

***Aureobasidium pullulans* İLE PULLULAN ÜRETİMİNE
ETKİ EDEN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERİN
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF VARIOUS PARAMETERS
AFFECTING ON PULLULAN PRODUCTION BY
*Aureobasidium pullulans***

GAMZE NUR MÜJDECİ

PROF. DR. Z. YEŞİM ÖZBAŞ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilimdalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Değerli ailem ve babama

ÖZET

***Aureobasidium pullulans* İLE PULLULAN ÜRETİMİNE ETKİ EDEN ÇEŞİTLİ PARAMETRELERİN İNCELENMESİ**

Gamze Nur MÜJDECİ

Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

Eş Danışman: Prof. Dr. M. Tijen BOZDEMİR

Aralık 2019, 300 sayfa

Bu tez çalışmasında, çeşitli fermantasyon parametrelerinin *Aureobasidium pullulans* AZ-6 suşunun, pullulan üretimine etkileri araştırılmıştır. Çalışmadaki fermantasyon deneyleri, kesikli sistemde; sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen çalkalamalı su banyolarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılacak olan suşun belirlenebilmesi amacıyla, yedi *A. pullulans* suşunun pullulan üretimleri karşılaştırılmış ve daha yüksek derişimde (17.56 g/L) pullulan ürettiği belirlenen; yerel *A. pullulans* AZ-6 suşu deneyler için seçilmiştir. Fermantasyon ortamında kullanılan farklı karbon kaynaklarının, *A. pullulans* AZ-6'nın pullulan üretimine etkileri incelendiğinde, denenen glukoz, fruktoz, sakkaroz, galaktoz ve maltoz içerisinde sakkarozun daha yüksek pullulan üretimini (15.66 g/L) sağladığı bulunmuştur. *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimini en iyi destekleyen azot kaynağının belirlenebilmesi için gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamında, organik azot kaynakları olarak; üre, maya özütü, pepton, inorganik azot kaynakları olarak ise; (NH₄)₂SO₄, NaNO₃ ve NH₄Cl kullanıldığında, maksimum pullulan derişimi (18.61 g/L); pepton ve (NH₄)₂SO₄'ın birlikte kullanıldığı ortamda elde edilmiştir.

Bu çalışmada daha sonra, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak *A. pullulans* AZ-6 suşuyla pullulan üretiminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, kullanılan programdaki dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemiyle, merkezde 6 tekrarlı, toplam 30 deneysel noktadan oluşan bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Tasarımda, bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı ve sıcaklık seçilirken, bağımlı değişkenler olarak; maksimum ekzopolisakkarit (EPS) ve pullulan derişimleri, *A. pullulans* AZ-6'nın özgül üreme hızı, maksimum özgül pullulan üretim hızı ve pullulan verimi seçilmiştir. Tasarım planındaki koşullara göre gerçekleştirilen deneylerden sonra, elde edilen sonuçlara, program yardımıyla çoklu regresyon analizi uygulanarak, bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlikler türetilmiş ve bu eşitliklerin uygunlukları, varyans (ANOVA) analiziyle değerlendirilmiştir. Optimizasyon, programdaki; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonuyla, nümerik olarak gerçekleştirilmiştir. Program tarafından üretilen 100 çözümden, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu değerinin; 0.977, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri ile pH'ının sırasıyla; 100 g/L, 11.305 g/L ve 6.481, sıcaklığın ise, 24.2°C olduğu koşullar, optimum olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen deneylerde maksimum EPS ve pullulan derişimleri, özgül üreme hızı, maksimum özgül pullulan üretim hızı ve pullulan verimi sırasıyla; 36.95 ve 35.47 g/L, 0.064 sa⁻¹, 0.036 [g pullulan/(g mo.sa)] ve %54.48 olarak elde edilmiş ve optimum koşullar; %95 güven düzeyinde doğrulanmışlardır.

Tez araştırmasında, çeşitli doğal substrat kaynaklarının; ön işlemlerden geçirildikten sonra, doğrudan fermantasyon ortamı veya fermantasyon ortamı temel bileşeni olarak kullanılmalarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, pullulan üretimine etkileri de araştırılmıştır. Doğal substrat kaynakları olarak; peyniraltı suyu, melas, üzüm posası, şeker pancarı küspesi, kavun, karpuz, soğan ve havuç kabukları ile tatlı patatesin kullanıldıkları deneylerde, maksimum pullulan üretimleri; tatlı patates özütü (37.62 g/L) ve melas çözeltisi (18.67 g/L) doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldığında gerçekleşmiştir.

Bu tez çalışmasında UV mutasyonu uygulamasının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkileri de incelenmiştir. Bu deneylerde elde edilen; 13 olası mutant suşun ürettikleri maksimum pullulan derişimlerinin (30.84-35.66 g/L) birbirlerine oldukça yakın oldukları ve bu suşlar tarafından üretilen maksimum pullulan derişimlerinin aynı koşullarda, *A. pullulans* AZ-6'nın ürettiğine oldukça benzer olduğu saptamıştır.

Tez araştırmasında, EPS örneklerinin, FT-IR spektrometresiyle gerçekleştirilen moleküler yapı analizlerinde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS'ye ait spektrumların, pullulan için karakteristik pikler içerdiği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen bazı EPS örneklerinin moleköl ağırlıkları hesaplandığında ise, bu değerlerin; 0.49×10^7 - 3.30×10^7 aralığında değıştikleri bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Aureobasidium pullulans*, pullulan, ekzopolisakkarit, fermentasyon, yanıt yüzey yöntemi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF VARIOUS PARAMETERS AFFECTING ON PULLULAN PRODUCTION BY *Aureobasidium pullulans*

Gamze Nur MÜJDECİ

Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

Co-supervisor: Prof. Dr. M. Tijen BOZDEMİR

December 2019, 300 pages

In this thesis, the effects of various fermentation parameters on the pullulan production of *Aureobasidium pullulans* AZ-6 strain were investigated. Fermentation experiments in the study were carried out in the batch system, in shaking water baths whose temperature and shaking speed could be controlled. In order to determine the strain to be used in the study, pullulan production of seven *A. pullulans* strains were compared and local *A. pullulans* AZ-6 strain which produced pullulan at higher concentration (17.56 g/L) was selected for the experiments. When the effects of different carbon sources used in fermentation medium on pullulan production of *A. pullulans* AZ-6 strain were examined, it was found that sucrose yielded higher pullulan production (15.66 g/L) among glucose, fructose, sucrose, galactose and maltose. In the experiments conducted for determining the nitrogen source that best supports the pullulan production of *A. pullulans* AZ-6 strain, in the fermentation medium, when as organic nitrogen sources; urea, yeast extract and pepton, as inorganic nitrogen sources; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , and NH_4Cl were used, maximum pullulan concentration (18.61 g/L) was obtained in the medium in which pepton and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were used together.

Later in this study, the optimization of pullulan production with *A. pullulans* AZ-6 was performed using the response surface methodology. In this scope, an experimental design plan consisting of 30 experimental points with six replicates in the center was created by using the central composite rotatable design method in the software. In this design, while the initial sucrose and peptone concentrations of the fermentation medium, the initial pH and temperature of the fermentation medium were selected as independent variables; the maximum exopolysaccharide (EPS) and pullulan concentrations, the specific growth rate of *A. pullulans* AZ-6, the maximum specific pullulan formation rate and pullulan yield were selected as dependent variables. After the experiments carried out according to the conditions in the design, model equations showing the effects of independent variables on dependent variables were derived by applying multiple regression analysis on obtained results with the help of the software, and the consistency of these equations were evaluated by variance (ANOVA) analysis. Optimization was performed with the desirability function in the software numerically. The conditions where the value of desirability function was 0.977, the initial sucrose and peptone concentrations and the pH of the fermentation medium were 100 g/L, 11.305 g/L and 6.481, respectively and the temperature was 24.2°C were determined as optimum among the 100 solutions computed by the software. In the experiments carried out under these conditions, maximum EPS and pullulan concentrations, specific growth rate, maximum specific pullulan formation rate and pullulan yield were obtained as; 36.95 and 35.47 g/L, 0.064 h⁻¹, 0.036 [g pullulan/(g mo.h)], and 54.48%, respectively and optimum conditions were confirmed at 95% confidence level.

In the thesis research, the effects of using various preprocessed natural substrate sources directly as a fermentation medium or as the main component of fermentation medium on the pullulan production of *A. pullulans* AZ-6 strain were also investigated. In the experiments where whey, molasses, grape pulp, sugar beet pulp, melon, watermelon, onion and carrot peels and sweet potato were used as natural substrate sources; maximum pullulan production was obtained when sweet potato extract (37.62 g/L) and molasses solution (18.67 g/L) was used as fermentation medium directly.

In this thesis, the effects of UV mutation application on the pullulan production of *A. pullulans* AZ-6 were also investigated. In these experiments, it was found that the

maximum pullulan concentrations (30.84-35.66 g/L) produced by 13 possible mutant strains were very close to each other and the maximum pullulan concentrations produced by these strains were very similar to those of *A. pullulans* AZ-6's production under the same conditions.

In the thesis research, in molecular structure analyzes performed by FT-IR spectrometer, it was determined that spectra of EPS produced by *A. pullulans* AZ-6 strain contained characteristic peaks for pullulan. When the molecular weights of some EPS samples obtained in the study were calculated, it was found that; these values vary in the range of 0.49×10^7 - 3.30×10^7 .

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, pullulan, exopolysaccharide, fermentation, response surface methodology

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve birikimleri ile beni yönlendiren, yakın ilgi ve desteği ile bana her konuda yardımcı olan, karşılaştığım sorunları çözmede her zaman desteğini gördüğüm değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Z. Yeşim Özbaş’a,

Çalışmalarım sırasında her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ikinci tez danışmanım, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. M. Tijen Bozdemir’e,

Tez izleme komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Nilüfer Cihangir ve Sayın Doç. Dr. Seda Karasu Yalçın’a

Tez çalışmamı “*Aureobasidium Pullulans* İle Pullulan Üretimine Etki Eden Çeşitli Parametrelerin İncelenmesi” başlıklı ve FHD-2015-5305 no.lu proje ile destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne,

Tez çalışmalarım sırasında şahsımı “2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı” kapsamında verdiği burs ile destekleyen TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı’na

Çalışmada kullanılan bazı *A. pullulans* suşlarının sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen, Varşova Üniversitesi, Bitki Patojenleri Bölümü öğretim üyesi Sayın Dr. Ewa Mirzwa-Mróz’e,

Araştırmada kullanılan melas ve şeker pancarı küspesini sağlayan; Safi Katı Yakıt San. ve Ticaret A.Ş’ye, üzüm posasını sağlayan Kavaklıdere Şarapları A.Ş’ye ve peynir altı suyunu sağlayan Dalgıçlar Çifliği firmasına,

Çalışmalarım boyunca verdikleri destek ile beni her zaman ayakta tutan, bugünlere gelmemi sağlayan ve bana koşulsuz sevgi gösteren sevgili annem Mübeccel MÜJDECİ ve babam merhum Bekir MÜJDECİ’ye, canımdan öte kardeşlerim Abdülğafur ve Ceylan MÜJDECİ’ye, doğumuyla birlikte hayatımı aydınlatan biricik yeğenim Ceren MÜJDECİ’ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxvi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Kesikli Fermantasyon Sistemlerinin Modellenmelerinde Kullanılan Kinetik Eşitlikler..	35
2.1.1. Özgül Üreme Hızı	35
2.1.2. Özgül Ürün Oluşum Hızı	36
2.1.3. Ürün Verimi.....	36
2.1.4. Substrat Tüketim Hızı.....	37
2.2. Yanıt Yüzey Yöntemi.....	37
2.2.1. Bağımsız Değişkenlerin Seçimi	39
2.2.2. Deney Tasarımı	39
2.2.3. Model Eşitliğinin Uyumluluğunun Test Edilmesi.....	43
2.2.4. Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Mikroorganizma.....	47
3.1.2. Besiyerleri.....	48
3.1.3. Doğal Substrat Kaynakları.....	48
3.1.4. Deney Düzenegi	49
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Aşı Kültürünün Hazırlanması.....	49
3.2.2. Başlangıç İnokulum Derişiminin Tayini	49
3.2.3. Biyokütle Derişiminin Tayini.....	50

3.2.4.	Ekzopolisakkarit Derişiminin Tayini.....	50
3.2.5.	Pullulan Derişiminin Tayini	50
3.2.6.	Çeşitli Şekerlerin Derişimlerinin Tayininde Kullanılan Çalışma Doğrularının Oluşturulması.....	51
3.2.7.	Enzimatik Yöntem ile Glukoz ve Fruktoz Derişimlerinin Tayini.....	52
3.2.8.	pH Ölçümü	52
3.2.9.	Moleküler Yapı Analizi	52
3.2.10.	Pullulan Fermantasyonunda Kullanılacak Olan <i>A. pullulans</i> Suşunun Seçimi ..	53
3.2.11.	Farklı Karbon Kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması.....	54
3.2.12.	Farklı Azot Kaynağı Kombinasyonlarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması	55
3.2.13.	Optimizasyon Çalışması İçin Deney Tasarım Planının Oluşturulması.....	58
3.2.14.	Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmeleri.....	60
3.2.15.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşu ile Pullulan Üretiminin Optimizasyonu.....	61
3.2.16.	Bazı Gıda Endüstrisi Artıkları ile Çeşitli Meyve ve Sebze Atıklarının Doğrudan ya da Bazı Ön İşlemlerden Geçirildikten Sonra Fermantasyon Ortamı Temel Bileşeni Olarak Kullanılmalarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi	63
3.2.17.	UV Mutasyonun <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	66
3.2.18.	EPS Örneklerinin Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması.....	68
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	71
4.1.	Pullulan Üretiminde Kullanılacak <i>A. pullulans</i> Suşunun Seçimine İlişkin Sonuçlar .	71
4.2.	Farklı Karbon Kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar	77
4.3.	Farklı Azot Kaynağı Kombinasyonlarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar	91
4.4.	Optimizasyon Çalışması İçin Deney Tasarım Planının Oluşturulması.....	100
4.5.	Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmeleri	132
4.6.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşu ile Pullulan Üretiminin Optimizasyonu	196
4.7.	Bazı Gıda Endüstrisi Atık ve Yan Ürünleri ile Çeşitli Meyve ve Sebze Atıklarının; Doğrudan Doğruya ya da Bazı Ön İşlemlerden Geçirildikten Sonra Fermantasyon	

Ortamı Temel Bileşeni Olarak Kullanılmalarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi	204
4.8. Bazı Gıda Endüstrisi Atık ve Yan Ürünleri ile Çeşitli Meyve ve Sebze Atıklarının; Doğrudan Doğruya ya da Bazı Ön İşlemlerden Geçirildikten Sonra Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanılmalarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi.....	225
4.9. UV Mutasyonun <i>A. pullulans</i> AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	249
4.10. EPS Örneklerinin Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması.....	264
4.11. Moleküler Yapı Analizi.....	269
5. YORUM.....	271
6. KAYNAKLAR	276
EKLER	283
EK 1. DİNİTROSALİSİLİK ASİT YÖNTEMİ.....	283
EK 3. FENOL-SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİ	287
EK 4. <i>A. pullulans</i> AZ-6 SUŞU İLE PULLULAN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU ÇALIŞMASINDA ELDE EDİLEN FERMANTASYON ORTAMININ BİLEŞİMİ.....	288
EK 5. OPTİMİZASYON ÇALIŞMASINDA İSTENİLEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU KULLANILARAK ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER.....	289
EK 6. İSTENİLEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU İLE YAPILAN OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN GRAFİK.....	291
EK 7. FARKLI FERMANTASYON KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN BAZI EPS ÖRNEKLERİNİN İNTRİNSİK VİSKOZİTELERİNİN HESAPLANMASINDA KULLANILAN GRAFİKLER.....	291
EK 8. FARKLI FERMANTASYON KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN BAZI EPS ÖRNEKLERİ İLE SAF VE TİCARİ PULLULAN ÖRNEKLERİNE AİT FT-IR SPEKTRUMLARI	294
EK 9. TEZDEN TÜRETİLMİŞ BİLDİRİLER	296
EK 10. TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	297
ÖZGEÇMİŞ	298

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Pullulanın bazı kullanım alanları.....	15
Çizelge 2.2. Pullulan fermantasyonunda kullanılmış olan bazı doğal substratlar.....	28
Çizelge 3.1. Çalışmada denenilen <i>A. pullulans</i> kültürleri.....	47
Çizelge 3.2. Pullulan üretiminde kullanılan organik ve inorganik azot kaynakları ve azot içerikleri.....	55
Çizelge 3.3. <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan farklı azot kaynağı kombinasyonları ve fermantasyon ortamlarındaki başlangıç derişimleri	56
Çizelge 3.4. Merkezi karma tasarım yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri....	59
Çizelge 3.5. Bağımlı değişkenler ve simgeleri	59
Çizelge 3.6. Optimizasyon çalışmasında kullanılan değişkenler ile her biri için belirlenen hedefler ve bu değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri	62
Çizelge 4.1. Ana fermantasyon ortamında yapılan deneylerde incelenen <i>A. pullulans</i> suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ile fermantasyon sırasında elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri.....	76
Çizelge 4.2. <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan karbon kaynakları ve her bir karbon kaynağının substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri	84
Çizelge 4.3. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu ile elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri.....	90
Çizelge 4.4. <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan azot kaynağı kombinasyonları ile her bir azot kaynağı kombinasyonunun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri	99
Çizelge 4.5. Bağımsız değişkenlerin, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak tasarlanan deneylerdeki gerçek değerleri	101
Çizelge 4.6. Bağımsız değişkenlerin, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak tasarlanan deneylerdeki kodlanmış değerleri.....	103
Çizelge 4.7. Merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen maksimum EPS derişimleri (Y_1) ve maksimum pullulan derişimleri (Y_2) ile her bir deney için hesaplanan özgül üreme hızları (Y_3), maksimum özgül pullulan üretim hızları (Y_4)	

ve pullulan verimleri (Y_5).....	133
Çizelge 4.8. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4) maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları.....	136
Çizelge 4.9. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları	148
Çizelge 4.10. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları	161
Çizelge 4.11. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum özgül ürün oluşum hızı (Y_4) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları	173
Çizelge 4.12. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları.....	185
Çizelge 4.13. Bağımlı değişkenlerin, deneysel değerleri, optimizasyon programı kullanılarak hesaplanan teorik değerleri ve optimum değerleri	202
Çizelge 4.14. Bileşimlerinde bir doğal substrat kaynağı ile ana fermantasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenleri içeren fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızı ve hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları değerleri.....	224
Çizelge 4.15. Çeşitli doğal substrat kaynaklarının, ayrı ayrı, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve en yüksek özgül ürün oluşum hızları	247
Çizelge 4.16. UV mutasyonu deneylerinde kullanılan UV doz ve süreleri ile, uygulama öncesi ve sonrası tespit edilen sayım sonuçları ve hesaplanan ölüm oranları.....	249
Çizelge 4.17. UV mutasyon uygulaması sonucunda elde edilmiş olan 13 adet olası mutant <i>A. pullulans</i> suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği deneylerde, fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları, hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları ve en yüksek sakkaroz tüketim hızları	262
Çizelge 4.18. Farklı fermantasyon koşullarında elde edilen EPS örneklerinin intrinsik viskozite değerleri ile molekül ağırlıkları	266

Çizelge 4.19. Saf ve ticari pullulan örnekleri ile farklı <i>A. pullulans</i> suşları tarafından üretilen EPS örneklerinin FT-IR analizi sonuçları	270
Çizelge Ek 4.1. Optimizasyon çalışması sonucunda belirlenen fermantasyon ortamı bileşimi	288
Çizelge Ek 5.1.Optimizasyon çalışmasında istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak belirlenen hedefler ve program tarafından önerilen çözümler	289

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	<i>A. pullulans</i> hücrelerinin dış yüzeyindeki polisakkarit tabakaları.....	8
Şekil 2.2.	Pullulan biyosentezi	10
Şekil 2.3.	Pullulanın molekül yapısı.....	11
Şekil 2.4.	Pullulan üretim akım şeması.....	17
Şekil 2.5.	Üç bağımsız değişkenli bir merkezi karma tasarım (CCD) yöntemi modeli.....	42
Şekil 4.1.	(A): <i>A. pullulans</i> AZ-6, (B): <i>A. pullulans</i> BJ20p4, (G): <i>A. pullulans</i> G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri	71
Şekil 4.2.	(A): <i>A. pullulans</i> AZ-6, (B): <i>A. pullulans</i> BJ20p4, (G): <i>A. pullulans</i> G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.....	72
Şekil 4.3.	(A): <i>A. pullulans</i> AZ-6, (B): <i>A. pullulans</i> BJ20p4, (G): <i>A. pullulans</i> G. Kaukaska B1 suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri	73
Şekil 4.4.	(C): <i>A. pullulans</i> CCF 4532, (M): <i>A. pullulans</i> MAFF 425047, (N): <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 ve (T): <i>A. pullulans</i> TrisCz suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri.....	74
Şekil 4.5.	(C): <i>A. pullulans</i> CCF 4532, (M): <i>A. pullulans</i> MAFF 425047, (N): <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 ve (T): <i>A. pullulans</i> TrisCz suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.....	74
Şekil 4.6.	(C): <i>A. pullulans</i> CCF 4532, (M): <i>A. pullulans</i> MAFF 425047, (N): <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 ve (T): <i>A. pullulans</i> TrisCz suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri	75
Şekil 4.7.	Farklı karbon kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun EPS üretimine etkileri	77
Şekil 4.8.	Farklı karbon kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkileri....	78
Şekil 4.9.	Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.....	79
Şekil 4.10.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için substrat olarak, (a): Glukoz, (b): Sakkaroz, (c): Fruktoz, (d): Maltoz ve (e): Galaktoz içeren ana fermentasyon ortamlarında ln X değğerlerinin zamanla değışimleri.....	81
Şekil 4.11.	Farklı karbon kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerinin incelendiğı deneylerde, fermentasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değışimleri.....	82
Şekil 4.12.	Farklı karbon kaynaklarının <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerinin incelendiğı deneylerde substrat tüketim hızlarının zamanla değışimleri	83

Şekil 4.13.	Glukoz, sakkaroz veya fruktozun <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun EPS üretimi üzerine etkileri	85
Şekil 4.14.	Glukoz, sakkaroz veya fruktozun <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkileri.....	85
Şekil 4.15.	Glukoz, sakkaroz veya fruktozun <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimi üzerine etkileri.....	86
Şekil 4.16.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için substrat olarak, (a): Glukoz, (b): Sakkaroz ve (c): Fruktoz içeren ana fermentasyon ortamlarında ln X değerlerinin zamanla değışimleri.....	87
Şekil 4.17.	Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermentasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değışimleri.....	88
Şekil 4.18.	Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermentasyon ortamlarında substrat tüketim hızlarının zamanla değışimleri	89
Şekil 4.19.	Fermentasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri ..	92
Şekil 4.20.	Fermentasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri.	93
Şekil 4.21.	Fermentasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.....	94
Şekil 4.22.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için azot kaynağı olarak (a): maya özütü ve (NH ₄) ₂ SO ₄ , (b): pepton ve (NH ₄) ₂ SO ₄ , (c): üre ve (NH ₄) ₂ SO ₄ , (d): NaNO ₃ ve maya özütü ve (e): NH ₄ Cl ve maya özütü içeren fermentasyon ortamlarında ln X değerlerinin zamanla değışimleri	95
Şekil 4.23.	Fermentasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde, sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri.....	97
Şekil 4.24.	Fermentasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değışimleri	98
Şekil 4.25.	“1-4” ve “23” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri	106
Şekil 4.26.	“1-4” ve “23” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri	106
Şekil 4.27.	“1-4” ve “23” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri	107
Şekil 4.28.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için (a): 1, (b): 2, (c): 3, (d): 4 ve (e): 23 numaralı deneylerde ln	

	X değerlerinin zamanla değişimleri.....	108
Şekil 4.29.	“1-4” ve “23” numaralı deneylerde, sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri ...	109
Şekil 4.30.	“1-4” ve “23” numaralı deneylerde, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri....	110
Şekil 4.31.	“5-8” ve “24” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	111
Şekil 4.32.	“5-8” ve “24” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri	112
Şekil 4.33.	“5-8” ve “24” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	113
Şekil 4.34.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için (a): 5, (b): 6, (c): 7, (d): 8 ve (e): 24 numaralı deneylerde, ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	114
Şekil 4.35.	“5-8” ve “24” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri	115
Şekil 4.36.	“5-8” ve “24” numaralı deneylerde, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri....	116
Şekil 4.37.	“9-16” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	117
Şekil 4.38.	“9-16” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri	117
Şekil 4.39.	“9-16” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	118
Şekil 4.40.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için (a): 9, (b): 10, (c): 11, (d): 12, (e): 13, (f): 14, (g): 15 ve (h): 16 numaralı deneylerde, ln X değerlerinin zamanla değişimleri	120
Şekil 4.41.	“9-16” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri	121
Şekil 4.42.	“9-16” numaralı deneylerde sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	121
Şekil 4.43.	“17-22” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	122
Şekil 4.44.	“17-22” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri	123
Şekil 4.45.	“17-22” numaralı fermentasyon deneylerinde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri	124
Şekil 4.46.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 için (a): 17, (b): 18, (c): 19, (d): 20, (e): 21, ve (f): 22 numaralı deneylerde ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	125
Şekil 4.47.	“17-22” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri	126

Şekil 4.48.	“17-22” numaralı deneylerde sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri	127
Şekil 4.49.	“25-30” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	128
Şekil 4.50.	“25-30” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri	128
Şekil 4.51.	“25-30” numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri	129
Şekil 4.52.	<i>A. pullulans</i> AZ-6 için (a): 25, (b): 26, (c): 27, (d): 28, (e): 29, ve (f): 30 numaralı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri	130
Şekil 4.53.	“25-30” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	131
Şekil 4.54.	“25-30” numaralı deneylerde sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri	131
Şekil 4.55.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	137
Şekil 4.56.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile başlangıç pH'ının (X_3); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6 \text{ g/L}$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)	139
Şekil 4.57.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6 \text{ g/L}$, $X_3 = 5.5$).....	141
Şekil 4.58.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile başlangıç pH'ının (X_3); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)	142
Şekil 4.59.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_3 = 5.5$)	144
Şekil 4.60.	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_2 = 6 \text{ g/L}$).....	145
Şekil 4.61.	Maksimum EPS derişimlerinin (Y_1); Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.99798x + 0.02261$; $R^2 = 0.998$)	147
Şekil 4.62.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	149

Şekil 4.63.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	151
Şekil 4.64.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)	153
Şekil 4.65.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	155
Şekil 4.66.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimine (Y_2) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$).....	157
Şekil 4.67.	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimine (Y_2) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L)	158
Şekil 4.68.	Maksimum pullulan derişimlerinin (Y_2); Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.99525x + 0.05047$; $R^2 = 0.995$)	160
Şekil 4.69.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz (X_1) ve başlangıç pepton (X_2) derişimlerinin; mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	163
Şekil 4.70.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	164
Şekil 4.71.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)	166
Şekil 4.72.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	168
Şekil 4.73.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$).....	169
Şekil 4.74.	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri	

	($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_2 = 6 \text{ g/L}$)	171
Şekil 4.75.	Özgül üreme hızlarının (Y_3); Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.98646x + 0.00059608$; $R^2 = 0.987$) ...	172
Şekil 4.76.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	174
Şekil 4.77.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6 \text{ g/L}$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)	176
Şekil 4.78.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6 \text{ g/L}$, $X_3 = 5.5$)	178
Şekil 4.79.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)	179
Şekil 4.80.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_3 = 5.5$)	181
Şekil 4.81.	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60 \text{ g/L}$, $X_2 = 6 \text{ g/L}$)	183
Şekil 4.82.	Maksimum özgül pullulan üretim hızlarının (Y_4); Eş. 4.4 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.86436x + 0.00573$; $R^2 = 0.864$)	184
Şekil 4.83.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pepton derişiminin (X_2); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)	187
Şekil 4.84.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6 \text{ g/L}$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)	188
Şekil 4.85.	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6 \text{ g/L}$, $X_3 = 5.5$)	190
Şekil 4.86.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur	

	grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$).....	191
Şekil 4.87.	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$)	193
Şekil 4.88.	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L).....	195
Şekil 4.89.	Pullulan veriminin (Y_5); Eş. 4.5 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.99527x + 0.11934$; $R^2 = 0.995$)	196
Şekil 4.90.	Optimum çalışma koşullarında; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişiminin zamanla değışimi.....	198
Şekil 4.91.	Optimum çalışma koşullarında; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişiminin zamanla değışimi.....	199
Şekil 4.92.	Optimum çalışma koşullarında biyokütle derişiminin zamanla değışimi	199
Şekil 4.93.	Optimum çalışma koşullarında, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu için $\ln X$ değerlerinin zamanla değışimi	200
Şekil 4.94.	Optimum çalışma koşullarında; fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değışimi	201
Şekil 4.95.	Optimum çalışma koşullarında; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşunun sakkaroz tüketim hızının zamanla değışimi	201
Şekil 4.96.	Kavun kabuğu, karpuz kabuğu, üzüm posası özütleri, melas çözeltisi veya peynir altı suyunun hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri	205
Şekil 4.97.	Kavun kabuğu, karpuz kabuğu, üzüm posası özütleri, melas çözeltisi veya peynir altı suyunun hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri	206
Şekil 4.98.	Kavun kabuğu, karpuz kabuğu, üzüm posası özütleri, melas çözeltisi veya peynir altı suyunun hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri.	207
Şekil 4.99.	Doğal substrat kaynağı olarak; (a): kavun kabuğu özütü, (b): karpuz kabuğu özütü, (c): üzüm posası özütü, (d): melas çözeltisi ve (e): peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değışimleri.....	208

Şekil 4.100. Doğal substrat kaynağı olarak kavun kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	210
Şekil 4.101. Doğal substrat kaynağı olarak kavun kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri	210
Şekil 4.102. Doğal substrat kaynağı olarak karpuz kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	211
Şekil 4.103. Doğal substrat kaynağı olarak karpuz kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri	211
Şekil 4.104. Doğal substrat kaynağı olarak üzüm posası özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	212
Şekil 4.105. Doğal substrat kaynağı olarak üzüm posası özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri	212
Şekil 4.106. Doğal substrat kaynağı olarak melas çözeltisi içeren fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değişimi	213
Şekil 4.107. Doğal substrat kaynağı olarak melas çözeltisi içeren fermantasyon ortamında; sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimi	213
Şekil 4.108. Doğal substrat kaynağı olarak peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamındaki laktoz derişiminin zamanla değişimi	214
Şekil 4.109. Doğal substrat kaynağı olarak peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamında; laktoz tüketim hızının zamanla değişimi	214
Şekil 4.110. Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu veya havuç kabuğu özütlerinin hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	215
Şekil 4.111. Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu veya havuç kabuğu özütlerinin hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri	216
Şekil 4.112. Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu veya havuç kabuğu özütlerinin hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri	217
Şekil 4.113. Doğal substrat kaynağı olarak; (a): tatlı patates özütü, (b): şeker pancarı küspesi özütü, (c): soğan kabuğu özütü, ve (d): havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, ln X değerlerinin zamanla değişimleri	218
Şekil 4.114. Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütü içeren fermantasyon ortamındaki	

glukoz, fruktoz ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri	219
Şekil 4.115. Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz, fruktoz ve toplam şeker tüketim hızlarının zamanla değişimleri	220
Şekil 4.116. Doğal substrat kaynağı olarak havuç kabuğı özütü içeren fermantasyon ortamındaki, glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri.....	220
Şekil 4.117. Doğal substrat kaynağı olarak havuç kabuğı özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri	221
Şekil 4.118. Doğal substrat kaynağı olarak soğan kabuğı özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz derişiminin zamanla değişimi	222
Şekil 4.119. Doğal substrat kaynağı olarak soğan kabuğı özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz tüketim hızının zamanla değişimi	222
Şekil 4.120. Doğal substrat kaynağı olarak şeker pancarı küspesi özütü içeren fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değişimi.....	223
Şekil 4.121. Doğal substrat kaynağı olarak şeker pancarı küspesi özütü içeren fermantasyon ortamındaki sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimi	223
Şekil 4.122. Soğan kabuğı özütü, üzüm posası özütü, melas çözeltisi veya şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	226
Şekil 4.123. Soğan kabuğı özütü, üzüm posası özütü, melas çözeltisi veya şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri.....	227
Şekil 4.124. Soğan kabuğı özütü, üzüm posası özütü, melas çözeltisi veya şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri	227
Şekil 4.125. <i>A. pullulans</i> AZ-6 için doğal substrat kaynağı olarak (a): soğan kabuğı özütü, (b): üzüm posası özütü, (c): melas çözeltisi ve (d): şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, ln X değerlerinin zamanla değişimleri	229
Şekil 4.126. Soğan kabuğı özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz derişiminin zamanla değişimi	230
Şekil 4.127. Soğan kabuğı özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; glukoz tüketim hızının zamanla değişimi	230
Şekil 4.128. Melas çözeltisinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki sakkaroz derişiminin zamanla değişimi.....	231

Şekil 4.129. Melas çözeltisinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimleri.....	231
Şekil 4.130. Şeker pancarı küspesi özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki sakkaroz derişiminin zamanla değişimi.....	232
Şekil 4.131. Şeker pancarı küspesi özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimleri.....	232
Şekil 4.132. Üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	233
Şekil 4.133. Üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	233
Şekil 4.134. Karpuz, kavun ya da havuç kabuğu özütleri veya peynir altı suyunun tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri	234
Şekil 4.135. Karpuz, kavun ya da havuç kabuğu özütleri veya peynir altı suyunun tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri	235
Şekil 4.136. Karpuz, kavun ya da havuç kabuğu özütleri veya peynir altı suyunun tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri.....	236
Şekil 4.137. Doğal substrat kaynağı olarak; (a): karpuz kabuğu özütü, (b): kavun kabuğu özütü, (c): havuç kabuğu özütü ve (d): peynir altı suyunun, tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, ln X değerlerinin zamanla değişimleri.....	237
Şekil 4.138. Kavun kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	238
Şekil 4.139. Kavun kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz ve fruktozun tüketim hızlarının zamanla değişimleri	238
Şekil 4.140. Karpuz kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	239
Şekil 4.141. Karpuz kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz ve fruktozun tüketim hızlarının zamanla değişimleri	239
Şekil 4.142. Havuç kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri	240
Şekil 4.143. Havuç kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri.....	241

Şekil 4.144. Peynir altı suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki laktoz derişiminin zamanla değışimi.....	241
Şekil 4.145. Peynir altı suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, laktozun tüketim hızının zamanla değışimi	242
Şekil 4.146. Fermantasyon ortamı olarak tatlı patates özütünün kullanıldığı deneyde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişiminin zamanla değışimi	242
Şekil 4.147. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişiminin zamanla değışimi	243
Şekil 4.148. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, biyokütle derişiminin zamanla değışimi.....	243
Şekil 4.149. Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ln X değerlerinin zamanla değışimleri	244
Şekil 4.150. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki glukoz, fruktoz ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değışimleri	245
Şekil 4.151. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki glukoz, fruktoz ve toplam şeker tüketim hızlarının zamanla değışimleri.....	245
Şekil 4.152. İlk gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri	251
Şekil 4.153. İlk gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri	252
Şekil 4.154. İlk gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri	252
Şekil 4.155. İlk gruptaki deneylerde kullanılan ve pullulan üretim özellikleri incelenen <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarının, ln X değerlerinin zamanla değışimleri (a): Mutant 10, (b): Mutant 13, (c): Mutant 15, (d): Mutant 17, (e): Mutant 20, (f): Mutant 23, (g): Mutant 26 ve (h): Mutant 27	254
Şekil 4.156. İlk gruptaki deneyler için, farklı <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarını içeren fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri.....	255
Şekil 4.157. İlk gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarının, fermantasyon ortamlarındaki sakkarozu tüketim hızlarının zamanla değışimleri	256
Şekil 4.158. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri	257
Şekil 4.159. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri	257

Şekil 4.160. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri	258
Şekil 4.161. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan ve pullulan üretim özellikleri incelenen <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarının ln X değerlerinin zamanla değışimleri (a): Mutant 29, (b): Mutant 31, (c): Mutant 32, (d): Mutant 35 ve (e): Mutant 37.....	259
Şekil 4.162. İkinci gruptaki deneyler için farklı <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarını içeren fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri	260
Şekil 4.163. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan <i>A. pullulans</i> AZ-6 olası mutant suşlarının, fermantasyon ortamlarındaki sakkarozu tüketim hızlarının zamanla değışimleri	261
Şekil Ek 2.1. Glukoz çalışma doğrusu ($y = 3,13x - 0.05193$; $R^2 = 0.9904$).....	284
Şekil Ek 2.2. Sakkaroz çalışma doğrusu ($y = 10.39018x - 0.0075$; $R^2 = 0.996$).....	284
Şekil Ek 2.3. Fruktoz çalışma doğrusu ($y = 2.84976x - 0.05264$; $R^2 = 0.992$).....	285
Şekil Ek 2.4. Galaktoz çalışma doğrusu ($y = 3.14405x - 0.09287$; $R^2 = 0.986$)	285
Şekil Ek 2.5. Laktoz çalışma doğrusu ($y = 2.20x - 0.05193$; $R^2 = 0.9907$).....	286
Şekil Ek 6.1. İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri ile değışimi ($X_1 = 100$ g/L; $X_2 = 11.305$ g/L)	291
Şekil Ek 7.1. a: <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından (a): optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deneyde üretilen, (b): melasın fermantasyon ortamında sakkarozun yerine bileşen olarak kullanıldığı deneyde üretilen, (c): <i>A. pullulans</i> AZ-6, mutant no. 20 suşu tarafından optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deneyde üretilen EPS örneklerinin sudaki çözeltilerinin indirgenmiş viskozitelerinin, EPS çözeltilerinin derişimleri ile değışimleri	293
Şekil Ek 8.1. <i>A. pullulans</i> AZ-6 suşu tarafından (a): ana fermantasyon ortamında gerçekleştirilen deneyde üretilen, (b): optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyde üretilen EPS örneklerine ait FT-IR spektrumları, (c): saf pullulan (Sigma) örneğine ait FT-IR spektrumu, (d): ticari pullulan (Hayashibara) örneğine ait FT-IR spektrumu.....	295

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	Derişim (g/L)
C _F	Fruktoz derişimi (g/L)
C _G	Glukoz derişimi (g/L)
C _{GAL}	Galaktoz derişimi (g/L)
C _L	Laktoz derişimi (g/L)
C _S	Sakkaroz derişimi (g/L)
C _{pm}	Maksimum pullulan derişimi (g pullulan/L)
d	İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu
k	Bağımsız değişken sayısı
k'	Huggins sabiti
K	Mark-Houwink sabiti
M _w	Molekül ağırlığı
n ₀	Merkez noktadaki tekrar sayısı
N	Tasarımdaki deney sayısı
q _p	Özgül pullulan oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
P	Anlamlılık düzeyi
r _S	Substrat tüketim hızı [g substrat/(L.sa)]
r _{S,G}	Glukoz tüketim hızı [g glukoz/(L.sa)]
r _{S,L}	Laktoz tüketim hızı [g laktoz/(L.sa)]
r _{S,S}	Sakkaroz tüketim hızı [g sakkaroz/(L.sa)]

R^2	Belirleme katsayısı
R^2_{adj}	Düzeltilmiş belirleme katsayısı
S	Substrat derişimi (g substrat/L)
S_s	En yüksek pullulan derişiminin elde edildiğı anda fermantasyon ortamında bulunan sakkaroz derişimi (g/L)
S_{s0}	Fermantasyon ortamındaki sakkarozun başlangıç derişimi (g/L)
t	Zaman (sa)
UV	Ultraviyole
Ü	Ürün derişimi (g/L)
X	Kuru ağırlık olarak mikroorganizma derişimi (g mo/L)
x_i	Kodlanmış değeri
x_0	Merkez noktadaki gerçek değeri
X_i	Gerçek değeri
X_j	Karesel modeldeki bağımsız değişken
X_1	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (g/L)
X_1^2	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin karesel etkisi
X_1X_2	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pepton derişiminin etkileşimi
X_1X_3	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve pH'ının etkileşimi
X_1X_4	Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve sıcaklığın etkileşimi
X_2	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (g/L)
X_2^2	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin karesel etkisi
X_2X_3	Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi ve pH'ının etkileşimi

X_2X_4	Fermantasyon ortamının pepton sakkaroz derişimi ve sıcaklığın etkileşimi
X_3	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı
X_3^2	Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının karesel etkisi
X_3X_4	Fermantasyon ortamının sıcaklığı ile başlangıç pH'ının etkileşimi
X_4	Fermantasyon ortamının sıcaklığı (°C)
X_4^2	Fermantasyon ortamının sıcaklığının karesel etkisi
y	Bağımlı değişken; yanıt
Y_1	Maksimum EPS derişimi (g/L)
Y_2	Maksimum pullulan derişimi (g/L)
Y_3	Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa ⁻¹)
Y_4	Maksimum özgül pullulan üretim hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
Y_5	Pullulan verimi (%)
$Y_{P/S}$	Ürün verimi (%)
α	Yıldız noktanın merkez noktaya olan uzaklığı
α_M	Mark-Houwink sabiti
β	Regresyon katsayısı
β_{ij}	Karesel modeldeki iki terimli regresyon katsayısı
β_j	Karesel modeldeki lineer regresyon katsayısı
β_{jj}	Karesel modeldeki ikinci dereceden regresyon katsayısı
β_0	Karesel modeldeki sabit katsayı
ε	Hata
η	Ölçülen viskozite
η_r	Bağıl viskozite

η_{sp}	Spesifik viskozite
η_y	Gerçek yanıt
η_0	Çözücü viskozitesi
$[\eta]$	İntrinsik viskozite
λ	Dalga boyu (nm)
μ	Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa ⁻¹)
μ_{max}	Maksimum özgül üreme hızı (sa ⁻¹)
v_m	Maksimum özgül pullulan oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
σ^2	Varyans

Kısaltmalar

ANOVA	Varyans analizi (analysis of variance)
CCD	Merkezi karma tasarım (central composite design)
CCRD	Döndürülebilir merkezi karma tasarım (central composite rotatable design)
Da	Dalton
DNS	Dinitrosalisilik asit
EMS	Etil metansülfonat
EPS	Ekzopolisakkarit
F	Fischer
FT-IR	Fourier Transform Infrared
PAS	Peynir altı suyu
PRESS	Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (the predicted residual error sum of squares)

RSM	Yanıt yüzey yöntemi (responce surface methodology)
UDPG	Üridin difosfoglukoz
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Pullulan beyaz renkli, tadı ve kokusu olmayan, yenilebilir, düşük oksijen geçirgenliğine sahip, suda yüksek oranda çözünebilen ve düşük derişimlerde dahi sulu çözeltileri viskoz özellikte olan, dayanıklı bir ekzopolisakkarit olarak bilinmektedir [1]. Bunlara ek olarak pullulanın; karsinogenik ve mutajenik etkilerinin olmadığı ve insan vücudunda yavaş sindirilebildiği de belirtilmektedir [2]. Bilinen en iyi pullulan üreticisi mikroorganizmanın; maya benzeri bir fungus olarak tanımlanan ve siyah maya olarak da bilinen *Aureobasidium pullulans* olduğu ifade edilmektedir [3]. Biyoteknolojik açıdan da önemli bir fungus olarak kabul edilen *A. pullulans*'ın, pullulanın yanı sıra ürettiği önemli bazı biyoürünler/metabolitler arasında; proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, ksilanaz gibi enzimler, aureobasidin adı verilen bir grup antibiyotik, ağır yağlar, β -glukan ve siderofor yer almaktadır [4]. *A. pullulans*'ın en önemli metabolitlerinden birisi olan pullulan, çeşitli endüstri dallarında giderek artan uygulama alanı bulması nedeni ile, ekonomik önemi yüksek polisakkaritler arasında gösterilmektedir [5]. Pullulan için küresel pazarda, gıda endüstrisinin büyük bir paya sahip olduğu ve bu sektörde pullulanın; diyet lifi, kıvam arttırıcı, nem tutucu, düşük viskoziteli dolgu ajanı, enkapsülasyon ajanı, stabilizör, nişasta ikamesi ve koruyucu ajan olarak kullanıldığı rapor edilmektedir. Pullulanın ayrıca, nano ambalaj, yenilebilir film ve şeker şurubu üretiminde de kullanıldığı ifade edilmektedir [6, 7]. Gıda endüstrisindeki kullanım alanlarının dışında söz konusu biyopolimerin biyomedikal, eczacılık ve kozmetik sektörlerinde de, önemli uygulama alanlarına sahip olduğu rapor edilmektedir [8].

Pullulanın ilk olarak 1976 yılında, Hayashibara Co. Ltd. (Japonya) firması tarafından ticari olarak üretildiği ve söz konusu firmanın almış olduğu patent koruması nedeni ile 2000 yılına kadar dünyada başka herhangi bir sanayileşmiş pullulan üreticisinin olmadığı belirtilmektedir. Adı geçen firmanın pullulan üretimi ile ilgili patentinin sona ermesi ile birlikte, Çin üreticilerinin de bu polimeri üretmeye başladıkları rapor edilmektedir [9]. Dünyada, en yüksek pullulan tüketiminin Japonya'da olduğu ifade edilmekte ve Türkiye de dahil olmak üzere birçok ülkede de bu biyopolimerin çeşitli alanlarda kullanımına izin verildiği bilinmektedir [10, 11].

Pullulanın çok sayıda önemli uygulama alanının olmasına rağmen, üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle kullanımının kısıtlandığı belirtilmektedir [12]. Son yıllarda pullulan üretimi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, pullulan verimini arttırmak amacıyla, çeşitli fermantasyon parametrelerinin optimizasyonunun denendiği görülmektedir. Bu amaçla da yanıt yüzey yönteminin (Response Surface Methodology, RSM) yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir [13–15]. RSM, bir çok biyoprosesde, ürünün son verimini önemli derecede etkileyen kritik faktörleri belirlemek ve bu faktörlerin etkilerini incelemek için kullanılan bir modelleme ve optimizasyon yöntemi olarak bilinmektedir. Yanıt yüzey yöntemi kapsamındaki; merkezi karma tasarım (Central Composite Design, CCD) yöntemi kullanılarak yapılan deney tasarımı ile, az sayıda deney yaparak çok sayıda fermantasyon ortamı bileşenleri ve fermantasyon koşullarının, ürün üzerine etkilerinin modellenebileceği belirtilmektedir. Biyoproseslerin optimizasyonunda yaygın olarak kullanılan bu yöntemde, çoklu regresyon analizi yapılarak, ikinci dereceden bir modelin katsayıları belirlenebilmektedir [16]. Pullulan üretimini daha ekonomik hale getirmeye yönelik gerçekleştirilen çalışmaların bazılarının da fermantasyon ortamlarında ucuz hammadde kullanımına ilişkin olduğu görülmektedir [17–19]. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, bazı endüstriyel ve tarımsal atık, artık veya yan ürünlerin fermantasyon ortamlarında doğal substrat kaynağı ya da ek karbon ve/veya azot kaynağı olarak kullanıldıkları belirtilmektedir.

Bu çalışmada ilk olarak, bazı yabancı kültür koleksiyonu merkezlerinden temin edilen *A. pullulans* suşları ve daha önce gerçekleştirmiş olduğumuz bir araştırmamızda, ham zeytinden izole etmiş olduğumuz, yerli bir *A. pullulans* suşunun (AZ-6), EPS ve pullulan üretim özellikleri karşılaştırılarak, çalışılan suşlar arasında, yüksek miktarda pullulan üretebilen suşun belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasının daha sonraki aşamalarında, fermantasyon ortamında farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanılmalarının, seçilen *A. pullulans* suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla çeşitli deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada daha sonra; yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, incelenen *A. pullulans* suşu ile pullulan üretiminde, bazı parametrelerinin optimizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan deney tasarımında, döndürülebilir merkezi karma tasarım (Central Composite Rotatable Design, CCRD) yöntemi kullanılmıştır.

Tez çalışmasında; çeşitli doğal substratların doğrudan veya fermantasyon ortamı temel bileşeni olarak kullanılmalarının, incelenen *A. pullulans* suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla; gıda endüstrisi artıkları olarak peyniraltı suyu, melas, üzüm posası ve şeker pancarı küspesi, meyve ve sebze atıkları olarak kavun, karpuz, soğan ve havuç kabukları ve bir diğer doğal substrat kaynağı olarak da; tatlı patates kullanılmıştır. Bu şekilde hem çevre dostu hem de ekonomik bir pullulan üretimi hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında ayrıca, UV mutasyonu uygulamasının seçilen suşun pullulan üretim kapasitesi üzerine etkileri de incelenmiş ve böylece yüksek verimle pullulan üretebilen bir mutant suş elde edilmeye çalışılmıştır.

Bunun yanısıra; deneylerde elde edilen ve yüksek oranda pullulan içeren bazı EPS örneklerinin karakterizasyonları da, bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla EPS örneklerinin molekül ağırlıkları belirlenirken intrinsik viskozite ile molekül ağırlığı arasındaki ilişkiden yararlanılmıştır. Bunun yanısıra FT-IR spektrometresi kullanılarak deneyler sırasında elde edilen bazı EPS örneklerinde, moleküler yapı analizleri de gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Aureobasidium pullulans, funguslar alemindeki *Ascomycota* grubu içerisinde yer alan; Dothideales takımı, *Dothideaceae* familyası ve *Aureobasidium* cinsine ait polimorfik ve oligotrofik bir tür olarak tanımlanmaktadır [20]. *Aureobasidium* cinsinin ilk kez, 1891'de Viala ve Boyer tarafından yapılan bir çalışmada, asma yapraklarında yanığa neden olan bir küfün taksonomik olarak araştırılması sırasında ortaya çıktığı, söz konusu türün ise ilk kez; De Bary tarafından 1866 senesinde; *Dematium pullulans*, 1910 senesinde ise; *A. pullulans* olarak tanımlandığı ifade edilmektedir [4, 21]. *A. pullulans*'ın bilinen birçok sinoniminin olduğu; bunların arasından en yaygın olarak; *Pullularia pullulans* ve *Dematium pullulans*'ın kullanıldığı ifade edilmektedir [22]. Söz konusu türe ait *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova, *A. pullulans* var. *subglacial* ve *A. pullulans* var. *namibiae* olmak üzere beş varyete olduğu rapor edilmektedir [23]. Bunlardan *A. pullulans* var. *pullulans*'ın fenotipik olarak; çabuk gelişen, kalın duvarlı ve melanin içeren hiflerin oluşumu nedeniyle, koyu kahverengi dairesel bölgeler geliştirebilen pembemsi kültürler ile karakterize edildiği ifade edilmektedir [23]. *A. pullulans* var. *melanogenum*'un ismini; ürettiği melanin pigmentinden, *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova'nın ise ismini; ürettiği aubasidan benzeri bir ekzopolisakkaritten aldığı belirtilmektedir. *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova'nın ayrıca, diğer varyetelerden farklı olarak; metil- α -D-glukozid ve laktozu asimile edemediği de rapor edilmiştir [23]. *A. pullulans* var. *subglaciale* varyetesinin, buzul ya da yarı buzul ortamlar ile deniz suyundan izole edildiği; *A. pullulans* var. *namibiae* varyetesinin ise, Namib çölündeki bir dolomit mermerinden izole edildiği ve kolonilerinin meşinimsi bir yapıda olduğu bildirilmiştir [23, 24]. Genel olarak, *A. pullulans* suşlarının yüksek şeker ve tuz derişimi içeren ortamlar ile geniş pH aralıklarında gelişebildikleri, yüksek dozda radyasyona karşı dayanıklı oldukları ve bu nedenle de doğal ve yapay ortamlardan yaygın olarak izole edilebildikleri rapor edilmektedir [22]. Bu türün yaygın olarak toprak, tuzlu sular, kıyı suları, derin sular, çeşitli bitki ve hayvan dokuları, elma, armut, üzüm, salatalık, yeşil fasulye, lahana, karides, arpa, yeşil zeytin, buğday, un, yulaf, fındık, pastörize portakal suyu, yoğurt, soğukta saklanan et ve peynirler, şarap ve şıra, çeşitli dondurulmuş gıdalar ve meyve suyu fabrikası ortamlarından izole edildiği belirtilmiştir [25–29].

Aureobasidium'un, malt ekstrakt agar (MEA) ya da glukoz pepton agar gibi besiyerlerinde, 30°C'de hızlıca gelişerek bir hafta içerisinde 30 mm büyüklüğe ulaşabildiği, başlangıçta düzgün yapıda olan kolonilerin kısa sürede, yapışkan bir salgı tabakası ile kaplandıkları belirtilmektedir [20]. İlk geliştiklerinde krem, açık pembe ya da açık kahve renkli olarak tanımlanan *A. pullulans* kolonilerinin, daha sonra ürettikleri melanin pigmenti nedeni ile kahverengi ya da siyah renge dönüştükleri, bu nedenle de siyah maya olarak da adlandırıldıkları ifade edilmektedir [20, 25, 26]. *A. pullulans*'ın, farklı pigmentasyon özelliklerine sahip varyetelerinin bulunduğu, *A. pullulans* var. *melanogenum* kolonilerinin, bir hafta içerisinde yeşil ya da siyah renge dönüştükleri, diğer varyetelerin ise; en az 1-2 hafta boyunca açık renkte kaldıkları rapor edilmiştir [20]. Renkli varyant olarak tanımlanan suşların, *A. pullulans*'ın tipik koloni görüntüsünden farklı olarak parlak kırmızı, sarı, pembe veya mor renkli koloniler oluşturabildikleri bilinmektedir. Bunun yanı sıra söz konusu suşların, melanin üretimlerinin daha düşük olduğu ve tipik koloni görüntüsü veren *A. pullulans* suşları ile DNA benzerliklerinin; %37-44 aralığında değiştiği ifade edilmektedir. Renkli varyantların yalnızca tropikal enlemlerden izole edildikleri de belirtilmektedir [12, 30].

A. pullulans'ın hücre morfolojisini inceleyen çalışmalarda, bu türün fenotipik plastisite özelliğine sahip olduğu rapor edilmektedir [31, 32]. Genel olarak bir organizmanın morfolojisi ile fizyolojik durum ve davranışını değiştirerek, çevresel sinyallere karşı cevap verebilmesi; "fenotipik plastisite" olarak adlandırılmaktadır [31]. *A. pullulans* suşlarının sahip oldukları fenotipik plastisite özellikleri nedeniyle, farklı çevresel koşullara dayanıklı oldukları belirtilmektedir [33]. *A. pullulans*'ın hücre morfolojisinin ortamın pH'ı, sıcaklığı ve ışık durumu ile ortamda bulunan karbon ve azot kaynakları, bunların derişimleri, ortamdaki oksijen derişimi ve kültürün yaşı gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği belirtilmektedir [26, 31].

Polimorfik bir fungus olan *A. pullulans*'ın, uzun, dallanmış ve septalı filamentler, büyük klamidosporlar ve daha küçük eliptik maya benzeri hücreler olmak üzere üç ayrı formunun bulunduğu ifade edilmektedir [12, 34]. Hif yapısının saydam, düz, ince duvarlı ve 2-16 µm genişliğinde olduğu, genellikle daha uzun hücrelerden oluştuğu; sert ve kompakt bir miselyum oluşturduğu belirtilmektedir. *A. pullulans*'a ait kompleks yaşam

döngüsünün 6 evreden oluştuğu belirtilmektedir [12]. Bunlardan ilki, blastosporlardan polar tomurcuklar ile yeni blastospor hücrelerinin oluşması olarak açıklanmaktadır. Birinci evrenin aksine, tomurcukların ana hücrelerden ayrılmadığı durumda ise, pseudomiselyum yapısının oluştuğu ve bu durumun ikinci evre olarak adlandırıldığı ifade edilmektedir. Üçüncü evrede ise, blastosporların daha sonra tomurcuklanacak veya çimlenecek olan ve şişmiş hücreler olarak da adlandırılan daha büyük hücrelere dönüştüğü rapor edilmektedir. Ortamda azot kaynağı olarak amonyum iyonlarının bulunduğu durumda bu evrenin desteklendiği ve şişmiş hücrelerin oluşumunun, inokülasyon derişimine de bağlı olduğu belirtilmektedir. Dördüncü evrede; daha sonra tomurcuklanacak, çimlenecek ya da klamidosporları oluşturacak şişmiş septalı hücrelerin oluştuğu ifade edilmektedir. Klamidosporların daha sonra miselyum oluşturacak şekilde çimlendikleri ve miselyumlardan da yeniden klamidosporların oluştuğu belirtilmektedir [12]. Bunun yanı sıra, blastosporlardan doğrudan miselyumların da oluşabileceği de rapor edilmektedir. *A. pullulans* hücrelerinin, morfolojik evreleri sırasıyla; maya benzeri hücre, genç blastospor, şişmiş blastospor ve miselyum oluşumu olarak sıralanmaktadır. *A. pullulans*'ın telemorf formunun olmadığı da belirtilmektedir [12].

A. pullulans'ın hücre morfolojisinin şişmiş hücre formundan klamidospor formuna dönüştüğünde, rengi koyu yeşil ile siyah arasında değişen melanin adı verilen bir pigment ürettiği belirtilmektedir [12, 35]. Melaninin, 1,8-dihidroksinaftalenden, pentaketid (poliketid) yol izi ile hem hücre içi hem de hücre dışı olarak sentezlendiği ifade edilmektedir [12, 36]. Genel olarak, melanin üreten organizmaların bu pigmenti kendilerini çevresel strese karşı korumak için ürettikleri rapor edilmektedir [37]. Melanin pigmentininin küf hücrelerini ozmotik stres, reaktif azot türleri ve reaktif oksijene karşı koruduğu ifade edilmektedir [38]. *A. pullulans*'ın melanin üretiminin; ortamdaki karbon ve azot kaynakları ile bunların derişimleri, oksijen derişimi ve iz mineraller gibi bazı fermentasyon parametrelerine bağlı olduğu rapor edilmektedir [36]. *A. pullulans* tarafından üretilen melaninin yaklaşık yarısının klamidospor formundaki hücrelerin duvarlarında depo edildiği, geri kalanının ise siyah granüller halinde ortama salındığı ifade edilmektedir. Melanin pigmentinin aseton, eter ve benzen gibi organik çözücülerde çözünmediği ve UV ışınlarına karşı oldukça dayanıklı olduğu belirtilmektedir. Melanin

pigmentinin varlığını ortaya koyan testlerden birinin; Nil mavisi ile pozitif reaksiyon vermesi olduğu rapor edilmektedir [12].

A. pullulans'ın endüstriyel öneme sahip birçok enzim ve metaboliti üretebildiği bilinmektedir. Söz konusu türün ürettiği enzimlerden bazılarının lipaz, amilaz, selüloz, ksiliniz, proteaz, laktaz, mannaz, β -glukosidaz, pektinaz, β -fruktofuranosidaz, glukoz oksidaz ve glukanaaz olduğu belirtilmektedir. *A. pullulans*'ın ayrıca, 2-metilbütanoik asit, 3-metil-1-bütanol ve etil oktanat gibi aroma bileşikler, poli-(β -L-malik asit) gibi poliesterler ve düşük molekül ağırlığına sahip, demir bağlayıcı molekül olarak tanımlanan siderofor ürettiği bilinmektedir [25, 28]. Son yıllarda sideroforun biyoteknolojik alanda oldukça önem kazandığı ifade edilmektedir. Söz konusu demir şelatının ayrıca, sağlık, tarım, kozmetik ve çevre gibi alanlarda da çeşitli uygulamalarının olduğu belirtilmektedir [39].

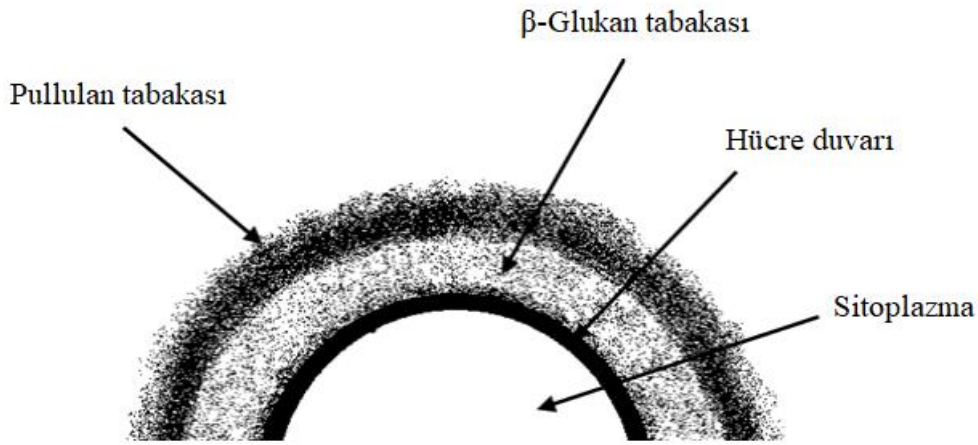
A. pullulans'ın, tek hücre proteini kaynağı olarak da kullanılabilmesinin yanısıra, bu türe ait suşların bazı antimikrobiyel bileşenler üretebildiği de ifade edilmektedir. *A. pullulans* suşlarının aureobasidin olarak adlandırılan, bir grup antifungal metaboliti üretebildiği rapor edilmektedir [28]. Söz konusu türün, zenobiyotikler ve kompleks bazı doğal molekülleri parçalayabildiği ve ayrıca, ağır metalleri bünyesinde biriktirebildiği, bu özellikleri nedeniyle de, biyolojik iyileştirme işlemlerinde kullanılabileceği ifade edilmektedir [22].

A. pullulans'ın biyoteknolojik öneme sahip en önemli metabolitinin; pullulan olduğu rapor edilmektedir. *A. pullulans*'ın hücre dışı polimer üretiminin ilk kez 1938 yılında Bauer tarafından keşfedildiği, 1958 yılında ise, Bernier tarafından bu polisakkaritin tanımlandığı ifade edilmektedir. 1959'da Bender ve ark.'nın [40], *A. pullulans* tarafından üretilen polisakkariti pullulan olarak adlandırdıkları, 1960'lı yılların başlarında ise, pullulanın yapısının ortaya konulduğu rapor edilmektedir. 1961'de, Bender ve Wallenfes'in, pullulan molekülünde bulunan α -(1-6) bağlarını kırarak, pullulanı maltotrioz ünitelerine dönüştüren pullulanaz enzimini keşfettikleri bildirilmektedir.

A. pullulans'ın pullulan üretiminin, hücre duvarı ya da hücre zarında gerçekleştirildiği ve daha sonra bu ekzopolisakkaritin dışarıya, gevşek ve yapışkan bir tabaka halinde

salgılandığı ifade edilmektedir [23, 41]. Pullulanın, *A. pullulans*'ın yanı sıra, *Aureobasidium mausonii*, *Tremella mesenterica*, *Cytaria hariatii*, *Cytaria darwinii*, *Teloschistes flavicans*, *Rhodotorula bacarum*, *Cryphonectria parasitica* ve *Rhodospiridium paludigenum* tarafından da üretilbildiği rapor edilmektedir [42–44].

A. pullulans tarafından üretilen diğer bir ekzopolisakkaritin; glukoz ve mannozdan oluşan, suda çözünmeyen ve jel benzeri bir yapıya sahip olan; β -(1→3) glukoz olduğu bildirilmektedir. *A. pullulans* tarafından hücrede üretilen pullulan ve β -(1→3) glukozun, daha sonra Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, hücre duvarı üzerine tutunduğu ifade edilmektedir [45].



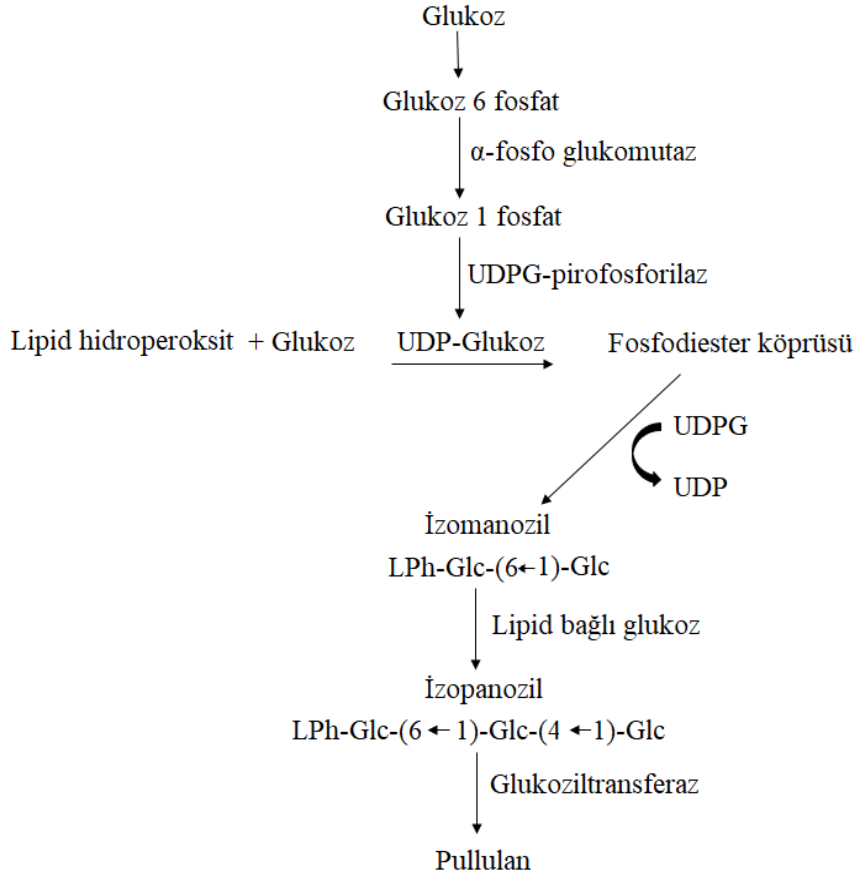
Şekil 2.1. *A. pullulans* hücrelerinin dış yüzeyindeki polisakkarit tabakaları

Yapılan araştırmalar, *A. pullulans* tarafından gerçekleştirilen pullulan sentezinin çeşitli mekanizmalarla açıklanabildiğini, ancak bu konuda halen bilinmeyen noktaların mevcut olduğunu ortaya koymaktadır. Glukozdan pullulan biyosentezi sırasında rol oynayan üç anahtar enzimin; α -fosfo glukomutaz, üridin difosfo glukoz pirofosforilaz (UDPG-pirofosforilaz) ve glukoziltransferaz oldukları ifade edilmektedir [41].

A. pullulans suşlarının pullulan sentezi amacıyla kullandıkları başlıca karbon kaynakları arasında glukoz, sakkaroz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, mannoz ve maltozun bulunduğu belirtilmektedir [41, 46]. *A. pullulans*'ın glukoz dışındaki diğer karbon kaynaklarını kullanarak pullulan sentezlediği durumlarda; bu karbon kaynaklarını hekzokinaz ve

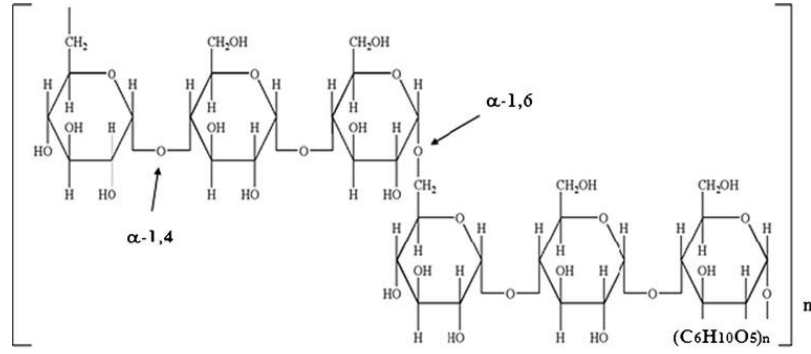
izomeraz enzimleri ile pullulan öncülü olan; üridin difosfoglukoz (UDPG)'a dönüştürdüğü ifade edilmektedir [41, 47]. Pullulan sentezinde glukozun kullanılması durumunda ise önce, α -fosfo glukomutaz enzimi yardımıyla glukoz-6-fosfattan, glukoz-1-fosfat oluştuğu, daha sonra ise; glukoz-1-fosfattan, UDPG-pirofosforilaz enzimi ile, pullulan öncülü olan; UDPG sentezlendiği rapor edilmektedir. Pullulan biyosentezinin bundan sonraki aşamasında ise; UDPG'daki glukozil-1-fosfatın, lipid hidroperoksit ile bağlanması sonucunda; fosfodiester köprüsünün oluştuğu belirtilmektedir. Elde edilen bu yapıya UDPG'de yer alan diğer glukoz birimlerinin bağlanması ile, lipid molekülü bağlı izomaltoz birimlerinin oluştuğu, elde edilen izomaltoz ile lipid bağlı glukozun tepkimeye girmesi sonucunda ise; izopanozil ara ürününün meydana geldiği ifade edilmektedir. Pullulan sentezinin son aşamasında ise; izopanozilin, glukozil transferaz enzimi ile polimerizasyonu sonucunda, pullulan zincirinin oluştuğu rapor edilmektedir. *A. pullulans*'ın pullulan sentez mekanizmasının, mikroorganizmanın karmaşık fizyolojik ve sitolojik özellikleri nedeniyle, halen tam olarak anlaşılmadığı belirtilmektedir. Pullulan biyosentezine ait olası yol izi; Şekil 2.2'de verilmektedir [47].

Pullulanın, hücrede logaritmik üreme evresinin sonunda üretilmeye başladığı, durağan evrede ise, pullulan üretiminin yüksek derişimlere ulaştığı rapor edilmektedir [48, 49]. Bununla birlikte, logaritmik üreme evresinin başlangıcında pullulan üretiminin gerçekleştirildiğini rapor eden bir çalışma da mevcuttur [49]. Substrat kaynağı olarak palmiye şekerinin kullanıldığı söz konusu çalışmada, fermantasyonun kesikli bir sistemde gerçekleştirildiği ve pullulan üretim koşullarının optimizasyonunun hedeflendiği belirtilmiştir. Bu araştırmada kullanılan *A. pullulans* MTCC 2195 suşunun fermantasyon ortamındaki adaptasyon (lag) evresinin oldukça kısa olduğu, logaritmik üreme evresinin başında hücrelerin pullulan üretimine başladıkları ve hücre üremesi ile pullulan üretiminin aynı anda gerçekleştiği rapor edilmiştir [49].



Şekil 2.2. Pullulan biyosentezi

Kimyasal formülü $C_6H_{10}O_5$ olan pullulanın molekül yapısı; Şekil 2.3’de yer almaktadır [41, 50]. Dallanmamış bir yapıya sahip olan pullulan, tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşmaktadır. Yapıda, maltotrioz birimleri birbirlerine, α -(1→6) bağları ile bağlanmaktadır. Maltotrioz birimlerini oluşturan üç glukoz molekülünün ise, birbirlerine α -(1→4) bağları ile bağlı oldukları bilinmektedir [47, 51, 52]. Pullulanın yapısında bulunan bu α -(1→6) ve α -(1→4) bağlarının söz konusu polimere, yapısal esneklik ve suda çözünme özellikleri kazandırdığı ifade edilmektedir [25, 52]. Pullulanın yapısında ayrıca, düşük oranda α -(1→3) bağlarının ve maltotetraoz birimlerinin de yer aldığı bildirilmektedir. (1-6)- α -D-pullulanaz ve (1-4)- α -D-pullulanaz enzimleri ile hidrolize edilebilen pullulanın sırasıyla; maltotrioz ve izoponaza parçalandığı ifade edilmektedir.



Şekil 2.3. Pullulanın molekül yapısı

Beyaz renkli, tatsız ve kokusuz olan pullulanın, su ve seyreltik alkali çözücülerde çözünemediği ancak, dimetilformamid ve dimetilsülfoksit dışındaki diğer organik çözücülerde ise, çözünemediği belirtilmektedir [53, 54]. Söz konusu polimerin Cu^{+2} iyonu ile kompleks oluşturduğu, iyot (I_2) ile ise, renk reaksiyonu vermediği de ifade edilmektedir [55].

Pullulanın polimerizasyon derecesinin; 100-5000, molekül ağırlığının ise yaklaşık; 1.5×10^4 - 1.2×10^7 Da arasında değiştiği bilinmektedir. Ortalama molekül ağırlığı 2×10^5 Da'un altında olan pullulan örneklerinin düşük molekül ağırlıklı olarak nitelendirildikleri belirtilmektedir [56]. Ticari olarak, yüksek molekül ağırlıklı pullulanın tercih edildiği ancak, düşük molekül ağırlıklı pullulanın kullanıldığı bazı uygulamaların da bulunduğu ifade edilmektedir [56, 57]. Pullulanın molekül ağırlığının, elde edildiği *A. pullulans* suşuna, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ına, kullanılan fermentasyon tekniğine, kullanılan substrata, fermentasyon ortamının bileşimine, ortamdaki oksijen derişimine ve fermentasyon süresine bağlı olarak değişebildiği belirtilmektedir [41, 47, 56, 58]. Pullulanın yapısının, 250-280°C'lerde bozunduğu rapor edilmektedir. Toksik, mutajenik ve karsinojenik olmayan pullulanın, biyoçözünür özellikte ve insan vücudunda yavaş sindirilebilen bir polimer olduğu bilinmektedir [2, 6].

Pullulan sahip olduğu çeşitli özellikleri nedeniyle oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu biyopolimerin eczacılık, gıda, biyomedikal ve kozmetik endüstrilerinde birçok amaçla kullanıldığı bilinmektedir [7]. Pullulanın Amerika'da, Mart/2002 tarihinden beri, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından "Generally Recognized As Safe (GRAS)" (GRN 000099) sınıfında

değerlendirildiği bildirilmektedir. Japonya’da, pullulanın, 30 yıldan uzun bir süredir çeşitli alanlarda kullanıldığı, bu süre içerisinde de herhangi bir yan etkisinin belirtilmediği rapor edilmektedir [11]. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından pullulanın, Japonya’daki kişi başına düşen ortalama günlük tüketiminin yaklaşık; 10 g olduğu tahmin edilmektedir [11, 51, 59]. 2015 yılında, dünyadaki en yüksek pullulan tüketiminin; 667 MT olarak Japonya’da gerçekleştiği, bunu sırasıyla; Çin ve Amerika Birleşik Devletleri’nin izlediği rapor edilmektedir [60]. 2015 yılında, dünya genelinde, üretilen pullulanın %40.74’ünün eczacılık endüstrisinde, %36.24’ünün ise, gıda endüstrisinde kullanıldığı ifade edilmektedir [60]. Son beş yıl içerisinde pullulanın dünya pazarındaki yıllık bileşik büyüme oranının (Compound Annual Growth Rate, CAGR) yaklaşık %2.2 olacağı ve 2017’de 120 milyon dolar değerinde olan pullulan üretiminin, 2023 yılında; 130 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir [61]. Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde, pullulan için belirtilen EC numarasının; 232-945-1 ve E kodunun ise; E1204 olduğu bildirilmektedir. AB ülkelerinde, pullulanın kapsül, tablet ve filmlerde gıda katkı maddesi olarak kullanımına ilişkin esasların, AB 231/2012 sayılı komisyon tüzüğü tarafından düzenlendiği rapor edilmektedir [11]. Rusya, Çin, Kore, Tayvan, Tayland, Singapur, Vietnam ile Arjantin, Brezilya, Paraguay ve Uruguay gibi Latin Amerika ülkelerinde de pullulanın kullanımına izin verildiği belirtilmektedir [11]. Ülkemizde ise, pullulanın kullanım esasları, Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Tebliği ile düzenlenmiş olup, bu biyopolimerin kullanımına; kapsül ve tablet formundaki takviye edici gıdalar (bebek ve küçük çocuklar için kullanılan takviye edici gıdalar hariç) ve nefes tazeleyici mikro şekerlerin bileşimlerinde, herhangi bir maksimum seviye belirtilmeden (quantum satis) izin verilmektedir [10].

Pullulana ait pazarda, gıda endüstrisinin önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir [62]. Bu polimerin nişasta gibi kıvam arttırıcı ve suda çözünebilir özellikte olduğu, su tutma kapasitesinin yüksek olduğu, bu nedenle de katı ve sıvı gıdalarda nişasta ikamesi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir [53]. Pullulanın yaygın olarak sos ve bazı içeceklerde viskozite sağlayan katkı maddesi olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Söz konusu biyopolimerin ayrıca, macun kıvamındaki gıdalarda stabilizör, tutucu ve birleştirici olarak görev yaptığı rapor edilmektedir [6]. Bunlara ek olarak, pullulanın yağ emülsiyonlarının stabilizasyonlarında yağ ve kolesterol ikamesi olarak kullanılabileceği

de ifade edilmektedir [53]. Pullulanın, mayonezlerde katkı maddesi olarak kullanıldığında ürünün kalite ve yapısını stabilize edebileceği bildirilmiştir [6].

Pullulanın, pullulanaz enzimi ile parçalanması sonucunda üretilen maltoz şurubunun, diğer şeker şuruplarına göre düşük donma noktasına sahip olması, gıdalardaki nişastanın retrogradasyonunu önlemesi, su tutma kapasitesinin yüksek olması, doğal şeker tadına sahip olması ve ısıya dayanıklı olması gibi avantajları nedeniyle, çeşitli gıdalarda kullanımının yaygınlaştığı ifade edilmektedir [63].

Pullulanın gıdalarda bozulmalara yol açan bakteri, küf ve mayalar tarafından kolaylıkla asimile edilebilen bir karbon kaynağı olmaması nedeni ile, gıdaların raf ömrünü uzatmada yararlı olduğu belirtilmektedir. Nişastadan daha yüksek su tutma kapasitesine sahip olan pullulanın, gıdaların bozulmalarını geciktirdiği de belirtilmektedir [53].

Gıda endüstrisinde pullulanın, ambalaj materyali olarak da kullanıldığı ifade edilmektedir [64]. Pullulanın düşük derişimlerdeki çözeltilerinin bile, yüksek viskoziteye sahip olmalarının, bu biyopolimerin film ve kaplama materyali olarak kullanılmasını sağladığı ifade edilmektedir [65]. Pullulan ile üretilen filmlerin şeffaf olmalarının yanısıra, oksijen ve yağ geçirgenliklerinin olmadığı ve iyi mekanik özelliklere sahip oldukları bilinmektedir [7, 53]. Pullulan filmlerin, söz konusu özellikleri nedeniyle, gıdada kolayca oksitlenen yağ ve vitaminlerin oksidasyonunu önlediği de rapor edilmektedir [53]. Bu filmlerin ağızda hemen erimeleri nedeniyle, yenilebilir film olarak nitelendirildikleri belirtilmektedir. Bunların yanısıra, pullulanın aroma maddeleri ve baharat için enkapsülasyon ajanı olarak kullanılabileceği de rapor edilmektedir [66].

Pullulanın vücutta yavaş sindirilmesi nedeni ile, kandaki glukoz seviyesini kademeli olarak yükselttiği belirtilmektedir. Bu biyopolimerin şeker hastaları için formüle edilen diyet yiyeceklerine ilave edilebileceği ifade edilmektedir. Ayrıca pullulanın, glukoz intoleransı olan hastalar için faydalı olduğu da belirtilmektedir [53]. Prebiyotik özellikte olan pullulanın, insan bağırsağındaki faydalı bifidobakterilerin gelişmelerini desteklediği ifade edilmektedir. Söz konusu polimerin insanlar için diyet lifi olarak kullanılabileceği rapor edilmektedir [7, 41].

Gıda endüstrisi dışında pullulanın; diş protezlerinde yapıştırıcı ajan olarak, kontrollü salınım özelliği gösteren ilaçlarda kaplama materyali olarak, vejeteryanlar, diyabet hastaları ve kısıtlı diyetleri olan hastaların beslenme gereksinimlerini karşılamak için kullanılan kapsüllerde (örneğin; Capsugel firmasının NPcaps® kapsülleri) jelatin yerine kullanıldığı bildirilmektedir [41, 45, 67, 68]. Leung ve ark. [69] tarafından yapılan bir çalışmada; pullulanın timol, metil salisilat, ökaliptol ve mentol gibi antimikrobiyel ajanlar ile birlikte kullanılmasıyla çeşitli yenilebilir filmler oluşturulduğu ve elde edilen bu filmlerin dişlerde plak oluşumunu, diş eti iltihabını ve kötü nefes kokularını engelleyebildiği rapor edilmiştir.

Pullulanın ince film oluşturabilme özelliği, şeffaflığı, nem tutma kapasitesi, suda çözünme ve yapışkanlık özellikleri nedeniyle kozmetik endüstrisinde de geniş bir uygulama alanına sahip olduğu ifade edilmektedir. Bu biyopolimerin toksik özellik taşıyamaması ve vücuda zararlı bir etkisinin olmaması nedeni ile, kozmetik alanında şampuan, saç kremi, çeşitli kremler, göz bakım ürünleri, losyonlar ve diş macunları bileşimlerinde kullanıldığı belirtilmektedir [3].

Pullulanın biyomedikal uygulamalar kapsamında; gen terapisinde, aşı üretiminde, kanser hücrelerinin görüntülenmesinde, moleküler şaperon olarak, kan plazmasını çoğaltmak amacı ile dekstran yerine ve kanser tedavisinde kullanılan karbon nanotüplerin salınımlarında da kullanılma olanaklarının araştırıldığı rapor edilmektedir [1].

Pullulanın kullanım alanları arasında; naylon ve rayon üretimi, elektronik, kromotografik, fitografik ve litografik uygulamalar ile, immobilizasyon uygulamaları olduğu da bildirilmektedir. Pullulanın ayrıca, baskı parlaklığı, yapışkanlık kuvveti ve viskozite stabilitesi açısından iyi özelliklere sahip bir kağıt kaplama malzemesinin bileşiminde de kullanıldığı ve söz konusu polimerin kağıt kaplama yapıştırıcısı olarak mükemmel özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir [53]. Pullulanın bazı kullanım alanları; Çizelge 2.1’de, toplu olarak gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Pullulanın bazı kullanım alanları

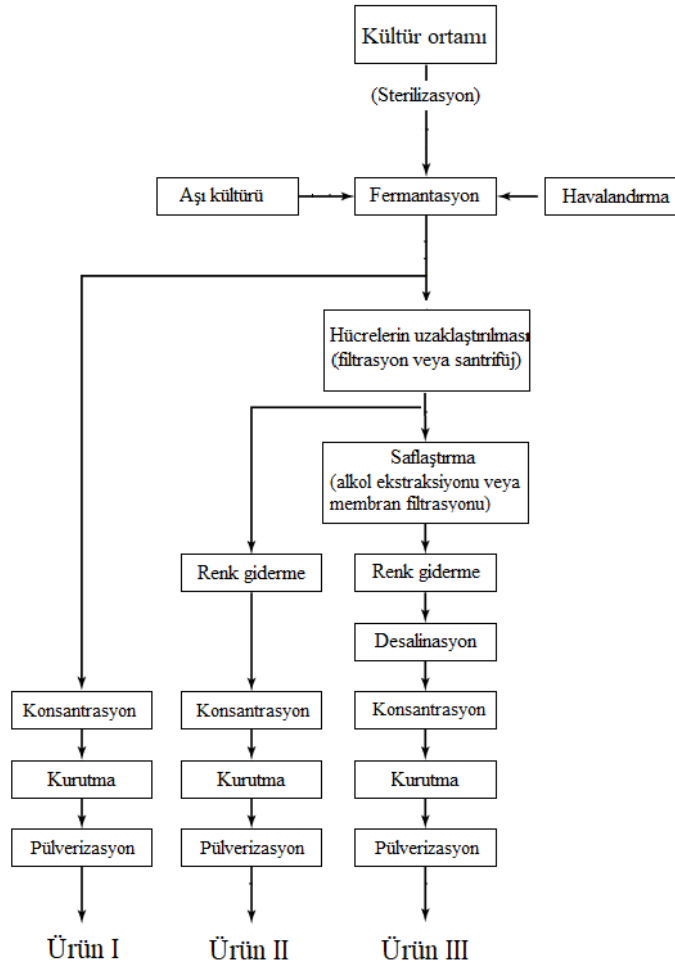
Endüstri	Kullanım amacı	Endüstri	Kullanım amacı
Gıda	Kıvam arttırıcı [1, 6, 65] Nişasta ikamesi Köpük yapıcı [17] Parlatıcı [1, 8, 11, 17, 70] Nano paket üretimi [17] Yenilebilir film üretimi [17] Nem tutucu [11, 71] Kaplama materyali üretimi [64, 70, 72, 73] Diyet lifi [6, 64] Düşük viskoziteli dolgu ajanı [4, 52, 53, 74] Stabilizör [71] Tutucu ve birleştirici ajan [53, 68, 75, 76]	Biyomedikal	Kanser terapisi [54, 68, 77] Aşı üretimi [53, 68] Moleküler şaperon [74] Kuantum noktaları ile birlikte medikal görüntüleme [6, 8, 74, 78] Doku mühendisliğinde yüzey modifikasyonu [1, 6, 16, 74, 79] Yapay organ üretimi [17] Gen terapisi [1, 54] Plazma expander [8, 53, 54, 68, 74, 80]
Endüstri	Kullanım amacı	Endüstri	Kullanım amacı
Eczacılık	Kapsül kaplama [54, 74] Kontrollü ilaç salınımında taşıyıcı [8, 30, 54, 67] Ağız bakım ürünleri üretimi [11, 53, 54, 68, 71, 81] Lipozom salınımı [47] Bazı kozmetik ürünlerin üretimi [6, 28, 82, 83] Kontakt lenslerin üretimi [6, 84, 85]	Diğer	Rayon ve naylon üretimi [81] Kağıt üretimi [53] Elektronik uygulamalar [86] Fotografik uygulamalar [86] Litografik uygulamalar [86] Enzim tutuklama [53] Çevre koruması [41] Elektroforez jeli üretimi [41, 87] Kromotografi jeli üretimi [53, 88] <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus subtilis</i> bakterilerinin tutuklanmalarında taşıyıcı materyal [47, 89] Endüstriyel flokülant

Pullulan üretiminin ticari olarak ilk kez 1976 senesinde, Okayama’da bulunan ve halen aktif olan bir Japon firması; Hayashibara tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Hayashibara’nın, pullulan üretiminde kullandığı fungusun üreme koşullarını ayarlayarak, belirli molekül ağırlığı ve özelliklere sahip pullulan ürünlerini elde edebildiği ifade

edilmektedir. Bu firma tarafından üretilen pullulanın; 100 000 veya 200 000 ortalama molekül ağırlığına sahip, gıda niteliğinde veya deiyonize ürünler oldukları belirtilmektedir. Pullulan filmlerin Hayashibara tarafından, 1982 yılında ticarileştirildiği ifade edilmektedir. Hayashibara Biyokimyasal Laboratuvarı (HBL)'nin, Pfizer firmasına, patenti kendisine ait olan pullulanı içeren film bazlı ağız bakım ürünlerinin ticari olarak üretilmesi ve pazarlanması için, dünya çapında bir lisans verdiği de belirtilmektedir. Pfizer'ın pullulan içeren film formundaki bir ağız bakım ürününü ilk kez, Listerin adı altında, Kanada'da piyasaya sürdüğü ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra HBL'nin, Pfizer'ın alt kuruluşu olan Warner-Lambert firmasına da, pullulan tedarik ettiği belirtilmektedir [12]. Pullulan üreticisi diğer ticari firmalar arasında; NOF Corporation (ABD), Advanced Enzyme Technologies Ltd. (ABD), Yushisein Co. Ltd. (Japonya), Sanging Biological Products (Japonya), Meihua Group (Çin), Kumar Organic Products Ltd. (Hindistan), Shangdong Kangnaxin Biotechnology Co., Ltd. (Çin), Shangdong Freda Biotechnology Co., Ltd. (Çin), Hebei Henbo Bio Technology Co., Ltd (Çin) ve Shangdong Jinmei Biotechnology Co., Ltd. (Çin) gösterilmektedir [52, 60].

Ticari pullulan üretiminin kesikli sistemde, derin kültür yöntemi ile gerçekleştirildiği ve substrat olarak; dekstran eşdeğeri %40-50 olan, %10-15 derişimde nişasta hidrolizatının kullanıldığı bildirilmektedir [36]. Fermantasyon ortamında ayrıca; pepton, fosfat ve bazı bazal tuzların da bulunduğu ve ortamının başlangıç pH'ının 5-6.8 olduğu belirtilmektedir [1]. Üretimde; aşı kültürünün, mutant suşlar olan; *A. pullulans* AHU 9553, *Dematium pullulans* IFO 4464 veya *Pullularia fermentans* var. *fermentans* IFO 6401 suşları ile hazırlandığı bildirilmektedir [36]. Fermantasyonun, yüksek viskoziteye sahip fermantasyon ortamının yeterli şekilde havalandırılmasını ve karıştırılmasını sağlamak için özel olarak dizayn edilmiş kesikli bir fermentör sisteminde, yaklaşık dört gün sürdüğü ifade edilmektedir. Üretimde; sıcaklığın 30°C'de sabit tutulduğu, havalandırma hızının ise, 0.5 vvm olduğu bildirilmektedir [36]. Fermantasyon sırasında pH'ın ilk gün hızlı bir şekilde 3.5'e kadar düştüğü, daha sonra ise yaklaşık bu değerde sabit kaldığı belirtilmiştir. Hücre üremesi ve pullulan sentezinin, bu pH'da gerçekleştiği, pullulan ve biyokütle derişimlerindeki artışların fermantasyon boyunca devam ettiği rapor edilmiştir. Üretilen pullulanın molekül ağırlığının, fermantasyonun erken aşamalarında; 2 000 000-3 000 000'a kadar ulaştığı, fermantasyonun sonlarında ise keskin bir şekilde azaldığı ifade

edilmektedir. Bu azalmanın, fermantasyon süresince mikroorganizma tarafından sentezlenen, pullulanı parçalayan bir enzimin etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir [36]. Pullulanın ticari olarak üretiminde, fermantasyon aşaması sonrasında kullanılan yöntemin, istenilen ürünün özelliklerine bağlı olarak seçildiği rapor edilmektedir. Pullulanın ticari üretimine (Hayashibara) ilişkin akım şeması; Şekil 2.4’de verilmektedir [36].



Şekil 2.4. Pullulan üretim akım şeması

Hayashibara firması tarafından üretilen pullulanın, fermantasyon ortamından geri kazanımı ve saflaştırılması için gerekli olan işlemlerin, bu biyopolimerin farklı spesifik uygulamalar için istenen kalitesine bağlı olduğu vurgulanmıştır [36]. Proses akım şemasında “ürün I” olarak tanımlanan pullulanın, ham pullulan olduğu ve endüstride yapıştırıcı, dispersant ve koagülant olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Söz konusu

şekilde; “ürün II” olarak gösterilen pullulanın; mikroorganizma hücreleri ve melanin pigmenti içermediği ancak fermantasyon ortamındaki mineral tuzları özellikle de; sodyum klorürü içerdiği ve bu ürünün, gıda endüstrisi de dahil olmak üzere, farklı endüstri dallarında hammadde olarak kullanılabildiği ifade edilmektedir. Üretim akım şemasında, “ürün III” olarak adlandırılan pullulanın bileşiminde ise; mikroorganizma hücreleri, renk maddesi ve mineral tuzların yer almadığı, bu ürünün yüksek saflıkta, beyaz toz formunda olduğu ve biyofilm yapımında kullanıldığı belirtilmektedir (Şekil 2.4).

Pullulan üretiminde, fermantasyon sonunda *A. pullulans* hücrelerinin kültür ortamından filtrasyon ile, melanin pigmentinin ise, aktif kömür uygulaması ile uzaklaştırıldığı belirtilmektedir. Üretilen pullulanın genellikle alkol ekstraksiyonu ile fermantasyon ortamından alındığı ve daha sonra saflaştırmanın ise, ultrafiltrasyon ve iyon değiştirici reçineler kullanılarak gerçekleştirildiği ifade edilmektedir [1].

Fermantasyon yoluyla pullulan üretiminin genel olarak; kullanılan suşa ve suşun morfolojik durumuna, uygulanan fermantasyon tipine ve işletme koşullarına bağlı olduğu bildirilmektedir [41, 47]. Bilinen en iyi pullulan üreticisi tür *A. pullulans* olsa da, bu türün bütün suşlarının pullulan sentezleyemediği rapor edilmektedir [17]. Pullulan üreticisi *A. pullulans* suşlarının morfolojik formları ile pullulan üretimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya yönelik çalışmalar olmasına rağmen, bu konunun halen tartışıldığı da bilinmektedir [41]. Yapılan bir araştırmada, pullulan üretiminin maya benzeri hücreler tarafından gerçekleştirildiği rapor edilirken; şişmiş hücrelerin ve klamidosporeların pullulan üretiminde yer alan hücre formları olduğunu ortaya koyan bazı çalışmalar da bulunmaktadır [90–92]. Singh ve ark. [65] tarafından yapılan bir çalışmada da pullulan üreticisi hücre formunun maya benzeri hücreler olduğu vurgulanmaktadır.

Pullulan üretiminin kesikli, beslemeli kesikli veya sürekli sistemlerde, serbest ya da immobilize hücreler kullanılarak gerçekleştirilebileceği ifade edilmektedir. Serbest *A. pullulans* hücreleri ile kesikli sistemlerde gerçekleştirilen pullulan üretiminin, en sık kullanılan yöntem olduğu belirtilmektedir [36]. Immobilize hücre reaktörünün, biyokütle veriminin artırılması amacıyla kullanıldığı, *A. pullulans* hücrelerinin tutuklanmaları amacıyla yaygın olarak; agar, kalsiyum aljinat, karregen ve agaroz gibi taşıyıcıların

kullanıldığı rapor edilmektedir. Bu tür reaktörlerde, pullulan veriminin difüzyonel sınırlamalar nedeniyle, klasik reaktörlere kıyasla çok daha düşük olduğu da belirtilmektedir [47].

Kesikli sistemlerde hücre gelişimi ve ürün oluşumu için gerekli olan tüm bileşenlerin, kapalı bir sistemde hazır olduğu, ortamdaki substrat, sisteme aşıl原因an mikroorganizma tarafından tamamen tüketildikten sonra fermantasyonun sonlandığı ifade edilmektedir [36]. Kesikli sistemlerde derin fermantasyon ile pullulan üretiminin, fermantasyon ortamının bileşimi, özellikleri ve reolojisi ile karıştırma hızı gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği ifade edilmektedir [47]. Yüksek karıştırma hızının, hücreler üzerinde hasara neden olabildiği belirtilmektedir. Derin fermantasyonda etkili havalandırma, uygun bir karıştırma hızı ve düşük kayma hızının maya benzeri *A. pullulans* hücrelerinin üremelerini desteklediği ve buna bağlı olarak da; pullulan üretimini arttırdığı rapor edilmektedir. Derin fermantasyonla pullulan üretiminde, EPS üretimine bağlı olarak fermantasyon ortamının viskozitesinin yükseldiği ve buna bağlı olarak da, *A. pullulans*'ın oksijen ihtiyacının arttığı ifade edilmektedir [47].

Kesikli sistemlerde pullulan üretimi amacıyla, katı hal fermantasyonunun da kullanılabildiği belirtilmektedir [93–96]. Katı hal fermantasyonunda ortam olarak çoğunlukla; gıda endüstrisi atık ve yan ürünleri ile tarımsal atıkların kullanıldığı rapor edilmektedir [95–98]. Kesikli sistemlerde, katı hal fermantasyonunun derin kültür fermantasyonuna göre bazı üstünlüklerinin olduğu belirtilmektedir. Katı hal fermantasyonunda su ve enerji gereksinimlerinin daha düşük olduğu ve daha düşük maliyetli ürün üretilbildiği rapor edilmektedir. Bununla birlikte pullulan üretimi için, katı hal fermantasyonu ile yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olduğu ifade edilmektedir. Fermantasyon ortamında kullanılan substratın, ortam bileşenlerinin, partikül büyüklüklerinin ve fermantasyon ortamındaki nem miktarının katı hal fermantasyonu ile metabolit üretimini önemli ölçüde etkileyen parametreler oldukları rapor edilmektedir [47]. Fermantasyon ortamındaki nem miktarının, hücre büyüme hızını ve metabolik aktiviteyi etkilediği ifade edilmektedir. Düşük porozite ve boşluk hacmine bağlı olarak, yüksek nem oranının oksijen taşınım hızını düşürdüğü belirtilmektedir. Bununla birlikte düşük nem oranının ise, fermantasyon ortamındaki substratın taşınımını olumsuz yönde

etkilediği ifade edilmektedir. Katı hal fermantasyonunda, partikül büyüklüğü küçük olan bir substratın kullanılması durumunda; özgül yüzey alanının büyük olması nedeniyle, mikrobiyel tutunmanın iyi olacağı, ancak bu durumda substrat topaklanmasının gerçekleşebileceği belirtilmektedir. Kullanılan substratın özgül yüzey alanının büyük olmasının, boşluk hacmi ve havalandırma hızının düşmesine, bu nedenle de metabolit üretiminin azalmasına sebep olacağı ifade edilmektedir [47].

