

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HAVA KALDIRMALI VE KABARCIK KOLON
BİYOREAKTÖRLERDE *Aureobasidium pullulans* İLE
PULLULAN ÜRETİMİ VE ÜRETİM KOŞULLARININ
OPTİMİZASYONU**

Emrah ÖZCAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sayit SARGIN

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.01

Sunuş Tarihi: 07.01.2014

Bornova-İZMİR

2014

Emrah ÖZCAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Hava Kaldırmalı ve Kabarcık Kolon Biyoreaktörlerde *Aureobasidium pullulans* İle Pullulan Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.01.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye:

.....

Üye :

.....

ÖZET**HAVA KALDIRMALI VE KABARCİK KOLON
BİYOREAKTÖRLERDE *Aureobasidium pullulans* İLE
PULLULAN ÜRETİMİ VE ÜRETİM KOŞULLARININ
OPTİMİZASYONU**

ÖZCAN, Emrah

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sayit Sargın

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Yekta Göksungur

Ocak 2014, 82 sayfa

Bu tezde, sentetik üretim ortamında *Aureobasidium pullulans* DSM-2404 suşu kullanılarak hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde pullulan üretimi incelenmiştir. Bu kapsamda biyokütle, toplam polisakkarit ve pullulan üretim kinetikleri belirlenmiştir.

Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerin pullulan üretimindeki performansları farklı koşullar (başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi) için karşılaştırılmıştır. Hava kaldırmalı biyoreaktörde elde edilen maksimum efektif verimin ($Y_p/s=0,402$), kabarcık kolon biyoreaktörde elde edilen maksimum efektif verimden ($Y_p/s=0,343$) daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Daha sonra, hava kaldırmalı biyoreaktörde prosesi etkileyen üç faktörün (başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi) pullulan üretimine etkisi cevap yüzey yöntemi (CYY) ile incelenmiştir.

İstatistiksel analiz sonuçları her durum için model uyumunun iyi olduğunu göstermiştir. Prosesteki bağımsız değişkenler olan başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin pullulan üretiminde güçlü doğrusal bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu bağımsız değişkenlerin pullulan üretimi üzerinde negatif kuadratik etkileri ve pozitif veya negatif etkileşim etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Bu etkileşim etkilerinden sadece başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresi etkileşiminin pullulan üretiminde anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır ($P > 0.05$). Optimizasyon sonucu, 95,2 g/L başlangıç substrat konsantrasyonu, 1,93 vvm havalandırma hızı ve 5,36 gün için maksimum pullulan konsantrasyonuna (38.77 g/L) erişilebileceği anlaşılmıştır. Bu çalışma, hava kaldırmalı biyoreaktörde pullulan üretim koşullarının cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonun yapıldığı ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: Pullulan, *Aureobasidium pullulans*, hava kaldırmalı biyoreaktör, kabarcık kolon biyoreaktör, Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)

ABSTRACT**PRODUCTION OF PULLULAN WITH *Aureobasidium pullulans*
IN AIR-LIFT AND BUBBLE COLUMN BIOREACTORS AND
OPTIMIZATION OF PROCESS PARAMETERS**

ÖZCAN, Emrah

MSc in Bioengineering.

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sayit Sargin

Co-Supervisor: Prof. Dr. Yekta Göksungur

January 2014, 82 pages

In this thesis, the production of pullulan from synthetic medium by *Aureobasidium pullulans* DSM-2404 in air-lift and bubble column bioreactor was investigated. The kinetics of polysaccharide, pullulan and biomass production was determined.

Performances of pullulan production in air-lift and bubble column bioreactors were compared in different conditions (i.e., initial sugar concentration, aeration rate and incubation time). Maximum effective yield (g pullulan produced g⁻¹ initial sugar) obtained in air-lift bioreactor ($Y_{p/s}=0,402$) was found to be higher than that obtained in bubble column bioreactor ($Y_{p/s}=0,343$).

Response surface methodology (RSM) was used to investigate the effects of three factors (initial sugar concentration, aeration rate and incubation time) on the concentration of pullulan in air-lift bioreactor. The levels of factors used in the experimental design were; 70–110 g/l initial sugar concentration, 1.0–3.0 vvm aeration rate and 3-5 days fermentation time.

Results of the statistical analysis showed that the fit of the model was good in all cases. Initial sugar concentration, aeration rate and incubation time

had a strong linear effect on pullulan concentration. Moreover, pullulan concentration was significantly influenced by the negative quadratic effects of the given variables and by their positive or negative interactions with the exception that the interaction between initial sugar concentration and incubation time was insignificant ($P > 0.05$). Maximum pullulan concentration of 38.77 g/l was obtained at the optimum levels of process variables (initial sugar concentration 95.2 g/l, aeration rate 1.93 vvm, and incubation time 5.36 days). This study is the first detailed work about the use of response surface methodology for the optimization of fermentation parameters in pullulan production using air-lift bioreactor. This study is the first detailed work about the use of response surface methodology for the optimization of fermentation parameters in pullulan production using air-lift bioreactor.

Keywords : Pullulan, *Aureobasidium pullulans*, air-lift bioreactor, bubble column bioreactor, Response Surface Method (RSM)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmama olanak tanıyan, beni her zaman teşvik eden ve ayrıca tez danışmanlarım olan Sayın Hocalarım Yrd. Doç. Dr. Sayit SARGIN ve Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR'a, teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın hemen hemen her aşamasında usanmadan bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini hiç bir koşulda esirgemeyen, tavsiyeleri ve yönlendirmeleriyle daha iyi sonuçlar almamı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Seval DAĞBAĞLI'ya,

Deneylerin gerçekleşmesi konusunda -ki onlarsız bu tezin bitmesi neredeyse imkansızdı- bana büyük katkıları olan lisans öğrencileri Burcu UYGUN ve Özge ESEN'e,

Bu tezde kullanılan organizmanın tedarikini sağlayan ve deneyler konusunda benimle deneyimlerini paylaşan Arş. Gör. Dr. Sırma YEĞİN'e,

Deneylerde kullanılan malzemelerin teminindeki finansmandan dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

ve tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım boyunca da benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET..... | v |
| ABSTRACT..... | vii |
| TEŞEKKÜR..... | ix |
| İÇİNDEKİLER..... | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiv |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xvi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ..... | 4 |
| 2.1 Tarihsel Altyapı..... | 4 |
| 2.2 Pullulanın Kimyasal Yapısı..... | 5 |
| 2.3 Pullulanın Fiziksel Özellikleri..... | 7 |
| 2.4 <i>Aureobasidium pullulans</i> ve Pullulan Üreten Diğer Mikroorganizmalar..... | 8 |
| 2.5 Pullulanın Kullanım Alanları..... | 11 |
| 2.5.1 Gıda sektörü..... | 11 |
| 2.5.2 Biyomedikal ve ilaç sektörü..... | 12 |
| 2.5.3 Diğer sektörler..... | 13 |
| 2.6 Fermantatif Pullulan Üretim Prosesi..... | 13 |
| 2.6.1 Pullulan üretimine etki eden parametreler..... | 14 |
| 2.6.2 Fermantasyon teknolojisi ve biyoreaktör tasarımları..... | 19 |
| 2.6.3 Alt akım işlemleri..... | 23 |
| 2.7 Hava Kaldırmalı Biyoreaktörler..... | 27 |
| 2.7.1 Hava kaldırmalı biyoreaktör morfolojileri..... | 28 |
| 2.7.2 Akışkan dinamiği..... | 31 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.7.3 Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin avantajları | 31 |
| 2.7.4 Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin dezavantajları..... | 33 |
| 2.7.5 Kabarcık kolon biyoreaktörler | 34 |
| 2.7.6 Kabarcık kolonlar ve hava kaldırmalı biyoreaktörlerin karşılaştırılması | 37 |
| 2.8 Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)..... | 39 |
| 2.8.1 İkinci dereceden modeller için kullanılan deney tasarımları | 41 |
| 3. MATERYAL & METOT | 46 |
| 3.1 Mikroorganizma..... | 46 |
| 3.2 Besi Ortamları | 46 |
| 3.2.1 Besi ortamlarının hazırlanışı | 47 |
| 3.3 Biyoreaktörler | 49 |
| 3.4 Alt Akım İşlemleri ve Analiz Yöntemleri..... | 50 |
| 3.4.1 Biyokütle tayini | 50 |
| 3.4.2 Toplam polisakkarit | 50 |
| 3.4.3 Pullulan tayini | 51 |
| 3.4.4 İndirgen şeker analizi | 52 |
| 3.4.5 Toplam şeker..... | 52 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 54 |
| 4.1 $MnCl_2$ 'nin Pullulan ve Melanin Üretimine Etkisi..... | 54 |
| 4.2 Pullulan Üretiminin Optimizasyonu İçin Ön Deneme Çalışmaları..... | 57 |
| 4.2.1 Havalandırma hızının pullulan üretimine etkisi | 58 |
| 4.2.2 Başlangıç substrat konsantrasyonunun pullulan üretimi üzerine etkisi.. | 62 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.3 Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) Kullanılarak Hava Kaldırmalı Biyoreaktörde Pullulan Üretiminin Optimizasyonu | 64 |
| 4.3.1 Hava kaldırmalı biyoreaktörde pullulan üretimi için alternatif optimum noktalar | 72 |
| 5. SONUÇ | 74 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 77 |
| ÖZGEÇMİŞ | 82 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 2.1. Pullulanın şematik kimyasal yapısı..... | 5 |
| 2.2. Pullulanın birbiri ardına devam eden birimleri şeklinde tanımlanan şematik yapısı..... | 7 |
| 2.3. <i>A. pullulans</i> 'ın morfolojik yapıları..... | 9 |
| 2.4. Pullulan ayırma saflaştırma basamakları..... | 26 |
| 2.5. En genel hava kaldırmalı biyoreaktör tasarımı..... | 28 |
| 2.6. Farklı tiplerdeki hava kaldırmalı biyoreaktörler..... | 30 |
| 2.7. Kabarcık kolon biyoreaktör..... | 35 |
| 2.8. Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerin operasyon aralığı..... | 38 |
| 2.9. Üç bağımsız değişkenden oluşan merkez tümleşik deney tasarımı..... | 42 |
| 2.10. Üç bağımsız değişkenden oluşan yüzey merkezli deney tasarımı..... | 43 |
| 3.1. Stok <i>A. pullulans</i> kültürü..... | 46 |
| 3.2. 2 günlük aşı kültürü..... | 47 |
| 3.3. Kültür ortamı ile birlikte hava kaldırmalı (solda) ve kabarcık kolon (sağda) biyoreaktörler..... | 49 |
| 3.4. Mikrobiyal polisakkarit üretim şeması..... | 53 |
| 4.1. KNO_3 ve $MnCl_2$ 'nin melanin üretimine etkisi..... | 55 |
| 4.2. Etanol ile çöktürülüp kurutulan polisakkaritler..... | 56 |
| 4.3. Kabarcık kolon biyoreaktörde değişik havalandırma hızlarında gözlemlenen büyüme kinetikleri..... | 60 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.4. Hava kaldırmalı biyoreaktörde değişik havalandırma hızlarında gözlemlenen büyüme kinetikleri..... | 61 |
| 4.5. Kabarcık kolon biyoreaktörde değişik başlangıç substrat konsantrasyonlarındaki gözlemlenen büyüme kinetikleri..... | 62 |
| 4.6. Hava kaldırmalı biyoreaktörde değişik başlangıç substrat konsantrasyonlarındaki gözlemlenen büyüme kinetikleri..... | 63 |
| 4.7. Havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin hızının a) izohips eğrisi, b) yüzey grafiği..... | 69 |
| 4.8. Başlangıç substrat konsantrasyonu ve havalandırma hızının a) izohips eğrisi, b) yüzey grafiği..... | 70 |
| 4.9. Başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin a) izohips eğrisi ,b) yüzey grafiği..... | 71 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

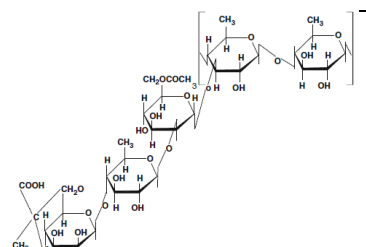
| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 1.1. Bazı ticari mikrobiyal ekstraselüler polisakkaritler..... | 1 |
| 2.1. Pullulanın bazı fiziksel özellikleri..... | 7 |
| 2.2. Pullulanın mikrobiyal kaynakları..... | 10 |
| 2.3. Son dönemlerde pullulan üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar..... | 21 |
| 2.4. Box-Behnken tasarım..... | 43 |
| 3.1. Reaktör Geometrileri..... | 49 |
| 4.1. Örnek 1, 2, 3 ve 4'ün 5. gün sonunda pullulan miktarları..... | 57 |
| 4.2. Deneysel tasarımda kullanılan üretim parametrelerinin seviyesi..... | 64 |
| 4.3. Deneysel tasarım..... | 65 |
| 4.4. Varyans analizi (ANOVA) tablosu..... | 66 |
| 4.5. Pullulan konsantrasyonları için tahmin edilen regresyon katsayıları..... | 68 |
| 4.6. Pullulan üretimi için 30 farklı alternatif optimum nokta..... | 73 |

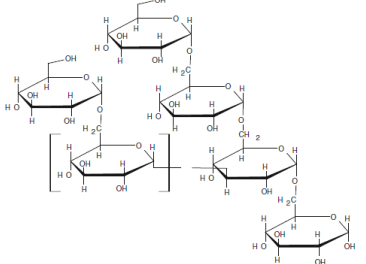
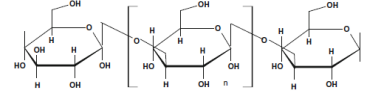
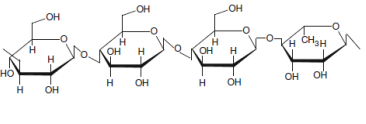
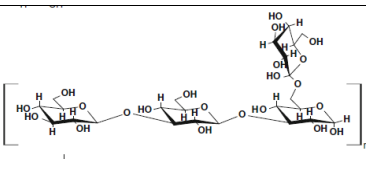
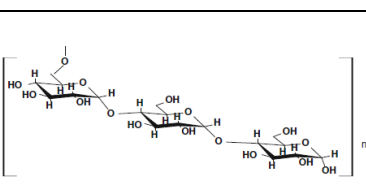
1. GİRİŞ

Son yıllarda petrol bazlı polimerlerden biyolojik kökenli polimerlere önemli bir yönelim olduğu görülmektedir. Endüstriyel üretim geçmişi uzun yıllara dayanan bitkisel kökenli polimerlerde -özelikle polisakkaritlerde- mevsimsel döngülere dayalı ürün alımı, yavaş üretim, gerekli alanların fazlalığı, kontrol zorluğu gibi zorluklarla karşılaşmaktadır. Mikrobiyal polimer üretimi ise mevsimsel şartlara bağlı olmayan, kontrollü ve bitkisel polimere göre çok daha yüksek verimi elde edilebilen bir alternatiftir.

Mikrobiyal kökenli birçok ekstraselüler polisakkarit uzun yıllardır endüstriyel ölçekte üretilmektedir (Çizelge 1.1). Bunların içinde pullulan en çok çalışılan ve tanımlananlardandır. Pullulan; gıda kaplama ve gıda katkı maddesi olarak kullanımından, doku mühendisliğindeki yapı iskelelerinde kullanımına kadar oldukça geniş bir kullanımı vardır. Pullulanın renksiz, kokusuz, yenebilir, toksik olmayan, immunojenik olmayan, biyobozunur özelliklerine ek olarak, suda yüksek çözünürlük, viskozite artırıcı, pullulan filmlerin oksijen geçirimsiz yapısı gibi mekanik özellikleri bu polisakkaritin geniş yelpazede kullanımına olanak tanır. (Dağbağlı vd., 2008; Rekha and Chandra, 2007).

Çizelge 1.1. Bazı ticari mikrobiyal ekstraselüler polisakkaritler. (Singh and Saini'den, 2012)

| Ekstraselüler polisakkarit | Üretici organizma | Kompozisyon | Kimyasal Yapı |
|----------------------------|-------------------------------|--|---|
| Xanthan | <i>Xanthomonas campestris</i> | Pentasakkarit içeren glikoz, mannoz, glukuronik asit ve asetil ve pirüvat altbirimleri |  |

| | | | |
|--------------|--|--|---|
| Dekstran | <i>Leuconostoc mesentroides</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Acetobacter</i> sp. | Birbirlerine α -(1-6) glikozidik bağlarla bağlanmış poliglukoz |  |
| Kurdlan | <i>Alcaligenes faecalis</i> | β -(1-3) glukan: poliglukoz |  |
| Gellan | <i>Pseudomonas elodea</i> | Kısmi olarak 0-asetillenmiş polimer, ramnoz, ve glukuronik asit |  |
| Skleroglukan | <i>Sclerotium glutanicum</i> | Öncelikle β -(1-3) ve oranca daha az β -(1-6) bağlarıyla bağlanan glikoz birimleri |  |
| Pullulan | <i>Aureobasidium pullulans</i> | Öncelikle α -(1-4) ve oranca daha az α -(1-6) bağlarıyla bağlanan glikoz birimleri |  |

Pullulan üretim maliyetinin ve piyasa satış fiyatının (yaklaşık 25 \$/kg) diğer birçok polisakkaritlere göre fazla oluşu bir kısıt gibi görünse de pullulanın insan sağlığını da içeren geniş kullanım alanları, pullulan ile ilgili her geçen gün artan patent sayısı bu polisakkaritin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Leathers, 2003).

Pullulan üretim maliyetlerini düşürmek için ise substrat olarak tarımsal atıkların kullanılmasının yanı sıra, değişik biyoreaktör tasarımları ile verim arttırılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmanın amacı da klasik mekanik karıştırılmalı tank biyoreaktörlere alternatif olarak hava ile karıştırılmalı (pnömatik) biyoreaktörler ile pullulan üretiminde verimi arttırmaktır. Bu bağlamda hem hava kaldırmalı biyoreaktör hem de kabarcık kolon biyoreaktörde pullulan üretimleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra pullulan üretimine etki eden bazı proses parametrelerinin cevap yüzey yöntemi (CYY) ile optimizasyonu yapılarak hava kaldırmalı biyoreaktörde üretilebilecek maksimum pullulan miktarı incelenmiştir.

Pullulan üretimindeki önemli kısıtlardan biri organizmanın ürettiği koyu yeşil-siyah renkli melanin pigmentidir. Alt akım işlemlerinde melanini ortamdan uzaklaştırmak (*demelanization*) çoğu zaman ekstra bir basamak gerektirmekte, bu da üretim maliyetlerinin artmasına ve zaman kaybına neden olur. Bu tez kapsamında ayrıca bu kısıt için üretim ortamı modifiye edilerek organizmanın melanin üretimi baskılanmaya ve ekstra bir saflaştırma basamağı gerektiren melanin giderimi ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Tarihsel Altyapı

Literatürde az sayıda ekstrasellüler fungal α -glukan rapor edilmiştir. Polimorfik bir fungus olan *A. pullulans* tarafından üretilen pullulan, bunların içinde en çok çalışılan α -glukandır.

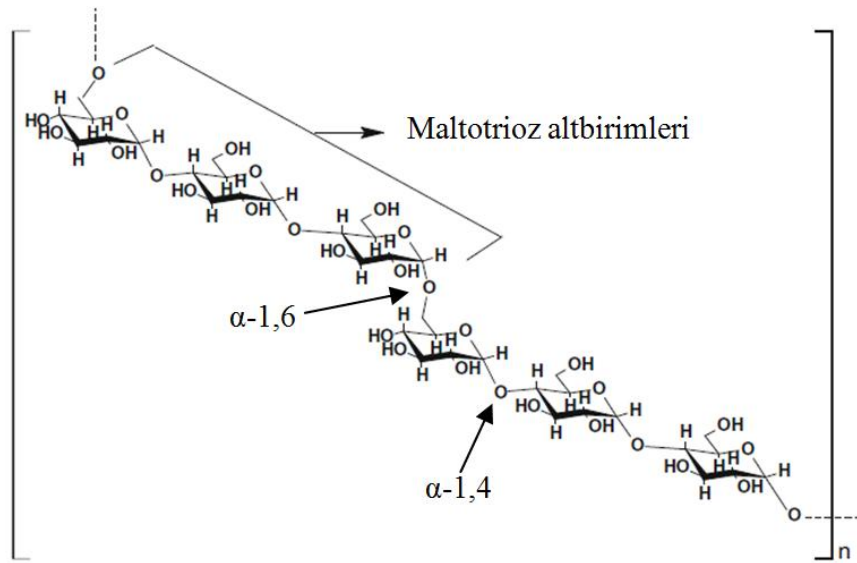
A. pullulans'ın tarafından üretilen ekstrasellüler polimer üzerine ilk öncü gözlem Bauer tarafından 1938 yılında yapılmıştır. Bernier ise 1958 yılında pullulanı kültür ortamından izole edip karakterize etmiştir. O tarihlerden bu yana pullulan üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Pullulan konusunda ilk titiz çalışmalardan birini yapan Bender et al. 1959 yılında pullulana bugün kullanılan ismini vermişlerdir (Singh and Saini, 2012).

Pullulanın yapısı ile ilgili yıllar içinde yapılan çalışmalarda pullulanın yapısında sadece α -(1 \rightarrow 4) ve α -(1 \rightarrow 6) glikozidik bağları olmayıp çok az oranda da olsa α -(1 \rightarrow 3) glikozidik bağı olduğu rapor edilmiştir. Wallenfels et al. 1960ların başlarında pullulanın kimyasal yapısını anlamaya çalışan ilk gruptandırlar. Aynı ekip 1961 yılında pullulanaz enziminin varlığını da rapor etmişlerdir. Böylece temel olarak pullulanaz enzimi tarafından hidrolize edilen pullulanın α -(1 \rightarrow 6) bağlarının ayrılarak trimer yapılar olan maltotirioz yapılarına ayrıldığı anlaşılmıştır (Singh and Saini, 2012).

Pullulanın ilk ticari üretimi 1976 yılında Hayashibara Şirketi tarafından Okayama, Japonya'da üretilmiştir. Aynı firma ayrıca 1982 yılında ilk defa pullulan filmlerini ticarileştirmiştir. 30 yıldan bu yana ticari üretimi gerçekleştiren pullulanla ilgili birçok patent alınmıştır. Pullulan 2011 yılı itibari ile piyasada 25 dolar/kg civarında alıcı bulmaktadır (Cheng et al., 2011)

2.2 Pullulanın Kimyasal Yapısı

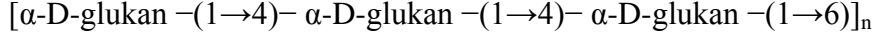
Pullulanın dimerik segment karakteristik yapısı $[\rightarrow x)\text{-}\alpha\text{-D-glukan-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-glukan-(1}\rightarrow]$ ve $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-glukan-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-glukan-(1}\rightarrow]$ şeklinde olup x 4 veya 6 olabilir. Bir trisakkarit olan maltotrioz (G_3) pullulanın temel birimidir. Pullulan maltotrioz (G_3) birimlerinin tekrar etmesiyle oluşur (Şekil 2.1) (Leathers, 2003; Singh and Saini, 2012).



Şekil 2.1. Pullulanın şematik kimyasal yapısı. Pullulan, birbiri ardına devam eden maltotrioz alt birimlerinden oluşmuştur (Singh ve Saini'den, 2012).

Maltotrioz alt birimleri, birbirine (1→4) ve (1→6) glikozidik bağları ile bağlanmakta olup (1→6) bağlarının bu alt birimler arasındaki oranı daha fazladır. Pullulanın kapalı formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ şeklindedir. Tek bir polisakkaritte hem α -(1→4) hem de α -(1→6) bağlarının olması, pullulanın amiloz ve dekstran arasında bir geçiş yapısı olarak anılmasına neden olur (Singh and Saini, 2012).

