

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KO-KÜLTÜR YÖNTEMİ
İLE PULLULAN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİLARA İTİK**

Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Programı: : Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

Manisa 2013

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KO-KÜLTÜR YÖNTEMİ
İLE PULLULAN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİLARA İTİK**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:

Tezin Savunulduğu Tarih : 18 Haziran 2013

Tez Danışmanı : Yrd. DoÇ. Dr. Uğur SİDAL

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ

Yrd. DoÇ. Dr. Fulya OCAK

Manisa 2013

İÇİNDEKİLER	Sayfa
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
ÇİZELGELER LİSTESİ	VII
GRAFİKLER LİSTESİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
1.GİRİŞ	1
 2. LİTERATÜR ÖZETİ	
2.1. Pullulanın Özellikleri Ve Kullanım Alanları	2
2.2. Mikroorganizmalar ve Özellikleri	8
2.2.1. <i>Aureobasidium pullulans</i>	10
2.2.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	14
2.3. Parametreler	15
2.3.1. Karbon Kaynağı	16
2.3.2. Azot Kaynağı	21
2.3.3. pH Kaynağı	22
2.3.4. Oksijen Kaynağı ve Havalandırma	24
2.3.5. Sıcaklık	26
2.4. Pullulanın Elde Edilmesi	29
 3. MATERYAL VE YÖNTEM	
3.1. Materyal	
3.1.1. Mikroorganizma	31
3.1.2. Substrat	31
3.2. Metotlar	
3.2.1. Substratların Hazırlanışı	32
3.2.2. DNS Hazırlanışı	32
3.2.3. Pullulan Üretimi	33
3.2.4. Analiz Yöntemleri	34
3.2.4.1. Kuru Hücre Ağırlığı	34
3.2.4.2. Mikrobiyal Polisakkarit	34

3.2.4.3. Pullulan Tayini	35
3.2.4.4. İndirgenen Şeker	35
3.2.4.5. pH	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. İnkübasyon Sürelerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi	38
4.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi	40
4.3. Farklı pH Değerlerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi	41
4.4. Substrat Konsantrasyonunun Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi	43
4.5. İnokulum Miktarlarının Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi	45
4.6. Farklı Azot Kaynaklarının Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi	46
4.7. Nitrojen Kaynağı Konsantrasyonunun Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi	47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	50
6. KAYNAKLAR	55

ÖZET

Pullulan, kimyasal yapı olarak başlıca α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinden oluşan bir glukandır. Endüstriyel açıdan öneme sahip olan bu homopolisakkarit, polimorfik bir küf olan *Aureobasidium pullulans* tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir. Pullulan biyopolimeri, biyolojik olarak parçalanabilen, yağa dirençli, sıcaklıktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermektedir ve suda çözünebilmektedir. Pullulan, bu özelliklerinin sonucunda yenilebilen filmlerin üretiminde kullanılmak için oldukça uygun bir polisakkarittir. Pullulan yenilebilen filmlerin üretiminin yanı sıra gıda, ilaç ve kozmetik gibi birçok alanda da kullanılabilir. Bu çalışmada *Aureobasidium pullulans* ve *Kluyveromyces marxianus* suşlarından pullulan üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla suşların besiyerinde üremeleri ve pullulan üretme yetenekleri ve aktivite gösterdiği optimum sıcaklık, pH, inokulum oranları saptanmıştır. NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kalsiyum nitrat ve üre en iyi azot kaynağı belirlenmek için test edildi. En iyi azot kaynağının NH_4Cl olduğu belirlendi. Pullulan üretimi için fermentasyon şartları optimize edildi. Pullulan miktarının belirlenmesinde DNS yöntemi kullanıldı. Optimum fermentasyon şartları üretim süresi 3 gün, substrat konsantrasyonu 5 %, pH 7.5 ve üretim sıcaklığı 28°C olarak saptandı.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal polisakkarit, Pullulan, *Aureobasidium pullulans*, *Kluyveromyces marxianus*, Yenilebilir film

ABSTRACT

Pullulan is an -glucan consisting mainly of maltotriose units interconnected via – 1,6 linkages. Pullulan is an extracellular polysaccharide produced by the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. It can be extruded easily as films that are biodegradable, is resistant to oils and grease, unaffected by temperature, impermeable to oxygen, nontoxic and therefore edible. Pullulan is a suitable polysaccharide due to its good-film-forming properties for production of edible protective films. Besides its applications in the edible film industry, pullulan has numerous applications in food, cosmetics and pharmacological industries. In this study, pullulan from *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces marxianus* strains was produced and characterized.

The strains were tested for determination of temperature, pH range and inoculum concentration for growth and pullulan production on plate. NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, calcium nitrate and urea were tested to determine the best nitrogen source. NH_4Cl was determined as the best nitrogen source. DNS method was used in determining the amount of pullulan. The optimum fermentation conditions were found to be incubation period of 3 days, substrate concentration of 5% and incubation temperature at 28°C pH 7.5

Key Words: Microbial polysaccharide, Pullulan, *Aureobasidium pullulans*, *Kluyveromyces marxianus*, Edible film

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca derin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve beni her zaman teşvik eden değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Uğur SİDAL’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında bilgisinden ve yayınlarından yararlandığım ve bana her konuda destek olan Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Doç. Dr. Yekta GÖKSUNGUR ve doktora öğrencisi Seval DAĞBAĞLI’ya, hayatımın her aşamasında sınırsız maddi ve manevi desteklerini sunan aileme içtenlikle teşekkür ederim.

DİLARA İTİK

MANİSA 2013

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa
2.1. Pullulanın Kimyasal Yapısı	3
2.2. Maya Hücrelerinin Tomurcuklanarak Bölünmesi	9
2.3. <i>Aureobasidium pullulans</i> Kolonileri	10
2.4. <i>Aureobasidium pullulans</i> 'ın morfolojik formları	12
2.5. <i>Kluyveromyces marxianus</i> Kolonileri	15
3.1. Üretim ortamlarında <i>Aureobasidium pullulans</i> ve <i>Kluyveromyces marxianus</i> suşlarının geliştirilmesi	33
3.2. Çalışmada Kullanılan Çalkalamalı İnkübatör ve Spektrofotometre	34
3.3. Mikrobiyal polisakkarit üretim şeması	36
A.1. İndirgen şeker analizi absorbans-konsantrasyon grafiği	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

2.1. Pullulan'ın Başlıca Nitelikleri	5
2.2. Pullulanın Kullanım Alanları	6
2.3. Pullulanın Gıdalarda Kaplama Maddesi Olarak Kullanımına Ait Örnekler	7
2.4. Şeker Pancarı ve Kamışı Melaslarının Ortalama Bileşimleri	22
4.1. Farklı İnokulum Saatlerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	37
4.2. Farklı İnokulum Oranlarının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	45
4.3. Farklı Azot Kaynaklarının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	46
4.4. Nitrojen Kaynaklarının Farklı Oranlarının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	48
5.1. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	50
5.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	51
5.3. Farklı pH Değerlerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	52
5.4. Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	52

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

4.1. Farklı İnkübasyon Sürelerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	38
4.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	40
4.3. Farklı pH Değerlerinin Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	41
4.4. Farklı Substrat Konsantrasyonlarının Kullanılmasıyla Elde Edilen Sonuçlar	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
µl	: Mikro litre
µm	: Mikro metre
µg	: Mikro gram
g	: Gram
l	: Litre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
N	: Azot
P	: Fosfor
S	: Kükürt
Mg	: Magnezyum
K	: Potasyum
Fe	: Demir
Zn	: Çinko
C	: Karbon
O	: Oksijen
S	: Kükürt
UV	: Ultraviyole
°C	: Santigrad derece
N	: Normalite
M	: Molarite
α-	: Alfa
β-	: Beta
Co	: Company (Şirket)

Ltd	: Limited
%	: Yüzde
>	: -den büyük
kDa	: Moleküler ağırlık
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
NH ₄	: Amonyum
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
NH ₄ Cl	: Amonyum klorür
K ₂ HPO ₄	: Potasyum di-hidrojen fosfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat-7 sulu
NaCl	: Sodyum klorür
KCl	: Potasyum klorür
Na-K	: Sodyum-potasyum
NaOH	: Sodyum hidroksit
DNS	: Dinitrosalisilik asit
v/v	: Volume to volume (hacim)
g	: Santrifüj döndürme hızı
rpm	: Revolutions per minute (karıştırma hızı)
vvm	: Vessel volumes per minute (havalandırma hızı)
PDA	: Patato Dextrose Agar
YM	: Yeast malt

1.GİRİŞ

Mikrobiyal hücre dışı ürünlerin üretilmesi, birçok bitkisel gıdanın aksine, kontrol edilebilen miktarlarda olmakta ve mevsimsel değişikliklerden etkilenmemektedir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından farklı özellikte hücre dışı polisakkaritler üretilmektedir [39].

Mikroorganizmaların ürettiği hücre dışı polisakkaritler, tek çeşit monomerden meydana gelerek homopolisakkaritleri oluştururken, kimyasal olarak farklı monomerlerden meydana geldiklerinde heteropolisakkaritler olarak adlandırılmaktadırlar. Üretilen polisakkaritler kimyasal yapılarına göre α - ve β - glukozlar olarak tanımlanmaktadır. Bunların bazıları, jel oluşumu ile veya akış karakterlerini değiştirerek çözeltilerin reolojik özelliklerini değiştirebilme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle sanayide birçok uygulama alanları bulunmaktadır [39].

Pullulan, kimyasal yapı olarak başlıca α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinin yanı sıra az sayıda da maltotetroaz ünitelerinin bulunduğu bir glukandır. Endüstriyel açıdan ilgi çeken ve ekonomik öneme sahip olan bir homopolisakkarittir ve maya özellikleri gösteren bir küf olan *Aureobasidium pullulans* tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir [32].

Pullulan biyopolimeri, biyo-indirgen, yağa dirençli, sıcaktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermektedir ve suda çözünmektedir. Pullulan, bu özelliklerinin sonucunda yenilebilen filmlerin üretiminde kullanılmak için oldukça uygun bir polisakkarittir. Ayrıca, pullulan yenilebilen filmlerin üretiminin yanı sıra pek çok alanda kullanılabilmektedir [10, 15].

Pullulanın kullanım alanları arasında gıda, ilaç, kozmetik gibi birçok sanayi dalı bulunmaktadır. Özellikle gıda sanayide, gıda kaplama ve paketlenme maddesi olarak kullanılması, düşük kalorili gıda formülasyonlarında nişasta yerine kullanılabilmesi, aroma ve baharatlar için mikroenkapsüle ajan olarak kullanılabilmesi gibi çok önemli kullanım alanları bulunmaktadır [39].

Pullulan, Hayashibara Biochemical Co. (Japonya) ve Shanghai Pua Biotech Co., Ltd. (Çin Halk Cumhuriyeti) tarafından hidrolize nişasta substratı kullanılarak endüstriyel ölçekte üretilmektedir [39].

Pullulan üretimi konusunda birçok farklı karbon kaynağı kullanılarak çalışmalar yapılmış ve en iyi sonuçların sakkaroz ile elde edildiği belirlenmiştir [39].

Kluyveromyces marxianus tarafından salınan inülinaz enzimi ile parçalanın inülin soğan, sarımsak, pırasa, hindiba ve enginar gibi birçok sebze de bulunan bir fruktoz oligomeridir.

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak yapılan bu çalışmada inülin içeren üretim ortamı substrat olarak kullanılarak *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının co-culture yöntemi ile pullulan üretimi incelenmiştir. Öncelikle çalkalamalı kültür kullanılarak en iyi üretimin elde edildiği optimum koşullar belirlenmiştir. Daha sonra *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile belirlenmiş optimum koşullarda üretilen en yüksek pullulan miktarları karşılaştırılmıştır. *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının co-culture yöntemi ile pullulan üretiminin, *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile pullulan üretimini nasıl etkilediği belirlenmiştir.

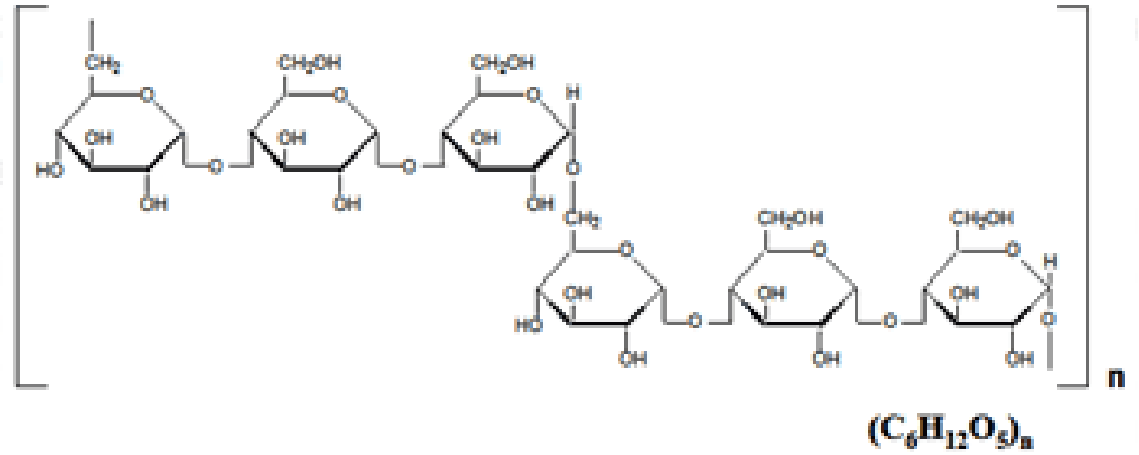
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Pullulanın Özellikleri ve Kullanım Alanları:

Farklı yapısal özelliklere ve karmaşıklığa sahip hücre dışı polisakkaritlerin, birçok mikroorganizma tarafından üretildiği bilinmektedir. Mikroorganizmaların ürettiği hücre dışı polisakkaritler, tek çeşit monomerden meydana gelerek homopolisakkaritleri oluştururken, kimyasal olarak farklı birkaç çeşit monomerden meydana geldiklerinde heteropolisakkaritler olarak adlandırılmaktadır. Bu hücre dışı polisakkaritlerin bazıları, jel oluşumu ile veya akış karakterini değiştirerek çözeltilerin reolojik (sıvı özellikleri) özelliklerini değiştirebilme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle sanayide birçok uygulama alanları vardır [39].

Pullulan, endüstriyel açıdan ilgi çeken ve ekonomik öneme sahip olan bir homopolisakkarittir ve maya özellikleri gösteren bir küf olan *Aureobasidium pullulans* tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir. Ancak son zamanlarda, pullulanın bir maya olan *Rhodotorula bacarum* tarafından da üretilbildiği belirlenmiştir [39].

Pullulan, kimyasal yapı olarak başlıca α -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinin yanı sıra az sayıda da maltotetroaz ünitelerinin bulunduğu bir glukandır [37]. α -1,4 ve α -1,6 bağlarının düzenli değişimi yapısal elastikiyet ve yüksek çözünürlüğe neden olmaktadır (Wu ve ark., 2009; Chi ve ark., 2009) [40].



Şekil 2.1. Pullulan'ın kimyasal yapısı (Anon, 2007) [41]

Pullulanın ortalama molekül ağırlığı, kullanılan suşa ve kültür ortamına bağlı olarak $5 \cdot 10^3$ - $2 \cdot 10^6$ Da arasında değişmektedir. Kullanılan ortam ve inkübasyon koşullarına bağlı olarak molekül ağırlığı bakımından çok büyük farklılıklar göstermesine karşın pullulan biyopolimeri endüstriyel ilginin odağında olmuştur. Biyo-indirgen, yağa dirençli, sıcaklıktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermekte ve bu nedenle de yenilebilir filmlere kolayca dönüştürülebilme özelliği göstermektedir [10, 15].

