hücre içerisinde üretilip daha sonra, yapışkan bir tabaka şeklinde dışarıya salındığı belirtilmektedir (Leathers, 2003; Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011). Bu aşamada, özellikle büyük ölçekli mikrobiyel pullulan üretimi esnasında, çeşitli sorunlarla karşılaşılabilirdiği ifade edilmektedir. *A. pullulans*'ın doğasından kaynaklanan en önemli problem, kuvvetli bir antioksidan sayılan melanin pigmentinin oluşumudur. Melanin pigmenti oluşumunun fermentasyon ortamı koşullarına, ışığa ve çözünmüş oksijen derişimine göre değişebilmekle birlikte genellikle, mikroorganizmanın üssel gelişim evresinin son safhasında üretilen, bir ikincil metabolizma ürünü olduğu bilinmektedir (Israilides ve ark., 1999). *A. pullulans* tarafından salgılandığında melanin pigmentinin, yaklaşık olarak yarısının klamidospore formundaki hücre formunda; hücre duvarında kaldığı, kalan kısmının ise, siyah granüller şeklinde ortama salındığı bildirilmektedir (Zheng ve ark., 2008). Koyu renkli melanin pigmentinin, kovalent bağ ile pullulan molekülüne bağlanarak saf pullulan izolasyonunu ve saflaştırılmasını zorlaştırdığı ve ayrıca, üretilen pullulanın belirli özelliklerini de (viskozite ve moleküler ağırlık vb.) olumsuz etkilediği belirtilmektedir (Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011). Bu nedenle melanin pigmenti oluşturmeyen suşların kullanılmasının, üretilen ekzopolisakkaritin aktif kömür ile adsorpsiyonu, çözücü-tuz kombinasyonları kullanılarak melanin pigmentini uzaklaştırmak ya da melanin üretimini engelleyecek koşullarda çalışmak, bu soruna getirilebilecek çözümler arasında olduğu ifade edilmektedir (Youssef, Biliaderis ve Roukas, 1998; Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011). Fermentasyon esnasında karşılaşılacak diğer bir sorunun ise, fermentasyonun süresine göre değişken olmakta birlikte, düşük molekül ağırlıklı pullulan üretimi sürecinin başlaması olduğu ifade edilmektedir. Bu problemin de, fermentasyon koşullarının, (başlangıç pH'ı, inokulum büyüklüğü, sıcaklık vb.) yüksek kalitede pullulan üretimine elverişli hale getirilmesi ile aşılabileceği belirtilmektedir (Youssef, Biliaderis ve Roukas, 1998) .

A. pullulans'ın pullulan molekülü dışında üretebildiği diğer bazı metabolik ürünlerinin de, biyoteknolojik açıdan oldukça önemli oldukları bilinmektedir. *A. pullulans*; endüstriyel açıdan önemli sayılan çeşitli enzimlerin (amilaz, selüloz, lipaz, proteaz, ksiliniz, manaz) sentezlerini gerçekleştirebilmektedir (Singh ve ark., 2015b; Prasongsuk ve ark., 2017). *A. pullulans*'ın ürettiği diğer önemli bir metabolitin ise; polimalik asit (PMA) adı verilen, suda çözünebilir, monomeri L-malik asit olan bir poliestir molekülü olduğu rapor edilmektedir. PMA eczacılıkta, taşıyıcı molekül olarak kullanılırken, gıda endüstrisinde ise; bu molekülün, malik asite dönüşümü yapılarak kullanıldığı belirtilmektedir (Tu ve ark., 2014; Wei ve ark., 2017). Arabitol ve mannitolün, 3,5-dihidroksidekanoil ve 5-hidroksi-2-dekanoil esterlerinden oluşan, liamocin adı verilen ve ağır yağ olarak da bilinen molekülün de, *A. pullulans* tarafından üretilen bir başka önemli metabolit olduğu da ifade edilmektedir (Manitchotpisit ve ark., 2014). Parlak sarı-yeşil renkli bir poliol molekülü olan liamocinin, biyosüpfektan etkisi gösterdiği belirtilmektedir. Bunun yanı sıra, liamocin moleküllerinin akciğer kanseri hücrelerine karşı anti-proliferatif etki göstererek; yeni tümör hücrelerinin oluşumunu engellediği de tespit edilmiştir (Price ve ark., 2013). Liamocin moleküllerinin antikanserojenik etkilerinin yanı sıra, antimikrobiyel etkilerinin de ortaya konulduğu çeşitli çalışmalar mevcuttur. Liamocin moleküllerinin özellikle *Streptococcus* türlerine karşı antimikrobiyel özellik gösterdiği de rapor edilmektedir (Manitchotpisit ve ark., 2014; Leathers ve ark., 2016).

A. pullulans'ın ürettiği metabolitleri dışında, kendi biyokütlesinin de önemli bir kullanım alanına sahip olduğu rapor edilmektedir. Yoğun mikroorganizma biyokütlesi anlamına da gelen tek hücre proteini (single cell protein), bileşimindeki yüksek orandaki protein, vitamin ve esansiyel aminoasit içeriği nedeniyle; özellikle gıda ve hayvan yemi endüstrilerinde kullanım alanı bulmaktadır (Nasseri ve ark., 2011; Li ve ark., 2013; Singh ve ark., 2015b). Mikroorganizmaların gelişimi için önemli kabul edilen demir molekülünün yokluğunda, çoğu mikroorganizma tarafından üretilen ve demir şelatlayabilen; siderofor molekülünün de, *A. pullulans* tarafından sentezlenebilen bir diğer metabolit olduğu rapor edilmektedir (Singh ve ark., 2015b).

Bütün bu metabolitlerin yanında; *A. pullulans* tarafından sentezlenen pullulan molekülünün, bu mikroorganizma için karakteristik sayılabilecek bir ürün olduğu ifade

edilmektedir. Pullulan, birçok mikroorganizma (*Aureobasidium* spp., *Rhodotorula bacarum*, *Cryphonectria parasitica*, *Cytaria* spp., *Teloschistes flavicans* ve *Tremella mesenterica*) tarafından üretilmesine rağmen, mikrobiyel pullulan üretimi çalışmalarının, yüksek ürün veriminden dolayı, *A. pullulans* üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir (Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011). *A. pullulans*'ın pullulan biyosentezi bir dizi biyokimyasal reaksiyonlar (Şekil 2.1.) sonucunda gerçekleşmektedir (Sugumaran ve Ponnusami, 2017). *A. pullulans*'ın pullulan üretiminde, glukoz dışında sakkaroz, galaktoz, mannoz, maltoz, fruktoz ve ksiloz gibi diğer bazı karbon kaynaklarını da kullanabildiği belirtilmektedir. Mikrobiyel pullulan sentezinin, üridin difosfoglukoz pirofosforilaz (UDPG-fosforilaz), α -fosfoglukoz mutaz ve glukoziltransferaz enzimlerinin varlığında gerçekleştiği rapor edilmektedir (Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011; Sugumaran ve Ponnusami, 2017a).



Şekil 2.1. *A. pullulans* tarafından pullulan üretimi yol izi

Mikrobiyel ekzopolisakkaritler kendilerine özgü fiziksel özellikleri nedeniyle, endüstride bitkisel kaynaklı ekzopolisakkaritler yerine kullanılabilecek alternatifler olarak kabul edilmektedirler (Singh, Saini ve Kennedy, 2008). Mikrobiyel bir ekzopolisakkarit olan pullulanın, molekül yapısındaki spesifik bağlanma şekline dolayısı, sudaki çözünürlüğü ve esnekliği fazladır. Yine moleküldeki özgün bağlanma şekline bağlı olarak pullulanın, adhesif bir özellikte olup yüzeyde film oluşturabildiği de ifade edilmektedir (Singh, Saini ve Kennedy, 2008). Pullulanın sulu çözeltisinin, oldukça geniş bir pH aralığında stabil kalabilmesinin yanı sıra; 250-280°C'lere karşı dirençli olup, daha yüksek sıcaklıklarda ise bozunduğu belirtilmektedir (Singh, Kaur ve Kennedy, 2015a). Pullulanın ortalama molekül ağırlığının 10 ile 600 kDa arasında değiştiği bildirilmektedir (Singh ve ark., 2017; Grumezescu ve Holban, 2018). Molekül ağırlığının, belirli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği de rapor edilmektedir. Bunlar; pullulan üretiminde kullanılan suşun özelliği, ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarı, fermentasyon ortamının başlangıç pH değeri, fermentasyon ortamında kullanılan azot ve karbon kaynakları ve fermentasyon süresi olarak verilmektedir (Sheng, Tong ve Ma, 2016; Sugumaran ve Ponnusami, 2017a). Molekül ağırlığı, pullulanın biyolojik aktivitesi ve kimyasal kullanım alanları için, önem teşkil eden bir özellik olarak belirtilmektedir (Cheng et al., 2011).

Pullulan ve türevlerinin toksik olmaması, tüketilebilir olması, biyolojik olarak parçalanabilir olması, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin olmaması gibi nedenlerle gıda, eczacılık, tıp ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılabildiği bilinmektedir (Sugumaran ve Ponnusami, 2017a). Pullulanın en önemli karakteristik özelliği; ince ve transparan bir film tabakası oluşturarak; oksijen ve yağ geçirgenliğini ortadan kaldırması olarak ifade edilmektedir. Bu özelliği nedeniyle endüstride pullulanın, kaplama malzemesi yada ambalaj materyali olarak kullanımının yaygın olduğu rapor edilmektedir (Wu ve ark., 2009). Pullulan ayrıca, gıda endüstrisinde de yoğun olarak kullanım alanı bulmaktadır. Pullulan düşük konsantrasyonlarda yüksek viskoziteli çözelti oluşturabildiğinden, kıvam artırıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Pullulanın sulu çözeltisinin viskozite değerinin, pH 2-11 aralığında sabit kaldığı rapor edilmektedir (Grumezescu ve Holban, 2018). Pullulan çözeltisinin viskozitesinin, sıcaklık değişimlerinden, pH'dan ve metal iyonlarından etkilenmemesi nedeniyle, gıda endüstrisinde mayonez gibi ürünlerde stabilizör olarak kullanılabildiği belirtilmektedir (Singh, Saini ve Kennedy, 2008).

Daha önce yapılan bir çalışmada; pullulanaz enzimi kullanılarak pullulan molekülünün hidrolize edildiğinde; maltotrioz şurubu elde edilebildiği rapor edilmiştir. Maltotrioz şurubunun; ısıtma işlemine karşı stabilite, diğer şekerlerin şuruplarıyla kıyaslandığında; daha açık renkte son ürün oluşturma, düşük viskoziteli çözelti oluşturma ve nişastalı ürünlerde olumsuz özellik olarak sayılabilecek; retrogradasyonu önleme gibi özellikleri bakımından fırıncılık ürünlerinde kullanılmaya elverişli olduğu belirtilmektedir (Singh, Saini ve Kennedy, 2010).

Pullulan molekülünün kuvvetli adhesif özelliği ile, film oluşturma kapasitesi yüksek olduğundan, oksijen geçirgenliği olmayan dayanıklı film oluşumu için önemli bir kaplama maddesi olarak kabul edilmektedir (Leathers, 2003; Chi ve ark., 2009). Pullulanın, α -D-glukan moleküllerinden oluşmasına rağmen, α -amilaz enzimine karşı dirençli olması nedeniyle sindirilememesi ve düşük kalorili ya da diyet ürün formülasyonlarında kullanılabilmesi, bir diğer önemli özelliğidir. Besinsel olarak da kullanılabilen pullulanın, yüksek lif içeriğinden dolayı prebiyotik olarak kullanılarak, *Bifidobacteria* gelişimini teşvik ettiği de rapor edilmiştir (Singh, Saini ve Kennedy, 2008). Pullulan kullanılarak yapılan yenilebilir ambalajlar, sebze ve meyve gibi taze ürünlerde nem kaybını ve oksijen geçirgenliğini azalttığından raf ömrünün uzatılmasına yarar sağlamaktadır. Bu ekzopolisakkarit ayrıca, aroma maddelerinin kaybolmasını da önleyerek, uzun süre tazeliğin korunmasında da fayda sağlayabilmektedir (Farris ve ark., 2014).

Pullulan molekülünün toksik olmaması ve suda kolay çözünebilmesi gibi özelliklerinden ötürü, kozmetik alanında losyon, çeşitli cilt maskeleri, şampuan ve diş macunu gibi ürünlerde sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir (Farris ve ark., 2014). Ayrıca pullulan biyoteknoloji, tıp ve eczacılık alanlarında da yaygın kullanım alanına sahiptir. Eczacılık sektöründe, ilaç formlarının içerisinde yer alan mikroküreler şeklinde veya nano boyuttaki jel formunda olan pullulan molekülleri, ilacın etken maddesini muhafaza edebilme ve zamanı gelince kontrollü olarak salınım yapma konusunda da önemli bir yere sahiptir (Singh ve ark., 2017; Sugumaran ve Ponnusami, 2017a). Kanser ilaçlarının, vücutta sağlıklı hücrelere karşı olan toksisitelerinin azaltılması ve iyileştirici özelliğinin geliştirilmesi amacıyla, bu ilaçlarla kompleks oluşturan mikrokürecikler, lipozomlar ve

çözünebilen polimer maddeler kullanılmaktadır. Pullulan bu amaca hizmet ederek, kanser ilaçlarının sitotoksik özelliklerinin ortadan kaldırılmasına yardımcı olan bir moleküldür (Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011). Kanserli hücrelerin belirlenmesinde önemli bir belirtecin, hücrelerin pH değerleri olduğu rapor edilmektedir. Kanserli hücrelerin pH değerinin, sağlıklı vücut hücrelerinin pH değerinden farklılık gösterdikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; bu farklılıktan yola çıkılarak, antikanserojenik polimerik maddelerin, kemoterapi ilaçlarıyla birlikte kompleks olarak verildiğinde, bu pH farklılığını belirleyerek, ilacın tümör hücreleri üzerinde kontrollü salınım yapmasını sağladığı rapor edilmiştir. Bu antikanserojenik polimerik maddelerden birinin de; pullulan olduğu bildirilmektedir (Prajapati, Jani ve Khanda, 2013; Singh ve ark., 2017) .

Pullulan, biyoteknoloji alanında da geniş bir kullanım alanına sahip bir biyopolimer olarak bilinmektedir. Genel olarak genetik materyal ve protein aktarımı, viral vektörler aracılığıyla yapılmaktadır. Fakat bu yöntemin immunojenik olarak bazı hastalıklara sebebiyet verebilmesi nedeni ile alternatif bazı yolların da kullanılabildiği ifade edilmektedir. Bu alternatiflerden birinin; gen ve protein materyallerinin aktarılmasının, pullulan molekülünün hidrofilik yüzeyine bağlanma aracılığıyla yapılabilmesi olduğu belirtilmektedir. Metal şelatlayabilen pullulan türevleri, sitotoksik maddeler olmadan plazmid DNA molekülleri ile kompleks oluşturarak genetik materyal aktarımını gerçekleştirebilmektedirler (Hosseinkhani ve ark., 2002; Prajapati, Jani ve Khanda, 2013; Singh ve ark., 2017).

Hidroksil gruplarının fazla olmasından ötürü pullulanın, kan plazmasını çoğaltmak amacıyla ya da aşı üretiminde farklı polisakkaritler yerine kullanılabildiği bildirilmektedir (Shingel, 2004; Cheng, Demirci ve Cathmark, 2011). Bütün bu kullanım alanlarının dışında pullulan; belirli moleküllerle kompleks oluşturarak proteinlerin ısı dirençlerini ve enzimatik aktivitelerini artıran şaperon molekülleri olarak (Prajapati, Jani ve Khanda, 2013), medikal görüntüleme alanında kullanılan quantum dot adı verilen floresan maddenin hücre içine geçirgenliğinin artırılmasında (Singh ve ark., 2017), enzim moleküllerinin kinetik aktivitesinin korunması amacıyla sıklıkla kullanılan bir teknik olan; enzim immobilizasyonu işleminde de (Mocanu ve ark., 2002), sıklıkla kullanılmaktadır.

Pek çok yerde kullanım alanı olan pullulan molekülünün üretiminde; *A. pullulans* glukoz, sakkaroz, ksiloz, mannoz, galaktoz gibi çeşitli şekerleri karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğine sahiptir. Fakat bu şekerler, fermantasyon yoluyla pullulan üretimi için, oldukça pahalı substratlar olarak kabul edilmektedirler. Ekonomik nedenlerle, farklı sektörlerde yaygın kullanım alanı olmasına rağmen, mikrobiyel pullulan üretiminin sınırlı olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2014). Bu gerekçeyle, pullulan üretiminde çeşitli doğal substratlar ile tarımsal atıklar ve gıda endüstrisi atıklarının, fermantasyon ortamında karbon ve azot kaynakları olarak kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur.

Singh ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir araştırmada; fermantasyon ortamı olarak farklı konsantrasyonlarda (%20-70 ve %90), şeker kamışı suyu kullanılmasının, pullulan üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada, başlangıç pH'sının ve fermantasyon sıcaklığının pullulan üretimi üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Anılan çalışmada, en yüksek pullulan derişimine (6.4 g/100 mL); fermantasyonun 96. saatinin sonunda, % 50'lik konsantrasyonda şeker kamışı suyu içeren fermantasyon ortamında, başlangıç pH'ının 5 ve fermantasyon sıcaklığının 37°C olduğu işletme koşullarında ulaşıldığı bildirilmiştir. Sözü edilen bu çalışmada, çalışılan *A. pullulans* suşu ile pullulan üretiminde, herhangi başka bir bileşen eklenmemiş, şeker kamışı suyu içeren fermantasyon ortamının başarılı sonuç verdiği de rapor edilmiştir.

Literatürde, hindistan cevizi üretiminden elde edilen yan ürünlerin (hindistan cevizi suyu ve sütü), *A. pullulans* MTCC 2195 suşu ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, fermantasyon ortamının başlangıç pH'sı ile, ortamda kullanılan sentetik azot kaynağı türünün (maya özütü, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, pepton, NaNO₃, NaNO₂ ve malt özütü) pullulan üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı da belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada elde edilen en yüksek pullulan derişiminin (58 g/L), fermantasyonun 144. saatinde, başlangıç pH'sı 7 olan ve karbon kaynağı olarak hindistan cevizi sütünün kullanıldığı bir fermantasyon ortamında elde edildiği rapor edilmiştir. Azot kaynakları arasında besiyeri bileşiminde kullanılan maya özütü, (NH₄)₂SO₄ ve NaNO₃'ün, pullulan üretimini desteklerken, NaNO₂'ün ise, pullulan üretimini baskıladığı tespit edilmiştir. Anılan çalışmada; kullanılan malt özütü, pepton ve NH₄Cl'ün ise; pullulan üretimi üzerinde fazlaca

etkisinin tespit edilmediği de vurgulanmıştır (Thirumavalavan, Manikkadan ve Dhanasekar, 2009) .

Biracılık endüstrisi artıklarından, proste son filtrasyon aşamasından sonra kalan sıvı kısmın (Spent grain liquor) içeriğinde yüksek oranda glukoz, mineral maddeler ve proteinlerin bulunduğu bilinmektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada; fermantasyon ortamı olarak bu zengin içerikli artık maddenin kullanılmasıyla, *A. pullulans* P56 suşu ile pullulan üretiminin araştırıldığı bildirilmiştir (Roukas, 1999). Söz konusu çalışmada; elde edilen en yüksek pullulan derişimine (6 g/L) fermantasyonun 72. saatinde ulaşıldığı ifade edilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında ise, fermantasyon ortamı olarak kullanılan söz konusu biracılık artığına ek bileşen olarak, fermantasyon ortamına çeşitli konsantrasyonlarda; K_2HPO_4 , L-glutamik asit, zeytinyağı ve Tween 80'in ayrı ayrı eklendikleri ve bu maddelerin üretilen pullulan derişimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bildirilmiştir. Söz konusu araştırmada; fermantasyon ortamına arpa likörünün yanısıra eklenen diğer bileşenler ile 4 farklı kombinasyonda ortam oluşturulduğu ifade edilmiştir. Bunlar; %0.5 (w/v)'lik K_2HPO_4 içeren ortam; %1 (w/v)'lik L-glutamik asit içeren ortam; %2.5 (v/v)'lik zeytinyağı ve %0.5 (v/v)'lik Tween 80 içeren ortam ve %0.5 (w/v)'lik K_2HPO_4 , %1 (w/v) 'lik L-glutamik asit, %2.5 (v/v)'lik zeytinyağı ve %0.5 (v/v)'lik Tween 80 içeren ortam olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; %0.5'lik K_2HPO_4 , %1'lik L-glutamik asit, %2.5'lik zeytinyağı ve %0.5'lik Tween 80 eklenmiş fermantasyon ortamlarında, çalışılan suş tarafından üretilen pullulan derişiminin sadece arpa likörü kullanılan fermantasyon ortamına kıyasla; 11 g/L'ye yükseltilebildiği ifade edilmiştir.

Pullulan üretiminde kullanılan fermantasyon ortamının bileşiminde temel substrat kaynağı olarak kullanılan sakkaroz yerine, hidrolize edilmiş patates nişastasının kullanıldığı bir çalışma rapor edilmiştir (Göksungur, Uzunoğulları ve Dağbağı, 2011). Bu çalışmada patates nişastasının, amiloglukozidaz ve pullulanaz enzimleri ile muamele edildiği ve hidroliz sonucunda farklı konsantrasyonlarda glukoz çözeltilerinin elde edildiği bildirilmiştir. Söz konusu araştırmada; yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, fermantasyon ortamında kullanılan hidrolizatın başlangıç glukoz derişimi, fermantasyon süresi ve fermantasyon ortamının başlangıç pH değeri olarak saptanmış olan; üç bağımsız değişkeninin pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı belirtilmiştir. Anılan

araştırmada; gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucunda elde edilen sonuçlara göre; hidrolizatın başlangıç glukoz konsantrasyonunun; 79.4 g/L, fermantasyon ortamının başlangıç pH değerinin; 7.26 olduğu koşullarda, maksimum pullulan konsantrasyonuna (19.2 g/L) fermantasyonun 111.8. saatinde ulaşıldığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak da; patates nişastası hidrolizatının, *A. pullulans* P56 suşu ile pullulan üretiminde, proses ekonomisi açısından, uygun bir substrat olduğu bildirilmiştir.

Pullulan üretimi amacıyla fermantasyon ortamı olarak doğal bir kaynağın kullanıldığı bir diğer araştırmada; endüstriyel bir atık olan manyok küspesinin katı faz fermantasyonu ile; *A. pullulans* MTCC2670 suşu kullanılarak, pullulan üretiminde değerlendirilmesinin amaçlandığı rapor edilmiştir. Söz konusu bu çalışmada, çeşitli azot kaynaklarının, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının ve fermantasyon süresinin; pullulan üretim verimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmada ayrıca; fermantasyon ortamına manyok küspesi dışında, glukoz, sakkaroz, fruktoz, maltoz, mannoz ve ksiloz gibi farklı karbon kaynakları da eklenerek, pullulan veriminin artırılmasının da amaçlandığı bildirilmiştir. Sonuç olarak en yüksek pullulan verimine sodyum nitratın azot kaynağı olarak kullanıldığı ve %5 mannoz içeren ortamda, fermantasyonun 4. gününde ulaşıldığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada ayrıca; fermantasyon ortamında manyok küspesi kullanılması ile elde edilen pullulanın yapısal özelliklerinin, FT-IR ve NMR yöntemleri kullanılarak belirlenmiş olduğu ve ticari bir pullulan örneği ile de karşılaştırıldığı rapor edilmiştir. Manyok küspesinin kullanıldığı fermantasyon ortamında üretilen pullulan ile, ticari pullulan örneğinin, FT-IR spektrumlarında benzer piklerin gözlemlendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada; NMR spektrumlarında ise; hem ticari pullulan hem de mikrobiyel olarak üretilen pullulan moleküllerinin verdikleri piklerdeki değerlerin, pullulan molekülünde bulunan; α (1→4) ile α (1→6) bağları ile bağlı, tekrarlı glukoz birimlerini gösterdiği de rapor edilmiştir. (Sugumaran, Jothi ve Ponnusami, 2014) .

Seo ve arkadaşlarının (2004), *A. pullulans* HP-2001 suşu ile yaptıkları bir çalışmada, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak; maya özütü ile soya fasülyesi posasının kullanıldığı ve sonuçların elde edilen pullulan miktarları yönünden karşılaştırıldığı ifade edilmiştir. Alınan sonuçlara göre; maya özütünün azot kaynağı olarak kullanılmasıyla elde edilen en yüksek pullulan derişiminin; 5.5 g/L olarak belirlendiği, soya fasülyesi posasının kullanıldığı durumda ise bu miktarın; 7.5 g/L olarak tayin edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca; fermantasyon ortamında kullanılan azot kaynağı türünün, elde edilen pullulan örneklerinin, molekül ağırlıkları üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Sonuç olarak; soya fasülyesi posasının, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılmasının; elde edilen pullulanın molekül ağırlığını olumlu etkilediği ve elde edilen pullulanın molekül ağırlığının, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak; maya özütü kullanıldığında elde edilen pullulan örneğinkinden daha yüksek olduğu da rapor edilmiştir. Söz konusu araştırmada, soya fasülyesi posasının, *A. pullulans* HP-2001 ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamında, maya özütü yerine kullanılabilecek, doğal ve ucuz bir substrat kaynağı olduğu da vurgulanmıştır.

Doğal substratlar ile yapılan bir diğer çalışmada; çeltik kavuzundaki lignoselülozik yapının, seyreltik sülfürik asitle hidrolize edildikten sonra, *A. pullulans* CCTCC M 2012259 suşu ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamında, karbon kaynağı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca; asit hidrolizi sonucu meydana gelen bir yan ürün olan; asetik asidin, pullulan biyosentezi üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre belirtilen suş ile üretilen pullulan miktarının, asit hidrolizi sonucu artan asetik asit miktarından olumsuz etkilendiği bildirilmiştir. Bu olumsuzluğun ortadan kaldırılması amacıyla söz konusu çalışmada; çeltik kavuzu hidrolizatının kullanıldığı aynı koşullarda hazırlanan iki fermantasyon ortamının birinde; *A. pullulans* CCTCC M 2012259 suşunun, diğerinde ise mutant bir suş olan; *A. pullulans* ARH-1 suşunun kullanıldığı ve iki farklı suşun bu ortamlarda ürettikleri maksimum pullulan derişimlerinin karşılaştırıldığı da bildirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda mutant suş kullanıldığında elde edilen maksimum pullulan derişiminin, fermantasyonun 48. saatinde 22.2 g/L, *A. pullulans* CCTCC M 2012259 suşu kullanıldığında ise maksimum pullulan derişiminin; fermantasyonun 60. saatinde 15.6 g/L olarak belirlendiği de ifade edilmiştir. Bu çalışma ile fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak çeltik kavuzu hidrolizatının, mutant bir suş olan *A. pullulans* ARH-1 ile pullulan üretiminde kullanılmasının, çeltik kavuzunun değerlendirilmesi açısından da anlamlı olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2014).

Doğal substrat kullanılarak gerçekleştirilen, katı hal fermantasyonu ve *A. pullulans* MTCC 2670 suşu ile pullulan üretiminin gerçekleştirildiği bir başka çalışma örneğinde; doğal substrat kaynağı olarak; manyok küspesi veya palmiye çekirdeğinin kullanıldığı

bildirilmiştir. Söz konusu araştırmada, üretilen pullulanın ortamlardan özütlenme yoluyla ayrıldığı, bu nedenle de; elde edilen pullulan derişimini etkileyen bazı faktörlerin (çözücü:katı oranı, çözücünün pH değeri, sistemin sıcaklığı ve çalkalama hızı) optimizasyonunun yapıldığı ifade edilmiştir. Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda; manyok küspesinin katı faz fermentasyonunda kullanıldığı durumda optimum koşulların; 50°C'lik sistem sıcaklığı, çözücü pH'sı 10, çözücü: katı oranı 6:1 (v/w) ve çalkalama hızı 300 rpm olarak belirlendiği rapor edilmiştir. Palmiye çekirdeğinin katı faz fermentasyonunda kullanıldığı deneylerde ise; optimum koşulların; 40°C'lik sistem sıcaklığı, çözücü pH'sı 10, çözücü: katı oranı 8:1 (v/w), çalkalama hızı 400 rpm olarak tespit edildiği belirtilmiştir (Sugumaran ve Ponnusami, 2017b).

Doğal substrat kaynakları kullanılarak pullulan üretimi amacıyla yapılan diğer bir çalışmada fermentasyon ortamı olarak; üzüm posası, zeytinyağı endüstrisi atıkları, patates ürünleri endüstrisinin nişasta açısından zengin artıkları, şeker pancarı melası kullanıldığı bildirilmiştir. *A. pullulans* NRRLY-6220 suşu ile gerçekleştirildiği bildirilen çalışmada; kullanılan doğal substratlar arasında en yüksek ekzopolisakkarit derişimine (22.3 g/L); fermentasyon ortamında üzüm posasının kullanıldığı ortamda ulaşıldığı bildirilmiştir. Bunun yanısıra; üzüm posası ortamında üretilmiş olan ekzopolisakkaritin; %97.4'lük kısmının saf pullulan olduğu da rapor edilmiştir. Patates ürünleri endüstrisinin, nişasta açısından zengin artıklarından hazırlanmış olan fermentasyon ortamında elde edilen ekzopolisakkarit derişiminin; 12.9 g/L olarak tespit edildiği, bu fermentasyon ortamının, NH₄NO₃ ve K₂HPO₄ ile desteklenmesi durumunda ise 12.9 g/L derişiminin; 30.8 g/L'ye yükseldiği belirtilmiştir. Şeker pancarı melası ve zeytinyağı endüstrisi atıklarının fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde ise, söz konusu araştırmada elde edilen ekzopolisakkaritin heterojen yapıda olduğu ve, ekzopolisakkaritin içeriğindeki pullulan yüzdesinin de düşük olarak tayin edildiği ifade edilmiştir (Israilides ve ark., 1994; Israilides ve ark., 1998).

Fermentasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak pirinç kepeği yağı keki, pamuk tohumu yağı keki, soya fasülyesi yağı keki, mısır maserasyon sıvısı veya hardal tohumu yağı kekinin kullanıldığı bir çalışmada, *A. pullulans* RBF 4A3 suşunun pullulan üretimi incelenmiştir (Sharma, Prasad ve Choudhury, 2013). Belirtilen her bir doğal substratın ayrı ayrı kullanılması ile hazırlanan fermentasyon ortamlarındaki doğal substrat oranının

%2 olduğu, bunun yanı sıra ortamlara, karbon kaynağı olarak da; %15 glukoz ilave edildiği ifade edilmiştir. Anılan çalışmada, kullanılan doğal substratlar arasında en yüksek pullulan derişimine (77.92 g/L); kullanılan atık maddeler arasında fermantasyon ortamında mısır maserasyon sıvısının kullanıldığı durumda ulaşıldığı belirlenmiştir. Bu araştırmada, pullulan üretimi açısından en iyi sonucu veren doğal substrat belirlendikten sonra, pullulan üretimi için fermantasyon koşullarının optimizasyonunun da gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Optimizasyon deneylerinde; fermantasyon ortamının hazırlanmasında kullanılan mısır maserasyon sıvısı konsantrasyonu, fermantasyon sıcaklığı ve süresi, çalkalama hızı, fermantasyon ortamının başlangıç pH değeri bağımsız değişkenler olarak seçilerek, pullulan üretimini destekleyen optimum koşulların belirlenmesi sağlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda maksimum pullulan üretiminin; 20°C’de, 200 rpm çalkalama hızında, fermantasyon ortamında %2 mısır maserasyon sıvısının kullanıldığı ve fermantasyon ortamının başlangıç pH değerinin 4.5 olduğu ortamda gerçekleştiği belirlenmiştir. Anılan çalışmada, optimum koşullarda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin; fermantasyonun 96. saatinde, 88.59 g/L olarak tayin edildiği, rapor edilmiştir.

Göksungur, Uçan ve Güvenç (2004) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, şeker pancarı melasının çeşitli kimyasal proseslerden geçirildiği ve fermantasyon ortamı olarak *A. pullulans* P56 suşu ile pullulan üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada ayrıca, sentetik bir besiyerinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerin de gerçekleştirildiği ve her iki ortamda yapılan deneyler sonucunda elde edilen ekzopolisakkaritlerin pullulan saflıklarının değerlendirildiği belirtilmiştir. Anılan çalışmada, fermantasyon ortamında kullanılacak şeker pancarı melasının, sülfürik asit ile hidrolize edildikten sonra, aktif karbon ile muamele edilip, başlangıç şeker konsantrasyonunun; 50 g/L olacak şekilde ayarlandığı belirtilmiştir. Sentetik ortam kullanıldığında ise, ortamdaki şeker derişiminin; 50 g sakkaroz/L olduğu rapor edilmiştir. Söz konusu araştırmada sonuç olarak; sentetik ortam fermantasyon ortamı olarak kullanıldığında yüksek saflıkta pullulan elde edilirken, fermantasyon ortamında şeker pancarı melası kullanıldığında üretilen polisakkaritin, yaklaşık olarak yarısının, pullulan dışında diğer polisakkaritlerden meydana geldiğinin belirlendiği ifade edilmiştir. Anılan çalışmanın devamında, sentetik fermantasyon ortamında, farklı sakkaroz başlangıç konsantrasyonlarının (30g/L, 50 g/L, 70 g/L) ve başlangıç pH değerinin pullulan üretimi

üzerindeki etkilerinin de araştırıldığı ifade edilmiştir. Deneysel sonuçlara göre, pullulan üretimini teşvik eden en uygun başlangıç pH değerinin; 7.5 ve ortamdaki sakkaroz başlangıç derişiminin; 50 g/L olduğu rapor edilmiştir.

An ve arkadaşlarının (2017), *A.pullulans* 201253 suşu ile yaptıkları bir çalışmada; fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak patates nişastası hidrolizatı (PNH) ile sentetik karbon kaynaklarının (glukoz ve sakkaroz), çeşitli kombinasyonlarda kullanılmaları ile hazırlanan ortamların, pullulan üretim verimi üzerindeki etkilerinin incelendiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada, patates nişastasının, fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılmak üzere; α -amilaz ve amiloglukozidaz enzimleri ile hidrolize edildiği rapor edilmiştir. Araştırmada; fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak dört farklı kombinasyonun kullanıldığı belirtilmiştir. Bunlar; yalnız sakkarozun ve yalnız PNH'nin karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlar ile PNH:sakkaroz (80:20 w/w) ve PNH:glukoz:sakkaroz (80:10:10; w/w/w) kombinasyonlarının karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamlar olarak rapor edilmiştir. Söz konusu çalışma sonucunda; sakkarozun, pullulan üretimini destekleyen en iyi substrat olduğu rapor edilmiştir. Sakkarozun ekonomik açıdan pahalı bir karbon kaynağı olması nedeniyle, pullulan üreten enzim üretimini teşvik eden sakkaroz ile birlikte PNH kullanılmasının mikrobiyel pullulan üretiminde ekonomik açıdan anlamlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Tatlı patatesin farklı enzimlerle hidrolize edildikten sonra, fermantasyon ortamı olarak, *A. pullulans* AP329 suşu ile pullulan üretiminde kullanıldığı bir başka çalışmada ise; enzimatik hidrolizasyon için; α -amilaz, β -amilaz, amiloglukozidaz ve pullulanaz enzimlerinin, farklı kombinasyonlarda ve hidrolizasyon sürelerinde kullanıldıkları bildirilmiştir. Analizler sonucunda ilk olarak; α -amilaz ile, sonrasında β -amilaz ve pullulanaz enzimleri ile, 48 saat boyunca hidrolize edilen tatlı patateslerden elde edilen hidrolizatın, diğer kombinasyonlardan elde edilen hidrolizatlardan daha fazla şeker içerdiği bildirilmiştir. Sözü edilen çalışmada daha sonra ise; bu şekilde elde edilen hidrolizatın, pullulan üretiminde kullanılacak fermantasyon ortamına sakkaroz yerine, farklı derişimlerde (w/v) (5%, 7.5%, 10%, 12.5% ve 15%) eklenerek kullanıldığı belirtilmiştir. Sonuç olarak; elde edilen en yüksek pullulan derişimine (29.43 g/L); %5 oranında tatlı patates hidrolizatı eklenmiş fermantasyon ortamında ulaşıldığı da rapor edilmiştir (Wu ve ark., 2009).

2.1. Kesikli fermantasyon sistemlerinde kullanılan kinetik eşitlikler

2.1.1. Özgül Üreme Hızı

Kesikli fermantasyon sistemlerinde, mikroorganizmaların üreme hızı, ortamdaki mikroorganizma derişiminin zamanla değışimi olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmaların üssel üreme bölgesinde üreme hızı, ortamdaki mikroorganizma derişimi ile doğru orantılı olarak değışmekte olup, Eş. 2.1 ile ifade edilmektedir (Maier, Pepper ve Gerba, 2011; Dönmez, 2017) .

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte, X ; mikroorganizmanın kuru ağırlık cinsinden derişimini (g mikroorganizma/L), t ; zamanı (sa), μ ; ise özgül üreme hızını (sa^{-1}) göstermektedir.

Mikroorganizmaların üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı, Eş. 2.1'in değışkenlerine ayrılarak düzenlenmesi sonucunda elde edilen diferansiyel denklemin her iki tarafının integralinin alınmasıyla elde edilen Eş. 2.2 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte, X_0 ; üssel üreme evresinin başladığı anda ($t = 0$) fermantasyon ortamdaki mikroorganizma derişimini, X ise üssel üreme evresinde, t anındaki mikroorganizma derişimini göstermektedir.

Mikroorganizmaların üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları, bu evredeki mikroorganizma derişimleri kullanılarak hesaplanan $\ln X$ değışlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler çizilmesiyle elde edilen doğruların eğimlerinden, Eş. 2.2 kullanılarak hesaplanmaktadır.

2.1.2. Özgöl ürün oluşum hızı

Kesikli fermantasyon sistemlerinde, özgöl ürün oluşum hızı (v) (Eş. 2.3), ürün oluşum hızının mikroorganizma derişimine oranı olarak tanımlanmaktadır (Shuler and Kargı, 2002).

$$v = \frac{dP}{dt} \frac{1}{X} \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte, v , özgöl ürün oluşum hızını [g pullulan/(g mikroorganizma.sa)], dP/dt ürün oluşum hızını [g pullulan/(L.sa)], X , ise ürün oluşum hızı hesaplandığı andaki mikroorganizma derişimini (g mikroorganizma/L) göstermektedir.

Bu araştırmada, özgöl pullulan oluşum hızı değerleri pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla derişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, önce, pullulan derişimlerinin zamanla derişimlerini gösteren eğriler kullanılarak, farklı zamanlardaki ürün oluşum hızları hesaplanmış, daha sonra ise bulunan her bir hız değeri, bu değerin hesaplandığı anda fermantasyon ortamında bulunan mikroorganizma derişimine bölünerek aynı zamana karşı gelen özgöl ürün oluşum hızı değeri hesaplanmıştır.

2.1.3. Substrat Tüketim Hızı

Bir mikroorganizmanın substrat tüketim hızı (r_s), fermantasyon ortamındaki substrat derişiminin zamanla derişimi (Eş. 2.4) olarak ifade edilmektedir (Liu, 2013).

$$r_s = - \frac{dS}{dt} \quad (2.4)$$

Bu çalışmada, farklı doğal substrat kaynaklarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki başlıca şeker türlerinin zamanla derişimleri tayin edilmiş ve elde edilen sonuçlar grafikler üzerinde gösterilmiştir. Her bir substrat için substrat tüketim hızları ise bu grafiklerdeki eğrilerin farklı zamanlardaki eğim değerleri bulunarak hesaplanmıştır.

2.2. Yanıt Yüzey Yöntemi

Optimizasyon; bir sistemin, prosesin yada ürünün performansını artırıp ondan maksimum seviyede yarar sağlamaya yönelik olarak yapılan bir çalışma olarak adlandırılmaktadır (Bezerra ve ark., 2008). Yanıt yüzey yöntemi ise; istatistiksel ve matematiksel yöntemler kullanılarak proses koşullarının optimize edilmesi ve ulaşılması istenen hedefin maksimum seviyeye çıkarılması amacıyla yapılan, bir deneysel modelleme yöntemidir (Baş ve Boyacı, 2007).

Bu yöntemde bağımlı değişkenler (y) ile bu bağımlı değişkenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin (x_i) birbiri arasındaki ilişkinin düşük dereceli bir polinom ile ifade edilebileceği belirtilmiştir (Myers, Montgomery ve Anderson-Cook, 2016). Yanıt adı da verilen bağımlı değişkenlerin; bağımsız değişkenlere bağlı olarak değişim gösterdikleri ifade edilmektedir.

Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyon sırasında takip edilmesi gereken aşamalar aşağıda verilmektedir (Bezerra ve ark., 2008).

1. Çalışmanın ulaşılmak istenen hedefine yönelik bağımsız değişkenlerin belirlenmesi
2. Deney tasarımında kullanılacak modelin belirlenmesi
3. Deney sonucunda elde edilen verilerin matematiksel ve istatistiksel yöntemler ile seçilen modele uygunluğunun test edilmesi
4. Elde edilen modelin seçilen yöntemle uygunluğunu olumsuz etkileyen değerlerin tekrar değerlendirilmesi, gerekiyorsa transformasyon yapılarak bu değerlerin düzeltilmesi
5. Belirlenen her yanıt değeri için, optimum değerlerin belirlenmesi

Yanıt (y) ile bağımsız değişkenler ($x_1, x_2 \dots x_i$) arasındaki ilişki; Eş 2.5’de ifade edilmiştir (Baş ve Boyacı, 2007).

$$y = f(x_1, x_2 \dots x_i) + \epsilon \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte yer alan y ; yanıtı, $f(x_1, x_2, \dots, x_i)$; yanıtı etkileyen bağımsız değişkenlerin fonksiyonunu, i , bağımsız değişkenlerin sayısını ve ϵ istatistiksel hatayı ifade etmektedir.

ϵ değerinin, ortalama değerinin sıfır olduğu, normal dağılım gösterdiği ve varyans değerinin ise; σ^2 olduğu belirtilmektedir (Myers, Montgomery ve Anderson-Cook, 2016).

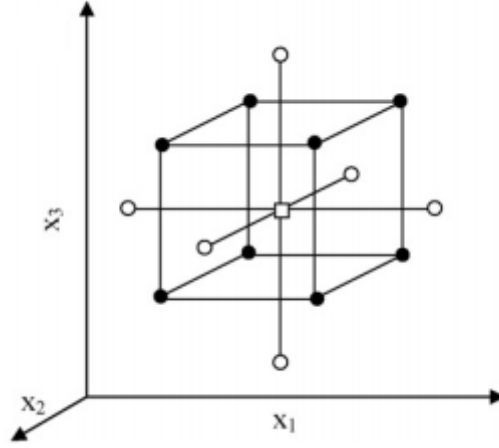
Deneyisel çalışmalarda bağımlı değişkenler üzerinde en çok etkisi olan bağımsız değişkenlerin seçimi ve düzeylerinin belirlenmesi önemli bir aşama olarak kabul edilmektedir. Bağımsız değişkenlerin düzeyleri değiştikçe, elde edilen yanıtın değeri de değişim göstermektedir. Bağımsız değişkenlere ait minimum ve maksimum değerler belirlendikten sonra modelleme aşaması gerçekleştirilmektedir. Optimizasyon programları yardımıyla bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkilerini incelemek üzere farklı deneysel matris modelleri ifade edilmiştir. Bunlar; birinci dereceden modeller (Plackett-Burman tasarımı, 2^k faktoriyel tasarımı, vb.) ile ikinci dereceden modeller (3^k faktoriyel tasarımı, merkezi karma tasarımı, Box-Behnken tasarımı) olarak ifade edilmektedir (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010). Bu aşamada, deney tasarımına uygun olan matris dizaynının belirlenmesi gerektiği bildirilmektedir.

Merkezi karma tasarım yönteminde deney dizaynı üç kısımdan oluşmaktadır. Bunlar; (1) Çok etkenli, -1 ve +1 olarak kodlanan faktöriyel noktalar, (2) her bir faktör için belirlenen merkez noktalar, (3) merkez noktadan $\pm \alpha$ kadar uzaklıkta olan yıldız noktalar olarak tanımlanabilir (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010). Sözü edilen α değeri Eş. 2.6. kullanılarak hesaplanmaktadır (Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010).

$$\alpha = [2^k]^{1/4} \quad (2.6)$$

Bu eşitlikte k , bağımsız değişken sayısını ifade etmekte olup iki bağımsız değişkenli tasarımlarda α değeri; 1.414, üç bağımsız değişkenli tasarımlarda ise α değeri; 1.682 olarak hesaplanmaktadır.

Merkezi karma tasarımında, iki ya da üç bağımsız değişkenli bir tasarımın yanıtlar üzerindeki etkileri incelenebilmektedir. 3 bağımsız değişkenli deney tasarımında bağımsız değişkenler; $-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$ olarak, beş seviyede incelenmektedir (Bezerra ve ark., 2008). Üç bağımsız değişkenli bir tasarımda merkezi karma yönteminde merkez nokta, yıldız nokta ve faktöriyel noktaların yerleşimi Şekil 2.2.'de belirtilen küpe benzetilmektedir (Bezerra ve ark., 2008).



Şekil 2.2. Üç bağımsız değişkenli merkezi karma sistemi modeli; (●) faktöriyel nokta, (○) yıldız nokta, (□) merkez nokta

Döndürülebilir merkezi karma tasarımı ile oluşturulan deney dizaynındaki deney sayısı (n) ise; Eş 2.7 kullanılarak hesaplanmaktadır (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010).

$$n = 2^k + 2k + n_0 \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte k; bağımsız değişken sayısını ifade ederken, n_0 ise; merkez noktadaki tekrar edilen deney sayısını ifade etmektedir.

Birden fazla bağımsız değişkenin bulunduğu modellerde, varyans analizi (ANOVA) yapılarak, deneysel verilerin bağımsız değişkenler ile olan ilişkilerinin yorumlanması gerektiği belirtilmektedir. Varyans analizi; deneysel verilerin analizi için yapılan istatistiksel tekniklerin toplamı olarak tanımlanmaktadır (Bezerra ve ark., 2008). Varyans analizi yapılırken elde edilen deneysel verilerin kurulan modele uygunluk seviyesi, belirli güven aralıklarında belirlenmelidir. Bu amaçla sıklıkla kullanılan güven aralıkları; 0.05 ve 0.01 olarak belirtilmektedir (Kavuncu, 2010). Kurulan modelin istatistiksel olarak öneminin belirlenmesi amacıyla; Fischer testi (F test) ve uyum eksikliği testi kullanılmaktadır. F değeri, model için oluşturulan varyansın, hata varyansına oranı olarak ifade edilmektedir. F testinde; deneysel verilerin sonucunda elde edilen F değeri ($F_{\text{hesaplanan}}$); istatistiksel yöntemlerle hazırlanmış tablolardaki; F değeri (F_{tablo}) ile karşılaştırılarak yorumlanmaktadır. Modelin geçerli olabilmesi için $F_{\text{hesaplanan}}$ değerini,

F_{tablo} değerinden büyük olması gerektiği de ifade edilmektedir (Kent, 2009). Uyum eksikliği değeri ise; elde edilen deneysel verilerin, modeldeki hata değeri ile karşılaştırılması anlamına gelmektedir. Modelin geçerli olabilmesi için bu değerin, istatistiksel açıdan önemsiz olması gerekmektedir. Aksi takdirde çıkan sonucun, seçilen model ile deneysel verilerin uyumlu olmadığı anlamına geldiği yorumu yapılmaktadır (Göksungur, Uzunoğulları ve Dağbağlı, 2011; Ramesh ve ark., 2013).

Varyans analizi yapılırken Fischer testi ve uyum eksikliği testlerine ek olarak, regresyon analizinin de yapılması ve regresyon katsayısının da (R^2) hesaplanması gerektiği belirtilmektedir. Regresyon katsayısı; tasarımdan elde edilen veriler ile deneysel verilerin, ortalama değerden uzaklaşma derecesi anlamını taşımaktadır. R^2 değeri -1 ile 1 değerleri arasında değişmektedir. R^2 değerinin 1 olması değişkenler arasında tam doğrusal bir ilişki olduğunu ifade etmekte, R^2 değerinin 0.9'dan büyük olması ise seçilen modelin deneysel verilerle büyük ölçüde uyumlu olması anlamına gelmektedir (Kavuncu, 2010).

Yanıt yüzey yönteminde en önemli aşamanın, seçilen yanıtlar için optimum değerlerin belirlenmesi olduğu ifade edilmektedir. Seçilen deney tasarımı ile deneysel çalışmalar tamamlanıp istatistiksel değerlendirmeler yapıldıktan sonra, elde edilen deneysel veriler ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin, matematiksel bir bağıntı ile ifade edilmesi gerekmektedir (Baş ve Boyacı, 2007). Ayrıca bağımsız değişkenlerin, yanıt üzerindeki etkilerinin görülebildiği iki boyutlu kontür grafikleri ile, üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri yardımıyla yanıt değişkeni için elde edilen maksimum ve minimum değerler belirlenerek, yanıt için optimal koşullar tespit edilebilmektedir (Baş ve Boyacı, 2007; Myers, Montgomery ve Anderson-Cook, 2016). Birden çok yanıt için optimum koşulların belirlenmesi ise; istenen hedefe ulaşma fonksiyonu (desirability function) ile yapılabilmektedir. İstenen hedefe ulaşma fonksiyonu (d); 0 ile 1 arasında değişim göstermektedir. Bu değerin bire yaklaşmasının, belirlenen optimum koşullarda, istenilen hedefe ulaşıldığı anlamına geldiği de belirtilmektedir (Murphy, Tsui ve Allen, 2005).

Literatürde yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, çeşitli *A. pullulans* suşları ile pullulan üretiminde fermantasyon koşullarının optimize edildiği bazı çalışmalar rapor edilmiştir. Sıcaklık, başlangıç pH değeri ve fermantasyon süresi gibi bazı koşulların yanıt yüzey yöntemi ile optimize edildiği bir çalışmada; *A. pullulans* SK1002 suşunun pullulan üretimi için belirlenen optimal koşullar; fermantasyon ortamı başlangıç pH değeri; 5.5,

fermantasyon sıcaklığı; 28°C olarak rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, bu koşullarda en yüksek pullulan derişimine (30.28 g/L) fermentasyonun 5. gününde ulaşıldığı da bildirilmiştir (Jiang 2010).

Yapılan bir diğer çalışmada ise; *A. pullulans* MTCC 2195 suşu ile ekzopolisakkarit üretimi için kullanılan bir fermentasyon ortamında, karbon kaynağı olarak sakkaroz yerine tatlı patatesin, bir öğütücüde çekilerek elde edilen tozunun kullanıldığı ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada, fermentasyon parametrelerinin optimizasyonu için; Plackett-Burman dizaynı ile merkezi karma tasarım yönteminin kullanıldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada; Plackett-Burman dizaynı kullanılmasının, fermentasyon ortamına eklenecek fazla sayıdaki bileşenin, tasarlanan az sayıdaki deney ile değerlendirebilme imkanını sağladığı da belirtilmiştir. Söz konusu araştırmada; merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan; tatlı patates tozu ile azot kaynağı olarak kullanılan; maya özütü miktarlarının, fermentasyon ortamı başlangıç pH'ının ve fermentasyon süresinin optimize edildiği ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, maksimum EPS derişimine (9.3 g/L), fermentasyon ortamı bileşiminde kullanılan tatlı patates tozunun; %10 (w/v) ve maya özütünün % 0.75 olduğu, başlangıç pH'ının 5.5 olarak ayarlandığı koşullarda, fermentasyonun 100. saatinde ulaşıldığı rapor edilmiştir. Sözü edilen çalışmada ayrıca, karbon kaynağı olarak tatlı patates tozunun kullanılmasıyla hazırlanan fermentasyon ortamının, sentetik karbon kaynağı olan sakkaroz kullanılarak hazırlanan fermentasyon ortamına göre daha ekonomik olduğu da belirtilmiştir (Padmanaban ve ark., 2015).

Metha, Prasad ve Choudhury (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; *A. pullulans* RBF 4A3 suşu ile pullulan üretiminde, maliyeti düşürmek amacıyla fermentasyon ortamı olarak palmiye şekeri, biyodizel üretim fabrikalarından sağlanan, yağından arındırılmış jatrofa tohumu keki ve nişasta fabrikalarından temin edilen mısır maserasyon sıvısının kullanıldığı rapor edilmiştir. Yapılan araştırmada; doğrudan fermentasyon ortamı olarak kullanılan bu substratların, merkezi karma tasarım yöntemi ile, farklı oranlarda kombine edildiği bir deney modelinin oluşturulduğu belirtilmiştir. Belirtilen çalışmada, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, sözü edilen doğal substratların pullulan üretimi üzerine olan etkilerinin, ikinci dereceden bir model ile ifade edilebildiği de belirtilmiştir. Analizler sonucunda; maksimum pullulan üretimi için belirlenen optimal fermentasyon ortamı bileşiminin; %18 (w/v) palmiye şekeri, %3 (w/v) jatrofa tohumu keki ve %0.97

(w/v) mısır maserasyon sıvısı, olarak belirlendiği ve bu ortamda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin ise; 66.25 g/L olarak tayin edildiği bildirilmiştir.

Göksungur ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları bir çalışmada, karıştırmalı bir tank reaktöründe *A. pullulans* P56 suşu ile pullulan üretimi için bazı işletme parametrelerinin (fermantasyon ortamındaki şekerin başlangıç derişimi, havalandırma oranı ve çalkalama hızı), optimizasyonu amacıyla, yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, elde edilen deneysel sonuçların ikinci dereceden bir polinoma uyduğu ifade edilmiştir. Optimum olarak belirlenen başlangıç şeker derişiminin; 51.4 g/dm³, havalandırma oranının; 2.36 vvm ve çalkalama hızının; 345.3 rpm olduğu bu eşitliklerden tespit edildiği bildirilmiştir. Optimal koşullarda yapılan deneyler sonucunda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin; 17.2 g/dm³ olarak tayin edildiği de belirtilmiştir.