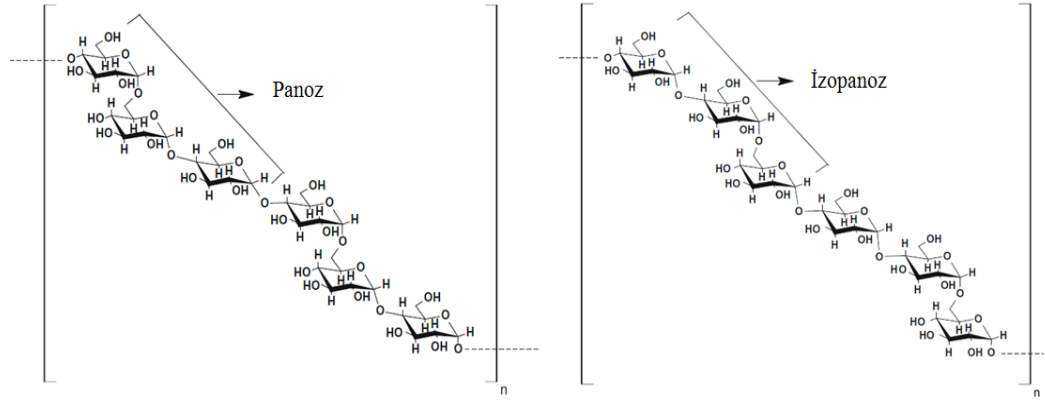
1960ların başlarında Wallenfels araştırma grubu ve diğer araştırma grupları, pullulanın 2:1 oranında (1→4) ve (1→6) bağlarına sahip lineer bir α -D-glukan olduğunu belirttiler (Singh and Saini, 2012). Pullulanın genel ve en çok kabul edilen yapısal formülü:



şeklindedir. Bu yapıda tek bir maltotrioz görünmektedir. Maltotrioz 3 α -D-glukanın birbirlerine (1 \rightarrow 4) bağları ile bağlanmasıyla oluşur. Pullulan ise bu maltotrioz altbirimlerinin birbirlerine (1 \rightarrow 6) bağları ile lineer bir şekilde bağlanması ile oluşmuştur. Formüldeki n, maltotrioz altbirimlerinin sayısını ifade etmekte olup, bu sayı ortam şartları, fermentasyon aşaması ve mikroorganizma suşuna göre değişiklik göstermektedir (Singh and Saini, 2012, Cheng et al., 2011).

Bu genel kimyasal yapıya ek olarak, gene Wallenfels et al. tarafından 1965 yılında pullulanın maltotetraoz (4 adet α -D-glukan) altbirimleri de içerdiğini belirtmiştir. Bu maltotetraoz alt birimleri oranca az olmakla birlikte (maksimum %7) lineer pullulan yapısına rastgele dağılmıştır. Pullulandaki maltotetraoz oranı kaynak türe spesifiktir (Singh and Saini, 2012). Maltotrioz alt birimlerinin aksine maltotetraoz α -amilaz enzimine afinitesi yüksektir. Dolayısıyla fermentasyonun ileri aşamalarında organizmanın salgıladığı α -amilaz enzimi nedeniyle pullulan maltotetraoz altbirimlerinden yıkılarak daha küçük moleküler ağırlıklı pullulan oluşur. Bazı türlerin ise α -(1 \rightarrow 4) bağlarına ek olarak az miktarda da olsa α -(1 \rightarrow 3) ve hatta β -(1 \rightarrow 3) ve β -(1 \rightarrow 6) bağları içerdiği de rapor edilmiştir. Bouveng et al. 1963 yılında *A. pullulans*'tan salgılanan hücre dışı polisakkaritte pullulana ek olarak β -glukan, galaktoz, glikoz, mannoz ve üronik asit içerikli polisakkaritler gözlemlemiştir (Singh and Saini, 2012).

Aerobacter aerogenes 'in ürettiği ekstrasellüler bir enzim olan "pullulanaz"ın keşfi, pullulanın yapısının anlaşılmasında için önemli bir rol oynamıştır (Singh et al., 2008). Pullulanaz, α -(1 \rightarrow 6) bağlarını yıkararak pullulanı maltotrioz alt birimlerine dönüştürür. Bazen de pullulanın asit hidrolizi ve diğer pullulanaz enzimlerini etkisiyle izomaltoz, maltoz, panoz ve izopanoza yıkılır. Böylece pullulan, panoz ya da izopanozun polimeriymiş gibi görünür (Singh ve Saini, 2012) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Pullulanın birbirini ardına devam eden panoz (solda) ve izopanoz (sağda) birimleri şeklinde tanımlanan şematik yapısı (Singh ve Saini'den, 2012).

2.3 Pullulanın Fiziksel Özellikleri

Düzgün α -(1 \rightarrow 6) bağları pullulana yapısal esneklik ve yüksek çözünürlük sağlamaktadır. Bu özelliği ile pullulan petrokimyasal türevli polimerleri ikame etme imkanı verir. Pullulan kimyasal polimerlerden farklı olarak hem insan hem de çevre için biyoyoumlu ve biyobozunurdur. Pullulan, toz halinde beyaz renkte olup, nem çekmeyen (*non-hygroscopic*) ve suda (sıcak veya soğuk) çabucak çözünür özelliktedir. Pullulan, toksik olmayan, kokusuz, tatsız ve yenilebilir özelliktedir. Pullulanın moleküler ağırlığı (M_w) ortam şartları ve mikroorganizma suşuna göre 362-480 kDa arasında değişmektedir (Okada et al., 1990).

Gıda kaplama endüstrisinde yıllardır kullanıldığından pullulanın belki de en bilinen özelliği oksijen geçirgenliğini çok düşük olması, yani oksijen bariyeri oluşturmasıdır. Pullulanın diğer fiziksel özellikleri çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Pullulanın bazı fiziksel özellikleri (Yatmaz ve Turhan'dan, 2012).

| Özellik | Etki |
|-------------------|--|
| Çözünürlük | Suda yüksek çözünürlük gösteren pullulan, dimetilformamid ve dimetil sülfoksit dışındaki organik çözücülerde çözünmez. |

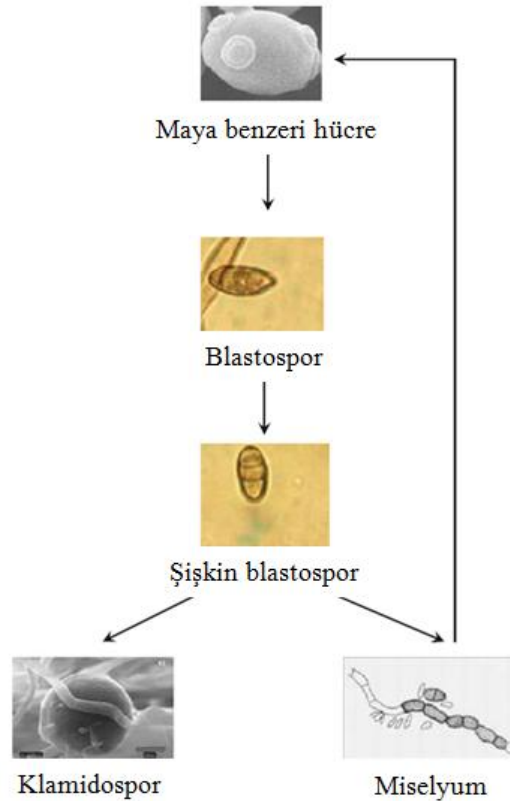
| | |
|--------------------------------|--|
| Kararlılık | 1, 4 ve 6. karbonlardaki bağlar sayesinde pullulan nispeten kararlıdır. 250-280 °C'lerde nişasta ile benzer şekilde ayrılmakta ve kömürleşmektedir. |
| Viskozite | Suda stabil viskoz bir yapı oluşturarak çözünür. Diğer polisakkaritlere göre daha az viskozdur ancak viskoz özelliğini kolay kaybetmez. Viskozite moleküler ağırlığı (MA) ile orantılıdır. Yüzey gerilimi suya yakındır (74 dyne/cm ²). |
| Film oluşturabilme | %5-25'lik sulu çözeltileri yenilebilir filmlerin içerisinde oluşturulabilir. Düşük oksijen geçirgenliği (0.5 cc/m ² /24 saat; %60 RH ve 23 °C), termal stabilite, anti-statik ve dondurulduktan sonra elastisitesini koruma özelliklerine sahiptir. Lezzet öğelerini tutar ve yağa dayanıklıdır. |
| Yapışma ve bağlayıcılık | Yoğun yapışkan özelliğe sahip olup; gıdalarda kullanıma uygundur. Püskürtme proseslerinde iyi bir yardımcı elemandır. |
| Nem tutma | RH<%70'de %10-15 nem içeriğine sahiptir. Higroskopik ve yapışkan değildir. Nemlendirici ve bağlayıcı olarak kullanılabilir. |
| Biyobozunurluk | Sindirimi yavaş bir polisakkarit olup pullulanaz ve izopullulanaz gibi mikrobiyal enzimler tarafından parçalanabilmektedir. |

2.4 *Aureobasidium pullulans* ve Pullulan Üreten Diğer Mikroorganizmalar

Aureobasidium pullulans, dünyanın birçok yerinde değişik floralarda yaşayabilir. Toprak ve suda bitkisel atıkları sindirerek saprofit olarak bulunabileceği gibi; yaprak üstü, banyo fayanslarındaki küf yapılarından da izole edilmiştir. *Aureobasidium pullulans*'ın izole edilmesinin nedenlerinden biri de pullulan üretiminin yanı sıra, amilaz, esteraz, proteaz, pektinaz, xylanaz gibi

hemisellülazlar ve mannanaz gibi endüstriyel değeri de olan bir çok enzimi üretmesidir (Gaur et al., 2010). Hatta *Aureobasidium pullulans* 'un bazı renkli-varyant (*color-variant*) türleri yüksek miktarda endo-xylanazın doğal üretici olarak bilinir (Singh ve Saini, 2012). *Aureobasidium pullulans* çoğunlukla melanin pigmenti üreten bir mikroorganizmadır. Tipik melanin üreten suşların rengi, açık beyaz-sarıdan koyu yeşil-siyaha doğrudur. *Aureobasidium pullulans*'ın renkli-varyant suşları ise renklerine göre tipik pigmentli suşlardan ayrılır. Tropikal bölgelerde yaşayan bu suşların renkleri parlak kırmızı, sarı, pembe ve mor olabilmektedir. Ayrıca toplam DNA'nın % 37-44'ünün pigmentlerle ilgili olduğu rapor edilmiştir (Gaur et al., 2010).

A. pullulans, polimorfik bir fungustur. Organizma, yaşına göre ve proses ortamına göre farklı morfolojilerde olabilir. Bu morfolojik yapılar, maya benzeri hücre (*yeast-like cell*) genç blastospor (*young blastospore*), şişkin hücre (*swollen blastospore*), miselyum (*mycelium*) ve klamidospor (*chlamydospore*) şeklindedir (Ronen et al., 2002) (şekil 2.3)



Şekil.2.3. *A. pullulans*'ın morfolojik yapıları (Ronen et al.'dan, 2002)

Hangi *A. pullulans* evresinin pullulan üretiminden sorumlu olduğu konusunda literatürde çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen bu araştırmaların bazıları birbiri ile çelişmektedir. Bu konuda genel bir konsorsiyum olmasa da maya benzeri hücrelerin ana pullulan üreticileri olduğu kabul edilebilir.

A. pullulans ile çalışmanın bazı dezavantajları vardır. Koyu yeşil-siyah renkli pigment olan melanin üretimi bu dezavantajlardan akla ilk gelenidir. Melanin, fermentasyonun ileri aşamalarında şişkin hücrelerin klamidospora dönüştüğü safhada görülür . Üretilen melaninin neredeyse yarısı klamidospurun hücre duvarında bulurken bir kısmı da ortama salınır (Hung et al., 2006, Singh ve Saini'den, 2012). Pullulan üretiminde melaninin varlığı alt akım işlemlerinde ekstra bir saflaştırma basamağı gerektirmektedir. *A. pullulans* ile çalışmanın bir diğer dezavantajı da, fermantasyon esnasında üretilen pullulan nedeniyle üretim ortamının viskozitesinin düşmesi böylece üretim sıvısında kütle ve enerji transferinin olumsuz etkilenmesidir.

A. pullulans pullulan üretimiyle anılsa da, literatürde pullulan üreten başka türler de tanımlanmıştır. Bu türlerin bazıları çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Pullulanın mikrobiyal kaynakları (Singh ve Saini'den, 2012)

| Mikroorganizma | Kaynak |
|---------------------------------|---|
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | Bauer (1938) , Cooke (1959) , Leathers (2003) |
| <i>Tremela mesenterica</i> | Fraser ve Jennings (1971) |
| <i>Cytaria harioti</i> | Waksman et al. (1977) , Oliva et al. (1986) |
| <i>Cytaria darwinii</i> | Waksman et al. (1977) , Oliva et al. (1986) |
| <i>Cryphonectria parasitica</i> | Corsaro et al. (1998) , Delben et al. (2006) , Forabosco et al. (2006) |
| <i>Teloschistes flavicans</i> | Reis vd. (2002) |
| <i>Rhodototula bacarum</i> | Chi ve Zhao (2003) |

2.5 Pullulanın Kullanım Alanları

Biyopolimerlerin sahip oldukları kullanışlı özellikler bilinmesine ve kimyasal kökenli polimerin yerlerine kullanılabilmesine rağmen, az sayıda biyopolimer endüstriyel sayıda üretilmektedir. Endüstriyel ölçekte üretilen biyopolimerlerin içinde pullulan önemli bir yer tutar. Pullulan endüstride saf halde kullanılabildiği gibi, kimyasal modifikasyonlardan sonra da kullanılabilmektedir. Pullulanın kimyasal modifikasyonları pullulana yeni mekanik özellikler katmaktadır (Dağbağlı vd., 2008) Kimyasal olarak modifiye edilmiş ya da pullulan içeren malzemelerle ilgili çok sayıda patent mevcuttur. Pullulanın kullanım alanları ise aşağıdaki gibi sıralanabilir.

2.5.1 Gıda sektörü

Pullulanın kullanım alanlarından belki de en bilineni “pullulan filmler ile gıdaların kaplanması”dır. Pullulan filmlerin tatsız, kokusuz, renksiz, yenebilir, oksijen-geçirgensiz ve güçlü mekanik özelliklerinden dolayı gıda kaplamalarında kullanılmaktadır (Ürküt, 2007). Pullulan filmler, pullulanın %5-10 oranında suda ya da uygun başka bir çözücüde çözündürülmesi ile elde edilir. Pullulan kaplaması gıdalar üzerinde ince bir tabaka oluşturur (5-60 µm). Pullulan suda kolayca çözüldüğü için pullulan filmler de ağızda kolayca erir. Pullulan filmlerin oksijen geçirgensizliği, gıdalarda yağlar, vitaminler ve diğer önemli içerikleri okside olmaktan koruduğu için gıdaları taze tutar, böylece gıdaların raf ömrü uzar. Sebzeler, meyveler, etler, kurutulmuş gıdalar pullulan filmlerle kaplanabilir (Singh and Saini, 2012, Cheng et al., 2011).

Pullulanın amilaza dayanıklı yapısından dolayı insanda çok yavaş sindirilir. Böylece düşük kalorili diyet gıdalarda nişasta yerine kullanılabilir. Pullulan, bakteri, küf veya fungus tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmazlar (hatta pullulanın fungal üremeyi inhibe ettiğini belirten çalışmalar vardır). Dolayısıyla pullulana içerikli gıdaların bozulma süresi uzayacağından, raf ömrünü de uzatmaktadır (Singh and Saini, 2012).

Pullulanın viskoz özelliklerinden dolayı, özellikle ketçap, mayonez gibi soslarda kıvam arttırıcı olarak kullanılır. Ayrıca pullulanın viskozitesi, sıcaklık, pH farklılıkları ve metal iyonları varlığı ile kayda değer bir değişim göstermez (Cheng et al., 2011; Singh and Saini, 2012).

Adhesif özelliklerinden dolayı, gıdalarda stabilize edici veya bağlayıcı ajan olarak kullanılır. Örneğin fındığın kurabiyeye yapışması için pullulan kullanılabilir. Pullulan buz ve laktoz kristalleri arttırdığı, böylece erimeyi zorlaştırdığı için dondurmalarda kullanılır. Gıda sektöründe sık kullanılan maltotriozca zengin şuruplar genelde, maltoz şuruplarından katyon iyon değişim kromatografisi kullanılarak elde edilir. Bu prosese alternatif olarak maltotriozca zengin şuruplar, pullulanaz enzimi kullanılarak pullulanın enzimatik hidrolizi ile de elde edilebilir (Singh and Saini, 2012).

2.5.2 Biyomedikal ve ilaç sektörü

Pullulan toksik-olmayan, immumojenik-olmayan, karsinojenik-olmayan ve biyobozunur özelliklerinden dolayı biyomedikal ve ilaç sektörlerinde sıklıkla kullanılır (Rekha ve Chandra, 2007).

Pullulan, adhesif (yapıştırıcı) özelliklerinden dolayı takma diş/diş protezlerinde, pullulan filmlerin sağladığı mekanik dayanım ve oksijen-geçirgenlik sayesinde ilaç kaplamalarında, mekanik özelliklerinden dolayı şampuan, krem ve kozmetik tozlarda (Dağbağlı, 2008; Cheng et al., 2011; Singh and Saini, 2012) ve konjugant olarak bazı aşılarında (Mitsubishi ve Koyama 1987; Singh and Saini'den, 2012) kullanılır.

Pullulan son dönemlerde hedeflenmiş ilaç ve gen salımı (*targeted drug and gene delivery*) için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Pullulan suda iyi çözünen bir polisakkarittir, dolayısıyla kontrollü ilaç salımında taşıyıcı olarak hidrofobikleştirilmiş pullulan kullanılır. Hidrofobikleştirme işlemi kimyasal olarak pullulanın modifiye edilmesiyle elde edilir (örneğin, pullulanacetate/sulfonamide, PA/SDM). Bir diğer ünlü polisakkarit olan dekstran

ile karşılaştırıldığında serumun içinde pullulan, dekstrandan daha hızlı degrede olur. Pullulan diğer polisakkaritlere göre karaciğerde daha çok birikir. Özellikle pullulanın karboksimetilasyonu pullulanın karaciğere afinitesi artırır. Böylece karaciğere hedeflenmiş ilaç sistemleri için pullulan kullanılabilir (Rekha ve Chandra, 2007).

Gen terapisi pullulanın kullanıldığı bir diğer uygulamadır. Gen terapisi kanser başta olmak üzere bir çok hastalığın tedavisinden kullanılmaktadır. Gen terapisinden genellikle gen taşıyıcı ajanlar olarak virüsler kullanılmaktadır. Virüslerin immünojenik yan etkilerinden dolayı, doğal polimerlerin katyonik türevleri bu amaç için kullanılmasına yönelik girişimler vardır. Bu bağlamda son dönemlerde pullulanın biyouyumlu ve toksik-olmayan özelliklerinden dolayı gen taşıyıcı ajan olarak kullanımı çalışılmaktadır (Rekha ve Chandra, 2007).

Pullulan, doku mühendisliği çalışmalarında da kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinde doku rejenerasyonun için kullanılan yapı iskeleleri (*scaffolds*) olarak kimyasal olarak modifiye edilmiş pullulan (örneğin, karboksimetil-pullulan) kullanan çalışmalar mevcuttur (Rekha ve Chandra, 2007).

2.5.3 Diğer sektörler

Pullulan gıda ve biyomedikal sektörlerindeki kullanımına ek olarak, sedimentasyon işleminde flokülant ajan olarak; kağıt üretiminde mekanik özelliklerinden dolayı yıpranmaya karşı ve hidrofilik özelliklerinden dolayı mürekkep tutucu olarak; gene hidrofilik özelliklerinden dolayı mürekkeplerin kalitesinin artırılmasında ve enzim immobilizasyonunda kullanılabilir (Cheng et al., 2011; Singh and Saini, 2012).

2.6 Fermantatif Pullulan Üretim Prosesi

Fermantatif pullulan üretiminde, başlangıçta saf suya benzer şekilde newtonian sıvı karakteristiği gösteren üretim ortamında, üretilen ekstrasellüler polisakkaritler yüzünden daha sonra viskozitede azalma gözlenerek non-

newtonian sıvı karakteristiği gözlenir. Üretim ortamının reolojisindeki karakteristik değişime ek olarak aerobik ortam ihtiyacı da fermantatif pullulan üretimlerindeki bir diğer ortak özelliktir.

Literatürde pullulan üretim prosesleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genellikle mikrobiyal kaynak, nutrient kaynağı, ortam koşulları (oksijen konsantrasyonu, pH, sıcaklık, mineral oranı gibi) ve biyoreaktör tasarımları ile ilgilidir. Bu çalışmalar incelendiğinde sonuçlar bazında bazı tutarsızlıklar gözlenmektedir. Pullulan üretiminde gözlenen bu tutarsızlıklar prosese etki eden -öngörülen/öngörülemeyen- birçok parametrenin varlığına işaretlerdir. Ayrıca kaynak suşa özđü yapılan çalışmalar bu tutarsızlıkları açıklamada bir diğer etkidir. Üretim esnasında viskozitedeki artış ve melanin üretimi ise fermantatif pullulan üretiminin başlıca sorunlarındanır.

2.6.1 Pullulan üretime etki eden parametreler

Fermantatif pullulan üretime etki eden başlıca parametreler karbon kaynağı, azot konsantrasyonu, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu ve pH'tır. Aşağıda bu parametrelerde dair bazı çalışmalar derlenmiştir.

2.6.1.1. Pullulan üretim ortamı

Pullulan üretiminde sentetik besi ortamları kullanılabilirdiği gibi üretim maliyetlerini düşürme adına tarımsal atıklar gibi kompleks besi ortamları da kullanılabilir.

Pullulan üretiminde glikoz, sükröz, mannoz, galaktoz, fruktozun yanı sıra melas gibi tarım atıkları pullulan üretiminde çok çalışılmış ve iyi bilinen karbon kaynaklarıdır (Singh et al., 2011, Cheng et al., 2011). Bunların içinde sükröz en çok kullanılan karbon kaynağıdır (Singh and Saini, 2007). Pullulan üretiminde tarımsal artıkların substrat olarak kullanımı proses maliyetlerini düşürmesi açısından oldukça avantajlı görünmektedir.

Pullulan üretiminde karbon kaynağına dair ilk rapor Bender et al. tarafından 1959 yılında yayınlanmıştır. Bender et al.'nin doğal *A. pullulans* ile gerçekleştirdikleri bu çalışmada 5 günlük üretim sonunda 22g/L glikoz ve 20 g/L sükröz tükendiğini ve buna karşılık 1,3 g ekstraselüler polisakkarit/g kuru hücre verim gözlemlemişlerdir (Singh and Saini, 2007).

Karbon kaynağı olarak xyloze ve laktoz içeren üretim ortamlarında düşük biyokütle ve pullulan üretimi gözlenmiştir (Duan et al. 2008; Cheng et al.'dan 2011). Göksungur vd.'nin (2003) *A. pullulans* P56 ile yaptıkları çalışmada pancar melası ve sentetik ortamda pullulan üretimi karşılaştırılmalı olarak yapılmıştır. 50 g/l başlangıç substrat konsantrasyonu ile (pH:7,5) pancar melasından 35g/L toplam polisakkarit ve 16,9 g/L pullulan; sentetik ortamdan ise 21,4g/L toplam polisakkarit ve 16,7 g/L pullulan elde edilmiştir. Pancar melasından daha çok pullulan elde edilmesine rağmen pancar melasından elde edilen toplam polisakkarit içerisindeki pullulan oranı (%48), sentetik ortamınkinden (%78) daha düşüktür. Bu çalışma pullulan üretiminde pancar melasının alternatif bir substrat olarak kullanılabilceğini fakat toplam polisakkarit içindeki pullulan oranının düşük olduğunu göstermiştir.

Sugumaran et al.'un (2012) *A. pullulans* MTCC 2670 ile yaptıkları çalışmada katı kültür fermantasyonu ile 4 çeşit tarımsal atığı (buğday kepeği, pirinç kepeği, hindistan cevizi çekirdeği ve palmiye çekirdeği) pullulan üretimi için karbon kaynağı olarak denemişlerdir. Çalışmada maksimum pullulan miktarı (18,43 g/L) ,pH 6,5'ta 7 günlük üretim sonunda palmiye çekirdeğinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada elde edilmiştir. Aynı araştırmacılar ucuz bir tarımsal atık olan palmiye çekirdeğinin pullulan üretiminde kullanılacak yeni ve kullanışlı bir karbon kaynağı olabileceği belirtmişlerdir.

Leathers and Gupta (1994) *Aureobasidium* sp. NRRLY-12,974 suşu ile biyoetanol prosesi atıklarını (mısır lifi, ince mısır slajı vb.) substrat olarak kullanarak pullulan üretmiştir.

Barnett et al.'un (1998) *A. pullulans* NRRLY-6220 suşu ile yaptıkları çalışmada, patates nişastası değişik enzimlerle (α -amilaz, pullulanaz,

amiloglikosidaz, β -amilaz) hidroliz edilerek pullulan üretiminde substrat olarak kullanılmıştır. α -amilazın tek başına kullanıldığı çalışmada düşük verim alınırken, pullulanaz ve amiloglikozidazın birlikte kullanıldığı çalışmada verim artmıştır. Pullulanaz ve β -amilazın birlikte kullanıldığı çalışmada ise pullulanaz ve amiloglikozidazın birlikte kullanıldığı çalışmadan iki katından fazla pullulan (maksimum 58g/L) elde edilmiştir.