Kesikli sistemlerde pullulan verimi ve oluşum hızının düşük olması nedeniyle, pullulan üretiminde, beslemeli kesikli ve sürekli sistemlerin de kullanıldığı bildirilmektedir [86]. Genel olarak beslemeli kesikli sistemlerde, fermantasyon kesikli olarak başladıktan hemen ya da belirli bir süre sonra, bir ya da birden fazla bileşenin sürekli veya belirli aralıklarla ortama beslendiği ancak, sistemden kültür çıkışının olmadığı bilinmektedir [99, 100]. Pullulan üretiminde, beslemeli kesikli fermantasyon yönteminin özellikle ürün verimini arttırmak için kullanıldığı belirtilmektedir [45]. Youssef ve ark. [100] tarafından yapılan bir araştırmada, kesikli ve beslemeli kesikli sistemlerde, *A. pullulans* P56 suşunun, pullulan üretim özelliklerinin incelendiği bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, beslemeli kesikli sistemin klasik kesikli sistem ile kıyaslandığında bazı üstünlüklerinin olduğu, bunların arasında da; çözünmüş oksijenin daha fazla olması, yüksek verimlilik ve daha kısa fermantasyon süresi olduğu ifade edilmiştir [100]. Yapılan bir başka çalışmada, yüksek substrat derişiminin, pullulan üretiminde yer alan glukotransferaz, α -fosfoglukoz mutaz ve UDPG-pirofosforilaz enzimlerini baskıladığı, buna bağlı olarak da; pullulan verimini azalttığı ifade edilmiştir. Bu sorunun, beslemeli kesikli sistemlerde sınırlandırıcı substratın, fermantasyon ortamına aralıklı olarak, düşük derişimlerde beslenmesi ile önlenebileceği belirtilmiştir [47].

Sürekli sistemlerde, tüm bileşenleri içeren fermantasyon ortamının sabit bir hızla (seyrelme hızı) sisteme sürekli olarak beslendiği, aynı zamanda fermentör içindeki kültürün de aynı hızla sistemden ayrıldığı ifade edilmektedir [36]. Kemostat olarak kontrol edilen sürekli bir sistemde seyrelme hızının, pullulan üretimini etkileyen önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir. Pullulan fermantasyonunda sürekli sistemin kullanıldığı ilk çalışmanın; Schuster ve ark. tarafından 1993 yılında gerçekleştirildiği

rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, kesikli ve sürekli sistemlerde mutant *A. pullulans* P56 suşunun üreme ve pullulan üretim özelliklerinin incelendiği belirtilmiştir [47, 101].

Hafez ve ark. [102] tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, beslemeli kesikli ve sürekli sistemlerde, *A. pullulans* ATCC 42023 suşunun pullulan üretim özelliklerinin, karşılaştırmalı olarak incelendiği bildirilmiştir. Sürekli sistemde gerçekleştirilen pullulan üretiminin 2L'lik çalışma hacminde ve pH'ı 5.5 olan bir ortamda, 1.0 vvm havalandırma hızı, 700 rpm çalkalama hızı ve 28°C'de gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Bu araştırmada, fermantasyon başladıktan 72 saat sonra, taze besiyerinin sisteme 20-80 mL/sa arasındaki akış hızıyla beslendiği, seyrelme hızının ise; 0.01-0.04 sa⁻¹ arasında değiştiği ifade edilmiştir. Söz konusu araştırmada en yüksek pullulan verimliliğinin; 0.896 g/Lsa olarak, 0.03 sa⁻¹ seyrelme hızına sahip sürekli sistemde, en yüksek pullulan derişiminin ise; 88.8 g/L olarak beslemeli kesikli sistemde elde edildiği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, sürekli sistemde elde edilen pullulan veriminin, beslemeli kesikli sisteme göre 1.5 kat daha fazla olduğu da vurgulanmıştır [102].

Başka bir araştırmada ise, topraktan izole edilmiş olan 10 adet *A. pullulans* suşu arasından seçilen, pullulan üretimi en yüksek bulunan; *A. pullulans* AUMC 2997 suşu ile çalışıldığı ve sürekli fermantasyon sisteminin kullanıldığı deneylerde, pullulan üretiminin optimizasyonunun gerçekleştirildiği belirtilmiştir [85]. Söz konusu araştırmada fermantasyon deneylerinin; 2L hacmindeki bir ortamda, 24°C'de, 500 rpm çalkalama hızında, pH 3-9 aralığında, 1-5 vvm arasındaki havalandırma hızında ve 1-3 L/24 sa arasındaki akış hızı aralığında gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Çalışmada en yüksek pullulan derişiminin pH'nın; 5.0, havalandırma hızının; 2.5 vvm ve akış hızının; 1 L/24 sa olduğu işletme koşullarında; 10.18±0.04 g/L olarak elde edildiği belirtilmiştir [85].

Fermantasyon tipinin yanı sıra, pullulan üretimini etkileyen bir diğer parametrenin ise; işletme koşulları olduğu bilinmektedir [47]. İşletme koşulları dikkate alındığında; fermantasyon ortamının bileşimi (ortamda bulunan karbon ve azot kaynakları, bunların başlangıç derişimleri, fermantasyon ortamındaki mineral tuzlar vb), sıcaklık, pH, karıştırma hızı, havalandırma, ışık yoğunluğu ve fermantasyon süresi gibi çeşitli parametrelerin pullulan üretimini etkilediği belirtilmektedir [41, 76, 100, 101]. Katı hal fermantasyonunda bunlara ek olarak; fermantasyon ortamının nem içeriği ve

fermantasyon ortamında kullanılan katı substratın çeşidi ile partikül büyüklüğünün pullulan üretimini önemli ölçüde etkilediği de ifade edilmektedir. Fermentasyon ortamında kullanılan karbon kaynağı türünün, pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bazı araştırmalarda glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz, sakkaroz, maltoz, selobiyoz, rafinoz, malto-oligosakkarit ve nişasta ile çalışıldığı rapor edilmektedir [111–115]. Yapılan çalışmalarda genel olarak en yüksek pullulan derişiminin, fermentasyon ortamında sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanıldığında elde edildiği belirtilmektedir [3, 77, 108]. Bunun yanı sıra pullulan üretimi için ksiloz ve laktozun, uygun şekerler olmadığını vurgulayan bazı çalışmalar da bulunmaktadır [3, 30, 41, 101, 109].

Fermentasyon ortamındaki azot kaynağının (genellikle NH_4^+ iyonlarının) pullulan üretiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir [41]. Pullulan üretiminde, fermentasyon ortamlarında organik azot kaynakları olarak; maya özütü, kazein hidrolizati, pepton, glutamat, üre, histidin, L-glutamik asit, L-asparajin veya amonyum süksinat, inorganik azot kaynakları olarak ise; amonyum sülfat, sodyum nitrat, sodyum nitrit, potasyum nitrat, sodyum glutamat veya amonyum nitratın kullanıldığı rapor edilmiştir [45, 75, 105, 110]. Gerçekleştirilen çalışmalarda, pullulan üretimi için en uygun inorganik azot kaynaklarının; amonyum sülfat ve amonyum nitrat gibi tuzlar oldukları vurgulanmıştır [47]. Pullulan üretimi amacıyla gerçekleştirilen birçok araştırmada; maya özütü ve amonyum sülfat kombinasyonunun fermentasyon ortamlarında azot kaynağı olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra, kompleks azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına kıyasla, pullulan üretimini arttırdığı da rapor edilmektedir [3]. Fermentasyon ortamındaki azot kaynağının tükenmesinin, *A. pullulans* tarafından pullulan üretime işaret ettiği ifade edilmektedir [47, 111]. Bunun yanı sıra, EPS üretimi için en uygun C:N oranının da; 10:1 olduğu belirtilmektedir [41, 80].

Fermentasyon ortamının pH'ının, pullulan üretimini etkileyen diğer bir önemli parametre olduğu belirtilmektedir. Düşük pH'ya sahip fermentasyon ortamında, *A. pullulans*'ın suda çözünmeyen β -glukan üretiminin desteklendiği ancak elde edilen pullulan veriminin azaldığı ifade edilmektedir. Genel olarak, ortam pH'ının 2'den daha düşük olmasının, *A. pullulans* 'ın küf formundaki hücre gelişimini desteklediği ve pullulan verimini düşürdüğü

rapor edilmektedir [47]. Pullulan üretimi için fermantasyonda optimum pH'ın; 5.5-7.5 arasında değiştiği belirtilmektedir [45, 75]. Asidik pH değerlerinde, pullulan derişiminin yüksek elde edildiği çok az sayıda çalışmanın olduğu da bildirilmiştir [1]. Biyokütle üretimi için gerekli olan optimum pH değerinin; 4.5 veya daha düşük olduğu vurgulanmaktadır. Pullulan sentezi ve biyokütle üretiminin gerçekleştiği optimum pH değerlerinin farklı olmalarının nedeni, bu iki sürecin birbirinden bağımsız olması ile açıklanmaktadır. Fermantasyon ortamının pH'ının, hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu, bu durumun da pullulan biyosentezini etkilediği belirtilmektedir. Ortamın pH'ının, üretilen pullulanın molekül ağırlığını da etkilediği ifade edilmektedir [47]. Nötral pH'da maya benzeri hücreler tarafından yüksek molekül ağırlığına sahip pullulanın sentezlendiği rapor edilmektedir [112].

Pullulan üretimini etkileyen parametrelerden bir diğerrinin de fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi olduğu bilinmektedir [22]. *A. pullulans*'ın aerobik bir mikroorganizma olması nedeni ile hem hücre gelişimi, hem de pullulan üretiminin oksijen içeren ortamlarda gerçekleştiği ifade edilmektedir [113]. Pullulan üretimi için gerekli olan çözünmüş oksijenin, yeterli bir havalandırma ile elde edilebileceği belirtilmektedir. Genel olarak, fermantasyon ortamındaki, yoğun havalandırmanın (2 vvm'e kadar olan), pullulan üretiminden sorumlu hücrelerin çoğalmalarına, böylece de pullulan derişiminin artmasına neden olduğu ifade edilmektedir [30]. Bununla birlikte, yoğun havalandırmanın, üretilen pullulanın molekül ağırlığında azalmaya neden olduğu da belirtilmektedir [41]. Ayrıca, Wecker ve Onken [114] tarafından yapılan bir çalışmada, *A. pullulans* ATCC 9348 suşu ile en yüksek pullulan üretiminin, çözünmüş oksijen derişiminin düşük olduğu koşulda gerçekleştiği de bildirilmiştir.

Pullulan üretimi için gerekli optimum sıcaklığın kullanılan suşa bağılı olduğu ve genel olarak *A. pullulans* için bunun; 24-30°C arasında değiştiği ifade edilmektedir [12]. Biyokütle ve pullulan üretimleri için gerekli optimum sıcaklık değerlerinin birbirlerinden farklı oldukları rapor edilmektedir [12, 47]. Wu et al. tarafından yapılan bir araştırmada, çalışılan suşun hücre üremesi için gerekli olan optimum sıcaklığın 32°C, pullulan üretimi için gerekli optimum sıcaklığın ise; 26°C olduğu saptanmıştır. Yüksek fermantasyon sıcaklıklarının *A. pullulans*'ın üremesini desteklediği ancak pullulan üretimini engellediği

belirtilmektedir. Fermantasyon ortamının sıcaklığının, *A. pullulans*'ın hücre morfolojisini, buna bağlı olarak da pullulan üretimini etkilediği ifade edilmektedir [47]. Bu nedenle de literatürde, hem *A. pullulans* hücrelerinin gelişmelerini desteklemek, hem de pullulan üretimini arttırmak amacıyla, fermantasyon boyunca iki aşamalı sıcaklık uygulamasının yapıldığı bazı çalışmaların olduğu görülmektedir [47, 73, 115].

Fermantasyon ortamındaki karbon ve azot kaynakları ile bunların derişimlerinin, sıcaklık, pH, ve havalandırma gibi farklı parametrelerin, *A. pullulans*'ın pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği bazı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Göksungur ve ark. [116] tarafından pancar melası ve sentetik ortam kullanılarak, *A. pullulans* ile pullulan üretimi üzerine gerçekleştirilen bir araştırmada; karbon kaynağı olarak sakkaroz içeren sentetik fermantasyon ortamlarında, sakkarozun başlangıç derişimi ile ortamın başlangıç pH'ının, *A. pullulans* P56 suşunun EPS ve pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği belirtilmiştir [116]. Deneylerin çalkalamalı su banyolarında; 28°C'de, 200 rpm sabit çalkalama hızında, 50 mL'lik çalışma hacminde, 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Yapılan deneylerde, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının 4.5-8.5 ve sakkaroz başlangıç derişiminin ise; 30-70 g/L aralığında değiştirildiği bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada en yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin sırasıyla; 21.4 ve 16.7 g/L olarak; başlangıç sakkaroz derişiminin; 50 g/L ve pH'ın ise, 7.5 olduğu işletme koşullarında elde edildiği belirtilmiştir [116].

Gerçekleştirilen bir başka bir çalışmada ise; hibiskus (hatmi çiçeği) bitkisinden izole edilmiş termotolerant bir *A. pullulans* suşu ile, bu suşun elde edilen mutantının, beslemeli kesikli bir sistemde pullulan üretimleri üzerine çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkileri incelenmiş ve fermantasyon ortamının optimizasyonu hedeflenmiştir [117]. Söz konusu çalışmada; fermantasyon yoluyla pullulan üretimini etkileyen çeşitli işlem parametrelerinin, ayrı ayrı ve birbirlerinden bağımsız olarak optimize edildiği; bu nedenle, her bir fermantasyon parametresinin optimum değeri belirlendikten sonra, bu değerin daha sonraki bütün deneylerde kullanıldığı ifade edilmiştir. Deneylerdeki ilk çalışma hacminin 1.5 L olduğu, daha sonra fermantasyon ortamının, 5 saatlik aralıklarla art arda iki kere 1.5 litre steril besiyeri ile beslendiği belirtilmiştir. Fermantasyon ortamının ilk 10 saat boyunca, 0.5 vvm hızındaki steril hava ile havalandırıldığı da ifade

edilmiştir. Anılan araştırmada, fermantasyon ortamının sıcaklığı 42°C’de sabit tutularak, ortamda farklı karbon (%4; w/v) ve azot (%0.5; w/v) kaynaklarının pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı ifade edilmiştir. Bu amaçla; karbon kaynakları olarak fruktoz, glukoz, sakkaroz, laktoz ve ksilozun, azot kaynakları olarak ise; sodyum nitrat, maya özütü, amonyum sülfat, sodyum nitrit ve histidinin denendiği ifade edilmiştir. Karbon kaynaklarının pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde; en yüksek pullulan üretiminin (37.4±0.8 g/L) çalışılan mutant suş ile, ortamda sakkaroz kullanıldığında, farklı azot kaynaklarının araştırıldığı deneylerde ise, en yüksek üretimin; 42.4±0.7 g/L olarak, yine mutant suş ile, ortamda amonyum sülfat kullanıldığında elde edildiği belirtilmiştir [117]. Bu çalışmada ayrıca, sıcaklık, karıştırma hızı, fermantasyon ortamının başlangıç pH’ı ve fermantasyon süresinin, incelenen *A. pullulans* suşlarının pullulan üretim özellikleri üzerine etkilerinin incelendiği de rapor edilmiştir. Anılan araştırmada, sıcaklık; 25-46°C, karıştırma hızı 5-60 rpm, ortam pH’ı 3.0-7.0 ve fermantasyon süresinin ise; 12-96 saat aralığında değişecek şekilde, çeşitli deneylerin gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada yapılan deneylerde, en yüksek pullulan derişimlerinin mutant suş ile; 42°C’de (27.5 g/L), 36. saatte (23.2±0.6 g/L), 40 rpm karıştırma hızında (43.2±0.6 g/L) ve pH 5.5’da (30.2±1 g/L) elde edildiği bildirilmiştir [117].

Ticari pullulanın üretimi için, termotolerant ve melanin üretmeyen *A. pullulans* suşlarının, mezofilik ve melanin üreticisi suşlara kıyasla bazı üstünlüklerinin olduğunu vurgulayan bir çalışmada, çiçek ve yaprak örneklerinden izole edilen 95 adet *A. pullulans* suşunun, 37°C’deki pullulan üretim özellikleri incelenmiş ve suşlardan 11 tanesinin bu sıcaklıkta önemli miktarlarda pullulan üretebildiği belirlenmiştir. Bunların arasından ise, sadece *A. pullulans* RG-5 suşunun hem melanin üretmeyip hem de yüksek derişimde pullulan üretebildiği belirtilmiştir. Söz konusu araştırmanın daha sonraki aşamalarında, fermantasyon ortamının optimizasyonu amacıyla, *A. pullulans* RG-5 suşunun pullulan üretimi üzerine çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkilerinin ayrı ayrı incelendiği rapor edilmiştir. Bu amaçla önce, 25-46°C sıcaklık aralığında, *A. pullulans* suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği belirtilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda *A. pullulans* RG-5 suşunun, 42°C’ye kadar olan çalışma sıcaklıklarını tolere edebilen, termotolerant bir suş olduğunun belirlendiği ifade edilmiştir. Anılan çalışmada daha

sonra; 42°C sabit sıcaklık değeriinde, çeşitli fermantasyon parametrelerinin *A. pullulans* RG-5 suşunun, pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı da belirtilmiştir. Denenen parametreler arasında; fermantasyon süresi (12-96 saat), fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (3.0-6.5), ortamda sabit derişimde (%2; w/v) kullanılan farklı karbon kaynakları (glukoz, fruktoz, sakkaroz, laktoz veya ksiloz) ve azot (%0.5; w/v) kaynaklarının (amonyum sülfat, maya özütü, sodyum nitrat, sodyum nitrit, veya histidin) yer aldığı belirtilmiştir. Söz konusu araştırmadaki en yüksek pullulan derişiminin; 37.1±1.0 g/L olarak, fermantasyon ortamı sıcaklığının; 42°C, başlangıç pH'ının 5.5 olduğu ortamda, karbon ve azot kaynakları olarak sırasıyla; sakkaroz ve amonyum sülfatın kullanıldığı fermantasyon ortamında, 48 saat sonra elde edildiği belirtilmiştir [105].

Sugumaran ve ark. [95] tarafından yürütölen bir diğör çalışmada; manyok otu küspesinin substrat olarak kullanıldığı ve oda sıcaklığında yürütölen fermantasyon deneylerinde, fermantasyon süresi, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı, nem oranı, azot ve karbon kaynakları ve katı substratın partiköl büyüklüğü gibi çeşitli parametrelerin *A. pullulans* MTCC 2670 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği ifade edilmiştir. Araştırmada denenen başlangıç pH değeriilerinin; 2.5-7.5, fermantasyon süresinin; 1-8 gün, nem oranının; 1:0.5-1:3 (substrat:nem) ve substratın partiköl büyüklüğünün ise; 1.4-4.7 mm aralığında değıştiği ifade edilmiştir. Ayrıca, azot kaynakları olarak; NaNO₂, NaNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, pepton, malt özütü, et özütü ve maya özütünün, karbon kaynakları olarak ise; glukoz sakkaroz, fruktoz, maltoz, mannoz ve ksiloz denendiği rapor edilmiştir. Araştırmada, pullulan veriminin gravimetrik olarak ölçöldüğü ve mg pullulan/g kurutulmuş substrat (ks) olarak ifade edildiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, fermantasyon ortamının başlangıç pH değeri 2.5'den 5.5'e kadar yükseltildiğinde, maya benzeri hücre formunun arttığı ve pullulan veriminin yükseldiği; 5.5'den daha yüksek pH değeriilerinde ise, pullulan veriminin azaldığı rapor edilmiştir. İncelenen suşun pullulan üretimine fermantasyon süresinin etkisinin incelendiği deneylerde, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının 5.5 ve nem oranının ise; 1:2 (substrat:nem) olduğu belirtilmiş ve en yüksek pullulan veriminin; 23.6 mg/g ks olarak, fermantasyonun 4. gününde elde edildiği belirtilmiştir. Fermantasyon ortamındaki başlangıç nem miktarının pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği deneylerde

de fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının 5.5 olarak sabit tutulduğu ve en yüksek pullulan veriminin; 24.3 mg/g ks olarak, nem oranının 1:2 (substrat:nem) olduğu koşulda elde edildiği rapor edilmiştir. Farklı azot kaynaklarının incelenen suşun pullulan üretimine etkilerinin incelendiği deneylerde, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ı, ve nem oranının sırasıyla; 5.5 ve 1:2 (substrat:nem) olarak sabit tutulduğu ve en yüksek pullulan veriminin; 33.4 mg/g ks olarak, NaNO₂'in kullanıldığı deneyde elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında, maya özütü ile de NaNO₂'a yakın değerlerde pullulan veriminin (32.1 mg/g ks) elde edildiği ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada, deneylerde belirlenen manyok küspesi optimum partikül büyüklüğünün; 2.38 mm olduğu ifade edilmiştir. Farklı ek karbon kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde, nem oranı 1:2 (manyok küspesi:nem) ve başlangıç pH'ı 5.5 olan manyok küspesinden hazırlanan ortamda azot kaynağı olarak NaNO₂ kullanılmış ve bu ortama %3 w/w derişimde glukoz, fruktoz, sakkaroz, mannoz, maltoz veya ksilozun ilave edildiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, en yüksek pullulan verimlerinin; 45.1 ve 40.0 mg/g ks olarak, manyok küspesinden hazırlanan ortama sırasıyla; mannoz ve glukoz eklendiğinde elde edildiği belirtilmiştir. Mannozun farklı derişimlerinin, manyok küspesi ortamına ek substrat kaynağı olarak eklendiği deneylerde ise, en yüksek pullulan verimine; 49.0 mg/g ks olarak %5 derişimde ulaşıldığı da rapor edilmiştir.

Pullulanın üretim maliyetinin büyük ölçüde, kullanılan hammaddeye, özellikle de karbon kaynağına bağlı olduğu bildirilmektedir [26]. Bu biyopolimerin üretimi için gerekli olan hammadde maliyetinin oldukça yüksek olduğu ve toplam maliyetin; %30'unu oluşturduğu ifade edilmektedir [118]. Yüksek üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla pullulan üretiminde, ucuz karbon kaynağı olarak, tarımsal atıklar ve doğal substratların kullanımlarının araştırıldığı bazı çalışmalar mevcuttur [3, 119]. Pullulan fermentasyonunda doğal substrat kaynaklarının kullanılmasıyla, tarımsal atıkların geri dönüşümlerine ve çevrenin korunmasına da katkı sağlanabileceği vurgulanmaktadır [17, 19]. *A. pullulans* ile pullulan üretimi için kullanılan doğal substrat kaynaklarının bazılarının; peynir altı suyu, üzüm pulpu, zeytinyağı fabrikası atıkları, patates cipsi üretiminden kalan nişastalı yan ürünler, mısır maserasyon sıvısı, tatlı patates, hindistan cevizi yan ürünleri, palmye çekirdeği, jack meyvesi çekirdeği ve hurma şurubu olduğu

görülmektedir [19, 84, 97, 120–124]. Pullulan üretimi amacıyla, farklı tarımsal atıkların kullanıldığı bazı çalışmalara örnekler, Çizelge 2.2’de verilmektedir.

Çizelge 2.2. Pullulan fermantasyonunda kullanılmış olan bazı doğal substratlar

Substrat	Suş	Referans
Turba yosunu hidrolizatı	<i>A. pullulans</i> 2552, 140B ve 142	[125]
Proteini uzaklaştırılmış peynir altı suyu	<i>A. pullulans</i> P56	[126]
Üzüm pulpu	<i>A. pullulans</i> NRRLY 6220	[66]
Zeytinyağı fabrikası atıkları		
Niştastalı atıklar*		
Hidrolize patates niştastası	<i>A. pullulans</i> NRRLY 6220, P56, 201253	[119, 127, 128]
Biracılık atıkları	<i>A. pullulans</i> P56	[129]
Mısır şurubu	<i>A. pullulans</i> NYS-1, NYSRP-1, ATCC 201253	[130, 131]
Palmiye şekeri	<i>A. pullulans</i> CFR-77, RBF 4A3, MTCC 2195	[14, 49, 132, 133]
Melas	<i>A. pullulans</i> P56, ATCC 42023, MTCC 2195	[84, 116, 123, 134]
Soya fasulyesi yağı	<i>A. pullulans</i> NRRLY-6220	[135]
Manyok niştastası	<i>A. pullulans</i> MTCC 1991	[136]
Buğday samanı	<i>A. pullulans</i> ATCC 42023	[84]
Pirinç samanı		
Odun talaşı		
Niştastalı patates atığı		
Glukoz şurubu		
Tatlı peyniraltı suyu		
Mısır maserasyon sıvısı	<i>A. pullulans</i> ATCC 42023, RBF 4A3	[84, 133, 137]
Tatlı patates	<i>A. pullulans</i> AP329, MTCC 2195	[121, 138]
Hindistan cevizi yan ürünleri	<i>A. pullulans</i> MTCC 2195	[19]
Deoiledjatropa çekirdeği keki	<i>A. pullulans</i> RBF 4A3	[82, 137]
Hardal çekirdeği yağı keki		
Pamuk çekirdeği yağı keki		
Pirinç kepeği yağı keki		
Soya fasulyesi yağı keki		
Palmiye çekirdeği	<i>A. pullulans</i> MTCC 2670	[96, 97, 122]

Çizelge 2.2. Devam ediyor

Substrat	Suş	Referans
Pirinç kepeği hidrolizatı	<i>A. pullulans</i> CCTCC M 2012259	[139]
Pirinç kepeği	<i>A. pullulans</i> MTCC 2670	[97]
Buğday kepeği		
Hindistan cevizi çekirdeği		
Jack meyvesi çekirdeği	<i>A. pullulans</i> NCIM 1049, MTCC 2195	[93, 123]
Soya fasulyesi posası	<i>A. pullulans</i> HP-2001	[140]
Yağı uzaklaştırılmış hint fıstığı çekirdeği keki	<i>A. pullulans</i> RBF 4A3	[133]
Manyok küspesi	<i>A. pullulans</i> MTCC 2670	[95]
Manyok unu	<i>A. pullulans</i> MTCC 2195	[141]
Kaju meyvesi suyu		
Fırıncılık artıkları		
Mısır unu		
Şeker kamışı küspesi hidrolizatı	<i>A. pullulans</i> LB83	[106]
Hurma şurubu	<i>A. pullulans</i>	[124]
Yer elması kökü	<i>A. pullulans</i> Y-4137	[142]
Kavak odunu		
<i>Chlorella vulgaris</i> mikroalg biyokütlesi		
Patates pulpu		

*: Patates cipsi üretiminden kalan nişastalı yan ürün

Thirumavalavan ve ark. [19] tarafından yapılan bir çalışmada; *A. pullulans* MTTC 2195 suşu ile pullulan üretimi amacıyla, fermantasyon ortamında doğal substrat kaynakları olarak; hindistan cevizi yan ürünlerinin (hindistan cevizi suyu veya sütü) kullanıldığı belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, hazırlanan fermantasyon ortamlarının başlangıç şeker derişimlerinin, sakkaroz da ilave edilerek 50 g/L olacak şekilde ayarlandığı ifade edilmiştir. Anılan araştırmada ayrıca, sakkaroz, potasyum dihidrojen fosfat, maya özütü, amonyum sülfat ve sodyum klorür içeren sentetik bir fermantasyon ortamında da, incelenen suşun pullulan üretim özellikleri incelenmiştir. Hindistan cevizi yan ürünleri kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamları ile sentetik fermantasyon ortamından elde edilen pullulan derişimlerinin kıyaslandığı deneylerde, en yüksek pullulan derişiminin; 54 g/L olarak, fermantasyonun 144. saatinde ve hindistan cevizi sütünün kullanıldığı deneyde elde edildiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada sentetik fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek pullulan derişiminin ise; 28 g/L olduğu ifade edilmiştir.

Araştırmada hindistan cevizi yan ürünlerinin, içerdikleri zengin mineral ve amino asitler nedeniyle, pullulan üretimi için oldukça uygun substratlar oldukları rapor edilmiştir. Ayrıca, bu yan ürünlerin herhangi bir ön işlem gerekmeden pullulan üretiminde kullanılabilmelerinin de bir avantaj olduğu vurgulanmıştır [19].

Sugumaran ve ark. [97] tarafından Hindistan'da gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, sakkaroz, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, maya özütü, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve NaCl 'ün yanı sıra doğal substrat kaynakları olarak pirinç kepeği, buğday kepeği, hindistan cevizi çekirdeği veya palmiye çekirdeğini de içeren katı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* MTCC 2670 suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği ifade edilmiştir. Çalışmada, fermantasyon ortamlarının başlangıç pH'larının 7.5, nem oranlarının ise; %50 olduğu belirtilmiştir. Söz konusu deneylerde elde edilen en yüksek pullulan derişimlerinin pirinç kepeği, buğday kepeği, hindistan cevizi çekirdeği ve palmiye çekirdeği ayrı ayrı fermantasyon ortamlarında kullanıldıklarında sırasıyla; 5.5, 7.5, 9.5 ve 16.0 g/L olarak elde edildiği ifade edilmiştir. Araştırmada denenen dört tarımsal atık arasından en yüksek pullulan üretiminin, palmiye çekirdeğinin kullanıldığı deneyde gerçekleştirildiği, bu deneyde elde edilen pullulanın FT-IR ve ^1H NMR analizleri ile belirlenmiş olan karakterisitik özelliklerinin ticari pullulan ile aynı olduğu, bu nedenle de bu substratın pullulan üretimi için düşük maliyetli potansiyel bir karbon kaynağı olabileceği vurgulanmıştır [97].

Sharma ve ark. [137] tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, *A. pullulans* RBF 4A3 suşu ile pullulan üretiminde, substrat olarak çeşitli tarımsal atıkların (pirinç kepeği, soya fasulyesi, pamuk çekirdeği ve hardal çekirdeği yağı kekleri ile mısır maserasyon sıvısı) denendiği rapor edilmiştir. Her bir doğal substratın fermantasyon ortamı bileşiminde ayrı ayrı denendiği, ortamın %2'sinin tarımsal atık, %15'inin ise, glukozdan oluştuğu ifade edilmiştir. Söz konusu araştırmada fermantasyon deneylerinin 28°C 'de, 250 mL hacmindeki erlenlerin içerisinde, 25 mL çalışma hacminde ve çalkalamalı sistemlerde, 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada en yüksek pullulan üretiminin (88.59 g/L); mısır maserasyon sıvısının substrat olarak kullanıldığı ortamda elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada mısır maserasyon sıvısından elde edilen pullulan derişiminin, kullanılan diğer doğal kaynaklar ile elde edilen pullulan

derişimlerine kıyasla oldukça yüksek olduğu; bunun nedeninin ise, mısır maserasyon sıvısının pullulan üretimi için yeterli oranda protein ve karbonhidrat içermesi olduğu belirtilmiştir [137].

Doğal substrat kaynaklarının pullulan üretimi amacıyla kullanıldıkları bir başka araştırmada bileşiminde sabit derişimde; maya özütü, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, K_2HPO_4 ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bulunan fermantasyon ortamlarında substrat kaynağı olarak; patates nişastası hidrolizatı veya sakkaroz ya da patates nişastası hidrolizatı-sakkaroz (80:20) karışımı veya patates nişastası hidrolizatı-sakkaroz-glukoz (80:10:10) karışımlarının, suş olarak ise; *A. pullulans* 201253'ün kullanıldığı belirtilmiştir [119]. Söz konusu araştırmada deneylerin; kesikli sistemlerde, 10 L hacmindeki biyoreaktörlerde, 7 L'lik fermantasyon hacimlerinde, 28°C'de ve 500 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada, fermantasyon ortamlarından belirli zaman aralıkları ile alınan örneklerdeki pullulan, biyokütle ve indirgen şeker derişimlerinin belirlendiği rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmada, mikroorganizmanın özgül üreme ve substrat tüketim hızları ile özgül ürün oluşum hızlarının da hesaplandığı belirtilmiştir. Anılan araştırmada en yüksek biyokütle derişiminin, 15.72 g/L olarak, nişasta hidrolizatının tek başına karbon kaynağı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiği ifade edilmiştir. En yüksek pullulan derişiminin hidrolize patates nişastası ile sakkarozun 80:20 oranında birlikte substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamında ve 54.57 g/L olarak elde edildiği rapor edilmiştir. Söz konusu araştırmada, patates hidrolizatına az miktarda sakkaroz ilavesinin üretilen pullulanın derişimini yükselttiği, bunun nedeninin ise; sakkarozun pullulan üretiminde rol oynayan enzimlerin üretimini arttırması olduğu da vurgulanmıştır. Araştırmada patates hidrolizatının pullulan üretimi amacıyla kullanılabilecek verimli ve ekonomik bir karbon kaynağı olabileceği rapor edilmiştir [119].

Pullulan fermantasyonu sırasında pullulan verimini arttırmak ve/veya pullulan üretiminde kullanılan bazı *A. pullulans* suşlarının pullulan üretimi için istenmeyen bir özellik olan melanin üretimlerini engellemek amacıyla *A. pullulans* suşlarının etidyum bromid, etil metansülfonat (EMS), nitroz asit ve/veya UV radyasyon gibi bazı mutajen ajanlar ile mutasyona uğrattıkları rapor edilmektedir [48, 56, 117]. Pullulan fermantasyonu

sırasında üretilen melaninin, fermantasyon ortamının rengini koyu yeşil ya da siyaha dönüştürdüğü, daha sonra saflaştırma aşamasında üretilen bu melaninin, pullulandan aktif kömür ile uzaklaştırılmasının, prosese ek bir iş gücü ve maliyet getirdiği ifade edilmektedir [92, 129, 130]. Mutasyon uygulaması ile, hem üretilen pullulan veriminin arttırılabildiği hem de melaninin üretiminin azaltılabildiği az sayıda çalışmanın olduğu belirtilmektedir [117, 144, 145]. Gniewosz ve Reinhard [48] tarafından yapılan bir çalışmada; *A. pullulans* A.p.-3 suşu ve bu suşa kimyasal ve UV mutasyonun birlikte uygulanması sonucunda elde edilen mutant *A. pullulans* B-1 suşunun, pullulan üretim özelliklerinin incelendiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, melanin üreten *A. pullulans* A.p.-3 suşunun yapılan uygulama sonucunda elde edilen mutantının (*A. pullulans* B-1) ise, melanin üretmediği ve pullulan veriminin de daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Chen ve arkadaşları [56] tarafından yapılan bir çalışmada; düşük molekül ağırlıklı pullulan üretimi amacıyla, çalışılan *A. pullulans* CGMCC 3.933 suşuna UV mutasyonu uygulandığı rapor edilmiştir. Araştırmada, yüksek molekül ağırlığına sahip pullulanın fermantasyon ortamının viskozitesini arttırdığı, bu durumun da pullulan üretiminin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca, düşük molekül ağırlıklı pullulanın kozmetik ürünlerde ve diyet gıdalarda kullanıldığı da ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada genel olarak, fermantasyon koşullarına ve kullanılan suşa bağlı olarak pullulanın molekül ağırlığının; 1.5×10^4 ile 1.2×10^7 Da aralığında değişiklik gösterdiği belirtilmiş, elde edilen *A. pullulans* UVMU6-1 mutant suşunun, yüksek derişimde ve istenildiği gibi düşük molekül ağırlığına (6.699×10^4 Da) sahip pullulan üretebildiği rapor edilmiştir.

Termotolerant bir *A. pullulans* suşunun kimyasal yöntemlerle mutasyona uğratıldığı bir diğer araştırmada ise; elde edilen mutant RG-5 suşunun 42°C’de, orjinal suş ile karşılaştırıldığında, daha düşük derişimde karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı ortamda ve daha kısa sürede, daha yüksek derişimde pullulan üretebildiği belirtilmiştir. Araştırmada, hem orjinal hem de mutant suşun melanin üretmedikleri de ifade edilmiştir. Anılan çalışmada ayrıca orjinal suşun termotolerant olduğu, mutant suşun da bu termotolerant özelliğini kaybetmediği de vurgulanmıştır [117].

Ticari bir pullulan üreticisi olan Hayashibara firması tarafından üretim sırasında kullanılan aşı kültürünün, mutant *A. pullulans* AHU 9553, *Dematium pullulans* IFO 4464 ve *Pullularia fermentans* var. *fermentans* IFO 6401 suşlarından hazırlandığı ifade edilmektedir. Ticari üretimde kullanılan mutant suşlar ile daha kısa sürede, oldukça düşük miktarda siyah pigment içeren pullulan elde edilebildiği ve pullulan veriminin de yüksek olduğu rapor edilmektedir [36].

Pullulan üretimi ile ilgili olarak gerçekleştirilen bazı araştırmalar incelendiğinde, genellikle üretici suş olarak; kültür koleksiyonlarından seçilmiş olan *A. pullulans* suşlarının kullanıldığı görülmektedir [128, 146–148]. Türkiye’de, özellikle son on beş yılda, laboratuvar koşullarında pullulan üretimi ile ilgili gerçekleştirilmiş olan çeşitli bilimsel araştırmalarda ise, yurtdışından sağlanmış ve melanin üretmediği belirtilen mutant bir suş olan *A. pullulans* P56 (Aristotle Üniversitesi, Selanik) ve yine yurt dışından temin edilmiş olan *A. pullulans* DSM-2404’ün (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; Alman Kültür Koleksiyonu) kullanıldığı ifade edilmiştir [116, 146].

A. pullulans P56 suşu ile yapılan çeşitli çalışmalarda genel olarak; farklı karbon kaynaklarının pullulan üretimi üzerine etkilerinin araştırılması [116], pullulan üretiminin optimizasyonu [128], pullulandan antimikrobiyal film üretimi [147] gibi konuların ele alındığı görülmektedir.

Göksungur ve ark. [116] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *A. pullulans* P56 suşunun pullulan üretimi üzerine, fermantasyon ortamında kullanılan farklı karbon kaynaklarının etkilerinin incelendiği belirtilmiştir. Bu amaçla karbon kaynağı olarak; pancar melası ve sakkarozun kullanıldığı ifade edilmiştir. Çalışmadaki deneylerin, başlangıç substrat derişimleri ve başlangıç pH’ları sırasıyla; 50 g/L ve 7.5 olan fermantasyon ortamlarında ve 28°C’de gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Anılan araştırmada, sentetik fermantasyon ortamının kullanıldığı deneyde elde edilen en yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin sırasıyla; 21.4 ve 16.7 g/L, melas çözeltisinin çeşitli ön işlemlerden geçirildikten sonra doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen en yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin ise sırasıyla; 35.0 ve 16.9 g/L olduğu ifade edilmiştir.

Pullulandan antimikrobiyel film üretimine yönelik olarak yapılan bir başka çalışmada; *A. pullulans* P56 suşu kullanılarak üretilmiş olan ve belirli oranda pullulan içeren EPS'den elde edilen biyofilmlere, çeşitli oranlarda lizozim ilave edildiği bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada; lizozim içeren bu pullulan filmlerin, *Escherichia coli* (ATCC 53868) ve *Lactobacillus plantarum* (DSM 1954) bakterilerine karşı inhibe edici etkilerinin araştırıldığı da belirtilmiştir. Sonuç olarak; çalışılan derişim aralığında lizozim ilave edilerek hazırlanmış pullulan filmlerinden bazılarının incelenen *E. coli* suşu üzerine antimikrobiyel etki gösterdiği ancak hazırlanan hiçbir filmin, *L. plantarum*'a karşı antibakteriyel etki göstermediği rapor edilmiştir [147].

Ülkemizde pullulan üretimi amacıyla *A. pullulans* P56 suşunun kullanıldığı bir diğer çalışmada; Ca-aljinat kullanılarak immobilize edilmiş suşun pullulan üretimi üzerine, çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkilerinin, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak incelendiği ifade edilmiştir. Araştırmada seçilen parametrelerin; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı, çalkalama hızı ve fermantasyon süresi olduğu belirtilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda optimum koşulların; pH 7.31, çalkalama hızı; 191.5 rpm ve fermantasyon süresi; 101.2 saat olarak belirlendiği ve bu koşullarda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin ise; $21.07 \pm 0.48 \text{ g/dm}^3$ olduğu rapor edilmiştir [148].

Göksungur ve ark. [128] tarafından yapılan bir diğer araştırmada ise; substrat kaynağı olarak hidrolize edilmiş patates nişastasının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* P56 suşu ile pullulan üretiminin, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyonu üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla seçilen bağımsız değişkenlerin; fermantasyon süresi, fermantasyon ortamının başlangıç substrat (patates nişastası hidrolizatında yer alan glukoz) derişimi ve başlangıç pH'ı olduğu belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada belirlenen optimum koşulların anılan parametreler için sırasıyla; 111.8 sa, 79.4 g substrat/L ve pH 7.26 olarak belirlendiği ve bu koşullarda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin de; 19.2 g/L olduğu ifade edilmiştir.

Ülkemizde yapılan ve *A. pullulans* DSM 2402 suşunun kullanıldığı bir başka çalışmada ise; tanımlı, sentetik bir fermantasyon ortamında, söz konusu suşun hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerdeki pullulan üretimlerinin incelendiği ve üretim koşullarının optimizasyonunun gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Araştırmada, hava

kaldırmalı biyoreaktörde elde edilen maksimum efektif verimin (Y_p/s); 0.402, kabarcık kolon biyoreaktörde elde edilen maksimum efektif verimden (Y_p/s); 0.343 daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Anılan çalışmada daha sonra, çalışılan suş ile hava kaldırmalı biyoreaktörde pullulan üretimine, substrat başlangıç derişimi, havalandırma hızı ve fermantasyon süresinin etkisinin yanıt yüzey yöntemi ile incelendiği belirtilmiştir. Araştırmada belirlenen optimum koşulların, başlangıç substrat derişimi; 95.2 g/L, havalandırma hızı; 1.93 vvm ve fermantasyon süresi; 5.36 gün olduğu ifade edilirken bu koşullarda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin ise; 38.77 g/L olduğu rapor edilmiştir [146].

2.1. Kesikli Fermantasyon Sistemlerinin Modellenmelerinde Kullanılan Kinetik Eşitlikler

2.1.1. Özgöl Üreme Hızı

Kesikli fermantasyon sistemlerinde, mikroorganizmaların üssel üreme bölgesindeki üreme hızı (dX/dt), fermantasyon ortamında bulunan mikroorganizma derişimi (X) ile doğru orantılı olarak değişmektedir [149–151]. Bir mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki üreme hızı, üremeyi sınırlandırıcı substratın belirli bir başlangıç derişiminde, Eş. 2.1 ile verilmektedir.

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

Bu eşitlikte X ; kuru ağırlık olarak mikroorganizma derişimini (g mo/L), t ; zamanı (saat) ve μ (saat⁻¹) ise, mikroorganizmanın özgöl üreme hızını göstermektedir.

Bir mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgöl üreme hızı sabit bir değerdedir. Kesikli üretim sistemlerinde, bir mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgöl üreme hızı, fermantasyon ortamındaki mikroorganizma derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik kullanılarak, farklı zamanlardaki X değerleri için $\ln X$ değerlerinin hesaplanması ve bulunan bu değerlerin zamanla değişimini gösteren bir grafiğin çizilmesi ile Eş. 2.2 kullanılarak hesaplanmaktadır [150].

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{d \ln X}{dt} \quad (2.2)$$

2.1.2. Özgöl Ürün Oluşum Hızı

Kesikli fermentasyon sistemleri için özgöl ürün oluşum hızı; q_p , ürün oluşum hızının mikroorganizma derişimine oranı olarak tanımlanmaktadır [149, 150]. Bu çalışmada, pullulan için özgöl ürün oluşum hızı, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, önce pullulan derişimlerinin ($\ddot{U}$; g pullulan/L) zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden farklı zamanlardaki eğim değerleri hesaplanarak ürün oluşum hızları [$d\ddot{U}/dt$; g pullulan/(L.sa)] bulunmuş, daha sonra ise, mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, aynı zamanlara karşı gelen mikroorganizma derişimleri belirlenerek, özgöl pullulan üretim hızları, [q_p ; g pullulan/(g mo.sa)] hesaplanmıştır (Eş. 2.3).

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{d\ddot{U}}{dt} \quad (2.3)$$

2.1.3. Ürün Verimi

Kesikli fermentasyonlar için ürün verimi; $Y_{p/S}$, fermentasyon işlemi sonucunda elde edilen ürün miktarının, tüketilen substrat miktarına oranı olarak tanımlanmakta olup (Eş. 2.4), mikroorganizmanın ve substratın türüne bağlı olarak değişmektedir [150].

$$Y_{p/S} = - \frac{\Delta \ddot{U}}{\Delta S} \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte S; substrat derişimini (g substrat/L) göstermektedir.

Bu çalışmada, pullulan için ürün verimi (Y_5 , %), Eş. 2.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Y_5 = \frac{C_{pm}}{S_{s0} - S_s} \times 100 \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte C_{pm} ; fermantasyon sırasında elde edilen en yüksek pullulan derişimini ifade etmekte olup; S_{S0} ve S_S ise sırasıyla, fermantasyon ortamındaki sakkarozun başlangıçtaki ve en yüksek pullulan derişiminin elde edildiği andaki derişimlerini göstermektedir.

2.1.4. Substrat Tüketim Hızı

Kesikli fermantasyon işlemlerinde substrat tüketim hızı (r_s), fermantasyon ortamında bulunan bir substratın derişiminin zamanla değışimi (Eş. 2.6) olarak tanımlanmaktadır.

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2.6)$$

Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarındaki substratların derişimleri fermantasyon süresince tayin edilmiş ve zamanla değışimlerini gösteren grafikler çizilerek, substrat tüketim hızları, bu grafiklerdeki eğrilerden farklı zamanlardaki eğim değeri bulunarak hesaplanmıştır.

2.2. Yanıt Yüzey Yöntemi

Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimini etkileyen çeşitli bağımsız değışkenlerin, seçilen bazı bağımlı değışkenler üzerindeki etkilerini gösteren model eşitliklerin türetilmesi amacıyla deney tasarımı için “Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM)” kullanılmıştır.

Deney tasarımında kullanılan yanıt yüzey yöntemi, ilk olarak, Box ve Wilson tarafından, 1951 yılında tanımlanmış ve kimyasal proseslerin optimizasyonu amacı ile geliştirilmiştir [152]. Bu yöntem, halen, kimya, ilaç, gıda, bilgisayar ve otomotiv endüstrilerinde ve tıpta yaygın olarak kullanılan bir yöntem olarak ifade edilmektedir. Yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı uygulamalarda, pahalı analiz yöntemlerinin maliyetlerinin düşürülmesi ve elde edilecek ürünlerin miktar ve kalitelerinin artırılması hedeflenmektedir. Yanıt yüzey yönteminde, bir prosesteki istenilen bir bağımlı değışken (yanıt; y) ile farklı sayıdaki bağımsız değışkenler ($x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$) arasındaki fonksiyonel bir ilişkinin, bazı matematiksel ve istatistiksel tekniklerin kullanılması ile türetilen ve düşük dereceli

bir polinom şeklinde gösterilebilen bir model eşitlik ile ifade edilebildiği belirtilmektedir [153]. Yanıt yüzey yönteminin, özellikle, bağımsız değişkenlerin, ürünün veya prosesin kalitesini ya da ölçüm sonucunu etkilediği endüstrilerde kullanıldığı bildirilmektedir. Bu yöntemde, bağımsız değişkenlerin her biri, “faktör” olarak da tanımlanmakta ve birbirlerinden bağımsız olarak değişim göstermektedir. Endüstriyel uygulamalarda elde edilen ölçüm sonucu ya da kalite özellikleri ise “yanıt” olarak tanımlanmaktadır [153, 154]. Yanıt yüzey yönteminin uygulandığı proseslerde genellikle, birden fazla yanıt bulunmaktadır [155].

Genel olarak, bir ürün, proses ya da sistemin içerdiği y yanıtı; $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$ bağımsız değişkenlerine bağlı olup bu değişkenler arasındaki ilişki Eş. 2.7 ile ifade edilmektedir [154].

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte yer alan y ; yanıt, $f(x_1, x_2, \dots, x_k)$; yüzey ve “ ε ” ise istatistiksel hata olarak adlandırılmaktadır. ε ’a ait değer, normal dağılıma sahip olduğu, ortalamasının sıfır ve varyans değerinin ise σ^2 olduğu kabul edilmektedir. Bu durumda, gerçek yanıt (η_y) fonksiyonu ise, Eş 2.8 ile ifade edilmektedir [154].

$$\eta_y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (2.8)$$

Yanıt yüzey yönteminin, temel olarak, sırasıyla, bağımsız değişkenlerin seçilebilmesi amacıyla eleme denemelerinin gerçekleştirilmesi, deneysel bölgenin sınırlandırılması ve işlemin veya ürünün optimizasyonu olmak üzere üç aşamadan oluştuğu belirtilmektedir. [153, 155]. Yanıt yüzey yönteminde takip edilmesi gereken işlem basamakları ise, aşağıdaki gibi verilmektedir [153].

1. Yanıt değerler üzerinde etkili olacak bağımsız değişkenlerin, eleme deneyleri ve literatür taraması yapılarak belirlenmesi.
2. Deney tasarımında kullanılacak yöntemin seçilmesi, tasarım bölgesinin tespiti ve deneylerin elde edilen deney tasarımına göre yürütülmesi,
3. Regresyon analizi ile model geliştirilmesi ve seçilen modelin uygunluğunun test edilmesi için varyans analizi (ANOVA),

4. Elde edilen modelin önemli olup olmadığı göz önüne alınarak bölge değişikliği yapılmasının gerekip gerekmediğinin belirlenmesi,
5. Her bir yanıt için optimum değerlerin belirlenmesi.

2.2.1. Bağımsız Değişkenlerin Seçimi

Matematiksel modelinin türetilmesi istenilen bir prosesin, yanıt yüzey yöntemi ile deney tasarım planı oluşturulurken ilk olarak; söz konusu prosesteki bağımlı ve bağımsız değişkenlerin belirlenmeleri gerekmektedir. Bir sistemdeki yanıtların değerleri o sistemdeki bağımsız değişkenlerin değerlerine bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle de, yanıt yüzey yönteminin uygulanması sırasında, önce bazı eleme deneylerinin yapılması ve incelenen sistemin çıktılarını yalnızca önemli derecede etkileyen bağımsız değişkenlerin belirlenmeleri gerekmektedir. Daha sonra ise, seçilen bu sistem değişkenlerin düzeyleri belirlenerek, yapılacak olan deneyler için bir deney tasarım planı oluşturulmaktadır. Söz konusu bağımsız değişkenlerin düzeyleri ise, her bir bağımsız değişkenin deneylerde kullanılacak olan matematiksel değerlerini ifade etmektedir. Bu aşamada, seçilen bağımsız değişkenlerin her biri için minimum, maksimum ve merkezi değerler belirlenmektedir. Belirlenen her bir değer, “kritik nokta” olarak da adlandırılmaktadır.

2.2.2. Deney Tasarımı

Yanıt yüzey yöntemindeki en önemli işlem basamağı deney tasarımıdır. Deney tasarımıdaki amaç; uygun deney kombinasyonunun belirlenmesi ve yanıtların değerlendirileceği noktaların seçimlerinin gerçekleştirilmesidir. Deney tasarımı yapılırken izlenmesi gereken yol aşağıda belirtilmektedir;

1. Bağımsız değişkenlerin düzeylerinin belirlenmesi,
2. Deney sayısının belirlenmesi,
3. Deney sırasının belirlenmesi.

Bağımsız değişkenlerin düzeyleri değiştikçe yanıt değişkenin değeri de değişmektedir. Yanıt yüzey yönteminde bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri de belirlenmektedir. Kodlanmış değerler, bağımsız değişkenlerin, deney düzlemi içerisinde yer alan eksen

üzerindeki boyutsuz değerleridir. Bağımsız değişkenlere ait gerçek değerlerin kodlanmış değerlere dönüştürülmesi için Eş 2.9 kullanılmaktadır [156, 157]. Burada x_i ; kodlanmış değeri, X_i ; gerçek değeri, Δx ; düzeyler arasındaki farkı, x_0 ise; merkez noktadaki gerçek değeri göstermektedir.

$$x_i = (X_i - x_0)/\Delta x \quad (2.9)$$

Deneylerin tasarımı için gerekli olan kriterlerin çoğunun, prosesin matematiksel modeli ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan deneyler sonucunda, bağımsız değişkenlerin yanıt üzerine etkilerinin birinci dereceden bir model (2^k faktoriyel tasarım, Plackett-Burman tasarım, simplex tasarım vb.) ile uyumluluk gösterdikleri bulunuyorsa, elde edilen verilerin üç boyutlu bir grafikte eğim göstermediği görülmektedir. İki bağımsız değişkenin olduğu bir deneyde, elde edilecek olan birinci dereceden bir polinomal model denklemi Eş. 2.10'daki gibi gösterilmektedir.

$$\eta_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad (2.10)$$

Bu eşitlikte, β değerleri; regresyon katsayılarını, x ise bağımsız değişkeni ifade etmektedir.

Birinci dereceden model eşitliğinde, x_1 ve x_2 bağımsız değişkenlerinin, bağımlı değişken üzerine sadece ana etkileri görülmektedir. Eğer değişkenler arasında bir etkileşim söz konusu ise, birinci dereceden model, Eş 2.11'deki gibi ifade edilmektedir.

$$\eta_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (2.11)$$

Ancak, deneysel verilerin gerçek yanıt fonksiyonları birinci dereceden model ile uyumluluk göstermemektedir. Bu nedenle de, elde edilen eğriliğin test edilmesi için ikinci dereceden bir model kullanılması gerekmektedir. İki bağımsız değişkenin olduğu koşullarda, elde edilecek olan ikinci dereceden bir polinomal model denklemi Eş. 2.12'de verilmektedir.

$$\eta_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (2.12)$$

Yanıt yüzey yönteminde yaygın olarak ikinci dereceden model denkleminin kullanıldığı belirtilmektedir. Bunun birçok nedeninin olduğu ifade edilmektedir [154]. İkinci

dereceden model oldukça esnektir. Bu model çeşitli fonksiyonel formlar alabilmekte ve gerçek yanıt fonksiyonunun tahminlenmesi kolaylaşmaktadır.

1. İkinci dereceden denklemlerde yer alan katsayı değerleri, β , en küçük kareler toplamı yöntemi ile kolayca hesaplanabilmektedir.
2. İkinci dereceden model denklemlerin, gerçek yanıt yüzey problemlerinin çözümünde oldukça başarılı olduğu belirtilmektedir [154].

Bu nedenlerle deney tasarımı, ikinci dereceden model ile uyumluluk gösterebilecek, Box-Behnken, Doehlert, üç seviyeli faktöriyel ya da merkezi karma tasarım (central composite design, CCD) yöntemlerinden birinin seçilmesinin gerektiği ifade edilmektedir [158].

Bu tez çalışmasında, deney tasarımı için, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılmıştır.

Merkezi karma tasarım yöntemi, Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş olup üç basamaktan oluşmaktadır [151, 152]:

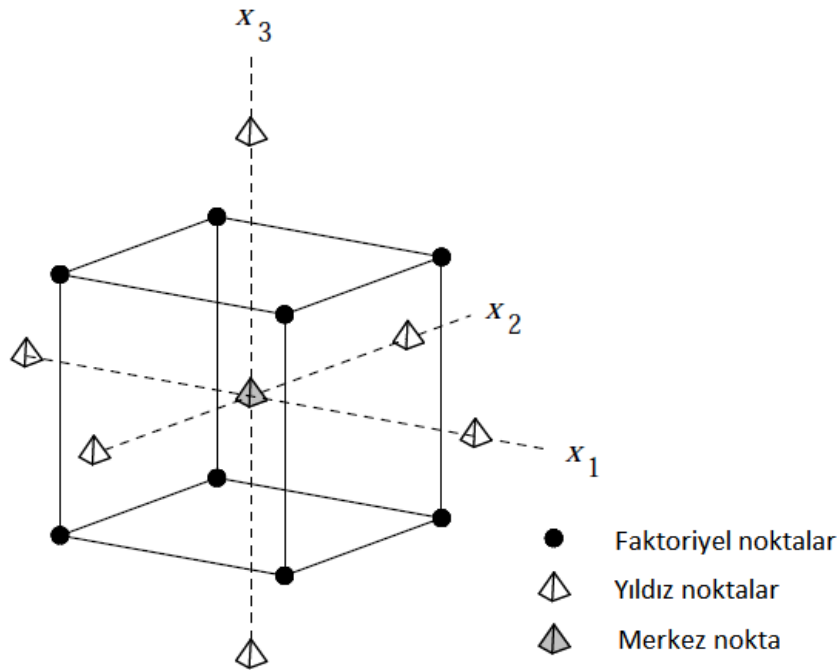
1. Çok etkenli ya da kesikli faktöriyel tasarım,
2. Yıldız (star) noktaların belirlenmesi ve
3. Merkez noktanın belirlenmesi.

Şekil 2.5’de deneysel tasarım noktaları gösterilmiş, üç bağımsız değişkenli bir CCD modeli görülmektedir. Üç bağımsız değişkenli bu tasarımda, deneysel noktaların yerleşimi bir kübe benzetilmektedir. Küpün merkezinde her bir faktör için belirlenen bir merkez noktası bulunmaktadır. Merkezden eşit uzaklıkta ve küpün köşelerinde yer alan faktöriyel noktalar, deney tasarımıdaki +1 ve -1 değerlerini temsil etmektedir. Küpün dışında bulunan ve merkez noktaya $\pm \alpha$ birim uzakta bulunan noktalar ise yıldız noktalar olarak adlandırılmaktadır [158]. Buradaki α değeri Eş 2.13 kullanılarak hesaplanmaktadır [159].

$$\alpha = [2^k]^{1/4} \quad (2.13)$$

Bu eşitlikte k, bağımsız değişken sayısını ifade etmektedir.

CCD yönteminde, tüm bağımsız değişkenler $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ olmak üzere beş seviyede çalışılmaktadır [160].



Şekil 2.5. Üç bağımsız değişkenli bir merkezi karma tasarım (CCD) yöntemi modeli

Faktör sayısının 2 olduğu bir tasarımda α değeri; 1.414, faktör sayısının 3 olduğu bir tasarımda α değeri; 1.682 ve faktör sayısının 4 olduğu bir tasarımda ise α değeri; 2 olarak hesaplanmaktadır. Faktör sayısının 2-4 arasında değiştiği; α değerinin ise, 1.5-2.0 arasında olduğu prosesler için CCD yöntemi kullanılarak yapılacak tasarımların döndürülebilir (rotatable) seçilmesi gerektiği ifade edilmektedir [155].

Döndürülebilir merkezi karma tasarım (Central composite rotatable design, CCRD) yöntemi kullanılarak oluşturulan deney tasarımında, gerçekleştirilmesi gereken deney sayısı Eş. 2.14'e göre hesaplanmaktadır. Bu eşitlikte, k , bağımsız değişken sayısını, n_0 ise merkez noktadaki tekrar sayısını ifade etmektedir [153].

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad (2.14)$$

2.2.3. Model Eşitliğin Uyumluluğunun Test Edilmesi

Deney tasarımı gerçekleştirildikten sonra elde edilen matrikse uygun olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen veriler kullanılarak oluşturulan model eşitliğin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) yapılarak test edilmektedir [153]. Bu amaçla, varyasyon katsayısının hesaplanması, regresyon analizine hipotez testlerinin uygulanması, belirleme katsayısının (R^2) ve düzeltilmiş belirleme katsayısının hesaplanması (R^2_{adj}), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamının (the predicted residual error sum of squares, PRESS) hesaplanması ve model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi) gibi farklı test yöntemleri uygulanmaktadır [161, 162]. Burada belirleme katsayısının 1'e yakın olması model uyumluluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. R^2 değerinin 0.9'dan büyük olduğu matematiksel bir modelin, deneysel sonuçlarla önemli oranda uyumlu olduğu ifade edilmektedir [163].

Elde edilen modelin istatistiksel öneminin belirlenmesi için Fisher (F) testi kullanılmaktadır. F testi iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Çeşitli istatistiksel hesaplamalar sonucunda elde edilen regresyona ait F değerinin, tabloda yer alan F değerinden büyük olduğu durumda, elde edilen matematiksel modelin önemli olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. F testinin bir diğer uygulamasında ise; çeşitli hesaplamalar sonucunda elde edilen model uygunsuzluğuna ait F değeri tabloda yer alan F değerinden büyük ise; model deneysel sonuçlar ile uyumluluk göstermemektedir ve geliştirilmesi gerekmektedir [153]. Uyum eksikliği testinin yapılabilmesi için deneylerin en azından merkez noktasında tekrarlı olması gerektiği ifade edilmektedir [153].

2.2.4. Optimum Koşulların Belirlenmesi

Yanıt yüzey yönteminin en önemli amaçlarından bir tanesi; istenilen yanıtlar için optimum faktör değerlerinin belirlenmesidir. Bunun için deneysel sonuçlar ile iyi derecede uyumluluk gösteren bir matematiksel model eşitliğin elde edilmesi gerekmektedir. Her bir bağımlı değişken için elde edilen model eşitlik, yanıt yüzey grafiği yardımı ile gözlemlenebilmektedir. Bu grafikler, iki bağımsız değişkenin bağımlı değişken üzerindeki etkilerinin gösterildiği üç boyutlu grafikleridir [153]. Bu grafiklerde bir ya da birden fazla bağımsız değişkene ait değer sabit kalmaktadır. Yanıt yüzey

grafiklerinde yer alan yüzey eğimleri incelenerek grafikte yer alan faktörlerin yanıt üzerindeki maksimum ve minimum etkileri gözlemlenebilmektedir. İki bağımsız değişkenin bağımlı değişken üzerindeki etkilerini gösteren iki boyutlu grafikler ise kontur grafiği olarak adlandırılmaktadır.

CCD yönteminde, prosese ait birden fazla yanıtın optimum değerleri, “istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu (desirability)” adı altında boyutsuz olarak verilmektedir. İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu ile, proses içerisindeki her bir yanıt için belirlenen değerler, minimum, maksimum veya tek bir hedef değer olarak girilmektedir. İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu değeri 0 ile 1 arasındadır ve 1’e yaklaştıkça belirlenen optimum koşulların hedef koşullara yaklaştığı söylenebilmektedir.

“d” ile ifade edilen; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu, Eş 2.15’deki gibi değerlendirilmektedir;

$$\begin{cases} 0, & y \leq y_{\min} \\ d & = (y - y_{\min}) / (y_{\max} - y_{\min}), & y_{\min} \leq y \leq y_{\max} \\ 1, & y \geq y_{\max} \end{cases} \quad (2.15)$$

Burada y, prosese ait yanıt; $y_{\max}$ ve $y_{\min}$ ise sırasıyla, söz konusu yanıtla ait maksimum ve minimum değerlerdir.

Literatürde, pullulan üretiminde kullanılan fermantasyon ortamlarının bileşimlerinin ve fermantasyon koşullarının optimizasyonu amacıyla yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı çeşitli araştırmalar yer almaktadır. Singh ve arkadaşları [13] tarafından yapılan bir çalışmada, pullulanın üretim maliyetinin azaltılabilmesi için, kullanılan fermantasyon ortamının bileşiminin yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edildiği ve bu amaçla deney tasarımı için beş düzeyde, CCRD yönteminin kullanıldığı ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada, seçilen bağımsız değişkenlerin; fermantasyon ortamındaki sakkaroz, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, maya özütü, K_2HPO_4 ve NaCl derişimleri, yanıtların ise; pullulan ve biyokütle derişimleri ile şeker tüketim oranı olduğu bildirilmiştir. 2010 yılında, Çin’de yapılan bir başka araştırmada, *A. pullulans* SK1002 suşunun pullulan üretiminin artırılabilmesi amacıyla fermantasyon koşullarının optimizasyonunda yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı bildirilmiştir [72]. Bu araştırmada, deney tasarımının CCD

yöntemi kullanılarak üç düzeyde gerçekleştirildiği, daha sonra ise, fermantasyon sıcaklığı, fermantasyon süresi ve fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı olmak üzere üç bağımsız değişkenin pullulan üretimi üzerine etkilerini gösteren model eşitliklerin elde edildiği rapor edilmiştir [72].

Göksungur ve arkadaşları [128] tarafından yapılan bir çalışmada ise, substrat kaynağı olarak hidrolize patates nişastası atığının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* P56 suşu ile yüksek derişimde pullulan elde edilebilmesi amacıyla, fermantasyon koşullarının optimizasyonunda yanıt yüzey yönteminin kullandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada, fermantasyon süresi, substrat başlangıç derişimi ve fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı olmak üzere üç parametrenin bağımsız değişkenler olarak seçildikleri, deney tasarımının ise, CCD yöntemi ile yapıldığı ifade edilmiştir [128].

Chen ve arkadaşları [163] tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise; *A. pullulans* CJ001 suşu ile pullulan üretiminde kullanılacak olan bir fermantasyon ortamının optimizasyonu amacıyla yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, bu amaçla iki farklı tasarım yönteminden yararlanıldığı belirtilerek; pullulan üretimi üzerine kritik etkileri olan faktörlerin belirlenebilmesi amacıyla, önce; Plackett-Burman tasarımının kullanıldığı, daha sonra ise fermantasyon ortamının optimizasyonu için; CCD yönteminden yararlanıldığı ifade edilmiştir [163].

Ganduri ve ark. [14] tarafından gerçekleştirilen ve fermantasyon ortamının başlangıç substrat (palmiye şekeri) derişimi, başlangıç pH'ı ve fermantasyon süresi olarak seçilen fermantasyon parametrelerinin, *A. pullulans* MTCC 2195 suşu ile pullulan üretimi üzerine etkilerini inceleyen bir araştırmada da yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, deney tasarımının CCD yöntemine göre üç düzeyde gerçekleştirildiği, merkez ve yıldız noktalarda; 6, faktöriyel noktalarda; 8 ve toplamda ise; 20 deneyden oluştuğu belirtilmiştir.

Yang ve ark. [3] tarafından yapılan ve *A. pullulans* MTCC2195 suşu ile pullulan üretiminin incelendiği bir diğer çalışmada ise, fermantasyon koşullarının yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilerek pullulan üretiminin artırılmasının hedeflendiği

belirtilmiştir. Söz konusu araştırmada, deney tasarımının Box-Behnken yöntemi ile üç düzeyde yapıldığı ve bu amaçla; seçilen fermantasyon ortamında kullanılan soya unu hidrolizatı, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ derişimlerinin, bağımsız değişkenler olarak seçildikleri ifade edilmiştir [3].

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Bu tez çalışmasında kullanılan *Aureobasidium pullulans* suşları, çeşitli kültür koleksiyonlarından liyofilize formda ya da yatık kültürler olarak sağlanmışlardır. Büyük kısmı yurtdışından sağlanan bu suşların yanı sıra araştırmada, daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir çalışmamızda, taze toplanmış Gemlik zeytini örneklerinden izole edilmiş ve tanımlanmış olan *A. pullulans* AZ-6 suşu da kullanılmıştır. Bu araştırmada kullanılan *A. pullulans* suşları, sağlandıkları merkezler ve suşların izole edildikleri kaynaklara ilişkin bilgiler; Çizelge 3.1 'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada denenen *A. pullulans* kültürleri

Suş no.	Koleksiyon merkezi	İzolasyon kaynağı
<i>A. pullulans</i> BJ20p4	Varşova Üniversitesi, Bitki Patojenleri Bölümü, Polonya	Elma
<i>A. pullulans</i> TreCisz2	Varşova Üniversitesi, Bitki Patojenleri Bölümü, Polonya	Armut
<i>A. pullulans</i> G.Kaukaska B1	Varşova Üniversitesi, Bitki Patojenleri Bölümü, Polonya	Armut
<i>A. pullulans</i> CCF 4532	Charles Üniversitesi, Botanik Bölümü, Fungus Koleksiyonu, Çekya	Küflenmiş ceviz
<i>A. pullulans</i> MAFF 425047	NIAS Kültür Koleksiyonu, Japonya	Oshima kirazı
<i>A. pullulans</i> NBRC 100716	NBRC Kültür Koleksiyonu, Japonya	Çilek
<i>A. pullulans</i> AZ-6	Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Türkiye	Ham Zeytin

Çalışmada kullanılacak olan *A. pullulans* kültürlerinin aktifleştirilmeleri amacı ile ilk olarak; Yeast Extract Malt Extract (YM) broth besiyerine ekimler yapılmış ve ekilen besiyerleri, 28°C'de yaklaşık 48 saat inkübasyona bırakılarak canlandırılmışlardır. Bu

araştırmada, ardışık pasajlarla aktifleştirilen tüm *A. pullulans* suşları, YM agar besiyerinde yatık stoklar halinde 4°C’de buzdolabında saklanmışlar ve uygun zaman aralıkları ile, aynı ortamlardan yararlanılarak aktifleştirilmişlerdir. Kültürlerin aynı zamanda, %20 gliserin içeren Yeast Extract Pepton Dextrose (YEPD) sıvı besiyerinde stokları da yapılarak, -70°C’de derin dondurucuda uzun süreli muhafazaları sağlanmıştır.

3.1.2. Besiyerleri

Araştırmada kullanılan üreme ve ana fermentasyon ortamları, literatürde *A. pullulans*’ın pullulan üretiminin incelendiği çeşitli çalışmalar dikkate alınarak belirlenmiştir. Deneylerde, fermentasyon ortamları için hazırlanan inokulumlar, bileşimi; (g/L): sakkaroz; 30, (NH₄)₂SO₄; 2.0, maya ekstraktı; 3.0, K₂HPO₄; 5.0, MgSO₄.7H₂O; 0.2 ve NaCl; 1.0 olan üreme ortamlarında hazırlanmışlardır. Çalışmada ana fermentasyon ortamı olarak ise, bileşimi (g/L) sakkaroz; 50, (NH₄)₂SO₄; 2.0, maya özütü; 3.0, K₂HPO₄; 5.0, MgSO₄.7H₂O; 0.2 ve NaCl; 1.0 olan besiyeri kullanılmıştır [19]. Araştırmada, *A. pullulans* suşlarının canlandırılmaları amacıyla kullanılan YM broth besiyerinin bileşimi; (g/L): glukoz; 10, maya özütü; 3, malt özütü; 3 ve pepton; 5 olup, suşların yatık stoklar halinde saklanmaları amacıyla ise; YM agar besiyerinden yararlanılmıştır.

3.1.3. Doğal Substrat Kaynakları

Bu tez çalışmasında, bazı doğal substrat kaynaklarının fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak veya doğrudan fermentasyon ortamı olarak kullanılmalarının, incelenen *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla, bazı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada kullanılan doğal substrat kaynakları arasında; peyniraltı suyu, melas, üzüm posası, şeker pancarı küspesi, kavun, karpuz, soğan veya havuç kabukları ile tatlı patates yer almaktadır. Deneylerde kullanılan peynir altı suyu, Çorum’da bulunan bir süt ve süt ürünleri fabrikasından, melas ve şeker pancarı küspesi örnekleri ise, Safi Katı Yakıt San. ve Ticaret A.Ş.’e (örnek temini sırasında; Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.) ait, Çorum şeker fabrikasından temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan üzüm posası örneği, Kavaklıdere Şarapları A.Ş. firmasının Ankara, Akyurt’ta bulunan fabrikasından sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan kavun,

karpuz, soğan ve havuç örnekleri, Ankara piyasasından, tatlı patates örnekleri ise, Adana'daki yerel bir üreticiden satın alınmışlardır.

3.1.4. Deney Düzenegi

Bu araştırmada deneysel çalışmalar, kesikli sistemde; sıcaklığı ve çalkalama hızı kontrol edilebilen çalkalamalı su banyolarında, 50-150 mL'lik çalışma hacminde, 250 ve 300 mL'lik erlenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Grant SS40-D (Birleşik Krallık), Haake SWB 20 (Almanya) ve Nüve ST-402 (Türkiye) modellerindeki çalkalamalı su banyoları kullanılmıştır. Deneyler süresince karıştırma hızları; 100 vuru/dak'da sabit tutulmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Aşı Kültürünün Hazırlanması

Fermantasyon deneylerinde kullanılacak aşı kültürlerinin hazırlanması amacıyla, sırasıyla; YM broth ve YM agar yatık besiyerlerinde 28°C'de, 48 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmiş olan *A. pullulans* suşları, bileşimi daha önce Bölüm 3.1.2'de verilen; üreme ortamlarına, 2 öze dolusu/50 mL üreme ortamı olacak şekilde, standart çaplı bir öze yardımıyla inoküle edilmişlerdir. Bu ortamlar daha sonra çalkalamalı su banyolarında, 28°C'de, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, yaklaşık 48 saat inkübe edilmişlerdir. Üreme ortamında geliştirilen *A. pullulans* kültürleri, pullulan fermantasyonu amacıyla kullanılacak olan fermantasyon ortamları için, aşı kültürü olarak kullanılmışlardır.

3.2.2. Başlangıç İnokulum Derişiminin Tayini

Araştırmada kullanılan *A. pullulans* suşlarının, fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla ilk olarak, üreme ortamlarından alınan kültürlerin %0.85'lik (w/v) serum fizyolojik içerisinde ardışık seyreltileri hazırlanmıştır. Daha sonra, bu seyreltilerden petri kaplarında, önceden hazırlanmış YM agar besiyerlerine, yüzeye sürme yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir. Ekimleri yapılan besiyerlerinin 28°C'de 48 saat inkübasyonlarının ardından, oluşan kültürlerde

koloni sayımları yapılarak, her bir suş için başlangıç *A. pullulans* sayıları; kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.3. Biyokütle Derişiminin Tayini

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde biyokütle derişimi, kuru hücre ağırlığı (g/L) cinsinden hesaplanmıştır. Biyokütle derişiminin ölçülmesi amacıyla; fermantasyon ortamından yaklaşık olarak; her 24 saatte bir alınan 10 mL kültür örneği ilk olarak; 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiş ve daha sonra süpernatant ayrılarak, kalan pelet bir etüvde 80°C’de, sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. Kurutulan pelet tartıldıktan sonra, fermantasyon ortamındaki biyokütle derişimi (g/L) hesaplanmıştır.

3.2.4. Ekzopolisakkarit Derişiminin Tayini

Bu araştırmada, fermantasyon ortamında *A. pullulans* tarafından üretilmiş olan ekzopolisakkarit (EPS) derişiminin tayini amacıyla, etil alkol ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır [12]. Bu amaçla fermantasyon ortamından, yaklaşık 24 saatte bir, 10 mL kültür alınarak, örnek 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra, santrifüjlenmiş örneğin süpernatant kısmı, uygun hacimli temiz birer beher içerisine ayrılarak üzerine, buzdolabı sıcaklığında bekletilmiş olan; %99.8’lik etil alkolden, iki hacim (1:2) ilave edilmiş ve örnekler, buzdolabında yaklaşık 24 saat bekletilmişlerdir. Etil alkol ekstraksiyonu uygulanan örnek, daha sonra karıştırılarak santrifüj tüplerine aktarılmış ve 4100 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen örneğin süpernatant kısmı, temiz birer beher içerisine ayrıldıktan sonra geriye kalan çökelti bir etüvde, 80°C’de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. Kurutulan örnek tartılarak, fermantasyon ortamında, *A. pullulans* tarafından üretilmiş olan EPS derişimi; g/L olarak hesaplanmıştır.

3.2.5. Pullulan Derişiminin Tayini

Bu tez çalışmasında pullulan derişiminin tayininde; Sharma ve ark. [137] tarafından önerilen yöntem çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır. Pullulan analizi için ilk olarak; daha önce Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı şekilde; fermantasyon ortamından ayrılarak

kurutulan EPS örneği, sulu derişimi; 20 mg/mL saf su olacak şekilde temiz bir deney tüpü içerisine tartılmış, daha sonra sıcak su banyosu içerisinde tutularak ve ara ara vortekslenerek çözündürölmüştür. Bu şekilde hazırlanan çözeltiden temiz bir deney tüpü içerisine 0.5 mL alınarak üzerine daha önce hazırlanmış olan; 0.4 mL fosfat-sitrik asit tamponundan (pH 5.0) ilave edilmiş ve karışım vortekslenmiştir. Daha sonra, bu karışımın içerisine 0.1 mL pullulanaz (Promozyme D2, Sigma, ABD) enzimi ilave edilerek bir vorteks yardımıyla karıştırılmış ve karışım enzimatik hidroliz reaksiyonun gerçekleşebilmesi amacıyla, 40°C'ye ayarlanmış bir etüvde, 2 saat bekletilmiştir [137]. Süre sonunda örneğin uygun derişimleri hazırlanmış ve incelenen EPS örneğinin pullulanaz enzimi ile hidrolizi sonucunda ortaya çıkan maltotrioz derişimine karşılık gelen eşdeğer glukoz derişimi, dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi (bkz. Ek 1) kullanılarak, 540 nm dalga boyunda, spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir [164]. Analizden elde edilen sonuçların hesaplanmalarında, önceden hazırlanmış glukoz çalışma doğrusundan (Şekil Ek 2.1) yararlanılmıştır.

Pullulan analizinin gerçekleştirildiği deneylerde, standart olarak; saf bir pullulan (Sigma, ABD) örneği de kullanılarak, analizi yapılan örneğe uygulanan tüm işlemler, bu örneğe de uygulanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler sırasında enzim ve substrat körü olmak üzere; iki kör çözelti kullanılmıştır. Enzim körü olarak; enzim eklenmemiş örnek ve tampon içeren çözelti, substrat körü olarak ise; örnek içermeyen fosfat-sitrik asit tamponu çözeltisi kullanılmıştır. Analiz edilen EPS örneğindeki pullulan derişiminin tayininde; EPS örneği için hesaplanmış olan eşdeğer glukoz derişimi, saf pullulan için elde edilen eşdeğer glukoz derişimine oranlanmış ve elde edilen oran, EPS'nin alınan kültür örneğindeki derişimi ile çarpılmıştır.

3.2.6. Çeşitli Şekerlerin Derişimlerinin Tayininde Kullanılan Çalışma Doğrularının Oluşturulması

Bu çalışmadaki deneylerde, fermantasyon ortamlarına eklenen veya ortamda bulunan bazı şekerlerin derişimlerinin tayinleri amacıyla, çalışma doğruları oluşturulmuştur. Bu amaçla, glukoz, sakkaroz, fruktoz, galaktoz ve laktoz için hazırlanan çalışma doğruları, Şekil Ek 2.1 - 2.5'de verilmektedir.

Çalışma doğrularının oluşturulmasında; glukoz, fruktoz, galaktoz ve laktoz için; DNS yöntemi (bkz. Ek 1), sakkaroz için ise; fenol-sülfürik asit yöntemi (bkz. Ek 3) kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler; Boeco marka bir spektrofotometrede (model S30, Almanya), indirgen şekerler için 540 nm, sakkaroz için ise; 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlardan yararlanılarak, çalışılan her bir şeker için absorbans-derişim grafikleri ile bu değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon eşitlikleri oluşturulmuştur.

3.2.7. Enzimatik Yöntem ile Glukoz ve Fruktoz Derişimlerinin Tayini

Bu tez çalışmasında doğal substrat kaynaklarının kullanıldıkları bazı deneylerde, fermentasyon ortamlarındaki glukoz derişimleri, D-glukoz HK enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda), fruktoz derişimleri ise; D-fruktoz/D-glukoz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılarak, spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Analizler, kitler tarafından önerilen yöntemlere göre ve kitler ile birlikte verilen tampon ve diğer çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında absorbans ölçümleri; 340 nm dalga boyunda yapılmış ve analiz edilen örnekteki glukoz ve/veya fruktoz derişimleri, her bir kite ait prosedürde yer alan formüllerden yararlanılarak hesaplanmışlardır.

3.2.8. pH Ölçümü

Bu tez çalışmasındaki deneyler sırasında, çeşitli besiyerleri ve fermentasyon ortamlarının pH ölçümlerinin ve ayarlamalarının yapılabilmesi amacıyla; Hanna HI 221 model (İtalya) bir pH metre kullanılmıştır.

3.2.9. Moleküler Yapı Analizi

Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilmiş olan ve yüksek miktarda pullulan içerdiği belirlenen bazı EPS örneklerinin moleküler yapı analizleri, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi (Shimadzu, FTIR-8101, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, Mishra ve Vuppu [165] tarafından önerilen yöntem, çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır. Analizde ilk aşamada; kurutulmuş EPS örneği (bkz. Bölüm 3.2.4) akık bir havan yardımı ile homojen hale getirildikten sonra bu örnekten yaklaşık 2 mg tartılarak, 80 mg KBr ile homojen bir karışım oluşturacak şekilde

karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım, hidrolik bir pres (Shimadzu, Japonya) yardımı ile preslenerek, pelet haline getirilmiştir. Elde edilen pelet spektrometrenin okuma yapılan haznesine yerleştirilmiş ve spektroskopik taramalar; 4000-400 cm^{-1} dalga sayıları arasında, 4.0 cm^{-1} çözünürlükte ve 40 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada saf (Sigma, P-4516) ve ticari olarak üretilmiş olan bir pullulan (Hayashibara Co. Ltd.) örneğinin, FT-IR analizleri de gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örneklerinin FT-IR spektrumları ile, saf ve ticari pullulan örneklerinininkiler karşılaştırılarak, EPS örnekleri ile saf ve ticari pullulanın moleküler yapılarının benzerlikleri değerlendirilmiştir.

3.2.10. Pullulan Fermantasyonunda Kullanılacak Olan *A. pullulans* Suşunun Seçimi

Tez çalışmasının bu bölümünde ilk olarak, çeşitli kültür koleksiyonu merkezlerinden getirtilen *A. pullulans* suşları ile kendi koleksiyonumuzda bulunan bir *A. pullulans* suşunun, EPS üretilip üretilmediğinin anlaşılabilmesi amacıyla bir ön deneme gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada denenen *A. pullulans* suşları Çizelge 3.1’de verilmektedir. Suş seçimi amacıyla yapılan deneylerde, bileşimi daha önce Bölüm 3.1.2’de verilen bir fermantasyon ortamı kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri, 50 mL hacmindeki ortamlarda, 250 mL’lik erlenler içerisinde gerçekleştirilmiştir. YM agar besiyerinde 28°C’de 48 saat aktiveleştirilen her bir kültürden ayrı ayrı birer öze dolusu olacak şekilde ana fermantasyon ortamlarına aşılanmış ve erlenler, çalkalamalı bir su banyosunda, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 28°C’de inkübasyona bırakılmışlardır. Suşların EPS üretilip üretilmediğinin belirlenebilmesi amacı ile fermantasyon ortamlarından 48 ve 72 saat sonra 10’ar mL kültür örnekleri alınarak, bu örneklerde EPS analizleri yapılmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda; incelenen tüm *A. pullulans* suşlarının, EPS üretebildikleri belirlenmiştir.

Tez çalışmasının bu bölümünde daha sonra, pullulan üretimi yüksek olan bir *A. pullulans* suşunun deneylerde kullanılmak üzere seçilebilmesi amacıyla; incelenen yedi *A. pullulans* suşunun pullulan üretimleri, karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak; daha önce Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde, her bir *A. pullulans* suşuna ait aşı kültürleri hazırlanmış ve bu kültürler; önceden hazırlanmış ana fermantasyon ortamlarına (bkz. Bölüm 3.1.2) ayrı ayrı, %5 (v/v) oranında aşılanmışlardır. Bu aşamada, çalışılan

suşların başlangıç inokülasyon derişimleri; daha önce Bölüm 3.2.2’de belirtildiğı şekilde saptanmıştır.

Ana fermentasyon ortamında gerçekleştirilen deneyler; çalkalamalı bir su banyosunda, 28°C’de, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 300 mL’lik erlenlerde, 150 mL çalışma hacimlerinde gerçekleştirilmiştir. Deneyler sırasında, fermentasyon boyunca yaklaşık her 24 saatte bir ortamlardan 10 mL hacminde kültür örnekleri alınarak bu örneklerde EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri (g/L) ölçülmüştür. Daha sonra ise, her bir suş için hesaplanan EPS, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamana karşı değışimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Grafiklerin çizilmeleri amacıyla; Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) paket programından yararlanılmıştır. Elde edilen verilerden yararlanılarak, incelenen *A. pullulans* suşları arasında, çalışılan koşullarda, en yüksek derişimde pullulan üreten suş belirlenmiş ve daha sonra araştırmaya, bu suş ile devam edilmiştir.

3.2.11. Farklı Karbon Kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Tez çalışmasının bu bölümünde çeşitli karbon kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla; glukoz, fruktoz, sakkaroz, galaktoz ve maltoz kullanılmış, pullulan üretimini en iyi destekleyen karbon kaynağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gerçekleştirilen deneylerde, daha önce Bölüm 3.1.2’de bileşimi verilen ana fermentasyon ortamındaki karbon kaynağı türü, başlangıç derişimi 50 g/L olarak sabit olacak şekilde, denenecek olan karbon kaynağı ile değıştirilmiştir. Çalışmada ilk olarak fermentasyon ortamı için, *A. pullulans* AZ-6 suşuna ait aşı kültürü, Bölüm 3.2.1’de belirtildiğı şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra bu kültürden, başlangıç aşılama derişimi yaklaşık; 1×10^7 kob/mL olacak şekilde, %5 (v/v) oranında farklı karbon kaynağı içeren fermentasyon ortamlarına inokülasyonlar yapılmıştır. Her bir fermentasyon ortamındaki, *A. pullulans* AZ-6 başlangıç inokülasyon derişiminin belirlenmesi amacıyla, kültürel ekimler gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 3.2.2).

Fermantasyonlar, çalkalamalı bir su banyosunda, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 28°C’de, 300 mL’lik erlenlerde, 150 mL çalışma hacminde yapılmış ve ortamlardan yaklaşık 24 saatte bir örnekler alınarak; EPS, pullulan, biyokütle ve substrat derişimleri analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin zamana karşı değışimlerini gösteren grafikler çizilerek ve bu grafiklerden yararlanılarak, her bir farklı karbon kaynağı içeren fermantasyon ortamı için, maksimum EPS ve pullulan derişimleri, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızı, substrat tüketim hızı ve özgül pullulan oluşum hızları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, *A. pullulans* AZ-6 suşunun en yüksek miktarda pullulan ürettiğı karbon kaynağı belirlenmiş ve çalışmanın daha sonraki aşamalarında gerçekleştirilen deneylerde substrat olarak, bu karbon kaynağı kullanılmıştır.

3.2.12. Farklı Azot Kaynağı Kombinasyonlarının *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Araştırmanın bu aşamasında, farklı azot kaynağı kombinasyonlarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, organik ve inorganik olmak üzere toplam altı farklı azot kaynağı, fermantasyon ortamlarına çeşitli kombinasyonlarda ilave edilerek bazı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada organik azot kaynakları olarak; maya özütü, üre, pepton ve inorganik azot kaynakları olarak ise; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 ve NH_4Cl kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan organik ve inorganik azot kaynakları ile bunların azot içerikleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Pullulan üretiminde kullanılan organik ve inorganik azot kaynakları ve azot içerikleri

Azot kaynağı	Azot içeriğı % (w/w)
Üre	46.60
Pepton	12.00
Maya özütü	10.50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	21.18
NaNO_3	16.47
NH_4Cl	26.17

A. pullulans AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine, farklı azot kaynağı kombinasyonlarının etkilerinin incelendiği çalışmada, bileşiminde organik ve inorganik olmak üzere iki farklı azot kaynağı kullanılan fermantasyon ortamlarının denendiği, iki grup deney yapılmıştır. Her iki deney grubunda da ana fermantasyon ortamında bulunan azot kaynakları dışındaki tüm bileşenlerin derişimleri ve fermantasyon koşulları, sabit tutulmuştur. Birinci gruptaki deneylerde, ana fermantasyon ortamındaki sakkaroz, K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve inorganik bir azot kaynağı olan; $(NH_4)_2SO_4$ 'ın başlangıç derişimleri sabit tutularak, organik azot kaynağı türündeki değişimin pullulan üretimine etkisi incelenmiştir. İkinci gruba giren deneylerde ise; ana fermantasyon ortamındaki sakkaroz, K_2HPO_4 , NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve organik bir azot kaynağı olan; maya özütünün başlangıç derişimleri sabit tutularak, inorganik azot kaynağı türündeki değişimin, pullulan üretimine etkisi araştırılmıştır. İlk gruptaki deneylerde kullanılan $(NH_4)_2SO_4$ 'ın başlangıç derişimi 2.00 g/L ve ikinci gruptaki deneylerde kullanılan maya özütünün başlangıç derişimi ise 3.00 g/L'dir. Deneylerde kullanılan, farklı azot kaynağı kombinasyonları ile fermantasyon ortamlarındaki başlangıç derişimleri; Çizelge 3.3'de verilmektedir.

Çizelge 3.3. *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan farklı azot kaynağı kombinasyonları ve fermantasyon ortamlarındaki başlangıç derişimleri

Fermantasyon ortamındaki azot kaynağı karışımları	Organik azot kaynağı	Başlangıç derişimi (g/L)	İnorganik azot kaynağı	Başlangıç derişimi (g/L)
1	Maya özütü	3.00	$(NH_4)_2SO_4$	2.00
2	Pepton	2.63	$(NH_4)_2SO_4$	2.00
3	Üre	0.68	$(NH_4)_2SO_4$	2.00
4	Maya özütü	3.00	$NaNO_3$	2.57
5	Maya özütü	3.00	NH_4Cl	1.62

Tez araştırmasının bu aşamasında deney tasarımı yapılırken, ana fermantasyon ortamının bileşiminde yer alan maya özütü (3.00 g/L) ve $(NH_4)_2SO_4$ (2.00 g/L) içerisindeki azot derişimleri hesaplanmış ve sırasıyla; 0.315 ve 0.424 g/L olarak bulunmuştur. Ana

fermantasyon ortamında bulunan organik ve inorganik azot kaynaklarının toplam azot derişimi ise; 0.739 g/L olarak hesaplanmıştır. Farklı azot kaynağı kombinasyonlarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği deneylerde, denenecek olan fermentasyon ortamlarının bileşimindeki toplam azot derişimleri, ana fermentasyon ortamındakine (0.739 g/L) eşit olacak şekilde sabit tutulmuştur.

İlk gruptaki deneylerde, fermentasyon ortamına, ana fermentasyon ortamında yer alan organik azot kaynağı; maya özütüne alternatif olarak yine bir organik azot kaynağı olan; üre veya pepton ilave edilmiş ve her birinin fermentasyon ortamındaki derişimi de, besiyerindeki toplam azot derişimi (0.739 g/L) sabit kalacak şekilde hesaplanmıştır. Benzer şekilde, ikinci gruptaki deneylerde de; fermentasyon ortamına, ana fermentasyon ortamındaki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'a alternatif, inorganik azot kaynakları olarak; NaNO_3 veya NH_4Cl ilave edilmiş ve her birinin fermentasyon ortamındaki derişimleri de, ortamın toplam azot derişimi, yukarıda belirtilen değerde sabit tutulacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.3).

Deneyler, Çizelge 3.3'de belirtilen kombinasyonlardaki farklı azot kaynaklarını içeren 150 mL'lik fermentasyon ortamlarında, 28°C'de, çalkalamalı bir su banyosunda, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon deneylerinde aşı kültürünün hazırlanması ve başlangıç inokülasyon derişiminin saptanması, daha önce sırasıyla Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Farklı azot kaynağı kombinasyonlarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, yaklaşık her 24 saatte bir fermentasyon ortamlarından 10 mL kültür alınarak örneklerdeki EPS, pullulan, biyokütle ve substrat derişimleri belirlenmiştir. Daha sonra, elde edilen verilerin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler çizilerek, her bir farklı azot kaynağı kombinasyonu içeren fermentasyon ortamı için; maksimum EPS ve pullulan derişimleri, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızı, substrat tüketim hızı ve özgül pullulan oluşum hızları hesaplanmıştır. Deneylerden sonra, *A. pullulans* AZ-6 suşunun en yüksek derişimde pullulan ürettiği fermentasyon ortamının, azot kombinasyonu belirlenmiş ve çalışmanın daha sonraki aşamalarındaki fermentasyon ortamlarında, bu azot kaynağı kombinasyonu kullanılmıştır.

3.2.13. Optimizasyon Çalışması İçin Deney Tasarım Planının Oluşturulması

Bu çalışmada, çeşitli fermantasyon parametrelerinin *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi ve pullulan üretiminin optimizasyonu amacıyla, yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology; RSM) kullanılmıştır. İncelenen suşun, pullulan üretimini etkileyebilecek fermantasyon parametreleri (bağımsız değişkenler) olarak da; fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (g/L), başlangıç pepton derişimi (g/L), başlangıç pH'ı ve sıcaklık (°C) seçilmişlerdir. Optimizasyon çalışması için; Design Expert® 10.0.2 (Inc. Minneapolis, ABD) programının deneme sürümü kullanılmış ve bu program kullanılarak, dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemine göre bir deney tasarım planı oluşturulmuştur.

Deney tasarımı, -2, -1, 0, +1, +2 olarak kodlanmış beş düzeyde gerçekleştirilerek, 24 farklı kombinasyona sahip, merkez noktasında 6 tekrarlı toplam 30 deneysel noktadan oluşmuştur. Tasarımdaki α değeri, daha önce Bölüm 2.2.2'de belirtilen Eş. 2.13 kullanılarak; 2, deney sayısı (N) ise; Eş. 2.14 kullanılarak, program tarafından; 30 olarak hesaplanmıştır.

Deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri; Bölüm 2.2.2'de yer alan Eş. 2.9 yardımıyla hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2), başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklık (X_4) olmak üzere seçilen dört bağımsız değişkenin her biri için, deney tasarımında kullanılacak olan çalışma aralığı değerleri literatürde benzer konuda yapılmış olan çeşitli araştırmalar dikkate alınarak belirlenmiş olup, X_1 için; 20-100 g/L, X_2 için; 0-12 g/L, X_3 için; 2.5-8.5 ve X_4 için ise; 24-32°C aralığında olmak üzere her bir değişken için, beş farklı seviye tespit edilmiştir. Deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ile literatür taraması sonucunda belirlenen seviyeleri, Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Merkezi karma tasarım yönteminde kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Simge	Değişken seviyeleri				
		-2	-1	0	+1	+2
Başlangıç sakkaroz derişimi (g/L)	X ₁	20	40	60	80	100
Başlangıç pepton derişimi (g/L)	X ₂	0	3	6	9	12
pH	X ₃	2.5	4	5.5	7	8.5
Sıcaklık (°C)	X ₄	24	26	28	30	32

Çizelge 3.5. Bağımlı değişkenler ve simgeleri

Bağımlı değişkenler	Simge
Maksimum EPS derişimi (g/L)	Y ₁
Maksimum pullulan derişimi (g/L)	Y ₂
Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	Y ₃
Maksimum özgül pullulan üretim hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	Y ₄
Pullulan verimi (%)	Y ₅

Araştırmada, tasarım planına göre gerçekleştirilen her bir deney için bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak; maksimum EPS derişimi, maksimum pullulan derişimi, mikroorganizmanın özgül üreme hızı, maksimum özgül pullulan üretim hızı ve pullulan verimi değerleri hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında, model eşitliklerin türetilmesi için seçilen bağımlı değişkenler ve simgeleri; Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Bu çalışmada optimizasyon aşamasında, deney tasarım planında yer alan her bir deney için verilen koşullarda fermentasyonlar gerçekleştirilerek, fermentasyon boyunca belirli zaman aralıklarında, kültürlerden 10 mL hacminde örnekler alınmış ve bu örneklerdeki EPS, pullulan, biyokütle ve substrat derişimleri tayin edilmiştir. Daha sonra, elde edilen

sonuçların her birinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Deney tasarım planına uygun olarak gerçekleştirilen her deneyde elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, maksimum EPS (Y_1) ve maksimum pullulan (Y_2) derişimleri belirlenmiştir. Çalışılan mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı, μ (Y_3), Bölüm 2.1.1’de verilmiş olan; Eş. 2.2 yardımıyla, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafik kullanılarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, maksimum özgül pullulan üretim hızları (Y_4) ise, her deney için pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, önce pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren eğrilerden farklı zamanlardaki eğim değerleri hesaplanarak, ürün oluşum hızları [$d\bar{U}/dt$; g pullulan/(L.sa)] bulunmuş ve daha sonra ise; mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden, aynı zamanlara karşı gelen mikroorganizma derişim değerleri okunarak, özgül pullulan üretim hızları [q_p ; g pullulan/(g mo.sa)], Bölüm 2.1.2’de yer alan; Eş. 2.3 kullanılarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler içerisindeki en yüksek değer ise, söz konusu deneydeki maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, her deney için pullulan verimi; Y_5 (%) ise; Bölüm 2.1.3’de yer alan; Eş. 2.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.14. Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Modellenmeleri

Bu çalışmada, seçilen bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini gösteren karesel model eşitlikler, çoklu regresyon analizi ile, Design Expert®10.0.2 (Inc. Minneapolis, USA) programı kullanılarak türetilmişlerdir.

