

*Aureobasidium pullulans* İLE LİAMOCİN (AĞIR YAĞ)  
ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF LIAMOCIN (HEAVY OIL)  
PRODUCTION BY *Aureobasidium pullulans*

ASLI DENİZ PEHLİVAN

PROF. DR. Z. YEŞİM ÖZBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

## ÖZET

### *Aureobasidium pullulans* İLE LİAMOCİN (AĞIR YAĞ) ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

Aslı Deniz PEHLİVAN

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

Ocak 2023, 150 sayfa

Bu tez çalışmasında, çeşitli fermantasyon parametrelerinin *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Çalışmada, tüm fermantasyon denemeleri kesikli sistemde, çalkalama hızı ve sıcaklığı kontrol edilebilen bir su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmada ilk olarak, altı *A. pullulans* suşunun liamocin üretimleri, bileşiminde üç farklı şekerin ayrı ayrı denendikleri agarlı bir besiyerinin kullanıldığı bir ön tarama testiyle makroskopik olarak incelenmiş ve tüm suşların agarlı besiyerinde gelişebildikleri ve liamocin üretiminin belirteci olarak koloni etrafında yağ tabakası üretebildikleri belirlenmiştir. Daha sonra, yüksek derişimde liamocin üreten bir suşun belirlenebilmesi amacıyla, altı *A. pullulans* suşunun liamocin üretimleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun, çalışılan diğer suşlardan daha yüksek derişimde (4.20 g/L) liamocin ürettiği belirlenmiştir. Sonraki aşamada ise, seçilen bu suşun farklı karbon kaynakları içeren fermantasyon ortamlarında liamocin üretimleri araştırılmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkaroz kullanıldığında en yüksek liamocin derişimi (5.50 g/L) fruktozun kullanıldığı denemelerde elde edilmiş ve bu nedenle çalışmaya, karbon kaynağı olarak fruktoz içeren fermantasyon ortamıyla devam edilmesine karar verilmiştir. Fermantasyon ortamında

kullanılan farklı azot kaynaklarının, incelenen suşun liamocin üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı denemelerde, organik azot kaynakları olarak; pepton ve maya özütü, inorganik azot kaynağı olarak ise;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kullanılmıştır. Azot kaynakları olarak pepton ve maya özütünün bir arada kullanıldığı deneylerde liamocin üretiminin, diğer azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarından daha yüksek derişimde olduğu (4.26 g/L) belirlenmiştir.

Bu çalışmada daha sonra, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretiminin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, ABD) programında yer alan; dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılmıştır. Program yardımıyla oluşturulan deney tasarım planı kapsamında, merkez noktada 6 paralel olmak üzere 20 deney gerçekleştirilmiştir. Tasarımda seçilen bağımsız değişkenler; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi, başlangıç pH'ı ve sıcaklık, bağımlı değişkenler ise; maksimum liamocin derişimi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum özgül liamocin üretim hızıdır. Tasarım planında verilen koşullarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen verilere, program yardımıyla çoklu regresyon analizi uygulanmış ve bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlikler türetilmiştir. Oluşturulan model eşitliklerin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Optimizasyon aşamasında, program tarafından oluşturulan 58 çözümden; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu (oranı) 0.825, fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi 93.47 g/L, başlangıç pH'ı 4.92 ve sıcaklığın ise 27.2°C olduğu bir çözüm seçilerek, bu koşullarda bir deney gerçekleştirilmiştir. Seçilen koşullarda gerçekleştirilen deneyde, maksimum liamocin derişimi; 3.56 g/L, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme hızı; 0.0670 sa<sup>-1</sup> ve maksimum özgül liamocin üretim hızı ise; 0.00450 [g liamocin/(g mo.sa)] olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçların, %95 güven aralığında oldukları doğrulanmıştır.

Bu tez çalışmasında, incelenen suş tarafından üretilen bazı liamocin örneklerinin moleküler olarak doğrulanmaları; MALDI-TOF-MS ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, GC-FID analizi ile incelenen suş tarafından üretilen liamocinin yağ asidi profili de belirlenmiştir.

Bu araştırmada, incelenen suş tarafından üretilen liamocin örneklerinin biyosürefektan aktivitesini belirlemeye yönelik bazı testler de gerçekleştirilmiştir.

1.08 mg/mL derişimindeki liamocin örneğinin yağ yayma çapı; 8.10 cm olarak ölçülmüştür. Liamocin örneğinin yüzey gerilimi değeri ise, asılı damla yöntemiyle, 31.6 mN/m olarak olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Liamocin, Ağır yağ, *Aureobasidium pullulans*, Fermantasyon, Optimizasyon, Biyosürefektan

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF LIAMOCIN (HEAVY OIL) PRODUCTION BY *Aureobasidium pullulans***

**Ash Deniz PEHLİVAN**

**Master of Science, Department of Food Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ**

**January 2023, 150 pages**

In this thesis, the effects of various fermentation parameters on liamocin production of *Aureobasidium pullulans* NBRC 100716 were investigated. In the study, all fermentation experiments were carried out in batch system, using a water bath with controllable shaking speed and temperature. Primarily, the liamocin production of six *A. pullulans* strains was macroscopically examined with a pre-screening test using an agar medium in which three different sugars were tested separately and it was determined that all strains could grow on agar medium and produce an oil layer around the colony as an indicator of liamocin production. Afterwards, liamocin production of six *A. pullulans* strains was compared with the aim of identifying a strain that produced high concentrations of liamocin, and it was determined that *A. pullulans* NBRC 100716 produced higher concentrations of liamocin (4.20 g/L) than the other strains studied. Then, liamocin production of this selected strain was investigated in fermentation media containing different carbon sources. In the experiments carried out for this purpose, when glucose,

fructose, maltose and sucrose were used as carbon sources in the fermentation medium, it was observed that the highest liamocin concentration (5.50 g/L) was obtained in the experiments using fructose. For this reason, it was decided to continue the study with a fermentation medium containing fructose as a carbon source. In the trials where the effects of different nitrogen sources used in the fermentation medium on the liamocin production of the tested strain were investigated; peptone and yeast extract were used as organic nitrogen sources and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was used as inorganic nitrogen source. In experiments where peptone and yeast extract were used together as nitrogen sources, it was determined that the production of liamocin was at a higher concentration (4.26 g/L) than in the fermentation medium where other nitrogen sources were used.

In the next part of this study, optimization of liamocin production of *A. pullulans* NBRC 100716 strain was performed by response surface method. For this purpose, in the Design Expert<sup>®</sup>12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, ABD) software; rotatable central composite design method was used. Within the scope of the experimental design plan created by the program, 20 experiments, 6 parallels at the central point, were carried out. While the independent variables selected in the design were the initial fructose concentration of the fermentation medium, initial pH and temperature, the dependent variables were the maximum liamocin concentration, the microorganism specific growth rate and the maximum specific liamocin formation rate. Multiple regression analysis was applied to the data obtained as a result of the experiments carried out under the conditions given in the design plan, with the help of the program, and model equations showing the effects of independent variables on dependent variables were derived. The convenience of the created model equations was evaluated by analysis of variance (ANOVA). An experiment was carried out under these conditions by choosing a solution with a desirability function was 0.825, initial fructose concentration of fermentation medium was 93.47 g/L, initial pH was 4.92 and temperature of 27.2°C from 58 solutions created by the program during the optimization. In the experiment performed under the selected conditions, the maximum liamocin concentration, the specific growth rate of *A. pullulans* NBRC 100716 strain and the maximum specific liamocin formation rate were found as; 3.56 g/L, 0.0670 h<sup>-1</sup> and 0.00450 [g liamocin/(g mo.h)], respectively. It has been verified that the obtained results are within 95% confidence intervals.

In this thesis, molecular confirmations of some liamocin samples produced by the tested strain were performed by MALDI-TOF-MS. In addition, the fatty acid profile of liamocin produced by the tested strain was also determined by GC-FID analysis. In this study, some tests were also performed to determine the biosurfactant activity of liamocin samples produced by the tested strain. The oil spreading diameter of the 1.08 mg/mL liamocin sample was measured as 8.10 cm. The surface tension value of the liamocin sample was determined as 31.6 mN/m using the pendant drop method.

**Keywords:** Liamocin, Heavy oil, *Aureobasidium pullulans*, Fermentation, Optimization, Biosurfactant

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve birikimleriyle beni yönlendiren, sadece tezim konusunda değil her konuda desteğini ve ilgisini yakından hissettiğim, hayat görüşüne ve meslek etiğine sonsuz saygı duyduğum, değerli tez danışmanım Prof. Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ'a,

Çalışmalarım sırasında her zaman bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana yol gösteren Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi Prof. Dr. M. Tijen BOZDEMİR'e,

Tezimle ilgili, yüzey gerilimi analizlerini gerçekleştirmemiz için laboratuvar imkan ve cihazlarını kullanmamız konusunda yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN ve Dr. Öğr. Üyesi Dicle KALAYCIOĞLU'na,

Lipid boyama ve görüntüleme amacıyla, laboratuvarını bize açan, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR ve inceleme sırasında bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Handan Sevim AKAN ve Doç. Dr. Hanife DÖNMEZ'e,

Tez çalışmamda kullandığım bazı yöntemler konusunda bana yardımcı olan Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Seda KARASU YALÇIN'a,

Deneyle sırasında kullandığım ham petrolü temin eden Hacettepe Üniversitesi Jeoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. İsmail Hakkı DEMİREL'e,

GC-MS analizlerimizi yaptırmamı sağlayan Hitit Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Arş. Gör. Dr. Gamze Nur MÜJDECİ'ye ve MALDI-TOF-MS analizlerimizi gerçekleştiren, Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'ne,

Tezim süresince bana her zaman destek olan Uzm. Meltem YILDIRIM, Uzm. Yelda ZENCİR ve Arş. Gör. Büşra AKDENİZ OKTAY'a,

Her zaman beni koşulsuz sevdiklerini bildiğim, çok değerli babam Selçuk PEHLİVAN, annem Serap PEHLİVAN, kardeşim Yunus Can PEHLİVAN, babaannem Nebahat PEHLİVAN'a ve her zaman yanımda olduğunu ve benimle gurur duyduğunu bildiğim büyükbabam Niyazi PEHLİVAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve sevgisini hep yanımda hissettiğim, bana cesaret ve güç veren Ozan BOZDEMİR'e,

Yeni gittiğim bir şehirde beni hiç yabancı hissettirmeyen ve desteklerini esirgemeyen sevgili ev arkadaşım Merve YURDAKUL başta olmak üzere; Cansu LEYLAK, Kübra KARA, Şeyma Zeynep MAVZEROĞLU, Büşra YİĞİTOL, Esra YETİŞGİN ve diğer araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürler...



# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xx
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	5
2.1. Kesikli Fermantasyon Sistemlerinde Kullanılan Kinetik Eşitlikler .....	18
2.1.1. Özgül Üreme Hızı .....	18
2.1.2. Özgül Ürün Oluşum Hızı .....	19
2.1.3. Substrat Tüketim Hızı .....	19
2.2. Yanıt Yüzey Yöntemi.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	25
3.1. Materyal .....	25
3.1.1. Mikroorganizma .....	25
3.1.2. Besiyerleri .....	26
3.1.3. Deney Düzenegi .....	26
3.2. Yöntem .....	26
3.2.1. Fermantasyon Ortamları İçin Aşı Kültürlerinin Hazırlanması.....	26
3.2.2. Liamocin Fermantasyonu .....	27
3.2.3. Başlangıç İnokülasyon Derişiminin Tayini.....	27
3.2.4. Liamocin Ekstraksiyonu ve Derişim Tayini.....	28
3.2.5. Biyokütle Derişiminin Tayini.....	28
3.2.6. Çeşitli Şekerlerin Derişimlerinin Tayininde Kullanılan Çalışma Doğrularının Oluşturulması .....	28

3.2.7. pH Ölçümü.....	29
3.2.8. Spektroskopik Analizler .....	29
3.2.8.1. Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Analizi .....	29
3.2.8.2. Gaz Kromatografisi Flame (Alev) İyonizasyon Dedektörü (GC-FID) Analizi.....	29
3.2.9. Liamocin Fermantasyonunda Kullanılacak <i>A. pullulans</i> Suşunun Seçimi ...	30
3.2.10. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması.....	31
3.2.11. Farklı Azot Kaynaklarının <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması .....	32
3.2.12. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Bazı Fermantasyon Parametrelerinin Etkilerinin İncelenmesi Amacıyla Deney Tasarım Planının Oluşturulması .....	35
3.2.13. Çalışma İçin Belirlenen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmeleri.....	37
3.2.14. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşu ile Liamocin Üretiminin Optimizasyonu.....	38
3.2.15. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşu Tarafından Üretilen Liamocin Örneklerinin Biyosürefektan Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	40
3.2.15.1. Yağ Yayma Testi (Oil Spreading Test) .....	40
3.2.15.2. Yüzey Geriliminin Belirlenmesi .....	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	42
4.1. Liamocin Fermantasyonunda Kullanılacak Olan <i>A. pullulans</i> Suşunun Seçimine İlişkin Sonuçlar .....	42
4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar .....	47
4.3. Farklı Azot Kaynaklarının <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar .....	55
4.4. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşu ile Liamocin Üretiminin Optimizasyonu İçin Deney Tasarım Planının Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar .....	62

4.5. Çalışmada Seçilen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmelerine İlişkin Sonuçlar .....	85
4.6. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşu ile Liamocin Üretimine Optimizasyonuna İlişkin Sonuçlar.....	106
4.7. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşu Tarafından Üretilen Liamocin Örneklerine Ait Spektroskopik Analizlerin Sonuçları.....	112
4.7.1. MALDI-TOF-MS Analizinin Sonuçları.....	112
4.7.2 GC-FID Analizi Sonuçları .....	114
4.8. <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 Suşu Tarafından Üretilen Liamocin Örneklerinin Biyosümfektan Aktivitelerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	116
4.8.1. Yağ Yayma Testine İlişkin Sonuçlar .....	116
4.8.2. Yüzey Gerilimi Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Sonuçlar .....	118
5. SONUÇ .....	121
6. KAYNAKLAR.....	125
EKLER .....	132
EK 1- FERMANTASYON DENEMELERİNDE KULLANILAN FARKLI <i>A.</i> <i>pullulans</i> KÜLTÜRLERİ .....	132
EK 2- LİAMOCİN EKSTRAKSİYONU.....	133
EK 3- DNS YÖNTEMİ.....	136
EK 4- FENOL SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİ .....	136
EK 5- DENEYLERDE FERMANTASYON ORTAMLARINDAKİ ÇEŞİTLİ ŞEKERLERİN DERİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN STANDART ÇALIŞMA DOĞRULARI .....	137
EK 6- DENEYLER SIRASINDA ÇEKİLEN BAZI MİKROSKOPİK GÖRÜNTÜLER.....	140
EK 7- OPTİMİZASYON ÇALIŞMASINDA BAĞIMLI DEĞİŞKENLER İÇİN BELİRLENEN HEDEFLER VE ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER .....	142
EK 8- <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNE AİT MALDI-TOF- MS SPEKTRUMU.....	144
EK 9- <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNE AİT GC-FID KROMATOGRAMI .....	145

EK 10- <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNE AİT YAĞ YAYMA METODU FOTOĞRAFLARI .....	146
EK 11- <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNİN YAĞ YAYMA TESTİNE AİT ÇALIŞMA DOĞRUSU .....	147
EK 12- Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	148
ÖZGEÇMİŞ .....	149

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. *A. pullulans* tarafından üretilen (a) liamocin A1 ve A2 (b) liamocin B1 ve B2 moleküllerinin kimyasal yapıları ..... 10
- Şekil 2.2. *A. pullulans*'ın liamocin, pullulan ve melanin biyosentezleri için önerilen yol izi ..... 11
- Şekil 2.3. Üç bağımsız değişkenli merkezi karma tasarım modeli ..... 22
- Şekil 4.1. Glukoz içeren besiyerinde; (a): *A. pullulans* BJ20p4, (b): *A. pullulans* TrisCisz2, (c): *A. pullulans* G. Kaukaska, (d): *A. pullulans* CCF 4532 (e): *A. pullulans* NBRC 100716, (f): *A. pullulans* AZ-6 suşlarına ait makroskopik morfoloji görüntüleri ..... 42
- Şekil 4.2. Fruktoz içeren besiyerinde; (a): *A. pullulans* BJ20p4, (b): *A. pullulans* TrisCisz2, (c): *A. pullulans* G. Kaukaska, (d): *A. pullulans* CCF 4532 (e): *A. pullulans* NBRC 100716, (f): *A. pullulans* AZ-6 suşlarına ait makroskopik morfoloji görüntüleri ..... 43
- Şekil 4.3. Sakkaroz içeren besiyerinde; (a): *A. pullulans* BJ20p4, (b): *A. pullulans* TrisCisz2, (c): *A. pullulans* G. Kaukaska, (d): *A. pullulans* CCF 4532 (e): *A. pullulans* NBRC 100716, (f): *A. pullulans* AZ-6 suşlarına ait makroskopik morfoloji görüntüleri ..... 44
- Şekil 4.4. (AZ-6): *A. pullulans* AZ-6, (CCF): *A. pullulans* CCF 4532, (GK): *A. pullulans* G. Kaukaska B1, (NB): *A. pullulans* NBRC 100716, (BJ): *A. pullulans* BJ20p4, (TC): *A. pullulans* TrisCisz2 suşları tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri ..... 45
- Şekil 4.5. (AZ-6): *A. pullulans* AZ-6, (CCF): *A. pullulans* CCF 4532, (GK): *A. pullulans* G. Kaukaska B1, (NB): *A. pullulans* NBRC 100716, (BJ): *A. pullulans* BJ20p4, (TC): *A. pullulans* TrisCisz2 suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri ..... 46
- Şekil 4.6. Farklı karbon kaynaklarının substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri ..... 48

Şekil 4.7.	Farklı karbon kaynaklarının substrat olarak kullanıldıkları ortamlarda, <i>A. pullulans</i> NBRC 100713 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	49
Şekil 4.8.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun farklı substratlar içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin ln değerlerinin zamanla değişimleri, (a): Glukoz, (b): Fruktoz, (c): Maltoz ve (d): Sakkaroz ....	50
Şekil 4.9.	Farklı karbon kaynaklarının <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri .....	52
Şekil 4.10.	Farklı karbon kaynaklarının <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerdeki substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri .....	53
Şekil 4.11.	Farklı azot kaynaklarıyla gerçekleştirilen deneylerde fermantasyon sırasında kültür ortamlarına ait görsel .....	55
Şekil 4.12.	Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri .....	56
Şekil 4.13.	Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri ...	57
Şekil 4.14.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun farklı azot kaynakları içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin ln değerlerinin zamanla değişimleri. (a): Pepton ve maya özütü, (b): Pepton, (c): Maya özütü ve (d): (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	58
Şekil 4.15.	Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynaklarının kullanıldığı denemelerde fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	59
Şekil 4.16.	Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri .....	60
Şekil 4.17.	25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri .....	65

Şekil 4.18.	25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11 19 ve 20 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	66
Şekil 4.19.	25.6 °C’de gerçekleştirilen (a): 3, (b): 11, (c): 19 ve (d): 20 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	67
Şekil 4.20.	25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11 19 ve 20 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	68
Şekil 4.21.	25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneylerde, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri .....	69
Şekil 4.22.	30.4°C’de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri .....	70
Şekil 4.23.	30.4°C’de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminlerinin zamanla değişimleri .....	70
Şekil 4.24.	30.4°C’de gerçekleştirilen (a): 2, (b): 5, (c): 7 ve (d): 13 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	71
Şekil 4.25.	30.4°C’de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	72
Şekil 4.26.	30.4°C’de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerdeki fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri .....	73
Şekil 4.27.	28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri .....	74
Şekil 4.28.	28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde <i>A. pullulans</i> NBRC suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	74

Şekil 4.29.	28°C’de gerçekleştirilen (a): 1, (b): 9, (c): 15 ve (d): 18 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	75
Şekil 4.30.	28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerdeki, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	76
Şekil 4.31.	28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri .....	77
Şekil 4.32.	24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri .....	78
Şekil 4.33.	24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimleri .....	78
Şekil 4.34.	24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen (a): 10 ve (b): 12 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	79
Şekil 4.35.	24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri .....	80
Şekil 4.36.	24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri .....	80
Şekil 4.37.	28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı merkez nokta deneylerinde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri .....	81
Şekil 4.38.	28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı merkez nokta deneylerinde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri .....	82
Şekil 4.39.	28°C’de gerçekleştirilen (a): 4, (b): 6, (c): 8, (d): 14, (e): 16 ve (f): 17 numaralı deneylerde, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri .....	83



- Şekil 4.40. 28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri ..... 84
- Şekil 4.41. 28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı deneylerde, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri ..... 85
- Şekil 4.42. Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile başlangıç pH değerlerinin (X2), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X3 = 28°C) ..... 89
- Şekil 4.43. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile sıcaklık değerlerinin (X3), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X2 = 5) ..... 90
- Şekil 4.44. Fermantasyon ortamı başlangıç pH’ı (X2) ile sıcaklık değerlerinin (X3), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X1 = 100 g/L) ..... 92
- Şekil 4.45. Maksimum liamocin derişimlerinin (Y1) deneysel değerleri ile tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8292x + 0.4596$ ,  $R^2 = 0.8292$ ) ..... 93
- Şekil 4.46. Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile başlangıç pH değerlerinin (X2); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X3 = 28°C) ..... 95
- Şekil 4.47. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X2 = 5) ..... 97
- Şekil 4.48. Fermantasyon ortamı başlangıç pH’ı (X2) ile sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X1 = 100 g/L) ..... 98
- Şekil 4.49. Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (Y2) deneysel değerleri ile tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.7905x + 0.0119$ ;  $R^2 = 0.7905$ ) ..... 99
- Şekil 4.50. Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile başlangıç pH değerlerinin (X2), maksimum liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki

	etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_3 = 28^\circ\text{C}$ ) .....	101
Şekil 4.51.	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ) ile sıcaklığının ( $X_3$ ), maksimum liamocin üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_2 = 5$ ) .....	103
Şekil 4.52.	Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı ( $X_2$ ) ile sıcaklığın ( $X_3$ ), maksimum liamocin üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 100 \text{ g/L}$ ) .....	104
Şekil 4.53.	Maksimum özgül liamocin üretim hızlarının ( $Y_3$ ) deneysel değerleri ile, tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8512x + 0,0005$ ; $R^2 = 0.8512$ ) .....	105
Şekil 4.54.	İstenilen hedefe ulaşma oranının, fruktoz başlangıç derişimi ve pH ile değişimleri ( $X_1$ =fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi, $X_2$ =pH) .....	106
Şekil 4.55.	Optimum çalışma koşullarında, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 tarafından üretilen liamocin derişiminin zamanla değişimi .....	107
Şekil 4.56.	Optimum çalışma koşullarında, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi .....	108
Şekil 4.57.	Optimum çalışma koşullarında, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu için $\ln X$ değerlerinin zamanla değişimi .....	109
Şekil 4.58.	Optimum çalışma koşullarında, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi .....	109
Şekil 4.59.	Optimum çalışma koşullarında, <i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun fruktoz tüketim hızının zamanla değişimi .....	110
Şekil 4.60.	Farklı derişimlerdeki liamocin çözeltilerinin yüzey gerilimlerinin liamocin derişimleri ile değişimi .....	119

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çalışmada liamocin üretimi amacıyla denenen <i>A. pullulans</i> kültürleri ..25
Çizelge 3.2.	GC-FID analizinde uygulanan sıcaklık programı ..... 30
Çizelge 3.3.	Deneylerde kullanılan organik ve inorganik azot kaynakları ve azot içerikleri ..... 33
Çizelge 3.4.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminde kullanılan farklı azot kaynakları ve fermantasyon ortamlarındaki başlangıç derişimleri .34
Çizelge 3.5.	Deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri ..... 36
Çizelge 3.6.	Deney tasarımında kullanılan bağımlı değişkenler ve simgeleri ..... 36
Çizelge 3.7.	Optimizasyon çalışmasında kullanılan bağımsız (X) ve bağımlı (Y) değişkenler için tanımlanan hedefler ile minimum ve maksimum değerler ..... 38
Çizelge 4.1.	Liamocin üretimleri incelenen <i>A. pullulans</i> suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ile fermantasyon sırasında elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri ..... 47
Çizelge 4.2.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminde kullanılan substrat kaynakları ve bu deneylerde elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme ve en yüksek ürün oluşum hızları ile en yüksek substrat tüketim hızı değerleri ..... 54
Çizelge 4.3.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşunun liamocin üretimine farklı azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme ve en yüksek ürün oluşum hızları ve en yüksek substrat tüketim hızı değerleri ..... 61
Çizelge 4.4.	Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde, seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri ..... 63
Çizelge 4.5.	Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri ..... 64

Çizelge 4.6.	Merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen maksimum liamocin derişimleri (Y1), özgül üreme hızları (Y2) ve maksimum liamocin üretim hızları (Y3) .....	86
Çizelge 4.7.	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları .....	88
Çizelge 4.8.	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları .....	94
Çizelge 4.9.	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), özgül liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları .....	100
Çizelge 4.10.	Bağımlı değişkenlerin deneysel değerleri ve optimizasyon programı kullanılarak hesaplanan teorik, minimum ve maksimum değerleri ....	111
Çizelge 4.11.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen ve bazı literatür çalışmalarından alınan liamocin örneklerine ait MALDI-TOF-MS spektrumları sonuçları .....	113
Çizelge 4.12.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğinin yağ asidi kompozisyonu .....	114
Çizelge 4.13.	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğinin doymuş ve doymamış yağ asidi oranları .....	115
Çizelge 4.14.	Optimum koşullarda gerçekleştirilen deney için, liamocin derişiminin zamanla değişimi ve yağ açma testi sonuçları .....	117

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

d	İstenilen hedefe ulaşma fonksiyonu
F	Fischer testi
X	Kuru ağırlık cinsinden biyokütle derişimi (g mo/L)
X <sub>0</sub>	Üssel üreme bölgesinin başladığı anda fermantasyon ortamındaki biyokütle derişimi (g mo/L)
t	Zaman (sa)
μ	Özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )
qp	Özgül ürün oluşum hızı [g liamocin/(g mo.sa)]
-r <sub>s</sub>	Substrat tüketim hızı [g substrat/(L.sa)]
β <sub>0</sub>	Sabit regresyon katsayısı
β <sub>1</sub>	Modeldeki bağımsız değişkenlerin lineer etki regresyon katsayısı
β <sub>2</sub>	Modeldeki bağımsız değişkenlerin ikinci dereceden etki regresyon katsayısı
β <sub>12</sub>	Modeldeki bağımsız değişkenlerin ikili etki katsayısı
ε	İstatistiksel hata
α	Tasarımdaki yıldız (eksenel) noktalarının merkez noktaya olan uzaklıkları
n	Tasarımdaki deney noktalarının sayısı
n <sub>0</sub>	Merkez noktada gerçekleştirilen deneylerin tekrar sayısı
k	Bağımsız değişken sayısı
R <sup>2</sup>	Belirleme katsayısı
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	Düzeltilmiş belirleme katsayısı
X <sub>1</sub>	Fruktoz başlangıç derişimi (g/L)

X2	Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı
X3	Fermantasyon ortamı sıcaklığı (°C)
X1 <sup>2</sup>	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin karesel etkisi
X1X2	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ve başlangıç pH'ının etkileşimi
X1X3	Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ve sıcaklığın etkileşimi
X2 <sup>2</sup>	Başlangıç pH'ının karesel etkisi
X2X3	Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı ile sıcaklığın etkileşimi
X3 <sup>2</sup>	Fermantasyon ortamı sıcaklığının karesel etkisi
Y1	Maksimum liamocin derişimi (g/L)
Y2	Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )
Y3	Maksimum özgül liamocin üretim hızı [g liamocin/(g mo.sa)]
p	Anlamlılık düzeyi
$\gamma$	Yüzey gerilimi
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
C:N	Karbon azot oranı

### **Kısaltmalar**

PMA	Polimalik asit
EFGB	Hücre dışı fungal glikolipid biyosürefektan (extracellular fungal glycolipid biosurfactant)
GRAS	Genel olarak güvenli (Generally recognized as safe)
MALDI-TOF-MS	Matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon kütle spektrometresi

CMC	Kritik misel konsantrasyonu
PEFA	Yağ asitlerinin poliöl esterleri (Polyol esters of fatty acids)
SCO	Tek hücre yağı (Single cell oil)
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri (Poly unsaturated fatty acid)
PKS	Fungal poliketid sentaz
KS	Ketoaçil sentaz
ACP	Açil taşıyıcı protein
KR	Ketoaçil redüktaz
UDPG	Üridin difosfoglukoz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ANOVA	Varyans analizi (Analysis of variance)
CCD	Merkezi karma tasarım (Central composite design)
DNS	Dinitrosalisilik asit
GC-FID	Gaz kromatografisi-Alev iyonizasyon dedektörü
KO	Kareler ortalaması
RSM	Response Surface Methodology (Yanıt yüzey yöntemi)
SD	Serbestlik derecesi
MEK	Metil etil keton
SO	Seyreltme oranı
YM	Yeast Extract Malt Extract

# 1. GİRİŞ

*Aureobasidium pullulans* bitki, yaprak yüzeyleri, toprak ve su başta olmak üzere çok çeşitli ortamlarda bulunabilen, polimorfik yapıda, maya benzeri bir küf olarak tanımlanmaktadır. *A. pullulans*'ın farklı suşlarının ksilanaz, lipaz, proteaz, selüloz gibi çeşitli endüstriyel enzimler, sideroforlar, polimalik asit (PMA) ve pullulan gibi çok çeşitli endüstriyel biyoürünler üretebildikleri rapor edilmiştir (Price ve ark., 2013; Leathers ve ark., 2018; Scholz ve ark., 2020). Pullulan; suda çözünebilen, yenilebilir, tatsız ve ortalama molekül ağırlığı 100-200 kDa aralığında olan,  $\alpha$ -1,4 ve  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarla bağlı, tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşan bir polisakkarit olarak tanımlanmaktadır (Price ve ark., 2013).

Son yıllarda *A. pullulans*'ın bazı suşlarının liamocin olarak da adlandırılan yağlar ürettikleri de rapor edilmiştir. Liamocin moleküllerinin; nadir *A. pullulans* suşları tarafından üretilerek hücre dışına salgılanan, yapısal olarak özgün ve sudan daha ağır olmaları nedeniyle ağır yağlar olarak da adlandırılan poliollipidler oldukları belirtilmektedir (Manitchotpsit ve ark., 2014). Yapıları ayrıntılı olarak belirlenen liamocin molekülleri; kısmen asetillenmiş üç veya dört 3,5-dihidroksidekanoik ester grubu içeren kuyruk kısmı ve tek bir arabitol veya mannitol içeren bir baş kısmından oluşan poliollipidler olarak tanımlanmışlardır (Price ve ark., 2013; Leathers ve ark., 2015). Liamocin moleküllerinin sarıdan, yeşilin farklı tonlarına kadar değişen renklerde olabildikleri ve bazı suşların ürettikleri liamocin moleküllerinin floresan özellik taşıdığı da belirtilmektedir (Manitchotpsit ve ark., 2011). İkincil metabolitler olarak sınıflandırılan liamocin moleküllerinin üretimleri için uygun besiyeri ve büyüme koşullarının çok önemli olduğu ve bazı *A. pullulans* suşlarının durağan (stationary) fazda, azottan yoksun ortamlarda liamocin üretebildikleri ifade edilmiştir (Garay ve ark., 2018).

Liamocin moleküllerinin belirli kanser hücre hatlarının çoğalmalarına karşı, inhibe edici bir etki gösterdikleri ve ayrıca; güçlü seçici antimikrobiyel moleküller oldukları da rapor edilmiştir (Manitchotpsit ve ark., 2011). Çeşitli *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocin moleküllerinin, bazı *Streptococcus* türlerine karşı spesifik antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kang ve ark., 2022). Bu nedenle, liamocinin yararlı



yeni bir antimikrobiyel ajan olma potansiyeline sahip olduğu ve aşırı antibiyotik kullanımıyla gelişen antibiyotik direncine sahip patojen suşlara karşı; yeni ve özellikle hedefe özgü bir antimikrobiyel madde olarak kullanılabilceği de bildirilmiştir. Bununla birlikte; liamocinin antimikrobiyel aktivitesinin ayrıntılı mekanizmasının hala belirsizliğini koruduğu da belirtilmiştir (Kang ve ark., 2022).

Gıda, tarım, tıp ve eczacılık alanlarında kullanılma potansiyeli yüksek olan poliol lipid yapısındaki liamocin molekülleri hakkında halen, literatürde az sayıda çalışma bulunmakla birlikte bu maddelerin, ticarileşme açısından umut vadeden biyosürfektan moleküller arasında kabul edildiği de bildirilmektedir (Garay ve ark., 2018).

Sürfektan maddeler, hidrofobik ve hidrofilik uçlara sahip olmaları nedeniyle amfifilik moleküller olarak tanımlanmaktadır (Jahan ve ark., 2020). Bu özellikleri nedeniyle sürfektanların, sulu ve susuz sistemler arasındaki ara yüzeylerde etkileşime girerek yüzey gerilimini azaltabildikleri bilinmektedir. Sürfektanların; deterjan, emülgatör ve köpürtücü ajan olarak işlev görebildikleri ve şampuanlar, kişisel bakım ürünleri, farmasötikler, boyalar gibi birçok ürün formülasyonunun ana bileşenini oluşturdukları ifade edilmektedir (Marchant ve Banat, 2012; Jahan ve ark., 2020). Biyosürfektanlar ise; bazı bakteri, maya ve küf türleri tarafından üretilen, yüzey aktif ve amfifilik bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda; kimyasal sürfektanların çevreye olumsuz bazı etkileri nedeniyle; biyosürfektanların giderek artan bir ilgi gördükleri rapor edilmektedir. Biyosürfektanlar; yaygın olarak kullanılan petrol bazlı ve ticari yüzey aktif maddelere karşı seçenek olabilen çevre dostu, biyolojik olarak parçalanabilen ve daha az toksik maddeler olarak da kabul görmektedirler (Scholz ve ark., 2020).

Mikrobiyel yollarla üretilen biyosürfektanların; moleköl ağırlıklarına göre; düşük moleköl ağırlıklı (glükolipidler, lipopeptitler ve flavolipidler) ve yüksek moleköl ağırlıklı (polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler ve lipoproteinler) biyosürfektanlar olarak ikiye ayrıldıkları belirtilmektedir (Marchant ve Banat, 2012). Bazı *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocinlerin ise; hücre dışı fungal glükolipid biyosürfektanlar (extracellular fungal glycolipid biosurfactant; EFGB) olarak, glükolipid biyosürfektanların altında bir grup olarak sınıflandırıldığı rapor edilmektedir (Garay ve ark., 2018).

Mayalar tarafından üretilen biyosülfektanların birçok potansiyel uygulama alanı bulunmaktadır. Bu maddelerin “genel olarak güvenli sınıfta kabul edilen” (Generally recognized as safe; GRAS) niteliklere sahip ürünler arasında oldukları ve toksik olmadıkları bilinmektedir. Bu nedenle de biyosülfektanların, gıda ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılma alanı buldukları bildirilmektedir (Kim, Lee ve Yun, 2015).

Liamocin moleküllerinin yüzey gerilimlerinin 27 mN/m ile 31.5 mN/m arasında değiştiği rapor edilmekte, bu değerlerin de yüzey gerilimini azaltmak için kullanılan ticari sülfektanlarınkine benzer olduğu belirtilmektedir (Garay ve ark., 2018). Bu nedenle liamocinlerin, ticari olarak kullanılan yüzey aktif maddeler gibi; yüzey gerilimini azaltabilen biyosülfektanlar olarak kullanılacakları de rapor edilmektedir (Scholz ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasının amacı; bazı *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimlerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, yüksek derişimde liamocin üreten bir suşun belirlenerek seçilen bu suşun, liamocin üretimi üzerine bazı fermantasyon parametrelerinin etkilerinin incelenmesidir. Bu tezde ayrıca, incelenen *A. pullulans* suşunun liamocin üretiminin, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmesi de amaçlanmıştır.

Bu araştırmada ilk olarak; çeşitli yabancı kültür koleksiyonu merkezlerinden sağlanan bazı *A. pullulans* suşları ve daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir araştırmada ham zeytinden izole edilmiş olan; yerli bir *A. pullulans* suşunun, liamocin üretme potansiyelleri çeşitli testler kullanılarak incelenmiş ve üretici suşlar arasından yüksek miktarda liamocin üretebilen bir suş belirlenmiştir. Daha sonra seçilen suşun liamocin üretimi üzerine, fermantasyon ortamında kullanılan farklı karbon ve azot kaynaklarının etkileri araştırılmıştır. Fermantasyon ortamı bileşiminde kullanılacak olan ve liamocin üretimini en iyi destekleyen karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesinin ardından çalışmada incelenen suşun liamocin üretimi için, bazı fermantasyon parametrelerinin optimizasyonu ile ilgili deneyler gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında ayrıca, çalışılan suş tarafından üretilen liamocinin moleküler karakterizasyonu da MALDI-TOF-MS ile ortaya konulmuş, yağ asidi kompozisyonu

belirlenmiş ve çalışılan suş tarafından üretilen liamocinin biyosürfektan niteliği de tanımlanmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Biyosürfektanlar; hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşan amfifilik bileşiklerdir. Bu yapıları nedeniyle biyosürfektanlar, sulu çözeltiler ve hidrokarbon karışımlarında yüzey ve ara yüzey gerilimlerini azaltabilen yüzey aktif bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Biyosürfektanların; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebildiği rapor edilmiştir (Jahan ve ark., 2020).

Biyosürfektanların birçok sentetik yüzey aktif maddeden daha etkili, seçici ve kararlı oldukları bildirilmiştir. Bunun yanısıra biyosürfektanların sentetik sürfektanlara göre daha düşük toksisite, biyolojik anlamda daha kolay parçalanma özelliği, çevre dostu ve daha yüksek köpük kapasitesine sahip olmaları gibi çeşitli üstünlükleri olduğu da rapor edilmiştir. Biyosürfektanların sentetik yüzey aktif maddelerden daha düşük kritik misel konsantrasyonuna (CMC) sahip olabilecekleri ve bunun da, çeşitli uygulamalarda verimliliği artırabileceği ifade edilmiştir.

Polar gruplarının yapısına göre sınıflandırılan kimyasal olarak sentezlenmiş yüzey aktif maddelerin aksine biyosürfektanların, esas olarak, kimyasal bileşimlerine ve mikrobiyel kökenlerine göre sınıflandırıldıkları bilinmektedir. Biyosürfektanlar genel olarak; aminoasitler, peptitler, anyonlar ve katyonlardan oluşan bir hidrofilik kısım ve mono-, di-, veya polisakkaritler ve doymamış, doymuş veya yağ asitlerinden oluşan bir hidrofobik kısım içermektedirler. Buna göre biyosürfektanların ana sınıfları arasında; karbonhidratların uzun zincirli bir alifatik aside bağlandığı glikolipitler ile lipopeptitler, lipoproteinler, fosfolipidler ve yağ asitlerinin bulunduğu bildirilmektedir (Jahan ve ark., 2020).

Bir biyosürfektandaki polar hidrofilik kısmın (baş grup) şekerler, aminoasitler, peptitler, proteinler veya karboksilik asit gibi fonksiyonel gruplardan oluşabileceği rapor edilmiştir. Hidrofobik kısmın ise; doymuş, doymamış ve/veya hidroksillenmiş yağ asitleri veya yağ alkollerini olabileceği belirtilmektedir (Desai ve Banat, 1997; Jahan ve ark., 2020).

Biyosürfektanların fermantasyon yolu ile üretilmelerini etkileyen faktörler arasında öncelikle mikrobiyel suş, fermantasyon ortamındaki karbon ve azot kaynakları, pH,

sıcaklık, oksijen ve ortamda bulunan metal iyonlarının derişimleri olduğu ifade edilmektedir (Vieira ve ark., 2021).

Biyosürefektanların gıda, ilaç, kozmetik, petrokimya, farmasötik, tarım gibi alanlarda uygulamaları olduğu gibi, petrol kirliliğinin temizlenmesi, ağır ham petrolün taşınması, hidrokarbonlar ve ağır metallerle kirlenmiş alanların biyolojik olarak temizlenmesinde de umut verici uygulamalarının olabileceği rapor edilmektedir (Brumano ve ark., 2017; Markande, Patel ve Varjani, 2021).

Poliol lipidler, hücre dışı fungal glikolipid biyosürefektanların (extracellular fungal glycolipid biosurfactant, EFGB) içinde yer alan bir sınıf olup, diğere hücre dışı fungal glikolipid biyosürefektanlardan (sophorolipidler, mannosylerythritol lipidler, sellobiyoz lipidler); polar kısım olarak karbonhidrat yerine polioli içermeleri yönüyle ayrılırlar. Polioli lipidler; liamocin ve yağ asitlerinin polioli esterleri (polyol esters of fatty acids, PEFA) olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Polioli lipid biyosentezi ve salgılanmasının; *Ascomycota*'da birkaç tür tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmektedir (Garay ve ark., 2018).

Mikrobiyel lipidler çoğunlukla algler, funguslar ve özellikle mayalar gibi ökaryotik organizmalar tarafından fermantasyon yoluyla üretilen katı ve/veya sıvı yağlar olarak tanımlanmaktadır. Trigliseritlerin alg, fungus ve mayalar gibi organizmalarda bulunan başlıca lipid bileşenleri oldukları ve trigliseritlerin çoğunlukla boyutları 14-20 karbon arasında olan yağ asidi zincirlerinden oluştuğları bilinmektedir (Ratledge, 1991). Tek hücre yağı (single cell oil, SCO) terimi, mikrobiyel olarak üretilen lipidleri, özellikle trigliseritleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bu tanımda fosfolipidler, glikolipidler ve karotenoidler gibi lipidlerin daha karmaşık diğere sınıflarının hariç tutulduğları belirtilmektedir. Tek hücre yağlarının, bitkisel yağlara benzer bir yapıya ve gliserolün üç merkezi pozisyonundaki yağ asitlerinin benzer bir dağılımına sahip oldukları bilinmektedir. Maya ve funguslar tarafından üretilen tek hücre yağlarında, moleküldeki yağ asitlerinin dağılımının bitkisel yağlardaki yağ asidi dağılımına çok benzer olduğu ifade edilmektedir. Mikrobiyel lipidlerin; çoklu doymamış yağ asitlerini (poly unsaturated fatty acid, PUFA) yüksek oranda içermeleri nedeni ile nutrasötik ve farmasötik uygulamalarda büyük öneme sahip oldukları ve ayrıca; kimyasal yapılarının bitkisel yağlarla benzerliği nedeniyle de, biyodizel üretimi amacıyla kullanılma potansiyellerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Anschau, 2017).

Tüm mikroorganizmaların genellikle, triaçilgliserol formunda lipid biriktirme kapasitesine sahip olmadıkları ifade edilmektedir. Biyokütlelerinin %20'sinden fazlasında lipid biriktiren mikroorganizmalar, oleaginous türler olarak tanımlanmaktadır (Caporusso, Capece ve De Bari, 2021). Oleaginous olarak tanımlanan bazı maya, küf, bakteri ve mikroalg türlerinin, kuru hücre ağırlıklarının büyük fraksiyonlarını lipid olarak üretebildikleri ve biyokütle ağırlıklarının %70'ine kadar lipid biriktirebildikleri belirtilmektedir.

Lipid üretimi için optimum koşullar, fermantasyon ortamında karbonun fazla ve diğer besin maddelerinin; özellikle azotun sınırlandırıldığı koşullar olarak belirtilmiştir (Anschau, 2017). Bu sınırlama nedeniyle; hücre büyümesi ve yeni hücre sentezinin erken üssel fazın bir noktasında duracağı ifade edilmektedir. Bu nedenle de fermantasyon ortamının, yüksek bir karbon azot oranı (C:N) olacak şekilde tasarlanması gerektiği rapor edilmektedir (Anschau, 2017). Uygulamada; her bir mikroorganizma için optimum C:N oranının belirlenmesinin gerektiğinin ifade edilmesine rağmen bu oranın genellikle; 40:1 veya 50:1 olarak ayarlandığı rapor edilmektedir (Ratledge, 2010).

Oleaginous (yağlı) mayalar, yüksek şeker içeriğini tolere edebilme, farklı karbon ve azot kaynaklarını kullanabilme, yüksek miktarda tek hücre yağı biriktirme ve genetik olarak tasarlanabilmeleri yönlerinden, tek hücre yağı üretiminde tercih edilen mikroorganizmalardır. Bu mayaların ayrıca; tarım ve endüstri artıkları gibi düşük maliyetli substratları, fermantasyon ortamı olarak kullanabilme ve bakteriyel kontaminasyona karşı dayanıklı olma gibi avantajları olduğu da rapor edilmektedir (Karamerou ve Webb, 2019).

*Candida curvata*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhodospiridium toruloides* ve *Lipomyces starkeyi* gibi bazı oleaginous maya türlerinin, kuru hücre ağırlıklarının %70'ine kadar lipid depolayabildikleri belirtilmektedir. Lipid üretiminin; C:N oranı, azot derişimi, havalandırma, inorganik tuz varlığı, pH ve sıcaklık gibi bazı faktörlerden önemli ölçüde etkilendiği de rapor edilmektedir (Chang ve ark., 2015; Anschau, 2017).

*Aureobasidium pullulans* filamentli *Ascomycota* grubu içerisinde bulunan; *Dothideomycetes* sınıfının *Dothideomycetidae* alt sınıfında yer alan polimorfik bir tür olarak sınıflandırılmaktadır (Leathers ve ark., 2015).

*Aureobasidium* alt türlerinin kozmopolit maya benzeri funguslar oldukları ve bazı suşlarının ürettikleri melanin pigmenti nedeniyle siyah maya olarak da bilindikleri rapor edilmektedir. *A. pullulans* suşlarının farklı büyüme ortamlarında farklı özellikler sergiledikleri bilinmektedir (Li ve ark., 2015). Bununla birlikte genel olarak *A. pullulans* kolonilerinin başlangıçta sarı, krem, açık pembe renklerde gözlenirken; daha sonraki büyüme aşamalarında siyah renkli klamidasporların üretimi nedeniyle siyaha dönüştükleri bilinmektedir (Li ve ark., 2015). Polimorfik bir küf olan *A. pullulans*'ın, uzun dallı septalı filamentler, büyük klamidosporlar ve daha küçük eliptik maya benzeri hücreler olmak üzere farklı formlarda buldukları ifade edilmektedir. *A. pullulans* türüne ait; *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *aubasidani*, *A. pullulans* var. *subplaciale* ve *A. pullulans* var. *namibiae* olmak üzere, beş varyete olduğu rapor edilmektedir (Li ve ark., 2015).

*A. pullulans*'ın bitki yüzeyleri, toprak, su, kaya yüzeyleri ve insan yapımı yüzeyler gibi çeşitli ortamlarda ve soğuk iklimlerden ılıman iklimlere, ıslak/nemli yüzeylerden, kurak bölgelere kadar farklı bölgelerde dünya çapında yaygın bir dağılıma sahip oldukları ifade edilmektedir (Prasongsuk ve ark., 2018; Roberti ve ark., 2019). Son yıllarda, *A. pullulans*'ın aşırı tuzlu habitatlar, kıyı suları ve derin denizlerde yaygın olarak buldukları rapor edilmiştir (Chi ve ark., 2009). *A. pullulans* izolatları ve suşlarının uluslararası literatürde iyi belgelenmiş, biyoteknolojik ve çevresel uygulamalar için güvenli kabul edilen çok çeşitli biyo-ürünler üretebildikleri bilinmektedir (Bozoudi ve Tsaltas, 2018).

*A. pullulans*'ın farklı suşlarının karbon ve enerji kaynakları olarak nişasta, selüloz, ksilan inülin, çeşitli şekerler (sakkaroz, fruktoz, laktoz, maltoz, glukoz), gliserol ve etanolü kullandıkları belirtilmektedir. Bu nedenle de *A. pullulans*, karbon kaynağı yararlanma kapasitesi en geniş olan mikroorganizmalardan biri olarak tanımlanmaktadır (Wang ve ark., 2022).

Bazı suşlarının çeşitli önemli metabolitler, enzimler, antibiyotikler, tek hücre proteinleri, polimalik asit (PMA) ve polisakkaritler üretebildikleri belirlendiği için *A. pullulans*, endüstriyel olarak da oldukça önemli bir fungus olarak kabul edilmektedir (Gaur ve ark., 2010). Çeşitli *A. pullulans* suşlarının  $\beta$  glukozidaz, amilaz, selülaz, lipaz, proteaz, ksilanaz ve mannanazlar gibi çok faydalı endüstriyel enzimler ürettikleri rapor edilmiştir (Bozoudi ve Tsaltas, 2018).

*A. pullulans* kaynaklı proteaz, lipaz ve amilaz gibi birçok hücre dışı enzimin saflaştırıldığı ve karakterize edildiği ifade edilmektedir (Chi ve ark., 2009).

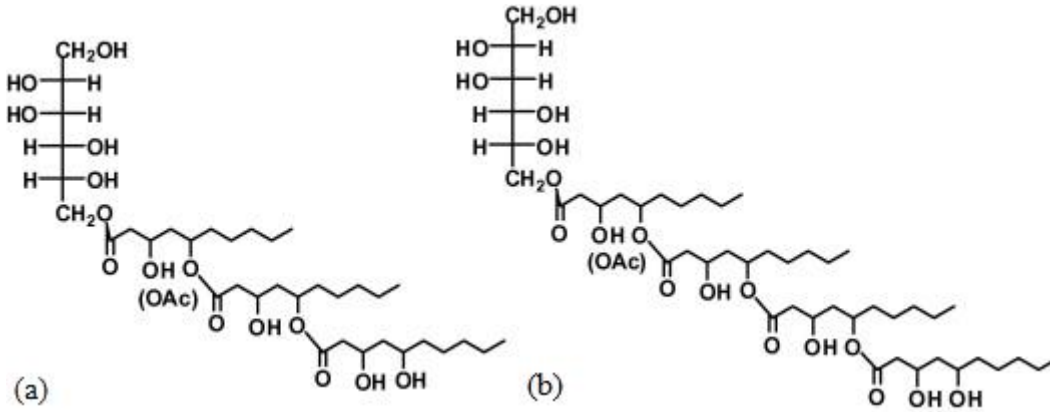
*A. pullulans*'ın tarım alanındaki en önemli uygulamalarından birinin; biyokontrol ajanı olarak kullanılması olduğu bildirilmektedir. *A. pullulans*'ın bazı uçucu organik bileşikleri, hidrolitik enzimleri ve antimikrobiyel bileşikleri üretebilmesi nedeniyle, özellikle hasat sonrası sorun yaratan bazı bitki patojenlerine karşı antagonistik aktivite gösterebildiği rapor edilmektedir (Singh ve ark., 2015; Bozoudi ve Tsaltas, 2018).

*A. pullulans*, pullulanın en önemli kaynağıdır. Pullulan gıda, kozmetik, ilaç, tarım ve kimya endüstrilerinde önemli özellikleri ve biyoteknolojik uygulamaları olan, ekonomik öneme sahip bir polisakkarittir (Bozoudi ve Tsaltas, 2018). Pullulan, lineer bir  $\alpha$ -D-glukan yapısında olan, esas olarak  $\alpha$  (1→6) bağlarıyla birbirine bağlanan tekrarlayan maltotrioz birimlerinden oluşan ve suda çözülebilen bir homopolisakkarittir (Li ve ark., 2015). Pullulanın toksik olmaması, mutajenik etkiye sahip olmaması, yenilebilir, kokusuz ve tatsız olması, küçük termal değişimlere dayanıklı olması gibi özellikleri nedeniyle; gıda, ilaç ve biyomedikal uygulamalar için geniş kullanım alanı bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, genel olarak güvenli kabul edilebilir (Generally recognized as safe, GRAS) grupta yer alması nedeniyle pullulanın; düşük kalorili gıdaların üretiminde de kullanılabileceği ifade edilmektedir (Mirzaee ve ark., 2020).