Literatürde pullulan üretiminde substrat olarak kullanılan diğer bazı tarımsal veya endüstriyel atıklar şöyledir: proteinsizleştirilmiş peyniraltı suyu, şeker kamışı suyu, tatlı patates, turba hidrolizatı (Roukas 1999; LeDuy and Boa 1983; Wu et al. 2009, Cheng et al., 2011'den), keçiboynuzu kabuğu, üzüm kabuğu posası (Deepak et al., 2012)

Fermantatif pullulan üretiminde karbon kaynağının fazla kullanımı (%5'ten fazla) substrat inhibisyonuna yol açar (Kim et al., 2000; Shin et al., 1987; Cheng et al. 'dan, 2011).

Pullulan üretiminin ko-kültür ile yapıldığı çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, *A. pullulans* SH 8646 ve *Kluyveromyces fragili* ATCC 52466'nın beraber kültüre ettiği bir çalışmada, D-fructopiranosil içeren inulin, *K. Fragili* tarafından inulaz enzimi ile hidrolize edilir ve *A. pullulans* için karbon kaynağı olarak kullanılır (Shin et al., 1987 ; Cheng et al. 'dan, 2011).

Pullulan üretimini etkileyen önemli bir diğer nutrient azottur. Azot kaynağı olarak amonyum iyonlarının (NH_4^+) kullanımı pullulan üretiminde önemli bir yer tutar (Cheng et al., 2011). Amonyum iyonlarının yanı sıra maya ekstraktı da azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Yatmaz ve Turan, 2011). Fazla azot beslemesi biyokütle miktarını arttırmasına rağmen polisakkarit miktarına belirgin bir katkısı yoktur (Orr et al. 2009; Cheng et al. 'dan, 2011).

Cheng et al.'un (2010) *A. pullulans* ATCC 201253 ile yaptıkları çalışmada çeşitli azot iyon konsantrasyonlarını denemiş ve maksimum pullulan miktarının (23,1 g/L), 5 g/L başlangıç amonyum sülfat konsantrasyonunda elde edildiği rapor edilmiştir.

Azot kaynağı olarak kompleks azot kaynaklarının kullanıldığı durumlar da vardır. Karbon kaynağı olarak sükroz veya mısır şurubunun kullanıldığı bir çalışmada azot kaynağı olarak soyton kullanılmış ve her iki karbon kaynağında da yüksek pullulan üretimi sağlanmıştır (Reed-Hammer and West, 1994, Ürküt'den 2007).

Etkin bir şekilde ekstraselüler polisakkarit üretilmesi için karbon/azot oranının 10:1 olması gerektiği de araştırmalar arasındadır. (Morin 1998; Kumar et al. 2007; Cheng et al.'dan, 2011).

Ayrıca biyotin, ferrik klorid, mangan klorid ve çinko kloridin pullulan üretimini arttırdığı da bilinmektedir (West and Reed-Hammer, 1992; West and Strohfus 1997; Singh and Saini'den, 2011). Buna karşılık Fe^{+3} ve Zn^{+2} , nin maya benzeri hücreler ve polisakkaritlerin gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Reeslev, 1995, Yatmaz ve Turan'dan, 2011).

2.6.1.2. pH ve sıcaklık

Bir çok çalışmada pullulan üretiminde optimum pH aralığı 5,5 ile 7,5 buçuk arasında değişmektedir. (Lee and Yoo 1993; Shingel 2004; Cheng et al. 2009b; Li et al. 2009, Singh and Saini'den, 2011). Düşük pH pullulan üretimini baskımlarken çözünmeyen glukan ve biyokütle üretimini uyarmaktadır (Singh and Saini, 2012).

Pullulan üretimi konusunda *A. pullulans*'ın hangi morfolojik formunun daha etkili olduğu konusunda literatürde bir birlik olmasa da, pH'ın hücre morfolojisini etkilediği düşünülmektedir. Maya benzeri hücreler (*yeast-like cells*) nötral pH'larda yüksek molekül ağırlıklı pullulan üretirken (Lee et al.2001; Singh and Saini'den, 2011) misel ve maya benzeri hücre morfolojisinin beraber olduğu kültürde yüksek pullulan konsantrasyonu elde edilmiştir (Roukas and Biliaderis 1995; Singh and Saini'den, 2011)

Pullulan üretiminde optimal sıcaklık suştan suşa değişmekle birlikte 25-30 °C arasındadır (Singh and Saini, 2012; Chengh et al., 2011). Sıcaklık, pullulan üretimini etkilemekle birlikte hücre büyümesi ve morfolojisini de etkilemektedir. Wu et al.'un (2010) yaptıkları bir çalışmada optimum sıcaklık pullulan üretimi için (27,4 g/L) için 26 °C iken hücre büyümesi için (10 g/L) 32 °C'dir (Singh and Saini, 2012).

Pullulan üretimi ve hücre büyümesinin farklı optimum sıcaklık gerektirdiği bir çalışmada, hücreler, büyümesi için 2 gün boyunca 32 °C, daha sonra pullulan üretiminin gerçekleşmesi için 26 °C'de inkübe edilmiştir (Wu et al., 2010)

2.6.1.3. Oksijen profili

Oksijen pullulan üretiminde önemli bir parametredir. Oksijensiz ortamda *A. pullulans* ne üremekte ne de pullulan üretmektedir. Pullulan üretimi yüksek havalandırma (2vvm civarı) gerektirir (Roukas and Mantzouridou, 2001; Singh and Saini'den, 2011). Bununla birlikte yüksek havalandırma üretilen pullulanın molekül ağırlığını düşürdüğü rapor edilmiştir (Audet et al., 1996; Singh and Saini'den, 2011). Birçok çalışmada yüksek havalandırmanın pullulan üretimini arttırdığını belirtirken, (Wecker and Onken, 2005) havalandırma hızı arttıkça kayma gerilimi de arttığından pullulan üretiminin olumsuz etkilendiğini belirtmektedir. Pullulan üretiminde genelde kayma geriliminden kolayca etkilenen maya formunda hücrelerle çalışıldığı hesaba katılmalıdır. Yüksek havalandırma hızında hesaba katılması gereken bir diğer olay pullulanın yüksek viskoz yapısının da etkisiyle yaşanan köpürmedir.

Hava basıncının arttırıldığı bir çalışmada oksijen transfer hızı da arttığından polisakkarit üretimi artmıştır. Bununla birlikte basınç 0,5–0,75 MPa kritik değerini geçince hücrelerin agregatlaştığı ve pullulan üretiminin durduğu gözlemlenmiştir (Dufresne et al., 1990; Singh and Saini'den, 2011).

2.6.2 Fermantasyon teknolojisi ve biyoreaktör tasarımları

Derin kültür fermantasyonu ile pullulan üretimi endüstriyel ölçekte uzun yıllardır başarıyla uygulanmaktadır. Pullulan üretimini, prosese etki eden parametrelerin yanı sıra biyoreaktör tasarımları da etkilemektedir. Literatürde pullulan üretiminde kesikli (*batch*), beslemeli kesikli (*fed-batch*) ve sürekli (*continuous*) üretim modlarının yanı sıra immobilize ve biyofilm sistemlerin de olduğu değişik tasarımlar mevcuttur.

Havalandırma ve karıştırma, biyoreaktörlerde işletim koşullarını etkileyen önemli faktörlerdendir. Havalandırma, hücrelerin pullulan üretimi için kritik bir parametredir ve mikrobiyal hücrelerin büyümesi ve verimi için gerekli oksijeni sağlar. Karıştırma ise; kütle ve enerji transfer olaylarını gerçekleştirmesinin yanı sıra, biyoreaktör içindeki besi ortamı komponentlerinin homojen dağılımı (hücre ve besinlerin dağılımı) için de önemlidir (Göksungur vd., 2005; Singh et al., 2010).

Pullulan sentezinin geç eksponansiyel fazda başladığı ve durağan fazda devam ettiği, ilk olarak Catley (1971) tarafından raporlanmış ve sonrasında McNeil and Harvey (1993) ve Leathers (2003)'in çalışmalarında doğrulanmıştır. Bu bilgi, büyüme hızının maksimize edilerek üretim olmayan fazın, yani eksponansiyel büyüme fazının, minimize edilmesi ve pullulan sentezi fazına olabildiğince hızlı ulaşılması açısından önemlidir. Bu da; etkili karıştırma ve oksijen transferine sahip biyoreaktörleri işaret etmektedir (Cheng et al., 2011).

Başlangıçta sıvının, saf suya yakın bir viskozlukta Newtonian davranışının olması; fakat geç eksponansiyel fazdaki kültür ortamının, yüksek viskoz hale gelmesi ve Newtonian olmayan davranış (pseudo-plastiklik) sergilemeye başlaması proses sürecini zora sokar (Gaidhani et al., 2005; Singh and Saini, 2011). Bu durumda, durgun tabakalara ve standart karıştırmalı tank reaktör kullanımında karıştırıcı taşmasına yol açan, kütle (oksijen, besin), momentum ve ısı transferi kısıtlanmaları meydana gelir. Zayıf karıştırmalı sistemlerde proses kontrolünün yetersiz olacağı açıktır ve geleneksel

fermentörlerde karıştırma, pullulan verimi, verimliliği ve kalitesini ciddi olarak etkiler. Bu sebeple, viskoz sıvı için iyi kitle karıştırmasına ve oksijen transferine sahip fermentör sistemler önerilir (Gaidhani et al. 2005).

Youssef et al., sükröz ve glikoz içeren çalkalamalı kültür ve karıştırmalı tank biyoreaktörlerde, çeşitli suşlardaki *A. pullulans* hücrelerini kullanarak pullulan üretimi yapmışlar ve verimliliği günde 4,5g/L olan pullulanın, maksimum konsantrasyonunun 31,3g/L olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Shabtai et al. , artan verimlilik sağlayan iki fazlı fermentasyon prosesi ile pullulan üretmişlerdir ve 50 saat içerisinde pullulan konsantrasyonunun 35g/L olduğunu bildirmişlerdir. Roukas et al. , 2vvm havalandırma hızına sahip hava kaldırmalı biyoreaktör kullanarak maksimum pullulan konsantrasyonunu 30g/L olarak elde etmişlerdir (Deepak et al., 2012).

Cheng et al.'ın (2011) *A. pullulans* ATCC 201253 melanin üretmeyen suşu ile kesikli biyoreaktörde yaptıkları çalışmada, üretim ortamı ve diğer proses parametrelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada 75 g/L başlangıç sükröz konsantrasyonu ile 25,8 g/L (toplam polisakkarit içindeki pullulan oranı %94,5) pullulan üretilmiştir. 7 günlük inkübasyon süresi boyunca maksimum verimlilik 0,68g/L/sa'tir.

Pullulan üretiminde fazla şeker beslemesi substrat inhibisyonuna yol açmaktadır (Cheng et al., 2011). Bu sıkıntıyı önlemek için bazı çalışmalarda beslemeli kesikli üretim sistemleri kullanılmıştır. Beslemeli kesikli üretim sistemlerinde substrat biyoreaktöre belirli aralıklarla beslenerek aşırı substrat varlığından kaynaklanan substrat inhibisyonunun önüne geçilebilir.

Youssef et al. (1999), beslemeli kesikli biyoreaktör kullanarak yaptıkları çalışmada, maksimum pullulan konsantrasyonu 7 günlük üretim sonunda 31,3 g/L'den 24,5 g/L'ye düşmüştür. Cheng et al. (2010) beslemeli kesikli biyoreaktör kullanarak yaptıkları çalışmada 10. güne kadar pullulan üretiminin arttığını ve maksimum verimliliğin 0,65 g/L/sa olduğunu belirtmişlerdir. (Cheng et al., 2011).

Pullulan üretiminde sürekli sistemlerin denendiği ilk çalışmada $0,05 \text{ h}^{-1}$ dilüsyon oranında verimlilik $0,16 \text{ g/L/sa}$ 'ten $0,35 \text{ g/L/sa}$ 'e yükselmiştir. Aynı çalışmada kültür 1000 saatten fazla bir süre sorunsuz devam etmiştir. (Schuster et al., 1993; Cheng et al.'dan, 2011).

Ürküt (2007), kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *A.pullulans* P56 ile yaptığı çalışmada sentetik besiyeri ortamında kesikli ve tekrarlanan kesikli fermentasyon sistemleri kullanarak pullulan üretimini araştırmıştır. Bu çalışmada en yüksek pullulan konsantrasyonu (19.52 g/l) % 2 sodyum aljinattan elde edilen 2.0-2.4 mm çapındaki boncuklarla elde edilmiştir.

Pullulan üretiminde kalsiyum aljinat gibi immobilizasyon yöntemlerine alternatif olarak hücrelerin katı bir yüzey üzerine tutturuldukları biyofilm sistemleri de mevcuttur. Örneğin, poliüretan köpük katı zemin üzerindeki biyofilm formasyonunda *A.pullulans* hücreleri 96 saatlik bir inkübasyondan sonra 18 g/L pullulan üretilmiştir (Mulchandani et al., 1998; Cheng et al.'dan, 2011).

Sürekli üretim modunda çalışan ve biyofilm biyoreaktörün kullanıldığı bir çalışmada $0,16 \text{ h}^{-1}$ dilüsyon oranıyla maksimum pullulan konsantrasyonu ve verimliliği sırasıyla $8,3 \text{ g/L}$ ve $1,33 \text{ g/L/sa}$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada reaktöre beslenen üretim ortamının kompozisyonu ise şu şekildedir, 15 g/L sükröz, $0,9 \text{ g/L}$ amonyum sülfat ve $0,4 \text{ g/L}$ maya ekstraktı (Cheng and Demirci, 2011).

Çizelge 2.3'te 2005-2011 yılları arasında yapılan değişik biyoreaktör sistemleriyle pullulan üretimi çalışmaları mevcuttur.

Çizelge 2.3. Son dönemlerde pullulan üretimi ile ilgili yapılan bazı çalışmalar (Cheng et al.'dan, 2011).

| <i>A. pullulans</i> suşu | Biyoreaktör tipi | Üretilen pullulan | Kaynak |
|---------------------------------|--|--------------------------|----------------------------|
| P56 | Kesikli | 16,7 g/L | Göksungur et al. 2005 |
| ATCC 42023 ve ATCC 62921 | Kesikli | 22,6 g/L | Lin et al. 2007 |
| P56 | İmmobilize/kesikli | 21,1 g/L | Ürküt vd., 2007 |
| NRM2 | Kesikli | 25,1 g/L | Prasongsuk et al. 2007 |
| FB-1 | Kesikli | 23,1 g/L | Singh and Saini 2007 |
| Y68 | Kesikli | 52,5 g/L | Duan et al. 2008 |
| MTCC 2195 | Kesikli | 80,0 g/L* | Thirumavalavan et al. 2008 |
| ATCC 9348 | Kesikli | 7.02 g/L | NA Zheng et al. 2008 |
| AP 329 | Kesikli | 29.4 g/L | Wu et al. 2009 |
| ATCC 9348 | Hava kaldırmalı/Kesikli | 18.0 g/L | Orr et al. 2009 |
| FB-1 | Kesikli | 45,0 g/L | Singh et al. 2009a |
| FB-1 | Kesikli | 44,2 g/L | Singh et al. 2009b |
| CGMCC 1234 | İki aşamalı sıcaklık uygulaması /Kesikli | 27.4 g/L | Wu et al. 2010 |
| ATCC 201253 | Kesikli | 25.8 g/L | Cheng et al. 2011b |
| ATCC 201253 | İmmobilize/Kesikli | 60,7 g/L | Cheng et al. 2010a |
| ATCC 201253 | İmmobilize/Sürekli | 1.33 g/L/saat | Cheng et al. 2011a |
| ATCC 42023 | İmmobilize/Kesikli | 21.9 mg/g hücre/saat | West 2011 |

*Başlangıç şeker konsantrasyonu 50g/L olduğundan sonuç çelişkili.

2.6.3 Alt akım işlemleri

Pullulan üretiminde alt akım prosesleri, fermantasyon sıvısından saf pullulanın eldesi için gereklidir. Alt akım prosesleri, kültürasyon sonrasında kültür ortamından hücre hasatı, fermantasyon süresince üretilen melanin pigmentlerinin uzaklaştırılması, uygun solvent kullanılarak polisakkaritin çöktürülmesi ve polisakkarit içindeki pullulanın saflaştırılması işlemlerini içerir (Singh and Saini, 2012).

Fermantasyon bitiminde, mikrobiyal hücreleri içeren besi ortamı (*broth*), hücresel yıkıntılar, besi ortamından kaynaklı artıklar ve ekstraselüler matriksi içerir ve bunlar fermantasyon boyunca salgılanmıştır (Kachhawa et al., 2003).

A. pullulans'un istenmeyen karakteristik özelliklerinden birisi, koyu bir pigment olan melanin üretmeleri ve bu sebeple koyu yeşil-siyah görünmeleridir. Melanin, pullulan üretimindeki en büyük engellerden biridir (Singh et al. 2009). Melaninler, hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyabilir yetenekte, güçlü antioksidan ajanlardır. *A. Pullulans*'da, melaninin neredeyse yarısı, klamidosporeların hücre duvarında depolanır ve geri kalanı, siyah granüller olarak kültür ortamına salınır. Melanin, ultraviyole ışığa karşı tamamen geçirimsiz ve aseton, eter, benzen gibi organik solventlerde çözünmemektedir (Singh and Saini, 2012).

Siehr (1981), melaninin ekstraselüler sentezinin yanı sıra, fermantasyonun son evresinde, hücre morfolojisi şişmiş hücrelerden klamidosporelara değiştiğinde, pentaketit yolak ile hücre içi sentezinin de yapıldığını raporlamıştır (Singh and Saini, 2012). Melanin sentezi kültür koşullarına bağlıdır ve kültür ortamı genellikle, en az melanin pigmentleşmesine göre optimize edilir. Fermantasyon sıvısına uygulanacak uygun bir üst akım prosesi, bu problemi hafifletebilmektedir (Kachhawa et al., 2003). Genellikle, melaninsiz pullulan üreten muatant suşlar kullanılarak, geri

dönüşüm ve saflaştırma işlemleri, uygun organik solvent kullanılarak yapılan tek basamaklı çöktürme ile gerçekleştirilebilir. Bu organik solvent genellikle, üç veya dört karbon atomuna sahip alkol, ester veya eter grubuna dahildir (Singh and Saini, 2012).

Yüksek molekül ağırlıklı ve nispeten melaninsiz pullulan elde etmek için, kültür koşulları ve suş seçimi önemli parametrelerdir. Melanin, aktif kömür ile muamele edilmesiyle ortamdan uzaklaştırılabilir (Singh et al., 2011). Çöktürülen pullulanın beyaz katı şeklinde olması gıda ve ilaç endüstrisinde ticari olarak kullanılabilmesi için önemli bir özelliktir (Ürküt, 2007). Pullulanın geri kazanımında ve saflaştırılmasında ise; organik solventler, özellikle alkol, kullanılır (Singh et al., 2011).

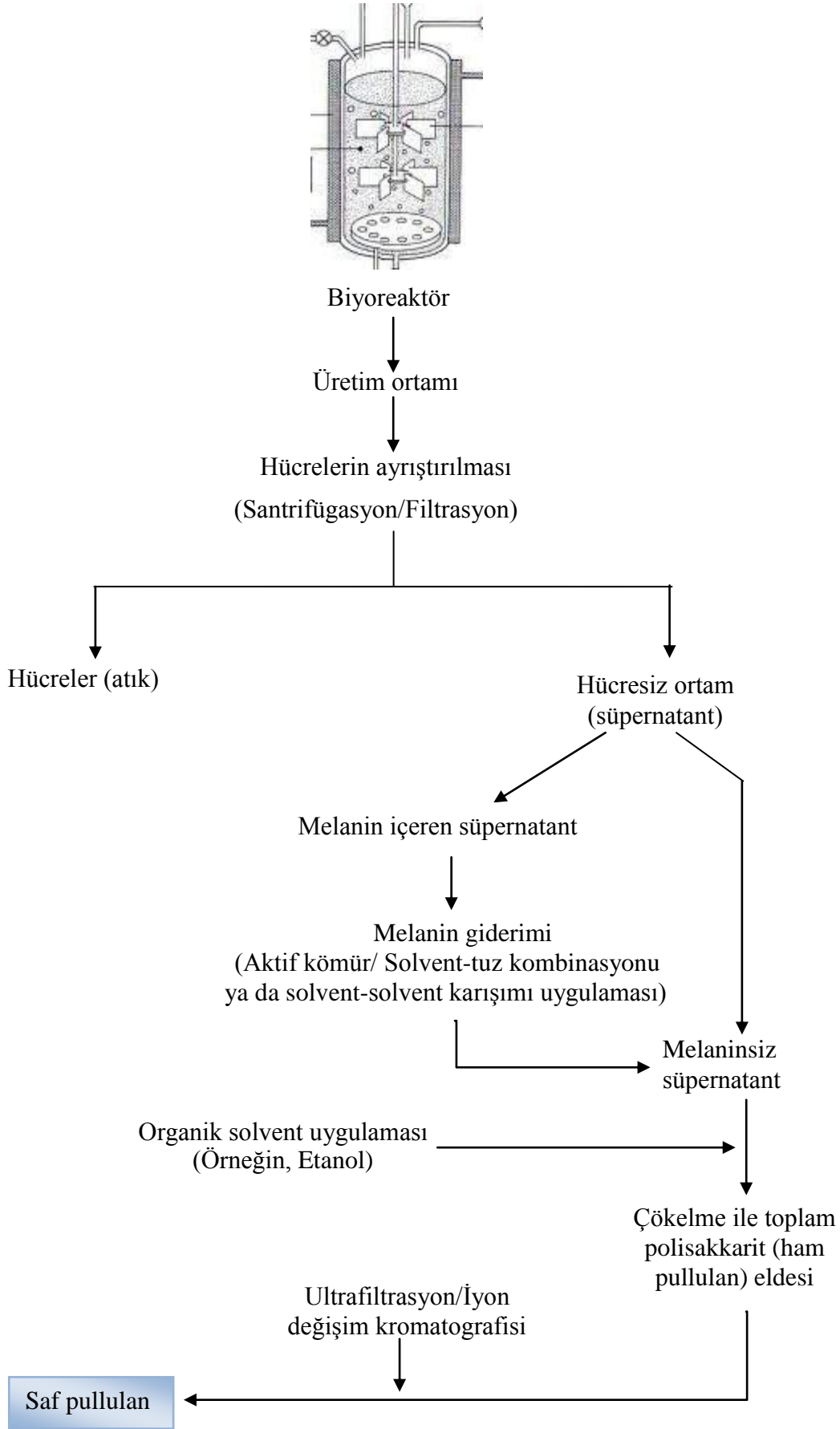
Wu et al. (2009), yapmış oldukları çalışma sonucunda fermantasyon ortamından pullulanın geri kazanımı için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem kapsamında öncelikle santrifüj işlemi ile hücreler ortamdan uzaklaştırılmakta, ardından elde edilen melaninli ortam sıcaklık uygulamasına tabii tutulmakta ve ortamdaki proteinler uzaklaştırılmaktadır. Melanin giderimi (*demelanization*) işlemi ise hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksidasyon işlemi sağlanarak yapılır. Oksidasyon işleminden sonra vakumda konsantre etme, etanol ile çöktürme ve kurutma işlemleri sonucunda yüksek saflıkta pullulan elde edilebilmektedir.

Hidrojen peroksit, okside olma yeteneğindeki hücreler için bir renk gidericidir. H_2O_2 'nin insan sağlığına olumsuz etkileri bilinmektedir. Genellikle gıda sektöründe kullanılan pullulan ele alındığında üretimin herhangi bir aşamasında ortama H_2O_2 eklenmesi sakıncalı görülebilir. Fakat uygun solvent ilavesi sonrası polisakkarit çöktürmesi işleminde üst sıvı ile birlikte H_2O_2 'nin giderimi sağlandığı kabul edilmektedir (Wu et al., 2009).