Pullulanın bazı özellikleri şunlardır:

- Çözünürlük; Pullulan soğuk ve sıcak suda çözülebilirken, organik çözügenlerde çözülmez. Çözeltileri düşük viskoziteye sahiptir, bu yüzden çalışılması kolaydır.
- Viskozite Stabilitesi; Yüksek moleküler ağırlık ve konsantrasyonlarda çözeltinin viskozite değeri artmakta, ancak bu artış sınırlı kalmaktadır.
- Yapıştırma Gücü; Kağıt, tahta ve metallerin çok iyi bir şekilde yapışmasını sağlamaktadır.
- Çevreye Uyumlu Olması; Çeşitli küf ve bakteriler tarafından tamamı indirgenemediği için kirliliğine neden olmamaktadır.
- Film Oluşturabilme Özelliği; Su ilave edildikten sonra basınç altında ısıtılırsa, yenilebilir filmlerin üretiminde kullanılabilen; saydam, yağa dirençli, oksijen geçirmeyen, parlak ve elastik ürünlere dönüştürülebilmektedir.
- Kaplama Maddesi; Bir gıda pullulan çözeltisine daldırılıp, kurutulursa stabil şekilde, kolayca kaplanmış olur. Bu şekilde kaplanmış gıdalar, parlak bir yüzey özelliği gösterirler ve bu parlaklık uzun süre dayanır. Bu özellik, kurutulmuş balık ve kabuklular gibi aromanın yanında yüzey parlaklığının da önemli olduğu gıdaların işlenmesinde yararlı olabilir. Toz çorbalar, kahve, köri ve çeşitli baharatları içeren liyofilize gıdalar pullulan ile kaplandığı zaman, aroma ve görünüşleri uzun süre korunabilmektedir.
- Düşük Oksijen Geçirgenliği; Pullulan filmlerin, düşük oksijen geçirgenliği oksidasyonu önlemekte, aroma ve tazeliğin korunmasını sağlamaktadır.
- Nişasta Yerine Kullanılabilme; Gıdalarda nişasta yerine kullanılabilmektedir. Vücutta düşük sindirilme özelliği, düşük kalorili gıda formülasyonlarında kullanılması için uygundur. Mükemmel su tutma özelliği, gıdaların bağlanma kuvvetini artırır ve

nişastadaki aşırı kuruma ya da bozulma önlenerek, koruma kalitesi geliştirilir. Ayrıca, pullulan doygunluk hissi vermektedir [10, 37, 44].

Çizelge 2.1. Pullulan'ın başlıca nitelikleri [10]

Parametre	Özellikleri
Görünüm	Beyaz yada sarımsı-beyaz toz
Suda çözünürlülüğü (25°C)	Kolay çözünür
Spesifik görüş aktivitesi [α]D ₂₀ (suda % 1)	Minimum + 160°
Polipeptidler (%)	Maksimum 0.5
Solüsyon pH'ı	5-7
Kalıntı mineral (%)	Maksimum 3
Nem (kurutmadaki kayıp, (%))	Maksimum 6
Moleküler ağırlık (kDa)	100-250

Pullulan sahip olduğu özellikler nedeniyle endüstriyel açıdan ilgi çeken bir biyopolimerdir ve sanayide birçok alanda kullanılabilmektedir. Pullulanın gıda sanayindeki kullanım alanları arasında; gıda kaplama ve paketlenme maddesi olarak kullanılması ve düşük kalorili gıda formülasyonlarında nişasta yerine kullanılabilmesi sayılabilir. Ayrıca aroma ve baharatlar için mikroenkapsüle ajan olarak da kullanılabilmektedir [17].

Pullulan ilaç endüstrisinde de tabletler için kıvam arttırıcı ajan olarak ve oksidasyonu önleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Pullulanın toksik olmaması, immunojenik özelliğinin olmaması ve biyolojik olarak parçalanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle tıbbi görüntüleme ve kontrollü ilaç salınımı gibi biyomedikal alanda da kullanım olanakları vardır [10, 15].

Çizelge 2.2. Pullulanın kullanım alanları [10]

SANAYİ KOLU	KULLANIM ALANLARI
Gıda sanayisi	• Gıdalarda kaplama maddesi • Yenilebilen film üretimi • Düşük kalorili gıda formülasyonlarında nişasta yerine • Gıda katkı maddesi • Aroma ve baharatlar için mikroenkapsüle ajan
İlaç sanayisi	• İlaçlar için kaplama ve paketleme maddesi • İnfüzyon sıvısı • Tabletler için kıvam arttırıcı ve stabilizatör ajan • Tabletler için oksidasyonu önleyici ajan
Kozmetik sanayisi	• Kozmetik emülsiyonları
Diğer	• Kan plazması yerine • Dielektrik materyali • Yapıştırıcı • Naylon elastikiyetinde konstrüksiyon materyal lifi • Gübrelerde suda çözünmeyi arttırıcı madde • Floküle edici ajan

Pullulanın kullanım alanlarından bazıları çizelge 2.2’de topluca verilmiştir. Pullulanın diğer uygulama alanları ise kağıt endüstrisinde, kozmetik emülsiyonlarında, floküle edici ajan olarak, gübrelerde suda çözünmeyi arttırıcı ajan olarak, polivinil alkole benzer fakat biyo-indirgen olmasının yanında birçok açıdan çok daha üstün özellikte filmler olarak, yapıştırıcı olarak, esterifikasyondan sonra naylon dayanıklılığında ve elastikiyetinde konstrüksiyon maddesi lifi olarak sayılabilir [33, 43].

Kurutulmuş pullulan tozu beyazdır ve soğuk veya sıcak suda kolayca çözünebilir. Pullulan filmler- 5-60 µm kalınlığında, renksiz, saydamdır. Mekanik özellikleri iyidir ve oksijen geçirgenliği azdır. Bu filmler boya ile renklendirilip, aroma eklenerek, gıdaya albeni kazandırmak amacıyla kullanılabilirler [10].

Pullulan film üzerine yapılan çalışmaların birçoğu gıda uygulamalarından çok mekanik özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu kapsamda yapılan farklı çalışmalarda, plastikleştiricilerin polimer zinciri üzerine etkileri incelenmiştir [10, 19].

Çizelge 2.3. Pullulanın gıdalarda kaplama maddesi olarak kullanımına ait örnekler

Materyal ve Uygulaması	Kaplama İşlevi
Pullulan	Oksijen Bariyeri
Yerfıstıkları, eriştelere	Oksijen Bariyeri
Kurutulmuş şekerlemeler	Oksijen Bariyeri
Sardalyalar ve et ürünleri	Mekanik zararlıların azaltılması
Kurutulmuş sebzeler	Oksijen Bariyeri

Kandemir ve arkadaşları, *A.pullulans* fermentasyonu saonucu % 59 saflıkta elde ettikleri pullulandan antimikrobiyal film üretimi üzerinde çalışmışlardır. Pullulan kaynaklı film içerisinde lizozim, EDTA ve sakkaroz eklenmesinin lizozim aktivitesi ve filmin mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. EDTA eklenmiş filmin *Escherichia coli* üzerinde etkili olduğu belirtilirken, kullanılan lizozim konsantrasyonun *Lactobacillus plantarum* üzerinde etki göstermediğini bulmuşlardır [18, 19].

Kandemir, lizozim ve EDTA içeren yenilebilir pullulan filmin hazır marul salatası ve kesilmiş salatalık üzerine etkilerini araştırmış ve antimikrobiyal madde içeren kaplama uygulamasının hazır salata örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine olumlu bir etkisi olmamasına rağmen mikrobiyolojik kalitenin korunmasında etkili olduğunu belirlemiştir [18, 19].

Göksungur ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, orta nemli hale getirilmiş kayısı, incir ve domates örnekleri, fermentasyon prosesi ile elde edilen pullulan film ve antimikrobiyallerin farklı kombinasyonları ile kaplanmış, depolama süresince mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal değişimleri analiz edilerek kontrol örnekleriyle

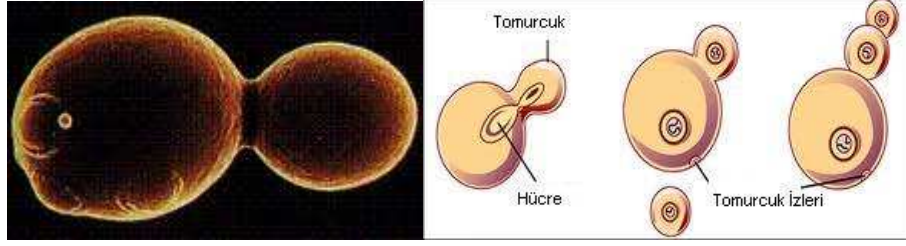
karşılaştırılmıştır. Antimikrobiyal içeren yenilebilir pullulan filmin, orta nemli ürünlerin raf ömrü ve kalite kriterleri üzerine etkileri iki farklı depolama sıcaklığında (+4°C ve +20°C) incelenmiştir. Kaplama işleminin nem kaybı ve renk üzerine depolamanın başlangıcında etkili olduğu (ilk 4 aya kadar) ancak ilerleyen depolama süreci içerisinde örneklerin araştırılan özellikleri üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Değişik koruyucular içeren pullulan fimler ile kaplamanın örneklerin mikrobiyolojik kalitesine etkilerinin örnekten örneğe değiştiği, ancak genel olarak kaplamaların antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yaptıkları çalışmada *A.pullulans* P56 suşundan fermentasyon yolu ile üretilen pullulanın akut toksisitesini araştırmak amacıyla medyan letal doz (LD50) tayin edilmiş ve pullulanın mutajenik/karsinojenik etki potansiyeli olmadığı bulunmuştur [16].

2.2. Mikroorganizmalar ve Özellikleri:

Endüstriyel mikrobiyolojide kullanılan başlıca organizmalar, funguslar (mayalar ve küfler) ve özellikle *Streptomyces* cinsinin üyeleri olmak üzere bazı prokaryotlardır. Endüstriyel mikroorganizmalar, bir veya daha fazla ürünü yüksek verimde sentezleyebilen metabolik uzmanlardır. Bu yüksek metabolik uzmanlığı sağlamak için, bilim adamları çoğu kez, endüstriyel mikroorganizma soylarını mutasyon veya rekombinasyonla genetik olarak değiştirirler. Bu değişiklikler, belirli bir organizmanın üretebildiği özel ürünün veriminin artışı sağlar.

Biyokatalitik işlemlerde kullanılan bütün mikroorganizma soylarının esas kaynağı doğadadır. Bununla birlikte, güncel endüstriyel soylar, ilk izole edilmiş yabani tipten çok farklıdır. Yararlı endüstriyel mikroorganizmalar geliştirildikten sonra, yüksek verimli soylar endüstrinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında muhafaza edilirler.

Mayalar tek hücreli fungus olup çoğu *Ascomycetes*'lere dahildir. Maya hücreleri küre biçimli, oval veya silindirik olup hücre bölünmesi tipik olarak tomurcuklanma ile olur. Tomurcuklanma olayında yeni bir hücre eski hücrenin dışı doğru büyümüş küçük bir yapısı olarak başlar; tomurcuk gittikçe büyür ve daha sonra ayrılır. Her ne kadar mayaların çoğu tek hücre olarak çoğalırlarsa da bazı mayalar filamentlerde oluşturabilir. Bu türlerde bazı özellikler sadece filamentli form tarafından ifade olunabilir.



Şekil 2.2. Maya hücrelerinin tomurcuklanarak bölünmesi

Maya hücreleri tipik olarak bakteri hücrelerinden çok daha büyüktür ve bu büyüklükleri sayesinde nükleus gibi büyük hücre içi yapılara sahip olmalarından dolayı mikroskopta bakterilerden kolayca ayırt edilebilirler.

Bircok maya türü anaerobik koşullarda rahatlıkla gelişebilir. Mayalarda üreme, katı yüzeylerde yayılma veya penetre olma şeklindedir. Mayalar bakterilere göre daha yavaş ürerler ve bundan dolayı bakteri üremesine uygun nötrale yakın pH veya yüksek sıcaklığa sahip çevre koşullarında bakteriler kadar rekabetçi değildirler.

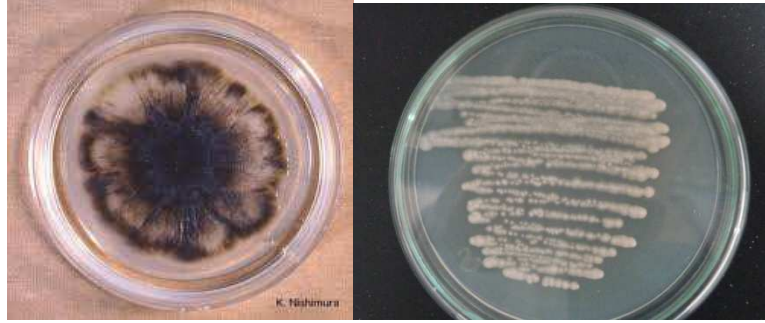
Mayaların üreyebileceği tam bir ortam hazırlamak için fosfor kaynağı, azot ve kükürt kaynağı eklenir. Üreme periyodu sonunda, maya hücreleri kültürden santrifüj edilerek elde edilir. Daha sonra hücreler su ile sulandırılarak yıkanır ve açık renge gelene kadar tekrar santrifüj edilir.

Mayalar meyve, çiçek ve ağaç kabukları gibi şeker bakımından zengin habitatları tercih ederler. Çoğu maya hem tamamen aerobik hem de fermentatif metabolizma yapma yeteneğindedir.

2.2.1. *Aureobasidium pullulans*:

Pullulan üretiminde genellikle *Aureobasidium pullulans* adı verilen küf kullanılmaktadır. *Aureobasidium pullulans*'ın ürettiği hücre dışı polisakkaritlerin kimyasal yapıları kullanılan substrata ve mikroorganizma suşuna göre değişmektedir [37].

Genellikle, bu mikroorganizmanın kültürleri ve kültürlerin çevresi fotooksidasyondan korunmak için, ışığa karşı sentezlenen melanin pigmenti nedeniyle siyah-yeşil görünmektedir [39].



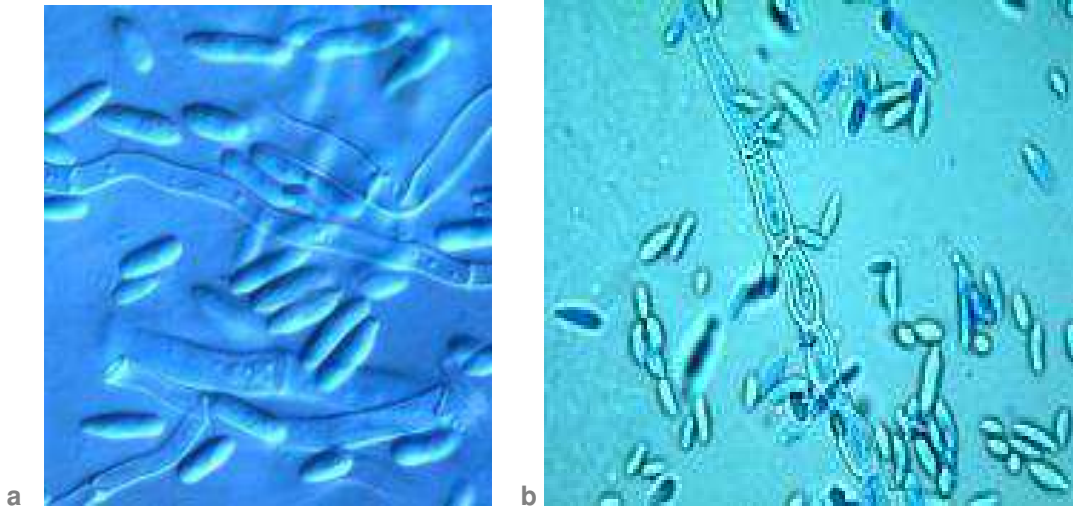
Şekil 2.3 (a ve b). a) *Aureobasidium pullulans* melanin üreten suş b) Mutant (melanin üretmeyen) *Aureobasidium pullulans* P56 suşu

Aureobasidium pullulans suşları arasında kültür özelliği bakımından çok büyük farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca bu organizma kültür koşullarına bağlı olarak maya özellikleri gösteren hücrelerden, çok hücreli filamentlere ve klamidosporelere kadar değişen farklı formları içeren karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir [35].

A.pullulans'ın sahip olduğu morfolojik form, pullulan üretimindeki önemli faktörlerden biridir. Bu mikroorganizmanın morfolojisi pH, azot kaynağı ve konsantrasyonu, çözünmüş oksijen gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle hangi morfolojinin ve hangi koşulların pullulan üretiminde etkin olduğu ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmıştır.