Son yıllarda *A. pullulans*'ın bazı suşlarının, genellikle mannitol ve arabitol olmak üzere açillenmiş polioliol baş grubundan oluşan ve sudan daha ağır olan yağlar ürettikleri rapor edilmiştir. Daha önceden “ağır yağlar” veya “hücre dışı lipidler” olarak isimlendirilen bu yeni bileşik grubu, yapısının detaylı olarak belirlenmesinden sonra liamocin olarak adlandırılmıştır. Liamocin; bir ila beş 3,5-dihidroksidekanoik ester grubu arasında değişen polyester kuyruklu, tek bir kısmen asetillenmiş polioliol baş grubundan oluşmaktadır (Price ve ark., 2013). Polioliol baş grubunun suşa, kültür ortamına, besiyerinin içerdiği polioliol kaynağı türüne göre değişiklik gösterebildiği rapor edilmiştir (Garay ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda; *A. pullulans*'ın farklı suşları tarafından üretilen ve A1, A2, B1 ve B2 olarak adlandırılan dört liamocin yapısının tanımlandığı belirtilmiştir (Price ve ark., 2013; Bischoff ve ark., 2015). *A. pullulans* suşları tarafından üretilen bu liamocin moleküllerinin kimyasal yapıları Şekil 2.1'de gösterilmektedir (Price ve ark., 2013).



Liamocinin; üç (liamocin A1 ve A2) veya dört (liamocin B1 ve B2) 3,5 dihidroksidekanoik ester grubu ile kısmen O-açillenmiş tek bir mannitol baş grubundan oluştuğu rapor edilmektedir. A1 ve B1 asetillenmemiş iken, A2 ve B2'nin her biri tek bir 3'-O-asetil grubu içermektedir (Price ve ark., 2013).

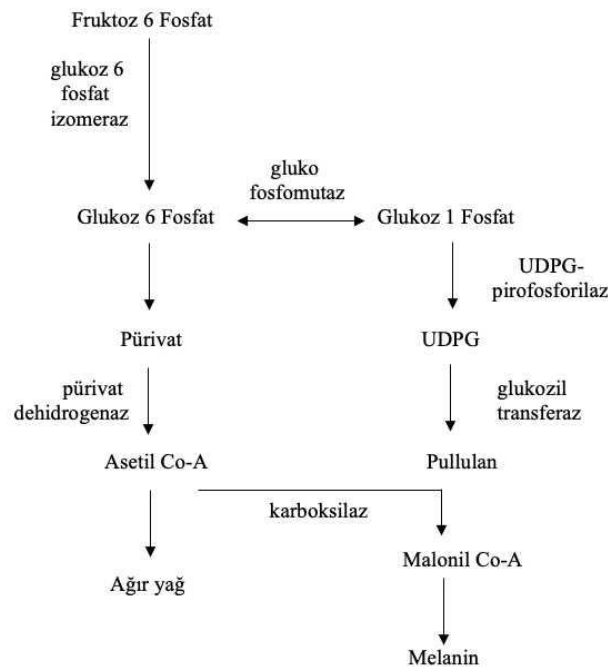


Şekil 2.1. *A. pullulans* tarafından üretilen (a) liamocin A1 ve A2 (b) liamocin B1 ve B2 moleküllerinin kimyasal yapıları

*A. pullulans*'ın liamocin biyosentezi yolunun hala tam olarak açıklanamadığı ifade edilmektedir. Li ve ark. (2015); asetilasyon içermeyen, tek bir 3,5 dihidroksidekanoik ester grubu ve mannitol baş grubu içeren yeni bir tip liamocin için varsayımsal bir biyosentetik yol önermişlerdir. Oleaginous mikroorganizmalarda hidroksil yağ asitleri biyosentez yoluna göre; 3,5-dihidroksi dekanoik asitlerin fungal poliketid sentaz (PKS) yoluyla sentezlenip düzenleniyor olabileceği rapor edilmiştir. 3-ketoaçil sentaz (KS) ve 3-ketoaçil ACP redüktazın (acyl carrier protein; açil taşıyıcı protein) 3,5 dihidroksidekanoik asit sentezinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Li ve ark., 2015). Anılan çalışmada önerilen varsayımsal yola göre; glukoz, mannitol-1-dehidrogenaz enzimi ile mannitole dönüşürken; fruktoz; mannitol dehidrogenaz enzimi katalizörlüğünde mannitole aktarılmaktadır. Bu arada glukozun, asetil Co-A'ya dönüştüğü ve asetil Co-A'dan malonil Co-A oluştuğu rapor edilmektedir. 3-ketoaçil sentaz (KS) enziminin varlığında; malonil-Co-A'nın, asetil Co-A'dan türeyen asetil gruplarıyla birleştiği belirtilmektedir. Bu kombinasyonun; 3-ketoaçil-ACP redüktaz enzimi (KR), dehidrataz enzimi ve enoil redüktaz enzimi ile indirgendiği ve yapıdan su

ayrıldığı ifade edilmektedir. Bir başka malonil Co-A grubunun indirgeyici bir döngüden geçerek 6 karbonlu bir molekül oluşturduğu ifade edilmektedir. Sonuç olarak; bu iki molekülün KS enzimi varlığında birleştiği ve KR tarafından indirgenerek bir 3,5-dihidroksidekanoid grubu oluşturduğu belirtilmektedir (Li ve ark., 2015; Garay ve ark., 2018).

Guo ve ark. (2018); melanin ve liamocin üretiminin pullulan üretimi ile ilişkili olabileceğini düşündüren bir başka varsayımsal biyosentez mekanizması önermişlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *A. pullulans*'ın liamocin, pullulan ve melanin biyosentezleri için önerilen yol izi

Anılan araştırmada; bu üç molekülün sentezinin kısmen aynı yol izini paylaştıkları ve birbirleriyle rekabet ve etkileşim halinde oldukları rapor edilmiştir. Söz konusu yol izinde; glukoz-6-fosfattan, sırasıyla izomerizasyon ve EMP yolu ile glukoz-1-fosfat ve pürivat üretildiği belirtilmektedir. Glukoz-1-fosfattan; uzun zincirli polisakkarit pullulanın öncülü olan üridin difosfoglukoz (UDPG) oluşurken, pürivatın; pürivat dehidrogenaz enzimi tarafından oksidasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonları ile asetil Co-A'ya dönüştürüldüğü rapor edilmektedir.

Sonuç olarak; asetil Co-A'nın lipid sentezine katıldığı veya malonil Co-A'ya dönüştürülürerek poliketid sentaz ve 1,8 dihidroksinaftalin yollarıyla fungal melanini oluşturduğu ifade edilmektedir (Guo ve ark., 2018).

Çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimlerinin, fermantasyon ortamında kullanılan karbon kaynağı türüne göre değişkenlik gösterebildiği rapor edilmektedir. Suşların liamocin üretimlerini pH, sıcaklık, ortamın C:N oranı, havalandırma, inkübasyon süresi ve inokülüm oranı gibi çeşitli parametrelerin etkileyebileceği ifade edilmektedir. Fermantasyon ortamının başlangıç C:N oranının, çeşitli mikroorganizmalardan tek hücre yağı üretiminin incelendiği araştırmalarda, yağ üretim potansiyelini etkileyen bir gösterge olduğu rapor edilmiştir (Garay ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada, oleaginous mayalar için lipid üretiminin; maya türüne ve karbon kaynağına bağlı olarak, başlangıç C:N oranının; 30-80 arasında değişen fermantasyon ortamlarında gerçekleşebildiği ifade edilmiştir (Garay ve ark., 2018).

Ağır yağlar üretebilen *A. pullulans*'ın oleaginous maya olarak kabul edilebileceği ve bununla birlikte; *A. pullulans* hücrelerinin yeterince büyüdüktan sonra ağır yağ partiküllerini serbest bırakırken, oleaginous mikroorganizmaların çoğunun lipid partiküllerini serbest bırakamadıkları rapor edilmiştir (Li ve ark., 2015).

Şimdiye kadar gerçekleştirilen araştırmalarda; fermantasyon ortamlarında liamocin üretimi için en sık kullanılan pH değerlerinin; 5.5-7.0 aralığında değiştiği rapor edilmektedir. Liamocin üretimi amacıyla, dar bir sıcaklık aralığı kullanıldığı (25-30 °C) ve bu amaçla en sık kullanılan iki sıcaklık değerinin; 25 veya 28 °C olduğu belirlenmiştir (Kurosawa ve ark., 1994; Manitchotpisit ve ark., 2011). Ayrıca, liamocin fermantasyonunda; %8-10 arasında değişen inokülüm oranlarının kullanıldığı da rapor edilmektedir (Garay ve ark., 2018).

Çeşitli *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocinin kültürden ekstraksiyonu amacıyla farklı uygulamalar rapor edilmiştir. En yüksek verimle sonuçlanan uygulamanın; kültür ve çözücüyü çeşitli oranlarda (1:1-1:2) bir araya getirerek uygulanan çözücü ekstraksiyonu, ardından faz ayrımı ve çözücü tabakanın kuruyana kadar buharlaştırıldığı yöntem olduğu ifade edilmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan çözücünün; metil etil keton olduğu rapor edilmektedir.

Bunun yanısıra literatürde liamocin ekstraksiyonu amacıyla çözücü olarak; etil asetat ve metanol-kloroform karışımının kullanıldığı çalışmalar da yer almaktadır (Liu ve ark., 2014; Garay ve ark., 2018). Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalarda; kullanılan suşlara, kültür ortamına ve fermantasyon koşullarına bağlı olarak elde edilen liamocin miktarının, bileşiminin ve görünümünün farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir (Kang ve ark., 2022).

Liamocinlerin; endüstriyel olarak büyük bir öneme sahip moleküller olduğu ifade edilmektedir. Renklerinin üretici suşa bağlı olarak; parlak sarı, çeşitli yeşil tonları, açık ve hatta koyu kahverengiye kadar değişen bir aralıkta olabildiği rapor edilmiştir (Manitchotpisit ve ark., 2011).

Manitchotpisit ve ark. (2011) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada; çalışılan 33 *A. pullulans* suşunun ürettikleri liamocin moleküllerinin floresan aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. Bu liamocin örneklerinin; 27mN/m ve 31.5 mN/m aralığında ölçülen yüzey gerilimlerine sahip oldukları da bildirilmiştir. Anılan araştırmada; saf suyun yüzey geriliminin 67 mN/m olarak ölçüldüğü belirtilmektedir (Manitchotpisit ve ark., 2011).

Kim ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada; yabani bir çiçek türünden izole edilen bir *A. pullulans* suşu tarafından üretilen gliserol liamocinin; biyosürefektan kapasitesinin araştırıldığı bildirilmiştir. Gliserol liamocinin 1.5 mg/L derişimde kullanıldığında; suya kıyasla (72.8 mN/m), 31.5 mN/m'lik düşük bir yüzey gerilimi sergilediği bildirilmiştir. Gliserol liamocinin düşük derişimlerde kullanılmalarna rağmen, diğer sürefektanlardan daha düşük yüzey gerilimi sergiledikleri ve daha fazla yüzey aktiviteye sahip, etkili bir biyosürefektan madde olduğunun doğrulandığı rapor edilmektedir.

Gerçekleştirilen bir başka araştırmada; *A. pullulans* LB 83 suşu tarafından üretilen liamocinin biyosürefektan aktivitesinin yağ yayma testi ile ölçülerek tensoaktivitesinin belirlendiği rapor edilmiştir (Brumano ve ark., 2017). Bu araştırmada, elde edilen değer, iyi bir biyosürefektan üreticisi olduğu bilinen *Bacillus subtilis* ile çalışıldığında elde edilenden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Anılan çalışmada belirlenen maksimum biyosürefektan aktivitesinin ayrıca; ticari sürefektanlarla (Tween 20, Tween 80 ve SDS) elde edilen değerlerle de karşılaştırıldığı belirtilmiştir.

Çalışmada, uygulandığı belirtilen yağ yayma testinde, oluşan berrak bölgenin çaplarının liamocin örneğinde; 8.05 cm iken; Tween 20, Tween 80 ve SDS için sırasıyla; 6.5, 5.0 ve 4.8 cm olarak ölçüldükleri rapor edilmiştir (Brumano ve ark., 2017). Söz konusu çalışmada; bu sonuçların çalışılan *A. pullulans* suşu kullanılarak üretilen liamocinin tensoaktivite değerlerinin, denenen diğer sürfektanlara göre daha yüksek değerde olduğu ve üretilen bu biyosürfektanın gelecekte umut verici uygulamalara sahip olabileceği de ifade edilmektedir.

Endüstriyel açıdan önemli moleküller olarak tanımlanan liamocinlerin belirli kanser hatlarının çoğalmasına karşı inhibe edici özellikler sergiledikleri de rapor edilmiştir. Manitchotpsit ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen ve bazı *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocin moleküllerinin antikanserojen etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; *A. pullulans* RSU 9 ve RSU 12 suşları tarafından üretilen liamocinin, iki insan meme kanseri hücresi hattını ve bir insan rahim ağzı kanseri hücresi inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca; denemelerde kullanılan liamocin örneklerinin, normal hücre hattı için toksik olmadıkları da rapor edilmiştir.

Leathers ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, liamocin moleküllerinin kuvvetli seçici antimikrobiyel moleküller olduklarının tespit edildiği belirtilmektedir. Söz konusu çalışmada liamocinin, süt sığırlarında mastitise sebep olan bazı patojenik türler de dahil olmak üzere, çalışmada test edilen *Streptococcus* türlerine karşı antimikrobiyel aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bu nedenle de liamocinin, özellikle geniş spektrumlu bir antibiyotik kullanımının istenmediği profilaktik uygulamalarda kullanılma potansiyeline sahip, yararlı yeni bir antimikrobiyel ajan olabileceği belirtilmiştir (Leathers ve ark., 2018).

Kurosowa ve ark. (1994) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; daha önce gerçekleştirilen çeşitli çalışmalardan izole edilen bazı *A. pullulans* suşlarının, nötralize edici ajan olarak CaCO<sub>3</sub> içermeyen bir fermantasyon ortamında, ağır yağ olarak adlandırılan hücre dışı lipidler ürettikleri ve bu lipidlerin; arabitol ve mannitolün yağ asidi esterlerinin bir karışımı olduğu rapor edilmiştir. Anılan çalışmada üretilen lipidlerin lipofilik kısmının iki ana bileşeninin, 3,5 dihidroksidekanoik ve 5-hidroksi-2-desenoik asit olduğu kanıtlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda izole edilmiş olduğu belirtilen 20 farklı *A. pullulans* suşunun, lipid üretimlerinin karşılaştırıldığı bu çalışmadaki en iyi lipid üretici suşun; İzu Yarımadası'ndaki bir ağaçtan izole edilen A-2 suşu olduğu

belirlenmiştir. Anılan çalışmada, bu suşa laboratuvar ortamında uygulanan mutasyon işlemi sonrasında açık renkli koloniler oluşturan *A. pullulans* A-21M suşunun elde edildiği ve bu mutant suşun, bileşiminde karbon kaynağı olarak %12 glukoz içeren bir fermantasyon ortamında, 35 g/L ağır yağ ürettiği rapor edilmiştir (Kurosawa ve ark., 1994).

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada; 50'den fazla *A. pullulans* suşunun yağ üretme yetenekleri bakımından karşılaştırıldıkları ve bunlardan 21 tanesinin hücre dışı yağlar üretebildikleri rapor edilmiştir (Manitchotpisit ve ark., 2011). Yağ üretebildikleri saptanan çoğu suşun filogenetik sınıflandırmada 8, 9 ve 11 olarak sınıflandırılan grupta olduğu belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada incelenen *A. pullulans* suşları tarafından üretilen yağın renginin parlak sarıdan malaşite kadar değiştiği ve suşların yarısından fazlasının ürettiği yağın, floresan özellik sergilediği bildirilmiştir. Anılan çalışmada; bileşiminde karbon kaynağı olarak %5 sakkaroz içeren bir fermantasyon ortamında üretilen ağır yağ derişiminin 0.5-6.0 g/L aralığında değiştiği ve bu çalışmada en yüksek derişimde ağır yağ üreten suşun *A. pullulans* CU39 olduğu bildirilmiştir (Manitchotpisit ve ark., 2011).

Manitchotpisit ve ark. (2014) tarafından yapılan bir başka çalışmada; incelenen bazı *A. pullulans* suşlarının ürettikleri liamocin örneklerinin antikanserojenik etkileri araştırılmıştır. İncelenen suşlardan *A. pullulans* CU 43 ve *A. pullulans* NRRL Y-12974 kullanılarak üretilen yağların, memeli kanseri hücre dizilerini farklı şekilde inhibe ettiklerinin belirlendiği de rapor edilmiştir. Anılan çalışmada ayrıca; *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocin örneklerinin moleküler karakterizasyonunun matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon kütle spektrometresi (MALDI-TOF-MS) ile yapıldığı rapor edilmiştir. İncelenen suşların ortaya konulmuş olan filogenetik analizinde; filogenetik dal 11'deki 4 suş olan; CU 31, CU 35, CU 39 ve CU 47 suşları için gözlemlenen ana iyonun  $m/z$  805.5 olduğu; diğer üç suş için ise (NRRL Y-2581, NRRL Y-4026 ve NRRL Y-4588); baskın iyonun  $m/z$  949.6 olduğu rapor edilmiştir. Kalan suşların (CU 43, CU 45 ve NRRL Y-12974) ise; spektrumlarında yaklaşık olarak eşit yoğunluklarda, hem  $m/z$  805.5 hem de  $m/z$  949.6 iyonlarını oluşturduğu, anılan çalışmada ifade edilmiştir.

Bischoff ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; *A. pullulans* NRRL 50380 suşu tarafından üretilen liamocinin bazı bakterilere karşı antibakteriyel

aktivitesinin incelendiği ve bu amaçla agar cup difüzyon yönteminin kullanıldığı belirtilmiştir. Kullanılan yöntem ile gerçekleştirilen kalitatif analiz sonucunda, liamocinin yedi *Streptococcus* türünden altısına karşı (*S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. infantarius* ve *S. salivarius*) güçlü antimikrobiyel aktivite sergilediği rapor edilmiştir. İncelenen türlerden yalnızca *S. sobrinus*'un, denenen liamocine karşı duyarlı olmadığı belirlenmiştir. Anılan çalışmada ayrıca; sıvı mikrodilüsyon yönteminin bir modifikasyonu kullanılarak liamocin için minimum inhibitör konsantrasyonlarının da belirlendiği ifade edilmiştir. Sonuç olarak; *Streptococcus* türlerine karşı minimum inhibitör konsantrasyonlarının; 10-78 µg/mL aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Bischoff ve ark., 2015).

Leathers ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada; daha önceki çalışmalarda liamocin üretimi için önerilen dört farklı besiyerinde, çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimlerinin karşılaştırıldığı bildirilmiştir. Anılan çalışmada en yüksek liamocin derişiminin; 8.0 g/L olarak, karbon kaynağı olarak sakkaroz içeren içeren bir fermantasyon ortamında, *A. pullulans* NRRL 50384 suşu tarafından üretildiği bildirilmiştir.

Mangrov sisteminden izole edilmiş olduğu ifade edilen, *A. pullulans* var. *melanogenum* P5 suşunun ağır yağ üretimi üzerine, farklı karbon kaynaklarının etkilerinin incelendiği bir diğer çalışmada; bileşiminde karbon kaynağı olarak glukoz, inülin, sakkaroz, fruktoz ve gliserol gibi farklı substratları içeren fermantasyon ortamlarının kullanıldığı belirtilmiştir. Bileşiminde karbon kaynağı olarak glukoz içeren fermantasyon ortamında; *A. pullulans* var. *melanogenum* P5 suşu tarafından üretilen ağır yağ derişiminin; 31.4 g/L olarak saptandığı ve bu ortamda, bileşiminde diğer karbon kaynaklarını içeren fermantasyon ortamlarından daha yüksek derişimde ağır yağ üretildiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2014). Söz konusu çalışmada, ağır yağ üretimini en iyi destekleyen ortamın bileşiminde karbon kaynağı olarak glukoz olduğu belirlendikten sonra, glukozun farklı derişimleri için *A. pullulans* var. *melanogenum* P5 suşunun ağır yağ üretiminin incelendiği bildirilmiştir. Glukozun denenen farklı derişimleri için (100-180 g/L) ise, ağır yağ üretimini en iyi destekleyen derişimin; 120 g/L glukoz olduğu bildirilmiştir. Bileşiminde karbon kaynağı olarak 120 g/L glukoz bulunan fermantasyon ortamına ayrıca; % 0.1 oranında mısır maserasyon sıvısı eklendiğinde ise; ulaşılan en yüksek ağır yağ derişiminin 32.5 g/L olduğu rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2014).

Anılan çalışmada ayrıca; fermantasyon yoluyla üretilen ağır yağların yağ asidi profillerini çıkartmak amacıyla, GC-MS analizlerinin gerçekleştirildiği de rapor edilmiştir. Gerçekleştirilen analizlerde; *A. pullulans* var. *melanogenum* P5 suşu tarafından üretilen ağır yağlarda bulunan uzun zincirli alkanların oranının; %66.15, yağ asitlerinin oranının ise; %26.38 olduğu rapor edilmiştir. Maya hücrelerinin plazma membranında yaygın olarak gözlenen; heksadekanoik asit (C<sub>16:0</sub>), oktadekanoik asit (C<sub>18:0</sub>) ve oktadesenoik asit (C<sub>18:1</sub>) gibi yağ asitlerinin, *A. pullulans* var *melanogenum* P5 suşu tarafından salgılanan ağır yağlarda da buldukları rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2014).

Price ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada; çeşitli şeker ve polioller karbon kaynaklarının *A. pullulans* NRRL 50380 suşunun liamocin üretimi üzerindeki etkilerinin incelendiği belirtilmiştir. Anılan araştırmada; sakkaroz, laktoz, fruktoz, glukoz, mannoz, galaktoz, arabinoz ve ksiloz gibi şekerlerin ve mannitol, sorbitol, galaktitol, arabitol, gliserol gibi poliollerin liamocin üretimi amacıyla fermantasyon ortamında karbon kaynakları olarak kullanıldıkları belirtilmiştir. Çeşitli şekerlerin fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak ayrı ayrı kullanılmalarının; liamocin baş gruplarının yapısını etkilemediği ve her durumda yalnızca mannitol baş grubuna sahip liamocin üretildiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak çeşitli poliollerin ayrı ayrı kullanıldığı durumlarda, fermantasyon ortamlarında üretilen liamocin moleküllerinden bazılarının farklı yapılarla sahip oldukları belirtilmiştir. D-mannitol içeren fermantasyon ortamlarında geliştirilen kültürlerin, % 100 mannitol baş grubuna sahip liamocinler üretirlerken; sorbitol, galaktitol ve gliserol içeren fermantasyon ortamında geliştirilen kültürlerin ise; mannitol ve substrat poliollerin karışımını içeren baş gruba sahip yapıda liamocin molekülleri ürettikleri rapor edilmiştir. Anılan araştırmada ilginç bulunan bir sonuç olarak da; liamocinin polioller baş grubu bileşiminin yapısını, fermantasyon ortamında kullanılan şeker türünün değil, polioller türünün belirlediği de rapor edilmiştir (Price ve ark., 2017).

Liamocin üretimi için, fermantasyon ortamı bileşimini optimize etmek amacıyla Leathers ve ark. (2018) tarafından bir çalışma gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Söz konusu araştırmada, iki seviyeli kısmi faktöriyel bir deney tasarım yöntemi olan; Plackett-Burman tasarımının kullanıldığı ifade edilmiştir. Tek seferde tek faktör yöntemi (one factor at a time) olarak da tanımlanan bu yaklaşımda, faktörlerden biri uygun bir aralıkta değiştirilirken, diğer değişkenlerin sabit tutulduğu bilinmektedir (Akkuş ve Karabudak,



2020). Ancak bu yaklaşımda deneye etki eden ilgili tüm değişkenlerin birleşik etkisini göstermenin mümkün olmadığı da belirtilmektedir. Buna ek olarak bu yöntemin sonuçlarının güvenilirliğinin düşük ve hata oranının da yüksek olduğu da ifade edilmektedir. Leathers ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilen ve Plackett-Burman tasarımının kullanıldığı söz konusu çalışmada, bileşimi optimize edilmiş ortamda, *A. pullulans* NRRL 50384 suşu tarafından üretilen liamocin derişiminin (22 g/L), standart ortama göre yaklaşık iki kat arttığı rapor edilmiştir.

Çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimi üzerine gerçekleştirilen bir başka araştırmada, liamocin üretimi üzerine iki farklı fermantasyon ortamının etkilerinin karşılaştırıldığı bildirilmiştir. İlk fermantasyon ortamının bileşiminde, azot kaynağı olarak; maya özütü ve peptonun, karbon kaynağı olarak ise; glukozun yer aldığı, ikinci ortamda ise azot kaynağı olarak; maya özütü ve NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>'ün, karbon kaynağı olarak ise; sakkarozun bulunduğu bildirilmiştir. İki ortamda da kullanılan karbon kaynaklarının oranı; %12 (w/v) olarak rapor edilmiştir. İlk ortamda; çeşitli *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocin derişiminin; 11.6-20.2 (g/L) aralığında değiştiği bildirilirken; ikinci ortam kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon deneylerinde elde edilen liamocin derişiminin ise; 8.0 g/L-16.1 g/L arasında olduğu rapor edilmiştir (Qin, 2019). Anılan çalışmada elde edilen en yüksek liamocin derişiminin (20.2 g/L), araştırmada kullanılan ilk fermantasyon ortamında, *A. pullulans* NRRL 58558 suşu ile elde edildiği, bu suşun ikinci fermantasyon ortamında ürettiği liamocin derişiminin ise; 8.0 g/L olarak, ilk ortama göre çok daha düşük derişimde kaldığı bildirilmiştir (Qin, 2019).

## 2.1. Kesikli Fermantasyon Sistemlerinde Kullanılan Kinetik Eşitlikler

### 2.1.1. Özgül Üreme Hızı

Kesikli fermantasyon sistemlerinde, mikroorganizmaların üssel üreme bölgesindeki üreme hızları, başlangıçtaki mikroorganizma biyokütle derişimi ile doğru orantılı olarak değişmekte olup, Eş. 2.1 ile ifade edilmektedir (Dönmez, 2017).

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

Bu eşitlikte X; mikroorganizmanın kuru ağırlık olarak derişimini ( g mikroorganizma/L), t; zamanı (saat) ve  $\mu$  ise; mikroorganizmanın özgül üreme hızını (saat<sup>-1</sup>) ifade etmektedir.

Kesikli fermantasyon sistemlerinde, mikroorganizmanın üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı; fermantasyon ortamında bulunan mikroorganizma derişiminin zamanla değişimini gösteren grafikler kullanılarak, farklı X değerleri için lnX değerlerinin hesaplanması ve ardından bu hesaplanan lnX değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafiğin çizilmesi ile Eş. 2.2 kullanılarak hesaplanmaktadır (Stanbury, Whitaker ve Hall, 2013; Clarke, 2013).

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

### 2.1.2. Özgöl Ürün Oluşum Hızı

Kesikli fermantasyon sistemlerinde özgül ürün oluşum hızı (qp); ürün oluşum hızının mikroorganizma derişimine oranı olarak ifade edilmektedir (Stanbury, Whitaker ve Hall, 2013).

Bu araştırmada, liamocin için özgül ürün oluşum hızı; liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Bunun için öncelikle; liamocin derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, farklı zamanlardaki eğim değerleri hesaplanmış ve ürün oluşum hızları bulunmuş; ardından mikroorganizma derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler yardımıyla, aynı zamanlara karşılık gelen mikroorganizma derişimleri belirlenmiştir. Bu sayede, özgül liamocin üretim hızı değerleri (Eş. 2.3), hesaplanmıştır (Doran, 2013; Stanbury, Whitaker ve Hall, 2013).

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

Bu eşitlikte, qp; özgül ürün oluşum hızı [g liamocin/ (g mikroorganizma.sa)], dP/dt; ürün oluşum hızı [g liamocin/(L.sa)], X ise; ürün oluşum hızı hesaplandığı andaki mikroorganizma derişimini ( g mikroorganizma/L) göstermektedir (Stanbury, Whitaker ve Hall, 2013).

### 2.1.3. Substrat Tüketim Hızı

Kesikli fermantasyon sistemlerinde bir mikroorganizmanın substrat tüketim hızı (rs); fermantasyon ortamında bulunan bir substratın zamanla değişim hızı olarak tanımlanmaktadır ve Eş. 2.4 ile ifade edilmektedir.

$$rs = -\frac{dS}{dt} \quad (\text{Eş 2.4})$$

Bu araştırmada, liamocin üretiminde kullanılan farklı fermantasyon ortamlarının bileşimlerinde yer alan substratların derişimleri fermantasyon süresince tayin edilmiş ve substrat derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilerek; bu grafiklerdeki farklı zamanlardaki eğim değerleri belirlenmiştir. Substrat tüketim hızları; elde edilen bu eğim değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

## 2.2. Yanıt Yüzey Yöntemi

Optimizasyon işlemi, belirlenen yanıtlar doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleri ile olan etkileşimlerinin ve bağımsız değişkenlerin yanıtlara olan etkilerinin belirlenerek bir araya getirilip uygulanması olarak tanımlanmaktadır (Koç ve Ertekin, 2010). Bir optimizasyon işlemi, hedef fonksiyonu olarak adlandırılan, daha önceden tanımlanmış kriterleri maksimum ya da minimum olarak elde etmek için belirlenen koşulların değiştirilmesi işlemini içermektedir. Yanıt yüzey yöntemi ise; ilk olarak Box ve Wilson tarafından 1951 yılında geliştirilen ve tanımlanan; deneysel verilerle ampirik modellerin uygunluğuna dayanan bir grup matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşan bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Bezerra ve ark., 2008). Yanıt yüzey yönteminin en kapsamlı uygulamaları, birkaç girdi değişkeninin, ürün veya sürecin bazı performans veya kalite özelliklerini potansiyel olarak etkilediği durumlardır. Bu performans ölçüsü veya kalite özelliğine yanıt; girdi değişkenlerine ise bağımsız değişken adı verilmektedir (Myers, Montgomery ve Anderson-Cook, 2016). Genel olarak, yanıt yüzey yönteminin üç aşamadan oluştuğu ve bunların sırasıyla; daha verimli denemeler gerçekteştirilmesine imkan sunan eleme denemeleri, bağımsız değişkenlerin yanıtta oluşturduğu değerlerin optimum noktaya ne kadar yakın olduğunun belirlendiği bölge araştırılması ve son olarak da, işlem veya ürünün optimizasyonu olduğu belirtilmektedir (Koç ve Ertekin, 2010).

y yanıt fonksiyonu ile  $x_1, x_2, x_3 \dots x_k$  bağımsız değişkenleri arasındaki ilişki, Eş. 2.5 ile gösterilmektedir.

$$y = f(x_1, x_2, x_3 \dots x_k) + \epsilon \quad (\text{Eş. 2.5})$$

Bu eşitlikte yer alan  $y$ ; yanıt,  $f(x_1, x_2, x_3 \dots x_k)$ ; yanıtı etkileyen bağımsız değişkenler;  $k$ ; yanıtı etkileyen bağımsız değişkenlerin sayısı ve  $\varepsilon$  ise istatistiksel hata olarak ifade edilmektedir (Myers, Montgomery ve Anderson-Cook, 2016).

Yanıt yüzey yönteminde modelin oluşturulması için regresyon analizi kullanılmaktadır. Bir faktörün ana veya etkileşimlerinden oluşan etkisinin yanıt değişkeninde ne kadar etkiye sahip olduğuna regresyon kat sayıları yardımıyla karar verildiği belirtilmektedir. Bu nedenle; yanıt yüzey yöntemlerindeki önemli adımlardan birinin; yanıt değişkenine etkisi olduğu düşünülen faktörlerin ve bu faktörlerin düzeylerinin belirlenmesi işlemi olduğu ifade edilmektedir (Tekindal, 2009).

Gerçek yanıt fonksiyonunun matematiksel formu genellikle bilinmediği için, tahmin edilmesi gerekmektedir. Yanıt yüzey yönteminin uygulamadaki başarısının, yanıt fonksiyonu için uygun matematiksel formun geliştirilmesine bağlı olduğu ifade edilmektedir. Gerçek yanıt yüzeyindeki eğriliğin tahminlenmesinde birinci dereceden, ikinci dereceden ve bazı durumlarda ise; daha yüksek dereceden polinomial modellerin de kullanıldığı belirtilmektedir (Eren, 2004).

İki düzeyli faktörlerden oluşan deneme düzenleri  $2^k$  faktöriyel deneme düzenleri olarak adlandırılırlar. Bu deneme düzenleri sonucunda oluşacak model, ana etkileri ve ana etkilerin birinci dereceden interaksiyonlarını içermektedir. Bu modeller; birinci dereceden modeller olarak adlandırılmaktadır ve Eş. 2.6 ile gösterilmektedir (Tekindal, 2009).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (\text{Eş. 2.6})$$

Bu eşitlikte;  $y$  değerleri yanıtları,  $\beta$  değerleri; regresyon katsayılarını,  $x$  değerleri ise; bağımsız değişkeni ifade etmektedir.

İkinci dereceden modeller; faktör düzeyi 3 olan, karesel yapıda; karesel ilişkileri ve ikinci dereceden interaksiyon terimlerini de içerebilen modeller olarak tanımlanmaktadır ve Eş. 2.7'deki gibi ifade edilmektedir (Tekindal, 2009).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{1x_1^2} x_1^2 + \beta_{2x_2^2} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (\text{Eş. 2.7})$$

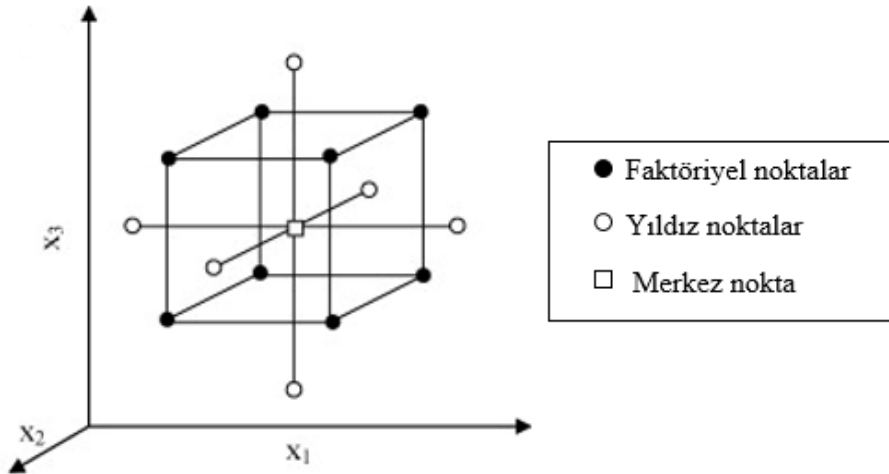
En yaygın kullanılan ikinci dereceden modellerin; merkezi karma tasarım (Central Composite Design) ve Box Behnken deneme düzenleri olduğu belirtilmektedir (Tekindal, 2009). Bu tez çalışmasında; deney tasarımı için merkezi karma tasarım (CCD) yöntemi kullanılmıştır.

Merkezi karma tasarımda, deney tasarımı 3 bölümden oluşmaktadır. Bunlar;  $2^k$  faktöriyel tasarımı (faktör seviyeleri -1, +1 olarak kodlanmış), her bir tasarım merkezine uzaklığı  $\alpha$  kadar olan iki yıldız noktasının (eksenel noktalar) belirlenmesi ve merkez noktaların belirlenmesi olarak ifade edilmektedir  $\alpha$  değeri, Eş 2.8 kullanılarak hesaplanmaktadır (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010; Bevilacqua, Corbo ve Sinigaglia, 2010).

$$\alpha = [2^k]^{1/4} \quad (\text{Eş 2.8})$$

Bu eşitlikteki k değeri; tasarımdaki değişken sayısını ifade etmektedir. Bu değer; 2 faktörlü tasarım için  $\alpha$  değerinin; 1.414, ve 3 faktörlü tasarım için  $\alpha$  değerinin; 1.682 olduğu anlamına gelmektedir.

Üç bağımsız değişken içeren bir merkezi karma tasarım modelinde faktöriyel noktalar, yıldız noktalar ve merkez noktanın yerleşimi, Şekil 2.3'te görülmektedir (Bezerra ve ark., 2008).



Şekil 2.3. Üç bağımsız değişkenli merkezi karma tasarım modeli

Döndürülebilir merkezi karma tasarımdaki gerçekleştirilmesi gereken deneylerin sayısı (n), Eş. 2.9 ile ifade edilmektedir.

$$n = 2^k + 2k + n_0 \quad (\text{Eş. 2.9})$$

Bu eşitlikte k değeri; tasarımdaki bağımsız değişken sayısını,  $n_0$  değeri ise; merkez noktada gerçekleştirilen deneylerin tekrar sayısını ifade etmektedir (Bhattacharya, 2021).

Deney tasarımının geliştirilmesinin ardından, kurulan model ile deneysel verilerin uygunluğunun belirlenmesi için, varyans analizinin (ANOVA) gerçekleştirilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Bezerra ve ark., 2008). Varyans analizinin gerçekleştirilmesi için; varyasyon katsayısının hesaplanması, hipotez testleri uygulanması, regresyon (belirleme) ve düzeltilmiş regresyon katsayılarının hesaplanması ( $R^2$  ve  $R^2_{adj}$ ), tahminlenmiş kalıntı hata kareler yönteminin (predicted residual error sum of squares) hesaplanması, kalıntı analizi ve model uyumsuzluğunun (lack of fit) test edilmesi gibi farklı yöntemlerin uygulanabileceği belirtilmektedir (Koç ve Ertekin, 2010).  $R^2$  değerinin 1'e yakın olmasının; model ile veriler arasında büyük oranda uyum olduğunu ifade ettiği vurgulanmaktadır.

Deneysel verilerle elde edilen bir hipotezin (sıfır hipotezi) reddedilmesi veya edilmemesi arasında karar vermek amacı ile birtakım istatistiksel hipotez testleri uygulanmaktadır (Eren, 2004). Bu hipotezin doğru iken reddedilmesi olasılığı, karar verme kuralının önemlilik seviyesi;  $\alpha$  olarak tanımlanmaktadır. En yaygın kullanılan önemlilik seviyesi ( $\alpha$ ) değerinin; 0.05 olduğu ve sıfır hipotezi reddedilirken %5 hata yapma olasılığı bulunduğu anlamını taşıdığı belirtilmektedir.

Oluşturulan modelin istatistiksel olarak öneminin belirlenmesi amacıyla Fischer (F) testi kullanılmaktadır (Bezerra ve ark., 2008). Bu amaçla; deneysel veriler sonucu hesaplanan değerlerin istatistiksel hesaplamalar sonucu oluşturulan tablolarla karşılaştırılarak yorumlanması gerektiği belirtilmektedir. Çeşitli istatistiksel hesaplamalar sonucunda elde edilen F değerinin tablodaki F değerinden büyük olduğu durumlarda, oluşturulan matematiksel modelin önemli olduğu ifade edilmektedir. Modelin güvenilirliğini test etmek için kullanılan bir diğer testin ise; model uyumsuzluğu testi olduğu belirtilmektedir (Bezerra ve ark., 2008).

Model uyumsuzluğu testi; deneyler sonucu elde edilen verilerin, modelin matematiksel formu ile uyumunun karşılaştırılması işlemi olarak tanımlanmaktadır. İstatistiksel açıdan, modelin geçerli olabilmesi için, bu değerın önemsiz olması gerektiği ifade edilmektedir (Koç ve Ertekin, 2010).

Yanıt yüzey yöntemindeki en önemli aşamalardan birinin, istenilen yanıtlar için optimum değerlerin belirlenmesi olduğu ifade edilmektedir (Koç ve Ertekin, 2010). Bu yöntem sayesinde, sistemin modellenmesi amacıyla basit empirik modellerin kullanılabilirdiği ve sistemin yanıtını etkileyen çok sayıda değişkenin bir arada görülebildiği bildirilmektedir. Yanıt yüzey ve kontur grafikleri kullanılarak yanıt için optimum koşulların belirlenebileceği ifade edilmektedir.

Yanıt yüzey grafikleri, ikiden fazla faktörün düzeylerinin yanıt değişkeninin üzerindeki etkilerinin üç boyutlu olarak gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Tekindal, 2009). İki den fazla faktör varsa; diğer faktörlerin düzeyleri sabitlenerek, ilgilenilen faktörlerin değerlerini görmek mümkün olabilmektedir. Kontur grafikleri ise; yanıt yüzey yönteminin sonuçlarının en iyi şekilde gözlemlenebileceği grafiklerden bir tanesi olarak belirtilmektedir. X eksenini ve Y ekseninde faktörler yer alırken, eksenlerin arasında kalan bölgelerde yanıt yüzeylerinin aldığı değerler gözlemlenebilmektedir. Oluşturulan regresyon modeli eğer doğrusal ise; eksenler arasında kalan bölge doğrusal çizgilerle ifade edilebilirken, modelde karesel bir ilişki söz konusu ise; daireler şeklinde ifade edilmektedir.

İstenilen hedefe ulaşma oranı (desirability function); optimizasyonda sistemin yanıtları üzerindeki önceliklerin belirlenerek işleme dahil edilmesi metodu olarak ifade edilmektedir (Eren, 2004). Bu değer tüm yanıtların bir araya getirildiği, 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt indeksidir. Bu yanıt değerinin 1'e yakın olmasının, araştırmacı tarafından belirlenen kriterlerin sağlandığı anlamına geldiği şeklinde yorumlanmaktadır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Mikroorganizma

Bu araştırmada kullanılan *Aureobasidium pullulans* suşları, farklı kültür koleksiyonlarından liyofilize formda ya da yatak kültürler olarak sağlanmışlardır. Bu suşların yanı sıra, laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada Gemlik zeytini örneklerinden izole edilmiş ve tanımlanmış olan *A. pullulans* AZ-6 suşu da bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Bu araştırmada kullanılan *A. pullulans* suşları ve izolasyon kaynakları izelge 3.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada liamocin üretimi amacıyla denenen *A. pullulans* kültürleri

Suş	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> NBRC 100716	NBRC Kültür Koleksiyonu, Japonya	ilek
<i>A. pullulans</i> AZ-6	Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Türkiye	Ham Zeytin

Bu çalışmada kullanılacak olan *A. pullulans* kültürleri, ilk olarak aktifleştirme amacıyla Yeast Extract Malt Extract (YM) broth besiyerine ekilmiş ve besiyerleri 28°C’de 48 saat



inkübasyona bırakılmışlardır. Aktifleştirilen bu kültürler daha sonra; YM yatık agar besiyerinde; 28°C’de yaklaşık 48 saat geliştirilerek, 4°C’de buzdolabında muhafaza edilmişlerdir. Bu işlem uygun zaman aralıklarıyla tekrar edilerek, deneylerde kullanılan *A. pullulans* kültürleri hazırlanmıştır.

### **3.1.2. Besiyerleri**

Bu tez çalışmasında kültürlerin aktifleştirilmeleri amacıyla bileşimi (g/L); glukoz; 10, maya özütü; 3, malt özütü; 3, bakteriyolojik pepton; 5 olan; YM broth besiyeri kullanılmıştır. Suşların yatık stoklar halinde saklanmaları amacıyla ise; YM agar besiyerinden yararlanılmıştır.

Araştırmada incelenen *A. pullulans* suşlarının liamocin üretilip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla ilk aşamada bileşimi (g/L); glukoz; 120, maya özütü; 0.5, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1, KCl; 0.5, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.2, agar; 15 olan, katı bir besiyerinden yararlanılmıştır (Liu ve ark., 2014). Çalışmadaki deneyler sırasında bu besiyerinin bileşimindeki karbon kaynağı (glukoz), diğer bileşenler ve derişimleri sabit kalacak şekilde sakkaroz veya fruktoz ile değiştirilerek, incelenen suşların liamocin üretimleri de incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında liamocin fermantasyonu amacıyla; bileşimi (g/L); sakkaroz; 50, pepton; 0.6, maya özütü; 0.4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0.4, NaCl; 1 olan ve pH’ı; 6.5’e ayarlanan bir besiyeri kullanılmıştır (Manitchotpisit ve ark., 2011). Fermantasyon deneylerinde, ortamlar için inokülüm hazırlanmasında kültür ortamı olarak da, aynı bileşimdeki besiyerinden yararlanılmıştır.

### **3.1.3. Deney Düzenegi**

Bu araştırmadaki fermantasyon deneyleri kesikli sistemde gerçekleştirilmiş olup bu amaçla, sıcaklığı ve karıştırma hızı kontrol edilebilen çalkalamalı bir su banyosu (Nüve ST-402, Türkiye) kullanılmıştır. Deneyler, 250-300 mL’lik erlenlerde, 50-100 mL’lik çalışma hacimlerinde gerçekleştirilmiştir.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Fermantasyon Ortamları İçin Aşı Kültürlerinin Hazırlanması**

Fermantasyon denemelerinde kullanılacak aşı kültürünün hazırlanması amacıyla; *A. pullulans* suşları öncelikle, daha önce Bölüm 3.1.2’de bileşimi verilen YM broth

besiyerlerinde 28°C’de 48 saat inkübasyona bırakılarak aktifleştirilmişlerdir. Aktifleştirilen kültürler daha sonra YM agar yatık besiyerlerine aşılınmışlar ve 28°C’de 48 saat inkübe edilerek geliştirilmişlerdir. Daha sonra, bu kültürlerden standart çaplı bir öze yardımıyla, bir öze dolusu alınarak, 250 mL’lik erlen içerisinde yer alan ve bileşimi daha önce Bölüm 3.1.2’de verilen 50 mL’lik kültür ortamlarına aşılama yapılmıştır. Aşılama ortamları çalkalamalı bir su banyosunda (Nüve ST-402, Türkiye), 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, 28°C’de yaklaşık 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Hazırlanan bu *A. pullulans* kültürleri, liamocin üretimi amacıyla kullanılacak fermantasyon ortamları için aşı kültürü olarak kullanılmışlardır.

### **3.2.2. Liamocin Fermantasyonu**

Bu tez çalışmasında liamocin fermantasyonu kesikli sistemde, sıcaklığı ve karıştırma hızı ayarlanabilen çalkalamalı bir su banyosu (Nüve ST-402, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon için önceden hazırlanan aşı kültürü (bkz. Bölüm 3.2.1), 300 mL’lik erlen içerisinde bulunan, pH’ı 6.50’ye ayarlanmış 100 mL çalışma hacmindeki fermantasyon ortamına (bkz. Bölüm 3.1.2) %10 oranında inoküle edilerek, 28°C sıcaklıkta, 100 vuru/dak sabit karıştırma hızında, yarı karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır (Şekil EK 1.1).

Çalışmada kültür ortamından, fermantasyon süresince yaklaşık 24 saatte bir, 10 mL örnek aseptik koşullarda alınarak, bu kültür ortamında liamocin, biyokütle ve substrat derişimi analizleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3. Başlangıç İnokülasyon Derişiminin Tayini**

Fermantasyon deneylerinde, Bölüm 3.2.1’de açıklandığı şekilde hazırlanan kültür ortamlarından fermantasyon ortamlarına, %10 (v/v) oranında aşılama gerçekleştirilmiştir. Aşılama fermantasyon ortamlarındaki *A. pullulans* kültürü başlangıç inokülasyon derişimlerinin tayin edilmesi amacıyla; kültürel sayım yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla YM agar besiyeri kullanılmış ve hazırlanan uygun dilüsyonlardan paralel olarak ekimleri yapılan petriyeler, 28°C’de, 5-7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnokülasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin sayımları yapılarak, fermantasyon ortamlarındaki *A. pullulans* kültürünün başlangıç inokülasyon derişimleri; kob/mL olarak tayin edilmiştir (Şekil EK 1.2).

### **3.2.4. Liamocin Ekstraksiyonu ve Derişim Tayini**

Bu tez çalışmasında, fermantasyon ortamında üretilen liamocinin ekstraksiyonu amacıyla; Manitchotpisit ve ark. (2011) tarafından önerilen bir yöntem tarafımızca modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak; fermantasyon ortamından yaklaşık 24 saat aralıklarla alınan 10 mL'lik örnekler, vidalı kapaklı cam tüplere konularak 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmişlerdir (Nüve, NF 615, Türkiye). Santrifüjleme işlemi sonrasında üstte kalan süpernatant kısım ayrılarak, altta kalan çökelti (Şekil EK 2.1-2.2) üzerine 3 mL saf su eklenmiş ve örneğe yıkama amacıyla 5000 rpm'de 20 dakika tekrar santrifüjleme işlemi uygulanmıştır. Daha sonra süpernatant ayrılarak, kalan pelet üzerine 3 mL %99.5'lik metil etil keton (Birpa, Türkiye) eklenmiş ve hazırlanan örneğe yaklaşık 90 saniye kuvvetli bir vorteksleme (Isolab, Türkiye) işlemi uygulanmıştır (Şekil EK 2.3-2.4). Örnek daha sonra bir çeker ocak sistemi içerisine yerleştirilerek 90 dakika bekletilmiş, süre sonunda yeniden kuvvetli şekilde vortekslenmiş ve 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant, önceden darası alınmış steril petri kutularına aktarılmıştır ve liamocin içeren çözücünün çeker ocak altında, buharlaşması sağlanmıştır. Ardından, petri kutuları tartılarak, üretilen liamocin derişimi (g/L) hesaplanmıştır (Şekil EK 2.5).

### **3.2.5. Biyokütle Derişiminin Tayini**

Bu araştırmada, fermantasyon deneyleri sırasında alınan kültür örneklerindeki biyokütle derişimleri, kuru hücre ağırlığı tayini ile belirlenmiş olup sonuçlar da; kuru hücre ağırlığı cinsinden (g/L) hesaplanmışlardır (Li ve Orduña, 2010). Bu amaçla fermantasyon ortamından yaklaşık her 24 saatte bir alınan 10 mL kültür örneği ilk olarak; 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı ayrılmış ve elde edilen pelete liamocin ekstraksiyonu (bkz. Bölüm 3.2.4) uygulanmıştır. Ekstraksiyon işleminden sonra kalan biyokütle peleti, sıcaklığı 80°C'ye ayarlanmış olan bir etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulup tartılarak, fermantasyon ortamındaki biyokütle derişimi (g/L) hesaplanmıştır.