Hücre ve melanin ayrıldıktan sonra ortam sıvısındaki toplam polisakkarit (ham pullulan), çeşitli solventlerle çöktürülebilir. Literatürde bu solventlerin bazıları şöyledir: asetilmetilamonyum hidroksit, metanol, 1:1 aseton ve etanol karışımı, tetrahidrofuran (THF), etanol, izopropil alkol (IPA) (Singh ve Saini, 2012). Bununla beraber, çökelen polisakkaritteki pullulanın saflığı fermantasyon için kullanılan substrata ve üretim koşullarına göre değişebilmektedir (Ürküt, 2007). Pullulanın daha ileri düzeyde saflaştırılması ise, ultrafiltrasyon veya iyon değiştirici reçinelerle sağlanabilir (Singh ve Saini, 2012).

Polisakkaritlerdeki pullulan içeriğinin belirlenmesi genellikle elde edilen polisakkaritlerin pullulanaz ile hidrolizinin ardından elde edilen maltotriozun kromatografi, spektrofotometri veya diğer metotlar kullanılarak saptanması ve hesaplanmasıyla yapılmaktadır (Ürküt, 2007).

Şekil 2.4'te pullulan ayırma/saflaştırma basamaklarının genel bir özeti verilmiştir.



Şekil 2.4. Pullulan ayırma saflaştırma basamakları

2.7 Hava Kaldırmalı Biyoreaktörler

Hava kaldırmalı (*air-lift*) reaktör terimi, spesifik olarak tasarlanmış kanallarda belirli döngüsel bir desende akışkan sirkülasyonu tarafından karakterize edilen gaz-sıvı veya gaz-sıvı-katı pnömatik bağlantılı cihazları kapsamaktadır (Merchuk and Gluz, 2002). Hava kaldırmalı biyoreaktörler ise ortam homojenizasyonunun, mekanik karıştırılmalı reaktörlere alternatif olarak hava ile (pnömatik) yapıldığı biyoreaktörlerdir. Pnömatik karıştırılmalı bu tip reaktörlerde akış, reaktör içerisinde bulunan gaz dağıtıcılar (*sparger*) yardımıyla sağlanmaktadır.

Gaz akışı, karıştırmanın yanı sıra gaz fazı ve ortam arasındaki maddelerin alışverişinin kolaylaştırılması gibi önemli bir işleve sahiptir. Genellikle sıvıya oksijen aktarımı yapılır ve reaksiyon ürünleri de gaz fazına transfer olarak uzaklaştırılır (Merchuk and Gluz, 2002).

Oksijen transfer hızının artırılması ve güç tüketiminin minimize edilmesi için önerilen birçok biyoreaktör tasarımından ilk patent alınanı, hava kaldırmalı biyoreaktör olup en umut vaat eden tasarımlardan biridir (Znad et al., 2004). Hava kaldırmalı döngü reaktörler, kimya, biyokimya ve çevre mühendislikleri işlemleri için en umut verici cihazlardan biri olarak ortaya çıkmıştır (Zhang et al., 2006). Fermantasyon ürünlerinin üretilmesinde bu tip reaktörlerin kullanılması oldukça eski bir geçmişe sahiptir ve zaman içinde yavaş da olsa gelişme göstermişlerdir (Emre, 2007). Pahalı biyokimyasalların üretiminden atık su arıtımına kadar oldukça geniş bir yelpazede kullanım gören hava kaldırmalı biyoreaktörler, modern biyoproses araştırma-geliştirme çalışmalarında da popülerliğini korumaktadır (Merchuk, 2003).

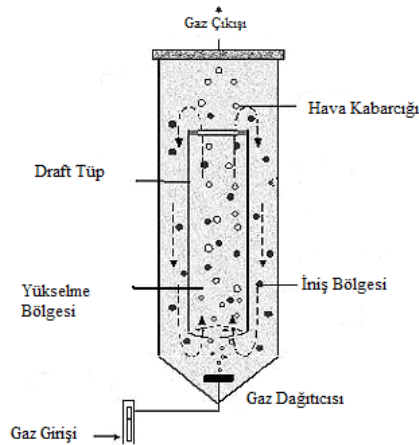
Basit dizayn ve yapımları, daha iyi anlaşılmalı akış düzenleri ve gereken transport hızları için nispeten daha az enerji girdileri, hava kaldırmalı reaktörleri daha cazip kılar. Düşük kayma bölgeleri, iyi karıştırma ve

karıştırıcı mil, salmastra, mil yatağı gibi parçaların eliminasyonundan kaynaklı genişletilmiş aseptik kullanım, fermantasyon uygulamalarında hava kaldırmalı biyoreaktörlere avantaj sağlar. Bitki, hayvan, maya, bakteri, fungus biyokütlelerinin ve bu hücrelerin ürettikleri ürünlerin sürekli üretimleri, hava kaldırmalı biyoreaktörlerde farklı kapasitelerde gerçekleştirilmiştir (Chisti, 1989).

2.7.1 Hava kaldırmalı biyoreaktör morfolojileri

Hava kaldırmalı biyoreaktörler, sadece bir tanesi gaz (hava ya da oksijen yoğunluğu artırılmış hava) ile beslenen, iki farklı bölgeye ayrılmış sıvı bölgelerinden meydana gelir. Gaz beslenen ve beslenmeyen bölgelerdeki farklı gaz tutulumları (*gas hold-up*), bu bölgelerde farklı kütle yoğunluklarına sebep olur. Gaz ile beslenen ve gazın etkisiyle yükselen düşük yoğunluklu sıvı, kendine ait bölgeden çıkıp daha büyük yoğunluklu bölgeye gelince basınç farkından dolayı aşağı doğru hareket eder. Böylece reaktör içinde sirkülasyon yaratılmış olur (Chisti, 1989).

Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin birçok formu vardır. En genel formu, biyoreaktör içinde ve boyu sıvı yüksekliğinden düşük olan, merkezi bir draft tüpünün altından püskürtücü kanalıyla (*sparger*) havanın beslendiği tasarımdır (şekil 2.5)

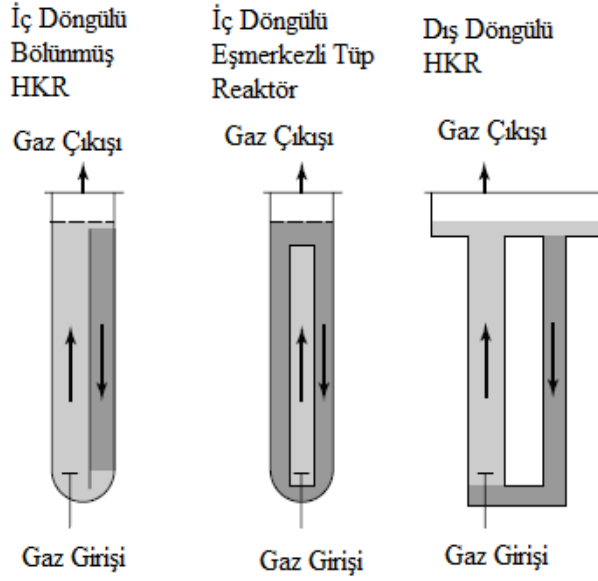


Şekil 2.5. En genel hava kaldırmalı biyoreaktör tasarımı.

Her hava kaldırmalı biyoreaktörde sirkülasyona bağlı sıvı akışının gerçekleştiği yükselme ve iniş bölgesi vardır. Yükselme bölgesi, gazın püskürtüldüğü ilk bölgedir ve gazın itici gücüyle sıvı yukarı doğru hareket eder. Bu bölgede, daha yüksek fraksiyonel gaz tutulumu vardır ve gaz-sıvı kütle transferinin büyük kısmı bu bölgede gerçekleşmektedir (Znad et al., 2004). Yukarı doğru akışın sebebi; gaz tutulumu ve azalan akışkan yoğunluğudur (Doran, 1995). İniş bölgesi ise yükselme bölgesine paralel, alt ve üst kısımlarından yükselme bölgesine bağlıdır. Bu bölgede akış yönü baskın aşağı yöndedir. Bu geri döngüdeki yürütücü güç, iniş bölgesindeki gaz miktarının daha az olmasından kaynaklanan iki bölüm arasındaki yoğunluk ve hidrostatik basınç farkından ortaya çıkar (Emre, 2007). Ayrıca iniş bölgesinde sıvı hızı, oluşturulan kabarcıkların serbest yükselme hızından daha hızlı olduğundan gaz aşağı taşınır. Bu durum, kabarcık ile sıvı arasında uzun bir temas süresi ile sonuçlanır, dolayısıyla da hücrelere oksijen transferi artar.

Momentum, kütle transferi ve ısı transferi iniş ve yükselme bölgesi için farklıdır. Fakat bu iki bölge birbirine bağlı olduğundan her bölgenin tasarımı (örneğin draft tüp çapı ve boyu), diğer bölümün performans ve özelliklerini etkileyebilmektedir (Merchuk and Gluz, 2002).

Hava kaldırmalı biyoreaktörler, içerisinde sirkülasyonu sağlayan kanalları oluşturan engellerin bulunuş şekline göre, iç döngülü (*iner loop*) veya dış döngülü (*dış döngülü*) hava kaldırmalı biyoreaktörler olarak iki ana grupta toplanabilir (şekil 2.6) (Merchuk and Gluz, 2002).



Şekil 2.6. Farklı tiplerdeki hava kaldırmalı biyoreaktörler (HKR: hava kaldırmalı reaktör)

İç döngülü hava kaldırmalı biyoreaktörler; draft tüp ya da dahili bir şaşırtıcı yardımıyla yükselme bölgesi ve iniş bölgesine ayrılabilir. Dış döngülü hava kaldırmalı biyoreaktörler; yükselme bölgesi ve iniş bölgesini, tepe ve dip kısımların yakınındaki enine bölmelerle birleştirerek ikiye ayırır (Şekil 2.6). Gaz dağıtımının, yükselme bölgesi ve iniş bölgesi arasındaki etkileşimin artışı için çeşitli modifikasyonlar, iç ve dış döngülü hava kaldırmalı biyoreaktörler üzerinde uygulanabilir. Ayrıca, yükselme ve iniş bölgeleri, elek levhaları, statik karıştırıcılar, duvardan çıkıntılı şaşırtıcılar gibi tasarımları da içerebilirler (Chisti, 1989).

Özet olarak, basit hava kaldırmalı reaktörler üzerinde sayısız olası varyasyon vardır ve farklı uygulamalar için avantajlı olarak değerlendirilebilir (Chisti, 1989).

2.7.2 Akışkan dinamiği

Hava kaldırmalı reaktörün bu derece geniş kullanımının ardında yatan sebep akışkan dinamik özellikleri ile ilgilidir (Merchuk, 2003). Hava kaldırmalı biyoreaktörler ve daha geleneksel olan mekanik karıştırılmalı tank biyoreaktörler arasındaki akışkan dinamikleri farklılıkları, bu başarıyı sağlamaktadır (Merchuk and Gluz, 2002).

Geleneksel karıştırılmalı tank ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde, akışkan hareketi için gerekli olan enerji, reaktör içinde odaksal olarak tek bir noktadan karıştırıcı veya püskürtücü aracılığıyla sağlanmaktadır. Sonuç olarak, enerji dağılımı karıştırıcı yakın çevresinde çok yüksek olmakla beraber duvarlara yaklaştıkça düşüş göstermektedir. Benzer şekilde, bu bölgede momentumun akışkana doğrudan aktarılması nedeniyle, kayma gerilimi de karıştırıcı yakınında en yüksek seviyesinde olacak ve uzaklaştıkça düşüş gösterecektir (Merchuk and Gluz, 2002).

Tan vd. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, hava kaldırmalı reaktörlerde sıvı türbülansının hem yükselme hem de iniş bölgelerinde homojen olarak dağıldığını göstermiştir. Dolayısıyla stres güçlerinin homojenliği, hava kaldırmalı reaktörler tarafından sunulan temel avantajlardandır. Sağlanan bu homojenite sayesinde, kayma gerilimine hassas kültürlerin hava kaldırmalı biyoreaktörlerde üretilmesi oldukça mantıklıdır (Merchuk and Gluz, 2002).

2.7.3 Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin avantajları

Hava kaldırmalı biyoreaktörler, kimya mühendisliği ve biyoteknoloji uygulamalarında artan bir ilgi kazanmaktadır. Bu ilgi hava kaldırmalı biyoreaktörlerin diğer geleneksel biyoreaktörlere üstün gelen avantajlarından

kaynaklanmaktadır (Zhang et al., 2006; Gavrilescu and Tudose, 1997). Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin avantajları şöyle sıralanabilir:

- Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde düşük kayma gerilimi elde edilir. Bu da bu biyoreaktörün, kayma gerilimine hassas hayvan ve bitki hücreleri gibi organizmaların büyütülmesinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini gösterir.
- Fermantasyon prosesi daha kolay kontrol edilebilir. Buna ek olarak, ortam homojenizasyonu ve kütle transferi daha uygun maliyetlidir; daha az enerji maliyeti gerektirir.
- Hava kaldırmalı bir biyoreaktörde karıştırma, hiçbir mekanik karıştırıcı olmadan sağlanır. Havalandırma, substrat, ürün/yan ürün, oksijen bakımından kütle transferinin iyileştirilmesi ile, mikroorganizma büyümesi ve verimi açısından yararlı olabilir. Havalandırma, üretim ortamında daha iyi bir karıştırma sağlar ve böylece, hücrelerin iç ve dış kısımları arasındaki konsantrasyon gradientini korunmasına yardımcı olur. Bu konsantrasyon gradienti her iki yönde de çalışır; gazların ve diğer katabolizma sonucu oluşan yan ürünlerin, hücrelerin mikro ortamından giderilmesini sağlarken; daha iyi bir difüzyon aracılığıyla hücrelere, yeterli şeker ve diğer nutrient kaynaklarının devamlılığını sağlar.
- İyi ısı aktarım karakteristikleri ve kısa karışma süresi sağlar.
- Sterilite, karıştırıcı ile karıştırma olmadığı için kolaylıkla devam ettirilebilir.
- Geniş bir boru içerisinde, sıvının yüksekliği 60m kadar olabilir. Borunun dip kısmındaki basınç, oksijen çözünürlüğünü arttıracaktır.

Bunların haricinde; reaktör içinde hareketli parçaların bulunmaması, daha tahmin edilebilir bir akış sağlar. Biyokimyasal reaksiyonlar bazen aşırı ısı

salımına sebep olurlar. Geleneksel mekanik karıştırıcı tank biyoreaktörü dizaynıyla, reaksiyonun yüksek ekzotermik ısını uzaklaştırmak oldukça zordur, bu ısının uzaklaştırılması hava kaldırmalı biyoreaktörle daha kolaydır (Emre, 2007; Roukas and Serris, 1999; Zhang, et al., 2006; Najafpour, 2007; Gavrilescu and Tudose, 1997).

2.7.4 Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin dezavantajları

Hava kaldırmalı reaktörlerin birçok avantajının ve bu avantajlar sayesinde büyük bir potansiyelinin olmasının yanında, bazı dezavantajları da vardır. Hava kaldırmalı reaktörlerin en önemli dezavantajları şöyledir:

- Büyük ölçekli borulardan ileri gelen yüksek yatırım maliyeti vardır.
- Yine yüksek ölçekli kullanımlarında, yüksek enerji maliyeti getirir. Bir karıştırıcı gerekmemesine rağmen, çok yüksek miktarda hava beslemesi gerekir ve hava, özellikle büyük ölçeklerde yüksek basınçlı olmalıdır. Bunun yanında, gazın basıncının etkinliği düşüktür.
- Köpük varlığında, gazın sıvıdan ayrımı çok etkin değildir. Hava kaldırmalı biyoreaktörlerin dizaynında, bu dezavantaj minimize edilmelidir.
- Besleme sadece bir bölgeden gelirse, organizmanın beslenme yetersizliğinden dolayı büyümesi sekteye uğrar. Bu durum, istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna, düşük verim ve yüksek ölüm hızına sebep olabilir. Bundan dolayı özellikle büyük ölçekte, beslemenin birçok noktadan yapılması gerekir. Benzer şekilde havanın da, kolonun birçok noktasından girişine izin verilmelidir. Fakat hava kaldırmalı biyoreaktörde bu mümkün değildir; keza sıvının reaktör boyunca devir daimi için, havanın daha çok alt kısımdan verilmesi gerekir (Najafpour, 2007).

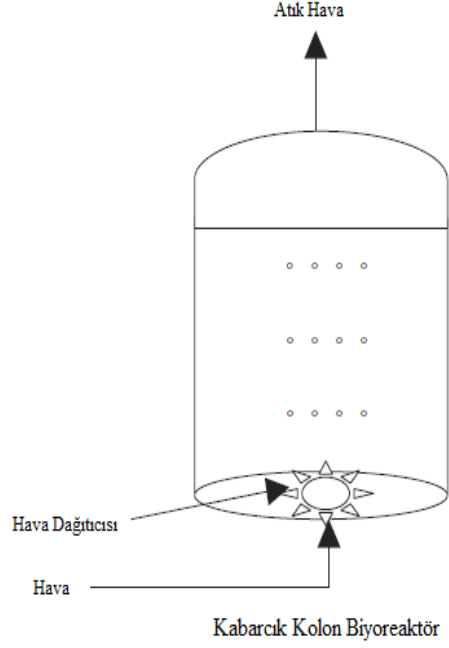
- Yüksek havalandırma ile birlikte çıkış gazı ile birlikte su moleküllerinin de çıkış böylece yüksek sıvı kaybı (Kişisel deneyim, 2013).

2.7.5 Kabarcık kolon biyoreaktörler

Bir diğer pnömatik karıştırılmalı biyoreaktör türü de kabarcık kolon (*bubble column*) biyoreaktördür. Kabarcık kolon biyoreaktörler basit şekilde draft tüpsüz hava kaldırmalı biyoreaktör şeklinde tanımlanabilir.

Kabarcıklı kolon biyoreaktörler de basit kullanımlarından dolayı sıkça kullanılan biyoreaktörlerdendir. Yapısal ve işlevsel olarak daha basit olması, bu reaktörleri mekanik karıştırılmalı reaktörlerden ayıran farklardan biridir. Kabarcık kolonlar, bu yönüyle karıştırılmalı reaktörlerin bir alternatifidir (Doran, 1995).

Kabarcık kolon reaktörlerde havalandırma ve karıştırma, rektör tabanından beslenen gazın yardımı ile sağlanmaktadır (Şekil 2.7). Bu işlem, mekanik karıştırmadan daha az enerji gerektirir (Doran, 1995). Böylece reaktörde hem havalandırma hem de karıştırma sağlanmış olur.



Şekil 2.7. Kabarcık kolon biyoreaktör.

Kabarcık kolon reaktörler yapısal olarak çok basittir. Genellikle basınçlı havanın gireceği bir dağıtıcıları (*sparger*) bulunur ve başka içsel yapılar içermemektedirler. Bazen yüksekliği fazla olan kabarcık kolon biyoreaktörlere, birleşen kabarcıkları küçültmek için delikli yatay levhalar monte edilir. Ekmek mayası üretiminde genellikle yükseklik/çap oranı 3:1 iken, diğer uygulamalarda bu oran 6:1 olarak kullanılır (Doran, 1995).

Kabarcıklı kolon biyoreaktörlerin en kayda değer avantajı basit yapılarıdır. Basit bir konfigürasyon, özellikle biyolojik proseslerde sterilizasyon açısından büyük önem taşır (Emre, 2007). Kabarcık kolon reaktörlerin diğer avantajları ise; düşük yatırım maliyeti, hareketli parçalar içermemesi, makul ısı ve kütle transfer performansı olarak sıralanabilir (Doran, 1995). Hareketli parçalar bulundurmaması nedeniyle de az bakım ve düşük işletme maliyetleri gerektirir (Vinod and Kumar, 2011)

Kabarcık kolon biyoreaktörlerin bir takım sıkıntıları da vardır; kabarcık kolon biyoreaktörde karıştırmanın havalandırma hızıyla orantılı olması dolayısıyla karıştırma düzeyi havalandırma ile değişmektedir. Buna ek olarak, biyoreaktörlerde beslenecek hava debisinin bir üst sınırı vardır. Bu sınır, damlacık sürüklenmesi olayı ile belirlenir. Bu problem yüksek gaz akış hızlarında sıvının gazla birlikte sürüklenmesi sonucuna yol açarak buharlaşma ile aşırı sıvı kaybına neden olur (Emre, 2007). Ayrıca köpük oluşumu da atık gazların giderimini zorlaştırır ve mekanik dağıtım veya besi ortamının içine köpük kırıcı eklenmesini gerektirebilir (Doran, 1995).

Farklı akış rejimleri, gaz akış hızı, gaz dağıtıcı dizaynı, kolon çapı ve viskozite gibi ortam özelliklerine dayanarak elde edilir. *Homojen akış* sadece, düşük gaz akışı hızında ve dağıtıcıdan çıkan kabarcıklar, kolonun enine kesitinde dengeli şekilde dağıldığında elde edilir. Homojen akışta, tüm kabarcıklar aynı yoğunlukla yükselirler ve gaz fazın geri karıştırması yoktur. Bu akış rejimi, sadece kabarcık dalgasındaki sürüklenmeden kaynaklanan sıvı karışması ile sınırlıdır (Doran, 1995).

Normal çalışma koşulları altında, daha yüksek gaz yoğunluğunda, düzensiz sirkülasyon akış birimleri gelişir ve *heterojen akış* meydana gelir. Bu rejimde, duvarların yakınında sıvının aşağı akışı meydana gelirken, kolonun merkezinde kabarcıklar ve sıvı yukarı çıkma eğilimindedir. Sıvı sirkülasyonu kabarcıkları sürükler; bu yüzden bir miktar gazın geri karışımı gözlenir (Doran, 1995).

Kabarcık kolon hidrodinamiği ve kütle transferi karakteristiği bütünüyle, dağıtıcıdan salınan gazın davranışına bağlıdır (Doran, 1995). Gaz tutulumu da kütle transferi çalışmaları ve reaktör dizaynında önemli bir parametredir (Vinod and Kumar, 2011). Reaktördeki gaz-sıvı kütle transferi katsayıları, büyük oranda kabarcık çapına ve gaz tutulumuna bağlıdır. Viskoz olmayan sıvıları içeren kabarcık kolon biyoreaktörlerde, bu değişkenler yalnızca gaz akış hızına bağlıdır. Bununla birlikte kabarcık kolonlarda, kesin

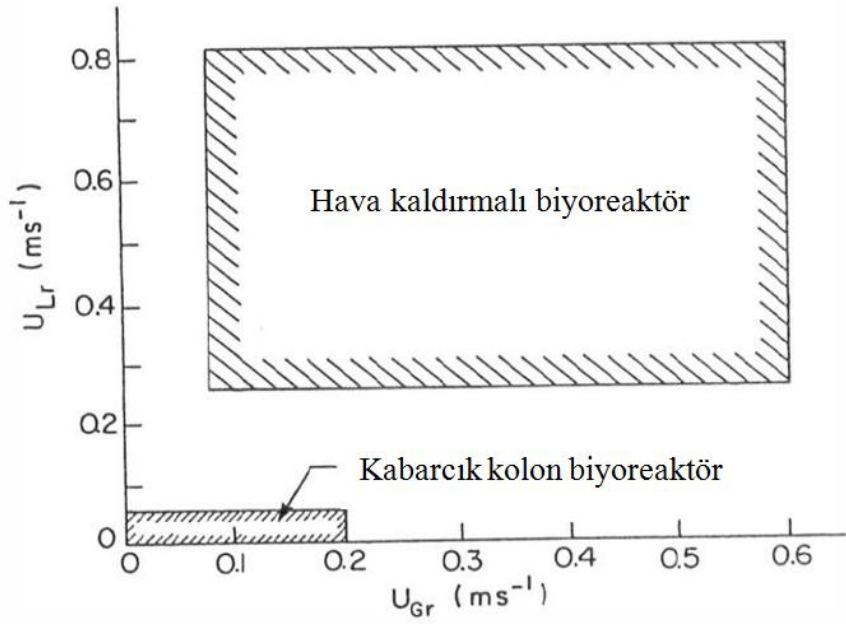
kabarcık boyutunun ve sıvı sirkülasyon yapılarının bilinmesi imkansızdır; kütle transferi katsayılarının kesin tahmini zordur (Doran, 1995).