Pullulan sentezinde *A.pullulans*'ın hangi morfolojik formunun rol oynadığı ile ilgili olarak Simon ve arkadaşları tarafından (1993) yapılan çalışmada polimorfik bir küf olan *A.pullulans*'ın hif, blastospor, klamidospor ve şişmiş hücreleri içeren bir yaşam döngüsü ile pullulan ürettiği belirtilmiştir. Buna göre klamidosporlar, pullulanın sentezlenmesinden sorumludur. Şişmiş hücreler (maya formundaki hücreler) ise diğer polisakkaritleri üretmekle sorumludur. Ancak hücre, kültür koşullarına bağlı olarak klamidospora dönüşürse, polisakkaritlerin pullulana dönüşümü mümkündür. Hifler ise hücre dışı polisakkaritlerin oluşumunda her hangi bir rol oynamamaktadır [35].

Pullulan biyopolimerinin başlıca hangi morfolojik form tarafından sentezlendiği ile ilgili geniş çaplı bir araştırma da Catley (1979, 1980) tarafından çalkalamalı kültür kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada, fermentasyon sırasında değişik zaman aralıklarında maya formları mekanik yöntemle misel formlarından ayrılmıştır. En yüksek pullulan üretiminin maya formlarıyla, en düşük pullulan üretiminin ise misel kısımla elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca pullulan sentezinin hücre gelişiminin erken aşamaları sırasında en aktif durumda olduğu belirlenmiştir [39].





Şekil 2.4. *A.pullulans*'ın morfolojik formları: a-b) *A.pullulans*'ın hif ve spor yapısı, c) *A.pullulans*'ın klamidosporeleri, d) Genel *A.pullulans*'ın şekli (Anon, 2007). [41]

McNeil ve arkadaşları (1989) tarafından sürekli yöntem kullanılarak yapılan çalışmada optimum pullulan üretiminin ve veriminin pH 4,5'te hücre popülasyonunun yaklaşık %50'si maya özellikleri gösteren formdan ve %50'si de filamentlerden meydana geldiğinde elde edildiği belirtilmiştir. Ayrıca Roukas ve Mantzouridou (2001) misel ve maya özellikleri gösteren hücrelerin pullulan üretiminden sorumlu olan morfolojik formlar olduğunu saptamışlardır. En yüksek polisakkarit konsantrasyonunun, toplam biyomasın %60'ı misel formdan %40'ı ise maya formundan oluştuğunda elde edildiği belirtilmiştir [39].

pH'nın *A.pullulans* 'ın morfolojisi üzerindeki etkileri ile ilgili olarak yapılmış çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Heald ve Kristiansen (1985) tarafından yapılan çalışmada *Aureobasidium pullulans*'ın maya özellikleri gösteren formlarının pullulan üretimindeki başlıca ajanlar olduğu gözlenmiştir. pH'nın, erken büyüme evresindeki maya formlarının

oranını etkilediği, dolayısıyla da pullulan üretimine etki ettiği, ancak üretilen toplam biyomas miktarının değişmediği ifade edilmiştir. Maya formlarının oranı pH ile artmakta, pH 6,3'te en yüksek, pH 3,5'te ise en düşük olmaktadır [39].

Kesikli kültürle aspiratör şişe kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ortam pH 6.0'da tutulduğunda maya formlarının, pH 2.7'de ise misel formlarının baskın olduğu belirtilmiştir. pH başlangıçta 6.0 iken, fermentasyon sırasında 2.7'ye düşmesine izin verildiğinde ise pullulan üretiminin pH 6.0'dakinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir [29, 39].

Hücre morfolojisini, aşının miktarıyla kontrol etmek konusunda yapılan bir çalışmada, düşük miktarda aşının özellikle miselyum oluşmasını sağlarken, yüksek miktardaki aşının blastospor oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir [31, 37].

Azotun hücre morfolojisi üzerindeki etkileri konusunda da yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Azot kaynağının hücre morfolojisi üzerinde çok önemli bir etkisinin olduğu belirtilmiştir. NH_4^+ iyonunun, filament ve tek hücrelerin heterojen popülasyonunu desteklediği, nitratın ise blastosporların lehinde misel oluşumunu baskıladığı ifade edilmiştir [37, 39].

Bermejo ve diğerleri (1981) hem azotun kısıtlandığı koşullarda hem de kısıtlanmadığı koşullarda tek hücrelerin klamidospore dönüşüğünü savunmuştur. Ancak Gadd (1990) tarafından yapılan çalışmada melanin üretiminin ve klamidospor oluşumunun sadece azotun kısıtlandığı koşullarda gerçekleştiği ifade edilmiştir. Gadd ve Copper (1984), çalışmalarında kullandıkları suşta misel oluşumunun NH_4^+ iyonunun varlığında gerçekleştiği gözlemlemiş, maya ekstratının da misel oluşumunda etkili olduğunu belirlemişlerdir [37].

Literatürdeki farklı sonuçlar suş çeşitliliğine dayanmaktadır. Ayrıca birçok çalışmada çalkalamalı kültür kullanılmasından kaynaklanan bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Çalkalamalı kültürde, kültür pH'sının, azot ve oksijen konsantrasyonlarındaki değişimin belirlenmesi ve kontrol edilmesi oldukça zordur. Bu faktörlerin kültür morfolojisi üzerinde çok büyük etkileri olduğu düşünüldüğünde, bu doğrultuda yapılan çalışmaların sonuçlarının yorumlanması oldukça zordur.

Aureobasidium pullulans aynı anda birden fazla yerde bulunan bir fungustur, çoğunlukla ekolojik örneklerden izole edilir [26, 31]. Özellikle su ve toprakta, özellikle çürük yaprak, çöp yığını, tahta, odun ve birçok bitki materyali üzerinde koloniler oluşturarak saprofit olarak bulunur. *Aureobasidium pullulans* çoğunlukla bitki patojeni (özellikle üzüm) olarak bilinir. Çürük meyvelerin ve diğer ekinlerin hasat sonrasında önemlidir [26, 31].

2.2.2. *Kluyveromyces marxianus*:

Kluyveromyces cinsinde bulunan birçok maya türü 1900'lü yılların başlarında tanımlanmıştır. Bunlar arasında *Kluyveromyces lactis*, *K. fragilis*, *K. thermotolerans*, *K. drosophilarum*, *K. waltii* sayılabilir [21].

Kluyveromyces cinsi taksonomide *Ascomycota* filumunda yer almaktadır. *Saccharomycetes* sınıfının *Saccharomycetaceae* familyasına dahildir. *Kluyveromyces* cinsi oldukça heterojen olup, bugüne kadar 16 türü tanımlanmıştır [11].

Kluyveromyces cinsi mayalar vejetatif olarak ürerler ve aseksüel üremeleri multilateral tomurcuklanma ile olur. Bu cinse ait türler küresel, oval veya uzanmış hücre şekillerine sahip olabilirler [11, 20]. Diploid olan *Kluyveromyces* türleri spor oluşturabilirler. Bu mayalarda gerçek hif oluşumu gözlenmez [20]. Doğal yaşam alanları çeşitli olabilir, meyvelerde ve süt ürünlerinde bulunabilirler.

Deak ve Beuchat (1996) süt ve süt ürünlerinden ve fırıncılık ürünlerinden hamurdan *Kluyveromyces marxianus* türünü izole etmiştir [4].

Kluyveromyces'un türe göre değişen 6-12 arasında kromozomu bulunmaktadır. *Kluyveromyces marxianus*'un 10 kromozomu vardır ve genom büyüklüğü 14Mb'dir [22].

Kluyveromyces marxianus homotalik, hemiaskomiset maya olarak tanımlanır. *Kluyveromyces marxianus* biyoteknolojik uygulamalar için tercih edilen bir türdür. Çünkü *Kluyveromyces marxianus* laktoz, polifruktosani ve inülini fermente edebilir, hızlı gelişim

oranı vardır, tipik jenerasyon süresi yaklaşık 70dk, termotolerant, 52°C'ye kadar gelişim gösterebilir. Hayvan besini ve laktoz kaynağı olarak kullanılır. Doğal kakao fermentasyonunda kullanılabilir. Pek çok enzim için kaynak olabilir ve klonlama teknolojisinde kullanılabilir. *Kluyveromyces* türleri, etanol ve yüksek fruktozlu şurupların eldesinde, polifruktan ve levanların hidrolizinde etkili inülinaz enzim kaynağıdır [4, 11].

Anderson ve arkadaşları (1986; 1988) öğütülmüş şeker kamışından 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişebilen termotolerant mayalar izole etmişlerdir. Çoğu izolatin *Kluyveromyces marxianus*'a ait olduğunu bildirmişlerdir. Hughes ve arkadaşları (1984) fermente pekmezden izole edilen *Kluyveromyces marxianus*'un 48°C'a kadarki sıcaklıklarda gelişebildiğini gözlemlemişlerdir. Vidal- Leira ve diğerleri (1979) *Kluyveromyces marxianus*'u maksimum sıcaklık değeri (Tmax) 24-48°C arasında olan mezofilik mikroorganizma olarak tanımlamışlardır [2]



Şekil 2.5. *Kluyveromyces marxianus* kolonileri

2.3. Parametreler:

Mikrobiyal hücre dışı ürünlerin üretim maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle mikrobiyal hücre dışı ürünlerin üretimini etkileyen çevresel faktörler üzerinde çalışmalar yapılarak hücre metabolizmalarının ve ürün veriminin optimize edilmesi gereklidir. Pullulan üretimine etki eden parametreler üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Pullulan sentezi için önemli olan başlıca parametreler; karbon kaynağı, azot konsantrasyonu, üretim ortamının pH'sı, oksijen konsantrasyonu ve sıcaklıktır.

2.3.1. Karbon Kaynağı:

Karbon kaynağı olarak, birçok şeker *A.pullulans* tarafından hücre gelişimi ve polisakkarit üretimi için kullanılabilmektedir. Bunlardan D-ksiloz, D,L-arabinoz, L-ramnoz, L-sorboz, D-galaktoz, sakkaroz, maltoz, sellobioz, trehaloz, laktoz, melibioz, rafinoz, melezitoz, inülin ve çözülebilir nişasta hücre gelişimi için kullanılabilmektedir. Pullulanın biyosentezi üzerinde yapılan çalışmalar ise *A.pullulans*'ın glukoz, fruktoz, ksiloz, galaktoz, arabinoz, ramnoz, maltoz, sakkaroz ve laktozu karbon kaynağı olarak kullanarak hücre dışı polisakkarit ürettiğini göstermiştir [9, 21].

En yüksek verim sakkaroz ve glukozdan elde edildiği için pullulan üretimi konusunda yapılan birçok çalışmada bu şekerler kullanılmıştır. Catley (1971) polisakkarit üretiminin kullanılan karbon kaynağından etkilendiğini ve en iyi sonuçların sakkaroz ile elde edildiğini belirtmiştir [39]. Schuster ve diğerleri (1993) sakkaroz, glukoz, fruktoz, laktoz ve ksiloz gibi farklı şeker kaynaklarını karşılaştırmışlar ve en yüksek pullulan üretiminin sakkaroz ile elde edildiğini belirlemişlerdir. Chul Sin ve arkadaşları (1987) ise pullulan üretiminin yüksek başlangıç sakkaroz konsantrasyonlarında inhibe olduğunu belirtmişlerdir [9, 37].

Pullulan üretiminde, hem sentetik ortam hem de pullulan üretimi için uygun oldukları belirlenen birçok endüstriyel atık (melas, deprotenize peynir suyu, biracılık atıkları) karbon kaynağı olarak kullanılabilmektedir. Endüstriyel atıkların kullanılması hem ekolojik açıdan hem de ekonomik açıdan avantajlı görünmektedir. Bu nedenle endüstriyel atıkların pullulan üretiminde üretim masraflarını azaltması umulmaktadır. Aynı zamanda biyodönüşüm açısından ekolojik ve ekonomik olarak umut verici bir yol olarak görülmektedir. Fakat değişik substratlar kullanılarak üretilen pullulan, saflığı açısından ve diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu durum fermentasyon için karbon kaynağı olarak endüstriyel atıklar kullanıldığında daha belirgindir. Bu özelliklerden bazıları, örneğin moleküler ağırlık, melanin pigmenti oluşumu, üretilen pullulan dışı polisakkaritler ve safsızlıklar, bu atıklardan pullulan üretiminin ticarileştirilmesi söz konusu olduğunda oldukça önemlidir [39].

Melas, şeker fabrikasyonu teknolojisinde mevcut teknik imkanlar ile sarf edilen emeği ve masrafı karşılayacak miktarda içinden kristal halde sakkaroz elde edilmeyen en son şuruptur. Şeker teknolojisinde işlenen pancara göre yaklaşık % 4-5 oranında melas elde edilir [12, 13].

Melasın bileşimi bitki türüne, mevsim ve toprak şartlarına, hasata, şeker rafinasyon işlemlerine ve melas depolama koşullarına bağlı olarak son derece değişkendir. Türkiye’de elde edilen melas, şeker pancarı melasıdır. Genel olarak pancar melası kamış melasına göre; azot, inorganik maddeler, potasyum ve kükürt içeriği açısından daha zenginken, kamış melasında ise fermente edilebilen ve fermente edilemeyen şekerler, fosfat ve biyotin içeriği daha fazladır. Pancar melası ve kamış melası arasındaki en önemli fark, pancar melasının daha fazla azot içermesi, kamış melasının ise daha fazla indirgen şeker içermesidir [12, 13].

Pancar ve kamış melalarının ortalama bileşimleri çizelge 2.2’de verilmektedir. Çizelge 2.4’de de görüldüğü gibi melasın son derece kompleks bir yapısı vardır. Melasta bulunan başlıca şeker sakkarozdur. Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, çözünür gamlar, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbonhidratlardır. Ayrıca mumsu maddeler, steroller ve pigmentler de az miktarda bulunur. Melasta bulunan azotlu maddeler amino asitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan azotlu maddeler betain ve glutamik asittir ve bu bileşikler melasın karakteristik koku ve lezzetinin büyük bir kısmını oluştururlar. Asetik asit, bütirik asit ve propiyonik asit melasta bulunan başlıca organik asitlerdir. Melasta % 4-11 arasında inorganik bileşikler vardır. Bunlardan başlıcaları potasyum, kalsiyum, magnezyum, sodyum, demir, sülfat, klorür ve fosfatlardır. Melasta biyotin, pantotenik asit, inositol, tiamin, riboflavin, nikotinik asit, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler vardır [12, 39].

Melasın endüstriyel fermentasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler de içerir. Kükürtdioksit, hidroksimetil furfural, potasyum imidodisulfonat, fenoller ve diğer bazı uçucu bileşikler bu tip maddelerdendir. Bu maddeler dışında bazı mineral maddelerin yüksek konsantrasyonları da inhibitör etki yapar [12].

Bileşen	Pancar melası	Kamış melası
Kuru madde, %	78-85	77-84
Toplam şeker, %	48-58	52-65
Sakkaroz, %	51	32
Glikoz, %	-	14
Fruktoz, %	-	16
Rafinoz, %	>1	-
Toplam azot, %	0.2-2.8	0.1-0.6
A- amino azot, %	0.36	0.03
Fosfor, P ₂ O ₅ , %	0.02-0.07	0.01-0.08
Kalsiyum, CaO, %	0.15-0.7	0.15-1.0
Magnezyum, MgO, %	0.01-0.1	0.25-0.8
Potasyum, K ₂ O, %	2.2-5.0	0.8-2.3
Çinko, Zn, µg/g	30-50	5-20
Toplam karbon, C, %	28-34	28-33
Toplam inorganik madde, %	4-11	3.5-7.5
Kükürt, SO ₃ , %	0.3-0.4	-
Biyotin, µg/g	0.01-0.13	0.9-1.8
Kalsiyum pantotenat, µg/g	40-100	16
Inositol, µg/g	5000-8000	2500
Tiamin, µg/g	1-4	-
Pridoksin, µg/g	2.3-5.6	-
Riboflavin, µg/g	0-0.75	-
Nikotinamid, µg/g	37-51	-
Folik asit, µg/g	0.21	-

Çizelge2.4. Şeker pancarı ve kamışı melaslarının ortalama bileşimleri (Burrows, 1970) [39].

Üretim ortamında yüksek konsantrasyonlarda ağır metallerin bulunması fermentasyon sırasında kritik problemlere neden olmaktadır. Ağır metaller mikroorganizmanın gelişmesini engeller, substratın pH'sını etkiler ve ürünün biyosentezi ile ilgili enzimlerin inaktivasyonuna neden olurlar. Bu nedenlerle, karbon kaynağı olarak melas

kullanıldığında mikrobiyal gelişimin sağlanabilmesi ve ürün veriminin artırılabilmesi için melasın bir takım ön işlemlerden geçirilmesi gereklidir.