### **3.2.6. Çeşitli Şekerlerin Derişimlerinin Tayininde Kullanılan Çalışma Doğrularının Oluşturulması**

Bu çalışmadaki fermantasyon deneylerinde, ortamda bulunan bazı şekerlerin derişimlerinin tayini amacıyla çeşitli çalışma doğruları oluşturulmuştur. Fermantasyon ortamında substrat olarak kullanılan indirgen şekerlerin (glukoz, fruktoz ve maltoz)

analizleri amacıyla; DNS yöntemi (bkz. EK 3), sakkarozun tayini için ise; fenol-sülfürik asit yöntemi (bkz. EK 4) kullanılmıştır. Ölçümler spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiş ve çalışma doğrularının oluşturulmasında incelenen her bir şeker için absorbans-derişim grafikleri oluşturulmuştur. Glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkaroz için hazırlanan çalışma doğruları sırasıyla; Şekil EK 5.1-5.4'te verilmektedir. Spektrofotometrik ölçümler bir spektrofotometrede (Boeco S30, Almanya) indirgen şekerler için 540 nm, sakkaroz için ise; 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7. pH Ölçümü**

Bu tez çalışmasındaki deneyler sırasında çeşitli besiyerlerinin ve fermantasyon ortamlarının pH ölçümleri; bir pH metre (Hanna HI 221, İtalya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.8. Spektroskopik Analizler**

#### **3.2.8.1. Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Analizi**

Bu çalışmada kullanılan bazı *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocin biyomolekülünün tanımlanması ve yapısal karakterizasyonu; hizmet alımı şeklinde Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK) tarafından, Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) (MALDI-TOF-MS) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Analiz sırasında liamocin örnekleri ilk olarak 1 mL asetonitril içerisinde çözülmüşlerdir. Matriks olarak; eşit hacimlerde (v/v); (50/50); asetonitril ve su çözeltisi içerisinde % 0.1 formik asitte çözülmüş doygun dihidrobenzoik asit çözeltisi kullanılmıştır. Örnek ve matriks 1:1 oranında karıştırılmıştır. “Kuru damla” yöntemi kullanılarak, 0.5 µL örnek hedef çelik plakaya damlatılmıştır. Analiz MALDI-TOF-MS cihazında (Bruker Daltonics, ABD) gerçekleştirilmiş ve 450 ile 1350 m/z aralığındaki piklerin varlığı izlenmiştir.

#### **3.2.8.2. Gaz Kromatografisi Flame (Alev) İyonizasyon Dedektörü (GC-FID) Analizi**

Bu tez çalışmasında *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilmiş olan liamocin biyomolekülünün GC-FID analizi, Hitit Üniversitesi HÜBTUAM-Kromatografik Analiz Teknikleri Laboratuvarı'nda, hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışılan suş

tarafından üretilmiş olan liamocin örneğinin yağ asidi kompozisyonunun belirlenebilmesi amacıyla yapılan bu analizde ilk olarak örneğin, metanolik KOH ile metil esterleri oluşturulmuş ve Thermo Scientific marka GC-FID (Gaz Kromatografisi- Alev İyonizasyon Dedektörü) ile analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz kolonu Rtx-2330 (30 m x 0.25 mm (iç çap) x 0.2 µm (film kalınlığı) ve sistemin taşıyıcı hareketli gazı He (1mL/dk) olarak kullanılmıştır. Analizde enjektör sıcaklığı 250 °C süre ise; 65 dk olarak belirtilmiştir Analizde uygulanan sıcaklık programı Çizelge 3.2’de verilmektedir.

Çizelge 3.2. GC-FID analizinde uygulanan sıcaklık programı

Artış Hızı (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dk)
	70	2.00
4.00	120	0.00
2.00	180	3.00
4.00	200	3.00
7.00	230	5.21

### 3.2.9. Liamocin Fermantasyonunda Kullanılacak *A. pullulans* Suşunun Seçimi

Araştırmanın bu bölümünde ilk olarak, çeşitli kültür koleksiyonlarından sağlanan *A. pullulans* suşlarının yanı sıra; daha önceki çalışmalarda kendi laboratuvarımızda izole edilmiş olan bir *A. pullulans* suşunun da liamocin üretip üretmediklerinin anlaşılması amacıyla bazı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada denenen *A. pullulans* suşları, daha önce Çizelge 3.1’de belirtilmiştir. Liamocin üreticisi olan suşların belirlenebilmesi amacıyla, 28°C’de 48 saat boyunca YM broth’da aktifleştirilen *A. pullulans* suşlarından, her biri ayrı ayrı olacak şekilde 1’er öze dolusu alınarak, daha önce Bölüm 3.1.2’de bileşimi verilen agarlı bir besiyerine, tek koloni düşürme tekniğiyle ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ardından, 28°C’de 5-7 gün inkübe edilen petri kutularında gelişen kültürler, koloniler etrafında, yağ tabakaları oluşumları açısından, görsel olarak incelenmişlerdir (Liu ve ark., 2014). Koloniler etrafında belirgin yağ tabakaları oluşturdukları gözlemlenen suşlar, potansiyel liamocin üreticileri olarak değerlendirilmişlerdir.

Koloni çevresinde yağ üretiminin, liamocin üretimi açısından bir ön tarama testi olması nedeniyle, yüksek miktarda liamocin üreten bir suşun belirlenerek fermantasyon deneylerinde kullanılabilmesi amacıyla, incelenen tüm *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde bileşimi daha önce Bölüm 3.1.2’de verilen fermantasyon ortamı kullanılmıştır. Deneylerde ilk olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi aşı kültürleri hazırlanmış ve her bir *A. pullulans* suşuna ait bu kültürler; daha önceden hazırlanmış olan fermantasyon ortamlarına (bkz. Bölüm 3.1.2) ayrı ayrı, %10 (v/v) oranında aşılanmışlardır. Fermantasyon deneyleri 300 mL hacmindeki erlenlerde, 100 mL’lik fermantasyon ortamlarında, 28°C’de ve 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Deneyler esnasında; fermantasyon boyunca yaklaşık her 24 saatte bir ortamlardan 10 mL kültür örnekleri alınarak bu örneklerden liamocin ekstraksiyonları gerçekleştirilmiş, ardından da liamocin ve biyokütle derişimleri (g/L) tayin edilmişlerdir.

Daha sonra her bir suş için hesaplanan liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler Origin Pro 8.5 (Originlab Corporation, Northampton, ABD) paket programından yararlanılarak çizilmiştir. Elde edilen verilerden yararlanılarak; incelenen *A. pullulans* suşları arasında, çalışılan koşullarda en yüksek derişimde liamocin üreten suş belirlenmiş ve araştırmının bundan sonraki bölümlerinde çalışmalara, seçilen bu suş kullanılarak devam edilmiştir.

Deneylerin bu aşamasında ayrıca, yapılan ön tarama testlerinde iyi bir liamocin üreticisi olduğu düşünölen; *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde bir lipid boyama işlemi uygulanmıştır. Kültür ortamında yaklaşık 48 saat geliştirilen aktif *A. pullulans* NBRC 100716 suşundan hazırlanan preparatlar izopropanol içinde çözündürölmüş % 0.5 (v/w) Oil Red O boyası (Merck, Almanya) ile boyanarak, yaklaşık beş dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Ardından; boyanan kültürler, basit ışık mikroskobu (Olympus BX50, Japonya) altında, 100x büyütmede immersiyon yağı kullanılarak incelenmiş ve hücrelerin içerisindeki yağ oluşumları değerlendirilmiştir.

### **3.2.10. Farklı Karbon Kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Tez çalışmasının bu bölümünde, çeşitli karbon kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla; maltoz, sakkaroz, fruktoz ve glukoz olmak üzere 4 farklı karbon kaynağı fermantasyon ortamı bileşiminde ayrı ayrı kullanılmışlardır. Kullanılan bu karbon kaynakları içerisinde, liamocin üretimini en iyi destekleyen karbon kaynağının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Daha önce Bölüm 3.1.2'de bileşimi verilen fermantasyon ortamındaki karbon kaynağı olan sakkaroz, başlangıç derişimi sabit ve 50 g/L olacak şekilde, denenecek olan karbon kaynağı türü ile değiştirilmiştir. İlk olarak *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna ait aşı kültürü Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanmış ve daha sonra bu kültürden başlangıç aşılama derişimi yaklaşık;  $1 \times 10^7$  kob/mL olacak şekilde, farklı karbon kaynakları içeren fermantasyon ortamlarına %10 (v/v) oranında, ayrı ayrı aşılama gerçekleştirelmıştır. Her bir fermantasyon ortamındaki *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişiminin tam olarak belirlenebilmesi amacıyla da; Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde ekimler gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon deneyleri 100 vuru/dak sabit çalkalama hızındaki çalkalamalı bir su banyosunda (Nüve ST-402, Türkiye), 28°C'de, 300 mL'lik erlenlerde ve 100 mL'lik çalışma hacimlerindeki ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Her bir ortamdan yaklaşık 24 saatte bir olacak şekilde kültür örnekleri alınmış ve bu örneklerde liamocin, biyokütle ve substrat derişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin zamana karşı derişimlerini gösteren grafikler çizilmiş ve bu grafiklerden yararlanılarak her bir farklı karbon kaynağını içeren fermantasyon ortamı için maksimum liamocin derişimleri, maksimum biyokütle derişimleri, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme, substrat tüketim ve özgül liamocin oluşum hızları hesaplanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirilerek, çalışılan *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun en yüksek derişimde liamocin ürettiği karbon kaynağı belirlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamında, substrat olarak seçilen bu karbon kaynağı kullanılmıştır.

### **3.2.11. Farklı Azot Kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Tez çalışmasının bu aşamasında; fermantasyon ortamında farklı azot kaynakları kullanımının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla fermantasyon ortamlarına, organik ve inorganik olmak üzere toplam üç farklı azot kaynağı ayrı ayrı ilave edilerek ve ayrıca organik azot

kaynaklarından ikisini içeren bir karışım ilave edilerek, bazı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada inorganik azot kaynağı olarak  $(NH_4)_2SO_4$ ; organik azot kaynakları olarak ise; pepton ve maya özütü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan azot kaynakları ile bunların azot içerikleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Deneylerde kullanılan organik ve inorganik azot kaynakları ve azot içerikleri

Azot kaynağı	Azot içeriği % (w/w)
Pepton	12.00
Maya özütü	10.50
$(NH_4)_2SO_4$	21.18

Farklı azot kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, fermantasyon ortamında bulunan azot kaynakları dışında bulunan diğer tüm bileşenlerin derişimleri ve fermantasyon koşulları sabit tutulmuştur.

Araştırmanın bu aşamasında deney tasarımı yapılırken, liamocin üretimi amacıyla kullanılan fermantasyon ortamının bileşiminde (bkz. Bölüm 3.1.2) yer alan pepton ve maya özütü içerisindeki azot derişimleri hesaplanmış ve sırasıyla; 0.072 ve 0.042 g/L olarak bulunmuştur. Fermantasyon ortamındaki toplam azot derişimi ise; 0.114 g/L olarak hesaplanmıştır. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde, denenecek olan fermantasyon ortamlarındaki azot kaynaklarının derişimleri, ana fermantasyon ortamındaki azot kaynağı kombinasyonlarının toplam azot derişimine (0.114 g/L) eşit olacak şekilde sabit tutulmuştur. Deneylerde kullanılan farklı azot kaynakları ve başlangıç derişimleri Çizelge 3.4'te verilmektedir.

1 numaralı fermantasyon ortamının kullanıldığı denemede; azot kaynakları ana fermantasyon ortamında olduğu haliyle, pepton ve maya özütünün kombinasyonu şeklinde kullanılmıştır.



İkinci fermantasyon ortamında, ana fermantasyon ortamında kullanılan pepton ve maya özütüne alternatif olarak, tek başına peptonun azot kaynağı olarak kullanıldığı bir deneme gerçekleştirilmiştir. 3 numaralı fermantasyon ortamında, azot kaynağı olarak yalnızca maya özütü kullanılmıştır. 4 numaralı fermantasyon ortamı bileşimine ise, organik azot kaynakları yerine tek başına, inorganik bir azot kaynağı olan;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ilave edilmiştir. Bu deneylerde kullanılan her bir fermantasyon ortamındaki azot kaynağı derişimleri; ana fermantasyon ortamındaki toplam azot derişimine (0.114 g/L) eşit olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminde kullanılan farklı azot kaynakları ve fermantasyon ortamlarındaki başlangıç derişimleri

Fermantasyon ortamı	Ortamda kullanılan azot kaynakları	Ortamdaki azot kaynaklarının başlangıç derişimleri (g/L)
1	Maya özütü + Pepton	1.000
2	Pepton	0.950
3	Maya özütü	1.080
4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.114

Deneyler, Çizelge 3.4'te verilen ve bileşimlerinde farklı azot kaynakları içerecek şekilde hazırlanmış 100 mL fermantasyon ortamı içeren 300 mL hacimli erlenlerde, 28°C sabit sıcaklık ve 100 vuru/dak sabit karıştırma hızına ayarlanmış çalkalamalı bir su banyosunda gerçekleştirilmiştir.

Farklı azot kaynaklarının, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bu deneylerde, yaklaşık 24 saatte bir fermantasyon ortamlarından 10'ar mL örnekler alınmış ve ortamlardaki liamocin, biyokütle ve substrat derişimlerini belirlemek amacıyla analizler yapılmıştır. Daha sonra, elde edilen bu verilerin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler çizilmiş ve bu grafiklerden yararlanılarak denenen her bir ortam için maksimum liamocin ve maksimum biyokütle derişimleri ile, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme, substrat tüketim ve özgül liamocin oluşum hızları hesaplanmıştır.

Elde edilen tüm bu verilerin değerlendirilmesi ile, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimini en iyi destekleyen azot kaynağı türü ve derişimi belirlenmiş ve fermantasyon ortamı bileşiminde sonraki deneylerde kullanılmıştır.

### **3.2.12. *A. pullulans* NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Bazı Fermantasyon Parametrelerinin Etkilerinin İncelenmesi Amacıyla Deney Tasarım Planının Oluşturulması**

Tez çalışmasının bu aşamasında, bazı fermantasyon parametrelerinin *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla, istatistiksel bir tasarım yönteminden yararlanılarak, bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Tasarım planının oluşturulmasında; yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology; RSM) içerisinde yer alan dönüşümlü merkezi karma tasarım (CCD; Central Composite Design) yöntemi kullanılmış ve bu amaçla da, Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının deneme sürümünden yararlanılmıştır. Deney tasarımı; -1.68, -1, 0, +1, +1.68 olarak kodlanmış beş farklı düzeyde gerçekleştirilerek, merkez noktada altı tekrarlı, 14 farklı kombinasyona sahip toplam 20 deneysel noktadan oluşmuştur. Tasarımdaki star (yıldız) noktası olan  $\alpha$  değeri, işlem aralığının genişliğini ifade etmektedir ve Bölüm 2.2’de yer alan Eş. 2.8 ile hesaplanmıştır. Tasarımdaki deney noktaları hesaplanan  $\alpha$  değerine göre 5 düzeyde kodlanarak oluşturulmuştur. Tasarımdaki deney noktalarının sayısı ise (n), program tarafından; daha önce Bölüm 2.2’de verilen Eş. 2.8’de yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada deney tasarımı için seçilen bağımsız değişkenler; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH’ı (X2) ve sıcaklık (X3) olup, seçilen bu değişkenler için kullanılacak olan çalışma aralıklarının belirlenmesinde, benzer konularda yapılan çeşitli araştırmaların verileri dikkate alınmışlardır. Her bir bağımsız değişken için beş farklı düzeyde çalışılmış olup, ilgili değişken seviyeleri ve çalışma aralıkları Çizelge 3.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Deneý tasarýmında kullanılan bağımsız deęişkenler ve seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Simge	Değişken seviyeleri				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
Fruktoz başlangıç derişimi (g/L)	X1	50.00	70.27	100.00	129.73	150.00
Başlangıç pH değeri	X2	3.0	3.8	5.0	6.2	7.0
Sıcaklık (°C)	X3	24.00	25.6	28.0	30.4	32.0

Bu tez çalışmasında; deneý tasarým programına göre gerçekleştirilen her bir deneý için bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak; maksimum liamocin derişimi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve maksimum liamocin oluşum hızı değerleri hesaplanmıştır. Belirlenen bağımlı değişkenler ve simgeleri Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Deneý tasarýmında kullanılan bağımlı deęişkenler ve simgeleri

Bağımlı değişkenler	Simge
Maksimum liamocin derişimi (g/L)	Y1
Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	Y2
Maksimum özgül liamocin üretim hızı [g liamocin/(g mo.sa)]	Y3

Araştırmanın bu bölümünde, Design Expert<sup>®</sup>12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılarak elde edilen deneý tasarým planında yer alan tüm deneýler, her bir deneý için planda verilmiş olan işletme koşullarında gerçekleştirilmişlerdir. Deneýlerin gerçekleştirilmeleri sırasında, fermantasyon süresince belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamından kültür örnekleri alınarak bu örneklerde liamocin, substrat ve biyokütle derişimlerini belirlemeye yönelik analizler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her bir deneý için, hesaplanmış olan liamocin, substrat ve biyokütle derişimlerinin zamana karşı değişimlerini gösteren grafikler, Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, Northampton, ABD) programı kullanılarak çizilmişlerdir.

Elde edilen bu veriler ve grafikler yardımıyla, çalışılan suş için her bir deney koşulundaki maksimum liamocin derişimi (Y1), özgül üreme hızı (Y2), maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) değerleri saptanmıştır.

Çalışılan mikroorganizmanın logaritmik bölgedeki üreme hızı (Y2),  $\mu$ , daha önce Bölüm 2.1’de verilmiş olan Eş. 2.1 yardımı ile,  $\ln X$  değerlerinin zamana göre değişimini veren grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu araştırmadaki maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) değerleri ise; her bir deney için liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamana göre değişimini gösteren grafikler kullanılarak hesaplanmıştır. Maksimum özgül liamocin oluşum hızı değerlerinin hesaplanması amacıyla öncelikle; liamocin derişimlerinin zamana göre çizilen grafiklerinden farklı zamanlardaki eğim değerleri hesaplanmıştır. Böylece liamocin oluşum hızları belirlenmiş ve daha sonra ise; biyokütle derişiminin zamanla değişimini gösteren grafiklerden aynı zamanlara karşılık gelen biyokütle derişimi değerleri okunarak özgül liamocin oluşum hızları hesaplanmıştır (Eş. 2.3). Bulunan değerler içindeki en yüksek değer; gerçekleştirilen deneylerdeki maksimum liamocin oluşum hızı olarak belirlenmiştir.

### **3.2.13. Çalışma İçin Belirlenen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmeleri**

Araştırmanın bu aşamasında, çalışmada seçilen bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini gösteren karesel model eşitlikler; kullanılan program (Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) yardımıyla, çoklu regresyon analizi kullanılarak türetilmişlerdir. Eşitliklerin türetilmelerinde, yararlanılan program tarafından önerilen; ikinci dereceden (karesel; quadratic) bir model denklem kullanılmıştır (bkz. Eş. 2.7). Daha sonra, belirlenen her bir yanıt için program tarafından türetilmiş karesel modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu amaçla; program tarafından oluşturulan ANOVA tablosu incelenerek modelin %95 güven düzeyinde önemli ( $p < 0.05$ ) olması, uyum eksikliğinin önemsiz ( $p > 0.05$ ) bulunması ve ilgili modele ait belirleme katsayısının ( $R^2$ ) ise; 0.75’ten büyük olması durumu dikkate alınmıştır.

Bu araştırmada varyans analizleri tamamlandıktan sonra ayrıca, her bir yanıt için elde edilen deneysel sonuçların, kullanılan program yardımıyla türetilen model eşitlikler kullanılarak hesaplanan tahminsel değerler ile karşılaştırıldıkları grafikler çizilmiştir.

Her bir bağımsız değişkenin bağımlı değişkenler üzerindeki ikili etkileşimlerini gösteren iki boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve üç boyutlu kontür grafikleri Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı tarafından çizilmiş ve yorumlanmıştır.

### 3.2.14. A. *pullulans* NBRC 100716 Suşu ile Liamocin Üretiminin Optimizasyonu

Bu araştırmada, A. *pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminin optimizasyonu amacıyla Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programında yer alan nümerik optimizasyon kullanılmıştır. Optimizasyon aşamasında ilk olarak, araştırma için seçilen bağımlı ve bağımsız değişkenler için belirlenen hedefler ile, minimum ve maksimum değerler tanımlanmışlardır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Optimizasyon çalışmasında kullanılan bağımsız (X) ve bağımlı (Y) değişkenler için tanımlanan hedefler ile minimum ve maksimum değerler

Değişken	Simge	Hedef	Minimum değer	Maksimum değer
Fruktoz başlangıç derişimi (g/L)	X1	Çalışılan aralıkta	50	150
Başlangıç pH' ı	X2	Çalışılan aralıkta	3	7
Sıcaklık (°C)	X3	Çalışılan aralıkta	24	32
Maksimum liamocin derişimi (g/L)	Y1	Maksimum	0.42	7
Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	Y2	Hedef belirtilmedi	0.028	0.089
Maksimum özgül liamocin üretim hızı [g liamocin/(g mo.sa)]	Y3	Çalışılan aralıkta	0.0011	0.0065

Bu araştırmada kullanılan bağımsız değişkenlerin maksimum ve minimum değerleri; deney tasarım planındaki ilgili değişkene ait en düşük ve en yüksek değerler seçilerek, hedef ise; çalışılan aralıkta olarak belirlenmiştir. Bağımlı değişkenler için minimum ve maksimum değerler ise; mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) için hedef

belirtilmeksizin, deney tasarım planı kapsamında gerçekleştirilen toplam 20 deney sonucunda, ilgili değişkene ait elde edilen en yüksek ve en düşük değerlerin seçimi sonucunda oluşturulmuştur. Bağımlı değişkenlerden; maksimum liamocin derişimi (Y1) için hedef maksimum olarak seçilerek, en düşük değer, deneyler sonucunda elde edilen değer olarak, en yüksek değer ise; ilgili literatür çalışmaları incelenerek ve deneyler sırasında elde edilen değerler dikkate alınarak bu değerin bir miktar üzerinde bir değer olacak şekilde tanımlanmıştır (bkz. Çizelge 3.7). Bağımlı değişkenlerden; maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) için ise; hedef çalışılan aralıkta olarak belirlenirken, maksimum ve minimum değerler deney tasarım planındaki en düşük ve en yüksek değerler seçilerek tanımlanmışlardır.

Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında, seçilen bağımlı ve bağımsız değişkenler ile bu değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri yukarıda anlatıldığı şekilde tanımlandıktan sonra Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı tarafından hesaplanan, her bir bağımlı ve bağımsız değişkenin değerini içeren farklı çözüm önerileri ile her çözüm önerisi için istenilen hedefe ulaşma oranı elde edilmiştir.

Araştırmanın bu aşamasında daha sonra, kullanılan program tarafından önerilen çözümler arasından istenilen hedefe ulaşma oranı en yüksek ve 1 değerine yakın olanlardan bir tanesi seçilerek; çözümde verilen bağımsız değişken değerlerinde paralelli olarak bir deney gerçekleştirilmiştir. Söz konusu deney; program tarafından optimum olarak önerilen koşullarda, 100 mL'lik çalışma hacminde, 300 mL'lik erlenler kullanılarak ve 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, bir su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon deneyinde; fermantasyon ortamından yaklaşık her 24 saatte bir alınan 10 mL'lik kültür örneklerinde, ortamdaki liamocin, biyokütle ve substrat derişimleri tayin edilmiştir. Daha sonra, optimizasyon sonucunda elde edilen verilerden hesaplanan değerlerin zamana karşı değişimlerini içeren grafikler çizilmiş ve istenen yanıtların optimum koşullarda elde edilen deneysel değerleri belirlenmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında ayrıca, programdaki ileri analiz (post analysis) sekmesinde bulunan doğrulama (confirmation) menüsü kullanılarak; elde edilen deneysel değerler ile programın hesaplamış olduğu %95 güven aralığındaki minimum maksimum değerler karşılaştırılmıştır ve deneysel değerlerin program tarafından öngörülen bu değerler arasında olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca, nümerik optimizasyon sekmesi ile, her bir yanıt için istenilen hedefe ulaşma oranı grafikleri de elde edilmiştir.

### **3.2.15. A. pullulans NBRC 100716 Suşu Tarafından Üretilen Liamocin Örneklerinin Biyosümfektan Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Biyosümfektan bileşiklerin en belirgin özelliklerinin, suyun yüzey gerilimini etkili bir şekilde azaltma yetenekleri olduğu ifade edilmekte ve biyosümfektanların yüzey aktivitesini doğrudan ölçen bir dizi yaklaşımın, bunların tespiti için tarama yöntemleri olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir. Bu yöntemler arasında en sık kullanılanlardan birisi de yağ yayma testi (oil spreading test) olarak ifade edilmektedir (Fracchia ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında, A. pullulans NBRC 100716 tarafından üretilen liamocin örneklerinin biyosümfektan aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla; hızlı ve yarı kantitatif bir test olan; yağ yayma testi uygulanmış ve ayrıca örneklerin yüzey gerilimi değerleri de tespit edilmiştir.

#### **3.2.15.1. Yağ Yayma Testi (Oil Spreading Test)**

Yağ yayma testi (oil spreading test), bir yağ-su karışımı yüzeyine damlatılan biyosümfektanın yağ-su karışımı yüzeyinde oluşturduğu berrak zonun çapının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu testin, mikroorganizmaların biyosümfektan üretimi ile ilgili yarı kantitatif bir sonuç sağladığı belirtilmektedir (Morikawa, Hirata ve Imanaka, 2000; Eldin, Kamel ve Hossam, 2019).

Biyosümfektan derişimi ile berrak zon çapı arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Ayrıca; yağ yayma testinin hızlı, uygulanması kolay, özel ekipman gerektirmeyen ve küçük hacimde örnek ile çalışılabilen bir yöntem olduğu da ifade edilmektedir.

Deneyin uygulanışında ilk olarak; 90 mm çapındaki temiz cam petri kutularına 20 mL saf su eklenmiştir. Daha sonra üzerine 400 µL siyah motor yağı ilave edilmiştir. Petri kutuları daha sonra hafifçe sallanarak motor yağının su yüzeyinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Ardından, A. pullulans NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneklerinin metil etil keton kullanılarak farklı seyreltileri hazırlanmış ve bu örneklerden 10 µL alınarak, petri kutularında yayılan motor yağlarının orta noktalarına ilave edilmiştir. Daha sonra yaklaşık 2 dakika beklenerek, örneklerin yağ üzerinde oluşturdukları berrak zonların çapları ölçülmüştür. Deneyler iki paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu test sırasında; negatif kontrol olarak saf su, pozitif kontrol olarak ise; Tween 80 kullanılmıştır. Aynı denemeler motor yağı yerine ham petrol (Mesozoyik yaşlı rezervuar kayalar, Diyarbakır) kullanılarak da gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.15.2. Yüzey Geriliminin Belirlenmesi

Tez çalışmasının bu bölümünde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen ve yüksek derişimli olan bazı liamocin örneklerinin arayüzey gerilimleri, asılı damla yöntemi ile belirlenmiştir (Thompson, Fox ve Bala, 2000). Bu amaçla, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde bulunan bir askıda damla cihazı; DSA (drop shape analyzer), (Krüss DSA-10, Almanya) kullanılmıştır. Deneyleerde ilk olarak analiz edilecek olan liamocin örneklerinin; etanol ve sudan (20:80) (v/v) oluşan bir karışımında çözüldürülmesi sağlanmış ve daha sonra ise farklı derişimleri (0.0003-1.20 mg/mL aralığında) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örneklerin arayüzey gerilimleri (mN/m), DSA cihazı yardımıyla ölçülmüştür. Ölçümler oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilmiştir ve analiz sırasında kontrol olarak; 10 mM derişimde, ticari bir anyonik sürfektan olan SDS (sodyum dodesil sülfat) kullanılmıştır.

Yüzey veya arayüzey gerilimlerinin ölçümlerinde; Du Nouy halka metodu, kılcal (kapiler) yükselme metodu, pendant (asılı) damla metodu (pendant drop shape technique), Sessile (durağan, sabit) damla ve Wilhemny tabakası metodu gibi birçok yöntem bulunmaktadır (Aydar ve Bağdatlioğlu, 2014). Bunlardan asılı damla yöntemi, arayüzey gerilimini ölçen optik yöntemlerden birisi olarak belirtilmektedir (Walter, Syldatk ve Hausmann, 2010). Bu yöntem; çapı bilinen bir iğneden sarkan damlanın şeklinin analiz edilmesi prensibine dayanır (Berry ve ark., 2015).

Pendant drop cihazı; ölçüm haznesi, damlanın şeklini kaydeden bir görüntüleme sistemi ve bir bilgisayar sisteminden oluşmaktadır. Bu sistem; askıdaki bir damlanın profilinin oluşturulması prensibine dayanmaktadır ve asılı damlanın görünüşü bir kamera ile sürekli olarak yakalanıp bilgisayara aktararak, damla profilinden alınan verilerle arayüzey gerilimi hesaplanmaktadır (Arashiro ve Demarquette, 1999).

Pendant drop yönteminde; oluşturulan damla profili kullanılarak elde edilen verilerden yüzey gerilimi, Young-Laplace denkleminde dayanarak; asılı damla için geliştirilen Eş. 3.1 kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$\frac{2}{r_{\text{apex}}} - \left[ \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right] = \left[ \frac{\Delta\rho g z}{\gamma} \right] \quad (\text{Eş. 3.1})$$

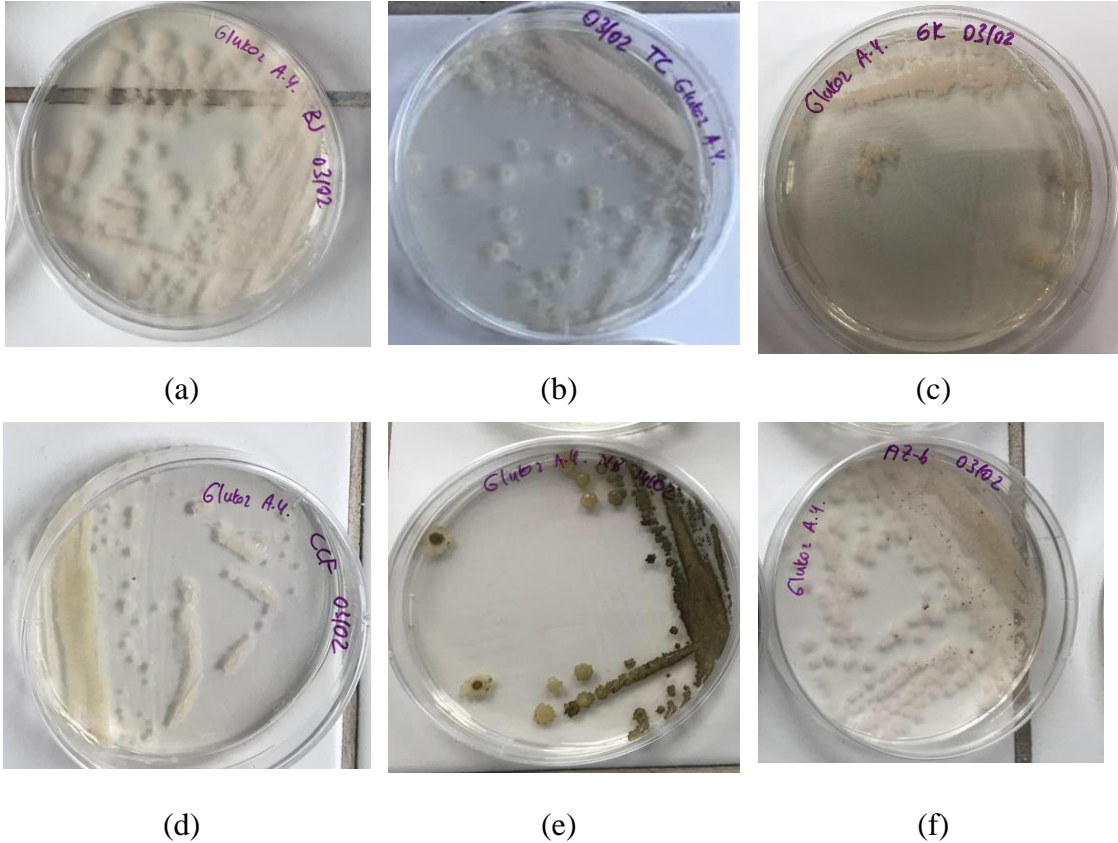
Eşitlikte verilen  $\gamma$ ; yüzey gerilimini,  $\Delta\rho$ ; ölçüm alınan arayüzeyler arasındaki yoğunluk farkını,  $z$ ; damlanın yüksekliğini,  $r_{\text{apex}}$ ;  $z$ 'nin 0 olduğu durumdaki yarıçapı,  $r_1$  ve  $r_2$  ise; damlanın eğrilik yarıçaplarını ifade etmektedir (Yeow ve ark., 2008).



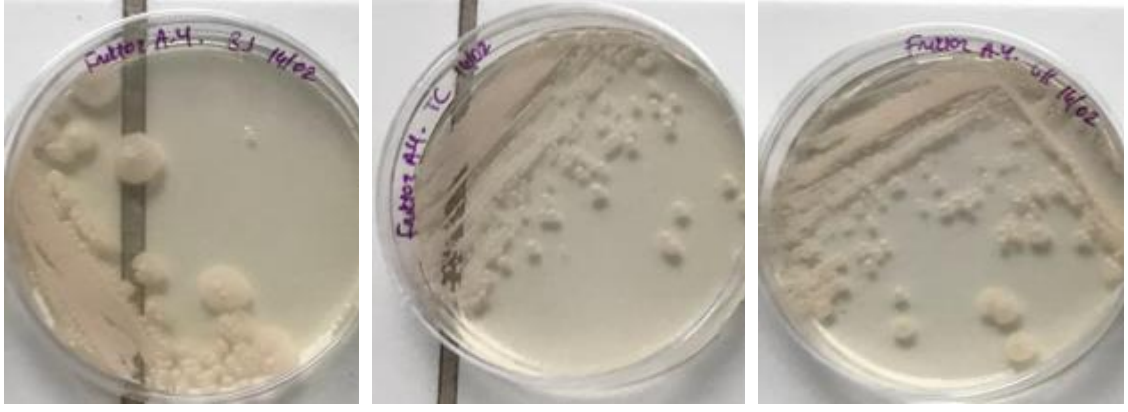
## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Liamocin Fermantasyonunda Kullanılacak Olan *A. pullulans* Suşunun Seçimine İlişkin Sonuçlar

Bu tez çalışmasında ilk olarak, farklı kültür koleksiyonu merkezlerinden sağlanan beş *A. pullulans* AZ-6 suşu ile kendi laboratuvarımızda önceden izole edilmiş yerli bir suşun (*A. pullulans* AZ-6) (bkz. Çizelge 3.1) liamocin üretip üretmedikleri bir ön tarama testi kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.1.1’de anlatıldığı gibi, uygun koşullarda aktifleştirilen bu altı suştan; bileşimi daha önce Bölüm 3.1.2’de verilmiş olan, agarlı bir besiyerine ekimler gerçekleştirilmiş ve ekimi yapılmış olan bu petri kutuları 28°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda, gelişen koloniler etrafında yağ tabakası oluşumları görsel olarak incelenmiştir. Şekil 4.1-4.3’de, bileşiminde sırasıyla glukoz, fruktoz ve sakkarozun kullanıldığı tarama ortamlarındaki makroskopik morfoloji görüntüleri verilmektedir.



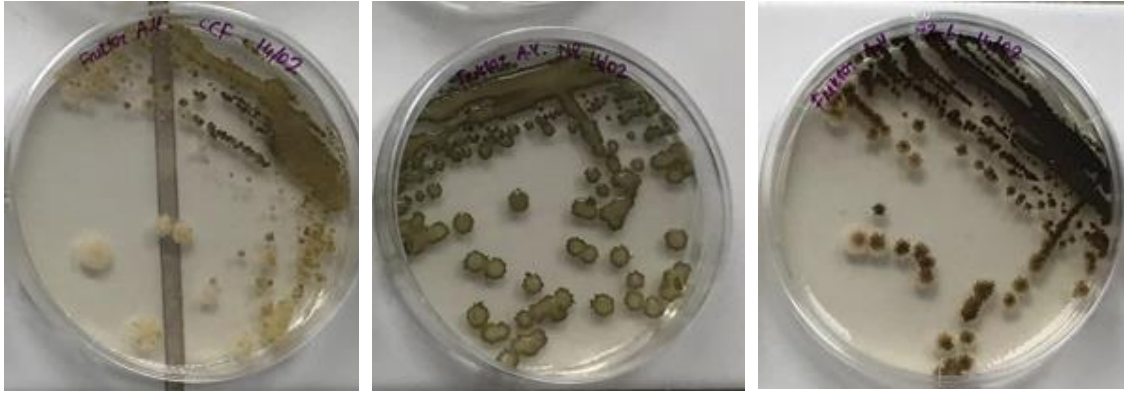
Şekil 4.1. Glukoz içeren besiyerinde; (a): *A. pullulans* BJ20p4, (b): *A. pullulans* TrisCis2, (c): *A. pullulans* G. Kaukaska, (d): *A. pullulans* CCF 4532, (e): *A. pullulans* NBRC 100716, (f): *A. pullulans* AZ-6 suşlarına ait makroskopik morfoloji görüntüleri



(a)

(b)

(c)

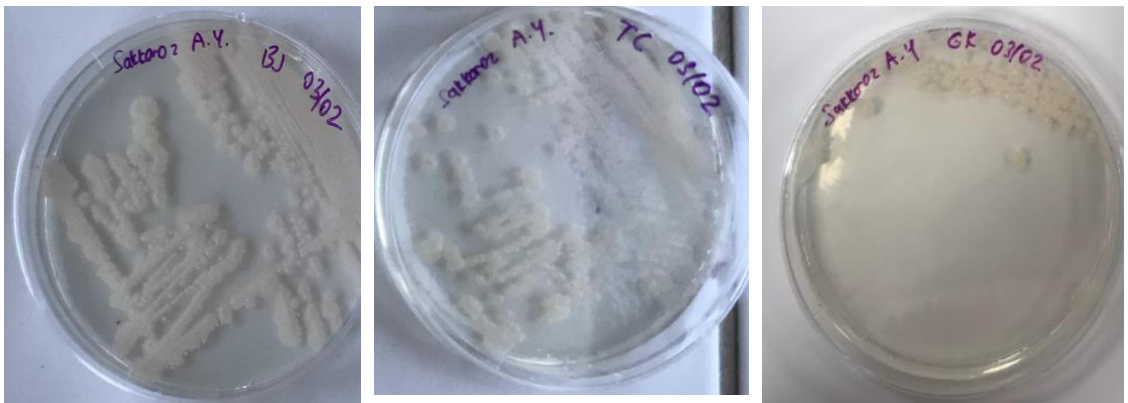


(d)

(e)

(f)

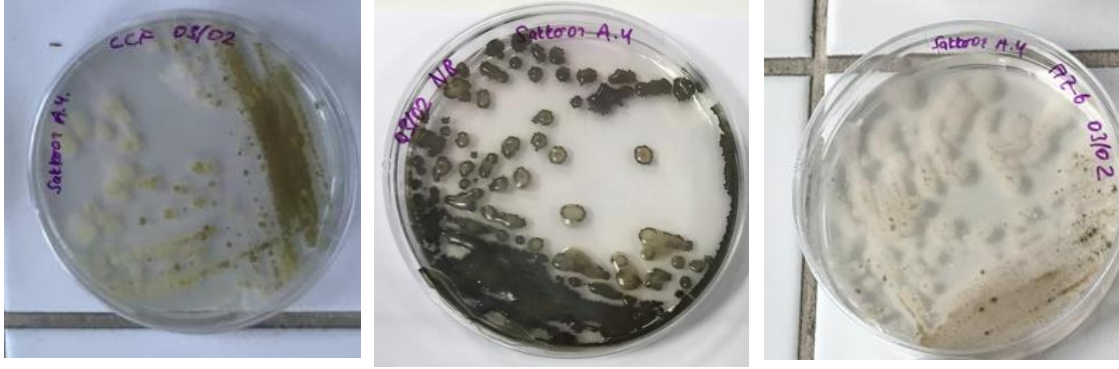
Şekil 4.2. Fruktöz içeren besiyerinde; (a): *A. pullulans* BJ20p4, (b): *A. pullulans* TrisCisz2, (c): *A. pullulans* G. Kaukaska, (d): *A. pullulans* CCF 4532 (e): *A. pullulans* NBRC 100716, (f): *A. pullulans* AZ-6 suşlarına ait makroskopik morfoloji görüntüleri



(a)

(b)

(c)



(d)

(e)

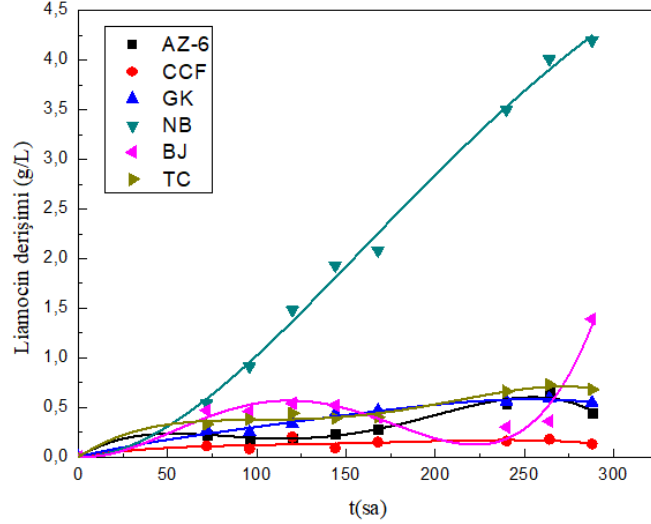
(f)

Şekil 4.3. Sakkaroz içeren besiyerinde; (a): *A. pullulans* BJ20p4, (b): *A. pullulans* TrisCisz2, (c): *A. pullulans* G. Kaukaska, (d): *A. pullulans* CCF 4532 (e): *A. pullulans* NBRC 100716, (f): *A. pullulans* AZ-6 suşlarına ait makroskopik morfoloji görüntüleri

Şekil 4.1-4.3 incelendiğinde de görülebileceği gibi; bu tez çalışmasında kullanılan altı suşun; karbon kaynağı olarak bileşiminde üç farklı çeşit şekerin ayrı ayrı denendikleri besiyerinde gelişebildikleri ve aynı zamanda liamocin üretiminin bir belirteci olarak kabul edilen yağ tabakasını üretebildikleri de gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyde bunun yanı sıra; *A. pullulans* BJ20p4, *A. pullulans* TrisCisz2 ve *A. pullulans* G. Kaukaska suşlarının oluşturdukları kolonilerin etraflarında parlak beyaz renkte, *A. pullulans* CCF 4532 suşuna ait kolonilerin çevresinde ise, bileşiminde glukozun kullanıldığı besiyerinde; açık beyaz, bileşimlerinde fruktoz ve sakkarozun kullanıldığı ortamlarda ise sırasıyla; sarımsı yeşil renkte yağ tabakalarının oluştuğu belirlenmiştir. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun; liamocin üretiminin gözlenmesi amacıyla kullanılan besiyerinde yeşil ve parlak bir görünümde yağ tabakası oluştururlarken, *A. pullulans* AZ-6 suşunun ise; bileşimlerinde glukoz ve sakkaroz içeren besiyerlerinde koloniler etrafında açık sarı-beyaz renkli yağ tabakası ürettiği, fruktoz içeren besiyerinde ise, yeşil tonlarında liamocin ürettikleri gözlemlenmiştir. Bu deneylerde; incelenen tüm *A. pullulans* suşlarının, kullanılan tarama besiyerinde parlak renkli, açık beyaz-sarı veya yeşil renkli liamocin üretebilme potansiyeli gösterdikleri tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının bu aşamasında daha sonra, incelenen *A. pullulans* suşları içerisinde liamocin üretimi yüksek bir suşun belirlenebilmesi amacıyla, bileşimi daha önceden verilmiş olan fermantasyon ortamında ve koşullarında (bkz. Bölüm 3) bazı deneyler

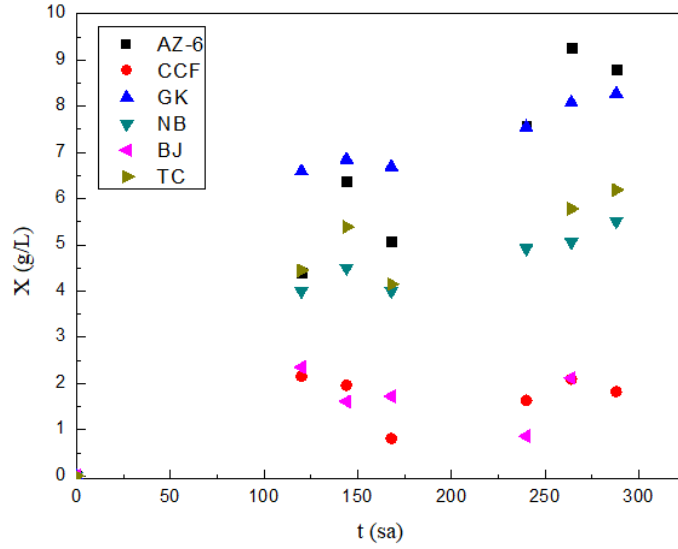
gerçekleştirilmiştir. İncelenen tüm suşlar için, fermantasyon süresince üretilen liamocin derişimlerinin, zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. (AZ-6): *A. pullulans* AZ-6, (CCF): *A. pullulans* CCF 4532, (GK): *A. pullulans* G. Kaukaska B1, (NB): *A. pullulans* NBRC 100716, (BJ): *A. pullulans* BJ20p4, (TC): *A. pullulans* TrisCisz2 suşları tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.4 incelendiğinde; *A. pullulans* AZ-6, *A. pullulans* CCF 4532, *A. pullulans* G. Kaukaska B1, *A. pullulans* NBRC 100716, *A. pullulans* BJ20p4, ve *A. pullulans* TrisCisz2 suşları tarafından üretilen en yüksek liamocin derişimleri sırasıyla; 0.66, 0.20, 0.59, 4.20, 1.39 ve 0.73 g/L olarak; fermantasyonun 264, 120, 264, 288, 288 ve 264. saatlerinde belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda; *A. pullulans* AZ-6, *A. pullulans* G. Kaukaska ve *A. pullulans* TrisCisz2 suşları için en yüksek liamocin derişimi değerlerinin birbirlerine yakın değerlerde oldukları saptanmıştır. İncelenen suşlar içerisinde en yüksek liamocin üretiminin (4.20 g/L), *A. pullulans* NBRC 100716 ile elde edildiği ve üretimin fermantasyon boyunca arttığı bulunmuştur. Bu deney için diğer suşlar ile karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek derişimde liamocin üretiminin (1.39 g/L) *A. pullulans* BJ20p4 suşu ile elde edildiği görülmektedir. *A. pullulans* CCF 4532 suşunun liamocin üretiminin ise, fermantasyon süresince, diğerlerine oranla oldukça düşük olduğu belirlenmiştir.

En yüksek liamocin üreten suşun belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde, incelenen suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değişimini gösteren grafik ise; Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. (AZ-6): *A. pullulans* AZ-6, (CCF): *A. pullulans* CCF 4532, (GK): *A. pullulans* G. Kaukaska B1, (NB): *A. pullulans* NBRC 100716, (BJ): *A. pullulans* BJ20p4, (TC): *A. pullulans* TrisCisz2 suşlarının biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.5 incelendiğinde; *A. pullulans* AZ-6 suşu için biyokütle derişiminin 264. saatte en yüksek değeri olan 9.26 g/L'ye ulaştığı saptanmıştır. *A. pullulans* CCF 4532 ve *A. pullulans* BJ20p4 suşları için; en yüksek biyokütle derişimlerine sırasıyla; 2.15 ve 2.35 g/L olarak, fermantasyonun 120. saatinde ulaşıldığı ve sonrasında ise biyokütle derişimlerinde büyük oranda bir değişiklik gözlenmediği saptanmıştır. Bu deneyde *A. pullulans* G. Kaukaska B1, *A. pullulans* NBRC 100716 ve *A. pullulans* TrisCisz2 suşları için hesaplanan en yüksek biyokütle derişimleri ise sırasıyla; 8.27, 5.51 ve 6.19 g/L olup, bu değerlere fermantasyonun 288. saatinde ulaşıldığı belirlenmiştir.

Tez çalışmasının bu aşamasında incelenen *A. pullulans* suşlarına ait, başlangıç inokülasyon derişimleri ile fermantasyon sırasında elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimlerini içeren veriler toplu olarak, Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Liamocin üretimleri incelenen *A. pullulans* suşlarının başlangıç inokülasyon derişimleri ile fermantasyon sırasında elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri

Suş	Başlangıç inokülasyon derişimi (kob/mL)	En yüksek liamocin derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)
<i>A. pullulans</i> AZ-6	4.5x10 <sup>7</sup>	0.66	9.26
<i>A. pullulans</i> CCF 4532	3.2x10 <sup>7</sup>	0.20	2.15
<i>A. pullulans</i> G. Kaukaska B1	6.4x10 <sup>7</sup>	0.59	8.27
<i>A. pullulans</i> NBRC 100716	5.6x10 <sup>7</sup>	4.20	5.51
<i>A. pullulans</i> BJ20p4	1.2x10 <sup>7</sup>	1.39	2.35
<i>A. pullulans</i> TrisCisz2	2.3x10 <sup>7</sup>	0.73	6.19

*A. pullulans* NBRC 100716 suşunun kullanıldığı deneyde, en yüksek liamocin derişimi 4.20 g/L ve en yüksek biyokütle derişimi ise; 5.51 g/L olarak saptanmıştır. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun ardından, liamocin üretimi nispeten yüksek olan diğer bir suş da; *A. pullulans* BJ20p4 olup, bu suşun ürettiği en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri sırasıyla; 1.39 g/L ve 2.35 g/L olarak belirlenmiştir. Diğer suşlarla gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen liamocin derişimlerinin bulunan bu değerlerden çok daha düşük oldukları tespit edilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında ayrıca, *A. pullulans* NBRC 100716 kültürüne uygulanan lipid boyama testinin sonuçları da (bkz Bölüm 3.2.9) dikkate alınmış ve yapılan mikroskopik incelemede hücrelerin yoğun yağ oluşumu gösterdikleri de tespit edilmiştir (Şekil EK 6). Bu veriler ışığında; tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında en yüksek derişimde liamocin üretimi sağlayan *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

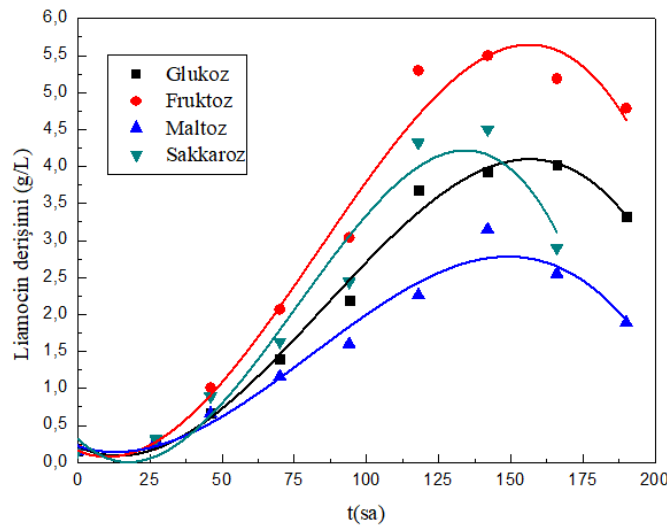
#### 4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar

*A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerinin araştırıldığı deneyler daha önce Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.