Pratikte kabarcık kolon biyoreaktörlere göre daha düşük kayma gerilimi elde edildiğinden hava kaldırmalı biyoreaktörler genellikle kayma gerilimine duyarlı hücrelerin büyümesi için önerilir. Buna karşın, literatürde aynı büyüme koşullarında kabarcık kolon biyoreaktörlere ve hava kaldırmalı biyoreaktörlere yetiştirilen hayvan hücrelerinin yarılanma ömürlerinde önemli bir fark olmadığını görülmüştür. Pnömatik karıştırmalı biyoreaktörlerde hücre bozunmasının temel nedeninin kolonun üst kısmında sıvıdan ayrılan kabarcıklar olduğu yolunda ipuçları elde edilmiştir. Bu etkinin ortadan kaldırılması için bu tip reaktörlerde bazı katkı maddeleri (Pluronic F-68, BSA ya da dekstran gibi) kullanılmaktadır. Kayma gerilimine duyarlı bitki hücreleri de kabarcık kolon biyoreaktörlerde başarılı bir şekilde yetiştirilebilmektedir. Deneysel sonuçlar bitki hücresi kültürlerinin büyümesinin kabarcıklı kolon reaktörlerde, karıştırmalı tank reaktörlerde ve bir çalkalayıcı içine yerleştirilen erlenlerde benzer olduğunu göstermiştir (Merchuk et al., 1994).

2.7.6 Kabarcık kolonlar ve hava kaldırmalı biyoreaktörlerin karşılaştırılması

Kabarcık kolonlar ve hava kaldırmalı biyoreaktörlerin hidrodinamik davranışları oldukça farklılık göstermektedir (Chisti, 1989). Hava kaldırmalı biyoreaktörler ve kabarcık kolonlar arasındaki en temel fark, sistem geometrisine bağlı sıvı akış türüne dayanmaktadır (Merchuk and Gluz, 2002). Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde sıvı sirkülasyonu, gaz akış hızına bağlı olarak belirlenmekte, ancak kabarcık kolonlarda sıvı akışı gaz akış hızından bağımsız olmaktadır (Chisti, 1989).. Kabarcık kolon, genellikle alt kısımdan içerisine gaz enjekte edilen basit bir kanaldan oluşmaktadır. Biyoreaktör içerisinde yükselen kabarcıklar tarafından rastgele karıştırma sağlanmaktadır (Merchuk and Gluz, 2002). Biyoreaktörlerde tipik bir gereklilik olan uzun

kullanım süreleri nedeniyle, kabarcık kolonlarda büyük miktardaki sıvı geçişleri, belirgin geri döngü hızları olmaksızın mümkün değildir (Chisti, 1989). Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde ise akışkan sirkülasyonunun en önemli kalıpları, yükselme ve iniş bölgelerine sahip olan reaktörün dizaynı ile belirlenir. Kapalı bir devre oluşturmak için iki kanal alt ve üst bölümlerinden bağlantılıdır (Merchuk and Gluz, 2002).



Şekil 2.8. Çeşitli gaz (U_{Gr}) ve sıvı akışkan (U_{Lr}) hızlarında hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerin operasyon aralığı (Chisti'den, 1989).

Hava kaldırmalı biyoreaktörlerde, sıvı akış hızı, sirkülasyon zamanı ve karışım zamanı gibi birçok deneysel korelasyon geliştirilmiştir. Hava kaldırmalı biyoreaktörlerdeki gaz tutulumu ve gaz-sıvı kütle transfer hızları ve genel reaktör performansı genel olarak kabarcık kolon biyoreaktörden daha iyidir. Bununla beraber, dış döngülü hava kaldırmalı biyoreaktörlerde, gaz ayrılmasının tamamlanmasına yakın, sıvı akış hızının artması ve gaz tutulumunun düşmesi nedeniyle, aynı gaz akış hızında kütle transfer hızı, kabarcık kolon biyoreaktörden daha düşüktür (Doran, 1995).

2.8 Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)

İlk kez 1951 yılında Box ve Wilson tarafından tanımlanmış ve geliştirilmiş olan cevap yüzey yöntemi, CYY (*Response Surface Methodology, RSM*), bir takım bağımsız değişkenle belirlenen bağımlı değişkenin veya aynı anlama gelecek şekilde proses yanıtının optimizasyonu sürecinin analizi ve modellenmesi için faydalı matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamı olarak ifade edilebilir (Kul, 2004; Yücel 2008).

Cevap yüzey yöntemi ismi, yöntemin çıktılarında olan modelin bir yüzey fonksiyonu olarak tanımlanmasından gelir. Genel olarak CYY’inde, Taylor açılımı kullanılmaktadır; Taylor eşitliğindeki katsayıları belirlemek için gerçekleştirilen özel deneysel tasarımlarla birlikte, proses yanıtını betimleyen fonksiyonun tahmini modeline ulaşmada Taylor eşitliğini kullanır.

CYY, deneysel tasarımların, genellikle birinci ve ikinci derece Taylor eşitlikleri aracılığıyla kombine edildiği ve böylelikle optimum koşulların belirlendiği bilimsel bir yaklaşımdır. CYY ile, bir prosesin optimum koşullarının belirlenmesine ek olarak bu prosesin tasarımı için gerekli bazı bilgilerin elde edilmesi de mümkün olur (Yücel, 2008).

Bir prosesi etkileyen parametrelere, bağımsız değişken ve bu bağımsız değişkenlere bağlı tanımlanan fonksiyona ise bağımlı değişken ya da yanıt denir. CYY’nin uygulanması için araştırmacı proses hakkında genel bir bilgiye sahip olmalı, prosesi etkileyen bağımsız değişkenler için bir işletme bölgesi (*operating region*) ve bir deneme bölgesi (*region of interest*) belirlemelidir. Özellikle biyoproseslerde yanıtı belirleyen bağımsız değişkenler oldukça fazladır. Bu durumda bir takım ön denemeler yapılarak yanıtı en çok etkileyen bağımsız değişkenler belirlenmeye çalışılır. Bu denemeler “eleme (*screening*) denemeleri” olarak adlandırılır ve araştırmanın ilerleyen safhalarında daha az sayıda deneme yapılarak maliyet ve zaman açısından önemli avantajlar sağlanmasına neden olur (Ürküt, 2007).

CYY'nin kullanıldığı proses uygulamalarında, bağımlı değişken yani yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel ilişkiyi anlayabilmek için ilk adım, yanıt ile bağımsız değişkenler seti arasındaki ilişkiyi yeterince doğru bir şekilde betimleyen fonksiyona erişecek uygun bir yaklaşımın bulunmasıdır. Genellikle, bağımsız değişkenlerin belirli değer aralıklarında geçerli olacak düşük dereceli polinomlar kullanılır. Eğer yanıt, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonuyla yeterince iyi bir şekilde modellenmişse, bu durumda yaklaşım fonksiyonu birinci-derece model formunda (y , yanıt; X_1, X_2, \dots, X_n , bağımsız değişken ve $B_0, B_1, B_2, \dots, B_n$, katsayılar olmak üzere) aşağıdaki gibi olacaktır:

$$y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_nX_n$$

Eğer sistemde bir eğrilik varsa, aşağıda görülen ikinci-dereceden bir modelde olduğu gibi daha yüksek dereceden bir polinom kullanılmalıdır:

$$y = B_0 + \sum_{i=1}^n B_i X_i + \sum_{i=1}^n B_i X_i^2 + \dots + \sum_{i < j} B_{ij} X_i X_j$$

Hemen tüm CYY problemlerinde, bu modellerden birisi veya her ikisi birden kullanılır. Bağımsız değişkenlerin tüm değer bölgelerini kapsayan doğru bir fonksiyonel ilişkiyi belirleme yaklaşımı konusunda, polinom modellerin yeterli olmayacağı açıktır. Fakat bağımsız değişkenlerin sınırlı değer aralıkları veya bölgeleri için polinom yaklaşımı oldukça iyi çalışmaktadır (Montgomery, 2005; Yücel'den, 2008).

Bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki matematiksel ilişkiyi modellemek ve bu modeller için maksimizasyon ya da minimizasyon (kısaca optimizasyon) yapmak kompleks ve tekrar eden hesaplamaları içerdiğinden CYY, bilgisayar programları ile kolayca ve çok kısa bir sürede yapılabilir.

Cevap yüzey yönteminin avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Prosesin doğasını matematiksel bir model ile açıklaması, yani bağımlı değişken ile bağımsız değişken arasındaki ilişkinin bu model ile ifade edilebilmesi.
- Prosesi açıklayan modeli geliştirmek için daha az sayıda deney yapmak.
- Bağımsız değişkenlerin yanıtta olan bireysel etkilerine ek olarak bağımsız değişkenlerin etkileşiminin yanıtta olan etkilerinin belirlenmesi.
- Bağımsız değişkenlere bağlı yanıtın optimizasyonunun yapılması.
- Bağımsız değişkenlere bağlı birçok proses yanıtının aynı anda incelenebilmesi.
- Projenin ne kadar süreceğinin ve maliyetinin bilenebilmesi.

2.8.1 İkinci dereceden modeller için kullanılan deney tasarımları

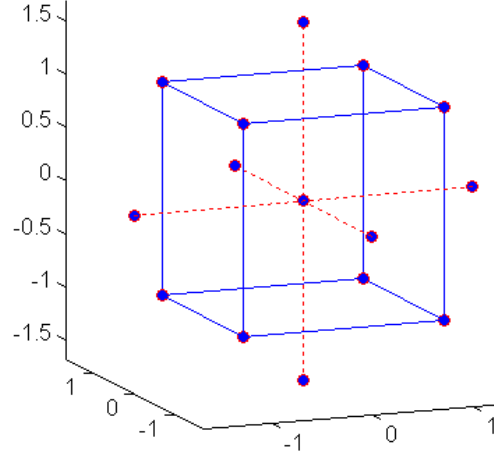
İkinci dereceden bir polinom, n bağımsız değişken sayısı olmak üzere $[1 + 2n + \frac{n(n-1)}{2}]$ adet parametre içermektedir. Deneysel tasarım en az polinomdaki parametre sayısı kadar nokta kullanılarak oluşturulmalıdır. Her bağımsız değişken en az üç seviyede temsil edilmelidir (Myers and Montgomery, 1995; Ürküt'ten, 2007). Aşağıda ikinci dereceden modeller için kullanılan iki deney tasarımı incelenmiştir.

2.8.1.1. Merkez-tümleşik tasarım (Central composite design)

İki bağımsız değişken ile oluşturulmuş bir merkez-tümleşik tasarım, bir dairenin çevresinde eşit uzaklıklarda bulunan sekiz nokta ve merkezinde bir veya daha fazla noktadan oluşmaktadır. Üç bağımsız değişken olduğu durumlarda ise bir kürenin yüzeyinde bulunan 14 nokta ve merkezinde 1 veya daha fazla noktadan oluşmaktadır (Myers and Montgomery, 1995; Ürküt'ten, 2007). Üç bağımsız değişkenin olduğu bir tasarımda bir kürenin yüzeyinde bulunan noktalara alternatif olarak, yapılacak deneyin operasyon şartlarına göre, deney tasarımı düzenlenebilir. Örneğin, deney tasarımı, bir küpün köşe noktaları (8

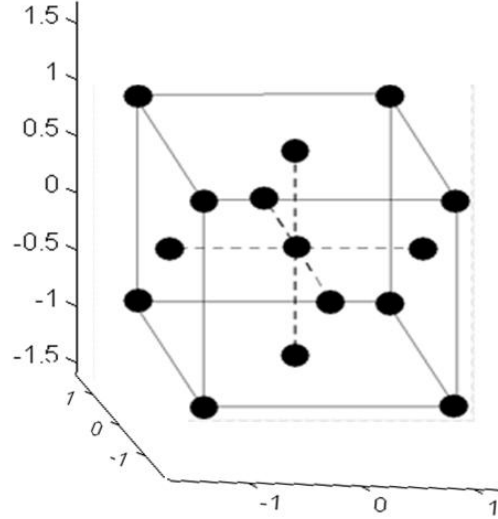
adet), küpün dışında veya yüzeyindeki noktalar (6 adet) ve merkezinde 1 veya daha fazla noktadan oluşabilir.

Sekil 2.9'da üç bağımsız değişkenden oluşan bir merkez tümleşik deney tasarımı gösterilmektedir. Küpün köşelerine denk gelen noktalar kodlanmış değerlere göre -1 veya $+1$; küpün dışındaki noktalar $-\alpha$ veya $+\alpha$; merkez ise 0 'dır (NOT: $|\alpha| > 0$).



Şekil 2.9. Üç bağımsız değişkenden oluşan merkez tümleşik deney tasarımı

Merkez-tümleşik tasarımın en önemli özelliği aksenal mesafenin ve merkezde yapılan tekrarların sayısının belirlenebilmesidir. Bazı durumlarda deneme bölgesi (*region of interest*) dışında deney yapmak operasyon şartlarından dolayı anlamlı olmayabilir bu durumda aksenal mesafe (α) küpün üzerine denk gelecek şekilde tasarım yapılabilir. Bu tip merkez-tümleşik tasarıma yüzey merkezli tasarım (*face centered design*) denir (şekil 2.10) (Myers and Montgomery, 1995; Ürküt'ten, 2007).



Şekil 2.10. Üç bağımsız değişkenden oluşan yüzey merkezli deney tasarımı ($\alpha=1$)

2.8.1.2. Box-Behnken tasarım

Box-Behnken tasarımda bağımsız değişkenlerden birinin değeri merkez değerde sabitlenirken diğer bağımsız değişkenlerin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanır. Çizelge 2.4'te ilk önce C bağımsız değişkenin düzeyi sabitlenmiş A ve B bağımsız değişkenlerinin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanmış, daha sonra aynı işlemler sırasıyla B ve A bağımsız değişkenleri merkezde sabitlenerek uygulanmıştır. Tasarım matrisinin son sütunlarında ise merkez nokta değerleri vardır (Kul, 2004).

Çizelge 2.4. Üç faktörlü(A,B ve C), üç seviyeli kodlanmış değerlere göre Box-Behnken tasarım.

| Sıralama | A | B | C |
|----------|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | 1 | -1 | 0 |
| 3 | -1 | 1 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | -1 | 0 | -1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 |
| 7 | -1 | 0 | 1 |
| 8 | 1 | 0 | 1 |
| 9 | 0 | -1 | -1 |
| 10 | 0 | 1 | -1 |

| | | | |
|----|---|----|---|
| 11 | 0 | -1 | 1 |
| 12 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |

Cevap yüzey yöntemi ile pullulan üretiminde özellikle son yıllarda sıkça kullanılan bir yöntemdir. Aşağıda bu çalışmaların bazıları optimizasyon sonucu elde edilebilecek maksimum pullulan miktarlarıyla birlikte şöyledir:

Göksungur vd. (2005), melanin üretimi baskılanmış *A. pullulans* P56 suşu ile yaptıkları çalışmada, karıştırmalı tank biyoreaktörde önemli ortam koşulları olan başlangıç şeker konsantrasyonu, havalandırma hızı ve karıştırma hızının pullulan üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yüzey merkezli deney tasarımının uygulandığı optimizasyon sonucunda maksimum pullulanın (17,2 g/L) üretildiği ortam koşullarının, 51,4 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu, 2,36 vvm havalandırma hızı ve 345,3 rpm karıştırma hızı olduğu anlaşılmıştır.

Ürküt vd. (2007), kalsiyum aljinata immobilize edilmiş *A. pullulans* P56 hücreleri ile pullulan üretiminin optimizasyonu yapılmıştır. Yüzey merkezli deney tasarımının uygulandığı optimizasyon sonucunda maksimum pullulanın (21,07 g/L) üretildiği ortam koşulların, inkübasyon süresinin 101,2 saat, karıştırma hızının 191,5 rpm ve pH'nın 7,31 olduğu anlaşılmıştır.

Singh et al. (2009), 5 faktörün (sükroz, amonyum sülfat, maya ekstraktı, dipotasyum hidrojen fosfat ve sodyum klorid) pullulan üretimine etkisini cevap yüzey yöntemi ile incelemişlerdir. Optimizasyon sonucunda maksimum pullulanın (44,2 g/L) üretildiği besi ortamının, %5,31 sükroz, %0,11 amonyum sülfat, %0,07 maya ekstraktı, %0,05 dipotasyum hidrojen fosfat ve %0,15 sodyum klorid içeren besi ortamı olduğu anlaşılmıştır (Cheng et al., 2011).

Jiang'ın (2010) *A. pullulans* SK1002 ile yaptığı çalışmada sıcaklık, inkübasyon zamanı ve pH'nın pullulan üretimine etkisi merkez-tümleşik tasarım ile merkezde 6 tekrarla toplamda 20 deneme ile incelenmiştir. Optimizasyon

sonucunda maksimum pullulanın (30,28 g/L) üretildiği ortam koşullarının, 5. günde 28 °C, 5 gün ve pH:5,5 için olduğu anlaşılmıştır.

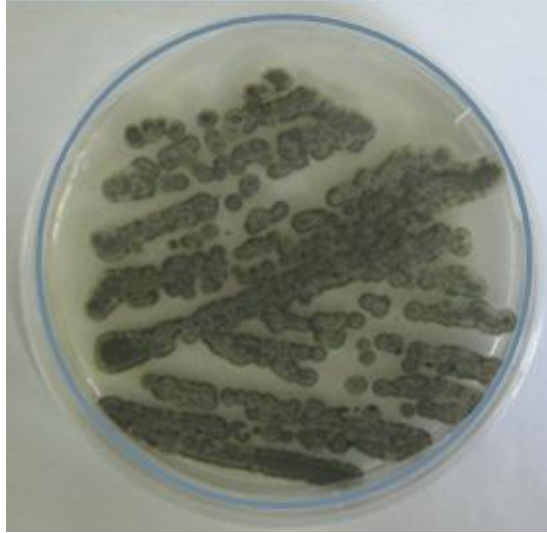
Choudhury et al.'un (2012) *A. pullulans* RBF-4A3 ile yaptıkları çalışmada kompleks ortam komponentleri olan glikoz, maya ekstraktı ve peptonun pullulan üretimine etkisi merkez-tümleşik tasarım ile merkezde 6 tekrarla toplamda 20 deneme ile incelenmiştir. Yapılan denemelerde maya ekstraktının pullulan üretiminde kritik rolü ve etkisi olduğu anlaşılmıştır. Optimizasyon sonucunda maksimum ekstraselüler polisakkaritin (70,43 g/L) üretildiği besi ortamının, %15,5 glikoz, %3,68 maya ekstraktı ve %1,75 pepton içeren besi ortamı olduğu anlaşılmıştır.

3. MATERYAL & METOT

3.1 Mikroorganizma

Bu tez kapsamında, pullulan üretimi için *Aureobasidium pullulans* DSM-2404 kullanılmıştır. Bu mikroorganizma Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Prof. Dr. Yekta Göksungur'un çalışma ekibinden temin edilmiştir.

Mikroorganizma, PDA (Potato Dextrose Agar) üzerinde 4°C'de saklanmış (Şekil 3.1) ve her 3 haftada bir altkültür yapılarak kültür yenilenmiştir.



Şekil.3.1. Stok *A. Pullulans* kültürü (PDA üzerinde, 4°C)

3.2 Besi Ortamları

Aşı ortamı kompozisyonu (g/L): sakkaroz 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6, maya ekstraktı 0,4, K_2HPO_4 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, NaCl 1,0 ve MnCl_2 0,01 (pH= 5,5).

Üretim ortamı kompozisyonu (g/L): sakkaroz 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6, maya ekstraktı 0,4, K_2HPO_4 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, NaCl 1,0 ve MnCl_2 0,01 (pH=7,5).

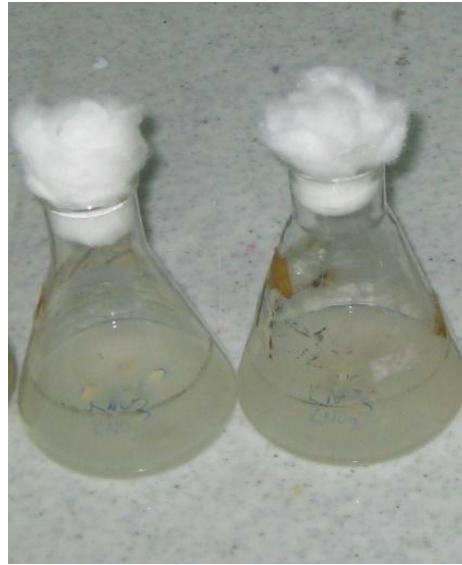
Kullanılan aşı ortamı ve üretim ortamları, 2M HCl çözeltisi ile yapılan gerekli pH ayarlamalarından sonra 121°C'de 15 dakika süresince otoklavda sterilize edilmiştir.

Tüm kimyasallar Merck (Darmstad, Germany) şirketlerinden temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

3.2.1 Besi ortamlarının hazırlanışı

3.2.1.1. Aşı ortamının hazırlanışı

28 °C'de 2 gün boyunca PDA üzerinde büyümeye bırakılan mikroorganizma, iki öze dolusu alınarak, daha önceden hazırlanmış 250 ml'lik erlendeki 50 ml'lik aşı ortamına eklenmiştir. Hazırlanan erlenler çalkalamalı inkübatörde 28 °C'de 200 rpm karıştırma hızında iki gün üremeye bırakılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. 2 günlük aşı kültürü.

3.2.1.2. Üretim ortamının hazırlanışı

İçerisine üretim ortamı konulan biyoreaktörler sterilizasyon için otoklava atılmadan önce, üretim ortamına, inkübasyon süresince yaşanabilecek köpürmeleri önlemek adına 2 damla köpük kırıcı eklenmiştir.

Otoklavdan çıkan ve oda sıcaklığına kadar soğuyan biyoreaktörler, üretim ortamını 28 °C'de sabitleyen sirkülatörlere bağlanmıştır. Üretim ortamının sıcaklığı 28°C'de sabitlenince biyoreaktörlere steril hava beslemesi yapan hava hatları açılmıştır. Rotametre yardımıyla hava beslemesi, gerekli debiye ayarlanarak (vvm bazında) biyoreaktörler inkübasyona hazır hale getirilmiştir.

Daha sonra erlenler içinde 28 °C'de 200 rpm karıştırma hızında iki gün üremeye bırakılan aşı kültürü (inokülan), içersinde üretim ortamı bulunan biyoreaktörlere steril koşullar altında hacimce %5 oranında eklenmiştir.

Havalandırmanın, pullulan üretimi üzerindeki etkisini incelemek için 50g/l başlangıç sükröz konsantrasyonunda hava kaldırmalı biyoreaktör için 1vvm, 2vvm ve 3vvm; kabarcık kolon biyoreaktör için 0,1vvm, 1,1vvm ve 2 vvm havalandırma hızları denenmiştir.

Başlangıç substrat konsantrasyonunun pullulan üretimine etkisini incelemek için ise; hava kaldırmalı biyoreaktörde 2vvm ve kabarcık kolon biyoreaktörde 1,1vvm sabit havalandırma hızında sırasıyla 70, 90 ve 110 g/l başlangıç sükröz konsantrasyonlarında denemeler yapılmıştır.

3.3 Biyoreaktörler

Denemelerde, 1300 ml toplam ve 1100 ml proses hacminde hava kaldırmalı biyoreaktör (*air-lift bioreactor*) ile 300 ml toplam ve 260 ml proses hacminde kabarcık kolon biyoreaktör (*bubble column bioreactor*) kullanılmıştır (şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kültür ortamı ile birlikte hava kaldırmalı (solda) ve kabarcık kolon (sağda) biyoreaktörler

Çizelge 3.1. Reaktör geometrileri.

| Kısaltmalar | Hava kaldırmalı biyoreaktör | Kabarcık kolon biyoreaktör |
|-------------|-----------------------------|----------------------------|
| V | 1300 ml | 300 ml |

| | | |
|----------------|---------|---------|
| A | 1,25 cm | - |
| D _d | 1,4 cm | - |
| D _t | 3,05 cm | 1,75 cm |
| H _d | 35,5 cm | - |
| H _t | 38 cm | 32 cm |

V=Toplam hacim (operasyon hacmi), A: Reaktör duvarı ve draft tüp arası uzaklık, D_t: Reaktör yarıçapı, D_d: Draft tüp yarıçapı, H_t: Reaktör boyu, H_d: Draft tüp boyu.

3.4 Alt Akım İşlemleri ve Analiz Yöntemleri

3.4.1 Biyokütle tayini

Hava kaldırmalı biyoreaktör için 10 ml ve kabarcık kolon biyoreaktör için 5 ml örnekler steril şartlar altında alınarak daha önceden darası not edilmiş falkon tüplerine aktarılmıştır. (Alınan örneklerin miktarının 10 ml ve 5 ml olarak seçilmesinin nedeni, reaktörlerin çalışma hacmini çok etkilememesiyle alakalıdır.) Daha sonra bu falkon tüpleri 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Üst sıvı (*cell free broth, supernatant*) daha sonra polisakkarit tayini için darası not edilmiş başka bir falkon tüpüne aktarılmıştır. Falkon tüpüyle birlikte 70 °C'de bir gece boyunca kurumaya bırakılan kalan hücreler (biyokütle) tartılmış, daha önceden kaydedilmiş daralarla farkı alınarak da biyokütle miktarı belirlenmiştir.