Lazaridou ve diğerleri (2002) ve Roukas (1998), melastan pullulan üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarda ağır metallerin ve mikrobiyal gelişmeyi engelleyen diğer inhibitör maddelerin uzaklaştırılması ve pullulan üretiminin artırılması için melası katyon değiştirici reçine, sülfürik asit, trikalsiyum fosfat, potasyum ferrosiyaniür ve EDTA, sülfürik asit + aktif kömür ile muamele gibi bir takım ön işlemlerden geçirmişlerdir. Israilides ve arkadaşları (1994) *Aureobasidium pullulans* NRRLY-6220 suşunu kullanarak işlem görmemiş melasla elde edilen pullulan konsantrasyonunun çok düşük olduğunu belirtmişlerdir [23, 35].

LeDuy ve diğerleri (1983) hem glukozun hem de galaktozun *Aureobasidium pullulans* tarafından metabolize edilebilmesinden yola çıkarak süt fabrikalarının atık ürünü olan laktozun, pullulan üretiminde kullanılması üzerinde çalışmışlardır. Laktoz pullulan üretimi için zayıf bir substrat olarak belirtilmesine karşın, kültür adaptasyonu ya da karışık kültürlerin kullanılması gibi yöntemlerle, yüksek verimler elde edilmiştir [38]. LeDuy ve Boa (1983) tarafından, substrat olarak turba hidrolizatını kullanarak *Aureobasidium pullulans*'ın çeşitli suşları ile 12-14 g/l polisakkarit üretildiği ifade edilmiştir [39].

Chul Shin ve diğerleri (1989) başlıca karbon bileşeni inülin olan yer elmasından pullulan üretiminde *Aureobasidium pullulans* SH 8646 ve *Kluyveromyces fragilis*'in karışık kültürü kullanılmış ve 17,5 g/l polisakkarit üretilmiştir [9].

Kluyveromyces marxianus tarafından salınan inülinaz enzimi ile parçalanmış inülin soğan, sarımsak, pırasa, hindiba ve enginar gibi birçok sebze de bulunan bir fruktoz oligomeridir. Lifler sınıfına aittir ve fruktan olarak bilinir. İnülin, fruktoz birimlerini kapsayan polimerlerdir ve tipik olarak bir terminal glukozu sahiptir. İnülindeki fruktoz birimleri beta – (2-1)- glikosidik bağlarıyla bağlanırlar. Oligo ve polisakkaritlerin karışımından oluşan inülin pek çok gıda da lifle zenginleştirme, prebiyotik özellik kazandırma, su bazlı gıdalarda yağ ikamesi olarak kullanılmaktadır.

Pullulan üretiminde substrat olarak fuel etanol yan ürünleri de kullanılmıştır [24, 38, 40]. Roukas (1999 a,b) proteini alınmış peynir suyunu ve bira fabrikası atıklarını kullanmıştır. *Aureobasidium pullulans* P56 ile proteini alınmış peynir suyu kullanarak maksimum 11 g/l polisakkarit elde etmiştir [33, 34]. Göksungur ve ark. (2004), melasa farklı ön işlemler uygulayarak gerçekleştirdikleri üretimde elde ettikleri maksimum pullulan konsantrasyonu 16.9 g/l olmuştur [14].

Barnett ve arkadaşları (1999) ise patates nişastasını atıklarını enzimatik yolla parçalayarak *Aureobasidium pullulans*'ın gelişmesi ve hücre dışı polisakkarit üretimi için uygun bir substrat elde etmişler ve çalışmalarını bu doğrultuda gerçekleştirmişlerdir. Bu şekilde hidrolize patates nişastası atıklarından *Aureobasidium pullulans* NRRLY-6220 suşu ile 69 g/l polisakkarit elde edildiği belirtilmiştir [5].

Israilides ve diğerleri (1998) tarafından *Aureobasidium pullulans* NRRLY-6220 ile üzüm kabuğu ekstratı, hidrolize nişasta atığı, zeytin yağ atığı ve melas gibi çeşitli endüstriyel atıkların pullulan üretimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen maksimum polisakkarit oranları sırasıyla 22.3 g/l, 30.8 g/l, 10.7 g/l ve 6.0 g/l olmuştur [39].

Vijayendra ve arkadaşları (2001) *Aureobasidium pullulans* CFR 77 ile hurma suyundan yapılan koyu renkli şeker kullanılarak, sakkaroz kullanılan sentetik ortamdan daha fazla miktarda (51.9 g/l) ve pigmentsiz pullulan elde edildiğini ve fermentasyon süresinin sentetik ortama göre daha kısa olduğunu belirlemişlerdir [42].

Pullulan, Hayashibara Biochemical Co. (Japonya) tarafından hidrolize nişasta substratı kullanılarak endüstriyel ölçekte üretilmektedir [3].

2.3.2. Azot Kaynağı:

Pullulan üretiminde bir diğer önemli etken ise azottur. Ortamdaki azot kaynağının hem çeşidi hem de konsantrasyonu küflerin ürettiği hücre dışı polisakkaritlerin sentezlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Aureobasidium pullulans ile kesikli yöntemle polisakkarit üretimi üzerinde NH_4^+ ve diğer azot kaynaklarının etkileri konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Azotun ortamdaki mevcudiyeti küf tarafından polisakkarit biyosentezinin başlangıcı açısından önemlidir. Fakat ortamdaki azot konsantrasyonu belli bir seviyeyi geçtiğinde pullulan üretiminin azaldığı belirtilmiştir. Genellikle polisakkaritlerin sadece azotun kısıtlandığı koşullarda üretildiği ve ortamdaki yüksek miktardaki azotun hücre dışı polisakkarit üretimini baskıladığı ve aksine biyomas oluşumunu teşvik ettiği kabul edilmektedir [1, 43, 44].

Catley (1971), *Aureobasidium pullulans* ile pullulan sentezinin sadece ortamdaki amonyum'un tükenmesinden sonra meydana geldiğini göstermiştir. Yapılan pek çok çalışma Catley'nin bu görüşünü desteklemiş ve amonyum iyonunun kısıtlanmasının pullulanın elde edilmesi için önemli olduğu ispat edilmiştir. Bu tür çalışmalar; ortamdaki azotun durumundaki değişikliklere bağlı olarak pH'nın sıklıkla değiştiğini ve bunun pullulan sentezinde çok önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. Fakat pullulan üretimindeki bu etkinin hücre morfolojisini etkileme yoluyla gerçekleştiği ve bu nedenle dolaylı yoldan olduğu savunulmuştur [1, 6, 7, 8, 37].

Catley'in bulguları, çalışmalarında sürekli karıştırılmalı tank tipi biyoreaktör kullanan Seviour ve Kristiansen (1983) tarafından da doğrulanmıştır. Yüksek amonyum konsantrasyonlarında, karbon akışının polisakkarit üretimi yerine biyomas oluşumu yönünde işlediği ifade edilmiştir. Ayrıca amonyum miktarının artmasının polisakkarit üretimini inhibe etmekle kalmayıp, lag fazını uzattığı da belirtilmiştir [7, 8].

Auer ve Seviour (1990) sürekli karıştırılmalı tank tipi biyoreaktör kullanarak yaptıkları çalışmada azot kaynağının hem çeşidinin hem de konsantrasyonunun

mikroorganizma tarafından azotun özümsemesiyle ilgili anahtar enzimatik sistemlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı ileri sürmüştür. Bu nedenle belirli hücre içi metabolitlerin havuzunun etkilendiğini ve karbon akışının biyomas üretimi yada polisakkarit sentezi doğrultusunda oluşunun buna göre belirlendiğini ifade etmişlerdir [1].

Reed-Hammer ve West (1994) kompleks azot kaynaklarının pullulan üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karbon kaynağı olarak sakkaroz veya mısır şurubu kullanıldığında kompleks bir azot kaynağı olarak soytunun kullanılması sonucu her iki karbon kaynağında da yüksek pullulan üretimi sağlandığını belirtmişlerdir [39].

Aureobasidium pullulans ile hücre dışı polisakkarit üretiminde azotun rolü üzerinde sürekli yöntem kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Sabit seyreltme hızı (D) 0.075 h⁻¹ ve pH 4.5'te amonyum iyonu konsantrasyonu arttıkça pullulan üretim miktarı azalmıştır [37].

2.3.3. pH Kaynağı:

Aureobasidium pullulans ile polisakkarit sentezinde kültür pH'sı da önemlidir. Kültür pH'sı organizmanın morfolojisi üzerinde etkili olarak, polisakkarit üretimini de etkilemektedir. Bu değişkenler birbirleriyle etkileşmekte ve bu değişkenlerin polisakkarit üretimi üzerindeki ayrı ayrı etkilerinin belirlenmesini de zorlaştırmaktadır.

Yüksek pH değerlerinde, glukozun öncelikle biyomas üretimi için kullanıldığı ve sadece ileri bir aşamada ve daha düşük bir pH değerinde polisakkarit sentezinin gerçekleştiği ilk defa Catley (1971) tarafından saptanmıştır. pH değeri 7.4'te sabit tutulduğunda, üretilen polisakkarit miktarı pH'nın doğal bir şekilde düşmesine oranla %20 civarında daha düşük olmuştur. Ono ve diğerleri (1977) tarafından çalkalamalı kültürde düşük pH'sının (2.5) polisakkarit sentezini inhibe ettiği gösterilmiş ve aynı araştırmacılar Catley'in bulgularını biyoreaktör kullanarak doğrulamışlardır. Bununla beraber pH'yı 3.5'ten 6.5'e yükseltmenin, büyük olasılıkla morfolojiyi etkileyerek polisakkarit verimini arttırdığı da belirtilmiştir [7, 8, 29, 37].

Göksungur ve ark. (2004), karbon kaynağı olarak pancar melası ve sentetik ortam kullanarak gerçekleştirdikleri pullulan üretiminde 4.5-8.5 arası farklı ortam pH'ları denemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarla pH'ın 7.5'e kadar artmasıyla pullulan ve polisakkarit konsantrasyonlarının arttığını fakat biyomasın azaldığını belirlemişlerdir [14].

Lacroix ve arkadaşları (1985) tarafından başlangıç kültür pH'sı olarak pH 2.0 seçildiğinde hiç pullulan üretilmediği ve maksimum verimin pH 5.5'te elde edildiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, yüksek oranda biyomas üretilmesi için pH 2.0'da başlatılan ve daha sonra pullulan sentezi için pH 5.5'e yükseltilen iki basamaklı bir fermentasyonun geliştirilmesi için kullanılmıştır. Bu fermentasyon sisteminin kullanılmasıyla fermentasyonun aseptik olmayan koşullarda da yapılabileceği belirtilmiştir. Buna göre, fermentasyonun ilk aşamasında çok düşük pH değerleri nedeniyle kontaminasyon riski bulunmamaktadır. Fermentasyonun ikinci aşamasında ise *Aureobasidium pullulans* kültürlerinin ortamda yüksek konsantrasyonlar halinde bulunması nedeniyle kontaminasyon riskinin önemsiz seviyelere indirilebileceği öne sürülmüştür [21].

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'dan daha başka bir azot kaynağı, örneğin glutamat kullanıldığında biyoreaktörde pH kontrolü ile *Aureobasidium pullulans*'ın pH 2.5'te de, daha yüksek pH değerlerindeki kadar polisakkarit sentezlediği Auer ve Seviour (1990) tarafından belirlenmiştir [37].

Sürekli kültürde ise, *Aureobasidium pullulans* ile en yüksek polisakkarit oranlarının pH (4.5) ve 0.075 h⁻¹ sabit seyreltme hızında (D) elde edildiği McNeil ve diğerleri (1989) tarafından belirtilmiştir [39].

Optimum pH konusunda literatürdeki farklı sonuçlar mikroorganizmanın farklı suşlarının kullanılmasından, substrat kompozisyonundan (azot kaynağının cinsi ve miktarı vb.) ve çalışmalarda kullanılan farklı fermentasyon sistemlerinden kaynaklanmaktadır.

2.3.4. Oksijen Kaynağı ve Havalandırma:

Pullulan üretimindeki bir diğer önemli faktör ise havalandırmadır. Bilindiği gibi *Aureobasidium pullulans* küfö aerobik bir mikroorganizmadır, bu nedenle de ortamın optimum şekilde havalandırılması gereklidir. Fermentasyon sırasında ürün oluşumu ile ortam reolojisi belirgin bir biçimde etkilenecek yüksek viskoz ve Newtonian dışı duruma gelmektedir. Bu nedenle hücre dışı polisakkarit fermentasyonları sırasında oksijenin kullanılabilirliği değişmektedir.

Havalandırma, kütle transfer özelliklerini geliştirerek mikroorganizma hücrelerinin gelişmesi ve performansları için yararlı olabilmektedir. Ortamın havalandırılması hücrelerin oksijen ihtiyacını karşılamasının yanı sıra üretim ortamının daha iyi karışmasını sağlayarak, hücre içi ve dışı arasındaki konsantrasyon oranlarını korumayı sağlar. Bu konsantrasyon oranları her iki doğrultuda çalışarak daha iyi bir difüzyonla hücrelerin yeterince şeker ve diğer besin elementlerini almalarını sağlarken, hücrelerin mikro çevrelerinden katabolizma sonucu oluşan yan ürünlerin ve gazların da uzaklaşmasını kolaylaştırır [36].

Imsheketskii ve diğerleri (1981) çözünmüş oksijen konsantrasyonunu hassas olmayan yöntemlerle belirledikleri bir çalışma sonucunda, yüksek miktarda oksijen alımının bazı suşlarda pullulan miktarını azalttığını belirtmişlerdir. Rho ve diğerleri (1988) ise tam aksine yüksek oksijen transfer oranlarının yüksek miktarda pullulan elde edilmesini sağladığını belirtmiştir. Yapılan her iki çalışmada da çalkalamalı kültür kullanılmıştır, pH kontrolü yoktur ve kültürlerin azot kısıtlaması özellikleri belirlenmemiştir. Aynı çalışma biyoreaktörde fakat yine pH kontrolü olmadan tekrarlandığında ise en iyi polisakkarit veriminin düşük çözünmüş oksijen miktarında (%10) elde edildiği bulunmuştur. Birbirinden çok farklı oksijen kütle transferi özellikleri göstermeleri nedeniyle ve organizma için tamamiyle farklı fiziksel çevreler sundukları için çalkalamalı kültürde elde edilen sonuçlarla, gelişmiş bir biyoreaktörde elde edilen sonuçların karşılaştırılması oldukça zordur [37].

Wecker ve Onken (1991) ise yaptıkları çalışmada, düşük çözünmüş oksijen miktarı ve düşük kayma kuvvetleri kombinasyonunun tek hücreli yapı oluşumunu desteklediğini ve en yüksek polisakkarit veriminin bu koşullarda elde edildiğini

belirlemişlerdir. Gibbs ve Seviour (1996) tarafından da karıştırıcı hızının artırılması ile pullulan konsantrasyonunun azaldığı ifade edilmiştir [35].

Dunfresne ve diğerleri (1991) biyoreaktör içindeki basıncı arttırarak (0.5 Mpa) daha yüksek bir çözünmüş oksijen miktarı elde etmiş ve azot kısıtlamalı koşullarda artan havalandırmanın pullulan miktarını arttırdığını belirlemişlerdir. Fakat bu basıncın üzerindeki basınçlarda biyomas büyük topaklar oluşturmuş ve pullulan ve biyomas miktarları düşmüştür [37].

Roukas ve Liakopoulou-Kyriakides (1999) melas ile karıştırmalı tank tipi biyoreaktör kullanarak yaptıkları çalışmalarında, polisakkarit konsantrasyonunun havalandırma hızının artması ile arttığını ve optimum havalandırma hızının 1 vvm olduğunu ifade etmişlerdir. Polisakkarit üretimindeki bu artışın çözünmüş oksijen ve biyomas konsantrasyonlarında oluşan artış sonucunda meydana gelebileceğini belirtmişlerdir [35].

Roukas ve Mantzouridou (2001) pullulan üretiminde hava kadırmalı biyoreaktör kullanarak pullulan üretiminde havalandırma hızının etkisini incelemişler ve maksimum pullulan üretiminin 2 vvm havalandırma hızı ile sağlandığını belirlemişlerdir [36].