Tez çalışmasında, tüm yanıtların modellenmelerinde, en yüksek belirleme katsayılarının (R^2) elde edildiği, Eş. 3.1’de belirtilen karesel model denklemi ile uyumlu eşitlikler kullanılmıştır. Burada, y ; yanıt, X_i ve X_j ; bağımsız değişkenler, β_0 ; sabit katsayı, β_j , β_{jj} ve β_{ij} ise sırasıyla; lineer, ikinci dereceden ve iki terimli regresyon katsayılarını ifade etmektedir [154].

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

Her bir yanıt için türetilen karesel modelin uygunluğu, program tarafından yapılan varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bunun için, program tarafından oluşturulan ANOVA tablosuna bakılarak; modelin %95 güven düzeyinde önemli ($p < 0.05$), modele ait uyum eksikliğinin önemsiz ($p > 0.05$) ve R^2 değerinin ise; 0.75'den büyük olup olmadığı incelenmiştir. Bu aşamada daha sonra, değişkenlerin yanıtlar üzerindeki tek tek ve karesel etkileri ile bu değişkenlerin ikili etkilerinin önemli olup olmadıkları belirlenmiştir. Bu amaçla da, program tarafından üretilen ANOVA tablosuna bakılmış ve p değerleri 0.05'den küçük olan doğrusal (β_j), karesel (β_{jj}) ve ikili etkileşim (β_{ij}) katsayıları, %95 güven düzeyinde önemli olarak değerlendirilmiştir.

Bu aşamada son olarak, program tarafından çizilen ve seçilen bağımsız değişkenlerin her bir yanıt üzerindeki ikili etkilerini gösteren üç boyutlu yanıt yüzey ve iki boyutlu kontur grafikleri tek tek incelenmiş ve yorumlanmıştır.

3.2.15. A. pullulans AZ-6 Suşu ile Pullulan Üretiminin Optimizasyonu

Bu tez çalışmasında, incelenen bağımsız değişkenlerin maksimum EPS ve pullulan derişimleri ile A. pullulans AZ-6 suşunun özgül üreme hızı, maksimum özgül pullulan üretim hızı ve pullulan verimi üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlikler türetildikten sonra, optimum deney koşullarının belirlenebilmesi için nümerik optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla, “istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu” kullanılmıştır.

Optimizasyon işleminden önce, istenen tüm yanıtlar için hedefler belirlenmiştir. Bu hedefler belirlenirken ise, istenen hedefe ulaşma değerinin; 1'e yakın olmasına dikkat edilmiştir. Bu çalışmanın en önemli amaçlarından biri; A. pullulans AZ-6 suşu ile yüksek derişimde pullulan üretimi olduğu için fermantasyon işlemi sonucunda elde edilecek maksimum EPS ve pullulan derişimlerinin yüksek olması hedeflenmiş ve her iki bağımlı değişkenin de değerlerinin maksimum olmasına karar verilmiştir. Optimizasyon çalışmasında, diğer yanıtlardan, mikroorganizma özgül üreme hızı ve pullulan verimi için herhangi bir hedef belirtilmemiş ve maksimum özgül pullulan üretim hızı için ise, daha önce hesaplanmış olan değer aralığında çalışılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada seçilen her bir bağımsız değişken için de bir hedef belirtilmiştir. Bu amaçla, her bağımsız değişkenin değerinin, çalışılan aralıkta değiştirilmesine karar verilmiştir. Optimizasyon çalışmasında kullanılan değişkenler ve her biri için belirlenen hedefler ile bu değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri; Çizelge 3.6’da sunulmuştur. İstenilen hedeflerin belirlenmesinden sonra, program tarafından önerilen farklı çözümler değerlendirilerek, bunlar arasından istenilen hedefe ulaşma değeri en yüksek olan çözümlerden birisi seçilerek, bu çözüme ait koşullarda bir deney, paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Optimizasyon çalışmasında kullanılan değişkenler ile her biri için belirlenen hedefler ve bu değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri

Değişken	Simge	Hedef	Minimum değer	Maksimum değer
Başlangıç sakkaroz derişimi (g/L)	X ₁	Çalışılan aralıkta	20	100
Başlangıç pepton derişimi (g/L)	X ₂	Çalışılan aralıkta	0	12
pH	X ₃	Çalışılan aralıkta	2.5	8.5
Sıcaklık (°C)	X ₄	Çalışılan aralıkta	24	32
Maksimum EPS derişimi	Y ₁	Maksimum	1.9	37
Maksimum pullulan	Y ₂	Maksimum	2.01	37
Mikroorganizmanın özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	Y ₃	Hedef belirtilmedi	0.025	0.058
Maksimum özgül pullulan üretim hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	Y ₄	Çalışılan aralıkta	0.021	0.059
Pullulan verimi (%)	Y ₅	Hedef belirtilmedi	6.9	47.3

Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyler; çalkalamalı bir su banyosunda, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 300 mL’lik erlenlerde, 150 mL’lik besiyerlerinde

yapılmıştır. Deneylerde, fermantasyon boyunca yaklaşık her 24 saatte bir ortamlardan, 10 mL'lik örnekler alınarak bu örneklerde EPS, pullulan, biyokütle ve substrat analizleri yapılmıştır. Daha sonra ise, Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) paket programı kullanılarak, EPS, pullulan, biyokütle ve substratın zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. İstenilen yanıtlara ait değerler, elde edilen grafiklerden de yararlanılarak, Bölüm 3.2.13'de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra, optimum koşullarda elde edilen yanıtlara ait deneysel değerlerin uygunlukları, bu değerlerin Design Expert® 10.0.2 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programının ileri analiz (post analysis) menüsünün altındaki doğrulama (confirmation) menüsünde yer alan ve program tarafından %95 güven düzeyinde öngörülen maksimum ve minimum değerler arasında olup olmadıklarına bakılarak değerlendirilmiştir.

3.2.16. Bazı Gıda Endüstrisi Artıkları ile Çeşitli Meyve ve Sebze Atıklarının Doğrudan ya da Bazı Ön İşlemlerden Geçirildikten Sonra Fermantasyon Ortamı Temel Bileşeni Olarak Kullanılmalarının A. *pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında, doğal substrat kaynağı olarak fermantasyon ortamlarında kullanılan bazı gıda endüstrisi artıkları ile çeşitli meyve ve sebze atıklarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, gıda endüstrisi artıkları olarak peynir altı suyu, melas, üzüm posası ve şeker pancarı küspesi, meyve ve sebze atıkları olarak kavun, karpuz, soğan ve havuç kabukları ve bir diğer doğal substrat kaynağı olarak da; tatlı patates kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan her bir doğal substrat kaynağı, yapısına uygun ön işlemlerden geçirildikten sonra, literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenen; bileşimlerinde bulunan temel şeker türü/türleri ve olası miktarları dikkate alınarak, başlangıç şeker derişimlerinin tespiti amacıyla analiz edilmişlerdir. Doğal substrat kaynakları ile yapılan deneylerde, optimizasyon çalışması sonucunda elde edilmiş olan koşullarda (pH 6.48; 24.2°C) ve fermantasyon ortamı bileşiminde (bkz. Ek 4) çalışılmıştır.

Peynir altı suyunun (PAS) kullanıldığı deneylerde, ortam iki şekilde hazırlanarak çalışılmıştır. PAS, *A. pullulans* AZ-6'nın pullulan üretimi için optimize edilmiş olan fermantasyon ortamı bileşiminde (bkz. Ek 4) yer alan sakkaroz çıkartılarak, diğer

bileşenler ile birlikte veya doğrudan, başka hiçbir bileşen eklenmeden ve herhangi bir ön işlem yapılmaksızın, fermantasyon ortamı olarak kullanılmıştır. Deneylerden önce, hazırlanan fermantasyon ortamları, otoklavda 121°C’de, 15 dakika sterilize edilmiş, daha sonra ise; pH’ları 6.48’e ayarlanmıştır. Peynir altı suyu (PAS) ile hazırlanan fermantasyon ortamlarındaki laktoz derişiminin tayini; DNS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [164].

Deneylerde, şeker fabrikalarının endüstriyel açıdan oldukça önemli bir artığı olan melas ile çalışıldığında ilk olarak, fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılarak melas örneğinin bileşimindeki sakkaroz derişimi tayin edilmiştir. Daha sonra melas, sakkaroz derişimi 100 g/L olacak şekilde saf su ile 1:10 oranında seyreltilmiştir [66]. Elde edilen melas çözeltisi doğrudan veya içerisine sakkaroz dışındaki fermantasyon ortamı bileşenleri (bkz. Ek 4); eklenerek, sterilize edildikten sonra kullanılmıştır. Hazırlanan fermantasyon ortamlarının sterilizasyonları otoklavda, 121°C’de 15 dakika tutularak gerçekleştirilmiş ve ortamlar soğutulduktan sonra başlangıç pH’ları, aseptik koşullarda 6.48’e ayarlanmıştır.

Üzüm posasının kullanıldığı deneylerde, üzüm posasının içerisindeki şekerin özütlenmesi amacıyla Israilides ve ark. [66] tarafından önerilen yöntem, çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır. Bu amaçla; üzüm posası üzerine 3:1 (w/v) oranında, yaklaşık 70°C’ye ısıtılmış olan saf su eklenerek, posa laboratuvar tipi bir blender yardımı ile 30 dakika boyunca aralıklı olarak karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan bu karışım temiz bir tülbent yardımıyla süzölmüştür. Elde edilen üzüm posası özütü doğrudan fermantasyon ortamı olarak veya bileşimi Ek 4’de verilmiş olan ortam bileşimindeki sakkaroz çıkartılarak deneylerde kullanılmıştır. Üzüm posası özütü kullanılarak hazırlanmış olan fermantasyon ortamları, 121°C’de 15 dakika sterilize edilerek, bu ortamların başlangıç pH’ları 6.48’e ayarlanmıştır. Söz konusu fermantasyon ortamlarının başlangıç glukoz ve fruktoz derişimleri; D-fruktoz/D-glukoz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) kullanılarak tayin edilmiştir.

Bu tez çalışmasında bir diğer doğal substrat olarak kullanılan şeker pancarı küspesinin fermantasyon deneyleri için hazırlanmasında; üzüm posası için kullanılan yöntemden yararlanılmıştır [66]. Şeker pancarı küspesi özütü, diğer doğal substratlarda olduğu gibi doğrudan fermantasyon ortamı olarak veya bileşimi Ek 4’de verilmiş olan fermantasyon

ortamı bileşimindeki sakkaroz dışındaki diğer bileşenleri de içerecek şekilde hazırlanarak, pullulan üretimi amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan fermantasyon ortamları 121°C’de 15 dakika sterilize edilerek, pH’ları, 6.48’e ayarlanmıştır. Şeker pancarı küspesi özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamlarının bileşimlerindeki başlangıç sakkaroz derişiminin tayini amacı ile, fenol-sülfürik asit yönteminden yararlanılmıştır [166].

Tez araştırmasının bu bölümünde kullanılan, kavun, karpuz, soğan ve havuç kabuğu özütleri içeren fermantasyon ortamlarının hazırlanmalarında ilk olarak hammaddeler; laboratuvarında bir yıkama işleminden geçirildikten sonra, kabukları uygun şekilde soyulmuştur. Bu amaçla, kavun ve karpuz kabukları yaklaşık 2 cm kalınlığında, havuç kabukları ise yaklaşık; 0.1 cm kalınlığında olacak şekilde soyulmuşlardır. Soğan örneklerinde ise, kabuklarının soyulması aşamasında, en dışta bulunan ince kahverengi kabuk ve altındaki beyaz kalın tabaka ile soğanın baş kısmı alınmıştır. Anlatıldığı şekilde hazırlanan kabuk örneklerinin bileşimlerindeki şekerlerin özütlenebilmesi amacıyla; sıcak su ile özütleme yönteminden yararlanılmıştır [66]. Özütleme işleminde kavun, karpuz kabukları ve soğan kabuklarına ayrı ayrı, 3:1 (w/v) oranında olacak şekilde yaklaşık 70°C’ye ısıtılmış olan saf su ilave edilmiş ve kabuklar bir blender yardımı ile parçalanarak, 30 dakika boyunca, sıkça karıştırılarak, bekletilmişlerdir. Yapılan işlemin ardından karışım, temiz bir tülbent yardımıyla sıkılarak süzölmüştür. Kaba filtrasyonun ardından kalan süzöntülere, 4100 rpm’de 20 dakikalık bir santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Elde edilen kavun, karpuz ve soğan kabuğu özütleri doğrudan doğruya veya bileşimi Ek 4’de verilen fermantasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenler aynı derişimde içerisine eklenerek, otoklavda aynı koşullarda sterilize edildikten sonra, fermantasyon ortamı olarak kullanılmışlardır. Kullanmadan önce ortamların başlangıç pH değerleri 6.48’e ayarlanmıştır. Kavun, karpuz ve havuç kabuğu özütlerinden elde edilen fermantasyon ortamlarındaki başlangıç fruktoz ve glukoz derişimleri; D-fruktoz/D-glukoz enzimatik test kiti (Megazyme, İrlanda) ile tayin edilmiştir. Soğan kabuğu özütünün kullanıldığı fermantasyon ortamındaki başlangıç glukoz derişimi ise; D-glukoz HK (Megazyme, İrlanda) test kiti ile belirlenmiştir.

Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patatesin kullanıldığı deneylerde, patatesler yıkanarak kabukları soyulduktan sonra, mümkün olduğunca homojen boyutlarda, yaklaşık 3x3 cm

olacak şekilde kesilmişlerdir. Daha sonra hazırlanan patateslerin üzerine 1:1 oranında (w/v) 70°C'ye ısıtılmış olan saf su eklenmiş ve karışım, bir blender yardımı ile parçalanmış ve 30 dakika boyunca, ara ara karıştırılmıştır [66]. Sıcak su ile yapılan özütlemenin sonunda örnek temiz bir tülbent yardımı ile süzölmüştür. Elde edilen tatlı patates özütünü içeren fermantasyon ortamları da yukarıda belirtilen diğer doğal substratları içeren fermantasyon ortamlarında olduğu gibi iki farklı şekilde hazırlanmış, otoklavda sterilize edilmiş ve pH'ları ayarlanmıştır. Tatlı patates özütü ile hazırlanan fermantasyon ortamlarının başlangıç sakkaroz derişimleri; fenol-sülfürik asit yöntemi ile analiz edilmiştir.

Doğal substrat kaynakları ile gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde, hazırlanan ortamlar için *A. pullulans* AZ-6 kültürünün hazırlanması daha önce Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Hazırlanan *A. pullulans* AZ-6 kültürü, fermantasyon ortamındaki başlangıç derişimi yaklaşık; 1×10^8 kob/mL olacak şekilde, %5 (v/v) oranında ayrı ayrı fermantasyon ortamlarına aşılanmıştır. Deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermantasyon ortamlarındaki başlangıç derişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla da, daha önce Bölüm 3.2.2'de verilen kültürel yöntem kullanılmıştır. Fermantasyon deneyleri; kesikli sistemde, çalkalamalı su banyolarında, 300 mL'lik erlenler içerisinde 150 mL çalışma hacminde, 24.2°C'de, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süresince yaklaşık 24 saatte bir ortamlardan örnekler alınarak örneklerde EPS, pullulan, biyokütle ve substrat derişimlerinin tayinleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen verilerin zamana karşı derişimlerini gösteren grafikler çizilerek, denenen her bir fermantasyon ortamı için elde edilen maksimum biyokütle, EPS ve pullulan derişimleri ile *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızı ve özgül pullulan oluşum hızı derişimleri ile substrat tüketim hızları hesaplanmıştır.

3.2.17. UV Mutasyonun *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında, ultraviyole (UV) ışını kullanılarak gerçekleştirilen mutasyon uygulamasının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla bazı deneyler yapılmıştır. UV mutasyonu uygulamasında, Chen ve ark. [56] ile Tarabasz-Szymafiska ve Galas [144] tarafından önerilen yöntemler,

çalışmamıza uyarlanarak kullanılmıştır. *A. pullulans* AZ-6 suşunun mutasyonu amacıyla; 254 nm dalga boyunda ve 8, 15 veya 30 watt gücündeki UV lambalar kullanılmıştır. 8 watt gücündeki UV uygulaması, bir steril kabin (bioLAF, Türkiye), 15 watt'lık uygulama bir UV kabin (CAMAG, İsviçre) ve 30 watt'lık UV uygulaması ise, steril hava akışlı bir kabin (Miprolab, Türkiye) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Deneylerde ilk olarak, 5 mL YM broth besiyerlerinde 72 saat geliştirilen *A. pullulans* AZ-6 kültürleri 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmişlerdir. Elde edilen hücre peletleri üzerine 5 mL steril serum fizyolojik ilave edilerek vorteks ile karıştırıldıktan sonra tüpler, 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmişlerdir. Peletlerin yıkama işlemleri 2 kez uygulandıktan sonra üzerlerine, 5 mL steril serum fizyolojik ilave edilmiş ve vortekslenerek homojenize edilmişlerdir. Bu şekilde hazırlanan hücre çözeltileri, aseptik koşullarda, steril boş petri kaplarına aktarılmışlardır. İçerisine *A. pullulans* AZ-6 hücre çözeltisi aktarılmış olan her bir Petri, 8, 15 veya 30 W gücündeki UV kaynaklarını içeren kabinlerde, kaynağa 15 cm uzaklıkta, 5, 10, 15 veya 20 dakika bekletilmişlerdir. Her bir UV ışını uygulamasından önce ve sonra petri kaplarındaki hücre çözeltilerinden aseptik koşullarda örnekler alınarak, %0.85'lik (w/v) serum fizyolojik içerisinde uygun dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra bu dilüsyonlardan YM agar besiyerlerine yüzeye yayma yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiş ve ekimleri yapılan petri kutuları 28°C'de, 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süresi sonunda oluşan kültürlerde sayımlar gerçekleştirilerek, UV uygulamasından önceki ve sonraki hücre derişimleri belirlenmiş ve her bir UV uygulaması için ölüm oranları (%) hesaplanmıştır.

Ölüm oranlarının yaklaşık %75'den fazla olduğu kültürlerde, olası mutant suşların seçilebilmeleri amacıyla; üreyen kolonilerin makroskopik morfolojileri incelenerek renk, boyut, şekil ve kenar özellikleri açısından farklı özellikler gösteren koloniler belirlenmiştir. Söz konusu kültürlerde, *A. pullulans* AZ-6'nın tipik koloni görüntüsünden farklılık gösteren her koloni izole edilerek, önce YM broth besiyerinde 28°C'de 48 saat geliştirilerek saf kültürleri elde edilmiş ve daha sonra YM agar yatık besiyerlerinde stokları oluşturulmuştur.

Bu çalışmada, farklı doz ve süreler kullanılarak gerçekleştirilen UV mutasyonu uygulamasının *A. pullulans* AZ-6 suşunun, pullulan üretimine etkilerinin incelendiği

deneyler; optimizasyon çalışması ile belirlenen fermantasyon koşullarında (bkz. Bölüm 4.6), seçilen olası mutant suşlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon deneylerinden önce, her bir olası mutant suşun üreme ortamında aşı kültürü hazırlanmış (bkz. Bölüm 3.2.1), daha sonra ise; bu kültürden başlangıç inokülasyon derişimi yaklaşık olarak; 1×10^8 kob/mL olacak şekilde, %5 (v/v) oranında fermantasyon ortamlarına aşılanmıştır.

Fermantasyon boyunca yaklaşık her 24 saatte bir ortamlardan örnek alınarak, bu örneklerdeki EPS, pullulan, biyokütle ve substrat derişimleri belirlenmiş ve elde edilen verilerin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Bu grafiklerden yararlanılarak, olası mutant suşların kullanıldığı her bir fermantasyon ortamında elde edilen maksimum biyokütle, EPS ve pullulan derişimleri ile *A. pullulans* AZ-6 suşunun substrat tüketim hızı, özgül üreme hızı ve özgül pullulan oluşum hızları hesaplanmıştır.

3.2.18. EPS Örneklerinin Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması

Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile gerçekleştirilen deneylerde üretilen ve yüksek miktarda pullulan içeren bazı EPS örneklerinin molekül ağırlıkları da hesaplanmıştır. EPS örneklerinin molekül ağırlıkları, polimerlerin molekül ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılan ve farklı derişimlerdeki seyreltik polimer çözeltilerinin viskozitelerinin ölçülmesini temel alan bir yöntem [167, 168] kullanılarak bulunmuştur. Bu yöntemde, bir polimerin ilk olarak farklı derişimlerdeki seyreltik çözeltileri hazırlanarak viskoziteleri ölçülmekte daha sonra ise, bulunan viskozite değerleri kullanılarak her bir çözelti için intrinsik viskozite değeri hesaplanmakta ve seyreltik polimer çözeltileri için intrinsik viskozite değeri ile polimerin molekül ağırlığı arasındaki ilişkiyi gösteren Mark-Houwink eşitliği kullanılarak molekül ağırlığı hesaplanmaktadır.

Bu araştırmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının belirlenebilmesi için bu örneklerin derişimleri, 1-5 g/100 mL aralığında değişen, sudaki seyreltik çözeltileri hazırlanarak viskoziteleri (η), 20°C’de ve 100 rpm karıştırma hızında, bir Brookfield DV-II Pro (Brookfield, Middleboro, MA) model viskozimetre ile LV-II (62) tip bir spindle kullanılarak, tayin edilmiştir.

Belirli bir sıcaklıktaki, yeterince seyreltik bir polimer çözeltisinin bağıl viskozitesi (η_r), bu çözeltinin viskozitesinin (η), aynı sıcaklıktaki bir referans sıvının (çözücünün) viskozitesine (η_0) oranı olarak tanımlanmakta olup, Eş. 3.2’de verilmektedir [168].

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (3.2)$$

Tez çalışmasında, molekül ağırlıkları hesaplanacak olan EPS örneklerinin, farklı derişimlerdeki seyreltik çözeltilerinin bağıl viskoziteleri de, Eş. 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, yukarıdaki eşitlikte, η ; seyreltik EPS çözeltisinin, 20°C’deki viskozitesi, η_0 ise; aynı sıcaklıkta, referans çözücü olarak kullanılan suyun viskozitesi olarak kullanılmıştır.

Seyreltik polimer çözeltileri için spesifik viskozite (η_{sp}) Eş. 3.3 ile gösterilmekte ve çözücünün viskozitesinde, çözünen moleküllerinin etkisiyle ortaya çıkan kısmi artışı ifade etmektedir.

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (3.3)$$

Bu çalışmada, her bir EPS örneği kullanılarak hazırlanan seyreltik çözeltiler için spesifik viskozite değerleri de, Eş. 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

Spesifik vizkozitenin çözeltinin derişimine bağılı olarak değiştiği ve Eş. 3.4’de verilen Huggins bağıntısıyla ifade edildiği belirtilmektedir [167, 168].

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2c \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte, k' ; Huggins sabitini, $[\eta]$; intrinsik viskoziteyi, c ; çözeltinin derişimini göstermekte olup, η_{sp}/c oranı ise; viskozite sayısı veya indirgenmiş spesifik viskozite olarak tanımlanmaktadır.

İntrinsik viskozite, $c = 0$ değeri kullanılarak yapılan ekstrapolasyon işlemi sonucunda bulunan kuramsal bir viskozite türüdür. İntrinsik viskozite, moleküller arası etkileşimlerin gözlenmediği polimer çözeltilerinde (sonsuz seyreltik çözeltiler), polimer moleküllerinin çözücü viskozitesini artırma yeteneğinin ölçüsünü göstermektedir. Bir

çözeltideki polimer derişiminin azalmasıyla η_{sp}/c oranının da azaldığı, yeterince seyreltik (sonsuz seyreltik) çözeltilerde $[\eta]$ ise değerine ulaştığı belirtilmektedir (bkz. Eş. 3.4).

Yukarıdaki viskozite türlerinden hiçbirisi gerçek viskozite birimi olan poise (g/cm.s) biriminde değildir. Bağlı ve spesifik viskoziteler birimsizdir. İndirgenmiş viskozite ve intrinsik viskozitenin birimleri ise, cm^3/g gibi bir birim ile verilmektedir [168].

Bu çalışmada, molekül ağırlıkları hesaplanacak EPS örneklerinin farklı derişimlerdeki seyreltik çözeltilerinin spesifik viskoziteleri hesaplandıktan sonra, intrinsik viskozitelerinin bulunabilmesi için önce indirgenmiş spesifik viskozite (η_{sp}/c) değerleri hesaplanmış, daha sonra ise bu değerlerin çözeltilerin derişimleri (c) ile derişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Çözeltilerin intrinsik viskozite $[\eta]$ değerleri ise, bu grafiklerdeki doğruların y eksenini kesim noktalarından bulunmuştur.

Mark-Houwink eşitliği, polimer çözeltilerinin intrinsik viskozitelerinin polimerlerinin molekül ağırlıkları ile derişimlerini ifade etmekte olup Eş. 3.5’de verilmiştir [167, 168].

$$[\eta] = K \cdot M_w^{\alpha_M} \quad (3.5)$$

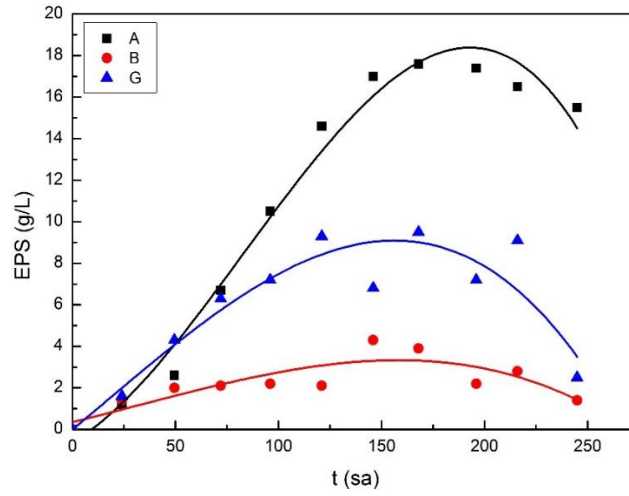
Bu eşitlikte, K ve α_M , Mark-Houwink sabitleri, M_w ise molekül ağırlığıdır. Mark-Houwink sabitlerinin değerlerinin sıcaklığa, polimer ve çözücünün türüne bağlı olarak deriştikleri ifade edilmektedir [168].

Literatürden, 20°C’de, pullulanın sudaki çözeltisi için K ve α_M değerleri, sırasıyla; 2.58×10^{-2} ve 0.646 olarak bulunmuştur [108, 169]. Bu değerler, bileşiminin büyük bir kısmı pullulandan oluşan EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılmıştır. EPS örneklerinin molekül ağırlıkları, her bir polimer çözeltisi için çizilen grafikten hesaplanan intrinsik viskozite değerleri ile K ve α_M değerlerinin, Mark-Houwink eşitliğinde (Eş 3.5) yerlerine konulmasıyla elde edilen denklemlerden hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Pullulan Üretiminde Kullanılacak *A. pullulans* Suşunun Seçimine İlişkin Sonuçlar

Pullulan üretiminde kullanılacak olan *A. pullulans* suşunun seçimi amacıyla ilk olarak, ana fermantasyon ortamı (bkz. Bölüm 3.1.2) kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde çeşitli kültür koleksiyon merkezlerinden getirtilen altı suş ile, laboratuvarımızda kendi kültür koleksiyonumuzda yer alan, yerli *A. pullulans* AZ-6 suşunun (bkz. Çizelge 3.1), EPS üretimleri araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, incelenen tüm *A. pullulans* suşlarının, EPS üretebildikleri tespit edilmiştir. İncelenen *A. pullulans* suşları içerisinde pullulan üretimi yüksek olan bir suşun belirlenebilmesi amacı ile yapılan deneylerde (bkz Bölüm 3.2.10), ilk aşamada incelenen; *A. pullulans* AZ-6, *A. pullulans* BJ20p4 ve *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşları için, fermantasyon süresince üretilen EPS derişimlerinin, zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.1.'de verilmiştir.

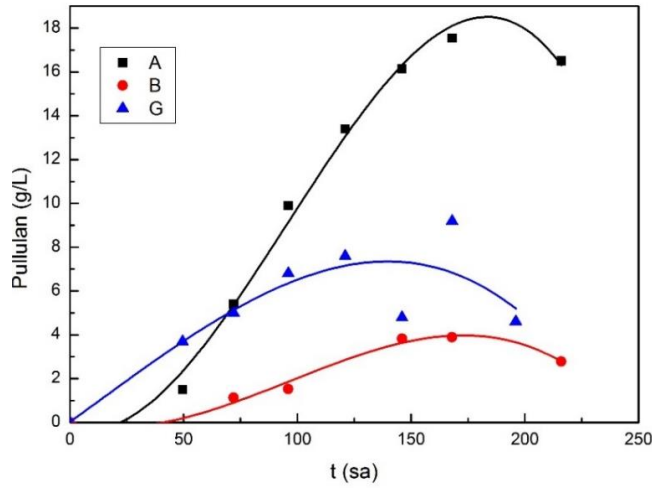


Şekil 4.1. (A): *A. pullulans* AZ-6, (B): *A. pullulans* BJ20p4, (G): *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Şekil 4.1 incelendiğinde; *A. pullulans* AZ-6, *A. pullulans* BJ20p4 ve *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen en yüksek EPS derişimleri sırasıyla; 17.60, 4.30 ve 9.50 g/L olarak, fermantasyonun 168, 146 ve 168. saatlerinde belirlenmiştir. *A.*

pullulans AZ-6 tarafından üretilen EPS derişiminin, özellikle, fermantasyonun 72. saatinden sonra hızla arttığı ve 168. saatten sonra ise bir miktar azaldığı belirlenmiştir.

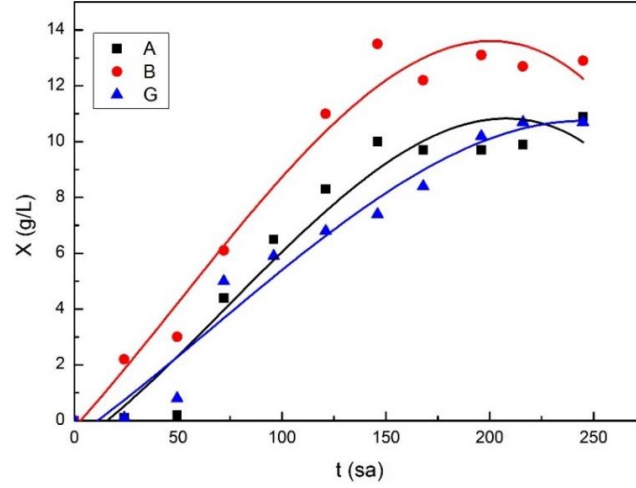
A. pullulans AZ-6, *A. pullulans* BJ20p4 ve *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin, fermantasyon süresince derişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.2'de verilmiştir. *A. pullulans* AZ-6 ve G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimlerine sırasıyla; 17.56 ve 9.15 g/L olarak, fermantasyonun 168. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir. *A. pullulans* BJ20p4 suşu tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimi ise; fermantasyonun 146. saatinde, 3.83 g/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. (A): *A. pullulans* AZ-6, (B): *A. pullulans* BJ20p4, (G): *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla derişimleri

En yüksek pullulan üreticisi suşun belirlenebilmesi için gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6, *A. pullulans* BJ20p4 ve *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla derişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.3'de sunulmuştur.

A. pullulans AZ-6, *A. pullulans* BJ20p4 ve *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşları için en yüksek biyokütle derişimleri sırasıyla; fermantasyonun 245, 146 ve 216. saatlerinde; 10.90, 13.50 ve 10.70 g/L olarak ölçülmüştür.

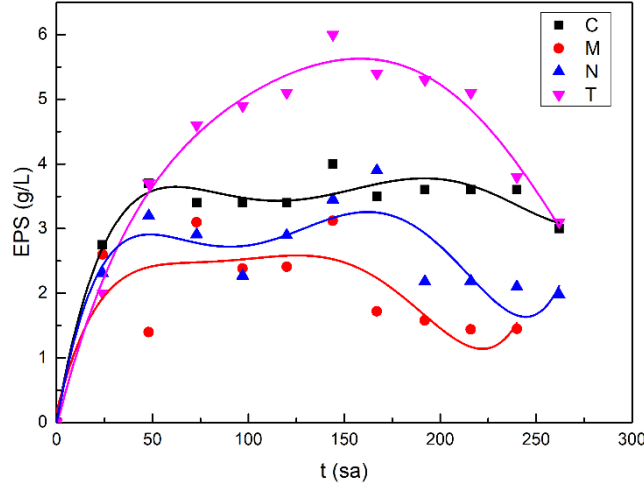


Şekil 4.3. (A): *A. pullulans* AZ-6, (B): *A. pullulans* BJ20p4, (G): *A. pullulans* G. Kaukaska B1 suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

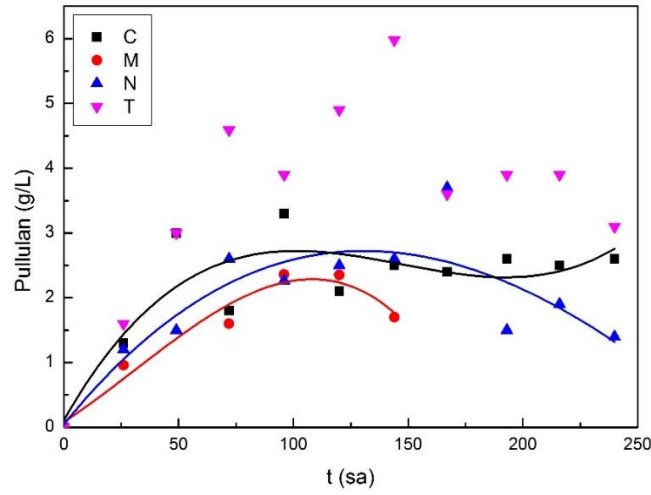
İncelenen suşlar arasında, pullulan üretimi yüksek olanın bulunabilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* TreCisz2, *A. pullulans* CCF 4532, *A. pullulans* MAFF 425047 ve *A. pullulans* NBRC ile çalışıldığında, bu suşlar tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise, Şekil 4.4'te verilmiştir.

Şekil 4.4 incelendiğinde, *A. pullulans* TrisCisz2 suşu tarafından üretilen en yüksek EPS derişimine 6.00 g/L olarak, fermantasyonun 144. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *A. pullulans* CCF 4532 suşu kullanılarak elde edilen en yüksek EPS derişiminin, fermantasyonun 144. saatinde 4.00 g/L ve *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen en yüksek EPS derişiminin ise; fermantasyonun 167. saatinde 3.90 g/L olduğu da belirlenmiştir. *A. pullulans* MAFF 425047 tarafından üretilen en yüksek EPS derişimi ise, fermantasyonun 72. saatinde, 3.10 g/L olarak tayin edilmiştir.

Bu çalışmada, *A. pullulans* TreCisz2, *A. pullulans* CCF 4532, *A. pullulans* MAFF 425047 ve *A. pullulans* NBRC suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.5'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. (C): *A. pullulans* CCF 4532, (M): *A. pullulans* MAFF 425047, (N): *A. pullulans* NBRC 100716 ve (T): *A. pullulans* TrisCisz2 suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

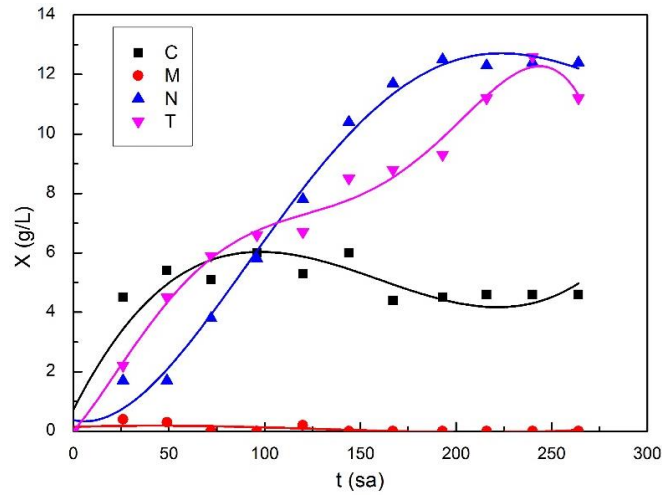


Şekil 4.5. (C): *A. pullulans* CCF 4532, (M): *A. pullulans* MAFF 425047, (N): *A. pullulans* NBRC 100716 ve (T): *A. pullulans* TrisCisz2 suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Deneylerde, *A. pullulans* TrisCisz2, *A. pullulans* NBRC 100716, *A. pullulans* CCF 4532 ve *A. pullulans* MAFF 425047 suşları tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimleri sırasıyla; 5.98, 3.67, 3.30 ve 2.36 g/L olarak tayin edilmiştir. *A. pullulans* TrisCisz2 ve *A. pullulans* NBRC 100716 tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimlerine sırasıyla; fermantasyonun 144. ve 167. saatlerinde, *A. pullulans* CCF 4532 ve *A. pullulans* MAFF

425047 suşları tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimlerine ise; fermantasyonun 96. saatinde ulaşıldığı belirlenmiştir.

Bu suşlara ait biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.6’da verilmiştir. Şekil 4.6 incelendiğine, *A. pullulans* TrisCisz2 suşuna ait biyokütle derişiminin, zamanla fermantasyonun 240. saatine kadar hızla arttığı ve en yüksek değeri olan 12.60 g/L’ye ulaştığı belirlenmiştir. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminin ise; zaman arttıkça fermantasyonun 193. saatine kadar arttığı ve daha sonra ise çok fazla değişmediği saptanmıştır. Bu suşa ait en yüksek biyokütle derişimi, 12.50 g/L olarak tayin edilmiştir. *A. pullulans* CCF 4532 suşuna ait biyokütle derişiminin; zamanla artarak, fermantasyonun 144. saatinde, en yüksek değeri olan 6.00 g/L’ye ulaştığı ve daha sonra ise bir miktar azaldığı belirlenmiştir. *A. pullulans* MAFF 425047 suşunun biyokütle derişiminde, fermantasyon süresince herhangi bir artış saptanamaması nedeniyle kullanılan ana fermantasyon ortamı bileşiminin ve çalışma koşullarının *A. pullulans* MAFF 425047 suşunun üremesini desteklemediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6. (C): *A. pullulans* CCF 4532, (M): *A. pullulans* MAFF 425047, (N): *A. pullulans* NBRC 100716 ve (T): *A. pullulans* TrisCisz2 suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Ana fermantasyon ortamındaki fermantasyon deneylerinde pullulan üretimleri incelenen *A. pullulans* suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ile fermantasyon sırasında elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ana fermentasyon ortamında yapılan deneylerde incelenen *A. pullulans* suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ile fermentasyon sırasında elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri

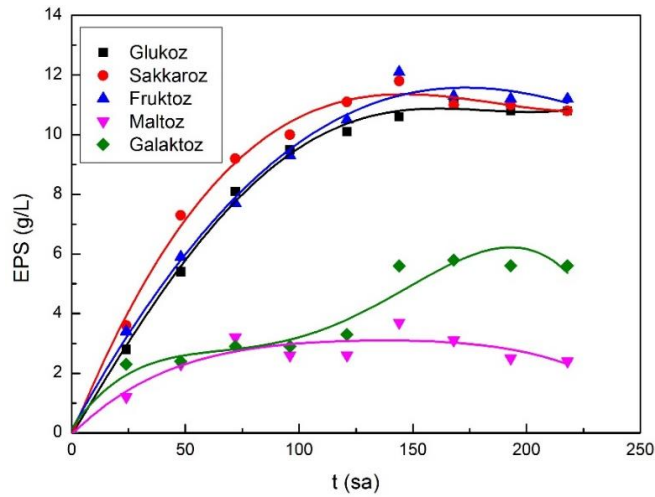
Suş	Başlangıç inokülasyon derişimi (kob/mL)	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)
<i>A.pullulans</i> AZ-6	2.4x10 ⁴	17.60	17.56	10.90
<i>A. pullulans</i> BJ20p4	8.1x10 ⁴	4.30	3.83	13.50
<i>A. pullulans</i> G. Kaukaska B1	5.7x10 ⁵	9.50	9.15	10.70
<i>A. pullulans</i> CCF 4532	2.4x10 ⁶	4.00	3.30	6.00
<i>A. pullulans</i> MAFF 425047	1.3x10 ³	3.10	2.36	-
<i>A. pullulans</i> NBRC 100716	5.4x10 ⁶	3.90	3.67	12.50
<i>A. pullulans</i> TreCisz2	2.8x10 ⁶	6.00	5.98	12.60

Bu çalışmadaki pullulan üretim kapasiteleri incelenen yedi farklı *A. pullulans* suşu içerisinde, deneylerde kullanılan ana fermentasyon ortamında en yüksek derişimde pullulan üreten suşun, *A. pullulans* AZ-6 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu suşun kullanıldığı deneyde, en yüksek EPS derişimi; 17.60 g/L ve en yüksek pullulan derişimi ise; 17.56 g/L olarak bulunmuştur. Bu deneylerde, pullulan üretimi nispeten yüksek bulunan bir diğer suş ise; *A. pullulans* G. Kaukaska B1 olup, bu suş tarafından üretilen en yüksek EPS ve pullulan derişimleri ise sırasıyla; 9.50 ve 9.15 g/L olarak belirlenmiştir. Diğer suşlar ile çalışıldığında ise; elde edilen EPS ve pullulan derişimlerinin daha düşük oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmaya kendi kültür koleksiyonumuzda bulunan ve ham zeytinden izole ettiğimiz bir suş olan *A. pullulans* AZ-6 ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar

Fermantasyon ortamlarında substrat kaynağı olarak farklı karbon kaynaklarının kullanılmasının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneyler daha önce Bölüm 3.2.11’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Söz konusu deneylerde, fermantasyon ortamlarında substrat kaynakları olarak, glukoz, fruktoz, sakkaroz, galaktoz ve maltoz kullanılmıştır. Bu deneylerde, fermantasyon ortamlarına aşıl原因an *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç aşıl原因a derişimi; 2.6×10^6 kob/mL olarak belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamlarında farklı karbon kaynaklarının kullanılmasının pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri Şekil 4.7’de verilmiştir.

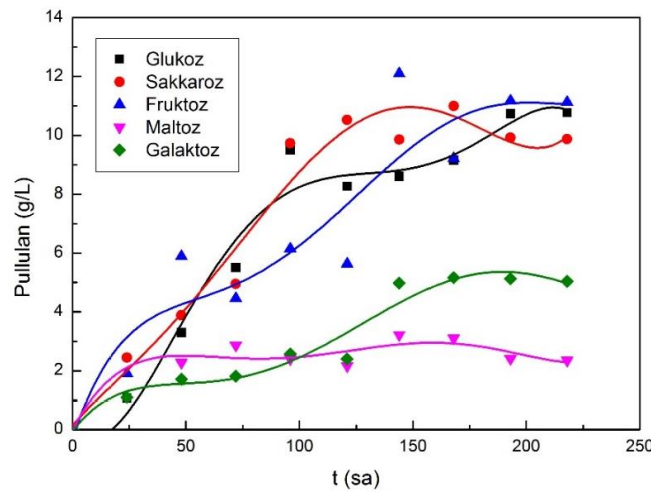


Şekil 4.7. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS üretimine etkileri

Bu çalışmadaki, en yüksek EPS derişimlerinin, fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak fruktoz, sakkaroz veya glukozun kullanıldığı deneylerde elde edildikleri belirlenmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde, fruktoz, sakkaroz ve glukozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimlerinin benzerlik gösterdikleri ve bu ortamlarda elde edilen en yüksek EPS derişimlerinin sırasıyla; 12.10, 11.80 ve 11.10 g/L oldukları tespit

edilmiştir. Ayrıca, en yüksek EPS üretiminin, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları deneylerde, fermantasyonun 144. saatinde; glukozun substrat olarak kullanıldığı deneyde ise; fermantasyonun 168. saatinde gerçekleştiği de gözlenmiştir. Maltozun substrat olarak kullanıldığı deneyde en yüksek EPS derişimi, fermantasyonun 144. saatinde; 3.70 g/L olarak ve galaktozun substrat olarak kullanıldığı deneyde ise; fermantasyonun 168. saatinde; 5.80 g/L olarak elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamlarında substrat olarak farklı karbon kaynaklarının kullanıldıkları çalışmalarda pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.8’de verilmiştir.

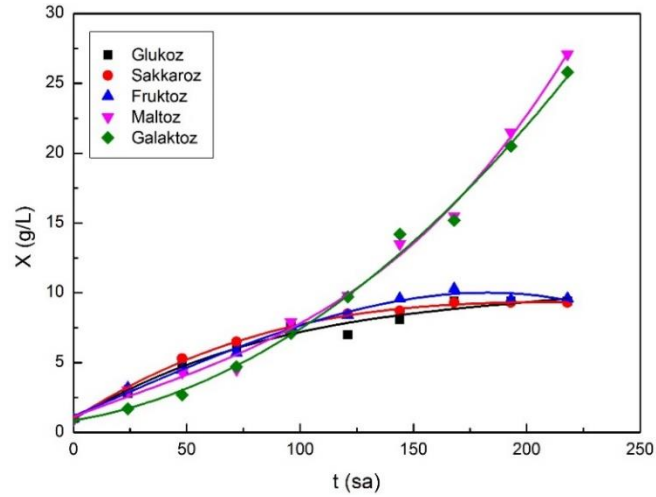


Şekil 4.8. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkileri

Şekil 4.8 incelendiğinde, fermantasyon ortamlarında glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları çalışmalarda elde edilen pullulan derişimlerinin, maltoz veya galaktozun substrat olarak kullanıldıkları çalışmalarda elde edilen derişimlerden daha yüksek oldukları belirlenmiştir. Fruktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı deneyde, en yüksek pullulan derişimi, fermantasyonun 144. saatinde, 12.10 g/L olarak tayin edilmiştir. Sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı deneyde, en yüksek pullulan derişimi, fermantasyonun 168. saatinde, 11.00 g/L ve glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı deneyde ise; fermantasyonun 218. saatinde, 10.77 g/L olarak tayin edilmiştir. Galaktoz ya da maltozun fermantasyon ortamlarında karbon kaynağı olarak

kullanıldıkları deneylerde ise, en yüksek pullulan derişimleri, sırasıyla; fermantasyonun 168. saatinde, 5.16 ve fermantasyonun 144. saatinde, 3.22 g/L olarak elde edilmiştir.

Ortamdaki karbon kaynağı türünün, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimine etkisi ise; Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Fruktoz, glukoz veya sakkarozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında biyokütle derişimlerinin zamanla değışimlerinin benzerlikler gösterdikleri belirlenmiştir. Söz konusu substratların kullanıldıkları ortamlarda, biyokütle derişimlerinin fermantasyonun 168. saatine kadar arttıkları, daha sonra ise çok fazla değışmedikleri saptanmıştır. Fruktoz, glukoz ve sakkarozun substrat olarak kullanıldıkları deneylerde en yüksek biyokütle derişimleri sırasıyla; 10.30, 9.40 ve 9.30 g/L olarak elde edilmiştir. Maltoz veya galaktozun substrat olarak kullanıldığı deneylerde ise, biyokütle derişiminin fermantasyon süresince hızla arttığı bulunmuştur. Bu çalışmadaki en yüksek biyokütle derişimleri, EPS ve pullulan derişimlerinin aksine, fermantasyon ortamlarında maltoz veya galaktozun substrat olarak kullanıldıkları deneylerde elde edilmiştir. Maltoz ve galaktoz kullanılan fermantasyon ortamlarında en yüksek biyokütle derişimleri, fermantasyonun 218. saatinde sırasıyla; 27.10 ve 25.80 g/L olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

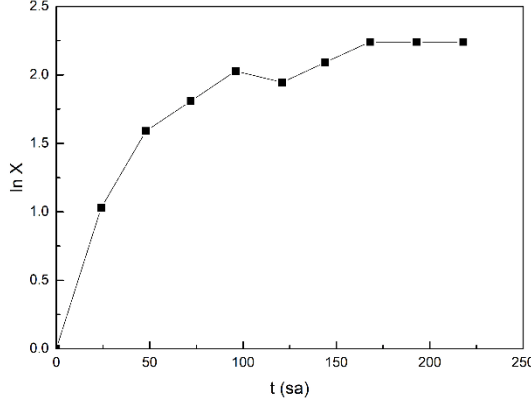
Bu çalışmada daha sonra, farklı karbon kaynakları içeren fermantasyon ortamlarında elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler kullanılarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun her bir fermantasyon ortamındaki özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, $\ln X$ değerlerinin zamana karşı değışimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.10) yararlanılmıştır.

Substrat olarak; sırasıyla glukoz, sakkaroz, fruktoz, maltoz ve galaktoz içeren fermantasyon ortamlarında; *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ) sırasıyla; 0.043, 0.047, 0.049, 0.023 ve 0.017 sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

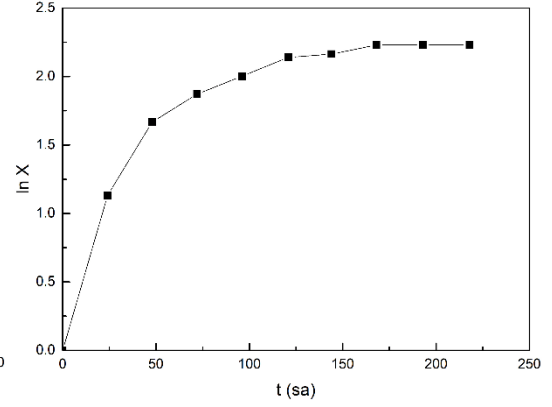
Fermantasyon ortamlarında substrat olarak farklı karbon kaynaklarının kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu için özgül pullulan oluşum hızlarının hesaplanabilmesi amacı ile, pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafiklerden önce farklı zamanlardaki eğim değerleri; $d\bar{U}/dt$ [g pullulan/(L.sa)], hesaplanarak pullulan üretim hızları bulunmuş, daha sonra ise; bu değerler kullanılarak ve aynı zamana karşı gelen mikroorganizma derişimi değerleri, mikroorganizma derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafiklerden okunarak, özgül pullulan oluşum hızları; q_p [g pullulan/(g mo.sa)], hesaplanmıştır.

Glukoz, sakkaroz, fruktoz, maltoz veya galaktozun substrat olarak kullanıldıkları deneylerde en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.129, 0.122, 0.131, 0.048 ve 0.060 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

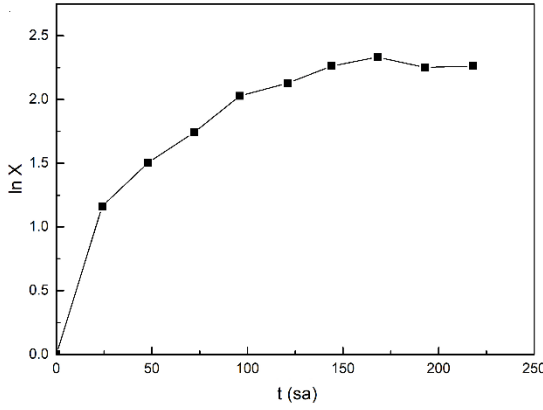
En yüksek özgül ürün oluşum hızına, glukoz ve fruktozun substrat olarak kullanıldıkları ortamlarda sırasıyla fermantasyonun 96 ve 48. saatlerinde; sakkaroz, maltoz ve galaktozun substrat olarak kullanıldıkları ortamlarda ise fermantasyonun 24. saatinde ulaşılmıştır.



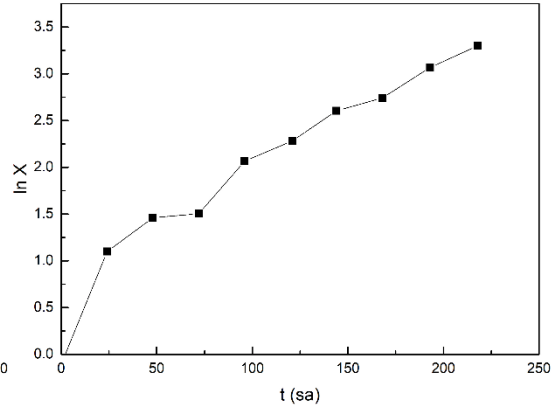
(a)



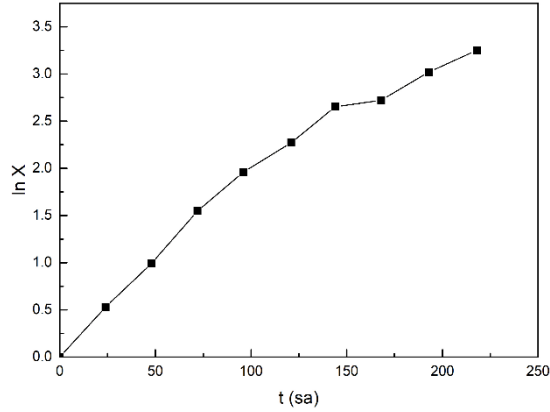
(b)



(c)



(d)

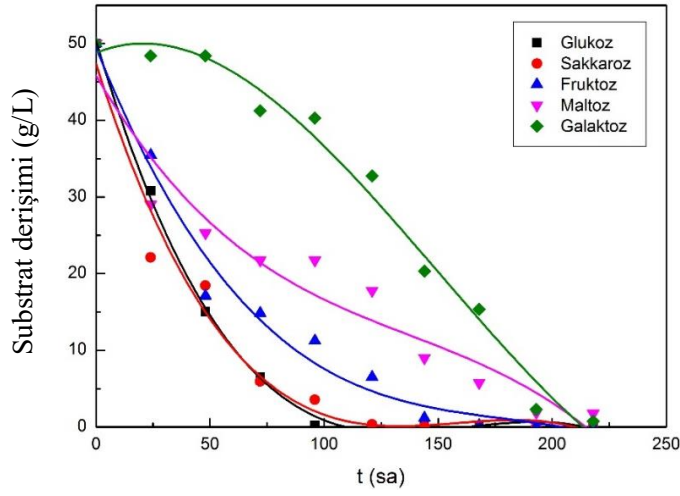


(e)

Şekil 4.10. *A. pullulans* AZ-6 suşu için substrat olarak, (a): Glukoz, (b): Sakkaroz, (c): Fruktoz, (d): Maltoz ve (e): Galaktoz içeren ana fermantasyon ortamlarında ln X değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada ayrıca, fermantasyon ortamlarından örnek alınarak fermantasyon süresince, ortamda tüketilmeden kalan substrat derişimleri de tayin edilmiştir. Bu çalışmadaki

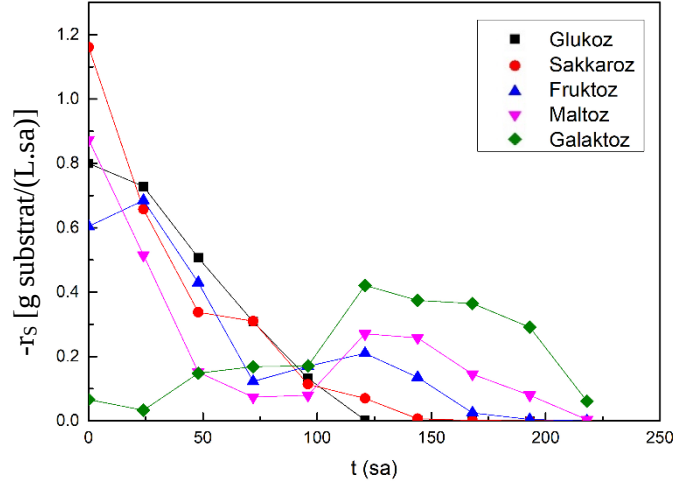
ortamların substrat derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler Şekil 4.11’de sunulmuştur.



Şekil 4.11. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerinin incelendiği deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.11’deki sonuçlar incelendiğinde; fermantasyon ortamındaki substratın glukoz olduğu çalışmada, ortamdaki glukozun fermantasyonun 168., fermantasyon ortamındaki substratın sakkaroz veya fruktoz olduğu çalışmalarda ise; ortamdaki sakkaroz ve fruktozun, fermantasyonun 193. ve fermantasyon ortamındaki substratın maltoz veya galaktoz olduğu çalışmalarda ise; ortamdaki maltoz ve galaktozun, fermantasyonun 218. saatinde tamamen tüketildikleri bulunmuştur.

Bu çalışmada; farklı karbon kaynaklarının fermantasyon ortamlarında, ayrı ayrı, substrat olarak kullanıldıkları deneylerde, her bir fermantasyon ortamı için *A. pullulans* AZ-6 suşunun substrat tüketim hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, substrat derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren Şekil 4.11’deki grafikler kullanılarak, her bir substrat için verilen eğride, farklı zamanlardaki eğim değerleri hesaplanmış ve bu yöntemle bulunan substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri ise; Şekil 4.12’de sunulmuştur.



Şekil 4.12. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerinin incelendiği deneylerde substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Substrat tüketim hızları; sakkaroz, maltoz veya glukozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında sırasıyla; 1.16, 0.87 ve 0.80 g substrat/(L.sa) olarak fermantasyonun başlangıcında, fruktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında, 0.69 g substrat/(L.sa) olarak, fermantasyonun 24. saatinde ve galaktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında ise 0.42 g substrat/(L.sa) olarak, fermantasyonun 121. saatinde hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kullanılan substratlar içerisinde, *A. pullulans* AZ-6 suşu için en yüksek substrat tüketim hızı değerine; sakkarozun fermantasyon ortamında substrat olarak kullanıldığı koşullarda ulaşılmıştır.

Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan karbon kaynakları ve her bir karbon kaynağının substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

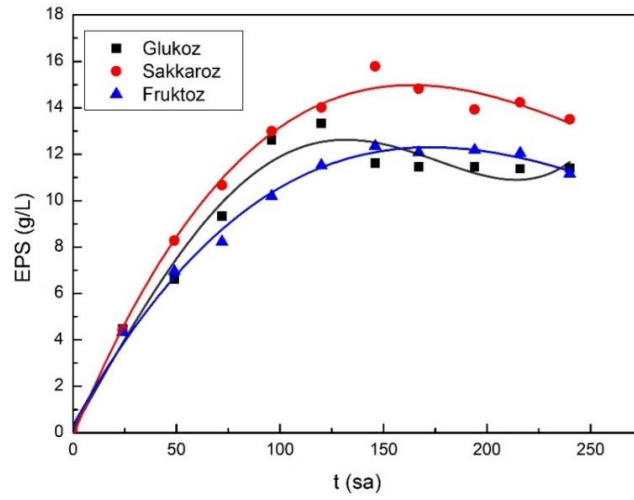
Çizelge 4.2’deki sonuçlar incelendiğinde; substrat olarak glukoz, sakkaroz veya fruktozun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin (10.77, 10.53 ve 11.18 g/L) birbirlerine oldukça yakın değerlerde oldukları saptanmış ve bu substratlar için bir deneme daha kurulmasına karar verilmiştir. Bu

amaçla, kültür ortamında daha önce Bölüm 3.2.11’de belirtilen koşullarda üretilen *A. pullulans* AZ-6 suşu, ayrı ayrı, 50 g/L sabit derişimde glukoz, sakkaroz veya fruktoz içeren fermantasyon ortamlarına aşılanmıştır. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermantasyon ortamındaki başlangıç derişimi; 1.03×10^7 kob/mL olarak belirlenmiştir.

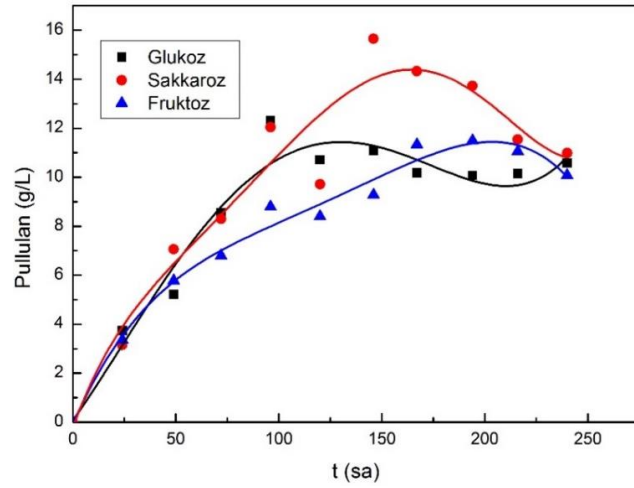
Çizelge 4.2. *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan karbon kaynakları ve her bir karbon kaynağının substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri

Fermantasyon ortamlarında kullanılan karbon kaynakları	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	En yüksek substrat tüketim hızı [g substrat/(L.sa)]
Glukoz	11.10	10.77	9.40	0.043	0.129	0.80
Sakkaroz	11.80	10.53	9.30	0.047	0.122	1.16
Fruktoz	12.10	11.18	10.30	0.049	0.131	0.69
Maltoz	3.70	3.22	27.10	0.023	0.048	0.87
Galaktoz	5.80	5.16	25.80	0.017	0.060	0.42

Glukoz, sakkaroz veya fruktozun fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanıldıkları söz konusu deneylerde, EPS ve pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise sırasıyla; Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS üretimi üzerine etkileri

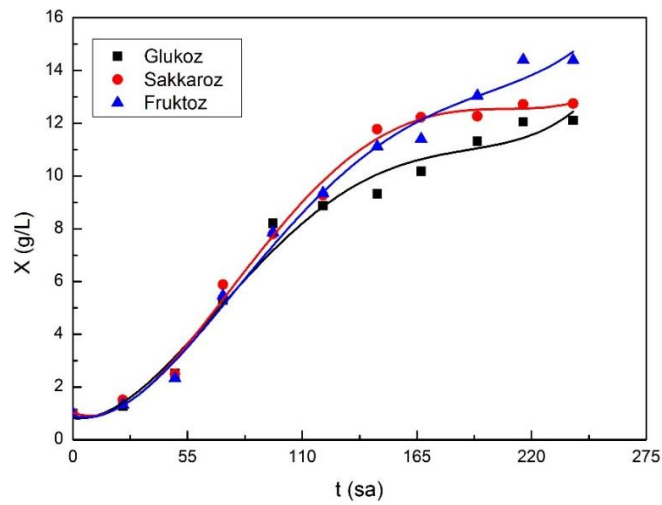


Şekil 4.14. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkileri

Sakkarozun substrat olarak kullanıldığı çalışmada, en yüksek EPS ve pullulan derişimleri, sırasıyla; 15.79 ve 15.66 g/L olarak fermentasyonun 146. saatinde elde edilmiştir. Glukozun substrat olduğu deneyde, en yüksek EPS derişimi; 13.33 g/L olarak, fermentasyonun 120. saatinde elde edilirken, en yüksek pullulan derişimi ise; 12.32 g/L olarak, fermentasyonun 96. saatinde elde edilmiştir. Fruktozun substrat olarak kullanıldığı deneyde ise; en yüksek EPS ve pullulan derişimleri sırasıyla; 12.19 ve 11.50 g/L olarak, fermentasyonun 194. saatinde tayin edilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneyler sonucunda, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile en yüksek pullulan üretiminin,

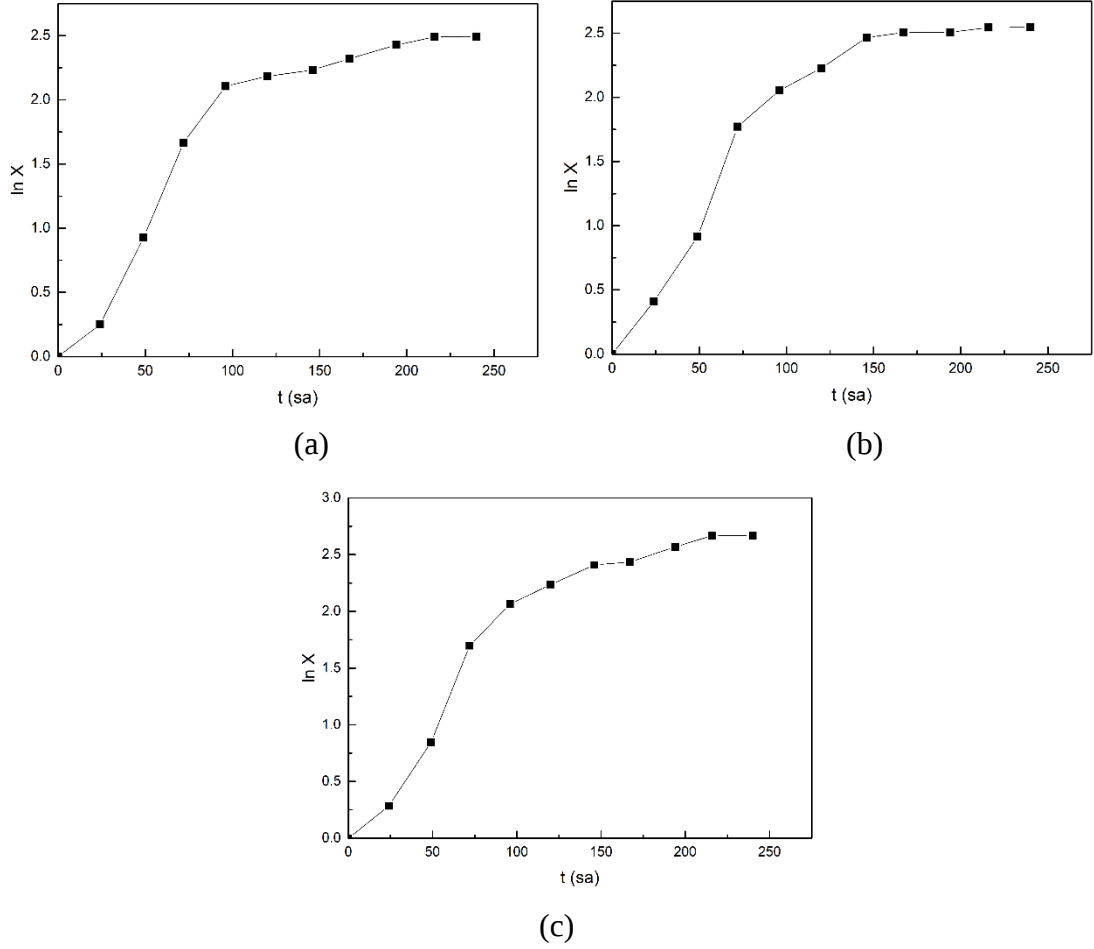
sakkarozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edildiği belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz veya sakkarozun kullanıldığı deneylerde, biyokütle değişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.15’de gösterilmiştir. Bu substratlar için fermantasyon süresince tayin edilen biyokütle değişimleri kullanılarak hesaplanan $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.15. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle değişimi üzerine etkileri

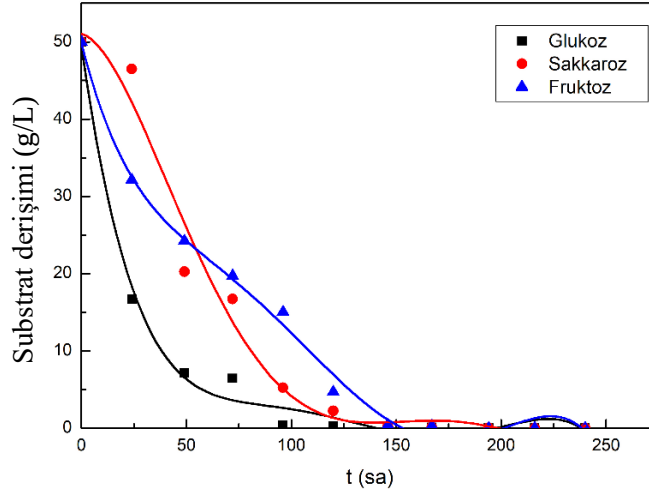
Denenen tüm substratlar için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle değişimlerinin fermantasyon süresince arttığı, elde edilen maksimum biyokütle değişimlerinin, glukoz, sakkaroz ve fruktoz için sırasıyla; 12.11, 12.76 ve 14.41 g/L olduğu (Şekil 4.15) ve Şekil 4.16’daki veriler kullanılarak hesaplanan özgül üreme hızlarının ise, glukoz için 0.032; sakkaroz ve fruktoz için ise; 0.037 sa⁻¹ olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16. *A. pullulans* AZ-6 suşu için substrat olarak, (a): Glukoz, (b): Sakkaroz ve (c): Fruktoz içeren ana fermentasyon ortamlarında $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışma için, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’deki grafikler kullanılarak özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Glukoz, sakkaroz ve fruktozun ayrı ayrı substrat olarak kullanıldıkları fermentasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi ile ilgili özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.121, 0.087 ve 0.105 g pullulan/(g mo.sa) olarak elde edilmiştir.

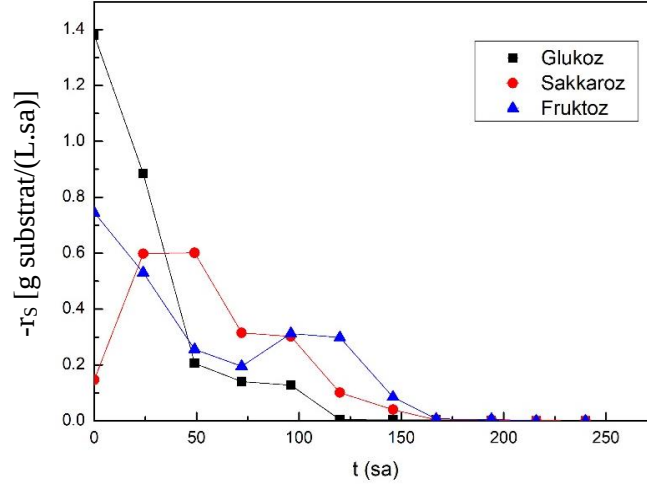
Bu gruptaki deneylerde ayrıca, fermentasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri de izlenerek Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri

Substrat olarak glukoz içeren fermantasyon ortamında, glukozun fermantasyonun ikinci gününe kadar hızla tüketildiği, daha sonra ise glukoz tüketiminin yavaşladığı tespit edilmiştir. Fruktözün substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında ise substrat tüketiminin, glukozu göre daha düşük bir hızla gerçekleştiği belirlenmiştir. Substrat olarak sakkarozun kullanıldığı deneylerde ise substrat tüketim hızının, diğer substratlara göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Her üç fermantasyon ortamında da söz konusu substratların fermantasyonun yaklaşık olarak 150. saatinden sonra tamamen tüketildikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada da, glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarındaki substrat tüketim hızları hesaplanmış ve zamanla değişimleri ise, Şekil 4.18’de gösterilmiştir. En yüksek substrat tüketim hızları glukoz ve fruktozun tek başına substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında sırasıyla; 1.38 ve 0.75 g substrat/L.sa olarak fermantasyonun başlangıcında ve sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında ise; 0.60 g substrat/L.sa olarak fermantasyonun 49. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.18. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında *A. pullulans* AZ-6 suşu ile elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri, Çizelge 4.3’de sunulmuştur.

Bu çalışmadaki en yüksek pullulan derişimi, sakkarozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Bu nedenle de, araştırmanın bundan sonraki aşamalarında fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanılmasına karar verilmiştir.

Literatürde, farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* suşlarının pullulan üretimleri üzerine etkilerinin incelendiği birçok çalışma yer almaktadır [13, 72].

Singh et al. [65] tarafından yapılan bir araştırmada, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş olan 50 adet *A. pullulans* suşu arasından seçilmiş, melanin üretmeyen, termotolerant bir suş olan *A. pullulans* RS-4 suşunun pullulan üretimi üzerine fermantasyon süresi, sıcaklık, pH, farklı karbon ve azot kaynakları ve bunların derişimlerinin etkilerinin incelendiği belirtilmektedir. Söz konusu çalışmada, karbon kaynağı olarak, maltoz, glukoz ve sakkarozun ayrı ayrı olmak üzere, %2 (w/v) oranında kullanıldıkları ifade edilmektedir. Fermantasyon işleminin, organik ve inorganik azot kaynakları olarak seçilen sırasıyla; maya özütü [%0.04 (w/v)] ve amonyum sülfat [%0.06 (w/v)] içeren 100 mL hacmindeki

sıvı fermantasyon ortamlarında, 43°C’de gerçekleştirildiği belirtilmektedir. Bu araştırmada, *A. pullulans* RS-4 suşu ile farklı karbon kaynakları içeren ortamlarda elde edilen pullulan miktarları karşılaştırılarak, en yüksek pullulan derişiminin, 4±0.05 g/100 mL olarak, glukozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edildiği ve bu değeri ise sırasıyla, maltoz ve sakkarozun substrat olarak kullanıldıkları ortamlarda elde edilen pullulan derişimlerinin izlediği de rapor edilmektedir.

Çizelge 4.3. Glukoz, sakkaroz veya fruktozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında *A. pullulans* AZ-6 suşu ile elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri

Fermantasyon ortamlarındaki karbon kaynağı	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	En yüksek substrat tüketim hızı [g substrat/(L.sa)]
Glukoz	13.33	12.32	12.11	0.032	0.121	1.38
Sakkaroz	15.79	15.66	12.76	0.037	0.087	0.60
Fruktoz	12.19	11.50	14.41	0.037	0.105	0.75

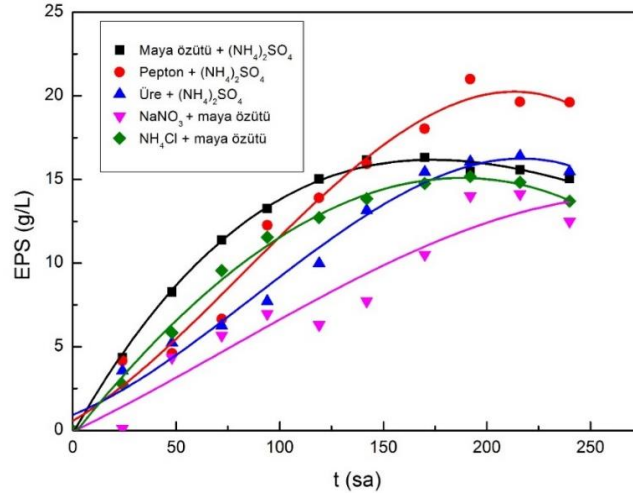
Literatürde yer alan başka bir çalışmada ise; *A. pullulans* CGMCC 3.933 suşunun UV mutantı; *A. pullulans* UVMU6-1 ile pullulan üretimi üzerine, çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkilerinin incelendiği rapor edilmiştir [56]. Bu çalışmada pullulan üretimi üzerine etkisi incelenen parametrelerden birinin de; karbon kaynağı türü olduğu ifade edilmiştir. Araştırmadaki fermantasyon deneylerinin, azot kaynağı olarak maya özütü (10 g/L) ve pepton (20 g/L) içeren sıvı fermantasyon besiyerlerinde, 30°C’de, 180 rpm çalkalama hızında gerçekleştirildiği ve bu çalışmada, glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkarozun, ortamda %4 derişimde olacak şekilde substrat olarak kullanıldıkları

belirtilmiştir [56]. Söz konusu araştırmada, en yüksek pullulan derişimine (19.8 g/L), glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı deneyde ulaşıldığı, bunu ise sırasıyla; maltoz, sakkaroz ve fruktozun karbon kaynakları olarak kullanıldığı deney sonuçlarının izlediği rapor edilmiştir Benzer şekilde, en yüksek biyokütle derişimlerine de, fermantasyon ortamında, karbon kaynağı olarak glukozun kullanılması ile ulaşıldığı da ifade edilmiştir [56].

4.3. Farklı Azot Kaynağı Kombinasyonlarının *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar

Farklı azot kaynağı kombinasyonlarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, organik ve inorganik olmak üzere toplam altı farklı azot kaynağı, fermantasyon ortamlarına, çeşitli kombinasyonlarda ilave edilerek bazı deneyler gerçekleştirilmiştir (bkz. Bölüm 3.2.12, Çizelge 3.2). Bu çalışmada, organik azot kaynakları olarak, maya özütü, üre ve pepton, inorganik azot kaynakları olarak ise; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 ve NH_4Cl kullanılmıştır. Bu deneyler için *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç aşılama derişimi; 8.6×10^7 kob/mL olarak belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı çalışmalarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Fermantasyon ortamının bileşimindeki inorganik azot kaynağının, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, derişiminin sabit tutulduğu ve sadece organik azot kaynağındaki değişimin, EPS üretimine etkisinin incelendiği çalışmalarda; en yüksek EPS derişiminin pepton kullanıldığında elde edildiği ve bunu sırasıyla; üre ve maya özütünün kullanıldığı çalışmaların izlediği bulunmuştur. Fermantasyon ortamlarında organik azot kaynağı olarak pepton, üre ve maya özütünün kullanıldığı çalışmalarda elde edilen en yüksek EPS derişimleri sırasıyla; 21.00, 16.40 ve 16.31 g/L olarak, fermantasyonun sırasıyla; 192, 216 ve 170. saatlerinde tayin edilmiştir.



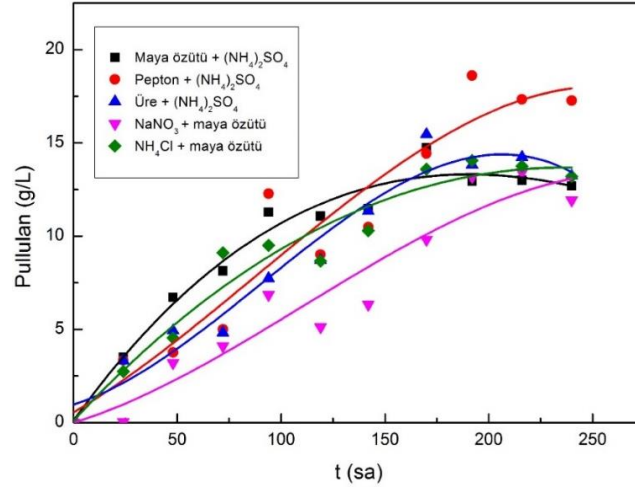
Şekil 4.19. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Fermantasyon ortamının bileşimindeki maya özütünün derişimi sabit tutularak sadece inorganik azot kaynağındaki değışimin EPS üretimine etkisinin incelendiğı çalışmalarda ise, en yüksek EPS üretiminin (16.31 g/L), (NH₄)₂SO₄ kullanıldığında elde edildiğı saptanmıştır. Fermantasyon ortamlarında inorganik azot kaynağı olarak, NH₄Cl ve NaNO₃'ın kullanıldığı çalışmalarda tayin edilen en yüksek EPS derişimleri sırasıyla, 15.18 ve 14.13 g/L'dir.

En yüksek EPS üretimlerinin, pepton ve (NH₄)₂SO₄ ile maya özütü ve NH₄Cl'ün azot kaynağı karışımları olarak kullanıldıkları çalışmalarda, fermantasyonun 192. ve maya özütü ve NaNO₃'ın azot kaynağı karışımı olarak kullanıldığı çalışmada ise, fermantasyonun 216. saatinde gerçekleştiğı belirlenmiştir (Şekil 4.19).

Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı çalışmalarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri ise, Şekil 4.20'de sunulmuştur. Fermantasyon ortamının bileşimindeki inorganik azot kaynağının derişiminin 2.00 g (NH₄)₂SO₄/L değerinde sabit tutulduğu deneylerde, ortamdaki organik azot kaynağındaki değışimin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde, en yüksek pullulan üretimine pepton kullanılan durumda ulaşıldığı ve bunu ise sırasıyla; üre ve maya özütünün kullanıldığı deney sonuçlarının izlediğı belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamlarında azot kaynağı karışımı olarak, pepton ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile maya özütü ve NH_4Cl 'ün birlikte kullanıldıkları çalışmalarda en yüksek pullulan derişimleri, sırasıyla; 18.61 ve 14.06 g/L olarak fermantasyonun 192. saatinde elde edilmiştir (Şekil 4.20).



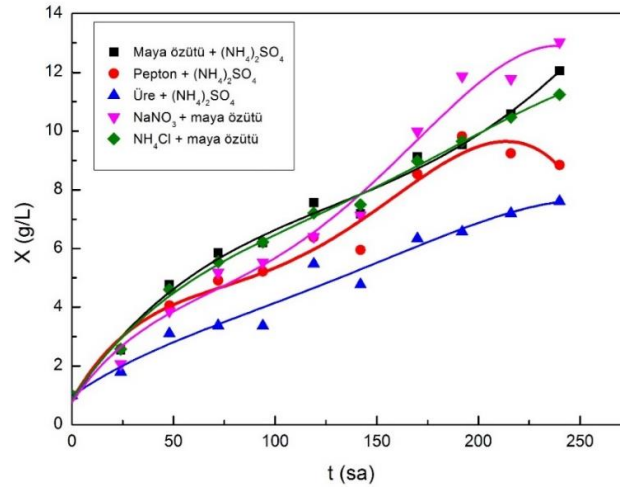
Şekil 4.20. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Sabit derişimde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren ortamlara, organik azot kaynağı olarak maya özütü ve üre ilave edildiğinde ise en yüksek pullulan derişimleri sırasıyla; 14.75 ve 15.45 g/L olarak fermantasyonun 170. saatinde tayin edilmiştir. Maya özütünün NaNO_3 ile birlikte kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki en yüksek pullulan derişimi ise, 13.42 g/L olarak fermantasyonun 240. saatinde elde edilmiştir.

Çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri ise; Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Pepton ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak birlikte kullanıldıkları çalışmada, en yüksek biyokütle derişimi, fermantasyonun 192. saatinde, 9.82 g/L olarak belirlenmiştir. Çeşitli azot kaynağı karışımlarının *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda, fermantasyon sonunda ulaşılan en yüksek biyokütle derişimi, maya özütü ve NaNO_3 'ün birlikte kullanıldıkları deneyde, fermantasyonun 240. saatinde,

13.03 g/L olarak tayin edilirken; en düşük biyokütle derişimi ise, üre ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın birlikte kullanıldıkları deneyde, yine aynı saatte, 7.61 g/L olarak elde edilmiştir.

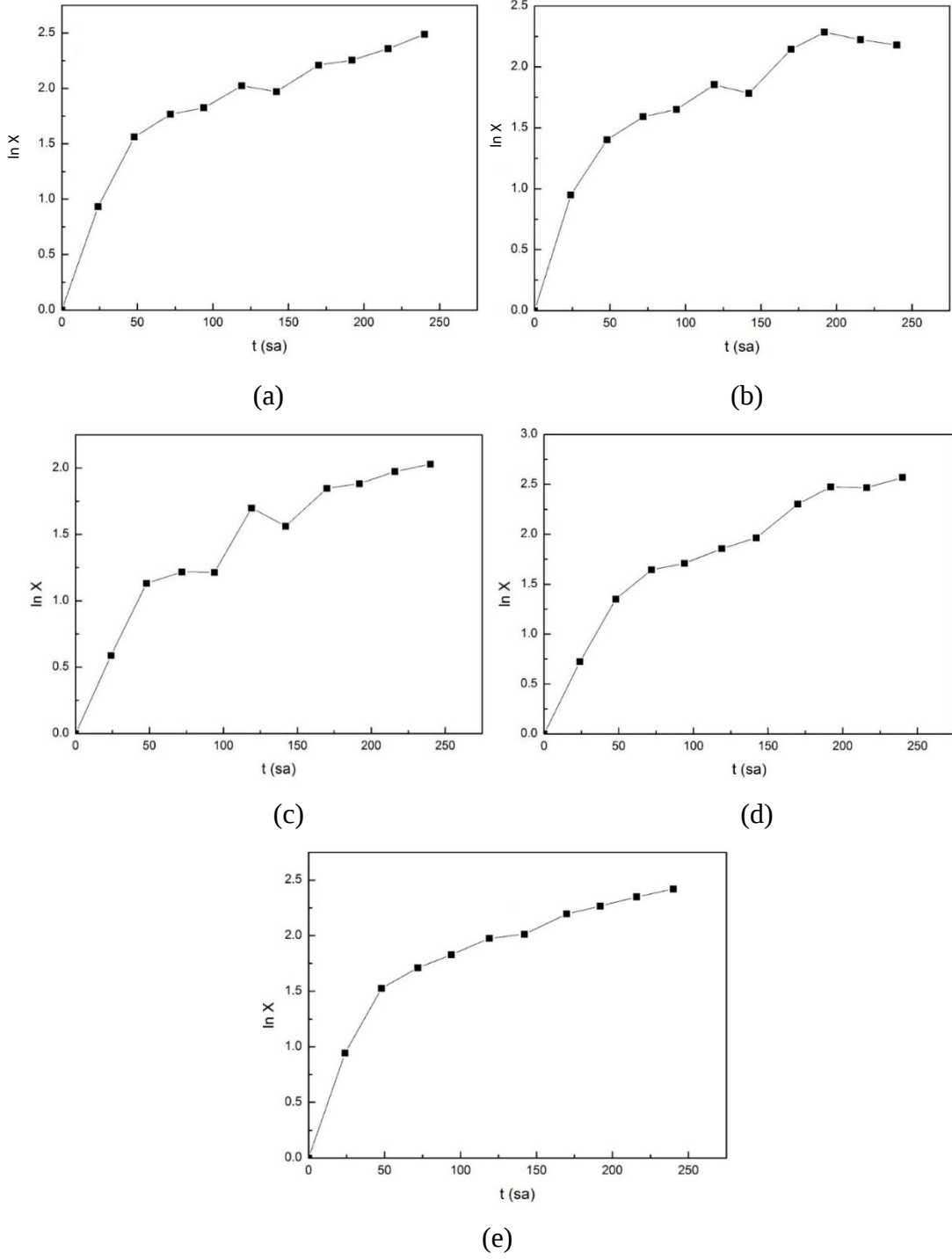
3.00 g/L maya özütü içeren fermantasyon ortamlarında yapılan çalışmalarda ise, ortama $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ veya NH_4Cl ilave edildiğinde, en yüksek biyokütle derişimleri, fermantasyonun 240. saatinde sırasıyla; 12.05 ve 11.24 g/L olarak tayin edilmiştir.



Şekil 4.21. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde fermantasyon ortamındaki azot kaynağı karışımlarının mikroorganizmanın özgül üreme hızına etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, her bir azot kaynağı karışımı ile gerçekleştirilen deney sonucunda elde edilen mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiş ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.22).

A. pullulans AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı, μ , azot kaynağı karışımı olarak maya özütü ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve maya özütü ve NH_4Cl içeren ortamlarda, 0.039 sa^{-1} ; üre ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile maya özütü ve NaNO_3 içeren ortamlarda ise, sırasıyla; 0.024 ve 0.030 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.



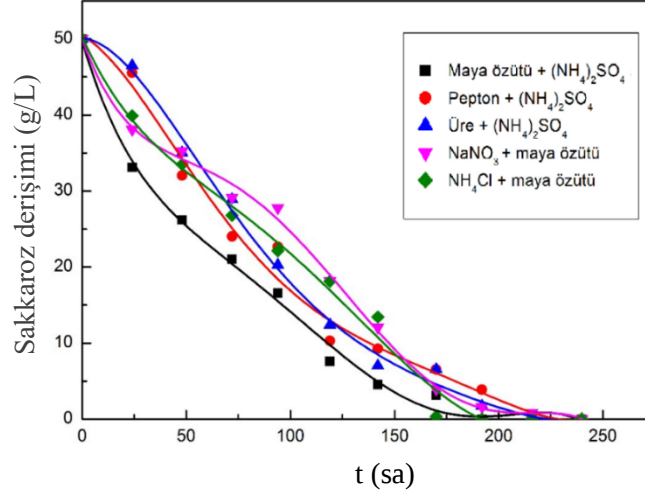
Şekil 4.22. *A. pullulans* AZ-6 suşu için azot kaynağı olarak (a): maya özütü ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (b): pepton ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (c): üre ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (d): NaNO_3 ve maya özütü ve (e): NH_4Cl ve maya özütü içeren fermantasyon ortamlarında $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Çalışmanın daha sonraki aşamasında ise, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında yapılan deneyler için pullulan üretimi ile ilgili en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla, her deney için mikroorganizma tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren eğrilerden (Şekil 4.20), farklı zamanlara karşı gelen eğim değeri hesaplanmış ve bulunan değeri, Şekil 4.21’de yer alan ve bu çalışmada denenen her bir azot kaynağı karışımı içeren fermantasyon ortamı için elde edilen eğrilerdeki aynı zamana karşı gelen X değeri bölünerek özgül ürün oluşum hızları hesaplandıktan sonra en yüksek özgül ürün oluşum hızı değeri belirlenmiştir. Bu çalışmada, en yüksek özgül ürün oluşum hızları, μ_m , maya özütü ve $(NH_4)_2SO_4$ ’ın, pepton ve $(NH_4)_2SO_4$ ’ın ve maya özütü ve NH_4Cl ’ün azot kaynağı karışımları olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamları için 0.367; üre ve $(NH_4)_2SO_4$ ’ın ve maya özütü ve $NaNO_3$ ’ın birlikte kullanıldıkları fermantasyon ortamları için ise sırasıyla, 0.365 ve 0.351 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Sabit derişimde $(NH_4)_2SO_4$ içeren ve bileşimindeki organik azot kaynağı türü değıştirilen fermantasyon ortamlarında, en yüksek özgül ürün oluşum hızları, maya özütü veya peptonun kullanıldığı ortamlarda, fermantasyonun 24.; ürenin kullanıldığı ortamda ise, fermantasyonun 48. saatinde elde edilmiştir.

Çeşitli azot kaynaklarını içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimi süresince bu ortamlardaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri de izlenmiştir (Şekil 4.23).

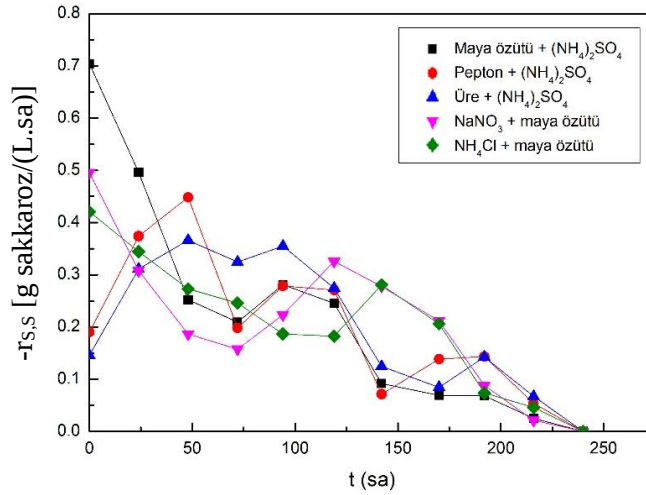
Şekil 4.23’e göre, sakkaroz, mikroorganizma tarafından; maya özütü ve $(NH_4)_2SO_4$ ve maya özütü ve NH_4Cl ’ün azot kaynağı olarak birlikte kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında, fermantasyonun 192., üre ve $(NH_4)_2SO_4$, pepton ve $(NH_4)_2SO_4$ ve maya özütü ve $NaNO_3$ ’ın birlikte kullanıldıkları ortamlarda ise, 240. saatinde tamamen tüketilmiştir.



Şekil 4.23. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde, sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu çalışmada ayrıca, farklı azot kaynağı kombinasyonlarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki substrat tüketim hızlarının zamanla değışimleri de incelenmiştir (Şekil 4.24). Fermantasyon ortamının bileşimindeki inorganik azot kaynağı olan (NH₄)₂SO₄'ın derişiminin 2 g/L olarak sabit tutulduğu ve sadece organik azot kaynağındaki değışimin substrat tüketim hızına etkisinin incelendiği deneylerde, en yüksek sakkaroz tüketim hızı; fermantasyon ortamında maya özütü kullanıldığında; 0.70 g sakkaroz/(L.sa) olarak fermantasyonun başlangıcında, pepton ve üre kullanıldığında ise sırasıyla; 0.45 ve 0.37 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 48. saatinde elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamının bileşimindeki maya özütünün derişiminin 3 g/L olarak sabit tutulduğu ve sadece inorganik azot kaynağındaki değışimin substrat tüketim hızına etkisinin incelendiği çalışmalarda ise; en yüksek substrat tüketim hızlarına fermantasyon ortamında NaNO₃ ve NH₄Cl kullanıldığında, sırasıyla; 0.50 ve 0.42 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında ulaşılmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynağı karışımlarının kullanıldığı deneylerde, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynağı kombinasyonlarının kullanılmasının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerinin incelendiği deneylerde elde edilen bazı sonuçlar ise, Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

Söz konusu çizelgede de görüldüğü gibi bu çalışmadaki en yüksek EPS ve pullulan derişimleri, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak pepton ve (NH₄)₂SO₄’ın birlikte kullanıldığı durumda elde edilmiştir. Bu deneylerde, en yüksek biyokütle derişimine, NaNO₃ ve maya özütü karışımının kullanıldığı fermantasyon ortamında ulaşılmıştır. En yüksek özgül üreme hızı (0.039 sa⁻¹) ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı [0.367 g pullulan/(g mo.sa)] değerleri, fermantasyon ortamında maya özütü-(NH₄)₂SO₄, pepton-(NH₄)₂SO₄ veya NH₄Cl-maya özütü kombinasyonlarının kullanıldığı deneylerde elde edilmiştir. Substrat tüketim hızının en yüksek olduğu azot kaynağı kombinasyonu ise; maya özütü + (NH₄)₂SO₄ olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, en yüksek pullulan derişimine pepton ve (NH₄)₂SO₄ kombinasyonu ile ulaşıldığı için, bundan sonraki deneylerde de fermantasyon ortamlarında bu azot kaynakları kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretiminde kullanılan azot kaynağı kombinasyonları ile her bir azot kaynağı kombinasyonunun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül ürün oluşum hızı ile substrat tüketim hızı değerleri

Azot kaynağı kombinasyonu	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	En yüksek substrat tüketim hızı [g sakkaroz/(L.sa)]
Maya özütü + (NH ₄) ₂ SO ₄	16.31	14.75	12.05	0.039	0.367	0.70
Pepton + (NH ₄) ₂ SO ₄	21.00	18.61	9.82	0.039	0.367	0.45
Üre + (NH ₄) ₂ SO ₄	16.40	15.45	7.61	0.024	0.365	0.37
NaNO ₃ + maya özütü	14.13	13.42	13.03	0.030	0.351	0.50
NH ₄ Cl + maya özütü	15.18	14.06	11.24	0.039	0.367	0.42

Yoon ve ark. [83] tarafından, Kore’de yapılan bir araştırmada, *A. pullulans* IMS 822 suşu ile pullulan üretiminin optimizasyonu amacı ile, fermantasyon ortamlarında çeşitli organik azot kaynaklarının kullanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan organik azot kaynaklarının; *Ashybya gossypii* özütü, et özütü, mısır maserasyon likörü ve tozu, malt özütü, soyton pepton ve maya özütü oldukları ifade edilmiştir. Söz konusu araştırmada, en yüksek pullulan ve biyokütle derişimlerinin denenenler arasında; *Ashybya gossypii* özütü içeren fermantasyon ortamında elde edildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, *Ashybya gossypii* özütünün bileşimindeki azota ek olarak riboflavinin de, *A. pullulans*’ın pullulan üretimini desteklemiş olabileceği vurgulanmıştır.

Sugumaran ve ark. [97] tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, fermantasyon ortamlarında, buğday ve pirinç kepekleri, hindistan cevizi çekirdeği ve palmye çekirdeği gibi doğal substrat kaynakları kullanılarak, *A. pullulans* MTCC2670 suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan doğal substrat kaynakları içerisinde, en yüksek pullulan derişiminin (16.0 g/L), fermantasyon ortamında palmye çekirdeği kullanıldığında elde edildiği vurgulanmıştır. Söz konusu araştırmada; substrat olarak palmye çekirdeğinin kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, çeşitli parametrelerin *A. pullulans* MTCC2670 suşunun, pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği de ifade edilmiştir. Araştırmada, azot kaynağı olarak, amonyum sülfat, amonyum klorür, pepton, maya özütü ve malt özütünün denendiği ve en yüksek pullulan derişiminin, 16.85 g/L olarak, maya özütü kullanıldığında elde edildiği; ancak, bu çalışmadaki diğer azot kaynakları ile de yakın derişimlerde pullulanın üretilebildiği vurgulanmıştır.

4.4. Optimizasyon Çalışması İçin Deney Tasarım Planının Oluşturulması

Bu çalışmada, çeşitli fermantasyon parametrelerinin, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerini gösteren model eşitliklerin türetilebilmesi ve fermantasyon koşullarının optimize edilebilmesi amacıyla ilk olarak; dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemine göre bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Deney tasarımı için seçilen dört bağımsız değişken ve bu değişkenlerin her biri için belirlenen beş seviyedeki çalışma değerleri, Bölüm 3.2.13’de yer alan Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Merkezi karma tasarım yöntemine göre oluşturulan deney tasarım planı, Çizelge 4.5 ve 4.6’da sunulmuştur. Seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri Çizelge 4.5’de, kodlanmış değerleri ise, Çizelge 4.6’da verilmiştir. Elde edilen deney tasarım planı, yıldız ve faktoriyel noktalarda yer alan 24 farklı deney, merkez noktada birbirinin tekrarı olan 6 deney ve toplamda ise, 30 deneyden oluşmaktadır.