Bu deneylerde, fermantasyon ortamlarında kullanılan karbon kaynakları glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkarozdur. Söz konusu deneylerde fermantasyon ortamlarına aşılana *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi  $3 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

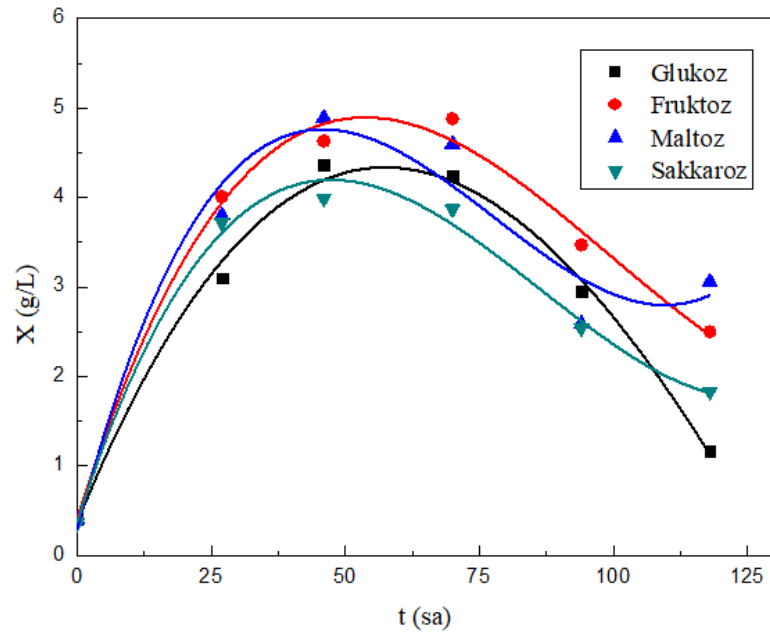
Fermantasyon ortamlarında farklı karbon kaynaklarının substrat olarak kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun ürettiği liamocin derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı karbon kaynaklarının substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu deneylerde en yüksek liamocin derişiminin, fermantasyon ortamında karbonhidrat kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı deneylerde elde edildiği belirlenmiştir. Şekil 4.6 incelendiğinde; fruktozun kullanıldığı fermantasyon ortamındaki liamocin derişiminin, 142. saatte en yüksek değeri olan 5.5 g/L’ye ulaştığı tespit edilmiştir. Glukozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında ise, en yüksek liamocin derişimi 166. saatte 4.02 g/L olarak belirlenmiştir. Maltoz ve sakkarozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarındaki en yüksek liamocin derişimleri fermantasyonun 142. saatinde sırasıyla, 3.15 g/L ve 4.50 g/L olarak saptanmıştır. Glukozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında 166. saatten sonra; fruktoz, maltoz ve sakkarozun karbon kaynakları olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında ise 142. saatten sonra liamocin derişimlerinin azaldıkları tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının bu aşamasında, fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin zamanla değişimini gösteren grafik ise; Şekil 4.7’de verilmiştir.



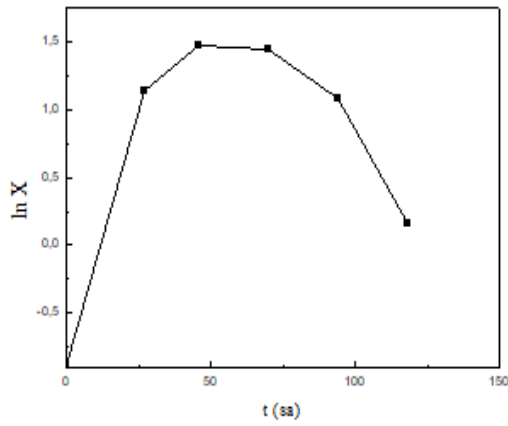
Şekil 4.7. Farklı karbon kaynaklarının substrat olarak kullanıldıkları ortamlarda, *A. pullulans* NBRC 100713 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Glukoz, maltoz ve sakkarozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında biyokütle derişimlerinin fermantasyonun 46. saatine kadar arttığı ve en yüksek biyokütle derişimlerine de aynı saatte ulaşıldığı tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle derişimleri glukoz, maltoz ve sakkarozun kullanıldığı ortamlar için sırası ile; 4.36, 4.89 ve 3.99 g/L olarak saptanmıştır. Fruktozun substrat kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında ise; en yüksek biyokütle derişimi, fermantasyonun 70. saatinde, 4.88 g/L olarak elde edilmiştir.

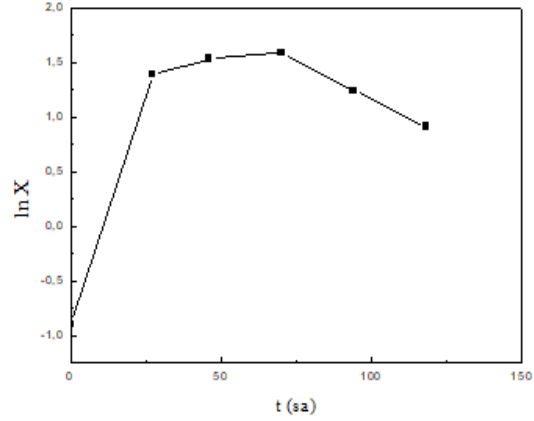
Çalışmanın bu aşamasında daha sonra, farklı karbonhidratların substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında yapılan deneyler sırasında elde edilen kuru hücre ağırlıklarından yararlanılarak,  $\ln X$  değerleri hesaplanmıştır. Ardından, hesaplanan bu  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuş (Şekil 4.8) ve bu grafiklerden de yararlanılarak, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun farklı substratlar içeren fermantasyon ortamlarındaki özgül üreme hızları,  $\mu$  ( $\text{sa}^{-1}$ ), belirlenmiştir.



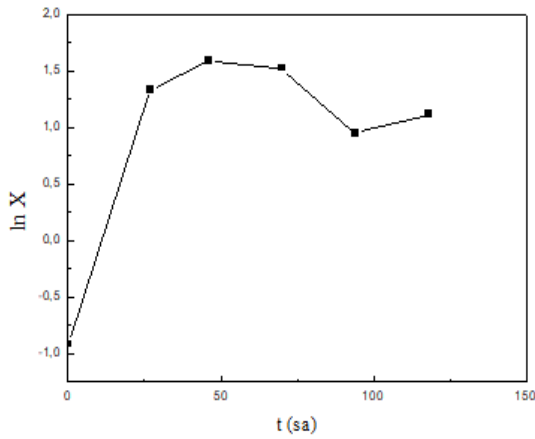
Deneyde kullanılan her bir ortam için, kullanılan suşun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı;  $\mu$  ( $\text{sa}^{-1}$ ), Bölüm 2.1.1’de verilen Eşitlik 2.1 kullanılarak,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak hesaplanmıştır.



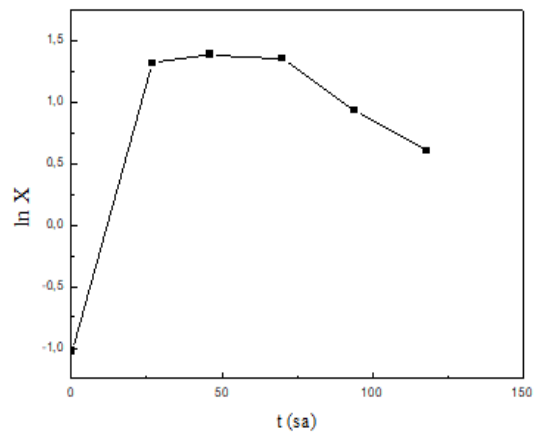
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.8. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun farklı substratlar içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin  $\ln$  değerlerinin zamanla değişimleri, (a): Glukoz, (b): Fruktoz, (c): Maltoz ve (d): Sakkaroz

Substrat olarak glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkaroz içeren fermantasyon ortamlarında; *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ) sırası ile; 0.0429, 0.0508, 0.0529 ve 0.0460  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

Değerlerden de görülebileceği gibi çalışılan suş için en yüksek özgül üreme hızı, ortamda maltoz ve ardından fruktoz kullanıldığında belirlenmiştir.

Bu araştırmada, substrat olarak farklı karbon kaynaklarının liamocin üretimine etkilerinin incelendiği deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül liamocin üretim hızları da (qp) hesaplanmıştır. Bu amaçla öncelikle, liamocin derişimlerinin zamana bağlı değişimlerini gösteren grafiklerden farklı zamanlardaki eğim değerleri bulunmuş ve liamocin oluşum hızları,  $dP/dT$  [g liamocin/(L.sa)], hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanması, daha önce Bölüm 2.1.2’de verildiği gibi yapılmıştır. Daha sonra ise; bu değerler kullanılarak ve biyokütle derişiminin zamana bağlı değişimini gösteren grafiklerden, aynı zamana karşılık gelen biyokütle derişimleri okunarak, özgül liamocin üretim hızları;  $qp$  [g liamocin/(g mo.sa)], hesaplanmıştır.

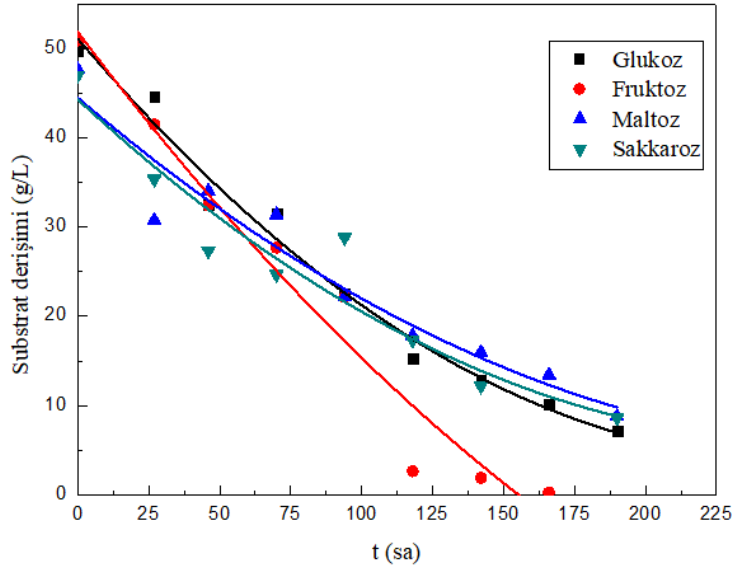
Substrat olarak glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkarozun kullanıldıkları deneylerde, en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırası ile; 0.0238, 0.0174, 0.0081 ve 0.0188 g liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum hızları, glukoz ve sakkarozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamlarında sırasıyla fermantasyonun 105 ve 120. saatlerinde belirlenmiştir. Fruktoz ve maltoz için ise bu değerler sırasıyla 113. ve 154. saatler olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada incelenen tüm substratlar göz önüne alındığında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen en yüksek liamocin derişiminin (5.50 g/L); fermantasyon ortamı bileşiminde fruktoz bulunan ortamda elde edildiği tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.6). Bu deneyler için, en yüksek biyokütle derişimi ise; bileşiminde maltoz veya fruktoz bulunan fermantasyon ortamlarında sırasıyla; 4.89 g/L ve 4.88 g/L olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde; çalışılan suş için en yüksek özgül üreme hızlarına da maltozun (0.0529  $sa^{-1}$ ) ve ardından fruktozun (0.0508  $sa^{-1}$ ) fermantasyon ortamlarında substrat olarak kullanıldığı denemelerde ulaşıldığı belirlenmiştir.

Tez araştırmasının bu bölümünde ayrıca, fermantasyon süresince fermantasyon ortamlarından örnekler alınarak, ortamda tüketilemeden kalan substrat miktarları da tayin edilmiştir. Bu deneylerde, fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.9’da verilmiştir.

Şekil 4.9’daki grafik incelendiğinde glukoz, maltoz ve sakkarozun fermantasyonun 190. saatine kadar büyük ölçüde tüketildikleri ancak bu saatten sonra ortamda bir miktar substrat kaldığı saptanmıştır.

Bu miktarlar glukoz, maltoz ve sakkaroz için sırası ile; 7.20, 8.79 ve 8.59 g/L olarak ölçülmüştür. Fruktozun substrat olarak kullanıldığı ortamda ise, fruktozun tamamen tüketildiği belirlenmiştir.

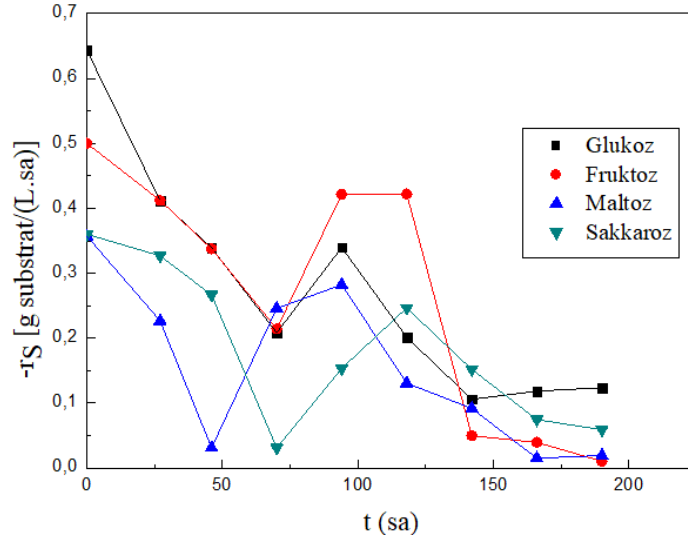


Şekil 4.9. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde fermantasyon ortamlarındaki substrat derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu araştırmada, farklı karbon kaynaklarının fermantasyon ortamında substrat olarak kullanıldıkları deneylerde, her bir fermantasyon ortamı için *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun substrat tüketim hızları da hesaplanmıştır. Bu amaçla; substrat derişimlerinin zamanla değişimlerini veren Şekil 4.9'daki grafikler kullanılarak, her bir karbon kaynağı için verilen eğride, farklı zamanlardaki eğim değerleri hesaplanılarak substrat tüketim hızlarının zamanla değişimlerini veren grafikler elde edilmiş ve Şekil 4.10'da sunulmuştur.

Glukoz, fruktoz ve maltozun substrat olarak kullanıldıkları fermantasyon ortamlarında substrat tüketim hızları sırasıyla; 0.64, 0.50, 0.36 g substrat/ (L.sa) olarak fermantasyonun başlangıcında, sakkarozun substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamında ise; 0.36 g substrat/ (L.sa) olarak fermantasyonun 27. saatinde hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde, kullanılan substratlar içerisinde en yüksek substrat

tüketim hızı değerlerine; glukozun veya fruktozun, fermantasyon ortamlarında substrat olarak kullanıldığı koşullarda ulaşıldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerdeki substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Çizelge 4.2’de; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminde, fermantasyon ortamlarında farklı karbonhidrat kaynakları kullanıldığında elde edilmiş olan en yüksek biyokütle ve liamocin derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ve özgül liamocin oluşum hızları ile substrat tüketim hızı değerleri verilmektedir.

Bu araştırmada en yüksek liamocin derişimine; substrat olarak fruktozun fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanıldığı denemede ulaşıldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun fruktoz içeren ortamdaki biyokütle üretiminin yüksek olduğu ve özgül üreme hızının da, maltoz dışında diğer substratlarla karşılaştırıldığında, nispeten daha iyi olduğu saptanmıştır. Bu deney için en yüksek özgül ürün oluşum ve en yüksek substrat tüketim hızlarına, fermantasyon ortamında glukoz kullanıldığında ulaşıldığı bulunmuştur. Tüm veriler değerlendirildiğinde, yüksek liamocin ve biyokütle derişimlerinin elde edildiği, substrat tüketim hızının da tatminkar bulunduğu fruktozun, deneylerin bundan sonraki aşamalarında karbon kaynağı olarak fermantasyon ortamında kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.2. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminde kullanılan substrat kaynakları ve bu deneylerde elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri, mikroorganizma özgül üreme ve en yüksek ürün oluşum hızları ile en yüksek substrat tüketim hızı değerleri

Fermantasyon ortamında kullanılan substrat kaynakları	En yüksek liamocin derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g liamocin / (g mo.sa)]	En yüksek substrat tüketim hızı [g substrat/(L.sa)]
Glukoz	4.02	4.36	0.0429	0.0238	0.64
Fruktoz	5.50	4.88	0.0508	0.0174	0.50
Maltoz	3.15	4.89	0.0529	0.0081	0.36
Sakkaroz	4.50	3.99	0.0460	0.0188	0.36

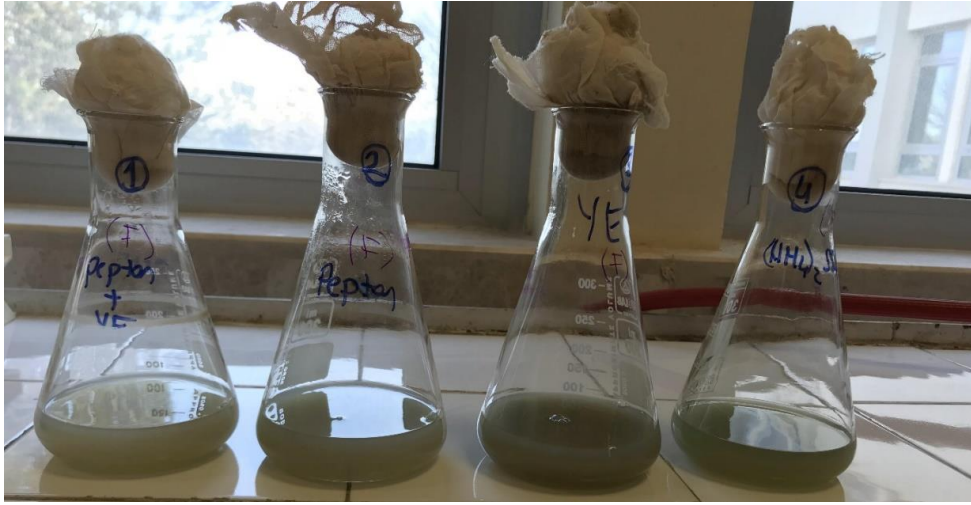
Literatürde çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimlerinin incelendiği çalışmalarda karbon kaynağı olarak genellikle sakkaroz kullanılmıştır (Manitchotpisit ve ark., 2011; Manitchotpisit ve ark., 2014; Leathers ve ark., 2018). Leathers ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada; Kurosawa ve ark. (1994) tarafından önerilen ve karbon kaynağı olarak %12 oranında glukoz içeren bir besiyeri kullanılarak altı farklı *A. pullulans* suşunun liamocin üretimleri araştırılmıştır. Anılan çalışmada; glukoz içeren besiyerinde elde edilen en yüksek liamocin derişiminin 4.8 g/L olarak, *A. pullulans* NRRL 50384 suşu ile elde edildiği rapor edilirken; diğer beş suş için aynı ortamdaki liamocin derişimlerinin; 0.3-1.7 g/L aralığında değiştiği belirtilmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir diğer araştırmada; fermantasyon ortamında substrat olarak çeşitli karbonhidratların ve poliollerin kullanıldığı bildirilmiştir (Price ve ark., 2017).

Anılan çalışmada fermantasyon ortamında kullanılan dokuz farklı karbon kaynağı (sakkaroz, laktoz, D-fruktoz, D-glukoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-arabinoz, L-arabinoz, D-ksiloz) arasından *A. pullulans* NRRL 50380 suşu ile elde edilen en yüksek liamocin derişimlerinin sırasıyla; sakkaroz, D-fruktoz, D-ksiloz, D-mannoz, L-arabinoz, D-glukoz, D-arabinoz, D-galaktoz ve laktoz içeren fermantasyon ortamlarında oldukları belirtilmiştir. Söz konusu araştırmada, en yüksek liamocin derişiminin 4.4 g/L olarak sakkarozun kullanıldığı ortamda elde edildiği ifade edilirken, karbon kaynağının D-fruktoz olduğu ortamda elde edilen liamocin derişiminin ise; 4.1 g/L ile, sakkarozu yakın ve ikinci sırada olduğu rapor edilmiştir (Price ve ark., 2017).

#### 4.3. Farklı Azot Kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 Suşunun Liamocin Üretimi Üzerine Etkilerinin Araştırılmasına İlişkin Sonuçlar

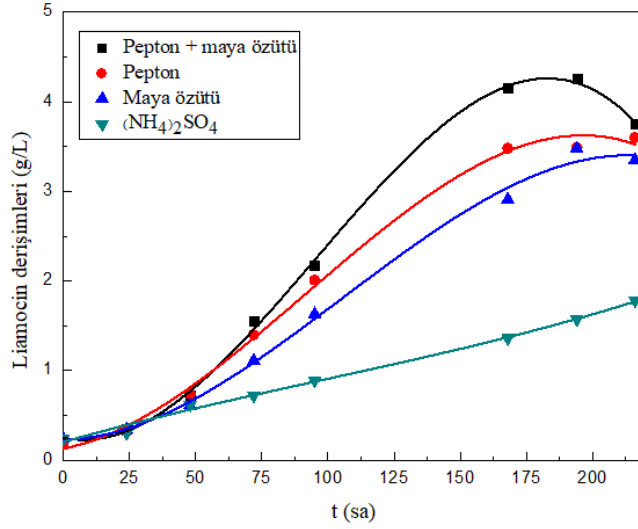
Farklı azot kaynaklarının fermantasyon ortamında kullanılmasının, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı deneylerde, organik ve inorganik olmak üzere üç farklı azot kaynağı denenmiştir (bkz. Çizelge 3.3) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı azot kaynaklarıyla gerçekleştirilen deneylerde fermantasyon sırasında kültür ortamlarına ait görsel

Bu deneylerde inorganik azot kaynağı olarak  $(NH_4)_2SO_4$ , organik azot kaynakları olarak ise; pepton ve maya özütü kullanılmıştır. Bu deneyler için *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç aşılama derişimi  $7.3 \times 10^7$  kob/mL olarak saptanmıştır.

Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100713 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri, Şekil 4.12’de verilmiştir.



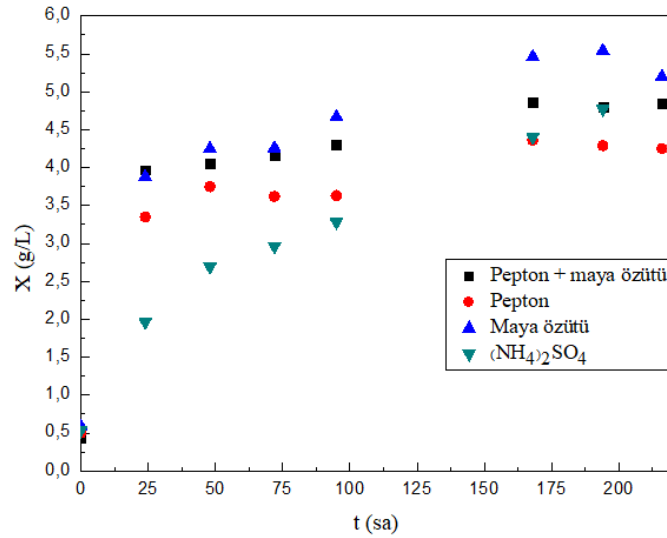
Şekil 4.12. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.12 incelendiğinde; fermantasyon ortamlarında organik azot kaynaklarından ikisinin kombinasyonunu içeren; pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldığı deneyde, en yüksek liamocin derişimi değeri olan 4.26 g/L'ye, 194. saatte ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, azot kaynağı olarak peptonun ve maya özütünün ayrı ayrı kullanıldığı deneylerde elde edilen en yüksek liamocin derişimleri sırası ile; 3.60 ve 3.48 g/L olarak fermantasyonun 216 ve 194. saatlerinde tayin edilmiştir. Fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak sadece inorganik bir azot kaynağı olan; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak gerçekleştirilen denemede ise, en yüksek liamocin derişimine (1.78 g/L) fermantasyonun 216. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Ortamdaki azot kaynağındaki türünün, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, en yüksek liamocin derişimine pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldığı denemede ulaşıldığı, bunu sırası ile; pepton, maya özütü ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'nin tek başlarına azot kaynağı olarak kullanıldıkları denemelerinin izledikleri saptanmıştır.

Bu deneye ait biyokütle (X) derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Fermantasyon ortamlarında çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

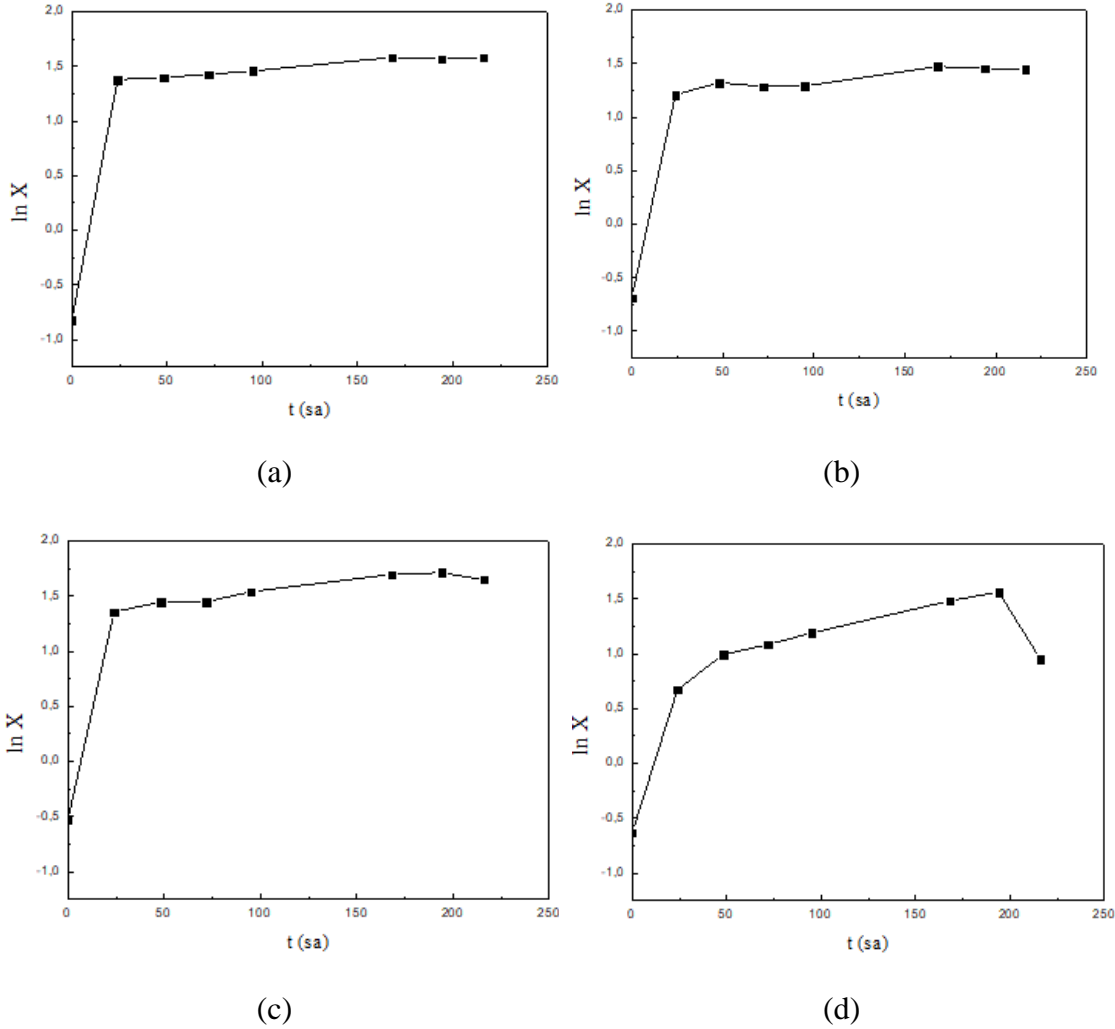
Söz konusu grafik incelendiğinde; en yüksek biyokütle derişimine (5.54 g/L); yalnızca maya özütünün fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak kullanıldığı denemede, fermantasyonun 194. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir. Fermantasyon ortamlarında azot kaynağı olarak pepton ve maya özütü kombinasyonu ve yalnızca peptonun kullanıldığı deneylerde, en yüksek biyokütle derişimleri sırası ile; 4.87 g/L ve 4.36 g/L olarak, fermantasyonun 168. saatinde elde edilmiştir. Azot kaynağı olarak tek başına (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ın kullanıldığı fermantasyon ortamında ulaşılan en yüksek biyokütle derişimi ise; 4.77 g/L olarak fermantasyonun 194. saatinde tespit edilmiştir.

*A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkilerinin araştırıldığı bu denemelerde ayrıca, fermantasyon ortamlarında kullanılan farklı azot kaynaklarının çalışılan suşun özgül üreme hızına olan etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla, biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılmıştır. ln X değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikler Şekil 4.14'te sunulmuştur.

Bu grafiklerde gösterilen ln X değerleri kullanılarak üssel üreme bölgelerindeki mikroorganizma özgül üreme hızları hesaplanmıştır. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun üssel bölgedeki özgül üreme hızı ( $\mu$ ), azot kaynağı olarak pepton ve maya özütü kombinasyonunun kullanıldığı fermantasyon ortamında; 0.025 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır.



Azot kaynağı olarak pepton, maya özütü ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın ayrı ayrı kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki mikroorganizma özgül üreme hızı değerleri sırasıyla; 0.0187, 0.0223 ve 0.029  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

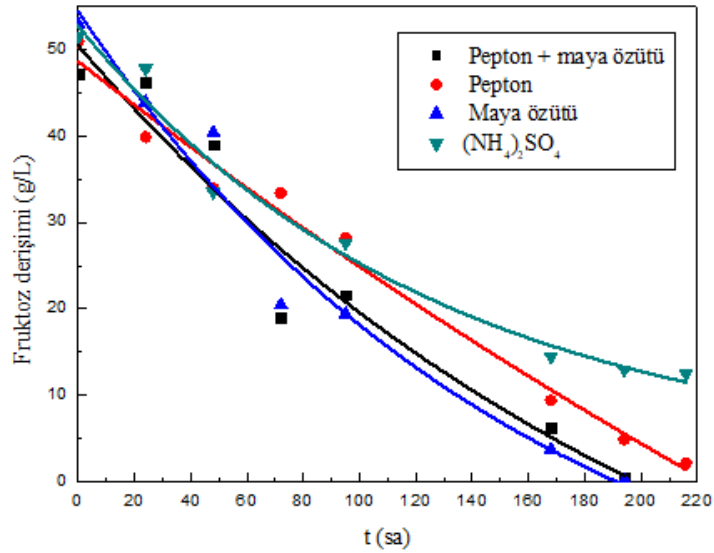


Şekil 4.14. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun farklı azot kaynakları içeren fermantasyon ortamlarındaki biyokütle derişimlerinin  $\ln$  değerlerinin zamanla değişimleri. (a): Pepton ve maya özütü, (b): Pepton, (c): Maya özütü ve (d):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Bu deneylerde ayrıca, çalışılan *A. pullulans* NBRC 100716 suşu için, en yüksek özgül liamocin oluşum hızı değerleri ( $q_p$ ) de saptanmıştır. Bu amaçla; Şekil 4.12'deki liamocin derişiminin zamanla değişimini gösteren grafikler kullanılarak, farklı zamanlara karşılık gelen eğim değerleri hesaplanmış ve bu değerler, Şekil 4.13'teki aynı zamana karşılık gelen biyokütle derişimlerine bölünerek, özgül ürün oluşum hızları hesaplanmıştır. Bu değerler arasında en yüksek olan belirlenerek, en yüksek özgül liamocin oluşum hızı değerleri saptanmıştır.

Bu değerler; pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldığı deneme için 0.0090; pepton, maya özütü ve  $(NH_4)_2SO_4$  kullanılan deneyler için sırasıyla; 0.0084, 0.0048, 0.0032 g liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. Azot kaynağı olarak pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldığı denemede en yüksek özgül ürün oluşum hızına; fermantasyonun 72. saatinde, yalnızca pepton kullanılan denemede ise fermantasyonun 48. saatinde ulaşıldığı belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak yalnızca maya özütü ve yalnızca  $(NH_4)_2SO_4$ 'ın kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki en yüksek özgül ürün oluşum hızlarına ise sırası ile; 106 ve 168. saatlerde ulaşıldığı bulunmuştur.

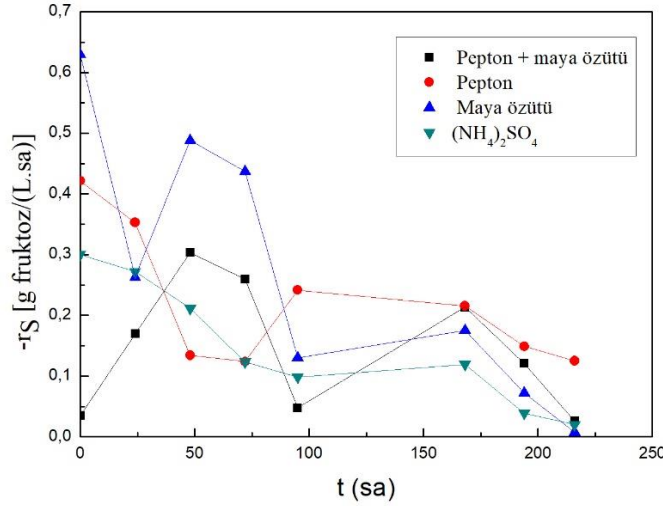
Çeşitli azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretiminde, bu ortamlardaki fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynaklarının kullanıldığı denemelerde fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.15'deki grafik incelendiğinde fruktozun, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldıkları ve maya özütünün tek başına kullanıldığı denemelerde, mikroorganizma tarafından 194. saatte tamamen tüketildiği belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak yalnızca pepton kullanılan denemede; fruktozun mikroorganizma tarafından 216. saatte tüketildiği, yalnızca  $(NH_4)_2SO_4$  kullanılan besiyerinde ise; fruktozun bir kısmının (12.52 g/L) tükenmeden kaldığı belirlenmiştir.

Bu deneylerde ayrıca, farklı azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarındaki substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri de incelenmiş ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Fermantasyon ortamlarında farklı azot kaynaklarının kullanıldığı deneylerde fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Azot kaynağı olarak pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldığı fermantasyon ortamdaki en yüksek fruktoz tüketim hızı; 0.30 g fruktoz/(L.sa) olarak fermantasyonun 48. saatinde elde edilmiştir. Pepton, maya özütü ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ın ayrı ayrı kullanıldığı deneylerde ise; en yüksek fruktoz tüketim hızlarına; fermantasyonun başlangıcında ulaşılmıştır ve bu değerler sırası ile; 0.42, 0.63 ve 0.30 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.

Fermantasyon ortamında kullanılan farklı azot kaynaklarının, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerden elde edilen bazı sonuçlar Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Çizelge 4.3 incelendiğinde; bu çalışmadaki en yüksek liamocin derişimi ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerlerine, azot kaynakları olarak pepton ve maya özütünün birlikte kullanıldığı 1 numaralı fermantasyon ortamında ulaşıldığı belirlenmiştir.

En yüksek biyokütle derişimi, yalnızca maya özütünün azot kaynağı olarak kullanıldığı; 3 numaralı deneyde elde edilmiştir. İnorganik bir azot türü olan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ın, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak tek başına kullanıldığı 4 numaralı denemede, en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı değerine ulaşıldığı tespit

edilmiştir. Fermantasyon ortamında substrat olarak kullanılan fruktoz tüketim hızının en yüksek olduğu deneme ise; azot kaynağı olarak yalnızca maya özütünün kullanıldığı 3 numaralı ortamda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimine farklı azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği deneylerde elde edilen en yüksek liamocin ve biyokütle derişimleri ile mikroorganizma özgül üreme ve en yüksek ürün oluşum hızları ve en yüksek substrat tüketim hızı değerleri

Fermantasyon ortamı	Fermantasyon ortamında kullanılan azot kaynakları	En yüksek liamocin derişimi (g/L)	En yüksek biyokütle derişimi (g/L)	Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	En yüksek özgül ürün oluşum hızı [g liamocin / (g mo.sa)]	En yüksek substrat tüketim hızı [g substrat / (L.sa)]
1	Maya özütü + Pepton	4.26	4.87	0.0250	0.0090	0.30
2	Pepton	3.60	4.36	0.0187	0.0084	0.42
3	Maya özütü	3.48	5.54	0.0223	0.0048	0.63
4	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.78	4.77	0.0290	0.0032	0.30

Bu araştırmadaki en yüksek liamocin derişimine ve en yüksek özgül ürün oluşum hızı değerine, fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak pepton ve maya özütünün birlikte kullandıkları 1 numaralı denemede ulaşıldığı için; deneylerin bundan sonraki aşamalarında bu azot kaynağı kombinasyonu kullanılmıştır.

Literatürde, çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimleri üzerine, yalnızca azot kaynaklarının etkilerinin incelendiği, fermantasyon ortamındaki diğer bileşenlerin derişimlerinin sabit tutulduğu bir başka araştırmaya rastlanmamıştır.

Literatürde yer alan ve çeşitli *A. pullulans* suşlarının liamocin üretimlerinin incelendiği birçok araştırmada kullanılan fermantasyon ortamlarının; azot kaynağı olarak yalnızca organik azot kaynaklarından ikisini (maya özütü ve pepton) içeren, inorganik azot kaynağı içermeyen ortamlar olduğu görülmektedir. Fermantasyon ortamında azot kaynağı olarak maya özütü ve peptonun birlikte kullanıldığı bu araştırmalardaki

deneylerde, çalışılan *A. pullulans* suşları tarafından üretilen liamocin derişimlerinin; 0.5-6.0 g/L aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Manitchotpisit ve ark., 2011; Price ve ark., 2017).

Leathers ve ark. (2015) tarafından geręekleřtirilen bir araştırmada; azot kaynağı olarak maya özütü ve pepton kullanılan fermantasyon ortamının yanında; inorganik azot kaynaklarından ikisini ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ) düşük derişimlerde içeren bir ortam da kullanıldığı rapor edilmiştir. Söz konusu ęalıřmada; fermantasyon ortamında maya özütü ve peptonun birlikte kullanıldığı denemede, *A. pullulans* NRRL 50384 suşu tarafından üretilen en yüksek liamocin derişimi; 8.0 g/L olarak rapor edilirken, ęalıřılan diğer beş suşun ürettikleri liamocin derişimlerinin 1.8-3.3 g/L aralığında değiştikleri rapor edilmiştir. Yine aynı ęalıřmada; azot kaynağı olarak  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{KNO}_3$  kullanılan fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek liamocin derişiminin; 4.8 g/L olarak, *A. pullulans* NRRL 50384 suşu tarafından üretildiği ve diğer suşlar için elde edilen en yüksek liamocin derişimlerinin ise; 0.3-1.7 g/L aralığında değiştiği ifade edilmiştir. Anılan ęalıřmada ayrıca; azot kaynağı olarak sadece L-asparagine içeren bir fermantasyon ortamı da kullanılmıştır. Bu fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek liamocin derişimi de; 1.7 g/L olarak rapor edilmiştir. Söz konusu ęalıřmada; Wang ve ark. (2014) tarafından önerilen ve azot kaynağı olarak maya özütü ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın bir arada kullanıldığı fermantasyon ortamında elde edilen en yüksek liamocin derişimi ise 1.9 g/L olarak rapor edilmiştir.

#### **4.4. *A. pullulans* NBRC 100716 Suşu ile Liamocin Üretiminin Optimizasyonu İçin Deney Tasarım Planının Oluşturulmasına İlişkin Sonuçlar**

Bu tez ęalıřmasında, farklı fermantasyon parametrelerinin *A. pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretimine olan etkileri araştırılarak, liamocin üretimi için optimum fermantasyon koşulların belirlenebilmesi amacıyla, Design Expert<sup>®</sup>12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılarak, dönüşümlü merkezi tasarım yöntemine göre bir deney tasarım planı oluşturulmuştur. Bu amaçla; seçilen bağımsız ve bağımlı değişkenler ve bu değişkenlerin her biri için belirlenen hedefler, minimum ve maksimum değerler daha önce verilen ęizelge 3.7'de belirtilmiştir.

Dönüşümlü merkezi tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney tasarım planında, bağımsız değişkenlerin beş farklı seviyedeki değerlerinin ęeřitli kombinasyonları ile oluşturulan deneysel koşullar ve bu koşullardaki bağımsız değişkenlere ait geręek ve

kodlanmış değerler sırasıyla; Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te verilmiştir. Oluşturulan tasarım planına göre deneyler, merkez noktada aynı koşullarda gerçekleştirilen 6 paralel deney, yıldız ve faktöriyel noktalarda ise 14 farklı kombinasyon deneyi olmak üzere; toplam 20 deney olarak yapılmıştır.

Çizelge 4.4. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde, seçilen bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri

Deney no	X1 (g/L)	X2	X3 (°C)
1	150.00	5.0	28.0
2	129.73	3.8	30.4
3	129.73	6.2	25.6
4	100.00	5.0	28.0
5	70.27	3.8	30.4
6	100.00	5.0	28.0
7	129.73	6.2	30.4
8	100.00	5.0	28.0
9	50.00	5.0	28.0
10	100.00	5.0	24.0
11	129.73	3.8	25.6
12	100.00	5.0	32.0
13	70.27	6.2	30.4
14	100.00	5.0	28.0
15	100.00	7.0	28.0
16	100.00	5.0	28.0
17	100.00	5.0	28.0
18	100.00	3.0	28.0
19	70.27	3.8	25.6
20	70.27	6.2	25.6

X1 = Fruktoz başlangıç derişimi, g/L; X2 = pH; X3 = Sıcaklık, °C

Çizelge 4.5. Merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak planlanan deneylerde seçilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri

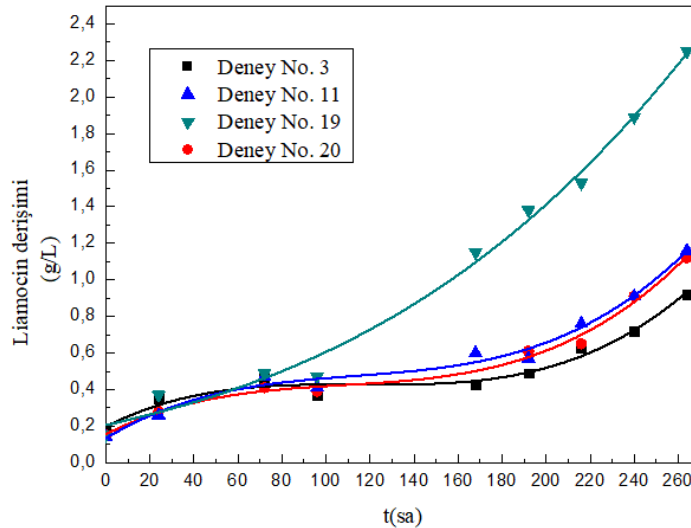
Deney no	X1 (g/L)	X2	X3 (°C)
1	+1.68	0	0
2	+1	-1	+1
3	+1	+1	-1
4	0	0	0
5	-1	-1	+1
6	0	0	0
7	+1	+1	+1
8	0	0	0
9	-1.68	0	0
10	0	0	-1.68
11	+1	-1	-1
12	0	0	+1.68
13	-1	+1	+1
14	0	0	0
15	0	+1.68	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	-1.68	0
19	-1	-1	-1
20	-1	+1	-1

X1 = Fruktöz başlangıç derişimi, g/L; X2 = pH; X3 = Sıcaklık, °C

Söz konusu deneyler gerçekleştirilirken, fermantasyon ortamlarının seçilen fruktoz başlangıç derişimleri 50-150 g/L aralığında değiştirilirken, başlangıç pH değeri; 3-7 ve ortam sıcaklığı ise; 24-32°C aralığında değiştirilmiştir.

Gerçekleştirilen deneyler için *A. pullulans* NBRC 100716 suşu, Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde aktifleştirilmiş ve fermantasyon ortamlarına ayrı ayrı inoküle edilmiştir. Deneylerde *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişimlerinin;  $1.5 \times 10^7$ - $6.6 \times 10^7$  kob/mL aralığında değıştikleri belirlenmiştir. Deneylerde, fermantasyon süresince, her bir fermantasyon ortamından belirli zaman aralıklarında kültür örnekleri alınarak, bu örneklerdeki liamocin, biyokütle ve substrat derişimleri analiz edilmiş ve her birinin zamanla değışimlerini gösteren grafikler çizilmiştir. Çizilen bu grafiklerden yararlanılarak, her bir deney için yanıt değışkenleri olan; maksimum liamocin ve biyokütle derişimleri ile, maksimum özgül liamocin oluşum hızları hesaplanmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak; Çizelge 4.4’teki deney tasarım planında verilmiş olan, 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. 3 ve 11 numaralı deneylerdeki fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimleri; 129.73; 19 ve 20 numaralı deneylerde ise 70.27 g/L’dir. Fermantasyon ortamı başlangıç pH’ı bu deneyler için 3.8 veya 6.2 olarak değışmektedir. Bu gruptaki deneyler, 25.6 °C’de gerçekleştirilmişler ve *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç derişimi ise;  $4.0 \times 10^7$  kob/mL olarak tespit edilmiştir. 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneyler için üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafik, Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



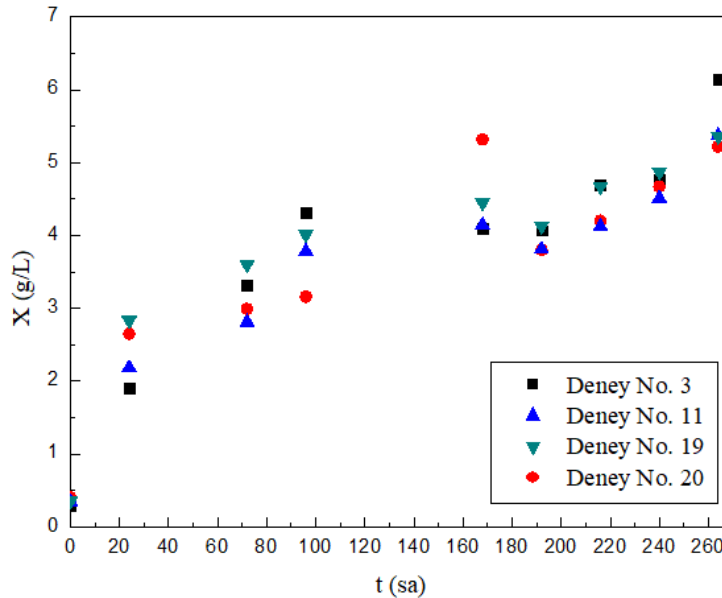
Şekil 4.17. 25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değışimleri



Şekil 4.17 incelendiğinde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen en yüksek liamocin derişiminin 2.25 g/L olarak 19 numaralı deneyde, fermantasyonun 264. saatinde elde edildiği belirlenmiştir. Bu grupta çalışılan tüm deneylerde, liamocin derişimlerindeki artışın yaklaşık 72. saate kadar benzer bir eğilim gösterdikleri, fermantasyonun ilerleyen saatlerinde ise, 19 numaralı deney koşullarında üretilen liamocin derişiminin diğerlerine kıyasla hızlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

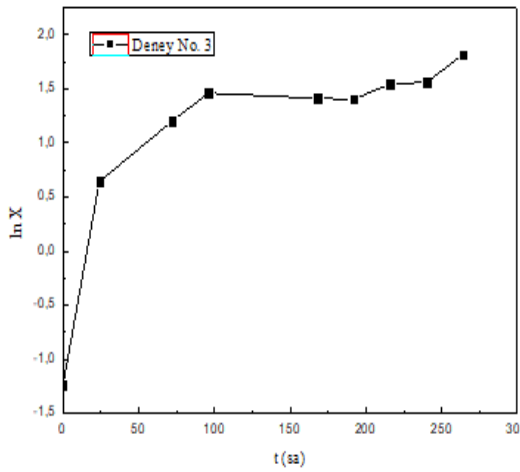
3, 11 ve 20 numaralı deneyler için de en yüksek liamocin derişimlerine 264. saatte ulaşıldığı ve bu değerlerin sırasıyla; 0.92, 1.16 ve 1.12 g/L oldukları saptanmıştır. Bu gruptaki deneylerde en yüksek liamocin derişimine; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin 70.27 g/L, başlangıç pH değerinin 3.8 ve sıcaklığın 25.6°C olduğu 19 numaralı deneyde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

3, 11, 19 ve 20 numaralı deney koşullarına ait, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri; Şekil 4.18’de verilmektedir. Bu gruba ait deneylerde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna ait en yüksek biyokütle derişimi, fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin 129.73 g/L, pH’ın 6.2 ve sıcaklığın 25.6°C olduğu 3 numaralı deneyde; 6.14 g/L olarak fermantasyonun sonunda saptanmıştır. 11, 19 ve 20 numaralı deneylerdeki en yüksek biyokütle derişimleri de sırası ile; 5.37, 5.36 ve 5.32 g/L (264. saat) olarak birbirlerine yakın değerlerde bulunmuşlardır.

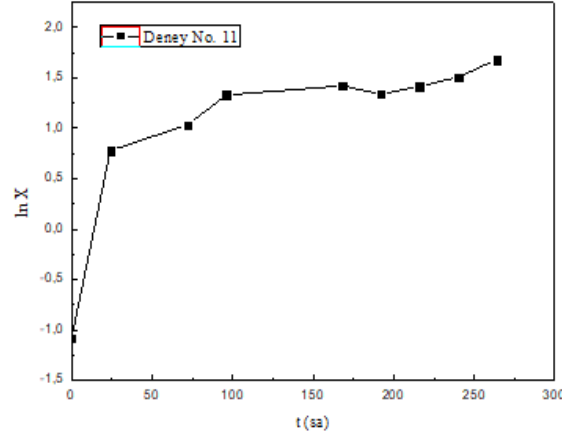


Şekil 4.18. 25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11 19 ve 20 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

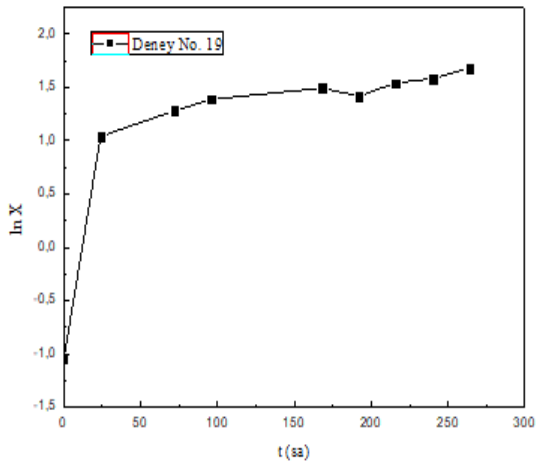
Çalışmanın bu aşamasında ayrıca, her deney için elde edilen kuru hücre ağırlıklarından hesaplanan  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler oluşturulmuş ve bunlardan yararlanılarak, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır (Şekil 4.19).



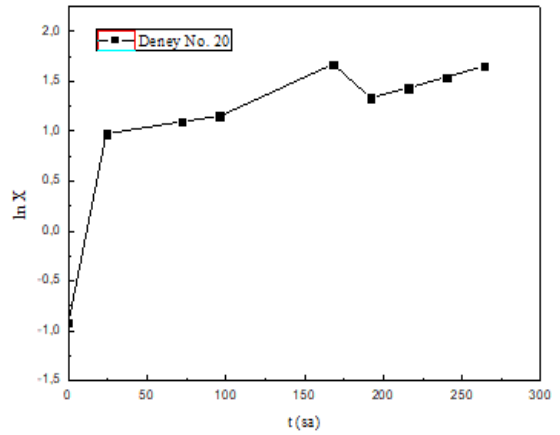
(a)



(b)



(c)



(d)

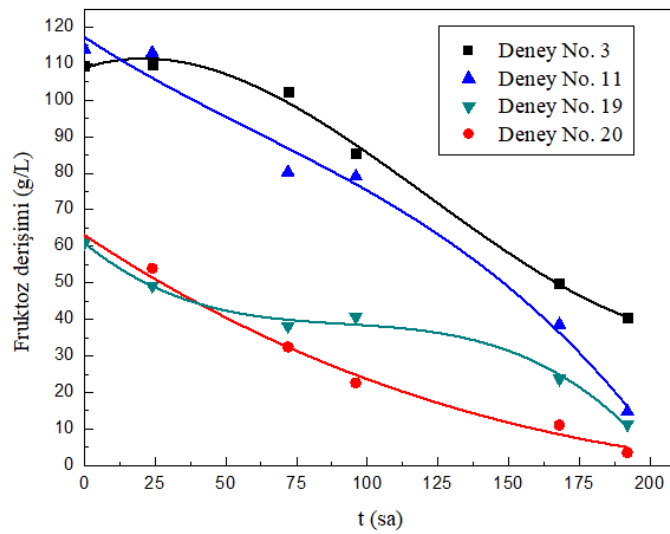
Şekil 4.19. 25.6 °C’de gerçekleştirilen (a): 3, (b): 11, (c): 19 ve (d): 20 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

25.6°C’de gerçekleştirilmiş olan deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ); 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.035, 0.029, 0.028 ve 0.053  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

Bu değerler incelendiğinde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna ait en yüksek özgül üreme hızına fruktoz başlangıç derişiminin 70.27 g/L ve başlangıç pH'nın 6.2 olduğu, 20 numaralı deney koşullarında ulaşıldığı saptanmıştır.