Pullulan üretiminde, beş düzeyli beş bağımsız değişkenin merkezi karma tasarım yöntemi ile değerlendirildiği bir başka çalışmada ise; fermentasyon ortamındaki farklı sakkaroz, amonyum sülfat, maya özütü, dipotasyum hidrojen fosfat ve sodyum klorür derişimlerinin; bağımlı değişkenler olarak belirlenmiş olan; pullulan derişimi, biyokütle derişimi ve şeker kullanımı yüzdesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bildirilmiştir. Belirtilen bağımlı değişkenler için, gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucunda bulunan; fermentasyon ortamının optimal bileşimi (w/v); % 5.31 sakkaroz, %0.11 amonyum sülfat, %0.07 maya özütü, % 0.05 dipotasyum hidrojenfosfat ve %0.15 sodyum klorür olarak rapor edilmiştir. Çalışmada pullulan derişimi; 100 mL fermentasyon ortamında üretilen kuru ağırlık miktarı cinsinden hesaplanmış olup, optimal koşullarda tespit edilen en yüksek pullulan derişiminin; %4.44 olarak belirlendiği rapor edilmiştir. (Singh, Singh ve Saini, 2009).

Fermentasyon yolu ile pullulan üretimi üzerine gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise; fermentasyon ortamının başlangıç pH değeri, fermentasyon süresi ve çalkalama hızının; *A. pullulans* P56 suşunun, pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği ve pullulan üretiminin, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edildiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada deneylerde kullanılan suşun, kalsiyum aljinat kürecikleri kullanılarak immobilize edildiği ve bu nedenle de ürünün ayrılmasının kolaylaştığı, ürünün kullanılan mikroorganizma ile kontaminasyon riskinin de azaldığı rapor edilmiştir. Anılan çalışmada sonuç olarak; optimum olarak belirlenen koşullarda; fermentasyonun 101.2.

saatinde, fermentasyon ortamı başlangıç pH'sı; 7.31 ve çalkalama hızı; 191.5 rpm'de ulaşılan maksimum pullulan derişiminin; 21.07 g/dm³ olarak tayin edildiğı ifade edilmiştir (Ürküt, Dağbağı ve Göksungur, 2007).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Araştırmada kullanılan *A. pullulans* AZ-6 suşu, laboratuvarımızda daha önceden yapılmış bir araştırma sırasında, ham Gemlik zeytini örneğinden izole edilmiş, fenotipik ve moleküler yöntemler ile tanımlanmış ve kültür koleksiyonumuza kazandırılmış bir suştur. Bu suş deneyler sırasında bileşimi (g/L); glukoz; 10, malt özütü; 3, maya özütü; 3 ve bakteriyolojik pepton; 5 olan Yeast Extract Malt Extract (YM) broth besiyerinde, 28°C’de yaklaşık 48 saat inkübasyonda bırakılarak canlandırılmıştır. Aktifleştirilen kültür daha sonra YM agar yatık besiyerinde; 28°C’de 48-72 saat geliştirildikten sonra 4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Bu işlem rutin aralıklarla tekrar edilerek, deneylerde kullanılan; *A. pullulans* AZ-6 kültürleri hazırlanmıştır.

3.1.2. Besiyeri

Çalışmada kullanılan kültür ortamı; fermantasyon ortamına aşılama yapılmadan önce *A. pullulans* AZ-6 kültürünün geliştirildiği ortamdır. Bu çalışmada, deneylerde kullanılan kültür ortamının bileşimi (g/L); sakkaroz; 30, maya ekstraktı; 3.0, (NH₄)₂SO₄; 2.0 K₂HPO₄ 5.0, NaCl 1.0 ve MgSO₄.7H₂O; 0.2 olarak kullanılmıştır (Thirumavalavan, Manikkadan ve Dhanasekar, 2009). Fermantasyon ortamı için inokulum hazırlanmasında; YM agar besiyerinde aktifleştirilmiş olan *A. pullulans* AZ-6 suşundan bir öze dolusu alınarak, 250 mL’lik erlen içerisinde yer alan 50 mL hacmindeki kültür ortamına aşılama yapılmış ve daha sonra aşılama ortamı 100 vuru/dak sabit çalkalama hızına sahip bir su banyosunda, 28°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.3. Fermantasyon ortamında kullanılan doğal substratlar

Bu çalışmada, çeşitli doğal substrat kaynakları kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamlarının, yerel bir suş olan; *A. pullulans* AZ-6’nın pullulan üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde, doğal substrat kaynakları olarak; çeşitli turuncgil kabukları (portakal, limon, greyfurt, turunç), şarap fabrikası artığı olan; iki farklı cins (Chardonnay ve Çalkarası) üzümünden elde edilmiş posa örnekleri, kestane ve fındık

kabuklarından hazırlanmış olan hidrolizatlar, şeker kamışından pekmez üretimi sırasında çıkan artık, kuru ve taze fındık zürüfları/çotanakları veya balkabağı kabuğu kullanılmıştır.

Bu araştırmada, deneylerde kullanılan turunçgil kabukları (portakal, limon, greyfurt, turunç) ayrı ayrı kurutulmuş olarak, Osmaniye’deki Afra Tarım Ürünleri Şirketi’nden temin edilmiştir (Şekil 3.1.).



(a)



(b)



(c)



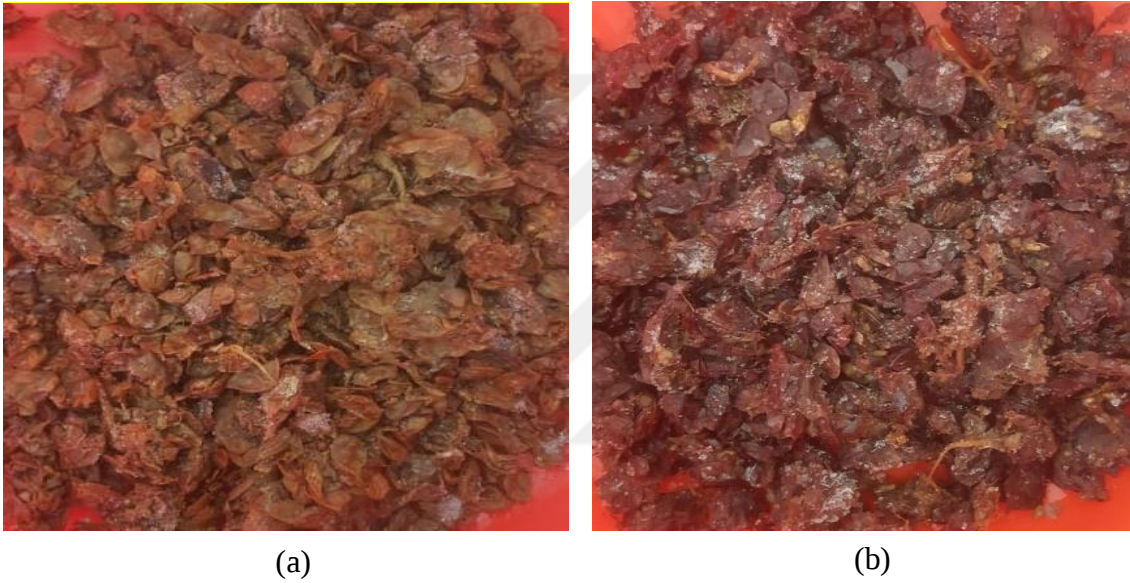
(d)

Şekil 3.1. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan kurutulmuş turunçgil kabuğu örnekleri; (a) Portakal, (b) Limon, (c) Greyfurt, (d) Turunç

Turunçgil kabukları bileşimlerinde, yüksek oranda kompleks bir karbonhidrat olan pektin molekülünü içermektedirler (Ahmed ve ark., 2016). Ayrıca, turunçgil kabuklarında, kabuk yağı olarak da adlandırılan, yoğun aroma bileşenleri içeren bazı maddeler de bulunmaktadır (López, Li ve Thompson, 2010). Kabuk yağı ve pektin kozmetik, eczacılık ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanım alanı bulmaktadır. Turunçgil üretimi oldukça zengin olan ülkemizde değerlendirilemeden kalan kabukların, ekonomik açıdan

da önem taşıyan pullulan üretimi amacıyla fermantasyon ortamı olarak incelenmeleri amaçlanmıştır.

Bu araştırmada, farklı cins üzümelerin (Chardonnay ve Çalkarası) şaraba işlenmeleri sırasında çıkan üzüm posaları, Ankara, Akyurt'taki Kavaklıdere Şarapları A.Ş.'ye ait fabrikadan temin edilmiştir (Şekil 3.2.). Şekil 3.2.b'de görülen Çalkarası cinsi üzüm posasının cibre fermantasyonu sonucunda elde edildiği belirtilmiştir. Şarap fabrikası artığı olan üzüm posalarının, bileşimlerindeki fenolik ve antioksidan maddeler ile, şeker içeriğinden ötürü, fermantasyon ortamı olarak çeşitli çalışmalarda, değerlendirilmeye uygun bir artık olduğu ifade edilmiştir (Arvanitoyannis, Ladas ve Mavromatis, 2006).



Şekil 3.2. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan farklı cins üzümelerin posaları; (a) Chardonnay cinsi üzüm posası, (b) Çalkarası cinsi üzüm posası

Deneylerde bir diğer fermantasyon ortamı olarak incelenen; kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, Abant İzzet Baysal Üniversitesi (AİBÜ), Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde hazırlanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları

Kestane kabukları Bursa’da bulunan Kafkas Pasta Şekerleme Sanayi ve Ticaret A.Ş.’ye ait bir işletmeden, fındık kabukları ise Düzce’deki yerel üreticilerden temin edilmiştir. Kestane kabuğunun, tıp ve eczacılık endüstrisinde kullanıldığı bilinmektedir (Kendir, Öztürk ve Köroğlu, 2016). Türkiye yoğun olarak fındık üretiminin gerçekleştiği bir ülkedir. Fındığın içinin çıkartılması ve değişik ürünlere işlenmesi esnasında, atık madde olarak ortaya çıkan fındık kabuğunun, yüksek oranda lignoselülozik madde içerdiği bilinmektedir (Uzuner ve Çekmecelioğlu, 2014). Bu lignosellülozik maddenin içeriğindeki lignin, selüloz ve hemiselüloz yapılarının enzimatik olarak veya asit yada baz hidrolizi gibi yöntemlerle ayrıştırılması ile ortaya çıkan hidrolizatın mikroorganizmalar tarafından daha kolay kullanılabilir şekerlerce zengin bileşenler içerdiği bildirilmiştir (Pınar ve ark., 2017). Lignoselülozik içeriği yüksek olan maddelere uygulanan asit hidrolizi sonucunda fermente edilebilir şeker olarak ksiloz ve glukoz meydana geldiği belirtilmiştir (Eryaşar, 2016). *A. pullulans* ksiloz ve glukoz fermente edebilen (Chen ve ark., 2014) bir mikroorganizma olduğundan pullulan üretiminde kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Deneylerde kullanılan şeker kamışı pekmezi artığı (ŞKPA), Düzce’nin Çilimli ilçesinin Tepe köyünden, organik şeker kamışı tarımı yapan bir üreticiden temin edilmiştir. Pekmez üretimi amacıyla kullanılan şeker kamışları; Ekim-Kasım aylarında hasat edildikten sonra yapraklarından ayrılarak, ezme makinesinden geçirilip, suları elde edilmektedir. Bitkinin açık yeşil renkli suyu daha sonra, ipek elekten ve tülbenkten geçirilerek süzülmekte ve ardından, üzeri açık kazanlarda karıştırarak 8-10 saatlik bir

kaynatma işlemine tabi tutulmaktadır. Kaynatma esnasında yüzeyde biriken köpüklü tabaka zaman zaman ayrılarak ayrı bir yerde biriktirilmektedir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan şeker kamışı pekmezi artığı (ŞKPA)

Bu köpüklü kısmın bileşiminde; hammaddeden gelen mumsu maddelerin yanısıra yağ, pektik asit, çeşitli azotlu bileşikler ve sakkaroz ile birlikte, çeşitli renk pigmentlerinin (klorofil, antosiyanin vb.) bulunduğu belirtilmektedir (Nualsri, Reungsang ve Plangklang, 2015). Pekmez kalitesini olumsuz etkilemesi nedeniyle, kaynatma süresince bu tabakanın ayrılarak atıldığı ifade edilmektedir. Şeker kamışı üretiminin ülkemizde henüz çok yaygın olmadığı bilinmekle birlikte, zengin bileşim özellikleri nedeniyle, deneylerde pullulan üretimi amacıyla, ŞKPA'nın da fermantasyon ortamı olarak incelenmesine karar verilmiştir.

Deneylerde kullanılan; Tombul cinsi fıındığın; kuru ve taze fıındık zürufları/çotanakları, Giresun'un Tirebolu ilçesinden temin edilmiştir (Şekil 3.5.).



(a)

(b)

Şekil 3.5. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan ; (a) kuru fındık zürufu, (b) taze fındık zürufu

Türkiye fındık üretimi ve ithalatı açısından dünyada lider olan ülkelerden biri konumundadır. Bu nedenle fındık üretimi Türkiye’de yoğundur. Fındık üretimi esnasında ortaya çıkan zürufun; tarım alanlarında gübre olarak yada ısı enerjisi üretimi için kullanıldığı belirtilmektedir (Çöpür ve ark., 2007). Bileşen olarak zengin olan fındık zürufunun, pullulan üretimi amacıyla incelendiği başka bir araştırma da bulunmaması nedeniyle bu atığın fermantasyon ortamı olarak incelenmesi, tezin amacı için de uygun bulunmuştur.

Bu araştırmada fermantasyon ortamı olarak denenen diğer bir doğal substrat kaynağı olan; kestane cinsi balkabağı kabuğu ise, Ankara ilinin Ayaş ilçesindeki yerel bir üreticiden temin edilmiştir (Şekil 3.6.). Gıda endüstrisinde yaygın kullanım alanına sahip olan pektin maddesi ile çeşitli polisakkaritler balkabağı kabuğunda yoğun olarak bulunmaktadır (Hamed ve Mustafa, 2018). Balkabağı kabuğunun içeriğindeki zengin bileşenlere rağmen, pullulan üretimindeki fermantasyon ortamında daha önce yapılan çalışmalarda kullanılmamış olmasından ötürü, bu doğal substratın fermantasyon ortamı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.6. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak kullanılan balkabağı kabuğu

Deneylerde fermantasyon ortamı olarak ayrı ayrı kullanılan her bir doğal substrat, kullanılan hammaddenin özelliklerine uygun olarak bazı ön işlemlerden geçirilerek ortamlar hazırlanmıştır.

3.1.4. Deney düzeneği

Bu araştırmada yapılan deneyler, kesikli sistemde; sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen çalkalamalı su banyolarında, 150 mL'lik çalışma hacminde, 300 mL'lik erlenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde, Nüve ST-402 ve Grant SS40-D modellerindeki çalkalamalı su banyoları kullanılmıştır. Çalışma sırasında sıcaklık *A. pullulans* AZ-6 suşu için, daha önce yapmış olduğumuz bir araştırmada bulmuş olduğumuz optimum sıcaklık olan; 24.2°C'de, karıştırma hızı ise; 100 vuru/dak'da sabit tutulmuştur. Hazırlanan ortamların başlangıç pH'ları da, daha önce belirlenmiş olan optimum pH olan; 6.48'e ayarlanmıştır ve fermantasyon deneyleri, karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Doğal substrat kaynaklarından fermantasyon ortamlarının hazırlanmaları

3.2.1.1. Turunçgil kabukları

Üreticiden temin edilmiş olan turunçgil kabukları, deneylerde kullanılıncaya kadar herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan buzdolabında, -18°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Fermantasyon ortamı olarak kullanılacak olan turunçgil kabuklarına bir asit hidrolizi uygulanarak, bileşimlerindeki şekerlerin özütlenmeleri hedeflenmiştir. Bu amaçla; Talebnia ve ark. (2008) tarafından önerilen yöntem kısmen modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak; donmuş turunçgil kabukları ayrı ayrı çözündürülerek, yaklaşık; 5 cm boyutunda olacak şekilde parçalanmışlardır. Küçültülen kabuk parçaları daha sonra; laboratuvar tipi bir öğütücü (Spice&Herb Grinder IC-04A, Çin) yardımıyla, yaklaşık 2 mm boyutunda olacak şekilde parçalamaya tabi tutulmuşlardır. 0.5 mL, %98'lik derişik H₂SO₄ (Sigma Aldrich, USA) çözeltisinin, 100 mL saf suya eklenmesiyle hazırlanan çözelti, öğütölmüş turunçgil kabuklarına uygulanacak olan asit hidrolizi amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan asit çözeltisi, uygun hacimdeki kapaklı deney şişelerine ayrı ayrı konulmuş olan öğütölmüş kabuklar üzerine; kabuk (g): asit çözeltisi (mL); 10:100 (w/v) olacak şekilde eklenmiştir. Elde edilen karışım oda sıcaklığında, rutin olarak karıştırma işlemi yapılarak yarım saat bekletilmiş ve daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika tutulmuştur (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Asit hidrolizi uygulanan turunçgil kabukları

Otoklavdan çıkarılan karışım soğutulduktan sonra, katı kısmı temiz bir tülbent yardımıyla süzölmüş ve elde edilen süzöntü, bir santrifüjde (Sigma, 3-18 K, Almanya) 10 000 rpm'de 15 dakika tutularak santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi sonrasında elde edilen hidrolizat, fermantasyon ortamı olarak kullanılmak üzere, bir otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak sterilize edilmiş ve daha sonra bu ortamın pH'sı 6.48'e ayarlanmıştır.

Hazırlanan fermantasyon ortamının bileşimindeki glukoz ve fruktozun (Grohmann, Cameron ve Buslig, 1995) başlangıç derişimlerinin tayinleri; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılarak, spektrofotometrik olarak

gerçekleştirilmiştir. Ortamın başlangıç sakkaroz derişiminin tayini ise; fenol sülfürik asit yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Dubois ve ark., 1956). Şeker derişimi ölçümleri; Boeco, S-30 model (Almanya) bir spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

3.2.1.2. Üzüm posası

Deneylerde kullanılacak olan üzüm posalarının fermantasyon ortamı olarak hazırlanmasında; Israilides ve arkadaşları (1998) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak üzüm posası örnekleri, sıcaklığı yaklaşık; 65-70°C'deki saf su örneği ile 3:1 (w/v) oranında olacak şekilde sulandırılmış ve daha sonra laboratuvar tipi bir blendera (Isolab, Türkiye) aktarılarak zaman zaman karıştırılmış ve örnek yarım saat bekletilmiştir. Karıştırma işleminden sonra örnekler, temiz çift katlı bir tülbent yardımıyla süzölmüş ve elde edilen süzöntöler daha sonra; 4100 rpm'de 20 dakika santriföjleme (Nüve, NF 400, Türkiye) işlemine tabi tutulmuşlardır. Daha sonra elde edilen üzüm posası özütleri, otoklavda 121°C'de 15 dakikada sterilize edilmiş ve soğutulduktan sonra başlangıç pH'ları 6.48'e ayarlanmıştır. Üzüm posası örneklerinden hazırlanmış olan fermantasyon ortamlarının bileşimlerindeki glukoz ve fruktozun başlangıç derişimleri; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılarak, spektrofotometrik ölçölmüştür.

3.2.1.3. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları

Bu çalışmada, deneylerde fermantasyon ortamları olarak kullanılan kestane ve fındık kabuklarından hazırlanmış hidrolizatlar, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (AİBÜ), Mühendislik Faköltesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmişlerdir. Asit hidrolizi ve detoksifikasyon uygulanan hidrolizatların hazırlanışları Ek 1'de verilmiştir (Eryaşar, 2016).

Başlangıç pH değeri yaklaşık 6.48 olan kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, deneylerde pullulan üretimi amacıyla ayrı ayrı fermantasyon ortamları olarak kullanılmışlardır. Kestane kabuğu hidrolizatı ortamının, bileşimindeki glukoz ve ksilozun başlangıç derişimleri sırasıyla; D-glukoz ve D-ksiloz enzimatik test kitleri (Megazyme, İrlanda) ile tayin edilmiştir. Fındık kabuğu hidrolizatı ortamında ise; ölçölebilir düzeyde glukoz bulunmaması nedeniyle yalnızca ortam bileşimindeki, ksilozun başlangıç derişimi aynı kit kullanılarak, spektrofotometrik yolla, enzimatik olarak analiz edilmiştir.

3.2.1.4. Şeker kamışı pekmezi artığı

Şeker kamışından pekmez üretiminde; kaynatma işlemi sırasında, üst kısımda toplanan köpüğümsü ve kaymak olarak da adlandırılan tabakanın bileşiminin, şeker kamışının bileşimi ile benzer olduğu ve bu kısmın içerisinde; fazla miktarda sakkarozun bulunduğu rapor edilmiştir (Nualsri, Reungsang ve Plangklang, 2015; Wei ve ark., 2017). Bu nedenle kullanılıncaya kadar, buzdolabı koşullarında 4°C’de bekletilen ŞKPA örneğinin bileşimindeki sakkaroz derişimi tayin edilmiştir. Bu amaçla; fenol-sülfürik asit yönteminden yararlanılmıştır (Dubois ve ark., 1956). Daha sonra; fermantasyon ortamı olarak kullanılmak üzere, ŞKPA’nın bileşimindeki sakkaroz miktarı; 100 g/L olacak şekilde saf su ile seyreltilmiş ve bu şekilde hazırlanan örnek, 4100 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında tortu ayrılarak, üstte kalan kısım otoklavda 121°C’de 15 dakika tutularak sterilize edilmiş ve otoklavlama sonrasında fermantasyon ortamı olarak kullanılmak üzere pH’sı aseptik koşullarda; 6.48’e ayarlanmıştır.

3.2.1.5. Kuru ve taze fındık zürüfları

Bu çalışmada, üreticiden doğrudan sağlanan taze fındık zürüfları, laboratuvarımızda bulunan bir öğütücü (Spice&Herb Grinder IC-04A, China) cihaz yardımıyla yaklaşık; 3 mm boyutunda olacak şekilde öğütülmüş ve kullanılıncaya kadar hazırlanmış olan örnekler, -18°C’de muhafaza edilmiştir.

Kuru fındık zürüflarından fermantasyon ortamının hazırlanmasında ise ilk olarak zürüflar; yıkama amaçlı olarak soğuk sudan geçirilmişler, süzdürülmüşler ve daha sonra bir gece boyunca 70 °C’lik etüvde bekletilmişlerdir. Kurutulan örnekler daha sonra laboratuvarında, bir öğütücüden (Spice&Herb Grinder IC-04A, China) geçirilerek; mümkün olduğunca ince formda olacak şekilde çekilmişlerdir. Çekilen kuru fındık zürufu örneğinin tane boyu dağılımının belirlenmesi amacıyla; Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Temel İşlemler Laboratuvarında elek analizi yapılmıştır. Bu amaçla ISO serisi elekler seçilmiştir. Analiz için kullanılan eleklerin gözenek açıklıkları; 0.500 mm, 0.355 mm, 0.212 mm, 0.150 mm, 0.106 mm, 0.063 mm’dir. Deney sırasında elekler; en iri gözenekliden, en ince gözenekliye doğru sıralanmış ve en altta da tava bulunacak şekilde elek sarsma makinasına (Edibon, USA) yerleştirilmişlerdir. Tane boyu analizi için öğütülmüş fındık zürufundan, iyice karıştırıldıktan sonra alınan 100 g temsili örnek kullanılmıştır. Elek setinin üzerinde, en üstte bulunan eleğe örnek döküldükten

sonra, elek sarsma makinesi, 5 dakika boyunca uygun titreşimde çalıştırılmıştır. Süre sonunda yapılan eleme işlemi sonucunda her elek üstünde kalan örnek miktarları tartılmıştır. Son aşamada; elde edilen tartım sonuçları kullanılarak, öğütülmüş fındık zürufu örneğinin tane boyu dağılım grafiği hazırlanmıştır (Şekil Ek 2). Elde edilen sonuçlara göre; öğütülmüş fındık zürufu örneğinin kütlece %61'inin, 0.5 mm'den iri boyutta olduğu belirlenmiştir.

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan, kuru fındık zürufu örnekleri, kullanılıncaya kadar kuru ve serin bir ortamda saklanmışlardır. Fermantasyon ortamlarının hazırlanması için, önceden öğütülmüş olan taze ve kuru fındık züruflarına ilk olarak; asit hidrolizi uygulanmıştır (Ceylan ve Ünal, 2015). Bu amaçla; 1.25 mL, %98'lik derişik H_2SO_4 (Sigma Aldrich, USA) çözeltisinin, 100 mL saf suya eklenmesiyle hazırlanan asit çözeltisi; taze veya kuru fındık zürufu (g) : asit çözeltisi (mL) 1/20 (w/v) olacak şekilde, öğütülmüş züruf örneklerinin üzerine ilave edilmiş ve yarım saat boyunca oda sıcaklığında sık sık karıştırılarak, bekletilmiştir. Daha sonra örnekler; 121°C'de 30 dakika otoklavlanmışlardır. Otoklavdan çıkan örnekler soğutulduktan sonra, çift katlı temiz bir tülbetten geçirilerek, elde edilen süzüntüler, 9000 rpm'de 15 dakika santrifüjleme işlemine tabi tutulmuşlardır (Sigma, 3-18 K, Almanya). Santrifüj işlemi sonrasında tortular ayrılarak, elde edilen taze veya kuru fındık zürufu çözeltileri, sterilizasyon amacıyla; otoklavda, 121°C'de 15 dakika tutulmuşlar ve daha sonra; pullulan üretimi amacıyla fermantasyon ortamları olarak kullanılmak üzere pH'ları 6.48'e ayarlanmışlardır (Şekil 3.8.)

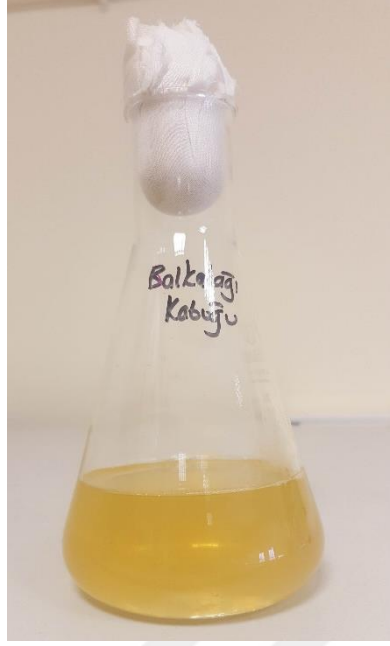
Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatı ortamlarının bileşimlerindeki ksilozun tayini amacıyla; D-ksiloz enzimatik test kiti; glukoz tayini amacıyla ise; DNS (Dinitrosalisilik Asit) yönteminden yararlanılmıştır (Miller, 1959).



Şekil 3.8. Kuru fındık zürüfü hidrolizatı besiyeri

3.2.1.6. Balkabağı kabuğu

Üreticiden sağlanan balkabağı kabukları, kullanılıncaya kadar herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan buzdolabı poşetleri içerisinde -18°C 'de muhafaza edilmişlerdir. Balkabağı kabuğunun bileşiminde pektin bulunduğu ifade edilmektedir (Du ve ark., 2011; Hamed ve Mustafa, 2018). Kabuk örneklerinin bileşiminde bulunan pektinin, fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilmesi amacıyla, turunçgil kabuklarına da uygulanan asit hidrolizi yöntemi kullanılmıştır (Talebni ve ark., 2008). Bu amaçla ilk olarak; balkabağı kabukları laboratuvar tipi bir öğütücü (Spice&Herb Grinder IC-04A, China) yardımıyla yaklaşık 2 mm boyutunda olacak şekilde parçalanmışlardır. Balkabağı kabuklarına uygulanan asit hidrolizi ve fermantasyon ortamının hazırlanmasında, daha önce turunçgil kabuklarına uygulanan işlem basamakları kullanılmıştır. Fermantasyon ortamı olarak hazırlanan balkabağı kabuğu hidrolizatının (Şekil 3.9.) pH'sı otoklavda yapılan sterilizasyon sonrasında 6.48'e ayarlanmıştır. Balkabağı hidrolizatı ortamının bileşimindeki başlangıç glukoz derişiminin belirlenmesinde; DNS yöntemi; başlangıç sakkaroz derişiminin belirlenmesinde ise; fenol sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır (Dobois ve ark., 1956; Miller, 1959).



Şekil 3.9. Balkabağı kabuğu hidrolizatı ortamı

3.2.2. *A. pullulans* AZ-6 kültürünün başlangıç inokülasyon derişiminin belirlenmesi

Daha önce Bölüm 3.1.2’de bileşimi verilen kültür ortamında, 28°C’de, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızına sahip bir su banyosunda (Grant SS40-D, İngiltere), yaklaşık 48 saat inkübasyonda bırakılarak geliştirilen *A. pullulans* AZ-6 kültürü, fermantasyon deneylerinde aşı kültürü olarak kullanılmıştır. Geliştirilmiş kültürden; doğal substrat kaynaklarından hazırlanan ve pH’ı; 6.48’e ayarlanmış olan, 150 mL’lik fermantasyon ortamına, %5 (v/v) oranında inokülasyon yapılmıştır. Deneyler sırasında, incelenen her bir fermantasyon ortamı için, *A. pullulans* AZ-6 suşu kültürünün, başlangıç inokülasyon derişimi de belirlenmiştir. Bu amaçla; %0.85’lik (w/v) serum fizyolojik kullanılarak, ardışık dilüsyonları hazırlanan kültürün, petri kutularındaki YM agar besiyerlerine, yüzeye yayma yöntemi ile paralel olarak ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekimleri yapılan petri kutuları daha sonra; 28°C’de yaklaşık 5 gün inkübe edilmişler ve süre sonunda gelişen kültürlerde sayımlar yapılarak, *A. pullulans* AZ-6 kültürünün başlangıç inokülasyon derişimleri (kob/mL) belirlenmiştir.

3.2.3. Biyokütle derişiminin tayini

Bu çalışmada, gerçekleştirilen fermantasyon deneyleri boyunca *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişiminin tayini; kuru hücre ağırlığı (g/L) temelinde ölçülmüş ve hesaplanmıştır. Biyokütle derişiminin ölçülebilmesi amacıyla; aşı kültürünün

fermantasyon ortamına aktarıldığı 0. saat de dahil olmak üzere, fermentasyon ortamından yaklaşık olarak her 24 saatte bir 10 mL kültür örneği alınarak, 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Nüve, NF 200, Türkiye). Santrifüj işlemi sonrasında, süpernatant ayrılmış ve elde edilen pelet, sıcaklık derecesi 80°C’ye ayarlanmış olan bir etüvde, sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur (Sheng, Tong ve Ma, 2016). Kurutulan pelet tartıldıktan sonra, fermentasyon ortamındaki biyokütle derişimi (g/L) hesaplanmıştır. Deneyler sırasında, biyokütle derişiminin hesaplanmasında, doğal substratlar kullanılarak hazırlanan her bir fermentasyon ortamından gelebilecek olan pelet miktarı, ortamlar hazırlandıktan sonra, biyokütle tayininde izlenen santrifüjleme ve kurutma basamakları uygulanarak hesaplanmış ve tartılan biyokütleden çıkartılmıştır.

Çalışmada; incelenen her bir fermentasyon ortamı için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılarak çizilmiştir.

3.2.4. Ekzopolisakkarit derişiminin tayini

Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından, fermentasyon ortamında üretilen ekzopolisakkaritin tayininde; etil alkol ile özütleme yönteminden yararlanılmıştır (Sharma, Prasad ve Choudhury, 2013; Sheng, Zhu ve Tong, 2014). Bu amaçla deneyler sırasında; genellikle yaklaşık 24 saatte bir olmak üzere, fermentasyon ortamından aseptik koşullar altında 10 mL’lik kültür alınarak, bu örnek, 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir (Nüve, NF 200, Türkiye). Daha sonra örneğin süpernatant kısmı ayrılarak, süpernatant : alkol oranı; 1 : 2 olacak şekilde, süpernatant üzerine; %99.8’lik soğuk etil alkol (Sigma Aldrich, USA) eklenmiştir. Karışım yaklaşık bir gece boyunca buzdolabında (4°C) bekletilerek, bileşimdeki ekzopolisakkaritin özütlenmesi sağlanmıştır. Ekzopolisakkaritin etil alkol ile özütlenmesi sonrasında, karıştırılan örnek yeniden; 4100 rpm’de 20 dakika santrifüjlenerek (Nüve, NF 400, Türkiye), süpernatant kısmı ayrılmış ve elde edilen pelet, bir etüvde, 80°C’de, sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Daha sonra bu kurutulmuş pelet tartılarak, incelenen suş tarafından üretilmiş olan ekzopolisakkarit miktarı (g/L) belirlenmiştir. Fermentasyon süresince, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen ekzopolisakkarit derişimlerinin, değişimlerini gösteren grafikler; Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılarak çizilmiştir.

3.2.5. Pullulan derişiminin tayini

Bu araştırmada, deneylerde Bölüm 3.2.4’de açıklandığı şekilde; etil alkol özütlemesi yöntemi ile elde edilmiş olan; ekzopolisakkarit örneğindeki pullulan miktarının hesaplanması; glukoz eşdeğeri üzerinden yapılmıştır (Sharma, Prasad ve Choudhury, 2013). Ekzopolisakkarit örneğindeki pullulanın tayininde ise ilk olarak; ekzopolisakkarit örneği; derişimi; 20 mg örnek/mL saf su olacak şekilde bir deney tüpü içerisine tartılmış ve yaklaşık 70°C’deki bir su banyosu içerisinde tutularak ve rutin olarak vorteks ile karıştırılarak çözündürülmüştür. Daha sonra bu çözeltiden temiz bir deney tüpü içerisine 0.5 mL alınarak üzerine; 0.4 mL fosfat sitrik asit tamponu (Ek 3, pH 5.0) ve 0.1 mL pullulanaz (Promozyme D2, Sigma Aldrich, USA) enzimi aseptik koşullarda eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Deneylerde bu aşamada; standart pullulan örneği olarak; ticari bir saf pullulan (Sigma, Aldrich, USA) kullanılmıştır. Standart örneğin hazırlanmasında; örnek ile aynı derişimde hazırlanan 0.5 mL saf pullulan çözeltisi üzerine; 0.4 mL fosfat sitrik asit tamponu (pH 5.0) ve 0.1 mL pullulanaz (Promozyme D2, Sigma Aldrich, USA) enzimi, aseptik koşullar altında eklenmiştir. Enzim körü olarak; 0.5 mL örnek ve 0.5 mL fosfat sitrik asit tamponu (pH 5.0) içeren çözelti; substrat körü olarak ise, içerisinde örnek bulunmayan 1 mL fosfat sitrik asit tamponu (pH 5.0) kullanılmıştır.

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan; örneği içeren karışım, her örnek için hazırlanan enzim körü ve standart saf pullulan içeren karışım, pullulanaz enziminin aktif çalışma sıcaklığı olan; 40°C’ye ayarlanmış olan bir etüvde, 2 saat bekletilmiştir. İncelenen EPS örneğinin enzimatik hidrolizi sonucunda oluşan glukoz derişiminin tayini; DNS yöntemi kullanılarak, spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir (Miller, 1959). Bu amaçla hazırlanan örneklerle uygun seyreltmeler uygulanmış ve spektrofotometrede (Boeco, S-30 Spectrophotometer, Almanya) ölçümler; 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ölçüm sonuçlarından, glukoz derişimlerinin hesaplanmasında, önceden hazırlanmış olan; glukoz çalışma doğrusundan yararlanılmıştır (Şekil Ek 4.1.). EPS örneklerindeki pullulan miktarlarının hesaplanması ise; glukoz eşdeğerleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; hesaplanan glukoz derişimi, standart saf pullulan çözeltisinden hesaplanan glukoz derişime oranlanarak, incelenen EPS örneği içerisindeki pullulan miktarı (%) belirlenmiştir. Daha sonra ise; EPS örneği içerisindeki pullulan miktarı (g/L) cinsinden hesaplanmıştır.

Bu araştırmada daha sonra; incelenen her bir fermantasyon ortamında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin, zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılarak çizilmiştir.

3.2.6. Toplam şeker derişiminin tayini

Bu çalışmada, bazı deneylerde gerçekteştirilen toplam şeker tayini; fenol sülfürik asit yöntemi kullanılarak, sakkaroz cinsinden belirlenmiştir (Dobois ve ark., 1956). Yöntemin uygulanışı, Ek 5’de verilmektedir. Analiz edilen örnekteki toplam şeker derişimi; spektrofotometrik olarak, 490 nm dalga boyunda ve önceden hazırlanmış olan sakkaroz çalışma doğrusu (şekil Ek 4.2.) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.7. İndirgen şeker derişiminin tayini

Deneylerde, indirgen şeker tayini Dinitrosalisilik Asit (DNS) yöntemi kullanılarak gerçekteştirilmiştir (Miller, 1959) (Ek 6 ve Ek 7). Çalışmada bazı örneklerdeki indirgen şeker derişiminin tayininde, önceden hazırlanmış olan glukoz çalışma doğrusundan (şekil Ek 4.1.) yararlanılmış, analizler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik yolla gerçekteştirilmiştir.

3.2.8. Glukoz derişimi tayini

Bu çalışmada bazı deneylerde, fermantasyon ortamındaki glukoz derişiminin tayini; D-glukoz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılarak belirlenmiştir. Analizler, kitin içeriğinde verilen yöntemeye uygun olarak yapılmış ve ölçümler 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Boeco S30, Almanya) olarak gerçekteştirilmiştir. Glukoz derişiminin hesaplaması ise; yine kit ile birlikte verilen kitapçıkta ki formüller kullanılarak yapılmıştır.

3.2.9. Glukoz/Fruktoz derişimlerinin tayinleri

Bu araştırmada, bazı deneylerde, doğal substratlardan yararlanılarak hazırlanan kompleks bileşimdeki fermantasyon ortamlarında yer alan glukoz ve fruktoz derişimlerinin eş zamanlı olarak belirlenmesinde; D-glukoz/D-fruktoz enzimatik test kitinden yararlanılmıştır (Megazyme, İrlanda). Analizler kitin içeriğinde verilen prosedüre uygun olarak yapılmışlar ve şeker derişimi ölçümleri, spektrofotometrik olarak, 340 nm dalga boyunda gerçekteştirilmişlerdir.

3.2.10. Ksiloz derişiminin tayini

Bu tez çalışmasında, fermentasyon ortamı olarak; lignoselülozik doğal substratların kullanıldığı ortamlarda (keştane ve fındık kabukları hidrolizatları, taze ve kuru fındık zürufu hidrolizatları) ortamdaki ksiloz derişiminin saptanmasında; D-ksiloz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılmıştır. Ksiloz derişimi ölçümlerinde, kit tarafından önerilen yöntem kullanılmış ve spektrofotometrik ölçümler; 340 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ksiloz derişiminin hesaplamasında; ilgili kitapçıkta verilen formüllerden yararlanılmıştır.

3.2.11. pH ölçümü

Bu tez çalışmasında deneyler sırasında gerekli pH ölçümleri; laboratuvarımızda bulunan bir pH metre (Hanna HI 221, İtalya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.12. EPS örneklerine uygulanan moleküler yapı analizi

Bu araştırmada; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilmiş olan ve yüksek pullulan derişimine sahip bazı EPS örneklerinin moleküler yapıları analiz edilmiştir (Mishra ve Vuppu, 2012). Bu amaçla; Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi (Shimadzu, FTIR-8101, Japonya) kullanılmıştır. Analizde ilk olarak; 80°C’de sabit tartıma gelene kadar kurutulan EPS örnekleri bir havan yardımıyla toz haline getirilmiştir. Daha sonra, 2 mg EPS örneği ile 60 mg KBr homojen bir şekilde karışırılmış ve elde edilen karışım, hidrolik bir press (Shimadzu, Hidrolik Press, Japonya) yardımıyla transparan bir pelet haline getirilmiştir. Hazırlanan pelet, kullanılan spektrometrenin ölçüm haznesine yerleştirildikten sonra, cihazda yapılan taramalar; 4000-400 cm⁻¹ dalga boyları arasında, 40 tekrarlı olarak ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem, saf bir pullulan (Sigma Aldrich, USA) örneği için de tekrarlanmıştır. FT-IR analizi yapılan; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örnekleri ve ticari saf pullulan örneğinden elde edilen spektrumlar benzer literatür çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca üretilen EPS örnekleri ile saf pullulan örneğinin moleküler yapıları da ortaya konulmuştur.

3.2.13. Farklı doğal substratlardan hazırlanan fermantasyon ortamlarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelenmesi

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde farklı doğal substratlar kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamlarının pullulan üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla kullanılan doğal substratlar; turuncgil kabukları (portakal, limon, greyfurt ve turunç), iki farklı cins (Chardonnay ve Çalkarası) üzümlerden elde edilmiş posa örnekleri, kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, şeker kamışı pekmezi artığı (ŞKPA), kuru ve taze fındık zürufları ve balkabağı kabuğudur. Kullanılan doğal substratların fermantasyon ortamı olarak hazırlanma yöntemleri; Bölüm 3.2.1.1.-3.2.1.6'da verilmiştir. Bölüm 3.1.2'de bileşimi verilen kültür ortamında 48 saat süreyle geliştirilen *A. pullulans* AZ-6 kültürü, doğal substrat kaynaklarından hazırlanan fermantasyon ortamlarına aşılanmıştır. Fermantasyon sıcaklığı ve fermantasyon ortamının başlangıç pH'sı *A. pullulans* AZ-6 suşu için, daha önce yapmış olduğumuz bir araştırmada bulunmuş olan optimum değerlerde kullanılmıştır. Fermantasyonlar, başlangıç pH değerleri 6.48'e ayarlanmış doğal substrat kaynaklarından hazırlanan ortamlarda, 100 vuru/dak 24.2°C'deki su banyosunda gerçekleştirilmiştir.

Yaklaşık 24 saatte bir doğal substrat kaynaklarından hazırlanmış fermantasyon ortamlarından örnekler alınarak biyokütle, EPS ve pullulan derişimi analizleri yapılmıştır. Deneyler sırasında ayrıca, farklı doğal substratlardan hazırlanan fermantasyon ortamlarının bileşim özelliklerine göre belirlenen şekerlerin derişimleri de, uygun metotlar kullanılarak ölçülmüştür. Her doğal substrat kaynağından ayrı olarak hazırlanan fermantasyon ortamında gerçekleştirilmiş deneyler için elde edilen analiz sonuçları kullanılarak mikroorganizmanın özgül üreme hızı, özgül ürün oluşum hızı ve her bir fermantasyon ortamında ölçülen farklı cinsteki şekerlerin tüketim hızları hesaplanmıştır. Analizler sonucunda biyokütle, EPS, pullulan ve fermantasyon ortamlarındaki şeker derişimlerinin zamanla derişimleri ile fermantasyon ortamlarındaki şekerlerin tüketim hızları; Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılarak grafiksel olarak gösterilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında ise, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde farklı doğal substrat kaynaklarının kullanılması ile elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve pullulan üretimini destekleyen en iyi doğal substrat belirlenmiştir. Kullanılan doğal substrat kaynakları arasında elde edilen en yüksek pullulan ve EPS değerine ulaşan ortam ŞKPA

olarak belirlenmiştir. Fakat lignoselülozik içeriği yüksek olan kuru findık zürufuna uygulanan asit hidrolizi sonucunda, elde edilen hidrolizatta, çalışılan mikroorganizma tarafından fermente edilebilir farklı şekerler (glukoz ve ksiloz) bulunduğundan ötürü optimizasyon deneyleri, ikinci en yüksek pullulan ve EPS değerleri kaydedilen kuru findık zürufu ortamı ile yapılmıştır. Tezin devamında kuru findık zürufunun kullanıldığı fermantasyon ortamı koşullarının Yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu yapılmıştır.

3.2.14. Kuru findık zürufu kullanılan fermantasyon ortamında, fermantasyon ortamını etkileyen koşulların yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile incelenmesi ve deney tasarımının oluşturulması

A.pullulans AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kuru findık zürufu kullanılan fermantasyon ortamındaki bazı parametrelerin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla seçilen bağımsız değişkenler; fermantasyon ortamındaki (NH₄)₂SO₄ derişimi (x1), fermantasyon ortamında 100 mL saf suya eklenen derişik H₂SO₄ çözeltisi hacmi (x2) ve fermantasyon ortamında 100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş findık zürufu miktarı (x3) olarak belirlenmiştir.

Bağımsız değişkenlerin belirlenen yanıtlar üzerindeki etkilerinin değeriendirilmesi için döndürölebilir merkezi karma tasarım yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada belirlenen bağımsız değişkenler doğrultusunda yapılan optimizasyon tasarımı Design Expert® 11 programının deneme sürümü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. -1.68, -1, 0, 1, +1.68 olarak kodlanmış 5 düzeyli 3 bağımsız değişkenin, 3 bağımlı değişken üzerindeki etkileri, merkez noktada 6 tekrarlı olmak üzere 20 farklı deney kombinasyonu ile incelenmiştir. Tasarımda elde edilen deney sayısı Eş. 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte k bağımsız değişken sayısını belirtmektedir.

$$\text{Deney sayısı} = 2^k + 2k + 6 \quad (3.1)$$

Deneylerde yıldız noktası olarak da adlandırılan α değeri ise Eş. 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır (Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010).

$$\alpha = [2^k]^{1/4} \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte k, bağımsız değişken sayısını ifade etmektedir. Seçilen 3 bağımsız değişken için hesaplanan α değeri 1.68 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1.'de bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin çalışma aralıkları literatürde benzer konuda yapılan çalışmalar dikkate alınarak oluşturulmuştur. Deney tasarımı, x1 için 0-7.2 g/L; x2 için 0.5-2.5 mL, x3 için 4-20 g olarak belirlenen çalışma aralıklarında Çizelge 3.1.'de belirtilen 5 seviye kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Merkezi karma yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin seviyeleri

Bağımsız değişkenlerin simgesi	Bağımsız değişkenler	Değişken seviyeleri				
		-1.68	-1	0	1	1.68
x1	(NH ₄) ₂ SO ₄ derişimi (g/L)	0.00	1.46	3.60	5.74	7.20
x2*	Asit (mL)	0.50	0.91	1.50	2.09	2.50
x3**	Fındık zürufu (g)	4.00	7.24	12.00	16.76	20.00
*100 mL saf suya eklenen derişik H ₂ SO ₄ çözeltisi hacmi,mL						
**100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş fındık zürufu miktarı,g						

3.2.15. Bağımlı değişkenlerin (yanıtların) hesaplanmaları

Belirlenen bağımsız değişkenler için minimum ve maksimum değerler tespit edildikten sonra Design Expert® 11 programının merkezi karma dizaynı ile oluşturduğu 20 adet deney tasarlanmıştır. 20 adet deneyin 6 tanesinin koşulları aynı olup merkez nokta deneyleri olarak değerlendirilmiştir.

Gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinde, fermantasyon ortamlarından belirli aralıklarla, aseptik koşullar altında örnek alınmıştır. Alınan örneklerle günlük olarak değişen biyokötle, EPS ve pullulan derişimleri belirlenmiştir. Optimizasyon deneylerinde her bir deney için mikroorganizmanın özgül üreme hızı ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri hesaplanmıştır. Deney tasarımına göre hazırlanan fermantasyon ortamlarının bileşim özelliklerine göre değişim gösteren glukoz ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri ve bu şekerlerin tüketim hızları da hesaplanmıştır. Ölçölen parametrelerin zamanla değişimlerini gösteren grafikler Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılarak çizilmiştir.

Yapılan deneyler sonrasında belirlenen bağımlı değişkenler (yanıtlar) ve simgeleri ise Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Bağımlı değişkenler (yanıtlar) ve simgeleri

Simge	Bağımlı değişken
y1	En yüksek pullulan derişimi (g/L)
y2	En yüksek EPS derişimi (g/L)
y3	Özgöl üreme hızı (sa ⁻¹)

3.2.16. Bağımlı değişkenlerin (yanıtların) yanıt yüzey yöntemi ile modellenmeleri

Deneyler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlerin değişimlerini gösteren model eşitlikler, çoklu regresyon analizi yöntemi ile Design Expert® 11 programı kullanılarak belirlenmiştir.

Yanıt yüzey yönteminde her bir yanıtın modellenmesi için ikinci dereceden model eşitlik denklemleri kullanılmıştır. Bu ikinci dereceden polinomial denklemin genel formu Eş. 3.3'de ifade edilmiştir (Baş ve Boyacı, 2007).

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte y; yanıt değişkenini, x_i ve x_j; bağımsız değişkenleri, β₀; bağımsız değişkenlerin etkisiz olduğu durumda yanıt değişkeninin değerini, β_j, β_{jj} ve β_{ij} değerleri ise sırasıyla; lineer, ikinci dereceden ve bağımsız değişkenlerin ikili etkileşim halinde olduğu zamanki katsayılarını ifade etmektedir.

Deneyler sonucunda elde edilen verilerin, seçilen model ile ne kadar örtüştüğü varyans analizi (ANOVA) yapılarak belirlenmiştir. Modelin elde edilen deneysel veriler ile uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla %95 güven aralığında F-testi ve lack of fit testi uygulanmıştır. Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki ikili etkileşimlerini gösteren yanıt yüzey ve kontür grafikleri de Design Expert® 11 programı ile oluşturulmuş ve yorumlanmıştır.

3.2.17. Optimizasyon

Belirlenen yanıt değişkenleri için model eşitlikler türetildikten sonra, optimum deney koşullarının belirlenebilmesi amacıyla “istenen hedefe ulaşma fonksiyonu” (desirability

function) kullanılmıştır. Bu amaçla Design Expert® 11 programı kullanılmıştır. Yapılan 20 deney sonucunda elde edilen deneysel verilerde ulaşılan maksimum yanıt değişkenlerinin değerlerinden yola çıkılarak hedef değerler belirlenmiştir. *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde pullulan derişimi ve EPS derişiminin yüksek değerlere çıkarılması istenen asıl hedef olduğu için, bu yanıt değişkenleri için seçilen hedefler maksimize edilmiştir. Ayrıca optimizasyon yapılırken verilen önem değeri açısından bu yanıtların önem seviyesinin 5 yıldız seviyesinde tutulması sağlanmıştır. Özgöl üreme hızı yanıtı için ise herhangi bir hedef belirtilmemiş ve önem seviyesi 3 yıldız seviyesinde tutulmuştur. Optimizasyon aşamasında her bir yanıt değişkeni için belirlenen hedefler Çizelge 3.3.'de ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3. Optimizasyon aşamasında kullanılan yanıt değişkenleri ve bu yanıt değişkenleri için belirlenen hedefler

Simge	Bağımsız değişken	Belirtilen hedef	Minimum değer	Maksimum değer
y1	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	Maksimum	17.00	80.00
y2	En yüksek EPS derişimi (g/L)	Maksimum	19.82	80.00
y3	Özgöl üreme hızı (sa ⁻¹)	Hedef belirtilmedi	0.020	0.082

Hedeflerin belirlenmesinden sonra, program çıktısının önerdiği birçok optimum koşul kombinasyonu arasından, belirlenen bağımlı değişken değerleri en yüksek ve istenen hedefe ulaşma fonksiyonu 1 değerine en yakın olan uygun kombinasyon belirlenmiştir.

Belirlenen kombinasyon ile yapılan deney sonucunda, elde optimum koşulun doğrulanması, bu koşullarda gerçekleştirilen deneyden elde edilen sonuçların istenen hedefe ulaşma fonksiyonu değeri ile doğrulanması sağlanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

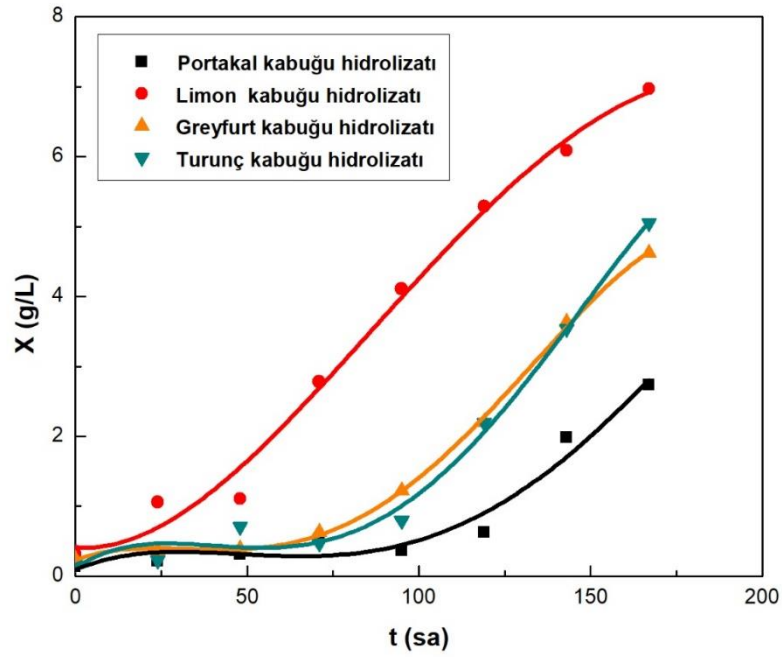
4.1. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan çeşitli doğal substrat kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırılması

Bu tez çalışmasında; çeşitli tarımsal artık ve atıklar ile gıda endüstrisi artıklarının yerel bir suş olan; *A. pullulans* AZ-6 ile pullulan üretimi amacıyla, fermantasyon ortamı olarak değerlendirilme olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, fermantasyon ortamı olarak kullanılan doğal substratlar; çeşitli turuncgil kabukları (portakal, limon, greyfurt ve turunç), üzüm posası, kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, şeker kamışı pekmezi artığı, kuru ve taze fındık zürüfları ve balkabağı kabuğudur. Doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanılan bu doğal substratlar, daha önce; Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak kullanılmışlardır. *A. pullulans* AZ-6 kültürü, bileşimi önceden; Bölüm 3.1.2'de verilmiş olan kültür ortamında, kesikli bir sistemde; çalkalamalı bir su banyosunda 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 48 saat geliştirildikten sonra, hazırlanan fermantasyon ortamına; %5 (v/v) oranında aşılınmış ve fermantasyon süreci başlatılmıştır. Fermantasyon süresi boyunca belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan örneklerde biyokütle, EPS, pullulan ve şeker derişimleri analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında incelenen her bir fermantasyon ortamı için, elde edilmiş olan sonuçlar aşağıda verilmektedir.