McNeil ve diğerleri (1989) sürekli karıştırmalı tank tipi reaktörde yaptıkları çalışmada 300 rpm karıştırma hızını ve 1 vvm havalandırma hızını kullanmışlardır. Youssef ve diğerleri (1999) ise yine sürekli karıştırmalı tank tipi reaktörde çalışmış ve karıştırma hızı olarak 650 rpm, havalandırma hızı olarak ise 3 l/dak. (6 l çalışma hacmi) kullanmışlardır. Schuster ve arkadaşları (1993) sürekli karıştırmalı tank tipi reaktörde 400 rpm karıştırma hızı ve 1 vvm havalandırma hızı ile çalışmışlardır [39, 44].

Moscovici ve diğerleri (1993) sürekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktör kullanarak yaptıkları çalışmada fermentasyonun ilerleyen aşamalarında karıştırma ve havalandırma hızlarını arttırmışlardır. Karıştırma hızı 400 rpm'den 900 rpm'e kadar, havalandırma hızı ise 0.6 vvm'den 1.9 vvm'e kadar arttırılmıştır. Fermentasyon ilerledikçe karıştırma ve havalandırma hızlarının önemli ölçüde arttırılmasına karşın, ortamdaki çözünmüş oksijen

konsantrasyonunun çok düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle oksijen ihtiyacının çok fazla olduğu ve kullanılan karıştırma ve havalandırma hızlarının organizmanın oksijen ihtiyacını yeterince karşılayamadığı sonucuna varmışlardır [39].

2.3.5. Sıcaklık:

Aureobasidium pullulans ile pullulan üretiminde sıcaklık çok önemli bir etken olmasına karşın, sıcaklığın etkisi ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır.

Ueda ve diğerleri (1963) pullulan üretiminin 25°C'de 30°C'dekinden daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir (West and Reed-Hammer, 1993). McNeil ve Kristiansen (1990) kesikli ve sürekli yöntemlerle yaptıkları çalışmada optimum pullulan üretimini 24°C'de gerçekleştirmişlerdir [37].

West ve Reed-Hammer (1993) karbon kaynağı olarak mısır şurubu yada sakkarozu kullandıklarında her iki substratla da pullulan üretimi için optimum sıcaklık değerinin 26°C olduğunu belirtmişlerdir [43].

Literatür incelendiği zaman, bütün suşlarda yüksek pullulan üretimini sağlayan belirli bir kültür koşulu olmadığı anlaşılmaktadır. Aynı zamanda, yüksek biyomas üretimi her zaman yüksek polisakkarit verimleriyle paralel değildir.

Aureobasidium pullulans ile pullulan üretiminde bazı sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu sorunlar:

- Melanin pigmenti oluşumu
- Fermentasyon ilerleyişine göre pullulanın molekül ağırlığının değişmesi
- Yüksek şeker konsantrasyonunun (>%5) neden olduğu inhibitör etki
- Pullulanın çöktürülmesi ve geri kazanılması ile ilgili yüksek maliyetler

Mikroorganizma suşunun geliştirilmesiyle ilk iki problemin üstesinden gelinebilmektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı pullulan üreten yeni bir *Aureobasidium pullulans* suşu bildirilmiştir [29, 44]. Shabtai ve Mukmenev (1995) iki basamaklı bir fermentasyon sistemi kullanarak *Aureobasidium pullulans* (ATCC 42023) ile pigmentsiz pullulan üretimi üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmada, kültür morfojenetik olarak maya özellikleri gösteren hücreler şeklinde tutuklanmış ve pigment oluşumu engellenmiştir [39].

West ve Strohfus (2001) tarafından pigment oluşumunun azaltıldığı ve pullulan üretiminin artırıldığı ve bu şekilde ticari pullulan üretiminde avantaj sağlayabilecek bir suş izole edildiği belirtilmiştir [39].

Diğer iki problemin çözümü için ise pullulanın çökeltilme ve geri kazanım maliyetlerinin düşürülmesi ve yüksek pullulan miktarlarının elde edilmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle farklı fermentasyon sistemlerinin incelenmesi gereklidir [39].

Shin ve arkadaşları yarı sürekli sistem kullanılarak yüksek şeker konsantrasyonunun inhibitör etkisinin engellenebileceğini ve daha yüksek pullulan miktarlarının elde edilebileceğini belirtmişlerdir. Fakat Youssef ve arkadaşları tarafından yapılan *A.pullulans* ile pigmentsiz pullulan üretimi konusunda kesikli ve yarı sürekli sistemlerin karşılaştırıldığı çalışmada, kesikli sistemin yarı sürekli sisteme göre daha iyi bir fermentasyon sistemi olduğunu ortaya konmuştur [39].

Schuster ve arkadaşları kesikli ve sürekli yöntemlerin karşılaştırıldığı bir çalışma yapmışlar ve sürekli yöntemde kesikliye göre iki kat daha fazla ürün elde etmişlerdir. Göksungur ve arkadaşları *A.pullulans* P56 suşu ile sentetik ortam kullanılarak karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde pullulan üretiminin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Deneysel verileri kullanarak bir matematik model oluşturmuşlar ve bu model yardımıyla proses için optimum koşullar olan 51.4 g/L başlangıç şeker konsantrasyonunda 2.36 vvm havalandırma ve 345.3 rpm karıştırma hızında, 17.2 g/L konsantrasyonunda pullulan elde etmişlerdir [41].

İmmobilize edilmiş *A.pullulans* hücreleri ile pullulan üretimi konusunda değişik çalışmalar yapılmıştır. *A.pullulans* hücreleri zeolit (alüminyum silikat) üzerine adsorpsiyonla immobilize edildiğinde en yüksek pullulan üretiminin pH 4.0 ve 5.0'da tutuklanmış hücrelerle, en düşük pullulan üretiminin ise pH 2.0 veya 2.5'te tutuklanmış hücrelerle elde edildiği belirtilmiştir [40, 41].

Aureobasidium pullulans hücrelerinin iyon değiştirici reçine trietilaminoetil-selüloz, dietilaminoetil-selüloz ve fosfoselüloz üzerinde tutuklanması konusunda da çalışılmıştır. Trietilaminoetil-selüloz üzerinde tutuklanan hücreler ile pH 2.0'da elde edilen pullulan miktarının diğerlerinden biraz daha fazla olduğu bulunmuştur [40, 41].

Aureobasidium pullulans hücrelerinin diatome toprak ve dietilaminoetil-selüloz üzerine adsorpsiyon ile tutuklanmaları karşılaştırıldığında ise diatome toprak üzerinde tutuklanan hücrelerde pullulan üretiminin daha fazla olduğu belirtilmiştir [39, 41].

Ürküt ve arkadaşları, kalsiyum aljinatta immobilize edilmiş *A.pullulans* P56 suşu ile sentetik besiyeri ortamında kesikli ve tekrarlanan kesikli fermentasyon sistemlerini kullanılarak pullulan üretimini araştırmışlardır [41].

Benzer çalışmada Göksungur ve diğerleri (2003), fermentasyon ortamındaki pullulan oranını toplam polisakkaritin %84.5'i kadar olduğunu bulmuş, tekrarlanan kesikli üretimlerde kalsiyum aljinat boncukları 6 defa önemli aktivite kayıpları ve deformasyon olmadan kullanmışlardır. Fermentasyon parametreleri, cevap yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiş ve proses için belirlenen optimum koşullarda (pH 7.31, karıştırma hızı 191.5 rpm, inkübasyon süresi 101.2 saat) 21.07 g/L maksimum pullulan konsantrasyonu elde edilmiştir [14, 39].

Ticari olarak pullulan üretiminde, dekstroz eşdeğeri 40-50 olan %10-15 konsantrasyondaki nişasta hidrolizatı, pepton, fosfat ve bazı tuzlar üretim ortamı olarak kullanılmaktadır. Başlangıç ortam pH'sı 6.5'tir. Fermentasyon boyunca özellikle ilk 24 saat pH giderek düşmekte ve son pH yaklaşık 3.5 olmaktadır. Kültür gelişimi maksimum 75 saat içinde meydana gelmekte ve optimum pullulan verimi yaklaşık fermentasyonun 100.saatinde görülmektedir [39].

Hayashibara Biochemical Co., yılda yaklaşık 300 ton pullulan üretimi gerçekleştirmektedir. Gıdada kullanıma uygun olan pullulanın Japonya'daki satış fiyatı 20\$/kg, ilaçta kullanıma uygun olanının fiyatı ise 25\$/kg civarındadır [3].

2.4. Pullulanın Elde Edilmesi

Alt akım (ayırma ve saflaştırma işlemlerinde, fermentasyon ortamından saf biyopolimer elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç için yapılan aşamalar; fermentasyon sonrası ortamdan hücre ayrılması, fermentasyon süresince oluşan, pullulan üretiminde en önemli engel olan melanin pigmentinin uzaklaştırılması ve polimerin uygun bir çözügenle çözülmesidir [40]. Biz çalışmamızda melanin üretmeyen mutant bir suş kullandığımız için melanin pigmentinin oluşturduğu sorunlarla karşılaşmayacağız.

Seihr, (1981) şişmiş hücrelerin klamidosporelere dönüştüğü fermentasyonun son aşamalarında melanin pigmentinin hücre içi ve hücre dışı sentezlendiğini belirtmiştir [40]. Melanin pigmentinin oluşumu ve ayrılması için gerekli alt akım işlemleri, mikroorganizma suşunun geliştirilmesiyle elimine edilebilmektedir. Shabtai ve Mukmenev (1995), iki basamaklı fermentasyon sisteminde *Aureobasidium pullulans* kullanarak pigmentsiz pullulan üretimi ile ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, kültür morfojenetik olarak maya özellikleri gösteren hücreler halinde tutuklanmış ve pigment oluşumu engellenmiştir [40].

Pullulan, genellikle hücrelerin ayrılmasından sonra fermentasyon ortamından, etanol ya da metanol kullanılarak çöktürmeyle geri kazanılmaktadır. Bununla beraber, çökelen maddedeki pullulanın saflığı fermentasyon için kullanılan substrata göre değişebilmektedir. Genellikle pullulan üretiminde ikinci bir ürün olarak melanin pigmenti oluşumuna rastlanmaktadır ve pullulanın renginin aktif karbonla açılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Çöktürülen pullulanın beyaz katı şeklinde olması gıda ve ilaç endüstrisinde ticari olarak kullanılabilmesi için önemli bir özelliktir.

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

Fermentasyondan sonra elde edilen ham pullulanın ticari olarak kullanılabilmesi için çeşitli alt akım işlemlerinden geçirilerek saflaştırılması gereklidir. Bunun için pullulanın kullanılacağı alana göre farklı işlemler uygulanmaktadır. Pullulanın gıda sanayinde kullanılabilmesi için, fermentasyon sonrasında elde edilen pullulan aktif kömür ile muamele edilerek renksiz hale getirilir ve konsantre edilir. Ardından püskürtmeli kurutmayla yada dondurularak kurutulur ve toz hale getirilir. İlaç endüstrisinde ve film yapımında kullanılan pullulan ise benzer bir yöntemle muamele edilir. Fakat renksizleştirme işleminden önce alkol fraksinasyonu veya membran filtreyle saflaştırma, renksizleştirmeden sonra ise desalinasyon işlemi gibi bir takım ilave işlemler uygulanır. Endüstriyel yapıştırıcı, dispersant ve koagulant için ise hem pullulan konsantre edilir, kurutulur ve toz haline getirilir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında biz çalışmamızda *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının co-culture ile inülin içeren ortam kullanılarak pullulan biyopolimerinin üretimi hakkında araştırma yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Çalışmalarda mikroorganizma olarak Doç. Dr. Yekta Göksungur'dan (Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü) temin edilen *Aureobasidium pullulans* P56 kullanılmıştır. *Aureobasidium pullulans* P56 suşu melanin üretmeyen mutant bir suştur. Mikroorganizma PDA (Potato Dextrose Agar) üzerinde +4°C'de saklandı ve her 3 haftada bir taze ortama ekim yapılarak kültür yenilendi. Taze ortama ekilen mikroorganizma 28°C'de 2 gün boyunca geliştirildi.

Çalışmalarda ikinci mikroorganizma olarak Ege Üniversitesi Etiltem'den temin edilen *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşu kullanılmıştır. *Kluyveromyces marxianus* inülini parçalayan inülinaz enzimini salgılayan bir suştur. Mikroorganizma YM agar (Yeast-Malt Agar) üzerinde +4°C'de saklandı ve her 3 haftada bir taze ortama ekim yapılarak kültür yenilendi. Taze ortama ekilen mikroorganizma 30°C'de 24 saat boyunca geliştirildi.

3.1.2. Substrat

Çalışmalarda üretim ortamı olarak inülin içeren ortam kullanıldı. Öncelikle mikroorganizmanın geliştirilmesi için kültür ortamı hazırlandı. Bu ortamın kompozisyonu sentetik üretim ortamının kompozisyonuna benzemekle birlikte, koşullar mikroorganizmanın geliştirilmesi için uygun şekilde ayarlandı. Kültür ortamında mikroorganizma geliştirildi ve daha sonra üretim ortamlarına atıldı. İnülin Artisan Gıda San. Ve Tic. A.Ş. İstanbul fabrikasından temin edildi.

3.2. Metotlar

3.2.1. Substratların Hazırlanışı

- *Aureobasidium pullulans* P56 suşu için kültür ortamı kompozisyonu (g/ 1): sukroz 30 (Merck-107651), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 (C.Erba-420777), maya ekstraktı 0.4 (Oxoid-LP0021), K_2HPO_4 5.0 (Merck-105101), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 (Emir Kimya) ve NaCl 1.0 (Sigma- S5886) (pH= 5.5) (Youssef et.al., 1999) [44].
- *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşu için kültür ortamının kompozisyonu (g/ 1): sukroz 20 (Merck-107651), NH_4Cl 1.5 (Merck-101145), maya ekstraktı 5.0 (Oxoid-LP0021), K_2HPO_4 5.0 (Merck-105101), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.65 (Emir Kimya) ve KCl(Merck-104938) 1.0 (pH= 6.5) (Mazutti et.al., 2010) [27].
- Sentetik üretim ortamının kompozisyonu (g/ 1): inülin 50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 (C.Erba-420777), maya ekstraktı 0.4 (Oxoid-LP0021), K_2HPO_4 5.0 (Merck-105101), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 (Emir Kimya) ve NaCl 1.0 (Sigma- S5886) (pH= 7.5) (Youssef et.al., 1999 ve Chul et.al., 1989) [9, 44].

Substart konsantrasyonunun pullulan üretimine etkisini incelemek için ise 30, 50 ve 70 g/l sakkaroz içeren sentetik üretim ortamları hazırlandı.

Kullanılan üretim ortamları ve kültür ortamı gerekli pH ayarlamalarından sonra 1.5 atm basınçta, 121°C'de 20 dakika süresince sterilize edildi.

3.2.2. DNS Hazırlanışı

1 gr dinitrosalisilik asit (DNS) (Aldrich-D0550) 50 ml su içinde çözündürüldü. Daha sonra 30 g Na-K tartarat (Fluka-60410) ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 20 ml 2 N NaOH (J. T. Baker-0450) ilave edildikten sonra son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı [28].

3.2.3. Pullulan Üretimi

Pullulan üretimi sıcaklık kontrollü çalkalamalı inkübatörde (Wise Cube& WIS-20) 200 rpm çalkalama hızında ve 28°C sıcaklıkta gerçekleştirildi. Şekil 3.1'te gösterilen çalkalamalı inkübatörde, içerisinde genellikle 50 ml üretim ortamı bulunan 250 ml'lik erlenler kullanıldı.



Şekil 3.1. Üretim ortamlarında *Aureobasidium pullulans* ve *Kluyveromyces marxianus* suşlarının geliştirilmesi

Öncelikle PDA üzerindeki *Aureobasidium pullulans* P56 mikroorganizması öze ile iki öze dolusu alınarak hazırlanan kültür ortamına aşılandı ve 200 rpm çalkalama hızında 28°C sıcaklıkta 48 saat boyunca mikroorganizmanın geliştirilmesi sağlandı. Daha sonra YM agar üzerindeki *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 mikroorganizması öze ile hazırlanan kültür ortamına aşılanarak 200 rpm çalkalama hızında 30°C sıcaklıkta 24 saat boyunca mikroorganizmanın geliştirilmesi sağlandı. Kültür ortamlarında geliştirilen mikroorganizmalar, fermentasyon başlangıcında aseptik koşullarda % 5 (v/v) oranında, üretim ortamına inoküle edildi. Fermentasyon süresince her 24 saatte bir örnek alınarak biyomas, polisakkarit, indirgen şeker ve pullulan miktarları belirlendi.