3.4.2 Toplam polisakkarit

Biyokütle ayırımından gelen üst sıvıya (*cell free broth, supernatant*) 2 hacim etanol ilave edilmiş (Göksungur vd., 2005) ve 4°C'de 1 gece boyunca bekletilerek polisakkaritlerin çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra çöken

polisakkaritler 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve üst sıvı (*supernatant*) toplam şeker tayini için ayrılmıştır. Toplam polisakkarit ise falkon tüpüyle birlikte 70 °C'de bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Daha önceden kaydedilmiş daralarla farkı alınarak da toplam polisakkarit miktarı belirlenmiştir.

NOT: Üretim ortamındaki $MnCl_2$, pullulan veriminin artması ve melanin oluşumunu engellenmesi amacıyla eklenmiş olup (West and Strohfus, 1997) bazı çalışmalarda ilerleyen günlerde biyoreaktörlerde melanin üretimine bağlı renk değişimi (beyazdan yeşile) gözlenmiştir. Pullulan üretiminde istenmeyen bu renk değişimini gidermek için biyokütle ayırımından gelen üst sıvıya (*cell free broth*), hacimce %4 oranında H_2O_2 eklenerek 50 °C'lik su banyosunda 30 dakika boyunca bekletilmiştir (Wu et al., 2009).

H_2O_2 'nin insan sağlığına olumsuz etkileri bilinmektedir. Genellikle gıda sektöründe kullanılan pullulan ele alındığında üretimin herhangi bir aşamasında ortama H_2O_2 eklenmesi sakıncalı görülebilir. Fakat etanol ilavesi sonrası polisakkarit çöktürmesi işleminde üst sıvı ile birlikte H_2O_2 'nin giderimi sağlandığı kabul edilmektedir (Wu et al., 2009).

3.4.3 Pullulan tayini

Üretilen toplam polisakkarit içindeki pullulan miktarının belirlenmesi için ise, elde edilen polisakkarit 0,05M sodyum asetat (pH 5,0) ile 10 mg/ml oranında çözülmüştür. 1 ml örneğe, 10 µl pullulanaz (Promozyme, Novo) ilave edilerek oda sıcaklığında 21 saat inkübe edilmiştir. Enzim, aynı konsantrasyondaki saf pullulan (kullanılan saf pullulan kaynağı: Hayashibara Co., Ltd., Japonya) örneğine de ilave edilmiştir. Daha sonra indirgen şeker analizi ile üretimden gelen polisakkarit içindeki pullulan ve saf pullulanın glikoz indirgen eşdeğerleri saptanmıştır. Saf pullulanın glikoz indirgen eşdeğeri ile toplam polisakkarit içindeki pullulanın glikoz indirgen eşdeğeri

karşılaştırılarak örneklerin pullulan içerikleri (yüzdeleri) belirlenmiştir (Ürküt, 2007).

3.4.4 İndirgen şeker analizi

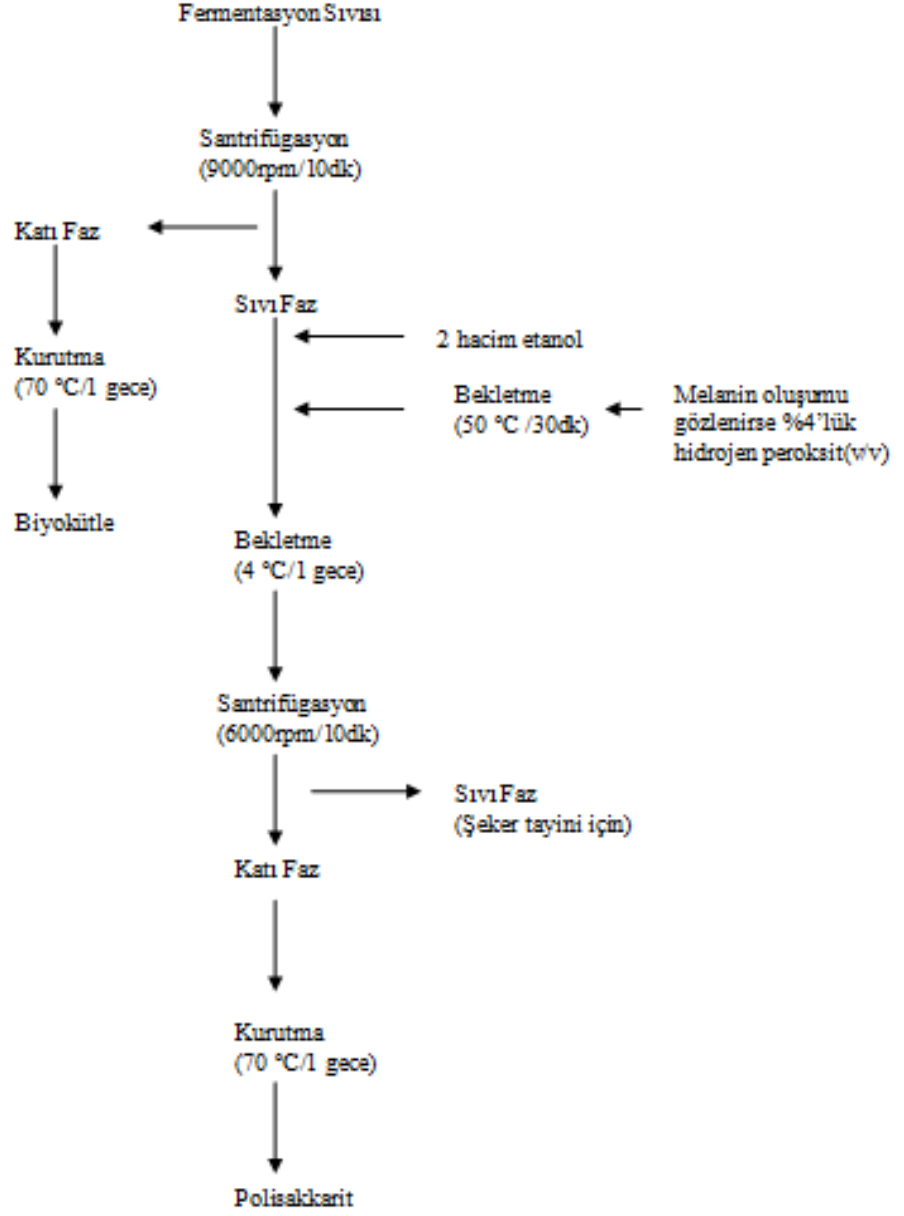
3.4.3'te belirtilen indirgen şeker miktarının saptanması için, uygun oranda seyreltme yapıldıktan sonra dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır. Buna göre 0,09, 0,18, 0,27, 0,36 mg/l glikoz içeren standart çözeltiler kullanılmıştır ve okumalar spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda yapılmıştır (Ürküt, 2007).

Yapılan tüm analizler 2 paralel halinde yapılmış ve aritmetik ortalamaları hesaplanarak kullanılmıştır.

3.4.5 Toplam şeker analizi

3.4.2'de belirtildiği şekilde etanolle çöktürülen polisakkaritin santrifüjlenmesi sonucu elde edilen sıvıdan örnek alınmış ve kalan şeker miktarının belirlenmesi için örnekler uygun oranda seyreltildikten sonra Fenol-Sülfirik Asit yöntemine göre toplam şeker tayin edilmiştir. Bu yöntemde 20, 40, 60, 80, 100 mg/l sakkaroz içeren standart çözeltiler kullanılmış ve okumalar spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Yapılan tüm analizler 2 paralel halinde yapılmış ve aritmetik ortalamaları hesaplanarak kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Mikrobiyal polisakkarit üretim şeması

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 MnCl₂'nin Pullulan ve Melanin Üretimine Etkisi

A. pullulans ile pullulan üretiminin en büyük dezavantajlarından biri melanin üretimidir (Singh et al., 2009). Üretim sonrası melanin giderimi fazladan bir saflaştırma basamağı yarattığı için hem zaman hem de ekonomik kayıptır. *A. pullulans* ile pullulan üretiminde melanin gideriminde aktif karbon kullanımı veya değişik oranlarda solvent-solvent / solvent-tuz karışımları uygulaması yapılabilmektedir (Kachhawa et al., 2003). Ayrıca melanin üretimi baskılanmış mutant organizmalarla da melaninsiz üretimler gerçekleştirilmektedir (Göksungur vd., 2005).

Mutant olmayan, doğal, *A. pullulans* suşları için de, üretim ortamı manipüle edilerek melanin üretimi baskılanabilir veya minimuma indirilebilir. Örneğin, üretim ortamında maya ekstraktı yerine KNO₃ ekleyerek melanin üretiminin baskılandığı bir çalışmanın (Thibault and LeDuy, 2001) yanı sıra üretim ortamına MnCl₂ eklenerek melanin üretiminin baskılandığı ve hatta pullulan üretiminde artışın gözlemlendiği çalışmalar vardır (West and Strohfus, 1997). MnCl₂'nin, *A. pullulans* ile pullulan üretiminde melanin yolağını (*pathway*) baskıladığı tahmin edilmektedir (West and Strohfus, 1997).

Bu çalışma kapsamında melanin üretimini minimum seviyede tutmak için KNO₃ ve MnCl₂'nin etkisi incelenmiş ve aşağıdaki üretim ortamları hazırlanmıştır.

(NOT: Kısaltma adına bu çalışma için, sükröz 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0,6, maya ekstraktı 0,4 g/L, K₂HPO₄ 5 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,2 g/L, ve NaCl 1 g/L (pH= 5,5) ile hazırlanan üretim ortamına “normal üretim ortamı” denilmiştir.)

Örnek 1: Normal üretim ortamı.

Örnek 2: Normal üretim ortamına maya ekstraktı yerine aynı miktarda KNO_3 eklenmiştir.

Örnek 3: Normal üretim ortamına 0,01 g/L $MnCl_2$ eklenmiştir.

Örnek 4: Normal üretim ortamına 0,01 g/L $MnCl_2$ ve maya ekstraktı yerine aynı miktarda KNO_3 eklenmiştir.

Üretimler, 250 mL'lik erlenlerde 50 mL'lik üretim ortamlarında 5 gün boyunca $28^\circ C$ 'de 200 rpm karıştırma hızında yapılmış ve her bir erlene -daha önce materyal & metot kısmında bahsedildiği gibi- eşit miktarlarda hücre ekimi yapılmıştır. Her bir örneğin paraleli olup toplam 8 erlenle yapılan çalışmada, üretilen melanin, renk değişimi aracılığıyla gözlenmiş (Şekil 4.1).

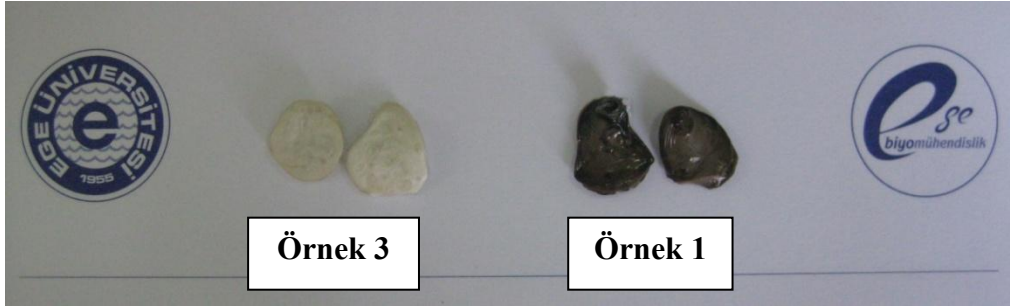


Şekil 4.1. KNO_3 ve $MnCl_2$ 'nin melanin üretimine etkisi. **a:** 2.gün, **b:** 3.gün, **c:**4.gün ve **d:**5.gün

1. günün sonunda örnekler arasında gözle görünür bir fark olmamasına rağmen ilerleyen günlerde örnekler arasında gözle görünür renk farklılıkları gözlenmiştir. *A. pullulans*'ta melanin üretiminden kaynaklanan yeşil-siyah renk tonunun varlığı bilinmektedir (Kachhawa et al., 2003). Dolayısıyla bu çalışmada melanin miktarı için kıstas olarak yeşil-siyah renkten beyaz-sarı renge doğru sıralama kalitatif yapılmıştır. Buna göre üretilen melanin miktarı çoktan aza doğru aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

Örnek 1 > Örnek 4 > Örnek 2 > Örnek 3

5 günlük üretimin ardından ortama $MnCl_2$ eklenmesinin melanin gideriminde en etkili yöntem olduğu gözlenmiş ve $MnCl_2$ 'nin melanin üretimi üzerindeki etkisi örneklerden elde edilen polisakkarit renginden de bariz bir şekilde görülmüştür (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Etanol ile çöktürülüp kurutulmuş polisakkaritler. $MnCl_2$ 'nin melanin üretimine etkisi.

Bu çalışmada ayrıca üretilen biyokütle, toplam polisakkarit ve pullulan miktarları da ölçülmüş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Örnek 1, 2, 3 ve 4'ün 5. gün sonunda biyokütle, toplam polisakkarit ve pullulan miktarları ile toplam polisakkarit içerisindeki pullulan yüzdeleri.

| | Biyokütle (g/L) | Toplam polisakkarit (g/L) | Pullulan (g/L) | Toplam polisakkarit içerisindeki pullulan yüzdesi (%) |
|----------------|----------------------------|--|---------------------------|--|
| Örnek 1 | 4,93 | 20,56 | 14,49 | 70,50 |
| Örnek 2 | 2,28 | 6,30 | 3,48 | 55,30 |
| Örnek 3 | 5,11 | 20,69 | 16,87 | 81,56 |
| Örnek 4 | 4,52 | 15,70 | 11,35 | 72,35 |

Bu sonuçlara göre, $MnCl_2$ 'ün melanin üretimini gözle görünür bir şekilde düşürmesinin yanı sıra pullulan miktarını da arttırdığı gözlenmiştir. Dolayısıyla biyoreaktörlerde yapılan çalışmalarda melanin üretimini baskılamak ve pullulan miktarını arttırmak için $MnCl_2$ kullanılmıştır.

4.2 Pullulan Üretimini Optimizasyonu İçin Ön Deneme Çalışmaları

Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde havalandırma hızının üretim verimine etkisi öteden beri bilinmektedir (Chisti, 1989). Pullulan üretiminde aşırı başlangıç substrat (şeker) konsantrasyonu organizmada substrat inhibisyonuna neden olmakta dolayısıyla üretim verimi azalmaktadır (Göksungur vd., 2005). Ayrıca pullulan üretiminde inkübasyonun ileri aşamalarında ortamdaki şeker miktarı tükendiğinde *A. pullulans* ortamdaki pullulanı salgıladığı glikoamilaz B enzimi ile parçalayabilmekte böylece ihtiyacı olan şeker miktarını karşılayabilmektedir (Göksungur vd., 2005).

Bahsedilen bu kısıtlar hesaba katılarak, havalandırma hızı, başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde pullulan üretimine etkisi incelenmiş ve hava kaldırmalı biyoreaktörde pullulan üretiminin cevap yüzey yöntemi (CYY) kullanılarak optimizasyonu yapılmıştır.

Yapılacak optimizasyondaki deneme bölgesinin (*region of interest*) belirlenmesi için incelenen üretim parametreleri olan havalandırma hızı, başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin pullulan üretimine etkisini anlamak için aşağıdaki ön denemeler yapılmıştır.

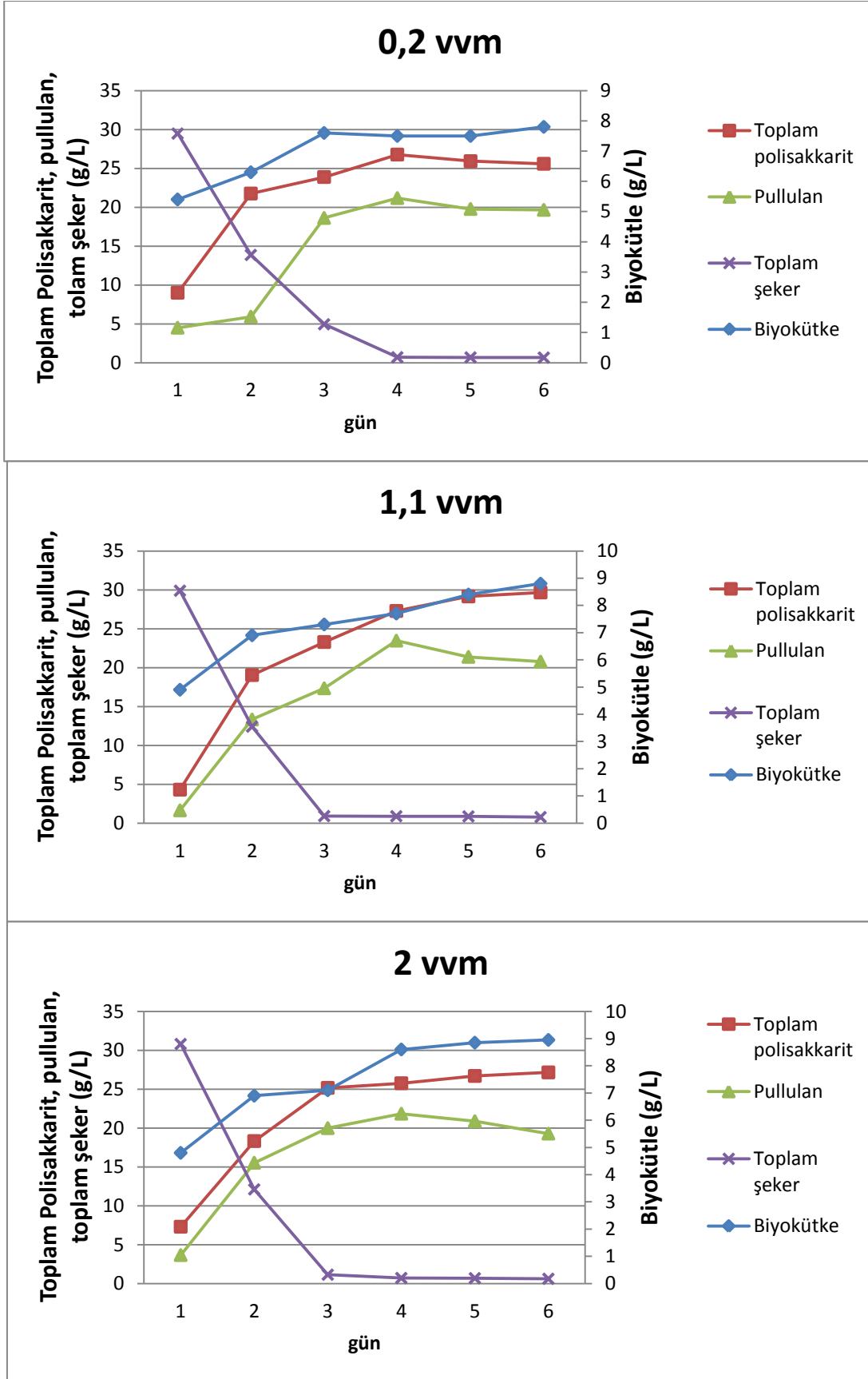
4.2.1 Havalandırma hızının pullulan üretimine etkisi

50 g/L sabit başlangıç sükroz konsantrasyonunda hava kaldırmalı biyoreaktörde 1vvm, 2vvm ve 3vvm; kabarcık kolon biyoreaktörde ise 0,2vvm, 1,1vvm ve 2vvm havalandırma hızlarında 6 gün boyunca her gün örnek alınarak hücre büyümesi, toplam polisakkarit miktarı, pullulan miktarı ve toplam şeker (sükroz) tüketim miktarı belirlenmiştir (şekil 4.3. ve şekil 4.4.).

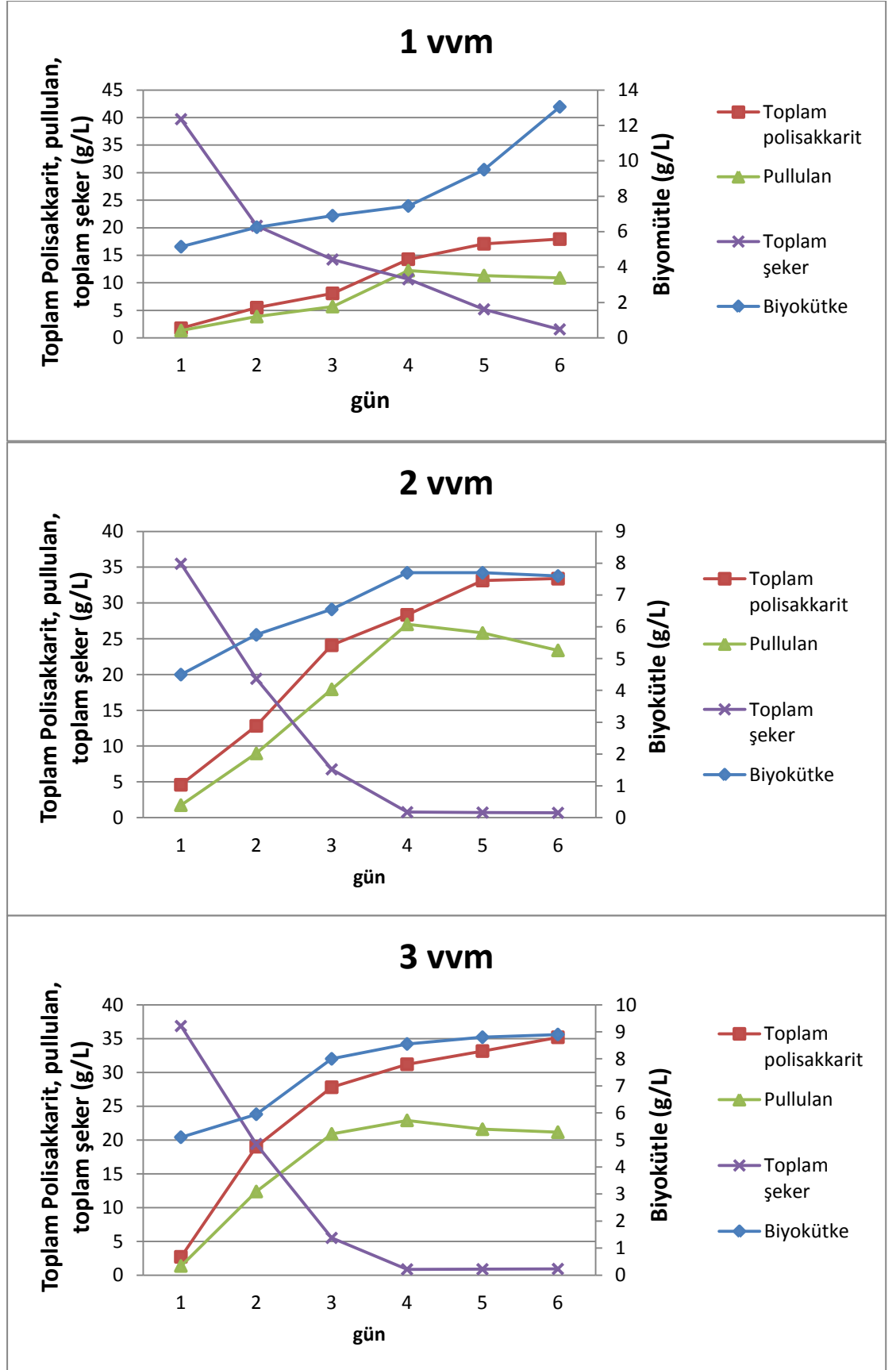
Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde havalandırma hızı için seçilen değerler, biyoreaktör işletme koşullarının yanı sıra ilgili biyoreaktörde belirtilen havalandırma hızlarında pullulan üretimi için artış ve azalışı gözlemek için seçilmiştir.

Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde sabit başlangıç substrat konsantrasyonu ve değişik havalandırma hızlarında gerçekleştirilen tüm denemelerde elde edilen grafikler benzer karakteristiklere sahiptir. Tüm grafiklerde farklı konsantrasyonlarda olmakla beraber 4. günün sonuna kadar biyokütle, toplam polisakkarit ve pullulan miktarının arttığı gözlenmiştir.