4.1.1. Çeşitli turuncgil kabukları ile yapılan çalışmalar

Çeşitli turuncgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, ayrı ayrı fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde ortamlara eklenen *A. pullulans* AZ-6 kültürünün başlangıç inokülasyon derişimi; 1.02×10^8 kob/mL olarak belirlenmiştir. Portakal, limon, greyfurt ve turunç kabukları kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.1.'de verilmektedir.

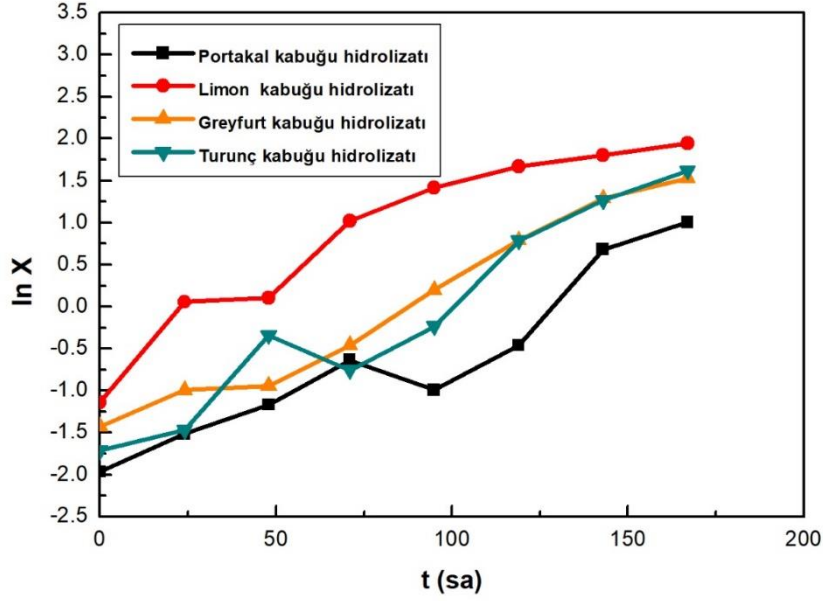


Şekil 4.1. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Çeşitli turunçgil kabuklarının fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşuna ait en yüksek biyokütle derişiminin (6.97 g/L), limon kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1.) Portakal, greyfurt ve turunç kabuğu hidrolizatları için fermantasyon süresince ulaşılan maksimum biyokütle derişimleri ise sırasıyla; 2.73 g/L, 4.62 g/L ve 5.05 g/L olarak belirlenmiştir. Farklı turunçgil kabukları ile yapılan deneylerde; genel olarak biyokütle derişimlerinin, kullanılan her bir ortamda fermantasyon süresince arttığı, ancak limon kabukları ile çalışıldığında bu artışın 24. saatten itibaren belirgin olduğu, diğer ortamlar dikkate alındığında ise; greyfurt ve turunç kabuklarından hazırlanan ortamlarda yaklaşık 95. saatte, portakal kabuğu ortamında ise ancak; 119. saatte başladığı tespit edilmiştir.

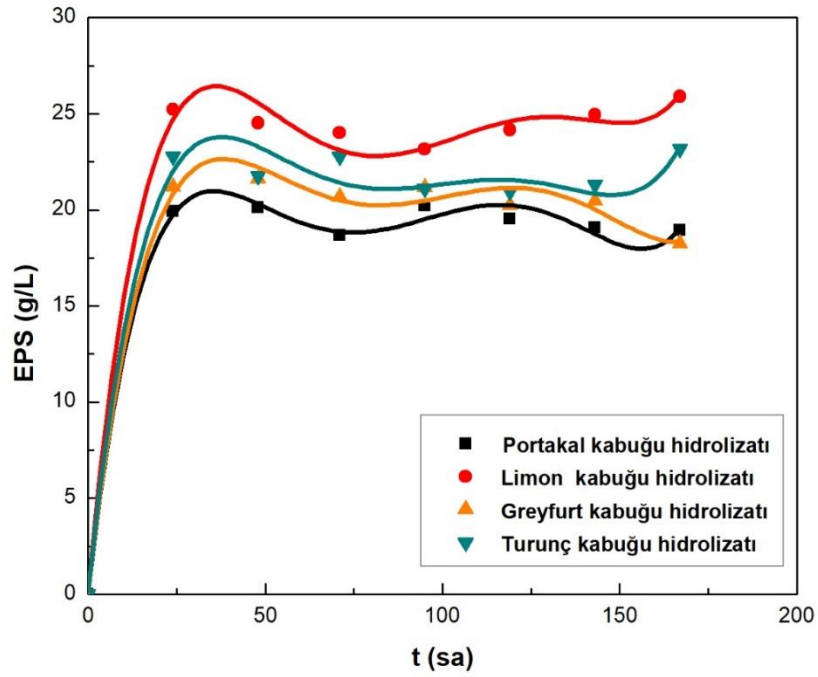
Bu deneylerde, çalışılan her bir fermantasyon ortamı için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla; Şekil 4.1.'deki grafikler kullanılarak, her bir zaman için ölçülen biyokütle değerlerinin ln değerleri hesaplanmış, incelenen tüm fermantasyon ortamları için zamana karşı ln X grafikleri oluşturulmuş (Şekil 4.2.) ve bu grafiklerden yararlanılarak da; *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül

üreme hızları (μ) hesaplanmıştır. Farklı turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, pullulan üretimi amacıyla, fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı bu deneylerde portakal, limon, greyfurt ve turunç kabuklarından asit hidrolizi ile hazırlanmış olan ortamlarda, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları sırasıyla; 0.035, 0.050, 0.024, 0.047 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.



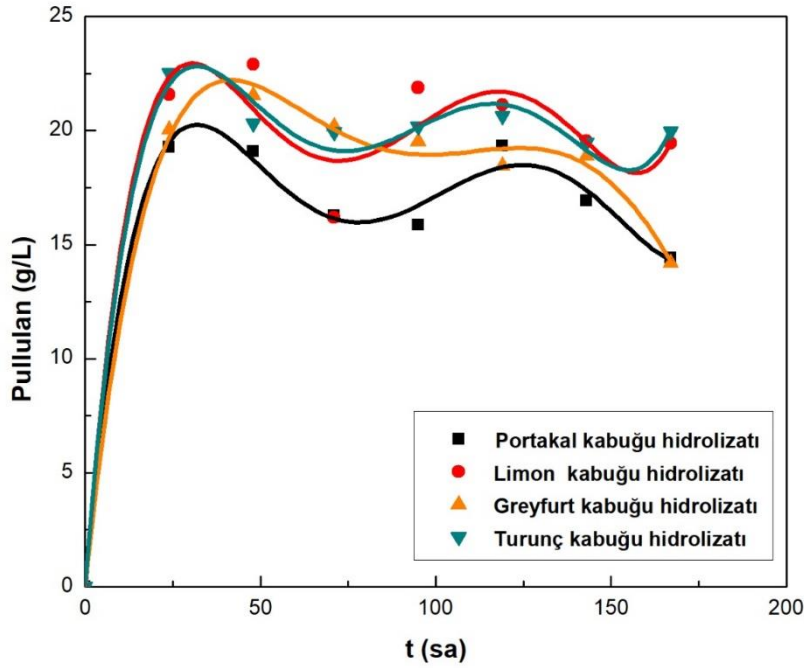
Şekil 4.2. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Çeşitli turunçgil kabuklarından hazırlanan hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS değerlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Bu deneylerde, en yüksek EPS derişimi (25.90 g/L), fermantasyonun 167. saatinde limon kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmada elde edilmiştir. Turunç kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen en yüksek EPS derişimi ise; 23.17 g/L olarak tespit edilmiştir. Greyfurt ve portakal kabuğu hidrolizatları, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıklarında; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen maksimum EPS derişimleri ise sırasıyla; 21.61 g/L ve 20.20 g/L olarak belirlenmiştir. İncelenen tüm ortamlarda çalışılan suşun EPS üretimlerinin, fermantasyonun ilk 24 saatine kadar hızla arttığı, daha sonra ise çok fazla bir değişimin olmadığı bulunmuştur.



Şekil 4.3. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.4.'te; bazı turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan miktarlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler verilmektedir. En yüksek EPS derişimlerinin elde edildiği; limon ve turunç kabuklarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan derişimlerinin de; yüksek ve birbirlerine çok yakın oldukları belirlenmiştir. En yüksek pullulan derişimi; limon kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı ortamda, 48. saatte; 22.91 g/L olarak bulunurken, turunç kabuğu hidrolizatı ortamında ise bu değeri; 22.52 g/L (24. saat) olarak belirlenmiştir. Greyfurt kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; maksimum pullulan derişimine (21.54 g/L) fermantasyonun 48. saatinde ulaşılırken, portakal kabuğu hidrolizatı ortamında ise en yüksek pullulan derişimine (19.34 g/L); fermantasyonun 119. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

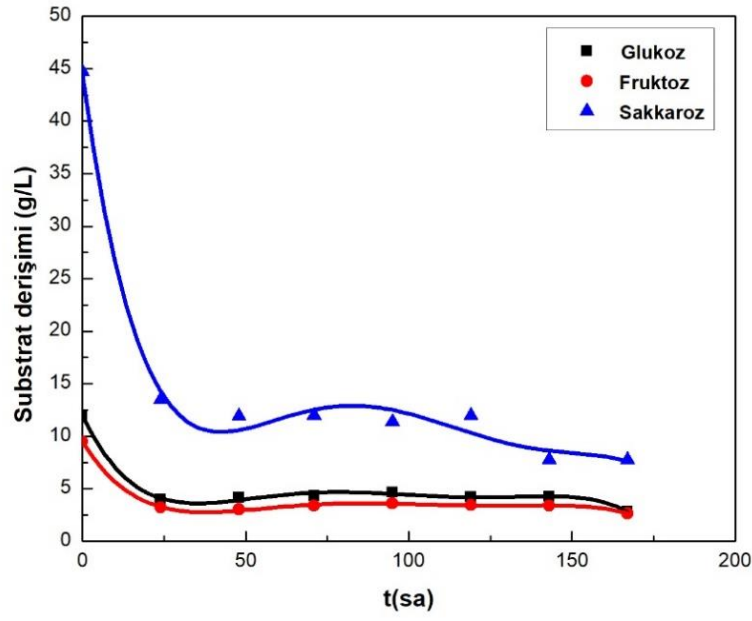


Şekil 4.4. Çeşitli turunçgil kabuklarından elde edilen hidrolizatların, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

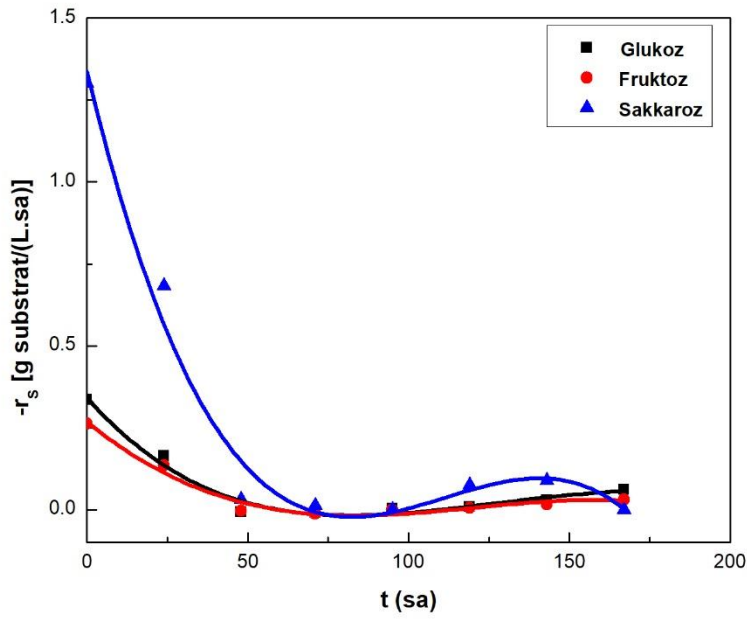
Tez araştırmasının bu bölümünde ayrıca; incelenen her bir ortam için, en yüksek özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla; her deney için pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler (Şekil 4.4.) kullanılarak, bu eğrilerde farklı zamanlara karşılık gelen eğim değęerlerinden ürün oluşum hızları belirlenmiştir. Sonrasında ise bulunan her bir hız değęeri, Şekil 4.1. kullanılarak, eğim hesaplanan zamana karşı gelen X değęerlerine bölünerek özgül ürün oluşum hızı değęerleri hesaplanmıştır. Bulunan değęerlerden turunçgil kabukları hidrolizatları kullanılan fermantasyon ortamlarında en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m) değęerleri belirlenmiştir. Bu çalışmada, portakal, limon, greyfurt ve turunç kabukları hidrolizatlarından hazırlanan fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu için elde edilen en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m) değęerleri sırasıyla; 3.13, 0.40, 5.04 ve 15.00 g pullulan/(g mikroorganizma.sa) olarak, sırasıyla fermantasyonun 22., 8., 10., ve 5. saatinde elde edilmiştir.

Bu deneylerde, çeşitli turunçgil kabuklarından hazırlanmış olan fermantasyon ortamlarının bileşimindeki glukoz, fruktoz ve sakkarozun derişimlerinin, zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.5.a-4.8.a'da verilmektedir. Ortamlardaki glukoz, fruktoz ve sakkarozun tayinlerinde sırasıyla; daha önce detayları Bölüm 3.2.6 ve 3.2.9'da verilmiş olan yöntemlerden yararlanılmıştır. Turunçgil kabuğu hidrolizatlarından hazırlanmış fermantasyon ortamlarındaki glukoz, fruktoz ve sakkarozun tüketim hızları daha önce Bölüm 2.1.3.'de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Şekil 4.5.b-4.8.b'de ise; fermantasyon ortamları bileşimindeki glukoz, fruktoz ve sakkarozun tüketim hızlarının, zamanla değişimini gösteren grafikler verilmiştir.

Şekil 4.5.a ve b'de; portakal kabuğu hidrolizatının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deney için, ortamda bulunan substratların derişimlerinin ve tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler gösterilmiştir. Bu deneylerde, fermantasyon ortamı olarak portakal kabuğunun kullanıldığı ortamda, sakkaroz, glukoz ve fruktozun başlangıç derişimleri sırasıyla; 44.71, 12.00, 9.50 g/L olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.5.a). İlgili şekilden de görülebileceği gibi; ortamdaki sakkaroz, glukoz ve fruktozun, fermantasyonun ilk 24 saatinde hızla tüketildiği, ilerleyen süreçte ise tüketimlerde çok fazla bir değişiklik olmadığı ve her üç şeker türü için de, ortamda tüketilmeden bir miktar kaldığı tespit edilmiştir. Bu deneylerde, ilk 24 saat içerisinde, fermantasyon ortamı bileşimindeki sakkarozun tüketiminin, ortamdaki fruktoz ve glukoz ile karşılaştırıldığında daha belirgin olduğu da görülmüştür. Ortamdaki substratların tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.5.b'de verilmektedir. Portakal kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde en yüksek tüketim hızı; incelendiğinde ise; 1.30 g sakkaroz/L.sa olarak, başlangıcında tespit edilmiştir. Glukoz ve fruktoz derişimlerinin değişimleri ise fermantasyonun 24. saatinden itibaren minimal seviyede olduğundan dolayı bu şekerlerin tüketim hızlarının neredeyse sabit seyrettiği görülmektedir.



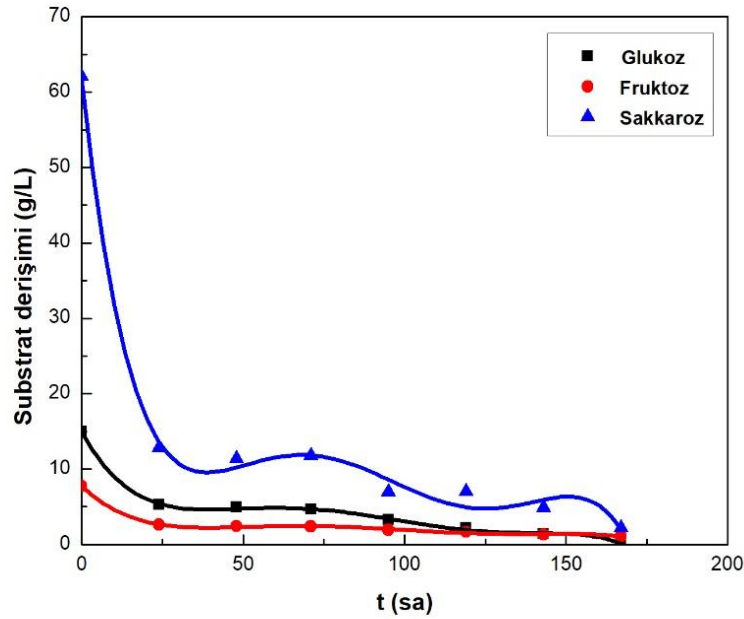
(a)



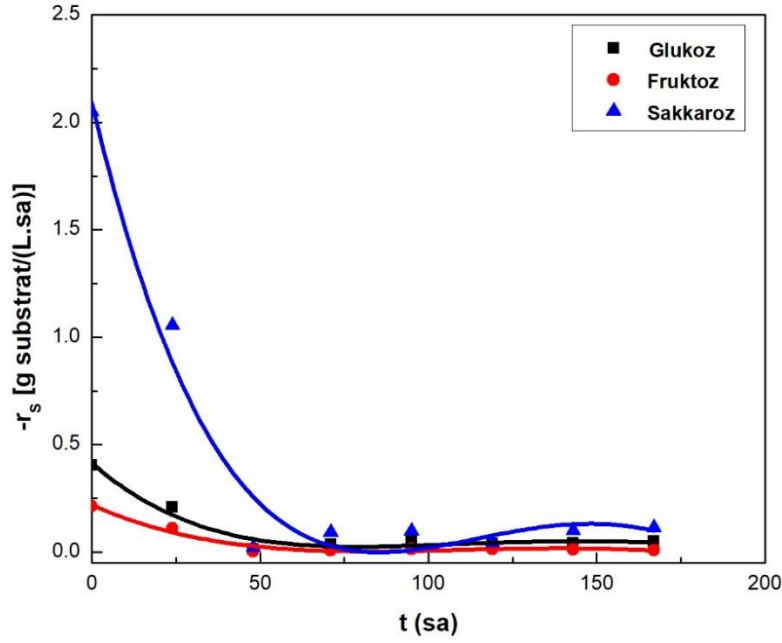
(b)

Şekil 4.5. Portakal kabuğu hidrolizatının fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Fermantasyon ortamı olarak limon kabuğu hidrolizatının kullanıldığı deneyde, ortamda bulunan şekerlerin derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.6.a’da, bu şekerlerin tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafiklerler ise; Şekil 4.6.b’ de verilmiştir. Söz konusu ortamın bileşiminde bulunan glukoz, fruktoz ve sakkarozun başlangıç derişimleri sırasıyla; 14.99, 7.76 ve 62.04 g/L olarak tayin edilmişlerdir. Fermantasyonun ilk 24. saatinde tüm substratların hızla tüketildikleri, ancak ortam bileşiminde diğerlerine göre daha yüksek derişimde olduğu saptanan sakkarozun ilk 24. saatteki tüketim hızının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Fermantasyonun sonunda (167. saat) ortamdaki tüm şekerlerin tamamına yakının tüketildiği bulunmuştur. Bu deneylerde; en yüksek substrat tüketim hızı; fermantasyonun başlangıcında; 2.05 g sakkaroz/(L.sa) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6.b). Limon kabuğu hidrolizatı bileşiminde yer alan; glukoz ve fruktozun en substrat tüketim hızları ise; 0.40 g glukoz/(L.sa) ve 0.21 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.



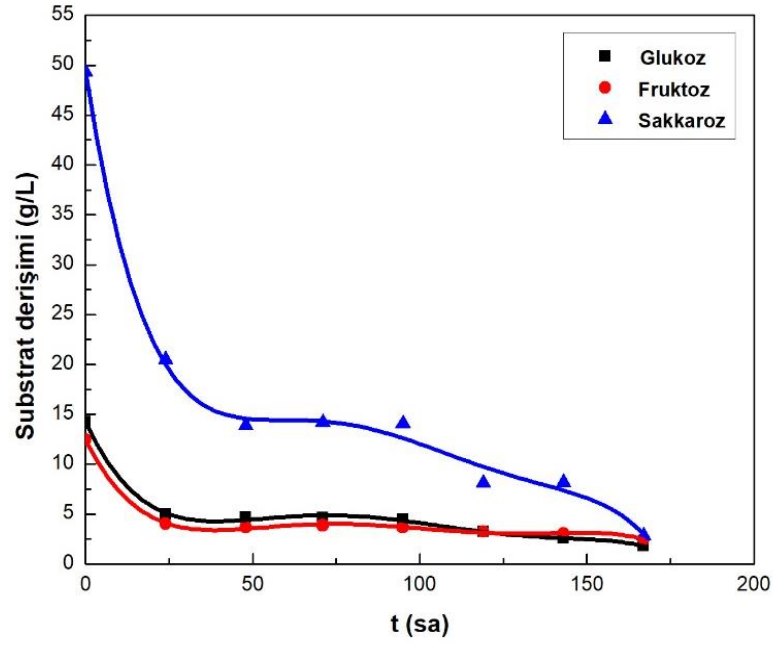
(a)



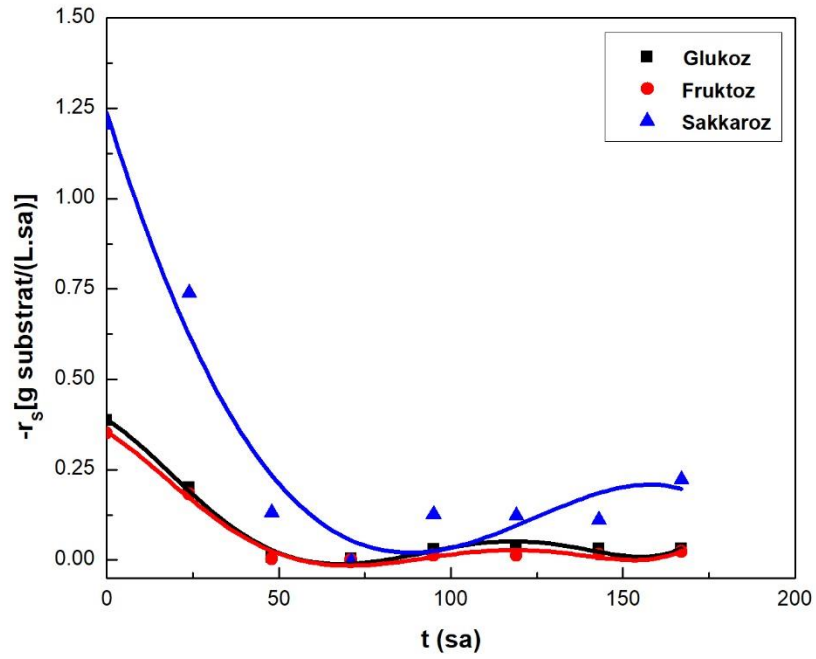
(b)

Şekil 4.6. Limon kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkarozun (▲) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Greyfurt kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki şekerlerin zamanla değışimleri; Şekil 4.7.a'da, ortamdaki şekerlerin tüketim hızlarının zamanla değışimleri ise; Şekil 4.7.b'de gösterilmiştir. Fermantasyonun başlangıcında greyfurt kabuğu hidrolizatı bileşiminde yer alan sakkaroz, glukoz ve fruktoz için ölçülen şeker derişimleri sırasıyla; 49.34 g/L, 14.26 g/L ve 12.45 g/L olarak belirlenirken; fermantasyonun 167. saatinde bu değerler sırasıyla; 2.83 g/L, 1.8 g/L ve 2.48 g/L olarak tayin edilmişlerdir. Glukoz ve fruktoz için hesaplanmış olan substrat tüketim hızlarının fermantasyon süresince birbirlerine yakın değerlerde oldukları saptanmış ve bu substratlar için hesaplanan en yüksek substrat tüketim hızı değerleri sırasıyla 0.39 g glukoz/(L.sa) ve 0.35 g fruktoz/(L.sa) olarak belirlenmiştir. Sakkaroz için hesaplanan en yüksek substrat tüketim hızı ise fermantasyonun başlangıcında 1.20 g sakkaroz/(L.sa) olarak belirlenmiştir.



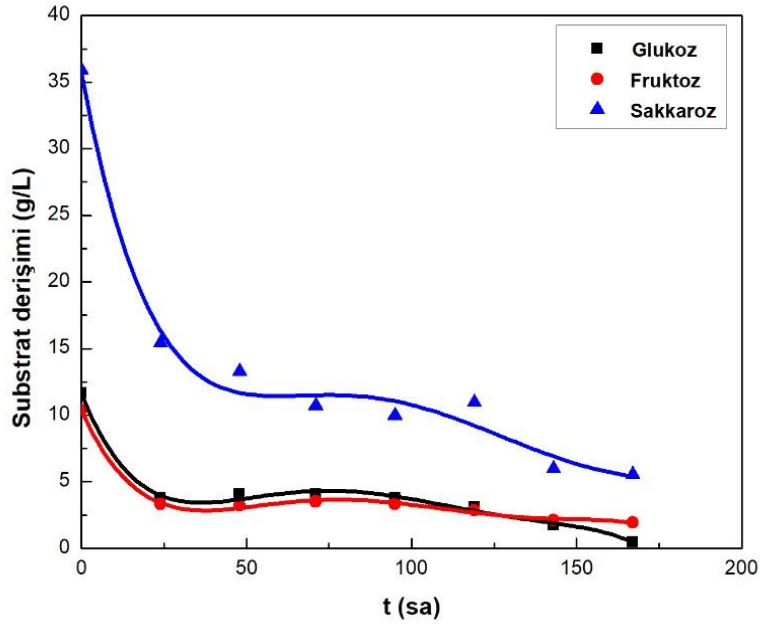
(a)



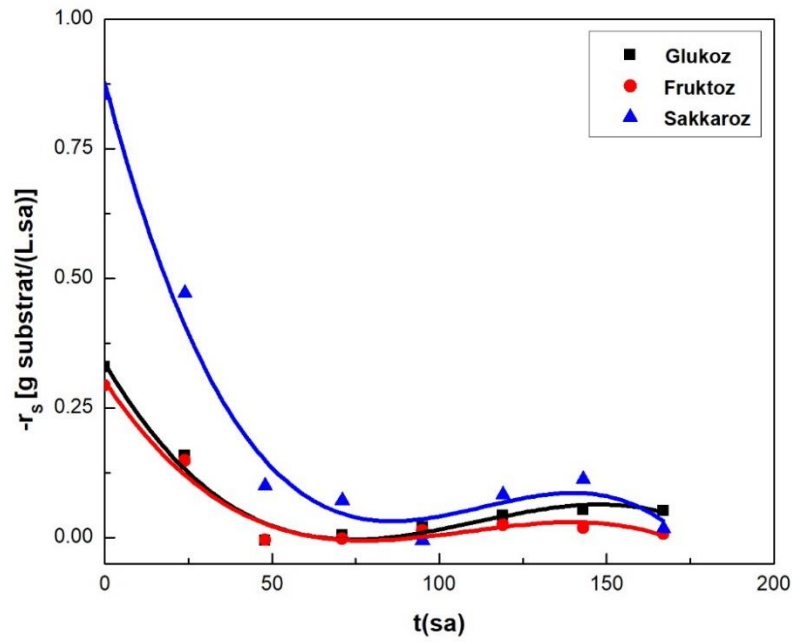
(b)

Şekil 4.7. Greyfurt kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Şekil 4.8.'de; turunç kabuğu hidrolizatının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki şeker derişimlerinin ve substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri verilmiştir. Turunç kabuğu hidrolizatının bileşimindeki glukoz, fruktoz ve sakkarozun başlangıç derişimleri sırasıyla; 11.68, 10.37 ve 35.92 g/L olarak tayin edilmişlerdir. Şekil 4.8.a'da görüldüğü gibi; bileşimdeki sakkarozun fermantasyonun ilk 50. saatine kadar hızla tüketildiği, sonrasında ise kullanılmaya devam edilerek, fermantasyonun sonunda ise ortamda 5.56 g/L sakkarozun tüketilmeden kaldığı saptanmıştır. Bu ortamda, sakkarozla göre çok daha düşük miktarlarda bulunan glukoz ve fruktozun ise, *A. pullulans* AZ-6 tarafından tüketilmekle birlikte, 95. saatten sonra, nerdeyse fazla tüketilmedikleri de belirlenmiştir. Fermantasyonun sonunda, ortamda glukoz kalmazken, kalan sakkaroz ve fruktoz derişimlerinin ise sırasıyla; 5.56 g/L ve 1.94 g/L olduğu belirlenmiştir. Turunç kabuğu hidrolizatı ortamında, sakkaroz için hesaplanan en yüksek substrat tüketim hızı değeri, fermantasyonun başlangıcında; 0.85 g sakkaroz/(L.sa) iken, glukoz ve fruktoz için, aynı zamanda hesaplanan en yüksek substrat tüketim hızları ise sırasıyla; 0.33 g glukoz/(L.sa) ve 0.29 g fruktoz/(L.sa) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8.b).



(a)



(b)

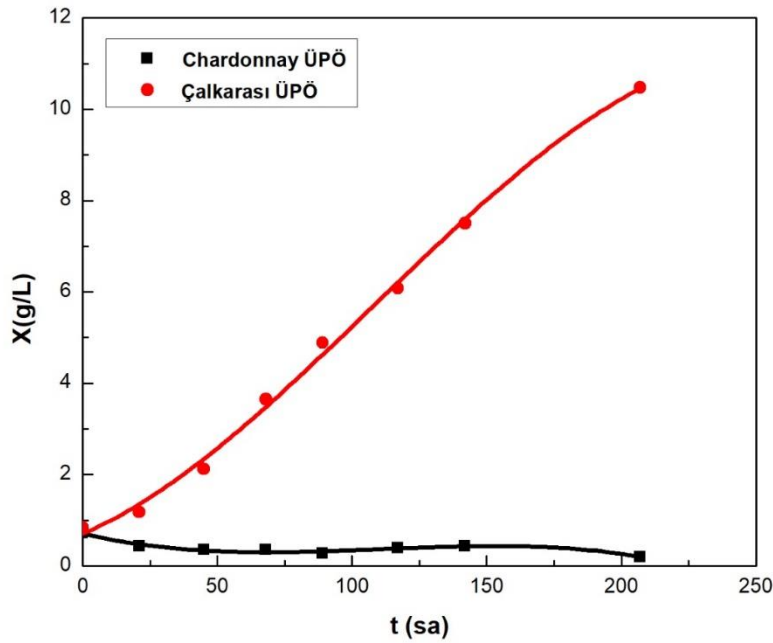
Şekil 4.8. Turunc kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ; (a) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■), fruktoz (●) ve sakkaroz (▲) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

4.1.2. Üzüm posası özütleri ile yapılan çalışmalar

Bu tez çalışmasında, şarap endüstrisi artığı olan iki farklı üzüm çeşidinin (Chardonnay ve Çalkarası) posalarından hazırlanmış özütler (ÜPÖ), fermantasyon ortamları olarak kullanılarak bu ortamların, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Üzüm posası özütlerinin hazırlanmalarında izlenen yöntem, daha önce Bölüm 3.2.1.2.'de verilmiştir. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, üzüm posasından hazırlanan fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimleri; 9.1×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Chardonnay (beyaz renkli) ve Çalkarası (kırmızı renkli) cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerdeki, biyokütle derişiminin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.9.'da verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde görülebileceği gibi; Çalkarası ÜPÖ'nün, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üremesini desteklediği ve bu ortamda, fermantasyon boyunca biyokütle derişiminin arttığı belirlenmiştir. Çalkarası ÜPÖ ortamında elde edilen en yüksek biyokütle derişimi;

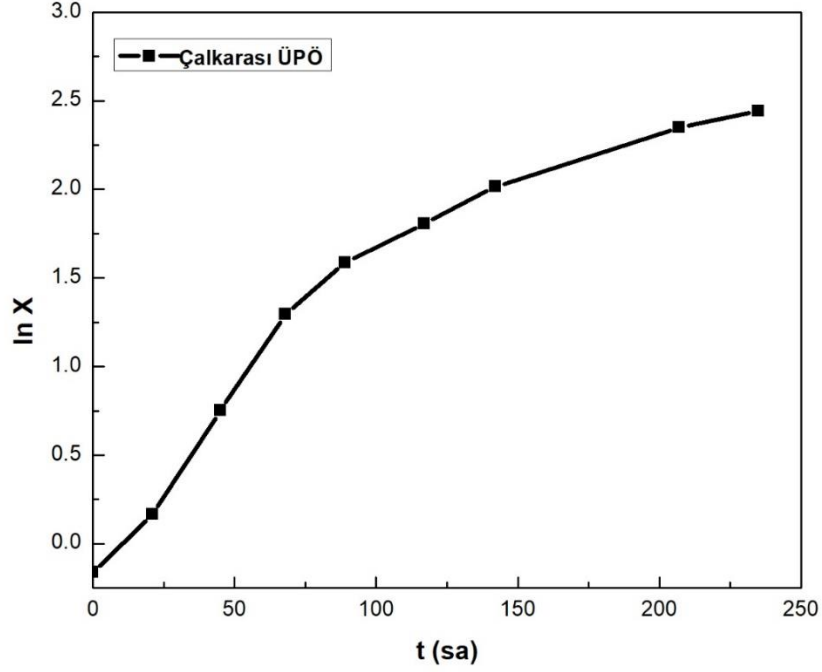
11.51 g/L olarak fermantasyonun sonunda elde edilmiştir. Chardonnay cinsi üzüm ÜPÖ'nün ise; fermantasyon ortamı olarak kullanıldığında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üremesine olanak vermediği ve biyokütle değişiminde fermantasyon süresince önemli bir değişim gözlenmediği de bulunmuştur. Deneylerde saptanan bu farklılığın; iki farklı cins üzümün şaraba işlenmeleri sırasında çıkan posalardan elde edilen özütlerin, bileşim özelliklerindeki farklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan üzümlerin cinslerinin farklı olmasının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütlesi üzerinde etkili olduğu da düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Chardonnay ve Çalkarası cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, biyokütle değişimlerinin zamanla değişimleri

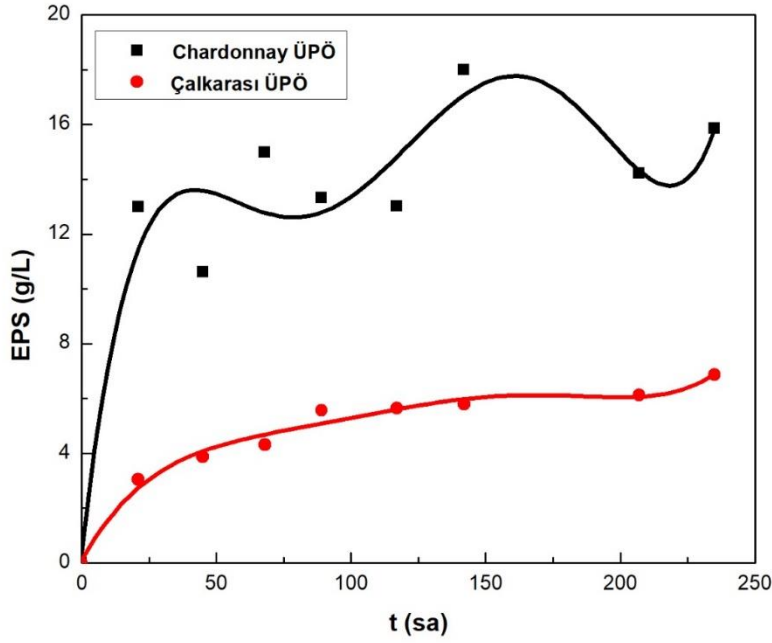
Bu deneylerde, fermantasyon ortamı olarak kullanılan Çalkarası cinsi ÜPÖ için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızı da (μ) hesaplanmıştır. Bu amaçla; $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikten (Şekil 4.10.) yararlanılmıştır. Çalkarası cinsi ÜPÖ'nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deney için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı; 0.021 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Fermantasyon ortamı olarak Chardonnay cinsi üzüm ÜPÖ'nün

kullanıldığı durumda ise; bu ortamda belirgin bir biyokütle değişimi gözlenemediğinden, *A. pullulans* AZ-6 suşu için bu ortamda, bir özgül üreme hızı değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.10. Çalkarası cinsi üzüm posasından hazırlanan özütün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Üzüm posası özütlerinin, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun ürettiği EPS derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde görülebileceği gibi; Chardonnay cinsi ÜPÖ'nün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen EPS derişimlerinin, Çalkarası cinsi ÜPÖ'nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığında elde edilen EPS derişimlerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Chardonnay cinsi ÜPÖ ortamı, çalışılan suşun EPS üretimini, Çalkarası cinsi ÜPÖ ortamından daha fazla teşvik etmiştir. Chardonnay cinsi ÜPÖ ortamında elde edilen en yüksek EPS derişimine (18 g/L), fermantasyonun 142. saatinde ulaşılırken, Çalkarası cinsi ÜPÖ ortamında, en yüksek EPS derişimine (6.87 g/L); fermantasyonun 235. saatinde ulaşmıştır.

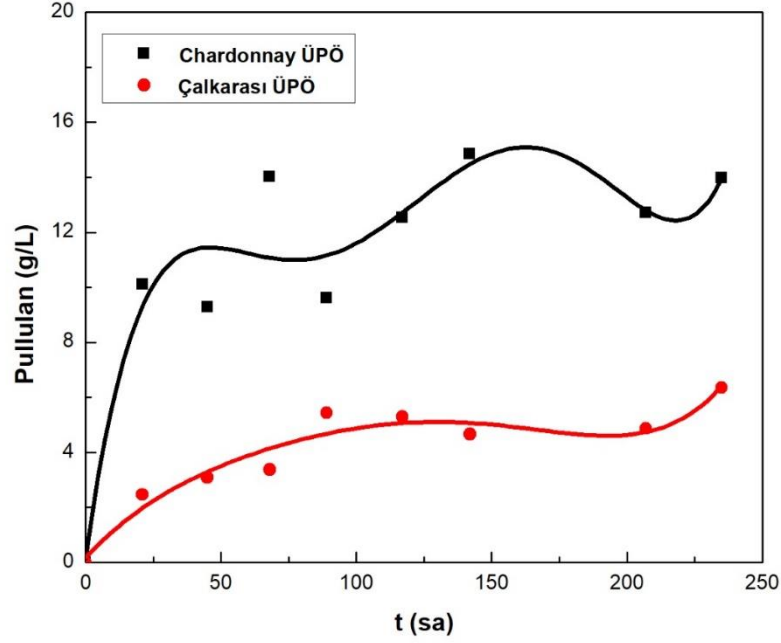


Şekil 4.11. Chardonnay ve Çalkarası cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.12.'de ise; üzüm posası özütü ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde; çalışılan suşun pullulan üretiminin, EPS üretimine oldukça benzer bir seyirde olduğu saptanmıştır. Chardonnay cinsi ÜPÖ'de elde edilen en yüksek pullulan derişimi 13.98 g/L olarak belirlenirken, fermantasyon ortamı olarak Çalkarası cinsi ÜPÖ kullanıldığında elde edilen maksimum pullulan derişimi; 6.35 g/L olarak belirlenmiştir.

Farklı üzümlerden elde edilmiş, şarap endüstrisi artığı olan üzüm posalarının tezde belirtildiği şekilde sıcak su ile özütleme yöntemi ile hazırlanarak *A. pullulans* ile pullulan üretiminde doğal substrat/fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalarda, bu doğal substratın, hem *A. pullulans*'ın EPS üretimini desteklediği ve hem de üzüm posasının kullanılması ile elde edilen EPS'nin yüksek saflıkta pullulan içerdiği ifade edilmektedir (Israilides ve ark., 1998; Israilides ve ark., 1999; Arvanitoyannis, Ladas, ve Mavromatis, 2006). Israilides ve arkadaşlarının (1998), üzüm posasından sıcak su ile özütleme yöntemi kullanarak hazırladıkları fermantasyon ortamında, *A. pullulans* NRRLY 6220 suşu ile pullulan üretimi gerçekleştirdikleri bir çalışma rapor edilmiştir.

Buna göre en yüksek EPS derişimine (22.3 g/L) fermantasyonun 7. gününün sonunda ulaşıldığı bildirilmiştir. Ayrıca fermantasyon sonunda elde edilen EPS'nin, kuru ağırlık olarak %97.4'ünün pullulan olduğunun da, yapılan analizlerle doğrulandığı ifade edilmiştir.

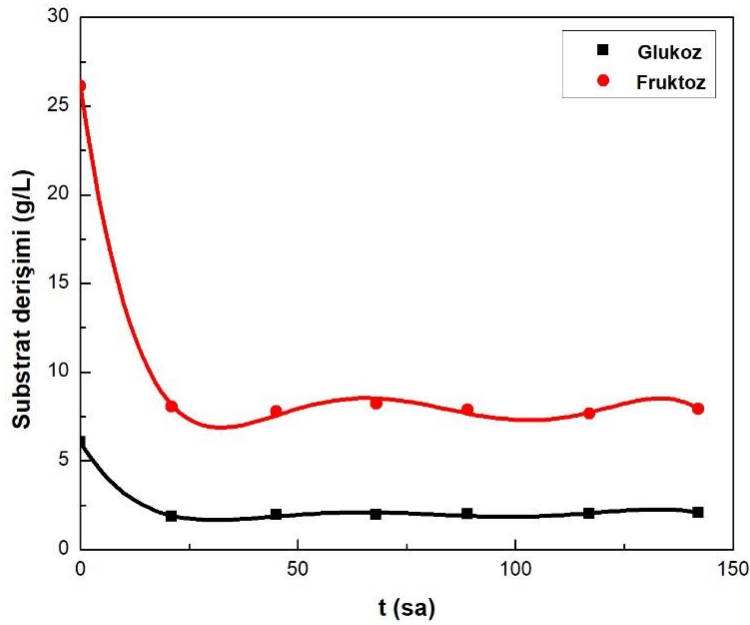


Şekil 4.12. Chardonnay ve Çalkarası cinsi üzüm posalarından hazırlanan özütlerin, fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

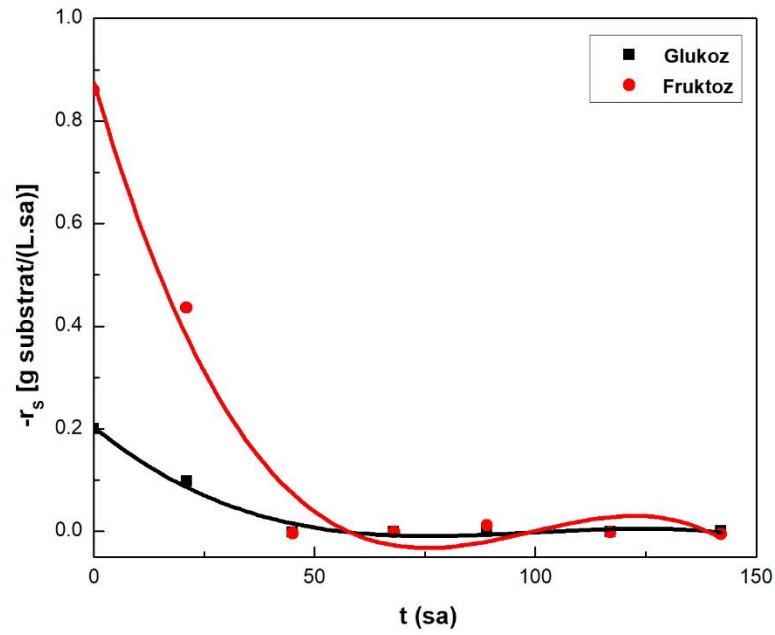
Bu deneylerde; çalışılan her iki cins ÜPÖ ortamında *A. pullulans* AZ-6 suşunun en yüksek özgül ürün oluşum hızları da belirlenmiştir. Bu amaçla; farklı cinsteki ÜPÖ kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamlarında üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.12.) farklı zamanlarda eğim değerleri hesaplanarak ürün oluşum hızları bulunmuş, sonrasında ise mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.9.) aynı zamanlara karşı gelen mikroorganizma derişim değerleri okunarak özgül ürün üretim hızları hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerden her bir üzüm cinsi için en yüksek olan özgül ürün oluşum hızı değerleri hesaplanmıştır. Çalkarası cinsi ÜPÖ'nün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m); 0.19 g

pullulan/(g mo.sa) iken, Chardonnay cinsi ÜPÖ'nün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde bu değer; 0.58 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Üzüm posalarından yararlanılarak hazırlanan fermantasyon ortamlarının bileşimlerdeki; glukoz ve fruktoz derişimleri; daha önce Bölüm 3.2.9.'de anlatıldığı şekilde; enzimatik bir kit aracılığıyla tayin edilmiştir. Şekil 4.13.a'da; Chardonnay cinsi ÜPÖ ortamının bileşimindeki; glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri, Şekil 4.13.b'de ise; aynı ortamda *A. pullulans* AZ-6 suşunun bu substratları tüketim hızları verilmiştir. Chardonnay cinsi ÜPÖ'nün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamda bulunan fruktozun başlangıç derişimi; 26.13 g/L, glukozun başlangıç derişimi ise; 6.07 g/L olarak tayin edilmiştir. Bu ortamda, zamana karşı derişimleri izlenen glukoz ve fruktozun, fermantasyonun ilk 21. saatine kadar hızla tüketildikleri, daha sonra ise derişimlerinin çok fazla değışmediği saptanmıştır. Bu duruma bağlı olarak da; belirlenen en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızları, her iki substrat için de; fermantasyonun başlangıcında ölçülmüştür (Şekil 4.13.b). Bu ortamda, glukoz için hesaplanan en yüksek substrat tüketim hızı; 0.2 g glukoz/(L.sa) olarak belirlenirken, fruktoz için bu değer; 0.86 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.



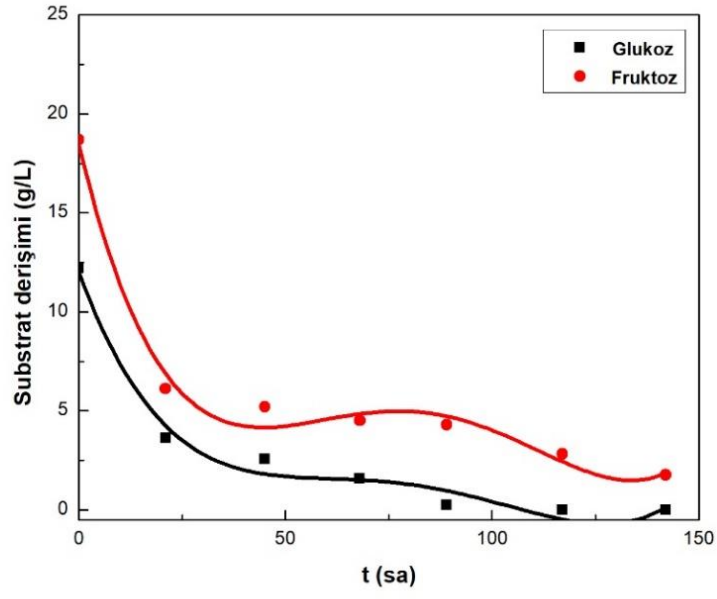
(a)



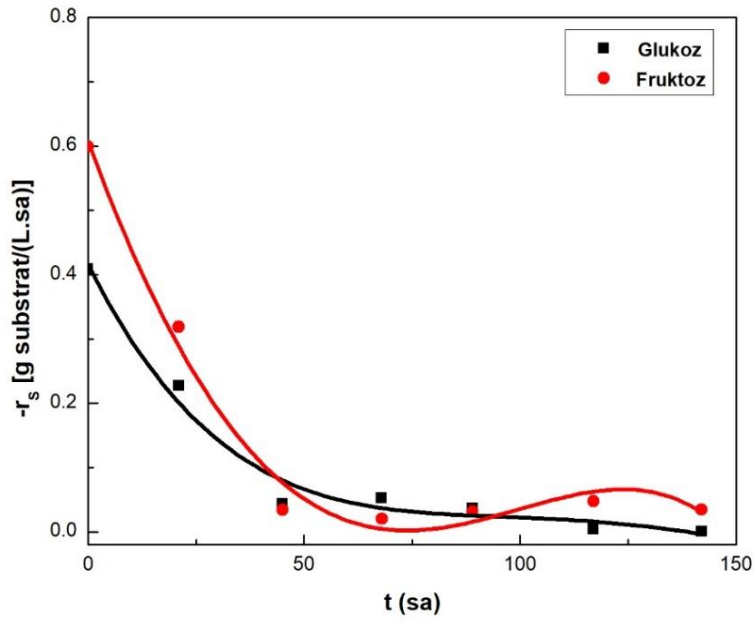
(b)

Şekil 4.13. Chardonnay cinsi üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde (a) glukoz (■) ve fruktoz (●) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■) ve fruktozun (●) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Şekil 4.14.a'da; Çalkarası cinsi üzüm ÜPÖ'nün, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamda bulunan glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri, Şekil 4.14.b'de ise, ortamdaki glukoz ve fruktozun *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından tüketim hızlarının zamanla değışimleri gösterilmiştir. Bu deneyde, ortam bileşimindeki glukozun, fermantasyonun 142. saatinde tamamen tüketilirken, ortamdaki fruktozun çok az miktarının (1.77 g/L), tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir. Bu ortamda glukoz için elde edilen en yüksek tüketim hızı; Chardonnay cinsi üzüm posasında olduğu gibi, fermantasyonun başlangıcında ve 0.41 g glukoz/(L.sa) olarak hesaplanırken, fruktoz için 0.60 g fruktoz/(L.sa) olarak belirlenmiştir.



(a)



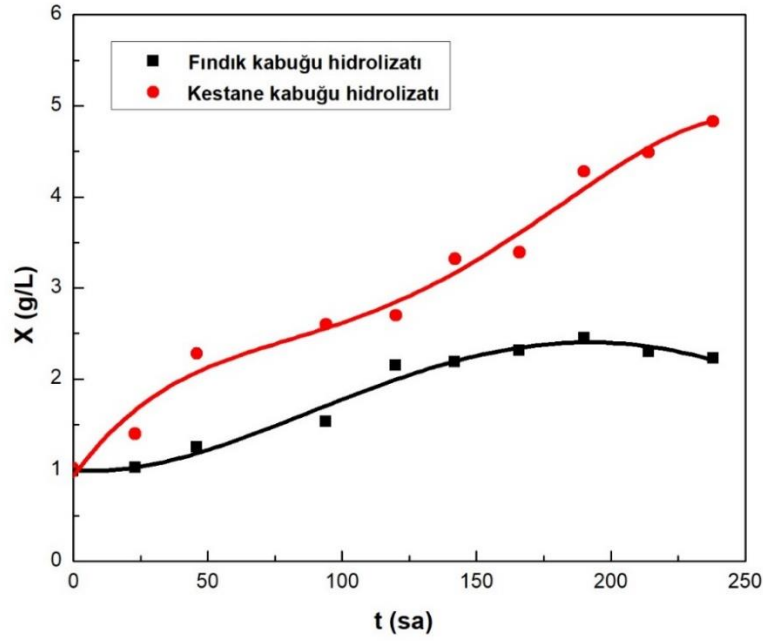
(b)

Şekil 4.14. Çalkarası cinsi üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde (a) glukoz (■) ve fruktoz (●) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■) ve fruktoz (●) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

4.1.3. Kestane ve fındık kabuğu özütleri ile yapılan çalışmalar

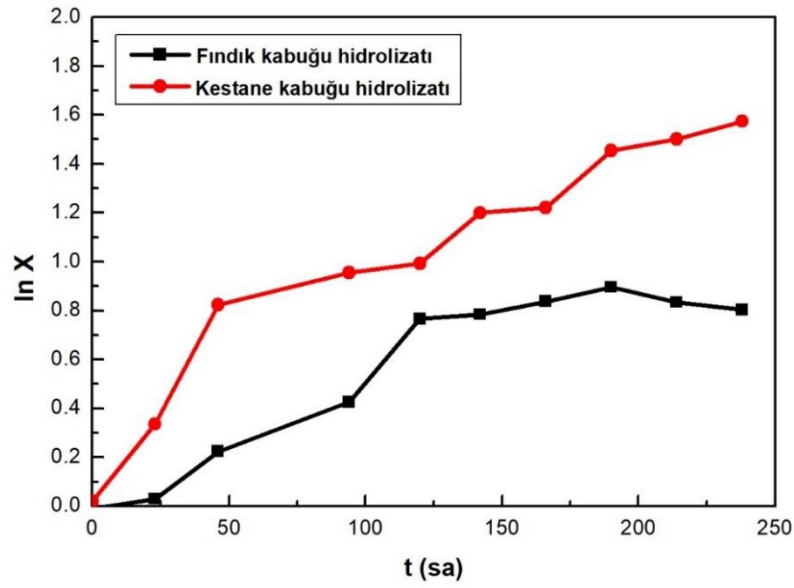
Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkileri incelenen diğer bir doğal substrat; kestane ve fındık kabuklarından hazırlanmış hidrolizatlar olmuştur. Deneylerde kullanılan kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (AİBÜ), Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden hazır olarak temin edilmişlerdir. Bu hidrolizatların hazırlanmasına ilişkin bilgiler; Ek 1'de sunulmuştur (Eryaşar, 2016). Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun inokülasyon başlangıç derişimi; 4.1×10^7 kob/mL olarak tayin edilmiştir.