Şekil 3.2. Çalkalamalı inkübatör ve spektrofotometre

3.2.4. Analiz Yöntemleri

3.2.4.1. Kuru hücre ağırlığı

Fermentasyon sıvısından alınan 1,5 ml örnek 8000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve saf su ile iki defa yıkandı. Yıkanan hücreler 80°C'de sabit tartıma kadar kurutularak kuru hücre ağırlığı belirlendi.

3.2.4.2. Mikrobiyal polisakkarit

Şekil 3.3'de fermentasyon sıvısındaki polisakkarit miktarını tayin etmek için kullanılan yöntem verilmiştir. Biyoması ayrılan fermentasyon sıvısına 2 hacim etanol ilave edildi ve +4°C'de 1 saat bekletilerek polisakkaritlerin çökmesi sağlandı. Filtrasyon işlemi ile ayrılan polisakkarit kısmı 80°C'de sabit tartıma kadar kurutularak mikrobiyal polisakkarit miktarı belirlendi.

3.2.3.3. Pullulan tayini

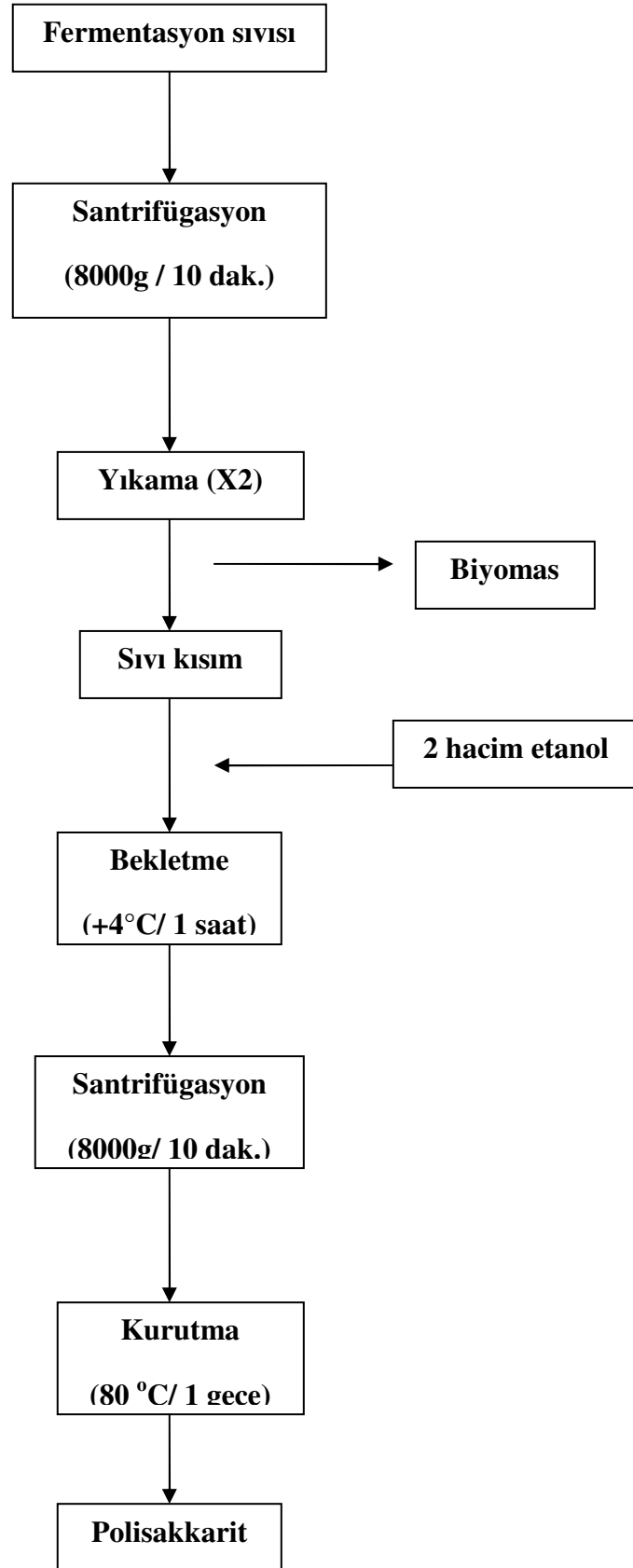
Üretilen polisakkarit içindeki pullulan miktarının belirlenmesi için ise, elde edilen polisakkarit 0.05 M sodyum asetat (pH 5.0) ile 10 mg/ml oranında çözöldü. 1ml örneğe, 10 µl Pullulanaz (Promozyme, Novo) ilave edilerek 25°C'de 21 saat inkübe edildi (Leathers et.al., 1988) [24]. Enzim aynı konsantrasyondaki bir pullulan (Hayashibara Biochemical Co.) örneğine de ilave edilmiştir. İndirgen şeker analizi ile glukoz indirgen eşdeğerleri saptandı ve bu bilgi kullanılarak örnekteki gerçek pullulan içeriği belirlendi.

3.2.3.4. İndirgenen şeker

İndirgen şeker miktarının saptanması için, uygun oranda seyreltme yapıldıktan sonra dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi (Miller, 1959) kullanılmıştır [28]. Buna göre genellikle glukoz içeren standart çözeltiler hazırlandı ve okumalar spektrofotometrede (Varian 50bio UV-Visible Spectrophotometer) 540 nm dalga boyunda yapıldı. Ek açıklamalar Şekil A.1'de indirgen şeker miktarlarını belirlemek için kullanılan absorbans-konsantrasyon grafiği ve denklemleri örnek olarak verilmiştir.

3.2.3.5. pH

Çalışmalarda pH okumaları pH metre ile yapılmıştır.



Şekil 3.3. Mikrobiyal polisakkarit üretim şeması

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Üretimin ilk aşamasında çalkalamalı kültürler kullanılarak sentetik üretim ortamın polisakkarit, biyomas miktarlarının karşılaştırılması ve en iyi sonuçların elde edildiği ortamların pullulan içerikleri incelenmiştir. İkinci aşamada ise en iyi pullulan üreten ortamın farklı substrat konsantrasyonları, farklı başlangıç pH ve farklı sıcaklık değerlerinin, farklı azot kaynaklarının ve nitrojen kaynaklarının konsantrasyon değerlerinin pullulan üzerindeki etkisi hakkında bilgiler karşılaştırılmıştır.

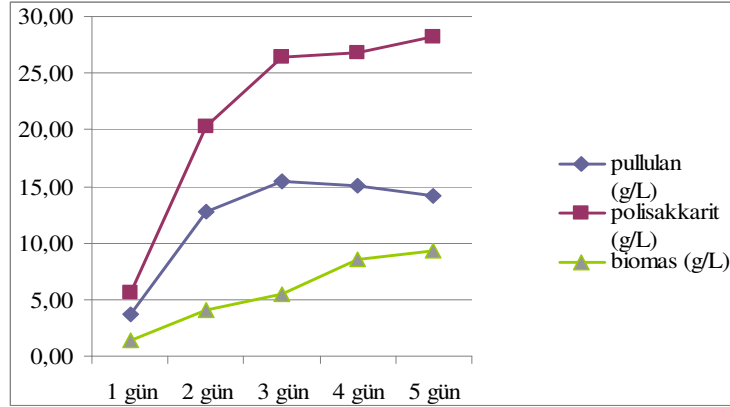
Maksimum polisakkarit üretimi 28°C sıcaklıkta pH 7.5'de elde edilmiştir. En iyi üretim fermentasyonun üçüncü gününde elde edilmiştir. *K.marxianus* ve *A.pullulans* 'ın eş zamanlı inokulasyonlarından elde edilen pullulan miktarına göre *K.marxianus*'un gecikmeli inokulasyonunun pullulan miktarını arttırdığı görülmüştür. Maksimum polisakkarit ve pullulan üretimi, *A.pullulans*'ın 10 saatlik öncü kültürasyonundan sonra *K.marxianus*'un inoküle edildiği zaman gerçekleşmiştir. *K.marxianus* ve *A.pullulans* 'ın eş zamanlı inokulasyonunda *Kluyveromyces marxianus* dominant karakter gösterip *Aureobasidium pullulans*'ın hücre gelişimini engellediği görülmüştür. *Kluyveromyces marxianus*'ın gecikmeli inokulasyonu yapıldığı zaman *Aureobasidium pullulans* popülasyonunda ve polisakkarit üretiminde artış olduğu görülmüştür.

İnokulum saatleri (30°C, 1gün, pH 7.5)	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (mg/ml)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
Eş zamanlı	2.78	0.74	1.31
8	3.40	0.93	0.83
9	4.22	1.07	0.97
10	5.65	1.26	1.36
11	5.33	1.19	1.24
12	5.18	1.10	1.11

Çizelge 4.1. İnokulum saatlerinin pullulan üretimine etkisi

4.1. İnkübasyon Sürelerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum inkübasyon süresinin bulunması için çalkalamalı inkübatörde pH 7.5 ve 30°C sıcaklıkta 6 gün boyunca denemeler yapılmıştır.



Grafik 4.1. İnkübasyon sürelerinin polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi

Deneyisel verilerimiz Grafik 4.1'de verilmiştir. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (28.23 g/l) değeri ile maksimum biomas oluşumu (9.29 g/l) 5.günde ve maksimum pullulan (15.51 g/l) üretimi 3.günde elde edilmiştir.

Vijayendra ve arkadaşları (2001) optimal pullulan üretiminin 72. saatte olduğunu belirtmişlerdir. Roukas ve Liakopoulou-Kyriakides (1999) optimum polisakkarit üretiminin 120. saatte olduğunu belirtmişlerdir. Farklı fermentasyon periyod zamanlarının çıkmasının sebebini; farklı tür tipleri, farklı fermentasyon ortam içeriği, farklı kültür koşullarınının kullanılmasından dolayı olduğunu belirtmişlerdir. Biomasın deney periyodunun sonlarına doğru artış gösterdiğini belirtmişlerdir [35, 42].

Göksungur ve arkadaşları (2003) tarafından *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile çalkalamalı inkübatör kullanarak sentetik ortamda üretilen maksimum polisakkarit üretimi 6.günde 21.6 g/l, maksimum pullulan üretimi 5.günde 16 g/l ve maksimum biomas oluşumu ise 6.günde 9 g/l olarak elde edilmiştir. Sürekli karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörde elde edilen polisakkarit, pullulan ve biyomas miktarları sırasıyla 7.günde 20.4 g/l, 4.günde 6.6 g/l,

6.günde 9.4 g/l olarak elde edilmiştir. Sülfürik asit+aktif kömür ile muamele edilmiş melaslı ortamdandn en yüksek polisakkarit üretimini (35 g/l) 6.günde elde ederken, sülfürik asit ve potasyum ferrosiyanür ile muamele edilmiş melaslarda daha az polisakkarit üretilmiş ve maksimum polisakkarit miktarları sırasıyla 4.günde 18 g/l ve 4.günde 11 g/l olarak elde etmişlerdir [14, 39].

Thomas ve Reed-Hammer (1993) tarafından sentetik ortam kullanılarak yapılan çalışmada *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 suşu ile çalkalamalı inkübatörde maksimum 17.08 g/l pullulan üretilmiştir [39].

Lacroix ve diğerleri (1985) sentetik ortamı substrat olarak kullanmış ve 50 g/l başlangıç şeker konsantrasyonunda ve pH 5,5 değerinde *Aureobasidium pullulans* 140B ve 2552 suşları ile sırasıyla 15 g/l ve 13 g/l polisakkarit üretimi elde etmişlerdir. 7-9 g/l biyomas oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Schuster ve diğerleri (1993) ise *Aureobasidium pullulans* P56 ile sentetik ortamdnd 16 g/l polisakkarit üretilmiştir [21].

Lazaridou ve diğerleri (2002) sülfürik asit+aktif kömür ile muamele edilmiş melas ortamında *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile çalkalamalı inkübatörde 24 g/l pullulan elde etmişlerdir [23].

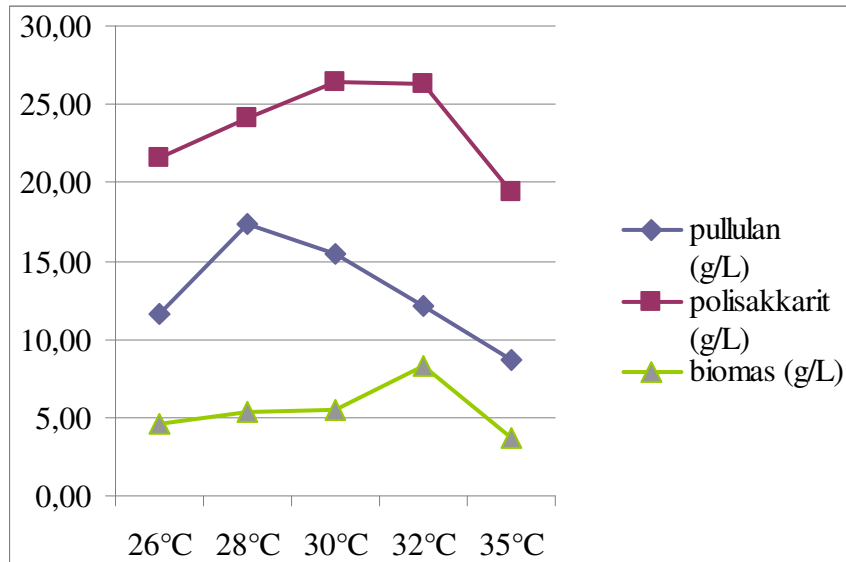
West ve Reed-Hammer (1993) mısır şurubu ve sentetik ortam karbon kaynağı olarak kullanıldığında pullulan üretiminin en düşük olduğu sıcaklık değerlerinde biyomas miktarlarının en yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Elde edilen en yüksek biyomas miktarları mısır şurubu için 4.23 g/l, sentetik ortam için ise 4.15 g/l olarak gerçekleşmiştir [43].

Chul Shin ve diğerleri (1989) inülinin substrat olarak kullanılması ile 8 g/l, Barnett ve diğerleri (1999) hidrolize patates nişastası atığı ile 26 g/l biyomas elde etmişlerdir. Proteini alınmış peynir suyundan 10.5 g/l biyomas elde edildiği ifade edilmiştir [9, 35].

4.2. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karışık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum sıcaklık değerinin bulunması için çalkalamalı inkübatörde 3gün, % 5 inülin içeren sentetik ortam ile pH 7,5 da sıcaklık 26°C, 28°C, 30°C, 32°C ve 35°C başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır.

Farklı başlangıç sıcaklık değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değerin 28°C olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık değerleri arttıkça biyomas miktarlarında artış görülmüştür. Deneysel verilerimiz Grafik 4.2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (26.39 g/l) değeri 30°C sıcaklıkta ve maksimum pullulan (17.31 g/l) üretimi 28°C sıcaklıkta elde edilmiştir.



Grafik 4.2. Farklı başlangıç sıcaklık değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

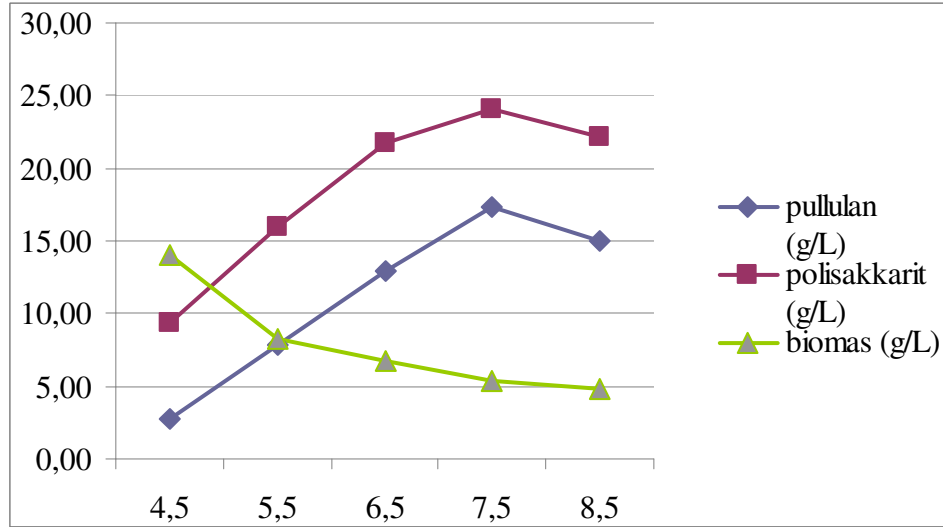
Ueda ve diğerleri (1963) pullulan üretiminin 25°C’de 30°C’dekinden daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir [43]. McNeil ve Kristiansen (1990) kesikli ve sürekli yöntemlerle yaptıkları çalışmada optimum pullulan üretimini 24°C’de gerçekleştirmişlerdir [37].