Bununla birlikte 4. günü izleyen günlerde artış hızının düşmesine rağmen toplam polisakkarit miktarları artmaya devam etmiş fakat pullulan miktarında düşüş gözlenmiştir. Ayrıca biyokütle miktarlarının 4. günü izleyen günlerde neredeyse sabitlendiği gözlenmiştir. Pullulan miktarındaki bu düşüşün sebebinin azalan şeker miktarını dengelemek için mikroorganizmadaki endojen bir enzim olan glikoamilaz B tarafından pullulanın parçalanması olduğu tahmin edilmektedir (Göksungur vd., 2005). Ayrıca, yapılan tüm denemelerde kabarcık kolon biyoreaktörde 3. günün sonunda, hava kaldırılmalı biyoreaktörde ise 4. günün sonunda ortamdaki şekerin neredeyse tamamının tükendiği gözlenmiştir (şekil 4.3 ve şekil 4.4).



Şekil 4.3. Kabarcık kolon biyoreaktörde değişik havalandırma hızlarında (0,2 vvm, 1,1 vvm ve 2 vvm) gözlemlenen büyüme kinetikleri

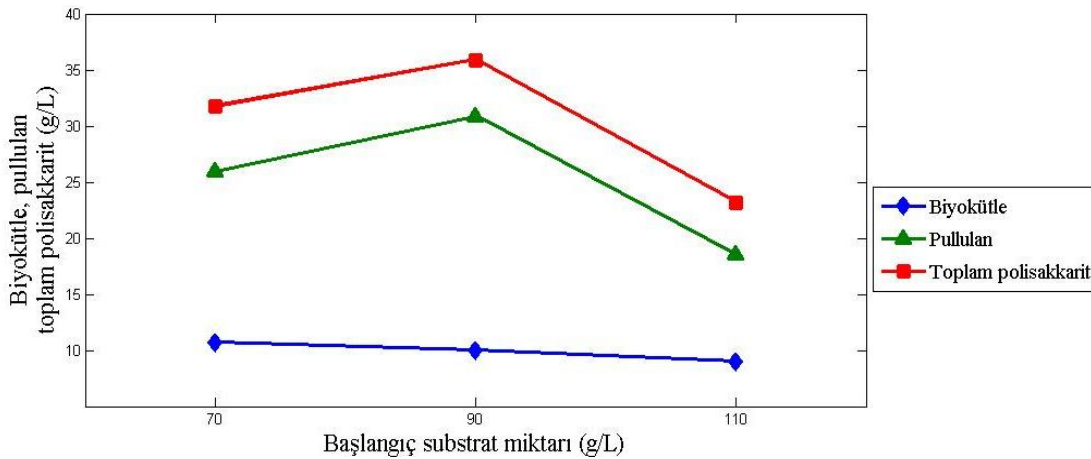


Şekil 4.4. Hava kaldırmalı biyoreaktörde değişik havalandırma hızlarında (1 vvm, 2vvm ve 3 vvm) gözlemlenen büyüme kinetikleri.

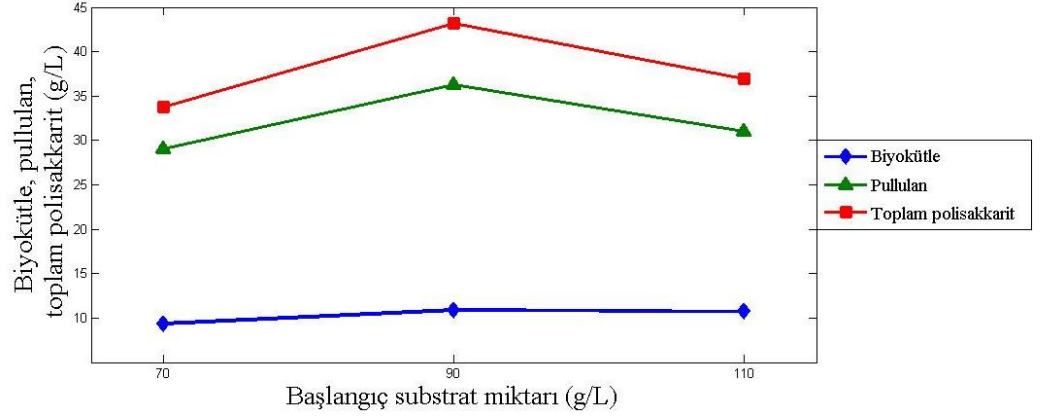
Elde edilen sonuçlara göre, her iki reaktör tipi için de en yüksek pullulan miktarı 4. günün sonunda elde edilmiş olup kabarcık kolon biyoreaktörde 0,2 vvm, 1,1 vvm ve 2 vvm havalandırma hızlarında sırasıyla 21,17 g/L, 23,46 g/L ve 21,83 g/L; hava kaldırmalı biyoreaktörde ise 1 vvm, 2 vvm ve 3 vvm havalandırma hızlarında sırasıyla 12,20 g/L, 27,02 g/L ve 22,89 g/L'dir. Sabit başlangıç şeker miktarı ve değişik havalandırma hızlarının denendiği bu çalışmada hava kaldırmalı biyoreaktörde elde edilen en yüksek pullulan miktarı (27,02 g/L), kabarcık kolon biyoreaktörde elde edilen en yüksek pullulan miktarından (23,46 g/L) daha fazladır.

4.2.2 Başlangıç substrat konsantrasyonunun pullulan üretimi üzerine etkisi

Bölüm 4.2.1'deki çalışmada elde edilen verilere göre hava kaldırmalı biyoreaktör için 2vvm ve kabarcık kolon biyoreaktörde ise 1,1vvm havalandırma hızında en yüksek pullulan miktarı elde edilmiştir. Bu çalışmada ise hava kaldırmalı biyoreaktörde 2vvm ve kabarcık kolon biyoreaktörde 1,1vvm sabit havalandırma hızlarında sırasıyla 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat (sükroz) konsantrasyonunun etkisi bölüm 4.2,1'de en yüksek pullulan miktarının elde edildiği 4. gün için incelenmiştir (şekil 4.5 ve şekil 4.6).



Şekil 4.5. 4. günün sonunda 1,1vvm havalandırma hızında kabarcık kolon biyoreaktörde 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat (şeker) konsantrasyonlarındaki biyokütle (◆), toplam polisakkarit (■) ve pullulan (▲) miktarları.



Şekil 4.6. 4. günün sonunda 2vvm havalandırma hızında hava kaldırmalı biyoreaktörde 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat (şeker) konsantrasyonlarındaki biyokütle (♦), toplam polisakkarit (■) ve pullulan (▲) miktarları.

4. gün sonunda kabarcık kolon biyoreaktör için 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda sırasıyla 25,98 g/L, 30,87 g/L ve 18,52 g/L pullulan üretilmiştir. Hava kaldırmalı biyoreaktör için ise 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda sırasıyla 29,03 g/L, 36,23 g/L ve 31,02 g/L pullulan üretilmiştir. 110 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda pullulan miktarındaki azalışın, substrat inhibisyonu durumundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Göksungur vd., 2005).

Bölüm 4.2.1 ve 4.2.2’de kabarcık kolon ve hava kaldırmalı biyoreaktör için ölçülen tüm pullulan miktarları karşılaştırıldığında hava kaldırmalı biyoreaktörde hesaplanan en yüksek pullulan miktarı (36,23 g/L) kabarcık kolon biyoreaktörde elde edilen en yüksek pullulan miktardan daha fazladır (30,87 g/L). Biyoreaktör sistemlerini karşılaştırmak için kullanılan efektif verim ($Y_{P/S}$), üretilen ürün miktarının kullanılan başlangıç substratına oranıdır. Bölüm 4.2.1 ve 4.2.2’de ölçülen en yüksek pullulan miktarları için hesaplanan efektif verim ($Y_{P/S}$) değerleri ise hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörler için sırasıyla 0,402 ve 0,343’tür.

Yapılan ön denemeler sonucunda hava kaldırmalı biyoreaktörün veriminin kabarcık kolon biyoreaktörün veriminden daha fazla olduğu görülmüş ve cevap yüzey yöntemi (CYY) ile yapılacak optimizasyonda sadece hava kaldırmalı biyoreaktörün kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3 Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) Kullanılarak Hava Kaldırmalı

Biyoreaktörde Pullulan Üretimini Optimizasyonu

Yapılan ön denemeler sonunda hava kaldırmalı biyoreaktörde sabit başlangıç substrat konsantrasyonunda 1,2 ve 3 vvm havalandırma hızları için en yüksek pullulanın elde edildiği 4. gün için pullulan miktarlarında sırasıyla bir artış ve azalış görülmektedir. Benzer şekilde sabit havalandırma hızında 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlarında 4. gün için pullulan miktarlarında sırasıyla bir artış ve azalış görülmektedir. Dolayısıyla optimizasyonda kullanılan üretim parametrelerinin (başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi) seviyesi çizelge 4.2'deki gibi belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Deneysel tasarımda kullanılan üretim parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) seviyesi

| Faktör | Parametre | Seviye | | |
|----------------|---|--------|----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| X ₁ | Başlangıç substrat konsantrasyonu (g/L) | 70 | 90 | 110 |
| X ₂ | Havalandırma hızı (vvm) | 1 | 2 | 3 |
| X ₃ | İnkübasyon süresi (gün) | 3 | 4 | 5 |

Optimizasyon çalışmalarında deney tasarımı olarak “yüzey merkezli tasarım (*face central design*)” seçilmiştir. Bu seçimde bu deney tasarımının sağladığı deneylerin işletme koşullarına uygunluğu etkili olmuştur.

Minitab Statistical Software (Release 13.20) programı ile yapılan optimizasyonunda deney tasarımı ve ilgili deneyin sonucunda elde edilen pullulan miktarları çizelge 4.3’da gösterilmiştir. Her bir parametre için 3 seviyede yüzey merkezli tasarım kullanılarak 20 noktada (14 farklı kombinasyon ve merkezde 6 tekrar) üretim gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. Deneysel tasarım ve üretilen pullulan miktarları.

| Deney no | Başlangıç substrat konsantrasyonu (g/L) | Havalandırma hızı (vvm) | İnkübasyon süresi (gün) | Pullulan (g/L) |
|----------|---|-------------------------|-------------------------|----------------|
| 1 | 90 | 2 | 4 | 35,205 |
| 2 | 110 | 3 | 5 | 22,479 |
| 3 | 110 | 3 | 3 | 13,620 |
| 4 | 110 | 1 | 5 | 29,923 |
| 5 | 90 | 1 | 4 | 27,964 |
| 6 | 90 | 2 | 4 | 35,207 |
| 7 | 70 | 1 | 3 | 15,908 |
| 8 | 90 | 2 | 4 | 35,635 |
| 9 | 70 | 2 | 4 | 28,684 |
| 10 | 90 | 3 | 4 | 23,775 |
| 11 | 110 | 1 | 3 | 25,451 |
| 12 | 110 | 2 | 4 | 31,746 |
| 13 | 90 | 2 | 5 | 36,800 |
| 14 | 90 | 2 | 4 | 35,635 |
| 15 | 90 | 2 | 4 | 35,207 |
| 16 | 90 | 2 | 4 | 36,163 |
| 17 | 70 | 3 | 3 | 15,168 |
| 18 | 90 | 2 | 3 | 29,766 |
| 19 | 70 | 1 | 5 | 20,446 |
| 20 | 70 | 3 | 5 | 24,329 |

Bağımsız değişkenlerin (başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi) bağımlı değişken (pullulan miktarı) ile uyumu varyans

analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Minitab Statistical Software (Release 13.20) program çıktısı olarak çizelge 4.4 ve çizelge 4.5'te verilmiştir. Deneysel veriler ve modelleme ile elde edilen (tahmini) veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı değeri (R^2) 0.993'tür. Bu değer, yüzey merkezli tasarım sonucu elde edilen model ile deneysel verilerin % 99,3 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir. Dolayısıyla, deneysel tasarım sonucu elde edilen model denkleminin, hava kaldırmalı biyoreaktörde incelenen bağımsız değişkenler için pullulan üretimini yüksek doğrulukla ifade ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Pullulan konsantrasyonu için yüzey merkezli tasarıma ait varyans analizi (ANOVA) tablosu ($R^2 = 0.993$)

| Kaynak | SD | KT | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|----------------|----|---------|----------|---------|--------|--------|
| Regresyon | 9 | 1076,85 | 1076,854 | 119,65 | 303,83 | <0.001 |
| Lineer | 3 | 192,24 | 192,239 | 64,08 | 162,72 | <0.001 |
| İkinci derece | 3 | 811,63 | 811,63 | 270,543 | 686,98 | <0.001 |
| Etkileşim | 3 | 72,99 | 72,985 | 24,328 | 61,78 | <0.001 |
| Artık hata | 10 | 3,94 | 3,938 | 0,394 | | |
| Uyum eksikliği | 5 | 3,21 | 3,205 | 0,641 | 4,37 | 0,066 |
| Saf hata | 5 | 0,73 | 0,733 | 0,147 | | |
| Toplam | 19 | 1080,79 | | | | |

SD, serbestlik derecesi; KT, kareler toplamı ; Düz. KT, düzeltilmiş kareler toplamı; Düz. KO, düzeltilmiş kareler ortalaması.

Regresyon eşitliğiyle açıklanan varyasyon miktarının daha büyük olması; bu eşitliğin, sonuçları anlamlı bir şekilde açıklama olasılığının da daha büyük olduğunu ifade eder. Varyans analizinde elde edilen F değeri, bu ilişkinin bir ölçüsüdür. Daha büyük F değeri, regresyon eşitliğinin, verileri anlamlı olarak açıklamada daha yetenekli olduğunu gösterir. F değeri ayrıca, farklı modellerin birbirleriyle karşılaştırılmasında da yardımcı bir parametredir. Karşılaştırılan modeller arasında F değeri daha büyük olanlar, modellerin ilişkin oldukları yanıt verilerini daha iyi açıklarlar. Uyum eksikliği (*Lack of Fit*) ise, bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya (*pure error*) göre küçük olduğunu diğer bir deyişle bu uyumsuzluğun anlamsız olduğunu göstermektedir (Yücel, 2008).

Çizelge 4.4 incelendiğinde regresyon için F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ($P < 0.05$), ayrıca model ile elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin (*lack of fit*) (0,066) %5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($P > 0.05$) görülmektedir. Bunun anlamı ise başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin hava kaldırmalı biyoreaktörde *A. pullulans* DSM 2404 hücreleri ile pullulan üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğidir.

DeneySEL veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve bulunan regresyon katsayıları kullanılarak (Çizelge 4.5) yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model denklem üretilmiş ve aşağıda verilmiştir.

$$Y = -143,692 + 2,34525 X_1 + 40,8987 X_2 + 11,7042 X_3 - 0,0109023 X_1^2 - 8,70641 X_2^2 - 1,29291 X_3^2 - 0,140112 X_1X_2 + 1,12625 X_2X_3$$

Y= Pullulan konsantrasyonu

X_1, X_2, X_3 = incelenen parametrelerin gerçek seviyeleri

Çizelge 4.5. görülen regresyon katsayıları Taylor açılım eşitliğindeki terimlerin katsayılarıdır. Bu katsayılar, bağımsız değişkenlerin gerçek veya kodlanmış değerlerinin kullanılmasıyla belirlenebilir. T-test değeri (T) regresyon katsayısının öneminin bir ölçüsüdür; yani bu katsayının gerçek bir anlamının olup olmadığını belirlemede kullanılır. T değerinin daha büyük mutlak değeri, katsayının gerçek olma olasılığının da büyük olduğunu ve böylelikle tahminlemede kullanılabileceğini gösterir (Yücel, 2008).

Çizelge 4.5'e bakıldığında başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi ile cevap (pullulan konsantrasyonu) arasında pozitif doğrusal bir etki olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Bunun anlamı artan başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi değerlerinde pullulan üretiminin artacağıdır. P değerleri her bir katsayının önemini kontrol etmek için bir kıstas olarak kullanılmaktadır. P değeri ne kadar

küçükse katsayıya ilişkin korelasyonun önem derecesi o kadar fazladır (Ürküt, 2007)

Çizelge 4.5. Pullulan konsantrasyonları için tahmin edilen regresyon katsayıları

| Terim | Katsayı | SH Kats. | T | P |
|-------------------------------|------------|----------|---------|--------|
| Sabit | -143,692 | 0,2157 | 162,866 | <0.001 |
| Baş. substrat kons. (X_1) | 2,34525 | 0,1984 | 9,415 | <0.001 |
| Havalandırma hızı (X_2) | 40,8987 | 0,1984 | -10,24 | <0.001 |
| İnkübasyon süresi (X_3) | 11,7042 | 0,1984 | 17,165 | <0.001 |
| $(X_1)^2$ | -0,0109023 | 0,3784 | -11,524 | <0.001 |
| $(X_2)^2$ | -8,70641 | 0,3784 | -23,007 | <0.001 |
| $(X_3)^2$ | -1,29291 | 0,3784 | -3,417 | 0.007 |
| $(X_1) * (X_2)$ | -0,140112 | 0,2219 | -12,63 | <0.001 |
| $(X_1) * (X_3)$ | -0,0023 | 0,2219 | -0,207 | 0,840 |
| $(X_2) * (X_3)$ | 1,12625 | 0,2219 | 5,076 | <0.001 |

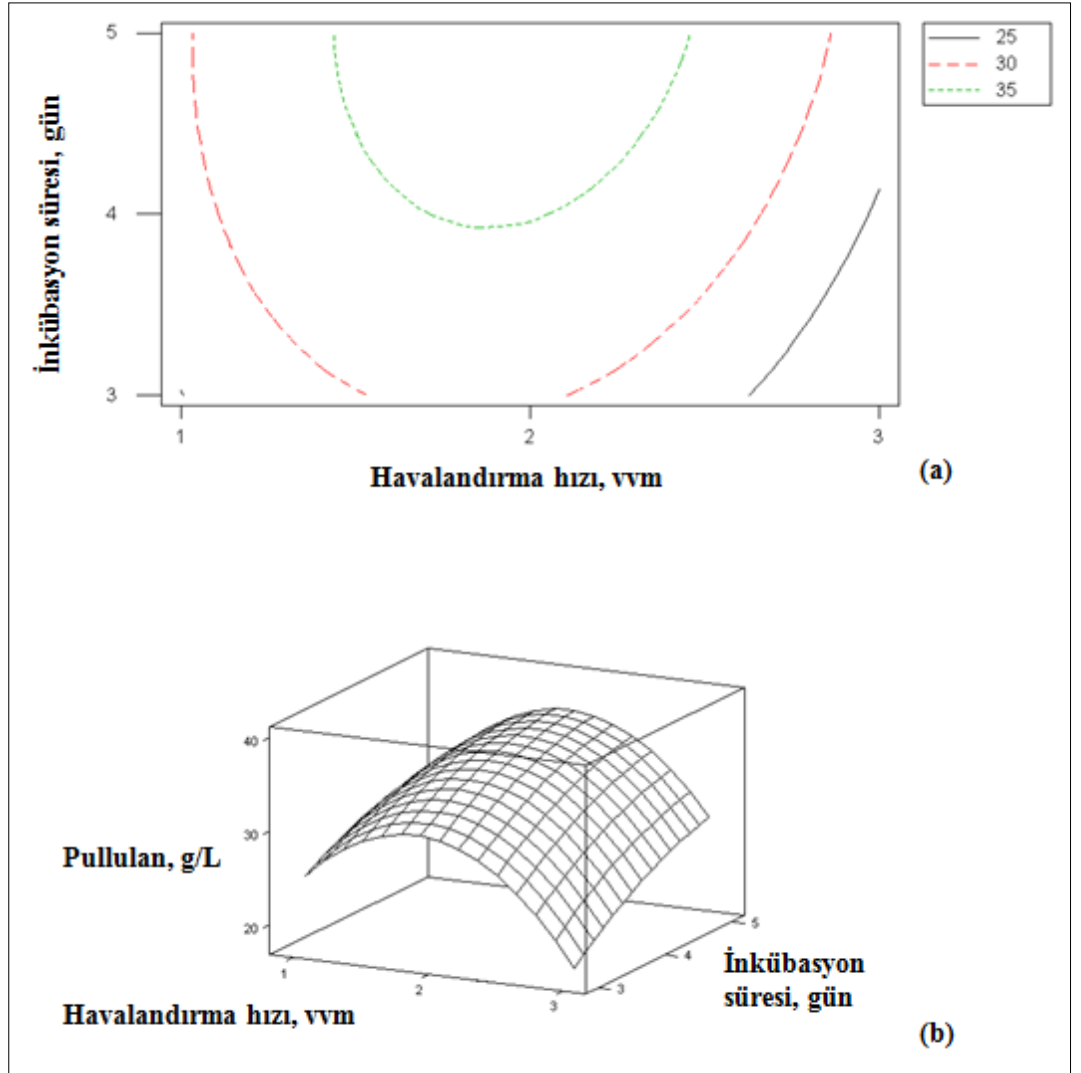
SH kat., Standart hata katsayıları

Aynı çizelge incelendiğinde başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin cevap üzerinde negatif kuadratik (ikinci dereceden) etkisinin olduğu da görülmektedir ($P < 0.05$). Bunun anlamı artan başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi değerlerinde pullulan üretiminin artması ve daha yüksek değerlere çıkılmaya devam edildiğinde pullulan üretiminin azalmasıdır.

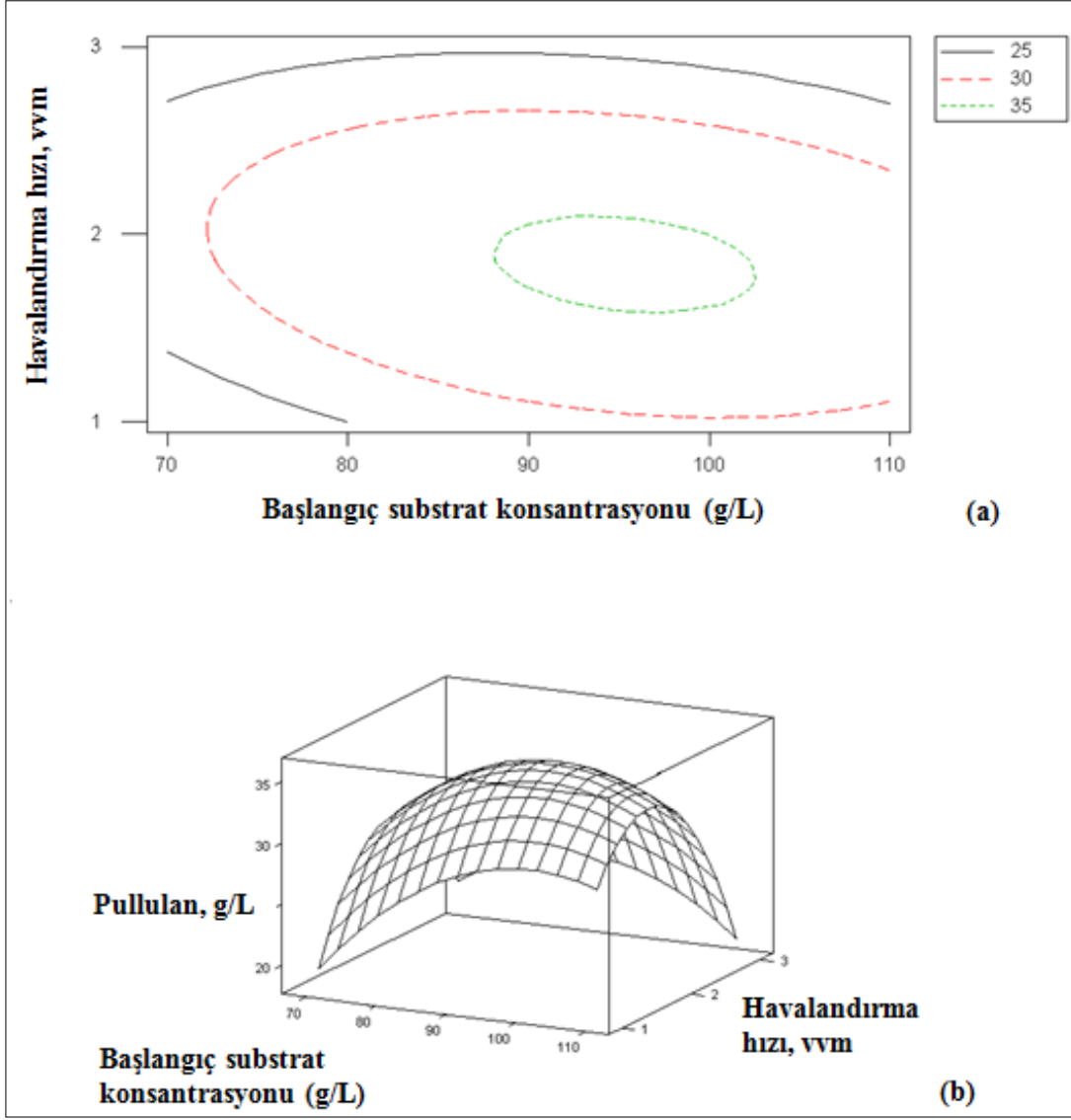
Parametrelerin ikili etkileşiminin ($X_1 * X_2$, $X_1 * X_3$, $X_2 * X_3$) pullulan üretimine negatif ve pozitif etkisi olmakla birlikte başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresi etkileşiminin ($X_1 * X_3$) pullulan üretiminde anlamlı bir etkisi yoktur ($P > 0.05$). Dolayısıyla başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresi etkileşimi ($X_1 * X_3$) modelde ihmal edilmiştir.

Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de bağımsız değişkenlerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki bağımsız değişken seviyelerinin pullulan

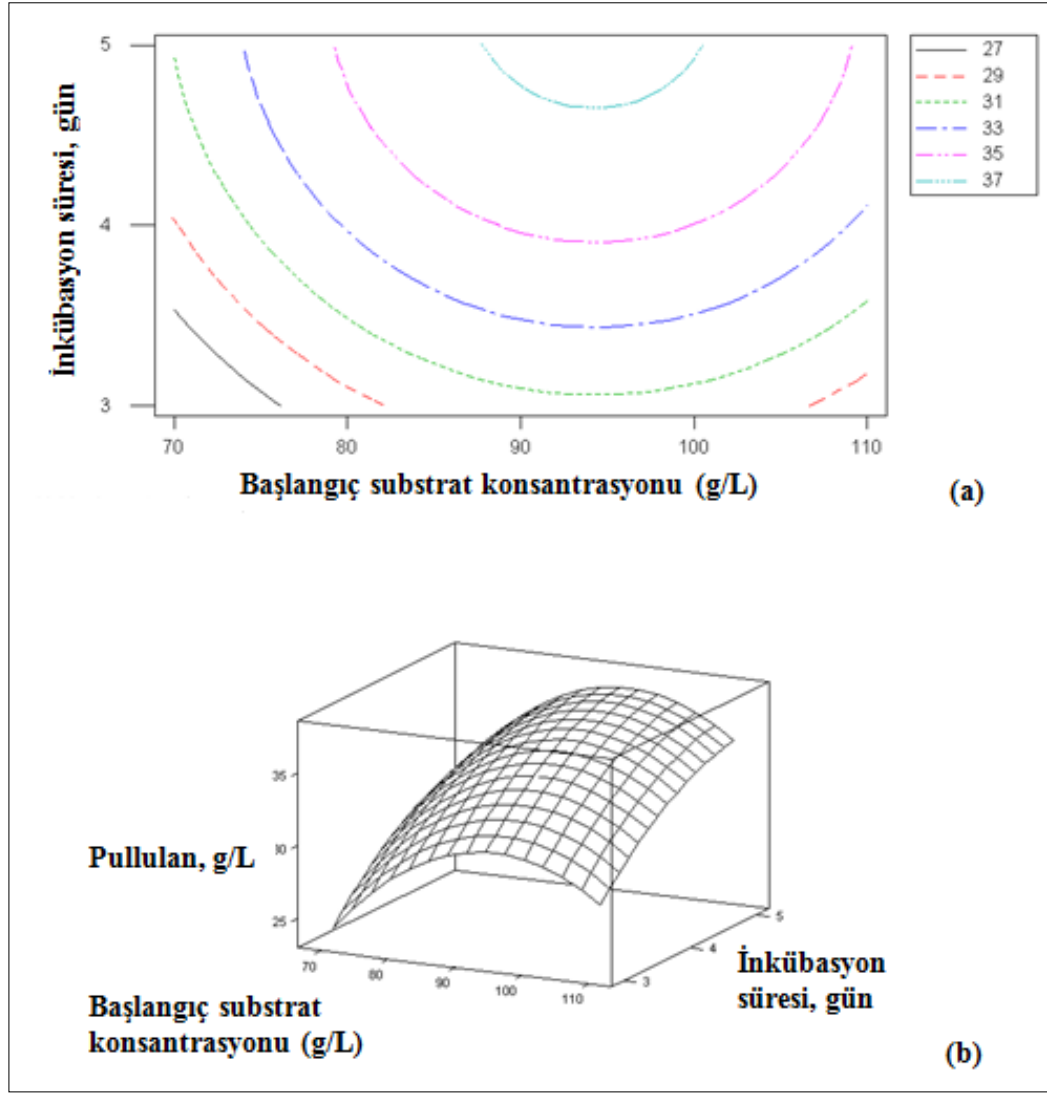
konsantrasyonu üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Maksimum pullulan konsantrasyon miktarları, başlangıç substrat miktarı ve havalandırma hızı faktörlerinin orta seviyelerinde elde edilirken inkübasyon süresi için orta seviyeden biraz daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Sabit substrat konsantrasyonunda (90 g/L), havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin a) izohips eğrisi, b) yüzey grafiği



Şekil 4.8. Sabit inkübasyon süresinde (4. gün), başlangıç substrat konsantrasyonu ve havalandırma hızının a) izohips eğrisi, b) yüzey grafiği



Şekil 4.9. Sabit havalandırma hızında (2 vvm), başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin a) izohips eğrisi, b) yüzey grafiği

Pullulan üretimini ifade eden model -ikinci dereceden polinomial denklem- yardımıyla proses için belirlenen optimum koşullar, başlangıç substrat konsantrasyonu, $X_1 = 95,154$ g/L; havalandırma hızı, $X_2 = 1,93$ vvm ve inkübasyon süresi, $X_3 = 5,367$ gün olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda model 38,77 g/l maksimum pullulan konsantrasyonunu vermiştir.

Maksimum pullulan miktarı elde etmek için gerekli optimum noktalardan, başlangıç substrat konsantrasyonu (95,154 g/L) ve havalandırma hızı (1,93 vvm) değerleri daha önce çizelge 4.2’de tanımlanan üretim parametreleri seviyelerinin arasında yer alırken inkübasyon süresi değeri (5,367 gün) bu parametre için

tanımlanan en üst üretim parametresi seviyesinden (5 gün) daha fazladır. Yapılan ön denemelerdeki bütün deneylerde 4. günden sonra pullulan miktarında düşüş gözlenirken sadece hava kaldırmalı biyoreaktörde 2vvm sabit havalandırma hızında, 90 g/L başlangıç şeker miktarında 5. gün bir önceki günden biraz daha fazla pullulan elde edilmiş olup altıncı gün pullulan seviyesi düşmüştür. Bu sonuç modellerle açıklanan optimum değerle örtüşmekte olup, cevap yüzey yönteminin prosesi açıklamada ne kadar etkili bir yöntem olduğunu bir kez daha göstermektedir.

4.3.1 Hava kaldırmalı biyoreaktörde pullulan üretimi için alternatif

optimum noktalar

Minitab Statistical Software (Release 13.20) programında bulunan sonuçlar benzer mantıkta ve işlevde çalışan bir diğer bilgisayar programı Design Expert (versiyon 7.0.0) ile de denenmiş ve aynı sonuçlar alınmıştır. Minitab Statistical Software (Release 13.20) programında elde edilen çıktılara ek olarak Design Expert (versiyon 7.0.0) programından alternatif optimum noktalar elde edilmiştir. Bu alternatif optimum noktalar elde edilen model sonucu bulunan maksimum pullulan seviyesinden biraz daha düşük olup yakın sonuçlar vermektedir. Design Expert (versiyon 7.0.0) programının verdiği alternatif optimum noktalarında elde edilen pullulan miktarı 23,532 g/L ile 37,501 g/L arasında değişmektedir (Çizelge 4.6). Bu çalışmadaki proses parametreleri olan başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresi değerleri arttıkça proses maliyeti arttığından -modelin verdiği maksimum pullulan miktarı değerlerinden düşük olmasına rağmen- alternatif optimum noktalara yönelme imkanı doğmaktadır.

Örneğin, inkübasyon süresinin 3,83 gün olduğu 3. alternatifte üretilen pullulan miktarı maksimum pullulan miktarından birazcık düşük olmasına rağmen maksimum pullulan miktarını veren optimum noktadan yaklaşık 2 gün erken proses süresiyle toplam maliyet hesabı açısından oldukça avantajlı görünmektedir. Benzer şekilde 77,23 g/L başlangıç substrat miktarı ve 1,55 vvm havalandırma hızının olduğu 15. alternatifte üretilen pullulan miktarı maksimum pullulan

miktarından birazcık düşük olmasına rağmen önemli maliyet girdilerinden şeker ve havalandırma için harcanan enerji konusunda avantajlı görünmektedir.

Çizelge 4.6. Pullulan üretimi için 30 farklı alternatif optimum nokta

| Alternatif No | Havalandırma hızı (vvm) | Substrat miktarı (g/L) | İnkübasyon süresi (gün) | Pullulan miktarı (g/L) |
|---------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 | 2,7004 | 84,376 | 4,4451 | 31,60275 |
| 2 | 2,6216 | 81,92 | 3,6795 | 28,98412 |
| 3 | 1,6554 | 97,596 | 3,3882 | 33,69002 |
| 4 | 1,3272 | 98,332 | 4,5408 | 35,43957 |
| 5 | 1,2786 | 92,408 | 4,8999 | 34,79945 |
| 6 | 1,434 | 75,04 | 5,1252 | 30,87491 |
| 7 | 2,3238 | 82,608 | 4,4079 | 34,78159 |
| 8 | 1,3936 | 83,888 | 5,0748 | 34,09676 |
| 9 | 1,7768 | 80,336 | 5,4525 | 35,8271 |
| 10 | 2,9648 | 86,576 | 4,44 | 27,70035 |
| 11 | 1,542 | 78,516 | 3,318 | 29,001 |
| 12 | 2,5598 | 96,848 | 5,5287 | 35,21832 |
| 13 | 2,082 | 72,324 | 4,2504 | 31,56839 |
| 14 | 2,748 | 94,556 | 4,2855 | 30,50296 |
| 15 | 1,5506 | 77,236 | 5,0163 | 33,05144 |
| 16 | 1,8702 | 84,184 | 5,1534 | 37,28854 |
| 17 | 2,0416 | 76,512 | 4,1961 | 33,24334 |
| 18 | 2,514 | 83,132 | 4,9386 | 34,69056 |
| 19 | 1,3714 | 102,792 | 4,3905 | 35,39349 |
| 20 | 1,9654 | 82,472 | 4,3524 | 35,69587 |
| 21 | 2,59 | 72,348 | 3,4194 | 25,06536 |
| 22 | 1,99 | 89,428 | 3,876 | 35,45355 |
| 23 | 1,3932 | 71,304 | 5,4378 | 28,2122 |
| 24 | 1,5966 | 101,912 | 4,8888 | 37,50167 |
| 25 | 1,0836 | 105,52 | 3,5469 | 30,03852 |
| 26 | 1,1134 | 105,764 | 3,8967 | 31,5042 |
| 27 | 2,8786 | 75,532 | 4,8786 | 28,51802 |
| 28 | 1,1458 | 70,196 | 5,6445 | 23,53222 |
| 29 | 1,5316 | 89,168 | 3,0462 | 30,73829 |
| 30 | 2,093 | 71,044 | 4,1829 | 30,7206 |

Tüm bunları hesaba katarak, ilerleyen çalışmalarda proses parametreleri ile pullulan miktarı arasındaki ilişkiyi açıklayan modele ek olarak, maliyet girdilerini de içeren bir model türetilbilir. Böylece pullulan üretimi konusunu değerlendiren üreticiler için değerli bir kaynak olabilir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerde *A. pullulans* DSM-2404 suşu ile pullulan üretimi yapılmıştır. Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerin pullulan üretimindeki performanslarını karşılaştırmak için bu reaktörlerde birçok deneme yapılmıştır. Bu denemelerde tüketilen substrat, biyokütle, toplam polisakkarit ve pullulan miktarları ölçülmüştür ve günlere göre kinetikleri belirlenmiştir.

Biyoreaktör aşamasına geçilmeden önce erlenlerde bazı denemeler yapılmıştır. Bu denemelerin amacı pullulan üretiminin en büyük kısıtlarından biri olan melanin üretimini engellemeye dairdir. Üretilen melanin alt akım işlemleri sırasında ekstra bir saflaştırma basamağı ile giderilebilir. Bu hem zaman hem de maliyet gerektiren bir işlemdir. Bu basamağı ortadan kaldırmak adına, melanin üretmeyen mutant suşların kullanımı veya üretim ortamında yapılacak bazı manipülasyonlar ile melanin üretimi baskılanabilir (West and Strohfus, 1997). Bu çalışmada kullanılan organizma olan *A. pullulans* DSM-2404, doğal bir suş olup üretimin ilerleyen aşamalarında melanin üretebilmektedir. $MnCl_2$ gibi bazı komponentlerin melanin üretimini baskıladığı bilinmektedir (West and Strohfus, 1997). Erlen denemelerinde de üretim ortamına $MnCl_2$ eklenerek üretilen melanin baskılanmaya çalışılmış ve başarılı olunmuştur. Ayrıca üretim ortamına eklenen $MnCl_2$ 'ün pullulan miktarını arttırdığı belirlenmiştir. Biyoreaktör denemelerinde de üretim ortamına $MnCl_2$ eklenerek melanin üretimi baskılanmaya çalışılmıştır.

Hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörlerin pullulan üretimindeki performanslarının denendiği ilk deney setinde, sabit substrat konsantrasyonunda (50 g/L süzkroz) farklı havalandırma hızlarında (hava kaldırmalı biyoreaktör için 1 vvm 2 vvm ve 3 vvm; kabarcık kolon biyoreaktör için 0,2 vvm, 1,1 vvm ve 2 vvm) 6 günlük denemeler yapılmıştır. 4. günün sonunda tüm denemelerde pullulan miktarında düşüşler gözlenmiştir. Bu denemelerde hava kaldırmalı biyoreaktörde üretilen maksimum pullulan miktarı 2 vvm havalandırma hızında ve 4. günde edilmiş olup 27,2 g/L; kabarcık kolon biyoreaktörde üretilen

maksimum pullulan miktarı ise 1,1 vvm havalandırma hızında ve 4. günde elde edilmiş olup 23,46 g/L'dir.

Başlangıç substrat konsantrasyonunun sabitlenip farklı havalandırma hızlarının denendiği deney setinden sonra bu sefer de havalandırma hızları sabitlenip farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarının pullulan üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu bağlamda hava kaldırmalı biyoreaktör için 2 vvm ve kabarcık kolon biyoreaktör için 1,1 vvm havalandırma hızlarında 70, 90 ve 110 g/L başlangıç şeker konsantrasyonlarında 4. günde üretilen pullulan miktarları incelenmiştir. Her iki biyoreaktör için 70, 90 ve 110 g/L başlangıç substrat konsantrasyonlarında sırasıyla bir artış ve azalış gözlemlenmiştir. Bu çalışmada hava kaldırmalı biyoreaktörde üretilen maksimum pullulan miktarı, 36,23 g/L ve kabarcık kolon biyoreaktörde üretilen maksimum pullulan miktarı ise 30,87 g/L'dir. Bu sonuçlar ayrıca iki biyoreaktörün karşılaştırıldığı tüm denemeler boyunca elde edilen maksimum pullulan miktarlarıdır. Bu maksimum pullulan miktarları üzerinden yapılan efektif verimler karşılaştırıldığında hava kaldırmalı biyoreaktör için efektif verimin $Y_{P/S}=0,402$; kabarcık kolon biyoreaktör için efektif verimin ise $Y_{P/S}=0,343$ olduğu görülmüştür. Bu denemeler sonucunda hava kaldırmalı biyoreaktörün pullulan üretimindeki performansı, kabarcık kolon biyoreaktörünkinden daha iyi olduğu görülmüştür.

Daha sonra cevap yüzey yöntemi ile üretim koşullarının optimizasyonu, pullulan üretim performansı kabarcık kolon biyoreaktöre göre daha iyi olan hava kaldırmalı biyoreaktör ile yapılmıştır.

Hava kaldırmalı biyoreaktörde üretim parametreleri olan başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin pullulan üretimi üzerindeki etkileri ve pullulan üretim koşullarının optimizasyonu yüzey merkezli tasarım (*face centered design*) kullanılarak yapılmıştır.

İstatistiksel analiz sonucu elde edilen modelin prosesi iyi bir şekilde temsil ettiği görülmüştür ($R^2 = 0.993$). Proseste bağımsız değişkenler olan başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma hızı ve inkübasyon süresinin pullulan üretiminde güçlü doğrusal bir etkisi olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu bağımsız

değişkenlerin pullulan üretimi üzerinde negatif kuadratik etkileri ve pozitif veya negatif etkileşim etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Bu etkileşim etkilerinden sadece başlangıç substrat konsantrasyonu ve inkübasyon süresi etkileşiminin pullulan üretiminde anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır ($P > 0.05$). Optimizasyon sonucu, 95,2 g/L başlangıç substrat konsantrasyonu, 1,93 vvm havalandırma hız ve 5,36. gün için maksimum pullulan konsantrasyonuna (38.77 g/L) erişilebileceği anlaşılmıştır.

Optimizasyon sonucu elde edilebilecek maksimum pullulan miktarına (38.77 g/L) ek olarak, 23,532 ile 37,501 g/L arasında pullulanın elde edilebileceği alternatif optimum noktalar da belirlenmiştir. Bu alternatif optimum noktalar, ilgili koşullarda üretilen pullulanın daha az olmasına rağmen zaman ve maliyet avantajları sağlayabilecek seçenekler sunabilir.

Bu çalışma, mekanik karıştırılmalı tank biyoreaktör ile pullulan üretiminin yapıldığı birçok çalışmayla karşılaştırıldığında genel olarak pnömatik biyoreaktörlerin, özellikle de hava kaldırmalı biyoreaktörün pullulan üretiminde daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışma ayrıca hava kaldırmalı biyoreaktörde pullulan üretim koşullarının cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonun yapıldığı ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Barnett, C., Smith, A., Scanlon, B. and Israilides, C. J.,** 1998, Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste, *Carbohydrate Polymers*, 38 (1998),203-209
- Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M. and Puri, V. M.,** 2010, Effects of initial ammonium ion concentration on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* and its modeling, *Journal of Food Engineering*, 103(2011), 115-122
- Cheng, K. C., Demirci, A. and Catchmark, J. M.,** 2011, Pullulan: biosynthesis, production, and applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 92: 29-44.
- Chisti, M. Y.,** 1989, *Airlift Bioreactors*, Elsevier Applied Science, London, 345p.
- Choudhury, A. R., Bhattacharyya, M. S. and Prasad, G. S.,** 2012, Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1: 232-237.
- Dağbağlı, S., Güvenç, U. ve Göksungur, Y.,** 2008, Mikrobiyal bir polisakkarit: pullulan, *Akademik Gıda Bilimi ve Teknoloji Dergisi*, 6 (3): 42-48.
- Deepak, K., Saini, N., Pandit V. and Ali, J.,** 2012, An insight to pullulan: A biopolimer in pharmaceutical approaches, *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 1 (3): 202-219.
- Doran, P. M.,** 1995, *Reactor Engineering, Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier Science & Technology Books, pp 333-392.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Emre, İ.**, 2007, Yarı-Kesikli Fermentasyonda Besleme ve Havalandırma Profillerinin Optimizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 158s.
- Gaidhani, H. K., McNeil, B. and Ni, X.**, 2005, Fermentation of Pullulan Using and Oscillatory Baffled Fermenter, Chemical Engineering Research and Design, 83 (A6): 640-645.
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M. and Gaur, M. K.**, 2010, Aureobasidium pullulans, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan, African Journal of Biotechnology, 9 (47): 7989-7997.
- Gavrilescu, M. and Tudose, R. Z.**, 1997, Mixing studies in external-loop airlift reactors, Chemical Engineering Journal, 66:97-104.
- Göksungur, Y., Dağbağlı, S., Uçan, A. ve Güvenç, U.**, 2005, Optimization of pullulan production from synthetic medium by Aureobasidium pullulans in a stirred tank reactor by response surface methodology, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80: 819-827.
- Jiang, L.**, 2010, Optimization of fermentation conditions for pullulan production by Aureobasidium pullulans using response surface methodology, Carbohydrate Polymers, 79: 414-417.
- Kachhawa, D. K., Bhattacharjee, P. and Singhal, R. S.**, 2003, Studies on downstream processing of pullulan, Carbohydrate Polymers, 52: 25-28.
- Kul, S.**, 2004, Cevap Yüzey Yöntemleri, Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 101s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leathers, T. D. and Gupta, S. C.,** 1994, Production of pullulan from fuel ethanol byproducts by *Aureobasidium* sp. strain NRRL Y-12,974, *Biotechnology Letters*, 1163-1166 pp.
- Leathers, T.D.,** 2003, Biotechnological production and applications of pullulan, *Appl Microbiol. Biotechnol*, 62: 468-473.
- Merchuk, J. C. and Gluz, M.,** 2002, Bioreactors, Air-Lift Reactors, *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel, 320-352 pp.
- Merchuk, J. C.,** 2003, Airlift bioreactors: review of recent advances, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 81: 324-337.
- Najafpour, G. D.,** 2007, *Biochemical Engineering and Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, 421p.
- Okada, K., Yoneyama, M., Mandai, T., Aga, H., Sakai, S. and Ichikawa, T.,** 1990, Digestion and fermentation of pullulan. *J Japan Soci Nutri Food Sci* 43:23–29.
- Rekha, M. R. and Chandra, P. S.,** 2007, Pullulan as a Promising Biomaterial for biomedical applications: a perspective, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 20 (2).
- Ronen, M., Guterman, H. and Shabtai, Y.,** 2002, Monitoring and control of pullulan production using vision sensor, *J. Biochem. Biophys. Methods* 51 (2002) 243–249
- Roukas, T. and Serris, G.,** 1999, Effect of shear rate on pullulan production from beet molasses by *aureobasidium* pullulans in an airlift reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 80: 77-89.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, R. S., Saini G. K. and Kennedy, J. F.,** 2010, Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase, *Carbohydrate Polymers*, 80: 401-407.
- Singh, R. S., Saini and G. K.,** 2012, Biosynthesis of pullulan and its applications in food and pharmaceutical industry, *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, Satyanarayana, T. et al. (Eds.), Springer, 509-553 pp.
- Singh, R. S., Saini, G. K. and Kennedy, J. F.,** 2009, Downstream processing and characterization of pullulan from a novel colour variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1, *Carbohydrate Polymers*, 78: 89-94.
- Sugumaran, K.R., Gowthami, E., Swathi, B., Elakkiya, S., Srivastava, S.N., Ravikumar, R., Gowdhaman, D. and Ponnusami, V.,** 2012, Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate, *Carbohydrate Polymers*, 92 (2013), 697– 703 pp.
- Thibault, J. and LeDuy, A.,** 2001, *Microbial Production Methods, Pullulan*, Encyclopedia of Bioprocess Technology, Laval University Sainte-Foy, Canada.
- Ürküt, Z.,** 2007, Kalsiyum Aljinatta İmmobilize Edilmiş *Aureobasidium pullulans* P56 Hücreleri ile Pullulan Üretiminin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 125s.
- Vinod, A. V. and Kumar, R. N.,** 2011, Dynamic and Gas Holdup Studies in a Bubble Column Bioreactor, 2nd International Conference on Environmental Science and Technology, IACSIT Press, Singapore, V2: 384-387.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wecker, A. and Onken, U.,** 2005, Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett* 13:155–160
- Wu, S., Chen, H., Jin, Z. and Tong, Q.,** 2010, Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:737–741
- Wu, S., Jin, Z., Kim, J. M., Tong, Q. and Chen, H.,** 2009, Downstream processing of pullulan from fermentation broth, *Carbohydrate Polymers*, 77: 750-753.
- Yatmaz, E. ve Turhan, İ.,** 2012, Fermentasyon yoluyla pullulan üretimi ve gıda endüstrisinde kullanımı, *Akademik Gıda Bilimi ve Teknoloji Dergisi*, 37 (2): 95-102.
- Yücel, M.,** 2008, Fermantasyon Optimizasyonunda İstatistiksel Metotlar, Lisans tezi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, 108s.
- Zhang, T., Zhao, B. and Wang, J.,** 2006, Mathematical models for macro-scale mass transfer in airlift loop reactors, *Chemical Engineering Journal*, 119: 19-26.
- Znad, H., Bales, V. and Kawase, Y.,** 2004, Modelling and scale up of airlift bioreactor, *Computers and Chemical Engineering*, 28: 2765-2777.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Mersin'de doğan Emrah ÖZCAN, ilk ve orta öğrenimini Mersin'de tamamlamıştır. 2011 yılında Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nden mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmalarına başlamıştır. 2012 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atanmış ve halen orada çalışmalarına devam etmektedir.