Şekil 4.15.'te; kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının, ayrı ayrı fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler verilmektedir. İlgili şekil incelendiğinde de görülebileceği gibi; fermantasyon ortamı olarak kestane kabuğu hidrolizati kullanıldığında elde edilen biyokütle derişiminin, fındık kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamdakine göre, daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri, kestane kabuğu hidrolizatının ve fındık kabuğu hidrolizatlarının, fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde sırasıyla; 4.83 g/L ve 2.23g/L olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, fındık kabuğu hidrolizatının ortam olarak kullanıldığı deneyde; fermantasyon boyunca biyokütle derişimlerinde düzenli bir artış görülmekle birlikte, kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı ortamda ise; fermantasyonun 120. saatinden itibaren, biyokütle çok fazla değişmediği de tespit edilmiştir.



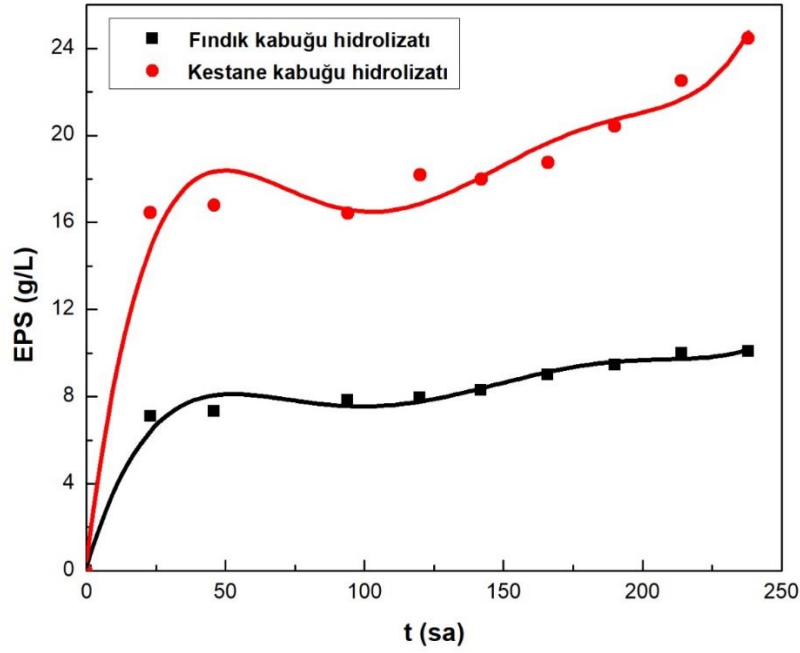
Şekil 4.15. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde, mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı değeri (μ), Bölüm 2.1.1.'de verilen Eş. 2.2 yardımıyla, $\ln X$ değeriinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler (Şekil 4.16.) kullanılarak hesaplanmıştır. Fermantasyon ortamında kestane kabuğu hidrolizatı kullanıldığında hesaplanan özgül üreme hızı değeri 0.021 sa^{-1} iken, fındık kabuğu hidrolizatı kullanıldığında hesaplanan özgül üreme hızı değeri 0.013 sa^{-1} 'dir.



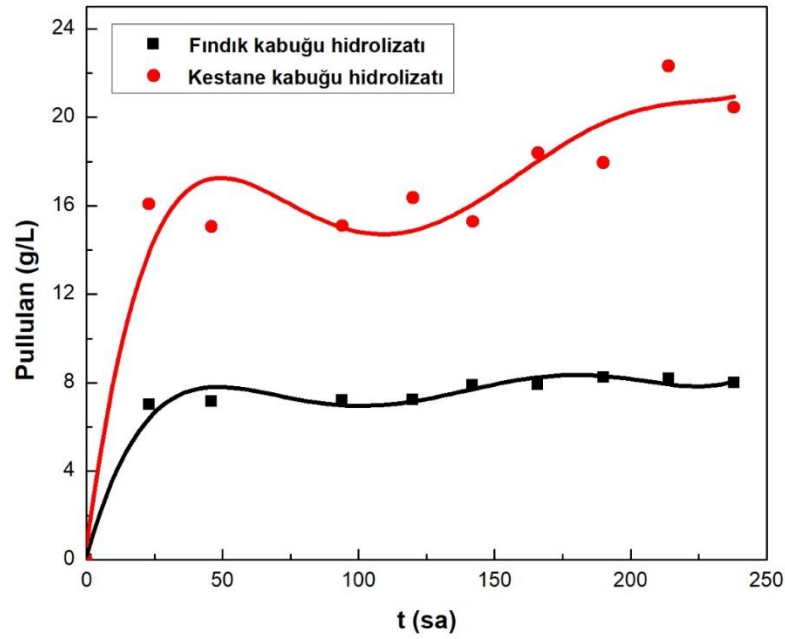
Şekil 4.16. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.17.'de kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri sunulmuştur. Kestane kabuğu hidrolizatında; fermantasyon boyunca, çalışılan suş tarafından üretilen EPS derişimlerinin, fermantasyon boyunca, fındık kabuğu hidrolizatındakinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kestane kabuğu hidrolizatının *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS üretimini fındık kabuğu hidrolizatına göre daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek EPS derişimleri, fındık kabuğu hidrolizatı ortamında; 10.09 g/L olarak tespit edilirken, fermantasyon ortamının kestane kabuğu hidrolizatı olduğu ortamda ise; 24.46 g/L olarak ölçülmüştür. En yüksek EPS derişimlerine, kullanılan her iki ortamda da; fermantasyonun 238. saatinde ulaşılmıştır. Bununla birlikte; kestane kabuğu hidrolizatı ortamında fermantasyon süresince incelenen suşun EPS üretimi giderek artma eğiliminde olmasına rağmen, fındık kabuğu hidrolizatında bu artışın ilk 24. saatten sonra çok küçük miktarlarda olduğu da tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Fermantasyon ortamı olarak kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının kullanıldığı deneylerde üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. Bu deneylerde, kullanılan her iki ortam için de, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin fermantasyon süresindeki değışimlerinin, üretilen EPS'ninkine oldukça benzer olduğu bulunmuştur. Elde edilen en yüksek pullulan derişimleri kestane kabuğu hidrolizatının ve fındık kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde sırasıyla; 22.33 g/L, 8.23 g/L olarak belirlenmiştir.

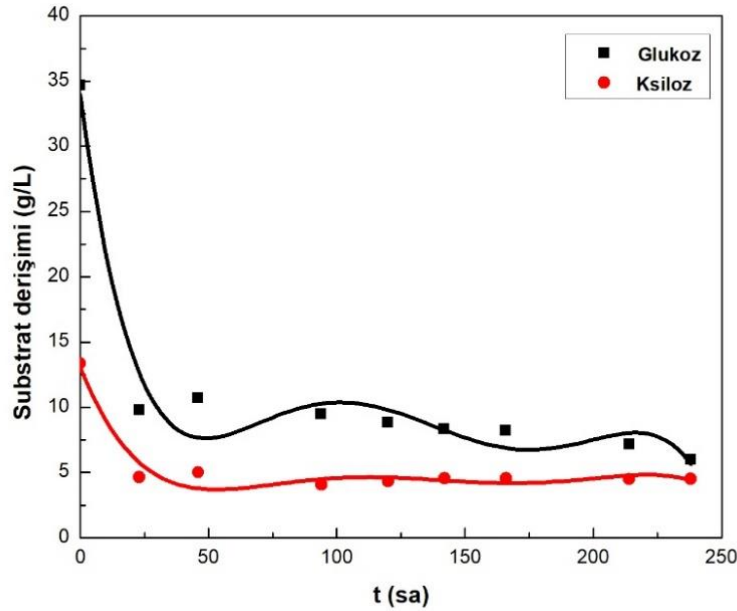


Şekil 4.18. Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

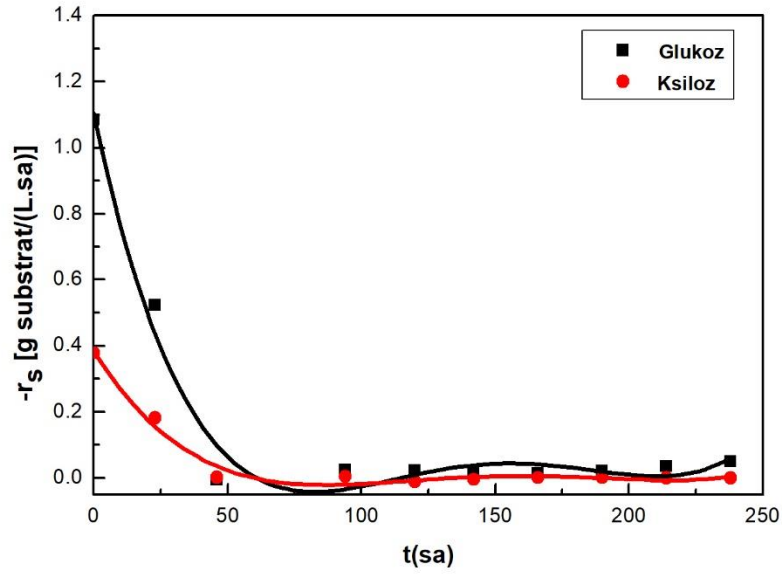
Kestane ve fındık kabuğu hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyler için hesaplanan özgül ürün oluşum hızları (v); biyokütle ve pullulan derişimlerinin zamanla değışimini gösteren grafikler (Şekil 4.15 ve 4.18.) kullanılarak belirlenmiştir. Fermantasyon ortamı olarak; kestane kabuğu hidrolizati kullanıldığında elde edilen en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m); 0.62 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanırken, fermantasyon ortamında fındık kabuğu hidrolizati kullanıldığında ise bu değeri; 0.51 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Bu deneylerde, kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarındaki şeker türü ve miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla bir ön deneme gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen şeker tayinleri; daha önce Bölüm 3.2.7 ve 3.2.10.'da anlatılan yöntemler ile tespit edilmişlerdir. Yapılan bu testler sonucunda, kestane kabuğu hidrolizatının bileşiminde, ölçülebilir miktarda; glukoz ve ksiloz bulunduğu tespit edilirken, fındık kabuğu hidrolizatında ise; ölçülebilir ksiloz bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle fermantasyon süresince, substrat olarak, fındık kabuğu hidrolizatında; ksilozun, kestane kabuğu hidrolizatında ise; ksiloz ve glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri izlenmiştir.

Fermantasyon ortamı olarak; kestane kabuğu hidrolizatının kullanıldığı deneylerde, ortamdaki şeker derişimlerinin zamanla değışimleri ile ortamdaki şekerlerin tüketim hızlarının zamanla değışimleri; Şekil 4.19.'da gösterilmektedir. Kestane kabuğu hidrolizatının glukoz başlangıç derişimi 34.7 g/L olarak tayin edilirken, ksiloz başlangıç derişimi ise; 13.37 g/L olarak ölçülmüştür (Şekil 4.19.a). Bu ortamda, glukoz derişiminde fermantasyonun ilk 23. saatine kadar hızlı bir azalma tespit edilirken, fermantasyonun 94. saatinden itibaren ise, önemli bir tüketim olmadığı da tespit edilmiştir. Ortamda bir miktar glukozun, ilerleyen süreçte, çalışılan suş tarafından tüketilmeden bırakıldığı belirlenmiştir. Bu deneylerde ortamdaki ksiloz derişimlerinin zamanla değışimleri incelendiğinde ise; fermantasyonun ilk 23. saatine kadar ksilozun hızlı tüketildiği, 94. saaten sonra ise tüketilemediği ve ortamda bir miktar ksilozun da kaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.19.b'de de görülebileceği gibi, kestane kabuğu hidrolizatı ortamında, fermantasyonun 94. saatinden sonra ksiloz ve glukozun derişimleri neredeyse değışmediğinden dolayı tüketim hızlarının da sabit kaldıkları izlenmiştir. Bu deneylerde, glukoz ve ksiloz için hesaplanan en yüksek tüketim hızları 1.08 g glukoz/(L.sa) ve 0.38 g ksiloz/(L.sa) olarak, fermantasyonun, başlangıcında belirlenmiştir.



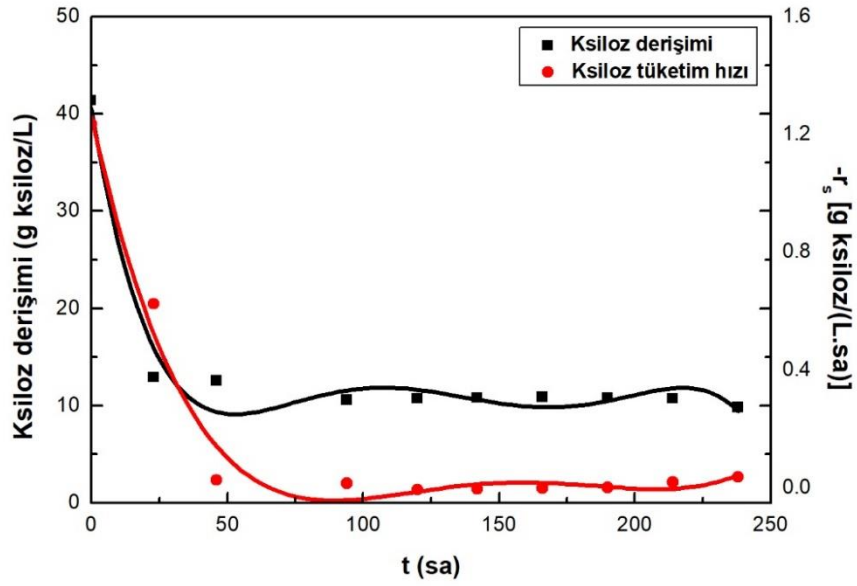
(a)



(b)

Şekil 4.19. Kestane kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde (a) glukoz (■) ve ksiloz (●) derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz (■) ve ksiloz (●) tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Şekil 4.20.'de; findık kabuğu hidrolizatı ortamındaki, ksiloz derişimlerinin zamanla değışimleri ile, bu ortam için hesaplanan; ksiloz tüketim hızlarının zamanla değışimleri verilmiştir. İlgili grafiğin incelenmesinden de görülebileceği gibi; fermantasyonun ilk 23 saatine kadar hızlı bir şekilde olmak üzere, 94. saatine kadar ortamdaki ksiloz derişiminin azaldığı, sonrasına ise ksilozun çok fazla tüketilmeden ortamda kaldığı tespit edilmiştir. Bu deneyde, en yüksek ksiloz tüketim hızı; fermantasyonun başlangıcında, 1.24 g ksiloz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.

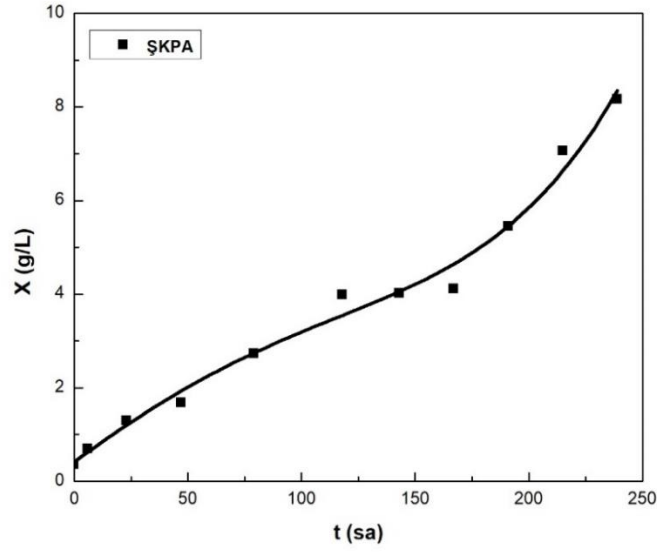


Şekil 4.20. Fındık kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ksiloz derişimlerinin ve ksiloz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

4.1.4. Şeker kamışı pekmezi artığı ile yapılan çalışmalar

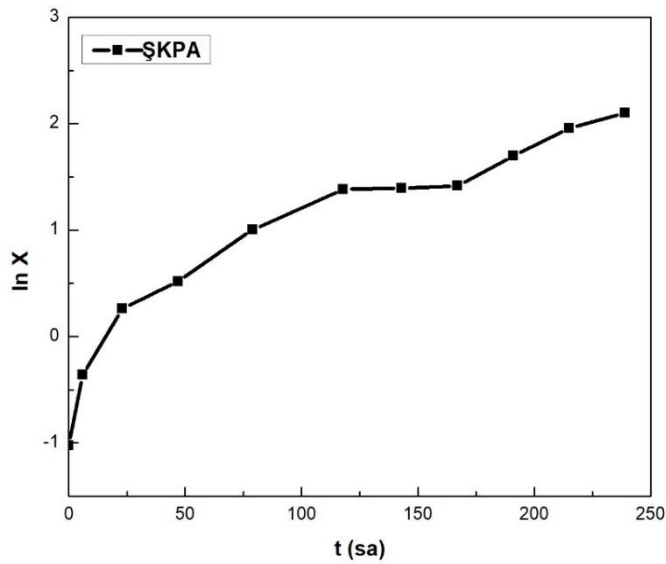
Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimi için, fermantasyon ortamı olarak incelenen bir diğer doğal substrat, şeker kamışı pekmezi üretiminde çıkan artıktır (ŞKPA) (bkz Bölüm 3.1.3.). Bu artığın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi; 9.1×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.21.'de; söz konusu ortamda; *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri verilmiştir. ŞKPA ortamında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişiminin fermantasyon süresince artış gösterdiği ve fermantasyonun sonunda biyokütle derişiminin; 8.17 g/L değerine ulaştığı tespit edilmiştir.



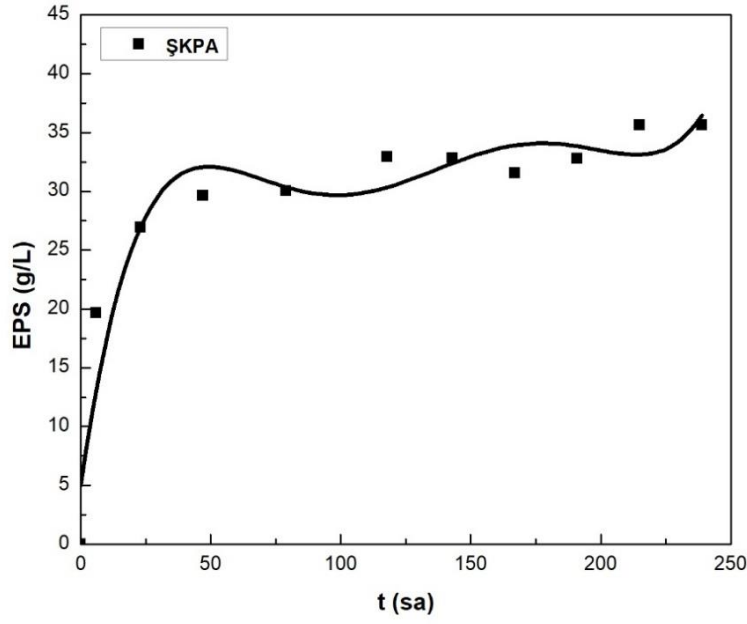
Şekil 4.21. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

ŞKPA'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ölçülen biyokütle derişimlerinin (Şekil 4.21.) $\ln$ değeri alınarak zamana karşı çizilen $\ln X$ grafiğı; Şekil 4.22.'de verilmektedir. Bu çalışmada, $\ln X$ grafiğinden, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesi dikkate alınarak hesaplanan; özgül üreme hızı 0.056 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.



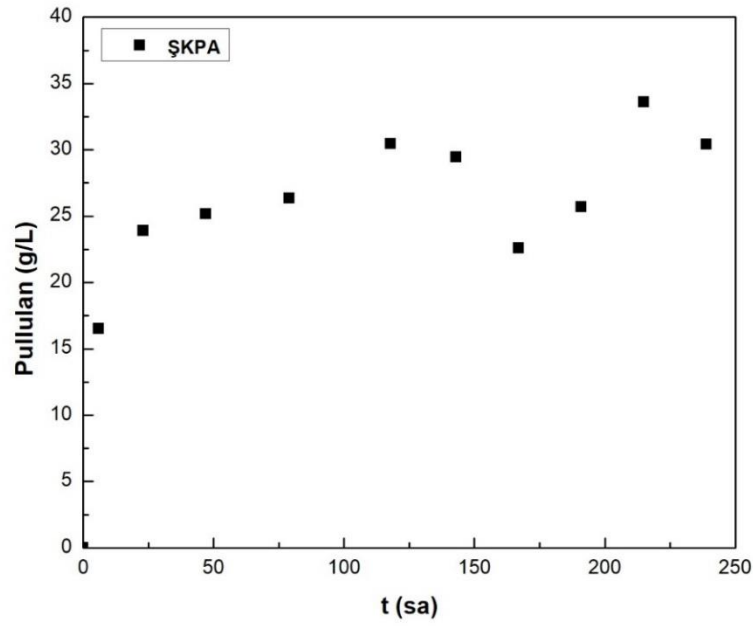
Şekil 4.22. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, $\ln X$ değeri zamanla değışimleri

Şekil 4.23.'de; ŞKPA'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri verilmiştir. Kullanılan ortamın, *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS üretimini oldukça teşvik ettiği, EPS derişiminin fermantasyonun 47. saatine kadar hızla artış gösterdiği (29.62 g/L), 47. saatten sonra ise derişimin çok fazla değışmediği bulunmuştur. Bu deneyde en yüksek EPS derişimine (35.65 g/L), fermantasyonun 239. saatinde ulaşılmıştır.



Şekil 4.23. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

ŞKPA ortamında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.24.'te verilmiştir. Bu deneyde, çalışılan suş tarafından üretilen pullulan derişiminin, fermantasyonun ilk 23. saatine kadar hızla arttığı (23.89 g/L), en yüksek değerine (33.59 g/L) ise, fermantasyonun 215. saatinde ulaştığı tespit edilmiştir.



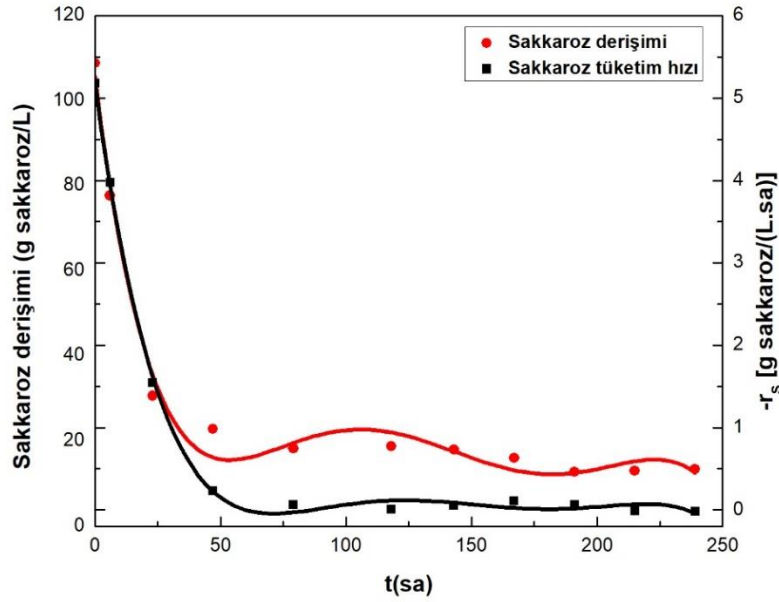
Şekil 4.24. Şeker kamışı pekmezi artığının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermantasyon ortamı olarak; şeker kamışından pekmez üretimi sırasında ortaya çıkan atığın kullanıldığı deneyde hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m) ise; 4.6 g pullulan/(g mo.sa) olarak belirlenmiştir.

Şeker kamışı bileşiminde yüksek oranda sakkaroz bulunduran ve şeker üretiminde kullanılan bir bitkidir (Pattrra ve ark., 2011; Singh ve ark., 2018). *A. pullulans* ile pullulan üretiminde sakkarozun, pullulan üretimini teşvik eden bir substrat olduğu daha önce yapılan bazı çalışmalarda ifade edilmiştir (Sheng, Tong ve Ma, 2016; An ve ark., 2017). Literatürde şeker kamışı suyu kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamında, *A. pullulans* tarafından üretilen en yüksek pullulan derişiminin; 64 g/L olarak fermantasyonun 96. saatinde tespit edildiği ifade edilmiştir (Singh ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında, şeker kamışından pekmez üretimi esnasında ortaya çıkan atığın da, yüksek oranda sakkaroz içerdiği, fermantasyon öncesinde yapılan analiz ile doğrulanmıştır. Fermantasyon ortamı, daha önce Bölüm 3.2.1.4'te belirtildiği şekilde hazırlanmış ve kullanılan ŞKPA örneğinde, yaklaşık olarak 600 g/L olarak tayin edilen sakkaroz derişimi, *A. pullulans* AZ-6 suşu için daha önce optimal olarak belirlenmiş olan

başlangıç derişimine (100 g sakkaroz/L) saf su ile seyreltilmiştir. Bu ortamda yapılan deneylerde, sakkaroz derişimlerinin fermentasyon süresince zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 4.25.'de verilmiştir. Deneylerde kullanılan suşun, sakkaroz tüketim hızının, fermentasyon süresince değişimi de, yine aynı grafikte sunulmuştur. İlgili grafik incelendiğinde; ortamdaki sakkarozun, fermentasyonun ilk 47 saatinde hızlı bir şekilde tüketilerek; 22.89 g/L' ye düştüğü, daha sonra ise bu azalmanın çok daha düşük miktarlarda olmak üzere, azalarak devam ettiği tespit edilmiştir. Bu deneylerde, fermentasyonun sonundaki sakkaroz derişiminin 13.45 g/L'ye indiğı belirlenmiştir. Bu çalışma için hesaplanan, en yüksek sakkaroz tüketim hızının ise; fermentasyonun başlangıcında 5.19 g sakkaroz/(L.sa) olduğu tespit edilmiştir.



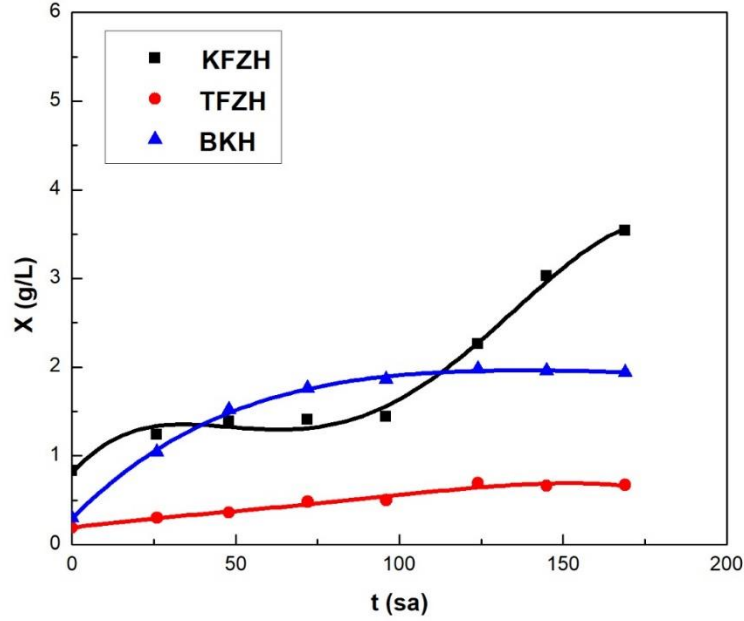
Şekil 4.25. Şeker kamışı pekmezi artığının fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde sakkaroz derişimlerinin ve sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

4.1.5. Kuru / taze fındık zürüfları ve balkabağı kabukları ile yapılan çalışmalar

Bu tez çalışmasında, doğal substrat kaynakları olarak, tarımsal atıklar olan; kuru ve taze fındık zürufu örnekleri ve balkabağı kabukları ile de çalışılmıştır. Kuru / taze fındık zürüfları ve balkabağı kabuklarından fermentasyon ortamlarının hazırlanmaları daha önce sırasıyla; Bölüm 3.2.1.5 ve Bölüm 3.2.1.6'da verilmiş olan yöntemler kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, söz konusu fermantasyon ortamlarına inokülasyon başlangıç derişimi; 3.6×10^7 kob/mL olarak tayin edilmiştir.

Şekil 4.26.'da, kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları (KFZH; TFZH) ile balkabağı kabuğu hidrolizatının (BKH) fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri verilmiştir.

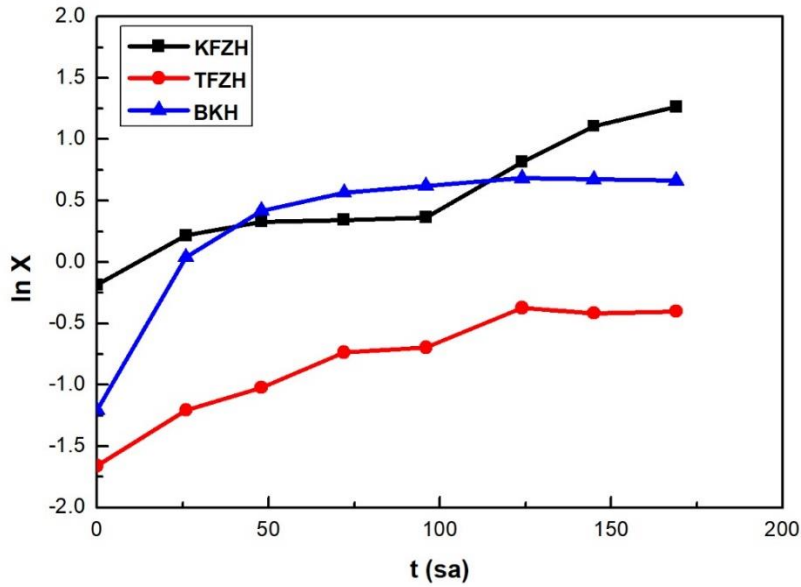


Şekil 4.26. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.26.'nın incelenmesinden de anlaşılacağı gibi; fındık zürufu örnekleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında; KFZH'nın, TFZH ortamına göre, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle üretimini daha fazla desteklediği saptanmıştır. Grafikten de görülebileceği gibi; TFZH'da biyokütlenin fermantasyon süresince az da olsa bir artış eğiliminde olduğu görülürken, KFZH ortamında ise; biyokütlenin fermantasyonun 96. saatine kadar bir miktar arttığı ancak 96. saatten sonra ise; biyokütlerdeki artışın çok daha belirgin hale geldiği saptanmıştır. Fermantasyon süresince, KFZH ve TFZH ortamlarında ulaşılan en yüksek biyokütle derişimleri, sırasıyla; 3.54 g/L ve 0.67 g/L olarak tayin edilmiştir. Fermantasyon ortamı olarak; BKH'nın kullanıldığı deneyde ise; incelenen suşun biyokütle derişiminin, fermantasyonun 72. saatine kadar bir miktar arttığı, daha

sonra ise çok fazla değişmediği de saptanmıştır. Balkabağı kabuğu kullanılan fermantasyon ortamında bu ortam için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun ulaştığı en yüksek biyokütle derişimi; 1.98 g/L olarak tayin edilmiştir.

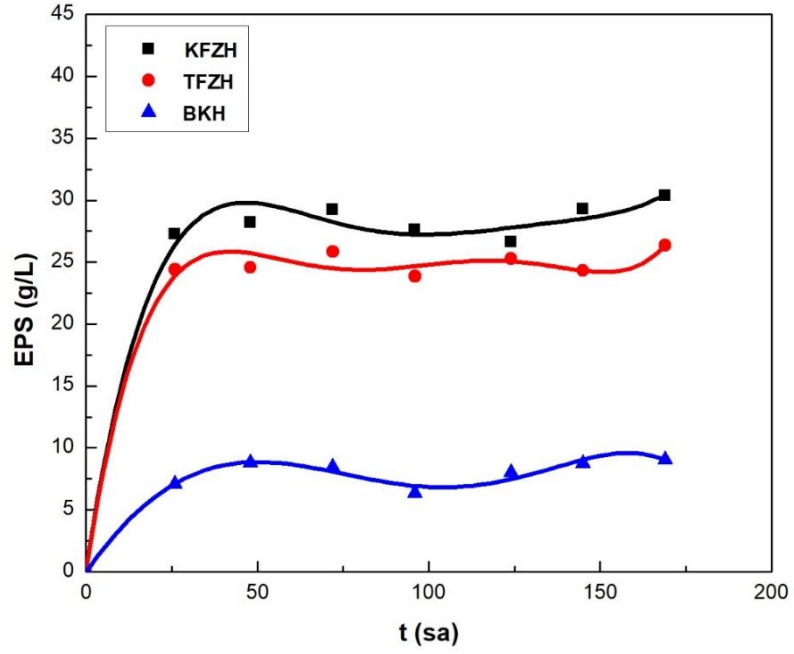
Şekil 4.27.'de; kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, biyokütle derişimlerinden hesaplanan; $\ln X$ değerlerinin zamanla derişimleri gösterilmektedir. Bu grafikten yararlanılarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ) hesaplanmıştır. KFZH'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu için hesaplanan özgül üreme hızı (μ); 0.016 sa^{-1} olarak belirlenirken, TFZH ortamında ise (μ) özgül üreme hızı; 0.018 sa^{-1} olarak tayin edilmiştir. Balkabağı kabuğu hidrolizatı ortamında ise, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızı; 0.048 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.27. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla derişimleri

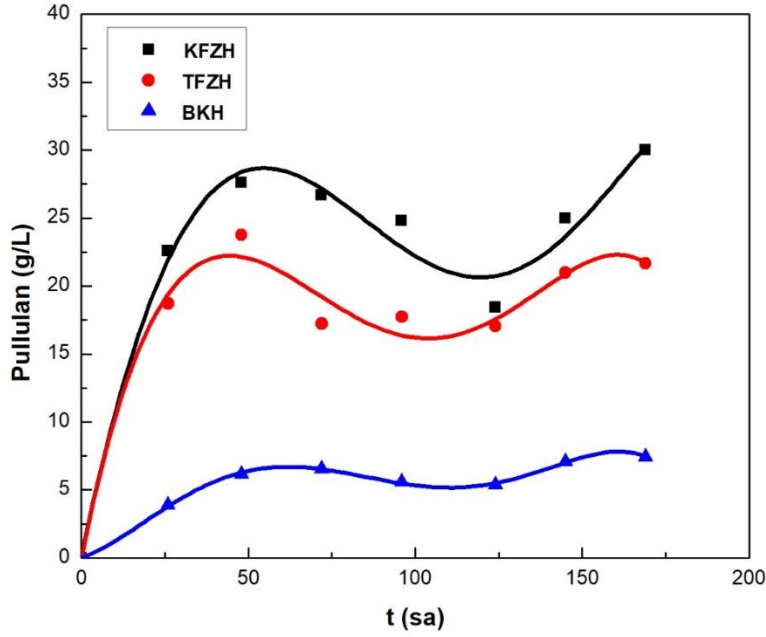
Kuru ve taze fındık zürufu ile balkabağı kabuğu hidrolizatlarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS miktarlarının zamanla derişimleri; Şekil 4.28.'de sunulmuştur. Fındık zürufu hidrolizatları (kuru ve taze) fermantasyon ortamı olarak kullanıldıklarında, *A. pullulans*

AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişiminin, balkabağı kabuğu hidrolizatı ortamında üretilen EPS derişiminden oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen en yüksek EPS derişimi, KFZH'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; 30.36 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon ortamları olarak; TFZH ve BKH'nın kullanıldığı deneylerde elde edilen en yüksek EPS derişimleri ise sırasıyla; 26.36 g/L ve 9.04 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 4.28. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.29.'da; kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri verilmiştir. Denenen 3 farklı hidrolizatta, çalışmada kullanılan suş tarafından üretilen EPS derişimlerine benzer olarak, bu deneylerde elde edilen en yüksek pullulan derişiminin; 30.02 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatinde, fermantasyon ortamı olarak; KFZH'nın kullanıldığı deneyde elde edildiği saptanmıştır. Fermantasyon ortamı olarak; TFZH kullanıldığında, elde edilen en yüksek pullulan derişimi; 21.67 g/L, BKH kullanıldığında ise; 7.43 g/L olarak belirlenmiştir.



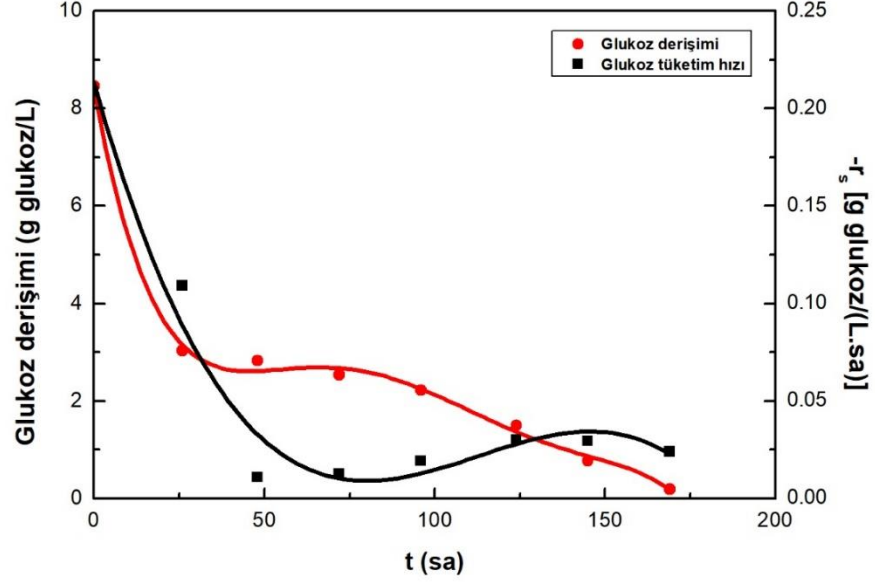
Şekil 4.29. Kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatları ile balkabağı kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu çalışmada elde edilen pullulan derişimlerinin zamana karşı değışimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.29.) ve Şekil 4.26.'da yer alan biyokütle grafiklerinden yararlanılarak, bu deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, en yüksek özgül ürün oluşum hızları (v_m) belirlenmiştir. Fermantasyon ortamı olarak; KFZH, TFZH ve BKH'nın fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 1.56, 6.48 g, 0.33 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmışlardır.

Bu deneylerde, kullanılan 3 farklı hidrolizatta, fermantasyon süresince substrat tüketim hızları da belirlenmiştir. Lignoselülozik madde içeriği yüksek olan kuru ve taze fındık zürufuna uygulanan asit hidrolizi sonrasında ortam bileşiminde temel şekerler olarak; glukoz ve ksilozun bulunduğu, bazı literatür kaynaklarından da doğrulanmıştır (Ceylan ve Ünal, 2015; Pınar ve ark. 2017).

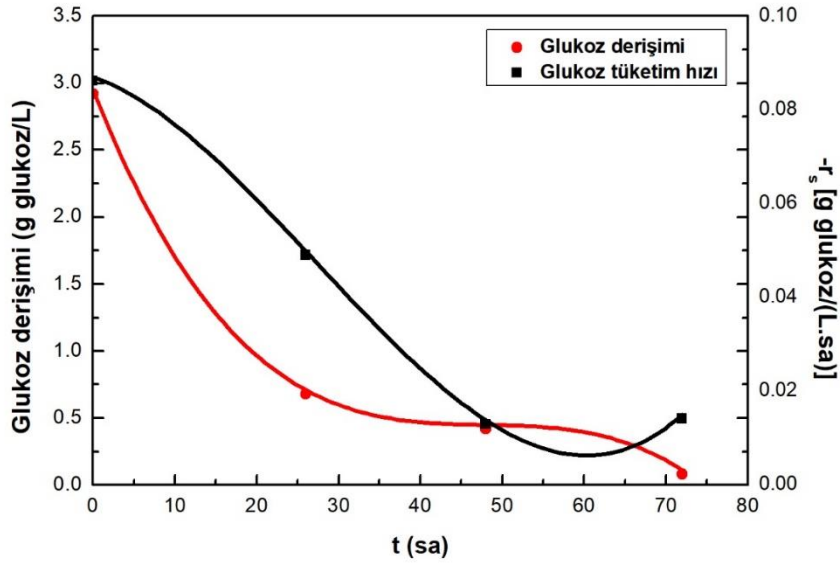
Şekil 4.30.'da, KFZH'nın fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; fermantasyon boyunca glukoz derişiminin değışimi ile fermantasyon süresince glukoz tüketim hızının zamanla değışimini gösteren grafiklere yer verilmiştir Ortamdaki

başlangıç derişimi; 8.46 g/L olan glukozun, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından fermentasyonun sonunda tamamen tüketildiği belirlenmiştir. Bu deneyde, glukoz tüketim hızının en yüksek değeri ise; 0.21 g glukoz/(L.sa) olarak, fermentasyonun başlangıcında bulunmuştur.



Şekil 4.30. Kuru fındık zürufu hidrolizatının fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Taze fındık zürufunun fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri ile, glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri; Şekil 4.31.'de sunulmuştur. Söz konusu grafik incelendiğinde görülebileceği gibi; Başlangıçta ortamda bulunan TFZH'da fermentasyonun başında, düşük miktarda bulunan glukozun (2.92 g/L), fermentasyonun 3. gününde tamamen tüketildiği bulunmuştur.



Şekil 4.31. Taze fındık zürufu hidrolizatının fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Çizelge 4.1.'de ise fermantasyon ortamı olarak kuru ve taze fındık zürufunun kullanıldığı deneylerde ortamda bulunan ksiloz miktarlarının fermantasyonun ilk günlerinde ölçülen değerleri belirtilmiştir. Başlangıçta fındık zürufu kullanılan ortamlarda bulunan az miktardaki ksiloz, kuru fındık zürufu kullanılan fermantasyon ortamında 26. saatin sonunda, taze fındık zürufu kullanılan fermantasyon ortamında 2. günün sonunda tamamen tüketilmiştir.

Çizelge 4.1. Fermantasyon ortamı olarak kuru ve taze fındık zürufu hidrolizatlarının kullanıldığı deneylerde, ortamda bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermantasyon süresi (saat)	Ksiloz derişimi (g/L) KFZH	Ksiloz derişimi (g/L) TFZH
0	2.71	0.68
26	0.002	0.21
48		0.079

Bu deneylerde, balkabağı kabuğu hidrolizatında, fermantasyon süresince glukoz ve sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri de incelenmiştir. Balkabağı kabuğunun

bileşiminde; glukoz ve sakkarozun olduğu bildirilmektedir. (Du ve ark., 2011; Shanmugavelan ve ark., 2013; Anonim, 2018). Ortamda bulunan glukoz ve sakkarozun analizlerinde daha önce Bölüm 3.2.6. ve Bölüm 3.2.7.’de belirtilen yöntemler kullanılmıştır. Fermantasyon ortamı olarak BKH’nın kullanıldığı deneyde; ortamdaki şekerlerin başlangıç derişimleri ile zamanla değışimleri; Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelgeden de görülebileceği gibi her iki şekerin de fermantasyonun 48. saatinde tamamen tüketildikleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Fermantasyon ortamı olarak balkabağı kabuğu hidrolizatının kullanıldığı deneyde, ortamda bulunan şeker derişimlerinin zamanla değışimleri

Fermantasyon süresi (saat)	Glukoz derişimi (g/L)	Sakkaroz derişimi (g/L)
	KFZH	TFZH
0	2.86	2.58
26	0.36	0.29
48	0.036	0.095

4.2. Pullulan üretimi amacıyla en uygun fermantasyon ortamının seçimi için sonuçların değerlendirilmeleri

Çeşitli tarımsal artık ve atıklar ile gıda endüstrisi artıklarının; *A. pullulans* AZ-6 ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyler sonucunda her bir substrat kaynağı için elde edilen en yüksek biyokütle (X), EPS, pullulan derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme hızları (μ) ve en yüksek özgül ürün oluşum hızlarına ait değerler, Çizelge 4.3.’de verilmiştir.

Çizelge 4.3.’de toplu olarak verilen sonuçlar incelendiğinde, *A. pullulans* AZ-6 suşu için denenen fermantasyon ortamlarında elde edilen biyokütle derişimlerinin; 0.72-11.51 g/L arasında değıştiği ve en yüksek biyokütle derişiminin; (11.51 g/L) Çalkarası cinsi ÜPÖ’nün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir. Genel olarak bakıldığında; taze fındık zürufu, Chardonnay cinsi ÜPÖ ve balkabağı kabuğu hidrolizatı ortamlarının kullanılan suşun üremesini teşvik etmediği, bunun yanı sıra, ŞKPA, limon ve turunç kabuğu hidrolizatlarında ise *A. pullulans* AZ-6 suşunun oldukça iyi ürettiği belirlenmiştir.

Kullanılan fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızı değerlerinin; 0.013-0.056 sa⁻¹ arasında değiştiği, bulunmuştur. Suşa ait en yüksek özgül üreme hızı; 0.056 sa⁻¹ olarak, şeker kamışı pekmez artığının (ŞKPA), fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.)

Bu tez çalışmasında kullanılan ve yerel bir suş olan *A. pullulans* AZ-6'nın, denenen fermantasyon ortamlarında, en yüksek EPS ve pullulan üretimlerinin, sırasıyla; 6.87-35.65 g/L ile 6.35-33.59 g/L arasında değiştiği bulunmuştur. Suşun en yüksek EPS ve pullulan üretimin gerçekleştirdiği fermantasyon ortamının, aynı zamanda en yüksek özgül üreme hızının da tespit edildiği; ŞKPA ortamı olduğu belirlenmiştir. Kuru fındık zürufu hidrolizatının (KFZH) fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde de, incelenen suşun, ŞKPA ortamındakine oldukça yakın değerlerde, EPS ve pullulan üretebildiği de saptanmıştır. KFZH ortamında tespit edilen en yüksek EPS ve pullulan derişimleri sırasıyla; 35.65 ile 33.59 g/L'dir. *A. pullulans* AZ-6 suşunun, genel olarak; üzüm posası özütleri, balkabağı kabuğu hidrolizatı ve fındık kabuğu hidrolizatının fermantasyon ortamları olarak kullanıldığı deneylerde, diğer ortamlara kıyasla, EPS ve pullulan üretimlerinin düşük olduğu da belirlenmiştir. Fermantasyon ortamı olarak; turunçgil kabuğu hidrolizatları ile, kestane ve taze fındık zürufu hidrolizatlarının kullanıldığı deneylerde, bu ortamların, *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS ve pullulan üretimlerini oldukça iyi destekledikleri de bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında ayrıca, çeşitli doğal substratlardan hazırlanan fermantasyon ortamlarının, incelenen suşun özgül ürün oluşum hızı (v) üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Denenen fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül ürün oluşum hızlarının; 0.19-15.00 g pullulan/(g mo.sa) arasında değiştiği, en düşük ve yüksek özgül ürün oluşum hızlarının fermantasyon ortamları olarak sırasıyla; Çalkarası cinsi ÜPÖ ile turunç kabuğu hidrolizatının kullanıldığı deneyler için hesaplandıkları da bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında, endojen *A. pullulans* AZ-6 suşunun, pullulan üretimini en iyi destekleyen fermantasyon ortamının belirlenmesi ve optimizasyonu hedeflenmiştir. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan doğal substratlar arasında; en yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin; ŞKPA, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığında elde edilmesine rağmen (bkz Çizelge 4.3.), şeker kamışı üretiminin henüz ülkemizde çok yaygın olmaması, hasat sezonunun kısa ve üretim kapasitenin düşük olması nedeniyle,

yine yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin elde edildiği, daha kolay ve ucuz elde edilebilir bir atık olan; kuru findık zürufu ile deneylere devam edilmesine karar verilmiştir. Lignoselülozik açıdan zengin bir atık olan findık zürufunun, bileşimindeki selüloz, lignin ve hemiselüloz yapılarının asit hidrolizi sonucunda ayrıştırılması ile meydana gelen hidrolizatın mikroorganizmalar tarafından kolay kullanılabilir şekerlerce zengin bileşenler de içerdiği ifade edilmektedir (Uzuner ve Çekmecelioğlu, 2014, Pınar ve ark., 2017). Proses ekonomisi açısından düşünöldüğünde de; tez çalışmasının devamında, bazı fermentasyon ortamı parametrelerinin optimizasyonu aşamasında deneylere, kuru findık zürufu hidrolizatı ile devam edilmesi uygun görölmüştür.

4.3. A. pullulans AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kuru findık zürufu hidrolizatının kullanıldığı fermentasyon ortamının optimizasyonu için deney tasarım planının oluşturulması

Bu tez çalışmasında, fermentasyon ortamı olarak kullanılan 12 farklı doğal substratın, yerel A. pullulans AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu suşun pullulan üretimini en çok destekleyen ortamın belirlenip, optimizasyonunun yapılarak, üretimin olabildiğince artırılması hedeflenmiştir. Araştırmanın bu aşamaya kadar olan bölümünde gerçekleştirilen deneylerde, kuru findık zürufu hidrolizatının (KFZH), A. pullulans AZ-6 suşu için en uygun fermentasyon ortamı olduğuna karar verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde ise; seçilen fermentasyon ortamının optimizasyonu amacıyla; Design Expert® 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programından yararlanılmıştır. Bu programda; dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Deney tasarımı için; daha önce; Bölüm 3.2.14.'de de açıklandığı gibi; amonyum sülfat derişimi (x1), 100 mL saf suya eklenen derişik H₂SO₄ çözeltisi hacmi (x2) ve 100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş findık zürufu miktarı (x3) olmak üzere 3 bağımsız değişken seçilmiştir.

Literatürde benzer konuda yapılan çeşitli çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler de dikkate alınarak, deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin çalışma aralıkları belirlenmiş ve her bir bağımsız değişken için beş farklı düzeyde çalışılmıştır. Beş farklı düzeyde kodlanmış tasarımdaki α değeri daha önce Bölüm 3.2.14.'deki Eş. 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Bu araştırmada bağımsız değişken sayısı 3 olduğu için, α değeri; 1.68 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Çeşitli doğal substratlardan hazırlanan fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek biyokütle, EPS, pullulan derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme hızları ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri

Fermantasyon ortamı	Biyokütle (g/L)	EPS (g/L)	Pullulan (g/L)	Özgöl üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
Portakal kabuğu hidrolizatı	2.73	20.20	19.34	0.035	3.13
Limon kabuğu hidrolizatı	6.97	25.90	22.91	0.050	0.40
Greyfurt kabuğu hidrolizatı	4.62	21.61	21.54	0.024	5.04
Turunç kabuğu hidrolizatı	5.05	23.17	22.52	0.047	15.00
Üzüm posası özütü (Chardonnay)	0.72	15.85	14.84	*	0.58
Üzüm posası özütü (Çalkarası)	11.51	6.87	6.35	0.021	0.19
Kestane kabuğu hidrolizatı	4.83	24.46	22.33	0.021	0.62
Fındık kabuğu hidrolizatı	2.45	10.09	8.24	0.013	0.51
Şeker kamışı pekmezi artığı	8.17	35.65	33.59	0.056	4.60
Kuru fındık zürufu hidrolizatı	3.54	30.36	30.02	0.016	1.56
Taze fındık zürufu hidrolizatı	0.69	26.36	23.76	0.018	6.48
Balkabağı kabuğu hidrolizatı	1.98	9.04	7.43	0.048	0.33

*İncelenen suşun, bu ortamda biyokütle derişiminde önemli bir değışiklik olmaması nedeniyle, bu değer hesaplanmamıştır.

Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney tasarımında, seçilen bağımsız değişkenlere ait gerçek değerler; Çizelge 4.4.'de, kodlanmış değerler ise; Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir. Elde edilen deney tasarım planı; merkez noktada 6 tekrarlı olmak üzere 20 adet deneyden oluşmaktadır.