Çizelge 4.5. Bağımsız değişkenlerin, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak tasarlanan deneylerdeki gerçek değerleri

Deney No.	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃	X ₄ (°C)
1	40	3	4.0	26
2	80	3	4.0	26
3	40	9	4.0	26
4	80	9	4.0	26
5	40	3	7.0	26
6	80	3	7.0	26
7	40	9	7.0	26
8	80	9	7.0	26
9	40	3	4.0	30
10	80	3	4.0	30
11	40	9	4.0	30
12	80	9	4.0	30
13	40	3	7.0	30
14	80	3	7.0	30
15	40	9	7.0	30

Çizelge 4.5. Devam ediyor.

Deney No.	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃	X ₄ (°C)
16	80	9	7.0	30
17	20	6	5.5	28
18	100	6	5.5	28
19	60	0	5.5	28
20	60	12	5.5	28
21	60	6	2.5	28
22	60	6	8.5	28
23	60	6	5.5	24
24	60	6	5.5	32
25	60	6	5.5	28
26	60	6	5.5	28
27	60	6	5.5	28
28	60	6	5.5	28
29	60	6	5.5	28
30	60	6	5.5	28

X₁ = başlangıç sakkaroz derişimi, g/L; X₂ = başlangıç pepton derişimi, g/L; X₃ = pH; X₄ = sıcaklık, °C

Çizelge 4.6. Bağımsız değişkenlerin, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak tasarlanan deneylerdeki kodlanmış değerleri

Deney No.	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃	X ₄ (°C)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1

Çizelge 4.6. Devam ediyor.

Deney No.	X ₁ (g/L)	X ₂ (g/L)	X ₃	X ₄ (°C)
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

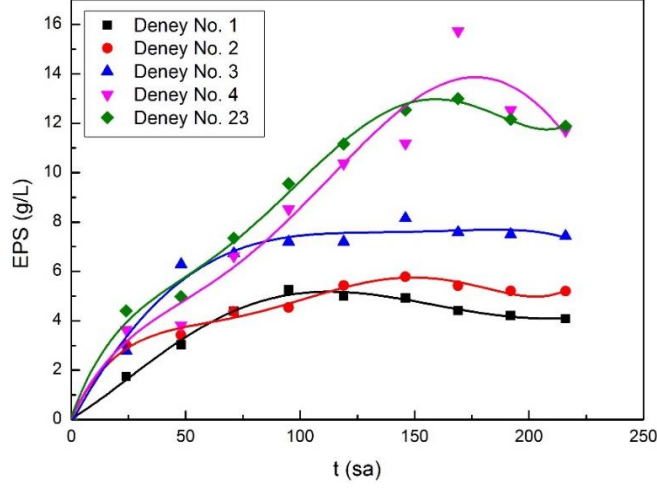
X₁ = başlangıç sakkaroz derişimi, g/L; X₂ = başlangıç pepton derişimi, g/L; X₃ = pH; X₄ = sıcaklık, °C

Deney tasarımına uygun olarak gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimlerinin, 8.6×10^7 - 1.0×10^8

kob/mL aralığında değiştikleri belirlenmiştir. Her deneyde, fermentasyon sũresince, fermentasyon ortamlarından, belirli zaman aralıklarında ȳrnek alınarak, bu ȳrneklerdeki, EPS, pullulan, biyokũtle ve substrat derişimleri tayin edilmiş ve her birinin zamanla değişimlerini gȳsteren grafikler çizilmiştir. Elde edilen bu grafiklerden yararlanılarak, her bir deney için yanıt olarak, maksimum EPS derişimi, maksimum pullulan derişimi, mikroorganizmanın ȳzgũl ȳreme hızı, maksimum ȳzgũl pullulan ȳretim hızı ve pullulan verimi değerleri hesaplanmıştır.

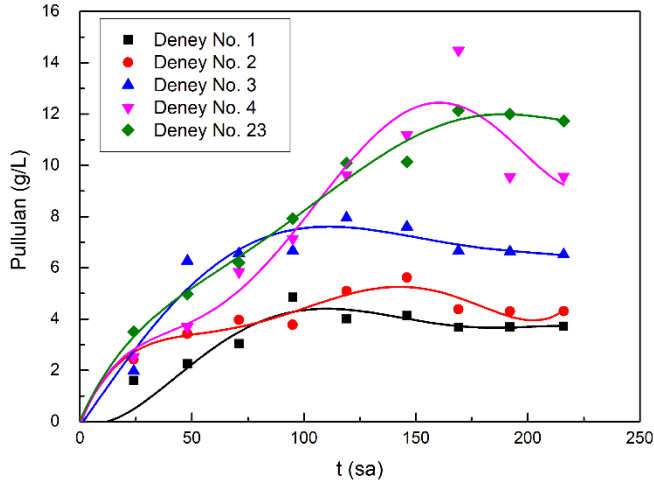
Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak; izelge 4.5’de yer alan, 1-4 ve 23 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerdeki fermentasyon ortamlarının başlangıç sakkaroz derişimleri; 40, 60 veya 80 g/L, başlangıç pepton derişimleri; 3, 6 veya 9 g/L ve başlangıç pH değerleri ise; 4 veya 5.5 olarak değişmektedir. 1-4 numaralı deneyler, 26°C’de, 23 numaralı deney ise; 24°C’de gerçekleştirilmiştir. Bu gruba ait deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokũlasyon derişimi 8.6×10^7 kob/mL’dir.

1-4 ve 23 numaralı deneyler için; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından ȳretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri şekil 4.25’de gȳsterilmiřtir. *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından ȳretilen en yũksek EPS derişiminin, 26°C’de gerçekleştirilen 4 numaralı deneyde, 15.74 g/L olarak, fermentasyonun 169. saatinde elde edildiği belirlenmiştir. 24°C’de gerçekleştirilen 23 numaralı deneyde ise; en yũksek EPS derişimine (13.0 g/L), yine fermentasyonun 169. saatinde ulaşıldığı saptanmıştır. 26°C’de, 1 numaralı deneyde, en yũksek EPS derişimi, 5.25 g/L olarak, fermentasyonun 95. saatinde elde edilirken, 2 ve 3 numaralı deneylerde ise, en yũksek EPS derişimleri, sırasıyla; 5.78 ve 8.16 g/L olarak fermentasyonun 146. saatinde elde edilmiştir. Bu gruba ait deneylerde, en yũksek EPS derişiminin, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 9 g/L, başlangıç pH’nın; 4 ve sıcaklığın ise; 26°C olduğu koşullarda elde edildiği gȳrũlmũřtũr.



Şekil 4.25. “1-4” ve “23” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

1-4 ve 23 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.26’da gösterilmiştir.

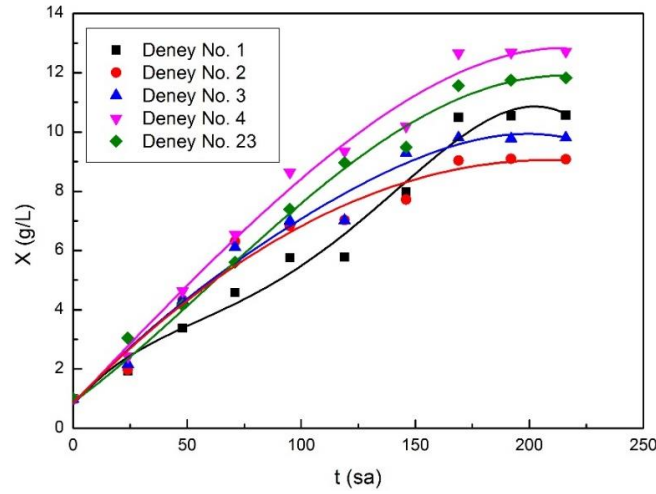


Şekil 4.26. “1-4” ve “23” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimleri; 4 ve 23 numaralı deneylerde, fermantasyonun 169. saatinde, sırasıyla; 14.48 ve 12.14 g/L olarak tayin edilmiştir. En yüksek pullulan derişimleri, 1 numaralı deneyde, fermantasyonun 95. saatinde, 4.85 g/L; 2 numaralı deneyde, fermantasyonun 146. saatinde, 5.62 g/L ve 3 numaralı deneyde ise, fermantasyonun 116. saatinde, 7.95 g/L

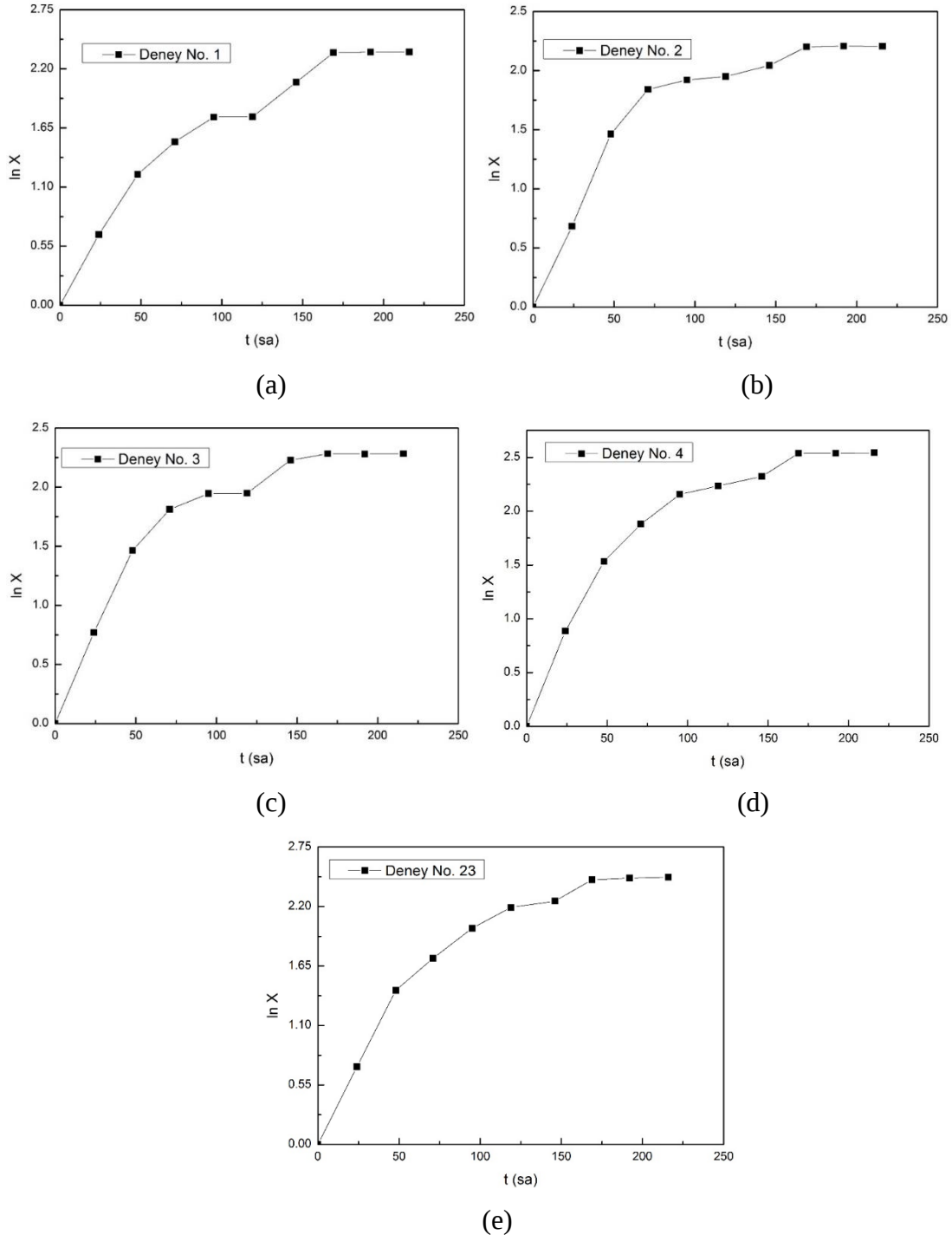
olarak elde edilmiştir. Bu gruba ait deneylerdeki en yüksek pullulan derişimine; en yüksek EPS derişiminde de olduğu gibi, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 9 g/L, başlangıç pH'ının; 4 ve sıcaklığın ise 26°C olduğu koşullarda (Deney No. 4) ulaşıldığı tespit edilmiştir.

1-4 ve 23 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Bu gruptaki deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşuna ait en yüksek biyokütle derişimleri, en yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin de tayin edildiği; 4 ve 23 numaralı deneylerde elde edilmiştir. En yüksek biyokütle derişimi; 26°C'de gerçekteştirilen 4 numaralı deneyde, 12.72 g/L ve 24°C'de gerçekteştirilen 23 numaralı deneyde ise, 11.83 g/L olarak; fermantasyonun 216. saatinde ölçülmüştür. 2 numaralı deneydeki, en yüksek biyokütle derişimi (9.10 g/L), fermantasyonun 192. saatinde elde edilmiştir. 1 ve 3 numaralı deneylerdeki en yüksek biyokütle derişimleri ise; sırasıyla; 10.57 ve 9.81 g/L olarak, fermantasyonun 216. saatinde tayin edilmiştir.



Şekil 4.27. “1-4” ve “23” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada ayrıca, her deney için; elde edilen biyokütle derişimleri kullanılarak hesaplanan $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler de çizilmiş ve bu grafiklerden yararlanılarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.28).



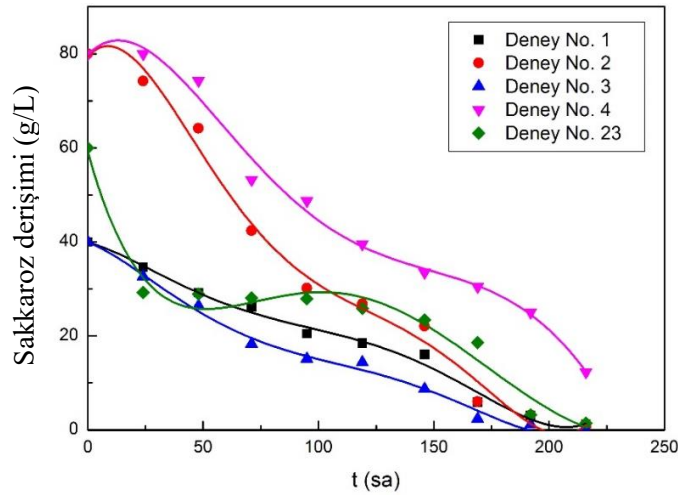
Şekil 4.28. *A. pullulans* AZ-6 suşu için (a): 1, (b): 2, (c): 3, (d): 4 ve (e): 23 numaralı deneylerde $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ), 1-4 numaralı deneylerde, sırasıyla; 0.025, 0.028, 0.031 ve 0.037 sa^{-1} ve 23 numaralı deneyde ise; 0.030 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, *A.*

pullulans AZ-6 suşuna ait en yüksek özgül üreme hızına, 4 numaralı deneyde, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 9 g/L, başlangıç pH'ının; 4 ve sıcaklığın ise; 26°C olduğu koşullarda ulaşıldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak, en yüksek özgül pullulan oluşum hızları da hesaplanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum hızları 1-4 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.035, 0.051, 0.038 ve 0.044 g pullulan/(g mo.sa) ve 23 numaralı deney için ise; 0.048 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Söz konusu deneylerde, en yüksek özgül pullulan üretim hızına; fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 3 g/L, başlangıç pH'ının; 4 ve sıcaklığın ise, 26°C olduğu koşullarda (Deney No. 2) ulaşılmıştır. Bu gruba ait deneylerde; ayrıca, en yüksek özgül ürün oluşum hızlarına, tüm deneyler için fermantasyonun 24. saatinde ulaşıldığı da belirlenmiştir.

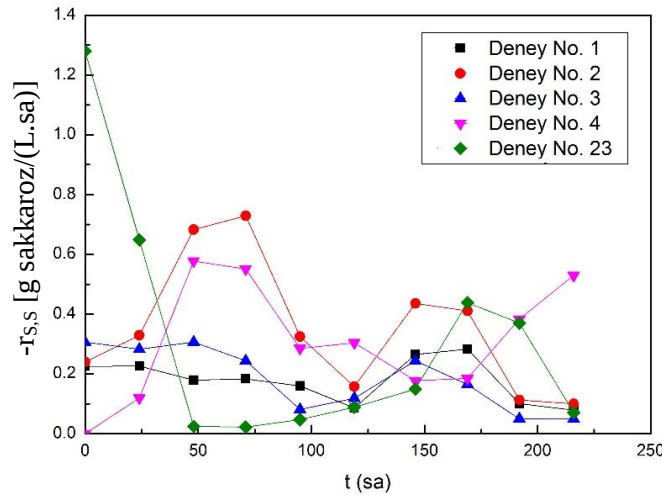
1-4 ve 23 numaralı deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29. “1-4” ve “23” numaralı deneylerde, sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.29 incelendiğinde; 1, 2, 3 ve 23 numaralı deneylerde, fermantasyon işleminin sonunda ortamdaki sakkarozun tamamının tüketildiği; 4 numaralı deneyde ise ortamda bir miktar sakkarozun tüketilmeden kaldığı saptanmıştır.

Bu çalışmada ayrıca, 1-4 ve 23 numaralı deneylerde kullanılan ve sakkaroz içeren fermantasyon ortamlarındaki substrat tüketim hızları da hesaplanmıştır. Söz konusu ortamlardaki substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri Şekil 4.30’da gösterilmiştir. 3 ve 4 numaralı deneyler için en yüksek sakkaroz tüketim hızlarına, sırasıyla; 0.31 ve 0.58 g sakkaroz/(L.sa) olarak fermantasyonun 48. saatinde ulaşılmıştır. En yüksek sakkaroz tüketim hızı 1 numaralı deneyde 0.23 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 24. ve 2 numaralı deneyde ise; 0.73 g sakkaroz/(L.sa) olarak 71. saatinde elde edilmiştir. En yüksek sakkaroz tüketim hızı; 23 numaralı deneyde ise, fermantasyonun başlangıcında, 1.28 g sakkaroz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır. Bu gruba ait deneylerdeki, en yüksek substrat tüketim hızı, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60 ve 6 g/L, fermantasyon ortamının başlangıç pH’ının 5.5 ve sıcaklığın ise, 24°C olduğu 23 numaralı deneyde elde edilmiştir.

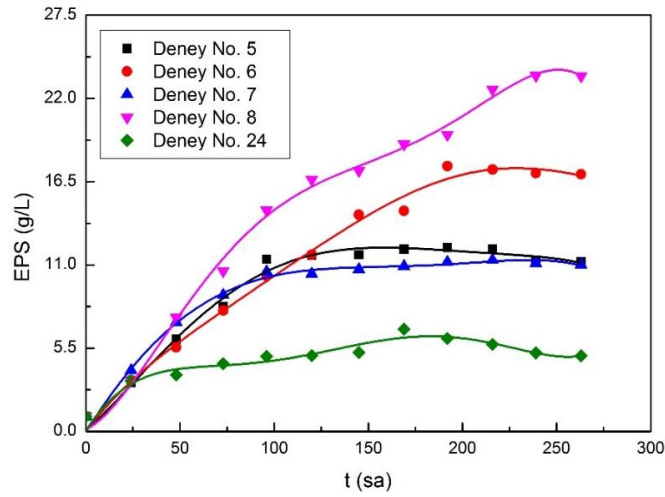


Şekil 4.30. “1-4” ve “23” numaralı deneylerde, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Bu çalışmada, pullulan ve sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, her bir deney için pullulan verimleri de hesaplanmıştır. 1-4 ve 23 numaralı deneyler için pullulan verimleri (%) sırasıyla; 24.9, 9.7, 31.1, 29.2 ve 29.3

olarak bulunmuştur. Bu gruba ait deneylerde, en yüksek pullulan verimi 23; en düşük pullulan verimi ise 2 numaralı deney koşullarında elde edilmiştir.

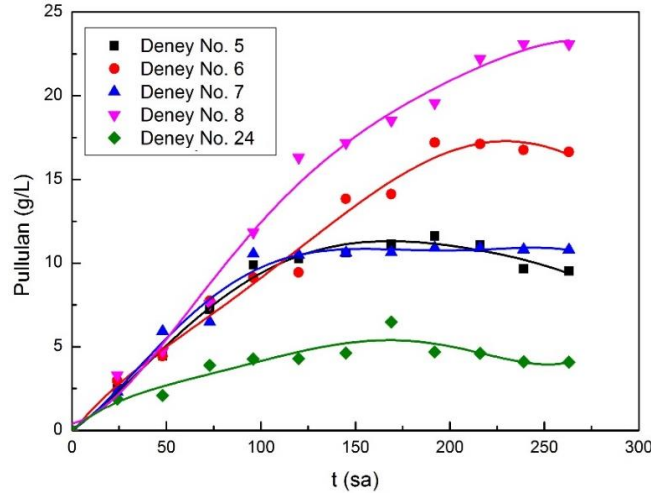
Çalışmada daha sonra, deney tasarım planında yer alan, 5-8 ve 24 numaralı fermantasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. 5-8 numaralı deneyler, 26°C, 24 numaralı deney ise; 32°C’de yapılmıştır. Bu gruba ait deneylerde, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi; 40, 60 veya 80 g/L, başlangıç pepton derişimi; 3, 6 veya 9 g/L ve fermantasyon ortamının başlangıç pH’ı ise; 5.5 veya 7.0’dır. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişiminin; 9.7×10^7 kob/mL olduğu tespit edilmiştir. 5-8 ve 24 numaralı deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31. “5-8” ve “24” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.31 incelendiğinde; en yüksek EPS derişiminin; 8 numaralı deneyde, 23.51 g/L olarak, fermantasyonun 239. saatinde elde edildiği belirlenmiştir. Bu deneyde, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 80 ve 9 g/L, başlangıç pH’ı 7 ve çalışma sıcaklığı ise; 26°C’dir. 5 ve 6 numaralı deneylerde en yüksek EPS derişimleri, fermantasyonun 192. saatinde elde edilmiş olup, bu değerler ise sırasıyla; 12.15 ve 17.53 g/L olarak ölçülmüştür. Maksimum EPS derişimi, 7 numaralı deneyde, fermantasyonun 216. saatinde, 11.33 g/L olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen en düşük EPS derişiminin (6.54 g/L) ise; 32°C’de gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde elde edildiği belirlenmiştir.

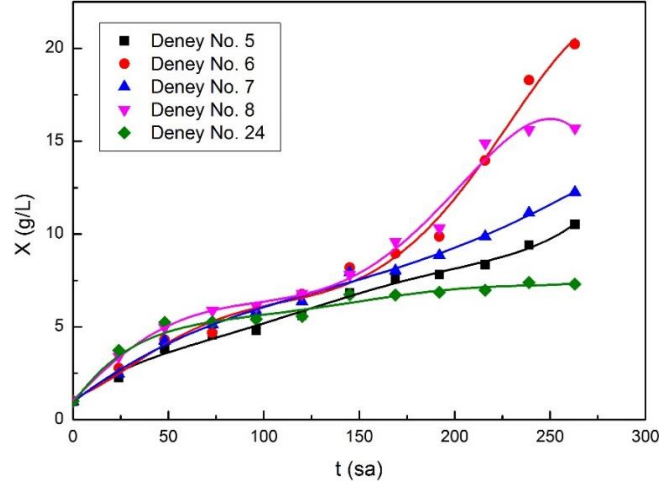
5-8 ve 24 numaralı deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.32’de sunulmuştur.



Şekil 4.32. “5-8” ve “24” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada, 26°C’de gerçekleştirilen 5, 6 ve 7 numaralı deneyler için, en yüksek pullulan derişimlerine sırasıyla; 11.62, 17.21 ve 10.92 g/L olarak, fermantasyonun 192. saatinde ulaşılmıştır. 32°C’de gerçekleştirilen 24 numaralı deneyde ise, en yüksek pullulan derişimi 6.48 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatinde elde edilmiştir. Bu gruba ait deneylerde en yüksek pullulan derişimi, en yüksek EPS derişiminin de tespit edildiği 8 numaralı deneyde, fermantasyonun 239. saatinde (23.10 g/L) elde edilmiştir.

5-8 ve 24 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşuna ait biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik, Şekil 4.33’te verilmiştir.

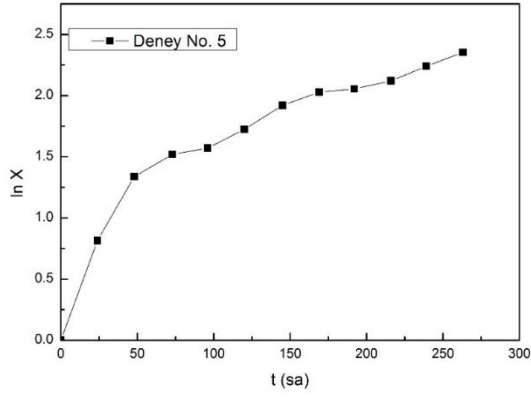


Şekil 4.33. “5-8” ve “24” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

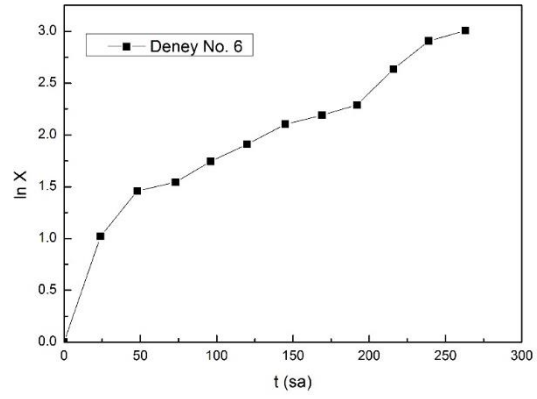
Bu çalışmadaki en yüksek biyokütle derişimleri, 5-8 numaralı deneylerde sırasıyla; 10.52, 20.22, 12.25 ve 15.7 g/L ve 24 numaralı deneyde ise; 7.38 g/L olarak elde edilmiştir. Bu gruba ait deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üremesini en çok destekleyen fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 3 g/L, başlangıç pH’nın 7 ve sıcaklığının ise, 26°C olduğu tespit edilmiştir.

5-8 ve 24 numaralı deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları; $\ln X$ değerlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.34).

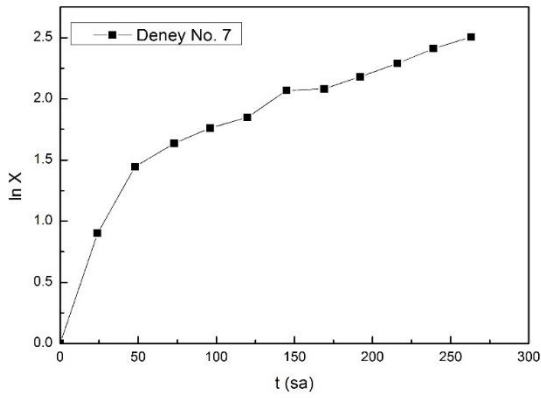
A. pullulans AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ); 5-8 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.034, 0.043, 0.038 ve 0.051 sa^{-1} ; 24 numaralı deney için ise; 0.055 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, en yüksek özgül üreme hızı; fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60 ve 6 g/L, başlangıç pH’nın 5.5 ve sıcaklığın ise 32°C olduğu, 24 numaralı deneyde elde edilmiştir.



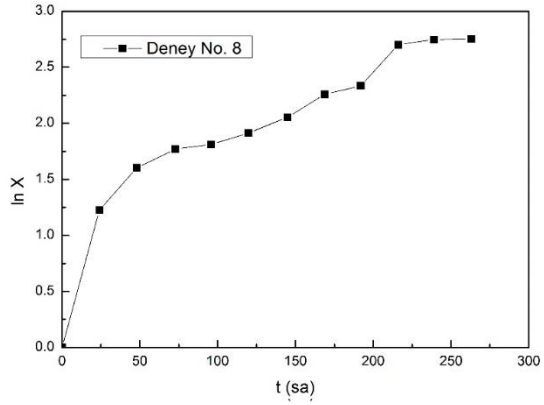
(a)



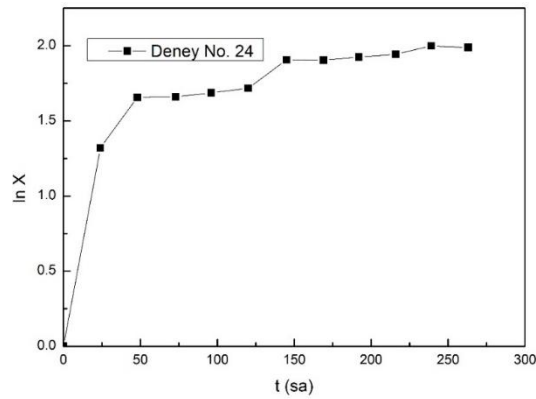
(b)



(c)



(d)



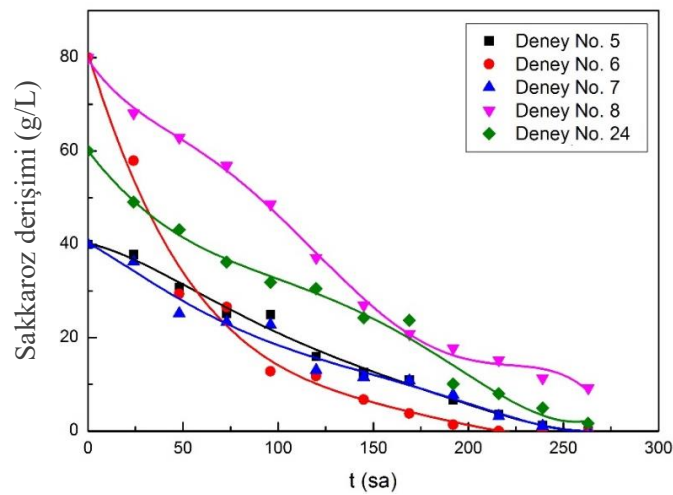
(e)

Şekil 4.34. *A. pullulans* AZ-6 suşu için (a): 5, (b): 6, (c): 7, (d): 8 ve (e): 24 numaralı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada ayrıca, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun maksimum özgül pullulan üretim hızları da hesaplanmıştır. 5-8 ve 24 numaralı deneyler için en yüksek özgül ürün oluşum

hızları sırasıyla; 0.046, 0.045, 0.039, 0.040 ve 0.021 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Bu grupta gerçekleştirilen deneylerde, en yüksek özgül pullulan oluşum hızının; fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 40 ve 3 g/L, başlangıç pH'ının 7.0 ve sıcaklığın ise 26°C olduğu, 5 numaralı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir. Bu gruptaki tüm deneyler için, en yüksek özgül ürün oluşum hızlarına; fermantasyonun 24. saatinde ulaşıldığı da belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamlarında bulunan sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler Şekil 4.35'de verilmiştir.

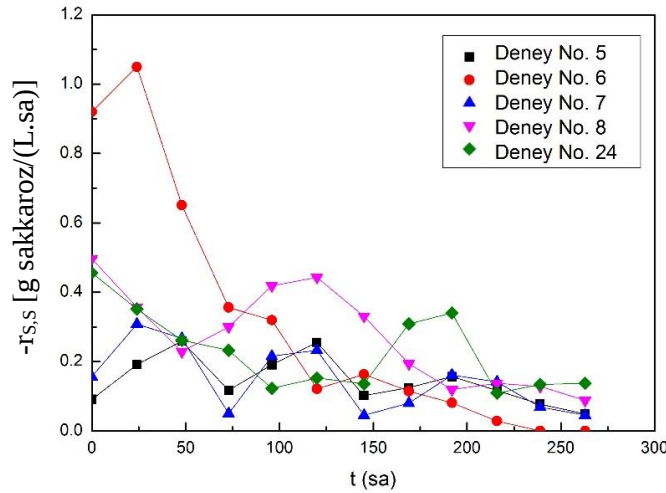


Şekil 4.35. “5-8” ve “24” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.35 incelendiğinde, 5-7 ve 24 numaralı deneylerde, fermantasyon işleminin sonunda; ortamdaki sakkarozun *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından tamamen tüketildiği; 8 numaralı deneyde ise, ortamda bir miktar sakkarozun tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir.

5-8 ve 24 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermantasyon ortamlarındaki sakkarozu tüketim hızları da hesaplanmış ve zamanla değişimleri Şekil 4.36'da gösterilmiştir. En yüksek sakkaroz tüketim hızları 6 ve 7 numaralı deneylerde sırasıyla; 1.05 ve 0.31 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 24. saatinde elde edilmiştir. En yüksek sakkaroz tüketim hızlarına; 8 ve 24 numaralı deneylerde sırasıyla; 0.50 ve 0.46 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında; 5 numaralı deneyde ise; 0.26 g

sakkaroz/(L.sa) olarak, fermentasyonun 48. saatinde ulaşılmıştır. Bu gruba ait deneylerdeki en yüksek sakkaroz tüketim hızı; 26°C’de, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 3 g/L ve başlangıç pH’ının ise, 7.0 olduğu koşullarda elde edilmiştir.



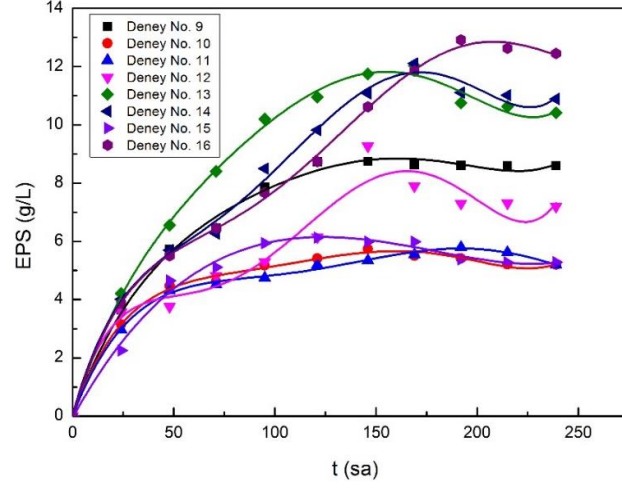
Şekil 4.36. “5-8” ve “24” numaralı deneylerde, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Bu çalışmada, pullulan ve sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak her bir deney için pullulan verimleri de hesaplanmıştır. 5-8 ve 24 numaralı deneyler için pullulan verimleri (%) sırasıyla; 34.9, 21.9, 33.9, 33.6 ve 17.9 olarak elde edilmiştir.

30°C’de gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi; 40 veya 80 g/L, başlangıç pepton derişimi; 3 veya 9 g/L ve başlangıç pH’ı ise 4 veya 7’dir (Çizelge 4.5). Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi; 8.8×10^7 kob/mL olarak belirlenmiştir. Söz konusu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.37’de sunulmuştur.

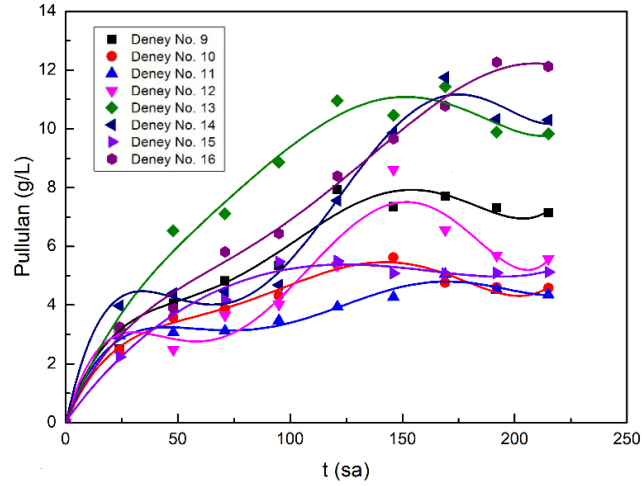
En yüksek EPS derişimleri; 9, 10 ve 12 numaralı deneylerde, sırasıyla; 8.75, 5.74 ve 9.27 g/L olarak, fermentasyonun 146. saatinde elde edilmiştir. 13 ve 14 numaralı deneylerde ise; en yüksek EPS derişimlerine; sırasıyla; 12.04 ve 12.11 g/L olarak, fermentasyonun 169. saatinde ulaşılmıştır. 30°C’de gerçekleştirilen 9-16 numaralı deneylerde, en yüksek

EPS derişimi, 12.92 g/L olarak, 16 numaralı deneyde ve fermentasyonun 192. saatinde elde edilmiştir. Bu deneyde, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla, 80 ve 9 g/L ve başlangıç pH'ı ise 7'dir.



Şekil 4.37. “9-16” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

9-16 numaralı deneylerde elde edilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.38’de gösterilmiştir.

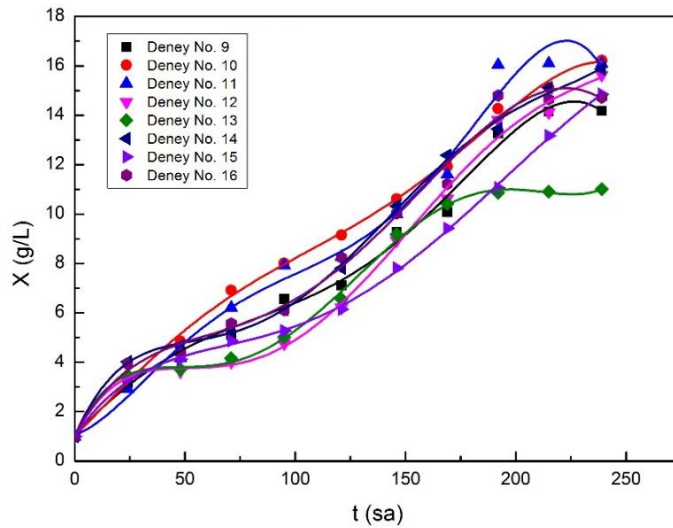


Şekil 4.38. “9-16” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmadaki en yüksek pullulan derişimi (12.27 g/L), 16 numaralı deneyde ve fermentasyonun 192. saatinde elde edilmiştir. En yüksek pullulan derişiminin; 5.05 g/L

olarak en düşük değerde tespit edildiği 11 numaralı deneyde kullanılan fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla; 40 ve 9 g/L ve başlangıç pH'ı ise 4'dür. En yüksek pullulan derişimleri, 10 ve 12 numaralı deneylerde; sırasıyla; 5.62 ve 8.62 g/L olarak, fermantasyonun 146.; 13 ve 14 numaralı deneylerde ise; 11.44 ve 11.75 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatinde elde edilmişlerdir. 9 ve 15 numaralı deneylerdeki; en yüksek pullulan derişimleri ise; sırasıyla; 7.94 ve 5.50 g/L olarak, fermantasyonun 121. saatinde tayin edilmiştir.

9-16 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.39'da verilmiştir.

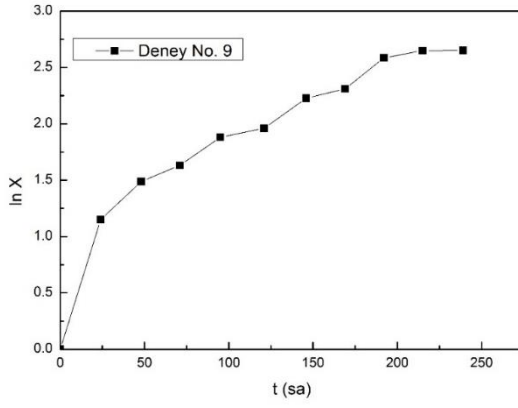


Şekil 4.39. “9-16” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

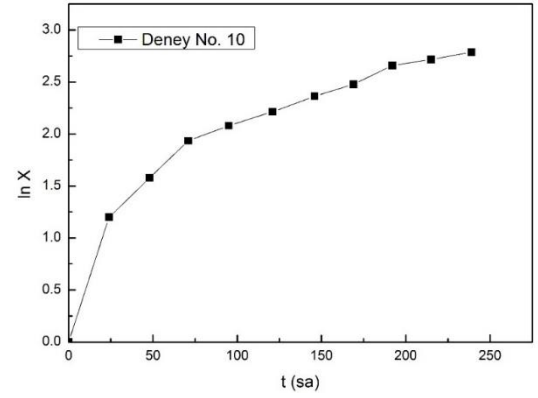
9-16 numaralı deneylerdeki en yüksek biyokütle derişimleri, sırasıyla; 14.18, 16.22, 16.10, 15.63, 11.01, 15.87, 14.85 ve 14.72 g/L olarak, fermantasyon işleminin sonunda ölçülmüştür. 30°C’de, en yüksek biyokütle derişimine başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 80 ve 3 g/L ve başlangıç pH'ının ise; 4 olduğu 10 numaralı fermantasyon ortamında ulaşılmıştır.

9-16 numaralı deneylerin gerçekleştirildiği fermantasyon koşullarında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları ise, $\ln X$ değerlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.40) yararlanılarak hesaplanmıştır. *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel

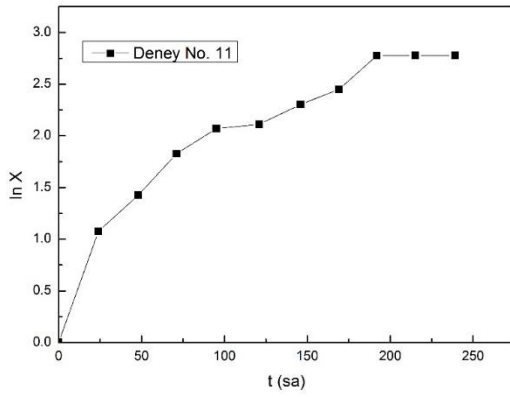
üreme bölgesindeki özgül üreme hızları; (μ) bu deneyler için sırasıyla; 0.048, 0.050, 0.045, 0.051, 0.052, 0.058, 0.049 ve 0.057 sa^{-1} olarak elde edilmiştir. Hesaplanan değerlere göre, 30°C'deki en yüksek özgül üreme hızının, 14 numaralı deneyde elde edildiği belirlenmiştir.



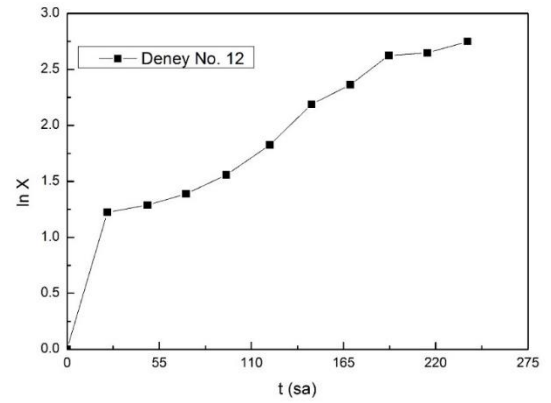
(a)



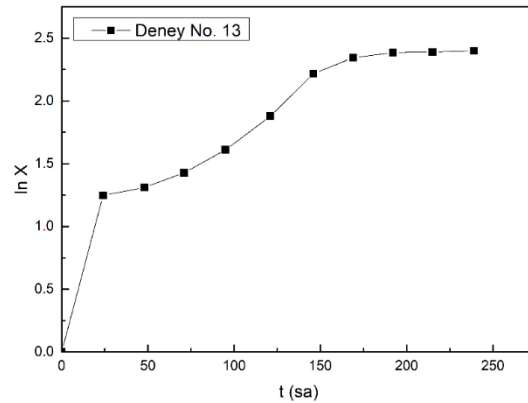
(b)



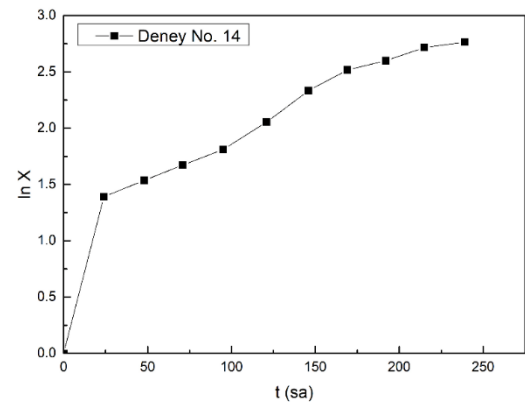
(b)



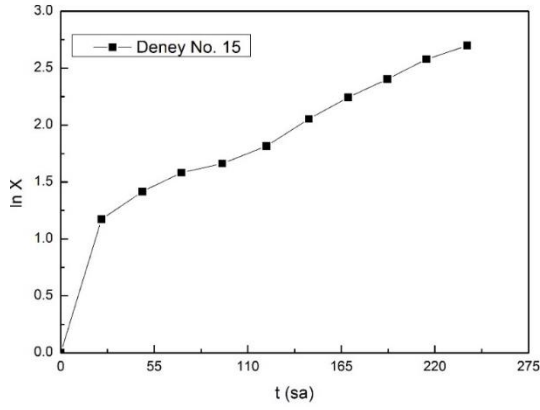
(d)



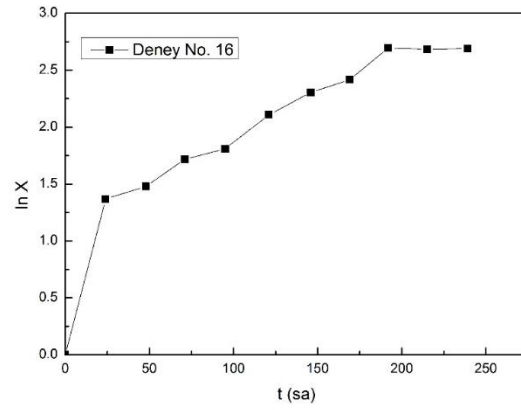
(e)



(f)



(g)



(h)

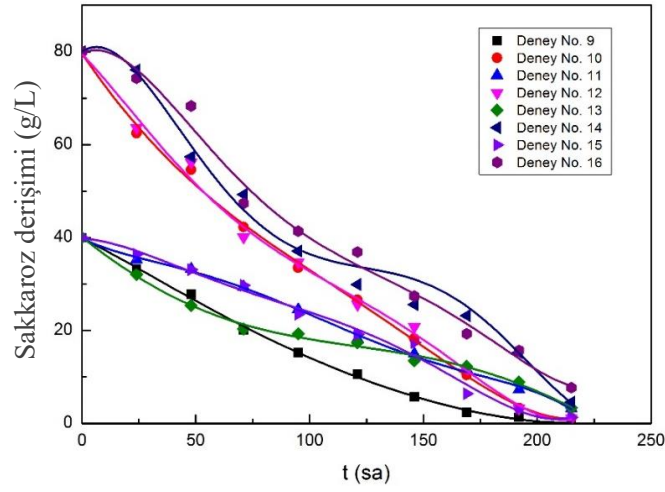
Şekil 4.40. *A. pullulans* AZ-6 suşu için (a): 9, (b): 10, (c): 11, (d): 12, (e): 13, (f): 14, (g): 15 ve (h): 16 numaralı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada ayrıca, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, her deney için maksimum özgül pullulan üretim hızları da hesaplanmıştır. 9-16 numaralı deneyler için en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.033, 0.031, 0.042, 0.037, 0.038, 0.041, 0.029 ve 0.034 g pullulan/(g mo.sa) olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre, 30°C'deki en yüksek özgül pullulan oluşum hızının ise, 11 numaralı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir.

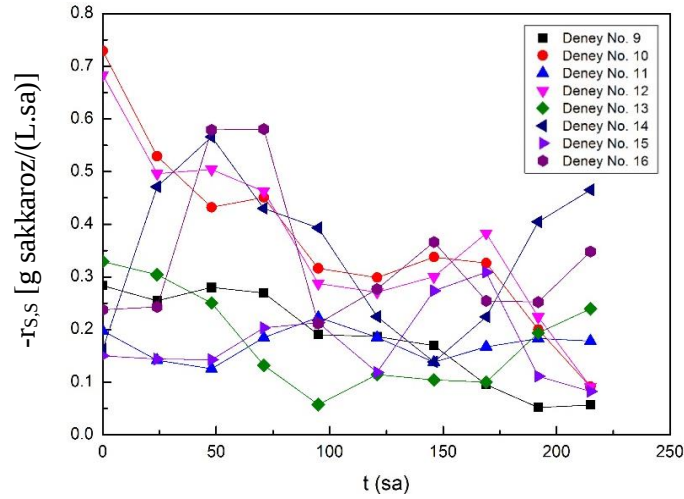
Fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri ise, Şekil 4.41'de verilmiştir. Fermantasyon işleminin sonunda; 9 numaralı deneyde, ortamdaki sakkarozun tamamen tüketildiği; 10-16 numaralı deneylerde ise; fermantasyon ortamlarında bir miktar sakkarozun tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir.

Sakkaroz içeren fermantasyon ortamlarında yapılan 9-16 numaralı deneyler için *A. pullulans* AZ-6 suşunun substrat tüketim hızları da hesaplanmıştır (Şekil 4.42). 9, 10, 12 ve 13 numaralı deneylerde; en yüksek sakkaroz tüketim hızları; sırasıyla; 0.28, 0.73, 0.68 ve 0.33 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edilmiştir. En yüksek sakkaroz tüketim hızı, 11 numaralı deneyde, 0.22 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 95. saatinde elde edilmiştir. 14 numaralı deneydeki en yüksek substrat tüketim hızı ise, 0.57 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 48. saatinde hesaplanmıştır. 15 ve 16 numaralı deneylerdeki en yüksek sakkaroz tüketim hızları ise,

sırasıyla; 0.31 ve 0.58 g sakkaroz/(L.sa) olarak, sırasıyla fermantasyonun 169 ve 71. saatlerinde elde edilmiştir.



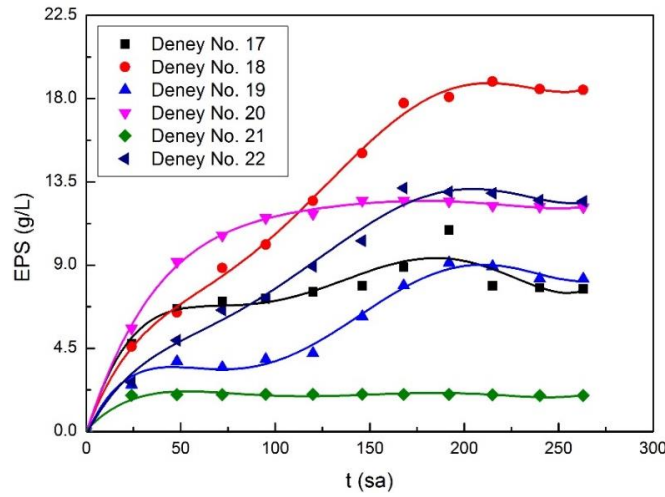
Şekil 4.41. “9-16” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.42. “9-16” numaralı deneylerde sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Deney tasarım planında, 17-22 numaralı olarak gösterilen deneyler, 28°C’de, 20, 60 veya 100 g/L başlangıç sakkaroz derişimlerinde; 0, 6 veya 12 g/L başlangıç pepton derişimlerinde; 2.5, 5.5 veya 8.5 başlangıç pH değğerlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimi, 1×10^8 kob/mL olarak belirlenmiştir.

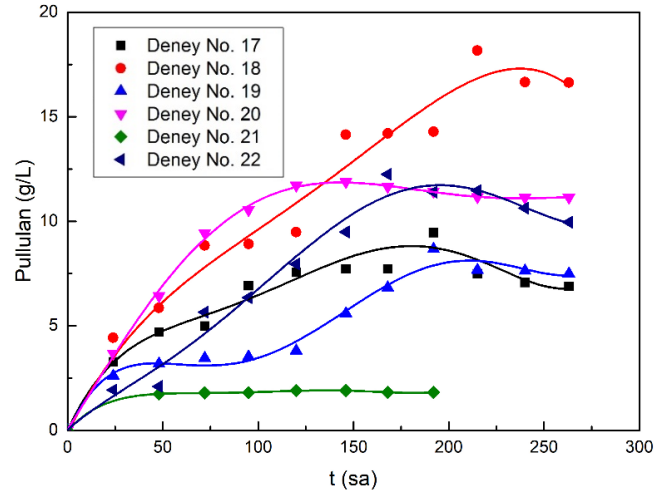
17-22 numaralı deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.43’de verilmiştir. *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen en yüksek EPS derişiminin 18 numaralı deneyde, en düşük EPS derişiminin ise; 21 numaralı deneyde elde edildiğı tespit edilmiştir. En yüksek EPS derişimi, 18 numaralı deneyde, fermantasyonun 215. saatinde, 18.93 g/L olarak elde edilirken; en düşük maksimum EPS derişimi ise, 21 numaralı deneyde, fermantasyonun 120. saatinde, 2.01 g/L olarak elde edilmiştir. 17, 19 ve 20 numaralı deneylerde ise; en yüksek EPS derişimlerine sırasıyla; 10.9, 9.13 ve 12.50 g/L olarak, fermantasyonun 192. saatinde ulaşılmıştır. 28°C’de gerçekleştirilen 22 numaralı deneyde ise; en yüksek EPS derişimi (13.17 g/L), fermantasyonun 168. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.43. “17-22” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

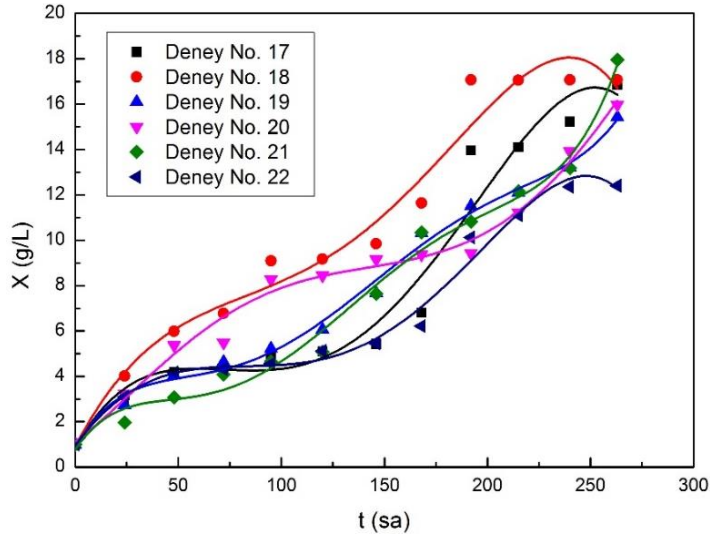
28°C’de gerçekleştirilen 17-22 numaralı deneylerde; pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise, Şekil 4.44’de sunulmuştur. Bu deneylerdeki en yüksek pullulan derişimi, en yüksek EPS derişiminde de olduğu gibi, 18 numaralı deneyde, fermantasyonun 215. saatinde ve 18.17 g/L olarak elde edilmiştir. En yüksek pullulan derişimleri; 17 ve 19 numaralı deneylerde, sırasıyla; 9.45 ve 8.67 g/L olarak, fermantasyonun 192. saatinde tespit edilirken, 20 ve 21 numaralı deneylerde ise, fermantasyonun 120. saatinde, sırasıyla; 11.88 ve 1.90 g/L olarak bulunmuştur. 22 numaralı deneyde ise; en yüksek pullulan derişimi; 12.25 g/L olarak, fermantasyonun 168. saatinde tayin edilmiştir. En yüksek EPS ve pullulan derişimlerinin elde edildiğı 18

numaralı deneyde kullanılan fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişimi (100 g/L); diğer deneylerde kullanılan ortamlardakilerden daha yüksektir. Bu gruptaki deneylerde; en düşük EPS ve pullulan derişimlerinin elde edildiğı 21 numaralı deneyde kullanılan fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının 2.5 olması nedeni ile; düşük pH değerlerinin, *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS ve pullulan üretimini olumsuz yönde etkilediğı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, 21 numaralı deneyde, EPS ve pullulan derişimlerinde fermantasyon süresince belirgin bir artış olmadığı da tespit edilmiştir.



Şekil 4.44. “17-22” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

17-22 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.45’de verilmiştir. Bu çalışmadaki tüm deneylerde; biyokütle derişimlerinin, fermantasyon süresince arttığı gözlenmiştir. 17-22 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşuna ait en yüksek biyokütle derişimleri, sırasıyla; 16.85, 17.07, 15.43, 15.98, 17.95 ve 12.41 g/L olarak ölçülmüştür. Bu gruba ait deney sonuçları kendi içerisinde karşılaştırıldığında, en yüksek biyokütle derişiminin; EPS ve pullulan derişimlerinin fermantasyon süresince en düşük değerlerde tespit edildiğı; 21 numaralı deneyde elde edildiğı bulunmuştur. Bu deneyde kullanılan fermantasyon ortamının düşük başlangıç pH'ının, *A. pullulans* AZ-6 suşu hücrelerinin morfolojik olarak küf formuna geçişini destekleyerek biyokütle derişiminin artmasına sebep olduğu, diğer bir deyişle; pullulan üretiminden sorumlu maya benzeri hücre sayısının azalmasıyla, pullulan derişiminin olumsuz yönde etkilediğı düşünülmektedir.

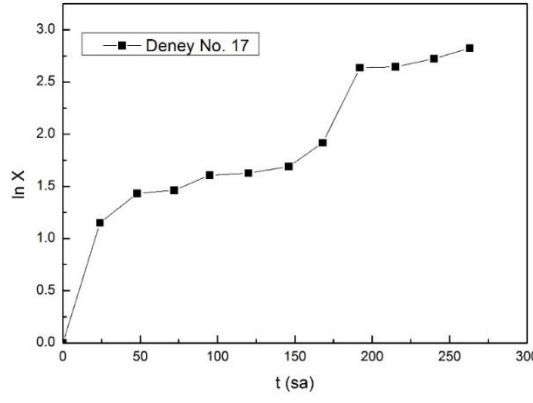


Şekil 4.45. “17-22” numaralı fermantasyon deneylerinde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

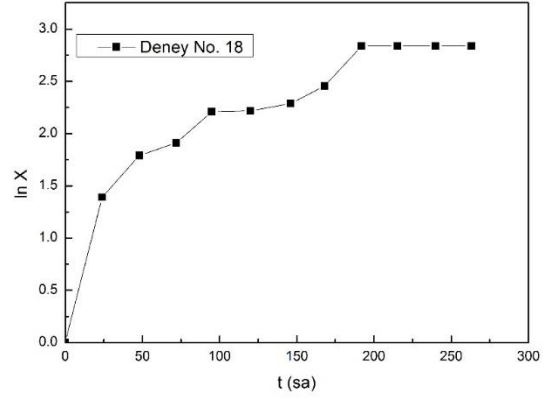
Çalışmanın bu bölümünde, ayrıca; deneyler sonucunda elde edilen biyokütle derişimleri kullanılarak hesaplanan $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler de çizilmiş ve bu grafiklerden yararlanılarak *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.46).

28°C’de gerçekleştirilen 17-22 numaralı deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ) sırasıyla; 0.048, 0.058, 0.042, 0.049, 0.028 ve 0.047 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır. Söz konusu deneylerdeki en yüksek özgül üreme hızı değeri; 0.058 sa^{-1} olarak, 18 numaralı deneyde elde edilmiştir.

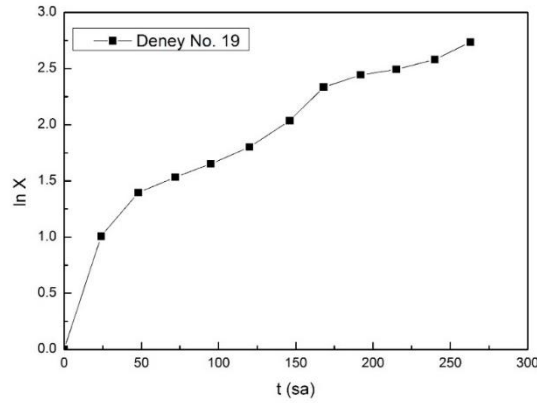
Bu çalışmada ayrıca, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, maksimum özgül pullulan üretim hızları da hesaplanmıştır. 17-22 numaralı deneyler için en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.043, 0.046, 0.040, 0.047, 0.040 ve 0.028 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek pullulan üretim hızının, 20 numaralı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, tüm deneyler için en yüksek özgül ürün oluşum hızlarına, fermantasyonun 24. saatinde ulaşıldığı belirlenmiştir.



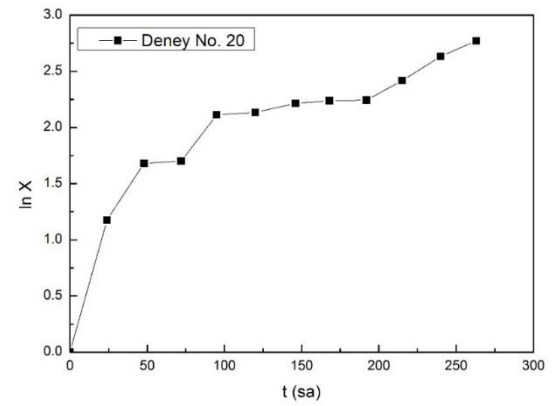
(a)



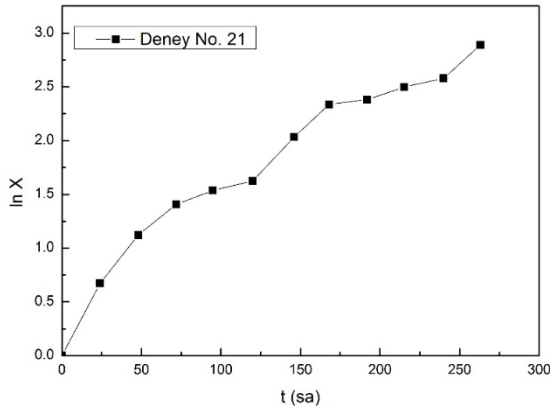
(b)



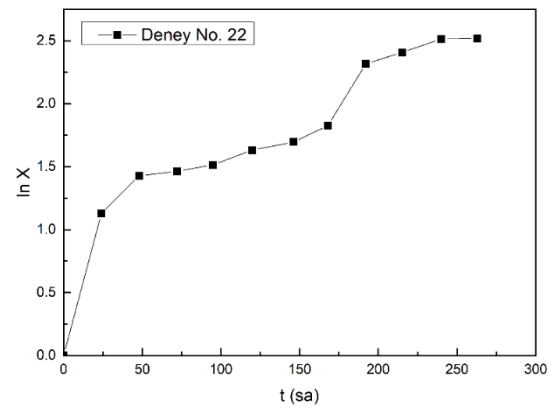
(c)



(d)



(e)

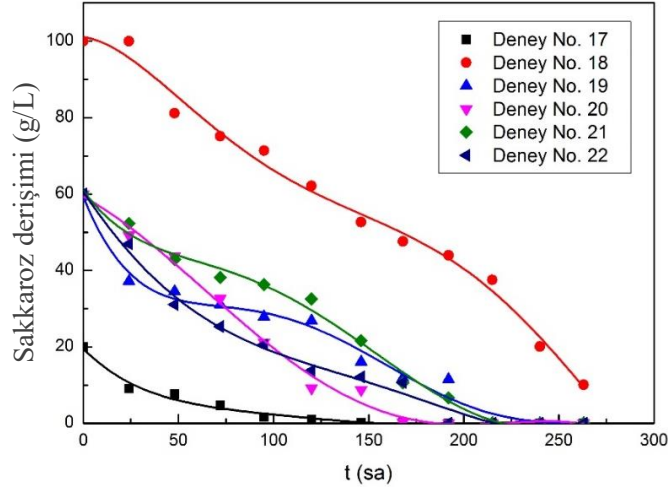


(f)

Şekil 4.46. *A. pullulans* AZ-6 için (a): 17, (b): 18, (c): 19, (d): 20, (e): 21, ve (f): 22 numaralı deneylerde $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

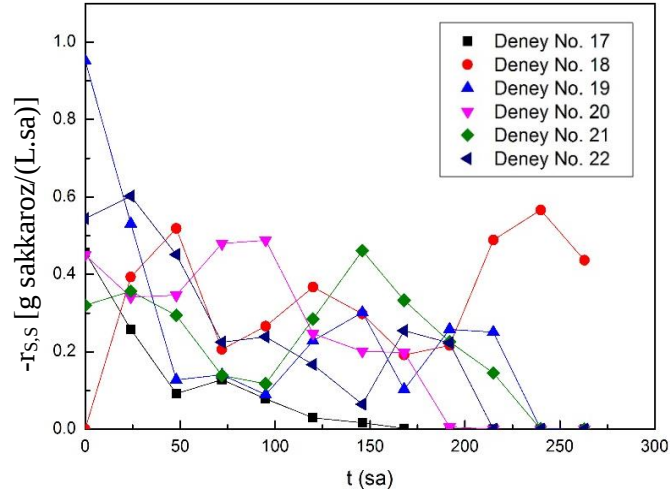
17-22 numaralı deneylerde kullanılan, fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.47’de verilmiştir. Bu grafikler incelendiğinde; fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin, 17 ve 20

numaralı deneylerde; fermantasyonun 192. ve 19, 21 ve 22 numaralı deneylerde ise, fermantasyonun 240. saatinde tamamen tüketildiği görülmüştür. 18 numaralı deneyde ise, fermantasyon sonunda ortamda bir miktar sakkarozun tüketilmeden kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.47. “17-22” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değışimleri

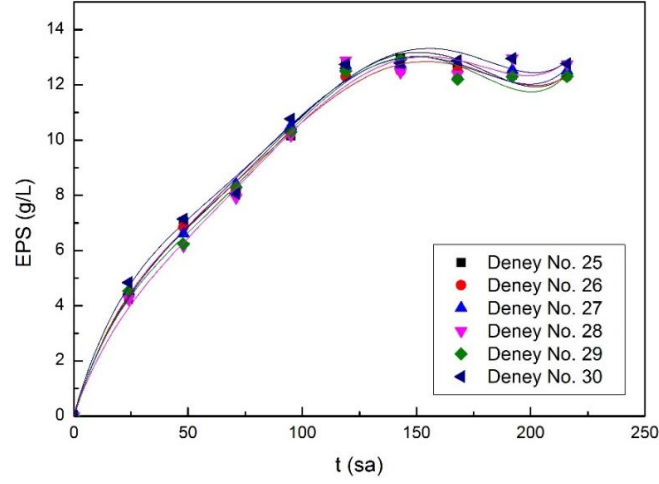
17-22 numaralı deneyler için, hesaplanan substrat tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.48’de sunulmuştur. 17 ve 19 numaralı deneylerde en yüksek sakkaroz tüketim hızları sırasıyla; 0.46 ve 0.95 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edilirken, 18 numaralı deneyde ise; 0.57 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 240. saatinde elde edilmiştir. 20 numaralı deneydeki en yüksek sakkaroz tüketim hızı ise, 0.49 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 95. saatinde, hesaplanmıştır. En yüksek sakkaroz tüketim hızı; 21 numaralı deneyde, 0.46 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 146. saatinde; 22 numaralı deneyde ise, 0.60 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 24. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.48. “17-22” numaralı deneylerde sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

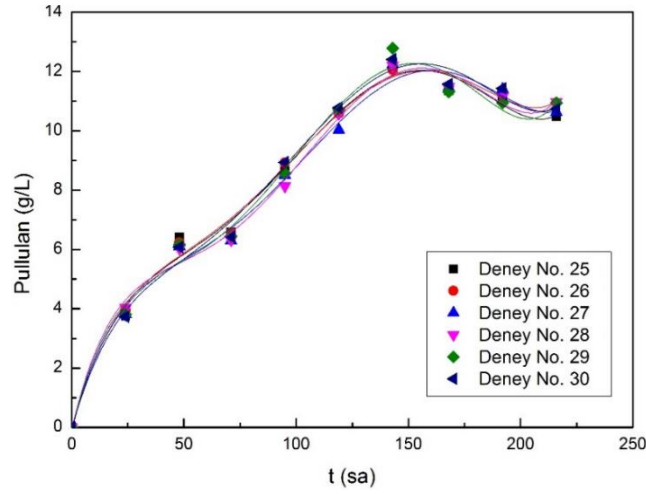
Bu çalışmada, pullulan ve sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, 17-22 numaralı deneyler için, fermentasyon ortamlarındaki pullulan verimleri de hesaplanmıştır. 17-22 numaralı deneyler için pullulan verimleri (%) sırasıyla; 47.3, 29.1, 17.9, 23.2, 6.9 ve 24.8 olarak elde edilmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında; son olarak, deney tasarım planında, merkez noktada yer alan 6 deney gerçekleştirilmiştir. 25-30 numaralı bu deneyler, 28°C’de, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60 ve 6 g/L; başlangıç pH’ının ise 5.5 olduğu fermentasyon ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermentasyon ortamlarındaki başlangıç aşılama derişimi; 9.1×10^7 kob/mL olarak belirlenmiştir. Merkez noktada gerçekleştirilen deneylerde; elde edilen EPS derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.49’da sunulmuştur. Tüm deneylerde; EPS derişimlerinin zamanla değişimlerinin benzer bir eğilim gösterdikleri belirlenmiştir. Merkez noktasındaki deneylerde elde edilen EPS derişimlerinin birbirlerine çok yakın oldukları tespit edilmiştir. 25-30 numaralı deneyler için en yüksek EPS derişimleri; sırasıyla; 12.96, 12.51, 12.75, 12.97, 12.92 ve 12.96 g/L olarak bulunmuştur.



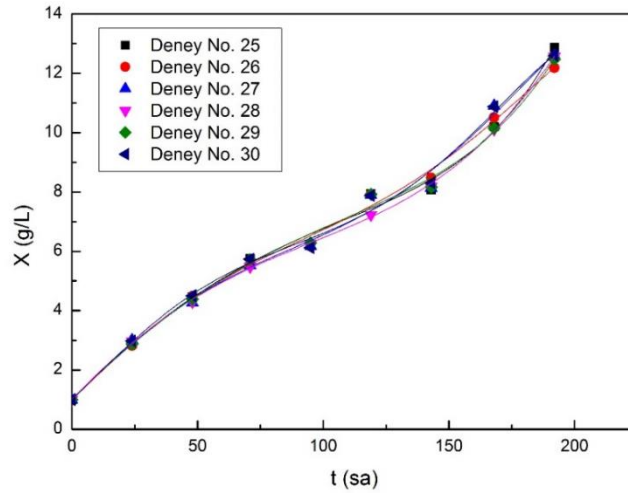
Şekil 4.49. “25-30” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Merkez noktada gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.50’de verilmiştir. Tüm deneylerde, pullulan derişimlerinin; fermantasyonun 143. saatine kadar artış gösterdikleri, daha sonra ise bir miktar azaldıkları belirlenmiştir. 25-30 numaralı deneyler için, elde edilen en yüksek pullulan derişimleri sırasıyla; 12.31, 12.06, 12.24, 12.20, 12.79 ve 12.41 g/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.50. “25-30” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

28°C’de gerçekleştirilen 25-30 numaralı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.51’de sunulmuştur.



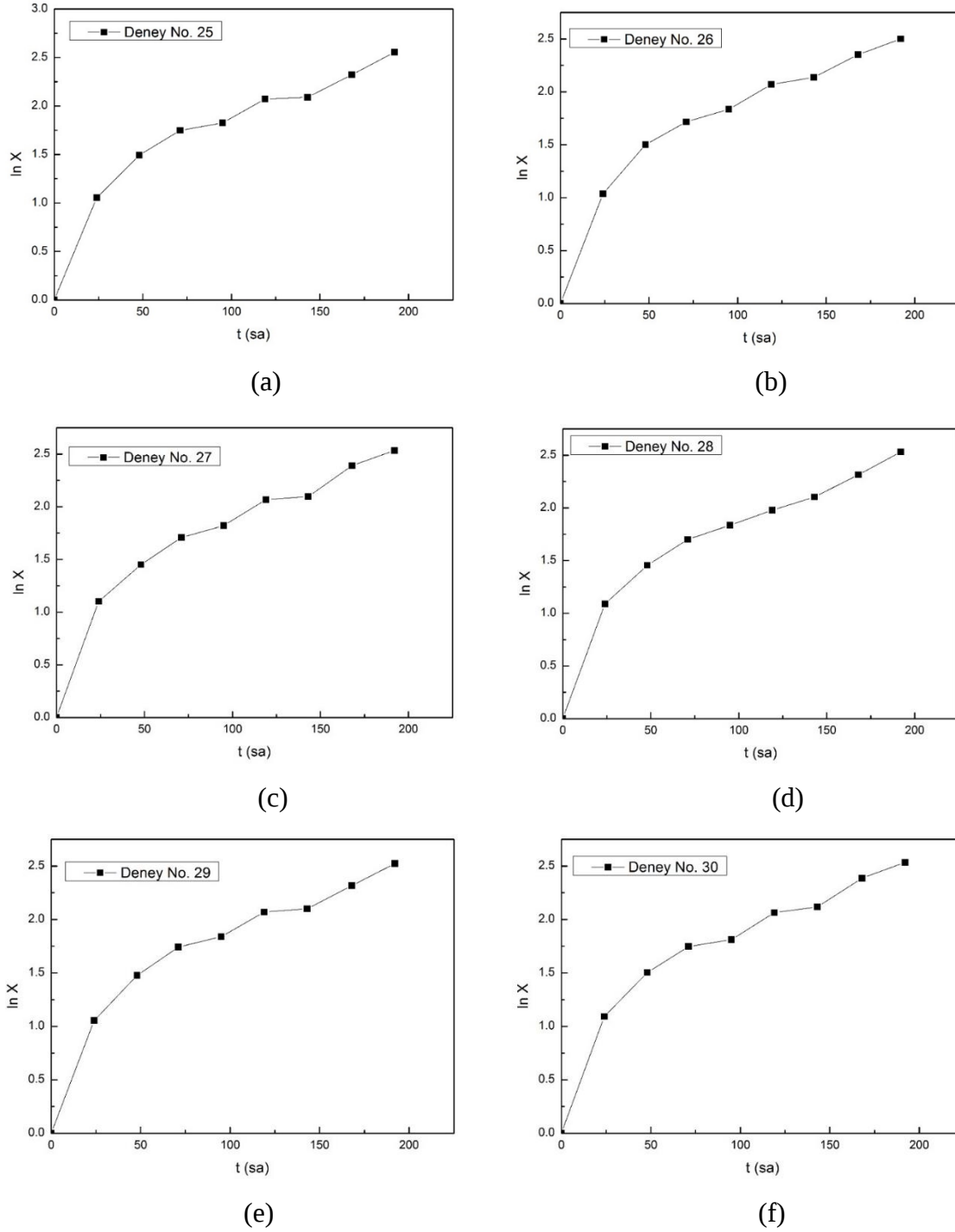
Şekil 4.51. “25-30” numaralı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu grafik incelendiğinde, tüm deneylerdeki biyokütle derişimlerinin fermantasyon süresince arttığı belirlenmiştir. 25-30 numaralı deneylerde; en yüksek biyokütle derişimleri, sırasıyla; 12.87, 12.19, 12.60, 12.57, 12.42 ve 12.60 g/L olarak elde edilmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde ayrıca, deneyler sonucunda elde edilen biyokütle derişimlerinden yararlanılarak hesaplanan $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler de oluşturulmuş ve bu grafiklerden, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.52). Merkez noktada gerçekleştirilen deneylerde, 25 ve 29 numaralı deneyler için *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ) 0.044; 28 ve 30 numaralı deneyler için, 0.045; 27 ve 29 numaralı deneyler için, 0.046 ve 26 numaralı deney için ise; 0.043 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.

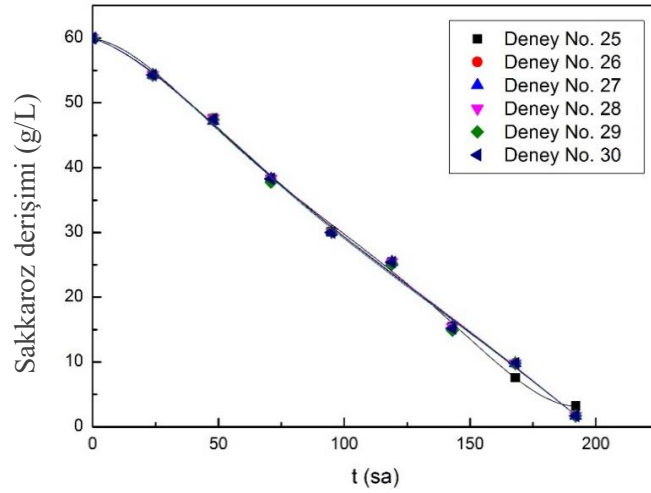
Bu çalışmada; ek olarak, pullulan ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak maksimum özgül pullulan üretim hızları da hesaplanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum hızları, 25 ve 29 numaralı deneylerin her ikisi için de; 0.055, 26-28 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.059, 0.053, 0.057; 30 numaralı deney için ise; 0.052 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada;

merkez noktada gerçekleştirilen tüm deneylerdeki en yüksek özgül ürün oluşum hızlarına, fermantasyonun 24. saatinde ulaşıldığı belirlenmiştir.



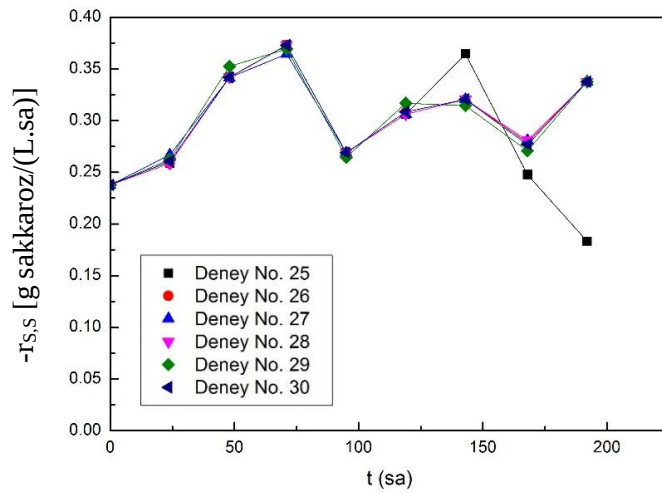
Şekil 4.52. *A. pullulans* AZ-6 için (a): 25, (b): 26, (c): 27, (d): 28, (e): 29, ve (f): 30 numaralı deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

25-30 numaralı deneyler için, fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.53’de gösterilmiştir. Söz konusu şekil incelendiğinde, merkez noktada gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçların birbirlerine çok yakın oldukları ve aynı eğri üzerinde yer aldıkları belirlenmiştir. Ayrıca, her deneyde, fermantasyon ortamındaki sakkarozun; fermantasyon işleminin sonunda hemen hemen tamamen tüketildiği de tespit edilmiştir.



Şekil 4.53. “25-30” numaralı deneylerde sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri

25-30 numaralı deneyler için, sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler Şekil 4.54’de verilmiştir.



Şekil 4.54. “25-30” numaralı deneylerde sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Merkez noktadaki deneylerde en yüksek substrat tüketim hızları, 0.37 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermentasyonun 71. saatinde elde edilmiştir.

Bu çalışmada, pullulan ve sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, her bir deney için pullulan verimleri de hesaplanmıştır. Pullulan verimleri (%); 25, 26, 29 ve 30 numaralı deneyler için sırasıyla; 27.6, 27.0, 28.4 ve 27.7; 26 ve 27 numaralı deneyler için ise; 27.4 olarak elde edilmiştir.

4.5. Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmeleri

Bu çalışmadaki deneylerin; Çizelge 4.5’de belirtilen ve merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney planına göre gerçekleştirilmesinden sonra, seçilen dört bağımsız değişkenin, elde edilen yanıtlar üzerine etkilerini gösteren bazı model eşitlikler de türetilmiştir. Bu amaçla; fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2), başlangıç pH’ı (X_3) ve sıcaklık (X_4) bağımsız değişkenler, en yüksek EPS derişimi (Y_1), en yüksek pullulan derişimi (Y_2), *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı (Y_3), maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) ve pullulan verimi yüzdesi (Y_5) ise; bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak seçilmiştir. Bu kapsamdaki deneylerden elde edilen tüm yanıtlar; Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7’deki sonuçlar incelendiğinde; elde edilen maksimum EPS derişimlerinin (Y_1); 2.02-23.51 g/L, maksimum pullulan derişimlerinin (Y_2); 1.90-23.10 g/L, mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı değerlerinin (Y_3); 0.025-0.058 sa⁻¹, maksimum özgül pullulan üretim hızı değerlerinin (Y_4); 0.021-0.059 [g pullulan/(g mo.sa)] ve pullulan verimlerinin (Y_5) ise, %6.9-47.3 aralıklarında değiştikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada; seçilen dört bağımsız değişkenin; her bir bağımlı değişken üzerindeki etkilerini gösteren model eşitliklerin türetilmesi için Design Expert 10.0.2 (Inc. Minneapolis, USA) programı kullanılmıştır. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkileri gösteren ve ikinci dereceden bir polinom şeklinde ifade edilen model eşitlikler; çoklu regresyon yöntemi uygulanarak türetilmiştir (Eş 3.1).

Çizelge 4.7. Merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen maksimum EPS derişimleri (Y_1) ve maksimum pullulan derişimleri (Y_2) ile her bir deney için hesaplanan özgül üreme hızları (Y_3), maksimum özgül pullulan üretim hızları (Y_4) ve pullulan verimleri (Y_5)

Deney No.	Y_1 (g/L)	Y_2 (g/L)	Y_3 (sa ⁻¹)	Y_4 [g pullulan/(g mo.sa)]	Y_5 (%)
1	5.25	4.85	0.025	0.035	24.9
2	5.78	5.62	0.028	0.051	9.7
3	8.16	7.95	0.031	0.038	31.1
4	15.74	14.48	0.037	0.044	29.2
5	12.15	11.62	0.034	0.046	34.9
6	17.53	17.21	0.043	0.045	21.9
7	11.33	10.92	0.038	0.039	33.9
8	23.51	23.10	0.051	0.040	33.6
9	8.75	7.94	0.048	0.033	27.0
10	5.74	5.62	0.050	0.031	9.1
11	5.80	5.05	0.045	0.042	17.8
12	9.27	8.62	0.051	0.037	14.6
13	12.04	11.44	0.052	0.038	41.3
14	12.11	11.75	0.058	0.041	20.7
15	6.13	5.50	0.049	0.029	26.4

Çizelge 4.7. Devam ediyor.

Deney No.	Y ₁ (g/L)	Y ₂ (g/L)	Y ₃ (sa ⁻¹)	Y ₄ [g pullulan/(g mo.sa)]	Y ₅ (%)
16	12.92	12.27	0.057	0.034	19.1
17	10.90	9.45	0.048	0.043	47.3
18	18.93	18.17	0.058	0.046	29.1
19	9.13	8.67	0.042	0.040	17.9
20	12.50	11.88	0.049	0.047	23.2
21	2.02	1.90	0.028	0.040	6.9
22	13.17	12.25	0.047	0.028	24.8
23	13.00	12.14	0.030	0.048	29.3
24	6.75	6.48	0.055	0.021	17.9
25	12.96	12.31	0.044	0.055	27.6
26	12.51	12.06	0.043	0.059	27.0
27	12.75	12.24	0.046	0.053	27.4
28	12.97	12.20	0.045	0.057	27.4
29	12.92	12.79	0.044	0.055	28.4
30	12.96	12.41	0.045	0.052	27.7

Tez çalışmasında ayrıca, Design Expert 10.0.2 programı kullanılarak türetilen her bir model için, varyans (ANOVA) analizi de yapılmıştır. Her bir modelin gerçek cevaba uygun olduğuna; modelin önemli ($p < 0.01$), uyum eksikliğinin önemsiz ($p > 0.05$) ve modele ait R^2 (belirleme katsayısı) değerinin ise; 0.75’den büyük olduğu koşullar dikkate alınarak karar verilmiştir.

Çoklu regresyon yöntemi ile elde edilen ve fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH’ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); en yüksek EPS derişimi (Y_1) üzerine etkilerini gösteren model denklem; Eş. 4.1’de verilmiştir.

$$Y_1 = + 12.85 + 2.04X_1 + 0.84X_2 + 2.73X_3 - 1.63X_4 + 1.69X_1X_2 + 0.99X_1X_3 - 1.15X_1X_4 - 0.84X_2X_3 - 1.41X_2X_4 - 1.00X_3X_4 + 0.51X_1^2 - 0.51X_2^2 - 1.32X_3^2 - 0.75X_4^2 \quad (4.1)$$

Modele ait belirleme katsayısı ise; $R^2 = 0.998$ olarak elde edilmiştir. R^2 değerinin 1’e çok yakın olması deneysel ve Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan Y_1 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir.

Bu modele ait varyans analizi sonuçları ise, Çizelge 4.8’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre model, %95 güven düzeyinde önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur. Ayrıca, tüm bağımsız değişkenlerin; maksimum EPS derişimi üzerindeki lineer etkilerinin, bu parametrelerin birbirleri ile etkileşimlerinin ve karesel etkilerinin de oldukça önemli oldukları ($p < 0.01$) tespit edilmiştir. Bu modele ait uyum eksikliğinin ise önemsiz ($p > 0.05$) olduğu kaydedilmiştir.

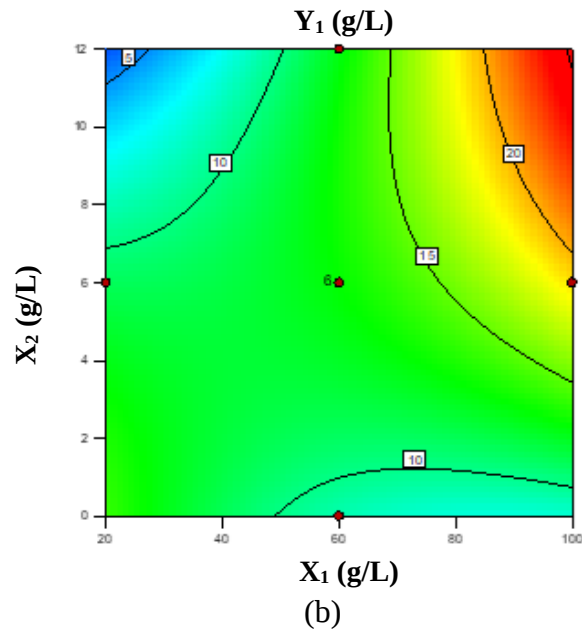
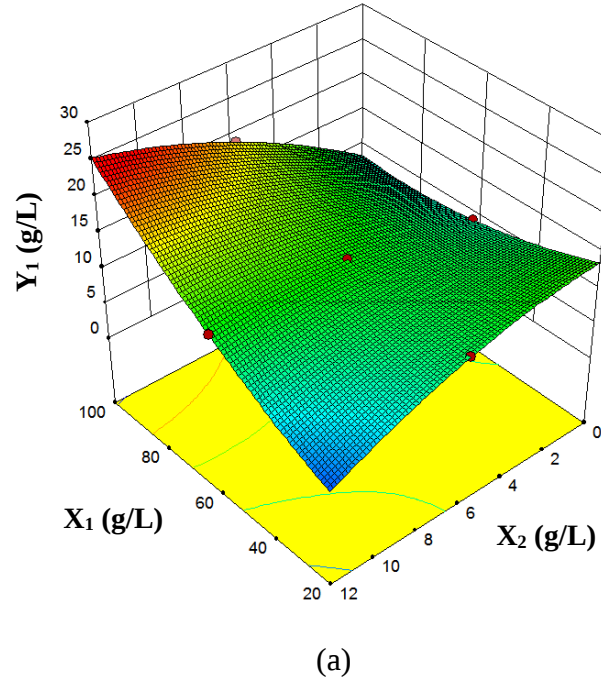
Bu çalışmada, seçilen bağımsız değişkenlerin; maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.55 - Şekil 4.60’da sunulmuştur. Her bir grafik, söz konusu grafik üzerinde yer almayan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Çizelge 4.8. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4) maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	14	41.31	529.13**	<0.0001
X_1	1	100.25	1284.13**	<0.0001
X_2	1	17.09	218.87**	<0.0001
X_3	1	178.92	2291.99**	<0.0001
X_4	1	63.99	819.75**	<0.0001
X_1X_2	1	45.73	585.81**	<0.0001
X_1X_3	1	15.70	201.13**	<0.0001
X_1X_4	1	21.05	269.59**	<0.0001
X_2X_3	1	11.21	143.54**	<0.0001
X_2X_4	1	31.78	407.11**	<0.0001
X_3X_4	1	15.90	203.68**	<0.0001
X_1^2	1	7.17	91.87**	<0.0001
X_2^2	1	7.24	92.70**	<0.0001
X_3^2	1	47.69	610.95**	<0.0001
X_4^2	1	15.37	196.92**	<0.0001
Uyum eksikliği	10	0.10	2.97	0.1209
Hata	5	0.034		
Genel	29			

**p<0.01, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Fermantasyon ortamlarındaki başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin, maksimum EPS derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.55'de gösterilmiştir.



Şekil 4.55. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

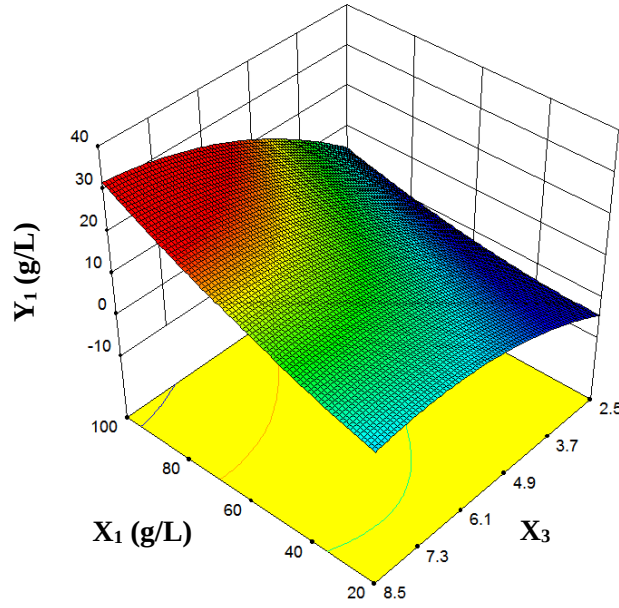
Şekil 4.55’deki değerlerden de görülebileceği gibi; fermantasyon ortamındaki maksimum EPS derişimi, başlangıç pepton derişiminin düşük olduğu koşullarda, başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla azalmaktadır. Çalışılan derişim aralığındaki, yüksek başlangıç pepton derişimlerinde ise; ortamdaki başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla; elde

edilen maksimum EPS derişimi de belirgin bir şekilde artmaktadır. Şekil 4.55a'da yer alan yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, fermentasyon ortamındaki başlangıç pepton derişiminin yüksek, sakkaroz derişiminin ise düşük olduğu koşullarda; elde edilen maksimum EPS derişiminin çok düşük olduğu belirlenmiştir. 28°C'de, başlangıç pH değerinin 5.5 olduğu fermentasyon ortamlarında, yüksek EPS derişimlerine, başlangıç sakkaroz derişiminin yaklaşık 85-100 g/L ve başlangıç pepton derişiminin ise, yaklaşık 7-12 g/L aralığında olduğu koşullarda ulaşılabilmektedir.

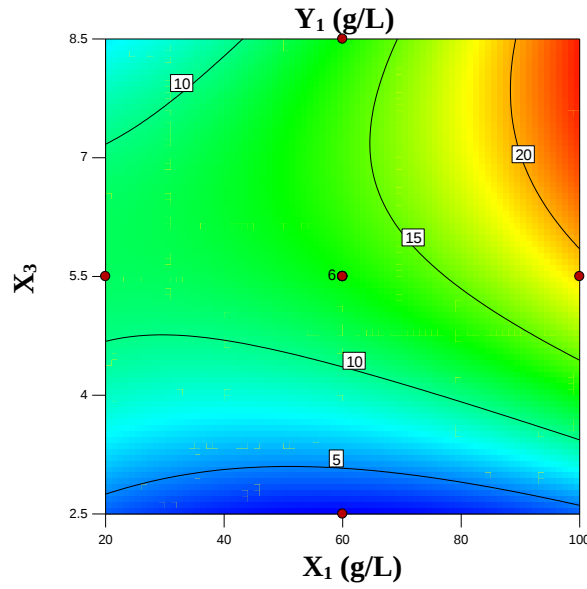
Şekil 4.55b'deki kontur grafiği incelendiğinde ise; başlangıç sakkaroz derişimi 100 g/L olan fermentasyon ortamlarında elde edilebilecek maksimum EPS derişimlerinin; ortamdaki başlangıç pepton derişiminin; 7-12 g/L aralığında değiştiği koşullarda, 20 g/L'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Başlangıç sakkaroz derişimi 95 g/L, başlangıç pepton derişimi ise, 11 g/L iken; elde edilebilecek maksimum EPS derişimi; 23 g/L olarak belirlenmiştir. Bu grafikten ayrıca, başlangıç pepton derişimi 12 g/L olan fermentasyon ortamlarında; başlangıç sakkaroz derişimi 27 g/L'den daha düşük olduğu da tespit edilmiştir.

Fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ile başlangıç pH'ının maksimum EPS derişimi üzerindeki etkileri ise; Şekil 4.56'da gösterilmiştir.

Şekil 4.56a'daki üç boyutlu grafik incelendiğinde, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının düşük olduğu koşullarda, başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla elde edilen maksimum EPS derişiminin de arttığı bulunmuştur. İlgili şekildeki sonuçlar incelendiğinde ayrıca; 28°C'de, fermentasyon ortamındaki peptonun başlangıç derişimi; 6 g/L değerinde sabit tutularak, sakkaroz başlangıç derişimi; 80-100 g/L ve başlangıç pH'ı ise, 6-8.5 aralığında değiştirildiğinde, fermentasyon sonucunda yüksek EPS derişimlerinin elde edildiği de belirlenmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.56. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile başlangıç pH'nın (X_3); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

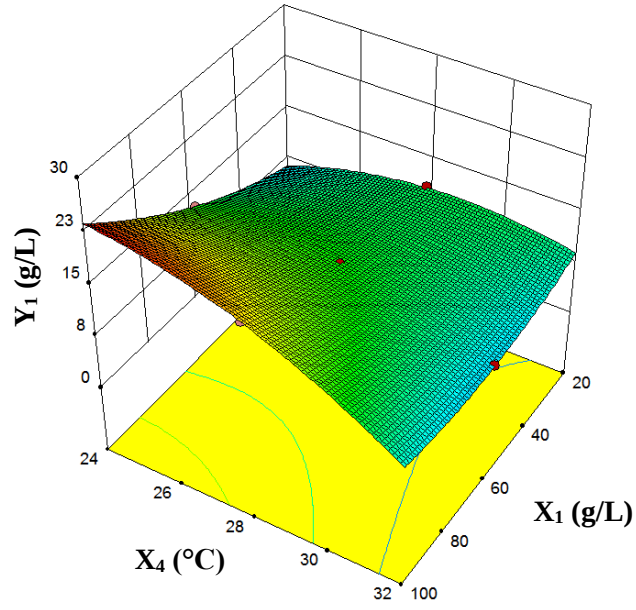
Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ile başlangıç pH'nın; maksimum EPS derişimi üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğı (Şekil 4.56b) incelendiğinde ise; 28°C 'de, sakkaroz başlangıç derişimi; 60 g/L, pepton başlangıç derişimi; 6 g/L ve başlangıç pH'ı 3'den küçük olan bir fermantasyon ortamında elde edilebilen maksimum

EPS derişiminin 5 g/L'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Kontur grafiğinden ayrıca; sakkaroz başlangıç derişimi 100 g/L olan fermentasyon ortamlarında, başlangıç pH'ının 6.0-8.5 aralığında değıştiğı koşullarda elde edilen maksimum EPS derişimlerinin de 20 g/L'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak; çalışılan aralıktaki tüm başlangıç sakkaroz derişimleri için fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının 2.5-3.5 aralığında değıştiğı koşullarda elde edilen maksimum EPS derişiminin; 10 g/L'den daha düşük olduğu da bulunmuştur.

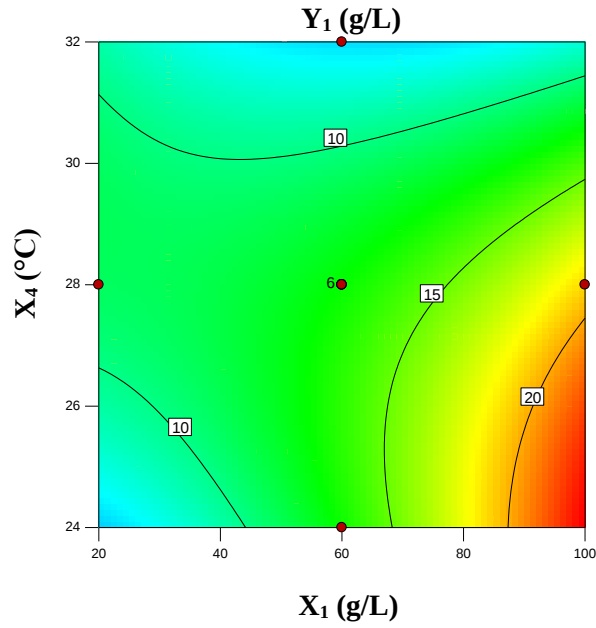
Sıcaklık ve fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; maksimum EPS derişimi üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.57'de sunulmuştur.