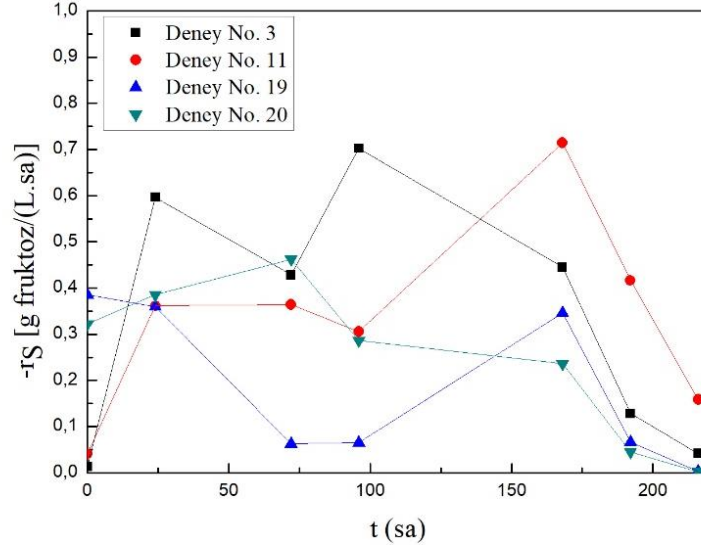
Bu çalışmada ayrıca; Şekil 4.17'deki liamocin ve Şekil 4.18'deki biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, en yüksek özgül ürün oluşum hızları (qp) da hesaplanmıştır. En yüksek özgül liamocin oluşum hızları 3 ve 20 numaralı deneyler için; 0.0020 g liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanırken, 11 ve 19 numaralı deneyler için ise sırasıyla; 0.0015 ve 0.0032; liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanmışlardır. Bu gruptaki deneyler arasında, en yüksek özgül ürün oluşum değerine, en yüksek liamocin derişiminin de elde edildiği, fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişiminin 70.27 g/L, başlangıç pH değerinin 3.8 ve sıcaklığın 25.6°C olduğu 19 numaralı deneyde ulaşıldığı saptanmıştır.

3, 11, 19 ve 20 numaralı deneylerdeki; fermantasyon ortamındaki fruktozun zamanla değişimini gösteren grafik incelendiğinde (Şekil 4.20); fruktoz başlangıç derişiminin; 129.73 g/L, başlangıç pH'nın; 6.2 olduğu 3 numaralı deneyde, ortamdaki fruktozun büyük bir kısmının tüketilmeden kaldığı belirlenirken, 11 ve 19 numaralı deneylerde fruktozun önemli ölçüde tüketilmekle birlikte ortamda, tüketilmeden kalan bir miktarın da olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortamında 70 g/L fruktoz içeren ve başlangıç pH'ı 6.2 olan 20 numaralı deneyde ise, 192. saatin sonunda ortamdaki fruktozun tamamına yakınının tüketildiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. 25.6 °C'de gerçekleştirilen 3, 11 19 ve 20 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Bu çalışmada; 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneylerde kullanılan ve substrat olarak fruktoz içeren fermantasyon ortamlarında substrat tüketim hızları da hesaplanmış ve substrat tüketim hızlarının zamanla değişimleri Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



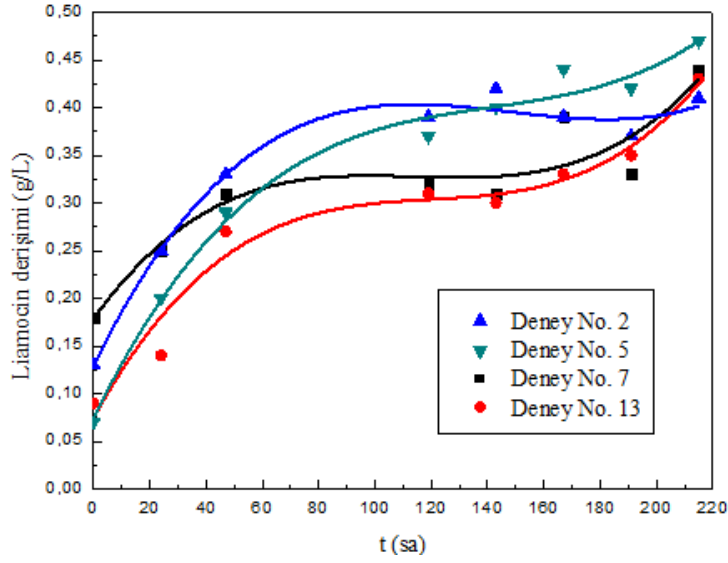
Şekil 4.21. 25.6 °C’de gerçekleştirilen 3, 11, 19 ve 20 numaralı deneylerde, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Bu gruptaki deneyler arasındaki en yüksek substrat tüketim hızlarına; 3 ve 11 numaralı deneylerde ulaşılmıştır. 3 numaralı deney için en yüksek substrat tüketim hızı; 0.703 g fruktoz/(L.sa) olarak fermantasyonun 96. saatinde hesaplanırken; 11 numaralı deney için ise bu değer; 0.714 g fruktoz/(L.sa) olarak fermantasyonun 168. saatinde hesaplanmıştır. 19 numaralı deney koşullarında en yüksek substrat tüketim hızı, fermantasyonun başlangıcında; 0.385 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanırken; 20 numaralı deney koşullarında ise; 0.462 olarak fermantasyonun 72. saatinde belirlenmiştir.

Bu çalışmada daha sonra; deney tasarım planında yer alan 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu grupta yer alan tüm deneyler için sıcaklık 30.4°C ve fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi 129.73 veya 70.27 g/L, başlangıç pH’ı ise 6.2 veya 3.8’dir. Bu gruptaki deneylerde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi;  $6.6 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

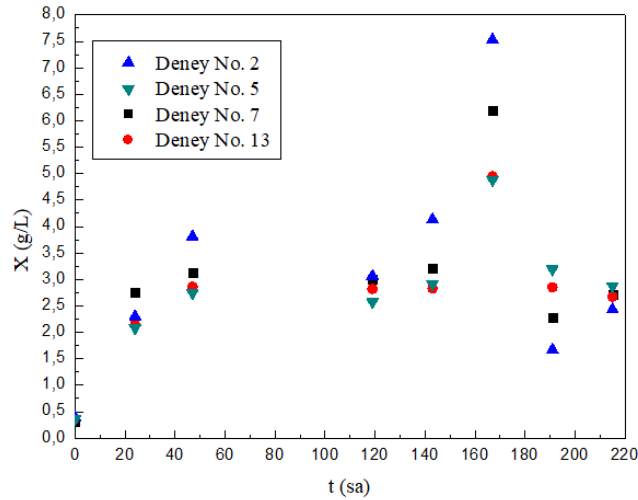
2, 5, 7 ve 13 numaralı deneyler için, liamocin derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.22’de verilmiştir. Şekil 4.22 incelendiğinde; bu gruptaki deneyler arasında, elde edilen en yüksek liamocin derişiminin (0.47 g/L); 5 numaralı deney koşullarında, fermantasyonun 215. saatinde elde edildiği saptanmıştır. 2 numaralı deneyde en yüksek liamocin derişimi; 0.42 g/L olarak, fermantasyonun 143. saatinde

belirlenmiştir. 7 ve 13 numaralı deneylerde ise; en yüksek liamocin derişimleri; 0.44 ve 0.43 g/L olarak fermantasyonun 215. saatinde saptanmışlardır.



Şekil 4.22. 30.4°C'de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri

2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.23'te verilmiştir.

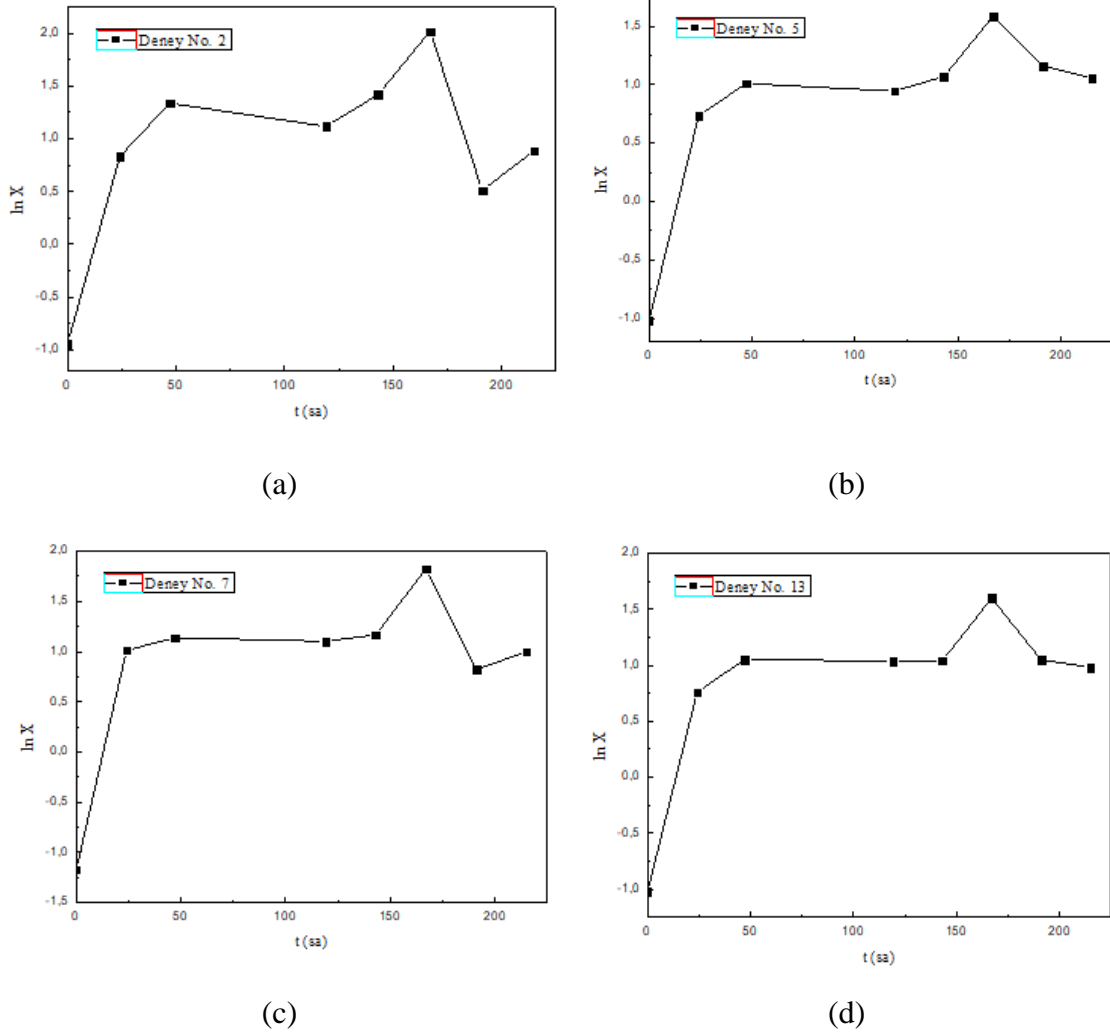


Şekil 4.23. 30.4°C'de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde elde edilen en yüksek biyokütle derişimleri fermantasyonun 167. saatinde sırasıyla; 7.53, 4.88, 6.20 ve 4.95 g/L olarak tespit

edilmiştir. 30.4°C’de gerçekleştirilen deneylerde en yüksek biyokütle derişimine; fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin 129.73 g/L, başlangıç pH’ının 3.8 olduğu; 2 numaralı deney koşullarında ulaşıldığı saptanmıştır.

Çalışmanın bu bölümünde ayrıca;  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafiklerden yararlanılarak, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme hızları da hesaplanmıştır (Şekil 4.24).



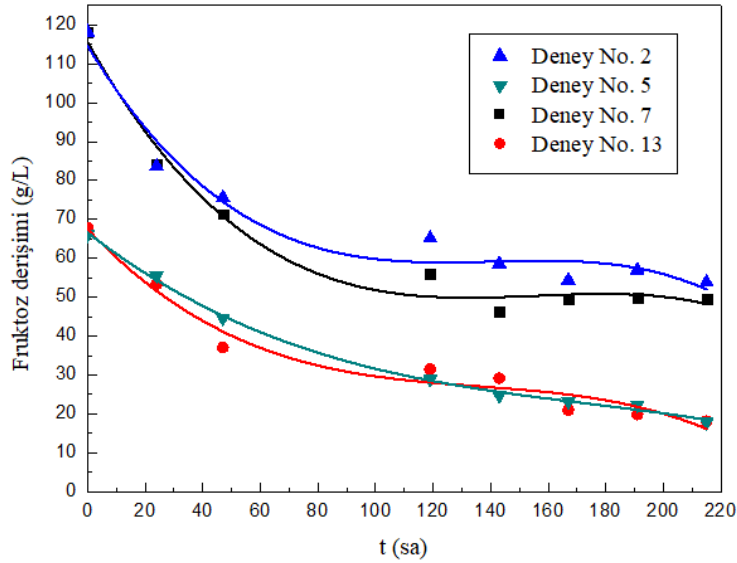
Şekil 4.24. 30.4°C’de gerçekleştirilen (a): 2, (b): 5, (c): 7 ve (d): 13 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

*A. pullulans* NBRC 100716 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları ( $\mu$ ); 2, 5 ve 7 numaralı deneyler için sırasıyla, 0.058, 0.053 ve 0.060  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

13 numaralı deney için ise özgül üreme hızı  $0.078 \text{ sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır ve bu gruptaki deneyler arasında hesaplanan en yüksek özgül üreme hızı değerinin; fruktoz başlangıç derişiminin  $70.27 \text{ g/L}$ , pH'ın  $6.2$  ve sıcaklığın  $30.4^\circ\text{C}$  olduğu 13 numaralı deneye ait olduğu belirlenmiştir.

Bu aşamada, liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23) yararlanılarak; en yüksek özgül ürün oluşum hızı (qp) değerleri de hesaplanmıştır. 2 ve 5 numaralı deneylerin her ikisi için de; özgül liamocin oluşum hızları;  $0.0020 \text{ g liamocin/(g mo.sa)}$  olarak hesaplanmıştır. 2 numaralı deneyde en yüksek özgül liamocin oluşum hızına fermantasyonun 14. saatinde ulaşılırken; 5 numaralı deneyde ise, fermantasyonun 26. saatinde ulaşılmıştır. 7 ve 13 numaralı deneylerdeki en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla;  $0.0011$  ve  $0.0017 \text{ g liamocin/(g mo.sa)}$  olarak; fermantasyonların 24. saatinde hesaplanmıştır.

$30.4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneyler için, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişimlerinin, zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.25'te sunulmaktadır.

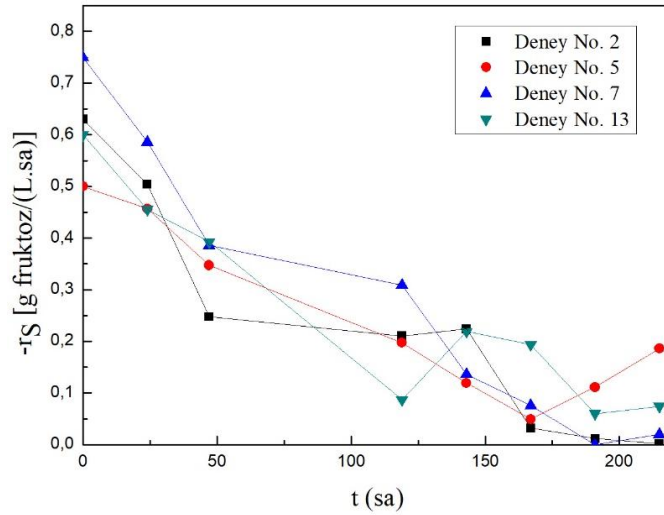


Şekil 4.25.  $30.4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.25 incelendiğinde; bu gruptaki tüm deneyler için, fermantasyonun 143. saatine kadar fruktoz derişimlerinde azalmalar olduğu, bu saatten sonra ise derişimlerin çok fazla değişmedikleri tespit edilmiştir.

Fruktoz başlangıç derişimi 129.73 g/L; pH değerleri sırasıyla 3.8 ve 6. 2 olan 2 ve 7 numaralı deneyler için; fermantasyonun 215. saatinde ortamda tüketilmeden kalan fruktoz derişimleri sırasıyla; 53.80 ve 49.44 g/L olarak saptanmıştır. 5 ve 13 numaralı deney koşullarında ise; fermantasyonun 215. saatinde ortamda tüketilmeden kalan fruktoz miktarları sırasıyla; 17.83 ve 18.09 g/L olarak belirlenmiştir.

Bu aşamada ilgili deney koşulları için *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun fruktoz tüketim hızları da hesaplanmış ve fermantasyon ortamlarındaki fruktoz tüketim hızı değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.26'da gösterilmiştir.

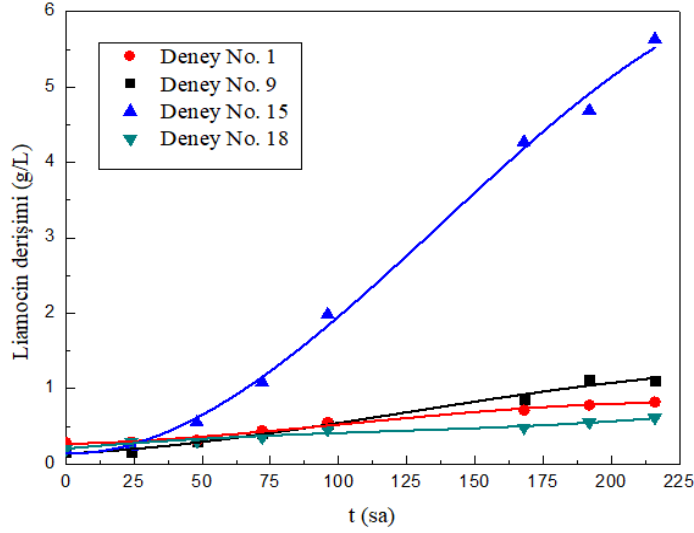


Şekil 4.26. 30.4°C'de gerçekleştirilen 2, 5, 7 ve 13 numaralı deneylerdeki fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

Bu deneyler için en yüksek fruktoz tüketim hızı; 0.75 g fruktoz/(L.sa) olarak fermantasyonun başlangıcında, 7 numaralı deneyde elde edilmiştir. 2, 5 ve 13 numaralı deneylerde, en yüksek substrat tüketim hızları ise sırasıyla; 0.63, 0.50 ve 0.60 g fruktoz/(L.sa) olarak belirlenmiştir. Bu gruptaki deneylerin tamamında, en yüksek fruktoz tüketim hızlarına fermantasyonun başlangıcında ulaşılmıştır.

Bu araştırmada daha sonra; deney tasarım planında yer alan 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneyler gerçekleştirilmiştir. 28°C'de gerçekleştirilen bu deneylerde fruktoz başlangıç derişimleri 50, 100 veya 150 g/L, başlangıç pH'ları 3, 5 veya 7'dir. Bu deneylerdeki *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi ise;  $6.0 \times 10^7$  kob/mL olarak tayin edilmiştir. Şekil 4.27'de, söz konusu deney koşullarında elde edilen liamocin derişimlerinin, zamanla değişimleri verilmiştir.

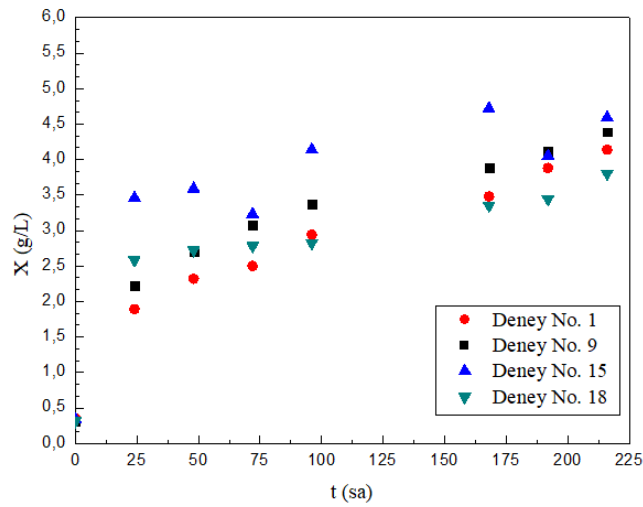




Şekil 4.27. 28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri

28°C’de gerçekleştirilmiş olan bu deneylerde en yüksek liamocin derişimi; 5.63 g/L olarak (216. saat), fruktoz derişiminin; 100 g/L ve pH’ın 7 olduğu, 15 numaralı deneyde belirlenmiştir. Bu grupta çalışılan 1, 9 ve 18 numaralı deneyler için en yüksek liamocin derişimleri ise sırasıyla; 0.82, 1.12 ve 0.61 g/L olarak belirlenmiştir. 1 ve 18 numaralı deneylerde en yüksek liamocin derişimine 216. saatte ulaşılırken; 9 numaralı deneyde fermantasyonun 192. saatinde ulaşıldığı tespit edilmiştir.

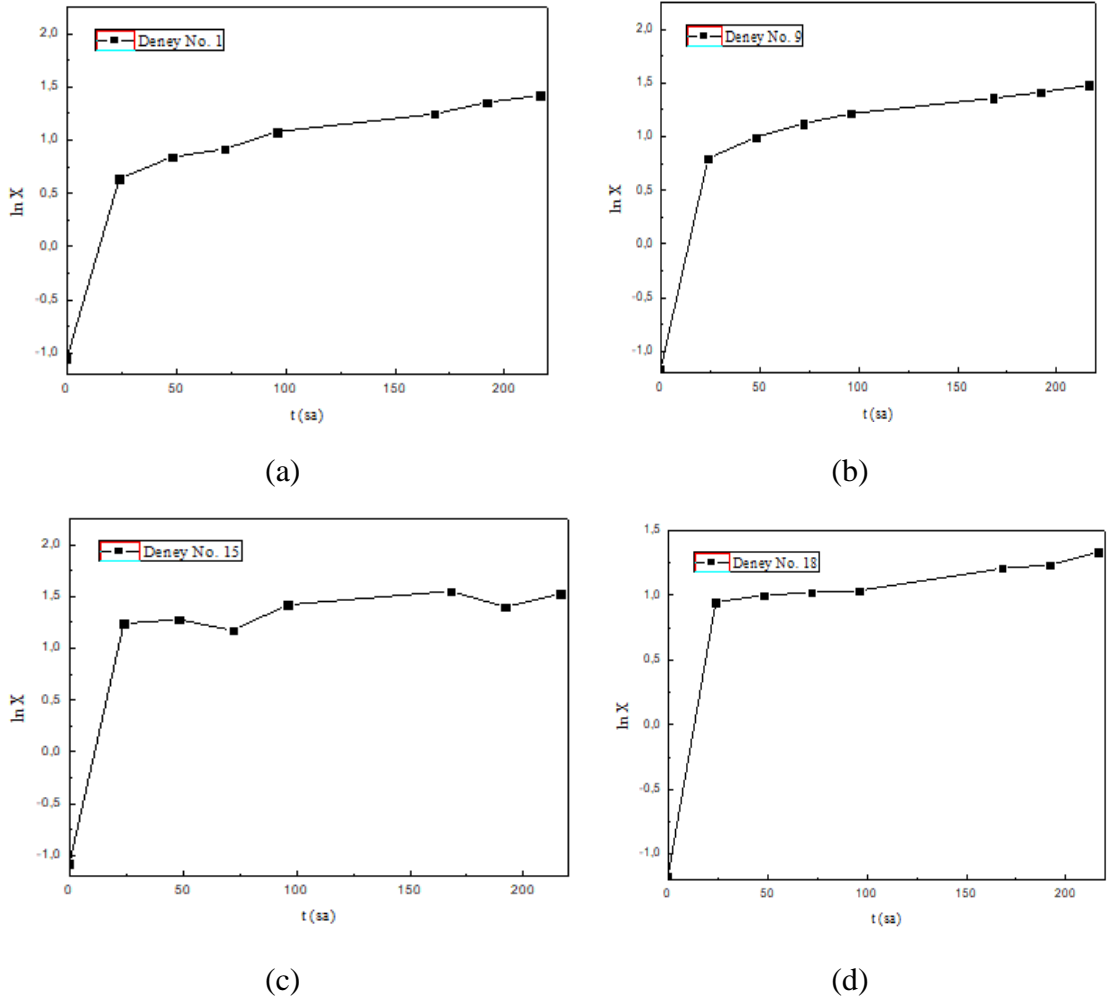
1, 9, 15 ve 18 numaralı deneyler için, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.28’de sunulmuştur.



Şekil 4.28. 28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde *A. pullulans* NBRC suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

En yüksek liamocin derişiminde olduğu gibi, en yüksek biyokütle derişimi de; 4.72 g/L olarak fermantasyonun 168. saatinde 15 numaralı deney koşullarında elde edilmiştir. 1, 9 ve 18 numaralı deneylerdeki en yüksek biyokütle derişimleri ise sırasıyla; 4.14, 4.39 ve 3.80 g/L olarak, fermantasyonun 216. saatinde tespit edilmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında da, belirtilen fermantasyon koşullarında *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme hızları,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikler oluşturularak, hesaplanmıştır (Şekil 4.29).



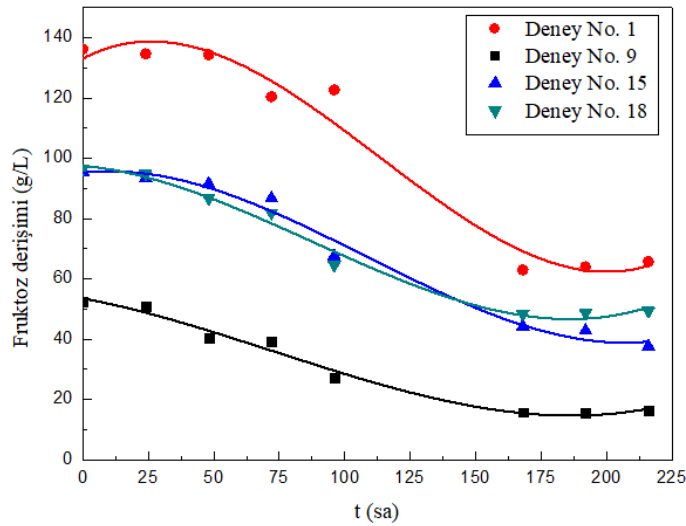
Şekil 4.29. 28°C’de gerçekleştirilen (a): 1, (b): 9, (c): 15 ve (d): 18 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

*A. pullulans* NBRC 100716 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.040, 0.054, 0.053 ve 0.033  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

28°C’de gerçekleştirilen bu gruptaki deneylerde, en yüksek özgül üreme hızı; fruktoz başlangıç derişiminin; 50 g/L, başlangıç pH’ının 5 olduğu 9 numaralı deneyde elde edilmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde de ayrıca söz konusu deneyler için; liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler kullanılarak, en yüksek özgül liamocin oluşum hızları da (qp) hesaplanmıştır. Bu deney grubunda en yüksek özgül liamocin oluşum hızı; 0.0063 g liamocin/(g mo.sa) olarak, 15 numaralı deney koşullarında tespit edilmiştir. 1, 9 ve 18 numaralı deneyler için ise en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0012, 0.0017 ve 0.0016 g liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanmışlardır.

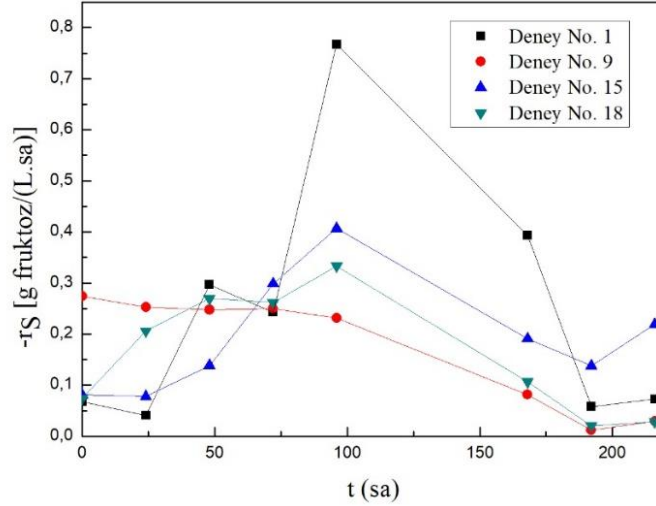
Bu gruptaki deneyler için, fermantasyon ortamında bulunan fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.30’da sunulmaktadır.



Şekil 4.30. 28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerdeki, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.30 incelendiğinde; bu gruptaki tüm deney koşullarında fermantasyon sonunda bir miktar fruktozun tüketilmeden ortamda kaldığı saptanmıştır. 28°C’de gerçekleştirilen bu deneylerden, 150 g/L fruktoz içeren, pH’ı 5 olan 1 numaralı deneyde 216. saatin sonunda ortamda kalan fruktozun 65.73 g/L olduğu tespit edilmiştir. 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde ortamda tüketilmeden kalan fruktoz derişimlerinin sırasıyla; 16.31, 37.58 ve 49.33 g/L olduğu tespit edilmiştir.

Bu aşamada, söz konusu deneyler için en yüksek substrat tüketim hızları da hesaplanmış ve hesaplanan substrat tüketim hızlarının zamanla değişimlerini içeren grafik; Şekil 4.31’de gösterilmiştir



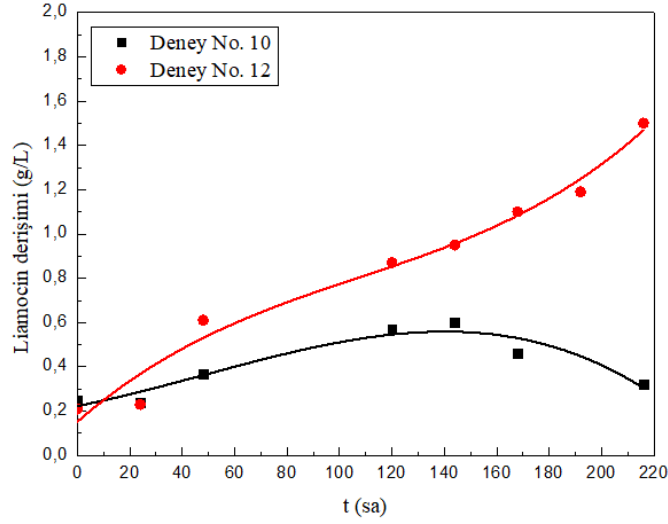
Şekil 4.31. 28°C’de gerçekleştirilen 1, 9, 15 ve 18 numaralı deneylerde fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

İlgili grafik incelendiğinde; 1, 15 ve 18 numaralı deneyler için en yüksek substrat tüketim hızlarına, fermantasyonun 96. saatinde ulaşıldığı ve bu değerlerin sırasıyla; 0.80, 0.40 ve 0.33 g fruktoz/(L.sa) olduğu tespit edilmiştir. 9 numaralı deney için ise en yüksek substrat tüketim hızı 0.27 g fruktoz/(L.sa) olarak fermantasyonun başlangıcında elde edilmiştir. 28°C’de gerçekleştirilen bu deneylerde, fruktoz başlangıç derişimi 150 g/L, başlangıç pH’ı 5 olan 1 numaralı deneyde en yüksek fruktoz tüketim hızı değerine ulaşıldığı belirlenmiştir.

Deneysel tasarım planında, 10 ve 12 numara ile gösterilen deneyler sırasıyla; 24 ve 32°C’de, 100 g/L fruktoz başlangıç derişiminde ve başlangıç pH’larının 5 olduğu işletme koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler için, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi ise;  $2.8 \times 10^7$  kob/mL olarak belirlenmiştir.

Bu deneyler için *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler; Şekil 4.32’de verilmiştir.

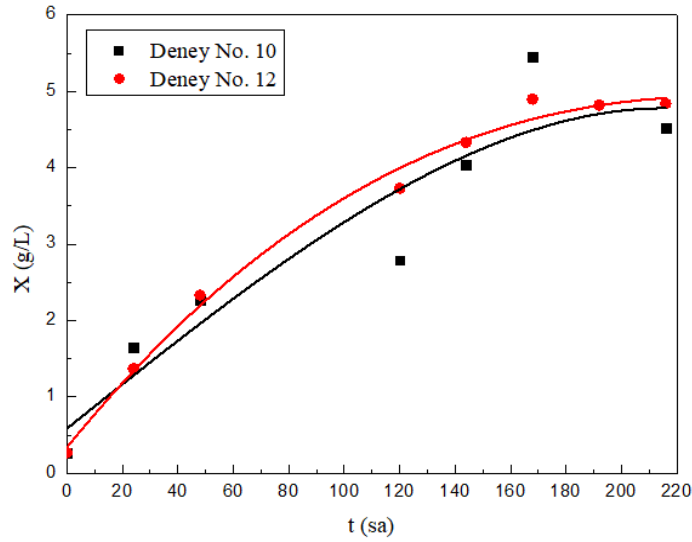
Deneysel tasarım planındaki en düşük ve en yüksek sıcaklıkların kullanıldığı, başlangıç substrat ve pH’ın ise aynı değerlerde olduğu, 10 ve 12 numaralı deneyler için elde edilmiş olan en yüksek liamocin derişimleri sırasıyla; 0.60 ve 1.50 g/L olarak, fermantasyonun 144 ve 216. saatlerinde elde edilmişlerdir.



Şekil 4.32. 24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değişimleri

Sıcaklığın 32°C olduğu 12 numaralı deneyde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretiminin, fermantasyon süresince, sıcaklığın 24°C olduğu 10 numaralı deneyden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

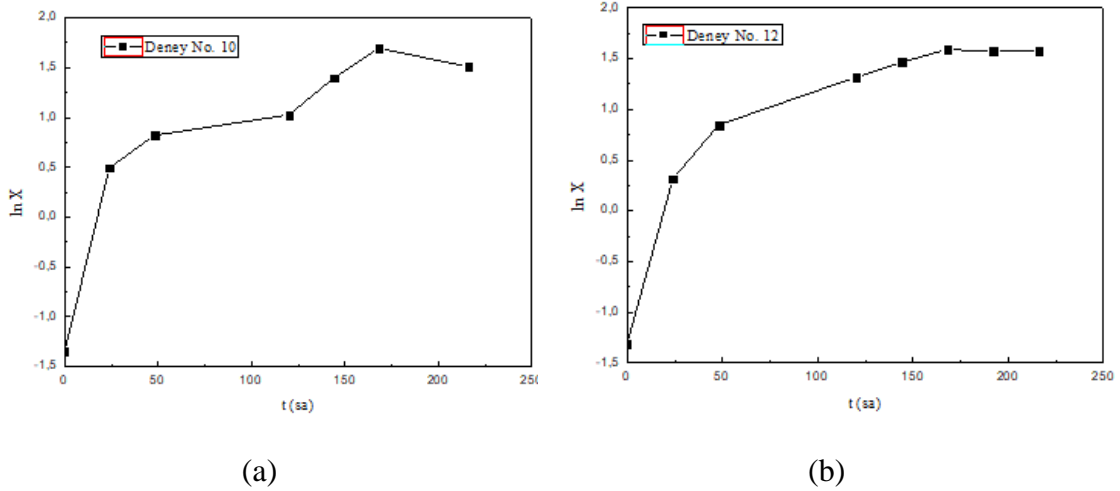
Bu deneyler için, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimini gösteren grafik; Şekil 4.33’te sunulmuştur.



Şekil 4.33. 24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimleri

10 ve 12 numaralı deneylerdeki en yüksek biyokütle derişimleri sırasıyla; 5.45 ve 4.90 g/L olarak fermantasyonun 168. saatinde elde edilmiştir.

Söz konusu deneyler için *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun özgül üreme hızları,  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimini gösteren grafikler yardımıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.34).

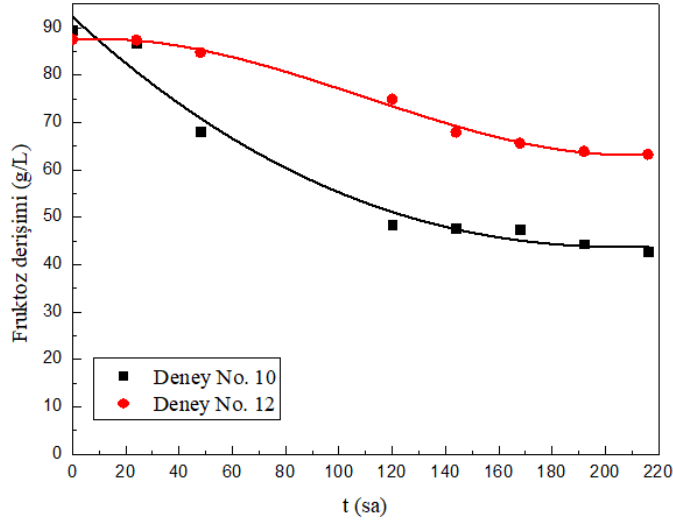


Şekil 4.34. 24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen (a): 10 ve (b): 12 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimleri

*A. pullulans* NBRC 100716 suşunun, üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları 10 ve 12 numaralı deneyler için sırasıyla; 0.056 ve 0.044 sa<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; fermantasyon ortam koşulları 100 g/L fruktoz, pH 5 ve 24°C olan 10 numaralı deneyde, fruktoz başlangıç derişimi ve pH’ı aynı, yalnızca sıcaklığı farklı ve 32°C olan; 12 numaralı deneydekenden daha yüksek özgül üreme hızı değerine ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak; *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun maksimum özgül liamocin üretim hızları da ( $q_p$ ) hesaplanmıştır. 10 ve 12 numaralı deneyler için hesaplanan  $q_p$  değerleri sırasıyla; 0.0016 ve 0.0029 g liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır. 10 numaralı deney için en yüksek özgül liamocin oluşum hızı fermantasyonun 24, 12 numaralı deney için ise 48. saatinde elde edilmiştir.

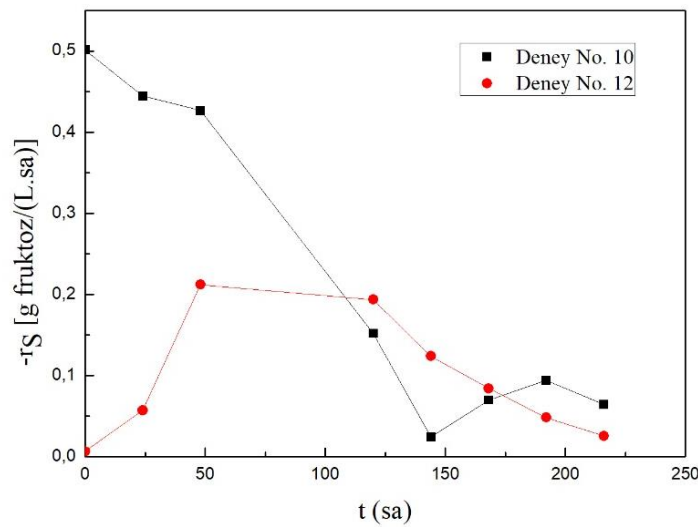
Bu gruptaki deneyler için, fermantasyon ortamlarında bulunan fruktoz derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.35’te gösterilmiştir.



Şekil 4.35. 24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

10 ve 12 numaralı deneylerde, fermantasyon sonunda ortamda bir miktar fruktozun *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından tüketilmeden kaldığı tespit edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişimleri 100 g/L, pH’ları 5 ve sıcaklık değerleri; 24 ve 32 °C olan 10 ve 12 numaralı deneyler için, ortamda tüketilmeden kalan fruktoz derişimleri sırasıyla; 42.87 ve 63.31 g/L olarak tespit edilmiştir.

Bu deney koşulları için ayrıca, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun fruktoz tüketim hızları da hesaplanmış ve Şekil 4.36’da; fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafik verilmiştir.

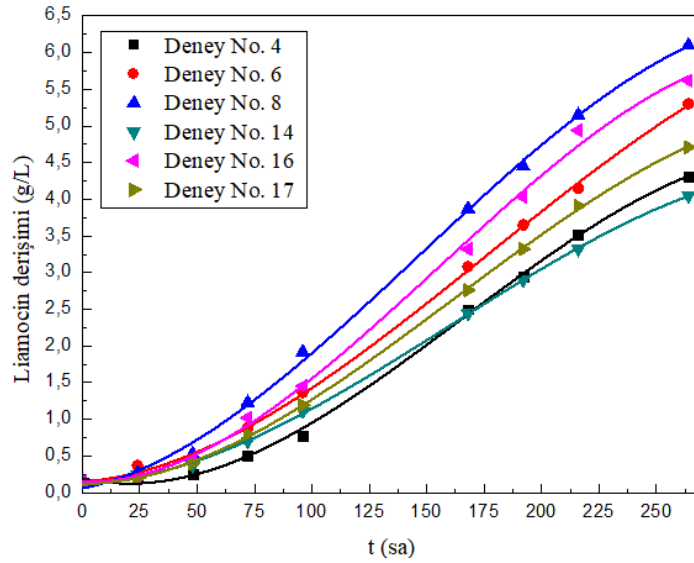


Şekil 4.36. 24°C ve 32°C’lerde gerçekleştirilen 10 ve 12 numaralı deneylerde, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

10 numaralı deneyde, en yüksek fruktoz tüketim hızına fermantasyonun başlangıcında, 0.50 g fruktoz/(L.sa) değeri ile ulaşılmıştır. 12 numaralı deneydeki en yüksek fruktoz tüketim hızı ise; fermantasyonun 48. saatinde 0.21 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır. Çalışılan işletme parametreleri dikkate alındığında, daha yüksek fruktoz tüketim hızlarına; sıcaklığın daha düşük olduğu (24°C), 10 numaralı deneyde ulaşıldığı belirlenmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde son olarak, Çizelge 4.4’de verilmiş olan deney tasarım planında yer alan; merkez nokta deneyleri, 6 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Tasarım planında 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı olarak gösterilmiş olan bu deneyler 28°C’de, fruktoz başlangıç derişimi; 100 g/L, başlangıç pH’ı ise; 5 olan işletme koşullarında gerçekleştirilmişlerdir. Bu deney için *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun başlangıç inokülasyon derişimi;  $1.5 \times 10^7$  kob/mL olarak saptanmıştır.

Merkez nokta deneylerinde elde edilen liamocin derişimlerinin zamanla değışimlerini gösteren grafik; Şekil 4.37’de verilmiştir.

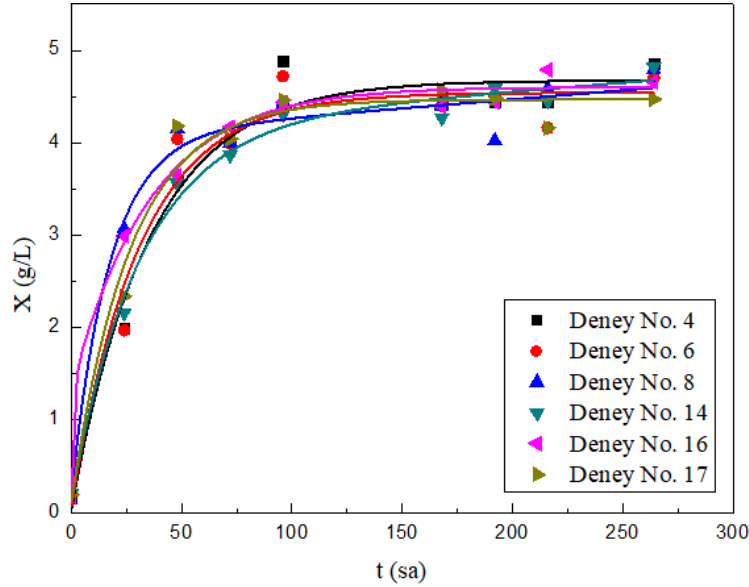


Şekil 4.37. 28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı merkez nokta deneylerinde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin derişimlerinin zamanla değışimleri

Söz konusu grafikten de görülebileceği gibi, gerçekleştirilen tüm deneylerde liamocin derişimlerinin zamanla değışimleri benzer bir eğilim göstermişlerdir.



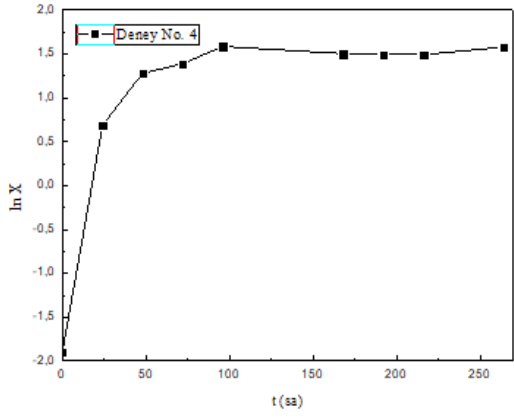
En yüksek liamocin derişimleri 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı deneyler için sırasıyla; 4.31, 5.30, 6.10, 4.05, 5.62 ve 4.71 g/L olarak, fermantasyonun 264. saatinde elde edilmiştir. Bu gruptaki deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimlerini gösteren grafik; Şekil 4.38’de sunulmuştur.



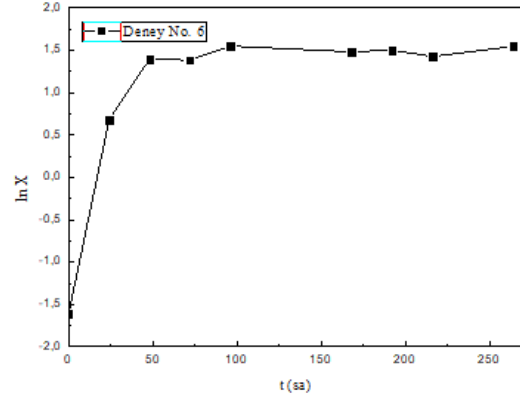
Şekil 4.38. 28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı merkez nokta deneylerinde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.38 incelendiğinde; merkez nokta koşullarında gerçekleştirilen tüm deneylerde elde edilen biyokütle derişimi eğrilerinin benzer bir eğilim gösterdikleri, fermantasyonun başlangıcında derişimlerde hızlı bir artış olduğu, yaklaşık 96. saatten sonra ise biyokütle miktarlarında fazla bir değişim olmadığı görülmektedir. Merkez nokta koşullarında yapılan bu deneylerde çalışılan suşa ait en yüksek biyokütle derişimlerinin; 4.57-4.89 g/L arasında değiştiği belirlenmiştir. Merkez noktadaki deneylerde elde edilen biyokütle derişimlerinin birbirlerine çok yakın oldukları tespit edilmiştir. 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı deneylerdeki biyokütle derişimleri sırasıyla; 4.89, 4.72, 4.79, 4.82, 4.79 ve 4.57 g/L olarak belirlenmiştir.

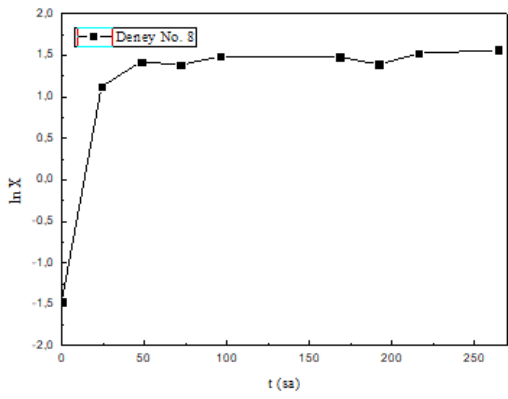
Çalışmanın bu bölümünde ayrıca; deneyler sırasında elde edilen kuru hücre ağırlıklarından yararlanılarak hesaplanan  $\ln X$  değerlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafikler de oluşturulmuştur (Şekil 4.39). Bu grafikler kullanılarak, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızları hesaplanmıştır.



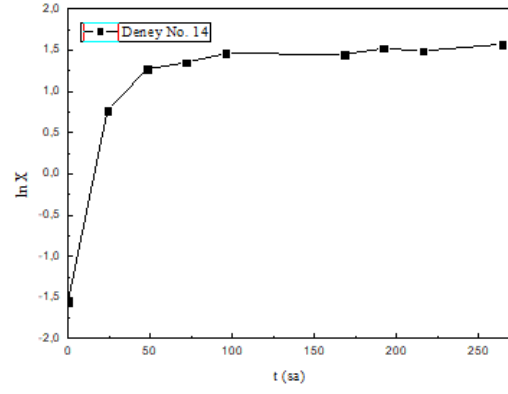
(a)



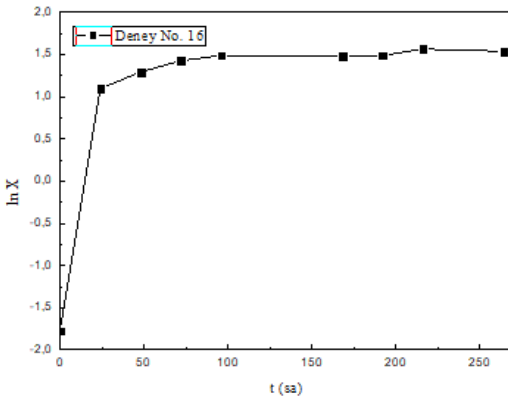
(b)



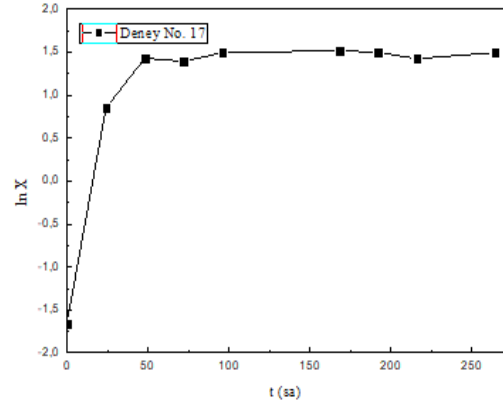
(c)



(d)



(e)



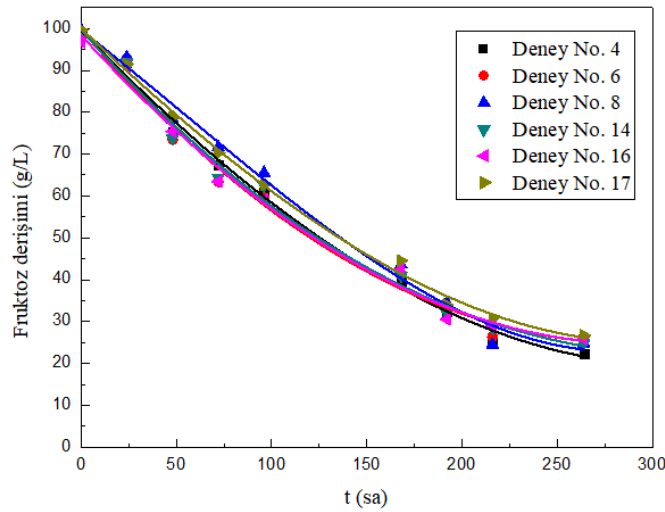
(f)

Şekil 4.39. 28°C’de gerçekleştirilen (a): 4, (b): 6, (c): 8, (d): 14, (e): 16 ve (f): 17 numaralı deneylerde, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişimlerinin ln X değerlerinin zamanla değişimleri

Bu deney koşullarında mikroorganizma özgül üreme hızlarının ( $\mu$ ); 0.062-0.089 arasında değiştikleri belirlenmiştir.  $\mu$ ; 4 ve 14 numaralı deneyler için; 0.078  $\text{sa}^{-1}$ , 6, 8, 16 ve 17 numaralı deneyler için ise sırasıyla; 0.062, 0.076, 0.083 ve 0.089  $\text{sa}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

Bu bölümde ayrıca; liamocin ve biyokütle derişimlerinin zamanla değişimlerini gösteren grafiklerden yararlanılarak, maksimum özgül ürün oluşum hızı (qp) değerleri de hesaplanmıştır. Merkez nokta deney koşulları için hesaplanan en yüksek özgül liamocin oluşum hızlarının birbirlerine oldukça yakın ve 0.0043 ve 0.0065 g liamocin/(g mo.sa) arasında değiştikleri bulunmuştur. En yüksek özgül liamocin oluşum hızları 4 ve 8 numaralı deneyler için; 0.0063, 6 ve 16 numaralı deneyler için ise; 0.0065 g liamocin/(g mo.sa) olarak saptanmıştır. 14 ve 17 numaralı deneyler için ise; en yüksek özgül ürün oluşum hızları sırasıyla; 0.0043 ve 0.0057 g liamocin/(g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.