Çizelge 4.4. Deney tasarımında seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Deney no	x1 (g/L)	x2 (mL derişik H ₂ SO ₄)	x3 (g)
1	1.46	0.91	16.76
2	1.46	0.91	7.24
3	5.74	0.91	16.76
4	5.74	0.91	7.24
5	5.74	2.09	16.76
6	1.46	2.09	7.24
7	1.46	2.09	16.76
8	5.74	2.09	7.24
9	3.60	0.50	12.00
10	3.60	2.50	12.00
11	3.60	1.50	20.00
12	3.60	1.50	4.00
13	0.00	1.50	12.00
14	7.20	1.50	12.00
15	3.60	1.50	12.00
16	3.60	1.50	12.00
17	3.60	1.50	12.00
18	3.60	1.50	12.00
19	3.60	1.50	12.00
20	3.60	1.50	12.00

x1: (NH₄)₂SO₄ derişimi (g/L), **x2:** 100 mL saf suya eklenen derişik H₂SO₄ çözeltisi hacmi (mL), **x3:** 100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş fındık zürufu miktarı (g)

Çizelge 4.5. Deney tasarımında seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri

Deney no	x1	x2	x3
1	-1	-1	+1
2	-1	-1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	+1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1
9	0	-1.68	0
10	0	1.68	0
11	0	0	1.68
12	0	0	-1.68
13	-1.68	0	0
14	1.68	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

x1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişimi (g/L), **x2:** 100 mL saf suya eklenen derişik H_2SO_4 çözeltisi hacmi (mL), **x3:** 100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş fındık zürufu miktarı (g)

4.4. Merkezi karma tasarım yöntemi ile planlanan deneylerin gerçekleştirilmesi

Çalışmanın bu bölümünde, Çizelge 4.4’de verilmiş olan ve merkezi karma tasarım yöntemine göre planlanmış olan deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler sırasında, *A. pullulans* AZ-6 suşu, önceden Bölüm 3.1.2.’de belirtildiğı şekilde aktifleştirilmiş ve %5 (v/v) oranında, başlangıç pH’ları 6.48’e ayarlanmış olan fermantasyon ortamlarına ayrı ayrı inoküle edilmiştir. Fermantasyon deneyleri, kesikli sistemde, çalkalamalı bir su banyosunda; 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 24.2°C’de, karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamlarındaki amonyum sülfat derişimi; 0-7.2 g/L,

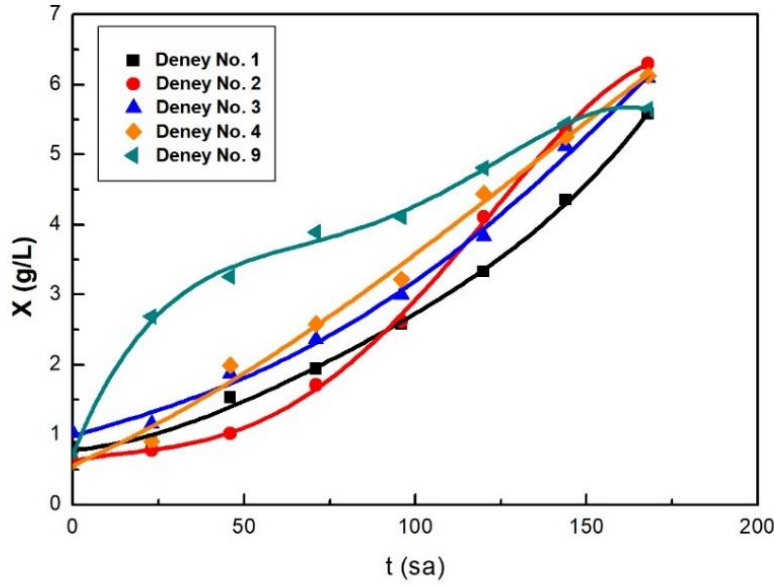
100 mL saf suya eklenen derişik H₂SO₄ çözeltisi hacmi; 0.5-2.5 ml ve 100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş fındık zürufu miktarı; 4-20 g aralığında değıştirilmiştir. Deneyler sırasında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokölasyon derişimlerinin; ortalama yaklaşık; 1.15×10^8 kob/mL olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak Çizelge 4.4'teki deney tasarım planında verilmiş olan; 1-4 ve 9 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. 1-4 numaralı fermantasyon ortamlarında 100 mL saf suya eklenen derişik H₂SO₄ (DSA) hacmi 0.91 mL iken, 9 numaralı ortamda 0.50 mL'dir. 1 ve 3 numaralı fermantasyon ortamlarında, 100 mL asit çözeltisine eklenen öğütölmüş fındık zürufu (ÖFZ) miktarı 16.76 g, 2 ve 4 numaralı fermantasyon ortamlarında 7.24 g ve 9 numaralı fermantasyon ortamında ise; 12.00 g'dır. Ayrıca 1 ve 2 numaralı fermantasyon ortamlarına azot kaynağı olarak eklenen amonyum sülfat derişimleri; 1.46 g/L, 3 ve 4 numaralı fermantasyon ortamlarında; 5.74 g/L ve 9 numaralı fermantasyon ortamında ise; 3.6 g/L'dir.

Optimizasyon deneylerinin çalışılan ilk bu grubunda, költürün başlangıç inokölasyon derişimi 1.87×10^8 kob/mL olarak belirlenmiştir.

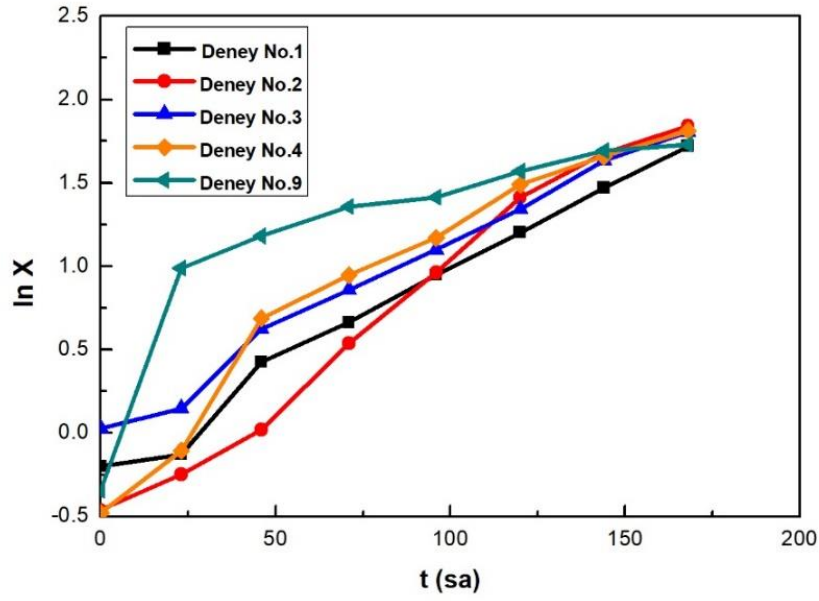
Deneyler sırasında, fermantasyon ortamlarından belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak, bu örneklerde; biyokötle, EPS, pullulan ve substrat derişimleri belirlenmiş ve her birinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler çizilmiştir.

Şekil 4.32.'de; 1-4 ve 9 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokötle derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler verilmiştir. Bu grupta incelenen tüm deneylerde biyokötle derişimlerinin fermantasyon süresince arttığı belirlenmiştir. Fermantasyonun 144. saatine kadar, 9 numaralı deneydeki biyokötle derişimleri, 1-4 numaralı deneylerde elde edilen biyokötle derişimlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Fermantasyonun 144. saatinden sonra 2, 3 ve 4 numaralı deneylerdeki biyokötle derişimlerinin, 9 numaralı deneydeki biyokötle derişiminden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bu deneylerde ulaşılan en yüksek biyokötle derişimleri, 2, 4, 3, 9 ve 1 numaralı deneylerde fermantasyonun sonunda ve sırasıyla; 6.3, 6.13, 6.09, 5.65 ve 5.58 g/L olarak belirlenmiştir.



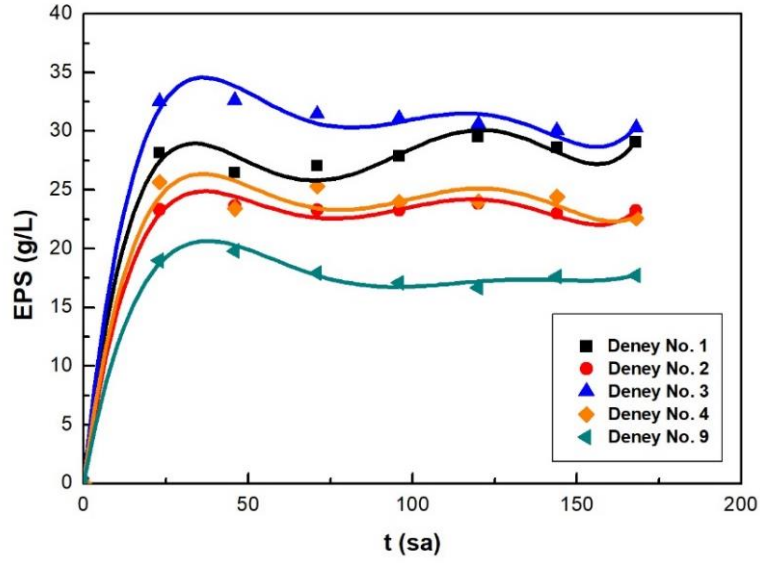
Şekil 4.32. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

Çalışmanın bu bölümünde ayrıca, her deney için bulunan kuru hücre ağırlıklarından hesaplanan $\ln X$ değęlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler çizilmiş ve bunlardan yararlanılarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki, özgül üreme hızları da (μ) hesaplanmıştır. Şekil 4.33.’de; 1-4 ile 9 numaralı deneylerde biyokütle derişimlerinin $\ln X$ değęlerinin zamanla değışimleri verilmiştir. 1-4 ve 9 numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşunun, üssel üreme bölgesinde hesaplanan μ değęleri sırasıyla; 0.024, 0.021, 0.021, 0.034 ve 0.058 sa^{-1} ’dir. Sonuçlar karşılaştırıldığında; çalışılan suşun en yüksek özgül üreme hızı; fermantasyon ortamındaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin; 3.6 g/L olduğu 9. deneyde elde edilmiştir.



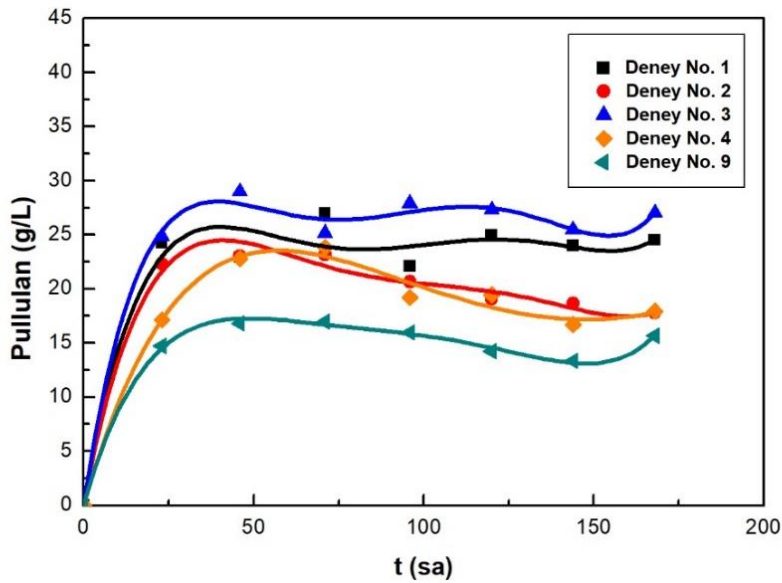
Şekil 4.33. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde, biyokütle derişimlerinin ln X değeri zamanla değışimleri

1-4 ve 9 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri; Şekil 4.34.’de sunulmuştur. Bu deneylerde elde edilen en yüksek EPS derişimi; 32.65 g/L olarak, fermantasyonun 46. saatinde 3 numaralı deneyde belirlenmiştir. 9 numaralı deneydeki fermantasyon ortamında elde edilen biyokütle derişimi, 1-4 numaralı deneylerdeki ortamlarda elde edilen biyokütle derişimlerinden yüksekken, üretilen EPS miktarı ise; 1-4 numaralı deneylerdekinden daha düşük olarak bulunmuştur. 9 numaralı deneyde elde edilen en yüksek EPS derişimi; 17.92 g/L olarak tayin edilmiştir. Bunun nedeni; fermantasyon ortamı bileşimindeki; değışkenlik gösteren amonyum sülfat derişimi olarak gösterilebilir. Amonyum sülfatın, *A. pullulans* ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamına eklendiğinde, biyokütle gelişimini teşvik etmesine rağmen, belirli bir konsantrasyondan sonra ise, EPS üretimini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Singh ve ark., 2012).



Şekil 4.34. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

1-4 ve 9 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.35.’de gösterilmiştir. Şekil 4.34.’de verilen; EPS derişimlerine benzer olarak; en yüksek pullulan derişimi yine 3 numaralı fermantasyon ortamında, fermantasyonun 46. Saatinde ve 28.97 g/L olarak tayin edilmiştir. Bu deneylerde, elde edilen en yüksek pullulan derişimleri; 1, 2, 4 ve 9 numaralı deneylerde, sırasıyla; 26.95, 23.14, 23.85 ve 17 g/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.35. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

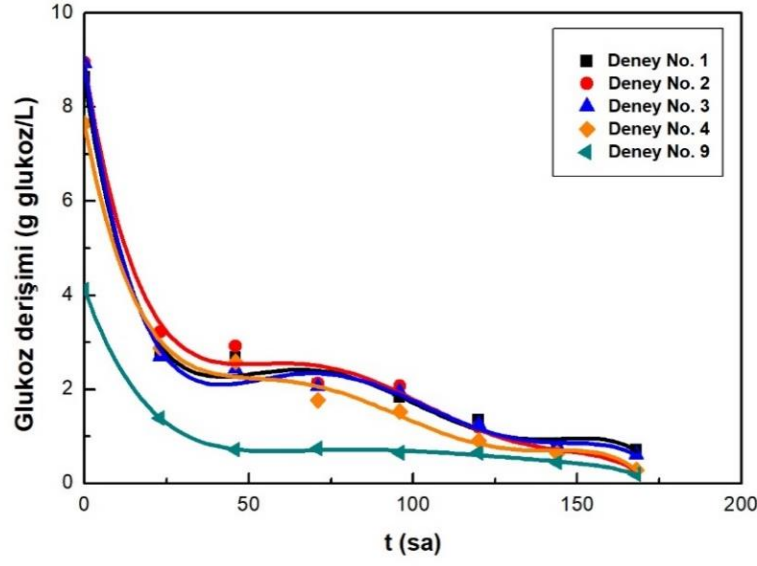
1-4 ve 9 numaralı deneyler için, biyokütle ve pullulan derişimi grafikleri (Şekil 4.32. ve Şekil 4.35.) kullanılarak, en yüksek özgül ürün oluşum hızları (v_m) da tespit edilmiştir. Buna göre en yüksek özgül ürün oluşum hızları 1-4 numaralı deneylerde sırasıyla; 1.72, 3.53, 1.29, ve 1.39 g pullulan/(g mo.sa) ve 9 numaralı deneydeki fermantasyon ortamında ise; 0.44 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Bu deneylerde, (1-4 ve 9 no.lu deneyler) fermantasyon ortamlarındaki glukoz ve ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri de incelenmiştir (Çizelge 4.6.) Fermantasyon ortamlarında bulunan ksiloz miktarları fermantasyonun 2. gününden itibaren ölçülebilir düzeyden uzaklaştığından dolayı ksiloz derişimi takibi 2. günün sonunda bırakılmıştır. Fermantasyonun başlangıcındaki ve ilk iki günündeki ksiloz derişimleri Çizelge 4.6.'da verilmiştir. 1 ve 3 ile 2 ve 4 numaralı fermantasyon ortamlarında 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ ve 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi eşit olduğundan dolayı başlangıçta ortamdaki ksiloz miktarları birbirine benzerlik göstermektedir.

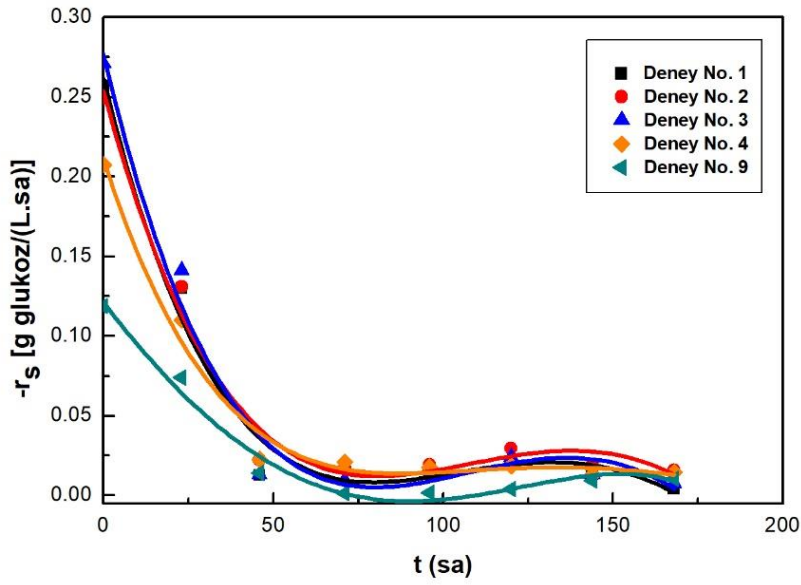
Çizelge 4.6. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarında bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri

Ksiloz derişimi (g/L)					
Fermantasyon süresi (saat)	Deney No.1	Deney No.2	Deney No.3	Deney No.4	Deney No.9
0	0.35	2.19	0.35	2.21	0.12
23	0.11	0.72	0.11	0.64	0.04
46	0.10	0.67	0.11	0.52	

Şekil 4.36.'da ise; deney; 1-4 ve 9 için, fermantasyon ortamlarındaki glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri sunulmuştur. 1-4 numaralı deneylerdeki glukoz başlangıç derişimlerinin, birbirlerine oldukça yakın oldukları, fermantasyon boyunca da benzer bir eğilimde azaldıkları tespit edilmiştir. 9 numaralı deneyde ise; ortamdaki glukoz başlangıç derişiminin (4.12 g/L), daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyonun sonunda, tüm ortamlardaki glukozun hemen hemen tamamına yakınının tüketildiği de belirlenmiştir. Hesaplanan en yüksek glukoz tüketim hızları; fermantasyonun başında elde edilmiştir. 1-4 ve 9 numaralı deneyler için hesaplanan glukoz tüketim hızları sırasıyla; 0.26, 0.25, 0.27, 0.21 ve 0.12 g glukoz/(L.sa) olarak tespit edilmiştir.



(a)



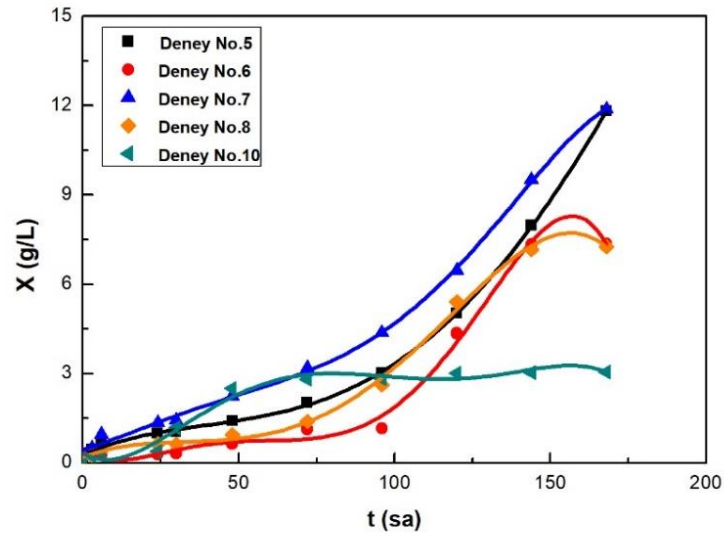
(b)

Şekil 4.36. “1-4” ve “9” numaralı deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Çalışmanın bu bölümünde, deney tasarım planında gösterilmiş olan (Çizelge 4.4.) deneylerden; 5, 6, 7, 8 ve 10 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. 5-8 numaralı deneylerdeki fermentasyon ortamlarında; 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi; 2.09 mL, 10 numaralı deney ortamında; 2.50 mL’dir. 5 ve 7 numaralı deneylerde; 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı; 16.76 g, 6 ve 8 numaralı deneylerde ise; 7.24 g ve 10

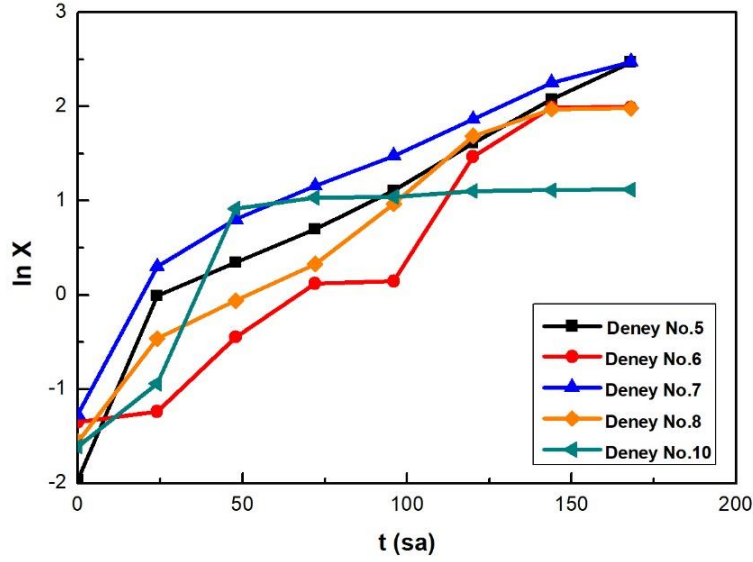
numaralı deneyde; 12.00 g'dır. Fermantasyon ortamlarına azot kaynağı olarak eklenen amonyum sülfat derişimleri; 5 ve 8 numaralı deneylerde; 5.74 g/L, 6 ve 7 numaralı deneylerde; 1.46 g/L ve 10 numaralı deneyde ise; 3.60 g/L'dir.

Bu deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşunun, başlangıç inokülasyon derişimi; 1.31×10^8 kob/mL olarak belirlenmiştir. Şekil 4.37.'de 5-8 ve 10 numaralı deneylerde elde edilmiş olan; biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri verilmektedir. Bu çalışmada *A. pullulans* AZ-6 suşu için elde edilen en yüksek biyokütle derişimlerinin; fermantasyonun sonunda, 5 ve 7 numaralı deneylerde, sırasıyla 11.82 ve 11.88 g/L olarak, birbirlerine oldukça yakın değerlerde tayin edilmiş oldukları saptanmıştır. Bu deneylerde, fermantasyon boyunca en düşük biyokütle derişimleri ise; ortamdaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin; 3.60 g/L, DSA derişiminin 2.5 mL ve ÖFZ miktarının 12 g olduğu deneyde tayin edilmişlerdir. Fermantasyon sonunda 10 numaralı deneyde elde edilen en yüksek biyokütle derişimi; 3.06 g/L olarak belirlenmiştir. Fermantasyon ortamındaki, DSA ve ÖFZ miktarları aynı olan; 6 ve 8 numaralı deneylerde ise, bileşiminde daha düşük derişimde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren ortamda (6 numaralı deney) üretilen biyokütle derişiminin, fermantasyon süresince daha düşük olduğu, daha sonra ise 8 numaralı deney ortamında elde edilen biyokütle derişimine ulaştığı tespit edilmiştir. 6 ve 8 numaralı deneylerde, fermantasyon sonunda elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri sırasıyla; 7.35 ve 7.26 g/L olarak tayin edilmiştir.



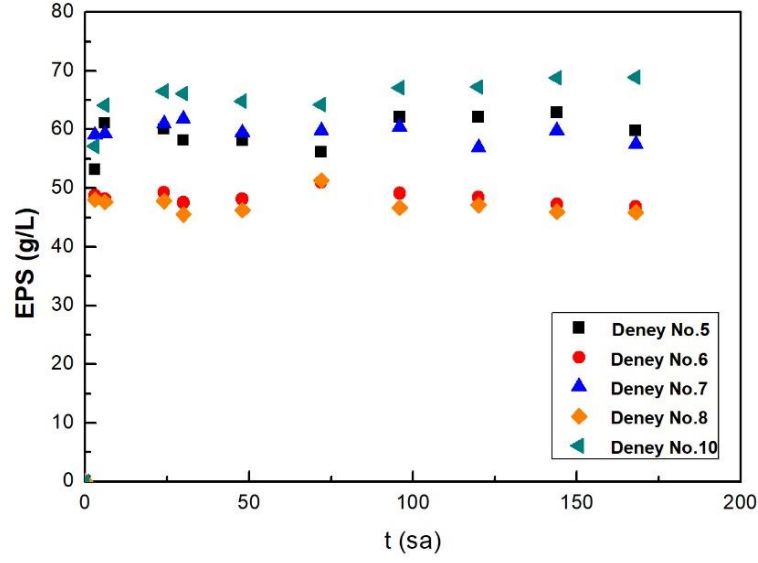
Şekil 4.37. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu için, özgül üreme hızları $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.38.). *A. pullulans* AZ-6 suşunun, üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ); 5-8 ve 10 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.082, 0.055, 0.065, 0.046 ve 0.078 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere göre en yüksek üreme hızı; 5. deneyde tayin edilmiştir.



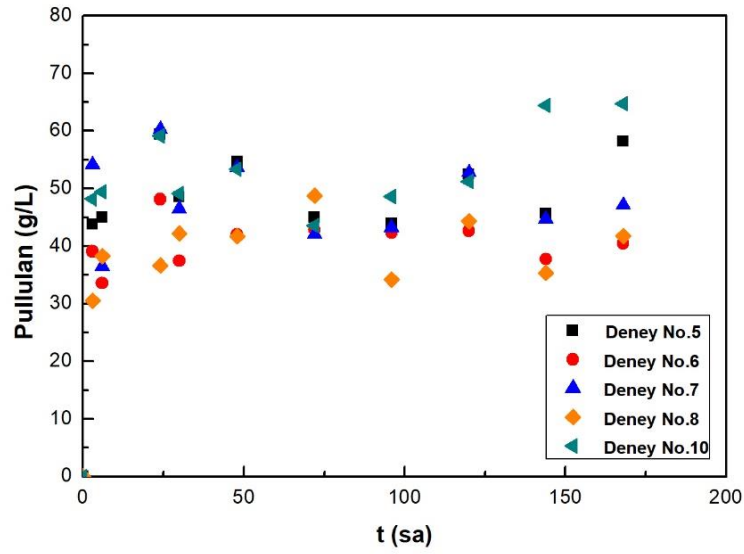
Şekil 4.38. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde, biyokütle değişimlerinin $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

5-8 ve 10 numaralı deneylerde elde edilen EPS değişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.39.’da sunulmuştur. Bu deneylerde elde edilen en yüksek EPS değişimi; 10 numaralı deneyde, fermantasyonun 168. saatinde, 68.92 g/L olarak belirlenmiştir. Söz konusu deneydeki bağımsız değişkenlerin değerleri; ortamdaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ değişimi; 3.60 g/L, 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi; deney tasarım planında (Çizelge 4.4.) belirlenmiş olan en yüksek asit değişimi olan; 2.50 mL ve ÖFZ miktarı; 12 g/L’dir. Deney tasarım planında; fermantasyon ortamlarında, aynı ÖFZ miktarları ve DSA değişimlerinin kullanıldığı; 5 ve 7 ile 6 ve 8 numaralı deneylerde analiz edilen EPS değişimlerinin, fermantasyon süresince benzer değerlerde seyrettikleri de tespit edilmiştir. Bu deneylerde fermantasyon boyunca elde edilen en düşük EPS değişimleri; 6 ve 8 numaralı deneylerde tayin edilmişlerdir.



Şekil 4.39. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.40.’da; 5-8 ve 10 numaralı deneyler için elde edilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri verilmektedir. Bu deneylerde elde edilen en yüksek pullulan derişimi, fermentasyonun 168. saatinde, 64.70 g/L olup, 10 numaralı deneyde belirlenmiştir. 5-8 ve 10 numaralı deneylerdeki fermentasyon ortamlarında üretilen en yüksek pullulan derişimleri ise sırasıyla; 59.40, 48.18, 54.14 ve 48.78 g/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.40. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu deneylerdeki, en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m) değerleri; Şekil 4.37.’deki biyokütle ve Şekil 4.40.’daki pullulan derişimleri grafiklerinden yararlanılarak hesaplanmışlardır. Sırasıyla 5-8 ve 10 numaralı deneyler için tespit edilen en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m) değerleri; 14.89, 52.88, 30.61, 45.45, 96.91 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

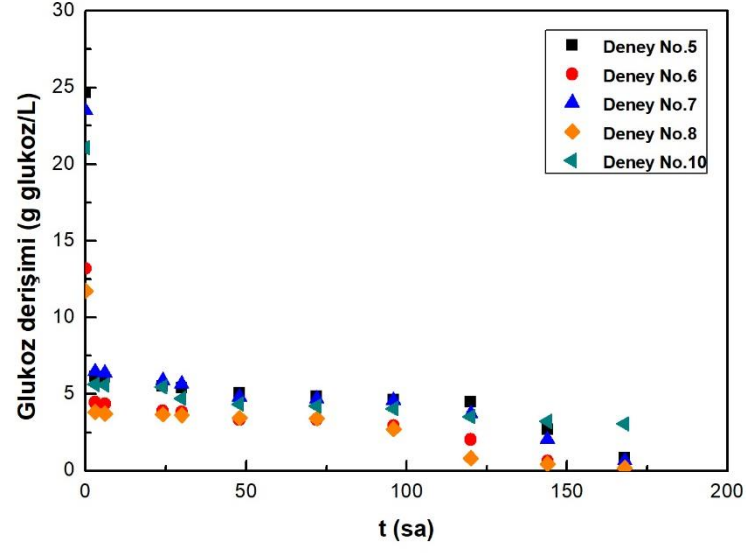
Çizelge 4.7’de; 5-8 ve 10 numaralı deneylerde, ortamlardaki ksiloz derişimlerinin fermentasyon süresince değışimleri verilmektedir. Öğütölmüş fındık zürufuna uygulanan işlemler sırasında, asit hidrolizinde kullanılan asitin derişiminin ve öğütölmüş ÖFZ miktarının ortamdaki şeker derişimini etkiledikleri düşünölmektedir. 5-8 numaralı deneyler için fermentasyon ortamında kullanılan DSA derişimi aynı olmakla birlikte, 5 ile 7 ve 6 ile 8 numaralı deneylerde kullanılan ÖFZ miktarları aynıdır (Çizelge 4.4.). 5 ve 7 numaralı ile 6 ve 8 numaralı fermentasyon ortamlarında ölçölen ksiloz başlangıç derişimleri birbirine oldukça yakın tayin edilmişlerdir. Bu gruptaki bütün deneylerde, tüm ortamlarda bulunan ksilozun 3. saatte kadar hızla tüketildiğı, yaklaşık 24. saatten sonra ise ksiloz derişimlerinin çok fazla değışmedikleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde fermentasyon ortamlarında bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değışimleri

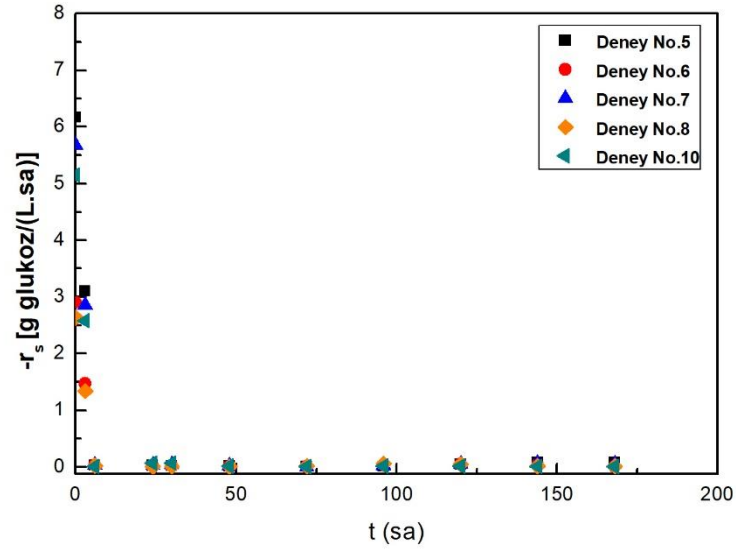
Ksiloz derişimi (g/L)					
Fermentasyon süresi (saat)	Deney No.5	Deney No.6	Deney No.7	Deney No.8	Deney No.10
0	5.89	3.46	4.96	3.67	5.65
3	1.87	1.43	2.09	1.26	1.90
6	1.72	1.34	1.97	1.16	1.57
24	1.70	1.26	1.95	1.16	1.37
30	1.65	1.26	1.85	1.15	1.34
48	1.64	1.21	1.71	1.06	1.34

Bu deneylerde ortamlardaki glukoz derişimleri de ölçölmüştür. 5-8 ve 10 numaralı deneylerde glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.41.’de verilmiştir. Ortamlardaki glukoz derişimlerinin, 5 ve 7 numaralı deneylerde, fermentasyonun 168. saatinde, 6 ve 8 numaralı deneylerde ise; fermentasyonun 144. saatinde tamamen tüketildiğı saptanmıştır. 10 numaralı deney için

ise; fermantasyonun başında; 21.08 g/L olarak belirlenen glukoz derişiminin, fermantasyonun 120. saatinden itibaren artık tüketilemediğı tespit edilmiştir. En yüksek glukoz tüketim hızı değerleri ise, 5-8 ve 10 numaralı deneyler için sırasıyla; 6.17, 2.91, 5.68, 2.63, 5.15 g glukoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.



(a)

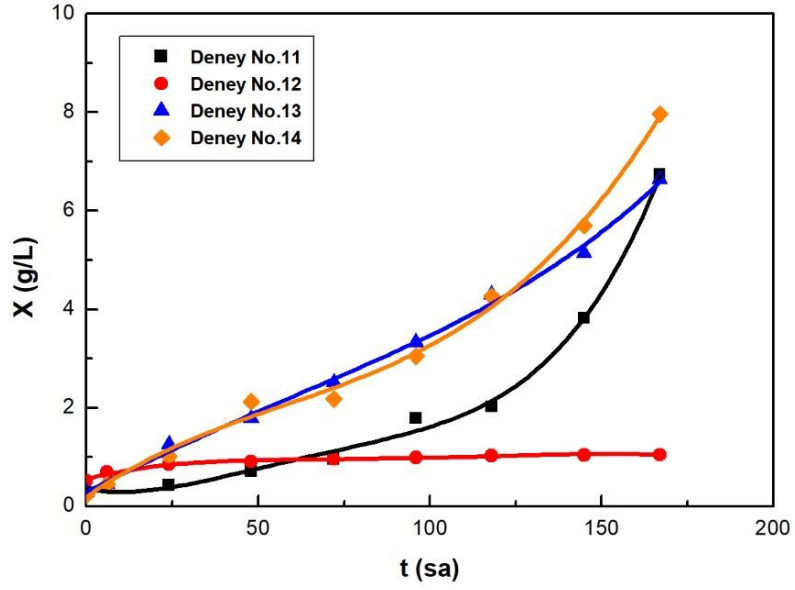


(b)

Şekil 4.41. “5-8” ve “10” numaralı deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

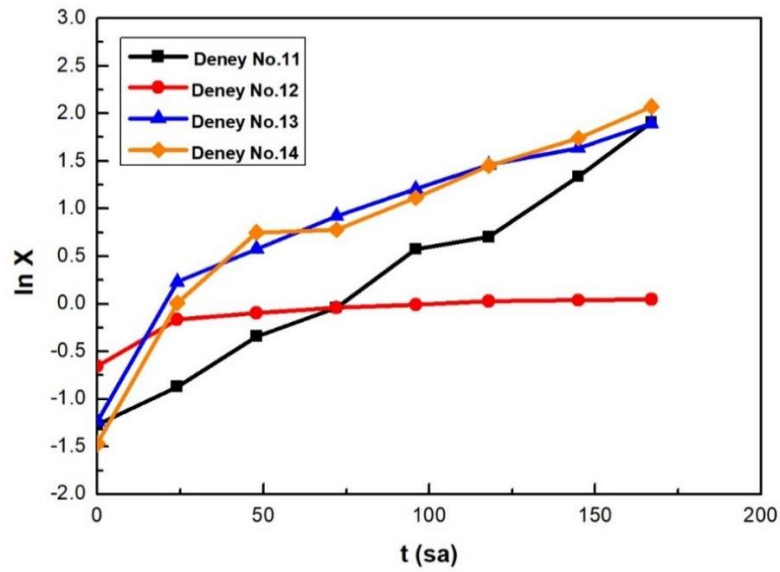
Optimizasyon deneylerinin üçüncü aşamasında, Çizelge 4.4.'te verilmiş olan; 11, 12, 13 ve 14 numaralı fermantasyon ortamları kullanılmıştır. Bu aşamadaki tüm fermantasyon ortamlarında 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi 1.50 mL'dir. 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı; 11 numaralı fermantasyon ortamında 20 g, 12 numaralı fermantasyon ortamında; 4 g ve 13 ile 14 numaralı fermantasyon ortamlarında ise; 12 g'dır. Bu deneylerde, azot kaynağı olarak fermantasyon ortamlarına eklenen amonyum sülfat derişimleri; 11 ve 12 numaralı deneyler için; 3.6 g/L, 14 numaralı deney için; 7.2 g/L'dir. Deney planına göre; 13 numaralı fermantasyon ortamına ise; amonyum sülfat eklenmemiştir.

11-14 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi 4.7×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir. Optimizasyon deneylerinin üçüncü aşamasında kullanılan; 11-14 numaralı fermantasyon ortamlarındaki, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri; Şekil 4.42.'de verilmektedir. Bu deneylerde elde edilen en yüksek biyokütle derişimi; 7.96 g/L olarak, 14 numaralı deneyde elde edilmiştir. 14 numaralı deneyde, ortama eklenen amonyum sülfat derişimi, optimizasyon deneylerinde, bu bağımsız değışken için tanımlanmış olan en yüksek değerdir. Cheng ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmaya göre fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanılan amonyum sülfat derişiminin artmasının, *A. pullulans* üremesini destekleyen bir parametre olduğu ifade edilmiştir. 11-14 numaralı deneylerde fermantasyon boyunca elde edilen en düşük biyokütle değerlerinin; 12. deneyde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.4.11). 12 numaralı deney parametrelerinden; ÖFZ miktarının (4.0 g) tasarımı bu bağımsız değışken için belirlenen en düşük değer olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4.) Buna bağılı olarak da; ÖFZ'na uygulanan asit hidrolizi sonucu elde edilen şeker miktarının da az olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle 12. deneyde kullanılan ortamın, biyokütle gelişimini, diğer ortamlar kadar desteklemediği düşünülmektedir.



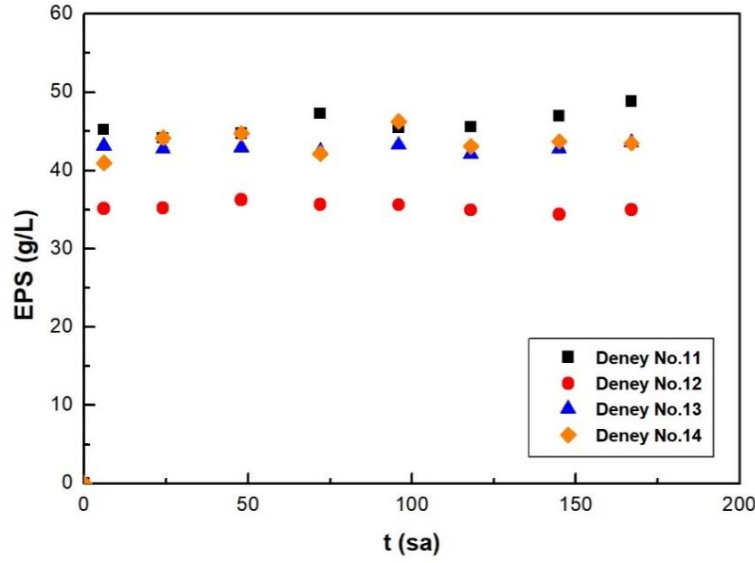
Şekil 4.42. “11-14” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

11-14 numaralı deneylerdeki, *A. pullulans* AZ-6 suşu için elde edilen biyokütle değeri­lerinin ln değeri­leri alınarak zamana karşı çizilen grafikler, Şekil 4.43.’de verilmektedir. Bu grafikler kullanılarak, çalışılan suşun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları hesaplanmıştır. 11-14 numaralı deneylerde hesaplanan μ değeri­leri sırasıyla; 0.026, 0.020, 0.061, 0.062 sa^{-1} olarak belirlenmiştir.



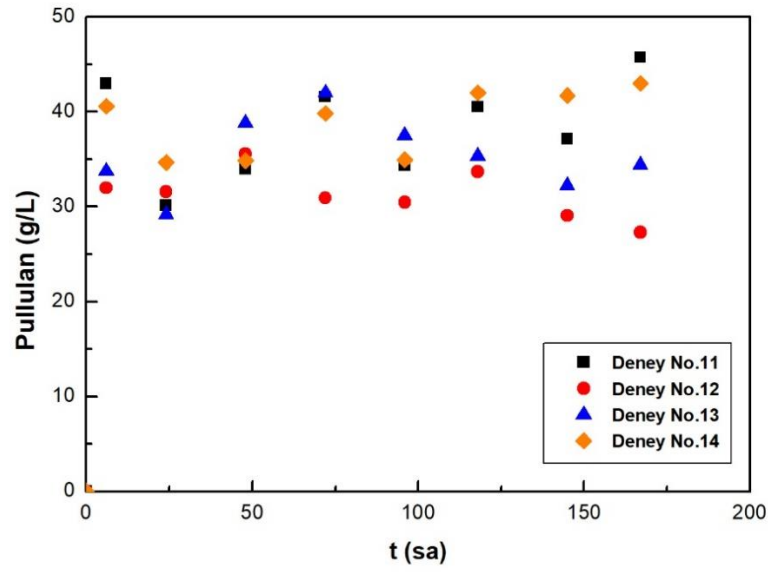
Şekil 4.43. “11-14” numaralı deneylerde, biyokütle derişimlerinin ln X değeri­lerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.44.'de; 11-14 numaralı deneylerde elde edilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri verilmiştir. Bu deneylerde, elde edilen en yüksek EPS derişimine (48.81 g/L), 11 numaralı deneydeki fermantasyon ortamında, 167. saatin sonunda ulaşılmıştır. En yüksek EPS derişimleri; 13 ve 14 numaralı deneylerde oldukça yakın değerlerde olup sırasıyla; 43.60 ve 46.26 g/L olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, 12 numaralı fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek EPS derişimine (36.25 g/L) fermantasyonun 48. saatinde ulaşılmış olup, fermantasyon sonuna doğru EPS'de bir miktar düşme olduğu da tespit edilmiştir.



Şekil 4.44. “11-14” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

11-14 numaralı deneyler için mikroorganizmanın ürettiği pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri ise; Şekil 4.45.'de verilmiştir. Bu deneylerde elde edilen en yüksek EPS derişimine benzer olarak, en yüksek pullulan derişimine (45.73 g/L) de 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı en yüksek ortam olan 11 numaralı deneyde ulaşılmıştır. En düşük pullulan derişimlerine ise; ÖFZ miktarının en düşük olduğu ortam olan; 12 numaralı deneyde ulaşılmıştır. 13 numaralı deney ortamında elde edilen en yüksek pullulan derişimi fermantasyonun 72. Saatinde; 42 g/L olarak belirlenirken, 14 numaralı deneyde bu miktar fermantasyonun 167. Saatinde; 43.01 g/L olarak tayin edilmiştir.



Şekil 4.45. “11-14” numaralı deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

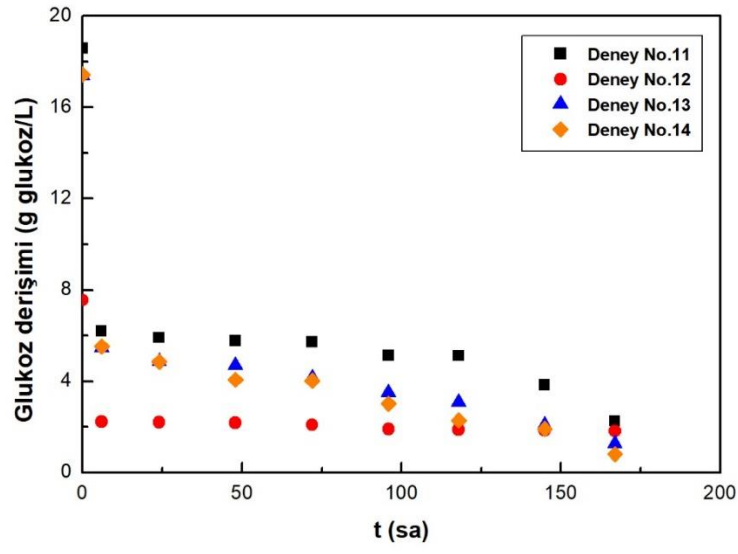
Pullulan derişimi grafiklerinden elde edilen eğim değeri, eğim değeri hesaplanan zamandaki biyokütle değeriyle bölünmesi ile hesaplanan; özgül ürün oluşum hızı (v) değeri de, bu deneylerde hesaplanmıştır. Bu çalışmada elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızı (v_m) değeri; 11-14 numaralı deneyler için sırasıyla, 20.75, 9.08, 16.68, 17.25 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Bu deneylerde tayin edilen ksiloz derişimlerinin zamanla değışimleri; Çizelge 4.8.’de gösterilmektedir. Deneylerde, asit hidroliz amacıyla kullanılan DSA hacmi ve ÖFZ miktarları aynı olan; 13 ve 14. deneylerde, ortamlardaki ksiloz başlangıç derişimleri birbirlerine oldukça yakın olarak analiz edilmiştir. 11 ve 12 numaralı deneylerde 6. saatte yaklaşık tamamen tükenen ksiloz derişimleri, 13 ve 14 numaralı deneylerde ise, fermantasyonun 72. saatinden sonra sonra oldukça düşük düzeye inmiştir.

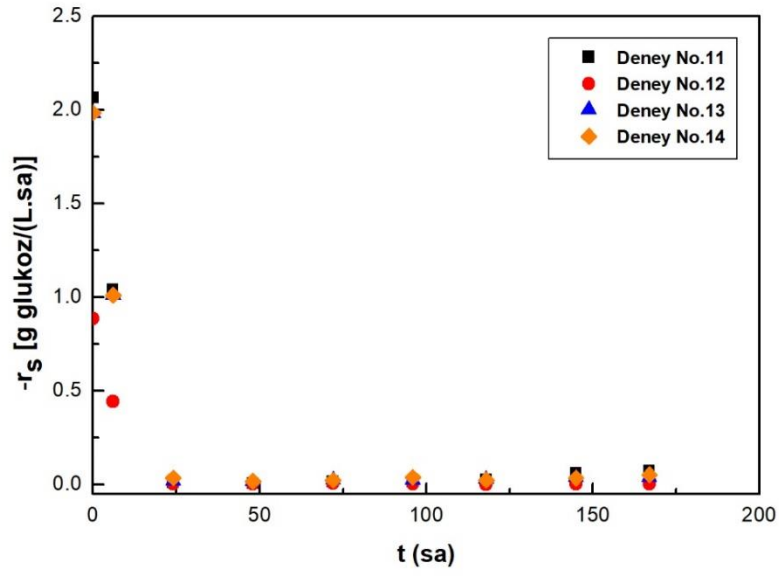
Çizelge 4.8. “11-14” numaralı deneylerde fermantasyon ortamlarında bulunan ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermantasyon süresi (saat)	Ksiloz derişimi (g/L)			
	Deney No.11	Deney No.12	Deney No.13	Deney No.14
0	2.71	1.83	4.08	3.93
6	0.95	0.63	1.46	1.34
24			1.29	1.19
48			1.13	1.08
72			0.92	0.95

Şekil 4.46.’da; 11-14 numaralı deney ortamlarındaki glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının, fermantasyon süresince değişimleri verilmektedir. 13 ve 14 numaralı ortamlarda başlangıçta ölçülen ksiloz miktarlarına benzer olarak, başlangıçtaki glukoz derişimleri de yakın bulunmuşlardır. Bu deneylerde asit hidrolizi sonucunda elde edilen en yüksek glukoz derişimi, 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı en yüksek ortam olan; 11 numaralı deneyde; 18.58 g/L olarak tayin edilmiştir. 11, 12 ve 13 numaralı deneylerde fermantasyon sonunda düşük bir miktar glukoz tüketilmeden kalırken, 14 numaralı fermantasyon ortamındaki glukozun ise, neredeyse tükendiği belirlenmiştir. Fermantasyonun birinci gününden sonra 11-14 numaralı deneylerin ortamlarındaki glukoz tüketim hızları, oldukça benzer değerler olarak hesaplanmışlardır. En yüksek substrat tüketim hızları; fermantasyonun başlangıcında, 11-14 numaralı deneyler için sırasıyla 2.07, 0.89, 1.98, 1.99 g glukoz/(L.sa) olarak hesaplanmışlardır.



(a)

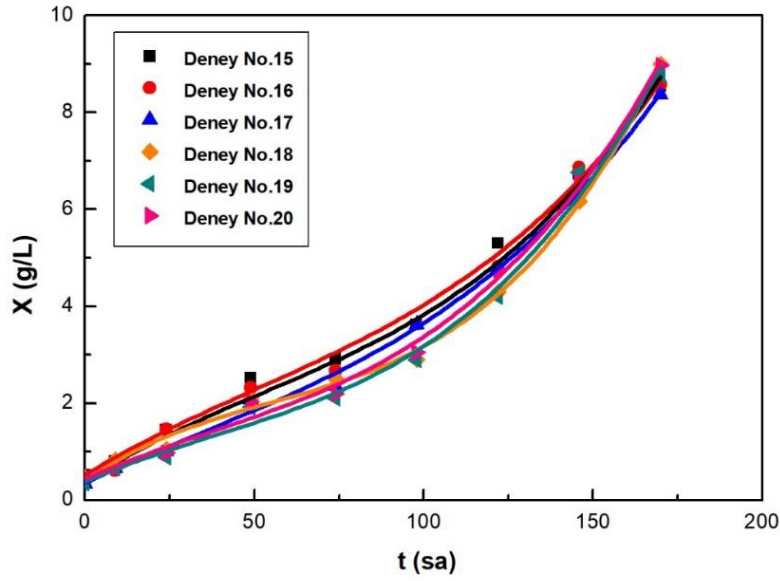


(b)

Şekil 4.46. “11-14” numaralı deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

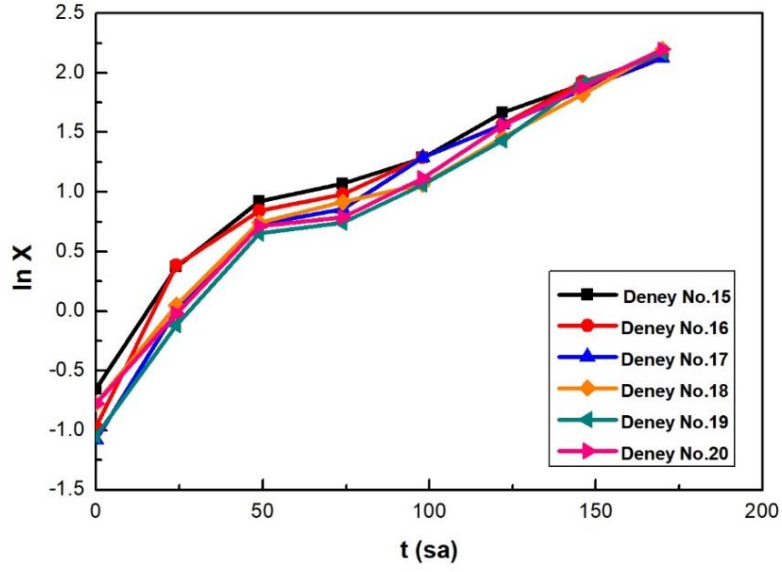
Optimizasyon deneylerinin son aşamasında, Çizelge 4.4.'te verilen; 15-20 numaralı, 6 tekrarlı merkez nokta deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu ortamda 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi 1.50 mL, 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı 12.0 g ve amonyum sülfat derişimi 3.60 g/L'dir. Merkez nokta deneyleri için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon başlangıç derişimi; 9.4×10^7 kob/mL olarak belirlenmiştir.

Merkez nokta olarak adlandırılan deney koşullarında, 6 tekrarlı olarak yapılan deneylerde, fermentasyon ortamlarındaki, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri; Şekil 4.47.'de sunulmuştur. İlgili şekildeki grafiklerden de görülebileceği gibi; fermentasyon süresince, tüm ortamlardaki biyokütle derişimlerinde artış olduğu belirlenmiştir. En yüksek biyokütle derişimleri, 15-20 numaralı deneylerde birbirlerine çok yakın ve sırasıyla, 8.54, 8.58, 8.37, 9.00, 8.76 ve 8.98 g/L olarak belirlenmiştir.



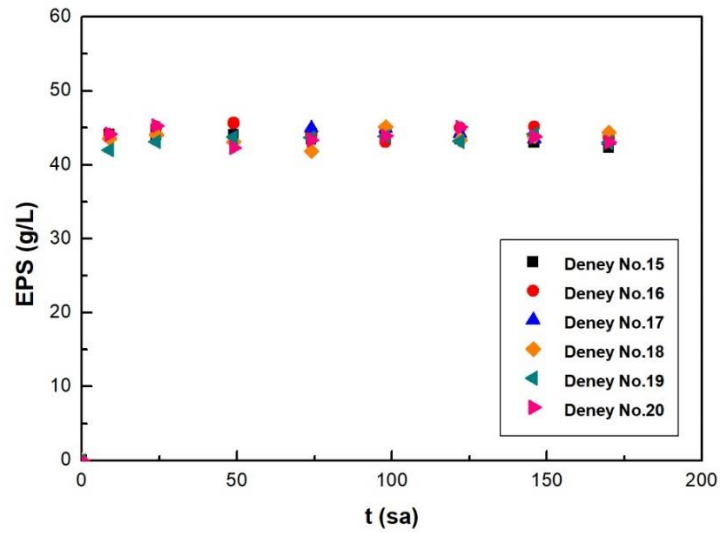
Şekil 4.47. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

15-20 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı (μ) değeri, sırasıyla; 0.043, 0.057, 0.045, 0.035, 0.039 ve 0.032 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Hesaplama yapılırken, mikroorganizmanın biyokütle derişimi değeri, $\ln$ değeri alınarak oluşturulan $\ln X$ değeri, zamana karşı değışimlerini gösteren; Şekil 4.48.'den yararlanılmıştır.



