

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN FERMENTASYONLA ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR
BİLEŞİKLERİN ETKİSİ**

Hilal Nur GÜRLER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN FERMENTASYONLA ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR
BİLEŞİKLERİN ETKİSİ**

Hilal Nur GÜRLER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN FERMENYASYONLA ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR
BİLEŞİKLERİN ETKİSİ**

Hilal Nur GÜRLER
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez FYL-2019-4755 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ARALIK 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNÜLİNAZ ENZİMİNİN FERMENTASYONLA ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR
BİLEŞİKLERİN ETKİSİ**

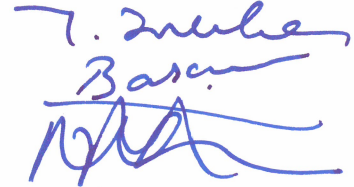
Hilal Nur GÜRLER
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 18/12/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Manolya Eser ÖNER



ÖZET

İNÜLİNAZ ENZİMİNİN FERMENTASYONLA ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR BİLEŞİKLERİN ETKİSİ

Hilal Nur GÜRLER

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Aralık 2019; 168 sayfa

Biyoteknolojik yöntemlerle inülinaz gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde son zamanlarda saf karbon kaynaklarının kullanımına alternatif olarak lignoselülozik kaynakların kullanımına ilgi artmıştır. Ancak söz konusu kaynakların karbon kaynağı olarak kullanılabilmesi için uygulanan çeşitli ön işlemler sonucunda fermentasyon ortamını etkileyecek inhibitörler oluşmaktadır. Bu aşamada son ürün üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın inhibitör bileşiklere karşı hassasiyetinin bilinmesi oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışmada inhibitör olarak farklı konsantrasyonlarda HMF (1.0-6.0 g/L), furfural (0.1-2.0 g/L), fenol (0.1-5.0 g/L), asetik asit (2.5-12.5 g/L) ve formik asit (1.5-7.0 g/L) kullanılarak *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) ile inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir inhibitör için en iyi *Iase* aktivitesinin elde edildiği fermentasyonlara 10 farklı matematiksel model (MGM, MLM, MRM, Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh) uygulanmıştır. Ayrıca tüm denemelerin sonuçları incelendikten sonra lignoselülozik materyalden gelmesi muhtemel tüm inhibitörleri içeren karışım fermentasyonunun sinerjist etkisini incelemek için Placket-Burman Dizayn kullanılmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise arpa kavuzu, yulaf kavuzu, buğday kepeği ve çavdar kepeği hidrolizatları sülfürik asit ile hidroliz edilmiş ve hidrolizatlarda inhibitör bileşen tayini yapılmıştır. Hidrolizatlar detoksifiye edilmeden fermentasyon sıvısı olarak kullanılmış olup inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon denemeleri sonucunda her inhibitör bileşik için en yüksek ve en düşük *Iase* aktivitesi HMF için 268.74 U/mL (1 g/L HMF), 62.76 U/mL (6 g/L HMF) furfural için 197.35 U/mL (0.1 g/L furfural), 5.14 U/mL (1.0 g/L furfural), fenol için 117.39 U/mL (0.1 g/L fenol), 12.57 U/mL (5 g/L fenol), asetik asit için 340.32 U/mL (2.5 g/L), 3.24 U/mL (12.5 g/L) ve formik asit için 136.83 U/mL (1.5 g/L formik asit), 312.69 U/mL (7 g/L formik asit) olarak bulunmuştur. *Iase* aktivitesinin en yüksek olduğu fermentasyonlara 10 farklı model uygulanmıştır. Modeller, model parametreleri (RMSE, MAE, AF, BF, R²) yardımıyla kıyaslanmış olup HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon için Stannard, furfural için Weibull, fenol için MGM, asetik asit için Huang ve formik asit için Weibull inülinaz üretimi açısından en uyumlu modeller olarak belirlenmiştir. İnhibitörlerin sinerjist etkisinin incelenmesi amacıyla Plackett-Burman Dizayn (PBD) ile inhibitörlerin karışım fermentasyonlarının optimizasyonunda tüm inhibitörlerin minimum (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L) konsantrasyonda olduğu fermentasyonda (3 numaralı deneme) 215.77 U/mL *Iase* aktivitesi tespit edilmiştir. Optimum karışım

fermentasyonuna ait *Iase* aktivitesinin kontrol fermentasyonundan istatistiksel olarak da farklı olmadığı görülmüştür ($P>0.05$). Çalışmanın son aşamasında ise arpa kavuzu, yulaf kavuzu, buğday kepeği ve çavdar kepeğinin seyreltik asit ile hidrolizi ile inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiş olup *Iase* aktivitesi sırasıyla 202.29, 42.03, 244.13 ve 254.60 U/mL olarak bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 20447)'nin farklı inhibitör (HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik asit) konsantrasyonlarına karşı tolerans aralıkları belirlenmiştir. Böylece mikroorganizmanın, lignoselülozik materyallerin işlenmesiyle açığa çıkması muhtemel inhibitör konsantrasyonlarına karşı tepkisi ortaya konmuştur. Ayrıca PBD ile gerçekleştirilen karışım fermentasyonları ile mikroorganizmanın tolere edebileceği inhibitör karışımı optimize edilmiştir (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L). Arpa kavuzu, çavdar kepeği ve buğday kepeği hidrolizatlarındaki inhibitör bileşik konsantrasyonlarını mikroorganizmanın tolere edebildiği ve detoksifikasyon işleminin gerek olmadığı ortaya konmuştur. Bu tez çalışması kapsamındaki gerçekleştirilen tüm fermentasyonların lignoselülozik maddeler ile gerçekleştirilecek fermentasyonlarda detoksifikasyon gibi proseslerin gerekliliğine karar verme aşamasında önemli olacağı düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: İnülinaz, inhibitör, *Aspergillus niger*, asetik asit, fenol, fermentasyon, formik asit, furfural, HMF.