Bu deneyler için, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimini gösteren grafikler de oluşturulmuş ve Şekil 4.40'da gösterilmiştir.



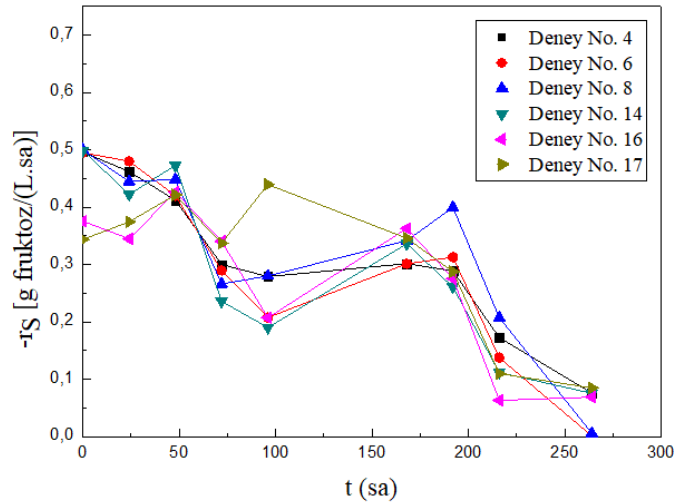
Şekil 4.40. 28°C'de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı deneylerde, fruktoz derişimlerinin zamanla değişimleri

Şekil 4.40 incelendiğinde; merkez nokta deney koşullarında, ortamlardaki fruktoz derişimlerindeki azalmaların, birbirlerine çok yakın oldukları tespit edilmiştir.

Söz konusu şekil incelendiğinde ayrıca; bu koşullarda gerçekleştirilen tüm deneyler için fermantasyonların sonunda (264. saat), ortamda tüketilmeden kalan fruktoz miktarlarının da yaklaşık olarak aynı oldukları belirlenmiştir.

Bu aşamada ayrıca, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimlerini gösteren grafikler de oluşturularak, Şekil 4.41’de sunulmuştur. Söz konusu şekil incelendiğinde; en yüksek substrat değişim hızlarına; 0.50 g fruktoz/(L.sa) değeri ile fermantasyonun başlangıcında, 4, 6, 8 ve 14 numaralı deneylerde ulaşıldığı belirlenmiştir.

En yüksek substrat tüketim hızı, 16 numaralı deney için fermantasyonun 50. saatinde 0.42 g fruktoz/ (L.sa), 17 numaralı deney için ise, fermantasyonun 96. saatinde; 0.43 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.41. 28°C’de gerçekleştirilen 4, 6, 8, 14, 16 ve 17 numaralı deneylerde, fruktoz tüketim hızlarının zamanla değişimleri

#### 4.5. Çalışmada Seçilen Bağımlı Değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Modellenmelerine İlişkin Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılarak oluşturulan deney tasarım planında (Çizelge 4.4) yer alan tüm deneylerin, verilen işletme koşullarında gerçekleştirilmesinin ardından, seçilen üç bağımsız değişkenin, elde edilen yanıtlar (bağımlı değişkenler) üzerindeki etkilerini gösteren bazı model eşitlikler türetilmiştir. Bu eşitliklerin türetilmelerinde, bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), pH (X2) ve sıcaklık (X3) seçilirlerken, maksimum liamocin derişimi (Y1), özgül üreme hızı (Y2) ve maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) bağımlı değişkenler olarak seçilmişlerdir. Bu aşamada gerçekleştirilen deneylerde elde edilen tüm yanıtlar; Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Merkezi karma tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen maksimum liamocin derişimleri (Y1), özgül üreme hızları (Y2) ve maksimum özgül liamocin üretim hızları (Y3)

Deney no	Y1 (g/L)	Y2 ( sa <sup>-1</sup> )	Y3 [g liamocin/(g mo.sa)]
1	0.82	0.040	0.0012
2	0.42	0.058	0.0020
3	0.92	0.035	0.0020
4	4.31	0.078	0.0063
5	0.47	0.053	0.0020
6	5.30	0.062	0.0065
7	0.44	0.060	0.0011
8	6.10	0.076	0.0063
9	1.12	0.054	0.0017
10	0.60	0.056	0.0016
11	1.16	0.029	0.0015
12	1.50	0.044	0.0029
13	0.43	0.078	0.0017
14	4.05	0.078	0.0043
15	5.63	0.053	0.0063
16	5.62	0.083	0.0065
17	4.71	0.089	0.0057
18	0.61	0.033	0.0016
19	2.25	0.028	0.0032
20	1.12	0.053	0.0020

Çizelge 4.6'daki sonuçlar incelendiğinde; elde edilen maksimum liamocin derişimlerinin (Y1); 0.42-6.10 g/L, mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin (Y2); 0.028-0.089 sa<sup>-1</sup>, maksimum özgül liamocin üretim hızı değerlerinin (Y3) ise; 0.0011-0.0065 [g liamocin/(g mo.sa)] aralıklarında değiştikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada seçilen üç bağımsız değişkenin her bir bağımlı değişken üzerindeki etkilerini gösteren model denklemler; Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının deneme sürümü kullanılarak, çoklu regresyon analizi yardımı ile türetilmişlerdir. Söz konusu eşitliklerin türetilmelerinde, anılan program tarafından önerilen ikinci dereceden bir model denklem kullanılmıştır. Daha sonra ise aynı program kullanılarak, türetilen her bir model eşitlik için, ANOVA testi ile varyans analizleri de yapılmıştır. Yapılan ANOVA testleri sonucunda, türetilen modellerin gerçek cevaplara uygunluklarının değerlendirilmesinde; modelin önemli ( $p<0.05$ ), uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz ( $p>0.05$ ) ve ilgili modele ait belirleme katsayısı değerinin ( $R^2$ ) ise; 0.75'ten büyük olması durumu göz önünde bulundurulmuştur. Belirtilen bu analizler tamamlandıktan sonra, her bir yanıt için elde edilen deneysel sonuçların, aynı program kullanılarak, model eşitliklerden hesaplanan tahminsel değerleriyle karşılaştırıldıkları grafikler de çizilmiştir.

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ( $X_1$ ), başlangıç pH'ı ( $X_2$ ) ve sıcaklığın ( $X_3$ ), maksimum liamocin derişimi ( $Y_1$ ) üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlik; Eş. 4.1'de verilmiştir.

$$Y_1 = + 5.03 - 0.1783X_1 + 0.4725X_2 - 0.2033X_3 + 0.1938X_1X_2 + 0.2313X_1X_3 + 0.2438X_2X_3 - 1.54(X_1)^2 - 0.7833(X_2)^2 - 1.52(X_3)^2 \quad (4.1)$$

Anılan programla gerçekleştirilen regresyon analizi sonucu elde edilen modele ait belirleme katsayısı ( $R^2$ ) değeri; 0.8292 olarak belirlenmiştir.  $R^2$  değerinin 1'e yakın olması; Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanan değerler ile deneysel verilerin birbirlerine yakınlık durumunu ifade etmektedir. Bu modele ait varyans analizleri sonuçları Çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Varyans analizi sonuçlarına göre; incelenen bağımsız değişkenlerin maksimum liamocin derişimi üzerine etkilerini gösteren model önemli ( $p<0.05$ ), uyum eksikliği ise önemsiz ( $p>0.05$ ) olarak bulunmuştur. Ayrıca incelenen bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan ikili etkileşimleri, ( $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  ve  $X_2X_3$ ) önemsiz bulunurken; her bir değişkenin karesel etkilerinin, maksimum liamocin derişimi üzerindeki etkileri ise, önemli olarak bulunmuştur.

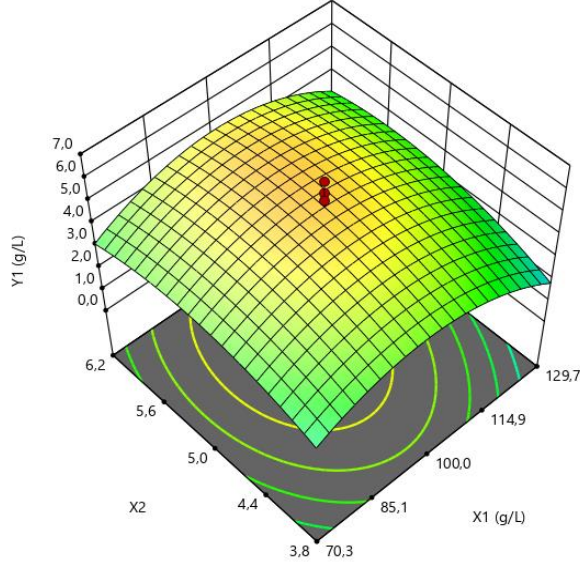
Çizelge 4.7. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F	p	
<b>Model</b>	9	7.82	4.71*	0.0118	Önemli
X1	1	0.4340	0.2617	0.6201	
X2	1	3.05	1.84	0.2050	
X3	1	0.5644	0.3403	0.5726	
X1X2	1	0.3003	0.1811	0.6795	
X1X3	1	0.4278	0.2579	0.6226	
X2X3	1	0.4753	0.2866	0.6041	
X1 <sup>2</sup>	1	34.33	20.70*	0.0011	
X2 <sup>2</sup>	1	8.84	5.33*	0.0436	
X3 <sup>2</sup>	1	33.08	19.95*	0.0012	
Uyum eksikliği	5	2.69	4.27	0.0685	Önemsiz
Hata	5	0.6291			
<b>Genel</b>	19				

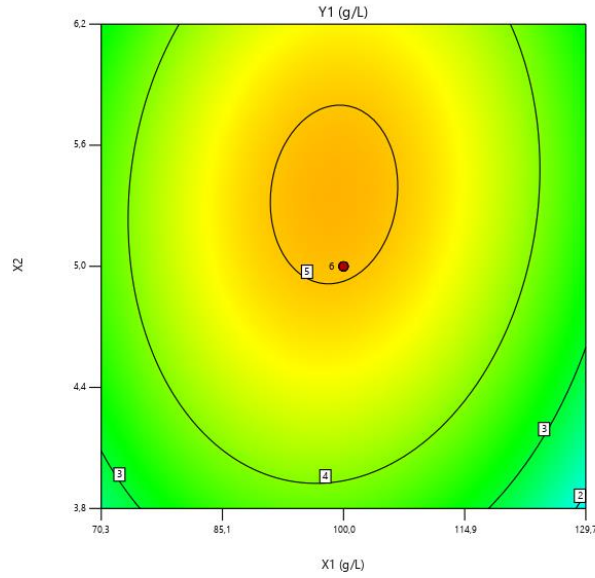
\*p<0.05, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Bu araştırmada seçilen bağımsız değişkenlerin; maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerine olan etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.42-Şekil 4.44'de verilmiştir. Şekil 4.42'de; 28°C'de, fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi ile başlangıç pH'ının, en yüksek liamocin derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri verilmiştir. Şekil 4.42 a'da verilen yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; fermantasyon ortamındaki fruktoz başlangıç derişiminin yüksek (120-129 g/L) ve başlangıç pH'ının düşük (3.8-4.2) olduğu durumda, maksimum liamocin derişiminin; 2.60 g/L'nin altında olduğu saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişiminin 90-110 g/L; başlangıç pH'ının 4.8-5.7 olduğu aralıkta, liamocin derişiminin maksimum değerine yakın ve 4.90-5.10 g/L arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek liamocin derişimine (5.10 g/L) fruktoz başlangıç derişiminin 100 g/L, pH'ın ise 5.30 olduğu koşulda ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Şekil 4.42 b’de verilmiş olan kontur grafiğine göre ise; fruktoz başlangıç derişiminin 90-106 g/L ve pH’ın 4.9-5.8 olduğu durumda; liamocin derişiminin 5 g/L’nin üzerinde olduğu ve maksimum liamocin derişimlerine ulaşıldığı belirlenmiştir. İlgili grafikten, fruktoz başlangıç derişimi 99.69 g/L ve pH 5.27 iken ulaşılan liamocin derişiminin; 5.10 g/L olduğu tespit edilmiştir.



(a)

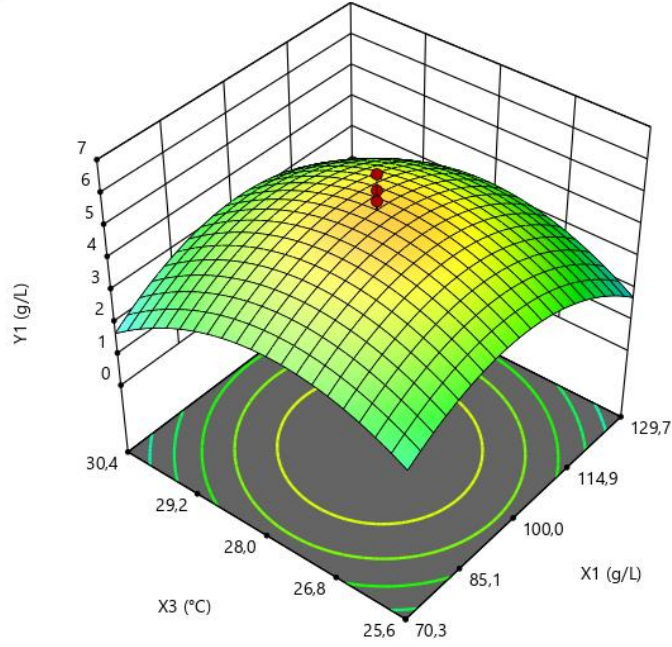


(b)

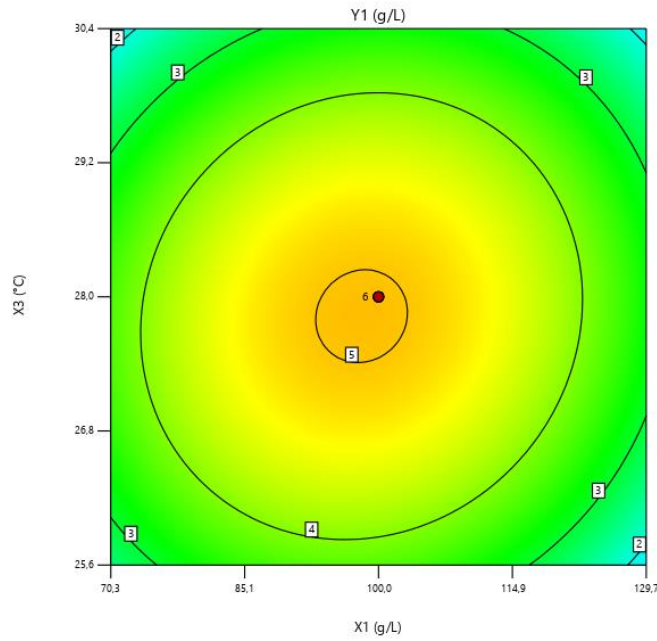
Şekil 4.42. Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile başlangıç pH değerlerinin (X2), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X3 = 28°C)



Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile sıcaklığın (X3), maksimum liamocin derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.43'te sunulmuştur.



(a)



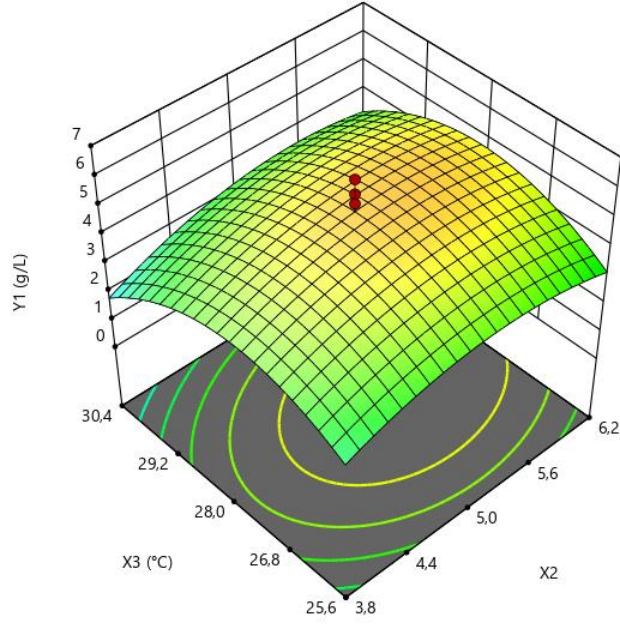
(b)

Şekil 4.43. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile sıcaklık değerlerinin (X3), maksimum liamocin derişimi (Y1) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X2 = 5)

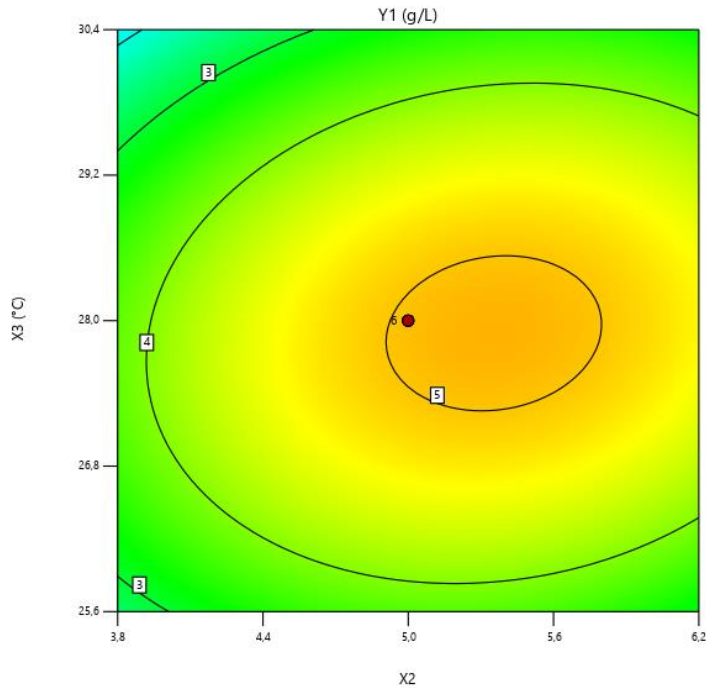
Söz konusu yanıt yüzey grafiği (Şekil 4.43 a) incelendiğinde; pH'ın 5 olduğu durumda, çalışılan aralıktaki fruktoz başlangıç derişiminin yüksek (123-129 g/L) sıcaklığın düşük (25°C) olduğu durumda, maksimum liamocin derişiminin 2.40 g/L'in altında olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın 25°C olduğu durumda fruktoz başlangıç derişiminin; 129 g/L'den 90 g/L'ye kadar azalması ile, maksimum liamocin derişiminin arttığı tespit edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişimi, 90 g/L değerinin altına düştüğünde ise liamocin derişiminin azaldığı saptanmıştır. Yüksek liamocin derişimlerine; fruktoz başlangıç derişiminin; 90-105 g/L ve sıcaklığın; 25-26°C arasında olduğu koşullarda ulaşılabildiği tespit edilmiştir. Bu değerlerdeki liamocin derişimlerinin; 4.8 g/L- 5.02 g/L aralığında değıştikleri saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişimi 98 g/L, sıcaklık 27.9°C iken; en yüksek liamocin derişimi 5.04 g/L olarak, maksimum değerinde belirlenmiştir.

Şekil 4.43 b'deki kontur grafiği incelendiğinde de; maksimum liamocin derişiminin, fruktoz başlangıç derişiminin 93-102 g/L; sıcaklığın 27-28°C arasında değıştiği koşullarda; 5 g/L'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişimi 97.3, sıcaklık 27.8°C iken; en yüksek liamocin derişimi 5.04 g/L olarak belirlenmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin çalışılan aralıktaki en yüksek değerlerde (127-129 g/L) ve sıcaklığın 25-26°C aralığında, en düşük değerlerde olduğu durumda, maksimum liamocin derişiminin; 2 g/L'nin altında olduğu belirlenmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin; 128.8 ve sıcaklığın 25.7°C olduğu durumda liamocin derişimi; 1.92 g/L olarak saptanmıştır.

Şekil 4.44'te fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı (X2) ile sıcaklık değerlerinin (X3), maksimum liamocin derişimi üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri sunulmuştur. İlgili yanıt yüzey grafiği incelendiğinde (Şekil 4.44 a); fruktoz başlangıç derişiminin 100 g/L olduğu koşulda; yüksek sıcaklık (30°C) ve düşük pH değerlerinde (3.8-4.0); en yüksek liamocin derişiminin 1.9-2.5 g/L değerleri aralığında değıştiği tespit edilmiştir. Yüksek liamocin derişimi değerlerine, sıcaklığın 26-29°C ve pH'ın 4.3-6.2 aralığında değıştiği koşullarda ulaşılmıştır. Bu aralıkta maksimum liamocin derişiminin; 4.5-5.08 g/L arasında değıştiği saptanmıştır. Sıcaklığın 27-28 °C ve pH'ın 4.8-5.7 arasında değıştiği koşullarda liamocin derişiminin; 5 g/L değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık 27.8°C, pH 5 iken; maksimum liamocin derişiminin; 5.05 g/L olduğu tespit edilmiştir.



(a)



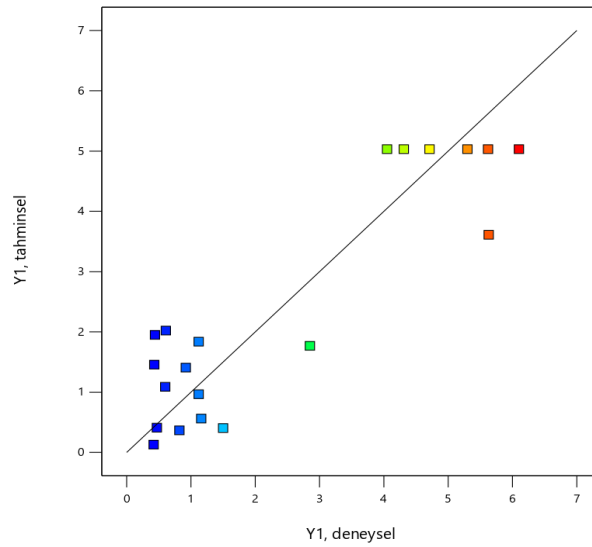
(b)

Şekil 4.44. Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı ( $X_2$ ) ile sıcaklık değerlerinin ( $X_3$ ), maksimum liamocin derişimi ( $Y_1$ ) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 100$  g/L)

Şekil 4.44 b'deki kontur grafiğı incelendiğinde ise, sıcaklığın; 27-28°C ve pH'ın; 4.9-5.8 arasında değıştığı koşullarda liamocin derişiminin; 5 g/L'nin üzerinde olduğı tespit

edilmiştir. Fruktöz başlangıç derişimi 100 g/L iken, pH'ın 5.29 ve sıcaklığın 27.7 °C olduğu koşulda ulaşılabilir maksimum liamocin derişiminin; 5.1 g/L olduğu saptanmıştır. Sıcaklığın; 25.6-25.9°C, pH'ın 3.8-4.0 aralığında değiştigi koşullarda, maksimum liamocin derişiminin 3 g/L'nin altında olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık 25.8°C; pH 3.84 iken; maksimum liamocin derişimi; 2.90 g/L olarak bulunmuştur.

Maksimum liamocin derişimlerinin (Y1); Eş. 4.1 kullanılarak hesaplanmış olan tahminsel değerleri ile, deneysel değerlerinin karşılaştırıldıkları grafik, Şekil 4.45'te gsterilmiştir. Anılan grafik için belirleme katsayısı;  $R^2 = 0.8292$  olarak hesaplanmıştır. Bu grafiğe gbre; tahminsel ve deneysel verilerin elde edilen doğru üzerinde saıldıkları saptanmıştır.



Şekil 4.45. Maksimum liamocin derişimlerinin (Y1) deneysel değerleri ile tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8292x + 0.4596$ ,  $R^2 = 0.8292$ )

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ile ortam sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gsteren model eşitlik; Eş. 4.2'de sunulmuştur.

$$Y2 = + 0.0775 - 0.0039X1 + 0.0067X2 + 0.0061X3 - 0.0053X1X2 + 0.0005X1X3 - 0.0005X2X3 - 0.0099(X1)^2 - 0.0113(X2)^2 - 0.0088(X3)^2 \quad (4.2)$$

Eş. 4.2'ye gbre Y2 değişkeni için  $R^2$  değeri; 0.7905 olarak hesaplanmıştır. Bu değerin 1'e yakın olması; deneysel olarak elde edilen Y2 değerleri ile, verilen eşitliğe gbre hesaplanan Y2 değerlerinin birbirlerine yakın olduklarını gstermektedir. Türetilen bu modele ait varyans analizi sonuçları; Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

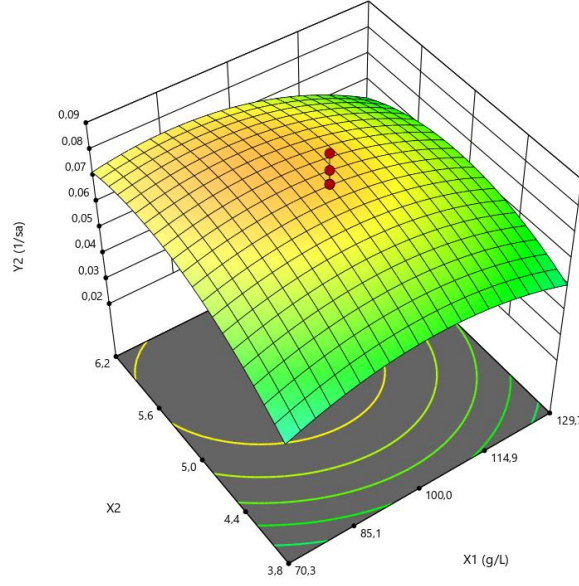
Varyans Kaynağı	SD	KO	F	p	
<b>Model</b>	9	6.00x10 <sup>-4</sup>	4.19*	0.0177	Önemli
X1	1	2.00x10 <sup>-4</sup>	1.51	0.2467	
X2	1	6.00x10 <sup>-4</sup>	4.43	0.0615	
X3	1	5.00x10 <sup>-4</sup>	3.71	0.0830	
X1X2	1	2.00x10 <sup>-4</sup>	1.59	0.2359	
X1X3	1	2.00x10 <sup>-6</sup>	0.0144	0.9068	
X2X3	1	2.00x10 <sup>-6</sup>	0.0144	0.9068	
X1 <sup>2</sup>	1	1.40x10 <sup>-3</sup>	10.19*	0.0096	
X2 <sup>2</sup>	1	1.80 x10 <sup>-3</sup>	13.30*	0.0045	
X3 <sup>2</sup>	1	1.10x10 <sup>-3</sup>	8.12*	0.0173	
Uyum eksikliği	5	2.00x10 <sup>-4</sup>	2.42	0.1770	Önemsiz
Hata	5	1.00x10 <sup>-4</sup>			
<b>Genel</b>	19				

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

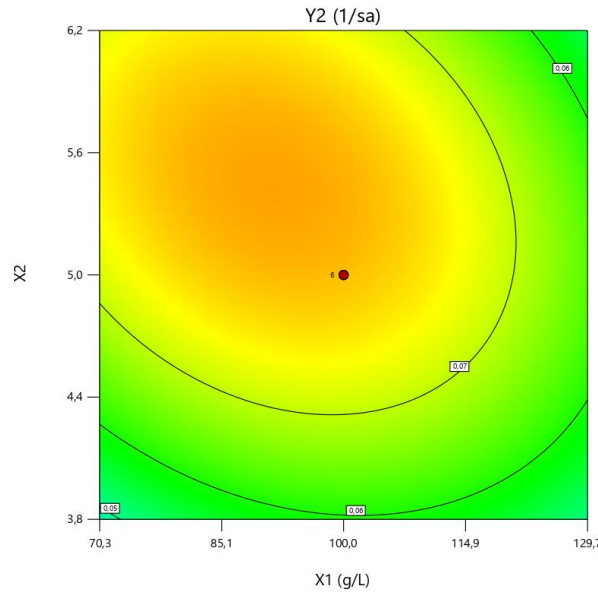
Çizelge 4.8'deki varyans analizi sonuçlarına göre; model önemli (p<0.05), modelin uyum eksikliği ise önemsiz (p>0.05) olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma özgül üreme hızı üzerine (Y2), incelenen tüm bağımsız değişkenlerin ikili etkileşimlerinin önemsiz (p>0.5), karesel etkilerinin ise önemli (p<0.5) oldukları da tespit edilmiştir.

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ile sıcaklığının (X3); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.46-4.48'de gösterilmiştir.

Şekil 4.46'da fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimleri ve başlangıç pH'larının, mikroorganizma özgül üreme hızları üzerindeki etkilerini gösteren; yanıt yüzey ve kontur grafikleri sunulmuştur.



(a)



(b)

Şekil 4.46. Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile başlangıç pH değerlerinin (X2); mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X3 = 28°C)

Şekil 4.46 a'da verilen yanıt yüzey grafiğine göre; fruktoz başlangıç derişimi ve ortam başlangıç pH'larının, çalışılan aralık için düşük değerlerinde, mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin de ( $\mu$ ) düşük oldukları saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişiminin 71 g/L ve pH'ın 3.8 olduğu koşulda  $\mu$  değerinin; 0.049 sa<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir. Fruktoz başlangıç derişimlerinin; 83-112 g/L, ortam başlangıç pH'larının;

4.3-6.2 aralığında değiştiği koşullarda; özgül üreme hızınının 0.070sa<sup>-1</sup>'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişimi; 94.8 g/L ve pH 5.27 iken; özgül üreme hızı; 0.079 sa<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

İlgili kontur grafiği incelendiğinde (şekil 4.46 b); fruktoz başlangıç derişimlerinin; 70-116 g/L, pH değerlerinin ise; 5.0-6.2 aralığında değiştiği koşullardaki mikroorganizma özgül üreme hızınının; 0.07 sa<sup>-1</sup>'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek özgül üreme hızı değerine (0.079 sa<sup>-1</sup>); fruktoz başlangıç derişiminin; 90.6 g/L, ortam başlangıç pH'ının; 5.4 olduğu koşulda ulaşılmıştır.

Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin (X1) ve sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren grafikler ise; şekil 4.47' de sunulmuştur.

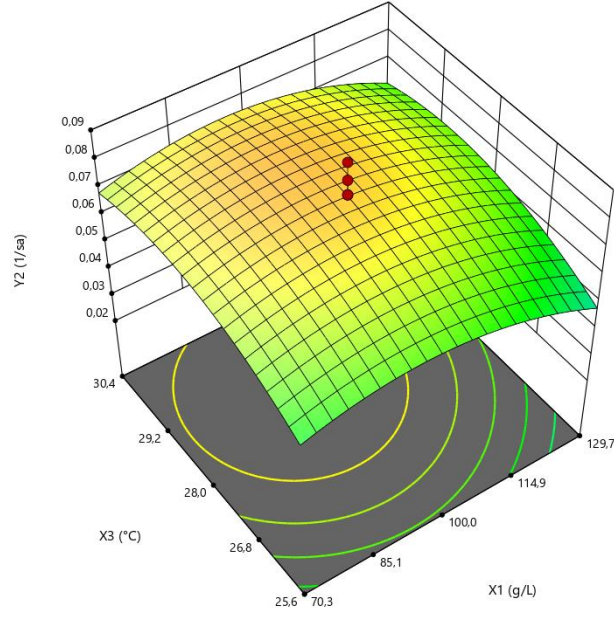
şekil 4.47 a'da verilmiş olan yanıt yüzey grafiğine göre; fruktoz başlangıç derişiminin; 129.3 g/L ve ortam sıcaklığının; 25.6°C olduğu koşullarda; mikroorganizma özgül üreme hızınının; 0.049 sa<sup>-1</sup> ile, en düşük değerinde olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklığın; 25.6-26.5°C aralığında, fruktoz başlangıç derişiminin; 70.3-120.0 g/L aralığında olduğu koşullarda; mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinin; 0.055-0.069 sa<sup>-1</sup> arasında değiştikleri saptanmıştır.

Yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerine; sıcaklığın 26.4-30.4°C, fruktoz başlangıç derişimlerinin ise; 75-112 g/L arasında değiştiği koşullarda ulaşıldığı saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişimi 99.2 g/L, sıcaklık 28.4°C iken özgül üreme hızınının; 0.078 sa<sup>-1</sup> olduğu bulunmuştur.

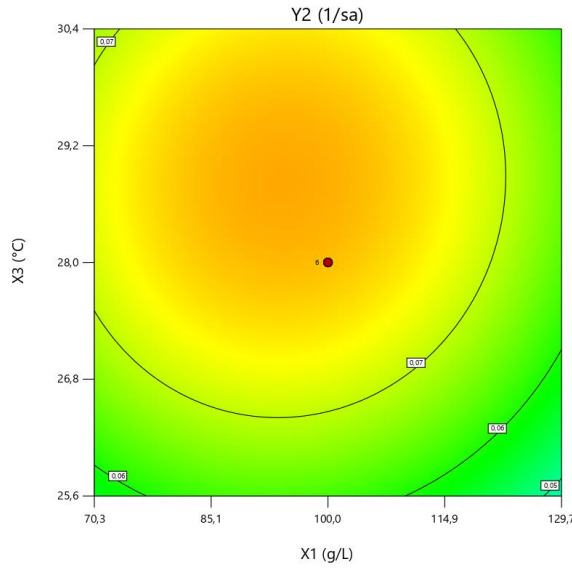
şekil 4.47 b'de verilen kontur grafiği incelendiğinde ise; fruktoz başlangıç derişimlerinin; 121-129 g/L, ortam sıcaklığının ise; 25.6-26.1°C aralığında değiştiği koşullarda özgül üreme hızınının; 0.055 sa<sup>-1</sup>'ten düşük olduğu belirlenmiştir. Tüm fruktoz başlangıç derişimi değerleri için özgül üreme hızı değerlerinin, sıcaklığın artmasıyla arttığı tespit edilmiştir.

Yüksek özgül üreme hızı değerlerine; sıcaklığın 27-30.4°C, fruktoz başlangıç derişimi değerlerinin ise; 75-114 g/L aralığında olduğunda ulaşıldığı saptanmıştır.

Fruktoz başlangıç derişiminin 93.52 g/L, ortam sıcaklığının; 28.5°C olduğu koşulda; özgül üreme hızı; 0.078 sa<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.



(a)

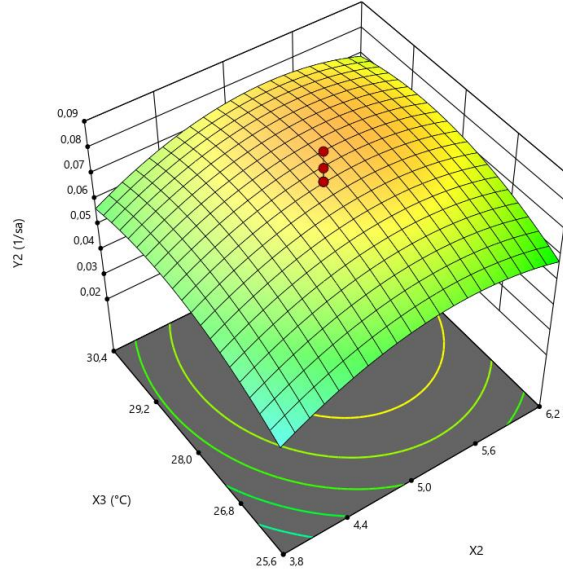


(b)

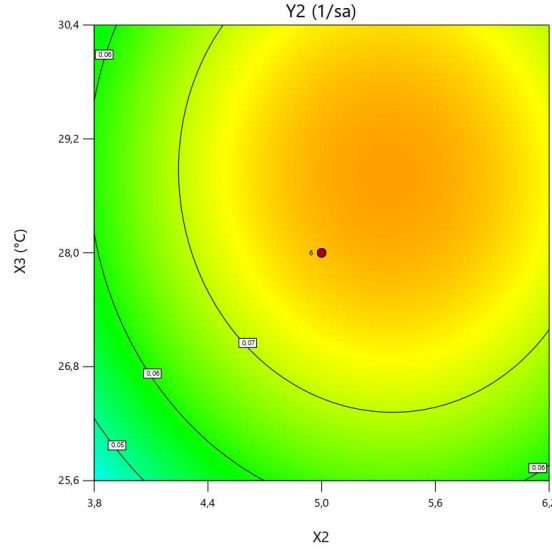
Şekil 4.47. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X2 = 5)

Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.48'de sunulmuştur.





(a)



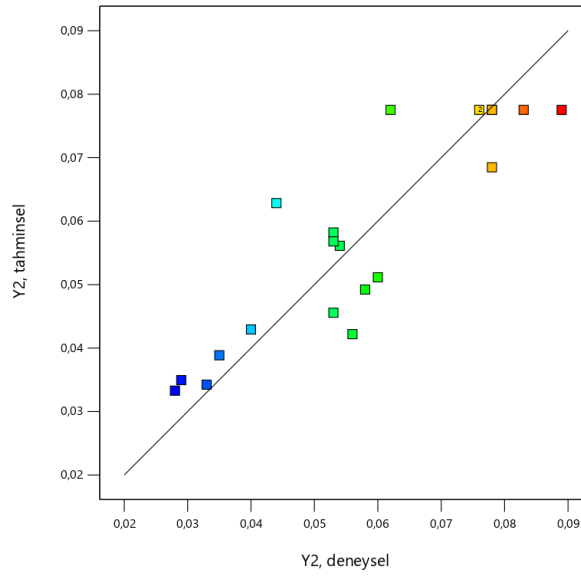
(b)

Şekil 4.48. Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı (X2) ile sıcaklığının (X3), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X1 = 100 g/L)

Şekil 4.48 a' da verilmiş olan; yanıt yüzey grafiği incelendiğinde, pH 3.8-4.05; sıcaklık 25.6-26.2°C aralığında iken; mikroorganizma özgül üreme hızının düşük değer aralığında değiştiği saptanmıştır. pH'ın 3.8; ortam sıcaklığının; 25.6°C olduğu koşulda özgül üreme hızı; 0.044 sa<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Fermantasyon ortamı pH'ı; 4.30-6.15, sıcaklığı; 26.5-30.3 aralığında iken, yüksek özgül üreme hızı değerlerine ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu değerlerin; 0.079 sa<sup>-1</sup>'in üzerinde oldukları bulunmuştur. pH'ın; 5.36, sıcaklığın; 28.5 olduğu koşulda, mikroorganizma özgül üreme hızının; 0.079 sa<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.48 b'deki kontur grafiği incelendiğinde de; çalışılan aralıktaki düşük pH (3.8-4.0) ve sıcaklık değerleri için (25.6-26.1°C), özgül üreme hızının; 0.05 sa<sup>-1</sup> den daha düşük olduğu saptanmıştır. Sıcaklığın; 28.8-30.4°C ve ortam başlangıç pH'ının; 4.6-6.0 değerleri aralığında olduğu koşullarda, özgül üreme hızı değerlerinin yüksek ve 0.076-0.079 sa<sup>-1</sup> değerleri arasında değiştikleri tespit edilmiştir. Sıcaklık; 29.5 °C, pH 4.90 iken ulaşılan mikroorganizma özgül üreme hızının, 0.077 sa<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir.

Mikroorganizma özgül üreme hızlarının deneysel ve Eş. 4.2 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik; Şekil 4.49'da verilmiştir.



Şekil 4.49. Mikroorganizma özgül üreme hızlarının (Y2) deneysel değerleri ile tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.7905x + 0.0119$ ;  $R^2 = 0.7905$ )

Mikroorganizma özgül üreme hızı için belirleme katsayısı değeri;  $R^2 = 0.7905$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer 0.75'ten büyük olmasının, Eş. 4.2'ye göre hesaplanan Y3 değerleri ile, deneysel olarak elde edilen Y3 değerlerinin birbirlerine büyük oranda yakın olduklarını ifade ettiği bilinmektedir.

Fermentasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ve pH'ı (X2) ile sıcaklığın (X3); maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) üzerine olan etkilerini gösteren model denklem Eş. 4.3'te gösterilmiştir.

$$Y3 = + 0.0060 - 0.0001X1 + 0.0005X2 + 0.000X3 - 0.0002X2X3 - 0.0017(X1)^2 - 0.0008(X2)^2 - 0.0014 (X3)^2 \quad (4.3)$$

Maksimum özgül liamocin üretim hızı değerleri için modele ait  $R^2$  değeri; 0.8512 olarak saptanmıştır. Bu değer 1'e yakın bulunmasının; deneysel Y3 değerleri ile Eş. 4.3'te verilen denklem kullanılarak hesaplanan tahminsel Y3 değerlerinin de birbirlerine yakın olduklarını ifade etmektedir. Bu modele ait varyans analizi sonuçları ise; Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

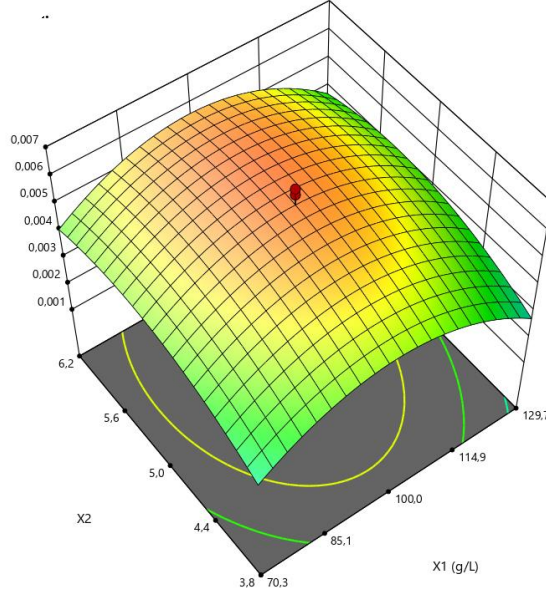
Çizelge 4.9. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığının (X3), özgül liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki etkilerine ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	SD	KO	F	p	
<b>Model</b>	9	$8.153 \times 10^{-6}$	6.36*	0.0039	Önemli
X1	1	$2.758 \times 10^{-7}$	0.2150	0.6528	
X2	1	$3.801 \times 10^{-6}$	2.96	0.1159	
X3	1	$1.618 \times 10^{-7}$	0.1261	0.7299	
X1X2	1	$1.250 \times 10^{-9}$	0.0010	0.9757	
X1X3	1	$1.250 \times 10^{-9}$	0.0010	0.9757	
X2X3	1	$3.612 \times 10^{-7}$	0.2816	0.6072	
X1 <sup>2</sup>	1	0.0000	32.57*	0.0002	
X2 <sup>2</sup>	1	$9.662 \times 10^{-6}$	7.53*	0.0207	
X3 <sup>2</sup>	1	0.0000	22.65*	0.0008	
Uyum eksikliği	5	$1.839 \times 10^{-6}$	2.53	0.1656	Önemsiz
Hata	5	$7.267 \times 10^{-7}$			
<b>Genel</b>	19				

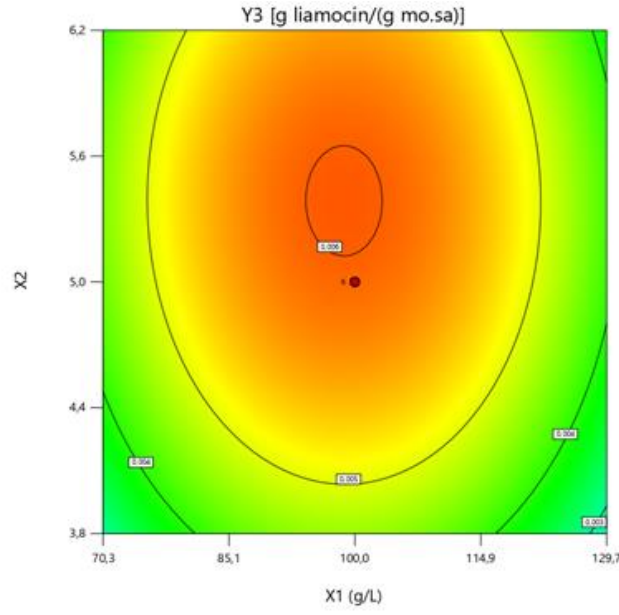
\* $p < 0.05$ , SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması

Çizelge 4.9'da verilen, modele ait varyans analizi sonuçlarına göre; modelin önemli ( $p < 0.05$ ), model uyum eksikliğinin ise önemsiz ( $p > 0.05$ ) olduğu belirlenmiştir. Diğer iki yanıt üzerine tüm bağımsız değişkenlerin karesel etkilerinin önemli bulunması gibi, maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) yanıtı için de tüm bağımsız değişkenlerin karesel etkileri önemli olarak tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ve pH değerlerinin, maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) üzerine olan etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.50'de sunulmuştur.



(a)



(b)

Şekil 4.50. Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile başlangıç pH değerlerinin (X2), maksimum liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X3 = 28°C)

Şekil 4.50 a'da verilmiş olan yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; pH 3.8 iken; çalışılan aralıktaki en düşük ve en yüksek fruktoz derişimlerinde, özgül ürün oluşum hızlarının da düşük olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon ortamı pH'ının; 4.40-6.15 ve fruktoz başlangıç derişimi değerlerinin; 75-120 g/L aralığında olduğu koşullarda, yüksek özgül liamocin üretim hızı değerlerine ulaşıldığı saptanmıştır. En yüksek özgül ürün oluşum

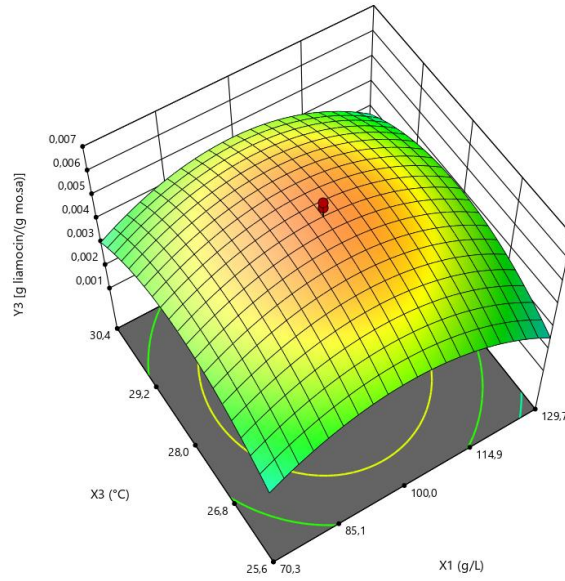
hızı değerleri, bağımsız değişkenlerin merkezdeki değerlerine yakın değerlerde oldukları koşullarda elde edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin; 97.2 g/L ve başlangıç pH'ının; 5.14 olduğu koşulda elde edilen özgül ürün oluşum değeri; 0.006 g liamocin/(g mo.sa) olarak belirlenmiştir.

Kontur grafiği incelendiğinde (Şekil 4.50 b); düşük pH ve yüksek fruktoz başlangıç derişimi değerleri için özgül ürün oluşum hızı değerinin, düşük olduğu tespit edilmiştir. pH'ın 3.82; fruktoz başlangıç derişiminin 129.4 olduğu koşulda, özgül liamocin üretim hızı; 0.0028 [g liamocin /(g mo.sa)] olarak belirlenmiştir. Yüksek özgül ürün oluşum hızı değerlerine; fermantasyon ortamı başlangıç pH değerlerinin; 4.50-6.18 ve fruktoz başlangıç derişimlerinin; 81.4-115.0 g/L aralığında olduğu koşullarda ulaşıldığı saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişiminin; 105.5 g/L ve başlangıç pH'ının; 5.3 olduğu koşulda; özgül liamocin üretim hızı değeri; 0.0059 [g liamocin /(g mo.sa)] olarak belirlenmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin; 94.3-103.0 g/L aralığında ve başlangıç pH'ının 5.12-5.62 aralığında olduğu koşullarda, özgül liamocin üretim hızı değerlerinin; 0.006 [g liamocin /(g mo.sa)] değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.50 b).

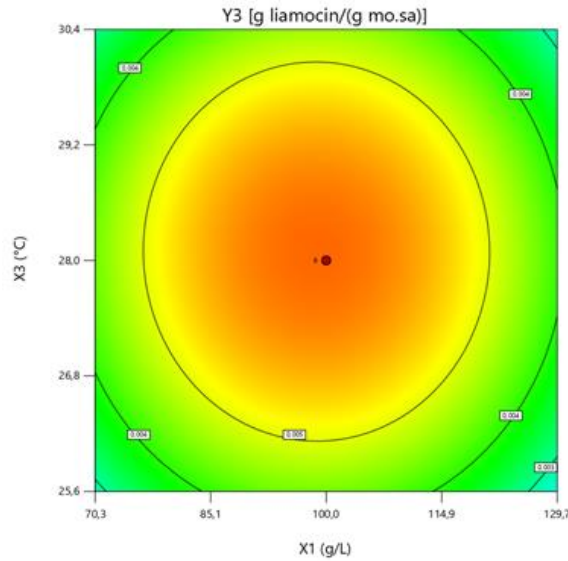
Fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1) ve sıcaklığının (X3), maksimum liamocin üretim hızı üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri; Şekil 4.51'de verilmiştir.