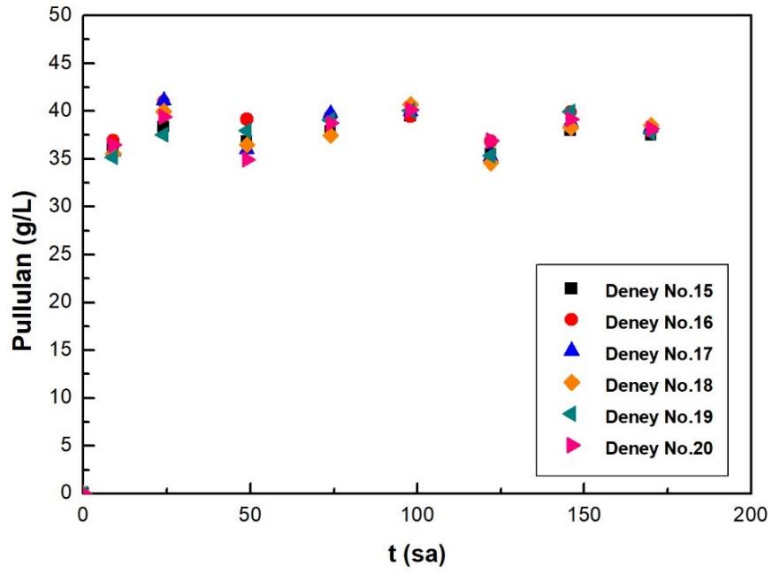
Şekil 4.48. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, biyokütle derişimlerinin $\ln X$ değeriinin zamanla değışimleri

15-20 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun ürettiğı EPS değeriinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.49.’da gösterilmektedir. Yapılan 6 tekrarlı deneyin her birinde, fermantasyon süresince EPS üretimlerinin benzer bir eğilim gösterdikleri belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek EPS derişimleri, 15-20 numaralı deneylerde sırasıyla; 44.37, 45.66, 44.99, 45.09, 44.15, 45.29 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 4.49. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.50.'de ise; merkez nokta olarak adlandırılan koşullarda gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri grafiğe geçirilmiştir. Fermantasyonun 49. ve 122. saatlerinde pullulan derişimlerinde bir miktar azalma görölmesine rağmen, pullulan üretiminin, EPS üretimine benzer olarak, fermantasyon süresince merkez nokta koşullarındaki 6 tekrarda, neredeyse aynı seyirde ilerlemiştir. 15-20 numaralı deneylerde elde edilen en yüksek pullulan derişimleri, sırasıyla; 39.50, 41.00, 41.09, 40.69, 40.07, 40.14 g/L olarak tespit edilmiştir.

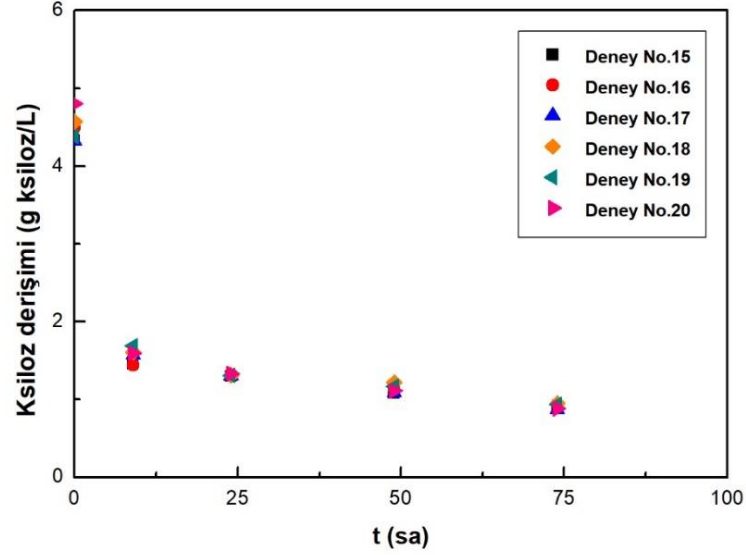


Şekil 4.50. “15-20” numaralı, merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

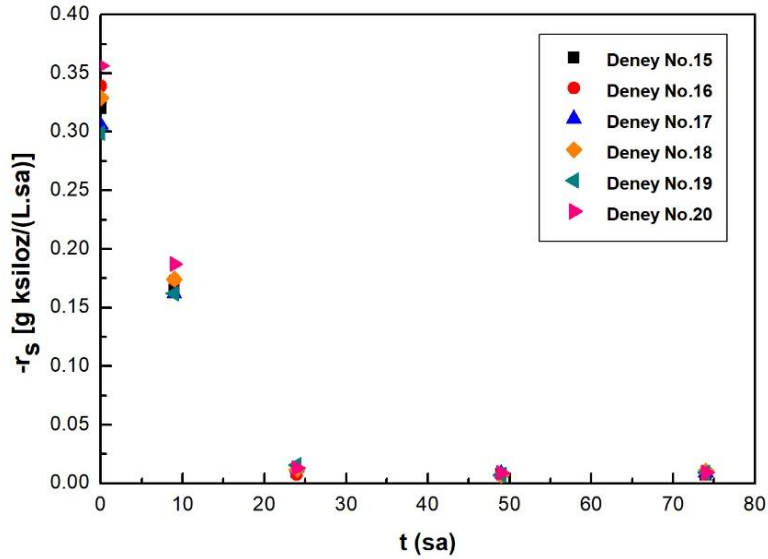
Bu deneyler için, biyokütle ve pullulan grafikleri kullanılarak, özgül ürün oluşum hızı (μ) değeri de hesaplanmıştır. Buna göre; merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde, en yüksek pullulan üretim hızları 15 numaralı deneyde; 7.21 g pullulan/(g mo.sa), 16 numaralı deneyde; 8.38 g pullulan/(g mo.sa), 17 numaralı deneyde; 7.64 g pullulan/(g mo.sa), 18 numaralı deneyde; 6.5 g pullulan/(g mo.sa), 19 numaralı deneyde; 8.49 g pullulan/(g mo.sa) ve 20 numaralı deneyde; 8.01 g pullulan/(g mo.sa)'dir.

Bu deneylerde, ortamda bulunan glukoz ve ksiloz derişimleri de, belirli zaman aralıkları ile yapılan analizlerle incelenmiştir. Şekil 4.51.'de, 15-20 numaralı merkez nokta koşullarında yapılan deneyler için, ölçülen ksiloz derişimlerinin ve ksiloz tüketim hızlarının zamanla değışimleri görölmektedir. Bu deneylerde, yapılan her bir tekrar deney için, ksiloz derişimindeki azalma miktarının hemen hemen aynı oldukları belirlenmiştir.

Fermantasyonun yaklaşık 74. saatinde ortamlardaki ksiloz derişimlerinin, büyük ölçüde tükenmelerinden dolayı, ilerleyen süreçte, ksiloz ölçümü yapılmamıştır. Benzer olarak; ksiloz tüketim hızları da, fermantasyonun başlangıcından, 74. saatin sonuna kadar, neredeyse aynı ölçüde azalmışlardır.



(a)

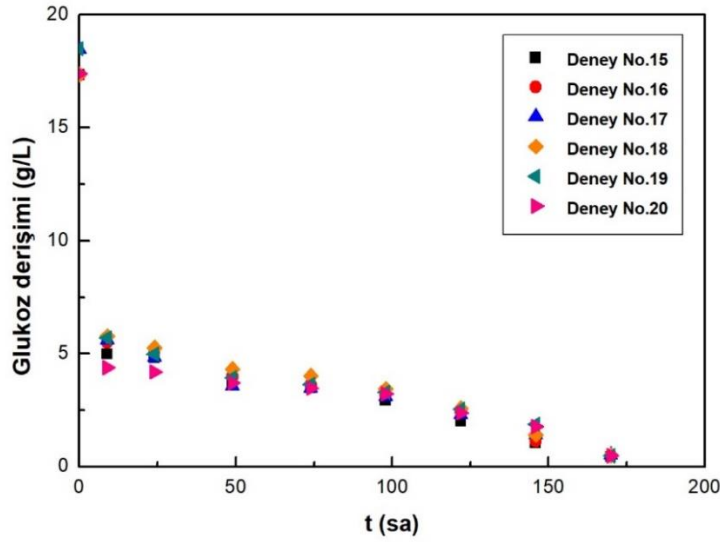


(b)

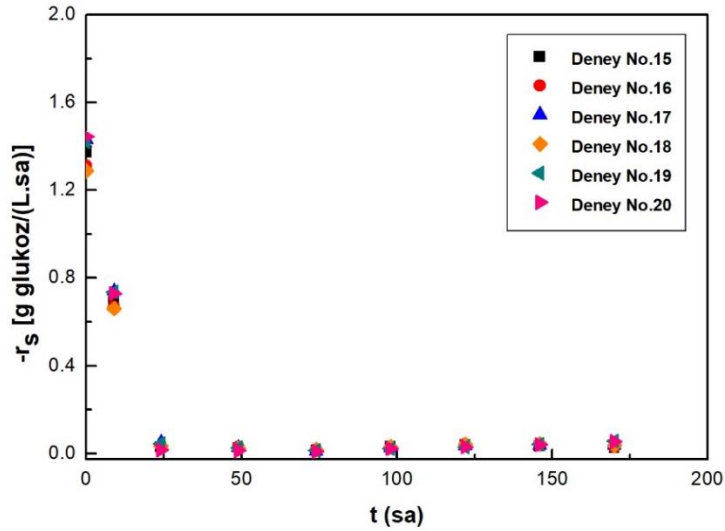
Şekil 4.51. “15-20” numaralı merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde; (a) ksiloz derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) ksiloz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Şekil 4.52.’de ise; söz konusu deneylerdeki glukoz derişimlerinin ve glukoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri sunulmuştur. Şekil 4.52.a’da da anlaşılaçağı üzere,

başlangıçtaki glukoz derişimleri yaklaşık olarak aynı olan, merkez nokta koşullarında 6 tekrar olarak yapılan deneylerde, glukoz derişimlerinin analizleri, fermentasyonun sonuna kadar sürdürölmüştür. Fermentasyonun 170. saatinde; tüm deney ortamlarındaki glukoz kullanılan suş tarafından, tamamen tüketölmüştür, 15-20 numaralı deneylerde, en yüksek substrat tüketim hızı değeri ise sırasıyla; 1.37, 1.31, 1.43, 1.29, 1.42, 1.45 g glukoz/(L.sa) olarak, fermentasyonun başlangıcında hesaplanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.52. “15-20” numaralı merkez nokta koşullarında yapılan deneylerde; (a) glukoz derişimlerinin zamanla değışimleri, (b) glukoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

4.5. Araştırmada seçilen bağımlı değişkenlerin yanıt yüzey yöntemi ile modellenmeleri

Bu tez çalışmasında optimizasyon deneyleri, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney planına göre yapılmıştır. Beş seviyeli 3 bağımsız değişken (x_1 , x_2 , x_3) ile deneyler gerçekleştirildikten sonra, seçilen 3 bağımsız değişkenin; elde edilen yanıtlar üzerindeki etkilerini gösteren bazı model eşitlikler türetilmiştir. Bu model eşitliklerin türetilmelerinde; fermantasyon ortamına azot kaynağı olarak eklenen $(NH_4)_2SO_4$ derişimi (x_1), 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi (x_2), 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı (x_3) bağımsız değişkenler olarak seçilirlerken; en yüksek pullulan derişimi (y_1), en yüksek EPS derişimi (y_2) ve özgül üreme hızı (y_3), bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak belirlenmişlerdir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlerin (yanıtlar) değerleri; Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, maksimum pullulan derişimlerinin; 17.0 ile 64.7 g/L, maksimum EPS derişimlerinin; 19.82-68.92 g/L ve özgül üreme hızı değerlerinin ise; 0.020 ile 0.082 sa^{-1} arasında değiştikleri görülmektedir.

Çizelge 4.9. Merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen optimizasyon deneylerinde elde edilen maksimum pullulan derişimleri (y_1), maksimum EPS derişimleri (y_2) ve özgül üreme hızları (y_3)

Deney no	y_1 (g/L)	y_2 (g/L)	y_3 (sa^{-1})
1	26.95	29.53	0.024
2	23.14	23.85	0.021
3	28.97	32.65	0.021
4	23.85	25.65	0.034
5	59.40	62.86	0.082
6	48.18	51.01	0.055
7	60.32	61.82	0.065
8	48.78	51.31	0.046
9	17.00	19.82	0.058
10	64.70	68.92	0.078
11	45.73	48.81	0.026
12	33.67	35.64	0.020
13	42.00	43.6	0.061

Çizelge 4.9. Devam ediyor

Deney no	y1 (g/L)	y2 (g/L)	y3 (sa ⁻¹)
14	43.01	46.26	0.062
15	39.50	44.37	0.043
16	41.00	45.66	0.057
17	41.09	44.99	0.045
18	40.69	45.09	0.035
19	40.07	44.15	0.039
20	40.14	45.29	0.032

Bu çalışmada seçilen bağımsız değişkenlerin her bir bağımlı değişken üzerindeki etkilerini gösteren model denklemlerin türetilmeleri amacıyla; Design Expert® 11 programının deneme sürümü kullanılarak, çoklu regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Anılan eşitliklerin türetilmelerinde, söz konusu program tarafından önerilen; ikinci dereceden bir model denklem kullanılmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen her bir modelleme çalışması için yine aynı program kullanılarak varyans analizleri de (ANOVA) yapılmıştır. Yapılan varyans analizleri sonucunda; oluşturulan modellerin gerçek cevaplara uygunluklarına ise; modelin önemli bulunması ($p < 0.05$), uyum eksikliğinin önemsiz ($p > 0.05$) olması ve ilgili modele ait regresyon katsayısı (R^2) değerinin; 0.75’den büyük olması durumu dikkate alınarak, karar verilmiştir. Belirtilen analizlerin tamamlanmasından sonra ise; her bir yanıt için elde edilen deneysel sonuçların, belirtilen program yardımı ile model eşitlikler kullanılarak, hesaplanan tahminsel değerleri ile karşılaştırıldıkları grafikler çizilmiştir.

Fermantasyon ortamındaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin (x_1), asit hidrolizi amacıyla kullanılan DSA hacminin (x_2) ve ÖFZ miktarının, en yüksek pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren; ikinci dereceden model denklem; Eş. 4.1’de verilmiştir.

$$y_1 = + 40.45 + 0.3008x_1 + 14.20x_2 + 3.81x_3 - 0.3813x_1x_2 - 0.0262x_1x_3 + 1.73x_2x_3 + 0.5055(x_1)^2 - 0.0796 (x_2)^2 - 0.4862 (x_3)^2 \quad (4.1)$$

İlgili programdan alınan sonuçlara göre; y_1 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı değeri; $R^2 = 0.9976$ olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1’e yakın olması deneysel olarak elde edilen y_1 değerleri ile, eşitlik 4.1. kullanılarak hesaplanan y_1 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir.

Yukarıdaki modelleme çalışmasına ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları ise; Çizelge 4.10.'da gösterilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, model önemli ($p<0.05$), uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur. Ayrıca, iki bağımsız değişkenin (x_2 , x_3), bu bağımsız değişkenlerin birbirleri ile olan ikili etkileşiminin (x_2x_3) ve x_1 değişkeninin karesel etkisinin de maksimum pullulan derişimi üzerinde önemli oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. x_1 , x_2 ve x_3 bağımsız değişkenlerinin maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

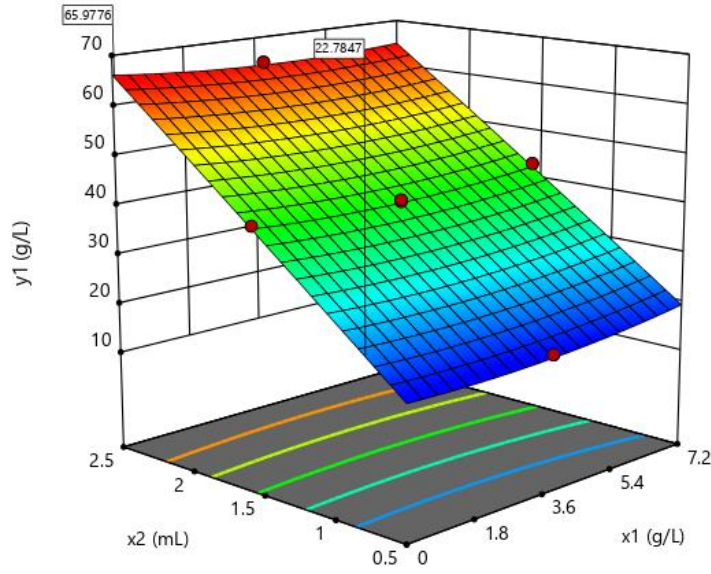
Varyans kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	2987.66	455.51**	<0.0001
x_1	1	1.24	1.70	0.2220
x_2	1	2755.59	3781.16**	<0.0001
x_3	1	197.79	271.40**	<0.0001
x_1x_2	1	1.16	1.60	0.2352
x_1x_3	1	0.0055	0.0076	0.9324
x_2x_3	1	23.91	32.81**	0.0002
x_1^2	1	3.68	5.05*	0.0484
x_2^2	1	0.0914	0.1254	0.7306
x_3^2	1	3.41	4.68	0.0559
Uyum eksikliği	5	5.38	2.82	0.1395
Hata	5	1.91		
Genel	19			

SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

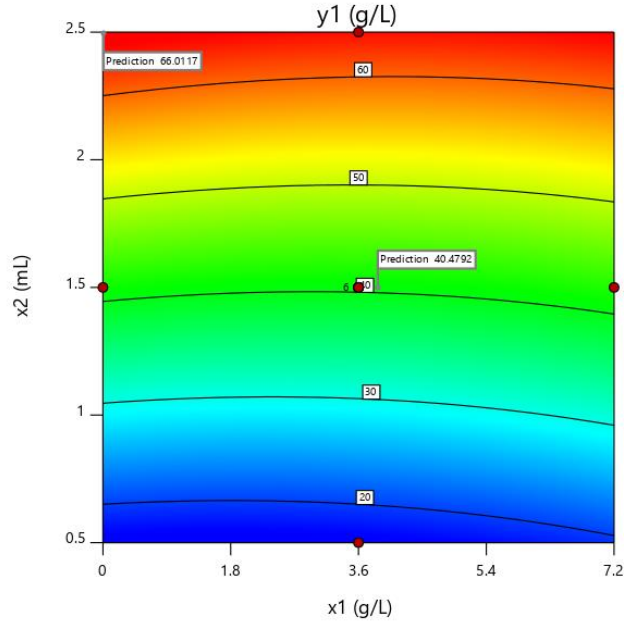
* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Fermantasyon ortamlarındaki amonyum sülfat derişimi (x_1) ve fermantasyon ortamı hazırlanırken 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi (x_2) değişkenlerinin, maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.53.'de görölmektedir. Şekil 4.53.a'da yer alan yanıt yüzey grafiğı incelendiğinde; maksimum pullulan derişimi, x_1 değerin sabit olduğu durumda, DSA çözeltisi hacmi arttıkça belirgin bir artış göstermektedir. İşaretlenen noktalarda görüldüğü üzere; y_1 değerin; başlangıç amonyum sülfat derişiminin yaklaşık 0.02 g/L olduğu durumda,

DSA hacmi 2.49 mL iken, 65.98 g/L; DSA hacmi 0.76 mL olan durumda ise; 22.78 g/L olacağı tespit edilmiştir. DSA hacmi sabit tutularak hazırlanan ortamlarda, amonyum sülfat derişimi 0 ile 7.2 g/L değerleri arasında değiştirildiğinde ise, y_1 değerlerinin çok fazla değişmedikleri tespit edilmiştir. Şekil 4.53.b’de verilen kontur grafiği incelendiğinde, bağımsız değişkenlerin merkez noktalarına yakın olduğu bir yerde, örneğin, x_1 değerinin 3.85 g/L ve x_2 değerinin 1.5 mL olduğu noktada, maksimum pullulan derişimi değeri; 40.48 g/L olarak görülmektedir. Aynı grafik üzerinde işaretlenen ikinci noktada ise ulaşılan en yüksek pullulan derişimine (66.01 g/L), ortama eklenen amonyum sülfat derişiminin 0.01 g/L ve DSA çözeltisi hacminin 2.49 mL olduğu bir ortamda ulaşılabacağı saptanmıştır. DSA çözeltisi hacmi 0.5 ile 1.5 mL arasında değişen ortamlarda elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin; 16 ile 40 g/L arasında değişirken, DSA çözeltisi hacmi; 2 ile 2.5 mL arasında değişen ortamlarda ise; 50 ile 66 g/L arasında değişeceği belirlenmiştir.



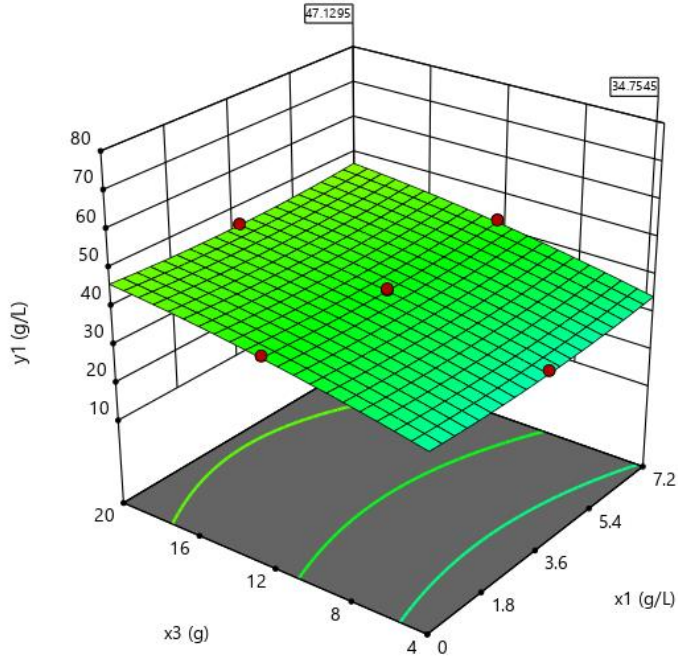
(a)



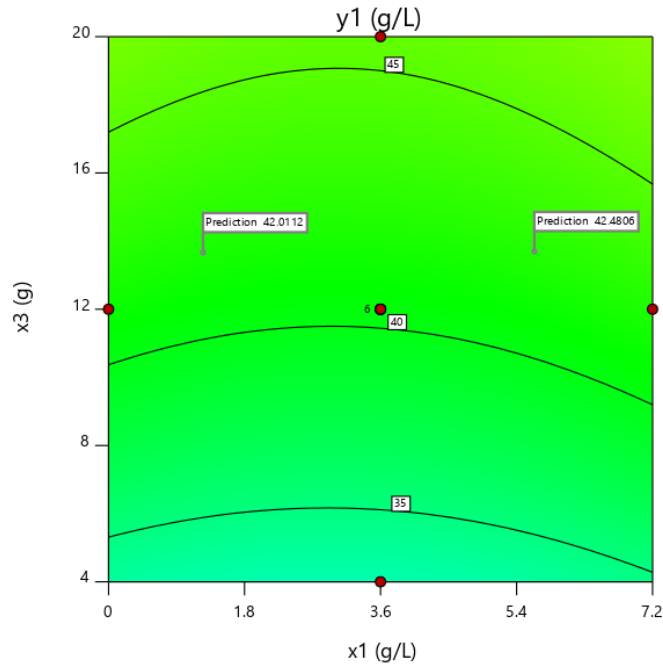
(b)

Şekil 4.53. Amonyum sülfat derişimi (x_1) ve DSA hacminin (x_2); maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_3=12$ g)

Şekil 4.54.'te amonyum sülfat derişimi (x_1) ve ÖFZ miktarı (x_3) değişkenlerinin, maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri sunulmuştur. Yanıt yüzey grafiğinde (Şekil 4.54.a), belirli amonyum sülfat derişiminde, ortama eklenen ÖFZ miktarı arttıkça, elde edilen maksimum pullulan derişiminin arttığı görülmektedir. Grafik üzerinde x_1 değerinin 34.75 g/L ve 47.13 g pullulan/L derişimleri, artan ÖFZ miktarı ile, artış gösteren maksimum pullulan derişimlerini göstermektedir. Söz konusu grafikten, ortama eklenen amonyum sülfat miktarının artmasının, elde edilecek olan en yüksek pullulan derişimini önemli ölçüde etkilemeyeceği de belirlenmiştir. Şekil 4.54.b'de işaretlenmiş olarak gösterilen; 42.01 ve 42.48 g pullulan/L derişimleri, ÖFZ miktarının; 13.5 g olduğu ortamlarda; sırasıyla 0.97 ve 5.99 g/L amonyum sülfat eklenen ortamları göstermektedir. İşaretlenen bu noktalar, ortama eklenen amonyum sülfat miktarı artış gösterdiğinde, maksimum pullulan derişiminin çok fazla değişmeyeceğini göstermektedir.



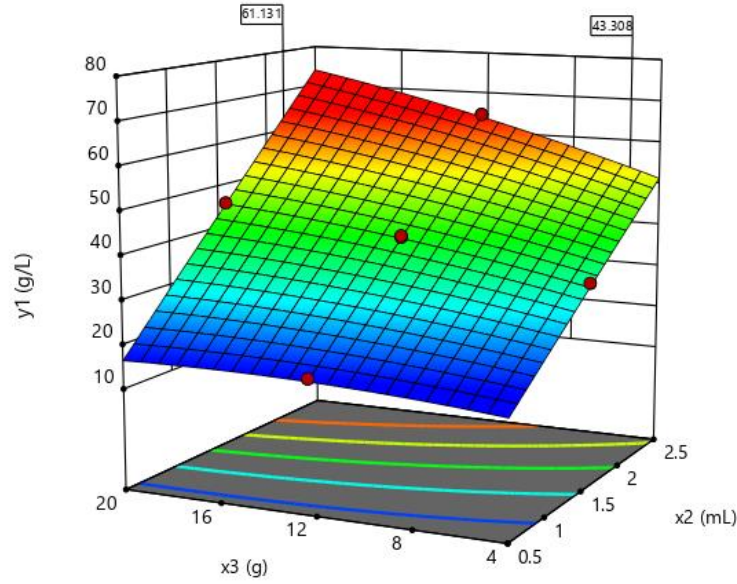
(a)



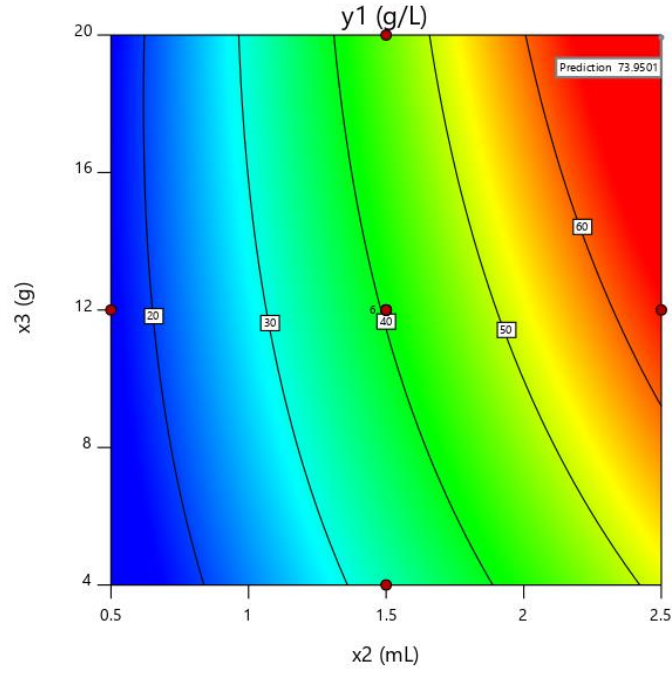
(b)

Şekil 4.54. Amonyum sülfat derişimi (x_1) ve ÖFZ miktarının (x_3); maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_2=1.5$ mL)

100 mL saf suya eklenen DSA hacmi (x_2) ve 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı (x_3) değişkenlerinin, maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.55.'de gösterilmiştir. Yanıt yüzey grafiğinden de görülebileceği gibi; en yüksek pullulan derişiminin (y_1); ÖFZ miktarının ve DSA hacminin, tanımlanmış olan en yüksek değerlerde olduğu ortamda elde edileceği tespit edilmiştir (Şekil 4.55.a). 2.05 mL DSA bulunan ortama eklenen ÖFZ miktarı 19.76 g'dan 4.16 g değerine düştüğü zaman elde edilebilecek en yüksek pullulan derişimleri yanıt yüzey grafiğinde işaretli olan; 61.13 ve 43.31 g/L noktaları ile gösterilmiştir. Şekil 4.55.b'de görülen kontur grafiğine göre; ortama eklenen DSA hacminin; 0.5 ile 1 mL arasında olması durumunda, elde edilecek olan en yüksek pullulan derişiminin; 20 g/L'nin altında olacağı saptanmıştır. Eklenen DSA hacminin; 2.0 ile 2.5 mL arasında olması halinde ise; elde edilecek en yüksek pullulan derişiminin; 50 g/L'den yüksek olacağı tespit edilmiştir. Söz konusu kontur grafiğine göre; elde edilecek en yüksek pullulan derişimi, ortama eklenen DSA hacminin 2.50 ml ve ÖFZ miktarının; 20 g olduğu ortamda; 73.95 g/L olarak hesaplanmıştır.



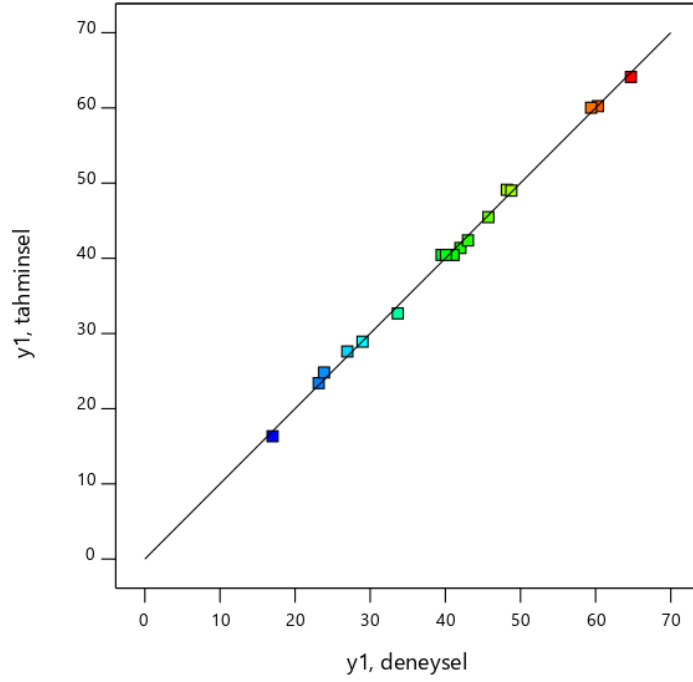
(a)



(b)

Şekil 4.55. DSA hacminin (x_2) ve ÖFZ miktarının (x_3); maksimum pullulan derişimi (y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_1 = 3.6$ g/L)

Maksimum pullulan derişimlerinin (y_1), Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırıldığı grafik; Şekil 4.56.'da sunulmuştur. Bu grafiğe göre; deneysel veriler ile tahminsel veriler birbirine oldukça yakındır. Bu değişken için regresyon katsayısı değeri; $R^2 = 0.9976$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerin 1'e oldukça yakın olması, eşitlik kullanılarak elde edilen veriler ile deneysel verilerin birbirleri ile uyumlu olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.56. En yüksek pullulan derişimlerinin (y1); deneysel değeri ile Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değeri karşılaştırılması ($y = 0.9975x + 0.1029$, $R^2=0.9976$)

Eş. 4.2’de diğeri bir bağımlı değişken olarak tanımlanan; en yüksek EPS derişimi (y2) için oluşturulan model denklem görülmektedir. Söz konusu eşitlikte; fermantasyon ortamına azot kaynağı olarak eklenen $(NH_4)_2SO_4$ ’ın derişimi (x_1), 100 mL saf suya eklenen DSA hacmi (x_2) ve 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarının (x_3) EPS derişimi üzerindeki etkileri, çoklu regresyon denklemi ile ifade edilmiştir.

$$y_2 = + 44.97 + 0.7859x_1 + 14.49x_2 + 4.19x_3 - 0.4475x_1x_2 + 0.2575x_1x_3 + 1.21x_2x_3 - 0.3019(x_1)^2 - 0.4999(x_2)^2 - 1.26(x_3)^2 \quad (4.2)$$

y_2 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı (R^2) değeri; 0.9971 olarak belirlenmiştir . R^2 değerinin 1’e yakın olması deneysel olarak elde edilen y_2 değerleri ile, Eş. 4.2’ye göre hesaplanan y_2 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir.

Modele ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları ise; Çizelge 4.11.’de gösterilmiştir. Varyans analizi tablosunda verilen sonuçlara göre; model önemli ($p < 0.05$), modele ait uyum eksikliği ise önemsiz ($p > 0.05$) olarak ifade belirlenmiştir. Maksimum EPS derişimi üzerinde tüm bağımsız değişkenlerin (x_1 , x_2 , x_3), x_2 ve x_3 ’ün ikili etkileşiminin ve x_3 ’ün karesel etkisinin de önemli bulunduğu görülmektedir.

Çizelge 4.11. x1, x2 ve x3 bağımsız değişkenlerinin maksimum EPS derişimi (y2) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

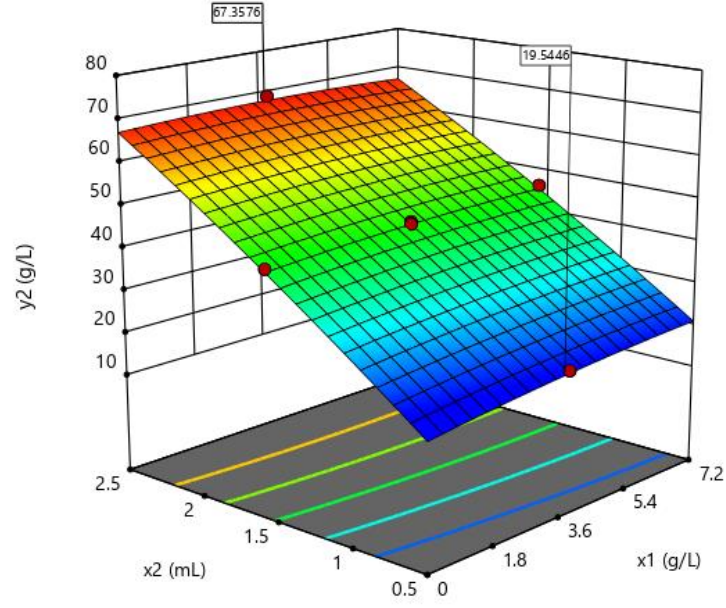
Varyans kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	3154.48	384.93**	<0.0001
x1	1	8.44	9.26*	0.0124
x2	1	2867.63	3149.34**	<0.0001
x3	1	239.34	262.86**	<0.0001
x1x2	1	1.60	1.76	0.2142
x1x3	1	0.5304	0.5826	0.4629
x2x3	1	11.71	12.86**	0.0050
x1 ²	1	1.31	1.44	0.2574
x2 ²	1	3.60	3.96	0.0748
x3 ²	1	22.88	25.13**	0.0005
Uyum eksikliği	5	7.49	4.64	0.0587
Hata	5	1.61		
Genel	19			

SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

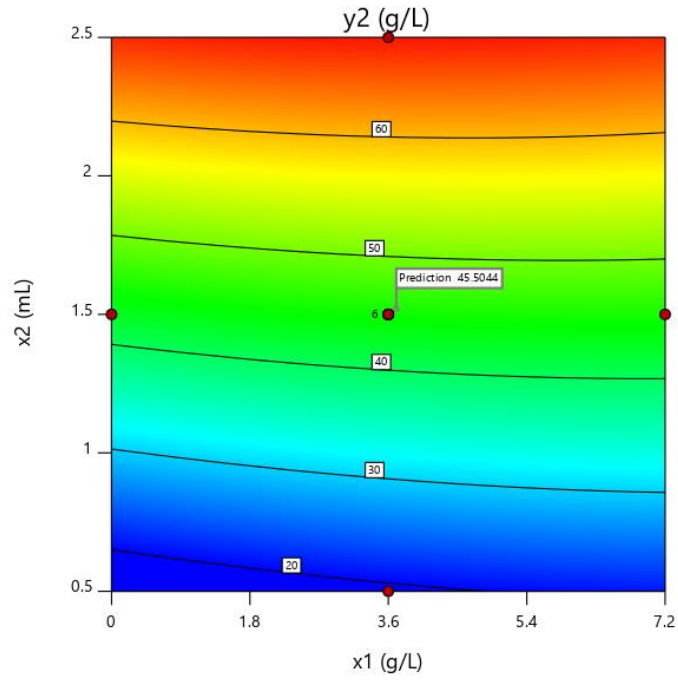
*p<0.05, **p<0.01

Fermantasyon ortamlarındaki amonyum sülfat derişimi (x1) ve fermantasyon ortamındaki (DSA) hacmi (x2) değişkenlerinin, maksimum EPS derişimi (y2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.57.'de görölmektedir. Şekil 4.57.a'da verilen yanıt yüzey grafiğine göre, ortama eklenen DSA hacminin artması ile elde edilen en yüksek EPS derişimi de önemli ölçüde artış göstermiştir. İlgili grafikte işaretlenmiş olarak görülen 19.55 ve 67.36 g EPS/L değerlerinde, amonyum sülfat derişimi 4.36 g/L olup, DSA hacmi değerleri ise sırasıyla; 2.5 ve 0.5 mL'dir. Ortamdaki amonyum sülfat derişiminin artması ile maksimum EPS değerlerinde önemli bir değişiklik olmayacağı tespit edilmiştir. Kontur grafiğinde (Şekil 4.57.b), en düşük EPS derişimlerinin, ortama eklenen DSA hacminin 1.0 mL'den az ve amonyum sülfat derişiminin 1.8 g/L'den az olduğu koşullarda elde edileceği görölmüştür. Şekil 4.57.b'ye göre, merkez nokta değerlerine (x1= 3.70 g/L ve x2= 1.52 mL iken; y2=45.50 g/L) yakın bölgelerde elde edilecek olan, en yüksek EPS derişiminin 40 ile 50 g/L arasında olacağı saptanmıştır.

Elde edilen en yüksek EPS derişimlerinin ise, DSA hacminin; 2 mL'nin üzerinde olduğu ortamlarda elde edileceği belirlenmiştir.



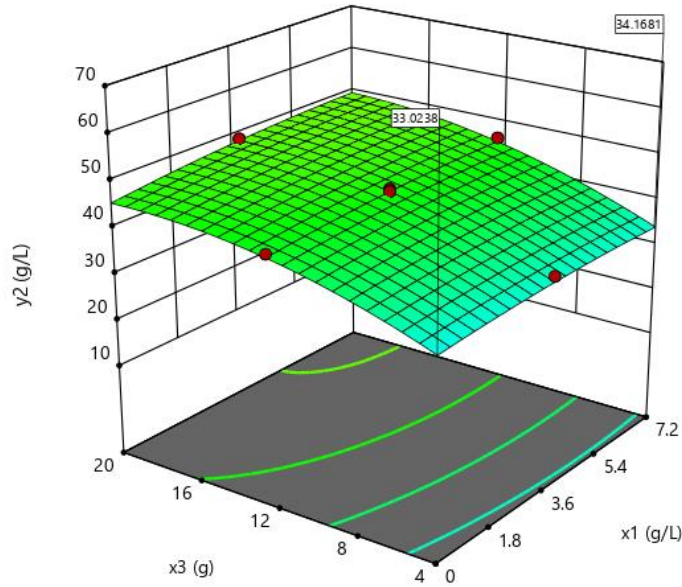
(a)



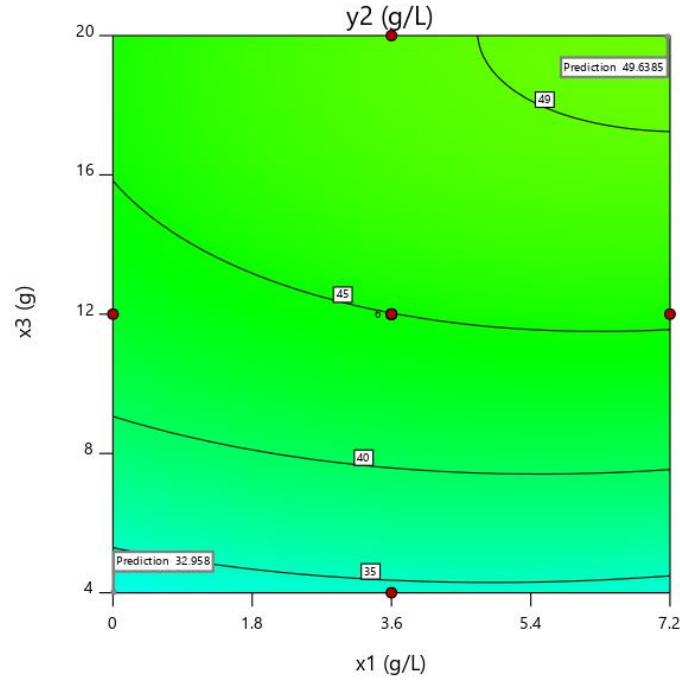
(b)

şekil 4.57. Amonyum sũlfat derişimi (x_1) ve DSA hacminin (x_2); maksimum EPS derişimi (y_2) ¼zerindeki etkilerini g¼steren (a) yanıt y¼zey ve (b) kontur grafikleri ($x_3=12$ g)

Amonyum sülfat derişimi (x_1) ve ÖFZ miktarının (x_3) maksimum EPS derişimi (y_2) üzerindeki etkileri; Şekil 4.58.'de verilen kontur ve yanıt yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Yanıt yüzey grafiğine göre; ÖFZ miktarı sabit tutulduğunda ortamdaki amonyum sülfat derişiminin artışı, elde edilen maksimum EPS miktarında önemli bir artışa neden olmayacağı bulunmuştur. Şekil 4.58.a'da işaretlenen noktalarda ÖFZ miktarı 4.0 g olarak sabitlendiğinde, amonyum sülfat derişimi 0 g/L iken maksimum EPS derişiminin 33.02 g/L; 7.2 g/L iken maksimum EPS derişiminin 34.17 g/L olarak elde edileceği görülmektedir. İlgili grafikten de anlaşıldığı üzere; ÖFZ miktarındaki artış, elde edilen maksimum EPS derişimini artıracakları belirlenmiştir. Şekil 4.58.b'de verilen kontur grafiğinde en yüksek EPS derişimine (49.64 g/L); ortamdaki amonyum sülfat derişiminin 5.4 g/L'den ve ÖFZ miktarının 16 g'dan yüksek olduğu koşullarda ulaşılabilirceği görülmektedir. Elde edilen en düşük EPS derişimine (32.96 g/L) ise, amonyum sülfat derişiminin 0 g/L ve ÖFZ miktarının 4 g olduğu koşullarda ulaşılabilirceği Şekil 4.58.b'deki kontür grafiğinde görülmektedir.



(a)

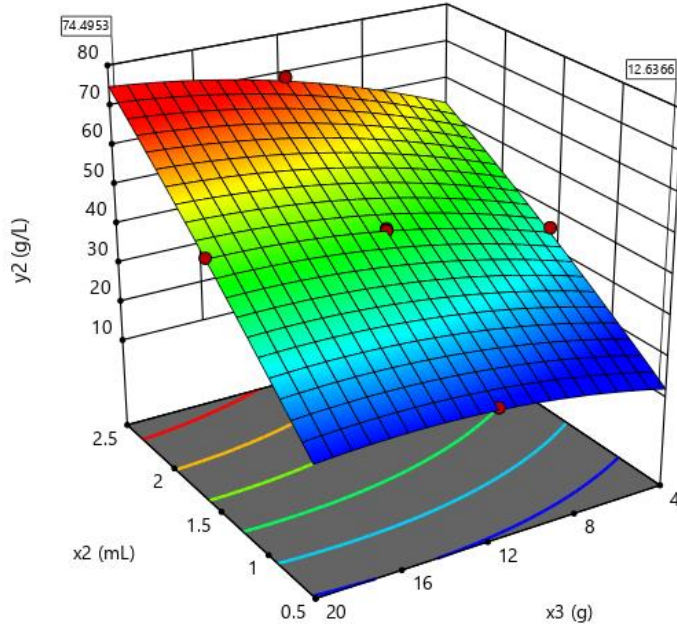


(b)

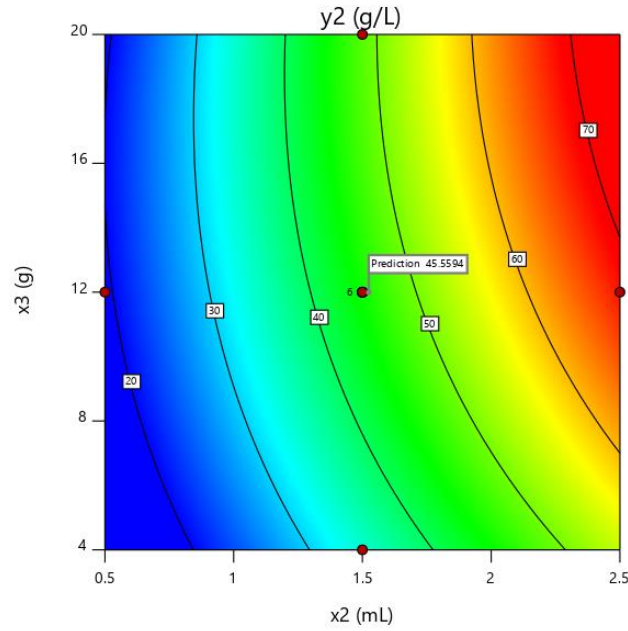
Şekil 4.58. Amonyum sülfat derişimi (x_1) ve ÖFZ miktarının (x_3); maksimum EPS derişimi (y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_2=1.5$ mL)

Şekil 4.59’da verilen yanıt yüzey ve kontur grafikleri, DSA hacminin (x_2) ve ÖFZ miktarının (x_3) elde edilen maksimum EPS derişimi üzerindeki etkilerini ifade etmektedir. Yanıt yüzey grafiğindeki en düşük ve en yüksek EPS derişimleri x_1 ve x_3 değişkenlerinin en düşük ve en yüksek oldukları değerlerde tespit edilmiştir. DSA hacminin ve ÖFZ miktarının sırasıyla 0.5 mL ve 4 g olduğu koşullarda düşük EPS derişimleri elde edilirken, DSA hacmi ve ÖFZ miktarının sırasıyla 2.5 mL ve 20 g olduğu koşullarda elde edilen EPS derişimlerinin yüksek oldukları belirlenmiştir. Şekil 59.a’da işaretlenen 12.63 g/L derişimine DSA hacminin 0.5 mL ve ÖFZ miktarının 4.42 g olduğu koşullarda ulaşılırken; 74.50 g/L derişimine DSA hacminin 2.50 mL ve ÖFZ miktarının 20 g olduğu koşullarda ulaşılabilceği görülmektedir. Şekil 4.59.b’deki kontur grafiğine göre, değişkenlerin merkez noktalarına yakın yerlerde maksimum EPS derişimlerinin; 40 ile 50 g/L arasında değiştiği görülmektedir. DSA hacminin; 1.5 mL ve ÖFZ miktarının; 12 g olduğu koşullarda; EPS derişiminin; 45.56 g/L olacağı saptanmıştır. Ortama eklenen 2.0 mL’den yüksek DSA hacimlerinde; elde edilecek olan EPS derişimlerinin 70 g/L değerinin üzerinde olacağı görülmektedir. Ortamdaki ÖFZ miktarı ile DSA hacminin

azalmasının, elde edilecek olan maksimum EPS derişimlerinin; 70 g/L'lerden 20 g/L'lerin altına düşmesine neden olacağı belirlenmiştir.



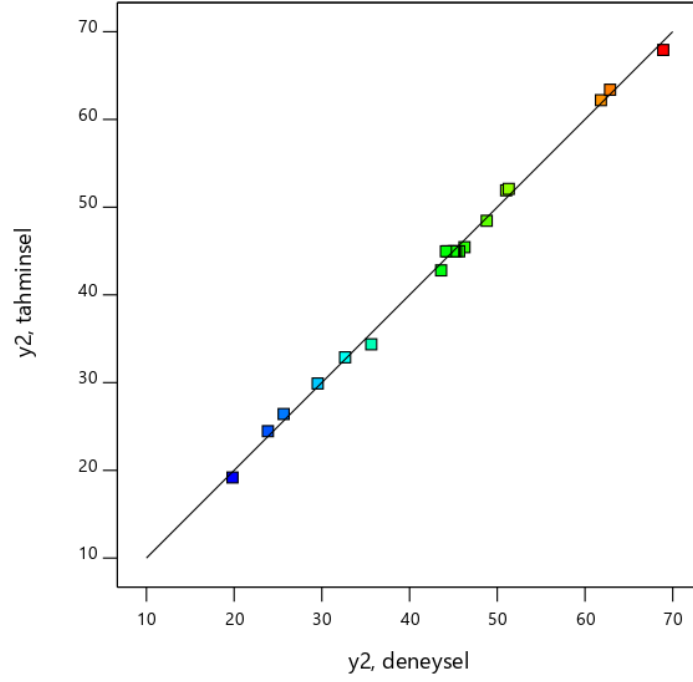
(a)



(b)

Şekil 4.59. DSA hacminin (x_2) ve ÖFZ miktarının (x_3); maksimum EPS derişimi (y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_1 = 3.6$ g/L)

Maksimum EPS derişimlerinin deneysel ve Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri; Şekil 4.60.'da görölmektedir. Deneysel veriler ile model eşitlik kullanılarak bulunan tahminsel verilerin birbirlerine uyumlu olduğu regresyon katsayısı ile doğrulanmıştır. Maksimum EPS derişimi için hesaplanan regresyon katsayısı değeri; $R^2 = 0.9971$ 'dir.



Şekil 4.60. En yüksek EPS derişimlerinin (y2); deneysel değerleri ile Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.9971x + 0.1284$, $R^2 = 0.9971$)

Ortamdaki $(NH_4)_2SO_4$ derişimi (x_1), DSA hacmi (x_2) ve ÖFZ miktarının (x_3) mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı (y_3) üzerindeki etkileri Eş 4.3'de ifade edilmektedir.

$$y_3 = + 0.0421 + 0.0014x_1 + 0.0133x_2 + 0.0034x_3 - 0.0003x_1x_2 + 0.0013x_1x_3 + 0.007x_2x_3 + 0.0053(x_1)^2 + 0.0076 (x_2)^2 - 0.0083 (x_3)^2 \quad (4.3)$$

Mikroorganizmanın özgül üreme hızı değerleri için modele ait R^2 değeri 0.7991 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 0.75'den büyük olması Eş. 4.3'e göre hesaplanan y_3 değerleri ile deneysel olarak elde edilen y_3 değerlerinin birbirlerine büyük ölçüde yakın olduklarını göstermektedir.

Modele ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları ise; Çizelge 4.12.'de gösterilmiştir. Varyans analizi tablosuna göre model önemli ($p<0.05$), model eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur. Çizelge 4.12.'den x2 değişkeni ile x2 ve x3'ün karesel etkisinin önemli olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.12. x1, x2 ve x3 bağımsız değişkenlerinin mikroorganizmanın özgül üreme hızı (y3) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

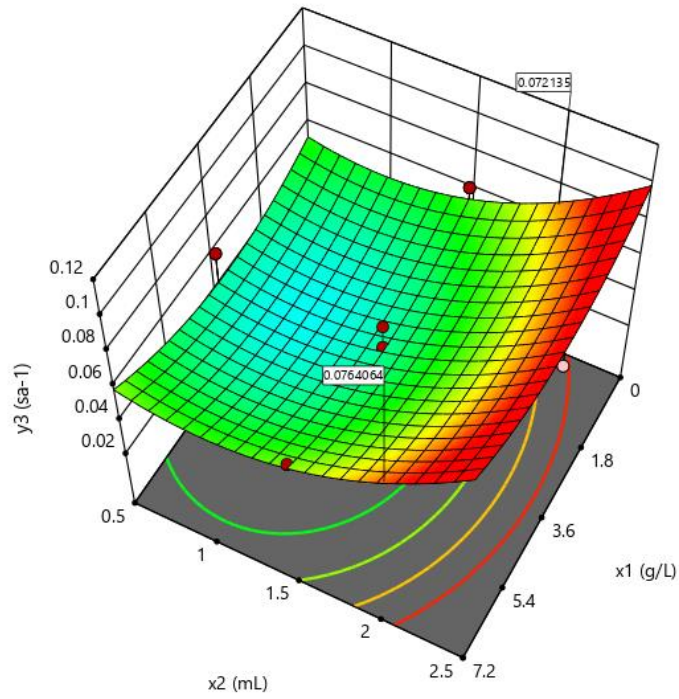
Varyans kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	9	0.0055	4.42*	0.0148
x1	1	0.0000	0.2069	0.6589
x2	1	0.0024	17.62**	0.0018
x3	1	0.0002	1.13	0.3118
x1x2	1	5×10^{-7}	0.0036	0.9530
x1x3	1	0.0000	0.0912	0.7689
x2x3	1	0.0004	2.86	0.1217
x1 ²	1	0.0004	2.94	0.1171
x2 ²	1	0.0008	6.05*	0.0337
x3 ²	1	0.0010	7.28*	0.0224
Uyum eksikliği	5	0.0010	2.49	0.1697
Hata	5	0.0004		
Genel	19			

SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

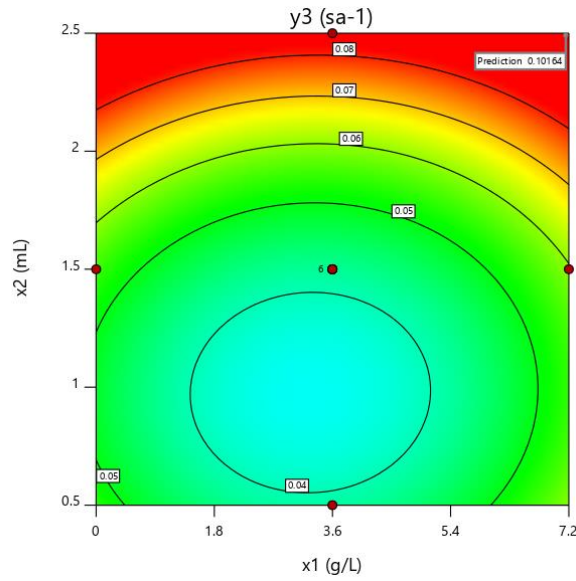
* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Fermantasyon ortamlarındaki amonyum sülfat derişimi (x1) ve DSA hacmi (x2) değişkenlerinin, mikroorganizmanın özgül üreme hızı (y3) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.61.'de görülmektedir. Şekil 4.61.a'daki yanıt yüzey grafiğine göre; DSA hacminin 2.0 mL'den yüksek olduğu ortam koşullarında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızının yüksek olacağı görülmektedir. Ayrıca, ortamdaki amonyum sülfat derişimindeki artış, çalışılan suşun özgül üreme hızı değerlerinde artışa yol açmaktadır. Söz konusu grafikten, DSA hacminin 2 ml olarak sabitlendiği ortamda, amonyum sülfatın olmadığı durumda 0.072 sa⁻¹ olarak tespit edilen

öztöl üreme hızı, ortamdaki amonyum sülfat derişiminin; 7.2 g/L olduğu durumda; 0.076 sa⁻¹ olacağı tespit edilmiştir. şekil 4.61.b'de görölen kontur grafiğinde, en dölşöl öztöl üreme hızı değerlerinin; DSA hacminin 1.5 mL'den dölşöl ve amonyum sülfat derişiminin; 1.8 ile 5.4 g/L aralığında değerliği koşullarda olduğu görölmektedir. Sölz konusu kontur grafiği üzerinde işaretlenmiş olan; en yüksek öztöl üreme hızı değerine (0.10 sa⁻¹) DSA hacminin 2.5 mL ve amonyum sülfat derişiminin 7.2 g/L olduğu fermentasyon ortamı koşullarında ulaşılacağı tespit edilmiştir. x1 ve x2 değerşkenleri için çalışılan aralıkta, öztöl üreme hızı değerleri 0.036 ile 0.1 sa⁻¹ aralığında değerşkenlik göstermektedir (şekil 4.61.b).