Yanıt yüzey grafiğı (Şekil 4.57a) incelendiğinde, başlangıç sakkaroz derişiminin düşük olduğu fermentasyon ortamlarındaki EPS üretiminin; sıcaklığın, 24°C'den 32°C'ye artmasıyla hemen hemen sabit kaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada denenen en düşük sıcaklıkta (24°C) ise; fermentasyon ortamındaki sakkarozun başlangıç derişiminin artmasıyla elde edilen maksimum EPS derişiminin de oldukça arttığı görülmüştür. Fermentasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin, 6 g/L ve başlangıç pH'ının ise; 5.5 olduğu koşullarda, yüksek EPS derişimlerinin; başlangıç sakkaroz derişiminin; 90-100 g/L ve sıcaklığın ise, 24-26°C aralığında değıştiğı işletme koşullarında elde edildiğı belirlenmiştir.

Şekil 4.57b'de yer alan kontur grafiğı incelendiğinde ise, maksimum EPS derişiminin; fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; 20 g/L olduğu ve sıcaklığın yaklaşık 24-26.5°C arasında değıştiğı, ayrıca; başlangıç sakkaroz derişiminin; 60 g/L ve sıcaklığın ise; 30.5-32°C arasında değıştiğı işletme koşullarında, 10 g/L'den daha düşük olduğu görülmüştür. Başlangıç sakkaroz derişiminin; 100 g/L olduğu ve sıcaklığın; 24-27°C aralığında değıştiğı koşullarda elde edilen maksimum EPS derişiminin ise; 20 g/L'den daha yüksek olduğu bulunmuştur. 25°C'de, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 6 ve 95 g/L ve başlangıç pH'ının ise; 5.5 olduğu koşullarda EPS derişiminin; 21.8 g/L olduğu da tespit edilmiştir.



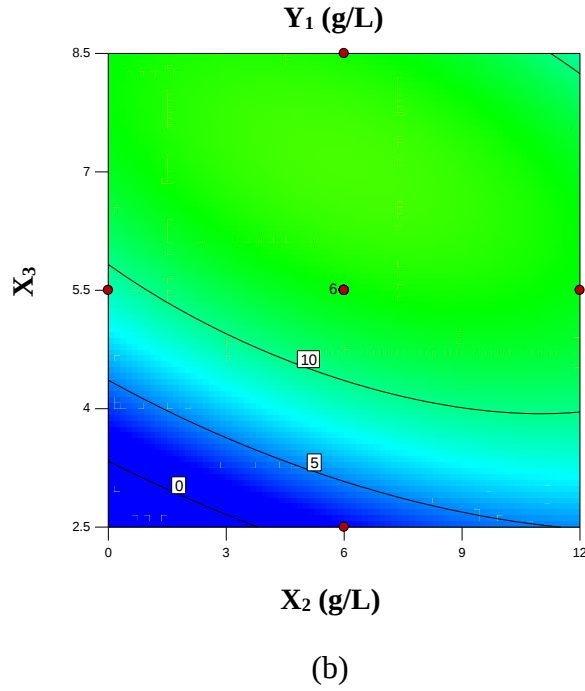
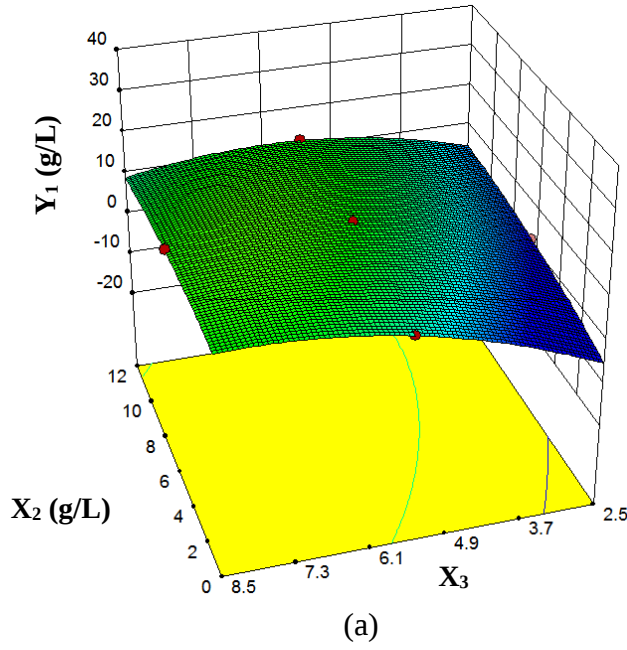
(a)



(b)

Şekil 4.57. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi ile başlangıç pH'ının; maksimum EPS derişimi üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.58'de sunulmuştur.



Şekil 4.58. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile başlangıç pH'nın (X_3); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

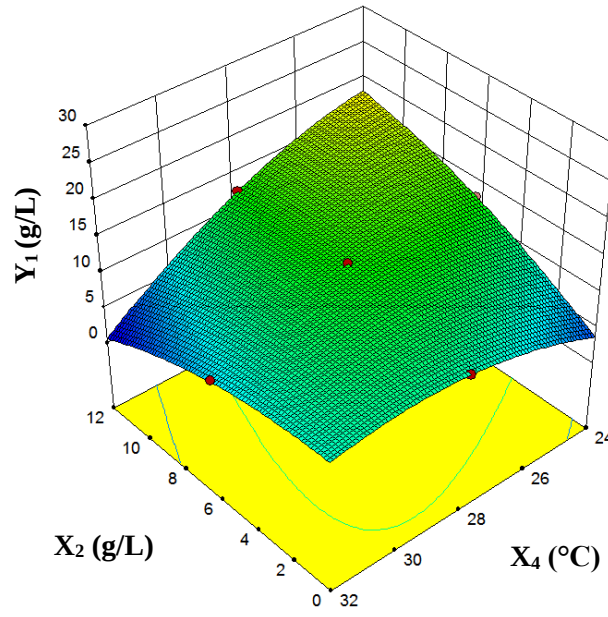
Şekil 4.58a'da yer alan yanıt yüzey grafiğı incelendiğinde; fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişiminin; 60 g/L, sıcaklığın ise; 28°C olduğu koşullarda; bu çalışmada kullanılan başlangıç pH aralığında, ortamdaki başlangıç pepton derişiminin

artması ile EPS üretimininde de genel olarak bir miktar arttığı belirlenmiştir. Ayrıca; başlangıç pepton derişiminin; 0-4 g/L, başlangıç pH'ının ise 2.5-3.5 aralığında değıştikleri fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum EPS derişimlerinin de düşük oldukları tespit edilmiştir.

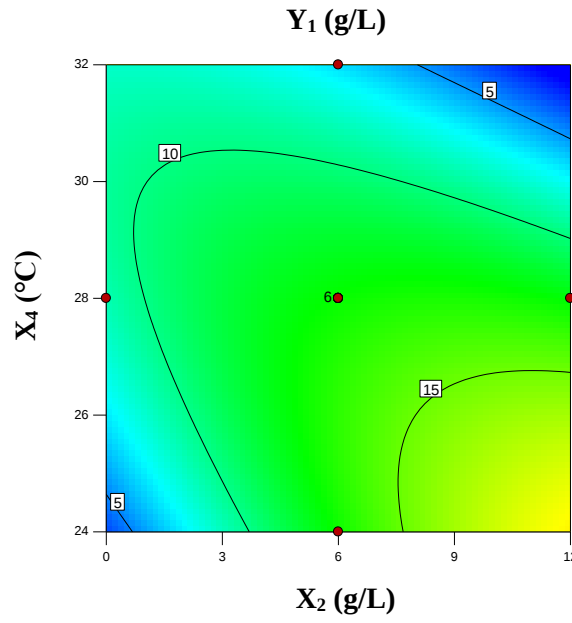
Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi ile başlangıç pH'ının; maksimum EPS derişimi üzerine etkilerini gösteren kontur grafiğı ise, Şekil 4.58b'de yer almaktadır. Bu grafik incelendiğinde; 28°C'de, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla, 60 ve 6 g/L olan fermantasyon ortamlarında; başlangıç pH'ının 2.5-4.3 aralığında değıştiğı işletme koşullarında, elde edilen maksimum EPS derişiminin; 10 g/L'den daha düşük olduğu belirlenmiştir. 28°C'de fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 60 ve 3 g/L, ve pH'ı ise; 3 iken; elde edilen maksimum EPS derişiminin 2 g/L olduğu bulunmuştur.

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkileri ise; Şekil 4.59'daki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir. Şekil 4.59a'daki yanıt yüzey grafiğı incelendiğinde, düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamındaki başlangıç pepton derişiminin artmasıyla elde edilen EPS derişimlerinin de arttığı tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda yapılan deneylerde ise, fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimindeki artışın; elde edilen EPS miktarlarını önemli ölçüde etkilemediğı bulunmuştur. Ayrıca, başlangıç sakkaroz derişimi, 60 g/L ve başlangıç pH'ı 5.5 olan fermantasyon ortamlarında; sıcaklığın; 24-25°C ve başlangıç pepton derişiminin ise, 9-12 g/L aralığında değıştiğı işletme koşullarında; EPS üretiminin de yüksek olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.59b'deki kontur grafiğı incelendiğinde ise; başlangıç pepton derişimi 8-12 g/L aralığında değışen fermantasyon ortamlarında; 24-26°C sıcaklık aralığında elde edilen EPS derişimlerinin; 15 g/L'den daha yüksek oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, 24°C'de, başlangıç pepton derişimi; 0-0.6 g/L, 32°C'de ise; başlangıç pepton derişimi; 8-12 g/L aralıklarında değışen fermantasyon ortamlarında elde edilen en yüksek EPS derişimlerinin 5 g/L'den daha düşük olduğu da bulunmuştur.



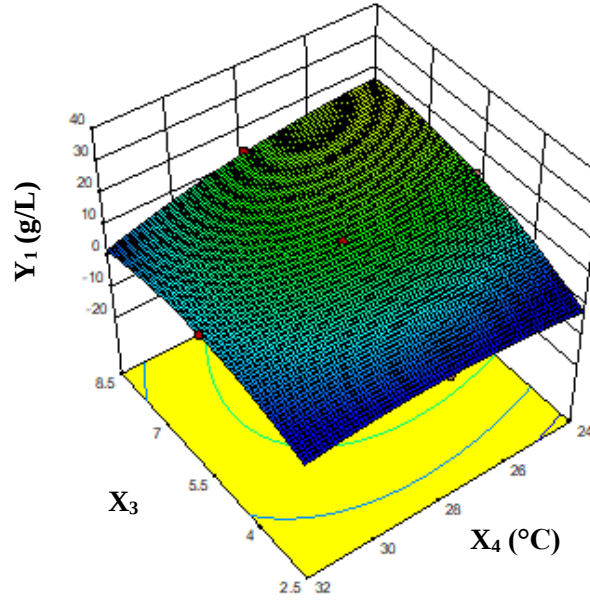
(a)



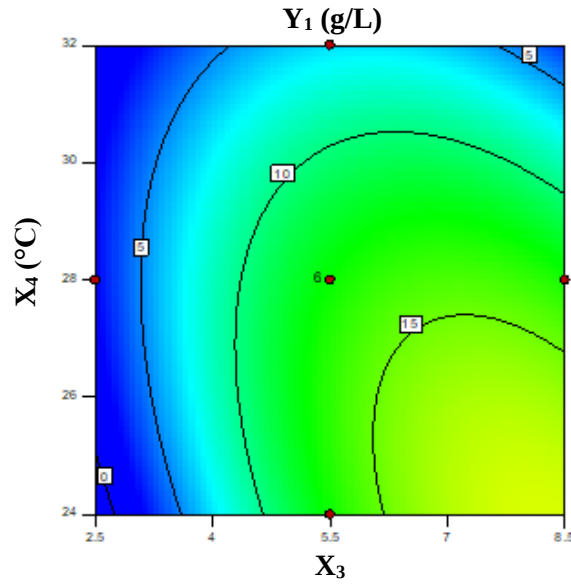
(b)

Şekil 4.59. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkileri ise, Şekil 4.60'daki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir.



(a)



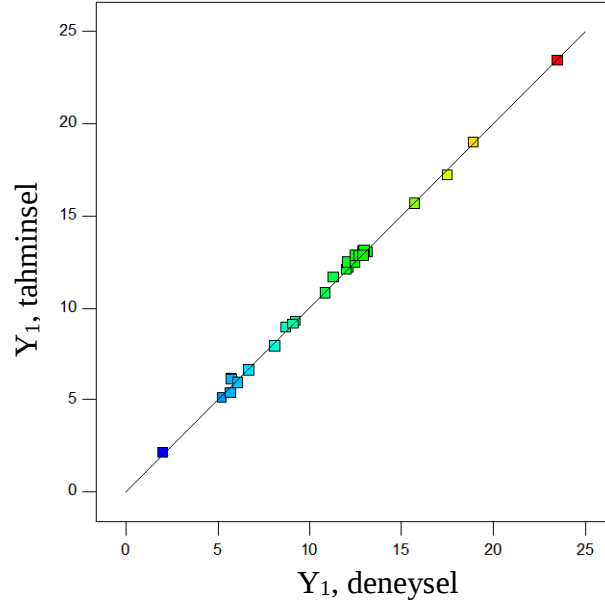
(b)

Şekil 4.60. Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum EPS derişimi (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L)

Başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla, 60 ve 6 g/L olan fermantasyon ortamlarında, elde edilen EPS derişimlerinin; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının artmasıyla düşük sıcaklıklarda arttığı; yüksek sıcaklıklarda ise çok fazla değişmediği bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca, sıcaklığın artmasıyla; fermantasyon sonucunda elde edilen en yüksek EPS derişimlerinin; düşük başlangıç pH değerlerinde çok fazla değişmediği; yüksek başlangıç pH değerlerinde ise; azaldığı da bulunmuştur.

Şekil 4.60b'deki kontur grafiği incelendiğinde, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının; 7-8.5 ve sıcaklığın ise, 24-27°C aralığında değiştiği işletme koşullarında elde edilen maksimum EPS derişimlerinin 15 g/L'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 24°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla, 60 ve 6 g/L, başlangıç pH'ının ise, 2.5-3.2 aralığında değiştiği koşullarda elde edilen maksimum EPS derişimlerinin ise; 5 g/L'den daha düşük olduğu bulunmuştur. 30°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla, 60 ve 6 g/L, ve pH'ının ise; 3 olduğu koşullarda elde edilen EPS derişiminin; 3.9 g/L olduğu tespit edilmiştir.

Maksimum EPS derişimlerinin (Y_1); Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırıldıkları grafik; Şekil 4.61'de gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde; tahminsel ve deneysel Y_1 değerlerinin diagonal üzerinde yer aldıkları ve birbirlerine çok yakın oldukları belirlenmiştir. Söz konusu grafik için belirleme katsayısı ise; $R^2 = 0.998$ olarak hesaplanmıştır. R^2 değerinin 1'e çok yakın olması; model eşitlikten hesaplanan tahminsel Y_1 değerleri ile deneysel Y_1 değerlerinin birbirleri ile uyumunun oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.61. Maksimum EPS derişimlerinin (Y_1); Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan tahminsel değeri ile deneysel değeri karşılaştırılması ($y = 0.99798x + 0.02261$; $R^2 = 0.998$)

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden çoklu regresyon model denklemi ise; Eş. 4.2'de gösterilmiştir.

$$Y_2 = + 12.34 + 2.12X_1 + 0.76X_2 + 2.68X_3 - 1.62X_4 + 1.54X_1X_2 + 1.02X_1X_3 - 1.05X_1X_4 - 0.77X_2X_3 - 1.40X_2X_4 - 1.01X_3X_4 + 0.39X_1^2 - 0.49X_2^2 - 1.29X_3^2 - 0.73X_4^2 \quad (4.2)$$

Türetilen model eşitlik için belirleme katsayısı ise; $R^2 = 0.995$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan R^2 değerinin 1'e çok yakın olması; deneysel ve Eş. 4.2'ye göre hesaplanan tahminsel Y_2 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. Bu modele ait varyans analizi sonuçları ise, Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Türetilen model; varyans analizi sonuçlarına göre %95 güven düzeyinde önemli ($p < 0.01$) bulunmuştur. Ayrıca, tüm bağımsız değişkenlerin; maksimum pullulan derişimi üzerindeki lineer etkilerinin, bu parametrelerin karesel etkilerinin ve birbirleri ile

etkileşimlerinin de oldukça önemli oldukları ($p<0.01$) tespit edilmiştir. Türetilen modelin uyum eksikliğinin ise; önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).

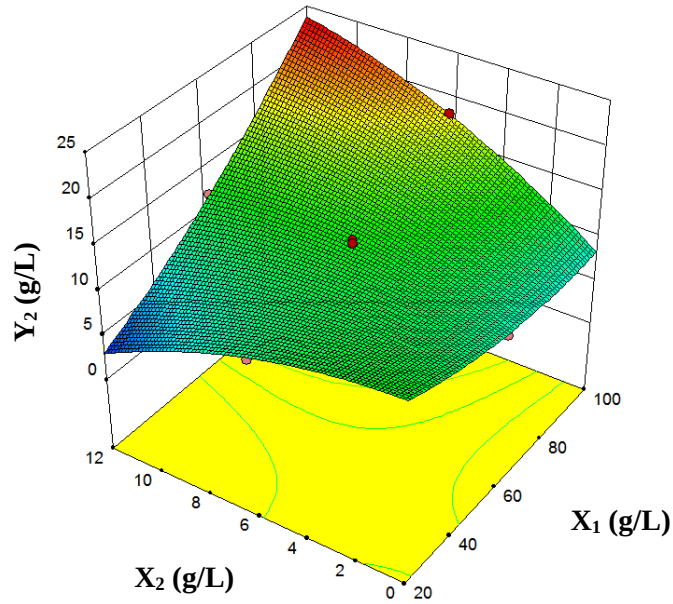
Çizelge 4.9. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	14	39.71	224.58**	<0.0001
X_1	1	107.70	609.13**	<0.0001
X_2	1	13.89	78.58**	<0.0001
X_3	1	172.70	976.79**	<0.0001
X_4	1	62.99	356.25**	<0.0001
X_1X_2	1	38.13	215.67**	<0.0001
X_1X_3	1	16.61	93.92**	<0.0001
X_1X_4	1	17.51	99.06**	<0.0001
X_2X_3	1	9.46	53.48**	<0.0001
X_2X_4	1	31.53	178.32**	<0.0001
X_3X_4	1	16.44	93.00**	<0.0001
X_1^2	1	4.18	23.62**	0.0002
X_2^2	1	6.68	37.79**	<0.0001
X_3^2	1	45.89	259.58**	<0.0001
X_4^2	1	14.81	83.76**	<0.0001
Uyum eksikliği	10	0.23	3.69	0.0810
Hata	5	0.063		
Genel	29			

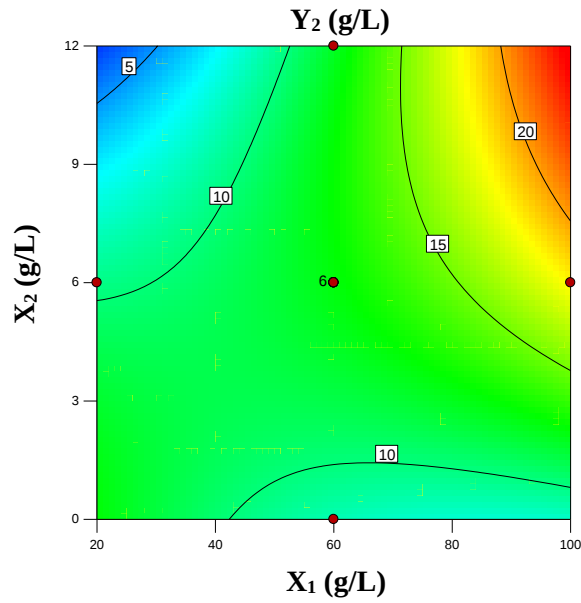
** $p<0.01$, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Bu çalışmada, seçilen bağımsız değişkenlerin; maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri ise, Şekil 4.62 – Şekil 4.67’de gösterilmiştir. Her bir grafik; söz konusu grafik üzerinde yer almayan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin; maksimum pullulan derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.62’de sunulmuştur.



(a)



(b)

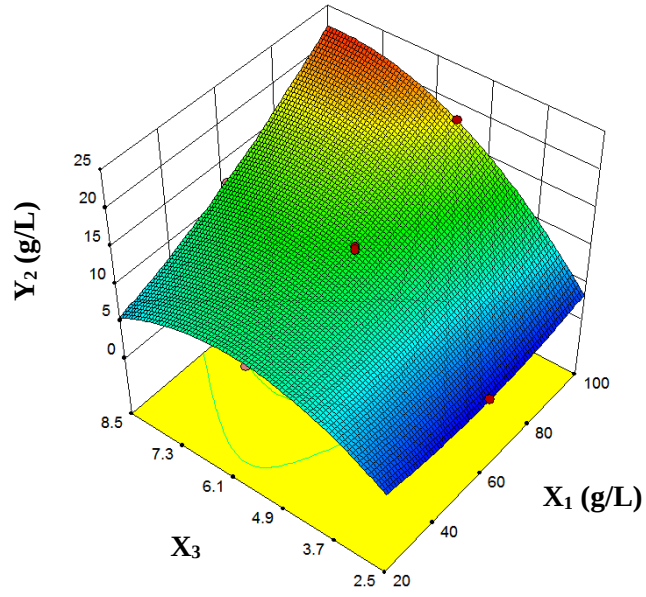
Şekil 4.62. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Bu çalışmada, 28°C’de ve başlangıç pH’ı 5.5 olan fermantasyon ortamlarında elde edilebilecek en yüksek pullulan derişimine, sakkaroz ve peptonun başlangıç derişimlerinin en yüksek değerlerinde olduğu işletme koşullarında ulaşılabileceği bulunmuştur. En yüksek pullulan derişiminin; fermantasyon ortamındaki sakkarozun başlangıç derişiminin düşük olduğu deneylerde, ortamdaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla bir miktar azaldığı, fermantasyon ortamındaki sakkarozun başlangıç derişiminin yüksek olduğu deneylerde ise; ortamdaki peptonun başlangıç derişiminin artması ile oldukça arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.62a).

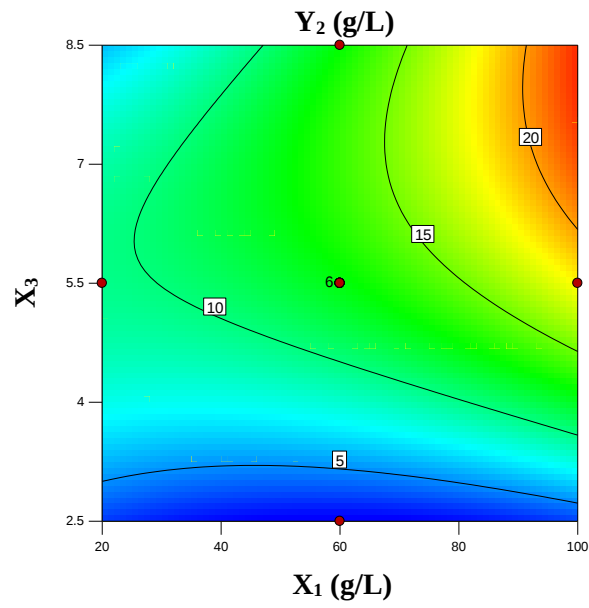
Şekil 4.62b’deki kontur grafiği incelendiğinde, başlangıç pepton derişimi; 12 g/L olan fermantasyon ortamlarında; elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin; başlangıç sakkaroz derişimi; 20-50 g/L aralığında değişen ortamlarda; 10 g/L’den daha düşük, başlangıç sakkaroz derişimi 90-100 g/L aralığında değişen ortamlarda ise, 20 g/L’den daha yüksek oldukları belirlenmiştir. 28°C’de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 95 ve 10.8 g/L ve başlangıç pH’ı ise, 5.5. iken elde edilen EPS derişiminin 21.5 g/L olduğu da tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pH’ının maksimum pullulan derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.63’de sunulmuştur.

Bu çalışmada, incelenen sakkaroz başlangıç derişim aralığında, fermantasyon ortamının başlangıç pH’ının düşük olduğu koşullarda elde edilen maksimum pullulan derişiminin de düşük olduğu bulunmuştur. Başlangıç pH’ı düşük olan fermantasyon ortamlarında; başlangıç sakkaroz derişimindeki artışın, elde edilen maksimum pullulan derişimlerini önemli ölçüde değiştirmede de belirlenmiştir (Şekil 4.63a). Bu çalışmada, en yüksek pullulan derişimleri, Şekil 4.63a’daki yanıt yüzey grafiğine göre, 28°C’de başlangıç pepton derişimi; 6 g/L olan fermantasyon ortamlarında, ortamın başlangıç pH’ının; yaklaşık, 7-8.5 ve başlangıç sakkaroz derişiminin ise, yaklaşık, 90-100 g/L aralığında değiştiği koşullarda elde edilmiştir. Ortamın başlangıç pH’ının; yaklaşık, 6-8.5 ve başlangıç sakkaroz derişiminin ise, yaklaşık, 20-40 g/L aralığında değiştiği koşullarda ise, elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin düşük oldukları bulunmuştur.



(a)



(b)

Şekil 4.63. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

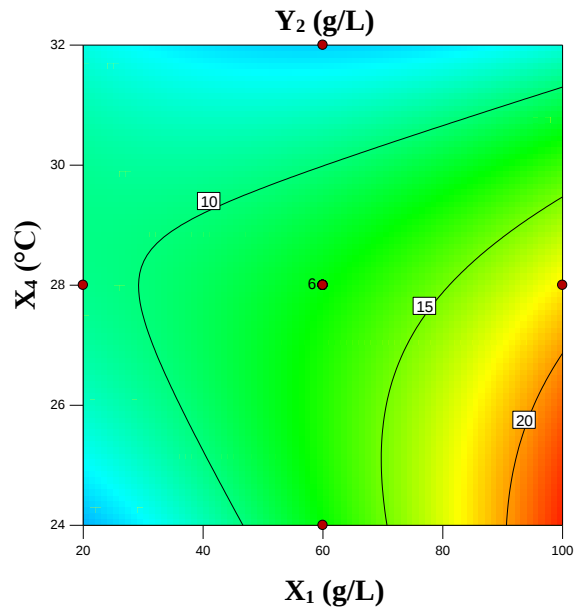
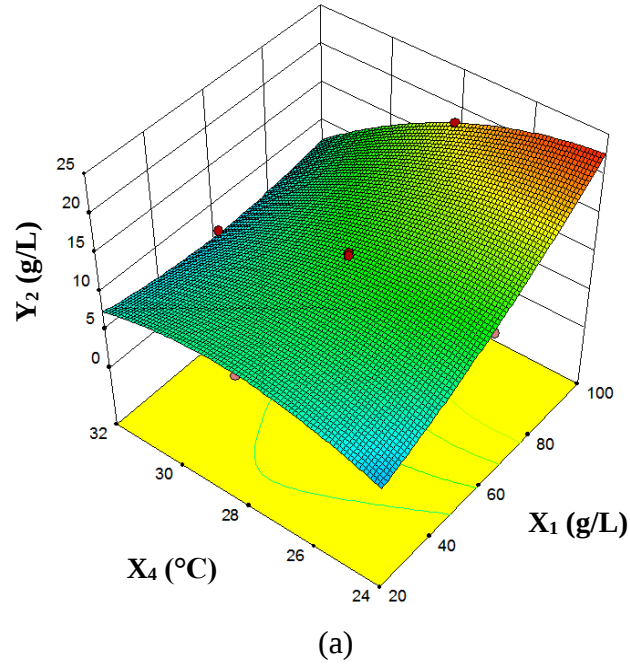
Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pH'ının; maksimum pullulan derişimi üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğinde (Şekil 4.63b), çalışılan tüm başlangıç sakkaroz derişimlerinde, başlangıç pH'ının; 2.7'den daha düşük olduğu

işletme koşullarında elde edilen maksimum pullulan derişiminin; 5 g/L'den daha düşük olduğu görölmüştür. 28°C'de, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 50 ve 60 g/L, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı ise, 2.6 iken elde edilen pullulan derişiminin 2.3 g/L olduğu bulunmuştur. Kontur grafiğı incelendiğinde ayrıca, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının 8.5 olduğu, başlangıç sakkaroz derişiminin ise; 90-100 g/L aralığında değıştiğı durumda elde edilen maksimum pullulan derişiminin; 20 g/L'den daha yüksek olduğu da belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile sıcaklığın (X_4) maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.64'deki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir. Başlangıç sakkaroz derişiminin düşük olduğu fermantasyon ortamlarında, sıcaklıktaki artışın, elde edilen pullulan derişimini önemli ölçüde değıştirmediğı belirlenmiştir.

Şekil 4.64a'daki veriler incelendiğinde, başlangıç pH'ı 5.5 ve başlangıç pepton ve sakkaroz derişimleri ise, sırasıyla; 6 ve 100 g/L olan fermantasyon ortamlarında yapılan çalışmalarda; sıcaklığın, 24°C'den 32°C'ye arttırılmasıyla elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin azaldığı görölmüştür. Yüksek pullulan derişimlerinin, fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişiminin, yaklaşık 90-100 g/L aralığında değıştiğı; sıcaklığın ise, 24-25°C olduğu koşullarda elde edildiğı tespit edilmiştir. Ayrıca, yüksek sıcaklıklarda, elde edilen maksimum pullulan derişiminin, ortamdaki başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla önemli ölçüde değışmediğı de belirlenmiştir.

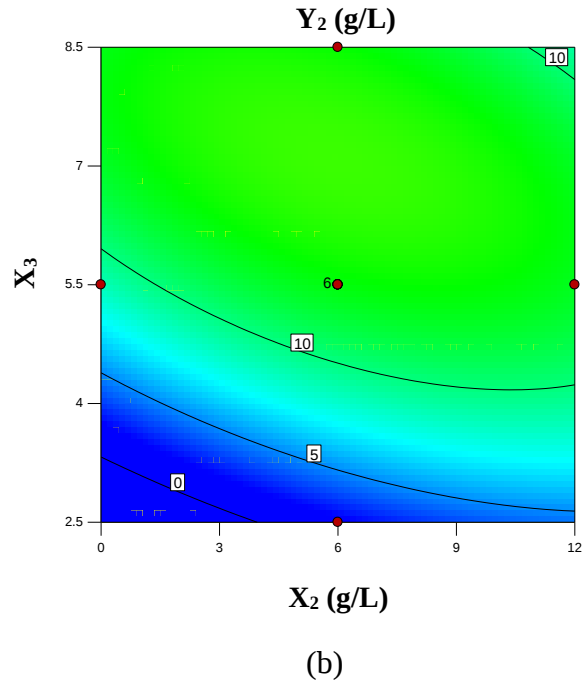
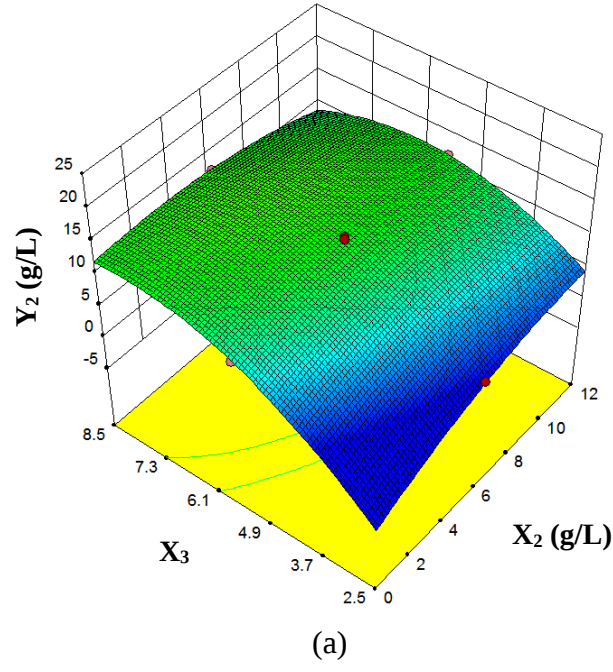
Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ile sıcaklığın, maksimum pullulan derişimi üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğı (Şekil 4.64b) incelendiğinde; 24°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; 90-100 g/L aralığında değıştiğı koşullarda, elde edilen maksimum pullulan derişiminin; 20 g/L'den daha yüksek olduğu görölmüştür. Ayrıca, 32°C'de elde edilen maksimum pullulan derişiminin; çalışılan aralıktaki tüm başlangıç sakkaroz derişimleri için 10 g/L'den daha düşük olduğu da tespit edilmiştir.



Şekil 4.64. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkileri ise, Şekil 4.65'deki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir. Bu çalışmadaki bağımsız değişkenler olan fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile başlangıç pH'ının (X_3); deney tasarımı için kullanılan çalışma aralıklarındaki en düşük değerlerinde elde edilen maksimum pullulan derişiminin de çok düşük bir değerde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.65a). Fermantasyon ortamındaki başlangıç pepton derişiminin düşük olduğu koşullarda, ortamın başlangıç pH değerinin artmasıyla maksimum pullulan derişiminin de önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.65a'daki değerler incelendiğinde; pullulan derişiminin; 28°C'de, başlangıç sakkaroz derişimi 60 g/L, başlangıç pepton derişimi, yaklaşık 6 g/L ve başlangıç pH değeri ise, yaklaşık 7 olan bir fermantasyon ortamında en yüksek değerine ulaştığı tespit edilmiştir.

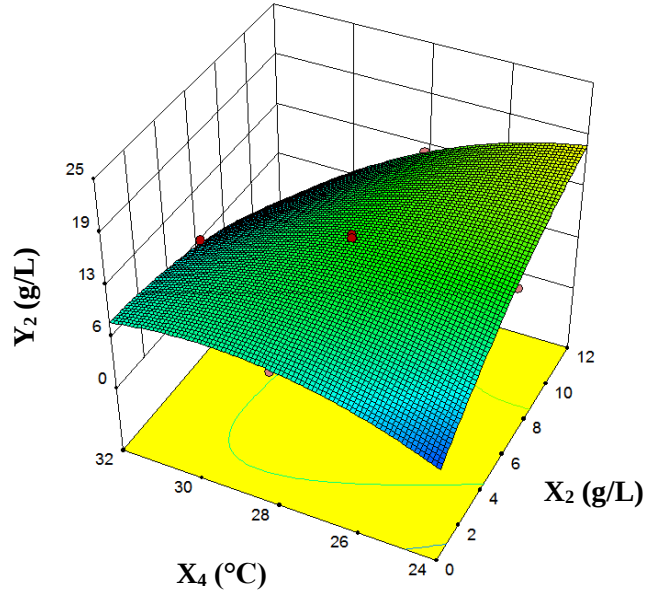
Şekil 4.65b'de yer alan kontur grafiğinde; başlangıç pepton derişimi ve başlangıç pH'ı sırasıyla; 8-12 g/L ve 4.5-8.5 aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin; 10 g/L'den daha yüksek olduğu görülmüştür. Başlangıç pepton derişimi; 2 g/L ve başlangıç pH'ı; yaklaşık, 2.5-3.8 arasında değişen fermantasyon ortamlarında ise; elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin; 5 g/L'den daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 28°C'de fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60 ve 4.3 g/L, başlangıç pH'ının ise, 2.8 olduğu koşullarda elde edilen pullulan derişiminin 1.81 g/L olduğu da tespit edilmiştir.



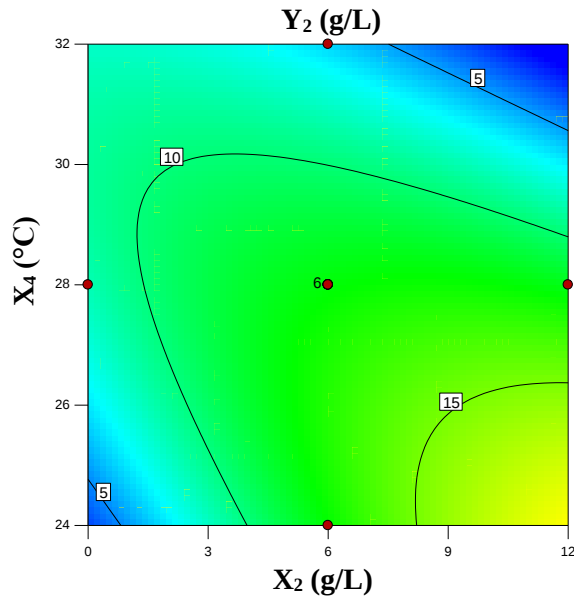
Şekil 4.65. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'nın (X_3); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ile sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.66'da gösterilmiştir. Söz konusu şekilde yer alan yanıt yüzey grafiğinden (Şekil 4.66a), başlangıç sakkaroz derişimi; 60 g/L ve başlangıç pH değeri; 5.5 olan bir fermantasyon ortamında; başlangıç pepton derişiminin; 11 g/L, sıcaklığın ise, 31°C'den daha yüksek olduğu koşullarda elde edilen en yüksek pullulan derişiminin 5 g/L'den daha düşük olduğu saptanmıştır. Sıcaklığın; yaklaşık, 24-26°C, başlangıç pepton derişiminin; 10-12 g/L aralığında değiştiği fermantasyon ortamlarında, elde edilen pullulan derişimlerinin ise 15 g/L'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, aynı grafikte, en yüksek pullulan derişiminin, başlangıç pepton derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında; sıcaklığın, 24°C'den yaklaşık 29°C'ye artmasıyla önce arttığı, daha yüksek sıcaklıklarda ise, bir miktar azaldığı da görülmüştür. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda; elde edilen pullulan derişimlerinin; fermantasyon ortamındaki başlangıç pepton derişiminin artmasıyla önemli miktarda arttığı da tespit edilmiştir.

Kontur grafiği (Şekil 4.66b) incelendiğinde; 32°C'de, başlangıç pepton derişimi; yaklaşık, 7.5-12 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin 5 g/L'den daha düşük olduğu belirlenmiştir. 31°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60 ve 11.3 g/L pH'ın ise; 5.5 olduğu koşullarda elde edilen pullulan derişiminin; 4.2 g/L olduğu tespit edilmiştir.



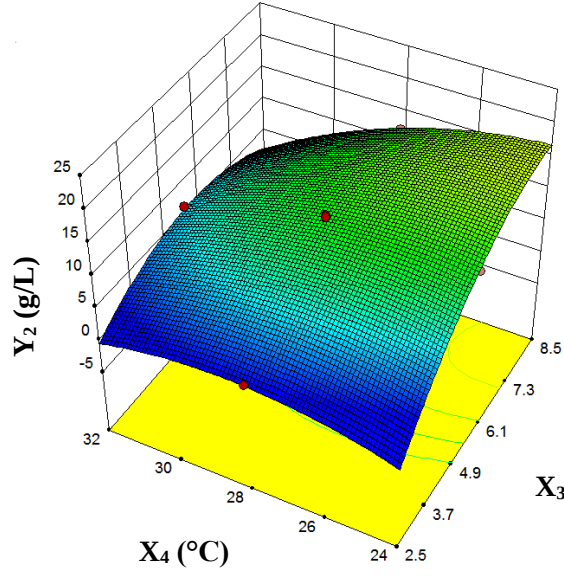
(a)



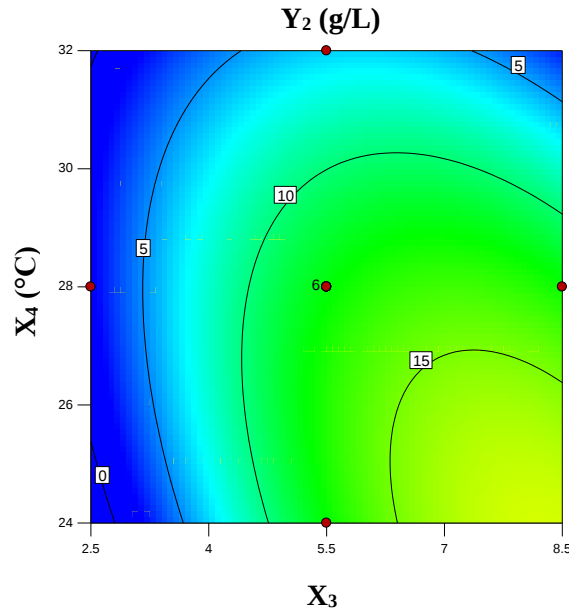
(b)

Şekil 4.66. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimine (Y_2) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pH değeri (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimi (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri, Şekil 4.67’de sunulmuştur.



(a)



(b)

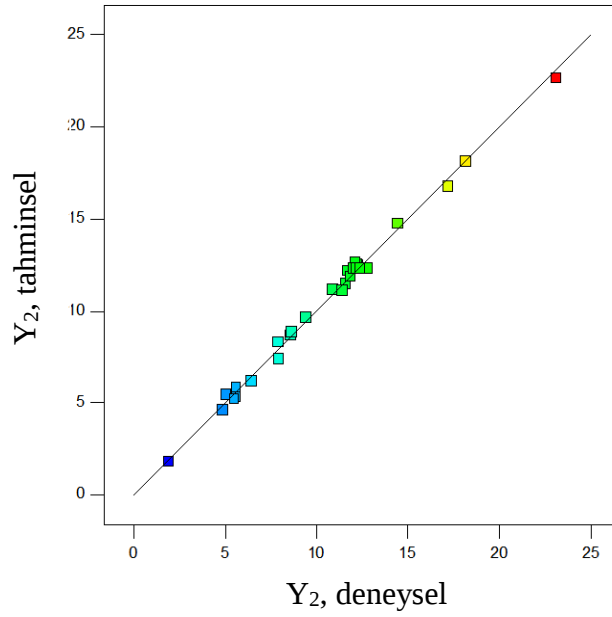
Şekil 4.67. Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); maksimum pullulan derişimine (Y_2) etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L)

Yanıt yüzey grafiğindeki (Şekil 4.67a) değerler incelendiğinde; 24-28°C sıcaklık aralığında, fermantasyon ortamının başlangıç pH değerinin artmasıyla, elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin de arttığı tespit edilmiştir. 28-32°C sıcaklık aralığında

ise; fermantasyon ortamının başlangıç pH değerinin artmasıyla elde edilen maksimum pullulan derişiminin, önce bir miktar arttığı; daha sonra ise azaldığı belirlenmiştir. Şekil 4.67 a'daki yanıt yüzey grafiği; başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla, 60 ve 6 g/L olan fermantasyon ortamlarında elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç pH değeri ve sıcaklığın; maksimum pullulan derişimi üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiği (Şekil 4.67b) incelendiğinde; çalışılan aralıktaki tüm sıcaklıklarda, başlangıç pH'ı; yaklaşık, 2.5-4.4 aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum pullulan derişimlerinin, 10 g/L'den daha düşük oldukları tespit edilmiştir. 31 °C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 60 ve 6 g/L; fermantasyon ortamının başlangıç pH'mın 3 olduğu durumda elde edilen pullulan derişiminin 2.75 g/L; söz konusu koşullarda fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının 5 olduğu durumda ise; elde edilen pullulan derişiminin 7.65 olduğu bulunmuştur. Başlangıç pH'ı 8.5 olan fermantasyon ortamında; sıcaklığın; ise 24-26.0°C aralığında değiştiği işletme koşullarında elde edilen pullulan derişiminin ise; 15 g/L'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Maksimum pullulan derişimlerinin (Y_2); deneysel değerleri ile Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırıldıkları grafik; Şekil 4.68'de sunulmuştur. Bu grafik incelendiğinde; tahminsel ve deneysel Y_2 değerlerinin diagonal üzerinde yer aldıkları ve birbirlerine çok yakın oldukları belirlenmiştir. Türetilen model için belirleme katsayısı ise; $R^2 = 0.995$ olarak hesaplanmıştır. R^2 değerinin 1'e çok yakın olması; model eşitlikten hesaplanan tahminsel Y_2 değerleri ile deneysel Y_2 değerlerinin birbirleri ile uyumunun oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.68. Maksimum pullulan derişimlerinin (Y₂); Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değeri ile deneysel değeri karşılaştırılması ($y = 0.99525x + 0.05047$; $R^2 = 0.995$)

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X₁), başlangıç pepton derişimi (X₂) ve başlangıç pH'ı (X₃) ile sıcaklığın (X₄); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y₃) üzerindeki etkilerini gösteren model denklem ise Eş. 4.3'de sunulmuştur.

$$Y_3 = + 0.045 + 3.042 \times 10^{-3} X_1 + 1.458 \times 10^{-3} X_2 + 4.375 \times 10^{-3} X_3 + 7.208 \times 10^{-3} X_4 + 8.125 \times 10^{-4} X_1 X_2 + 1.188 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 5.625 \times 10^{-4} X_1 X_4 - 3.125 \times 10^{-4} X_2 X_3 - 2.062 \times 10^{-3} X_2 X_4 - 1.437 \times 10^{-3} X_3 X_4 + 1.948 \times 10^{-3} X_1^2 + 7.292 \times 10^{-5} X_2^2 - 1.927 \times 10^{-3} X_3^2 - 6.771 \times 10^{-4} X_4^2 \quad (4.3)$$

Çoklu regresyon yöntemi kullanılarak elde edilen Eş. 4.3 için R^2 değeri; 0.987 olarak hesaplanmıştır. Korelasyon denkleminin 1'e çok yakın olan R^2 değeri; deneysel Y₃ değerleri ile bu denklem kullanılarak hesaplanan tahminsel Y₃ değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. Türetilen modele ait varyans analizi sonuçları; Çizelge 4.10'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre model %95 güven düzeyinde önemli ($p < 0.01$), modelin uyum eksikliği ise, önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	14	1.696×10^{-4}	78.08**	0.0001
X_1	1	2.220×10^{-4}	102.22**	< 0.0001
X_2	1	5.104×10^{-5}	23.50**	0.0002
X_3	1	4.594×10^{-4}	211.48**	< 0.0001
X_4	1	1.247×10^{-3}	574.09**	< 0.0001
X_1X_2	1	1.056×10^{-5}	4.86*	0.0435
X_1X_3	1	2.256×10^{-5}	10.39*	0.0057
X_1X_4	1	5.062×10^{-6}	2.33	0.1477
X_2X_3	1	1.562×10^{-6}	0.72	0.4097
X_2X_4	1	6.806×10^{-5}	31.33**	< 0.0001
X_3X_4	1	3.306×10^{-5}	15.22**	0.0014
X_1^2	1	1.041×10^{-4}	47.91**	< 0.0001
X_2^2	1	1.458×10^{-7}	0.067	0.7991
X_3^2	1	1.019×10^{-4}	46.89**	< 0.0001
X_4^2	1	1.257×10^{-5}	5.79*	0.0295
Uyum eksikliği	10	2.708×10^{-6}	2.46	0.1660
Hata	5	1.100×10^{-6}		
Genel	29			

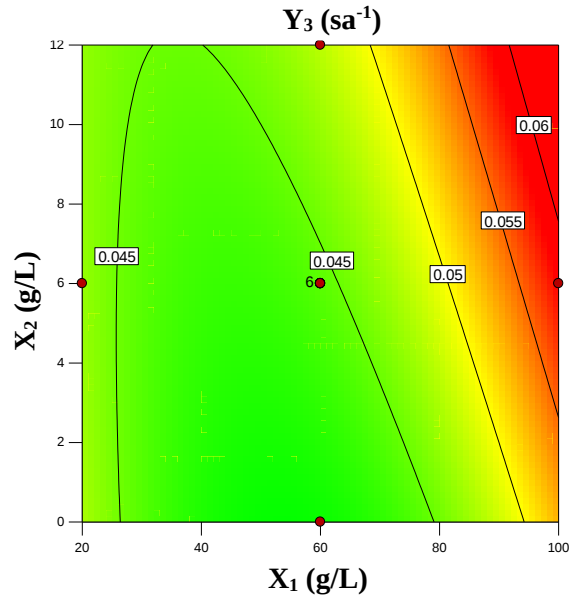
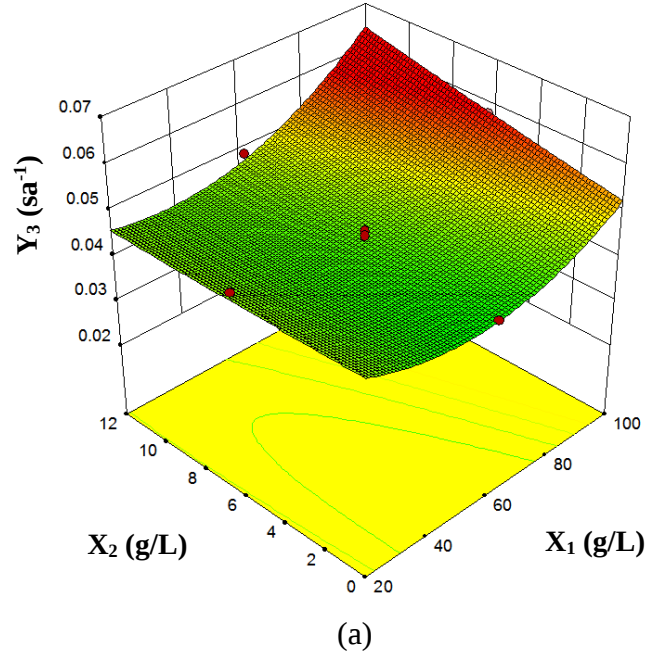
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Tüm bağımsız değişkenlerin; özgül üreme hızı üzerindeki lineer etkilerinin önemli oldukları ($p < 0.05$) belirlenmiştir. Mikroorganizmanın özgül üreme hızına; başlangıç sakkaroz derişimi ve sıcaklığın ikili etkileşiminin; başlangıç pepton derişimi ve başlangıç pH'ının ikili etkileşiminin ve başlangıç pepton derişiminin karesel etkisinin ise önemsiz olduğu ($p > 0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca; türetilen modelin uyum eksikliğinin; önemsiz olduğu ($p > 0.05$) da bulunmuştur.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve başlangıç pepton derişimleri ile başlangıç pH'ı ve sıcaklığın mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.69 – Şekil 4.74'te sunulmuştur. Her bir grafik, söz konusu grafik üzerinde yer almayan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak çizilmiştir.

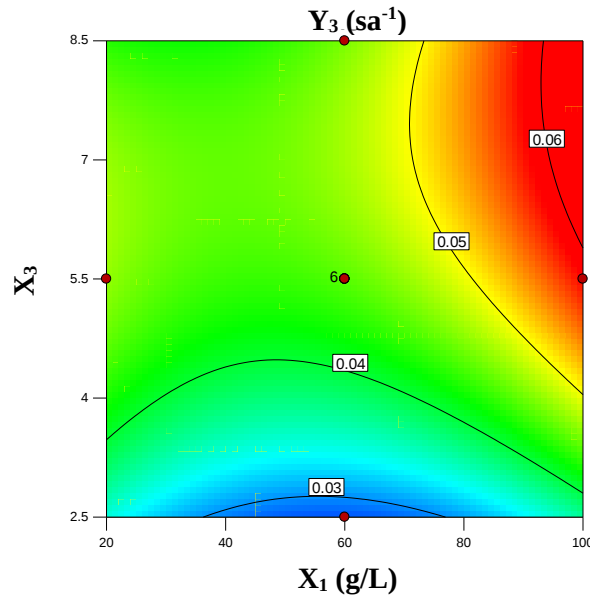
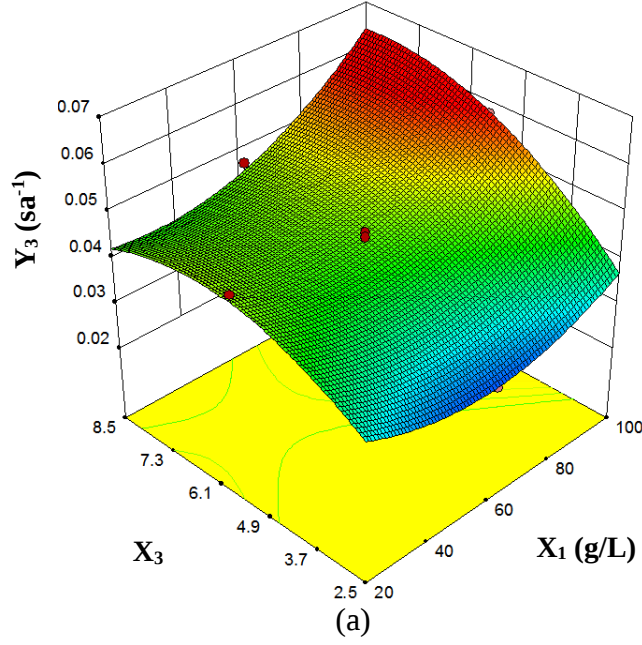
Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pepton derişiminin mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.69'da sunulmuştur. Yanıt yüzey grafiğindeki değerler incelendiğinde; fermantasyon ortamlarında, pepton için kullanılan derişim aralığındaki tüm başlangıç derişimlerinde; ortamdaki başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla mikroorganizmanın özgül üreme hızının da arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.69a). Yanıt yüzey grafiğindeki (Şekil 4.69a) sonuçlar incelendiğinde; başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri; sırasıyla, 60 ve 7.5 g/L'den daha yüksek olan fermantasyon ortamlarında; mikroorganizma özgül üreme hızının yüksek değerlere ulaştığı bulunmuştur. Ayrıca, mikroorganizmanın özgül üreme hızının; sakkaroz başlangıç derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında, ortamdaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla değişmediği; sakkaroz başlangıç derişimi yüksek olan fermantasyon ortamlarında ise; ortamdaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla belirgin bir artış gösterdiği de tespit edilmiştir.

Şekil 4.69b'deki kontur grafiğindeki değerler incelendiğinde; başlangıç sakkaroz derişimi 100 g/L olan fermantasyon ortamlarındaki başlangıç pepton derişiminin; 7.7-12 g/L aralığında değiştirilmesi ile elde edilen, mikroorganizma özgül üreme hızlarının, 0.06 sa^{-1} 'den daha yüksek oldukları bulunmuştur. 28°C 'de başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 95 ve 11.6 g/L ve pH'ın ise, 5.5 olduğu koşullarda, mikroorganizma özgül üreme hızının 0.061 sa^{-1} olduğu tespit edilmiştir. Bu grafikten ayrıca, çalışılan aralıktaki tüm başlangıç pepton derişimlerinde, fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişiminin 20-25 g/L aralığında değiştiği koşullarda elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının da 0.045 sa^{-1} 'den daha düşük oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.69. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz (X_1) ve başlangıç pepton (X_2) derişimlerinin; mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkileri ise, Şekil 4.70'deki yanıt yüzey ve kontur grafiklerinde gösterilmiştir.



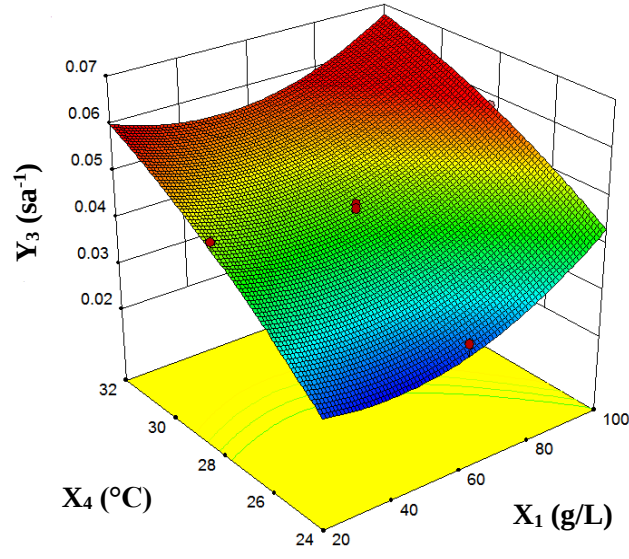
Şekil 4.70. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Yanıt yüzey grafiğindeki değerler incelendiğinde; özellikle, sakkarozun başlangıç derişiminin yüksek olduğu fermentasyon ortamlarında, ortamın başlangıç pH değerinin artmasıyla mikroorganizmanın özgül üreme hızının da arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, başlangıç pH'ı 5'den daha yüksek olan fermentasyon ortamlarında, ortamdaki başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla mikroorganizmanın özgül üreme hızının da arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin ise, başlangıç sakkaroz derişiminin; 80-100 g/L, başlangıç pH değerinin ise, 5.5-8.5 aralığında değıştiği fermentasyon ortamlarında elde edildiği bulunmuştur (Şekil 4.70a).

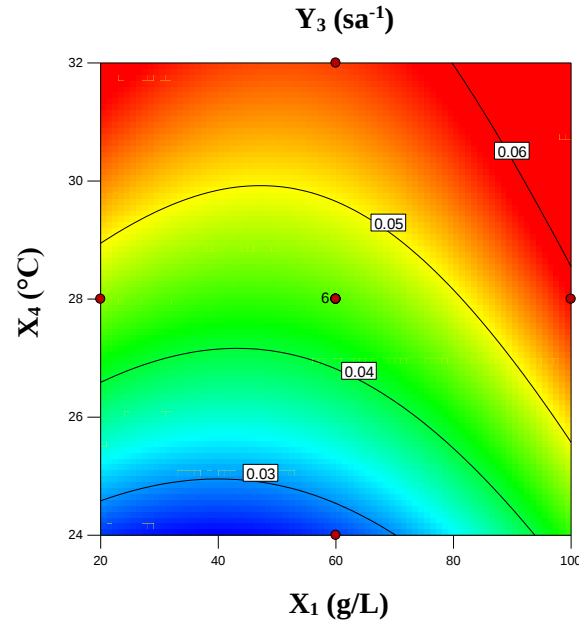
Fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pH'ının; mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğinde (Şekil 4.70b); başlangıç sakkaroz derişimi 100 g/L olan fermentasyon ortamlarında; başlangıç pH'ının, 6-8.5 aralığında değışmesi ile elde edilen, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızının; 0.06 sa⁻¹'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 28°C'de, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri ile başlangıç pH'ı sırasıyla; 60 g/L, 6 g/L ve 5.5 olan fermentasyon ortamında mikroorganizma özgül üreme hızı; 0.044 sa⁻¹ olarak bulunmuştur.

Fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X₁) ile sıcaklığın (X₄); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y₃) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.71'de sunulmuştur.

Yanıt yüzey grafiğindeki (Şekil 4.71a) sonuçlar incelendiğinde; bu çalışmadaki deneyler için seçilen derişim aralığındaki tüm sakkaroz başlangıç derişim değerlerinde, fermentasyon ortamının sıcaklığının artmasıyla mikroorganizmanın özgül üreme hızının da arttığı görülmüştür. En yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı değerleri ise; sakkaroz başlangıç derişimi 60-100 g/L aralığında değışen fermentasyon ortamlarında ortamdaki başlangıç pepton derişiminin 6 g/L ve başlangıç pH'ının ise 5.5 olduğu deney koşullarında, yaklaşık olarak, 28-32°C sıcaklık aralığında elde edildiği bulunmuştur.



(a)



(b)

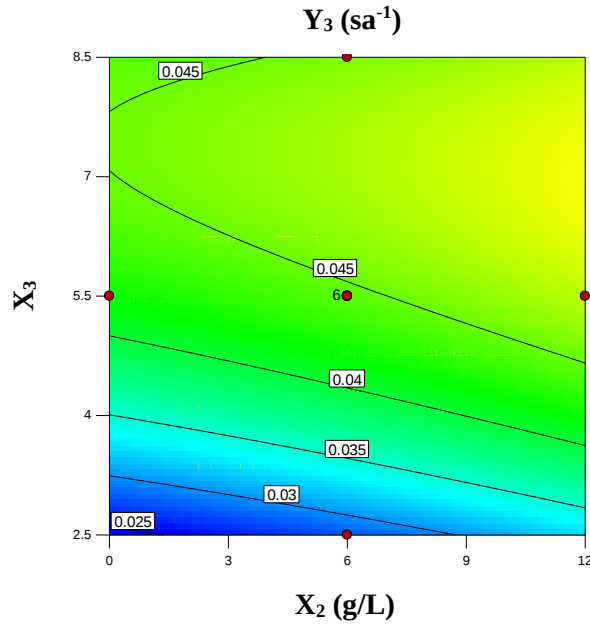
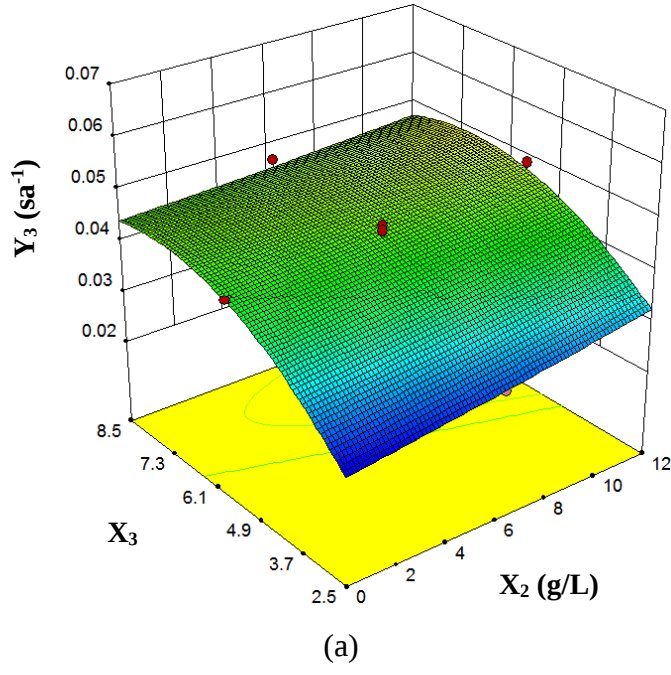
Şekil 4.71. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Kontur grafiğinde (Şekil 4.71b) ise, çalışılan aralıktaki tüm sakkaroz başlangıç derişimlerinde, 30-32°C sıcaklık aralığında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızının; 0.050 sa^{-1} 'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Başlangıç pepton derişimi; 6

g/L ve başlangıç pH'ı 5.5 olan fermantasyon ortamlarında; sakkaroz başlangıç derişimi ve sıcaklığın sırasıyla; 20-70 g/L ve 24-26°C aralığında değıştikleri deney koşullarında elde edilen özgül üreme hızının ise, 0.040 sa⁻¹'den daha düşük olduğu bulunmuştur. Fermantasyon ortamındaki sakkaroz başlangıç derişiminin; 100 g/L ve sıcaklığın; 28.5-32°C aralığında değıştiği koşullarda ise; elde edilen özgül üreme hızının, 0.060 sa⁻¹'den daha yüksek olduğu görölmüştür. Söz konusu kontur grafiğı incelendiğinde, 31°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin 96 g/L olduğu koşulda elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızının ise, 0.065 sa⁻¹ olduğu bulunmuştur (Şekil 4.71b).

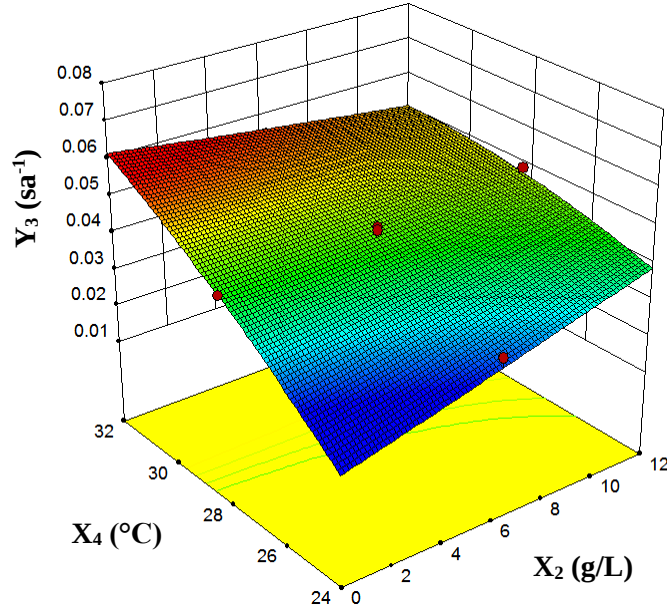
Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X₂) ve başlangıç pH'ının (X₃); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y₃) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.72'de verilmiştir. Yanıt yüzey grafiğindeki sonuçlar incelendiğinde, fermantasyon deneylerinde kullanılan derişim aralığındaki tüm pepton başlangıç derişimlerinde; ortamın başlangıç pH değeri artmasıyla elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının da arttığı bulunmuştur. Başlangıç pH ve pepton derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında, mikroorganizmanın özgül üreme hızının da düşük olduğu görölmüştür. Ayrıca, bu çalışmada incelenen tüm başlangıç pH değerlerinde; fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimindeki değışimin; mikroorganizmanın özgül üreme hızını önemli ölçüde etkilemediği de belirlenmiştir (Şekil 4.72a).

Şekil 4.72b'deki kontur grafiğı incelendiğinde, çalışılan aralıktaki tüm pepton başlangıç derişimlerinde, mikroorganizma özgül üreme hızının; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının; 2.5-3.5 aralığında değıştiği koşullarda; 0.040 sa⁻¹'den daha düşük; fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının; 7-8 aralığında değıştiği koşullarda ise; 0.045 sa⁻¹'den daha yüksek olduğu bulunmuştur. 28°C'de fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60 ve 2 g/L; başlangıç pH'ının ise; 3 olduğu durumda, mikroorganizmanın özgül üreme hızının da 0.030 sa⁻¹ olduğu belirlenmiştir.

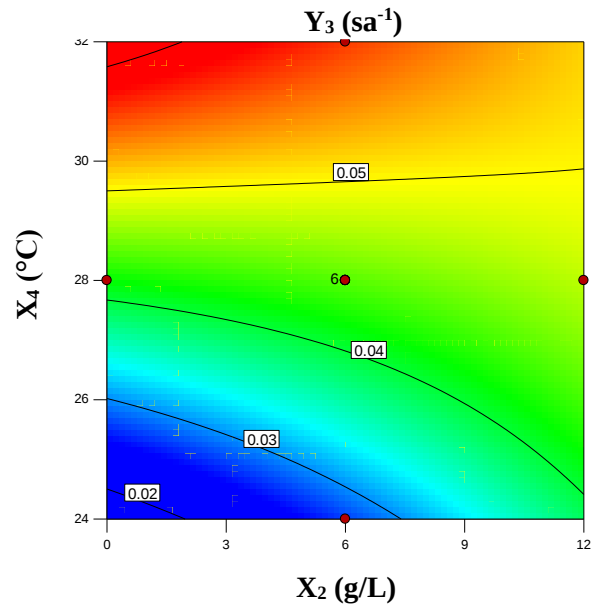


Şekil 4.72. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'nın (X_3); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.73’de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.73. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$)

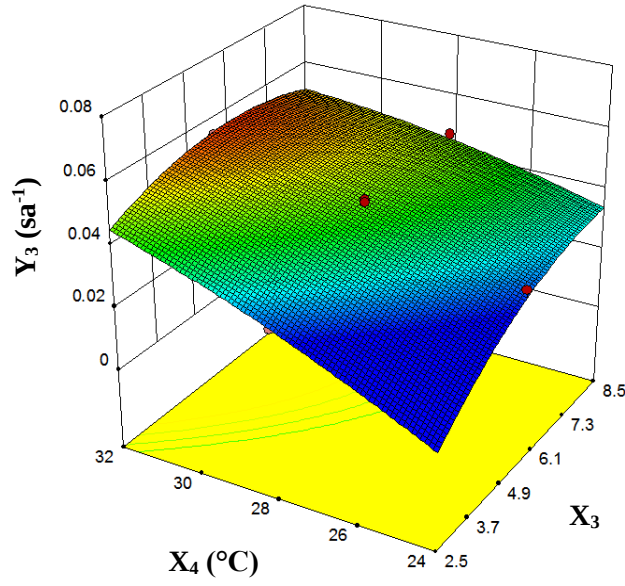
Yanıt yüzey grafiğindeki değerler incelendiğinde, düşük sıcaklıklarda, fermantasyon ortamındaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla; mikroorganizmanın özgül üreme hızının da arttığı bulunmuştur (Şekil 4.73a). Söz konusu grafiğe göre, en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin, sıcaklığın; 28-32°C, fermantasyon ortamındaki pepton başlangıç derişiminin ise; 0-6 g/L aralığında değiştiği deney koşullarında elde edildiği saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, düşük sıcaklıklarda (24-28°C), fermantasyon ortamındaki başlangıç pepton derişimi düşük olduğunda (0-6 g/L), elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının da daha düşük oldukları tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi ile sıcaklığın; mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiği (Şekil 4.73b) incelendiğinde; çalışılan tüm başlangıç pepton derişimlerinde, 30-32°C sıcaklık aralığında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının; 0.050 sa⁻¹'den daha yüksek oldukları bulunmuştur. 31 °C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla 60 ve 1 g/L; pH'nın ise, 5.5 olduğu koşullarda mikroorganizma özgül üreme hızının; 0.057 sa⁻¹ olduğu belirlenmiştir. 24°C'de elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının ise; çalışılan tüm başlangıç derişimleri için 0.04 sa⁻¹'den daha düşük oldukları tespit edilmiştir.

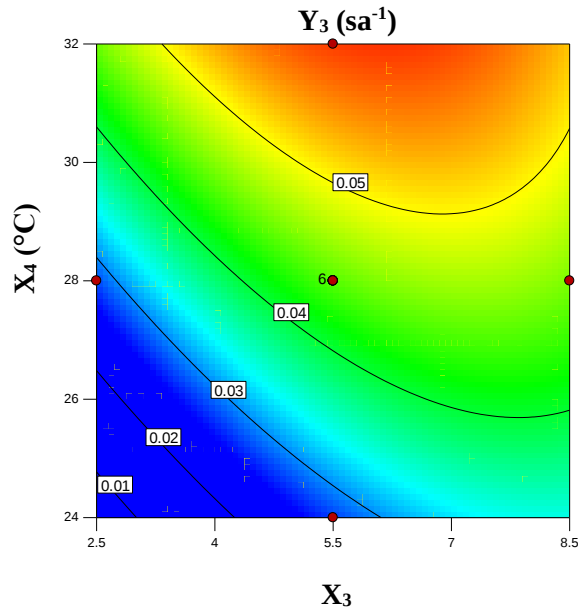
Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X₃) ve sıcaklığın (X₄); mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y₃) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.74'de gösterilmiştir. Şekil 4.74 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; 24°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının artmasıyla; mikroorganizmanın özgül üreme hızının da arttığı tespit edilmiştir. 32°C'de ise; mikroorganizmanın özgül üreme hızının; ortamın başlangıç pH'ının artmasıyla; 2.5-5.5 başlangıç pH aralığında önce arttığı; daha sonra ise; 5.5-8.5 başlangıç pH aralığında azaldığı görülmüştür. Bu araştırmada, düşük sıcaklık ve düşük fermantasyon ortamı başlangıç pH değerlerinde mikroorganizmanın özgül üreme hızının da düşük olduğu bulunmuştur (Şekil 4.74a).

Kontur grafiği (Şekil 4.74b) incelendiğinde ise, 24°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının; 2.5-6.0 aralığında değiştiği koşullarda; mikroorganizma özgül üreme hızının; 0.030 sa⁻¹'den daha düşük olduğu bulunmuştur. Fermantasyon ortamının

başlangıç pH'ının; 7, sıcaklığın; 29.1-32°C aralığında olduğu koşullarda ise; mikroorganizma özgül üreme hızının 0.050 sa⁻¹'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



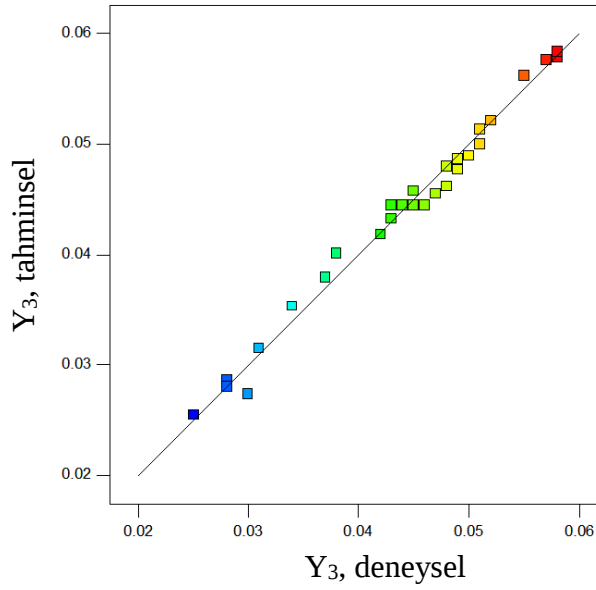
(a)



(b)

Şekil 4.74. Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L)

Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (Y_3); çoklu regresyon yöntemi kullanılarak türetilen Eş. 4.3 ile hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırıldıkları grafik; Şekil 4.75’de verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde; mikroorganizma özgül üreme hızının tahminsel ve deneysel değerlerinin birbirlerine oldukça yakın oldukları tespit edilmiştir. Türetilen model eşitlik (Eş. 4.3) için belirleme katsayısı; $R^2 = 0.987$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan R^2 değerinin 1’e çok yakın olması ise; eşitliğin kullanılması ile elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının; deneysel sonuçlarla oldukça uyumlu olduklarını göstermektedir.



Şekil 4.75. Özgül üreme hızlarının (Y_3); Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.98646x + 0.00059608$; $R^2 = 0.987$)

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH’ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren doğrusal olmayan çok değişkenli regresyon denklemi ise, Eş. 4.4’de sunulmuştur.

$$Y_4 = + 0.055 + 1.208 \times 10^{-3} X_1 - 1.250 \times 10^{-4} X_2 - 9.583 \times 10^{-4} X_3 - 4.458 \times 10^{-3} X_4 - 5.625 \times 10^{-4} X_1 X_2 - 4.375 \times 10^{-4} X_1 X_3 - 1.312 \times 10^{-3} X_1 X_4 - 2.437 \times 10^{-3} X_2 X_3 + 9.375 \times 10^{-4} X_2 X_4 - 1.875 \times 10^{-5} X_3 X_4 - 2.698 \times 10^{-3} X_1^2 - 2.948 \times 10^{-3} X_2^2 - 5.323 \times 10^{-3} X_3^2 - 5.198 \times 10^{-3} X_4^2 \quad (4.4)$$

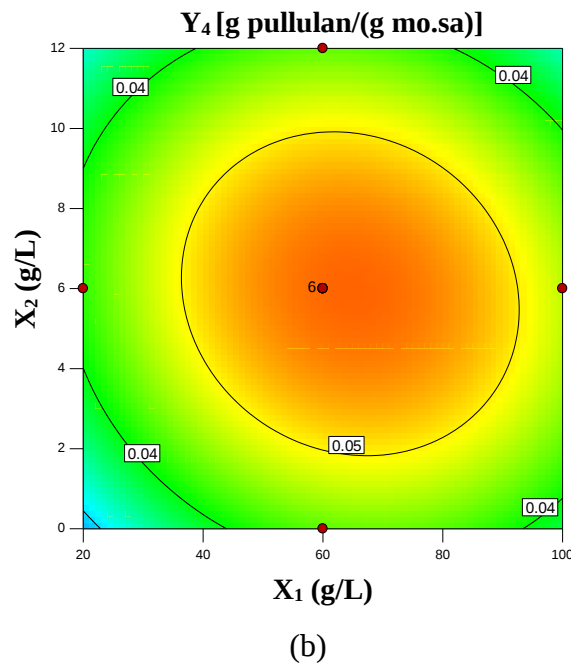
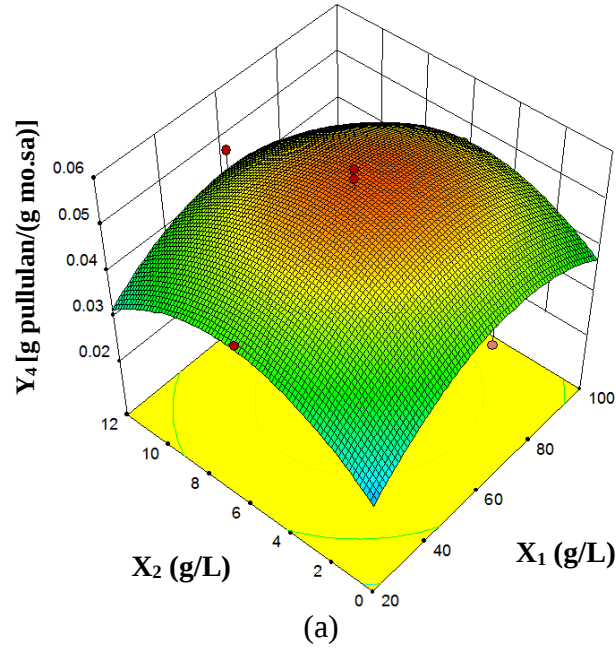
Çoklu regresyon yöntemi kullanılarak elde edilen Eş. 4.4 için R^2 değeri; 0.864 olarak hesaplanmıştır. Korelasyon denkleminin 1'e çok yakın olan R^2 değeri; deneysel Y_4 değerleri ile bu denklem kullanılarak hesaplanan tahminsel Y_4 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. Bu çalışmada; seçilen dört bağımsız değişkenin; maksimum özgül ürün oluşum hızına etkilerini gösteren model eşitliğe (Eş. 4.4) ait varyans analiz sonuçları ise, Çizelge 4.11'de verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre türetilen model eşitliğin; %95 güven düzeyinde önemli ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.11. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); maksimum özgül ürün oluşum hızı (Y_4) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	14	1.518×10^{-4}	6.83**	0.0003
X_1	1	3.504×10^{-5}	1.58	0.2286
X_2	1	3.750×10^{-7}	0.017	0.8984
X_3	1	2.204×10^{-5}	0.99	0.3353
X_4	1	4.770×10^{-4}	21.45**	0.0003
X_1X_2	1	5.063×10^{-6}	0.23	0.6402
X_1X_3	1	3.063×10^{-6}	0.14	0.7158
X_1X_4	1	2.756×10^{-5}	1.24	0.2831
X_2X_3	1	9.506×10^{-4}	4.27	0.0564
X_2X_4	1	1.406×10^{-5}	0.63	0.4389
X_3X_4	1	5.625×10^{-8}	0.025	0.8758
X_1^2	1	1.996×10^{-4}	8.98**	0.0090
X_2^2	1	2.384×10^{-4}	10.72**	0.0051
X_3^2	1	7.771×10^{-4}	34.95**	< 0.0001
X_4^2	1	7.411×10^{-4}	33.32**	< 0.0001
Uyum eksikliği	10	3.007×10^{-5}	4.58	0.0534
Hata	5	6.567×10^{-6}		
Genel	29			

** $p<0.01$, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.76'da verilmiştir.

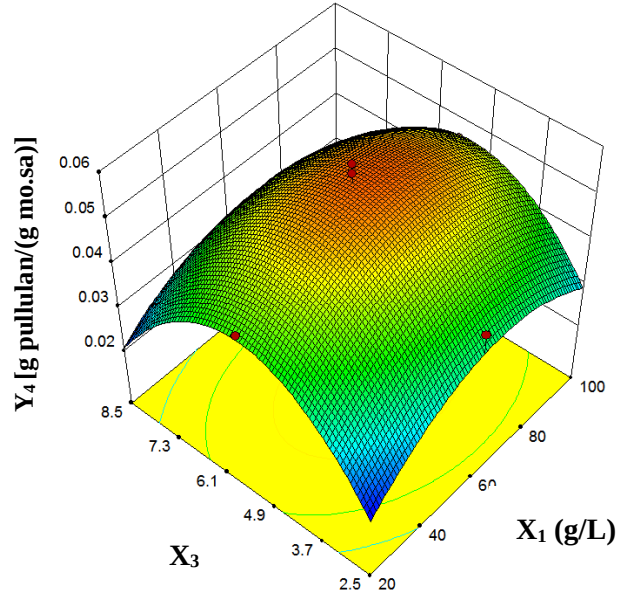


Şekil 4.76. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pepton derişiminin (X_2); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

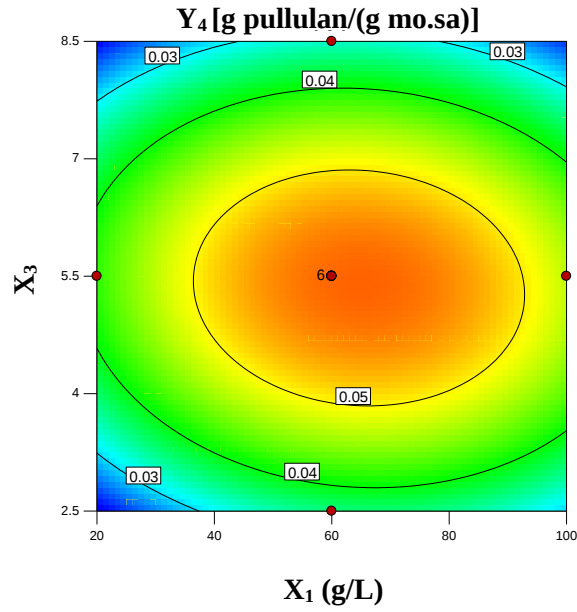
Bu çalışmadaki en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerlerinin; tüm bağımsız değişkenlerin merkez noktalarındaki değerlerinde elde edildikleri tespit edilmiştir (şekil 4.76a).

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pepton derişiminin; maksimum özgül pullulan üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiği (şekil 4.76b) incelendiğinde; 28°C’de, başlangıç pH’ı 5.5; başlangıç sakkaroz derişimi; 60 g/L, başlangıç pepton derişimi ise; 6 g/L olan bir fermantasyon ortamında; merkez noktasındaki koşullarda; pullulan için elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızının; 0.055 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu bulunmuştur. 28°C’de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 65.4 ve 11.5 g/L olduğu durumda, maksimum özgül ürün oluşum hızı; 0.045 [g pullulan/(g mo.sa)] olarak belirlenmiştir. Başlangıç sakkaroz derişimi; 20 g/L olan, başlangıç pepton derişimi ise; 0-3.8 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızlarının ise, 0.040 [g pullulan/(g mo.sa)] değerinden daha düşük oldukları tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ile başlangıç pH’ının (X_3); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) zerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; şekil 4.77’de verilmiştir. şekil 4.77a’daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerlerinin; fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişimi ile başlangıç pH’ının merkez noktasındaki değerlerine yakın olduğu koşullarda elde edildikleri tespit edilmiştir. Fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişimi ile başlangıç pH’ının; en düşük ve en yüksek değerlerinde oldukları koşullarda elde edilen özgül ürün oluşum hızlarının ise en düşük değerlerinde oldukları belirlenmiştir.



(a)



(b)

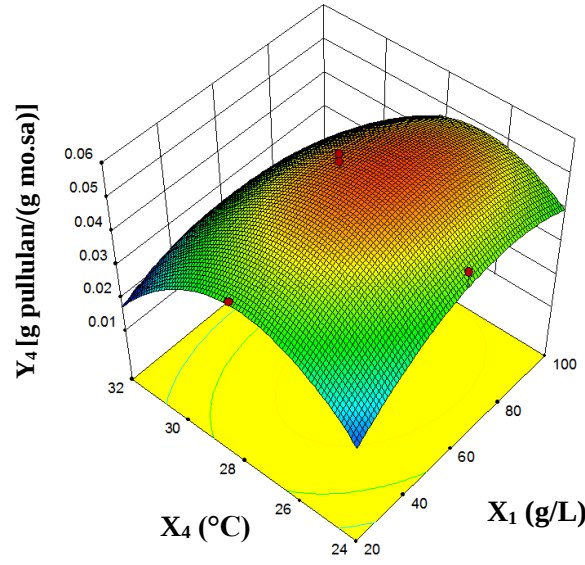
Şekil 4.77. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Şekil 4.77b’de yer alan kontur grafiği incelendiğinde; 28°C’de, başlangıç sakkaroz derişimi; 60 g/L; başlangıç pH’ı; 4.0, başlangıç pepton derişimi ise 6.0 g/L olan bir fermantasyon ortamında pullulan için elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızının, 0.050 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu bulunmuştur. 28°C’de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; 25 g/L ve başlangıç pH’ının ise, 8 olduğu koşullarda pullulan için elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızının ise; 0.029 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu tespit edilmiştir.

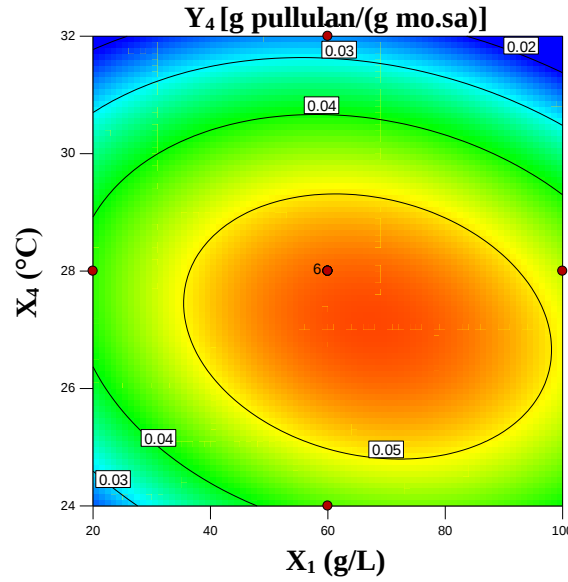
Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül ürün oluşum hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.78’de sunulmuştur.

Şekil 4.78a’daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; düşük sıcaklıklarda, başlangıç sakkaroz derişimi düşük; yüksek sıcaklıklarda ise; başlangıç sakkaroz derişimi yüksek olan fermantasyon ortamlarında elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızlarının, düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca, sabit sıcaklıktaki çalışmalarda; fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişiminin, 20 g/L’den 60 g/L’ye artmasıyla, elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızının arttığı; fermantasyon ortamındaki sakkaroz başlangıç derişiminin 60 g/L’den daha yüksek olduğu çalışmalarda ise, elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızının azaldığı da tespit edilmiştir. 28°C’de, fermantasyon ortamındaki sakkarozun başlangıç derişimindeki değişimin, elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızı değerlerini çok fazla değiştirmedeği; başlangıç sakkaroz derişimi 60 g/L olan fermantasyon ortamlarında ise; elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızlarının, 28°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda oldukça azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.78a).

Şekil 4.78b’deki kontur grafiğindeki değerler incelendiğinde ise; başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri ile pH değerinin; sırasıyla, 20 g/L, 6 g/L ve 5.5; sıcaklığın ise; 28°C olduğu merkez noktadaki fermantasyon koşullarında elde edilen en yüksek özgül pullulan üretim hızı değerinin; 0.042 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu tespit edilmiştir. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; 100 g/L; sıcaklığın ise, 31°C olduğu durumda elde edilen en yüksek özgül pullulan üretim hızı değerinin ise; 0.030 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu bulunmuştur.



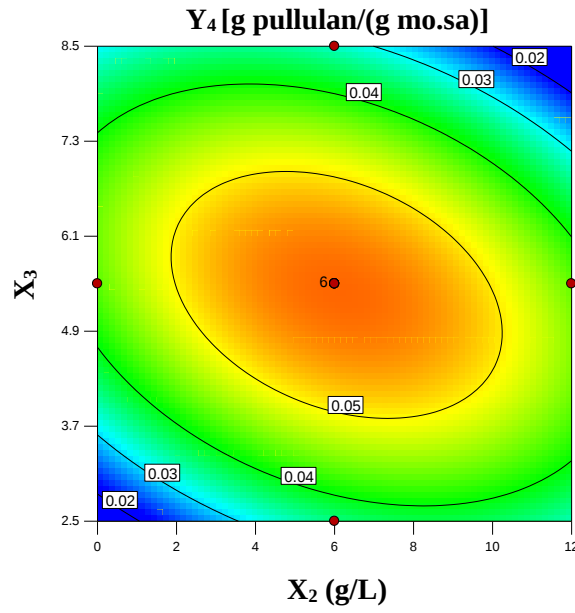
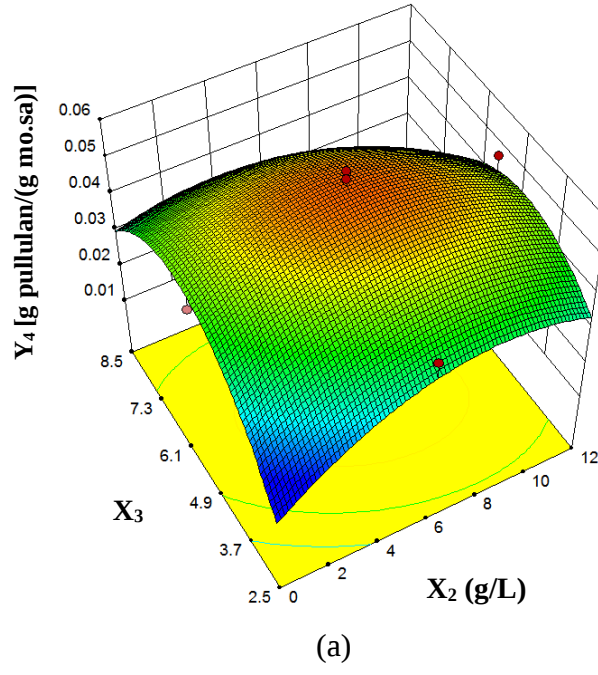
(a)



(b)

Şekil 4.78. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'nın (X_3); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise, Şekil 4.79'da sunulmuştur.



Şekil 4.79. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

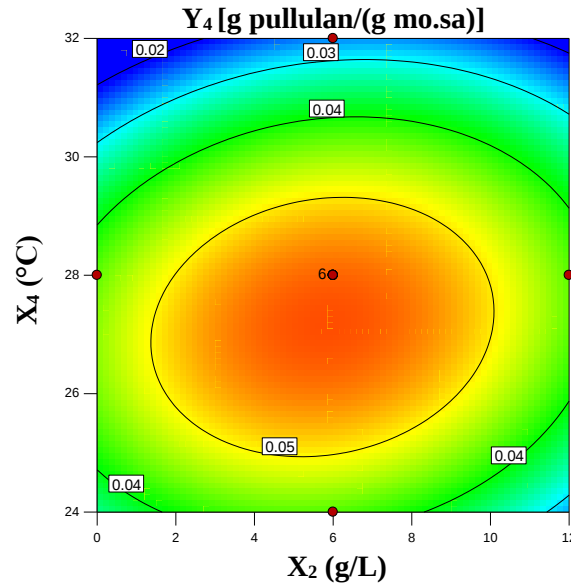
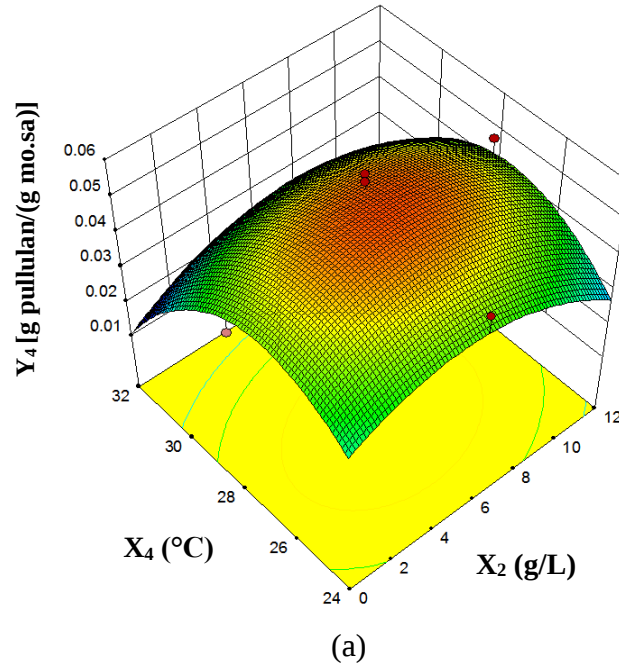
Şekil 4.79a'daki yanıt yüzey grafiğine göre; maksimum özgül ürün oluşum hızı, başlangıç pH'ı 2.5 olan fermantasyon ortamlarında, ortamdaki pepton başlangıç derişiminin, 0

g/L'den 6 g/L'ye artmasıyla artmakta; 6 g/L'den daha yüksek olan pepton başlangıç derişimlerinde ise, çok fazla değişmemektedir. Pepton başlangıç derişimi 12 g/L olan fermantasyon ortamlarında ise, maksimum özgül ürün oluşum hızı, önce ortamın başlangıç pH'ının; 2.5'den 5.5'e artmasıyla artmakta; daha yüksek olan başlangıç pH değerlerinde azalmaktadır. Bu çalışmadaki en yüksek özgül pullulan oluşum hızı değerleri ise, bağımsız değişkenlerin her birinin değerinin merkez noktasındaki değerine yakın olduğu koşullarda elde edilmiştir.

Şekil 4.79b'deki kontur grafiğinden; pepton başlangıç derişimi; 6 g/L; başlangıç pH'ı ise 2.5 olan bir fermantasyon ortamında elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızının; 0.036 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu bulunmuştur. Aynı grafikte, fermantasyon ortamının pepton başlangıç derişiminin 7-12 g/L aralığında değiştii ve başlangıç pH'ının; 8.5 değerinde sabit olduğu koşullarda, pullulan için elde edilen en yüksek özgül ürün oluşum hızının ise; 0.03 [g pullulan/(g mo.sa)]'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.80'de gösterilmiştir. Şekil 4.80a'ya göre; maksimum özgül ürün oluşum hızı, 24°C'de, fermantasyon ortamındaki başlangıç pepton derişiminin; 0 g/L'den 6 g/L'ye artmasıyla artmakta, optimum değerine ulaştıktan sonra; 6 g/L'den daha yüksek olan başlangıç pepton derişimlerinde ise azalmaktadır. Diğer sıcaklıklarda da; 24°C'dekine benzer değişimler gözlenmektedir. Pepton başlangıç derişimi sabit olan fermantasyon ortamlarında ise, maksimum özgül ürün oluşum hızı; önce sıcaklığın, 24°C'den 28°C'ye artmasıyla artmakta ve 28°C'de en yüksek değerine ulaşmakta; daha sonra ise, 28-32°C sıcaklık aralığında; sıcaklık arttıkça azalmaktadır.

Bu çalışmadaki, en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri, bağımsız değişkenlerin değerlerinin merkezdeki değerlerine yakın değerlerde oldukları deney koşullarında elde edilmiştir. Yanıt yüzey grafiğindeki (Şekil 4.80a), en düşük özgül ürün oluşum hızı değerleri ise; 32°C'de, pepton başlangıç derişimi yüksek olan fermantasyon ortamlarında elde edilmiştir.



Şekil 4.80. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$)

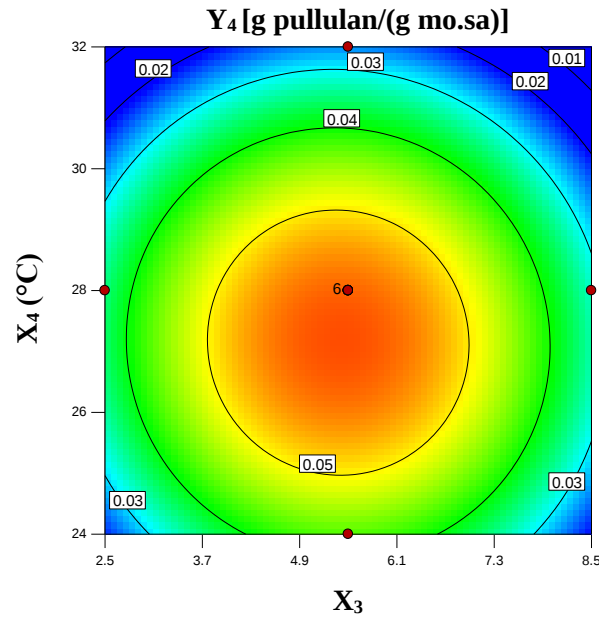
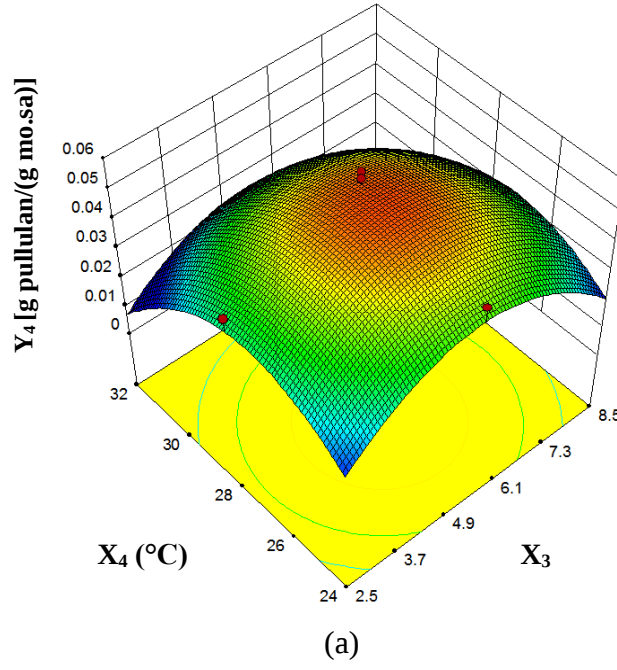
Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi ve sıcaklığın; maksimum özgül pullulan üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğı (Şekil 4.80b) incelendiğinde; 32°C’de, 2.7 g/L pepton başlangıç derişiminde elde edilen en yüksek özgül pullulan üretim hızının; 0.02 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu bulunmuştur. 28°C’de,

fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi 8 g/L olduğunda ise, maksimum özgül pullulan üretim hızının; 0.054 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül ürün oluşum hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.81'de verilmiştir.