Şekil 4.51 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; çalışılan aralıktaki düşük fruktoz başlangıç derişimi ve düşük sıcaklık değerleri için özgül liamocin üretim hızı değerlerinin de, düşük oldukları tespit edilmiştir. Fruktoz başlangıç derişiminin; 70.74 g/L, ortam sıcaklığının; 25.7 °C olduğu koşulda; özgül ürün oluşum hızı değeri; 0.0029 [g liamocin /(g mo.sa)] olarak saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişiminin; 75.6-122.0 g/L, sıcaklığın 25.9-30.0 °C aralığında olduğu koşullarda, yüksek özgül liamocin üretim hızlarına ulaşıldığı saptanmıştır. Şekil 4.51 b'deki kontur grafiğine göre ise; yüksek fruktoz başlangıç derişimi ve düşük sıcaklık koşullarında; özgül liamocin üretim hızının; 0.0030 [g liamocin /(g mo.sa)]'dan daha düşük değerlerde olduğu saptanmıştır. Fruktoz başlangıç derişiminin; 128.8 g/L, sıcaklığın ise; 25.7 °C olduğu koşullarda, özgül liamocin üretim hızı; 0.0028 [g liamocin /(g mo.sa)] olarak tespit edilmiştir. Yüksek özgül liamocin üretim hızı değerlerine, fruktoz başlangıç derişiminin 85.6-116.0 g/L, sıcaklığın; 26.8-29.0°C aralığında olduğu koşullarda ulaşıldığı tespit edilmiştir ve bu aralıkta özgül liamocin üretim hızı değerlerinin; 0.0055 [g liamocin /(g mo.sa)] değerinin üzerinde olduğu da

belirlenmiştir. Fruktöz başlangıç derişimi; 99.6 g/L; sıcaklık 28.2 °C iken, özgül liamocin üretim hızı; 0.0059 [g liamocin / (g mo.sa)] olarak saptanmıştır



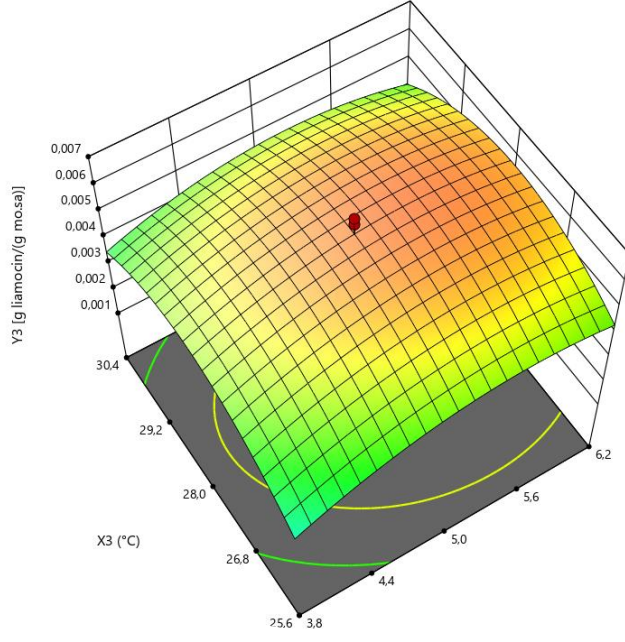
(a)



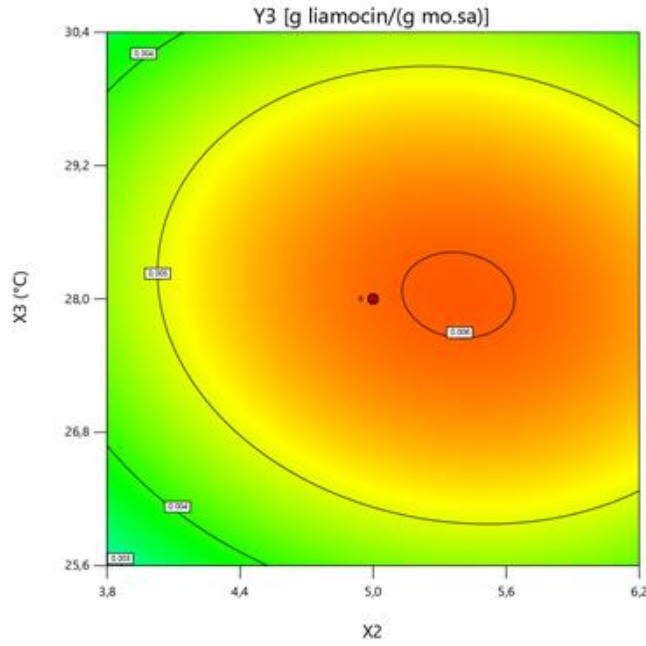
(b)

Şekil 4.51. Fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1) ile sıcaklığının (X3), maksimum liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri (X2 = 5)

Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ının (X2) ve sıcaklığın (X3), maksimum liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri ise; Şekil 4.52'de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.52. Fermantasyon ortamı başlangıç pH'ı ( $X_2$ ) ile sıcaklığın ( $X_3$ ), maksimum liamocin üretim hızı ( $Y_3$ ) üzerindeki etkilerini gösteren (a): yanıt yüzey ve (b): kontur grafikleri ( $X_1 = 100$  g/L)

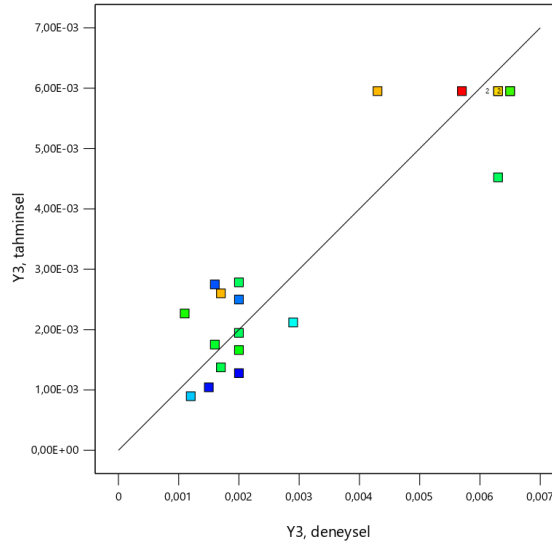
Şekil 4.52 a'daki yanıt yüzey grafiği incelendiğinde; fruktoz başlangıç derişiminin 100 g/L, sıcaklığın  $28^\circ\text{C}$  olduğu durumda; özgül liamocin üretim hızının, pH'ın 3.8'den 5.62'ye doğru artması ile arttığı, 5.62'den 6.2'ye kadar artmaya devam etmesi ile ise, azalmaya başladığı saptanmıştır. Yüksek özgül liamocin üretim hızı değerlerine; pH'ın



4.42-6.17 ve sıcaklığın 26.5-29.7 °C aralığı değerlerinde olduğu durumda ulaşıldığı belirlenmiştir.

Şekil 4.52 b’de verilmiş olan kontur grafiğine göre ise; düşük pH ve sıcaklık değerleri koşullarında, özgül ürün oluşum hızının düşük olduğu saptanmıştır. pH 3.84 ve sıcaklık 25.6°C iken ulaşılan özgül ürün oluşum hızı değeri; 0.029 [g liamocin / (g mo.sa)] olarak tespit edilmiştir. Fermantasyon ortamı başlangıç pH’ının; 5.12-5.62, ortam sıcaklığının; 27.6-28.4 °C aralığında değiştiği koşullarda, özgül liamocin üretim hızının; 0.006 [g liamocin / (g mo.sa)] değerinin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ortam pH’ı 5.39 ve sıcaklık 28.0 °C iken; ulaşılan özgül liamocin üretim hızı değeri; 0.00603 [g liamocin / (g mo.sa)] olarak saptanmıştır.

Maksimum özgül liamocin üretim hızı değerlerinin, deneysel değerleri ile, Eş. 4.3 kullanılarak hesaplanan tahminsel değerlerinin karşılaştırıldığı grafik; Şekil 4.53’te görülmektedir.



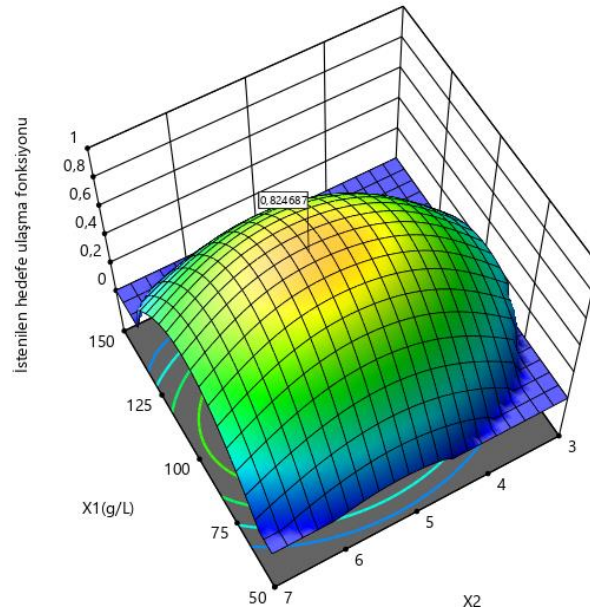
Şekil 4.53. Maksimum özgül liamocin üretim hızlarının (Y3) deneysel değerleri ile, tahminsel değerlerinin karşılaştırılması ( $y = 0.8512x + 0,0005$ ;  $R^2 = 0.8512$ )

Belirtilen grafikteki model eşitlik için belirleme katsayısı;  $R^2 = 0.8512$  olarak, 1’e yakın bir değerde hesaplanmıştır. Bu durum; deneysel olarak elde edilen veriler ile, Eş. 4.3’teki model eşitlik kullanılarak hesaplanan; maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) değerlerinin, birbirleriyle olan uyumlarının, yüksek olduğunu ifade etmektedir.



#### 4.6. A. pullulans NBRC 100716 Suşu ile Liamocin Üretimini Optimizasyonuna İlişkin Sonuçlar

Bu tez çalışmasında A. pullulans NBRC 100716 suşunun liamocin üretiminin optimizasyonu amacıyla; Design Expert®12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının deneme sürümü kullanılmıştır. Optimizasyon öncesinde ilk aşamada; bağımsız değişkenler olarak seçilen fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi (X1), başlangıç pH'ı (X2) ve sıcaklığın (X3); bağımlı değişkenler olarak belirlenen maksimum liamocin derişimi (Y1), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) ve maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) üzerindeki etkilerini gösteren model eşitlikler türetilmiştir. Optimizasyon aşamasında, tüm bağımlı değişkenler (yanıtlar) için istenilen hedeflerin belirlenmesi için, kullanılan programda yer alan; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonundan yararlanılmıştır. Söz konusu program tarafından, istenilen hedefler doğrultusunda gerekli optimum koşullar ve bu koşullarda elde edileceği öngörülen yanıt değerleri, 58 farklı optimum çözüm olarak üretilmiştir. Bu çözümler, Çizelge EK 7'de sunulmuştur. Söz konusu çizelgede yer alan optimum çözümlere ait; istenilen hedefe ulaşma oranlarının 0.814-0.825 aralığında değiştikleri belirlenmiştir. Söz konusu oranın; 0.825 olarak hesaplandığı bir çözüm için, fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi ile pH'ın, istenilen hedefe ulaşma oranına etkilerini gösteren bir örnek grafik; Şekil 4.54'de sunulmuştur.

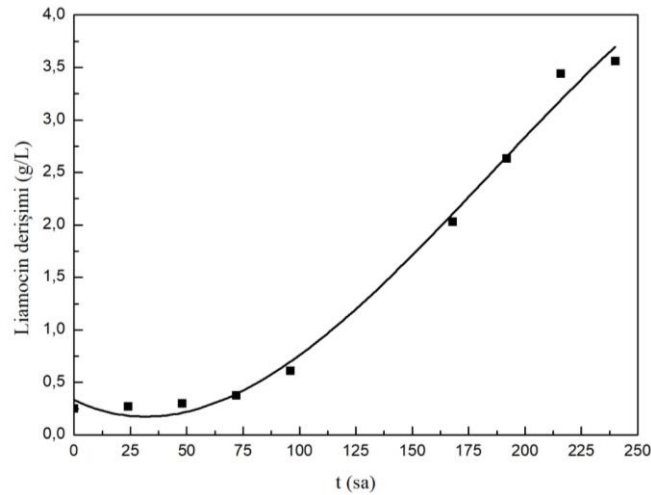


Şekil 4.54. İstenilen hedefe ulaşma oranının, fruktoz başlangıç derişimi ve pH ile değişimleri (X1= fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi, X2= pH)

Bu tez araştırmasında, program tarafından üretilen çözümler arasından, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu; 0.825 olan bir çözüm seçilerek, programın verdiği koşullarda bir optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. İlgili çizelgede seçilen çözüme (Çözüm no. 11) göre; fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişiminin; 93.47 g/L, başlangıç pH'ının; 4.92 ve sıcaklığın ise; 27.2°C olduğu optimum deney koşullarında yapılacak olan bir fermantasyon çalışması sonucunda, elde edilecek maksimum liamocin derişiminin; 4.90 g/L, mikroorganizma özgül üreme hızının; 0.07447 sa<sup>-1</sup> ve maksimum özgül liamocin üretim hızının ise; 0.00567 [g liamocin/(g mo.sa)] olacağı öngörülmüştür.

Optimizasyon işleminin gerçekleştirileceği işletme koşullarının belirlenmesinin ardından; bu koşullarda iki paralel deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler çalkalamalı bir su banyosunda, 100 mL fermantasyon ortamı içeren erlenlerde, 100 vuru/dak sabit çalkalama hızında, kesikli bir sistemde gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamlarına aşılacak olan *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun, başlangıç inokülasyon derişimi; 6.8 x 10<sup>7</sup> kob/mL olarak saptanmıştır. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda, her bir yanıtta ait elde edilen değerlerin ortalamaları hesaplanmış ve bu değerlerin zamanla değişimlerini gösteren grafikler çizilmiştir.

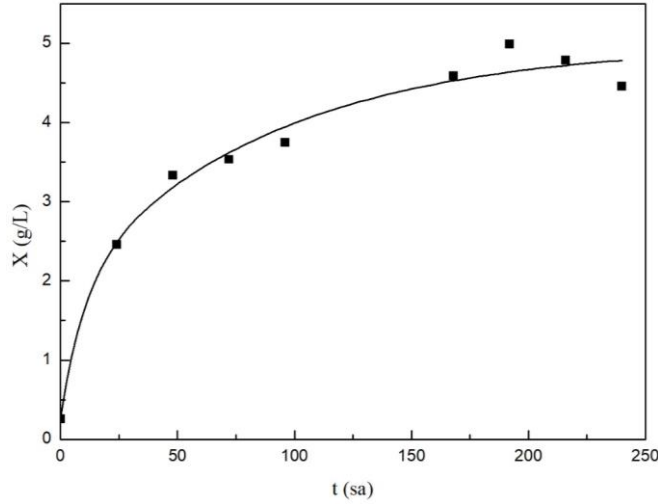
Şekil 4.55'te; optimizasyon çalışmasında, ilgili program tarafından saptanan optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100176 suşu tarafından üretilen liamocin derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik sunulmuştur.



Şekil 4.55. Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100716 tarafından üretilen liamocin derişiminin zamanla değişimi

Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100176 suşu tarafından üretilen liamocin derişiminin zamanla arttığı ve en yüksek derişimin; 3.56 g/L olarak fermantasyonun sonunda tayin edildiği belirlenmiştir.

Optimum çalışma koşullarında gerçekleştirilen deneyde, elde edilen biyokütle derişiminin, zamanla değişimini gösteren grafik; Şekil 4.56'da verilmiştir.



Şekil 4.56. Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun biyokütle derişiminin zamanla değişimi

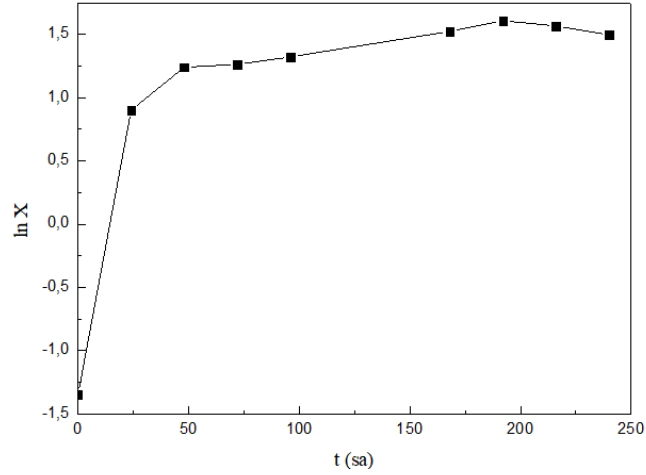
Bu grafik incelendiğinde; optimum fermantasyon koşullarında, biyokütle derişiminin fermantasyonun 192. saatine kadar arttığı ve bu koşullarda belirlenen en yüksek biyokütle derişiminin; 4.99 g/L olduğu belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmasında ayrıca; elde edilen biyokütle derişim sonuçlarından yararlanılarak, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun, özgül üreme hızı da hesaplanmıştır. Bu amaçla, anılan biyokütle derişimlerinin ln X değerleri hesaplanarak, bunların zamanla değişimlerini gösteren bir grafik (Şekil 4.57) çizilmiş ve ardından, üssel üreme bölgesindeki özgül üreme hızı hesaplanmıştır.

Şekil 4.57'de yer alan grafik yardımıyla hesaplanan; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu için optimum fermantasyon koşullarında, üssel üreme bölgesindeki mikroorganizma özgül üreme hızı ( $\mu$ );  $0.067 \text{ sa}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir.

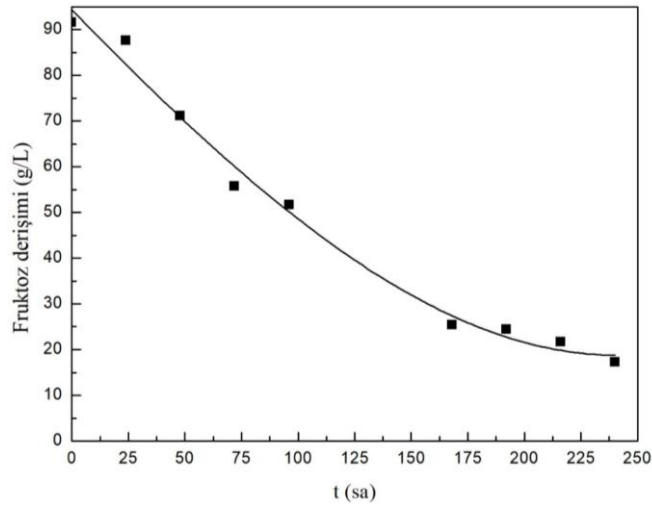
Optimizasyon aşamasında ayrıca; *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun, optimum fermantasyon koşullarındaki, maksimum özgül liamocin üretim hızı da hesaplanmıştır. Bu amaçla, Şekil 4.55'teki liamocin derişiminin zamanla değişimini gösteren grafik ve

Şekil 4.56'daki biyokütle derişiminin zamanla değişimini gösteren grafiklerden yararlanılmıştır. Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu için belirlenen en yüksek özgül liamocin oluşum hızı değeri; 0.0045 g liamocin/ (g mo.sa) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.57. Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu için ln X değerlerinin zamanla değişimi

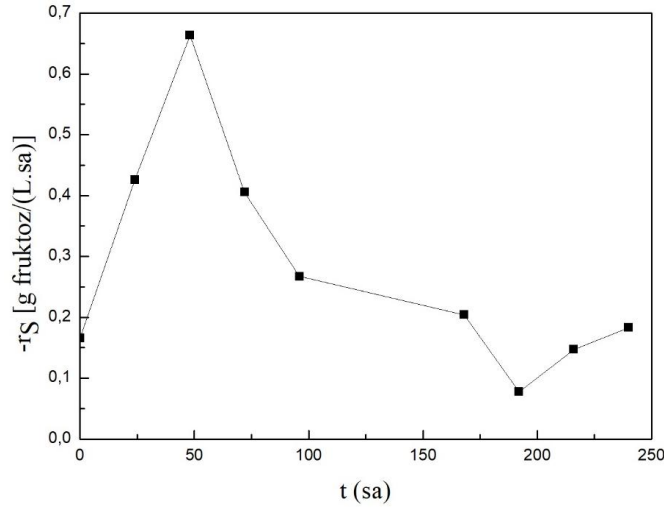
Şekil 4.58'de; optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deneylerde, fermantasyon ortamında bulunan fruktoz derişiminin, zamanla değişimini gösteren grafik yer almaktadır.



Şekil 4.58. Optimum çalışma koşullarında, fermantasyon ortamındaki fruktoz derişiminin zamanla değişimi

Optimum fermantasyon koşullarında gerçekleştirilen deney için, ortamdaki fruktoz derişiminin zamanla azaldığı ve fermantasyonun sonunda, ortamda bir miktar fruktozun (17.29 g/L) tüketilmeden kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.58).

Şekil 4.59'da ise; fruktoz tüketim hızının zamanla değişimini gösteren grafiğe yer verilmiştir.



Şekil 4.59. Optimum çalışma koşullarında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun fruktoz tüketim hızının zamanla değişimi

Söz konusu koşullar için en yüksek fruktoz tüketim hızı ise; fermantasyonun 48. saatinde 0.66 g fruktoz/(L.sa) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.59).

Bu çalışma sonucunda elde edilen; bağımlı değişkenlerin deneysel değerleri ve Eş. 4.1-4.3 yardımıyla hesaplanan teorik değerleri; Çizelge 4.10'da sunulmuştur. Optimizasyon deneylerinde elde edilen sonuçlar, Design Expert® 12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının ileri analizler (post analysis) bölümü kullanılarak, %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, tüm bağımlı değişkenlerin, ilgili program yardımı ile %95 güven aralığında, önceden türetilmiş olan model eşitliklerden (Eş. 4.1-4.3), optimum deney koşullarındaki minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra ise, söz konusu bu değerlerin, çalışmada belirlenen bağımlı değişkenlerin optimizasyon programını kullanarak belirlenen en yüksek ve en düşük değerler arasında olup olmadıkları incelenmiştir. Çizelge 4.10'da, bağımlı değişkenler için Eş. 4.1-4.3 kullanılarak hesaplanmış olan, minimum ve maksimum değerler görülmektedir.

Çizelge 4.10. Bağımlı değişkenlerin deneysel değerleri ve optimizasyon programı kullanılarak hesaplanan teorik, minimum ve maksimum değerleri

Bağımlı değişken	Simge	Deneysel değer	Teorik değer	Minimum değer	Maksimum değer
Maksimum liamocin derişimi (g/L)	Y1	3.56	4.90	1.80	8.00
Mikroorganizma özgül üreme hızı (sa <sup>-1</sup> )	Y2	0.0670	0.0744	0.04619	0.1027
Maksimum özgül liamocin üretim hızı [(g liamocin/(g mo.sa)]	Y3	0.0045	0.0057	0.00295	0.0084

Söz konusu çizelge incelendiğinde, bağımlı değişkenlere ait deneysel sonuçların, teorik değerlerine oldukça yakın oldukları ve aynı zamanda bu sonuçların program yardımı ile hesaplanan minimum ve maksimum değerler arasında oldukları tespit edilmiştir.

Ayrıca; programdaki doğrulama (confirmation) menüsü kullanılarak da; belirlenen optimum koşulların %95 güven aralığında kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu doğrulanmıştır.

Bu tezin hazırlanması sürecinde literatürde, merkezi tasarım yöntemini kullanarak, liamocin üretiminin optimizasyonunu gerçekleştiren bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte literatürde, liamocin fermantasyonu amacıyla, bir tarama tasarımı olan; Plackett-Burman tasarımını, ortam bileşiminin optimizasyonu amacıyla kullanan bir çalışma yer almaktadır (Leathers ve ark., 2018). Söz konusu çalışmada; *A. pullulans* NRRL 50384 suşu ile, antistreptokokal liamocin üretiminin amaçlandığı ifade edilmiştir. Söz konusu araştırmada; daha önceki çalışmalarda en yüksek liamocin derişiminin elde edildiği fermantasyon ortamındaki bileşenlerin, tek seferde tek faktör (one-factor-at-a-time) olarak ifade edilen bir tasarım yöntemi ile, farklı derişimlerde ayrı ayrı test edildikleri bildirilmiştir (Manitchotpisit ve ark., 2011). Uygulanan bu tasarım modelinde, her deneysel değişken için en yüksek ve en düşük değerler seçilerek bir deney tasarımının gerçekleştirildiği belirtilmiş ancak, sonuçlara uygulanan varyans analizi (ANOVA) sonucunda, test edilen değerler içinde, model terimlerinden hiçbirinin istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı da ( $p > 0.05$ ) rapor edilmiştir. Anılan çalışmada bu nedenle; deney

tasarımında denenen düşük değerin kabul edildiği  $K_2HPO_4$  bileşeni haricinde diğer bileşenler için; yüksek ve düşük değerlerin orta nokta değerleri kullanılarak optimize edilmiş bir ortam tasarlandığı bildirilmiştir.

Bununla birlikte çeşitli *A. pullulans* suşları ile liamocin üretimi üzerine yapılan sınırlı sayıdaki bazı çalışmalarda, *A. pullulans* NRRL 62041, 62034, 62038 ve 62039 suşları tarafından üretilen en yüksek liamocin derişimleri sırasıyla; 3.10, 2.30, 1.60 ve 1.30 g/L olarak rapor edilmiştir. Literatürde bulunan araştırmalarda, *A. pullulans* NRRL 50382 ve NRRL 62040 suşları ile çalışıldığında, bu suşlar tarafından üretilen liamocin derişimlerinin; 0.3 g/L'nin altında olduğu ifade edilmiştir. Manitchotpisit ve ark. (2014) tarafından yüksek derişimlerde liamocin üreticisi suşlar olarak; *A. pullulans* NRRL 62031, 62042 ve 50384 suşları tanımlanmış olup, bu suşlar ile çalışıldığında elde edilen en yüksek liamocin derişimlerinin ise; 7.0-8.6 g/L aralığında değıştiği de rapor edilmiştir.

#### **4.7. *A. pullulans* NBRC 100716 Suşu Tarafından Üretilen Liamocin Örneklerine Ait Spektroskopik Analizlerin Sonuçları**

##### **4.7.1. MALDI-TOF-MS Analizinin Sonuçları**

Bu tez çalışmasında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen yüksek derişimli bir liamocin örneğinin, MALDI-TOF-MS analizleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK)'nde, hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Analizler, daha önce Bölüm 3.2.8.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve bu analiz için; Bruker Daltonics marka, UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer model, bir spektrometre kullanılmıştır. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından fermantasyon yoluyla üretilmiş olan liamocin örneği için, analiz sonucunda elde edilmiş olan; MALDI-TOF-MS spektrumu; Şekil EK 8'de verilmiştir. Çizelge 4.11'de ise; liamocin örneğinin MALDI-TOF-MS analizleri sonucu elde edilen iyonların, kütle/yük (m/z) oranları ile literatürdeki benzer çalışmalarda elde edilen; m/z oranları verilmiştir.

Liamocin örnekleri; MALDI-TOF-MS pozitif iyon modunda analiz edilmiş ve 750-1010 Da aralığında;  $[M+Na]^+$  iyonları elde edilmiştir. Şekil EK 8'de verilen spektrum incelendiğinde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin baskın olarak Liamocin B1 (m/z 949.5) ve Liamocin A2 molekülünü (m/z 805.4) içerdiği görülmektedir. Bu majör iyonlara, minör iyonlar eşlik etmiştir ve bunlar arasında 42 Da'lık kütle farklılığı bulunduğu görülmektedir. Bu 42 Da kütle farkının, bir asetil grubu

ile farklılık gösteren ürünler için tipik olduğu rapor edilmiştir (Price ve ark., 2013). Bu nedenle spektrumda; m/z 763.4 ( $[805.4 - 42 + \text{Na}]^+$ ) iyonları görülmektedir (bkz. EK 8). Literatürde; m/z 763.4 ve m/z 949.5 piklerinin, asetillenmemiş liamocin bileşiğinden ve 805.4'teki pikin, mono asetillenmiş bileşiklerden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Manitchotpisit ve ark., 2011; Price ve ark., 2013). Bu veriler sırasıyla;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  m/z 763.2 ve 949.4 iyonlarına yol açan 740.2 ve 926.4 Da kütleli, asetillenmemiş iki tip liamocin (Liamocin A1 ve B1) olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  iyonlarını sırasıyla m/z; 805.2 ve 991.4 veren; kütleleri; 782.2 ve 968.4 Da olan, iki tip mono-asetillenmiş Liamocin A2 ve B2 olduğu ifade edilmektedir (Price ve ark., 2013).

Çizelge 4.11. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen ve bazı literatür çalışmalarından alınan liamocin örneklerine ait MALDI-TOF-MS spektrumları sonuçları

Bileşik	MALDI-TOF-MS $[\text{M} + \text{Na}]^+$ iyonları kütle/yük (m/z) oranları		
	<i>A. pullulans</i> NRRL 50380 (Price ve ark., 2013)	<i>A. melanogenum</i> AS37 (Saika ve ark., 2020)	<i>A. pullulans</i> NBRC 100716
Liamocin A1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	763.20	763.45	763.40
Liamocin A2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	805.20	805.46	805.40
Liamocin B1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	949.30	949.57	949.50
Liamocin B2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$	991.40	991.58	993.50

Manitchotpisit ve ark. (2011), farklı suşların, farklı liamocin profilleri ürettiklerini bildirmiştir. *A. pullulans* NRRL 58544, NRRL 58547, NRRL 58551, NRRL 58558 suşları tarafından üretilen liamocin profilini baskın olarak; Liamocin A2 (m/z 805.2)'nin oluşturduğunu; *A. pullulans* NRRL Y-2581, NRRL Y-4026 ve NRRL 4588 suşları için ise, üretilen liamocinin büyük oranda; m/z oranı 949.4 olan Liamocin B1'den oluştuğu rapor edilmiştir. *A. pullulans* NRRL 50380, NRRL 58556 ve NRRL Y-12974 suşlarının



ise; Liamocin A2 ve B1’i eşit oranda içerdikleri belirtilmiştir. Anılan çalışmada liamocin profilleri karşılaştırılan suşların tamamının, Liamocin A1 içerdiği belirtilirken, Liamocin B2’nin bazı suşlarda küçük oranlarda yer aldıkları ifade edilmektedir (Manitchotpisit ve ark., 2014).

#### 4.7.2 GC-FID Analizi Sonuçları

Bu tez çalışmasında; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen bazı liamocin örneklerinin GC-FID analizleri, Hitit Üniversitesi HÜBTUAM-Kromatografik Analiz Teknikleri Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.12’de, gerçekleştirilen GC-FID analizi sonucunda elde edilen; yağ asidi kompozisyonu verilmektedir. Liamocin örneğine ait doymuş/doymamış yağ asidi yüzdeleri ise, Çizelge 4.13’de sunulmuştur.

Çizelge 4.12. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğinin yağ asidi kompozisyonu

Alıkonma süresi	Yağ asidi	Alan (%)
4.69	Kaproik asit (C <sub>6:0</sub> )	0.019
8.15	Kaprilik asit (C <sub>8:0</sub> )	0.012
12.51	Kaprik asit (C <sub>10:0</sub> )	0.045
14.89	Undekanoik asit (C <sub>11:0</sub> )	0.042
17.14	Laurik asit (C <sub>12:0</sub> )	0.011
19.89	Tridekanoik asit (C <sub>13:0</sub> )	0.060
22.70	Miristik asit (C <sub>14:0</sub> )	0.086
25.77	Pentadekanoik asit (C <sub>15:0</sub> )	0.030
29.12	Palmitik asit (C <sub>16:0</sub> )	25.000
30.55	Palmitoleik asit (C <sub>16:1</sub> )	0.450
32.14	Heptadekanoik asit (C <sub>17:0</sub> )	0.155
35.67	Stearik asit (C <sub>18:0</sub> )	34.488
36.9	Oleik asit (C <sub>18:1</sub> )	33.451
39.07	Linoleik asit (C <sub>18:2</sub> )	4.799
41.56	Araşidik asit (C <sub>20:0</sub> )	0.920
41.82	$\alpha$ -Linolenik asit (C <sub>18:3</sub> )	0.105
42.77	Eikosenoik asit (C <sub>20:1</sub> )	0.066
47.76	Behenik asit (C <sub>22:0</sub> )	0.137
53.12	Lignocerik asit (C <sub>24:0</sub> )	0.123

Çizelge 4.13. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğinin doymuş ve doymamış yağ asidi oranları

Yağ asidi	%
Doymuş	61.128
Doymamış	38.871
Tekli doymamış	33.967
Çoklu doymamış	4.904

Çizelge 4.12-13'deki yağ asidi oranları incelendiğinde; *A. pullulans* NBRC 100716 tarafından üretilen liamocinin yapısında; % 61.12 oranında doymuş, % 38.87 oranında ise, doymamış yağ asitlerinin yer aldığı görülmektedir. Doymamış yağ asitlerinin % 33.97'si tekli doymamış yağ asitleri iken; % 4.90'ı çoklu doymamış yağ asitleri olarak belirlenmiştir. GC-FID analizi gerçekleştirilen liamocin örneğinin ağırlıklı kompozisyonunun; palmitik asit (C<sub>16:0</sub>), stearik asit (C<sub>18:0</sub>), oleik asit (C<sub>18:1</sub>) ve linoleik asit (C<sub>18:2</sub>)'ten oluştuğu ve bu yağ asitlerinin oranlarının da sırasıyla; % 25.00, 34.49, 33.45 ve 4.80 oldukları görülmektedir.

*A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğine ait, GC-FID analizi sonucunda elde edilen kromatogram ise; EK 9'da verilmiştir.

Literatürde, *A. pullulans* var. *melanogenum* P10 suşu tarafından üretilmiş olan tek hücre yağı için, yağ asidi kompozisyonunun belirlendiği bir çalışmada; yağ asidi bileşiminin esas olarak palmitik asit (C<sub>16:0</sub>), palmitoleik asit (C<sub>16:1</sub>), stearik asit (C<sub>18:0</sub>), oleik asit (C<sub>18:1</sub>) ve linoleik asit (C<sub>18:2</sub>)'ten oluştuğu rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2014). Anılan çalışmada, belirlenen yağ asitlerinin yüzdelerinin ise sırasıyla; % 26.7, 1.7, 6.1, 44.5 ve 21.0 olarak belirlendikleri ifade edilmiştir. Konu olan çalışmada belirlenen yağ asidi bileşiminin, bitkisel yağların yapısındakilere benzer olduğu, bu sebeple de *A. pullulans* var. *melanogenum* P10 suşu tarafından üretilen bu yağların, biyodizel üretimi amacıyla iyi bir hammadde olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2014).

Dünyada üretilen biyodizelin % 95'inden fazlasının yemeklik bitkisel yağlardan elde edildiği ve bu durumun da; dünya çapında bitkisel yağ üretimine olan talebi arttırdığı bildirilmektedir (Beopoulos, Nicaud ve Gaillardin, 2011).

Bu tez araştırmasında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin yağ asidi kompozisyonunun da, bitkisel yağların yapısındakine benzer bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle de tez çalışmamızda üretilen liamocinin küresel anlamda artan yağ talebini karşılamak konusunda, potansiyel uygulamaları olabilecek kıymetli bir yağ olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanısıra; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin bileşiminde, insan vücudunda sentezlenemeyen ve dışarıdan alınması zorunlu olan esansiyel yağ asitlerinden;  $\alpha$ -linolenik ve linoleik asitlerin de bulunduğu saptanmıştır. Bu açıdan da, tez çalışmamızda *A. pullulans* NBRC 100716 suşunu kullanarak üretmiş olduğumuz liamocinin, insan vücudu için elzem bazı yağ asitleri için potansiyel bir kaynak olabileceği ancak bu konuda ileri bazı çalışmalar yapılması gerektiği öngörülmektedir.

#### **4.8. *A. pullulans* NBRC 100716 Suşu Tarafından Üretilen Liamocin Örneklerinin Biyosümfektan Aktivitelerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar**

##### **4.8.1. Yağ Yayma Testine İlişkin Sonuçlar**

Bu tez araştırmasında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretiminin optimizasyonu amacıyla gerçekleştirilen deneylerde elde edilen liamocin örneklerinden bazılarına, daha önce Bölüm 3.2.15.1’de anlatıldığı gibi yağ yayma testi uygulanmıştır (bkz. Şekil EK 10). Bu aşamada, liamocin derişimleri ile, zon çapları arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışma doğrusu da oluşturulmuştur (Şekil EK 11). Söz konusu grafiğe göre, 1 g/L liamocin derişiminde elde edilen yağ yayma çapı; 7.8 cm olarak elde edilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerde, çalışılan suş tarafından üretilen liamocin örneklerine ilişkin, yağ açma deneyi sonuçları; Çizelge 4.14’te verilmektedir.

Çizelge 4.14 incelendiğinde görülebileceği gibi, optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyde, fermantasyonun 48. saatinde elde edilen liamocin örneğine (1.07 mg/mL) uygulanan test sonucunda elde edilen yağ açma çapı; 8.00 cm olarak ölçülmüştür. Test sırasında, fermantasyonun 0, 24 ve 48. saatlerinde, liamocin örneklerinin yağ yayma çapları herhangi bir seyreltmeye gerek olmaksızın, testin yapıldığı 90 mm’lik petri kutularında ölçülebilmştir.

Daha sonra ise, fermantasyon süresince liamocin üretiminin artması ve petri kutusu çapından kaynaklanan kısıtlamadan dolayı, seyreltilerek ölçülmüştür.

Çizelge 4.14. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deney için, liamocin derişiminin zamanla değişimi ve yağ açma testi sonuçları

<b>t (sa)</b>	<b>Fermantasyon ortamındaki liamocin derişimi (g/L)</b>	<b>Testte kullanılan liamocin miktarı* (mg)</b>	<b>SO</b>	<b>Testte kullanılan, seyreltilmiş örnekteki liamocin miktarı** (mg)</b>	<b>Çap (cm)</b>
0	0.27	0.90	-	0.90	5.60
24	0.29	0.97	-	0.97	5.90
48	0.32	1.07	-	1.07	8.00
72	0.37	1.23	1:2	0.62	5.10
96	0.63	2.10	1:3	0.70	5.90
168	2.03	6.77	1:8	0.85	6.25
192	2.63	8.77	1:10	0.88	6.50
216	3.44	11.47	1:11	1.04	7.75
240	3.56	11.87	1:11	1.08	8.10

\*: 3 mL MEK'te çözülen, SO: Seyreltme oranı, \*\*seyreltme MEK ile yapılmıştır.

Örnekler uygun hacimlerde MEK çözültisi kullanılarak, çaplarının ölçülebileceği derişimlere seyreltilmiştir (bkz. Çizelge 4.14). Fermantasyon süresince liamocin örneklerinin derişimlerindeki artıştan dolayı seyreltme oranları da artmıştır.

Optimum koşullarda gerçekleştirilen bu deney için en yüksek çap değeri fermantasyon sonunda elde edilmiştir.

Fermantasyon sonunda (240. saat) üretilen liamocin örneğinin yağ yayma çapı; 8.10 cm olarak ölçülmüş olup, seyreltme oranı; 1:11 olarak uygulanmıştır.

Bu tez araştırmasında, çalışılan suşun biyosüpfektan üretme yeteneğinin belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin, biyosüpfektan karakterde olduğu bulunmuştur. Bunun yanısıra, üretilen liamocinin biyosüpfektan kapasitesinin, mevcut ticari sentetik süpfektanlar ile rekabet edebilir ölçüde olduğu da belirlenmiştir.

Youssef ve ark. (2004) tarafından gerçekleştirilen ve çeşitli *Bacillus* suşları tarafından üretilen biyosümfektanların tespit edilmesi için üç farklı yöntemin karşılaştırıldığı bir çalışmada, berrak zon çapı ve biyosümfektan derişimi arasında, belirli bir derişim aralığında (50-400 mg/L) doğrusal bir ilişki olduğu ve yağ yayma testinin, biyosümfektan üretiminin tespiti amacıyla kullanılabilir bir yöntem olduğu ifade edilmiştir (Youssef ve ark., 2004).

*A. pullulans* LB83 suşu tarafından üretildiği belirtilen bir biyosümfektanın, yağ yayma kapasitesinin ölçüldüğü bir çalışmada; elde edilen en yüksek yağ yayma çapının, 1.52 g/L liamocin için; 8.05 cm olduğu bildirilmiştir (Brumano ve ark., 2017). Anılan çalışmada ayrıca; ticari olarak kullanılan bazı sentetik sümfektanların yağ açma çaplarının da ölçüldüğü ve Tween 20, Tween 80 ve SDS (10 g/L) için berrak zon çaplarının sırasıyla; 6.5, 5.0 ve 4.8 cm olarak belirlendikleri rapor edilmiştir. Bu sonucun; *A. pullulans* LB83 suşu tarafından üretilen poliöl lipidlerin yağ açma çaplarının, test edilen sümfektanlardan daha yüksek olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Brumano ve ark., 2017).

Bir diğer araştırmada *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarını da içeren 105 deniz bakterisinden izole edilen çeşitli biyosümfektanlar için tespit edilen en yüksek yağ yayma çapı; 3.5 cm olarak bildirilmiştir (Thavasi, Jayalakshmi ve Banat, 2011).

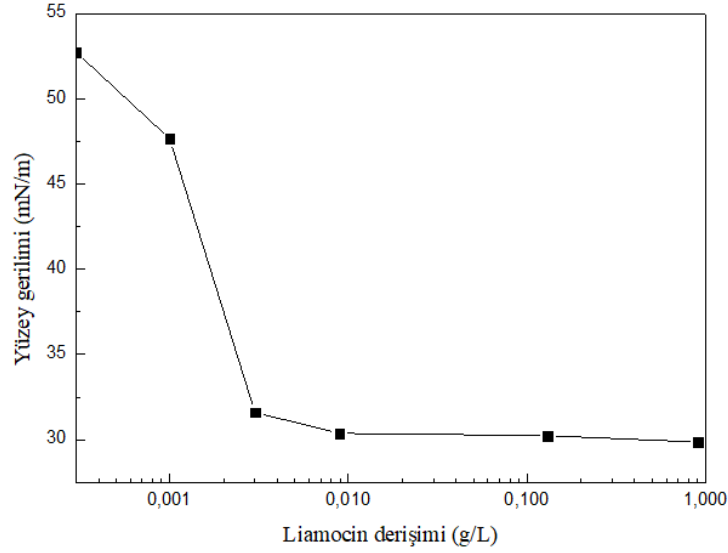
Silva ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir başka araştırmada ise, filamentli bir fungus olan; bir *Cunninghamella echinulata* suşundan elde edilen ve saflaştırılan bir biyosümfektanın, %1 (w/v) oranında kullanılması sonucu elde edilen maksimum yağ yer değiştirme zonu çapının; 6.89 cm olduğu rapor edilmiştir

#### **4.8.2. Yüzey Gerilimi Değerlerinin Ölçülmesine İlişkin Sonuçlar**

*A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin yüzey gerilimi değerleri ölçümleri daha önce bölüm 3.2.15.2'de anlatıldığı şekilde, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde gerçekleştirilmiştir. Pendant drop (asılı damla) yöntemiyle gerçekleştirilen bu ölçümlere dair elde edilen sonuçlar Şekil 4.60'da sunulmuştur.

Asılı damla yöntemi ile oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilen yüzey gerilimi ölçümlerinde, deneyde kullanılan ultra saf suyun yüzey gerilimi değeri; 72.30 mN/m olarak ölçülmüştür. Su/etil alkol (80:20) (v/v) karışımının yüzey gerilimi ise; 52.73 mN/m olarak ölçülmüştür. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen; su/etil alkol (v/v; 80:20) içerisinde çözüldürülmüş olan 0.003 g/L derişimindeki liamocin örneğinin suyun

yüzey gerilimi değerini; 31.6 mN/m'ye, 0.9 g/L derişimindeki liamocinin ise; 29.86 mN/m'ye düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.60). Aynı deney koşullarında hazırlanmış (su/etil alkol çözeltisinde) anyonik ticari bir sürfektan olan SDS için ise yüzey gerilimi değeri; 32.23 mN/m olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.60. Farklı derişimlerdeki liamocin çözeltilerinin yüzey gerilimlerinin liamocin derişimleri ile değişimi

Literatürde liamocin örnekleri için ölçülen yüzey gerilimi değerlerinin; 27mN/m ile 31.5 mN/m arasında değiştii rapor edilmektedir (Manitchotpisit ve ark., 2011; Kim, Lee ve Yun, 2015).

Manitchotpisit ve ark. (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; *A. pullulans* NRRL 50380 suşu tarafından üretilen liamocin örneklerinin 67 mN/m olarak ölçülen suyun yüzey gerilimi değerini; 27 mN/m'ye düşürebildiği rapor edilmiştir.

Gerçekleştirilen bir başka araştırmada ise; suyun yüzey geriliminin 72.8 mN/m olarak ölçülürken; *A. pullulans* L3-GPY suşu tarafından üretilen liamocinin bu değeri, 1.5 mg/L derişimde; 31.5 mN/m'ye düşürdüğü ifade edilmiştir. İlgili çalışmada; liamocin örneğinin düşük derişimde kullanılmasına rağmen diğer sürfektan maddelerden daha düşük yüzey gerilimi değerleri ortaya koyduğu ve bu sebeple de etkili bir biyo-yüzey aktif madde olarak tanımlanabileceği ifade edilmektedir (Kim, Lee ve Yun, 2015). Liamocin örnekleri için ölçülen bu yüzey aktivite değerlerinin, ticari yüzey aktif maddeler için belirlenen yüzey gerilimi değerleri aralığında olduğu ifade edilmektedir (Garay ve ark., 2018).

Tez araştırmasının bu kısmında elde edilen sonuçlara göre, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin, suyun yüzey gerilimini (72.30 mN/m) oldukça düşürdüğü (31.60 mN/m) bulunmuştur. Bu yüzey gerilimi değerinin, ticari bir sürfektan olan SDS'nin yüzey geriliminden (32.23 mN/m) daha düşük olduğu görülmektedir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bu açıdan incelendiğinde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin, ticari sürfektanlarla rekabet edebilecek, oldukça etkin bir biyosürfektan olarak tanımlanabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda üretilen liamocinin, biyosürfektan niteliğine yönelik bazı araştırma açılımlarına sahip olabileceği de öngörülmektedir.

## 5. SONUÇ

Bu tez araştırmasında, nadir *A. pullulans* suşları tarafından üretilen, ağır yağ olarak da adlandırılan ve poliöl lipid yapısında olan liamocin üretimi üzerinde çalışılmıştır. Tezde esas olarak, bazı fermantasyon parametrelerinin bu çalışma için en iyi üretici olarak belirlenen *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkileri incelenmiş ve çalışma kapsamında bir optimizasyon çalışması da gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde halen liamocin üretimine yönelik bir başka çalışmanın bulunmaması, yurtdışı literatüründe ise, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretiminin incelenmemiş ve liamocin fermantasyonu için kullanılan diğer suşlar ile ortam bileşimi üzerine farklı bir yöntem ile yapılan tek bir optimizasyon çalışmasının dışında, başka çalışmanın bulunmaması nedeni ile de, bu tez çalışmasının özgün, ülkemiz açısından ilk ve öncü bir araştırma olduğu düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen genel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Bu tez çalışmasının ilk aşamasında; çeşitli kültür koleksiyonlarından sağlanmış olan beş farklı *A. pullulans* suşu ile laboratuvarımızda yapılmış olan önceki çalışmalarda, taze Gemlik zeytini örneklerinden izole edilmiş olan; *A. pullulans* AZ-6 suşunun liamocin üretme yetenekleri, agarlı bir besiyeri kullanılarak, bir ön tarama testi yardımıyla görsel olarak incelenmiştir. Uygulanan bu test sonucunda incelenen tüm suşların, karbon kaynağı olarak bileşiminde üç farklı şekerin ayrı ayrı denedikleri besiyerinde gelişebildikleri ve aynı zamanda liamocin üretiminin bir belirteci olarak kabul edilen yağ tabakasını üretebildikleri gözlemlenmiştir. Daha sonra söz konusu suşların liamocin üretim kapasiteleri, tanımlı bir fermantasyon ortamında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen fermantasyon deneyleri, kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. İncelenen altı farklı suş arasından; *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun, diğerlerinden daha yüksek derişimde (4.20 g/L) liamocin üretebildiği belirlenmiştir ve araştırmaya bu suş ile devam edilmesine karar verilmiştir.
2. Farklı karbon kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimi üzerine etkilerinin incelendiği deneylerde, karbon kaynakları olarak; glukoz, fruktoz, maltoz ve sakkaroz kullanılmıştır. Kesikli sistemde, 100 vuru/dak çalkalama hızındaki su banyosu kullanılarak ve 28°C’de gerçekleştirilen bu deneylerde 100 mL’lik fermantasyon ortamları kullanılmıştır.



Bu deneylerdeki en yüksek liamocin derişimi (5.50 g/L), fermantasyon ortamında fruktozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı denemede elde edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarına; karbon kaynağı olarak fruktozu içeren fermantasyon ortamları kullanılarak devam edilmiştir.

3. Farklı azot kaynaklarının *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretimine etkilerinin araştırıldığı deneylerde; organik azot kaynakları olarak pepton ve maya özütü; inorganik azot kaynağı olarak ise;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kullanılmıştır. Kesikli sistemde, aynı koşullarda gerçekleştirilen deneylerde pepton ve maya özütünün, azot kaynağı olarak bir arada kullanıldığı fermantasyon ortamında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun liamocin üretiminin (4.26 g/L), diğer azot kaynaklarının kullanıldığı ortamlardakine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Tez çalışmasının sonraki deneylerinde, fermantasyon ortamlarında bu azot kaynağı kombinasyonu kullanılarak devam edilmiştir.
4. Bu araştırmada daha sonra; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu ile liamocin üretimi amacıyla, bazı fermantasyon koşullarının, yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; Design Expert ® 12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programının deneme sürümünde yer alan; dönüşümlü merkezi karma tasarım yöntemi kullanılmıştır. Söz konusu program tarafından oluşturulan deney tasarım planına göre; merkez noktada 6 paralel olmak üzere, 20 deney gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bağımsız değişkenler olarak; fermantasyon ortamının fruktoz başlangıç derişimi (X1), pH (X2) ile sıcaklık (X3), bağımlı değişkenler olarak ise; maksimum liamocin derişimi (Y1), mikroorganizma özgül üreme hızı (Y2) ve maksimum özgül liamocin üretim hızı (Y3) seçilmiştir. Seçilen üç farklı bağımsız değişken için beş farklı düzeyde çalışılmıştır.
5. Tez çalışmasının bu aşamasında daha sonra; söz konusu program tarafından oluşturulan tasarım planındaki deneyler gerçekleştirilmiş ve seçilen üç bağımsız değişkenin elde edilen yanıtlar üzerindeki etkilerini gösteren bazı model eşitlikler türetilmiştir. Türetilen bu model eşitliklerin uygunlukları varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir ve çalışmada elde edilen tüm modellerin önemli ( $p < 0.05$ ) ve uyum eksikliğinin önemsiz ( $p > 0.05$ ) oldukları belirlenmiştir. Ayrıca; program yardımıyla elde edilen yanıt yüzey ve kontür grafikleri kullanılarak bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri incelenmiştir.
6. Bu aşamada daha sonra, Design Expert ® 12 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılarak, seçilen bağımlı değişkenlerin (yanıtların), belirlenen

hedefler doğrultusunda sağlanabilmeleri için fermantasyon koşullarının nümerik optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak programda yer alan; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonundan yararlanılarak, bağımlı ve bağımsız değişkenler için hedefler belirlenmiştir ve belirlenen hedefler doğrultusunda program tarafından 58 farklı çözüm önerilmiştir. Bu çözümler arasından istenilen hedefe ulaşma oranı yüksek (0.825) bir çözüm seçilerek, bu çözüm doğrultusunda önerilen deney koşullarında iki paralel olacak şekilde bir deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneyin koşulları ilgili program tarafından; fermantasyon ortamı fruktoz başlangıç derişimi, 93.47 g/L, başlangıç pH'ı 4.92 ve sıcaklık ise; 27.2°C olarak önerilmiştir. Bu koşullarda elde edilecek maksimum liamocin derişiminin; 4.90 g/L, mikroorganizma özgül üreme hızının; 0.074 sa<sup>-1</sup> ve maksimum özgül liamocin üretim hızının ise; 0.00567 [g liamocin/(g mo.sa)] olacağı öngörülmüştür. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda; maksimum liamocin derişimi; 3.56 g/L, mikroorganizma özgül üreme hızı; 0.0670 sa<sup>-1</sup> ve maksimum özgül liamocin üretim hızı; 0.00450 [g liamocin/(g mo.sa)] olarak elde edilmiştir. Deneysel olarak elde edilen bu sonuçlar ile program tarafından önerilen teorik değerler, yine aynı programın doğrulama menüsü kullanılarak karşılaştırılmış ve önerilen optimum koşullarda elde edilen deneysel verilerin; %95 güven aralığında, minimum ve maksimum değerler arasında olduğu istatistiksel olarak doğrulanmıştır.