(a)

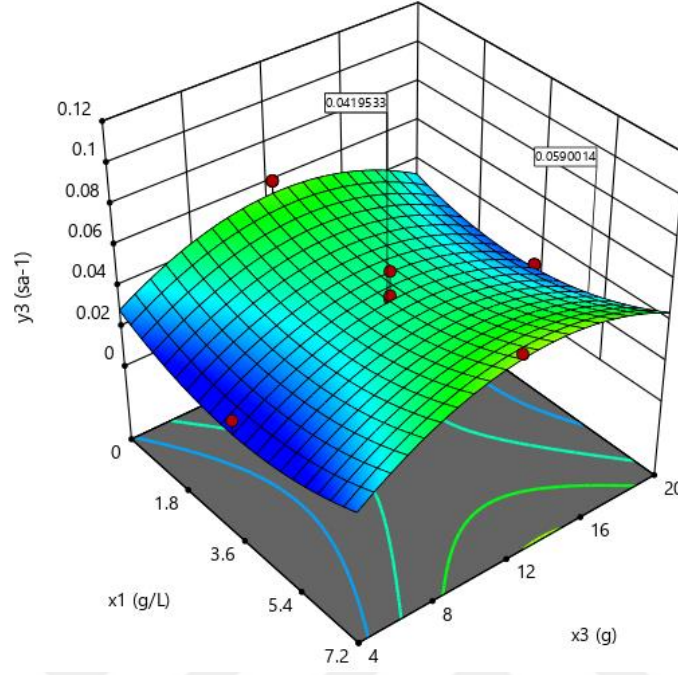


(b)

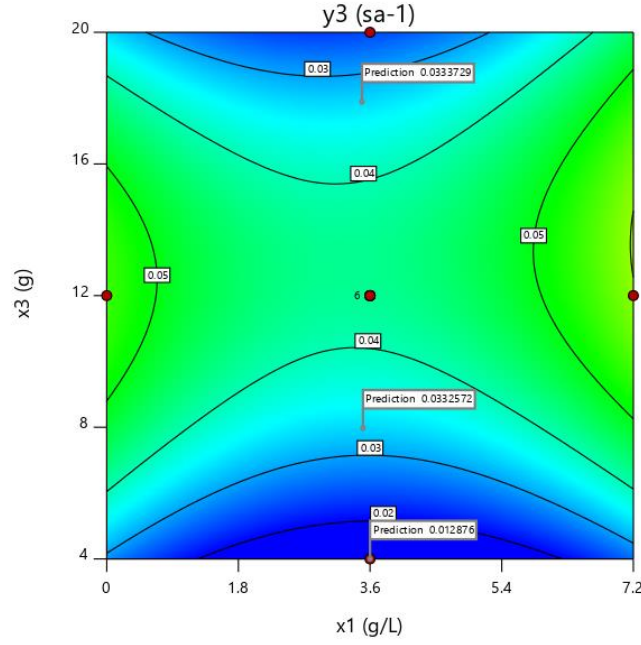
Şekil 4.61. Amonyum sülfat derişimi (x_1) ve DSA hacminin (x_2); mikroorganizma özgül üreme hızı (y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_3=12$ g)

Mikroorganizmanın özgül üreme hızına etki eden değişkenlerden olan amonyum sülfat derişimi (x_1) ve ÖFZ miktarının (x_3) y_3 değişkeni üzerindeki ikili etkileri Şekil 4.62.'daki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde sunulmuştur. Yanıt yüzey grafiğinde görülebileceği gibi en yüksek özgül üreme hızı, amonyum sülfat derişiminin, çalışılan aralıkta en yüksek derişimde (7.2 g/L) olduğu ve ÖFZ miktarının; 12 ile 16 g arasında değiştiği koşullarda belirlenmiştir. Şekil 4.62.a'da işaretlenen noktada (0.059 sa^{-1}) amonyum sülfat derişimi 7.2 g/L ve ÖFZ miktarı 15.36 g olarak belirlenmiştir. Merkez nokta değerlerinde tespit edilen özgül üreme hızı değerleri; 0.040 ile 0.045 sa^{-1} aralığında değişmektedir. Merkez nokta değerlerine yakın bir noktada ($x_1=3.33 \text{ g/L}$ ve $x_3=11.65 \text{ g}$) işaretlenen özgül üreme hızı değerinin 0.042 sa^{-1} olarak bulunacağı görülmektedir. Şekil 4.62.b'de görülen kontur grafiğinden özgül üreme hızı değerlerinin; 0.013 ile 0.06 sa^{-1} aralığında değiştiği görülmektedir. Elde edilen en düşük özgül üreme hızı değeri (0.013 sa^{-1}) ÖFZ miktarının en düşük (4 g) ve amonyum sülfat derişiminin yaklaşık; 3.6 g/L olduğu koşulda tespit edilmiştir. ÖFZ miktarının 8 ile 16 g ve amonyum sülfat derişiminin 1.8 ile 5.4 g/L olduğu aralıkta tespit edilen özgül üreme hızı değerleri; 0.04 ile 0.05 sa^{-1} aralığında değişim göstermektedir. Ayrıca, amonyum sülfat derişiminin 3.5 g/L olarak sabit tutulduğu durumda, Şekil 4.62.b'de işaretlenen noktalarda mikroorganizmanın

özellik üretim hızı değeri (0.33 sa⁻¹) neredeyse aynı olup, ÖZ miktarlarının sırasıyla 7.93 g ve 17.85 g olduğu görülmektedir.



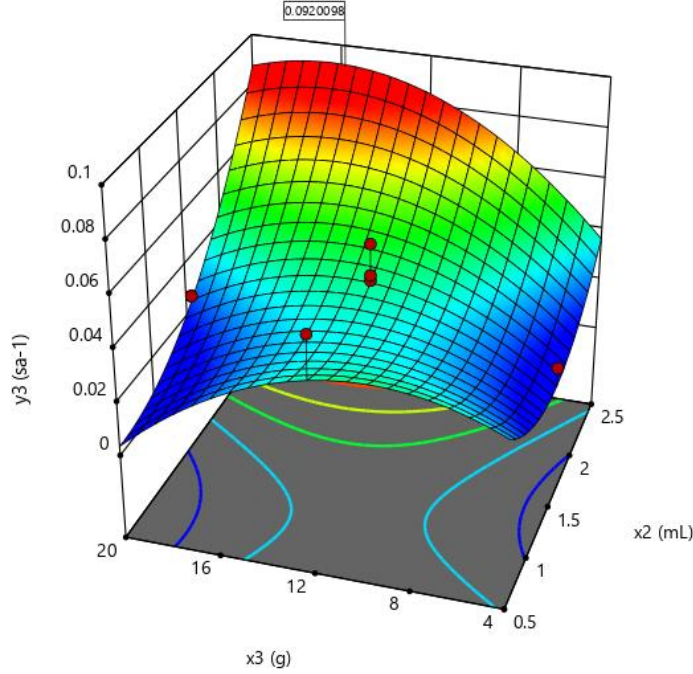
(a)



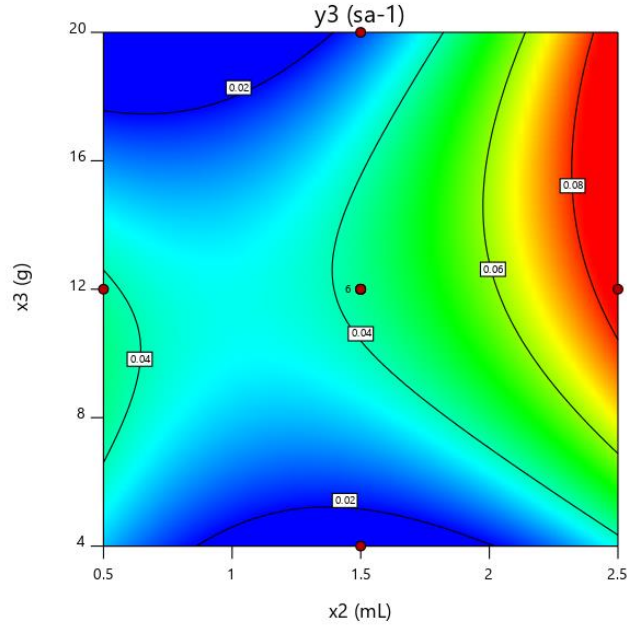
(b)

Şekil 4.62. Amonyum sülfat derişimi (x1) ve ÖZ miktarının (x3); mikroorganizma özgül üretim hızı (y3) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri (x2= 1.5 mL)

Şekil 4.63'te, DSA hacminin (x_2) ve ÖFZ miktarının (x_3) mikroorganizmanın özgül üreme hızı değerleri üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir. Yanıt yüzey grafiğinde; ÖFZ miktarındaki artışın, özgül üreme hızı değerlerini önemli ölçüde arttırdığı görülmektedir. Ayrıca ortama eklenen ÖFZ miktarı ile birlikte artan DSA hacminin, en yüksek özgül üreme hızı değerlerine ulaşılmasını sağladığı görülmüştür. Şekil 4.63.a'da işaretlenen noktada, en yüksek özgül üreme hızına (0.092 sa^{-1}), ÖFZ miktarı ve DSA hacimlerinin sırasıyla 16 g ve 2.5 ml olduğu koşullarda ulaşılabileceği belirlenmiştir. En düşük özgül üreme hızı değerleri, ortama eklenen DSA hacminin 2.0 mL'den az olduğu koşullarda görülmektedir. Şekil 4.63.b'de verilen kontur grafiğinden, yüksek özgül üreme hızı değerlerine ulaşılması için; yüksek ÖFZ miktarı ve yüksek DSA hacmi ile çalışılması gerektiği belirlenmiştir. Düşük DSA hacimleri ile çalışılan ortamlarda, ÖFZ miktarının 8 ile 12 g aralığındaki ÖFZ miktarlarının; özgül üreme hızı değerlerini bir miktar arttırdığı belirlenmiştir. Yüksek DSA hacimleri ile çalışılan ortamlarda, ortamdaki ÖFZ miktarının 8 ile 16 g arasında olduğunda elde edilen özgül üreme hızı değerlerinin; 0.04 ile 0.08 sa^{-1} arasında değişim gösterdiği görülmektedir.



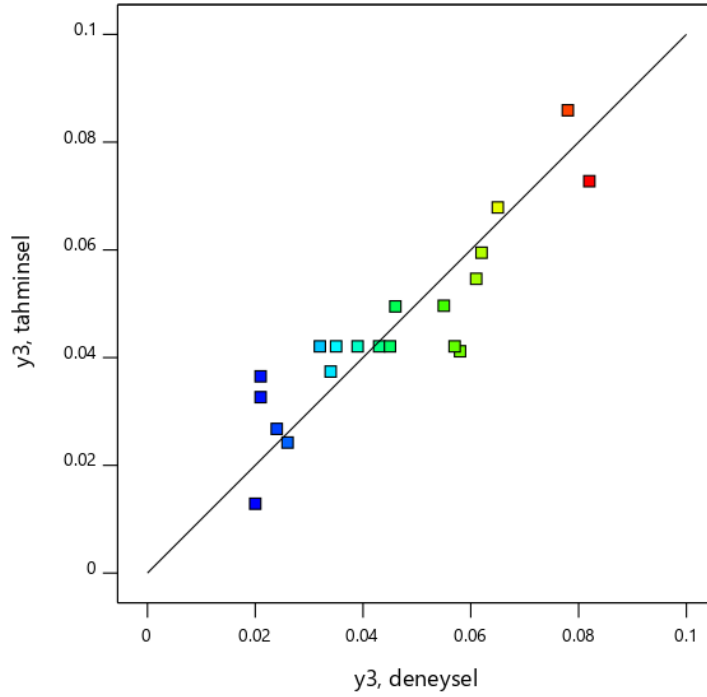
(a)



(b)

Şekil 4.63. DSA hacminin (x_2) ve ÖFZ miktarının (x_3); mikroorganizma özgül üreme hızı (y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a) yanıt yüzey ve (b) kontur grafikleri ($x_1 = 3.6$ g/L)

Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel özgül üreme hızı değerleri ile deneysel özgül üreme hızı değerlerinin karşılaştırıldıkları grafik; Şekil 4.64.'de görülmektedir. Türetilen model eşitlik için regresyon katsayısı değeri; $R^2 = 0.7991$ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan regresyon katsayısı değerinin; 0.75'den büyük olması nedeniyle, deneysel olarak elde edilen veriler ile tahminsel veriler büyük ölçüde uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.64. Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (y3); deneysel değerleri ile Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.7992x + 0.0091$, $R^2=0.7991$)

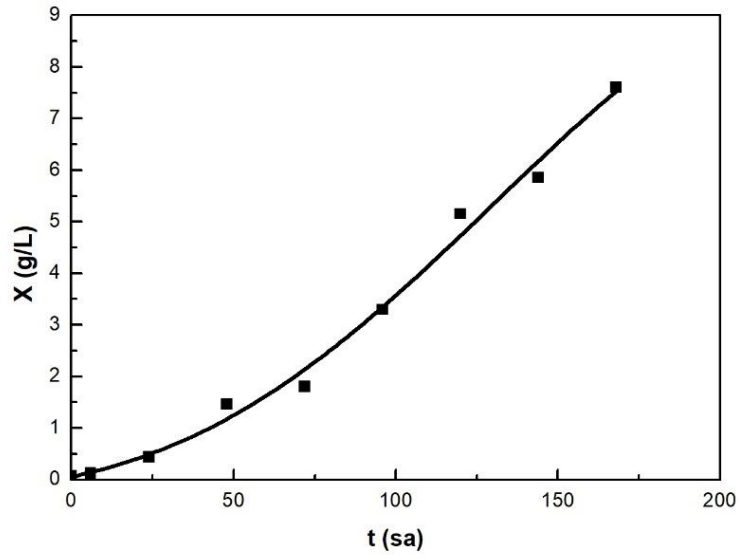
4.6. A. pullulans AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kuru fındık zürufu hidrolizatının kullanıldığı fermantasyon ortamının optimizasyonu

Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde, denenen doğal substratlar içerisinde en iyi ortam olarak belirlenen; kuru fındık zürufu hidrolizatının kullanıldığı fermantasyon ortamının optimizasyonu amacıyla, Design Expert® 11 (Inc. Minneapolis, USA) programının deneme sürümü kullanılarak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan bağımsız değişkenler; amonyum sülfat derişimi (x1), DSA hacmi (x2) ve ÖFZ miktarı (x3) olarak belirlenmiştir. Seçilen bağımlı değişkenler ise, maksimum pullulan derişimi (y1), maksimum EPS derişimi (y2) ve mikroorganizmanın özgül üreme hızıdır (y3). Optimizasyon çalışması yapılırken yanıtlar için, programda yer alan; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılmış ve fermantasyon ortamı parametreleri için, program tarafından belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için öngörülen değerler elde edilmiştir. Program tarafından, toplamda 91 farklı çözüm oluşturmuştur. Oluşturulan çözümler; Ek 8'deki çizelgede gösterilmektedir. Bu çizelgede, her bir çözüm için bağımlı ve bağımsız değişkenlerin değerleri ile, program tarafından hesaplanan; istenilen hedefe ulaşma oranları da görülmektedir.

Söz konusu çizelgede bulunan 91 çözümde, istenilen hedefe ulaşma oranlarının; 0.78 ile 0.915 arasında değiştiği görülmektedir. Verilen çözümler arasından, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun; 0.915 olduğu bir çözüm seçilerek verilen koşullarda optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çözümde; amonyum sülfat derişimi 7.2 g/L, DSA hacmi; 2.5 mL ve ÖFZ miktarı; 20 g'dır. Bu koşullar kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamında; *A. pullulans* AZ-6 suşu kullanılarak yapılacak deney için elde edilecek maksimum pullulan derişiminin; 74.812 g/L, maksimum EPS derişiminin; 74.757 g/L ve mikroorganizmanın özgül üreme hızının; 0.108 sa⁻¹ olacağı öngörülmüştür.

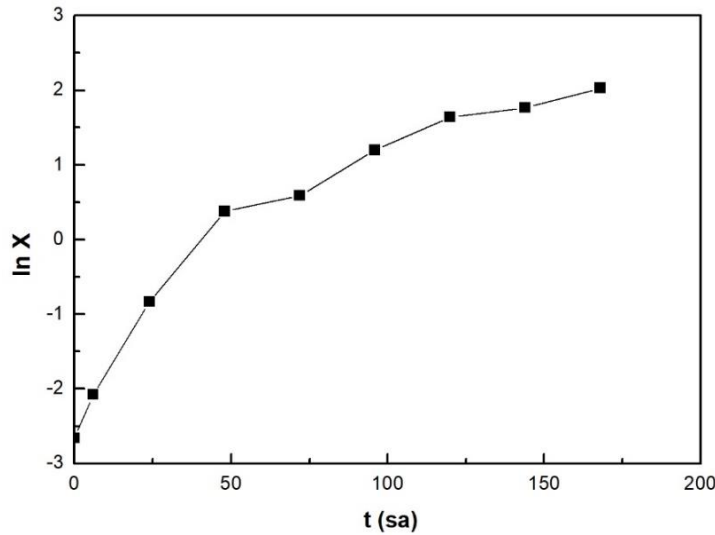
Optimizasyon çalışmasının yapılacağı fermantasyon ortamı koşulları belirlendikten sonra, yukarıda bu koşullar kullanılarak; 2 paralel deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler çalkalamalı su banyolarında, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 300 mL'lik erlenlerde 150 mL fermantasyon hacminde, kesikli bir sistemde ve karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.1.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanan kültür ortamında, 28°C'de 48 saat geliştirilen *A. pullulans* AZ-6 suşu, seçilmiş olan çözümde verilmiş olan parametrelere göre hazırlanan fermantasyon ortamlarına, %5 (v/v) oranında aşılanmıştır. Aşılanan kültürün inokülasyon başlangıç derişimi; 9.8x10⁷ kob/mL olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon süresince belirli zaman aralıklarında kültürden alınan örneklerde; biyokütle derişimleri, üretilen EPS ve pullulan derişimleri ile, ksiloz ve glukoz derişimlerinin zamanla değişimleri analiz edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen yanıtı ait belirlenen değerlerin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuştur (Şekil 4.65-4.69).

Şekil 4.65.'de; optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri verilmiştir. Söz konusu grafik incelendiğinde; biyokütle derişiminin fermantasyon süresince arttığı ve en yüksek değerine (7.61 g/L), fermantasyonun sonunda ulaştığı görülmektedir.



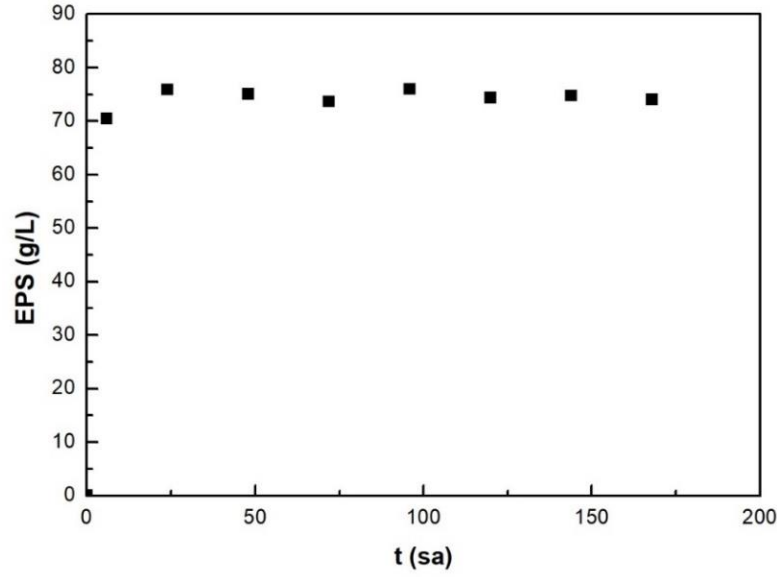
Şekil 4.65. Optimum koşullarda *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

Çalışılan suşun, üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızının hesaplanması için, biyokütle derişimlerinin ln değeri alınarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.66.) ln X değeriinin zamanla değışimini gösteren grafikten hesaplanan özgül üreme hızı (μ) değeri; 0.097 sa^{-1} dir.



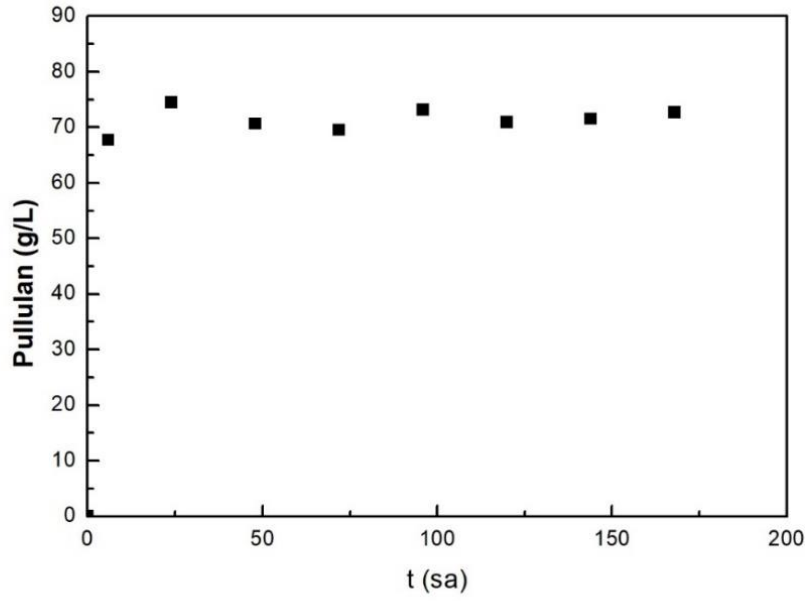
Şekil 4.66. Optimum koşullarda *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değeriinin zamanla değışimi

Optimum koşullarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS miktarlarının zamanla değişimleri ise; Şekil 4.67.'de sunulmuştur. Fermantasyonun ilk 24 saatine kadar hızla artış gösteren EPS derişiminin, daha sonra ise çok fazla değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Bu deneyde, elde edilen en yüksek EPS derişimi, fermantasyonun 96. saatinde, 75.95 g/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.67. Optimum koşullarda *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

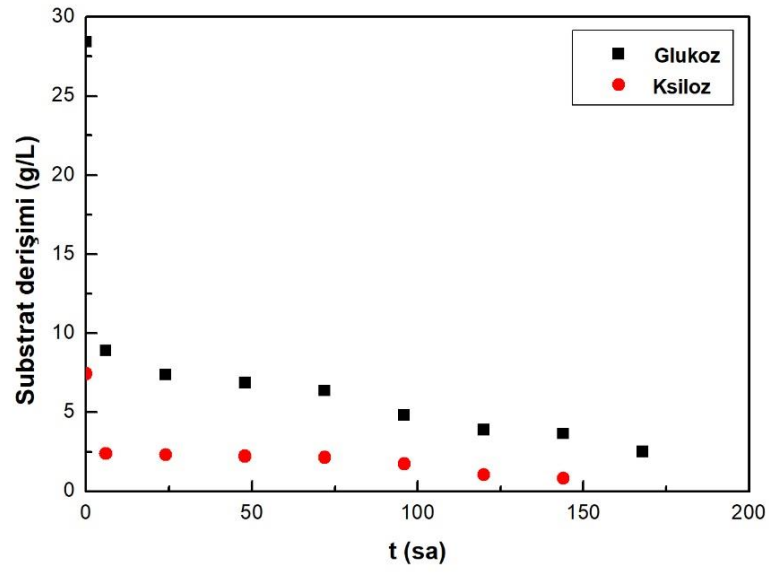
Şekil 4.68.'de ise optimum çalışma koşullarında *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri görölmektedir. Şekil 4.67.'de verilmiş olan; EPS grafiğine benzer olarak pullulan derişimlerinde de; fermantasyonun ilk günlerindeki artıştan sonra, önemli bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Optimum fermantasyon ortamı koşullarında gerçekleştirilen deneylerde, elde edilen en yüksek pullulan derişimi; fermantasyonun 24. saatinde 74.39 g/L olarak tespit edilmiştir.



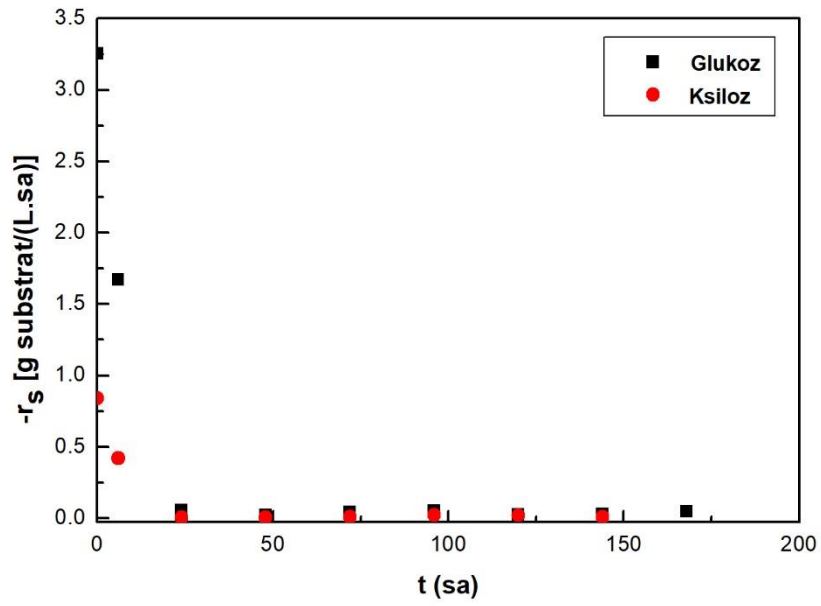
Şekil 4.68. Optimum koşullarda *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu aşamada, Şekil 4.65. ve Şekil 4.68. kullanılarak, optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyler için, özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Bu koşullarda çalışılan suş için en yüksek özgül ürün oluşum hızı (ν) değeri; 120.0 g pullulan/(g mo.sa) olarak bulunmuştur.

Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamında bulunan ksiloz ve glukozun zamanla değışimleri ile bu şekerlerin tüketim hızlarının zamanla değışimleri; Şekil 4.69.'da gösterilmiştir. Fermantasyon ortamındaki başlangıç derişimleri; 28.42 g/L glukoz ve 7.44 g/L ksiloz olan substratların, zamanla tüketildikleri görülmektedir. Fermantasyonun 168. saatinde ortamda bir miktar glukoz tüketilmeden kalırken, fermantasyonun 144. saatinde ksilozun tamamının çalışılan suş tarafından tüketildiğı belirlenmiştir. Fermantasyonun başlangıcında yüksek olan substrat tüketim hızlarının da, fermantasyonun 24. saatinden itibaren çok fazla değışmediğı bulunmuştur (Şekil 4.69.b). En yüksek substrat tüketim hızı değeri glukoz ve ksiloz için sırasıyla; 3.26 g glukoz/(L.sa) ve 0.84 g ksiloz/(L.sa) olarak tespit edilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.69. Optimum koşullarda ortamda bulunan; (a) glukoz (■) ve ksiloz (●) derişimlerinin zamanla değişimleri, (b) glukoz (■) ve ksiloz (●) tüketim hızlarının zamanla değişimleri

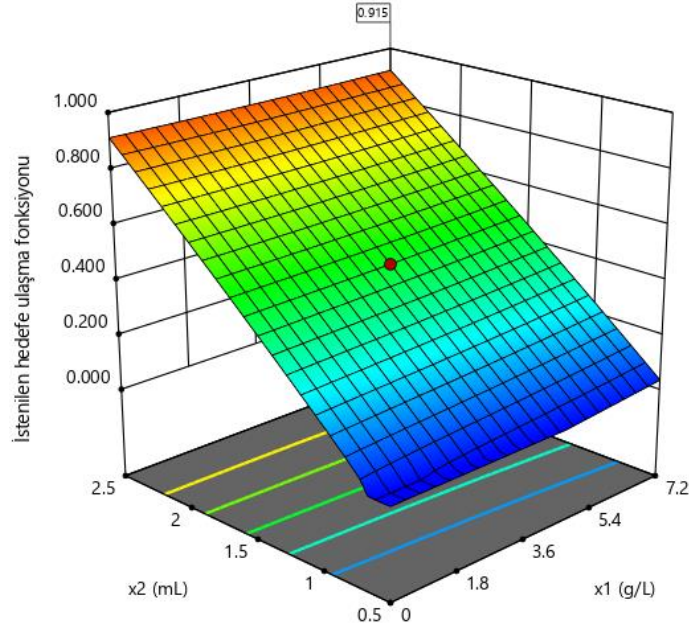
Bağımlı değişkenlerin deneysel olarak elde edilen değerleri ile Eş. 4.1-4.3 kullanılarak hesaplanan teorik değerleri; Çizelge 4.13.'de verilmiştir. Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlerin değerleri; Design Expert® 11 programındaki; ileri analiz bölümü kullanılarak, %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Çizelge 4.13.'de bağımlı değişkenler için program çıktısında Eş 4.1-4.3 kullanılarak hesaplanan minimum ve maksimum değerler görülmektedir. Elde edilen deneysel değerlerin, hesaplanan minimum ve maksimum değerler arasında oldukları görülmektedir. Ayrıca; deneysel olarak elde edilen bağımlı değişken değerleri ile teorik değerlerin de birbirlerine oldukça yakın oldukları belirlenmiştir. Bunun yanısıra; programdaki doğrulama menüsü kullanılarak da, belirlenen optimum koşulların %95 güven aralığında olduğu doğrulanmıştır.

Çizelge 4.13. Bağımlı değişkenlerin program kullanılarak hesaplanan teorik değerleri ile program çıktısından elde edilen minimum ve maksimum değerleri ve deneysel değerleri

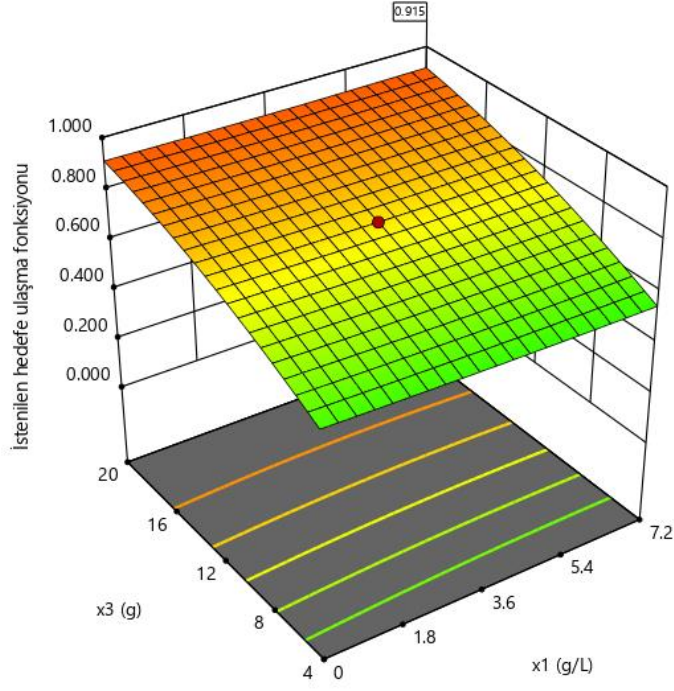
Bağımlı değişken	Simge	Teorik değer	Deneysel değer	Minimum değer	Maksimum değer
Maximum pullulan derişimi (g/L)	y1	74.81	74.39	70.43	79.20
Maximum EPS derişimi (g/L)	y2	74.76	75.95	69.85	79.66
Mikroorganizma özgöl üreme hızı (sa ⁻¹)	y3	0.108	0.097	0.048	0.170

Farklı bağımsız değişken değerleri ile oluşturulan 91 çözüm için, program çıktısından elde edilen istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun değerleri Ek 8'de görülmektedir. Ek 8'de yer alan çizelgeye göre optimizasyon çalışmasında ulaşılacak en yüksek istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu değeri; 0.915 olarak ifade edilmiştir. Bu çalışmada; önerilen 91 çözüm arasında, ilk çözümdeki değişkenler kullanılarak yapılan optimizasyon deneyi sonucunda da elde edilen istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun değeri; 0.915 olarak bulunmuştur. Optimizasyon deneyi sonucunda istenilen hedefe ulaşma fonksiyonuna bağımsız değişkenlerin ikili etkilerini gösteren grafikler; Şekil 4.70.'de verilmiştir. Şekil 4.70.a'da, amonyum sülfat derişiminin istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunda önemli bir etkisinin olmadığı görülürken, fermantasyon ortamı hazırlanırken asit hidrolizinde

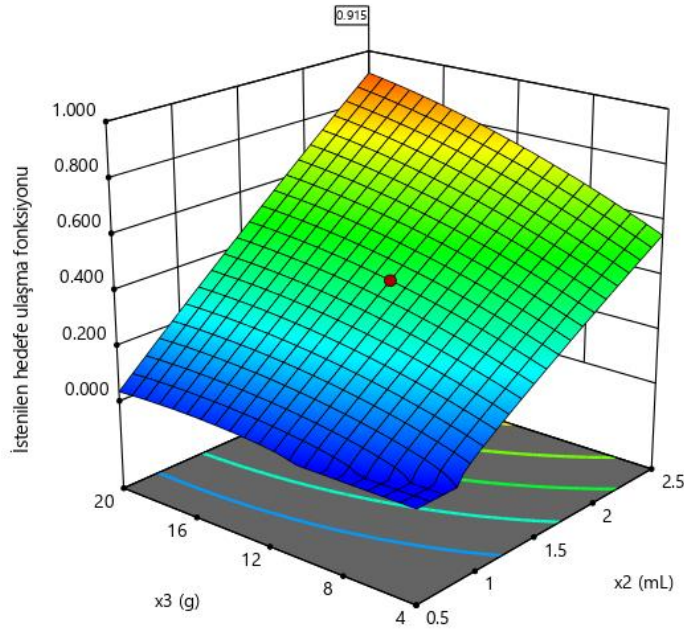
kullanılan; DSA hacminin artmasıyla, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun önemli derecede arttığı görülmektedir. Şekil 4.70.b’de verilen grafiğe göre; amonyum sülfat derişiminin, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunda önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir. Fermantasyon ortamında 100 mL asit çözeltisine eklenen ÖFZ miktarı artış gösterdikçe ise, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun yükseldiği ve ÖFZ miktarı; 20 g olduğunda, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonuna ait değerin; 0.915 olduğu saptanmıştır. DSA hacmi ve ÖFZ miktarının en düşük olduğu koşullarda; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu değerin oldukça düşük olduğu, iki değişkenin değerlerinin de en yüksek olduğu koşullarda ise, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu değerin; 0.915 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.70.c).



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.70. İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun; (a) x_1 ve x_2 ($x_3 = 20$ g), (b) x_1 ve x_3 ($x_2 = 2.5$ mL) (c) x_2 ve x_3 ($x_1 = 7.2$ g/L) bağımsız değişkenlerine göre değişimi

4.7. EPS örneklerine uygulanan moleküler yapı analizinin sonuçları

Bu çalışmada *A. pullulans* AZ-6 suşu kullanılarak yapılan optimizasyon deneylerinde elde edilen EPS örneklerinden en yüksek pullulan derişimine sahip olan örneklerle moleküler yapı analizi uygulanmıştır (bkz Bölüm 3.2.12.) Bu analiz için Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi kullanılmıştır. Bu deneylerde kontrol amaçlı olarak; saf bir pullulan (Sigma Aldrich, USA) örneği kullanılmış ve bu örneğe de FT-IR analizi uygulanmıştır. Yapılan analiz sonucunda EPS örnekleri ile ticari pullulan örneğinden elde edilen FT-IR spektrumlarındaki piklerin dalga boyları karşılaştırılmıştır. Böylece moleküler yapı benzerlikleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada seçilen EPS örnekleri ile saf pullulan örneğine uygulanan FT-IR analizi sonucunda elde edilen spektrumlardaki çeşitli fonksiyonel gruplara ait dalga boyları; Çizelge 4.14.'de görölmektedir.

Çizelge 4.14. Optimizasyon deneylerinden elde edilen EPS örnekleri ile saf pullulan örneğine yapılan FT-IR analizi sonuçları

Fonksiyonel gruplar	Dalga boyu (cm ⁻¹)		
	Saf pullulan	EPS örnek 1	EPS örnek 2
O-H gerilmesi	3438.4	3418.3	3431.8
C-H gerilmesi	2928.3	2932.2	2937.9
O-C-O gerilmesi	1645.5	1610.8	1610.8
C-O-H gerilmesi	1418.3	1417.9	1419.8
C-O-C gerilmesi	1155.5	1115.0	1140.1
α -1,6 glikozidik bağ	927.9	-	-
α -D-glukopiranozid	850.7	847.3	839.1
α -1,4-D-glikozidik bağ	756.2	765.8	765.8

Pullulan için, FT-IR spektrumundaki 650-1500 cm⁻¹ dalga boyu aralığının, bu moleküle özgü karakteristik özellikleri gösteren parmak izi bölgesini ifade ettiği belirtilmektedir (Choudhury, Saluja ve Prasad, 2011). Bu tez çalışmasında, optimizasyon aşamasındaki fermantasyon deneylerinde üretilmiş olan EPS örnekleri ile, kontrol amaçlı olarak incelenen saf pullulan örneğine ait FT-IR analizleri sonucunda elde edilen spektrumların,

parmak izi bölgesi ve diğer fonksiyonel grupları işaret eden bölgelerde oldukça benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.14.).

EPS örneklerinde, 3418.3 ve 3431.8 cm^{-1} dalga boylarında tespit edilen piklerin; tekrarlayan –OH bantlarını gösterdikleri rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2017). Ayrıca, 1. ve 2. EPS örneklerinde, sırasıyla; 2932.2 ve 2937.9 cm^{-1} dalga boylarında gözlenen, saf pullulan örneğinde ise; 2928.3 cm^{-1} dalga boyunda tespit edilen piklerin de C-H gerilmelerini ifade ettiği, literatür bilgileri ile de doğrulanmıştır (An ve ark., 2017). Gerçekleştirilen analizde; birinci ve ikinci EPS örnekleri için O-C-O, C-O-H ve C-O-C gerilmelerini ifade eden pikler sırasıyla, 1610.8-1610.8 cm^{-1} , 1417.9-1419.8 cm^{-1} , 1115.0-1140.1 olarak belirlenmiştir (Choudhury, Saluja ve Prasad, 2011). Söz konusu fonksiyonel gruplar için örneklerde elde edilen piklerin dalga boylarının, saf pullulan örneği için elde edilenler ile büyük oranda benzerlik gösterdiği de tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra, pullulan molekülünde karakteristik olarak kabul edilen α -1,4-D-glukosidik bağ ve α -D-glukopiranosid birimlerinin verdikleri piklerin, EPS örnekleri ile saf pullulan örneğinde çok yakın oldukları da tespit edilmiştir. 927.9 cm^{-1} dalga boyunda tespit edilen ve α -1,6 glukosidik bağını ifade eden pik ise sadece saf pullulan molekülünde izlenmiştir. Saf pullulan molekülünde α -1,4 glukosidik bağ, α -1,6 glukosidik bağından daha fazla oranda bulunmaktadır (Shingel, 2002). Ayrıca, pullulanın mikrobiyel yolla üretiminde, molekülünün glikozidik bağ yapısının, fermantasyon ortamı hazırlama sürecindeki proseslerden dolayı, saf pullulandan bir miktar farklılık göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, EPS örneklerinin ve saf pullulan örneğinin FT-IR analizi sonucunda elde edilen spektrumları; Şekil Ek 9'da verilmektedir.

5. SONUÇ

- Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, çeşitli tarımsal artık ve atıklar ile gıda endüstrisi artıklarının; daha önce tarafımızca ham zeytinden izole edilmiş yerel bir suş olan; *A. pullulans* AZ-6 ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Pullulan üretimini destekleyen en iyi doğal substrat seçildikten sonra tezin geri kalan kısmında, seçilen doğal substrattan hazırlanan fermantasyon ortamına ait bazı parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Endojen *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde, fermantasyon ortamı olarak kullanılan doğal substratlar; çeşitli turuncgil kabukları (portakal, limon, greyfurt ve turunç), iki farklı üzüm çeşidine ait üzüm posaları, kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, şeker kamışı pekmezi artığı, kuru ve taze fındık zürüfları ve balkabağı kabuğudur.
- Yukarıda sözü edilen doğal substrat kaynakları, herhangi bir sentetik bileşen eklenmeden doğrudan ayrı ayrı fermantasyon ortamları olarak kullanılmışlardır.
- Fermantasyon ortamı olarak kullanılacak olan her bir doğal substrat kaynağı, yapısal ve besinsel özellikleri de dikkate alınarak, uygun ön işlemlerden geçirilmişlerdir. Fermantasyonlar kesikli sistemde, çalkalamalı su banyolarında 100 vuru/dak'da sabit çalkalama hızında *A. pullulans* AZ-6 suşu için, daha önce belirlenmiş olan optimum sıcaklık olan; 24.2°C'de ve fermantasyon ortamı başlangıç pH'sı 6.48'de olacak şekilde, karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir. *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermantasyon ortamlarına inokülasyon oranı; mL'deki hücre sayısı yaklaşık; 7.2×10^7 kob/mL olacak şekilde, %5 (v/v) olarak yapılmıştır.
- Fermantasyon boyunca, belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde, biyokütle, ekzopolisakkarit (EPS), pullulan ve substrat derişimleri belirlenmiştir. Deneylerde ayrıca, mikroorganizmanın özgül üreme hızı (μ) ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı (v_m) değerleri de hesaplanmıştır.
- Elde edilen veriler değerlendirilerek, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, pullulan üretimini en iyi destekleyen doğal substratın belirlenmesi sağlanmıştır. Fermantasyon ortamı olarak kullanılan doğal substratlar arasında; en yüksek EPS (35.65 g/L) ve pullulan (33.59 g/L) derişimlerine; şeker kamışı pekmezi artığı (ŞKPA) ortamında ulaşılmıştır. Kuru fındık zürufunun (KFZ), fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde de oldukça yakın EPS (30.36 g/L) ve

pullulan (30.02 g/L) derişimleri elde edilmiştir. Hammaddenin bulunabilirliği ve daha ekonomik olması nedeni ile deneylere, KFZ ile devam edilmesine karar verilmiştir.

- Bu çalışmada, kuru fındık zürufunun, fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneylerde, bazı ortam parametrelerinin Yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile optimize edilmesi amacıyla; Design Expert® 11 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programında, dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılmıştır. Program tarafından oluşturulan deney tasarım planına göre, merkez noktada 6 tekrarlı olarak 20 deney gerçekleştirilmiştir. 3 farklı bağımsız değişken için beş farklı düzeyde çalışılmıştır .
- Deney tasarımı için seçilen bağımsız değişkenler; amonyum sülfat derişimi (x1), derişik H₂SO₄ çözeltisi hacmi (x2) ve öğütölmüş kuru fındık zürufu (ÖFZ) miktarı (x3) olarak belirlenmiştir. Bağımlı değişkenler (yanıtlar) ise; maksimum pullulan derişimi (y1), maksimum EPS derişimi (y2) ve mikroorganizmanın özgül üreme hızıdır (y3).
- Program tarafından verilen deney tasarım planındaki 20 deneyin gerçekleştirilmesi sonucunda, bağımsız değişkenlerin hem kendilerinin hem de ikili etkilerinin, bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri, Design Expert® 11 programı yardımıyla türetilen model eşitlikler kullanılarak, çoklu regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Sonrasında gerçekleştirilen her bir modelleme çalışması için varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Yapılan varyans analizleri sonucunda; oluşturulan modellerin, deneysel olarak elde edilen yanıtlara uygunlukları belirlenmiştir. Ayrıca program çıktısından elde edilen yanıt yüzey ve kontür grafikleri yardımıyla bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri yorumlanmıştır.
- Sonrasında kullanılan doğal substratlar içerisinde pullulan üretimini destekleyen en iyi ortamlardan biri olarak belirlenen; kuru fındık zürufu hidrolizatının kullanıldığı fermantasyon ortamında optimum koşulların belirlenebilmesi amacıyla, Design Expert® 11 (Inc. Minneapolis, USA) programının deneme sürümü kullanılarak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır
- Design Expert® 11 programının, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak, merkez noktada 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilen 20 deneyden elde edilen yanıt değişkenleri değerlendirilmiştir. Kullanılan program çıktısından elde edilen 91

adet çözüm arasından, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu değeri en yüksek olan çözüm seçilerek, çözümün önerdiği koşullarda optimizasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda, seçilen çözümde verilen optimum koşullar; 7.2 g/L amonyum sülfat, 20 g öğütülmüş fındık zürufu ve 2.5 mL derişik sülfirik asittir.

- Bu koşullarda gerçekleştirilen deneyde elde edilen en yüksek pullulan ve EPS derişimleri ise sırasıyla; 74.39 ve 75.95 g/L olup, optimum koşullarda mikroorganizmanın özgül üreme hızı; 0.097 sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Optimum deney koşullarında istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun değeri ise; 0.915 olarak bulunmuştur.
- Tezin son aşamasında ise; FT-IR spektrometresi kullanılarak, yüksek pullulan içeriğine sahip bazı EPS örneklerinin molekül yapıları, ticari olarak üretilen saf bir pullulan örneğinin spektrumları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; ticari saf pullulan spektrumu ile fermantasyon yoluyla üretilen EPS örneklerinin spektrumlarının büyük ölçüde benzer olduğu görülmüştür.
- Bu tezde elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, kullanılan doğal substratların çoğunun (Çalkarası çeşidi üzüm posası ve balkabağı kabuğu hariç) yerel bir suş olan *A. pullulans* AZ-6 ile pullulan üretimini oldukça desteklediği bulunmuştur. Laboratuvarımızda ham zeytinden izole edilmiş ve moleküler olarak da tanımlanmış olan bu suşun pullulan üretimi amacıyla kullanılabilecek doğal substratların çoğunda iyi sonuçlar vermesi, suşun ilerde ticari pullulan üretimi amacıyla da değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.
- Ülkemiz fındık üretimi açısından dünyada önde gelen ülkelerden olması nedeniyle fındık zürufuna ulaşılması da kolaydır. Günümüzde çoğunlukla yakacak ve gübre amaçlı kullanılan zürufun biyoteknolojik bir proses olan pullulan üretiminde değerlendirilmesinin ülke ekonomisine katma değeri yüksek bir ürün sağlayacağı açıktır.
- Daha önce pullulan üretimi üzerine yapılan çalışmalarda, fındık zürufunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı herhangi bir çalışmaya raslanmamıştır. Bu nedenle gerçekleştirilen bu tez çalışmasının bir ilk olma niteliği de bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., Nowrouzi, A., Bioprocessing of Citrus Waste Peel for Induced Pectinase Production by *Aspergillus niger*; Its Purification and Characterization, Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 9 (2) (2016) 148-154.
- Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. and Ghezzehei, T. A., A New Method for Rapid Determination of Carbohydrate and Total Carbon Concentrations Using UV Spectrophotometry, Carbohydrate Polymers, 97 (2013) 253-261.
- An, C., Ma, S., Chang, F., Xue, W., Efficient Production of Pullulan by *Aureobasidium pullulans* Grown on Mixtures of Potato Starch Hydrolysate and Sucrose, Brazilian Journal of Microbiology, 48 (1) (2017) 180-185.
- Anonim, Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, <http://www.turkomp.gov.tr/food-kabak-islik-kestane-201> (Erişim tarihi, 19 Kasım 2018)
- Arvanitoyannis, J. S., Ladas, D., Mavromatis, A., Potential Uses and Applications of Treated Wine Wastes: A Review, International Journal of Food Science and Technology, 41 (5) (2006) 475-487.
- Baş, D., Boyacı, İ. H., Modeling and Optimization I: Usability of Response Surface Methodology, Journal of Food Engineering, 78 (3) (2007) 836-845.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Design of Experiments: A Powerful Tool in Food Microbiology, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2 (2010) 1419-1429.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A., Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry, Talanta, 76 (5) (2008) 965-977.
- Campbell, B. S., Siddique, A. M., McDougall, B. M., Seviour, R. J., Which Morphological Forms of the Fungus *Aureobasidium pullulans* are Responsible for Pullulan Production?, FEMS Microbiology Letters, 232 (2) (2004) 225-228.
- Ceylan, S., Ünal, S., The Saccharification of Hazelnut Husk to Produce Bioethanol, Energy Sources Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects, 37 (2015) 972-979 .
- Chen, Y., Guo, J., Li, F., Liu, M., Zhang X., Guo, X., Xiao, D., Production of Pullulan from Xylose and Hemicellulose Hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* AY82 with pH Control and DL-dithiothreitol Addition, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 19 (2) (2014) 282-288.

- Chen, G., Wang, J., Su, Y., Zhu, Y., Zhang, G., Zhao, H., Liu, H., Yang, Y., Nian, R., Zhang, H., Wei, Y., Xian, M., Pullulan Production from Synthetic Medium by a New Mutant of *Aureobasidium pullulans*, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47 (10) **(2017)** 963-969
- Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M., Pullulan: Biosynthesis, Production and Applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 92(1) **(2011)** 29-44
- Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M., Puri, V. M., Effects of Ammonium Ion Concentration on Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* and Its Modeling, Journal of Food Engineering, 103 (2) **(2011)** 115-122.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., Zhang, T., Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a Biotechnologically Important Yeast, Applied Microbiology and Biotechnology, 82(5) **(2009)** 793-804.
- Choudhury, A. R., Saluja, P., Prasad G. S., Pullulan Production by Osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 Isolated from Flowers of *Caesulia axillaris*, Carbohydrate Polymers, 83 (4) **(2011)** 1547-1552.
- Çöpür, Y., Güler, C., Akgül, M., Taşçıoğlu, C., Some Chemical Properties of Hazelnut Husk and Its Suitability for Particleboard Production, Building and Environment, 42 (7) **(2007)** 2568-2572.
- Dönmez, S., Endüstriyel Mikrobiyoloji, Kavramlar, Kurallar ve Uygulamalar, Sidas, İzmir, Bölüm 4, **2017**
- Du, B., Song, Y., Hu, X., Liao, X., Ni, Y., Li, Q., Oligosaccharides Prepared by Acid Hydrolysis of Polysaccharides from Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Pulp and Their Prebiotic activities, International Journal of Food Science and Technology, 46 **(2011)** 982-987.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Analytical Chemistry, 28 (3) **(1956)** 350-356.
- Eryaşar, K. Kestane Kabuğu içeren Fermantasyon Ortamında *Candida tropicalis* ile Ksilitol Üretiminin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu, **2016**.
- Farris, S., Unalan, I. U., Introzzi, L., Fuentes-Alventosa, J. M., Cozzolino, C. A., Pullulan-based Films and Coatings for Food Packaging: Present Applications, Emerging Opportunities and Future Challenges, Journal of Applied Polymer Science, 131 (13) **(2014)** 1-12

- Garriga, M., Almaraz, M. and Marchiaro, A., Determination of Reducing Sugars in *Undaria Pinnatifida* (Harvey) Algae by UV-Visible Spectrophotometry (DNS Method), *Actas de Ingeniería*, 3 (2017) 173-179.
- Göksungur, Y., Dağbaşı, S., Uçan, A., Güvenç, U., Optimization of Pullulan Production from Synthetic Medium by *Aureobasidium pullulans* in a Stirred Tank Reactor by Response Surface Methodology, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80 (7) (2005) 819-827
- Göksungur, Y., Uçan, A., Güvenç, U., Production of Pullulan from Beet Molasses and Synthetic Medium by *Aureobasidium pullulans*, *Turkish Journal of Biology*, 28 (2004) 23-30
- Göksungur, Y., Uzunoğulları, P., Dağbaşı, S., Optimization of Pullulan Production from Hydrolysed Potato Starch Waste by Response Surface Methodology, 83 (3) (2011) 1330-1337.
- Grohmann, K., Cameron, R. G., Buslig, B. S., Fractionation and Pretreatment of Orange Peel by Dilute Acid Hydrolysis, *Biosource Technology*, 54 (2) (1995) 129-141.
- Grumezescu, A. M., Holban, A. M., Biopolymers for Food Design, *Handbook of Food Bioengineering*, Vol. 20, Elsevier, Londra, Chapter 4, 2018.
- Güney, M. Ş., Utilization of Hazelnut Husk as Biomass, *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 4 (2013) 72-77.
- Hamed, A. A. R., Mustafa, S. E., Extraction and Assessment of Pectin from Pumpkin Peels, *Biofarmasi: Journal of Natural Products Biochemistry*, 16(1) (2018) 1-7.
- Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., Tabata, Y., Liver Targeting of Plasmid DNA by Pullulan Conjugation Based on Metal Coordination, *Journal of Controlled Release*, 83(2) (2002) 287-302.
- Hu, R., Lin, L., Liu, T., Ouyang, P., He, B., Liu, S., Reducing Sugar Content in Hemicellulose Hydrolysate by DNS Method: A Revisit, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2 (2) (2008) 156-161.
- Israilides, C. J., Scanlon, B., Smith, A., Harding, S. E., Jumel, K., Characterization of Pullulans Produced from Agro-industrial Wastes, *Carbohydrate Polymer*, 25 (3) (1994) 203-209.
- Israilides, C. J., Smith, A., Harthill, J. E., Barnett, C., Bambalov, G., Scanlon, B., Pullulan Content of the Ethanol Precipitate from Fermented Agro-industrial Wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49 (1998) 5.
- Israilides, C. J., Smith, A., Scanlon, B., Barnett, C., Pullulan from Agro-industrial Wastes, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16 (1) (1999) 309-324.