West ve Reed-Hammer (1993) karbon kaynağı olarak mısır şurubu yada sakkarozu kullandıklarında her iki substratla da pullulan üretimi için optimum sıcaklık değerinin 26°C olduğunu belirtmişlerdir [43].

McNeil ve Kristiansen (1990) *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretimi için en önemli faktörlerden birinin sıcaklık olduğunu bildirmiştir. En yüksek pullulan üretiminin 26°C'de gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Pullulanın yüksek sıcaklıklara karşı hassasiyet gösterdiğini bildirmiştir [38].

4.3. Farklı Başlangıç pH Değerlerinin Polisakkarit ve Pullulan Üretimine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum pH'nın bulunması için çalkalamalı inkübatörde 3 gün, % 5 inülin içeren sentetik ortam ile 28°C sıcaklıkta pH 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 ve 8,5 başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır. Çünkü pH; fermentasyon ortamını, mikroorganizmaların morfolojisini, hücre gelişimini ve pullulan üretimini etkiler.



Grafik 4.3. Farklı başlangıç pH değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Farklı başlangıç pH değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değer pH 7.5 olduğu belirlenmiştir. Asidik pH (2.5-5.5) değerlerinde polisakkarit ve pullulan miktarı düşerken, biyomas miktarı artar; artan pH'larda (6.5-8.5) ise polisakkarit ve pullulan üretimi yüksek ve biyomas miktarı ise düşüktür. Deneysel verilerimiz Grafik 4.3'de

verilmiştir. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (24.12 g/l) ve pullulan (17.31 g/l) üretimleri pH 7.5 değerinde elde edilmiştir. pH 4.5, 5.5, 6.5 ve 8.5 değerleri sırasıyla 9.3, 15.9, 21.7 ve 22.09 g/l polisakkarit ve sırasıyla 2.7, 7.83, 12.98 ve 15.02 g/l pullulan elde edilmiştir.

Cately (1979) pH 1.5'dan 6.5'a kadar ölçümler yapmıştır. pH 1.5 ile 3.5 arası en düşük pullulan sentezi olurken en yüksek biomasın pH 2.5'da elde edildiğini bulmuşlardır. Maksimum pullulan değerini ise pH 5.5'da elde etmişlerdir [39]. Lee & Yoo (1993) en yüksek pullulan üretimini pH 6.0' da elde etmiştir [45].

Lacroix ve diğerleri (1985) sentetik ortamda *Aureobasidium pullulans* 140B ve *Aureobasidium pullulans* 2552 suşu ile optimum başlangıç pH değerinin 5.5 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *Aureobasidium pullulans*'ın oldukça asidik bir pH olan 2.0 değerinde çok iyi bir şekilde gelişebildiğini, ancak bu durumda pullulan sentezleyemediğini belirtmişlerdir [21, 45].

Lazoridou ve diğerleri (2002) *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile sülfürik asit+aktif kömürle muamele edilmiş melaslı ortamda maksimum pullulan üretiminin pH 7.0 değerinde gerçekleştiğini ifade etmişlerdir [23].

Roukas (1999) sülfürik asit ile muamele edilmiş melaslı ortamda farklı pH değerlerini karşılaştırmış ve optimum pH'nın 6.5-7.5 aralığı olduğunu belirtmiştir [35].

Aureobasidium pullulans P56 suşu ile proteini alınmış peynir suyu substrat olarak kullanıldığında optimum başlangıç pH değerinin 6.5 olduğu öne sürülmüştür. Bira fabrikası atıklarının substrat olarak kullanıldığı çalışmada da optimum pH değerinin 6.5-7.5 olduğu ifade edilmiştir [33, 34].

Göksungur ve diğerleri (2003) sentetik ortamda *Aureobasidium pullulans* P56 ile optimum başlangıç pH değerinin 7.5 olduğunu bildirmişlerdir. Cheng, Demirci & Catchmark (2010) en yüksek pullulan üretimini pH 5.0' da elde etmiştir [39].

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, çalkalamalı kültürde *Aureobasidium pullulans* P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karışık kültürü ile % 5 şeker içeren sentetik ortamın kullanılmasıyla (pH= 7.5) pullulan üretimi konusunda başarılı

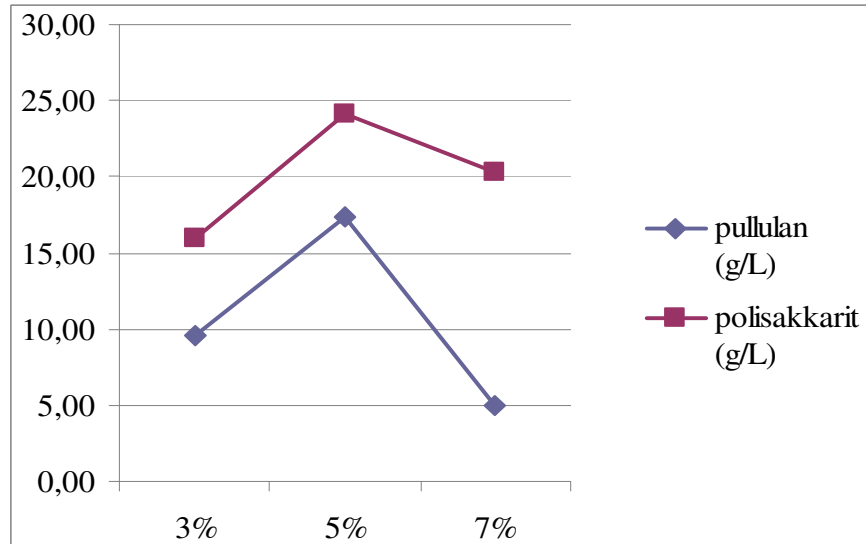
bir sonuç elde edilebileceği ortaya çıkmaktadır. Pullulan üretiminin artırılması için çeşitli parametreler (üretimi artırıcı besin elementlerinin ilavesi, azot konsantrasyonu vb.) üzerinde çalışmalar yapılması gerektiği kanısına varılabilir.

Ayrıca son yıllarda doğal ve yenilenebilir kaynaklardan, mikroorganizmalar tarafından üretilen biyomateryallere olan ilgi giderek yoğunlaşmıştır. Bu tip maddelerden olan mikrobiyal polisakkaritler birçok mikroorganizma tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir.

4.4. Substrat Konsantrasyonunun Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde optimum substrat konsantrasyon değerinin bulunması için çalkalamalı inkübatörde 3gün, pH 7.5 ile 28°C sıcaklıkta 28 g/l, 49 g/l ve 68 g/l inülin içeren başlangıç değerlerinde denemeler yapılmıştır.

Artan substrat konsantrasyonunun pullulan üretimini inhibe edici etkisi vardır. Grafik 4.4'de görüldüğü gibi en iyi sonuç % 5 şeker içeren ortamdan elde edilirken; şeker konsantrasyonu arttıkça (% 7'de) pullulan üretiminin engellendiği ortaya çıkmaktadır. Yapılan deneylerin sonucu Grafik 4.4'de verilmiştir.



Grafik 4.4. Farklı substrat konsantrasyonlarının kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Schuster ve diğerkleri (1993) tarafından *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile çalkalamalı inkübatörde % 5 şeker içeren sentetik ortam kullanarak 0.19 g/l/h hacimsel verimlilik değeri elde edilmiştir [39].

Göksungur ve arkadaşları (2003) tarafından *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ile % 3, % 5, % 7 şeker içeren sentetik ortamlardan üretilen pullulan miktarları (çalkalamalı inkübatör, 28°C, pH 7.5) ile yapılan çalışmada; maksimum pullulan üretimi % 5 şeker içeren ortamda 5.günde 16.7 g/l olarak gerçekleştiğini görmüşlerdir. % 3 şeker içeren ortamda üretilen pullulan miktarı ise ortamdaki şekerin tamamının tüketilmesiyle belli bir seviyede kaldığını ve 5.günde 9.2 g/l pullulan üretildiğini tespit etmişlerdir. % 7 şeker içeren ortamda üretilen polisakkarit miktarları birbirine yakın seviyede gerçekleşmesine karşın, bu ortamlarda üretilen pullulan değerleri birbirinden çok farklı miktarlarda olduğunu bulmuşlardır. Bu durum belli bir seviyeye kadar substrat konsantrasyonunun artmasıyla pullulan üretiminin arttığını, daha sonraki seviyelerde ise substrat inhibasyonu nedeniyle pullulan üretimin azaldığını göstermektedir [14, 39]. Chul Shin ve diğerkleri (1987) da benzer şekilde yüksek başlangıç sakkaroz konsantrasyonlarında pullulan üretiminin engellendiğini öne sürmüşlerdir [37].

Bazı fermentasyonlarda polisakkarit konsantrasyonunun maksimuma ulaştıktan sonra azaldığı gözlemlenmektedir. % 5 şeker içeren ortamda pullulan miktarı 5.günde maksimuma ulaşmış ve 6.günde azalmıştır. West ve Strohfus (1996) tarafından fermentasyonun son aşamalarında mikroorganizma tarafından endojen glukozamilaz A enzimin salgılandığı öne sürülmüştür [23]. Bu enzim üretilen polisakkaritleri olduğu kadar pullulanı da parçalayabilme özelliğine sahiptir.

Farklı substrat konsantrasyonlarının pullulan üretimi üzerindeki etkisi melaslı ortam kullanılarak incelendiğinde, % 5 başlangıç şeker konsantrasyonuna sahip ortam en iyi sonucu vermiştir [23].

Roukas (1998) sülfürik asit ile muamele edilmiş melaslı ortamda en iyi polisakkarit üretiminin % 7 başlangıç substrat konsantrasyonu ile elde edildiğini ileri sürmüştür [32].

4.5. İnokulum Miktarlarının Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde inokulum miktarlarının pullulan üretimini nasıl etkilediğini araştırmak için çalkalamalı inkübatörde 3gün, pH 7.5 ile 28°C sıcaklıkta % 5 (v/v) *Aureobasidium pullulans* ile *Kluyveromyces marxianus* 'ın % 1, % 2 ve % 3 (v/v) inokulum oranlarında denemeler yapılmıştır.

Kluyveromyces marxianus'ın farklı inokulum değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değerin % 5 (v/v) inokulum oranında *Aureobasidium pullulans* ile % 1 (v/v) inokulum oranında *Kluyveromyces marxianus*'un kullanılması ile elde edilmiştir. *Kluyveromyces marxianus*'ın inokulum oranı arttıkça biyomas miktarı artar fakat polisakkarit ve pullulan miktarı azalır.

Chul Shin ve diğerleri (1989) başlıca karbon bileşeni inülin olan yer elmasından pullulan üretiminde % 7 (v/v) *Aureobasidium pullulans* SH 8646 ve % 1 (v/v) *Kluyveromyces fragilis*'in karışık kültürünü kullanarak maksimum polisakkarit ve pullulan üretmişlerdir. *Kluyveromyces fragilis*'in inokulum oranı arttıkça biyomas değerinin arttığını fakat polisakkarit üretiminin engellediğini belirtmişlerdir [9].

İnokulum oranları [% (v/v)]				
<i>Aureobasidium pullulans</i> P56	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-Y-1165	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (g/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
5	0	20.08	15.0	6.0
5	1	24.12	17.31	5.4
5	2	18.3	13.56	7.49
5	3	16.4	11.28	8.27

Çizelge 4.2. Farklı inokulum oranlarının kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

4.6. Farklı Azot Kaynaklarının Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde farklı azot kaynaklarının polisakkarit ve pullulan üretimine etkisinin belirlenmesi için çalkalamalı inkübatörde 3gün, pH 7.5 ile 28°C sıcaklıkta, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kalsiyum nitrat ve üre farklı azot kaynağı olarak kullanılarak denemeler yapılmıştır.

En yüksek pullulan üretimi (17.31 g/l) ve polisakkarit üretimi (24.12 g/l) azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'dan elde edilmiştir. Kalsiyum nitratın biyomas oluşumu kısıtladığı görülmektedir. Yapılan deneylerin sonucu Çizelge 4.3'de tablo halinde verilmiştir.

Azot kaynakları	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (g/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
NH_4Cl	19.6	15.74	5.26
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24.12	17.31	5.4
Kalsiyum nitrat	18.48	12.84	2.72
Üre	20.1	14.0	5.03

Çizelge 4.3. Farklı azot kaynaklarının kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Auer ve Seviour (1990) sürekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktör kullanarak yaptıkları çalışmada azot kaynağının hem çeşidinin hem de konsantrasyonunun mikroorganizma tarafından azotun özümsemesiyle ilgili anahtar enzimatik sistemlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle belirli hücre içi metabolitlerin havuzunun etkilendiğini ve karbon akışının biyomas üretimi ya da polisakkarit sentezi doğrultusunda oluşunun buna göre belirlendiğini ifade etmişlerdir [1].

Reed-Hammer ve West (1994) kompleks azot kaynaklarının pullulan üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karbon kaynağı olarak sakkaroz veya mısır şurubu kullanıldığında kompleks bir azot kaynağı olarak soytonun kullanılması sonucu her iki karbon kaynağında da yüksek pullulan üretimi sağladığını belirtmişlerdir [39].

4.7. Nitrojen Kaynağı Konsantrasyonun Polisakkarit ve Pullulan Üretimi Üzerine Etkisi

Aureobasidium pullulans P56 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının karşık kültürleri ile inülin içeren ortamdan pullulan üretiminde ortamda kullanılan nitrojen kaynaklarının farklı oranda kullanılarak polisakkarit ve pullulan üretimine etkisinin belirlenmesi için çalkalamalı inkübatörde 3gün, pH 7.5 ile 28°C sıcaklıkta maya ekstratı ve amonyum sülfatın farklı oranda ortama ilave edilmesi ile denemeler yapılmıştır.

Nitrojen kaynağı konsantrasyonun polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi incelendiğinde en yüksek pullulan eldesi 17.31 g/l, nitrojen kaynağı olarak 0.1 % maya ekstratı ile 0.06 % amonyum sülfat kullanıldığı zaman gözlemlenmiştir. Maya ekstratının tek başına nitrojen kaynağı olarak kullanılması polisakkarit ve pullulan üretimini azalttığı görülmektedir. Her iki nitrojen kaynağının belli sınırlar arasında kullanılması polisakkarit ve pullulan üretimini arttırdığı görülmüştür.

Chul Shin ve diğerleri (1989) çalışmalarında kültür ortamına maya ekstratı ilave etmeden sadece amonyum sülfatı nitrojen kaynağı olarak kullanarak en yüksek ekzopolisakkarit üretimini (17 g/l) gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca maya ekstratının kültür ortamı pH'nı azaltmadan hücre gelişimine katkıda bulunduğunu fakat amonyum sülfatın ortam pH'nın düşürdüğünü ve hücre gelişimini engellediğini öne sürmüşlerdir [9].

Nitrojen kaynakları [% (v/v)]				
Maya ekstratı	Amonyum sülfat	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (g/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
0.03	0	18.78	10.03	3.53
0.05	0	19.73	10.54	4.44
0.07	0	20.15	11.56	6.92
0.1	0	21.31	11.86	7.72
0.03	0.06	19.56	12.12	4.06
0.05	0.06	20.5	13.61	4.32
0.07	0.06	21.64	15.2	4.56
0.1	0.06	24.12	17.32	5.4
0	0.03	18.99	11.54	3.57
0	0.06	21.07	11.62	4.1
0	0.1	22.53	11.78	4.27
0	0.15	16.51	7.42	8.36
0	0.3	9.3	2.7	14.76

Çizelge 4.4. Nitrojen kaynaklarının farklı oranlarının kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Amonyum sülfat konsantrasyonunun arttıkça ortam pH'nın 6.2'den 2.5'a kadar düştüğünü belirtmişlerdir. Karbon kaynağı olarak glukoz, maltoz ve sukroz kullanıldığı zaman, %0.06 amonyum sülfat içeren kültür ortamına maya ekstratı eklenmesi ekzopolisakkarit üretimini arttırdığını fakat karşık kültürler ile karbon kaynağı inülin kullanıldığı zaman ortama maya ekstratının eklenmesi ekzopolisakkarit üretimini tersine azalttığını savunmuşlardır. Maya ekstratının ekzopolisakkarit üretimini azaltmasını negatif etki olarak değerlendirselerde, *Kluyveromyces fragilis* 'in metabolik etkisini uyarmasını ve

Kluyveromyces fragilis 'in substrat tüketimini hızlandırmasınıbpozitif etki olarak belirtmişlerdir.