7. Bu tez çalışmasında ayrıca; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin karakterizasyonu amacıyla, yüksek derişimli bazı örneklerle, MALDI-TOF-MS ve GC-FID analizleri de yaptırılmıştır. MALDI-TOF-MS analizleri sonucunda elde edilen spektrum incelendiğinde ve literatürdeki benzer sonuçlarla karşılaştırıldığında; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin baskın olarak; m/z 949.5 olan Liamocin B1 ve m/z 805.4 olan Liamocin A2 moleküllerini içerdiği ve bu suş tarafından üretilen ağır yağların liamocin oldukları doğrulanmıştır. GC-FID analizi sonucunda ise; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin yağ asidi profili belirlenmiş ve yapısında; % 61.12 oranında doymuş, % 38.87 oranında ise doymamış yağ asitlerini içerdiği tespit edilmiştir. Belirlenen bu yağ asidi kompozisyonunun, bitkisel yağların yağ asidi bileşimine benzer olduğu, bu sebeple de; bu tez çalışmasında bulunan liamocinin ileride, mikrobiyel tek hücre yağı üretimine yönelik araştırmalarda da değerlendirilebileceği öngörülmüştür.

8. Bu tez araştırmasında ayrıca; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin, biyosürfektan aktivitesini belirlemeye yönelik bazı testler de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla uygulanan yağ yayma (açma) testi sonucunda; 1.08 mg/mL derişimdeki liamocin örneğinin yağ yayma çapı; 8.10 cm olarak llmştir. Söz konusu test sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin, düşük derişimlerde bile etkili bir biyosürfektan kapasitesinin olduğu belirlenmiştir.
9. Bu tez çalışmasında son olarak; *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğinin yüzey gerilimi değerini, pendant drop (asılı damla) yöntemiyle llmştir. Liamocin örneğinin suyun yüzey gerilimi değerini; 72.30 mN/m'den 31.6 mN/m'ye düşürdüğü belirlenmiştir. Bu değerin, çeşitli ticari sürfektanların yüzey gerilimi değerlerinden daha düşük olduğu ve *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin, ticari olarak kullanılan bazı biyosrfektanlarla rekabet edebilir nitelikte olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocinin; yeni ve etkili bir biyosürfektan olarak kullanılabileceği ve bu açıdan da tez çalışmasında üretilen liamocinin gelecekteki uygulamaları bakımından oldukça umut verici bir biyomolekül olduğu düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akkuş, M.S., Karabudak, S., Biyoproses Çalışmalarında Deneysel Tasarım Yönteminin Uygulanması, İleri Mühendislik Çalışmaları ve Teknolojileri Dergisi, 1 (2020) 188-197.
- Anschau, A., Lipids from Oleaginous Yeasts: Production and Encapsulation, Nutrient Delivery, GRUMEZESCU, A. M. (ed.) Academic Press, Cambridge, 2017.
- Arashiro, E.Y., Demarquette, N.R., Use of the pendant drop method to measure interfacial tension between molten polymers, Materials Research-ibero-american Journal of Materials, 2 (1999) 23-32.
- Aydar, A.Y., Bağdatlıoğlu, N., Yemelik Yağların Yüzey Gerilimi ve Temas Açılarının Belirlenmesinde Uygulanan Yöntemler, Akademik Gıda, 12 (2014) 108-114.
- Bemiller, J.N., Carbohydrate chemistry for food scientists, Elsevier, 2018.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., Gaillardin, C., An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes, Applied Microbiology and Biotechnology, 90 (2011) 1193-1206.
- Berry, J.D., Neeson, M.J., Dagastine, R.R., Chan, D.Y., Tabor, R.F., Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry, Journal of colloid and interface science, 454 (2015) 226-237.
- Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Design of experiments: a powerful tool in food microbiology, Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, (2010) 1419-1429.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, Talanta, 76 (2008) 965-977.
- Bhattacharya, S., Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy, Response surface methodology in engineering science, IntechOpen, 2021.
- Bischoff, K.M., Leathers, T.D., Price, N.P., Manitchotpisit, P., Liamocin oil from *Aureobasidium pullulans* has antibacterial activity with specificity for species of *Streptococcus*, The Journal of Antibiotics (Tokyo), 68 (2015) 642-645.
- Bozoudi, D., Tsaltas, D., The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector, Fermentation-Basel, 4 (2018).

- Brumano, L.P., Antunes, F.a.F., Souto, S.G., Dos Santos, J.C., Venus, J., Schneider, R., Da Silva, S.S., Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process, *Bioresource Technology*, 243 (2017) 264-272.
- Caporusso, A., Capece, A., De Bari, I., Oleaginous Yeasts as Cell Factories for the Sustainable Production of Microbial Lipids by the Valorization of Agri-Food Wastes, *Fermentation-Basel*, 7 (2021).
- Chang, Y.-H., Chang, K.-S., Lee, C.-F., Hsu, C.-L., Huang, C.-W., Jang, H.-D., Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source, *Biomass and bioenergy*, 72 (2015) 95-103.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., Zhang, T., Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (2009) 793-804.
- Clarke, K.G., Microbial kinetics during batch, continuous and fed-batch processes, *Bioprocess Engineering*, (2013) 97-146.
- Desai, J.D., Banat, I.M., Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol Mol Biol Rev*, 61 (1997) 47-64.
- Doran, P.M., *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, Oxford, 2013.
- Dönmez, S., *Endüstriyel Mikrobiyoloji, Kavramlar, Kurallar ve Uygulamalar*, Sidas, İzmir, 2017.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical chemistry*, 28 (1956) 350-356.
- Eldin, A.M., Kamel, Z., Hossam, N., Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods, *Microchemical Journal*, 146 (2019) 309-314.
- Eren, İ. Patateslerin osmotik dehidrasyonunun “response surface” metodu kullanılarak optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İzmir, 2004.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Giovanna, M., M, I., *Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials*, InTech, 2012.

- Garay, L.A., Sitepu, I.R., Cajka, T., Xu, J., Teh, H.E., German, J.B., Pan, Z.L., Dungan, S.R., Block, D.E., Boundy-Mills, K.L., Extracellular fungal polyol lipids: A new class of potential high value lipids, *Biotechnology Advances*, 36 (2018) 397-414.
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M., Gaur, M.K., *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan, *African Journal of Biotechnology*, 9 (2010) 7989-7997.
- Guo, J., Huang, S.Y., Chen, Y.F., Guo, X.W., Xiao, D.G., Discovering the role of the apolipoprotein gene and the genes in the putative pullulan biosynthesis pathway on the synthesis of pullulan, heavy oil and melanin in *Aureobasidium pullulans*, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34 (2018).
- Jahan, R., Bodratti, A.M., Tsianou, M., Alexandridis, P., Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 275 (2020).
- Jain, A., Jain, R., Jain, S., . Basic techniques in biochemistry, microbiology and molecular biology, Springer, 2020.
- Kang, X.-X., Jia, S.-L., Wei, X., Zhang, M., Liu, G.-L., Hu, Z., Chi, Z., Chi, Z.-M., Liamocins biosynthesis, its regulation in *Aureobasidium* spp., and their bioactivities, *Critical Reviews in Biotechnology*, 42 (2022) 93-105.
- Karamerou, E.E., Webb, C., Cultivation modes for microbial oil production using oleaginous yeasts—A review, *Biochemical Engineering Journal*, 151 (2019) 107322.
- Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S., Response surface methodology, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2 (2010) 128-149.
- Kim, J.S., Lee, I.K., Yun, B.S., A Novel Biosurfactant Produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a Tiger Lily Wild Flower, *Lilium lancifolium* Thunb, *Plos One*, 10 (2015).
- Koç, B., Ertekin, F., Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Gıda*, 35 (2010) 1-8.
- Kurosawa, T., Sakai, K., Nakahara, T., Oshima, Y., Tabuch, T., Extracellular accumulation of the polyol lipids, 3, 5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decenoyl esters of arabitol and mannitol, by *Aureobasidium* sp, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58 (1994) 2057-2060.
- Leathers, T.D., Price, N.P.J., Bischoff, K.M., Manitchotpisit, P., Skory, C.D., Production of novel types of antibacterial liamocins by diverse strains of *Aureobasidium*

- pullulans grown on different culture media, *Biotechnology Letters*, 37 (2015) 2075-2081.
- Leathers, T.D., Skory, C.D., Price, N.P.J., Nunnally, M.S., Medium optimization for production of anti-streptococcal liamocins by *Aureobasidium pullulans*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13 (2018) 53-57.
- Li, E., Orduña, R., A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance, *Letters in Applied Microbiology*, 50 (2010) 283-288.
- Li, Y., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Liu, G.L., Lee, C.F., Ma, Z.C., Chi, Z.M., Taxonomy of *Aureobasidium* spp. and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers, *Crit Rev Microbiol*, 41 (2015) 228-237.
- Liu, Y.-Y., Chi, Z., Wang, Z.-P., Liu, G.-L., Chi, Z.-M., Heavy oils, principally long-chain n-alkanes secreted by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* strain P5 isolated from mangrove system, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41 (2014) 1329-1337.
- Manitchotpisit, P., Price, N.P.J., Leathers, T.D., Punnapayak, H., Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnology Letters*, 33 (2011) 1151-1157.
- Manitchotpisit, P., Watanapoksin, R., Price, N.P.J., Bischoff, K.M., Tayeh, M., Teeraworawit, S., Kriwong, S., Leathers, T.D., *Aureobasidium pullulans* as a source of liamocins (heavy oils) with anticancer activity, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30 (2014) 2199-2204.
- Marchant, R., Banat, I., Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?, *Biotechnology Letters*, 34 (2012) 1597-1605.
- Markande, A.R., Patel, D., Varjani, S., A review on biosurfactants: properties, applications and current developments, *Bioresource Technology*, 330 (2021).
- Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry*, 31 (1959) 426-428.
- Mirzaee, H., Khodaiyan, F., Kennedy, J.F., Hosseini, S.S., Production, optimization and characterization of pullulan from sesame seed oil cake as a new substrate by *Aureobasidium pullulans*, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 1 (2020) 100004.
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants, *Biochim Biophys Acta*, 1488 (2000) 211-218.

- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons, **2016**.
- Nielsen, S.S., Total carbohydrate by phenol-sulfuric acid method, Food analysis laboratory manual, Springer, **2017**.
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., Punnapayak, H., The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology, Folia Microbiologica, 63 (**2018**) 129-140.
- Price, N.P., Bischoff, K.M., Leathers, T.D., Cosse, A.A., Manitchotpisit, P., Polyols, not sugars, determine the structural diversity of anti-streptococcal liamocins produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380, The Journal of Antibiotics (Tokyo), 70 (**2017**) 136-141.
- Price, N.P., Manitchotpisit, P., Vermillion, K.E., Bowman, M.J., Leathers, T.D., Structural characterization of novel extracellular liamocins (mannitol oils) produced by *Aureobasidium pullulans* strain NRRL 50380, Carbohydrate Research, 370 (**2013**) 24-32.
- Qin, Z. Production of Heavy Oil Liamocins by *Aureobasidium pullulans*, The Ohio State University, Columbus, **2019**.
- Ratledge, C., MICROORGANISMS FOR LIPIDS, Acta Biotechnologica, **1991**.
- Ratledge, C., Single cell oils for the 21st century, Single Cell Oils, Elsevier, **2010**.
- Roberti, R., Di Francesco, A., Innocenti, G., Mari, M., Potential for biocontrol of *Pleurotus ostreatus* green mould disease by *Aureobasidium pullulans* De Bary (Arnaud), Biological Control, 135 (**2019**) 9-15.
- Saika, A., Fukuoka, T., Mikome, S., Kondo, Y., Habe, H., Morita, T., Screening and isolation of the liamocin-producing yeast *Aureobasidium melanogenum* using xylose as the sole carbon source, J Biosci Bioeng, 129 (**2020**) 428-434.
- Scholz, K., Seyfried, M., Brumhard, O., Blank, L.M., Tiso, T., Hayen, H., Comprehensive liamocin biosurfactants analysis by reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometric and charged-aerosol detection, Journal of Chromatography A, 1627 (**2020**) 461404.
- Silva, N.R.A., Luna, M.A., Santiago, A.L., Franco, L.O., Silva, G.K., De Souza, P.M., Okada, K., Albuquerque, C.D., Da Silva, C.a.A., Campos-Takaki, G.M., Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella*



- echinulata isolated from caatinga soil in the northeast of Brazil, International journal of molecular sciences, 15 (2014) 15377-15395.
- Singh, R., Gaur, R., Bansal, S., Biswas, P., Pandey, P.K., Jamal, F., Tiwari, S., Gaur, M.K., *Aureobasidium pullulans*-an industrially important pullulan producing black yeast, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4 (2015) 605-622.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., Principles of fermentation technology, Elsevier, Oxford, 2013.
- Tekindal, M. Yanıt yüzeyi metodu ve bir uygulama, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İstatistik Anabilim Dalı, Ankara, 2009.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Banat, I.M., Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*, Bioresource Technology, 102 (2011) 772-778.
- Thompson, D.N., Fox, S.L., Bala, G.A., Biosurfactants from potato process effluents, Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Springer, 2000.
- Vieira, I.M.M., Santos, B.L.P., Ruzene, D.S., Silva, D.P., An overview of current research and developments in biosurfactants, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 100 (2021) 1-18.
- Walter, V., Syldatk, C., Hausmann, R., Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms, Biosurfactants, SEN, R. (ed.) Springer, USA, 2010.
- Wang, C.-L., Li, Y., Xin, F.-H., Liu, Y.-Y., Chi, Z.-M., Evaluation of single cell oil from *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* P10 isolated from mangrove ecosystems for biodiesel production, Process Biochemistry, 49 (2014) 725-731.
- Wang, Z., Zhang, M., Chi, Z., Liu, G.L., Chi, Z.M., Liamocin overproduction by the mutants of *Aureobasidium melanogenum* 9-1 for effectively killing spores of the pathogenic fungi from diseased human skin by Massoia lactone, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 38 (2022) 107.
- Yeow, Y.L., Pepperell, C.J., Sabturani, F.M., Leong, Y.-K., Obtaining surface tension from pendant drop volume and radius of curvature at the apex, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 315 (2008) 136-146.

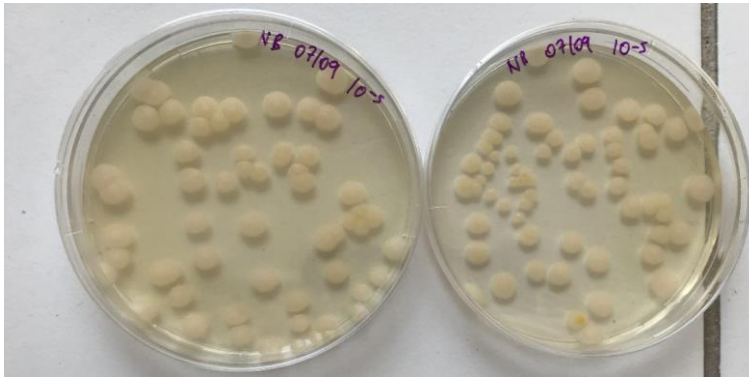
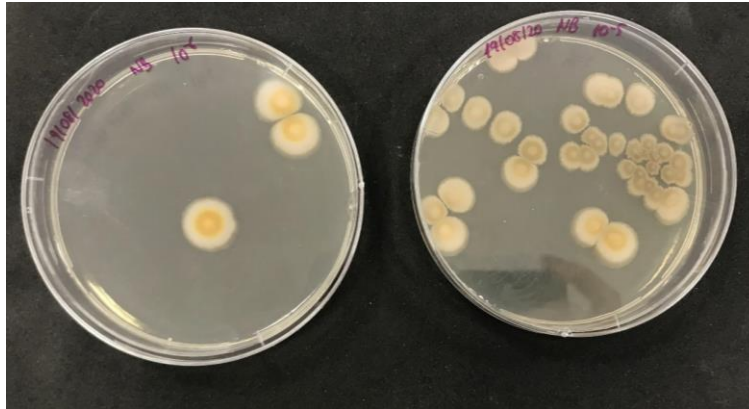
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., Mcinerney, M.J.,  
Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse  
microorganisms, *Journal of microbiological methods*, 56 (2004) 339-347.
- Zhang, P., Hai, H., Sun, D., Yuan, W., Liu, W., Ding, R., Teng, M., Ma, L., Tian, J.,  
Chen, C., A high throughput method for total alcohol determination in  
fermentation broths, *BMC biotechnology*, 19 (2019) 1-8.

## EKLER

### EK 1- FERMANTASYON DENEMELERİNDE KULLANILAN FARKLI *A. pullulans* KÜLTÜRLERİ



Şekil Ek 1.1. Fermantasyon denemelerinde kullanılan farklı *A. pullulans* kültürlerinin fermantasyonun 5. günündeki görüntüleri



Şekil Ek 1.2. Başlangıç inokülasyon derişimi tayininde kültürel sayım amacıyla kullanılan bazı *A. pullulans* kültürleri

## EK 2- LİAMOCİN EKSTRAKSİYONU



(a)

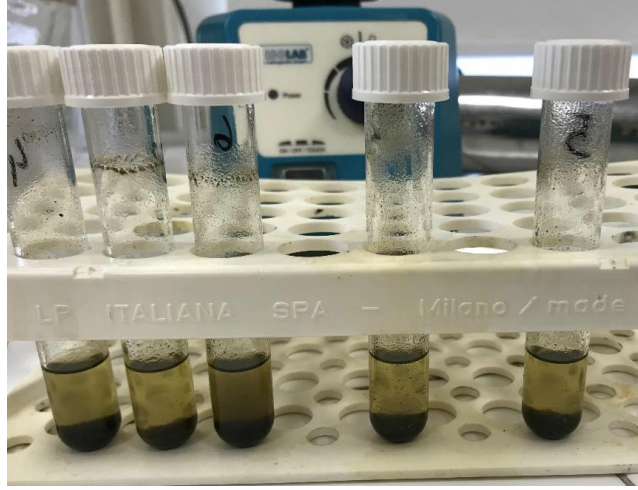


(b)

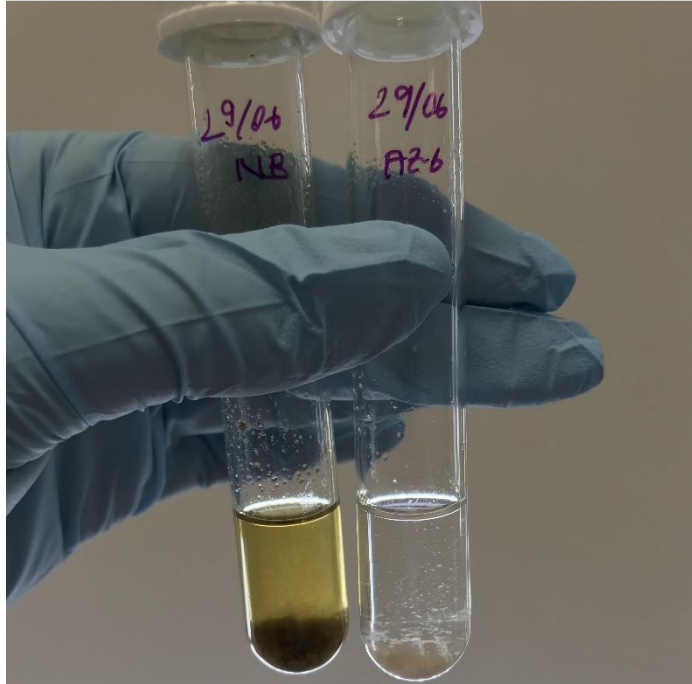
Şekil Ek 2.1. *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna ait, fermantasyon ortamında substrat olarak (a) sakkaroz, (b) fruktoz kullanılan besiyerlerinde, santrifüj sonrası elde edilen biyokütle peletleri



Şekil Ek 2.2. *A. pullulans* AZ-6 ve NBRC 100716 suşlarına ait, santrifüj sonrası elde edilen biyokütle peletleri



Şekil Ek 2.3. Liamocin ekstraksiyonu sırasında, *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna ait, metil etil keton eklenmiş ve vortekslenmiş örnekler



Şekil Ek 2.4. Liamocin ekstraksiyonu sırasında, *A. pullulans* NBRC 100716 ve AZ-6 suşlarına ait, metil etil keton eklenmiş ve vortekslenmiş örnekler



Şekil Ek 2.5. Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilmiş olan, *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilmiş bazı liamocin örnekleri

### **EK 3- DNS YÖNTEMİ**

Dinitrosalisilik asit yöntemi; kimyasal yolla karbonhidrat analizi sağlayan kolorimetrik bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Bemiller, 2018). Bu yöntem; indirgen şekerlerin serbest karbonil gruplarının varlığının saptanması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde; sarı renkli 3,5-dinitrosalisilik asitin, indirgen şeker varlığında ve bazik ortamda, kırmızı-kahverengi renkli 3-amino 5-nitrosalisilik asite indirgendiği bilinmektedir. Gerçekleşen bu reaksiyon sonucu oluşan rengin yoğunluğunun, kolorimetrik olarak spektrofotometrede 540 nm'de ölçülebildiği ve oluşan renk yoğunluğunun, indirgen şeker derişimi ile doğru orantılı olduğu ifade edilmektedir (Miller, 1959; Zhang ve ark., 2019; Jain ve ark., 2020). Söz konusu yöntemde kullanılan DNS çözeltisinin hazırlanmasında; 1 g DNS (Sigma) 20 mL 2 N NaOH (Sigma) çözeltisinde çözündürülmüştür. Aynı bir erlenmeyerde; 30 g sodyum potasyum tartarat (Merck) 50 mL saf suda çözündürülmüştür. Daha sonra hazırlanan iki çözelti birleştirilerek, tamamen berraklaşmaya kadar bir manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti, bir balon jodede son hacmi 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. İndirgen şeker miktarı belirlenecek olan örneklerin uygun seyreltileri hazırlandıktan sonra, 1 mL örnek çözelti cam bir tüpe aktarılarak üzerine 1 mL DNS çözeltisi eklenmiştir. Bu çözeltinin kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilmesinin ardından cam tüp; buz dolu bir beher içerisine alınarak, hızlı bir şekilde soğutulmuştur. Aynı işlemler, içerisinde örnek olmayan saf su ile tekrar edilerek kör hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin absorbanları, bir spektrofotometrede (Boeco S30, Almanya) 540 nm dalga boyunda köre karşı okunmuşlardır. Analiz edilen örneklerde bulunan indirgen şeker derişimlerinin hesaplanmasında, incelenen indirgen şeker türü için oluşturulan çalışma doğrularından ve denklemlerinden yararlanılmıştır.

### **EK 4- FENOL SÜLFÜRİK ASİT YÖNTEMİ**

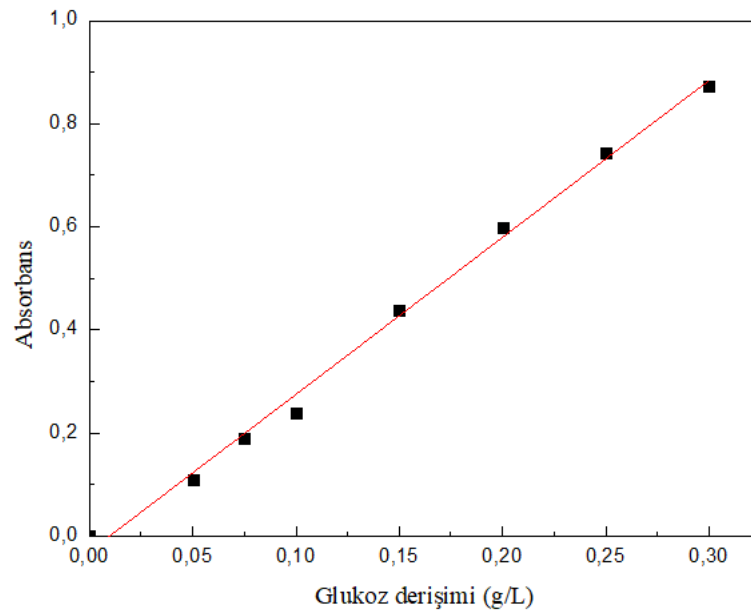
Fenol-sülfürik asit yöntemi, karbonhidrat analizinde kullanılan ve farklı şeker çeşitleri içeren çözeltilerde; toplam çözünebilir şeker miktarının tayininde kullanılan kimyasal bir yöntemdir. Bu yöntem; basit ve hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak tanımlanmaktadır (Dubois ve ark., 1956; Nielsen, 2017).

Bu yöntemde; analizde kullanılan konsantre sülfürik asitin, herhangi bir polisakkariti, oligosakkariti veya disakkariti monosakkaritlere parçaladığı ifade edilmektedir. Daha

sonra pentozların furfurala; heksozların ise, hidroksimetilfurfurala (HMF) parçalandığı ve oluşan bu parçalanma ürünlerinin fenolle reaksiyona girerek, spektrofotometrede 490 nm’de absorbans veren sarı renkli bileşikler ürettikleri belirtilmektedir (Nielsen, 2017).

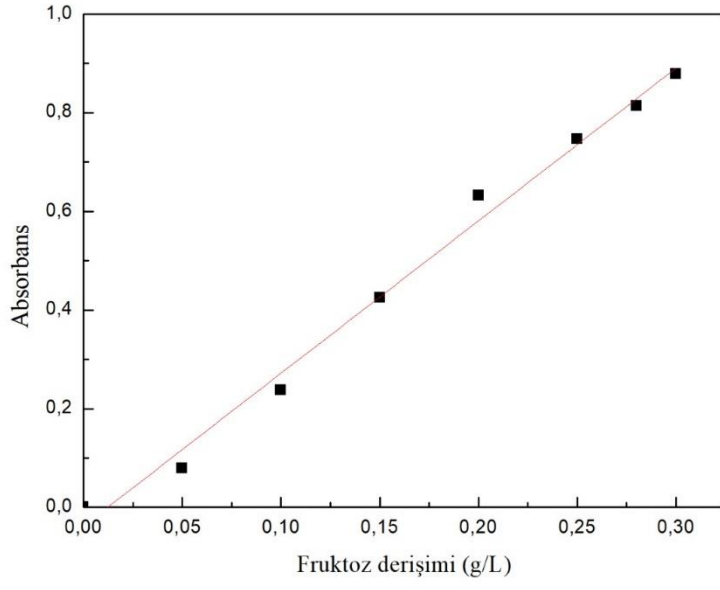
Bu yöntemin uygulanışında; toplam şeker tayini gerçekleştirilecek olan örneklerin uygun seyreltileri hazırlandıktan sonra; 2 mL örnek üzerine 1 mL %5’lik (w/v) fenol çözeltisi ve ardından 5 mL derişik sülfürik asit (Sigma) ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında bir su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Bu işlemler, içerisine örnek yerine saf su konulmuş olan kör çözeltisi ile de tekrarlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları bir spektrofotometrede (Boeco S30, Almanya), 490 nm dalga boyunda köre karşı ölçülmüşlerdir.

## **EK 5- DENEYLERDE FERMANTASYON ORTAMLARINDAKİ ÇEŞİTLİ ŞEKERLERİN DERİŞİMLERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN STANDART ÇALIŞMA DOĞRULARI**

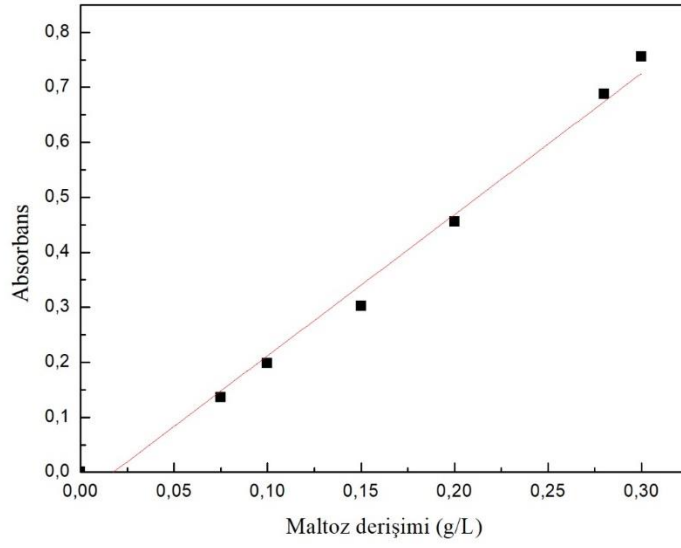


Şekil Ek 5.1. Glukoz çalışma doğrusu ( $y = 3.044x - 0.0295$ ;  $R^2 = 0.9946$ )

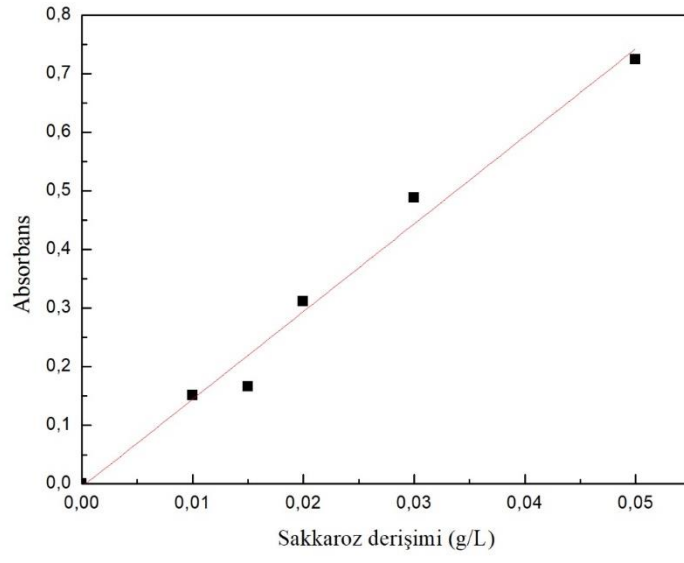




Şekil Ek 5.2. Fruktoz çalışma doğrusu ( $y = 3.091x - 0.037$ ;  $R^2 = 0.9898$ )

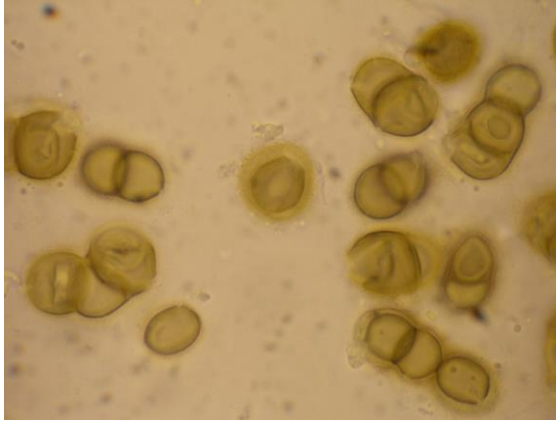


Şekil Ek 5.3. Maltoz çalışma doğrusu ( $y = 2.567x - 0.04$ ;  $R^2 = 0.9860$ )



Şekil Ek 5.4. Sakkaroz çalışma doğrusu ( $y = 14.943x - 0.0046$ ;  $R^2 = 0.9800$ )

## EK 6- DENEYLER SIRASINDA ÇEKİLEN BAZI MİKROSKOPİK GÖRÜNTÜLER



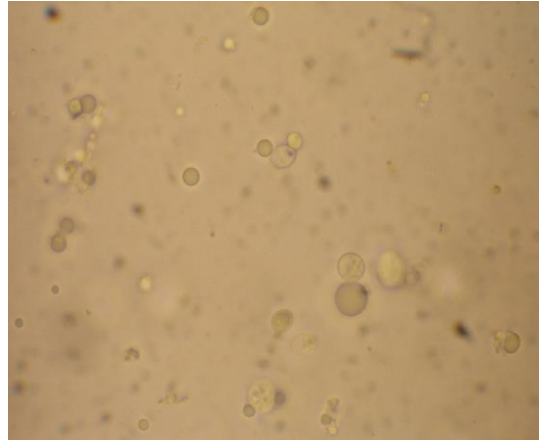
(a)



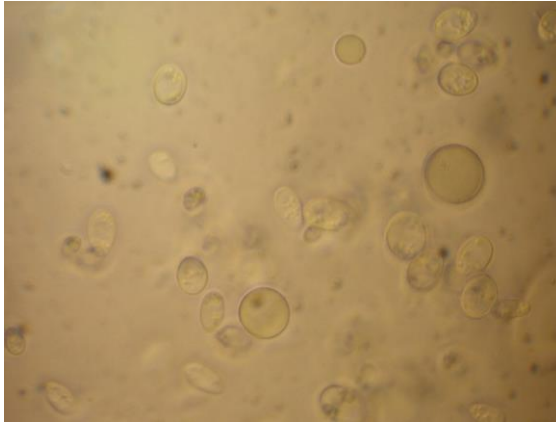
(b)



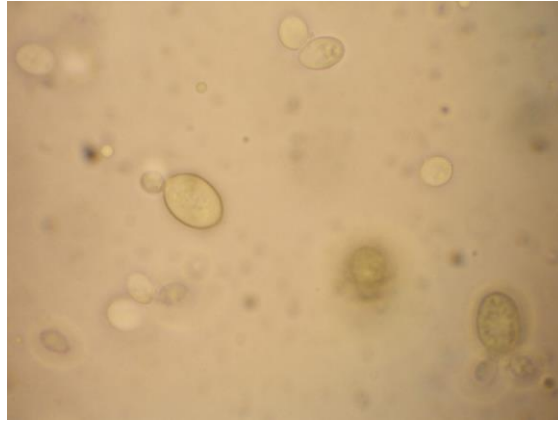
(c)



(d)



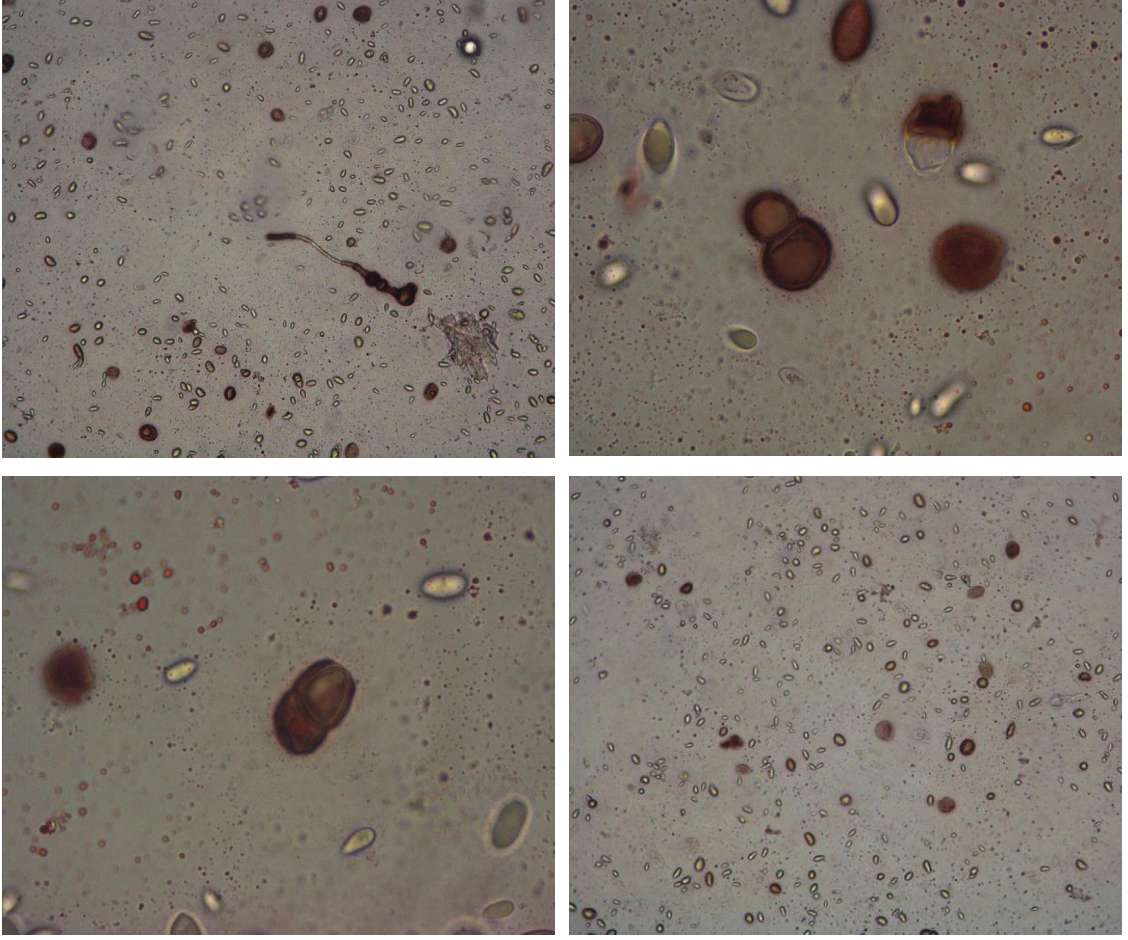
(e)



(f)

Şekil Ek 6.1. *A. pullulans* suşlarının mikroskopik görüntüleri (x100) (a) ve (b): *A. pullulans* NBRC 100716, (c) ve (d): *A. pullulans* AZ-6, (e): *A. pullulans* BJ20p4, (f): *A. pullulans* TrisCisz2

EK-6.2 Oil Red O boyası ile boyanmış *A. pullulans* NBRC 100716 suşunun ve ürettiği liamocinin basit ışık mikroskobu (x100) altındaki görüntüleri



Şekil Ek 6.2. *A. pullulans* NBRC 100716 suşuna Oil Red O boyası ile uygulanan lipid boyama testinin sonuçları

## EK 7- OPTİMİZASYON ÇALIŞMASINDA BAĞIMLI DEĞİŞKENLER İÇİN BELİRLENEN HEDEFLER VE ELDE EDİLEN ÇÖZÜMLER

Çizelge Ek 7.1. Optimizasyon çalışması için bağımlı değişkenler için belirlenen hedefler

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
A:Fruktoz konsantrasyonu	is in range	50	150	1	1	3
B:pH	is in range	3	7	1	1	3
C:Sıcaklık	is in range	24	32	1	1	3
Liamocin derişimi	maximize	0,42	7	1	1	5
Özgül üreme hızı	none	0,028	0,089	1	1	3
Özgül liamocin üretim hızı	is in range	0,0011	0,0065	1	1	5

Number	Fruktoz konsantrasyonu	pH	Sıcaklık	Liamocin derişimi	Özgül üreme hızı	Özgül liamocin üretim hızı	Desirability	Desirability (w/o Intervals)
1	93,351	4,918	27,247	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825 Selected
2	93,484	4,920	27,238	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
3	93,303	4,922	27,244	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825

Çizelge Ek 7.2. Optimizasyon çalışması için program tarafından üretilen çözümler

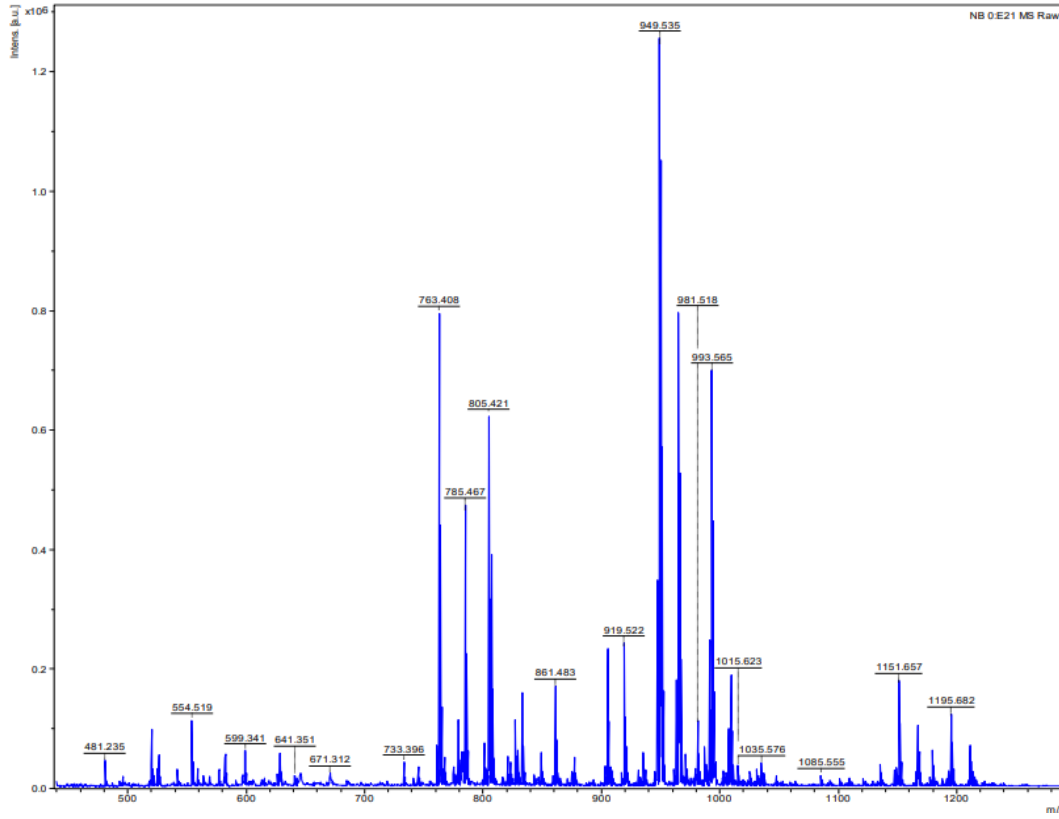
Number	Fruktoz konsantrasyonu	pH	Sıcaklık	Liamocin derişimi	Özgül üreme hızı	Özgül liamocin üretim hızı	Desirability	Desirability (w/o Intervals)
1	93,351	4,918	27,247	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825 Selected
2	93,484	4,920	27,238	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
3	93,303	4,922	27,244	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
4	93,479	4,912	27,250	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
5	93,594	4,914	27,242	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
6	93,167	4,928	27,243	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
7	93,221	4,915	27,258	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
8	93,630	4,919	27,233	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
9	93,158	4,921	27,253	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
10	93,736	4,909	27,242	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
11	93,475	4,928	27,228	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
12	93,010	4,930	27,249	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
13	93,044	4,918	27,264	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
14	93,106	4,939	27,232	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
15	92,857	4,933	27,253	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
16	93,741	4,896	27,260	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
17	94,008	4,893	27,252	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
18	93,313	4,949	27,209	4,895	0,075	0,006	0,772	0,825
19	92,690	4,920	27,280	4,896	0,075	0,006	0,772	0,825
20	93,694	4,886	27,276	4,896	0,074	0,006	0,772	0,825
21	92,613	4,945	27,250	4,895	0,075	0,006	0,772	0,825
22	92,523	4,954	27,244	4,895	0,075	0,006	0,772	0,825
23	92,465	4,910	27,307	4,895	0,075	0,006	0,771	0,825
24	91,995	4,944	27,288	4,894	0,075	0,006	0,771	0,825
25	92,827	4,980	27,196	4,894	0,075	0,006	0,771	0,825
26	94,342	4,954	27,160	4,894	0,074	0,006	0,771	0,825

ation  
 tes  
 nmary  
 ph Columns  
 luation  
 is  
 liamocin derijimi (An  
 Özgül üreme hızı (An  
 Özgül liamocin üretin  
 ization  
 merical  
 phical  
 nalysis  
 nt Prediction  
 yfirmation  
 fficients Table

Solutions	Starting Points								
27	91,915	4,917	27,332	4,894	0,075	0,006	0,771	0,825	
28	95,398	4,876	27,225	4,894	0,074	0,006	0,771	0,825	
29	93,369	4,851	27,349	4,894	0,074	0,006	0,771	0,825	
30	91,243	5,014	27,252	4,890	0,075	0,006	0,771	0,824	
31	92,951	4,851	27,362	4,891	0,074	0,006	0,771	0,824	
32	91,844	4,813	27,532	4,881	0,075	0,006	0,770	0,823	
33	89,717	4,918	27,530	4,878	0,076	0,006	0,770	0,823	
34	94,363	4,667	27,764	4,844	0,074	0,006	0,767	0,820	
35	106,287	4,960	27,309	4,827	0,073	0,006	0,766	0,818	
36	104,292	5,228	26,983	4,817	0,073	0,006	0,765	0,817	
37	112,184	5,518	27,934	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
38	112,172	5,498	27,875	4,790	0,074	0,006	0,763	0,815	
39	112,174	5,531	28,004	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
40	112,096	5,554	28,032	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
41	112,075	5,559	28,037	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
42	112,095	5,552	28,049	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
43	112,051	5,564	28,049	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
44	112,046	5,565	28,060	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
45	112,021	5,572	28,051	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
46	112,053	5,560	28,074	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
47	111,973	5,582	28,065	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
48	112,046	5,560	28,084	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	
49	112,007	5,571	28,081	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815	

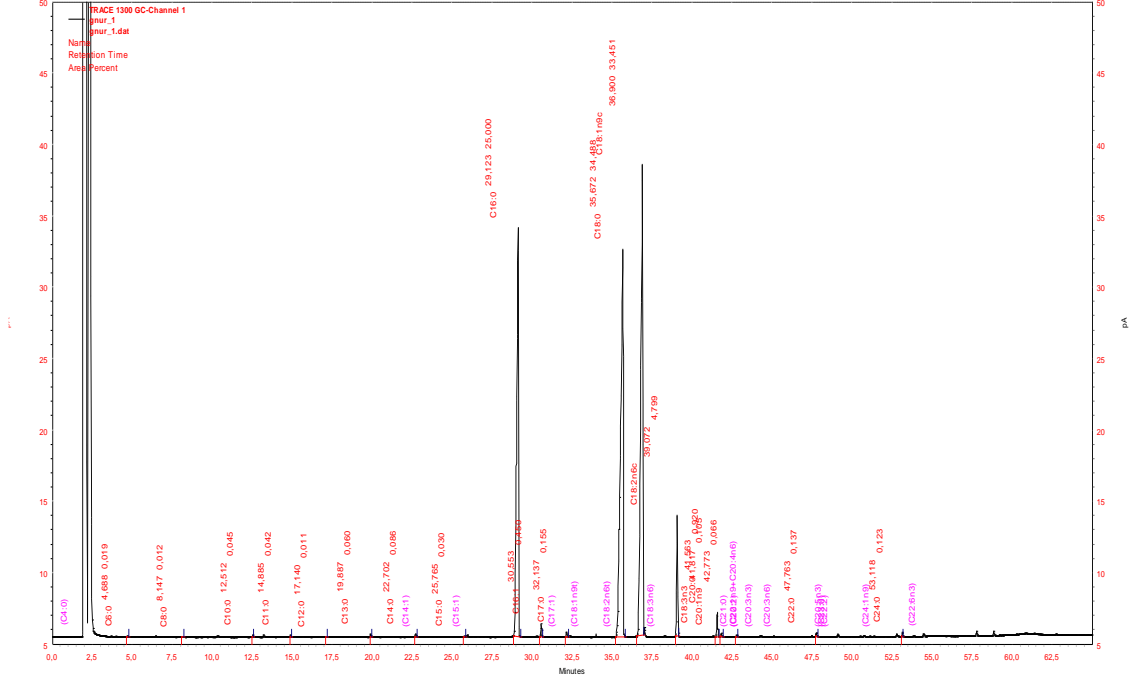
50	111,909	5,585	28,120	4,791	0,074	0,006	0,763	0,815
51	111,865	5,598	28,109	4,791	0,074	0,006	0,762	0,815
52	111,939	5,567	28,155	4,790	0,074	0,006	0,762	0,815
53	112,282	5,478	28,089	4,788	0,074	0,006	0,762	0,815
54	111,567	5,605	28,255	4,789	0,074	0,006	0,762	0,815
55	111,301	5,632	28,303	4,788	0,075	0,006	0,762	0,815
56	111,584	5,662	27,914	4,788	0,073	0,006	0,762	0,815
57	110,505	5,758	28,271	4,787	0,074	0,006	0,762	0,815
58	110,611	5,596	28,506	4,779	0,075	0,006	0,761	0,814

**EK 8- *A. pullulans* NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNE AİT MALDI-TOF- MS SPEKTRUMU**



Şekil Ek 8.1. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğine ait MALDI-TOF- MS spektrumu

## EK 9- *A. pullulans* NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNE AİT GC-FID KROMATOGRAMI



Şekil Ek 9.1. *A. pullulans* NBRC 100716 suşu tarafından üretilen liamocin örneğine ait GC-FID kromatogramı



**EK 10- *A. pullulans* NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNE AİT YAĞ YAYMA METODU FOTOĞRAFLARI**

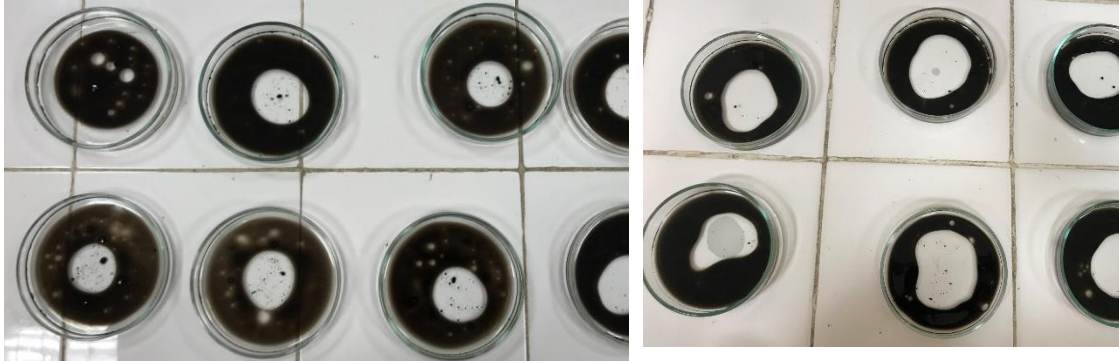


(a)



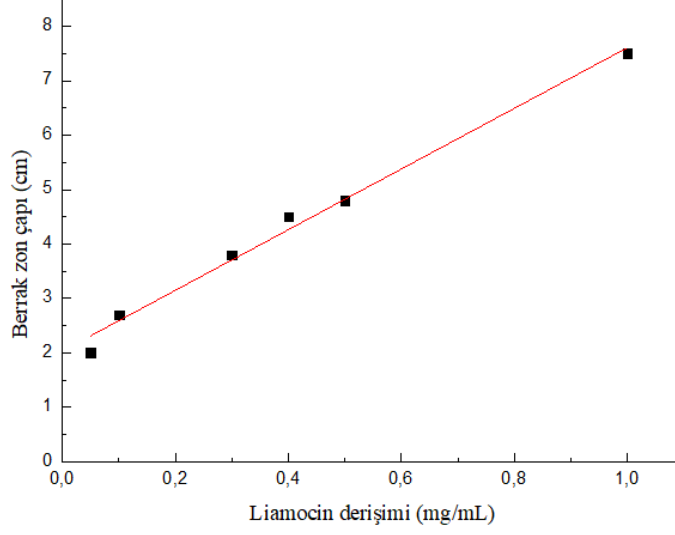
(b)

Şekil Ek 10.1. Yağ yayma yönteminin uygulanışı. (a) motor yağı, (b) ham petrol kullanılarak gerçekleştirilen denemeler



Şekil Ek 10.2. Yağ yayma yöntemi deneylerine ait bazı görüntüler

**EK 11- *A. pullulans* NBRC 100716 SUŞU TARAFINDAN ÜRETİLEN LİAMOCİN ÖRNEĞİNİN YAĞ YAYMA TESTİNE AİT ÇALIŞMA DOĞRUSU**



Şekil Ek 11.1. Liamocin derişimleri ile zon çapları arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma doğrusu ( $y = 5.5749x + 2.0331$ ;  $R^2 = 0.9874$ )