Maksimum özgül ürün oluşum hızının, 24°C'de, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının 2.5'den 5.5'e artmasıyla artarak, optimum değerine, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının 5.5 olduğu durumda ulaştığı, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının 5.5'den daha yüksek olduğu koşullarda ise azaldığı bulunmuştur. Maksimum özgül ürün oluşum hızı değerinin; çalışma aralığına giren diğer sıcaklıklarda da, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının 2.5-8.5 aralığında değışmesiyle; 24°C'dekine benzer şekilde değıştikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.81a). Başlangıç pH'ı 2.5 olan fermentasyon ortamında, sıcaklığın artmasıyla maksimum özgül ürün oluşum hızı da artmakta, 28°C'de en yüksek değerine ulaşmakta; daha yüksek sıcaklıklarda ise azalmaktadır. Bu çalışmada incelenen tüm başlangıç pH değerlerinde, sıcaklığın; elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızı değerlerini benzer şekilde etkilediğı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneylerdeki en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri; sıcaklığın, 28°C'ye, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz, pepton ve pH değerlerinin ise, sırasıyla; 60 g/L, 6 g/L ve 5.5'e yakın olduğu koşullarda elde edilmiştir (Şekil 4.81 a).

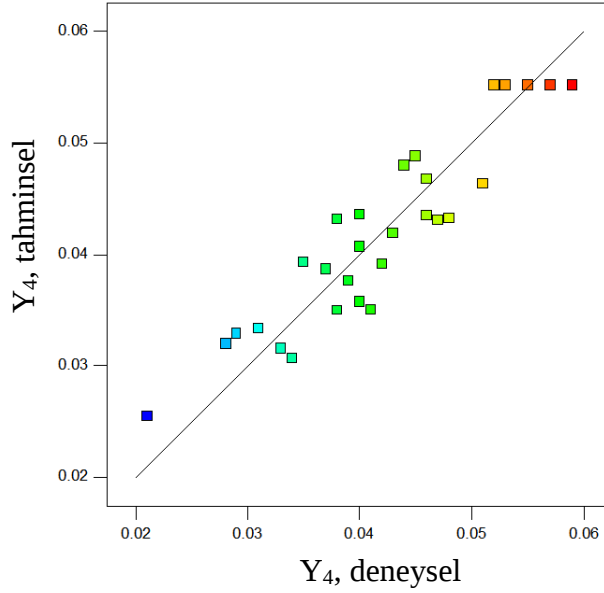
Şekil 4.81b'de yer alan kontur grafiğinde, 28°C'de, fermentasyon ortamının başlangıç pH'ının; 2.5 olduğu durumda elde edilen maksimum özgül ürün oluşum hızının 0.036 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu bulunmuştur. 24.5°C'de, fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin sırasıyla; 60, 6 g/L; pH'ının ise; 4.3 olduğu koşullarda elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızının 0.045 [g pullulan/(g mo.sa)] olduğu tespit edilmiştir. 32°C'de ise; çalışılan tüm başlangıç pH değerlerinde elde edilen maksimum özgül pullulan üretim hızlarının; 0.03 [g pullulan/(g mo.sa)] değerinden daha düşük oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.81. Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L)

Maksimum özgül pullulan üretim hızının (Y_4); merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen 30 deneyde elde edilen deneysel değerleri ile Eş. 4.4 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırıldığı grafik, Şekil 4.82'de gösterilmiştir.

Söz konusu grafikte; elde edilen sonuçların, diagonal doğrusu etrafında saçıldıkları tespit edilmiştir. Türetilen model eşitlik (Eş. 4.4) için belirleme katsayısı ise; $R^2 = 0.864$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.82. Maksimum özgül pullulan üretim hızlarının (Y_4); Eş. 4.4 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.86436x + 0.00573$; $R^2 = 0.864$)

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH değeri (X_3) ile sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden, doğrusal olmayan model denklem ise Eş. 4.5'te gösterilmiştir.

$$Y_5 = + 27.58 - 4.83X_1 + 1.12X_2 + 4.34X_3 - 2.75X_4 + 3.38X_1X_2 - 0.19X_1X_3 - 1.16X_1X_4 - 1.74X_2X_3 - 3.54X_2X_4 + 0.60X_3X_4 + 2.68X_1^2 - 1.73X_2^2 - 2.91X_3^2 - 0.97X_4^2 \quad (4.5)$$

Türetilen model eşitlik için belirleme katsayısı; $R^2 = 0.995$ olarak hesaplanmıştır. Bulunan R^2 değerinin 1'e çok yakın olması; deneysel ve Eş. 4.5'e göre hesaplanan tahminsel Y_5 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. Çok değişkenli regresyon yöntemi kullanılarak türetilen modele ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.12'de sunulmuştur. Varyans analizi sonuçlarına göre modelin %95 güven düzeyinde oldukça önemli ($p < 0.01$) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F değeri	p değeri
Model	14	162.89	225.50**	< 0.0001
X_1	1	558.73	773.51**	< 0.0001
X_2	1	29.93	41.43**	< 0.0001
X_3	1	452.40	626.31**	< 0.0001
X_4	1	181.50	251.27**	< 0.0001
X_1X_2	1	182.25	252.31**	< 0.0001
X_1X_3	1	0.56	0.78	0.3915
X_1X_4	1	21.62	29.93**	< 0.0001
X_2X_3	1	48.30	66.87**	< 0.0001
X_2X_4	1	200.22	277.19**	< 0.0001
X_3X_4	1	5.76	7.97*	0.0128
X_1^2	1	196.88	272.56**	< 0.0001
X_2^2	1	82.41	114.09**	< 0.0001
X_3^2	1	232.00	321.18**	< 0.0001
X_4^2	1	25.85	35.79**	< 0.0001
Uyum eksikliği	10	0.97	4.48	0.0559
Hata	5	0.22		
Genel	29			

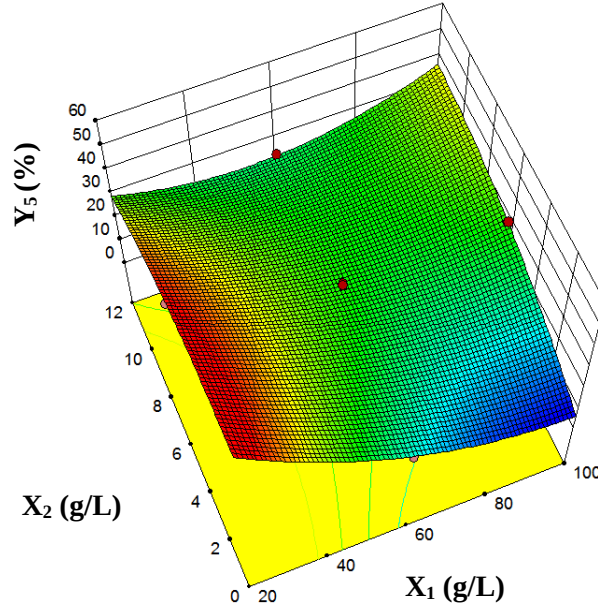
** p<0.01, * p<0.05, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Ayrıca, tüm bağımsız değişkenlerin; pullulan verimi üzerindeki lineer ve karesel etkilerinin oldukça önemli oldukları ($p<0.01$) da belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin ikili etkileşimlerinin pullulan verimi üzerindeki etkileri incelendiğinde ise; yalnızca, fermantasyon ortamının sakkaroz başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının ikili etkisinin önemsiz ($p>0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Bu modele ait uyum eksikliğinin önemsiz ($p>0.05$) olduğu da belirlenmiştir.

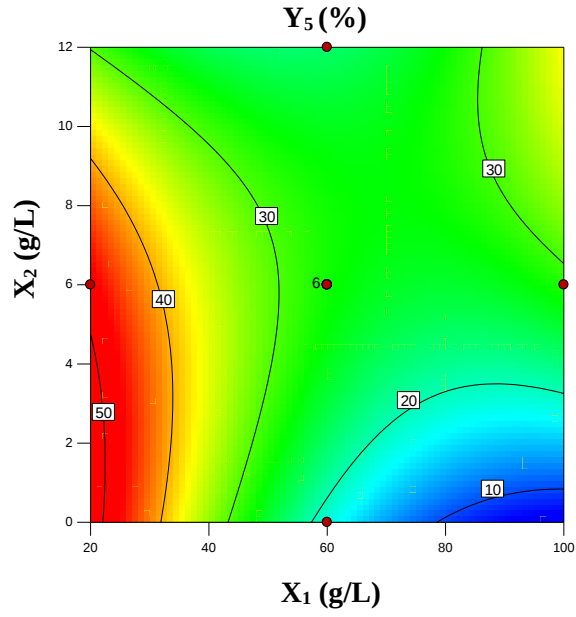
Bu çalışmada incelenen bağımsız değişkenlerin pullulan verimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.83 - Şekil 4.88’de sunulmuştur. Her bir grafik, söz konusu grafik üzerinde yer almayan bağımsız değişkenlerin merkez noktasındaki değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz (X_1) ve başlangıç pepton (X_2) derişimlerinin; pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.83’de verilmiştir. Yanıt yüzey grafiğı (Şekil 4.83a) incelendiğinde; pullulan veriminin; başlangıç sakkaroz derişimi yüksek olan fermantasyon ortamlarında, organik azot kaynağı olarak kullanılan peptonun ortamdaki başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı; başlangıç sakkaroz derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında ise, ortamdaki peptonun başlangıç derişimindeki değişimlerden çok fazla etkilenmediğı bulunmuştur.

Şekil 4.83b’deki kontur grafiğı incelendiğinde; fermantasyon ortamındaki başlangıç sakkaroz derişiminin 20 g/L değerinde sabit olduğı; başlangıç pepton derişiminin ise; 0-4.4 g/L aralığında değıştiğı koşullarda, elde edilen pullulan verim yüzdesinin, %50’den daha fazla olduğı tespit edilmiştir. Ayrıca, 28°C’de başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 26 ve 5 g/L olduğunda; pullulan veriminin %45 olduğunda belirlenmiştir. Başlangıç pepton derişiminin; 0-3 g/L aralığında değıştiğı; başlangıç sakkaroz derişiminin ise; 100 g/L değerinde sabit olduğunda fermantasyon koşullarında elde edilen pullulan veriminin ise; %20’den daha az olduğunda bulunmuştur.



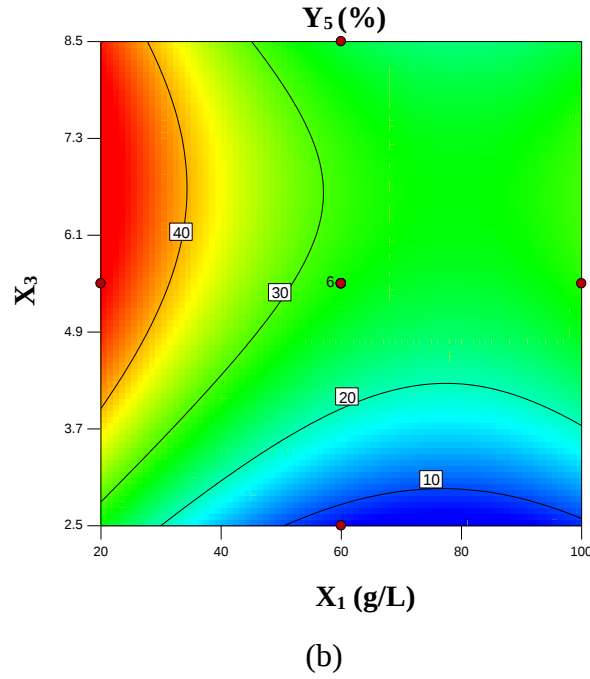
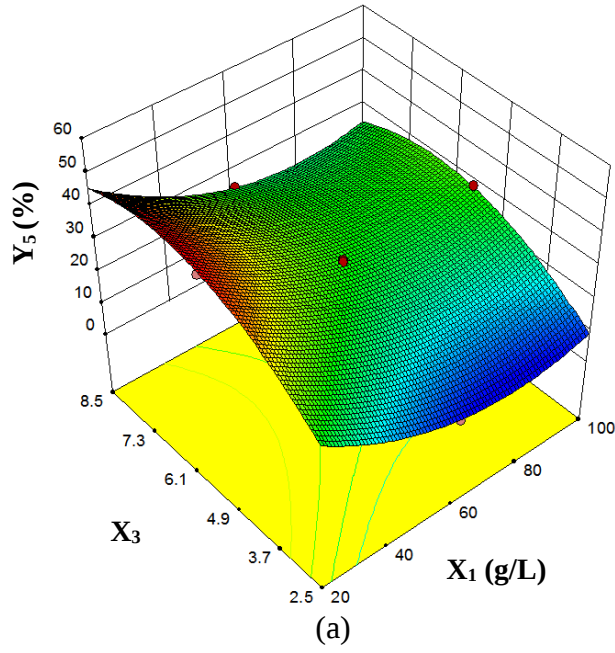
(a)



(b)

Şekil 4.83. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pepton derişiminin (X_2); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_3 = 5.5$, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'ının (X_3); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.84'de sunulmuştur.



Şekil 4.84. Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve başlangıç pH'nın (X_3); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Şekil 4.84'deki yanıt yüzey grafiğinden de görülebileceği gibi; başlangıç sakkaroz derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında; ortamın başlangıç pH değerinin artmasıyla, pullulan verimi de artmakta ve yüksek değerlere ulaşmaktadır. Başlangıç pH

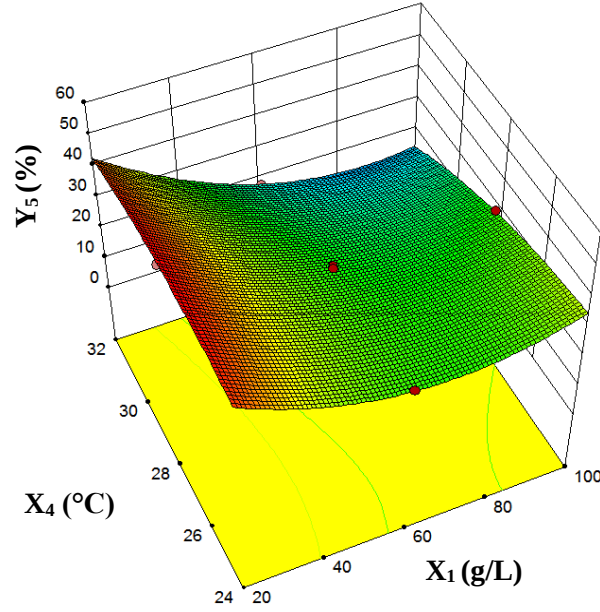
değeri yüksek olan fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan verimi ise, ortamdaki başlangıç sakkaroz derişiminin artmasıyla azalmaktadır. Bu çalışmada; pullulan için en yüksek verim değerlerinin; başlangıç sakkaroz derişimi düşük; başlangıç pH değeri ise yüksek olan fermantasyon ortamlarında elde edildiğı tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve başlangıç pH'ının; pullulan verimi üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğı (Şekil 4.84b) incelendiğinde; başlangıç sakkaroz derişimi 20 g/L olan; başlangıç pH'ı ise; 4.0-8.5 aralığında değışen fermantasyon ortamlarında, elde edilen pullulan veriminin; %40'ın üzerinde olduğı bulunmuştur. 28°C'de, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin 27 g/L ve pH'ının 6.7 olduğı koşullarda ise, pullulan veriminin; yaklaşık %45 olduğı belirlenmiştir. Aynı grafikten ayrıca, başlangıç sakkaroz derişimi 80 g/L olan; başlangıç pH'ı ise; 2.5-3.0 aralığında değışen fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan veriminin de, %10'un altında olduğı tespit edilmiştir.

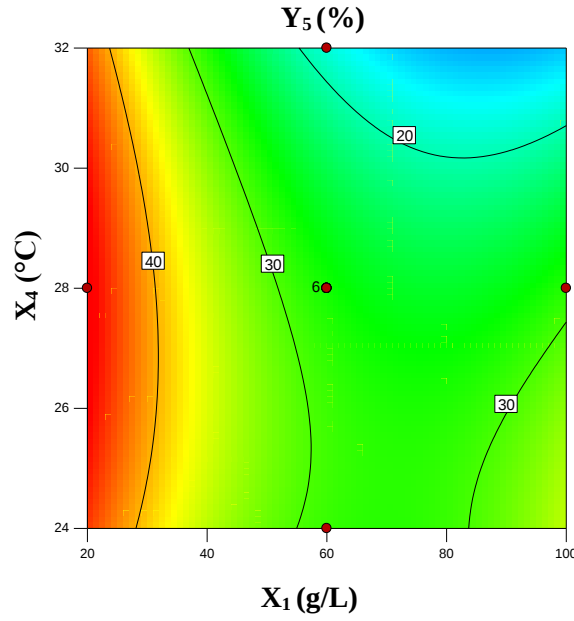
Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.85'de gösterilmiştir. Sakkarozun başlangıç derişiminin düşük olduğı fermantasyon ortamlarında, 24-32°C aralığında, sıcaklıktaki artışın pullulan verimini çok fazla değıştirmediği; sakkarozun başlangıç derişiminin yüksek olduğı ortamlarda ise, pullulan veriminin sıcaklığın artmasıyla azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, sakkaroz başlangıç derişiminin; 20-30.3 g/L aralığında değıştiğı fermantasyon ortamlarında; incelenen tüm sıcaklıklardaki (24-32°C) pullulan veriminin de yüksek olduğı belirlenmiştir (Şekil 4.85a).

İncelenen tüm sıcaklıklarda, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; 20-23.6 g/L arasında değıştiğı koşullarda elde edilen pullulan veriminin; %40'dan daha fazla olduğı bulunmuştur (Şekil 4.85b). Fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi ve sıcaklığın pullulan verimi üzerindeki etkilerini gösteren kontur grafiğinde ayrıca, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri sırasıyla; 80 ve 6 g/L ve başlangıç pH'ı; 5.5 olan fermantasyon ortamlarında; sıcaklığın; 30-32°C aralığında değıştiğı işletme koşullarında elde edilen pullulan veriminin de %20'den daha az olduğı tespit edilmiştir. 31°C 'de

fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin 85 g/L olduğu durumda ise; pullulan veriminin yaklaşık %16 olduğu belirlenmiştir.



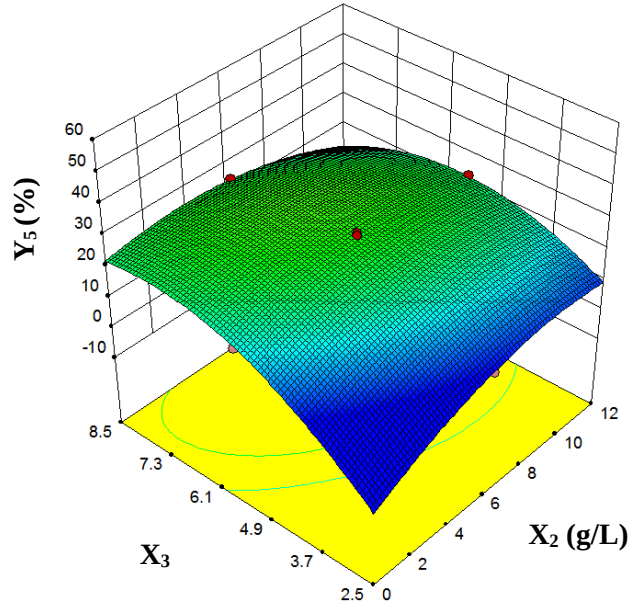
(a)



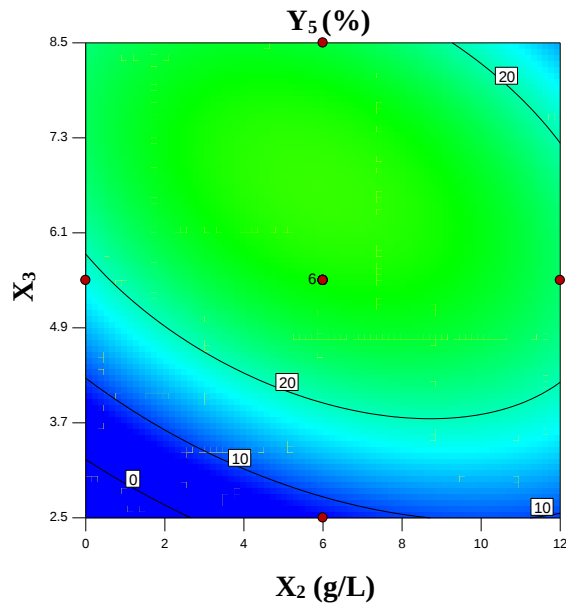
(b)

Şekil 4.85. Fermentasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X_1) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_2 = 6$ g/L, $X_3 = 5.5$)

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.86'da verilmiştir.



(a)



(b)

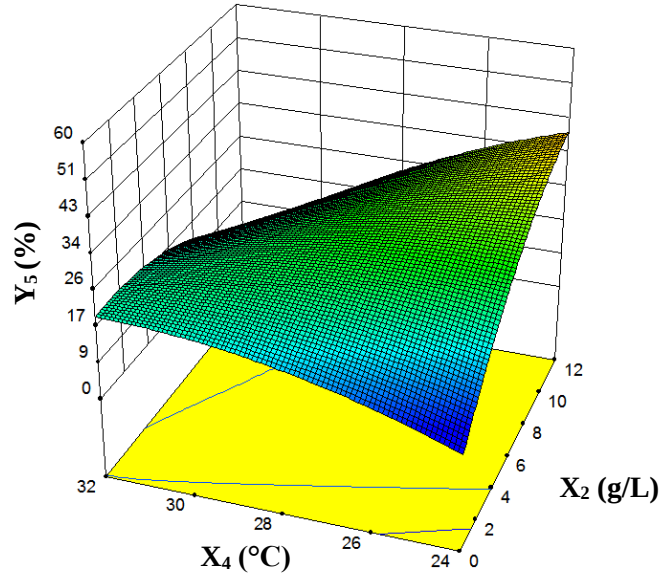
Şekil 4.86. Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ının (X_3); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_4 = 28^\circ\text{C}$)

Pullulan veriminin; pepton içermeyen fermantasyon ortamlarında, ortamın başlangıç pH değerinin artmasıyla arttığı bulunmuştur (Şekil 4.86a). Yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; elde edilen pullulan veriminin; başlangıç pH'ı 2.5 olan fermantasyon ortamlarında, ortamdaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla arttığı, başlangıç pH'ı 8.5 olan fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan veriminin ise, 0-6 g/L başlangıç pepton derişim aralığında değişmeyerek daha yüksek başlangıç pepton derişim değerlerinde (6-12 g/L) azaldığı bulunmuştur. Yanıt yüzey grafiğindeki sonuçlar, başlangıç pepton derişimi düşük olan fermantasyon ortamlarında, başlangıç pH'ının yüksek olduğu koşullarda pullulan için yüksek verim değerlerinin elde edildiğini göstermektedir.

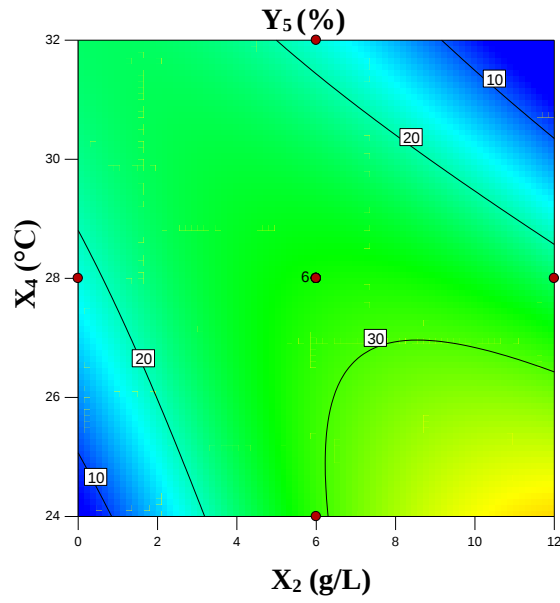
Bu çalışmadaki kontur grafiği incelendiğinde ise; fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin; 0-9 g/L, başlangıç pH'ının ise 5.8-7.0 aralığında değiştiği fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan veriminin, %20'nin üzerinde olduğu bulunmuştur (Şekil 4.86b). Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin 12 g/L değerinde sabit olduğu durumda, ortamın başlangıç pH'ının 7.3-8.5 aralığında değiştiği koşullarda elde edilen pullulan verimi yüzdesinin ise; %20'nin altında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin, 2 g/L ve pH'ının ise, 3 olduğu durumda elde edilen pullulan veriminin yaklaşık %4 olduğu da tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.87'de gösterilmiştir. Yanıt yüzey grafiğindeki (Şekil 4.87a) değerler incelendiğinde, 24°C'de, fermantasyon ortamındaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla pullulan veriminin de arttığı bulunmuştur. 32°C'de ise; fermantasyon ortamındaki peptonun başlangıç derişiminin artmasıyla; elde edilen pullulan veriminin başlangıç pepton derişimi 0-4 g/L aralığında değişen ortamlarda değişmediği; başlangıç pepton derişimi; 4-12 g/L aralığında değişen ortamlarda ise azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, pullulan veriminin; sıcaklığın artmasıyla, 12 g/L başlangıç derişiminde pepton içeren fermantasyon ortamlarında azaldığı; pepton içermeyen fermantasyon ortamlarında ise arttığı da tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda, başlangıç pepton derişimi yüksek olan

fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan veriminin çok düşük olduğu bulunmuştur.



(a)



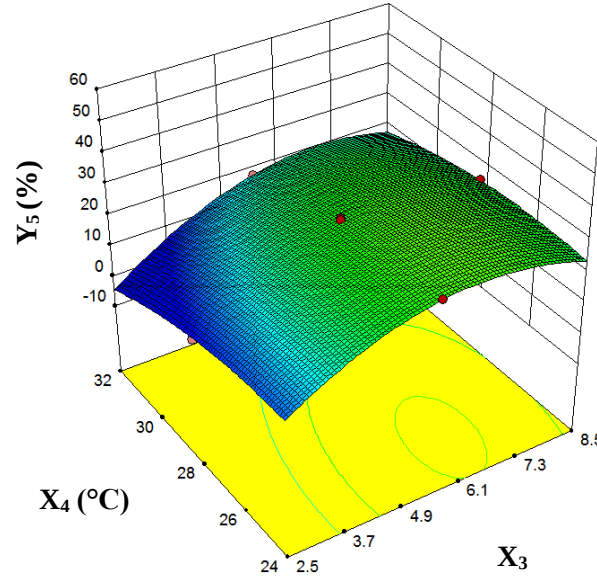
(b)

Şekil 4.87. Fermentasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X_2) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_3 = 5.5$)

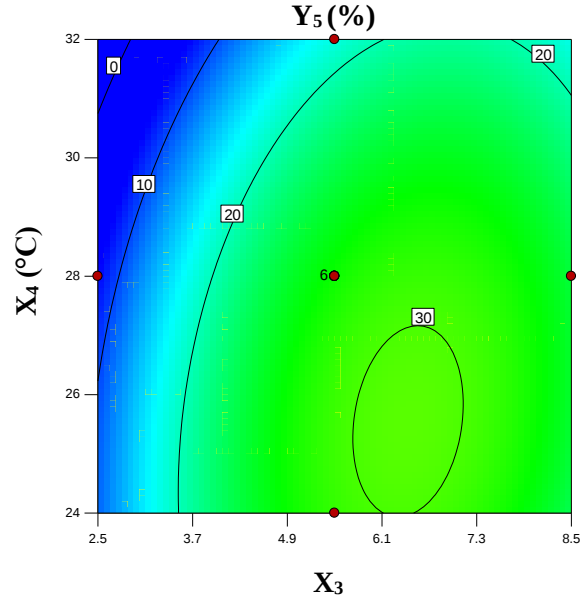
Şekil 4.87b'deki kontur grafiği incelendiğinde ise; pepton başlangıç derişimi; 6.5-12 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında, sıcaklığın; 24-25.5°C aralığında değiştii koşullarda elde edilen pullulan veriminin, %30'dan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 32°C'de, başlangıç sakkaroz derişimi ve pH'ı sırasıyla; 60 g/L ve 5.5 olan, pepton başlangıç derişimi ise; 5-12 g/L aralığında değişen fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan veriminin ise; %20'den daha düşük olduğu bulunmuştur. 31°C'de ise, fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişiminin; 11 g/L olduğu durumda pullulan veriminin; %7 olduğu belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X₃) ve sıcaklığın (X₄); pullulan verimi (Y₅) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise Şekil 4.88'de verilmiştir. Yanıt yüzey grafiğindeki (Şekil 4.88a) değerler incelendiğinde, bu çalışma için seçilen tüm fermantasyon ortamı başlangıç pH değerlerinde elde edilen pullulan verimlerinin; sıcaklıkla çok fazla değişmedikleri bulunmuştur. Ayrıca, incelenen çalışma aralığına giren tüm sıcaklık değerlerinde, elde edilen pullulan verimlerinin; 2.5-5.5 başlangıç pH aralığında, fermantasyon ortamının, başlangıç pH'ının artmasıyla arttığı ve en yüksek değerlerine başlangıç pH'ı 5.5 olan ortamlarda ulaşarak; 5.5-8.5 başlangıç pH aralığında ise fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının artmasıyla azaldıkları da belirlenmiştir.

Şekil 4.88b'de yer alan kontur grafiğindeki değerler incelendiğinde ise; çalışılan aralıktaki tüm fermantasyon sıcaklıklarında, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının; 2.5-3.5 aralığında değiştii koşullarda elde edilen pullulan veriminin %20'nin altında olduğu bulunmuştur. Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ının; 5.8 ve sıcaklığın; 26°C olduğu koşullarda elde edilen pullulan veriminin ise, %30 olduğu tespit edilmiştir.



(a)

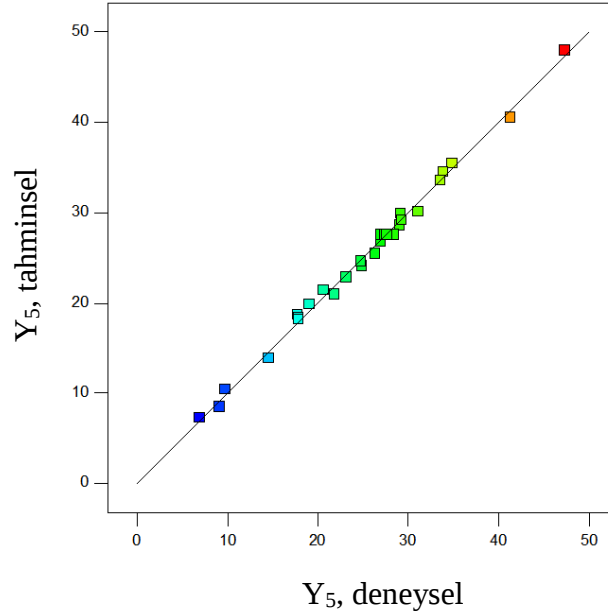


(b)

Şekil 4.88. Fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X_3) ve sıcaklığın (X_4); pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ($X_1 = 60$ g/L, $X_2 = 6$ g/L)

Pullulan verimlerinin (Y_5); deneysel değerleri ile Eş. 4.5 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerin karşılaştırıldıkları grafik; Şekil 4.89'da gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde; tahminsel ve deneysel Y_5 değerlerinin; diagonal doğrusu üzerinde yer aldıkları tespit edilmiştir.

Söz konusu grafik için belirleme katsayısı; $R^2 = 0.995$ olarak hesaplanmıştır. R^2 değerinin 1'e çok yakın olması; model eşitlik kullanılarak hesaplanan Y_5 değerleri ile uyumunun oldukça yüksek olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.89. Pullulan veriminin (Y_5); Eş. 4.5 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri ile deneysel değerlerinin karşılaştırılması ($y = 0.99527x + 0.11934$; $R^2 = 0.995$)

4.6. A. pullulans AZ-6 Suşu ile Pullulan Üretiminin Optimizasyonu

Bu çalışmada; bağımsız değişkenler olarak seçilen; fermantasyon ortamı başlangıç sakkaroz derişimi (X_1), başlangıç pepton derişimi (X_2) ve başlangıç pH'ı (X_3) ile sıcaklığın (X_4); bağımlı değişkenler olarak belirlenen; maksimum EPS derişimi (Y_1), maksimum pullulan derişimi (Y_2), mikroorganizmanın özgül üreme hızı (Y_3), maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y_4) ve pullulan verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlikler türetildikten sonra, tüm değişkenlerin; optimum değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla; Design Expert 10.0.2 (Inc. Minneapolis, USA) programının deneme sürümü kullanılarak, bir nümerik optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, optimizasyon işleminden önce; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak tüm

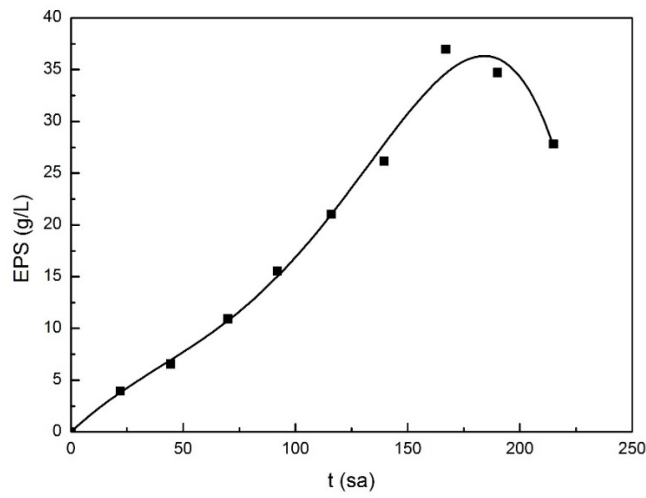
yanıtlar için istenilen hedefler belirlenmiştir (bkz. Bölüm 3.2.15, Çizelge 3.6). Bu işlem sonucunda ise; program tarafından 100 farklı çözüm önerilmiştir.

Optimizasyon çalışmasında kullanılan bağımsız ve bağımlı değişkenler için öngörülen hedefler ve bu hedeflere ulaşılabilmesi için kullanılan kısıtlar ile optimizasyon işlemi sonucunda elde edilen 100 farklı çözüm, Ek 5'deki Çizelge Ek 5.1'de sunulmuştur. Elde edilen her bir çözüm için bağımlı ve bağımsız değişkenlerin değerleri ve program tarafından hesaplanan istenilen hedefe ulaşma değerleri de aynı çizelgede verilmiştir. İstenilen hedefe ulaşma değerlerinin; 0.398-0.977 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Bulunan çözümler incelendiğinde; istenilen hedefe ulaşma değerlerinin; 0.977 olarak hesaplandığı çözüm için, fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişiminin; 100 g/L, başlangıç pepton derişiminin; 11.305 g/L, başlangıç pH'nın; 6.481; sıcaklığın ise, 24.2°C olduğu belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmasındaki bağımsız değişkenler için hesaplanan söz konusu değerler ise; pullulan üretimi sırasında kullanılacak olan optimum koşullar olarak seçilmiştir. Optimizasyon işleminde; bu koşullar kullanılarak elde edilecek olan maksimum EPS ve pullulan derişimlerinin; sırasıyla, 37.078 ve 35.372 g/L, özgül üreme hızının; 0.062 sa⁻¹, maksimum özgül pullulan üretim hızının; 0.021 [g pullulan/(g mo.sa)]; pullulan veriminin ise, %53.681 olacağı bulunmuştur. Başlangıç sakkaroz ve pepton derişimlerinin istenilen hedefe ulaşma değerine etkilerini gösteren bir örnek grafik ise, Ek 6'daki Şekil EK 6.1'de sunulmuştur.

Bu çalışmada daha sonra; dört bağımsız değişkenin optimizasyon işlemi ile belirlenen optimum değerlerinin kullanıldığı fermantasyon koşullarında; iki paralel deney gerçekleştirilmiştir. Söz konusu deneyler; sakkaroz başlangıç derişimi; 100 g/L; pepton başlangıç derişimi; 11.305 g/L ve diğer bileşenleri ile bunların başlangıç derişimleri; ana fermantasyon ortamındakiler ile aynı; başlangıç pH'ı ise; 6.481 olan bir fermantasyon ortamında, 24.2°C'de, 100 vuru/dak karıştırma hızında, kesikli çalışan çalkalamalı su banyolarında, erlenler içerisinde, 150 mL çalışma hacmi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamına inoküle edilecek *A. pullulans* AZ-6 suşu; bileşimi daha önce verilen kültür ortamı kullanılarak, çalkalamalı bir su banyosunda, 28°C'de, 48 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır. Söz konusu deneylerde kullanılan, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç aşılama derişimi; 9.3x10⁷ kob/mL olarak belirlenmiştir.

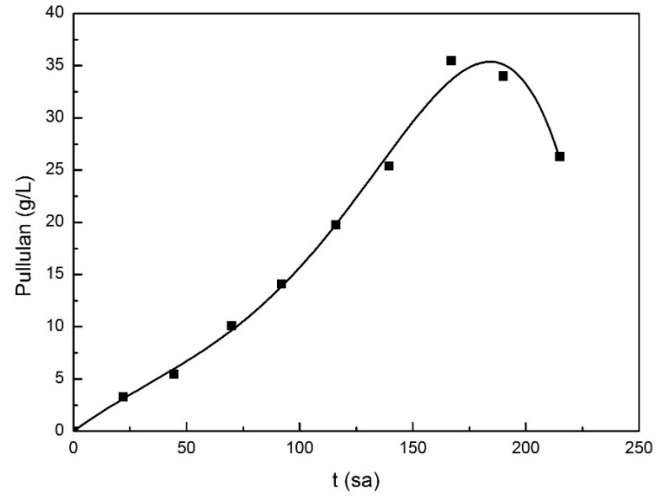
Her bir deney sonucunda elde edilen değerlerin ortalamaları hesaplanmış ve optimum koşullarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS ve pullulan derişimleri ile biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir.

Optimum koşullarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişiminin zamanla değişimi; şekil 4.90'da sunulmuştur. Bu grafikler incelendiğinde; ortamdaki EPS derişiminin; zamanla artarak fermantasyonun 167. saatinde en yüksek değerine ulaştığı, daha sonra ise, bir miktar azaldığı belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen en yüksek EPS derişimi ise; 36.95 g/L olarak tayin edilmiştir.



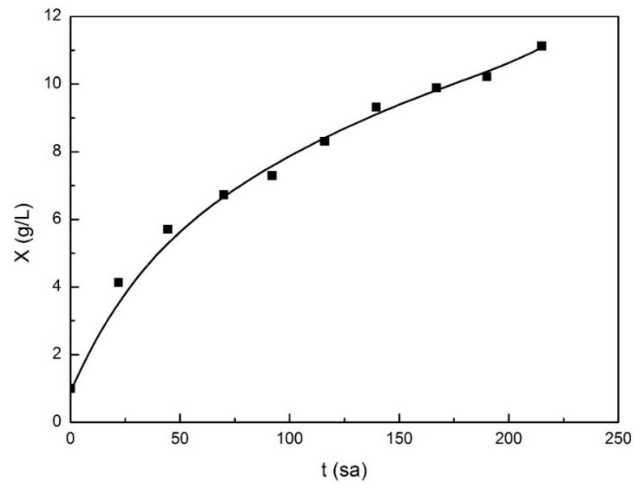
şekil 4.90. Optimum alışma koşullarında; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişiminin zamanla değişimi

Optimum alışma koşullarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişiminin zamanla değişimi ise; şekil 4.91'de verilmiştir. Bu çalışmadaki en yüksek pullulan derişimi; fermantasyonun 167. saatinde, 35.47 g/L olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.91. Optimum çalışma koşullarında; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişiminin zamanla değişimi

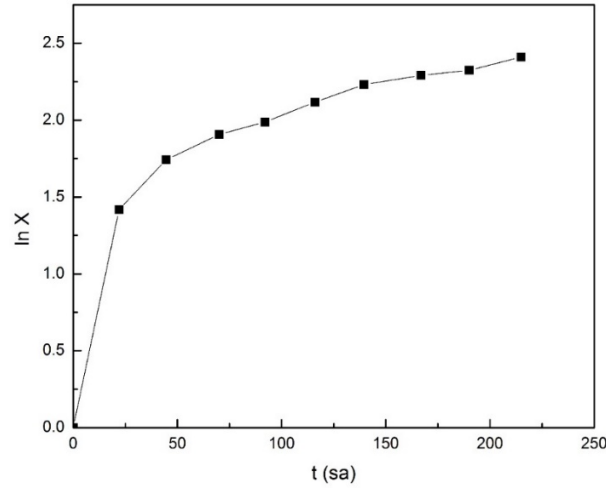
Optimum koşullarda elde edilen biyokütle derişiminin zamanla değişimi ise, Şekil 4.92'de gösterilmiştir. Bu grafikteki değerler incelendiğinde; biyokütle derişiminin zamanla artarak; fermantasyonun sonunda, 11.13 g/L değerine ulaştığı belirlenmiştir.



Şekil 4.92. Optimum çalışma koşullarında biyokütle derişiminin zamanla değişimi

Bu çalışmada ayrıca, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, optimum fermantasyon koşullarındaki özgül üreme hızı da hesaplanmıştır. Bu amaçla; $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimini gösteren bir grafik (Şekil 4.93) çizilmiş ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızı hesaplanmıştır.

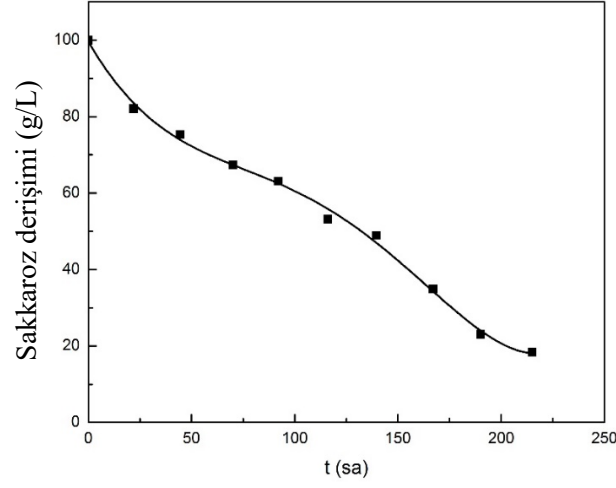
Optimum koşullarda, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı, μ , 0.064 sa⁻¹ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.93. Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu için ln X değerlerinin zamanla değişimi

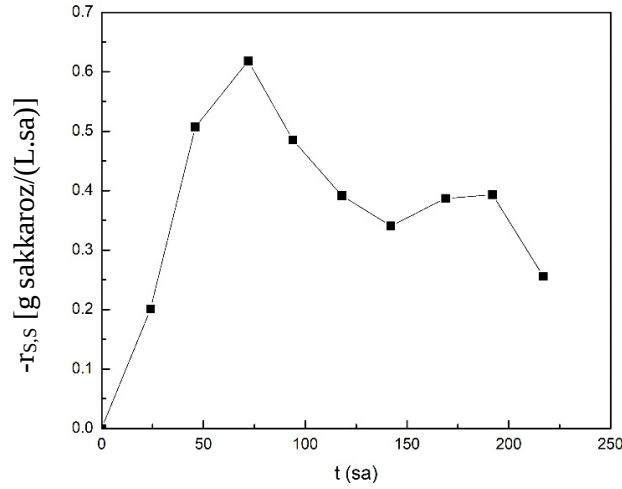
Bu çalışmada ek olarak, optimum koşullarda; pullulan üretimi ile ilgili maksimum özgül ürün oluşum hızı da hesaplanmıştır. Bu amaçla, pullulan derişiminin zamanla değişimini gösteren grafikte (Şekil 4.91), farklı zamanlara karşı gelen eğim değerleri hesaplanmış ve bulunan değerler, Şekil 4.92’de yer alan grafikteki aynı zamanlara karşı gelen biyokütle derişimlerine bölünerek özgül ürün oluşum hızları hesaplanmış; daha sonra ise en yüksek özgül ürün oluşum hızı değeri belirlenmiştir. Optimum koşullardaki maksimum özgül ürün oluşum hızı değeri, μ_m , 0.036 g pullulan/(g mo.sa) olarak fermentasyonun 22. saatinde elde edilmiştir.

Optimum koşullarda, fermentasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değişimi Şekil 4.94’de; sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimi ise, Şekil 4.95’de gösterilmiştir.



Şekil 4.94. Optimum çalışma koşullarında; fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değişimi

Şekil 4.94'deki sonuçlar incelendiğinde; optimum koşullarda gerçekleştirilen bu çalışmada, fermantasyon işleminin sonunda, ortamda bir miktar sakkarozun tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.95 incelendiğinde ise, en yüksek sakkaroz tüketim hızının 0.62 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 72. saatinde elde edildiği bulunmuştur.



Şekil 4.95. Optimum çalışma koşullarında; *A. pullulans* AZ-6 suşunun sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimi

Bu çalışma için pullulan verimi de hesaplanmıştır. Yukarıda belirtilen deney koşullarında gerçekleştirilen fermantasyon işlemindeki pullulan verimi; %54.485 olarak bulunmuştur.

Bağımlı değişkenlerin; bu çalışma sonucunda elde edilen deneysel değerleri ile Eş. 4.1-4.5 kullanılarak hesaplanan teorik değerleri; Çizelge 4.13’de sunulmuş ve elde edilen sonuçlar; Design Expert 10.0.2 (Inc. Minneapolis, USA) programında yer alan ileri analiz (post analysis) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaç için ilk olarak; tüm bağımlı değişkenlerin; optimizasyon programı kullanılarak %95 güven düzeyinde, daha önce türetilmiş olan model eşitliklerinden (Eş. 4.1-4.5), yukarıda belirtilen deney koşullarındaki minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmadaki bağımlı değişkenlerin; optimizasyon programının doğrulama menüsü kullanılarak elde edilen minimum ve maksimum değerleri ile deneysel ve teorik değerleri karşılaştırmalı olarak, Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13’deki sonuçlar incelendiğinde, bağımlı değişkenlerin deneysel değerlerinin teorik değerlerine çok yakın oldukları ve bu değerlerin bilgisayar programı ile hesaplanan en yüksek ve en düşük değerler arasında oldukları belirlenmiştir.

Ayrıca bağımlı değişkenlerin deneysel değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde oldukları da bulunmuş ve Design Expert® 10.0.2 (Stat-ease Inc., Minneapolis, ABD) programının doğrulama menüsü yardımıyla da, belirlenen optimum koşulların, %95 güven düzeyinde oldukları da doğrulanmıştır.

Çizelge 4.13. Bağımlı değişkenlerin, deneysel değerleri, optimizasyon programı kullanılarak hesaplanan teorik değerleri ve optimum değerleri

Bağımlı değişken	Simge	Deneysel değer	Teorik değer	Minimum değer	Maksimum değer
Maksimum EPS derişimi (g/L)	Y ₁	36.950	37.078	35.720	38.440
Maksimum pullulan derişimi (g/L)	Y ₂	35.470	35.372	33.320	37.420
Mikroorganizmanın özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	Y ₃	0.064	0.062	0.055	0.069
Maksimum özgül pullulan üretim hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	Y ₄	0.036	0.021	-0.00198	0.044
Pullulan verimi (%)	Y ₅	54.480	53.681	49.600	57.890

Choudhury ve arkadaşları [78] tarafından, Hindistan'da yapılan bir araştırmada; fermantasyon ortamı bileşiminin; *A. pullulans* RBF 4A3 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, incelendiği belirtilmiştir. Bu çalışmada; seçilen bağımsız değişkenler; fermantasyon ortamının glukoz derişimi (X_1), maya özütü derişimi (X_2) ve pepton derişimi (X_3) olarak ifade edilmiştir. Söz konusu araştırmada, deney tasarım planının; merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak, her bir bağımsız değişken için beş düzeyde, merkezde 6 tekrarlı olacak şekilde yapıldığı rapor edilmiştir. Çalışmada, tasarım planında yer alan 20 deney gerçekleştirildikten sonra, seçilen bağımsız değişkenlerin pullulan derişimine etkilerini gösteren bir model eşitliğin de türetildiği ve bu eşitliğin ikinci dereceden olduğu; R^2 değerinin ise, 0.9909 olarak hesaplandığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada; *A. pullulans* RBF 4A3 suşu ile pullulan üretimi için belirlenen optimum deney koşullarının; glukoz, maya özütü ve pepton derişimleri için, sırasıyla %15.5, %3.68 ve %1.75 olduğu ve bu koşullarda elde edilen pullulan derişiminin ise, 70.43 g/L olduğu belirtilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ise; *A. pullulans* DSM-2404 ile havalandırmalı bir reaktörde pullulan üretimi üzerine, fermantasyon ortamının başlangıç substrat derişimi (X_1), havalandırma hızı (X_2) ve inkübasyon süresinin (X_3) etkilerinin yanıt yüzey yöntemi ile incelendiği belirtilmiştir. Araştırmada, her bir bağımsız değişkenin; 3 düzeyde incelendiği ve yapılan deney tasarımı sonucunda belirlenen 20 deneyin gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Deneylerden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak varyans analizinin yapıldığı ve elde edilen model eşitliğin ikinci dereceden bir polinom olduğu; R^2 değerinin ise; 0.993 olarak belirlendiği belirtilmiştir. Çalışmanın daha sonraki aşamasında, yanıt yüzey yöntemi ile belirlenen optimum koşulların; başlangıç substrat derişimi; 95.2 g/L, havalandırma hızı; 1.93 vvm ve inkübasyon süresi; 5.36 gün olarak belirlendikleri, bu koşullarda elde edilecek pullulan derişiminin ise, 38.7 g/L olarak öngörüldüğü rapor edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca; optimum koşullarda bir deneyin daha yapıldığı ve bu deneyde elde edilen pullulan derişiminin ise, 39.2 g/L olduğu da ifade edilmiştir [146].

Padmanaban ve arkadaşları [138] tarafından yapılan bir diğer araştırmada ise, substrat olarak kurutulmuş tatlı patates ununun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* MTCC 2195 suşu ile EPS üretiminin optimizasyonunun hedeflendiği ifade

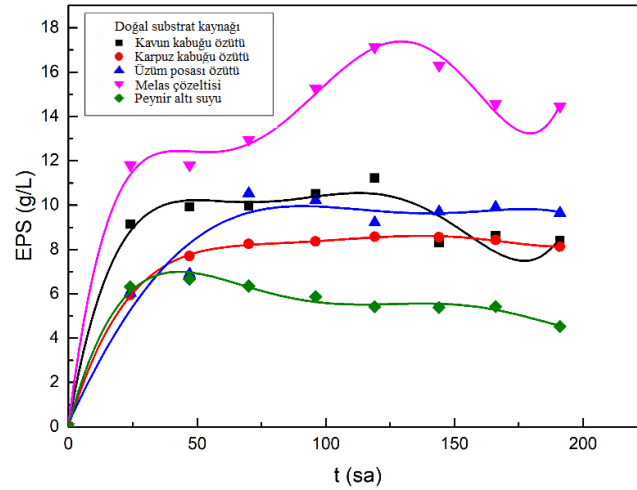
edilmiştir. Bu çalışmada ilk olarak; EPS üretimine etki eden fermantasyon ortamı bileşenlerinin ve bunların derişimlerinin belirlenebilmesi amacı ile Plackett-Burman tasarımının kullanıldığı belirtilmiştir. Söz konusu araştırmada, bağımsız değişken olarak tatlı patates unu (X_1), maya özütü (X_2), NH_4SO_4 (X_3), NaNO_3 (X_4), NaCl (X_5), KH_2PO_4 (X_6) ve MgSO_4 (X_7) derişimlerinin seçildiği rapor edilmiştir. Deney tasarım planına göre gerçekleştirilen deneylerden sonra, yüksek derişimdeki tatlı patates unu ve maya özütünün *A. pullulans* MTCC 2195 suşu ile EPS üretimini arttırdığının belirlendiği bildirilmiştir. Anılan çalışmada daha sonra; *A. pullulans* MTCC 2195 suşu ile EPS üretimi amacıyla fermantasyon koşullarının optimizasyonu için, merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak 31 deneyden oluşan bir deney tasarımının yapıldığı belirtilmiştir. Optimizasyonda bağımsız değişkenler olarak; tatlı patates unu derişimi (X_1), maya özütü derişimi (X_2), pH (X_3) ve fermantasyon süresinin (X_4) seçildiği rapor edilmiştir. Tasarıma uygun olarak gerçekleştirilen deneylerden sonra yapılan regresyon analizinin ardından, belirleme katsayısı (R^2); 0.979 olan ve bağımsız değişkenlerin EPS derişimi üzerine etkilerini gösteren ikinci dereceden bir model eşitliğinin elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada, optimum koşullar; tatlı patates tozu; %10, maya özütü; %0.75, pH; 5.5 ve fermantasyon süresi; 100 saat olarak belirlenmiş olup, bu koşullarda elde edilen maksimum EPS derişiminin 9.3 g/L olduğu rapor edilmiştir.

4.7. Bazı Gıda Endüstrisi Atık ve Yan Ürünleri ile Çeşitli Meyve ve Sebze Atıklarının; Doğrudan Doğruya ya da Bazı Ön İşlemlerden Geçirildikten Sonra Fermantasyon Ortamı Temel Bileşeni Olarak Kullanılmalarının *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının bu bölümünde; bazı gıda endüstrisi artıkları ile çeşitli meyve ve sebze atıklarının; fermantasyon ortamlarında, doğal substrat kaynakları olarak kullanılmalarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada substrat olarak; peynir altı suyu, melas, üzüm posası ve şeker pancarı küspesi, kavun, karpuz, soğan ve havuç kabukları ile tatlı patates kullanılmıştır.

Araştırmanın bu bölümünde ilk olarak; yukarıda belirtilen doğal substrat kaynakları kullanılarak, farklı bileşimlerdeki bazı fermantasyon ortamları hazırlanmış ve bu ortamlarda bazı deneyler yapılarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun EPS ve pullulan üretim özellikleri araştırılmıştır.

Peynir altı suyu, kavun kabuğu özütü, karpuz kabuğu özütü, üzüm posası özütü veya melas çözeltisinin, ayrı ayrı substrat kaynakları olarak kullanıldıkları farklı bileşimlerdeki fermentasyon ortamlarında gerçekleştirilen birinci gruptaki deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun fermentasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimi; 2.8×10^6 kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.96'da gösterilmiştir. Bu çalışmada; en yüksek EPS derişiminin; substrat kaynağı olarak melasın kullanıldığı fermentasyon ortamında elde edildiğı ve bunu sırasıyla; kavun kabuğu, üzüm posası, karpuz kabuğu özütleri ve peynir altı suyunun substrat kaynağı olarak kullanıldıkları fermentasyon ortamlarının izlediğı bulunmuştur. Fermentasyon ortamlarında karbon kaynağı olarak; melas, kavun kabuğu, üzüm posası ve karpuz kabuğu özütleri ve peynir altı suyu kullanılan çalışmalarda elde edilen en yüksek EPS derişimleri sırasıyla; 17.12, 11.22, 10.53, 8.58 ve 6.66 g/L olarak tayin edilmiştir.



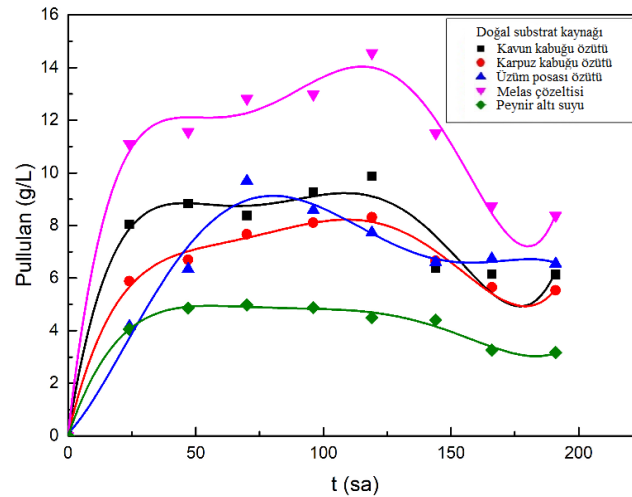
Şekil 4.96. Kavun kabuğu, karpuz kabuğu, üzüm posası özütleri, melas çözeltisi veya peynir altı suyunun hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermentasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu çalışmada, en yüksek derişimdeki EPS üretimlerinin; fermentasyon ortamında; kavun veya karpuz kabuğu özütü ya da melasın doğal substrat kaynağı olarak kullanıldıkları deneylerde; fermentasyonun 120., üzüm posasının substrat olarak kullanıldığı deneyde;

fermantasyonun 73., peynir altı suyunun substrat olarak kullanıldığı deneyde ise; fermentasyonun 49. saatinde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

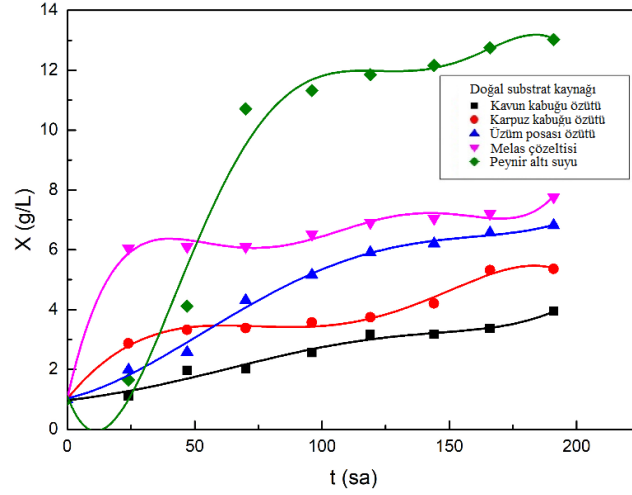
Fermentasyon ortamlarında farklı doğal substrat kaynaklarının kullanıldığı birinci gruptaki deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.97’de sunulmuştur. Fermentasyon ortamlarında, doğal substrat kaynağı olarak kavun veya karpuz kabuğu özütü ya da melasın kullanıldığı çalışmalarda; en yüksek pullulan derişimleri; sırasıyla; 9.87, 8.32 ve 14.55 g/L olarak, fermentasyonun 120. saatinde elde edilmiştir.

Fermentasyon ortamlarında, doğal substrat kaynağı olarak üzüm posası özütü ve melasın kullanıldığı deneylerde, en yüksek pullulan derişimleri sırasıyla; 9.69 ve 4.98 g/L olarak, fermentasyonun 73. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.97. Kavun kabuğu, karpuz kabuğu, üzüm posası özütleri, melas çözeltisi veya peynir altı suyunun hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermentasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

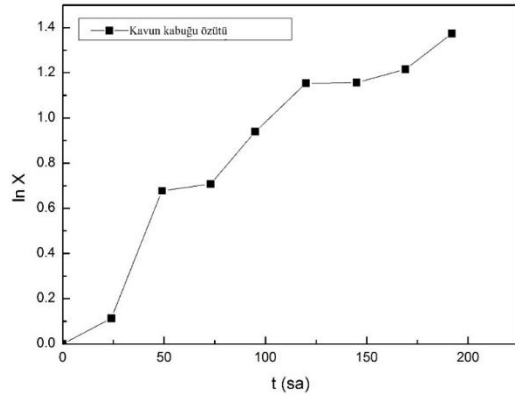
Bu deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri ise; Şekil 4.98’de gösterilmiştir.



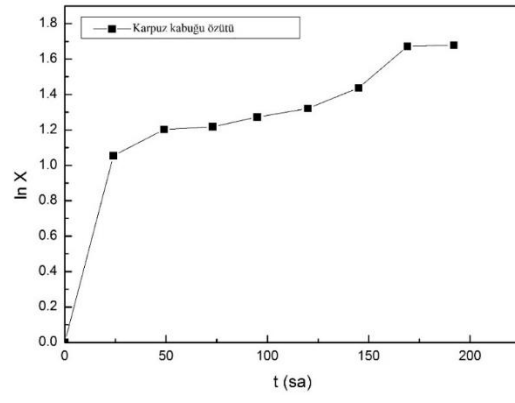
Şekil 4.98. Kavun kabuğu, karpuz kabuğu, üzüm posası özütleri, melas çözeltisi veya peynir altı suyunun hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermantasyon ortamlarında, doğal substrat kaynağı olarak; melas, peynir altı suyu ve üzüm posası ile kavun ve karpuz kabuğu özütlerinin kullanıldıkları deneylerde en yüksek biyokütle derişimleri, fermantasyonun 191. saatinde sırasıyla; 7.77, 13.03, 6.82, 3.95 ve 5.36 g/L olarak tayin edilmiştir.

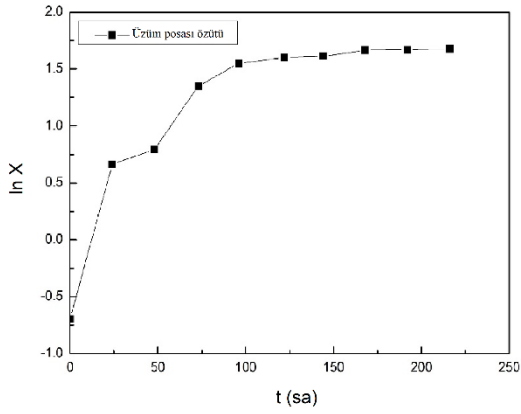
İlk gruptaki deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, her deneyde elde edilen, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak $\ln X$ değerleri hesaplandıktan sonra; bu değerlerin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir (Şekil 4.99) ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır.



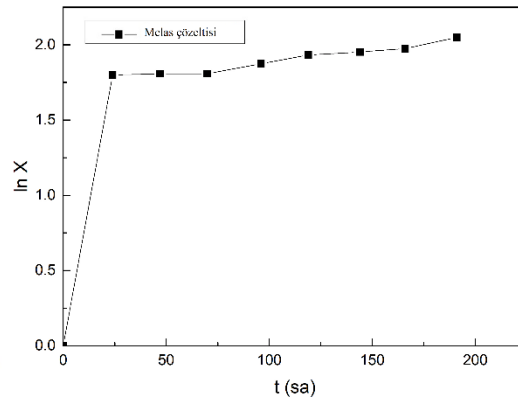
(a)



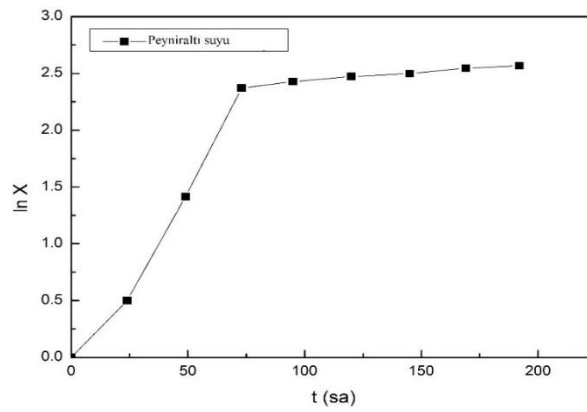
(b)



(c)



(d)



(e)

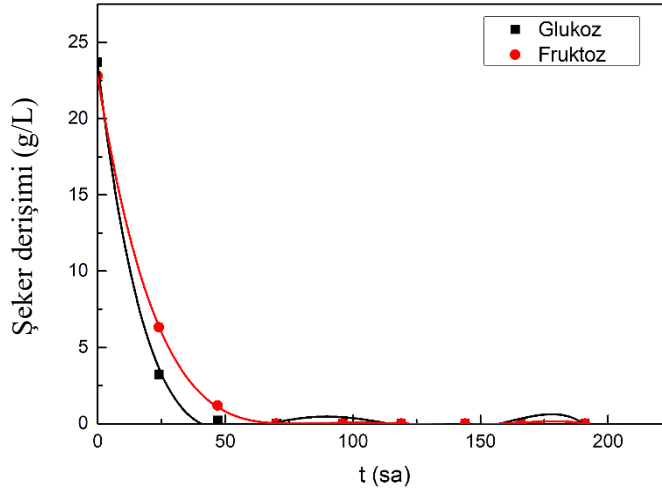
Şekil 4.99. Doğal substrat kaynağı olarak; (a): kavun kabuğu özütü, (b): karpuz kabuğu özütü, (c): üzüm posası özütü, (d): melas çözeltisi ve (e): peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

A. pullulans AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı; μ , substrat olarak; kavun kabuğu, karpuz kabuğu veya üzüm posası özütü içeren fermantasyon ortamlarında; sırasıyla; 0.023, 0.073 ve 0.056 sa⁻¹; melas çözeltisi veya peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamlarında ise sırasıyla; 0.104 ve 0.037 sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

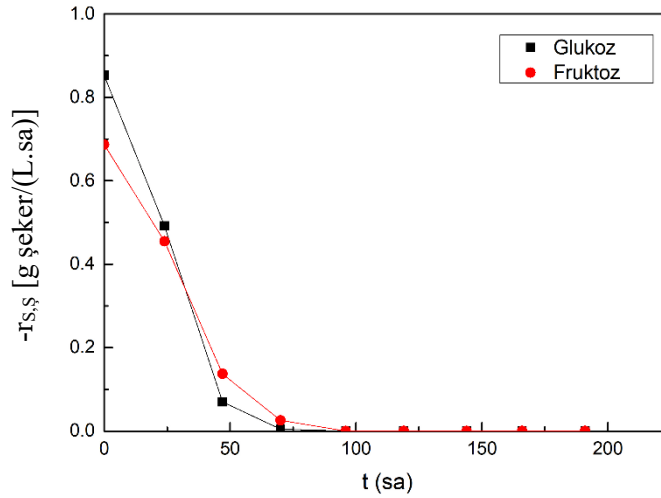
Farklı doğal substrat içeren fermantasyon ortamları kullanılarak gerçekleştirilen ilk gruptaki deneyler için, pullulan üretimi ile ilgili en yüksek özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla; her deney için, pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.97) yararlanılarak farklı zamanlara karşı gelen eğim değerleri hesaplanmış ve bu değerler; Şekil 4.98’de yer alan grafiklerdeki aynı zamana karşı gelen X değerlerine bölünerek özgül ürün oluşum hızları da hesaplandıktan sonra en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri bulunmuştur. Bu çalışmada; en yüksek özgül ürün oluşum hızları; μ_m , doğal substrat kaynağı olarak; kavun kabuğu, karpuz kabuğu veya üzüm posası özütü içeren fermantasyon ortamları için, sırasıyla; 0.094, 0.122 ve 0.115; melas veya peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamları için ise; sırasıyla, 0.176 ve 0.211 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada ayrıca; her biri farklı doğal substrat kaynağını içeren fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimi süresince, bu ortamlarda bulunan farklı şeker türlerinin derişimleri de tayin edilmiştir. Kavun kabuğu özütünün substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler Şekil 4.100’de; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise Şekil 4.101’de sunulmuştur.

Kavun kabuğu özütünün substrat kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktozun her ikisinin de fermantasyonun 70. saatinde, tamamen tüketildiği görülmüştür (Şekil 4.100). Bu deneyde, en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızları; fermantasyonun başlangıcında, sırasıyla; 0.85 g glukoz/(L.sa) ve 0.69 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.101).



Şekil 4.100. Doğal substrat kaynağı olarak kavun kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri

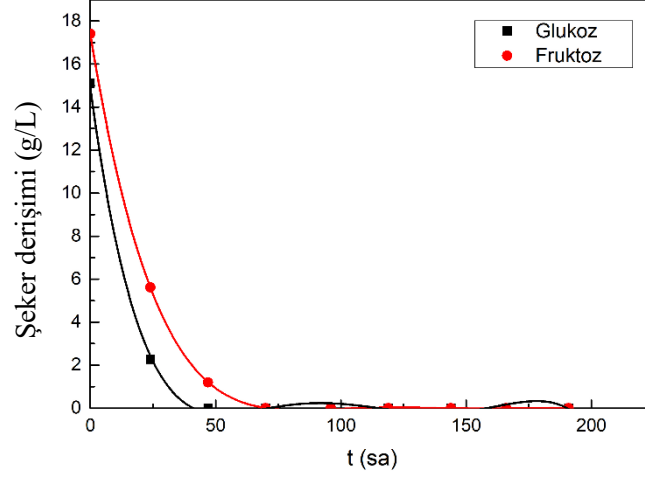


Şekil 4.101. Doğal substrat kaynağı olarak kavun kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

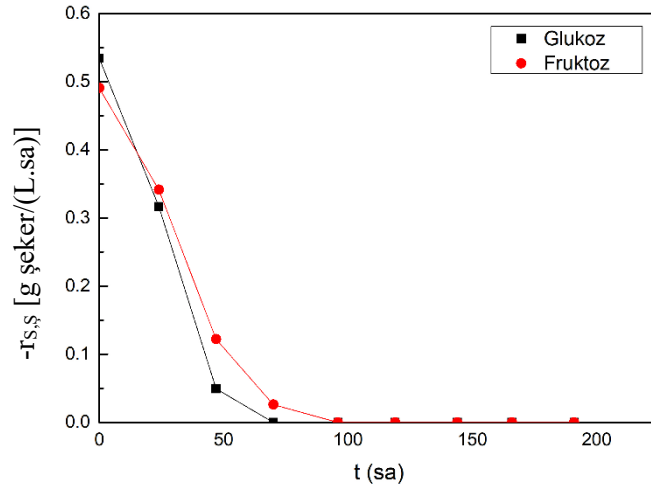
Karpuz kabuğu özütünün substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.102'de; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.103'de sunulmuştur.

Şekil 4.102'deki deney sonuçları incelendiğinde; karpuz kabuğu özütünün doğal substrat kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukozun fermantasyonun 40., fruktozun ise; fermantasyonun 70. saatinde tamamen tüketildikleri tespit edilmiştir. Şekil 4.103'deki sonuçlar incelendiğinde ise; karpuz kabuğu özütü içeren fermantasyon

ortamındaki en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının; sırasıyla; 0.54 g glukoz/(L.sa) ve 0.49 g fruktoz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edildikleri bulunmuştur.



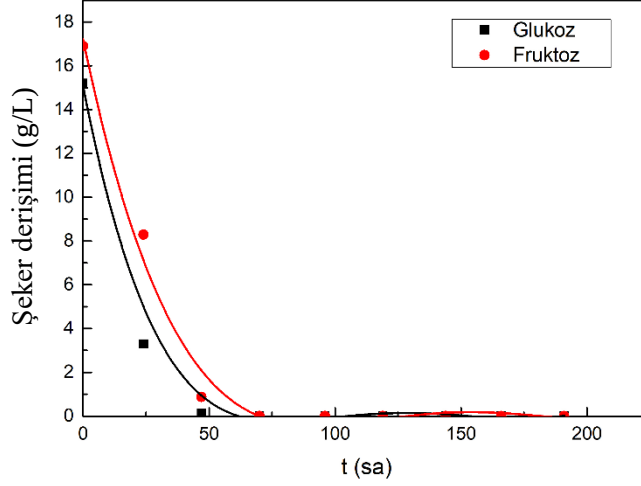
Şekil 4.102. Doğal substrat kaynağı olarak karpuz kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri



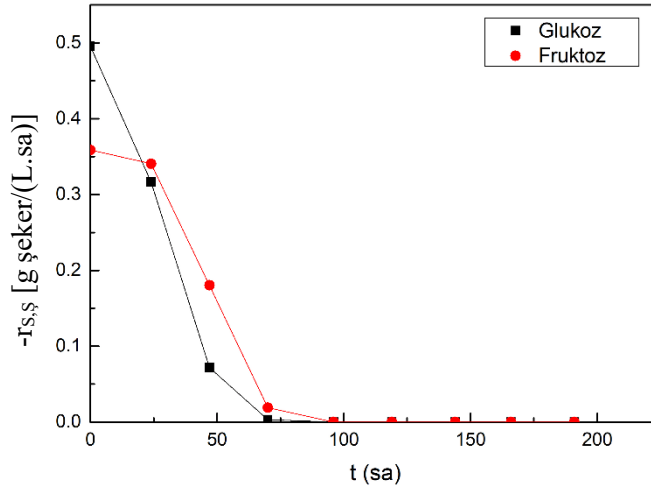
Şekil 4.103. Doğal substrat kaynağı olarak karpuz kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Üzüm posası özütü içeren fermantasyon ortamındaki; glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.104'de, aynı ortamdaki şeker tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.105'de gösterilmiştir. Üzüm posası özütünün substrat kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktozun her ikisinin de fermantasyonun 70. saatinde tamamen tüketildiği

görülmüştür (Şekil 4.104). Bu deneyde, en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızları; fermentasyonun başlangıcında, sırasıyla; 0.50 g glukoz/(L.sa) ve 0.36 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.105).

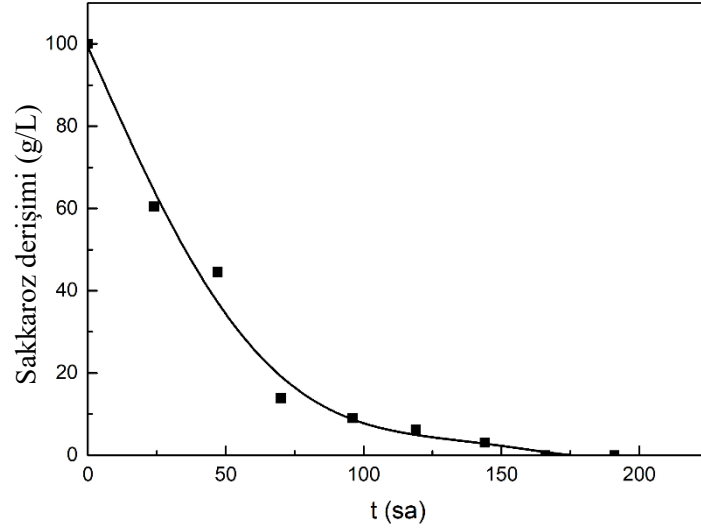


Şekil 4.104. Doğal substrat kaynağı olarak üzüm posası özütü içeren fermentasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri

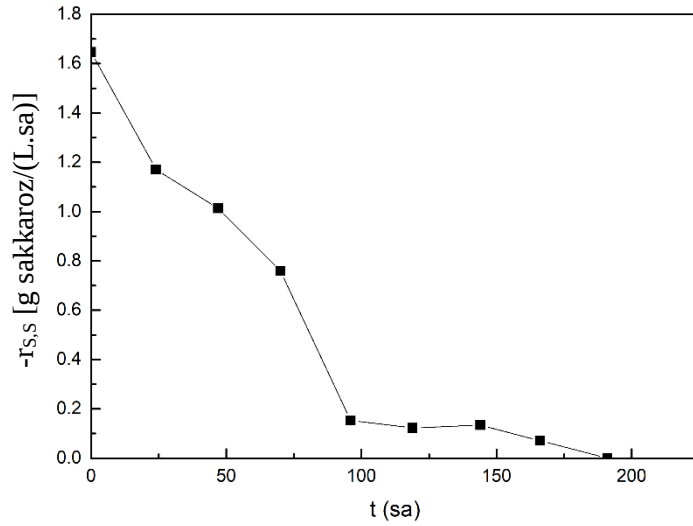


Şekil 4.105. Doğal substrat kaynağı olarak üzüm posası özütü içeren fermentasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Melasın doğal substrat kaynağı olarak kullanıldığı deneyde fermentasyon ortamındaki sakkaroz derişimlerinin ve mikroorganizmanın sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler, sırasıyla; Şekil 4.106 ve 4.107'de sunulmuştur.



Şekil 4.106. Doğal substrat kaynağı olarak melas çözeltisi içeren fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değışimi

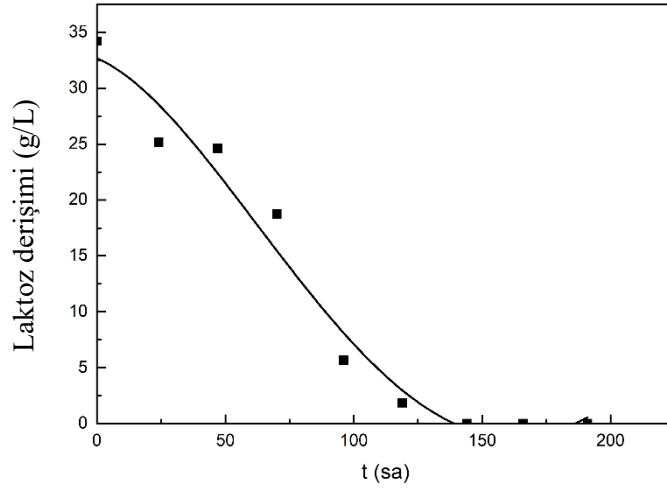


Şekil 4.107. Doğal substrat kaynağı olarak melas çözeltisi içeren fermantasyon ortamında; sakkaroz tüketim hızının zamanla değışimi

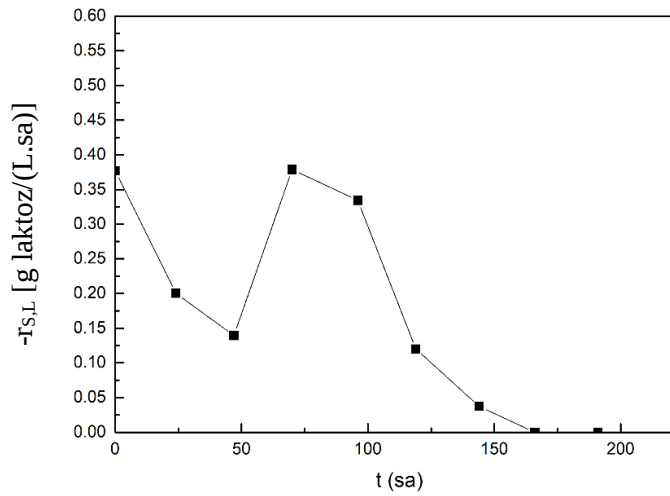
Söz konusu fermantasyon ortamındaki sakkarozun, fermantasyonu 169. saatinde tamamen tüketildiğı görölmüştür. Ayrıca, melasın hammadde olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki en yüksek sakkaroz tüketim hızı; 1.65 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edilmiştir (Şekil 4.107).

Peynir altı suyunun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki laktoz derişiminin zamanla değışimini gösteren grafik; Şekil 4.108’de, kullanılan suşun laktozu

tüketim hızının zamanla değişimini gösteren grafik ise Şekil 4.109’da sunulmuştur. Şekil 4.108 incelendiğinde; fermantasyon ortamındaki laktozun fermantasyonun 145. saatinde tamamen tüketildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.108. Doğal substrat kaynağı olarak peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamındaki laktoz derişiminin zamanla değişimi

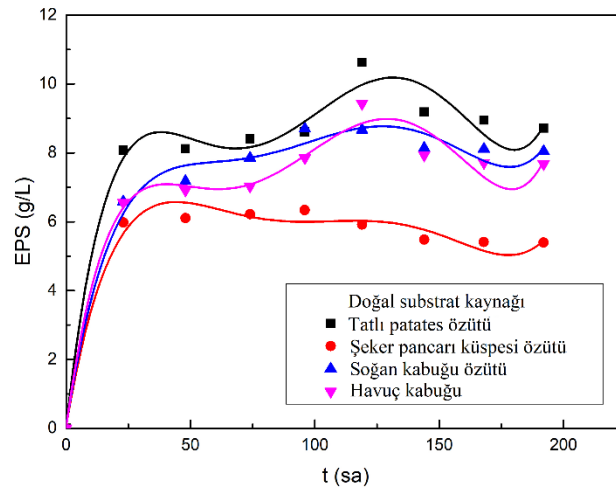


Şekil 4.109. Doğal substrat kaynağı olarak peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamında; laktoz tüketim hızının zamanla değişimi

Şekil 4.109 incelendiğinde ise; fermantasyon ortamındaki en yüksek laktoz tüketim hızının; 0.38 g laktoz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edildiği belirlenmiştir.

Bu kapsamdaki ikinci çalışmada ise; doğal substrat kaynağı olarak; havuç ve soğan kabuğu özütleri, şeker pancarı küspesi özütü ve tatlı patates özütü kullanılmıştır. Bu deneylerde de; fermantasyon ortamlarında; ana fermantasyon ortamının bileşimindeki karbon kaynağı dışındaki bileşenler ile başlangıç derişimleri sabit tutulmuş ve fermantasyon koşulları ile kültürün geliştirilmesi; ilk grup deneylerdeki gibi yapılmıştır. Bu deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi; 2.7×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu ve havuç kabuğu özütlerinin ayrı ayrı doğal substrat kaynakları olarak kullanılmaları ile hazırlanan farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.110'da gösterilmiştir.

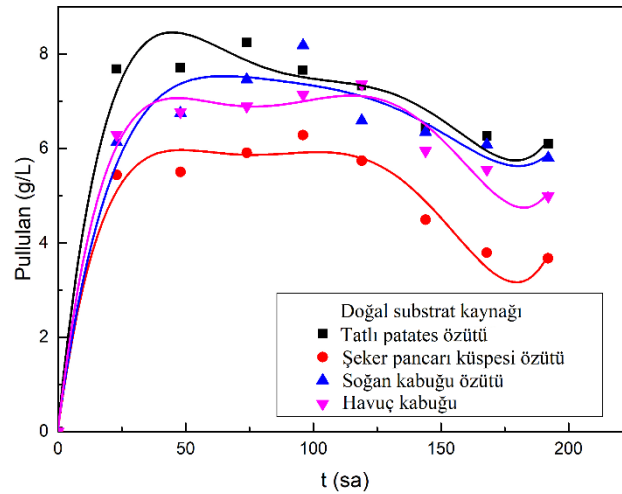


Şekil 4.110. Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu veya havuç kabuğu özütlerinin hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmadaki en yüksek derişimdeki EPS üretiminin; fermantasyon ortamında, doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütünün kullanıldığı deneyde elde edildiği, bunu sırasıyla; havuç veya soğan kabuğu özütleri ile şeker pancarı küspesi özütünün doğal substrat kaynakları olarak kullanıldıkları deneylerin izlediği bulunmuştur.

Tatlı patates, havuç kabuğu, soğan kabuğu ve şeker pancarı küspesi özütlerinin; ayrı ayrı, doğal substrat kaynağı olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde elde edilen en yüksek EPS derişimleri; sırasıyla, 10.63, 9.43, 8.70 ve 6.34 g/L olarak tayin edilmiştir. Bu çalışmada, en yüksek derişimdeki EPS üretiminin; doğal substrat kaynağı olarak; şeker pancarı küspesi veya soğan kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamlarında; fermantasyonun; 96., tatlı patates veya havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamlarında ise; fermantasyonun; 119. saatinde gerçekleştiği gözlenmiştir.

İkinci gruptaki deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.111’de verilmiştir.



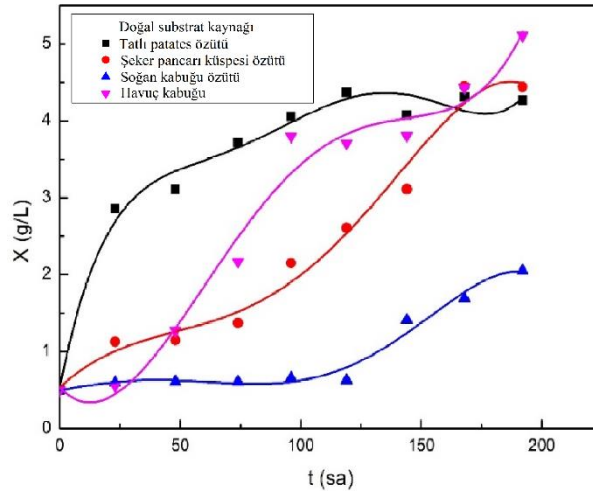
Şekil 4.111. Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu veya havuç kabuğu özütlerinin hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak; sırasıyla, şeker pancarı küspesi özütü ve soğan kabuğu özütünün kullanıldığı deneylerde; en yüksek pullulan derişimleri; sırasıyla; 6.28 ve 8.18 g/L olarak, fermantasyonun 96. saatinde elde edilmiştir.

En yüksek pullulan derişimi; doğal substrat kaynağı olarak; tatlı patates özütünün kullanıldığı deneyde; 8.24 g/L olarak, fermantasyonun 74. saatinde ve havuç kabuğu

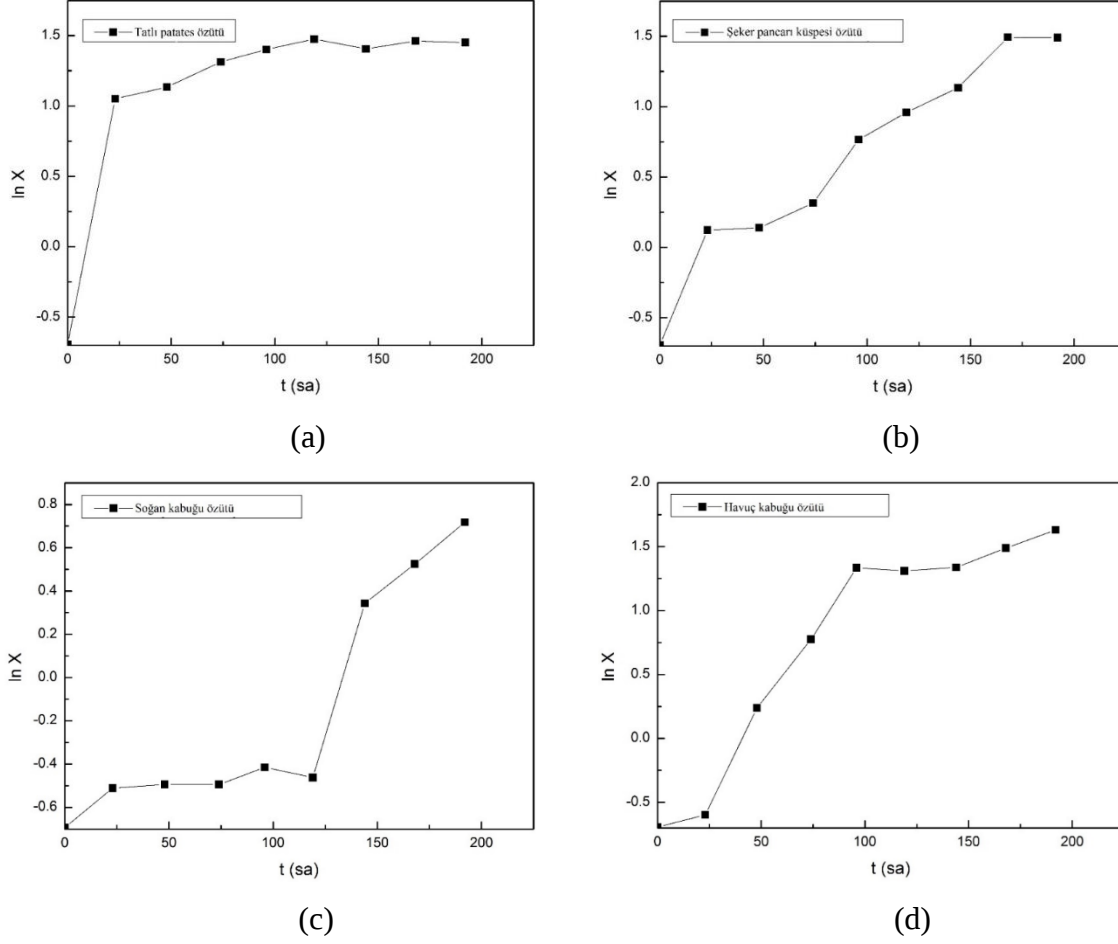
özütünün kullanıldığı deneyde ise; 7.36 g/L olarak, fermantasyonun 119. saatinde tayin edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.112’de verilmiştir. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütünün kullanıldığı çalışmada, en yüksek biyokütle derişimi; 4.37 g/L olarak, fermantasyonun 116. saatinde elde edilmiştir. En yüksek biyokütle derişimleri; fermantasyon ortamında; doğal substrat kaynağı olarak; soğan ve havuç kabuğu özütlerinin kullanıldıkları deneylerde; sırasıyla; 2.05 ve 5.11 g/L olarak, fermantasyonun 192. saatinde; şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı deneyde ise; 4.45 g/L olarak, fermantasyonun 168. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.112. Tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan kabuğu veya havuç kabuğu özütlerinin hammadde olarak kullanıldıkları; farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

İkinci gruptaki deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, her deneyde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak $\ln X$ değerleri hesaplandıktan sonra; bu değerlerin zamanla değişimlerini gösteren grafikler (Şekil 4.113) çizilmiş ve mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır.

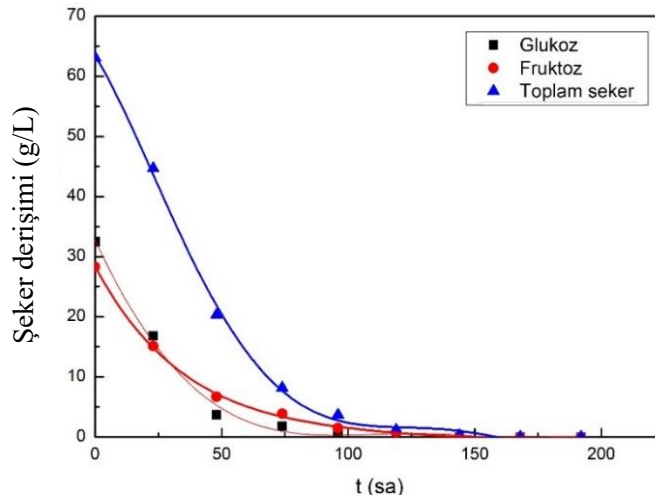


Şekil 4.113. Doğal substrat kaynağı olarak; (a): tatlı patates özütü, (b): şeker pancarı küspesi özütü, (c): soğan kabuğu özütü, ve (d): havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilen deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

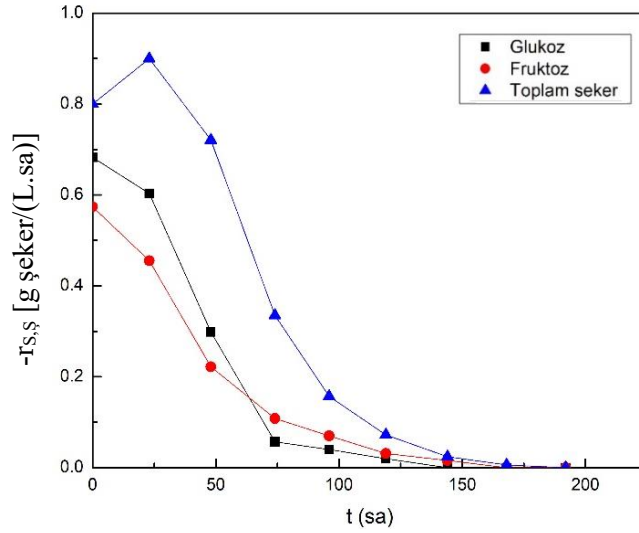
A. pullulans AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı (μ); tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan ve havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamlarında sırasıyla; 0.076, 0.035, 0.032 ve 0.033 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışma için en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri de hesaplanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum hızları; doğal substrat kaynağı olarak; tatlı patates, şeker pancarı küspesi, soğan ve havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamlarında; sırasıyla, 0.117, 0.209, 0.444 ve 0.497 g pullulan/(g mo.sa) olarak, fermantasyonun 23. saatinde elde edilmiştir.

Bu deneylerde fermantasyon ortamlarındaki şeker derişimlerinin zamanla değişimleri de izlenmiştir. Tatlı patates özütü içeren fermantasyon ortamındaki; glukoz, fruktoz ve toplam şeker (sakkaroz cinsinden) derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.114’de, aynı ortamdaki şeker tüketim hızlarının zamanla değişimleri ise; Şekil 4.115’de gösterilmiştir. Şekil 4.114’deki deney sonuçları incelendiğinde; tatlı patates özütünün doğal substrat kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve toplam şekerin fermantasyonun sırasıyla 119, 144, ve 168. saatlerinde tamamen tüketildikleri tespit edilmiştir. Şekil 4.115’deki sonuçlar incelendiğinde ise; tatlı patates özütü içeren fermantasyon ortamındaki en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının; sırasıyla; 0.68 g glukoz/(L.sa) ve 0.57 g fruktoz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edildikleri bulunmuştur. Tatlı patatesin doğal substrat kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamındaki, en yüksek toplam şeker tüketim hızı ise, 0.9 g sakkaroz/(L.sa) olarak; fermantasyonun 23. saatinde elde edilmiştir.

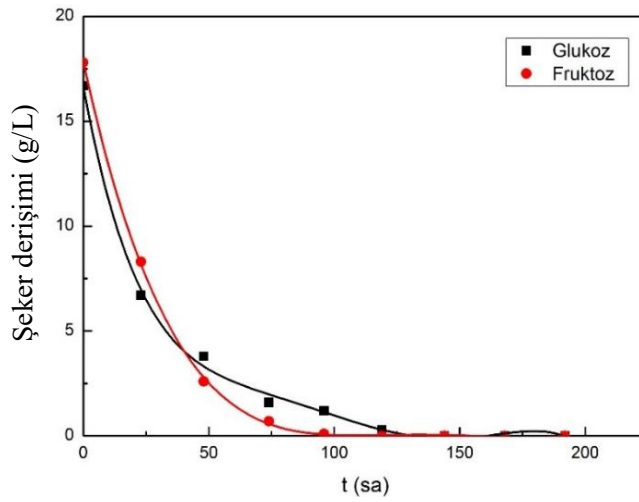


Şekil 4.114. Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz, fruktoz ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri

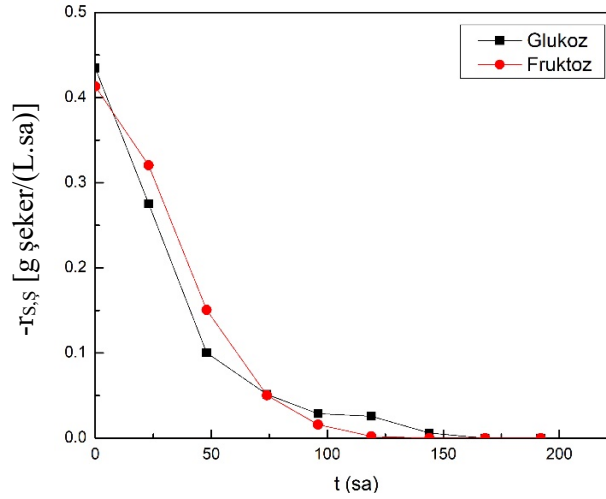


Şekil 4.115. Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz, fruktoz ve toplam şeker tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Doğal substrat kaynağı olarak havuç kabuğu özütünün kullanıldığı fermantasyon ortamındaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri Şekil 4.116'da, aynı ortamda, mikroorganizmanın glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri ise; Şekil 4.117'de verilmiştir.



Şekil 4.116. Doğal substrat kaynağı olarak havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamındaki, glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

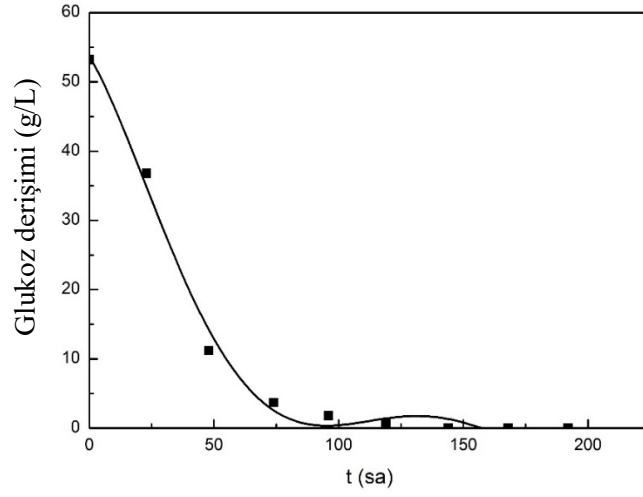


Şekil 4.117. Doğal substrat kaynağı olarak havuç kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

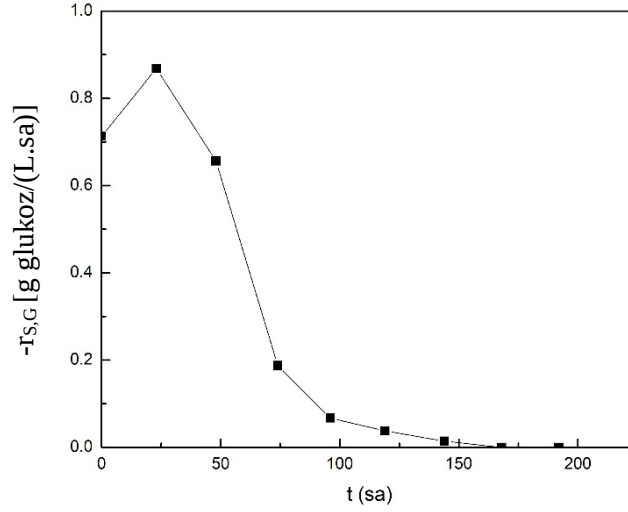
Fermantasyon ortamında, doğal substrat kaynağı olarak havuç kabuğu özütünün kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun ortamdaki fruktozu, fermantasyonun 119. saatinde, glukozu ise; fermantasyonun 144. saatinde tamamen tükettiği saptanmıştır (Şekil 4.116). Bu deneyde, fermantasyon ortamındaki en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının; sırasıyla; 0.43 g glukoz/(L.sa) ve 0.41 g fruktoz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edildikleri, daha sonra ise her iki hızın da zamanla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.117).

Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak soğan kabuğu özütünün kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz derişiminin zamanla değişimi; Şekil 4.118’de, glukoz tüketim hızının zamanla değişimi ise, Şekil 4.119’da gösterilmiştir.

Bu deneyde; *A. pullulans* AZ-6 suşunun ortamdaki glukozu, fermantasyonun 144. saatinde tamamen tükettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.118). Ayrıca; bu deneyde, mikroorganizmanın glukoz tüketim hızının; fermantasyonun 23. saatinde en yüksek değerinde [0.87 g glukoz/(L.sa)] olduğu; daha sonra ise hızla azaldığı da belirlenmiştir (Şekil 4.119).

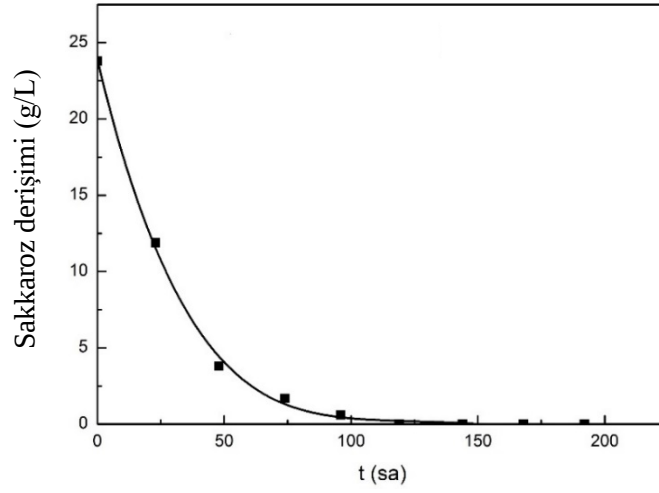


Şekil 4.118. Doğal substrat kaynağı olarak soğan kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamındaki glukoz derişiminin zamanla değişimi

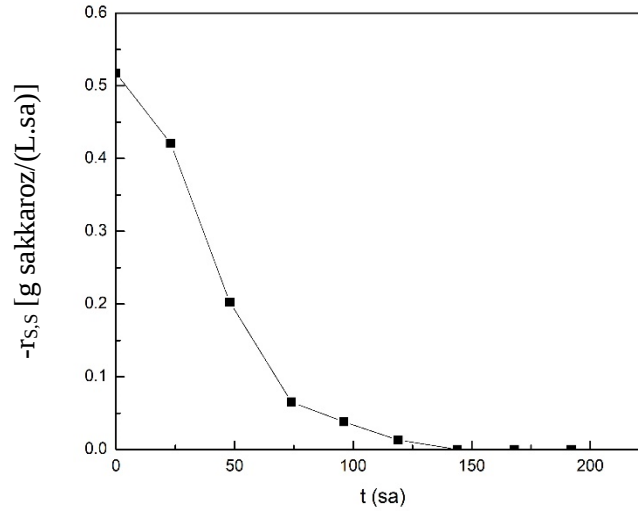


Şekil 4.119. Doğal substrat kaynağı olarak soğan kabuğu özütü içeren fermantasyon ortamında; glukoz tüketim hızının zamanla değişimi

Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağı olarak şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı deneyde, sakkaroz derişiminin zamanla değişimi; Şekil 4.120’de, sakkaroz tüketim hızının zamanla değişimi ise; Şekil 4.121’de gösterilmiştir.



Şekil 4.120. Doğal substrat kaynağı olarak şeker pancarı küspesi özütü içeren fermantasyon ortamındaki sakkaroz derişiminin zamanla değışimi



Şekil 4.121. Doğal substrat kaynağı olarak şeker pancarı küspesi özütü içeren fermantasyon ortamındaki sakkaroz tüketim hızının zamanla değışimi

Şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı fermantasyon ortamındaki sakkarozun; fermantasyonun, 119. saatinde tamamen tüketildiği saptanmıştır (Şekil 4.120). Bu deneyde ayrıca, en yüksek sakkaroz tüketim hızının; 0.52 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edildiği, daha sonra ise zamanla üssel olarak azaldığı da tespit edilmiştir (Şekil 4.121).

Bileşimlerinde bir doğal substrat kaynağı ile ana fermantasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenleri içeren fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS,

pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızı ve hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları değerleri, Çizelge 4.14’de sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Bileşimlerinde bir doğal substrat kaynağı ile ana fermentasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenleri içeren fermentasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızı ve hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları değerleri

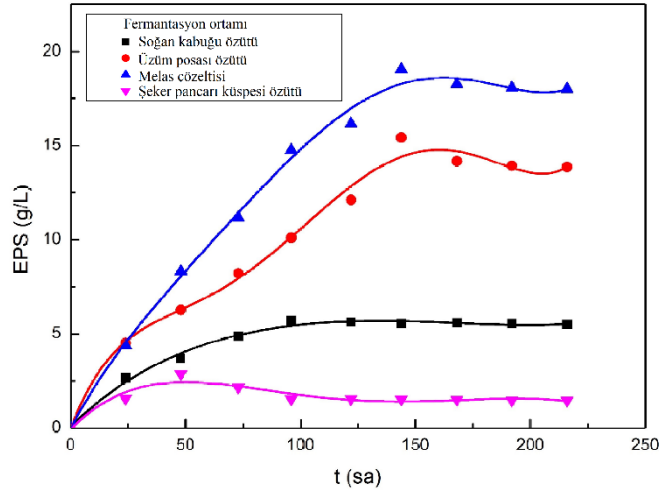
Fermentasyon ortamındaki doğal substrat kaynağı	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
Kavun kabuğu özütü	11.22	9.87	3.95	0.023	0.094
Karpuz kabuğu özütü	8.58	8.32	5.36	0.073	0.122
Üzüm posası özütü	10.53	9.69	6.82	0.056	0.115
Melas çözeltisi	17.12	14.55	7.77	0.104	0.176
Peynir altı suyu	6.66	4.98	13.03	0.037	0.211
Tatlı patates özütü	10.63	8.24	4.37	0.076	0.117
Şeker pancarı küspesi özütü	6.34	6.28	4.45	0.035	0.209
Soğan kabuğu özütü	8.70	8.18	2.05	0.032	0.444
Havuç kabuğu özütü	9.43	7.36	5.11	0.033	0.497

4.8. Bazı Gıda Endüstrisi Atık ve Yan Ürünleri ile Çeşitli Meyve ve Sebze Atıklarının; Doğrudan Doğruya ya da Bazı Ön İşlemlerden Geçirildikten Sonra Fermantasyon Ortamı Olarak Kullanılmalarının *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimine Etkilerinin İncelenmesi

Tez çalışmasının bir önceki bölümünde; doğal substrat kaynağı olarak kullanılan; üzüm posası veya şeker pancarı küspesi özütü veya kavun, karpuz, soğan ya da havuç kabuğu özütü, tatlı patates özütü, peynir altı suyu veya melas çözeltisi içeren ortamlara; ana fermantasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenler de ilave edilerek hazırlanan farklı bileşimlerdeki fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimi incelenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde ise, yukarıda belirtilen her bir doğal substrat kaynağı Bölüm 3.2.16'da anlatılan ön hazırlama işlemlerinden geçirildikten sonra; başka bir bileşik eklenmeden, doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanılmışlardır.

Bu çalışmada; söz konusu doğal substrat kaynakları üç gruba ayrılarak bazı deneyler yapılmıştır. İlk grupta; fermantasyon ortamları olarak; soğan kabuğu, üzüm posası ve şeker pancarı küspesi özütleri ile melas çözeltisi kullanılmıştır. Bu deneylerde; fermantasyon ortamlarına eklenen *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi; 4.6×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Soğan kabuğu, üzüm posası veya şeker pancarı küspesi özütü ya da melas çözeltisinin ortama başka herhangi bir bileşen ilave edilmeden, doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları birinci gruptaki deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.122'de verilmiştir. Bu deneylerde, en yüksek EPS derişiminin; melas çözeltisinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; 19.05 g/L olarak, fermantasyonun 144. saatinde elde edildiğı belirlenmiştir. Üzüm posası, soğan kabuğu veya şeker pancarı küspesi özütlerinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde en yüksek EPS derişimleri ise sırasıyla; 15.42, 5.69 ve 2.87 g/L olarak tayin edilmiştir. Ayrıca, üzüm posası, soğan kabuğu ve şeker pancarı küspesi özütlerinin fermantasyon ortamı olarak; kullanıldıkları deneylerde, en yüksek derişimdeki EPS üretimlerinin, sırasıyla; fermantasyonun; 144, 96 ve 48. saatlerinde gerçekleştiğı de belirlenmiştir.

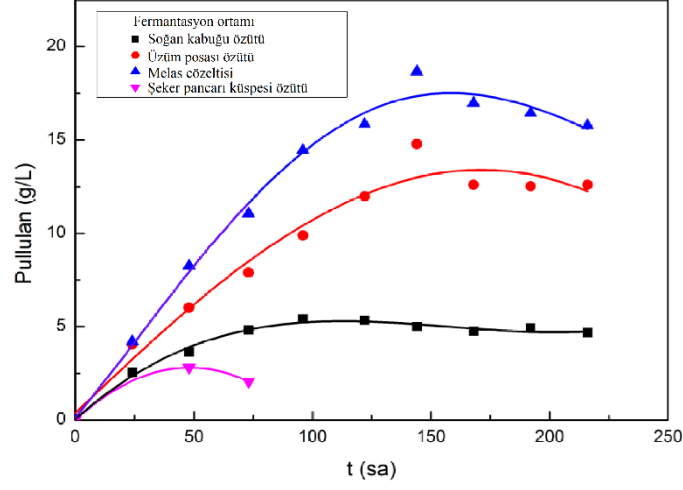


Şekil 4.122. Soğan kabuğu özütü, üzüm posası özütü, melas çözeltisi veya şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri

Çeşitli doğal substrat kaynaklarının doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları birinci gruba ait deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.123’de sunulmuştur.

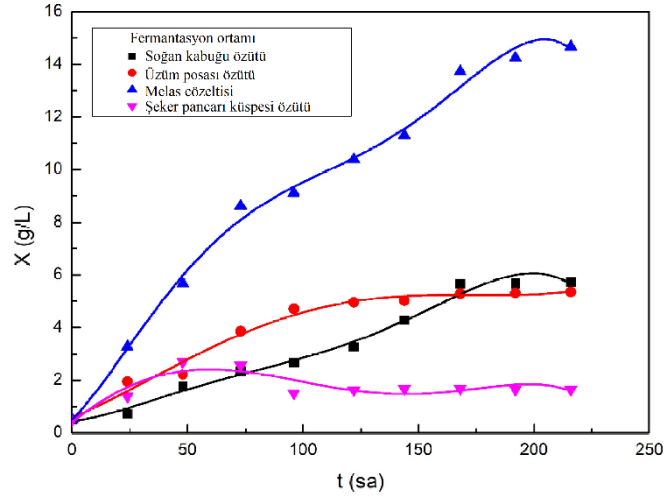
Melas çözeltisi veya üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; en yüksek pullulan derişimleri, sırasıyla; 18.67 ve 14.80 g/L olarak, fermantasyonun 144. saatinde elde edilmiştir.

En yüksek pullulan derişimi; soğan kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmada 5.41 g/L olarak, fermantasyonun 96. saatinde; şeker pancarı küspesi özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmada ise, 2.61 g/L olarak, fermantasyonun 48. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.123. Soğan kabuğu özütü, üzüm posası özütü, melas çözeltisi veya şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

Biyokütle derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler Şekil 4.124'de verilmiştir. Soğan kabuğu veya üzüm posası özütü ya da melas çözeltisinin fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde en yüksek biyokütle derişimleri; sırasıyla, 5.73, 5.35 ve 14.67 g/L olarak, fermantasyonun 216. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.124. Soğan kabuğu özütü, üzüm posası özütü, melas çözeltisi veya şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

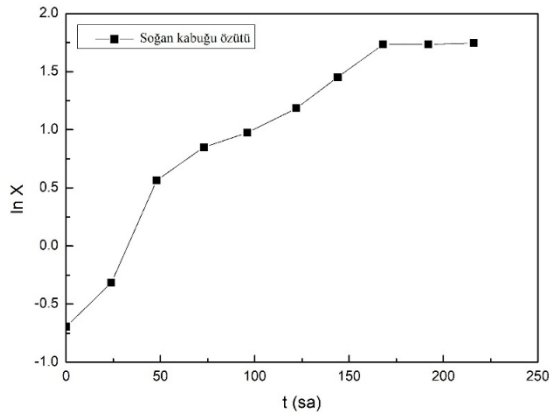
Şeker pancarı küspesi özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ise, en yüksek biyokütle derişimi, 2.70 g/L olarak, fermantasyonun 48. saatinde elde edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, bu deneylerdeki en yüksek biyokütle derişiminin; seyreltik melas çözeltisinin, tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiğini göstermektedir. Birinci gruptaki deneylerde en düşük biyokütle derişimi ise, şeker pancarı küspesi özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilmiştir.

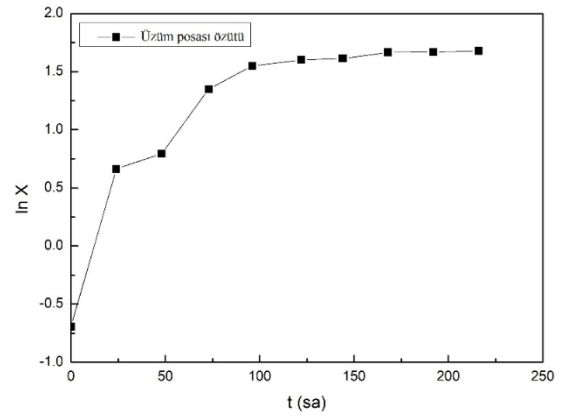
Farklı doğal substrat kaynakları veya özütlerinin tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, her bir doğal substrat kaynağı ile gerçekleştirilen çalışmada elde edilen ve mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler (Şekil 4.125) çizilmiş ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır.

Soğan kabuğu, üzüm posası ve şeker pancarı küspesi özütleri ile melas çözeltisinin, ayrı ayrı, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları, μ , sırasıyla; 0.037, 0.056, 0.042 ve 0.078 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.

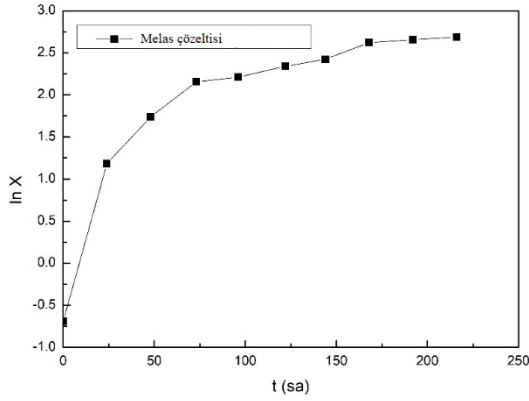
Çeşitli doğal substrat kaynaklarının tek başına, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; pullulan üretimi ile ilgili en yüksek özgül ürün oluşum hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, her deney için pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.123) yararlanılarak, farklı zamanlara karşı gelen eğim değerleri hesaplanmış ve bu değerler, Şekil 4.124’de yer alan eğrilerdeki aynı zamana karşı gelen X değerlerine bölünerek özgül ürün oluşum hızları hesaplandıktan sonra; en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerleri bulunmuştur. Bu çalışmada, en yüksek özgül ürün oluşum hızları, μ_m , soğan kabuğu, üzüm posası ve şeker pancarı küspesi özütleri veya melas çözeltisinin fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneyler için sırasıyla; 0.146, 0.087, 0.042 ve 0.054 g pullulan/(g mo.sa) olarak, fermantasyonun 24. saatinde elde edilmiştir.



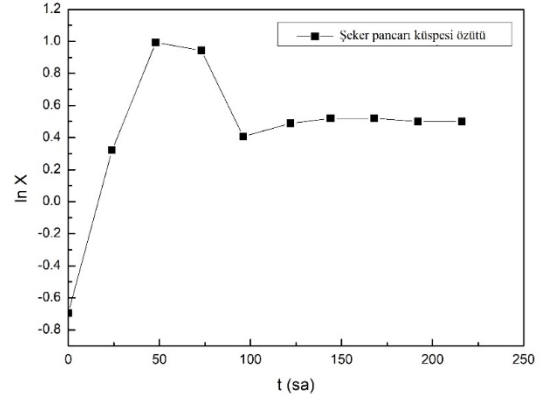
(a)



(b)



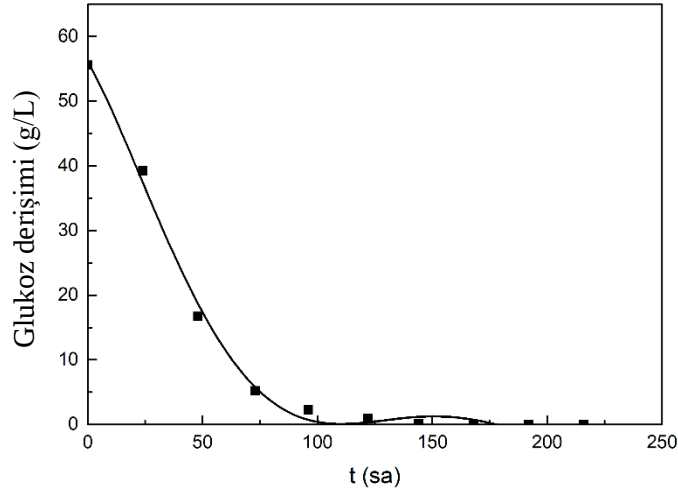
(c)



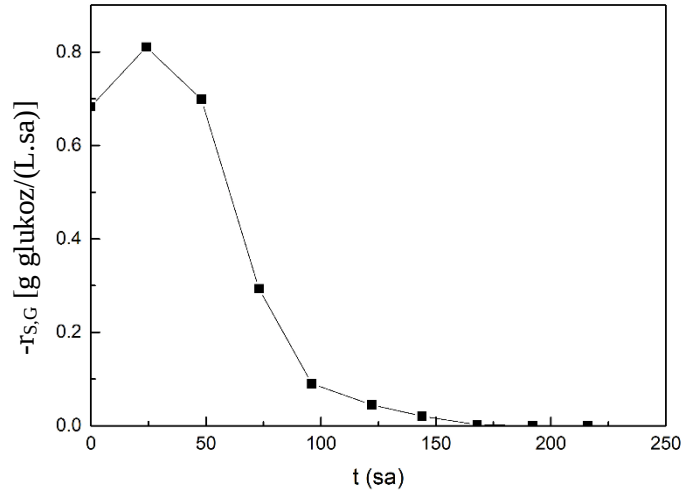
(d)

Şekil 4.125. *A. pullulans* AZ-6 için doğal substrat kaynağı olarak (a): soğan kabuğu özütü, (b): üzüm posası özütü, (c): melas çözeltisi ve (d): şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

Soğan kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 4.126'da; glukoz tüketim hızının zamanla değişimini gösteren grafik ise; Şekil 4.127'de verilmiştir.



Şekil 4.126. Soğan kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz derişiminin zamanla değişimi

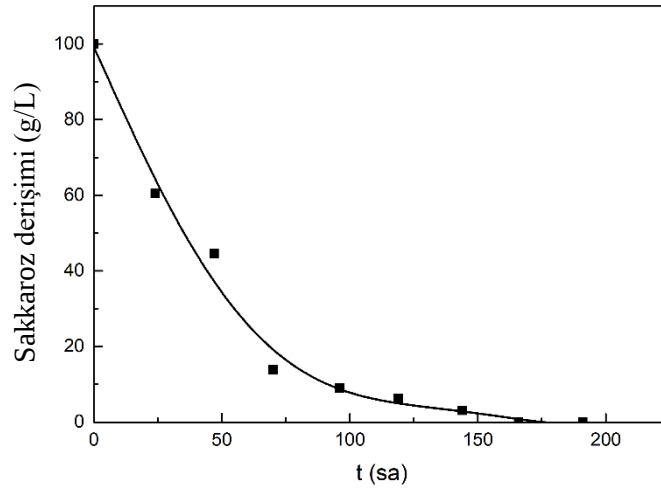


Şekil 4.127. Soğan kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; glukoz tüketim hızının zamanla değişimi

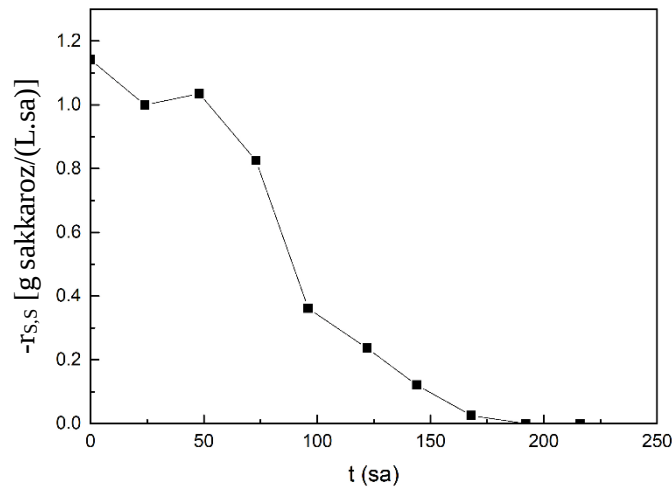
Şekil 4.126 incelendiğinde; ortamdaki glukozun fermantasyonun 168. saatinde tamamen tüketildiği görülmüştür. Şekil 4.127 incelendiğinde ise; soğan kabuğu özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, en yüksek glukoz tüketim hızına, 0.81 g glukoz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 24. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Melas çözeltisinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki sakkarozun, fermantasyonun 168. saatinde tamamen tüketildiği bulunmuştur (Şekil

4.128). Söz konusu deneyde, en yüksek sakkaroz tüketim hızı ise, fermantasyonun başlangıcında, 1.14 g sakkaroz/(L. sa) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.129).



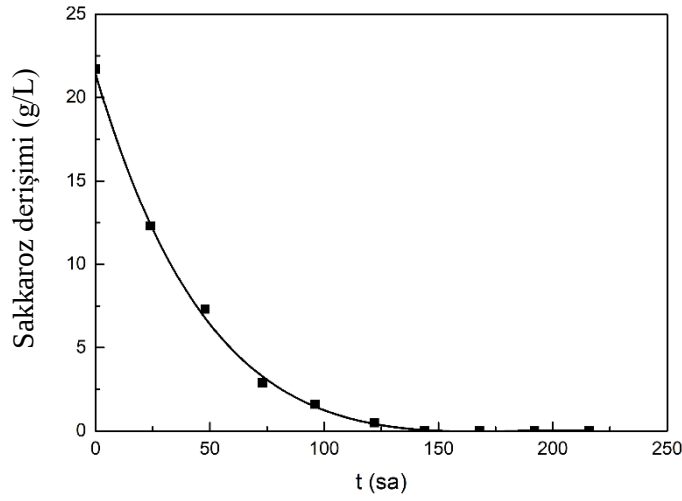
Şekil 4.128. Melas çözeltisinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki sakkaroz derişiminin zamanla değışimi



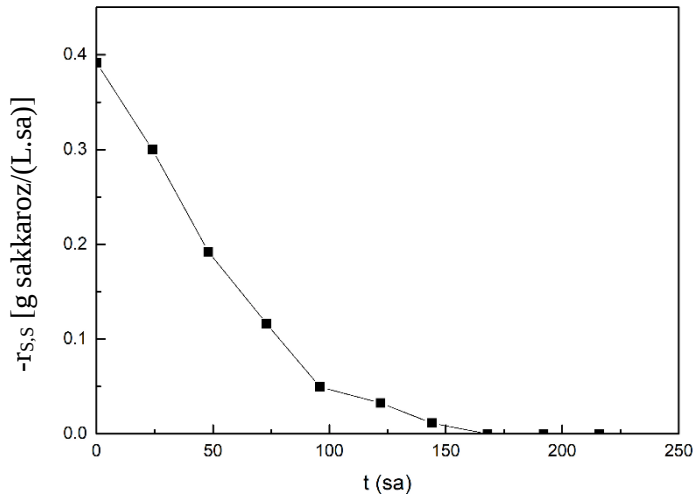
Şekil 4.129. Melas çözeltisinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; sakkaroz tüketim hızının zamanla değışimleri

Fermantasyon ortamı olarak, yalnızca şeker pancarı küspesi özütünün kullanıldığı deneyde, ortamdaki sakkaroz derişiminin zamanla değışimini gösteren grafik; Şekil 4.130'da; sakkaroz tüketim hızının zamanla değışimini gösteren grafik ise; Şekil 4.131'de verilmiştir. Şekil 4.130 incelendiğinde, ortamdaki sakkarozun fermantasyonun 144. saatinde tamamen tüketildiği görülmüştür. Şeker pancarı küspesi özütünün tek başına

fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, en yüksek sakkaroz tüketim hızı, 0.39 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermentasyonun başlangıcında hesaplanmıştır.

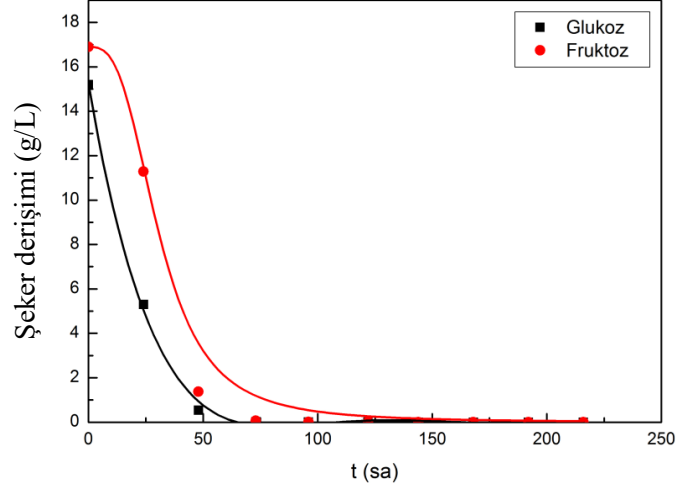


Şekil 4.130. Şeker pancarı küspesi özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki sakkaroz derişiminin zamanla değışimi



Şekil 4.131. Şeker pancarı küspesi özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde sakkaroz tüketim hızının zamanla değışimleri

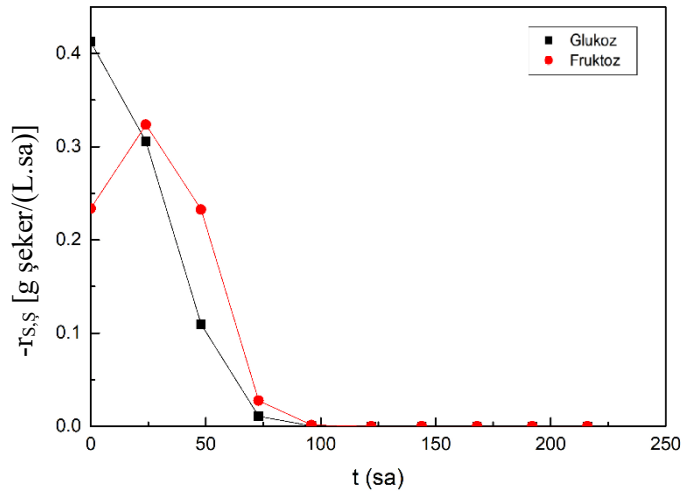
Üzüm posası özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.132’de sunulmuştur. Bu deneyde; fermentasyon ortamındaki glukoz ve fruktozun her ikisinin de fermentasyonun 122. saatinde tamamen tüketildikleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.132. Üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.133’de verilmiştir.

Üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, en yüksek glukoz tüketim hızı; fermantasyonun başlangıcında, 0.41 g glukoz/(L.sa) olarak elde edilen; en yüksek fruktoz tüketim hızı ise, fermantasyonun 24. saatinde, 0.32 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.

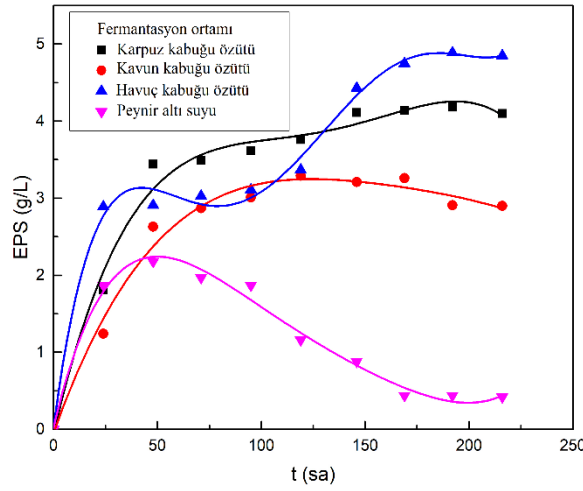


Şekil 4.133. Üzüm posası özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

İkinci gruptaki deneylerde ise; fermantasyon ortamı olarak karpuz, kavun veya havuç kabuğu özütü ya da peyniraltı suyu kullanılmıştır. Bu deneyler de, ilk gruptaki deneyler ile aynı fermantasyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. İkinci gruptaki deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi; 4.5×10^7 kob/mL olarak tespit edilmiştir.

Karpuz, kavun veya havuç kabuğu özütü ya da peynir altı suyunun, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.134’de verilmiştir.

A. pullulans AZ-6 suşu ile en yüksek derişimdeki EPS üretiminin, havuç kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiği ve bunu sırasıyla; karpuz ve kavun kabuğu özütleri ile peynir altı suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerin izlediği bulunmuştur.

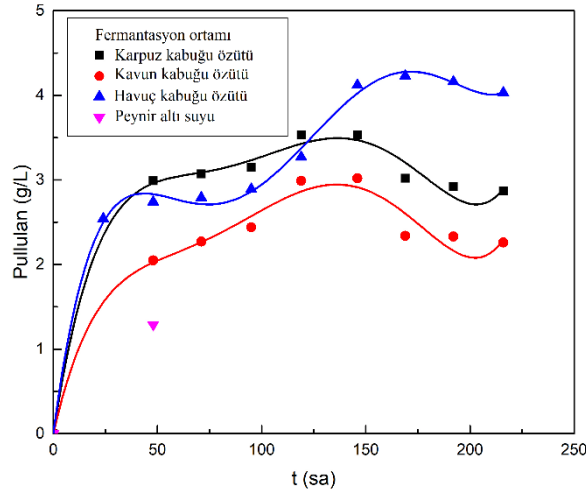


Şekil 4.134. Karpuz, kavun ya da havuç kabuğu özütleri veya peynir altı suyunun tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

Havuç, karpuz veya kavun kabuğu özütü ya da peynir altı suyunun, tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde elde edilen en yüksek EPS derişimleri ise, sırasıyla; 4.89, 4.18, 3.29 ve 2.18 g/L olarak tayin edilmiştir.

Ayrıca, en yüksek derişimde EPS üretiminin; karpuz veya havuç kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, fermentasyonun 192.; kavun kabuğu özütü veya peynir altı suyunun; fermentasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde ise, sırasıyla, fermentasyonun; 119. ve 48. saatinde gerçekleştiği de belirlenmiştir.

Bu deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.135’de sunulmuştur.

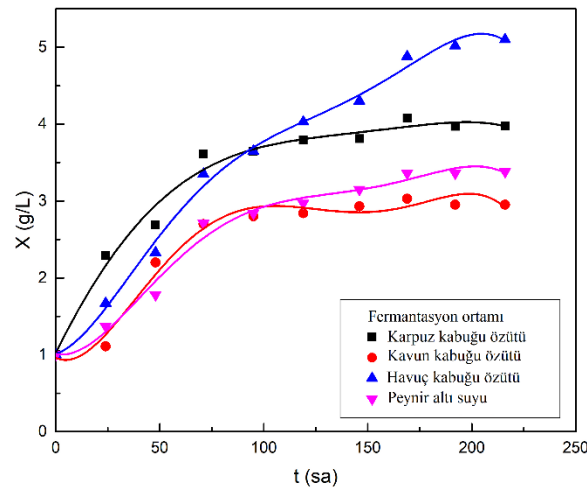


Şekil 4.135. Karpuz, kavun ya da havuç kabuğu özütleri veya peynir altı suyunun tek başına fermentasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

Karpuz veya kavun kabuğu özütünün, tek başına, fermentasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; en yüksek pullulan derişimleri, sırasıyla; 3.53 ve 3.02 g/L olarak, fermentasyonun 146. saatinde elde edilmiştir.

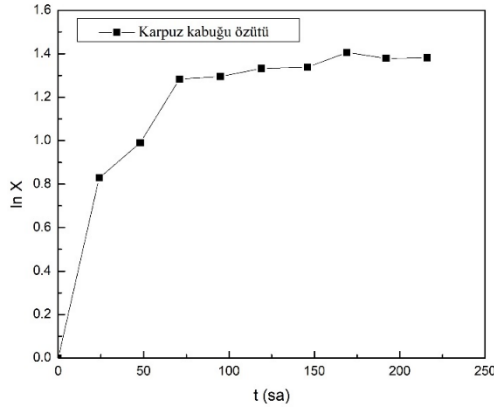
Havuç kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneydeki en yüksek pullulan derişimi, 4.23 g/L olarak, fermentasyonun 169. saatinde; peynir altı suyunun fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneydeki en yüksek pullulan derişimi ise; 1.29 g/L olarak, fermentasyonun 48. saatinde elde edilmiştir. Peynir altı suyunun fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmada, fermentasyonun ikinci gününden sonra ise, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretmediği tespit edilmiştir.

Farklı doğal substrat kaynaklarının fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.136'da sunulmuştur. Karpuz ve kavun kabuğu özütlerinin fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmalarda, en yüksek biyokütle derişimleri, sırasıyla; 4.08 ve 3.03 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatinde elde edilmiştir. Doğal fermantasyon ortamı olarak sadece havuç kabuğu özütünün veya peynir altı suyunun kullanıldığı deneylerde; *A. pullulans* AZ-6 suşuna ait en yüksek biyokütle derişimleri ise; sırasıyla; 5.02 ve 3.36 g/L olarak, fermantasyonun 192. saatinde elde edilmiştir.

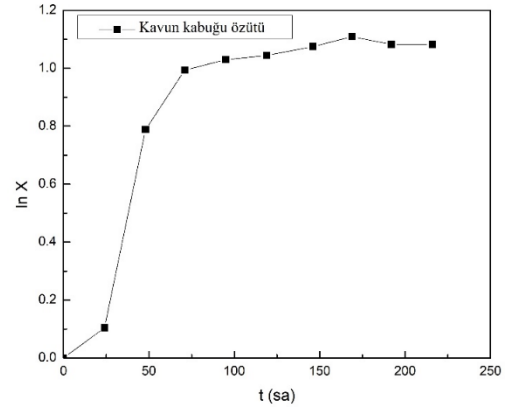


Şekil 4.136. Karpuz, kavun ya da havuç kabuğu özütleri veya peynir altı suyunun tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

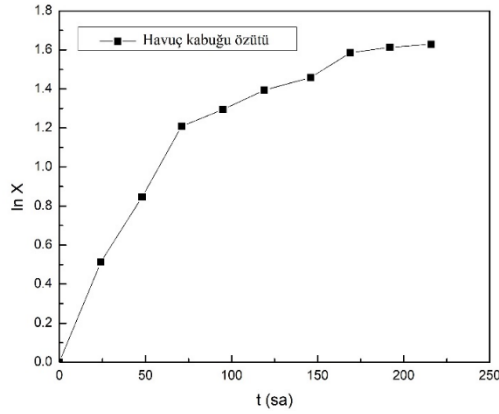
Bu çalışmadaki deneylerde kullanılan, her bir doğal fermantasyon ortamı için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla; $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.137) yararlanılmıştır. Karpuz, kavun ve havuç kabuğu özütleri ile peynir altı suyunun, ayrı ayrı, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneyler için, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları (μ) sırasıyla; 0.035, 0.029, 0.021 ve 0.018 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.



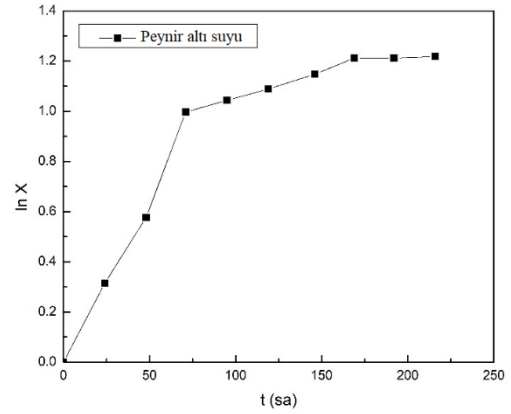
(a)



(b)



(c)



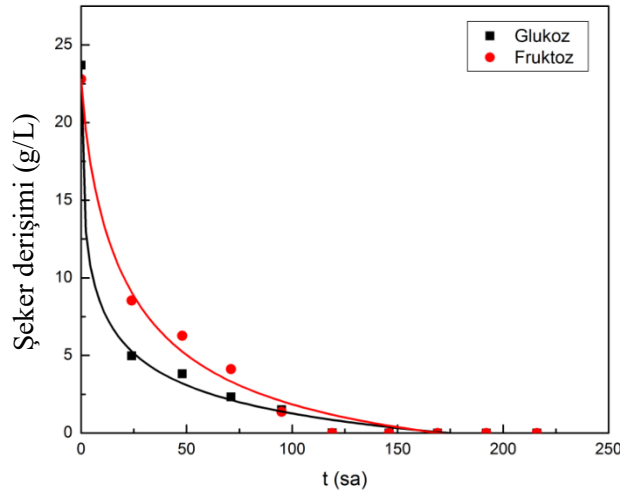
(d)

Şekil 4.137. Doğal substrat kaynağı olarak; (a): karpuz kabuğu özütü, (b): kavun kabuğu özütü, (c): havuç kabuğu özütü ve (d): peynir altı suyunun, tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

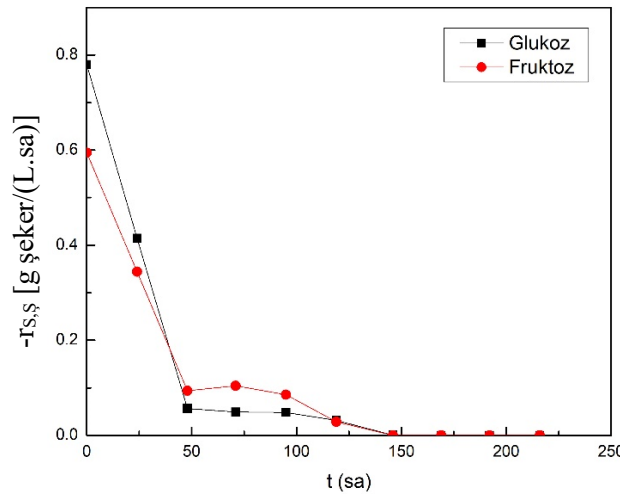
Bu çalışmadaki deneyler için özgül pullulan oluşum hızları da hesaplanmıştır. Karpuz veya havuç kabuğu özütlerinin tek başlarına, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde; en yüksek özgül ürün oluşum hızları; fermantasyonun 24. saatinde sırasıyla, 0.368 ve 0.363 g pullulan/(g mo.sa) olarak elde edilmiştir. Kavun kabuğu özütü veya peynir altı suyunun tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde ise, en yüksek özgül ürün oluşum hızları, fermantasyonun 48. saatinde, 0.368 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Bu gruptaki deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki bazı şekerlerin derişimlerinin ve bu şekerlerin tüketim hızlarının zamanla değişimleri de izlenmiştir. Kavun kabuğu özütünün

fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.138’de verilmiştir. Söz konusu grafikler incelendiğinde; ortamdaki glukoz ve fruktozun her ikisinin de fermentasyonun 119. saatinde, tamamen tüketildikleri bulunmuştur. Kavun kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.139’da sunulmuştur.



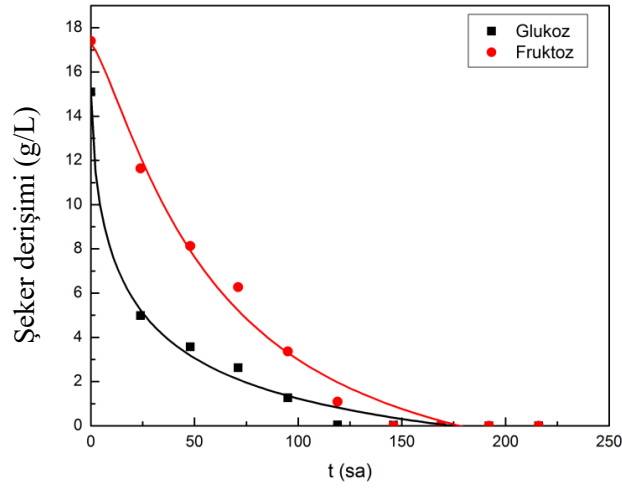
Şekil 4.138. Kavun kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri



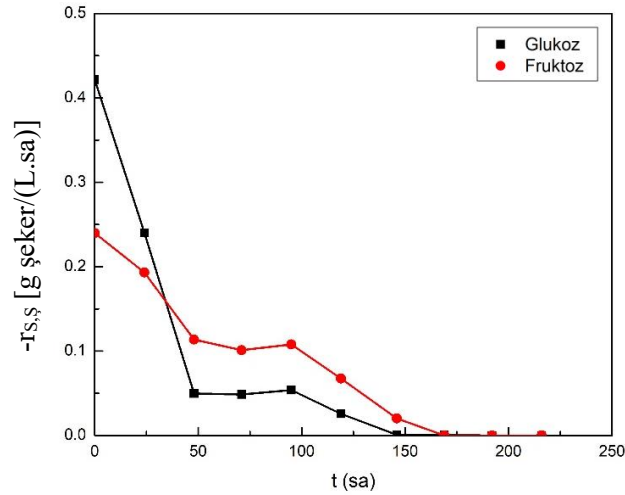
Şekil 4.139. Kavun kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz ve fruktozun tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Söz konusu deneyde, en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızları, sırasıyla; 0.78 g glukoz/(L.sa) ve 0.59 g fruktoz/(L.sa) olarak, fermentasyonun başlangıcında elde edilmiştir.

Karpuz kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.140'da; mikroorganizmanın ortamdaki glukoz ve fruktozu tüketim hızlarının zamanla değışimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.141'de verilmiştir.



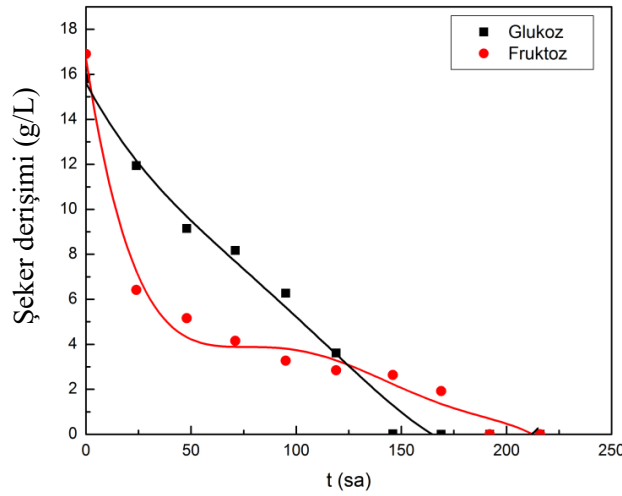
Şekil 4.140. Karpuz kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değışimleri



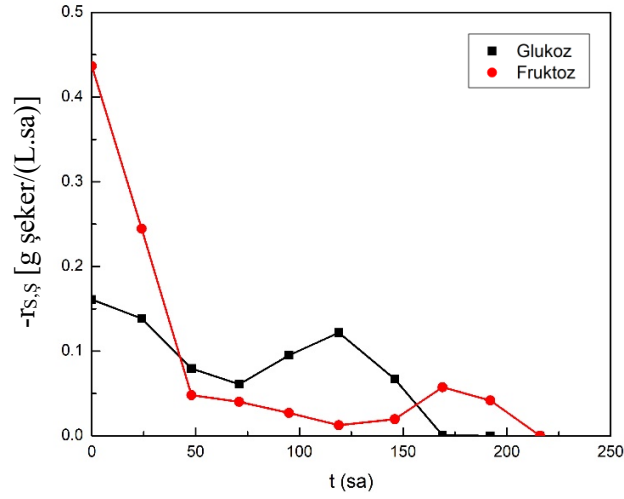
Şekil 4.141. Karpuz kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz ve fruktozun tüketim hızlarının zamanla değışimleri

Bu deneyde; ortamdaki glukoz ve fruktozun her ikisinin de; fermentasyonun 146. saatinde tamamen tüketildikleri belirlenmiştir (Şekil 4.140). Şekil 4.141 incelendiğinde ise; ortamdaki en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının, fermentasyonun başlangıcında, sırasıyla; 0.42 g glukoz/(L.sa) ve 0.24 g fruktoz/(L.sa) olduğu görülmüştür.

Havuç kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.142’de verilmiştir. Söz konusu grafikler incelendiğinde ortamdaki glukozun ve fruktozun sırasıyla; fermentasyonun 164. ve 216. saatinde tamamen tüketildikleri tespit edilmiştir. Havuç kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.143’de sunulmuştur. Söz konusu deneyde, en yüksek glukoz ve fruktoz tüketim hızları sırasıyla; 0.16 g glukoz/(L.sa) ve 0.44 g fruktoz/(L.sa) olarak, fermentasyonun başlangıcında hesaplanmıştır.

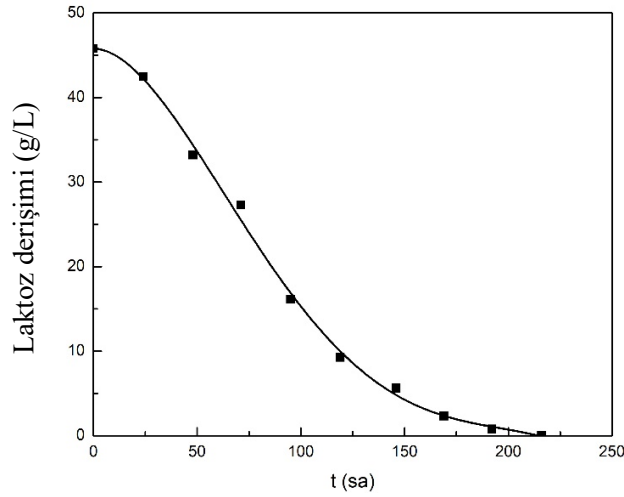


Şekil 4.142. Havuç kabuğu özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz ve fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

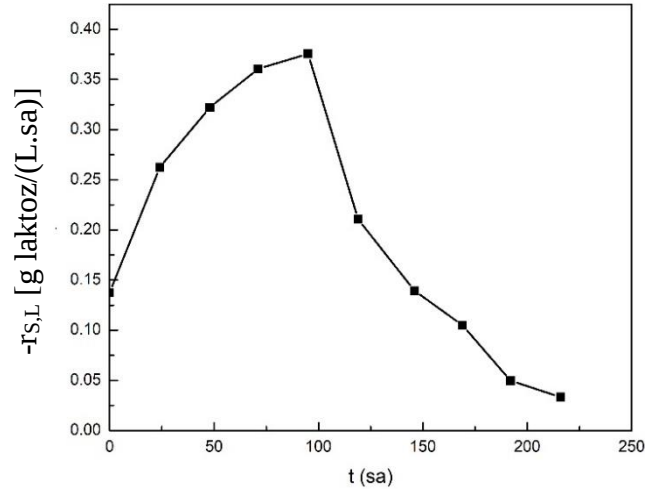


Şekil 4.143. Havuç kabuğu özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, glukoz ve fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Peynir altı suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ise; fermantasyon ortamındaki laktozun (Şekil 4.144), *A. pullulans* AZ-6 tarafından, fermantasyonun 216. saatinde tamamen tüketildiği bulunmuştur. Söz konusu deneyde, fermantasyonun başlangıcında düşük olan laktoz tüketim hızının önce zamanla arttığı, en yüksek değerine 0.38 g laktoz/(L.sa) olarak; fermantasyonun 95. saatinde ulaştığı ve daha sonra ise; hızla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.145).

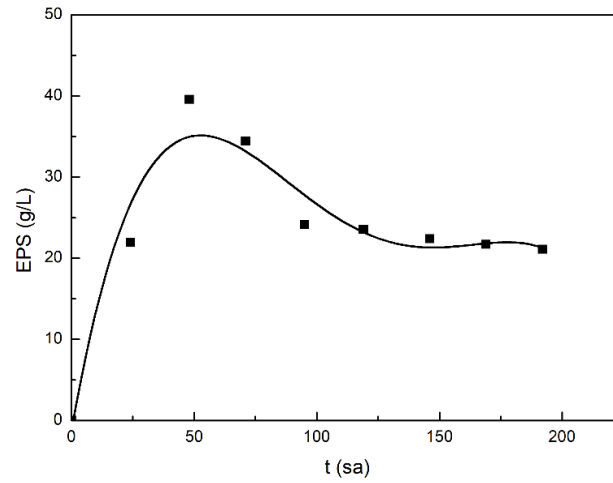


Şekil 4.144. Peynir altı suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki laktoz derişiminin zamanla değişimi



Şekil 4.145. Peynir altı suyunun fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, laktozun tüketim hızının zamanla değişimi

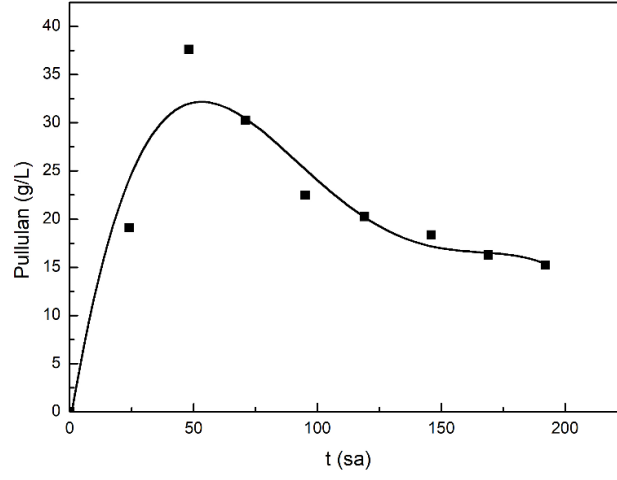
Bu çalışmada son olarak, tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde; *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretim özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak, söz konusu fermantasyon ortamındaki EPS derişiminin zamanla değişimi incelenmiştir (Şekil 4.146). Bu deneydeki, en yüksek EPS derişimi; 39.6 g/L olarak, fermantasyonun 48. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.146. Fermantasyon ortamı olarak tatlı patates özütünün kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS derişiminin zamanla değişimi

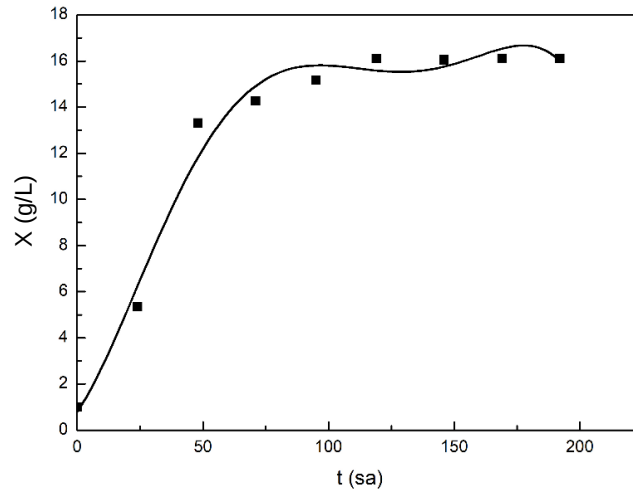
Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki pullulan derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 4.147'de verilmiştir. Bu

deneydeki en yüksek pullulan derişimi; 37.62 g/L olarak, fermentasyonun 48. saatinde elde edilmiştir.



Şekil 4.147. Tatlı patates özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen pullulan derişiminin zamanla değışimi

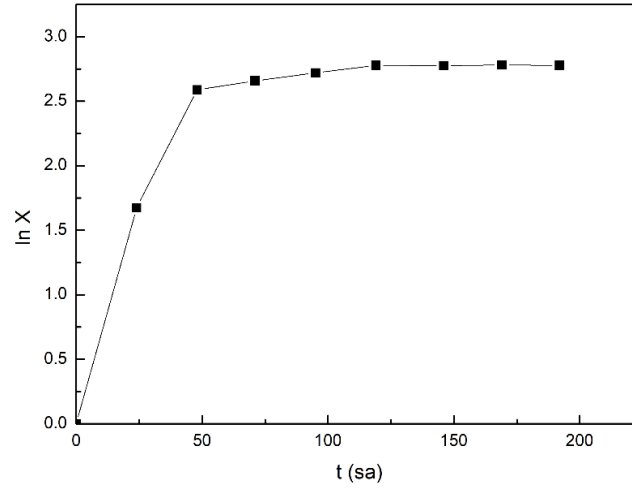
Tatlı patates özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, biyokütle derişiminin zamanla değışimini gösteren grafik; Şekil 4.148’de sunulmuştur.



Şekil 4.148. Tatlı patates özütünün fermentasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, biyokütle derişiminin zamanla değışimi

Bu deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun biyokütle derişiminin, fermentasyonun 48. saatine kadar hızla arttığı, daha sonra ise çok fazla değışmediği bulunmuştur.

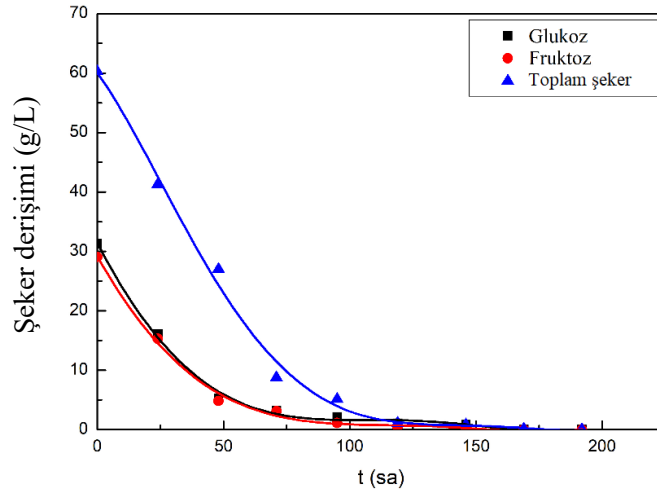
Bu çalışmadaki en yüksek biyokütle derişimi; 16.12 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatinde elde edilmiştir. Bu çalışmada, biyokütle derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik kullanılarak hesaplanan $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimini gösteren bir grafik çizilmiş (Şekil 4.149) ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızı hesaplanmıştır. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı, μ ; 0.070 sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.149. Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri

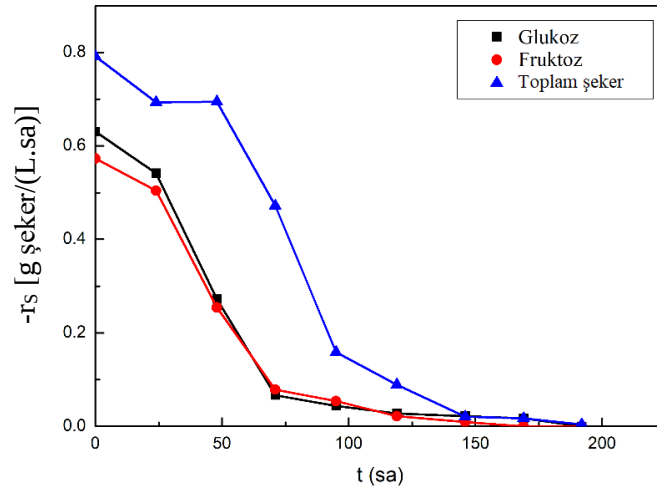
Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi ile ilgili maksimum özgül ürün oluşum hızı değeri de hesaplanmıştır. Bu çalışmada, en yüksek özgül ürün oluşum hızı, ν_m , 0.796 g pullulan/(g mo.sa) olarak fermantasyonun 24. saatinde elde edilmiştir.

Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, ortamdaki glukoz, fruktoz ve sakkaroz cinsinden toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.150’de verilmiştir. Bu çalışmada, fermantasyon ortamındaki fruktozun fermantasyonun; 146.; glukoz ve toplam şekerin ise, 169. saatinde tamamen tüketildikleri bulunmuştur.



Şekil 4.150. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki glukoz, fruktoz ve toplam şeker derişimlerinin zamanla değişimleri

Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde, *A. pullulans* AZ-6 suşunun ortamdaki glukoz, fruktoz ve toplam şeker tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.151’de sunulmuştur. Bu deneyde; glukoz, fruktoz ve toplam şeker için en yüksek tüketim hızları ise, sırasıyla; 0.63 [g glukoz/(L.sa)], 0.57 [g fruktoz/(L.sa)] ve 0.79 [g toplam şeker/(L.sa)] olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.151. Tatlı patates özütünün fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ortamdaki glukoz, fruktoz ve toplam şeker tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Çeşitli doğal substrat kaynaklarının, ayrı ayrı, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve en yüksek özgül ürün oluşum hızları; Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Bazı gıda endüstrisi atık ve yan ürünleri ile çeşitli meyve ve sebze atıklarının, ön işlemlerden geçirildikten sonra fermantasyon ortamı temel bileşeni (bkz. Bölüm 4.7) ya da doğrudan fermantasyon ortamı (bkz. Bölüm 4.8) olarak kullanıldıkları deneylerden elde edilen sonuçlar birlikte incelendiğinde; en yüksek EPS (39.6 g/L) ve pullulan (37.62 g/L) derişimlerinin; tatlı patates özütünün tek başına doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edildiği tespit edilmiştir. Tatlı patates özütünün, optimum fermantasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenler ile kullanıldığı deneylerde ise, elde edilen en yüksek EPS ve pullulan derişimleri sırasıyla; 10.63 ve 8.24 g/L olarak tayin edilmiştir. Kavun, karpuz veya soğan kabuğu özütleri, şeker pancarı özütü ya da peynir altı suyunun kullanıldıkları deneylerde, ortamlara azot kaynakları, mineraller ve tuz ilavesinin, elde edilen EPS ve pullulan derişimlerini arttırdığı tespit edilmiştir. Bunun aksine, üzüm posası veya tatlı patates özütleri ya da melas çözeltisinin doğrudan yalnız başlarına fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, elde edilen EPS ve pullulan derişimlerinin, sakkaroz dışındaki diğer ortam bileşenleri ile birlikte kullanıldıklarında elde edilen EPS ve pullulan derişimlerinden daha yüksek oldukları belirlenmiştir.

Doğal substrat kaynakları ile gerçekleştirilen deneylerde, *A. pullulans* AZ-6’ya ait en yüksek biyokütle derişimleri; 16.12 ve 14.67 g/L olarak sırasıyla; tatlı patates özütü ve melas çözeltisinin doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları koşullarda elde edilmiştir. Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6, en yüksek özgül üreme hızına (0.078 sa^{-1}); şeker pancarı küspesi özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde ulaşmış, bunu ise sırasıyla; tatlı patates özütü (0.076 sa^{-1}) ve karpuz kabuğu özütünün (0.073 sa^{-1}) sakkaroz dışındaki diğer bileşenler ile birlikte kullanıldıkları deneyler izlemiştir. Doğal substrat kaynaklarının kullanıldıkları deneylerdeki en yüksek özgül ürün oluşum hızı; $0.796 \text{ [g pullulan/(g mo.sa)]}$ olarak, tatlı patates özütünün doğrudan fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı durumda elde edilmiştir.

Çizelge 4.15. Çeşitli doğal substrat kaynaklarının, ayrı ayrı, fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları deneylerde, fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve en yüksek özgül ürün oluşum hızları

Fermantasyon ortamı olarak kullanılan doğal substrat kaynağı	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]
Kavun kabuğu özütü	3.29	3.03	3.03	0.029	0.368
Karpuz kabuğu özütü	4.18	3.53	4.08	0.035	0.368
Üzüm posası özütü	15.42	14.80	5.35	0.056	0.087
Melas çözeltisi	19.05	18.67	14.67	0.042	0.042
Peynir altı suyu	2.18	1.29	3.36	0.018	0.368
Tatlı patates özütü	39.60	37.62	16.12	0.070	0.796
Şeker pancarı küspesi özütü	2.87	2.61	2.70	0.078	0.054
Soğan kabuğu özütü	5.69	5.41	5.73	0.037	0.146
Havuç kabuğu özütü	4.89	4.23	5.02	0.021	0.363

Literatürdeki bazı çalışmalarda, pullulan üretimi için fermantasyon ortamlarında çeşitli doğal substrat kaynaklarının doğrudan ya da bazı bileşenler ilave edilerek fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları belirtilmektedir [66, 170]. Israilides ve ark. [66] tarafından yapılan bir araştırmada; fermantasyon ortamlarında, doğal substrat kaynakları olarak; üzüm kabuğu posası özütü, hidrolize nişasta atığı, melas ve zeytinyağı fabrikası atıklarının kullanıldığı ve deneylerde kullanılan; *A. pullulans* NRRLY 6220 suşunun, bu ortamlardaki pullulan üretim özelliklerinin incelendiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada, söz konusu doğal substrat kaynaklarının her birinin tek başına ya da farklı bileşenler de ilave edildikten sonra fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları rapor edilmiştir. Söz konusu

araştırmada; fermantasyon deneylerinin; 28°C’de, 200 rpm çalkalama hızında çalışan su banyolarında gerçekleştirildiği ve 7 günde tamamlandığı bildirilmiştir. Anılan çalışmada, üzüm kabuğu posası özütünün tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen, en yüksek EPS derişiminin; 22.3 g/L; üzüm kabuğu posası özütüne, derişimi %0.2 olacak şekilde maya özütü ilave edilerek hazırlanan bir diğer fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek EPS derişiminin ise; 21.0 g/L olduğu rapor edilmiştir. Bu araştırmada; nişasta atığının tek başına fermantasyon ortamı olarak kullanıldığı deneyde elde edilen en yükek EPS derişiminin, 18.8 g/L; nişasta atığına sırasıyla; derişimi %0.2 olacak şekilde maya özütü veya her birinin derişimi %0.2 olacak şekilde NH_4NO_3 ve K_2HPO_4 ilave edilerek hazırlanan fermantasyon ortamlarında yapılan çalışmada elde edilen EPS derişimlerinin ise sırasıyla; 24.0 ve 30.8 g/L olduğu ifade edilmiştir. Anılan çalışmada ayrıca, zeytinyağı fabrikası atıklarının doğal substrat kaynağı olarak kullanıldığı deneylerde elde edilen EPS derişiminin, ortama hiçbir bileşen ilave edilmediğinde; 7.9 g/L; ortama %0.1 derişimlerinde; NH_4NO_3 ve K_2HPO_4 ilave edildiğinde; 10.7 g/L; ortama; %0.1 derişimlerinde; NH_4NO_3 ve K_2HPO_4 ile melas ilave edildiğinde ise, 4.2 g/L olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, fermantasyon ortamı olarak sadece melas kullanıldığında elde edilen EPS derişiminin ise; 6.0 g/L olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, doğal substrat kaynakları olarak nişasta atığı ve üzüm kabuğu posası özütünün kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında, elde edilen EPS’nin hemen hemen tamamının pullulan olduğu ve söz konusu ortamlarda, yüksek saflıkta EPS üretildiği de vurgulanmıştır [66].

Doğal substrat kaynağı olarak tatlı patates hidrolizatının kullanıldığı bir başka çalışmada ise, *A. pullulans* AP329 suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği belirtilmiştir. Anılan çalışmada, fermantasyon ortamlarında substrat olarak; tatlı patates hidrolizatından başka sakkaroz veya glukozun kullanıldığı deneylerin de yapıldığı ve elde edilen pullulan derişimlerine ait sonuçların birbirleri ile karşılaştırıldıkları ifade edilmiştir. Bu deneylerde kullanılan substratlara ek olarak, fermantasyon ortamlarına maya özütü, KH_2PO_4 , KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve NaCl’ün de ilave edildiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada; 28°C’de gerçekleştirilen deneylerde; glukoz, sakkaroz ve tatlı patates hidrolizatı içeren fermantasyon ortamlarında elde edilen pullulan derişimlerinin birbirlerine oldukça yakın ve sırasıyla; 95.01, 95.07 ve 95.18 g/L oldukları bildirilmiştir [121].

4.9. UV Mutasyonun *A. pullulans* AZ-6 Suşunun Pullulan Üretimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında, farklı dozlarda UV ışını uygulamasının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun, pullulan üretim özellikleri üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla, Bölüm 3.2.17’de anlatıldığı gibi hazırlanan *A. pullulans* AZ-6 hücre çözeltileri, 8, 15 ve 30 W gücündeki, 254 nm dalga boyuna sahip UV kaynakları altında, her bir UV kaynağına 15 cm mesafede, 5, 10, 20 ve 30 dakika sürelerle bekletilmişlerdir. Bu çalışmada ilk olarak, kullanılan UV ışını uygulamalarının, *A. pullulans* AZ-6 suşu üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla; her bir uygulama için, ölüm oranları (%), daha önce Bölüm 3.2.17’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Çizelge 4.16’da; bu deneylerde kullanılan UV uygulamaları ile *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç ve uygulama sonrası tespit edilen hücre derişimleri ve hesaplanan ölüm oranları (%) verilmektedir.

Çizelge 4.16. UV mutasyonu deneylerinde kullanılan UV doz ve süreleri ile, uygulama öncesi ve sonrası tespit edilen sayım sonuçları ve hesaplanan ölüm oranları

Deneylerde kullanılan UV doz ve süreleri	Başlangıç hücre derişimi [log (kob/mL)]	UV uygulaması sonrası hücre derişimi [log (kob/mL)]	Ölüm oranları (%)
8 W / 5 dk	6.08	4.34	98.17
8 W / 10 dk	5.86	2.85	99.90
8 W / 20 dk	6.00	3.20	99.83
8 W / 30 dk	6.20	2.78	99.96
15 W / 5 dk	6.00	2.60	99.96
15 W / 10 dk	5.85	3.00	99.86
15 W / 20 dk	5.84	2.90	99.88
15 W / 30 dk	5.93	2.30	99.98
30 W / 5 dk	6.34	5.68	78.18
30 W / 10 dk	6.53	4.45	99.18
30 W / 20 dk	6.04	4.69	95.55
30 W / 30 dk	6.11	4.30	98.46

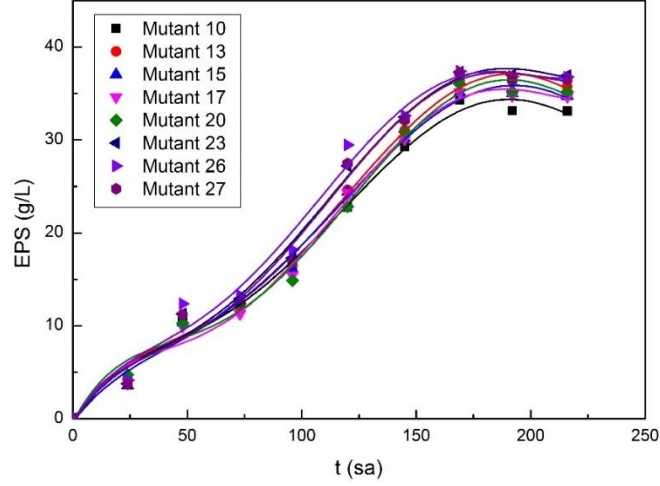
Çizelge 4.16 incelendiğinde; deneylerde gerçekleştirilen UV uygulamaları sonucunda hesaplanan ölüm oranlarının; %78.18-99.98 aralığında değiştiği görülmektedir. Çalışmada, 8 W'lık UV kaynağı kullanılarak yapılan deneylerde, en düşük ölüm oranı (%98.17); 5 dakikalık, en yüksek ölüm oranı (%99.96) ise; 30 dakikalık uygulama sonucunda elde edilmiştir. Araştırmada, 15 W gücünde bir UV kaynağı kullanıldığında ise; tüm uygulama sürelerinde elde edilen ölüm oranlarının (%99.86-%99.98) birbirlerine oldukça yakın oldukları, en yüksek ölüm oranına ise, en uzun uygulama süresi olan 30 dakika sonra ulaşıldığı tespit edilmiştir. Çizelge 4.16 incelendiğinde ayrıca, 30 W gücünde UV kaynağının kullanıldığı deneylerde, en kısa uygulama süresi olan 5 dakikanın, diğer uygulama sürelerine kıyasla kültürlerde daha düşük oranda (%78.18) ölüme sebep olduğu görülmektedir. 30 W'lık UV kaynağının kullanıldığı deneylerde, 10, 20 ve 30 dakikalık uygulama sonrasında ise, ölüm oranları sırasıyla; %99.18, %95.55 ve %98.46 olarak elde edilmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde, farklı dozlardaki UV uygulamalarından sonra elde edilen kültürlerden, Bölüm 3.2.17'de anlatıldığı şekilde 13 suş seçilmiştir. Seçilen suşların pullulan üretim yeteneklerinde bir değişim olup olmadığının anlaşılabilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneyler, daha önce belirlenmiş olan optimum koşullarda (bkz. Bölüm 4.6) gerçekleştirilmiştir. Deneyler; iki grup halinde yapılmıştır.

İlk gruptaki deneylerde kullanılan ve mutant 10, 13, 15, 17, 20, 23, 26 ve 27 olarak kodlanan suşların fermantasyon ortamlarındaki başlangıç inokülasyon derişimlerinin 2.7×10^7 - 5.0×10^7 aralığında değiştikleri belirlenmiştir. İncelenen suşların ürettikleri EPS derişimlerinin, zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.152'de sunulmuştur.

Bu grafikler incelendiğinde, EPS üretimleri araştırılan tüm suşların, fermantasyon süresince oldukça benzer miktarlarda üretim yaptıkları belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde, olası mutant suşlar tarafından üretilen maksimum EPS derişimlerinin de birbirlerine çok yakın oldukları, 26, 23 ve 27 no.lu suşların ürettikleri maksimum EPS derişimlerinin sırasıyla; 37.38, 37.30 ve 37.15 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatinde elde edildiği belirlenmiştir. Çalışmada 13, 20, 17 ve 15 no.lu olası mutant suşların kullanıldıkları deneylerde ise, en yüksek EPS derişimleri sırasıyla; 36.30, 36.01, 35.17 ve

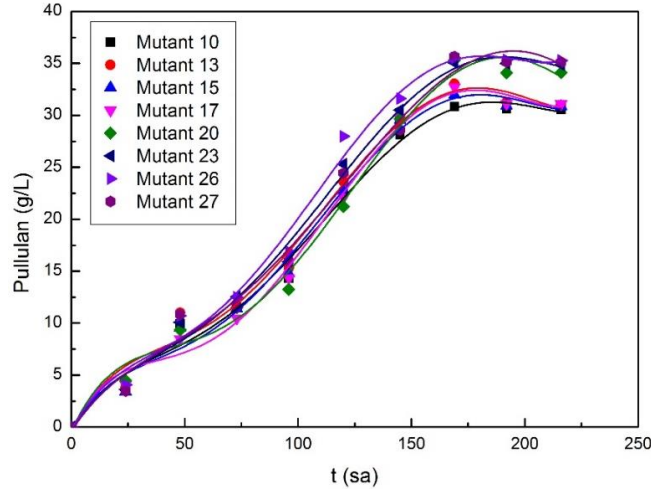
35.12 g/L olarak yine, fermantasyonun 169. saatinde elde edilmiştir. İlk gruptaki deneylerde en düşük EPS derişiminin; 34.27 g/L olarak, 10 no.lu olası mutant suş ile elde edildiği tespit edilmiştir.



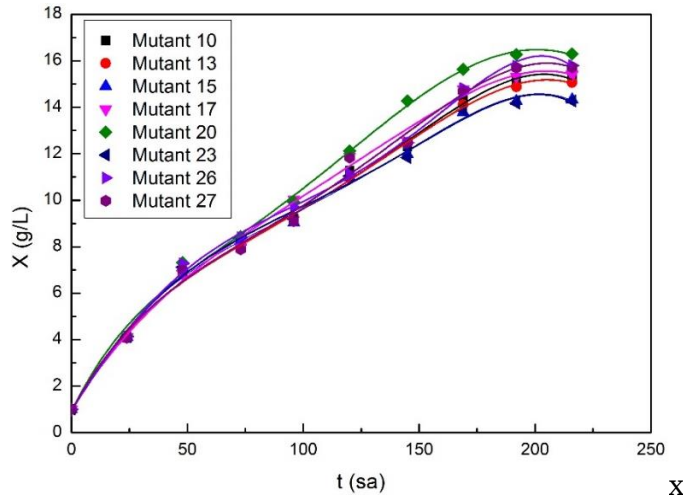
Şekil 4.152. İlk gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylerde kullanılan suşlar tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.153’de verilmiştir. Fermantasyon süresince elde edilen en yüksek pullulan derişiminin, 27 no.lu suşun kullanıldığı deneyde; 35.66 g/L olarak, fermantasyonun 169. saatine elde edildiği belirlenmiştir. 26, 20, 23, 13, 17, 15 ve 10 no.lu olası mutant suşların kullanıldıkları deneylerdeki en yüksek pullulan derişimleri ise sırasıyla; 35.51, 35.29, 35.06, 33.03, 32.71, 31.96 ve 30.84 g/L olarak, yine fermantasyonun 169. saatinde belirlenmiştir.

İlk gruptaki deneylerde kullanılan suşlar ile gerçekleştirilen deneylerde, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.154’de sunulmuştur. Fermantasyon süresince tüm suşlardaki biyokütle derişimi artışlarının, benzer bir eğilim gösterdiği saptanmıştır. İncelenen tüm suşlar için en yüksek biyokütle derişimlerinin ise; fermantasyonun 216. saatinde elde edildiği tespit edilmiştir. Çalışmadaki, en yüksek biyokütle derişimi; 16.30 g/L olarak, 20 no.lu suş ile çalışıldığında, en düşük derişim (14.27 g/L) ise, 23 no.lu suş ile çalışıldığında elde edilmiştir.

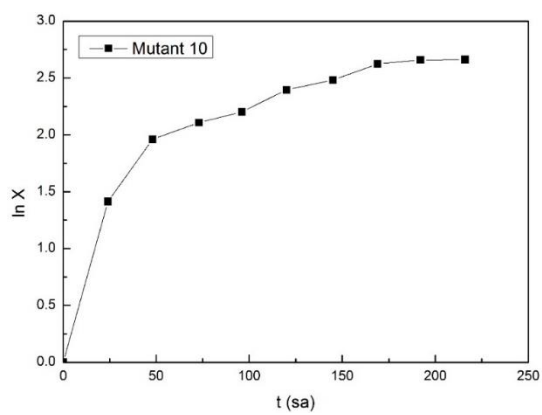


Şekil 4.153. İlk gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimleri

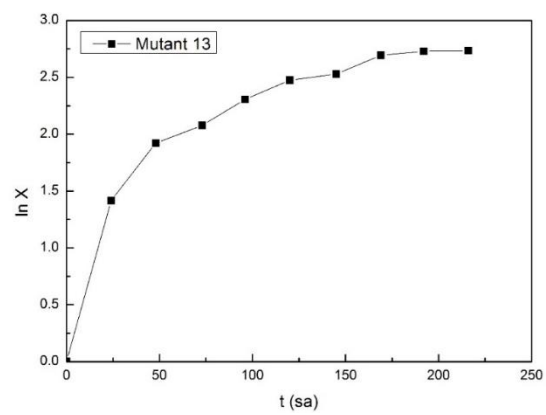


Şekil 4.154. İlk gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

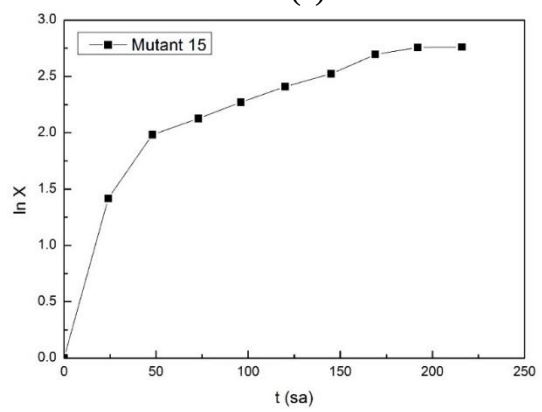
Bu çalışmada, UV mutasyon işlemi sonucunda elde edilen 10, 13 15, 17, 20, 23, 26 ve 27 no.lu olası mutant *A. pullulans* AZ-6 suşlarının, özgül üreme hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla, her bir olası mutant suş ile gerçekleştirilen deneyde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikler çizilmiş ve üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.155).



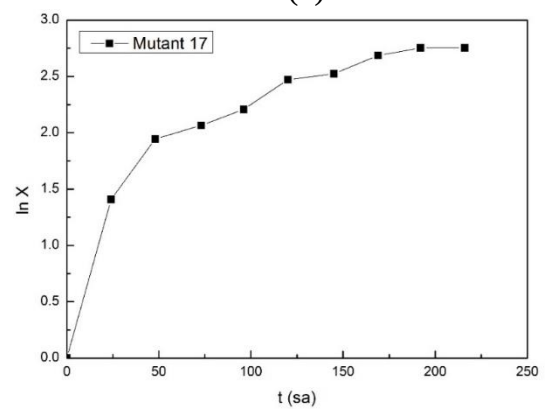
(a)



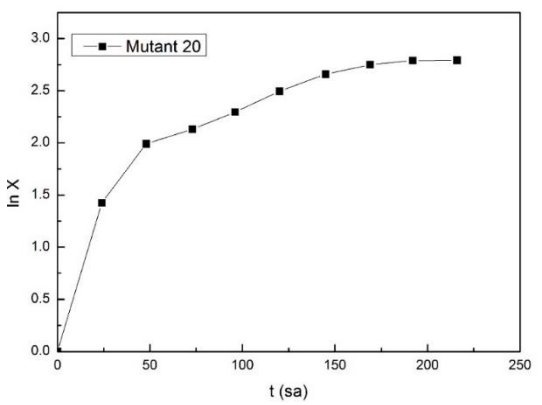
(b)



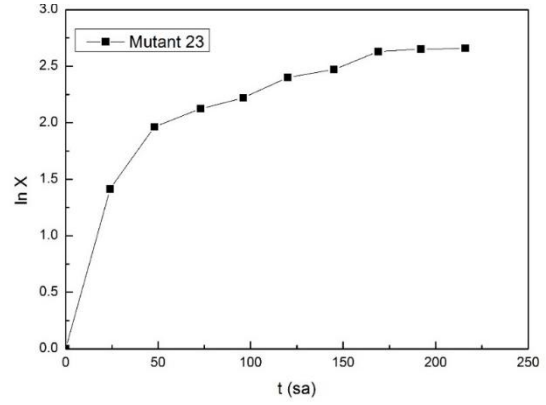
(c)



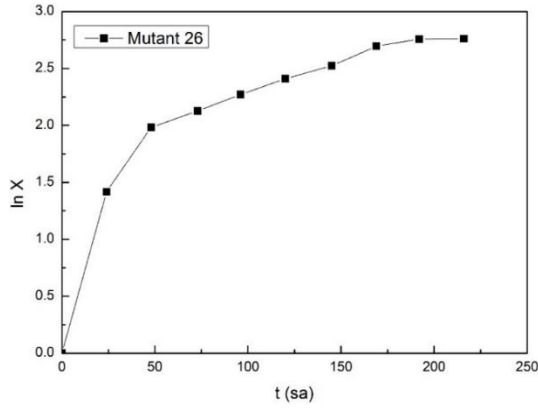
(d)



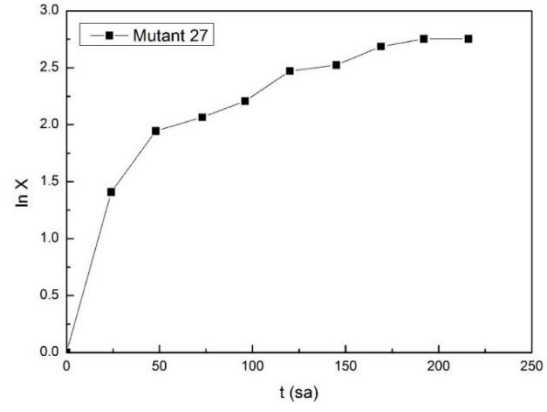
(e)



(f)



(g)



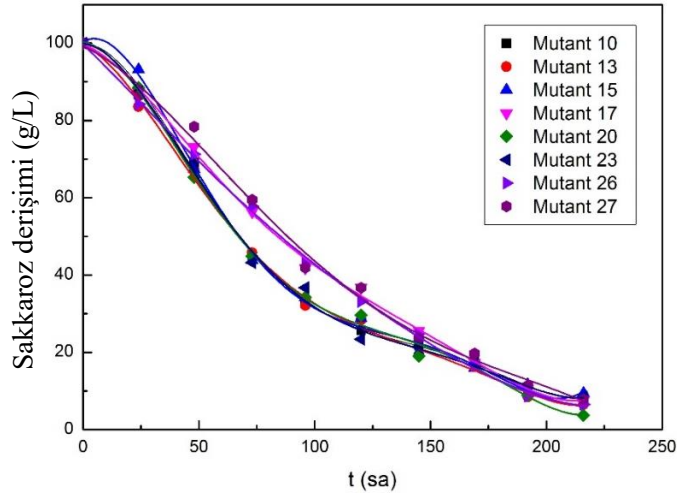
(h)

Şekil 4.155. İlk gruptaki deneylerde kullanılan ve pullulan üretim özellikleri incelenen *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının, $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimleri (a): Mutant 10, (b): Mutant 13, (c): Mutant 15, (d): Mutant 17, (e): Mutant 20, (f): Mutant 23, (g): Mutant 26 ve (h): Mutant 27

Birinci gruptaki deneylerde, pullulan üretimleri incelenen tüm suşların özgül üreme hızları; 0.059 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.

İlk gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının, pullulan üretimleri ile ilgili; en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerlerinin hesaplanabilmesi amacıyla; pullulan (Şekil 4.153) ve biyokütle (Şekil 4.154) değişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılmıştır. Bu çalışmadaki en yüksek özgül ürün oluşum hızları, μ_m , fermantasyonun 24. saatinde, 10, 15 ve 27 no.lu mutant suşlar için; 0.035, 17 ve 26 no'lu mutant suşlar için; 0.041 ve 13, 20 ve 23 no.lu mutant suşlar için ise, sırasıyla; 0.039, 0.045 ve $0.037 \text{ g pullulan/(g mo.sa)}$ olarak hesaplanmıştır.

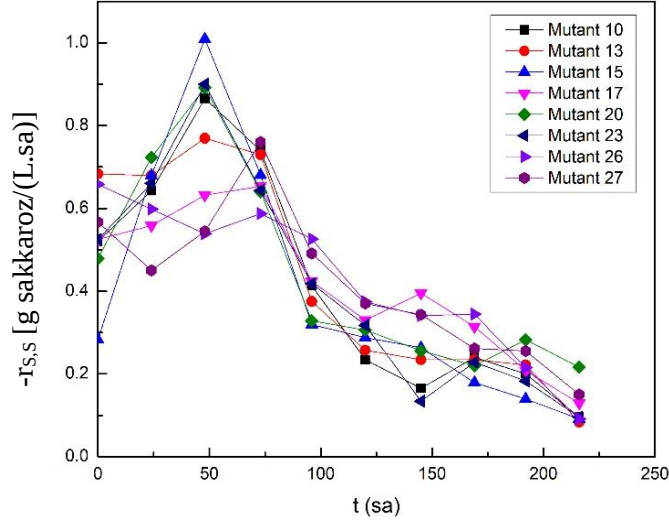
Bu kapsamdaki deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz değişimlerinin zamanla değişimleri de izlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.156'da sunulmuştur. 17, 26 ve 27 no.lu ve 10, 13, 15, 20 ve 23 no.lu olası mutant suşların kullanıldıkları deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz değişimlerinde, fermantasyon süresince birbirine benzer değişimlerin olduğu ve tüm deneylerde fermantasyon sonunda bir miktar sakkarozun ortamda tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.156. İlk gruptaki deneyler için, farklı *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarını içeren fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri

İlk gruptaki deneylerde kullanılan suşların, fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.157’de sunulmuştur. 10, 13, 15, 20 ve 23 no.lu suşların en yüksek sakkaroz tüketim hızları, sırasıyla; 0.87, 0.77, 1.00, 0.89 ve 0.90 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 48. saatinde; 17 ve 27 no.lu suşların en yüksek sakkaroz tüketim hızları, sırasıyla; 0.65 ve 0.76 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun 73. saatinde ve 26 numaralı mutant suşun en yüksek sakkaroz tüketim hızı ise; 0.66 g sakkaroz/(L.sa) olarak, fermantasyonun başlangıcında elde edilmiştir. İlk gruptaki deneylerde kullanılan suşlar içerisinde, sakkaroz tüketim hızı en yüksek olan suşun, 15 no.lu suş olduğu tespit edilmiştir.

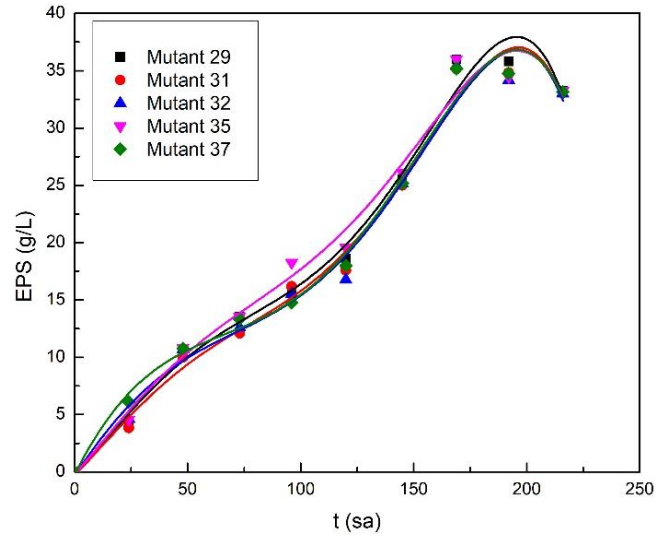
Bu kapsamdaki ikinci çalışmada ise; 29, 31, 32, 35 ve 37 no.lu olası mutant *A. pullulans* AZ-6 suşlarının pullulan üretim özellikleri araştırılmıştır. Bu deneylerde kullanılan, olası mutant suşların başlangıç inokülasyon derişimlerinin; 6.9×10^7 - 8.3×10^7 kob/mL aralığında değiştii tespit edilmiştir.



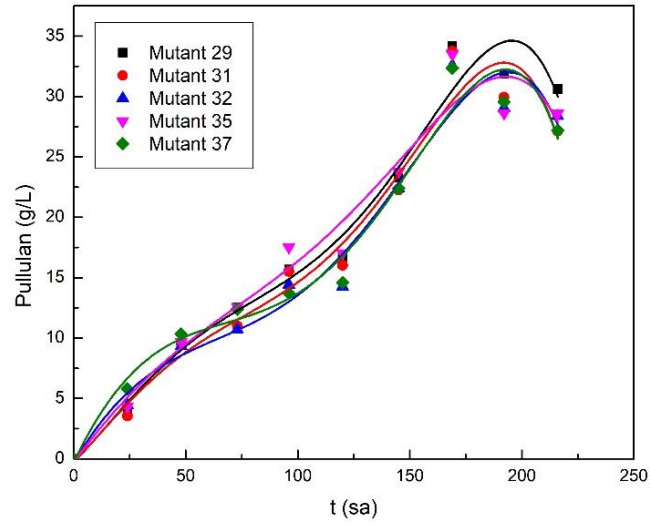
Şekil 4.157. İlk gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının, fermantasyon ortamlarındaki sakkarozu tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Bu deneylerde incelenen suşlar tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler, Şekil 4.158’de verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm suşların EPS üretimleri fermantasyon süresince birbirlerine çok yakın değerlerde olmakla birlikte en yüksek EPS derişiminin (36.01 g/L) 35 no.’lu suş tarafından, en düşük EPS derişiminin ise; 35.16 g/L olarak 31 ve 37 no.’lu suşlar tarafından üretildiği bulunmuştur. Söz konusu deneylerde, incelenen tüm kültürler için en yüksek EPS derişimlerinin, fermantasyonun 169. saatinde elde edildiği belirlenmiştir.

A. pullulans AZ-6’ya, UV mutasyonu uygulanması sonucunda elde edilmiş olan; 29, 31, 32, 35 ve 37 no.lu suşlar tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise, Şekil 4.159’da verilmiştir. Bu deneylerdeki, en yüksek pullulan derişimi; 34.18 g/L olarak, 29 no.lu kültürün kullanıldığı çalışmada elde edilmiştir. 31, 32, 35 ve 37 no.lu kültürler tarafından üretilen en yüksek pullulan derişimleri ise sırasıyla; 33.75, 32.59, 33.49 ve 32.35 g/L olarak, birbirlerine çok yakın değerlerde ve fermantasyonun 169. saatinde tayin edilmişlerdir.

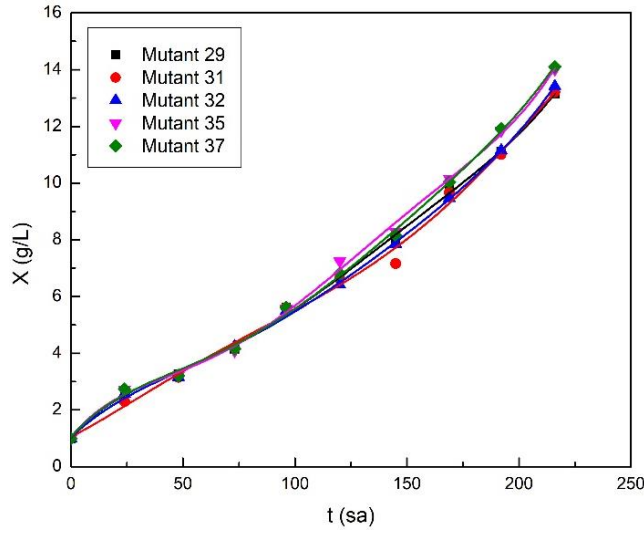


Şekil 4.158. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen EPS derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.159. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşları tarafından üretilen pullulan derişimlerinin zamanla değışimleri

Bu çalışmada biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri de izlenmiş ve elde edilen sonuçlar, Şekil 4.160'da gösterilmiştir. İncelenen tüm kültürlerin biyokütle derişimlerinin fermantasyon süresince artış gösterdikleri belirlenmiştir. 29, 31, 32, 35 ve 37 no.lu kültürler için en yüksek biyokütle derişimleri, fermantasyonun 216. saatinde sırasıyla; 13.16, 13.21, 13.42, 14.01 ve 14.10 g/L olarak tayin edilmiştir.

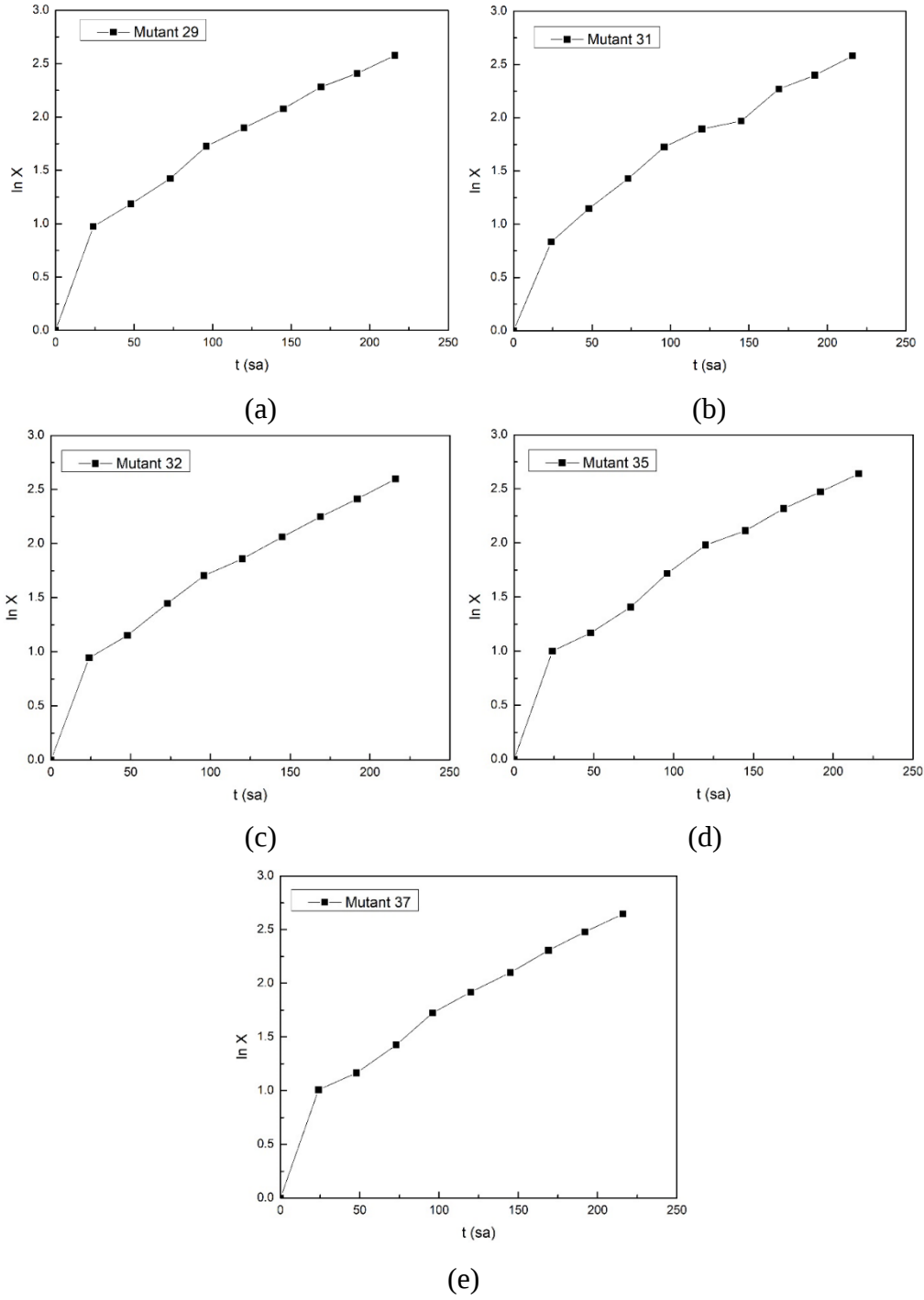


Şekil 4.160. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değışimleri

İkinci gruptaki deneylerde kullanılan suşların, özgül üreme hızlarının hesaplanabilmesi için; her bir suş için $\ln X$ değeriinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler (Şekil 4.161) çizilmiştir.

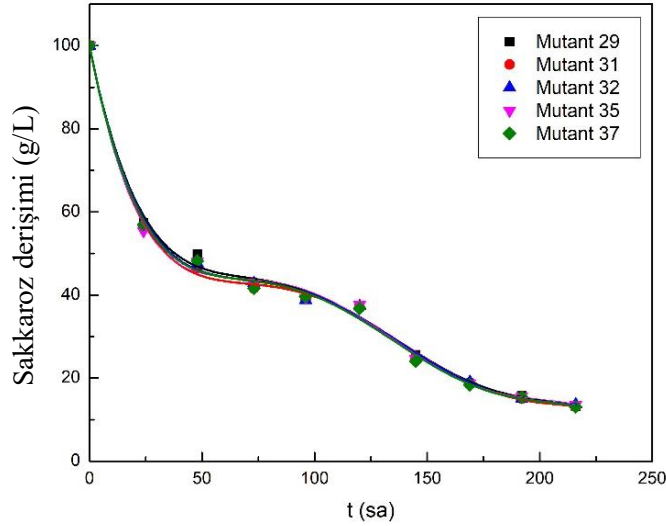
Elde edilen sonuçlara göre üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları; 29, 31 ve 32 no.lu suşlar için sırasıyla; 0.041, 0.035 ve 0.039 sa^{-1} ; 35 ve 37 no.lu suşlar için ise; 0.042 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır.

İkinci gruptaki deneylerde incelenen suşların özgül pullulan oluşum hızları da hesaplanmıştır. Bu deneylerde, 29, 31, 32, 35 ve 37 no.lu suşlar için en yüksek özgül ürün oluşum hızları, fermantasyonun 24. saatinde elde edilmiş olup; sırasıyla; 0.061, 0.064, 0.072, 0.066 ve 0.088 g pullulan/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.