Seviour ve Kristiansen (1983) pullulan fermentasyonlarında amonyum sülfatın başlangıç değeri 0.06% veya daha düşük olsa bile kültür ortamındaki pH azalmasının sebebinin amonyum sülfat ile bir ilgisi olmadığını belirtmişlerdir [9].

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının co-culture ile inülin içeren ortam kullanılarak pullulan biyopolimerinin üretimi hakkında araştırma yapılmıştır. Optimum fermentasyon şartları inkübasyon süresi 3 gün, substrat konsantrasyonu 5%, pH 7.5 ve üretim sıcaklığı 28°C olarak bulundu. *Aureobasidium pullulans* P56 suşu inülin içeren ortamda maksimum 15 g/L pullulan üretmiştir. Fakat *Aureobasidium pullulans* P56 suşu ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1165 suşlarının co-culture ile inülin içeren ortamda maksimum pullulan değeri 17.31 g/L olarak bulunmuştur. Bu da co-culture yönteminin pullulan üretimini arttırdığını göstermiştir.

İnkübasyon süreleri (gün)	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (g/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
1	5.65	3.75	1.36
2	20.25	12.71	4.08
3	26.39	15.51	5.53
4	26.84	15.04	8.49
5	28.23	14.12	9.29
6	24.39	13.57	7.68

Çizelge 5.1. İnkübasyon sürelerinin polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi

Maksimum polisakkarit ve pullulan üretimi, *A.pullulans*'ın 10 saatlik öncü kültürasyonundan sonra *K.marxianus*'un inoküle edildiği zaman gerçekleşmiştir. En fazla polisakkarit (28.23 g/l) üretimi ile maksimum biyomas oluşumu (9.29 g/l) 5.günde ve maksimum pullulan (15.51 g/l) üretimi 3.günde elde edilmiştir.

Farklı başlangıç sıcaklık değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değer 28°C olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık değerleri arttıkça biyomas miktarlarında artış görülmüştür. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (26.39 g/l) değeri 30°C sıcaklıkta ve maksimum pullulan (17.31 g/l) üretimi 28°C sıcaklıkta elde edilmiştir.

Sıcaklık değerleri	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (g/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
26°C	21.54	11.61	4.6
28°C	24.12	17.31	5.4
30°C	26.39	15.51	5.53
32°C	26.32	12.1	8.3
35°C	19.43	8.62	3.72

Çizelge 5.2. Farklı başlangıç sıcaklık değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Farklı başlangıç pH değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değerin pH 7.5 olduğu belirlenmiştir. Asidik pH (2.5-5.5) değerlerinde polisakkarit ve pullulan miktarı düşerken, biyomas miktarı artar; artan pH'larda (6.5-8.5) ise polisakkarit ve pullulan üretimi yüksek ve biyomas miktarı ise düşüktür. Görüldüğü gibi en fazla polisakkarit (24.12 g/l) ve pullulan (17.31 g/l) üretimleri pH 7.5 değerinde elde edilmiştir. pH 4.5, 5.5, 6.5 ve 8.5 değerleri sırasıyla 9.3, 15.9, 21.7 ve 22.09 g/l polisakkarit ve sırasıyla 2.7, 7.83, 12.98 ve 15.02 g/l pullulan elde edilmiştir.

pH değerleri	Üretilen polisakkarit miktarı (g/l)	Üretilen pullulan miktarı (g/l)	Oluşan biyomas miktarı (g/l)
4.5	9.3	2.7	14.1
5.5	15.9	7.83	8.3
6.5	21.7	12.98	6.8
7.5	24.12	17.31	5.4
8.5	22.09	15.02	4.8

Çizelge 5.3. Farklı başlangıç pH değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarının pullulan üretimine etkisi konusunda elde edilen sonuçlar; % 3, % 5 ve % 7 substrat konsantrasyon değerlerinde sırasıyla 16.02 g/l, 24.12 g/l ve 20.34 g/l polisakkarit ve sırasıyla 9.52 g/l, 17.31 g/l ve 4.93 g/l pullulan olarak bulunmuştur. Optimum değer % 5 substrat konsantrasyonundan elde edilmiştir. Artan substrat konsantrasyonunun pullulan üretimini inhibe edici etkisi vardır.

Substrat konsantrasyonu	% 3	% 5	% 7
Üretilen polisakkarit miktarı (g/L)	16.02	24.12	20.34
Üretilen pullulan miktarı (g/L)	9.52	17.32	4.93

Çizelge 5.4. Farklı substrat konsantrasyonlarının kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar

Kluyveromyces marxianus'ın farklı inokulum değerlerinin pullulan üretimine etkisi incelendiğinde optimum değer % 5 (v/v) inokulum oranında *Aureobasidium pullulans* ile % 1 (v/v) inokulum oranında *Kluyveromyces marxianus*'un kullanılması ile elde edilmiştir. *Kluyveromyces marxianus*'ın inokulum oranı arttıkça biyomas miktarı artar fakat polisakkarit ve pullulan miktarı azalır.

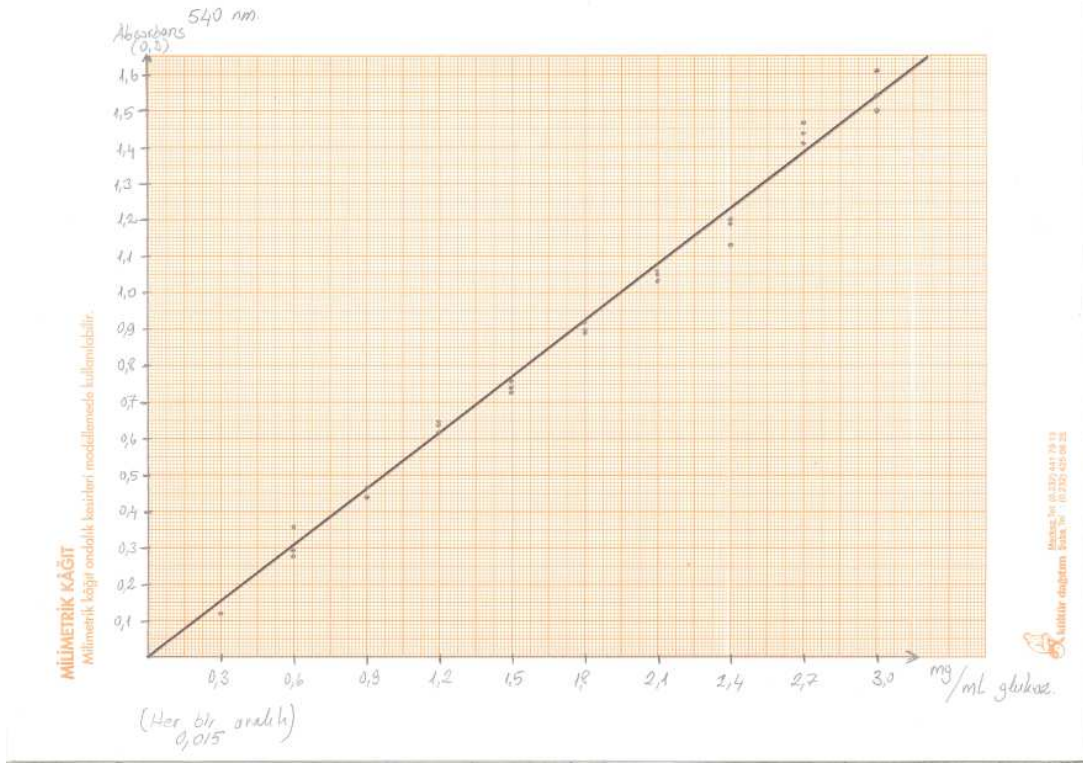
Farklı azot kaynaklarının pullulan üretimine etkisi konusunda elde edilen sonuçlar; NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, kalsiyum nitrat ve üre azot kaynaklarında sırasıyla 19.6 g/l, 24.12 g/l, 18.48 g/l ve 20.01 g/l polisakkarit ve sırasıyla 15.74 g/l, 17.31 g/l, 12.84 g/l ve 14.0 g/l pullulan olarak bulunmuştur. En iyi pullulan ve polisakkarit üretimi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'den elde edilmiştir. Nitrojen kaynağı konsantrasyonunun polisakkarit ve pullulan üretimine etkisi incelendiğinde en yüksek pullulan eldesi 17.31 g/l, nitrojen kaynağı olarak 0.1 % maya ekstratı ile 0.06 % amonyum sülfat kullanıldığı zaman gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, endüstriyel bir polisakkarit olan pullulan biyopolimeri, biyolojik olarak parçalanabilen, yağa dirençli, sıcaklıktan etkilenmeyen, oksijen geçirmeyen, toksik olmayan yapı özellikleri göstermesi ve suda çözünebilmesi nedeniyle yenilebilen filmlerin üretiminde kullanılmak için uygun bir polisakkarittir. Ayrıca, pullulan yenilebilen filmlerin üretiminin yanı sıra ilaç, kozmetik gibi pek çok sanayi alanında kullanılabilmektedir. Günümüzde birçok endüstriyel kullanım alanı bulmuş olan pullulanın, yapılan çalışmaların ışığında kullanım alanlarının gelecekte daha da artacağı açıktır.

Pullulan'ın özelliklerini göz önünde alarak kullanım alanlarını genişletmek ve iyileştirmek için araştırma yapılmalıdır. Şu zamana kadar pullulan üretimindeki tüm çalışmalar polimorfik funguslar üzerinde yapılmıştır. Bakteriler tarafından pullulan sentezi yapılıp yapılmayacağı yeni bir araştırma konusu olabilir.

EK AÇIKLAMALAR-A

ŞEKİL A.1. İNDİRGEN ŞEKER ANALİZİ ABSORBANS-KONSANTRASYON GRAFİĞİ



6. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Auer, D. P. F., and Seviour, R. J., 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 637-644.
2. Anderson P. J., McNeil K., Watson K., 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 1314-1320.
3. Anonymus (2001) Pres release. Hayashibara in worldwide license and supply agreement with Pfizer using pullulan for oral use.
http://www.hayashibara.co.jp./eng/contents_hn.html
4. Apan, M., 2007. Beyaz peynir yüzeyinde gelişen mayaların izolasyonu ve identifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73 syf.
5. Barnett, C., Smith, A., Scanlon, B and Israilides, C. J., 1999. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. *Carbohydrate polymers*, 38: 203-209.
6. Catley, B. J., 1970. Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure. *FEBS Letters*, 10: 190-193.
7. Catley, B. J., 1971a. Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by *Pullularia pullulans*. *Applied Microbiology*, 22: 650-654.
8. Catley, B. J., 1971b. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. *Applied Microbiology*, 22: 641-649.
9. Chul Shin, Y., Kim, Y. H., Lee, H. S., Cho, S. J. and Byun, S. M., 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 129-133.
10. Dağbaşı S., Güvenç U., Göksungur Y., 2008. Mikrobiyal bir polisakkarit: pullulan. *Akademik Gıda*, 6(3): 42-48.

11. Egel, Ç., 2005. *Kluyveromyces marxianus* türlerinde glikojen ve trehaloz metabolizmasının analizi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 99 syf.
12. Göksungur, Y., 1998. Melastan laktik asit üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu, doktora tezi, E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 155s (yayınlanmamış).
13. Göksungur, Y., 2004. Optimization of the production of chitosan from beet molasses by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79: 974-981.
14. Göksungur Y., Uçan A. & Güvenç U., 2004. Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology*, 28: 23-30.
15. Göksungur Y., Dağbaşı S., Uçan A. & 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.
16. Göksungur Y., Baysal, T., Güvenç, U., Harsa, Ş., Lermioğlu, F., Baysal, H., Ersus, S., Dağbaşı, S., Kandemir, N. S., 2008. *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretiminin optimizasyonu ve kimyasal koruyucu (antioksidan ve antimikrobiyal) içeren pullulan filmin orta nemli gıdaların raf ömrüne etkileri. TÜBİTAK-TOGAV 104 O 155, 1001 Araştırma Projesi Sonuç Raporu.
17. Israilides, C., Scanlon, B. Smith, A., Harding, S. E. and Jumel, K., 1994. Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 25: 203-209.
18. Kandemir, N., Yemencioğlu, A., Mecitoğlu, I., Elmacı, Z. S., Arslanoğlu, A., Göksungur, Y., Baysal, T., 2005. Production of antimicrobial films by incorporation of partially purified lysozyme into biodegradable films of crude exopolysaccharides obtained from *Aureobasidium pullulans* fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (4): 343-350.
19. Kandemir, N. S., 2006. Doğal antimikrobiyal madde içeren yenilebilir pullulan film uygulamasının hazır salatanın raf ömrüne etkileri. Yüksek lisans tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Bornova-İzmir, 101s.

20. Kurtzman, C. P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula*. *FEMS Yeast Research*, 4: 233-245.
21. Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G. and Choplin, L., 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 202-207.
22. Lane, M. M. and Morrissey, J. P., 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24: 17-26.
23. Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Roukas, T. and Izydorczyk, M., 2002. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a non pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97: 1-22.
24. Leathers, T. D., Nofsinger, G. W., Kurtzman, C. G. and Bothast, R. J., 1998. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3: 231-239.
25. Leathers, T. D., & Gupta, S. C., 1994. Production of pullulan from fuel ethanol by products by *Aureobasidium* sp. strain NRRY-12,974. *Biotechnology Letters*, 16: 1163-1166.
26. Leathers, T. D., 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 468-473.
27. Mazutti, M. A., Zabet, G., Boni, G., Skovronski, A., Oliveira, D., Luccio, M. D., Rodrigues, M. I., Mauger, F., Treichel, H., 2010. Mathematical modeling of *Kluyveromyces marxianus* growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37: 391-400.
28. Miller, G. L., 1959. Use of DNS reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
29. Ono, K., Yasuda, N., & Ueda, S., 1977. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41: 2113-2118.

30. Pollock, J. T., Thorne, L. Armentrout, R. W., 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains to produce high molecular weight pullulan with reduced pigmentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (3): 877-883.
31. Ram S. Singh, Gaganpreet K. Saini, John F. Kennedy, 2008. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73: 515-531.
32. Roukas, T., 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, 33(8): 805-810.
33. Roukas, T., 1999 a. Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22: 617-621.
34. Roukas, T., 1999 b. Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15: 447-450.
35. Roukas, T. and Liakopoulou-Kyriakides, M., 1999. Production of pullulan from beet molasses by in a stirred tank fermentor. *Journal of Food Engineering*, 40: 89-94.
36. Roukas, T. and Mantzouridou, F., 2001. Effect of the aeration rate on pullulan production and fermentation broth rheological properties in airlift reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 371-376.
37. Seviour, R. J., Stasinopoulos, S. J., Auer, D. P. F. and Gibbs, P. A., 1992. Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (3): 279-329.
38. Shengjun, W., Chen, H., Jin, Z., Tong, Q., 2010. Effect of two stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26: 737-741.
39. Uçan, A., 2003, Sentetik Ortam ve Melastan *Aureobasidium pullulans* ile Pullulan Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü (yayınlanmamış)
40. Uzunoğulları, P., 2010. Patates atığında *Aureobasidium pullulans* ile pullulan üretimi ve cevap yüzey yöntemi ile proses koşullarının optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (yayınlanmamış).
41. Ürküt, Z., Dağbaşı, S., Göksungur, Y., 2007. Optimization of pullulan production using caalginate-immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 837-846.

42. Vijendra, S. V. N., Devendra, B., Prasad, M. S., Krisha, N., Bansal, D., Nand, K., 2001. Jaggery: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CFR-77. *Process Biochemistry*, 4: 359-364.
43. West, T. P. and Reed-Hammer, B., 1993. Effect of temperature on pullulan production in relation to carbon source. *Microbios*, 75: 261-268.
44. Youssef, F., Roukas, T. and Biliaderis, C. G., 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 34: 355-366.
45. Zhenqiang, X., Shengjun, W., Saikun, P., 2011. Effect of two-stage controlled pH and temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 86: 1814-1816.