- Jiang, L., Optimization of Fermentation Conditions for Pullulan Production by *Aureobasidium pullulan* Using Response Surface Methodology, Carbohydrate Polymers, 79 (2) **(2010)** 141-417.
- Kavuncu, N., Soya Yağından Konjuge Linoleik Asit Konsantresinin Eldesi: Tepki Yüzey Metodolojisi ile Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2010**.
- Kendir, G., Öztürk, A., Köroğlu, A., *Castanea Sativa* Mill. (Kestane), Meyve ve Yaprak Anatomisi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 40 (2) **(2016)** 1-18.
- Kent, L., Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Eldesi: Tepki Yüzey Metodolojisi ile Optimizasyonu, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2009**.
- Khuri, A. I., Mukhopadhyay, S., Response Surface Methodology, WIREs Computational Statistics, 2 (2) **(2010)** 128-149.
- Leathers, T. D., Biotechnological Production and Applications of Pullulan, Applied Microbiology and Biotechnology, 62(5-6) **(2003)** 468-473.
- Leathers, T. D., Price, N. P. J., Manitchotpisit, P., Bischoff, K. M., Production of Anti Streptococcal Liamocins from Agricultural Biomass by *Aureobasidium pullulans*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32 (12) **(2016)** 198-207
- Li, Y., Chi, Z., Wang, G., Wang, Z., Liu, G., Lee, C., Ma, Z., Chi, Z. Taxonomy of *Aureobasidium* spp. and Biosynthesis and Regulation of Their Extracellular Polymers, Critical Reviews in Microbiology, 41 (2) **(2013)** 228-237.
- Liu, S., Bioprocess Engineering Kinetics, Biosystems, Sustainability and Reactor Design, Elsevier, İspanya, Chapter 3, **2013**.
- López, J. A. S., Li, Q., Thompson, I. P., Biorafinery of Waste Orange Peel, Critical Reviews in Biotechnology, 30 (1) **(2010)** 63-69.
- Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P., Environmental Microbiology, 2nd Edition, Elsevier, Part I, Chapter 3, **2011**
- Manitchotpisit, P., Watanapoksin, R., Price, N. P., Bischoff, K. M., Tayeh, M., Teeraworawit, S., Kriwong, S., Leathers, T. D., *Aureobasidium pullulans* as a Source of Liamocins (Heavy Oils) with Anticancer Activity, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30 (8) **(2014)** 2199-2204.
- Metha, A., Prasad, G. S., Choudhury, A. R., Cost Effective Production of Pullulan from Agri-industrial Residues Using Response Surface Methodology, International Journal of Biological Macromolecules, 64 **(2014)** 252-256.
- Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars, Analytical Chemistry, 31(3) **(1959)** 426-428.

- Mishra, B., Vuppu, S., Characterization of Exopolysaccharide a Pullulan Produced by a Novel Strain of *Aureobasidium pullulans* –SB-1 Isolated from the Phyllophane of Brassica Olecea Cultivated in Odisha State, India, Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 14 (3) **(2012)** 369-374
- Mocanu, G., Mihai, D., Picton, L., LeCerf, D., Muller, G., Associative Pullulan Gels and Their Interaction with Biological Active Substances, Journal of Controlled Release, 83 (1) **(2002)** 41-51.
- Mohan, C., Buffers: A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Clabiochem, Almany, **2003**.
- Murphy, T. E., Tsui, K. L., Allen, J. K., A Review of Robust Design Methods for Multiple Responses, Research in Engineering Design, 16(3) **(2005)** 118-132.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., and Anderson-Cook, C. M., Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments Third Edition, A John Wiley & Sons, New Jersey, pp 104-115, **2016**.
- Nasseri, A. T., Rasoul-Amin, S., Morowvat, M. H., Ghasemi, Y., Single Cell Protein: Production and Process, American Journal of Food Technology, 6 (2) **(2011)**.
- Nualsri, C., Reungsang A., Plangklang, P., Biochemical Hydrogen and Methane Potential of Sugarcane Syrup Using a Two-Stage Anaerobic Fermentation Process, Industrial Crops and Products, 82 **(2015)** 88-99
- Padmanaban, S., Balaji, N., Muthukumaran, C., Tamilarasan, K., Statistical Optimization of Process Parameters for Exopolysaccharide Production by *Aureobasidium pullulans* Using Sweet Potato Based Medium, 5 (6) **(2015)** 1067-1073.
- Pattra, S., Lay, C. Lin, C., O-Thong, S., Reungsang, A., Performance and Population Analysis of Hydrogen Production from Sugarcane Juice by Non-sterile Continuous Stirred Tank Reactor Augmented with *Clostridium butyricum*, International Journal of Hydrogen Energy 36 (14) **(2011)** 8697-8703.
- Pinar, O., Karaosmanoğlu, K., Sayar, N. A., Kula, C., Kazan, D., Sayar, A. A., Assessment of Hazelnut Husk as a Lignocellulosic Feedstock for the Production of Fermentable Sugars and Lignocellulolytic Enzymes, 3 Biotech, 7 (6) **(2017)** 367-376 .
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., and Khanda, S. M., Pullulan: An Exopolysaccharide and its Various Applications, Carbohydrate Polymers, 95(1) **(2013)** 540-549.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., Punnapayak, H., The Current Status of *Aureobasidium pullulans* in Biotechnology, Folia Microbiologica, 63(2) **(2017)** 129-140.

- Price, N. P., Manitchotpit, P., Vermillon, K. L., Bowman, M. J., Leathers, T. D., Structural Characterisation of Novel Extracellular Liamocins (Mannitol Oils) Produced by *Aureobasidium pullulans* Strain NRRL 50380, Carbohydrate Research, 370 (2013) 24-32.
- Ramesh, S., Muthuvelayudham, R., Kannan, R. R., Thangavelu, V., Statistical Optimization of Process Variables for Corncob Hemicellulose Hydrolysate to Xylitol by *Debaryomyces hansenii* var *hanseii*, International Journal of ChemTech Research, 5 (1) (2013) 186-196.
- Roukas, T., Pullulan Production from Brewery Wastes by *Aureobasidium pullulans*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15 (4) (1999) 447-450.
- Seo, H., Son. C., Chung, C., Jung, D., Kim, S., Gross, R. A., Kaplan, D. L., Lee, J., Production of High Molecular Weight Pullulan by *Aureobasidium Pullulans* HP-2001 with Soybean Pomace as a Nitrogen Source, Biosource Technology, 95 (3) (2004) 293-299.
- Shanmugavelan, P., Kim, S. Y., Kim, J. B., Kim, H. W., Cho, S. M., Kim S. N., Kim, S. Y., Cho, Y. S., Kim, H. R., Evaluation of Sugar Content and Composition in Commonly Consumed Korean Vegetables, Fruits, Cereals, Seed Plants and Leaves by HPLC-ELSD, Carbohydrate Research, 380 (2013) 112-117.
- Sharma, N., Prasad, G. S., Choudhury, A. R., Utilization of Corn Steep Liquor for Biosynthesis of Pullulan, an Important Exopolysaccharide, Carbohydrate Polymers, 93(1) (2013) 95-101
- Sheng, L. Tong, Q., Ma, M., Why Sucrose is the Most Suitable Substrate for Pullulan Fermentation by *Aureobasidium pullulans* CGMCC1234?, Enzyme and Microbial Technology, 92 (2016) 49-55.
- Sheng, L., Zhu, G., Tong, Q., Effect of Uracil on Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* CGMCC1234, Carbohydrate Polymers, 101 (2014) 435-437.
- Shingel, K. I., Determination of Structural Peculiarities of Dextran, Pullulan and γ -Irradiated pullulan by Fourier-transform IR Spectroscopy, Carbohydrate Research, 337(16) (2002) 1445-1451.
- Shingel, K. I., Current Knowledge on Biosynthesis, Biological Activity and Chemical Modification of the Polysaccharide, Pullulan, Carbohydrate Research, 339 (3) (2004) 447-460.
- Shuler, M. L. Kargi, F., Bioprocess Engineering: Basic Concepts, Second Edition, Prentice Hall, USA, 2002.
- Singh , R. S., Gaur, R., Bansal, S., Biswas, P., Pandey, P. K., Jamal, F., Tiwari, S., Gaur, M. K., *Aureobasidium pullulans*-An Industrially Important Pullulan Producing Black Yeast, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4 (10) (2015b) 605-622.

- Singh, R. S., Gaur, R., Pandey, P. K., Jamal, F., Pandey, L. K., Singh, S., Kewat, H. K., Tiwari, S., Biswas, P., Gaur, M. K., A Novel Media Optimised for production of Pullulan in Flask Type Fermentation System, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7 (4) **(2018)** 53-61
- Singh, R., Gaur, R., Tiwari, S., Gaur, M. K., Production of Pullulan by a Thermotolerant *Aureobasidium pullulans* Strain in Non-stirred Fed Batch Fermentation Process, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (3) **(2012)** 1042-1050.
- Singh, R. S., Kaur, N. and Kennedy, J. F., Pullulan and Pullulan Derivatives as Promising Biomolecules for Drug and Gene Targeting, *Carbohydrate Polymers*, 123 **(2015a)** 190-207.
- Singh, R. S., Kaur, N., Rana, V., Kennedy, J. F., Pullulan: A Novel Molecule for Biomedical Applications, *Carbohydrate Polymers*, 171 **(2017)** 102-121.
- Singh, R. S., Saini, G. K. and Kennedy, J. F., Pullulan: Microbial Sources, Production and Applications, *Carbohydrate Polymers*, 73 (4) **(2008)** 515-531.
- Singh, R. S., Saini, G. K. and Kennedy, J. F., Maltotriose Syrup Preparation from Pullulan Using Pullulanase, *Carbohydrate Polymers*, 80 (2) **(2010)** 401-407.
- Singh, R. S. Singh, H., Saini, G. K., Response Surface Optimization of the Critical Medium Components for Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* FB-1, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152 (1) **(2009)** 42-53.
- Sugumaran, K. R., Gowthami, E., Swathi, B., Elakkiya, S., Sirivastava, S. N. Ravikumar, R., Gowdhaman, D., Ponnusami, V., Production of Pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian Palm Kernel: A Novel Substrate, 92 **(2013)** 697-703.
- Sugumaran, K. R., Jothi, P., Ponnusami, V., Bioconversion of Industrial Solid Waste- Cassava Bagesse for Pullulan Production in Solid State Fermentation, *Carbohydrate Polymers*, 99 **(2014)** 22-30.
- Sugumaran, K. R., Ponnusami, V., Conventional Optimization of Aqueous Extraction of Pullulan in Solid-State Fermentation of Cassave Bagasse and Asian Palm Kernel, *Biocatalyst and Agricultural Biotechnology*, 10 **(2017b)** 204-208.
- Sugumaran, K. R., Ponnusami, V., Review on Production, Downstream Processing and Characterization of Microbial Pullulan, *Carbohydrate Polymers*, 173 **(2017a)** 573-591.
- Talebnia, F., Pourbafrani, M., Lundin, M., Taherzadeh, M. J., Optimization Study of Citrus Wastes Saccharification by Dilute-Acid Hydrolysis, *BioResources*, 3 **(2008)** 1.
- Thirumavalavan, K., Manikkadan, T. R., Dhanasekar, R., Pullulan Production from Coconut By-products by *Aureobasidium pullulans*, *African Journal of Biotechnology*, 254 **(2009)** 8-2.

- Tu, G., Wang, Y., Ji, Y., Zou, X., The Effect of Tween 80 on the Polymalic Acid and Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31 (1) **(2014)** 219-226.
- Uzuner, S., Çekmecelioğlu, D., Hydrolysis of Hazelnut Shells as a Carbon Source for Bioprocessing Applications and Fermentation, International Journal of Food Engineering, 10 (4) **(2014)** 799-808.
- Uzunoğulları, P., Patates Atığında *Aureobasidium pullulans* ile Pullulan Üretimi ve Cevap Yüzey Yöntemi ile Proses Koşullarının Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2010**
- Ürküt, Z., Dağbaşı, S., Göksungur, Y., Optimization of Pullulan Production Using Ca-Alginate-immobilized *Aureobasidium pullulans* by Response Surface Methodology, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82 (9) **(2007)** 837-846.
- Wang, D., Ju, X., Zhou, D., Wei, G., Efficient Production of Pullulan Using Rice Hull Hydrolysate by Adaptive Laboratory Evolution of *Aureobasidium pullulans*, Biosource Technology, 164 **(2014)** 12-19.
- Wei, P., Cheng, C., Lin, M., Zhou, Y., Yang, S., Production of Poly(malic acid) from Sugarcane Juice in Fermentation by *Aureobasidium pullulans*: Kinetics and Process Economics, 224 **(2017)** 581-589.
- Wu, S., Jin, Z., Tong, Q., Chen, H., Sweet potato: A Novel Substrate for Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans*, Carbohydrate Polymers, 76 **(2009)** 645-49
- Xia, J., Li, R., He, A., Xu, J., Liu, X., Li, X., Xu, J., Production of Poly (β -L-malic acid) by *Aureobasidium pullulans* HA-4D Under Solid State Fermentation, 224 (1) **(2017)** 289-295.
- Yang, J., Zhang, Y., Zhao, S., Zhou, Q., Xin, X., Chen, L., Statistical Optimization of Medium for Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* NCPS2016 Using Fructose and Soybean Meal Hydrolysates, Molecules, 23 (6) **(2018)** 1334-1350.
- Yatmaz, E., Turhan, İ., Fermentasyon Yoluyla Pullulan Üretimi ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı, Gıda, 37 (2) **(2012)** 95-102
- Yıldız, H., Karataş, N., Microbial Exopolysaccharides: Resources and Bioactive Properties, Process Biochemistry, 72 **(2018)** 41-46.
- Youssef, F., Biliaderis, C. G., Roukas, T., Enhancement of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture using olive oil and sucrose as carbon source, Applied Biochemistry and Biotechnology, 71 (4) **(1998)** 13-30.

Zheng, W., Campbell, B. S., McDougall, B. M., Seviour, R. J., Effects of Melanin on Accumulation of Exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* Grown on Nitrate, Biosource Technology, 99(16) **(2008)** 7480-7486.



EKLER

EK 1- FERMANTASYON ORTAMI OLARAK KULLANILAN KESTANE VE FINDIK KABUĞU HİDROLİZATLARININ HAZIRLANMASI

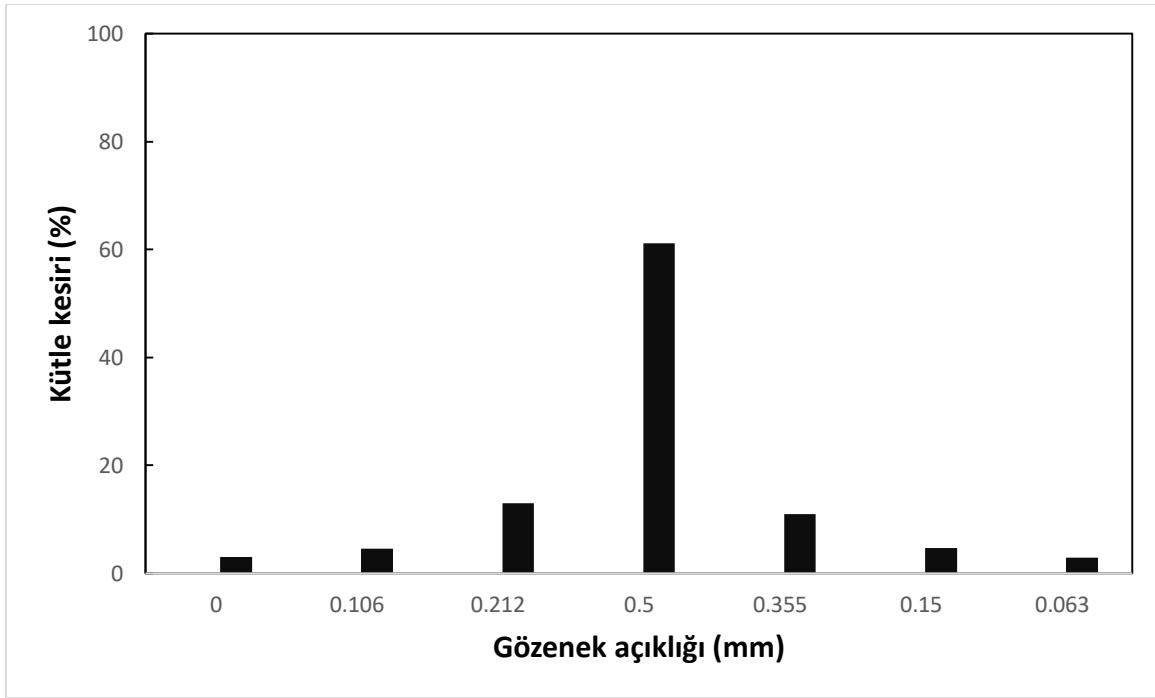
A. pullulans AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde fermantasyon ortamı olarak kullanılan; kestane ve fındık kabuğu hidrolizatları, Abant İzzet Baysal Üniversitesi (AİBÜ), Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde hazırlanmıştır. Kestane ve fındık ve kabuğu hidrolizatlarının hazırlanmasında ilk olarak öğütülmüş kabuk örneklerine asit hidrolizi uygulanmış sonrasında, hidrolizatlara içeriğindeki inhibitör maddelerin arındırılması amacıyla farklı uygulamalar yapıldığı belirtilmiştir (Eryaşar, 2016) .

Bu amaçla, 60°C'de 12-15 saat süre ile kurutulan kabukların, sonrasında laboratuvar tipi bir öğütücü (IKA-Werke M20) kullanılarak öğütüldüğü bildirilmiştir. Öğütülmüş kabuk örnekleri %1.25 (v/v) derişimindeki sülfürik asit çözeltisi ile %10 (w/v) oranında karıştırıldığı belirtilmiştir. Sonrasında elde edilen karışımın otoklavda 125°C'de 30 dakika bekletildiği rapor edilmiştir. Otoklavlama işleminden sonra karışımındaki kabuklar bir tülbent yardımıyla ayrılıp, sıvı kısımların kaba filtre kâğıdı kullanılarak süzüldüğü ifade edilmiştir. Süzüntülere 9000 rpm'de 15 dakika santrifüjleme işlemi uygulanarak ham hidrolizatların elde edildiği bildirilmiştir.

Ham hidrolizatların fermantasyon ortamı olarak kullanılabilmesi için hidrolizatlara bir seri detoksifikasyon işlemi uygulandığı belirtilmektedir. Ham hidrolizlardaki uçucu inhibitör maddelerin uzaklaştırılabilmesi amacıyla hidrolizatlar, 100°C'deki bir su banyosunda 15 dakika bekletilmiş, sonrasında kalsiyum hidroksit eklenerek pH değerleri 10'a ayarlanmış ve bu aşamada meydana gelen çökeltilerin, kaba filtrasyon yöntemi ile ayrıldığı bildirilmiştir. Daha sonra pH, 13 M'lık H₂SO₄ ile 7'ye düşürüldükten sonra oluşan çökeltilerin 9000 rpm'de 15 dakika santrifüjleme işlemi yapılarak ayrıldığı ifade edilmiştir. Üstte kalan süzüntülerin, 5 g/100 mL oranında toz haldeki aktif kömür ile muamele edilmiş olduğu belirtilmiştir. Aktif kömür ile muamele edilen hidrolizatların sonrasında 200 vuru/dk'lık çalkalama hızındaki 30°C'deki su banyosunda 1 saat boyunca bekletildikleri de rapor edilmiştir. Su banyosundan alınan karışımlar kaba filtre kâğıdından süzüldükten sonra elde edilen berrak hidrolizatlardaki şeker konsantrasyonun artırılabilmesi amacıyla, hidrolizatlar döner vakumlu buharlaştırıcıda, 75°C'de son

hacimleri ilk hacimlerinin üçte biri olacak kadar buharlaştırma işlemi yapıldığı belirtilmiştir. Bu şekilde elde edilen kestane ve fındık kabuğu hidrolizatlarının, filtre sterilizasyonundan sonra, 4°C’de muhafaza edilmesi gerektiği de ifade edilmiştir.

EK 2- ÖĞÜTÜLMÜŞ KURU FINDIK ZÜRUFU ÖRNEĞİNİN TANE BOYUTU DAĞILIM GRAFİĞİ

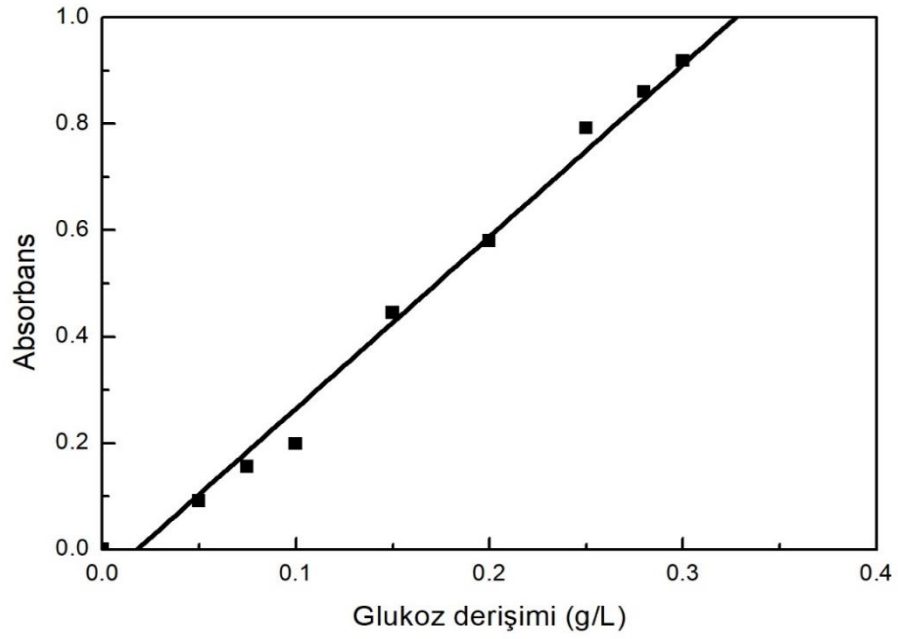


Şekil Ek 2- Öğütülmüş kuru fındık zürufu örneğinin tane boyu dağılım grafiği

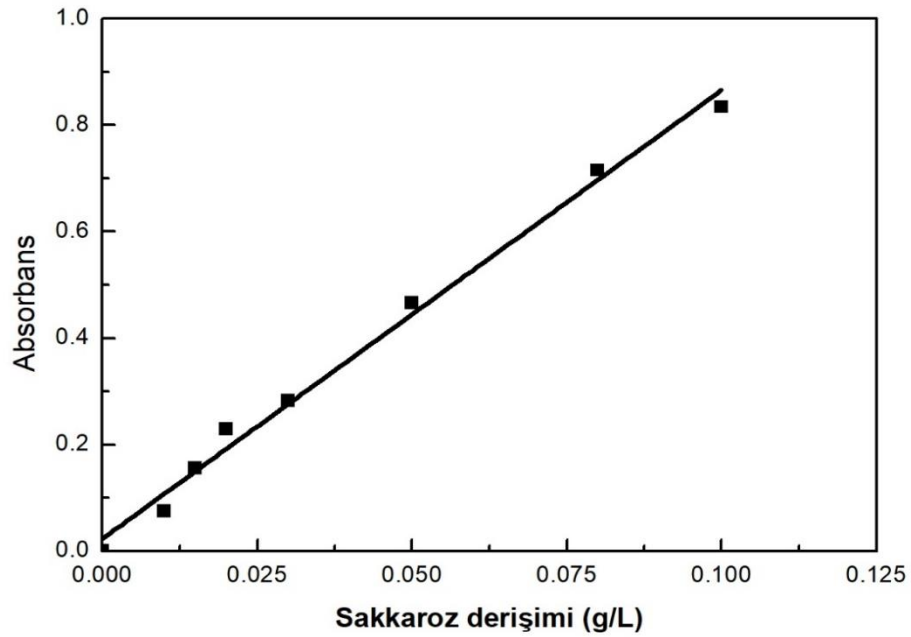
EK 3- FOSFAT SİTRİK ASİT TAMPONU (pH 5.0) HAZIRLAMA

Pullulan analizinde kullanılan sitrik asit-fosfat tamponu pH değeri 5’dir. Bu amaçla öncelikle 0.1 M’lık bir sitrik asit (Carlo Erba, Fransa) çözeltisi ve 0.2 M’lık sodyum fosfat dibazik (Sigma Aldrich, USA) çözeltisi hazırlanır. Sonrasında bu çözeltiler manuelde (Mohan, 2003) verilen oranlarda karıştırıldıktan sonra, pH değeri pH metrede (Hanna HI 221, İtalya) ölçülerek tampon çözeltisinin pH’sı tam olarak 5 olana dek 1 N’lik HCl (Sigma Aldrich, USA) veya 1 N’lik NaOH (Sigma Aldrich, USA) ile ayarlama yapılır.

EK 4- GLUKOZ VE SAKKAROZ STANDART ÇALIŞMA DOĞRULARI VE DENKLEMLERİ



Şekil Ek 4.1. Glukoz çalışma doğrusu ($y=3.232x-0.0583$, $R^2= 0.98999$)



Şekil Ek 4.2. Sakkaroz çalışma doğrusu ($y = 8.4235x + 0.0234$; $R^2= 0.9924$)

EK 5- FENOL SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİNİN UYGULANIŞI

Şeker analizleri esnasında toplam şeker derişimi tayini Fenol sülfürik asit yöntemi (Dubois ve ark., 1956) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar sakkaroz eşdeğeri üzerinden verilmiştir.

Bu yöntemde polisakkarit ve disakkaritlerin derişik sülfürik asit varlığında fural ürünleri meydana getirdiği bildirilmiştir. Oluşan bu maddelerin fenol ile reaksiyona girerek spektrofotometrede 490 nm’de okunabilen sarı renkli ürün oluşumunu gerçekleştirdiği ifade edilmektedir (Albalasmeh, Berhe ve Ghezzehei, 2013).

Yöntemin uygulanışında; önceden hazırlanan standart doğrunun derişim aralıkları dikkate alınarak, örneklerin uygun seyreltileri hazırlanır. Sonrasında 2 mL seyreltilmiş örnek üzerine, %5’lik (w/v) 1 mL fenol çözeltisi koyulup vorteks ile karıştırıldıktan sonra karışıma 5 mL derişik sülfürik asit (Sigma Aldrich, USA) ilave edilmektedir. Saf su fenol sülfürük asit methodunda kör olarak kullanıldığından aynı işlemler örneklerle aynı anda saf su için de tekrarlanır. Sülfürük asit eklenmesi esnasında reaksiyon ekzotermik olduğundan, işlem oda sıcaklığındaki su banyosunda gerçekleştirilir. Reaksiyonun tamamlanması için arada vorteksle karıştırma işlemi uygulanarak 20 dakika beklenir. Süre sonunda örneklerin absorbans okumaları spektrofotometrede (Boeco S30, Almanya), 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilir.

EK 6- DNS YÖNTEMİNİN UYGULANIŞI

Şeker analizlerinde indirgen şeker tayini Dinitrosalisilik Asit (DNS) yöntemi (Miller, 1959) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar glukoz eşdeğeri üzerinden hesaplanmıştır.

İndirgen şekerlerdeki serbest halde bulunan karbonil gruplarının, alkali koşullar altında 3,5-dinitrosalisilik asiti (DNS çözeltisi) indirgediği, bunun sonucunda indirgen şekerin yükseltgendiği ifade edilmektedir. İndirgen şeker içeriğindeki yükseltgenen karbonil gruplarının miktarına göre DNS çözeltisinin renk tonunun değişim gösterdiği bildirilmiştir (Hu ve ark., 2008).

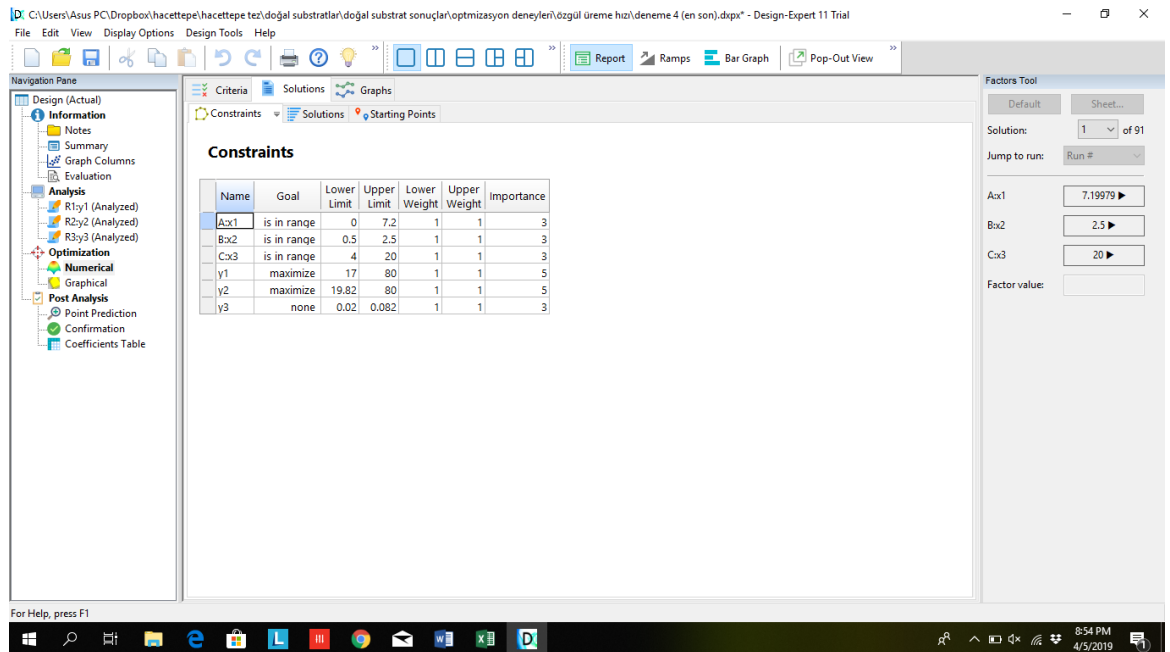
Bu yöntemin uygulanışında ilk olarak indirgen şeker miktarı belirlenmek istenen örnekten uygun seyreltmeler hazırlanmıştır. 1 mL indirgen şeker miktarı belirlenmek istenen çözelti üzerine, 1 ml DNS çözeltisi konulduktan sonra karışım 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda karışım buzlu su banyosunda hızlı şekilde

soğutulurak reaksiyon tamamlanması sağlanmış ve indirgen şeker derişimi spektrofotometrede (Boeco S30, Almanya) 540 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

EK 7- DİNİTROSALİSİLİK ASİT (DNS) ÇÖZELTİSİNİN HAZIRLANMASI

DNS çözeltisi ışığa karşı duyarlı bir kimyasal olduğundan ötürü DNS çözeltisi hazırlanacak kabın ışık almayacak şekilde aliminyum folyo ile kaplanmıştır. Kullanılan DNS (Sigma Aldrich, USA) 1 g tartıldıktan sonra 20 mL 2M'lık NaOH'da (Sigma Aldrich, USA) çözündürülmüştür. Ayrı bir kaptaki ise 30 g potasyum sodyum tartarat tetrahidrat (Merck, Almanya) iyice çözünene kadar 50 mL su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Sonrasında hazırlanan iki çözelti bir araya getirilerek tamamen berrak ve homojen bir hal alana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Son hacim balon joje ile 100 mL'ye tamamlanmış ve kullanılıncaya kadar amber renkli şişede buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir (Garriga, Almaraz ve Marchiaro, 2017).

EK 8. İSTENEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU KULLANILARAK YAPILAN OPTİMİZASYONDA, BAĞIMLI DEĞİŞKENLER İÇİN BELİRLENEN HEDEFLER VE SONUCUNDA ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER



Design-Expert 11 Trial

File Edit View Display Options Design Tools Help

Navigation Pane

Design (Actual)

Information

Notes

Summary

Graph Columns

Evaluation

Analysis

R1y1 (Analyzed)

R2y2 (Analyzed)

R3y3 (Analyzed)

Optimization

Numerical

Graphical

Post Analysis

Point Prediction

Confirmation

Coefficients Table

Solutions

91 Solutions found

Number	x1	x2	x3	y1	y2	y3	Desirability
1	7.200	2.500	20.000	74.812	74.757	0.108	0.915
2	7.041	2.500	20.000	74.718	74.796	0.107	0.915
3	7.016	2.500	20.000	74.703	74.802	0.106	0.915
4	7.200	2.499	19.978	74.774	74.732	0.108	0.915
5	6.925	2.500	20.000	74.652	74.823	0.105	0.915
6	7.139	2.498	20.000	74.730	74.733	0.107	0.914
7	6.728	2.500	20.000	74.547	74.863	0.104	0.914
8	6.683	2.500	20.000	74.524	74.872	0.103	0.914
9	7.200	2.496	20.000	74.716	74.674	0.108	0.914
10	6.613	2.500	20.000	74.490	74.885	0.103	0.914
11	6.536	2.500	20.000	74.453	74.898	0.102	0.914
12	6.423	2.500	20.000	74.401	74.917	0.101	0.913
13	6.408	2.500	20.000	74.395	74.919	0.101	0.913
14	5.929	2.500	20.000	74.209	74.977	0.098	0.912
15	0.001	2.500	20.000	76.105	73.189	0.098	0.912
16	5.842	2.500	20.000	74.181	74.984	0.097	0.912
17	0.014	2.500	20.000	76.092	73.198	0.097	0.912
18	5.799	2.500	20.000	74.168	74.987	0.097	0.912
19	0.081	2.500	20.000	76.027	73.244	0.097	0.912
20	0.137	2.500	20.000	75.975	73.282	0.097	0.912
21	5.678	2.500	20.000	74.132	74.995	0.096	0.912

Factors Tool

Default Sheet...

Solution: 1 of 91

Jump to run: Run #

Asx1: 7.19979

Bx2: 2.5

Cx3: 20

Factor value:

For Help, press F1

8:54 PM 4/5/2019

Design-Expert 11 Trial

File Edit View Display Options Design Tools Help

Navigation Pane

Design (Actual)

Information

Notes

Summary

Graph Columns

Evaluation

Analysis

R1y1 (Analyzed)

R2y2 (Analyzed)

R3y3 (Analyzed)

Optimization

Numerical

Graphical

Post Analysis

Point Prediction

Confirmation

Coefficients Table

Solutions

22	0.246	2.500	20.000	75.873	73.355	0.096	0.912
23	0.255	2.500	20.000	75.864	73.361	0.096	0.912
24	0.000	2.500	19.962	76.065	73.175	0.098	0.912
25	5.560	2.500	20.000	74.101	75.000	0.095	0.912
26	5.550	2.500	20.000	74.099	75.001	0.095	0.912
27	5.516	2.500	20.000	74.090	75.002	0.095	0.912
28	0.384	2.500	20.000	75.748	73.445	0.095	0.912
29	5.475	2.500	20.000	74.081	75.003	0.095	0.911
30	0.205	2.500	19.965	75.873	73.315	0.096	0.911
31	5.395	2.500	20.000	74.062	75.005	0.094	0.911
32	0.520	2.500	20.000	75.629	73.530	0.094	0.911
33	5.374	2.500	20.000	74.058	75.006	0.094	0.911
34	0.634	2.500	20.000	75.533	73.601	0.094	0.911
35	0.719	2.500	20.000	75.462	73.652	0.093	0.911
36	5.207	2.500	20.000	74.026	75.007	0.093	0.911
37	5.180	2.500	20.000	74.021	75.006	0.093	0.911
38	0.849	2.500	20.000	75.358	73.728	0.093	0.911
39	0.959	2.500	20.000	75.273	73.792	0.092	0.911
40	1.032	2.500	20.000	75.218	73.832	0.092	0.911
41	0.082	2.497	20.000	75.940	73.167	0.097	0.911
42	4.887	2.500	20.000	73.961	74.998	0.092	0.911
43	4.868	2.500	20.000	73.979	74.997	0.092	0.911
44	4.764	2.500	20.000	73.970	74.991	0.091	0.911
45	1.287	2.500	20.000	75.035	73.970	0.091	0.910
46	1.451	2.500	20.000	74.925	74.054	0.090	0.910
47	4.411	2.500	20.000	73.956	74.960	0.090	0.910
48	1.625	2.500	20.000	74.814	74.139	0.089	0.910

Factors Tool

Default Sheet...

Solution: 1 of 91

Jump to run: Run #

Asx1: 7.19979

Bx2: 2.5

Cx3: 20

Factor value:

For Help, press F1

8:55 PM 4/5/2019

C:\Users\Asus PC\Dropbox\hacettepe\hacettepe tez\doğal substratlar\doğal substrat sonuçları\optimizasyon deneyleri\özümlü üreme hızı\deneme 4 (en son).dpx* - Design-Expert 11 Trial

File Edit View Display Options Design Tools Help

Report Ramps Bar Graph Pop-Out View

Navigation Pane

Design (Actual)

- Information
 - Notes
 - Summary
 - Graph Columns
 - Evaluation
- Analysis
 - R1y1 (Analyzed)
 - R2y2 (Analyzed)
 - R3y3 (Analyzed)
- Optimization
 - Numerical
 - Graphical
- Post Analysis
 - Point Prediction
 - Confirmation
 - Coefficients Table

Criteria Solutions Graphs

Constraints Solutions Starting Points

49	4.380	2.500	20.000	73.956	74.956	0.090	0.910
50	4.344	2.500	20.000	73.957	74.952	0.090	0.910
51	1.716	2.500	20.000	74.759	74.182	0.089	0.910
52	1.734	2.500	20.000	74.749	74.191	0.089	0.910
53	4.252	2.500	20.000	73.959	74.941	0.089	0.910
54	1.807	2.500	20.000	74.706	74.224	0.089	0.910
55	4.181	2.500	20.000	73.962	74.931	0.089	0.910
56	7.200	2.487	20.000	74.462	74.452	0.107	0.910
57	1.856	2.500	20.000	74.678	74.246	0.089	0.910
58	1.980	2.500	20.000	74.610	74.300	0.089	0.910
59	1.993	2.500	20.000	74.603	74.306	0.088	0.910
60	4.014	2.500	20.000	73.974	74.906	0.089	0.910
61	2.050	2.500	20.000	74.573	74.330	0.088	0.910
62	3.934	2.500	20.000	73.982	74.892	0.088	0.910
63	3.876	2.500	20.000	73.988	74.882	0.088	0.910
64	2.207	2.500	20.000	74.493	74.395	0.088	0.910
65	2.311	2.500	20.000	74.444	74.436	0.088	0.910
66	3.739	2.500	20.000	74.006	74.855	0.088	0.910
67	3.709	2.500	20.000	74.011	74.850	0.088	0.910
68	2.365	2.500	20.000	74.420	74.457	0.088	0.910
69	3.647	2.500	20.000	74.021	74.837	0.088	0.910
70	3.589	2.500	20.000	74.031	74.824	0.088	0.910
71	3.530	2.500	20.000	74.042	74.811	0.088	0.910
72	2.559	2.500	20.000	74.336	74.528	0.088	0.910
73	3.360	2.500	20.000	74.079	74.770	0.088	0.910
74	3.309	2.500	20.000	74.091	74.758	0.088	0.910
75	2.781	2.500	20.000	74.250	74.604	0.087	0.910
76	3.233	2.500	20.000	74.110	74.738	0.087	0.910

Factors Tool

Default Sheet...

Solution: 1 of 91

Jump to run: Run #

Acx1: 7.19979

Bx2: 2.5

Cx3: 20

Factor value:

For Help, press F1

8:55 PM 4/5/2019

C:\Users\Asus PC\Dropbox\hacettepe\hacettepe tez\doğal substratlar\doğal substrat sonuçları\optimizasyon deneyleri\özümlü üreme hızı\deneme 4 (en son).dpx* - Design-Expert 11 Trial

File Edit View Display Options Design Tools Help

Report Ramps Bar Graph Pop-Out View

Navigation Pane

Design (Actual)

- Information
 - Notes
 - Summary
 - Graph Columns
 - Evaluation
- Analysis
 - R1y1 (Analyzed)
 - R2y2 (Analyzed)
 - R3y3 (Analyzed)
- Optimization
 - Numerical
 - Graphical
- Post Analysis
 - Point Prediction
 - Confirmation
 - Coefficients Table

Criteria Solutions Graphs

Constraints Solutions Starting Points

66	3.739	2.500	20.000	74.006	74.855	0.088	0.910
67	3.709	2.500	20.000	74.011	74.850	0.088	0.910
68	2.365	2.500	20.000	74.420	74.457	0.088	0.910
69	3.647	2.500	20.000	74.021	74.837	0.088	0.910
70	3.589	2.500	20.000	74.031	74.824	0.088	0.910
71	3.530	2.500	20.000	74.042	74.811	0.088	0.910
72	2.559	2.500	20.000	74.336	74.528	0.088	0.910
73	3.360	2.500	20.000	74.079	74.770	0.088	0.910
74	3.309	2.500	20.000	74.091	74.758	0.088	0.910
75	2.781	2.500	20.000	74.250	74.604	0.087	0.910
76	3.233	2.500	20.000	74.110	74.738	0.087	0.910
77	2.893	2.500	20.000	74.212	74.640	0.087	0.910
78	3.200	2.500	20.000	74.118	74.729	0.087	0.910
79	3.088	2.500	20.000	74.150	74.698	0.087	0.910
80	3.064	2.500	20.000	74.157	74.691	0.087	0.910
81	3.118	2.500	20.000	74.141	74.706	0.087	0.910
82	0.000	2.489	20.000	75.775	72.893	0.097	0.907
83	0.000	2.500	19.382	75.432	72.966	0.099	0.905
84	7.200	2.500	19.186	73.937	74.307	0.110	0.905
85	7.200	2.468	20.000	73.941	73.998	0.105	0.902
86	0.000	2.500	18.143	74.033	72.391	0.102	0.889
87	0.010	2.435	20.000	74.183	71.483	0.092	0.883
88	7.200	2.500	17.471	71.999	73.116	0.111	0.879
89	7.200	2.500	14.793	68.721	70.603	0.110	0.832
90	0.000	2.500	12.266	66.493	67.337	0.100	0.788
91	7.200	2.500	12.268	65.346	67.501	0.104	0.780

Factors Tool

Default Sheet...

Solution: 1 of 91

Jump to run: Run #

Acx1: 7.19979

Bx2: 2.5

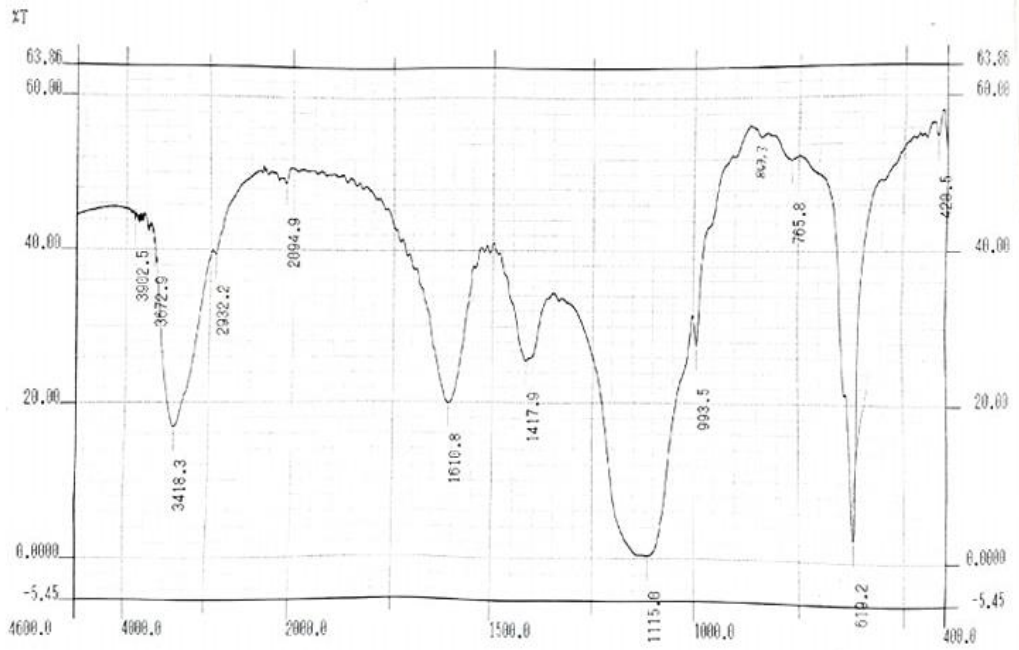
Cx3: 20

Factor value:

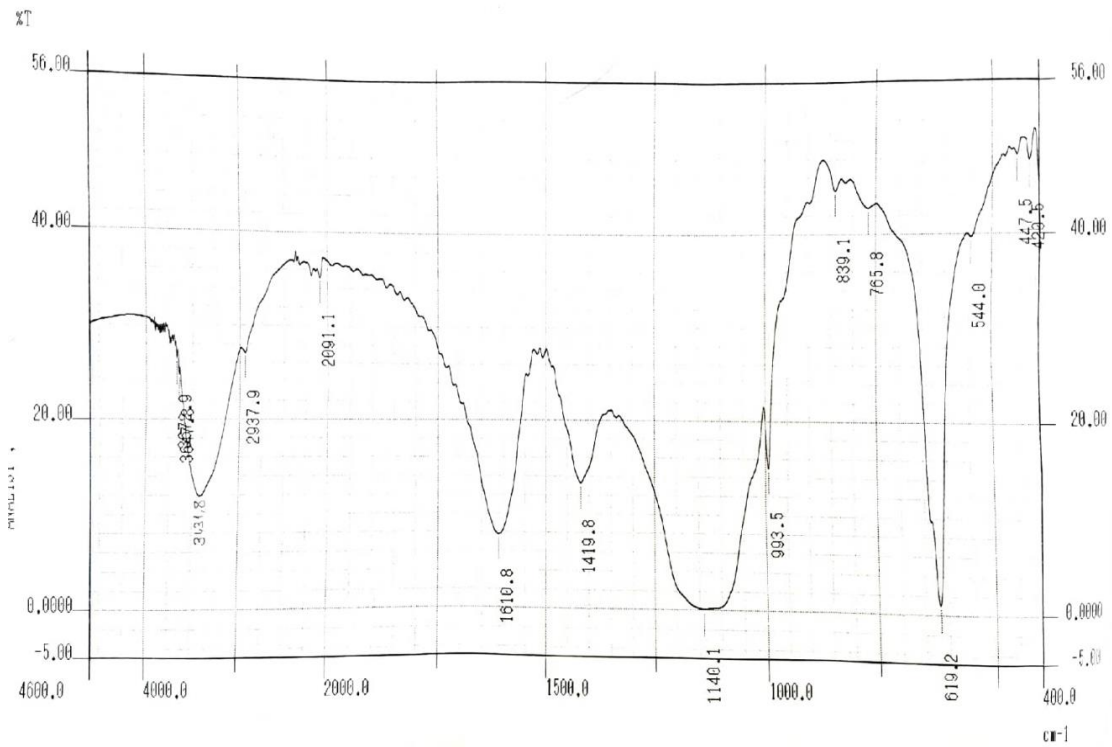
For Help, press F1

8:56 PM 4/5/2019

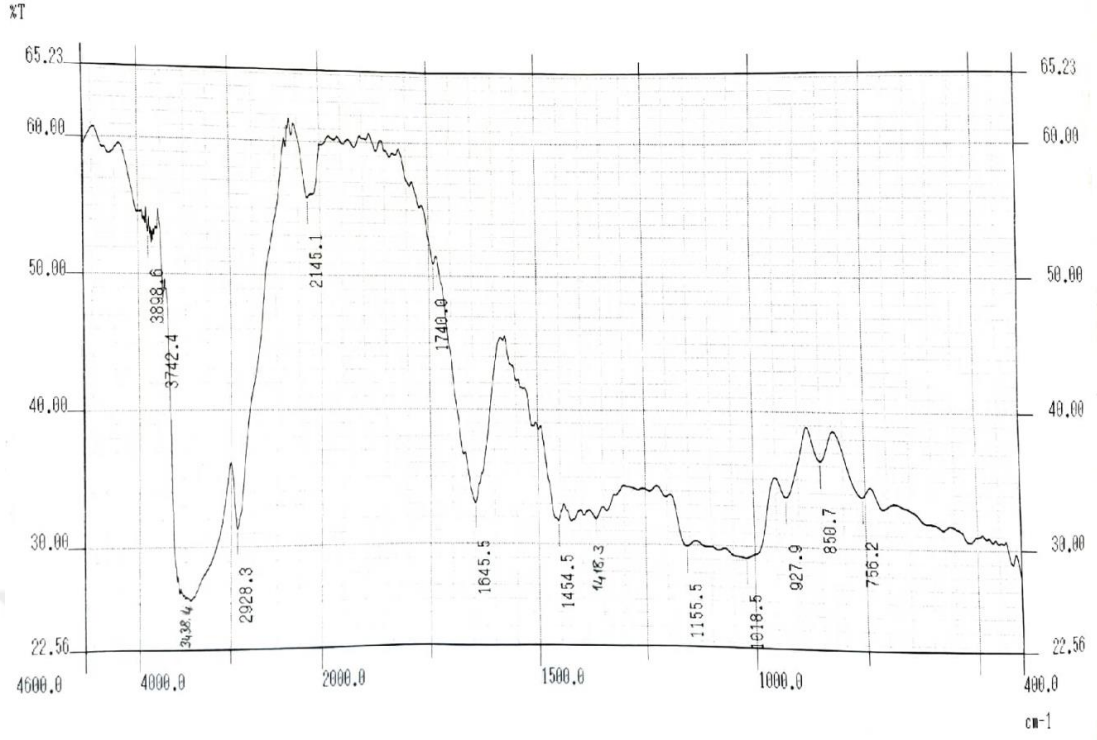
**EK 9-OPTİMİZASYON DENEYLERİNDEN ELDE EDİLEN EPS ÖRNEKLERİ
VE SAF PULLULAN ÖRNEĞİNE AİT FT-IR SPEKTRUMLARI**



(a)



(b)



(c)

Şekil Ek 9.1 (a) EPS 1. örnek (b) EPS 2. örnek (c) saf pullulan örneğine ait FT-IR spektrumları



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 24/06/2019

Tez Başlığı: ÇEŞİTLİ DOĞAL SUBSTRATLARIN YEREL BİR *Aureobasidium pullulans* SUŞUNUN PULLULAN ÜRETİMİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 151 sayfalık kısmına ilişkin, 23/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

21/06/2019

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Büşra AKDENİZ
Öğrenci No: N16228172
Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği
Programı: Gıda Mühendisliği
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Z. Yeşim Özbaş

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı : Büşra Akdeniz
Doğum Yeri : Çankaya/ANKARA
Doğum Yılı : 1991
E-posta : busra.akdeniz@hacettepe.edu.tr

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim:

Lisans :Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü / 2009-2014
Yandal :Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü / 2012-2014
Yüksek Lisans (1) :Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü / 2015-2017
Yüksek Lisans (2) :Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü / (Devam ediyor)

Stajlar : 2012- Eti Gıda Sanayi ve Ticaret A. Ş.
2012- Uzungil Şekerleme Gıda San. Tic. LTD. ŞTİ.
2013-Sütaş Süt Ürünleri A.Ş.

Akademik Ünvanlar

Araştırma Görevlisi : Gıda Mühendisliği / Hacettepe Üniversitesi / ANKARA / 2017-devam ediyor

Yayın, Bildiri ve Tebliğ

- Akdeniz, B., Şumnu, G., Şahin, S. (2018) Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (*Allium cepa*) skin, Journal of Food Processing and Preservation,42 (7)

- Akdeniz, B., Şumnu, G., Şahin, S. (2017) 10. Gıda Mühendisliği Kongresi, “Soğan Kabuğundan (*Allium Cepa*) Özütlenen Fenolik Bileşenlerin Farklı Kaplama Malzemeleri ile Enkapsülasyonunun Değerlendirilmesi” (Poster sunumu)
- Akdeniz, B., Şumnu, G., Şahin, S. (2017), AIDIC/Chemical Engineering Transactions, “The Effects of Maltodextrin and Gum Arabic on Encapsulation of Onion Skin Phenolic Compounds” (Sözlü sunum)

İş Tecrübesi : 2015- Bilintur Catering Centre