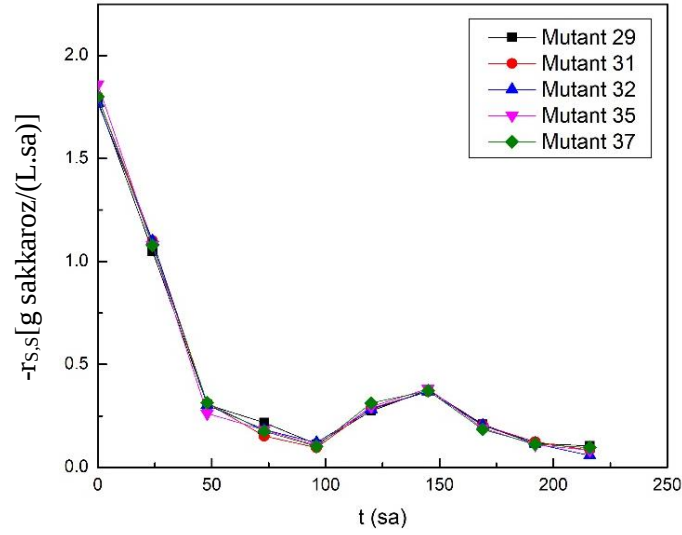
Şekil 4.161. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan ve pullulan üretim özellikleri incelenen *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının ln X değerlerinin zamanla değişimleri (a): Mutant 29, (b): Mutant 31, (c): Mutant 32, (d): Mutant 35 ve (e): Mutant 37

A. pullulans AZ-6 olası mutant suşları ile gerçekleştirilen ikinci gruptaki deneylerde ayrıca; fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri de izlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.162’de sunulmuştur. Bu deneylerde kullanılan fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimlerinin benzer bir eğilim gösterdikleri ve tüm deneylerde fermantasyon sonunda bir miktar sakkarozun ortamda tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.162. İkinci gruptaki deneyler için farklı *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarını içeren fermantasyon ortamlarındaki sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimleri

Substrat tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler ise; Şekil 4.163’de verilmiştir. 29, 31, 32, 35 ve 37 no.lu olası mutant suşlar için en yüksek substrat tüketim hızları, fermantasyonun başlangıcında elde edilmiş olup sırasıyla; 1.78, 1.80, 1.77, 1.86 ve 1.80 g sakkaroz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.163. İkinci gruptaki deneylerde kullanılan *A. pullulans* AZ-6 olası mutant suşlarının, fermantasyon ortamlarındaki sakkarozu tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Bu çalışmada, UV mutasyon uygulaması sonucunda elde edilmiş olan; 13 adet olası mutant *A. pullulans* suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği deneylerde, fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları, hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları ve en yüksek sakkaroz tüketim hızları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Söz konusu çizelge incelendiğinde, farklı dozlardaki UV uygulaması sonucunda elde edilen olası mutant suşlar arasında, en yüksek EPS derişiminin (37.38 g/L); 26 no.lu suş (15 W / 20 dak) ile, en yüksek pullulan derişiminin (35.66 g/L); 27 no.lu suş (15 W / 30 dak) ile, en yüksek biyokütle derişiminin (16.30 g/L) ise; 20 no.lu suş (8 W / 20 dak) ile elde edildiği görülmektedir. Çalışmada, 15 W gücündeki UV kaynağı ile gerçekleştirilen 20 ve 30 dakikalık UV uygulamalarının üretilen pullulan miktarını bir miktarda arttırdığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. UV mutasyon uygulaması sonucunda elde edilmiş olan 13 adet olası mutant *A. pullulans* suşunun pullulan üretim özelliklerinin incelendiği deneylerde, fermantasyon ortamlarında tayin edilen en yüksek EPS, pullulan ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları, hesaplanan en yüksek özgül ürün oluşum hızları ve en yüksek sakkaroz tüketim hızları

Mutant no.	En yüksek EPS derişimi (g/L)	En yüksek pullulan derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Özgül üreme hızı (sa ⁻¹)	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g pullulan/(g mo.sa)]	En yüksek substrat tüketim hızı [g sakkaroz/(L.sa)]
10	34.27	30.84	15.21	0.059	0.035	0.87
13	36.30	33.03	15.06	0.059	0.039	0.77
15	35.12	31.96	14.33	0.059	0.035	1.00
17	35.17	32.71	15.40	0.059	0.041	0.65
20	36.01	35.29	16.30	0.059	0.045	0.89
23	37.30	35.06	14.27	0.059	0.037	0.90
26	37.38	35.51	15.80	0.059	0.041	0.66
27	37.15	35.66	15.71	0.059	0.035	0.76
29	35.98	34.18	13.16	0.041	0.061	1.78
31	35.16	33.75	13.21	0.035	0.064	1.80
32	35.42	32.59	13.42	0.039	0.072	1.77
35	36.01	33.49	14.01	0.042	0.066	1.86
37	35.16	32.35	14.10	0.042	0.088	1.80

Çalışmanın bu aşamasında, 30 W'lık UV uygulaması sonucunda elde edilen 29, 31, 32, 35 ve 37 no.lu suşların özgül üreme hızlarının, diğer olası mutant suşlardan daha düşük olduğu da belirlenmiş, maksimum özgül üreme hızı (0.035 sa⁻¹) en düşük olan suşun; 31

no.lu suş (30 W / 10 dak) olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada, en yüksek özgül ürün oluşum hızına, 0.088 g pullulan/(g mo.sa) olarak, 37 no.'lu suşla (30 W / 30 dak), en yüksek substrat tüketim hızına ise; 1.86 g sakkaroz/(L.sa) olarak, 35 no.'lu suşla (30 W / 20 dak) ulaşılmıştır.

Literatürde yer alan bazı çalışmalarda, pullulan üretimi amacıyla incelenen *A. pullulans* suşlarının melanin üretimlerini engellemek ve/veya pullulan üretim kapasitelerini arttırmak amacıyla, UV ve/veya kimyasal mutasyon uygulamalarının kullanıldığı ifade edilmektedir [48, 117, 143].

Seo ve arkadaşları [143] tarafından yapılan bir çalışmada, *A. pullulans* ATCC 42023 suşunun UV mutanlığı olan; *A. pullulans* HP-2001 suşu ile çalışıldığı ve bazı fermentasyon parametrelerinin bu suşun pullulan üretimi üzerine, etkilerinin araştırıldığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, karbon kaynağı derişiminin pullulan üretimini etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu, fermentasyon ortamındaki yüksek glukoz derişimlerinin pullulan üretimini baskılayabildiği (katabolik represyon) ifade edilmiştir. Anılan çalışmada, pullulan üretiminde, katabolik represyona karşı dirençli mutant suşların kullanılmalarının önemi vurgulanırken, kullanılan *A. pullulans* HP-2001 suşunun da katabolik represyona karşı dirençli olduğu ve glukoz derişimi %20 (w/v)'ye kadar olan fermentasyon ortamlarında pullulan üretebildiği rapor edilmiştir [143].

Literatürde yer alan bir başka araştırmada ise; melanin üreten *A. pullulans* A.p.-3 suşu ve bu suşa kimyasal ve UV mutasyonun birlikte uygulanması sonucunda elde edilmiş olan *A. pullulans* B-1 suşu ile çalışıldığı belirtilmiştir [48]. Bu çalışmada, *A. pullulans* A.p.-3 ve mutant *A. pullulans* B-1 suşlarının, bileşiminde karbon kaynağı olarak sakkaroz, azot kaynağı olarak ise; maya özütü ve (NH₄)₂SO₄ karışımının kullanıldığı bir fermentasyon ortamındaki pullulan ve melanin üretme özelliklerinin karşılaştırıldıkları ifade edilmiştir. Söz konusu araştırmada, mutant ve mutant olmayan *A. pullulans* suşlarının ürettikleri pullulan derişimlerinin birbirlerine yakın değerlerde oldukları ifade edilmiştir. Anılan çalışmada, her iki suş tarafından üretilen pullulan örneklerinin, FT-IR spektrometresi ile moleküler analizlerinin de yapıldığı ve elde edilen spektrumların, ticari pullulanın spektrumu ile benzerlik gösterdikleri de ifade edilmiştir. Bu araştırmada ayrıca,

mutasyonun, hücre içi ve dışı melanin üretimini önemli derecede düşürdüğü de belirtilmiştir [48].

Gaur ve Singh [117] tarafından yapılan bir araştırmada ise, hibiskustan (hatmi çiçeği) izole edilen bir termotolerant *A. pullulans* suşu ve bu suşun kimyasal yöntemlerle mutasyonu sonucunda elde edilen bir mutant *A. pullulans* suşu ile çalışıldığı rapor edilmiştir. Deneylerde, sentetik fermantasyon ortamlarında, çeşitli fermantasyon parametrelerinin değiştirilmesi ile yüksek miktarlarda pullulan üretiminin gerçekleştirilebileceği optimum koşullar belirlenmeye çalışılmıştır. Anılan çalışmada, fermantasyon ortamında karbon kaynakları olarak %4 (w/v) derişimde, fruktoz, glukoz, sakkaroz, laktoz ve ksilozun, azot kaynakları olarak ise; %0.5 (w/v) derişimdeki, sodyum nitrat, maya özütü, amonyum sülfat, sodyum nitrit ve histidinin kullanıldığı ifade edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarının pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği deneylerde, en yüksek pullulan derişiminin (37.4 ± 0.8 g/L); mutant suş ile, fermantasyon ortamında sakkaroz kullanıldığında; farklı azot kaynaklarının pullulan üretimi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı deneylerde ise, en yüksek pullulan derişiminin (42.4 ± 0.7 g/L); yine mutant suş ile fermantasyon ortamında amonyum sülfat kullanıldığında elde edildiği belirtilmiştir [117]. Bu çalışmada ayrıca, sıcaklık, karıştırma hızı, fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı ve fermantasyon süresinin, mutant ve mutant olmayan *A. pullulans* suşlarının pullulan üretim özelliklerine etkilerinin araştırıldığı da rapor edilmiştir. Söz konusu araştırmada, sıcaklığın; 25-46°C, karıştırma hızının; 5-60 rpm, ortam pH'ının; 3.0-7.0 ve fermantasyon süresinin; 12-96 saat aralığında değiştirildiği deneylerde elde edilen en yüksek pullulan derişimlerinin çalışılan *A. pullulans* suşunun mutantı ile elde edildiği de bildirilmiştir.

4.10. EPS Örneklerinin Molekül Ağırlıklarının Hesaplanması

Bu çalışmada, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen ve bileşiminin %90'dan fazlası pullulandan oluşan bazı EPS örneklerinin molekül ağırlıkları da tayin edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, yanıt yüzey yöntemi ile belirlenen; optimum koşulların kullanıldığı fermantasyon ortamında, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örneğinin molekül ağırlığı tayin edilmiştir. Daha sonra ise, fermantasyon ortamlarında doğal substrat kaynağı olarak peynir altı suyu, melas çözeltisi, üzüm posası ve şeker pancarı

küspesi özütleri, kavun, karpuz, soğan ve havuç kabuklarının özütleri ya da tatlı patates özütünün kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* AZ-6 tarafından üretilen EPS örneklerinin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında son olarak, *A. pullulans* AZ-6 suşunun UV mutasyonu sonucunda elde edilen olası mutant suşlar tarafından üretilen EPS örneklerinin molekül ağırlıkları da belirlenmiştir.

Bu araştırmada, pullulan miktarları yüksek olan EPS örneklerinin molekül ağırlıkları, Bölüm 3.2.18’de verilen yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla, EPS örneklerinin sudaki çözeltileri hazırlanmış, bir viskozimetre kullanılarak 20°C’de viskoziteleri tayin edilmiş; daha sonra ise bu viskozite değerleri kullanılarak intrinsik viskozite değerleri hesaplanmıştır. Farklı fermantasyon koşulları altında üretilen bazı EPS örneklerinin intrinsik viskozitelerinin hesaplanmasında kullanılan grafikler; Şekil Ek 7.1 - 7.3’de sunulmuştur. Daha sonra ise; Mark-Houwink bağıntısı kullanılarak, her bir EPS örneğine ait molekül ağırlıkları hesaplanmıştır. EPS örneklerinin intrinsik viskozite değerleri ile hesaplanan molekül ağırlıkları, Çizelge 4.18’de sunulmuştur.

Bu çalışmada elde edilen ve bileşiminde yaklaşık %90’dan fazla pullulan bululan EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının; 0.49×10^7 - 3.3×10^7 aralığında değiştiği belirlenmiştir.

Literatürde, pullulanın molekül ağırlığının kültür koşullarına bağlı olarak; 1.5×10^4 ve 1.0×10^7 arasında değişebildiği belirtilmektedir [140]. Çizelge 4.18’deki sonuçlar incelendiğinde, molekül ağırlıkları en yüksek olan EPS örneklerinin, doğal substrat kaynakları olan şeker pancarı küspesi özütü veya üzüm posası özütünün, doğrudan (başka herhangi bir bileşen eklemeyen) fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde elde edildikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, fermantasyon ortamlarında, doğal substrat kaynaklarının kullanıldıkları deneylerde *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örneklerine ait molekül ağırlıklarının, aynı suş tarafından fermantasyon ortamındaki substratın sakkaroz olduğu deneyde üretilen EPS örneğine ait molekül ağırlığından (1.05×10^7) daha yüksek oldukları da tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. Farklı fermantasyon koşullarında elde edilen EPS örneklerinin intrinsik viskozite değerleri ile molekül ağırlıkları

EPS örneği*	İntrinsik viskozite (100 mL/g)	Molekül ağırlığı ($\times 10^{-7}$)
P-O	8.88	1.05
P-Kr	9.98	1.26
P-Kv	7.96	0.89
P-S	12.39	1.77
P-ÜP	16.70	2.80
P-ŞP	18.56	3.30
P-M	9.22	1.11
P-PAS	5.40	0.49
P-TP	14.08	2.15
P-H	11.07	1.48
P-Kr ⁺	8.92	1.06
P-Kv ⁺	10.69	1.40
P-S ⁺	12.37	1.76
P-ÜP ⁺	14.66	2.29
P-ŞP ⁺	14.64	2.29
P-M ⁺	12.32	1.75
P-PAS ⁺	11.46	1.56
P-TP ⁺	9.69	1.21
P-H ⁺	13.24	1.96
P-10	8.09	0.91
P-13	8.63	1.01
P-15	8.21	0.93
P-17	10.62	1.39
P-20	9.84	1.24
P-23	9.88	1.24
P-26	7.40	0.79
P-27	8.19	0.93
P-29	6.73	0.69
P-31	11.33	1.54
P-32	11.33	1.54
P-35	9.69	1.21
P-37	9.77	1.22

*: P-O; optimum koşullarda *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından, P-Kr: karpuz kabuğu özütü, P-Kv: kavun kabuğu özütü, P-S: soğan kabuğu özütü, P-ÜP: üzüm posası özütü, P-ŞP: şeker pancarı küspesi özütü, P-M: melas çözeltisi, P-PAS: peynir altı suyu, P-TP: tatlı patates özütü ve P-H: havuç kabuğu özütünün doğrudan doğruya fermantasyon ortamı olarak kullanıldıkları; P-Kr⁺: karpuz kabuğu özütü, P-Kv⁺: kavun kabuğu özütü, P-S⁺: soğan kabuğu özütü, P-ÜP⁺: üzüm posası özütü, P-ŞP⁺: şeker pancarı küspesi özütü, P-M⁺: melas çözeltisi, P-PAS⁺: peynir altı suyu, P-TP⁺: tatlı patates özütü ve P-H⁺: havuç kabuğu özütünün fermantasyon ortamı bileşeni olarak kullanıldıkları koşullarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından; P-10, P-13, P-15, P-17, P-20, P-23, P-26, P-27, P-29, P-31, P-32, P-35, P-37; optimum koşullarda mutant 10, 13, 15, 17, 20, 23, 26, 27, 29, 31, 32, 35, 37 suşları tarafından üretilen EPS örnekleri

Bu tezde, optimum işletme koşullarında, *A. pullulans* AZ-6'nın UV mutasyonuna uğratılması sonucunda elde edilen; 17, 20, 23, 31, 32, 35 ve 37 no.lu suşların ürettikleri EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örneğinin molekül ağırlığından (1.05×10^7) daha yüksek oldukları da belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Olası mutant suşlar tarafından üretilen EPS örnekleri arasında molekül ağırlığı en yüksek olanların (1.54×10^7), 31 ve 32 no.lu suşlar ile çalışıldığında elde edildiği tespit edilmiştir.

Literatürde, yapılan bazı çalışmalarda, fermantasyon ortamında doğal sustrat kaynaklarının kullanıldıkları deneylerde elde edilen pullulanın molekül ağırlığının, fermantasyon ortamında substrat kaynağı olarak glukozun kullanıldığı deneylerde elde edilen pullulanın molekül ağırlığından daha yüksek olarak bulunduğu rapor edilmiştir [140, 171]. Fermantasyon ortamında doğal substrat kaynağının kullanıldığı bir çalışmada, mutant *A. pullulans* HP-2001 suşunun, karbon kaynağı olarak %2 (w/v) derişimde glukoz, azot kaynağı olarak ise; farklı derişimlerde maya özütü ya da soya fasulyesi pulpu içeren fermantasyon ortamlarında ürettiği pullulan örneklerinin molekül ağırlıklarının jel geçirgenlik kromatografisi ile belirlendiği ve elde edilen değerlerin birbirleri ile karşılaştırıldığı belirtilmiştir [140]. Azot kaynağı olarak; maya özütünün kullanıldığı deneylerde elde edilen pullulan örneklerinin molekül ağırlıklarının; $0.17-1.32 \times 10^6$, soya fasulyesi pulpunun kullanıldığı deneylerde elde edilen pullulan örneklerinin molekül ağırlıklarının ise; $1.32-5.66 \times 10^6$ aralığında değıştikleri ifade edilmiştir. Araştırmada, fermantasyon ortamında soya fasulyesi pulpu kullanıldığında; elde edilen pullulanın molekül ağırlığının yükseldiği, en yüksek molekül ağırlıklı pullulanın; ortamda %0.35 (w/v) oranında soya fasulyesi pulpu kullanıldığında elde edildiği rapor edilmiştir. Genel olarak, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak soya fasulyesi pulpunun kullanılmasının, elde edilen pullulanın molekül ağırlığını, maya özütüne göre 4 kat arttırdığı ifade edilmiştir.

Thorne ve arkadaşları [172] tarafından yapılan bir patent çalışmasında, yüksek molekül ağırlıklı ve melanin miktarı düşük pullulan üretiminin hedeflendiği belirtilmiştir. Araştırmada, çeşitli ağaçların yapraklarından izole edilmiş farklı *A. pullulans* suşları arasından seçilen *A. pullulans* AP30, bir enstitüden temin edildiği belirtilen *A. pullulans*

AP1 ve mutant bir suş olan *A. pullulans* AP24 suşları tarafından üretilen pullulan örneklerinin molekül ağırlıklarının Mark-Houwink eşitliği kullanılarak belirlendiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada örneklerin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin viskozitelerinin, Brookfield DV-II model bir viskozimetre ile ölçüldüğü; daha sonra ise, elde edilen veriler yardımıyla çizilen grafikler kullanılarak, her bir örnek için, intrinsik viskozite değerlerinin hesaplandığı belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, *A. pullulans* API, AP24 ve AP30 suşları tarafından üretilen pullulan örnekleri için intrinsik viskozite değerleri sırasıyla; 1.8, 4.0 ve 9.0 dL/g olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, her bir örnek için hesaplanan intrinsik vizkozite değerlerinin Mark-Houwink eşitliğinde yerine konulmasıyla bu örneklerin molekül ağırlıklarının da hesaplandığı bildirilmiştir. *A. pullulans* API, AP24 ve AP30 suşları tarafından üretilen pullulan örneklerinin molekül ağırlıkları sırasıyla; 0.9×10^6 , 3.0×10^6 ve 11×10^6 olarak hesaplanmıştır. Anılan çalışmada ayrıca aynı yöntem ile, Hayashibara firmasından temin edilmiş olduğu belirtilen; ticari pullulan örneklerinin (PF10 ve PF20) de molekül ağırlıklarının belirlendiği ve bu değerlerin PF10 için; 0.06×10^6 ve PF20 için ise; 0.2×10^6 olduğu rapor edilmiştir. Araştırmada, *A. pullulans* API, AP24 ve AP30 suşları tarafından üretilen pullulan örneklerinin, hedeflendiği gibi yüksek molekül ağırlıklarına sahip oldukları ve melanin içermedikleri ifade edilmiştir.

Başka bir araştırmada ise; karbon ve azot kaynaklarının türü, fermantasyon ortamındaki azot derişimi, havalandırma hızı ve fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı gibi parametrelerin *A. pullulans* ATCC 42023 ve ATCC 62921 suşlarının EPS üretim özellikleri ve elde edilen EPS örneklerinin molekül ağırlıkları üzerine etkilerinin incelendiği belirtilmiştir [173]. Bu amaçla iki düzeyli faktöriyel tasarım yöntemi kullanılarak bir deney tasarımının yapıldığı rapor edilmiştir. Çalışmada elde edilen EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının jel geçirgenlik kromatografisi kullanılarak belirlendiği ifade edilmiştir. Bu araştırmada, elde edilen EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının suşa bağlı olarak değıştikleri bildirilmiştir. İncelenen fermantasyon parametrelerinin etkisine bağlı olarak, deney tasarımındaki her bir deneyde elde edilen EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının fermantasyonun ilk gününde, ATCC 42023 suşu için, $1.88 - 6.05 \times 10^5$; ATCC 62921 suşu için ise; $2.58 - 6.15 \times 10^4$ aralıklarında değıştikleri

rapor edilmiştir. Fermantasyonun sonuna doğru ise, her iki suş tarafından üretilen EPS örneklerinin molekül ağırlıkları arasındaki farkın azaldığı ifade edilmiştir [173].

Sugumaran ve arkadaşları [93] tarafından yapılan bir çalışmada ise, karbon kaynağı olarak jack meyvesi çekirdeği içeren bir fermantasyon ortamında, *A. pullulans* NCIM 1049 tarafından üretilen pullulanın molekül ağırlığının, jel geçirgenlik kromatografisi yardımıyla belirlendiği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada elde edilen pullulan örneğinin molekül ağırlığının, 1.1789×10^6 g/mol olduğu belirtilmiştir.

4.11. Moleküler Yapı Analizi

Bu çalışmada, fermantasyon ortamlarından elde edilen bazı EPS örneklerinin moleküler yapı analizleri daha önce Bölüm 3.2.9’da verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında saf (Sigma) ve ticari (Hayashibara) pullulan örnekleri için de FT-IR spektrumları elde edilmiştir. Farklı *A. pullulans* suşları tarafından üretilen EPS örneklerinin FT-IR spektrumları ile saf ve ticari pullulanın FT-IR analizleri sonucunda elde edilen piklerin dalga sayısı değerleri birbirleri ile karşılaştırılarak; söz konusu EPS örnekleri ile saf ve ticari pullulan ile moleküler yapılarının benzerlikleri değerlendirilmiştir. Saf ve ticari pullulan ile bu çalışmadaki bazı deneylerde, farklı *A. pullulans* suşları kullanılarak üretilen EPS örneklerinin, FT-IR spektrometresi ile analizleri sonucunda elde edilen spektrumlardaki çeşitli fonksiyonel gruplara ait dalga sayıları Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; şekerlerdeki –OH guruplarının tekrarlayan birimlerinin varlığını gösteren piklerin ($3453.2-3397.1 \text{ cm}^{-1}$), incelen tüm pullulan içeren EPS örneklerinde de elde edildikleri belirlenmiştir. Değerlendirilen piklerde diğer bir güçlü absorpsiyonun da, $2928.3-2922.5 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında, C-H gerilme bağlarında elde edildiği gözlemlenmiştir. İncelenen tüm örneklerde ayrıca, O-C-O gerilmesi, C-O-H eğilmesi, C-O-C ve C-O gerilmelerine ait pikler sırasıyla; $1653.0-1618.5$, $1456.4-1358.0$, $1159.5-1111.1$ ve $1024.3-981.9 \text{ cm}^{-1}$ aralığında değişen dalga sayılarında ölçülmüştür. α -konfigürasyonunu gösteren ve $754.3-848 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında değişen pikler ise yalnızca saf ve ticari pullulan örnekleri ile *A. pullulans* G.

Kaukaska B1 ve *A. pullulans* AZ-6 suşları tarafından üretilen EPS örneklerinde ölçülebilmıştır.

Çizelge 4.19. Saf ve ticari pullulan örnekleri ile farklı *A. pullulans* suşları tarafından üretilen EPS örneklerinin FT-IR analizi sonuçları

Pullulan ve EPS Örnekleri	Fonksiyonel Grupların Dalga Sayıları (cm ⁻¹)						
	O-H gerilmesi	C-H gerilmesi	O-C-O gerilmesi	C-O-H eğilmesi	C-O-C gerilmesi	C-O gerilmesi	α -konfigürasyonu
Saf pullulan (Sigma)	3445.0	2926.4	1645.5	1367.7	1159.4	993.5	848.8
Ticari pullulan (Hayashibara)	3453.0	2924.4	1653.0	1360.0	1157.4	1020.5	848.5
EPS* (<i>A. pullulans</i> G. Kaukaska B-1)	3431.8	2928.3	1618.5	1360.0	1122.7	1022.4	848.0
EPS* (<i>A. pullulans</i> TreCisz2)	3453.0	2922.5	1653.0	1360.0	1116.9	1020.0	-
EPS* (<i>A. pullulans</i> BJ20p4)	3453.2	2926.4	1645.5	1358.0	1118.8	1024.3	-
EPS* (<i>A. pullulans</i> MAFF 425047)	3431.0	2928.3	1651.3	1456.4	1118.8	981.9	-
EPS* (<i>A. pullulans</i> AZ-6)	3431.0	2926.4	1620.4	1360.0	1159.4	1020.5	848.0
EPS* (<i>A. pullulans</i> NBRC 100716)	3397.1	2928.3	1651.3	1425.6	1126.6	983.8	-
EPS** (<i>A. pullulans</i> AZ-6)	3424.1	2926.4	1651.3	1368.0	1111.1	989.6	754.3

*: Pullulan üretiminde kullanılacak *A. pullulans* suşunun seçimi için gerçekleştirilen deneylerde elde edilen EPS örnekleri

** :Optimum koşullarda, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örneği

Pullulan için belirleyici bölge olduğu ifade edilen; 1500-650 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında EPS örneklerinde elde edilen piklerin de, standart pullulan örnekleri ile benzer oldukları görülmektedir (Çizelge 4.19). Bu deneylerde elde edilen, bazı EPS örnekleri ile saf ve ticari pullulan örneklerine ait FT-IR spektrumları Şekil Ek 8.1’de verilmektedir.

5. YORUM

Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine, çeşitli fermantasyon parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Araştırmada elde edilen genel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Çalışmada ilk olarak, çeşitli kültür merkezlerinden sağlanmış olan altı farklı *A. pullulans* suşu ile laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilmiş olan bir araştırmamızda taze toplanmış Gemlik zeytinlerinden izole edilmiş, endojen *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretim özellikleri, bileşimi tanımlı bir fermantasyon ortamı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen deneyler; kesikli sistemlerde, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızına sahip su banyolarında, 28°C’de, 50 mL hacmindeki fermantasyon ortamlarından yararlanılmıştır. İncelenen suşlar arasında *A. pullulans* AZ-6 suşunun diğerlerinden daha yüksek miktarda (17.56 g/L) pullulan üretebildiği belirlenerek, çalışmaya bu suş ile devam edilmiştir.

2. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimine etkilerinin incelendiği deneylerde, karbon kaynağı olarak; glukoz, fruktoz, sakkaroz, galaktoz ve maltoz kullanılmıştır. Kesikli sistemlerde, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızına sahip su banyoları kullanılarak, 28°C’de, 300 mL’lik erlenlerde ve 150 mL çalışma hacminde gerçekleştirilen deneylerdeki en yüksek pullulan derişimi; 15.66 g/L olarak sakkarozun kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edilmiş ve araştırmamızın bundan sonraki deneylerinde fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanılmıştır.

3. Farklı azot kaynağı kombinasyonlarının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, organik azot kaynakları olarak, maya özütü, üre ve pepton, inorganik azot kaynakları olarak ise; (NH₄)₂SO₄, NaNO₃ ve NH₄Cl denenmiştir. Organik azot kaynaklarının denediği çalışmalarda fermantasyon ortamlarında, inorganik azot kaynağı olarak; sabit derişimde (NH₄)₂SO₄, inorganik azot kaynaklarının denendiği çalışmalarda ise, organik azot kaynağı olarak; sabit derişimde maya özütü kullanılmıştır. Bu aşamadaki fermantasyon deneyleri de bir önceki aşamada olduğu gibi; 28°C’de, çalkalamalı bir su banyosunda, 100 vuru/dak sabit çalkalama

hızında, 300 mL hacmindeki erlenlerin içerisinde ve 150 mL'lik fermantasyon ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, pepton + (NH₄)₂SO₄ kombinasyonunun, *A. pullulans* AZ-6'nın pullulan üretimini (18.61 g/L) diğerlerine göre daha çok desteklediği belirlenmiş ve bundan sonraki deneylerde fermantasyon ortamlarında belirtilen azot kaynağı kombinasyonu kullanılmıştır.

4. Bu tez çalışmasında daha sonraki aşamada; *A. pullulans* AZ-6 suşu ile pullulan üretimi için, fermantasyon koşullarının yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Design Expert® 10.0.2 (Inc. Minneapolis, ABD) programının deneme sürümü kullanılmıştır. Kullanılan program yardımıyla, dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemine göre bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Deney tasarımında, bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi (X₁), fermantasyon ortamının başlangıç pepton derişimi (X₂), fermantasyon ortamının başlangıç pH'ı (X₃) ve sıcaklık (X₄), bağımlı değişkenler olarak ise; maksimum EPS derişimi (Y₁), maksimum pullulan derişimi (Y₂), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y₃), maksimum özgül pullulan üretim hızı (Y₄) ve pullulan verimi (Y₅) seçilmişlerdir. İlgili program kullanılarak oluşturulan deney tasarım planı, -2, -1, 0, +1, +2 olarak kodlanmış beş düzeyde gerçekleştirilerek, 24 farklı kombinasyona sahip, merkez noktasında 6 tekrarlı toplam 30 deneysel noktadan oluşmuştur.

5. Bu aşamada daha sonra; tasarım planındaki deneyler gerçekleştirilmiş ve kullanılan program yardımıyla, bağımsız değişkenlerin her bir yanıt üzerindeki etkilerini gösteren karesel model eşitlikler türetilmiştir. Bu modellerin uygunlukları ilgili program kullanılarak gerçekleştirilen, varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen tüm model eşitliklerin önemli (p<0.01) ve bu modellerin uyum eksikliklerinin ise, önemsiz (p>0.05) oldukları bulunmuştur. Elde edilen model eşitliklerin belirleme katsayılarının da (R²); 0.864-0.998 aralığında değiştikleri belirlenmiştir.

6. Bu tez araştırmasında daha sonra; optimum deney koşullarının belirlenebilmesi için nümerik optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonundan yararlanılarak, bağımlı ve bağımsız değişkenler için hedefler belirlenmiştir. Bu aşamada, bağımsız değişkenlerin çalışılan aralıkta, bağımlı

değişkenlerden EPS ve pullulan derişimlerinin ise, maksimum olmasına karar verilmiştir. Diğer bağımlı değişkenlerden mikroorganizma özgül üreme hızı ve pullulan verimi için herhangi bir hedef belirtilmemiş ve maksimum özgül pullulan üretim hızı için ise, daha önce hesaplanmış olan değer aralığında çalışılması hedeflenmiştir. Belirlenen hedefler doğrultusunda, optimizasyon programı tarafından, istenilen hedefe ulaşma değerleri; 0.398-0.977 aralığında değişen, 100 farklı çözüm üretilmiştir. Bu çözümler arasında istenilen hedefe ulaşma değeri (0.977) en yüksek olan çözümlerden birisi seçilerek, bu çözüme ait koşullarda bir deney gerçekleştirilmiştir. Bu çözümde, ilgili program tarafından fermantasyon ortamının başlangıç sakkaroz derişimi; 100 g/L, başlangıç pepton derişimi; 11.305 g/L, başlangıç pH'ı; 6.481; sıcaklığı ise, 24.2°C olarak verilmiştir. Belirlenen bu optimum koşullarda, elde edilecek olan maksimum EPS ve pullulan derişimlerinin sırasıyla; 37.078 ve 35.372 g/L, özgül üreme hızının; 0.062 sa⁻¹, maksimum özgül pullulan üretim hızının; 0.021 [g pullulan/(g mo.sa)], pullulan veriminin ise; %53.681 olacağı öngörülmüştür. Optimum koşulların doğrulanmaları amacıyla; program tarafından önerilen koşullarda fermantasyon deneyleri yapılmış ve bu deneylerde maksimum EPS ve pullulan derişimleri, özgül üreme hızı, maksimum özgül pullulan üretim hızı ve pullulan verimi sırasıyla; 36.950 ve 35.470 g/L, 0.064 sa⁻¹, 0.036 [g pullulan/(g mo.sa)] ve %54.480 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile, program tarafından önerilen optimum koşullar, %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak doğrulanmışlardır. Bunun yanı sıra, optimizasyon çalışmasından sonra, elde edilen en yüksek EPS ve pullulan derişimleri ile pullulan verimi değerlerinde, deney tasarımına göre yürütülen deneylerde bu yanıtlar için elde edilmiş olan en yüksek değerlere kıyasla önemli bir artış olduğu da saptanmıştır.

7. Bu tez çalışmasında, çeşitli doğal substratların *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde; peynir altı suyu (PAS), melas, üzüm posası, şeker pancarı küspesi, tatlı patates ile kavun, karpuz, soğan ve havuç kabukları ile çalışılmıştır. Söz konusu bu doğal kaynaklar, bazı ön işlemlerden geçirildikten sonra, doğrudan fermantasyon ortamı olarak ya da fermantasyon ortamı temel bileşeni olarak deneylerde kullanılmışlardır.

Bu çalışmada, doğal substrat kaynaklarının fermantasyon ortamı temel bileşeni olarak kullanıldıkları deneylerde; doğal substrat kaynaklarının kendilerine (PAS), çözeltilerine (melas) ya da özütlerine (üzüm posası özütü, şeker pancarı küspesi özütü, kavun, karpuz, soğan ve havuç kabuklarının özütleri ve tatlı patates özütü), bileşimi Ek 4’de verilen fermantasyon ortamındaki sakkaroz dışındaki diğer bileşenler ilave edilerek kullanılmıştır. Kesikli sistemlerde ve optimum fermantasyon koşullarında (pH 6.48, 24.2°C) gerçekleştirilen bu deneylerdeki en yüksek EPS ve pullulan derişimleri sırasıyla; 17.12 ve 14.55 g/L olarak, melas çözeltisinin kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edilmiştir. Söz konusu deneylerde, en düşük EPS (6.66 g/L) ve pullulan (4.98 g/L) derişimleri ise; peynir altı suyunun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında tayin edilmiştir.

Peynir altı suyu, melas çözeltisi, üzüm posası, şeker pancarı küspesi, kavun, karpuz, soğan ve havuç kabukları ile tatlı patates özütlerinin ayrı ayrı, doğrudan fermantasyon ortamları olarak kullanıldıkları deneylerde ise, en yüksek EPS ve pullulan derişimleri sırasıyla; 39.60 ve 37.62 g/L olarak tatlı patates özütü ile, en düşük EPS ve pullulan derişimleri ise sırasıyla; 2.18 ve 1.29 g/L olarak peynir altı suyu ile elde edilmiştir.

8. Bu tez çalışmasında, farklı doz (8, 15 ve 30 W) ve süreler (5, 10, 20 ve 30 dak) kullanılarak gerçekleştirilen UV ışını uygulamasının, *A. pullulans* AZ-6 suşunun pullulan üretimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. UV ışını mutasyonunun, incelenen *A. pullulans* AZ-6 suşunun başlangıç hücre derişimleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, kullanılan her bir doz/süre kombinasyonu için ölüm yüzdeleri hesaplanmıştır. Hesaplanan ölüm yüzdesi değerlerinin bu çalışma için %78.20 ile %99.98 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ölüm yüzdesi %75’den fazla olan kültürlerden, makroskopik morfoloji özellikleri de dikkate alınarak seçilen toplam 13 koloninin mutant suş olma olasılıkları dikkate alınarak, pullulan üretimleri incelenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerde; elde edilen en yüksek EPS (37.38 g/L) ve pullulan (35.66 g/L) derişimleri sırasıyla, mutant suş no.26 ve no.27 ile çalışıldığında belirlenmiştir. Ancak elde edilen bu değerlerin; *A. pullulans* AZ-6 suşunun optimum koşullarda ürettiği EPS (36.95 g/L) ve pullulan (35.47 g/L) derişimlerine çok yakın oldukları da bulunmuştur.

9. Gerçekleştirilen araştırmada, bazı EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının hesaplanması amacıyla yapılan deneylerde, bir polimerin molekül ağırlığı ile intrinsik viskozite arasındaki ilişkiyi gösteren Mark-Houwink bağıntısından yararlanılmıştır. Bu çalışmada elde edilen ve bileşiminde yaklaşık %90'dan fazla pullulan içeren EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının; 0.49×10^7 - 3.30×10^7 aralığında değiştiğı belirlenmiştir. Çalışılan suşun, nispeten daha yüksek molekül ağırlığına sahip EPS üretimlerinin, fermantasyon ortamı olarak doğal substratlar kullanıldığında gerçekleştiğı de belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, yerel bir suş olan *A. pullulans* AZ-6 tarafından üretilen EPS örneklerinin molekül ağırlıklarının, literatürdeki istenen değerlerde oldukları tespit edilmiştir.

10. Bu tez çalışmasında, bazı EPS örneklerinin Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrometresi ile moleküler yapı analizleri de gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde, *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından üretilen EPS örnekleri ile saf (Sigma) ve ticari (Hayashibara) pullulana ait FT-IR spektrumlarının birbirleri ile uyumlu oldukları saptanmıştır. Aynı zamanda, çalışılan yerel suş tarafından üretilen EPS örneklerinden elde edilen FT-IR spektrumlarında, pullulan molekülü için literatürde verilen ve parmak izi bölgesi olarak ifade edilen $1500-650 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında pikler de elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] V.D. Prajapati, G.K. Jani, S.M. Khanda, Carbohydrate Polymers, 95 (2013) 540.
- [2] B.W. Wolf, Use of Pullulan as a Slowly Digested Carbohydrate, US 2004/0127460 A1, 2004.
- [3] J. Yang, Y. Zhang, L. Chen, X. Xin, J. Yang, S. Zhao, Molecules, 23 (2018) 1334.
- [4] S. Prasongsuk, P. Lotrakul, I. Ali, W. Bankeeree, H. Punnapayak, Folia Microbiologica, 63 (2018) 129.
- [5] M.A. Alsoufi, R.A. Aziz, International Journal of Molecular Biology, 2 (2017) 1.
- [6] O. Pinar, F. Yangilar, P. Oğuzhan, F. Yangilar, African Journal of Food Science and Technology, 4 (2013) 57.
- [7] V. Ponnusami, V. Gunasekar, Production of Pullulan by Microbial Fermentation. Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology, K. G. Ramawat, J. M. Merillon (Eds), Springer, Switzerland, 581-596, 2015.
- [8] D. Kumar, N. Saini, V. Pandit, S. Ali, International Journal of Basic and Applied Sciences, 1 (2012) 202.
- [9] <http://www.marketresearchreport.com> (Erişim tarihi: 1 Temmuz 2019).
- [10] <http://www.mevzuat.gov.tr> (Erişim tarihi: 1 Temmuz 2019).
- [11] G. Wyard, United States Department of Agriculture Agricultural Marketing Service National Organic Program Document, Washington, DC, 2018.
- [12] R.S. Singh, G.K. Saini, Biosynthesis of Pullulan and Its Applications in Food and Pharmaceutical Industry. Sustainable Agriculture and Biotechnology, T. Satyanarayana, B. N. Johri, A. Prakash (Eds), Springer Science+Business Media B.V, New York, 509-553, 2012.
- [13] R.S. Singh, H. Singh, G.K. Saini, Applied Biochemistry and Biotechnology, 152 (2009) 42.
- [14] V. Ganduri, U.K. Mangamuri, R.S. Babu, K.R.S.S. Rao, Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 10 (2017) 457.
- [15] Y. Wang, J. Wen, J. Dongmei, C. Piao, H. Yu, J. Liu, International Forum on Energy, Environment and Sustainable Development, (2016) 844.
- [16] A.R. Choudhury, M.S. Bhattacharyya, G.S. Prasad, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 1 (2012) 232.
- [17] B. Mishra, D. Zamare, M. Akula, Selection and Utilization of Agro-Industrial Waste for Biosynthesis and Hyper-Production of Pullulan: A Review. Biosynthetic Technology and Environmental Challenges, S. J. Varjani, B. Parameswaran, S. Kumar, S. K. Khare (Eds), Springer, Singapore, 89-103, 2018.
- [18] K.R. Sugumaran, V. Ponnusami, BioTechnology An Indian Journal, 9 (2014) 79.
- [19] K. Thirumavalavan, T.R. Manikkadan, R. Dhanasekar, African Journal of Biotechnology, 8 (2009) 254.
- [20] M. Pitkaranta, M. Richardson, Aureobasidium. Molecular Detection of Human Fungal Pathogens, D. Liu (Ed), Taylor and Francis, Florida, 37-49, 2011.
- [21] W.B. Cooke, Mycopathologia et Mycologia Applicata, 12 (1959) 1.
- [22] P. Gibss, R.J. Seviour, Pullulan. Polysaccharides in Medicinal Applications, S. Dumitriu (Ed), Taylor and Francis, New York, 59-81, 1996.
- [23] Y. Li, Z. Chi, G. Wang, Z. Wang, G. Liu, Z. Ma, Z. Chi, Y. Li, Z. Chi, G. Wang,

- Z. Wang, G. Liu, C. Lee, Z. Ma, *Critical Reviews in Microbiology*, 41 (2015) 228.
- [24] P. Zalar, C. Gostinčar, G.S. De Hoog, V. Uršič, M. Sudhadham, *Studies in Mycology*, 61 (2008) 21.
- [25] Z. Chi, F. Wang, Z. Chi, L. Yue, G. Liu, T. Zhang, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (2009) 793.
- [26] R. Singh, R. Gaur, S. Bansal, P. Biswas, P.K. Pandey, F. Jamal, S. Tiwari, M.K. Gaur, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4 (2015) 605.
- [27] J.I. Pitt, A.D. Hocking, *Primary Keys and Miscellaneous Fungi. Fungi and Food Spoilage*, J. Pitt, A. Hocking (Eds), Springer, New York, 65-67, 2009.
- [28] D. Bozoudi, D. Tsaltas, *Fermentation*, 4 (2018) 85.
- [29] M. Stratford, *Food and Beverage Spoilage Yeasts. The Yeast Handbook Volume 2*, Springer, New York, 335-380, 2006.
- [30] K. Cheng, K. Chen, C. Chen, A. Demirci, *Applied Researches in Polysaccharides*, 661 (2015) 73.
- [31] R.A. Slepecky, W.T. Starmer, *Mycologia*, 101 (2009) 823.
- [32] G.F. Chan, A.S.M. Puad, C.F. Chin, N.A.A. Rashid, *Folia Microbiologia*, 56 (2011) 459.
- [33] V.C. Castiglia, F. Kuhar, *Revista Argentina de Microbiologia*, 47 (2015) 256.
- [34] L. Simon, C. Caye-Vaugien, M. Bouchonneau, *Journal of General Microbiology*, 139 (1993) 979.
- [35] R.S. Singh, G.K. Saini, J.F. Kennedy, *Carbohydrate Polymers*, 78 (2009) 89.
- [36] J. Thibault, A. LeDuy, *Pullulan, Microbial Production Methods. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, M. Flickinger, S. W. Drew (Eds), John Wiley and Sons, Canada, 2233-2247, 1999.
- [37] J.M. Henson, M.J. Butler, A.W. Day, *Annual Reviews of Phytopathology*, 37 (1999) 447.
- [38] S. Katja, *Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. The Yeast Handbook*, C. Rosa, G. Peter (Eds), Springer, Heidelberg, 501-414, 2006.
- [39] B. Erdem, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (2013) 77.
- [40] H. Bender, J. Lehmann, K. Wallenfels, *Biochimica et Biophysica Acta*, 36 (1959) 309.
- [41] K.C. Cheng, A. Demirci, J.M. Catchmark, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92 (2011) 29.
- [42] S. Pawar, G. Pathade, V. Rale, *BioTechnology an Indian Journal*, 6 (2012) 111.
- [43] R. Singh, Sarup, N. Kaur, V. Rana, J.F. Kennedy, *Carbohydrate Polymers*, 171 (2017) 102.
- [44] R.S. Singh, N. Kaur, *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 6 (2018) 28.
- [45] K.I. Shingel, *Carbohydrate Research*, 339 (2004) 447.
- [46] R. Singh, R. Gaur, P.K. Pandey, F. Jamal, L.K. Pandey, S. Singh, H.K. Kewat, S. Tiwari, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7 (2018) 53.
- [47] K.R. Sugumaran, V. Ponnusami, *Carbohydrate Polymers*, 173 (2017) 573.
- [48] M. Gniewosz, W. Duszkiwicz-Reinhard, *Carbohydrate Polymers*, 72 (2008) 431.
- [49] V.S.R.K. Ganduri, U.K. Mangamuri, M. Vijayalakshmi, S. Poda, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8 (2016) 217.

- [50] D. İtik, U. Sidal, C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 9 (2013) 21.
- [51] M.R. Rekha, C.P. Sharma, Trends in Biomaterial and Artificial Organs, 20 (2007) 116.
- [52] R. Singh, Pullulan, the Magical Polysaccharide, LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, 14-32, 2015.
- [53] R.S. Singh, Saconidium, G.K. Ini, J.F. Kennedy, Carbohydrate Polymers, 73 (2008) 515.
- [54] R. Singh, N. Kaur, J.F. Kennedy, Carbohydrate Polymers, 123 (2015) 190.
- [55] K. Cheng, A. Demirci, J.M. Catchmark, V.M. Puri, Journal of Food Engineering, 98 (2010) 353.
- [56] G. Chen, J. Wang, Y. Su, Y. Zhu, G. Zhang, H. Zhao, H. Liu, Y. Yang, R. Nian, H. Zhang, Y. Wei, M. Xian, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47 (2017) 963.
- [57] Y. Lin, Improving the Production of High Molecular Weight Pullulan Using a New Radial Reciprocating Plate Impeller, Ottawa Üniversitesi, 2010.
- [58] J.H. Lee, J. hwa Kim, M. ryung Kim, S. mi Lim, S. wan Nam, J. woo Lee, S. koo Kim, 12 (2002) 1.
- [59] A. Spatareanu, M. Bercea, T. Budtova, V. Harabagiu, L. Sacarescu, S. Coseri, Carbohydrate Polymers, 111 (2014) 63.
- [60] <https://www.globalmarketers.biz> (Erişim tarihi: 1 Temmuz 2019).
- [61] <https://www.globalinforeserach.com> (Erişim tarihi: 1 Temmuz 2019).
- [62] O. Ates, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 3 (2015) 1.
- [63] R.S. Singh, G.K. Saini, J.F. Kennedy, Carbohydrate Polymers, 80 (2010) 401.
- [64] S. Farris, I.U. Unalan, L. Introzzi, J.M. Fuentes-Alventosa, C.A. Cozzolino, Journal of Applied Polymer Science, 131 (2014) 1.
- [65] R. Singh, R. Gaur, S. Bansal, F. Jamal, P.K. Pandey, S. Tiwari, S. Sarsaiya, S. Mishra, N. Chaturvedi, D.P. Singh, M.K. Gaur, F.G.V. Arasu, Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 7 (2017) 26.
- [66] C.J. Israilides, A. Smith, J.E. Harthill, C. Barnett, G. Bambalov, B. Scanlon, Applied Microbiology and Biotechnology, 49 (1998) 613.
- [67] M. Gniewosz, K. Krasniewska, A. Synowiec, Electronic Journal Of Polish Agricultural Universities, 16 (2013) 1.
- [68] I. Bataille, A. Meddahi-Pellé, C. Le Visage, D. Letourneur, F. Chaubet, Pullulan for Biomedical Uses. Polysaccharides. Medicinal and Pharmaceutical Applications, V. Popa (Ed), A Smithers Group Company, United Kingdom, 35-39, 1982.
- [69] I.S.S. Leung, A.F. Sorg, Fast Dissolving Orally Consumable Film, United States Patent, US 7,025,983 B2, 2006.
- [70] The EFSA Journal, 85 (2004) 1.
- [71] H. Chaen, Pullulan. Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents, A. Imeson (Ed), John Wiley & Sons, Ltd., United Kingdom, 266-274, 2010.
- [72] L. Jiang, Carbohydrate Polymers, 79 (2010) 414.
- [73] Z. Xia, S. Wu, S. Pan, Carbohydrate Polymers, 86 (2014) 1814.
- [74] R.S. Singh, N. Kaur, V. Rana, J.F. Kennedy, Carbohydrate Polymers, 171 (2017) 102.
- [75] O. Kırtel, G. Avşar, B.A. Erkorkmaz, E.T. Öner, Microbial Polysaccharides as Food Ingredients. Handbook of Food Bioengineering Microbial Production of

- Food Ingredients and Additives, A. M. Holban, A. M. Grumezescu (Eds), Elsevier Inc., Oxford, 347-374, **2017**.
- [76] R.S. Singh, G.K. Saini, Biosynthesis of Pullulan and Its Applications in Food and Pharmaceutical Industry. Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology, T. Satyanarayana, A. J. Prakash, B.Narain (Eds), Springer, New York, 509-555, **2013**.
 - [77] R.J. Seviour, F. Schmid, B.S. Campbell, Fungal Exopolysaccharides. Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Applications, V. Popa (Ed), Smithers, Birleşik Krallık, 89-144, **2011**.
 - [78] A.R. Choudhury, P. Saluja, G.S. Prasad, Carbohydrate Polymers, 83 (**2011**) 1547.
 - [79] D. Wang, T. Ni, X. Ju, G. Wei, Applied Microbiology and Biotechnology, 102 (**2018**) 8921.
 - [80] G.R. Krishna, Modeling and Fermentation Aspects of Pullulan Production from Jaggery. Sustainable Biological Systems for Agriculture Emerging Issues in Nanotechnology, Biofertilizers, Wastewater, and Farm Machines, M. Goyal (Ed), Apple Academic Press, Inc., Kanada, 159-192, **2018**.
 - [81] C.D. Skory, T.D. Leathers, N.P. Price, Methods and Strains for Producing Bioproducts in *Aureobasidium pullulans*, US 2017/0016039 A1, **2017**.
 - [82] A.R. Choudhury, N. Sharma, G. Prasad, Microbial Cell Factories, 11 (**2012**) 39.
 - [83] S. Yoon, E. Hong, S. Kim, P. Lee, M. Kim, H. Yang, Y. Ryu, Bioprocess and Biosystems Engineering, 35 (**2012**) 167.
 - [84] A.M.A. Hafez, H.M. Abdelhady, M.S. Sharaf, T.S. El-Tayeb, Journal of Applied Sciences Research, 3 (**2007**) 1416.
 - [85] H. Moubasher, S.S. Wahsh, Basic Research Journal of Microbiology, 1 (**2014**) 11.
 - [86] X. Ju, D. Wang, G. Zhang, D. Cao, G. Wei, Applied Biochemistry and Biotechnology, 99 (**2015**) 211.
 - [87] M. Nakatani, A. Shibukawa, T. Nakagawa, Electrophoresis, (**1996**) 1584.
 - [88] Tsuneyuki Nagase, K. Tsuji, M. Fujimoto, F. Masuko, Cross-Linked Pullulan, 4,152,170, **1979**.
 - [89] A.A. Krumnow, I.B. Sorokulova, E. Olsen, L. Globa, J.M. Barbaree, V.J. Vodyanoy, Journal of Microbiological Methods, 78 (**2009**) 189.
 - [90] P.J. Heald, B. Kristiansen, Biotechnology and Bioengineering, 27 (**1985**) 1516.
 - [91] B.X. Li, N. Zhang, Q. Peng, T. Yin, F.F. Guan, G.L. Wang, Y. Li, Applied Microbiology and Biotechnology, 84 (**2009**) 293.
 - [92] L. Simon, B. Bouchet, C. Caye-Vaugien, D.J. Gallant, Canadian Journal of Microbiology, 41 (**1995**) 35.
 - [93] K.R. Sugumaran, R. V. Sindhu, S. Sukanya, N. Aiswarya, V. Ponnusami, Carbohydrate Polymers, 98 (**2013**) 854.
 - [94] K.R. Sugumaran, P. Shobana, P. Mohan Balaji, V. Ponnusami, D. Gowdhaman, International Journal of Biological Macromolecules, 66 (**2014**) 229.
 - [95] K.R. Sugumaran, P. Jothi, V. Ponnusami, Carbohydrate Polymers, 99 (**2014**) 22.
 - [96] K.R. Sugumaran, V. Ponnusami, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 10 (**2017**) 204.
 - [97] K.R. Sugumaran, E. Gowthami, B. Swathi, S. Elakkiya, S.N. Srivastava, R. Ravikumar, D. Gowdhaman, V. Ponnusami, Carbohydrate Polymers, 92 (**2013**) 697.
 - [98] D.A. Mitchell, D.M. Stuart, R.D. Tanner, Solid State Fermentation, Microbial

- Growth Kinetics. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, M.C. Flickinger and S. W. Drew (Eds), Vol. 1-5, John Wiley & Sons, Inc., Canada, 1999, (n.d.).
- [99] A.C. Soderberg, Fermentation Design. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook Principles, Process Design, and Equipment, H. C. Vogel, C. L Todaro (Eds), Noyes Publications, New Jersey, 67-120, **1997**.
- [100] F. Youssef, T. Roukas, C.G. Biliaderis, Process Biochemistry, 34 (**1999**) 355.
- [101] R. Schuster, E. Wenzig, A. Mersmann, Applied Microbiology and Biotechnology, 39 (**1993**) 155.
- [102] A.M.A. Hafez, H.M. Abdelhady, M.S. Sharaf, T.S. El-Tayeb, Egyptian Journal of Microbiology, 43 (**2008**) 37.
- [103] E. Yatmaz, İ. Turhan, Gıda, 37 (**2012**) 95.
- [104] W. Gao, Y. Kim, C. Chung, J. Li, J. Lee, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 15 (**2010**) 837.
- [105] R. Singh, G. Rajeeva, S. Tiwari, M.K. Gaur, Brazilian Journal of Microbiology, 43 (**2012**) 1042.
- [106] R. Terán Hilaes, C.A. Orsi, M.A. Ahmed, P.F. Marcelino, C.R. Menegatti, S.S. da Silva, J.C. dos Santos, Bioresource Technology, 230 (**2017**) 76.
- [107] L. Sheng, G. Tang, P. Su, J. Zhang, Q. Xiao, Q. Tong, M. Ma, Carbohydrate Polymers, 136 (**2016**) 1332.
- [108] N.N. Liu, Z. Chi, Q.Q. Wang, J. Hong, G.L. Liu, Z. Hu, Z.M. Chi, International Journal of Biological Macromolecules, 102 (**2017**) 1016.
- [109] X. Duan, Z. Chi, L. Wang, X. Wang, Carbohydrate Polymers, 73 (**2008**) 587.
- [110] J.D. Oliveira, L.M.A. Lopes, F.D. Pimenta, E.F.C. Sérvulo, International Journal of Engineering and Technology, 15 (**2015**) 11.
- [111] L. Sheng, G. Zhu, Q. Tong, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62 (**2014**) 10529.
- [112] G. Rajeeva, S. Ranjan, G. Monika, K.G. Manogya, African Journal of Biotechnology, 9 (**2010**) 7989.
- [113] T.D. Leathers, Pullulan. Biopolymers, Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes, E. J. Vandamme, S. De Baets, A.Steinbüchel (Eds), Wiley VCH, 1-11, 2002., (n.d.).
- [114] A. Wecker, U. Onken, Biotechnology Letters Vol, 13 (**1991**) 155.
- [115] S. Wu, H. Chen, Z. Jin, Q. Tong, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26 (**2010**) 737.
- [116] Y. Göksungur, A. Uçan, U. Güvenç, Turkish Journal of Biology, 28 (**2004**) 23.
- [117] R. Gaur, R. Singh, African Journal of Biotechnology, 9 (**2010**) 7322.
- [118] B. Mishra, Advances in Biotechnology and Microbiology, 6 (**2017**) 1.
- [119] C. An, S.J. Ma, F. Chang, W.J. Xue, Brazilian Journal of Microbiology, 48 (**2017**) 180.
- [120] T. Roukas, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22 (**1999**) 617.
- [121] S. Wu, Z. Jin, Q. Tong, H. Chen, Carbohydrate Polymers, 76 (**2009**) 645.
- [122] R. Durgalakshmi, V. Ponnusami, K.R. Sugumaran, International Journal of ChemTech Research, 6 (**2014**) 2920.
- [123] S. Srikanth, M. Swathi, M. Tejaswini, G. Sharmila, C. Muthukumaran, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3 (**2014**) 7.
- [124] M. Haidar, J. Adil, Science Journal of University of Zakho, 5 (**2017**) 20.

- [125] J. Boa, A. LeDuy, Applied and Environmental Microbiology, 48 (1984) 26.
- [126] T. Roukas, Process Biochemistry, 33 (1998) 805.
- [127] C. Barnett, A. Smith, B. Scanlon, C.J. Israilides, Carbohydrate Polymers, 38 (1999) 203.
- [128] Y. Göksungur, P. Uzunoğulları, S. Dağbağlı, Carbohydrate Polymers, 83 (2011) 1330.
- [129] T. Roukas, M. Liakopoulou-Kyriakides, Journal of Food Engineering, 40 (1999) 89.
- [130] T.P. West, B. Strohfus, Microbiological Research, 156 (2001) 285.
- [131] T.P. West, Folia Microbiologia, 56 (2011) 335.
- [132] S.V.N. Vijayendra, D. Bansal, M.S. Prasad, K. Nand, Process Biochemistry, 37 (2001) 359.
- [133] A. Mehta, G.S. Prasad, A.R. Choudhury, International Journal of Biological Macromolecules, 64 (2014) 252.
- [134] A. Lazaridou, T. Roukas, C.G. Biliaderis, H. Vaikousi, Enzyme and Microbial Technology, 31 (2002) 122.
- [135] R.F. Sena, M.C. Costelli, L.H. Gibson, R.W. Coughlin, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 23 (2006) 507.
- [136] R.C. Ray, S.N. Moorthy, Journal of Scientific and Industrial Research, 66 (2007) 252.
- [137] N. Sharma, G.S. Prasad, A.R. Choudhury, Carbohydrate Polymers, 93 (2013) 95.
- [138] S. Padmanaban, N. Balaji, C. Muthukumaran, K. Tamilarasan, 3 Biotech, 5 (2015) 1067.
- [139] D. Wang, X. Ju, D. Zhou, G. Wei, Bioresource Technology, 164 (2014) 12.
- [140] H. Seo, C. Son, C. Chung, D. Jung, S. Kim, R.A. Gross, D.L. Kaplan, J. Lee, Bioresource Technology, 95 (2004) 293.
- [141] K. Thirumavalavan, T. Manikkadan, R. Dhanasekar, Biotechnology, 7 (2008) 317.
- [142] O. V Senko, E.N. Efremenko, Catalysis in Industry, 9 (2017) 344.
- [143] H. Seo, C. Chung, S. Kim, R.A. Gross, D.L. Kaplan, J.W. Lee, Journal of Microbiology and Biotechnology, 14 (2004) 237.
- [144] L. Tarabasz-Szymańska, E. Galas, Enzyme and Microbial Technology, 15 (1993) 317.
- [145] August Böck, K. Lechner, O. Huber, *Aureobasidium pullulans* Strain Process for Its Preparation, and Use Thereof, 5,019,514, 1991.
- [146] E. Özcan, S. Sargin, Y. Göksungur, Biochemical Engineering Journal, 92 (2014) 9.
- [147] N. Kandemir, A. Yemenicioğlu, Ç. Mecitoğlu, Z.S. Elmaci, A. Arslanoğlu, Y. Göksungur, T. Baysal, Food Technology and Biotechnology, 43 (2005) 343.
- [148] Z. Ürküt, S. Dağbağlı, Y. Göksungur, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 82 (2007) 837.
- [149] P.M. Doran, Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, Inc., Oxford, 635-651, 2013.
- [150] M. Shuler, F. Kargı, Bioprocess Engineering Basic Concepts, 2., Prentice Hall, Inc., New Jersey, 553, 2002.
- [151] S. Liu, How Cells Grow. Bioprocess Engineering, Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design, Elsevier B.V., Oxford, 549-606, 2013.
- [152] A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay, WIREs Computational Statistics, 2 (2010) 128.

- [153] M. Bezerra, R. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, *Talanta*, 76 (2008) 965.
- [154] K.M. Carley, N.Y. Kamneva, J. Reminga, Response Surface Methodology Center for Computational Analysis of Social and Organizational Systems Technical Report, Pittsburgh, 2004.
- [155] A. Bevilacqua, M.R. Corbo, M. Sinigaglia, Design of Experiments : A Powerful Tool in Food Microbiology. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, A. Mendez-Vilas (Ed), Formatex Research Center, Badajoz, 1419-1429, 2010.
- [156] J. Zhang, Y.C. Dong, L.L. Fan, Z.H. Jiao, Q.H. Chen, *Carbohydrate Polymers*, 115 (2015) 694.
- [157] M. Iqbal, N. Iqbal, I.A. Bhatti, N. Ahmad, M. Zahid, *Ecological Engineering*, 88 (2016) 265.
- [158] R. Myers, D. Montgomery, C. Anderson-Cook, Response Surface Methodology Process and Production Optimization Using Designed Experiments, John Wiley and Sons, Canada, 1-281, 2009.
- [159] D.K.J. Lin, Statistical Inference For Response Surface Optima. Response Surface Methodolgy and Related Topics, A. Khuri (Ed), World Scientific Publishing, London, 65-88, 2006.
- [160] J. Zhang, Y. Dong, L. Fan, Z. Jiao, Q. Chen, *Carbohydrate Polymers*, 115 (2015) 694.
- [161] B. Koç, F. Kaymak Ertekin, *Gıda Teknolojisi Derneği*, 35 (2010) 63.
- [162] T. Sarchami, E. Johnson, L. Rehmann, *Bioresource Technology*, 208 (2016) 73.
- [163] J. Chen, S. Wu, S. Pan, *Carbohydrate Polymers*, 87 (2012) 771.
- [164] G.L. Miller, *Analytical Chemistry*, 31 (1959) 426.
- [165] B. Mishra, S. Vuppu, *Research Journal of Recent Sciences*, 2 (2013) 16.
- [166] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Analytical Chemistry*, 28 (1956) 350.
- [167] E. Pişkin, *Polimer Teknolojisine Giriş, İnkılap Kitabevi, İstanbul*, 1987.
- [168] M. Saçak, *Polimer Kimyası, Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Şti., Ankara*, 2012.
- [169] T.J. Pollock, L. Thorne, R.W. Armentrout, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1992) 877.
- [170] S. Wu, Z. Jin, J.M. Kim, Q. Tong, H. Chen, *Carbohydrate Polymers*, 77 (2009) 750.
- [171] C. Israilides, B. Scanlon, A. Smith, S.E. Harding, K. J, *Carbohydrate Polymers*, 25 (1994) 203.
- [172] L.P. Thorne, T.J. Pollock, R.W. Armentrout, High Molecular Weight Pullulan And Method For Its Production, US 6387666, 2002.
- [173] Y. Lin, Z. Zhang, J. Thibault, *Process Biochemistry*, 42 (2007) 820.
- [174] M. Garriga, M. Almaraz, A. Marchiaro, *Actas de Ingeniería*, 3 (2017) 173.
- [175] J.N. BeMiller, *Carbohydrate Analysis. Food Analysis*, S Nielsen (Ed.), Springer, New York, 147-178, 2010.

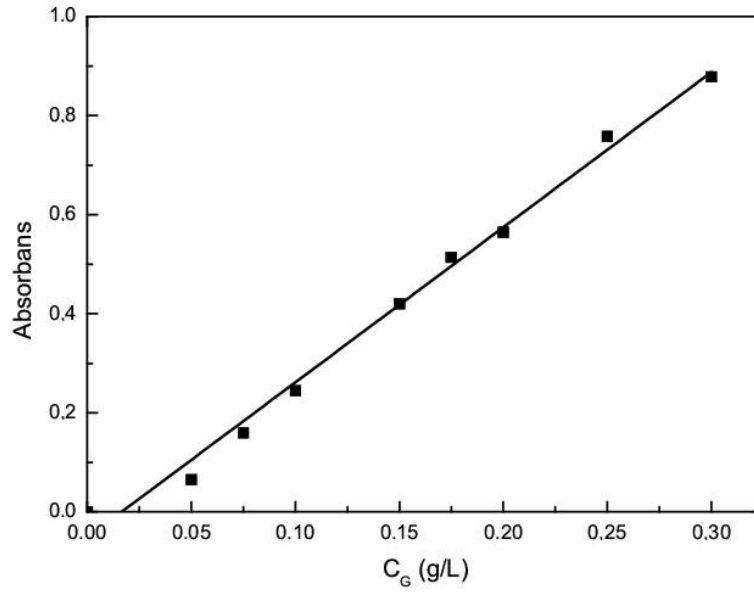
EKLER

EK 1. DİNİTROSALİSİLİK ASİT YÖNTEMİ

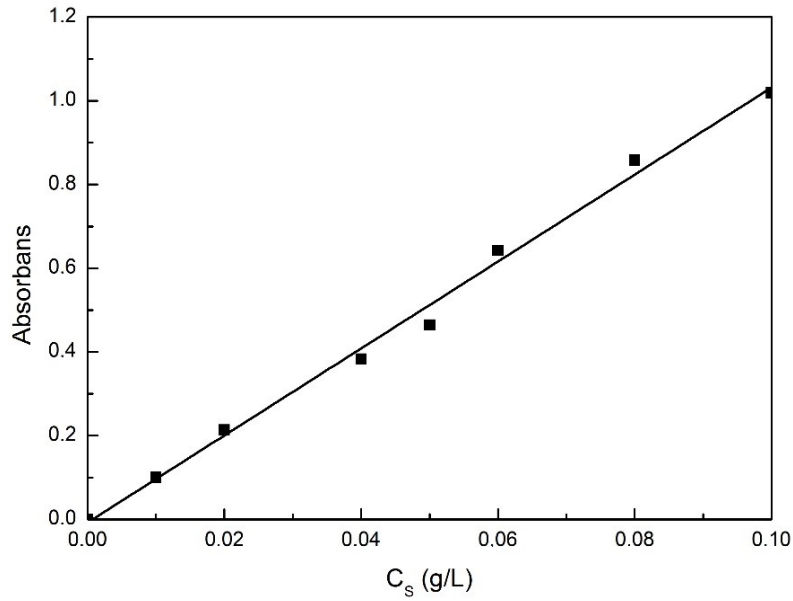
Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi; indirgen şekerlerin tayininde kullanılan kolorimetrik bir metod olarak bilinmektedir. Bu yöntemde; 3,5-dinitrosalisilik asitin (sarı) indirgen şekerler tarafından, bazık ortamda, 3-amino-5-nitrosalisilik asite (kırmızı-kahverengi) indirgendiği ifade edilmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan rengin yoğunluğunun, indirgen şeker derişimi ile doğru orantılı olduğu ve spektrofotometrede, 540 nm’de ölçülebildiği belirtilmektedir [174].

Yöntemin uygulanışında kullanılan DNS çözeltisi hazırlanırken; 1 g DNS (Sigma), 50 mL saf suda çözündürülmekte, daha sonra üzerine 30 g sodyum potasyum tartarat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilip son hacim saf su ile 100 mL’ye tamamlanmaktadır. İndirgen şeker tayini yapılacak örneklerde gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra, 1 mL örnek çözeltisi bir cam tüpe aktarılmakta ve üzerine 1 mL DNS çözeltisi eklenmektedir. Elde edilen çözelti karıştırıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilmektedir. Süre sonunda tüp, soğuk su dolu bir beherin içerisine alınarak hızlıca soğutulmaktadır. Aynı işlemler içerisinde örnek olmayan saf su için de gerçekleştirilmekte ve elde edilen çözelti kör olarak kullanılmaktadır. Absorbans okumaları spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda köre karşı gerçekleştirilmektedir [164]. Örnekteki indirgen şeker derişiminin hesaplanması amacıyla, incelenecek olan indirgen şeker türü için oluşturulmuş; absorbans-derişim grafiğinden ve ilgili korelasyon eşitliğinden yararlanılmaktadır.

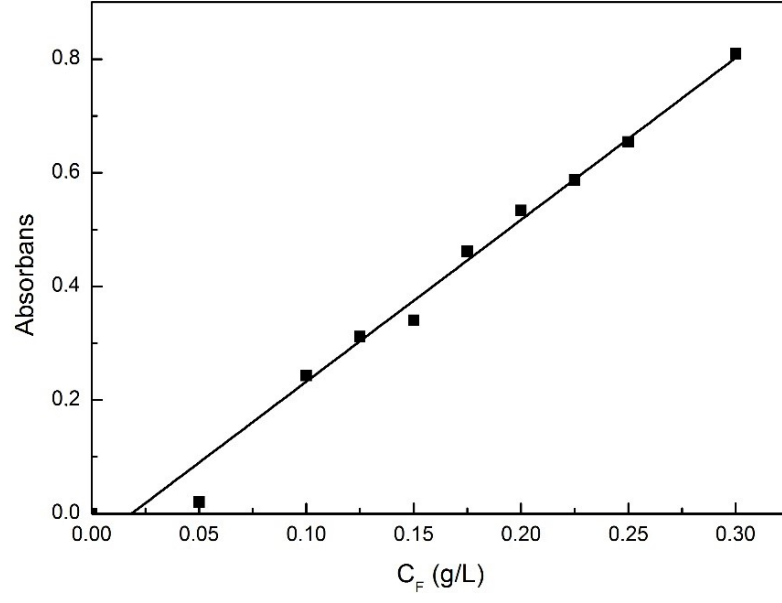
EK 2. BAZI FERMANTASYON ORTAMLARINDAKİ SUBSTRAT DERİŞİMLERİNİN TAYİNLERİNDE KULLANILAN ÇALIŞMA DOĞRULARI



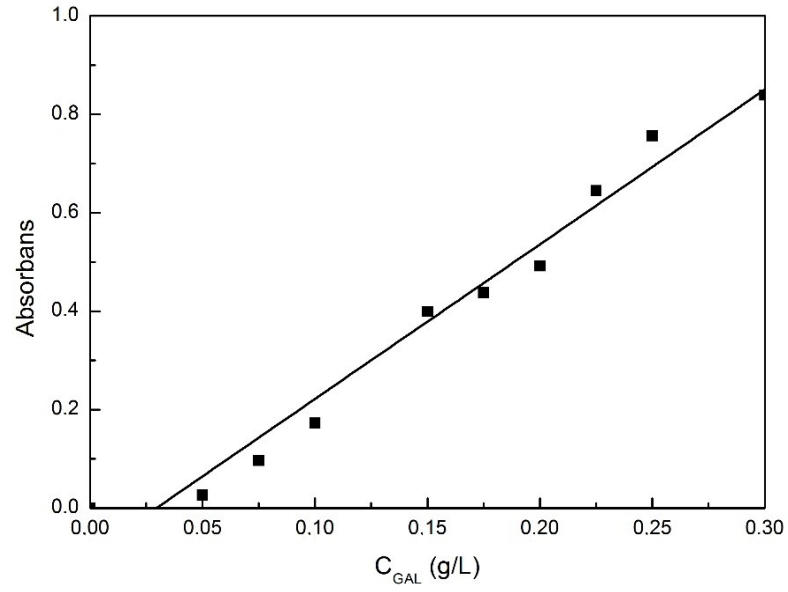
Şekil Ek 2.1. Glukoz çalışma doğrusu ($y = 3,13x - 0.05193$; $R^2 = 0.9904$)



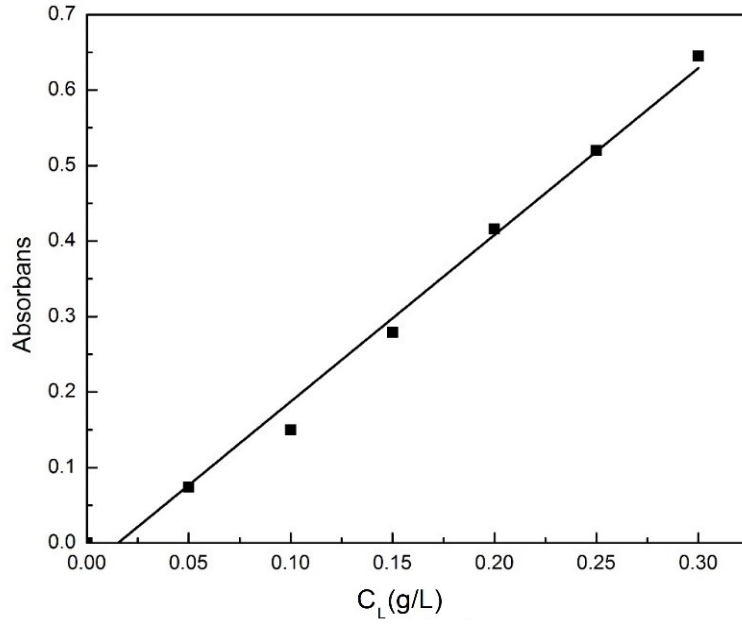
Şekil Ek 2.2. Sakkaroz çalışma doğrusu ($y = 10.39018x - 0.0075$; $R^2 = 0.996$)



Şekil Ek 2.3. Fruktoz çalışma doğrusu ($y = 2.84976x - 0.05264$; $R^2 = 0.992$)



Şekil Ek 2.4. Galaktoz çalışma doğrusu ($y = 3.14405x - 0.09287$; $R^2 = 0.986$)



Şekil Ek 2.5. Laktoz çalışma doğrusu ($y = 2.20x - 0.05193$; $R^2 = 0.9907$)

EK 3. FENOL-SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİ

Fenol sülfürik asit yöntemi; bir örnekteki toplam karbonhidrat derişimini belirlemek için kullanılan, basit ve hızlı kolorimetrik bir yöntem olarak tanımlanmaktadır [175]. Bu yöntem kullanılarak, mono-, di-, oligo- ve polisakaritler de dahil olmak üzere tüm karbonhidratların derişimlerinin tayin edilebildiği ifade edilmektedir. Fenol-sülfürik asit yönteminde; polisakkaritler, oligosakkaritler ya da disakkaritlerin derişik sülfürik asit ile monosakkaritlere parçalandığı ve oluşan parçalanma ürünlerinin fenol ile reaksiyona girerek sarı-turuncu bir renk oluşturdıkları belirtilmektedir [175].

Yöntemin uygulanışında; toplam şeker tayini yapılacak olan örneklerin uygun seyreltileri hazırlandıktan sonra, 2 mL örnek üzerine 1 mL %5'lik (w/v) fenol çözeltisi ve 5 mL derişik sülfürik asit ilave edilmektedir. Elde edilen çözelti bir vorteks yardımıyla yaklaşık olarak 15 dakika karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığındaki bir su banyosunda 20 dakika bekletilmektedir. Aynı işlemler içerisinde örnek yerine saf su konularak hazırlanan kör çözelti için de uygulanmaktadır. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları ise bir spektrofotometrede, 490 nm dalga boyunda ve köre karşı ölçülmektedir.

Daha sonra ise bir absorbans-derişim grafiği çizilerek, elde edilen eğriye ait korelasyon eşitliğinin yardımıyla, incelenen örnekteki şeker derişimi hesaplanmaktadır [166].

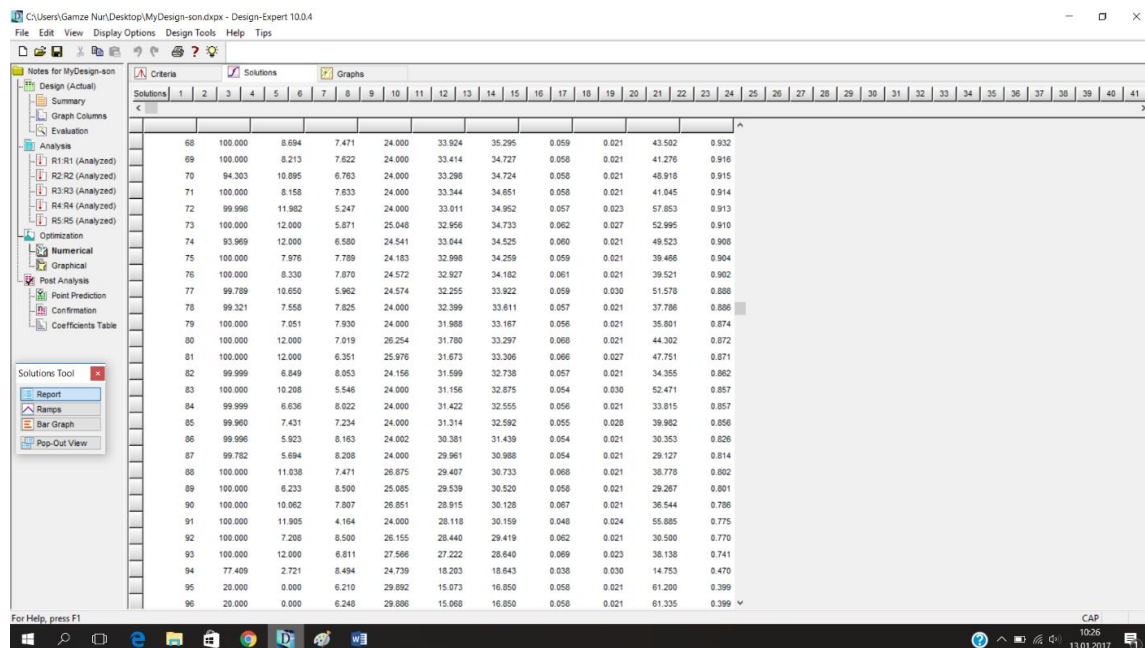
EK 4. *A. pullulans* AZ-6 SUŞU İLE PULLULAN ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU ÇALIŞMASINDA ELDE EDİLEN FERMANTASYON ORTAMININ BİLEŞİMİ

Çizelge Ek 4.1. Optimizasyon çalışması sonucunda belirlenen fermantasyon ortamı bileşimi

Bileşen	Derişim (gL ⁻¹)
Sakkaroz	100.0
Pepton	11.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
K ₂ HPO ₄	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	1.0

Yukarıda bileşimi verilen fermantasyon ortamının bileşenlerinden sakkaroz ayrı olarak hazırlanmıştır. Sakkaroz çözeltisi ve diğer bileşenleri içeren ortam, otoklavda 121°C’de 15 dakika tutularak ayrı ayrı sterilize edilmişler ve soğuduktan sonra birleştirilmişlerdir. Hazırlanan fermantasyon ortamının başlangıç pH’ı ise 6.48’e ayarlanmıştır.

Çizelge Ek 5.1. Optimizasyon çalışmasında istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılarak belirlenen hedefler ve program tarafından önerilen çözümler



Çizelge Ek 5.1. Devam ediyor

C:\Users\Gamze Nur\Desktop\MyDesign-son.dpx - Design-Expert 10.0.4

File Edit View Display Options Design Tools Help Tips

Notes for MyDesign-son

Design (Actual)
Summary
Graph Columns
Evaluation
Analysis
R1 R1 (Analyzed)
R2 R2 (Analyzed)
R3 R3 (Analyzed)
R4 R4 (Analyzed)
R5 R5 (Analyzed)
Optimization

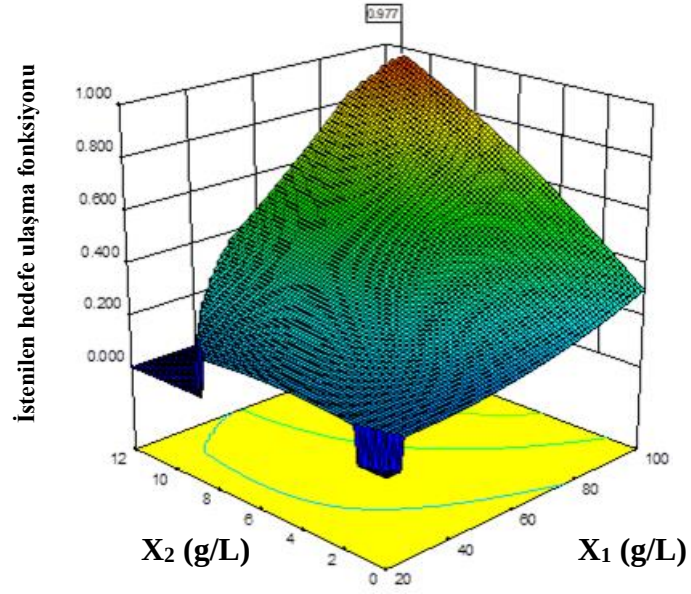
Criteria Solutions Graphs

Solutions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

	97	20.000	0.029	6.228	29.907	15.064	16.844	0.058	0.021	61.283	0.399
	98	20.000	0.033	6.236	29.910	15.063	16.844	0.058	0.021	61.316	0.399
	99	20.001	0.000	6.158	29.880	15.063	16.830	0.058	0.021	60.957	0.398
	100	20.003	0.000	6.084	29.892	15.063	16.820	0.058	0.021	60.670	0.398

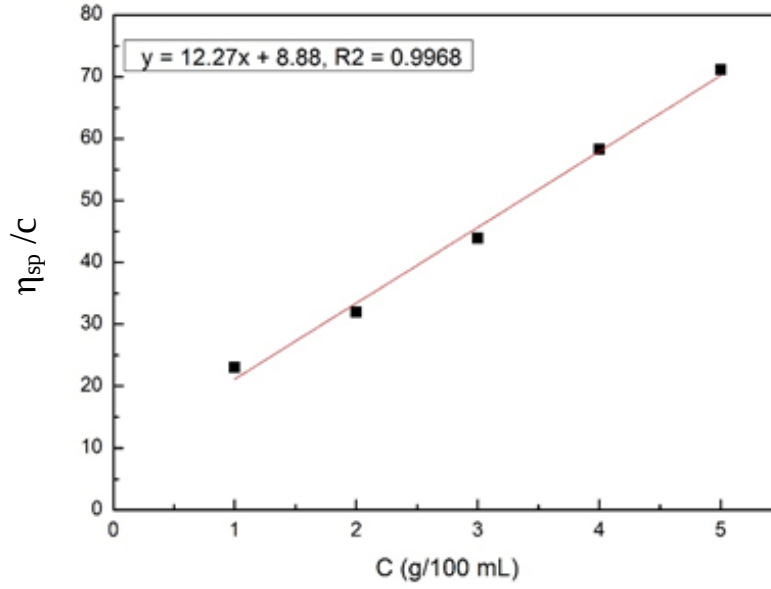
100 Solutions found

EK 6. İSTENİLEN HEDEFE ULAŞMA FONKSİYONU İLE YAPILAN OPTİMİZASYONDA ELDE EDİLEN GRAFİK

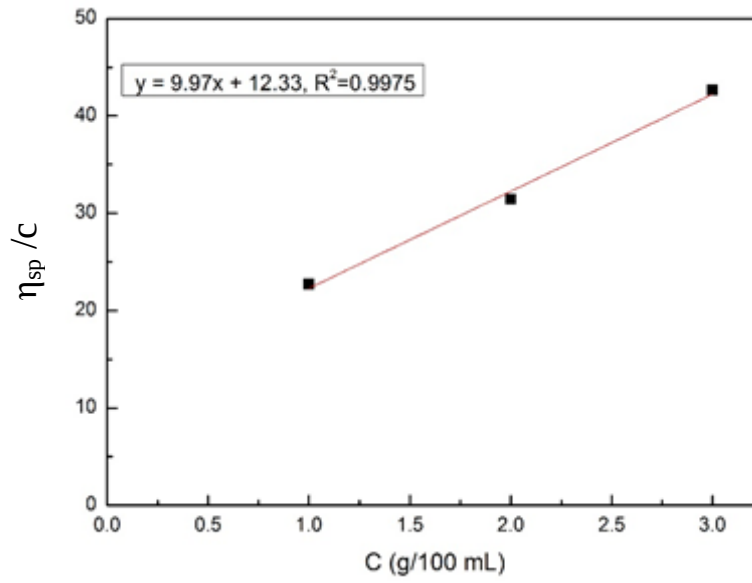


Şekil Ek 6.1. İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun, başlangıç sakkaroz ve pepton derişimleri ile değişimi ($X_1 = 100$ g/L; $X_2 = 11.305$ g/L)

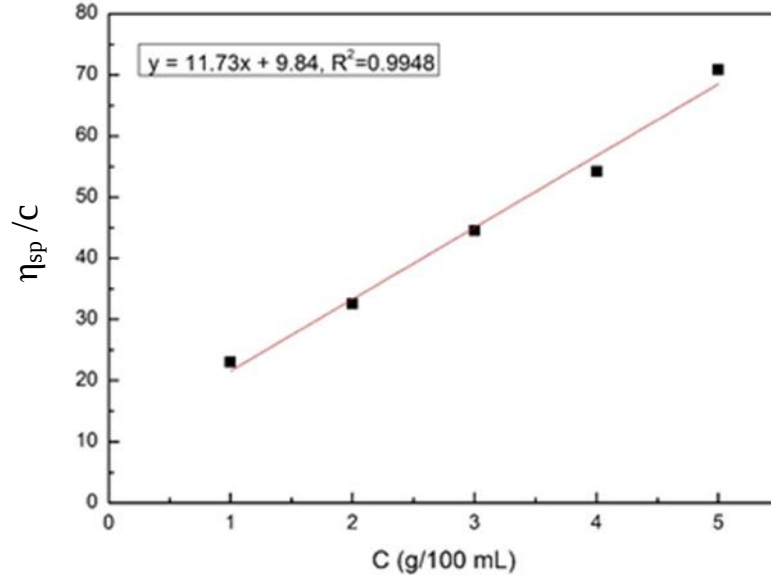
EK 7. FARKLI FERMANTASYON KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN BAZI EPS ÖRNEKLERİNİN İNTRİNSİK VİSKOZİTELERİNİN HESAPLANMASINDA KULLANILAN GRAFİKLER



(a)



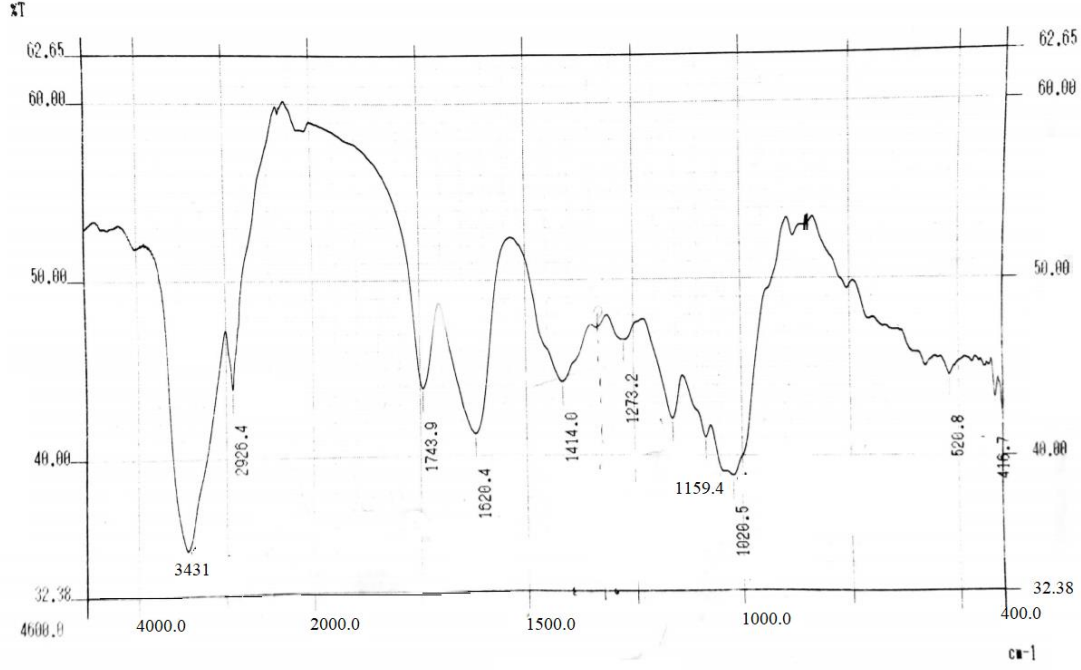
(b)



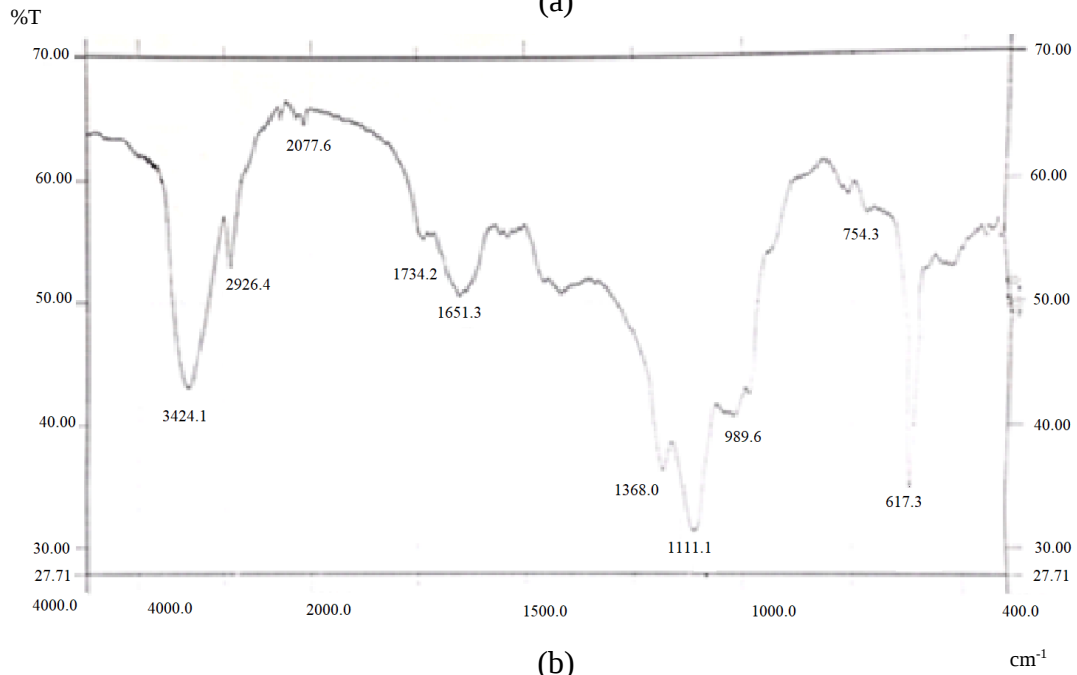
(c)

Şekil Ek 7.1. a: *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından (a): optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deneyde üretilen, (b): melasın fermantasyon ortamında sakkarozun yerine bileşen olarak kullanıldığı deneyde üretilen, (c): *A. pullulans* AZ-6, mutant no. 20 suşu tarafından optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deneyde üretilen EPS örneklerinin sudaki çözeltilerinin indirgenmiş viskozitelerinin, EPS çözeltilerinin derişimleri ile değışimleri

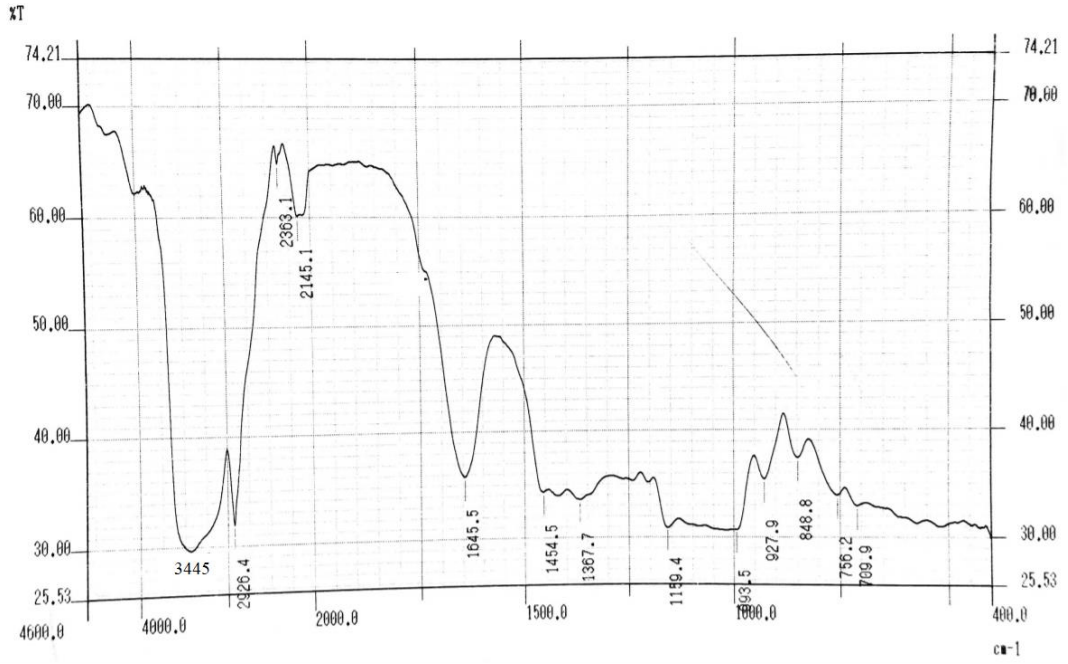
EK 8. FARKLI FERMANTASYON KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN BAZI EPS ÖRNEKLERİ İLE SAF VE TİCARİ PULLULAN ÖRNEKLERİNE AİT FT-IR SPEKTRUMLARI



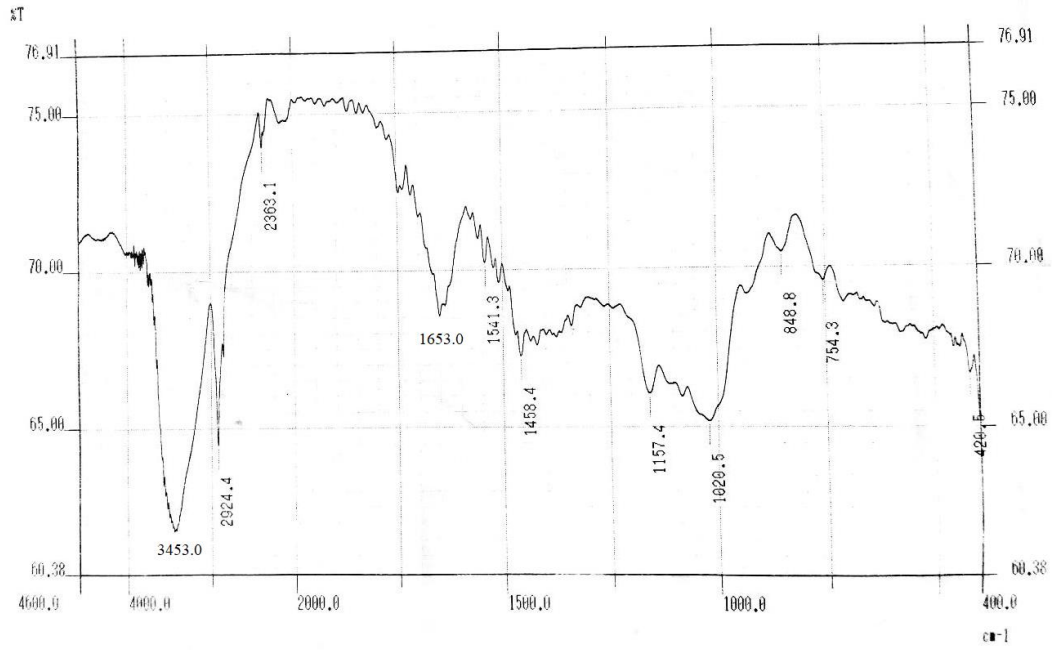
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil Ek 8.1. *A. pullulans* AZ-6 suşu tarafından (a): ana fermantasyon ortamında gerçekleştirilen deneyde üretilen, (b): optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyde üretilen EPS örneklerine ait FT-IR spektrumları, (c): saf pullulan (Sigma) örneğine ait FT-IR spektrumu, (d): ticari pullulan (Hayashibara) örneğine ait FT-IR spektrumu

EK 9. TEZDEN TÜRETİLMİŞ BİLDİRİLER

Müjdecı, G, N., Bozdemir, M, T., Özbaş, Z, Y. Effects of various substrates on growth and pullulan production characteristics of *Aureobasidium pullulans* AZ-6, 10th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica, Sofya, Bulgaristan, 2017.

Müjdecı, G, N., Bozdemir, M, T., Özbaş, Z, Y. A comparative study on pullulan production by various *Aureobasidium pullulans* strains, FEMS 2017-7th Congress of European Microbiologists, Valensiya, İspanya, 2017.

Müjdecı, G, N., Bozdemir, M, T., Özbaş, Z, Y. Mikrobiyel bir polisakkarit: Pullulan ve uygulama alanları, 10. Gıda Mühendisliğı Kongresi, Side, Türkiye, 2017.

Kara, G, N., Bozdemir, M, T., Özbaş, Z, Y. *Aureobasidium pullulans*: Biyoteknolojik Önemi, Türkiye 12. Gıda Kongresi, Edirne, Türkiye, 2016.