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Manolya Eser ÖNER

ABSTRACT

THE EFFECT OF INHIBITOR COMPOUNDS IN THE PRODUCTION OF INULINASE ENZYME BY FERMENTATION

Hilal Nur GURLER

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

December 2019, 168 pages

The usage of lignocellulosic sources as an alternative to the pure carbon sources in the production of value-added products such as inulinase by the biotechnological process has been recently increased. However, some pretreatment methods for the use of these sources in the medium lead to the formation of inhibitors that will affect the fermentation medium. In this situation, it is very important to know the tolerance of the microorganism to inhibitory compounds to be used in the production of the value-added product. In this study, inulinase fermentations were performed by *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) using different concentrations of HMF (1.0-6.0 g/L), furfural (0.1-2.0 g/L), phenol (0.1-5.0 g/L), acetic acid (2.5-12.5 g/L) and formic acid (1.5-7.0 g/L) as an inhibitor. The ten different mathematical models (MGM, MLM, MRM, tannard, Weibull, MMF, Asymmetric, Baranyi, Huang, Fitzhugh) were applied to fermentations in which the best *Iase* activity was obtained for each inhibitor and control fermentation. In addition, the Plackett-Burman design was used to investigate the synergistic effect of mix fermentation, which contains all possible inhibitors from lignocellulosic material after data analysis. Finally, the lignocellulosic compounds such as barley husk, oat husk, wheat bran, and rye bran were hydrolyzed with dilute acid and inulinase fermentations were performed.

The highest and lowest *Iase* activity was obtained for HMF 268.74 U/mL (1 g/L HMF), 62.76 U/mL (6 g/L HMF); for furfural 197.35 U/mL (0.1 g/L furfural), 5.14 U/mL (1.0 g/L furfural), for phenol 117.39 U/mL (0.1 g/L phenol), 12.57 U/mL (5 g/L phenol), for acetic acid 340.32 U/mL (2.5 g/L), 3.24 U/mL (12.5 g/L) and for formic acid 136.83 U/mL (1.5 g/L formic acid), 312.69 U/mL (7 g/L formic acid). 10 different models were applied to fermentations with highest *Iase* activity. The models were compared with some model parameters such as RME, MAE, AF, BF, R2. The most compatible models for the production of inulinase was determined to tannard for HMF, Weibull for furfural, MGM for phenol, Huang for acetic acid, and Weibull for formic acid. Plackett-Burman Design results showed that, the *Iase* activity was determined as 215.77 U/mL in fermentations which all inhibitors were at minimum concentration (HMF=3.0 g/L, furfural= 0.1 g/L, phenol= 0.1 g/L, acetic acid= 2.5 g/L, formic acid= 3.0 g/L). The enzyme activity was not statistically different from control fermentation ($P>0.05$). Finally, inulinase fermentations were carried out by hydrolysis of barley, oat, wheat bran and rye bran with dilute acid and *Iase* activity was found to be 202.29, 42.03, 244.13 and 254.60 U/mL, respectively.

In this study, the tolerance ranges of different inhibitor (HMF, furfural, phenol, acetic acid, and formic acid) concentrations of *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 20447) were determined. Thus, it will be predetermined whether the microorganism will work at inhibitor concentrations likely to be released by lignocellulosic materials. This is considered to be important in deciding the necessity of processes such as detoxification. In addition, the mixture fermentations were optimized for the inhibitor mixture to be tolerated by the microorganism (HMF=3.0 g/L, furfural= 0.1 g/L, phenol= 0.1 g/L, acetic acid= 2.5 g/L, formic acid= 3.0 g/L). It was demonstrated that the inhibitor compound concentrations in barley, rye bran and wheat bran hydrolysates are tolerated by the microorganism and no detoxification process is required. It was thought that all fermentations performed would be important in deciding the necessity of processes such as detoxification in fermentations with lignocellulosic materials.

KEYWORDS: Inulinase, inhibitor, *Aspergillus niger*, acetic acid, phenol, fermentation, formic acid, furfural, HMF.

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

Asst. Prof. Dr. Barçın KARAKAS BUDAK

Asst. Prof. Dr. Manolya Eser ONER

ÖNSÖZ

Dünya üzerindeki nüfus artışı ile insanların gıdaya olan ihtiyaçları da her geçen gün artmaktadır. Gıda sektörünün genişlemesiyle gıda atıklarında da artış görülmektedir. Bu atıkların çevreye zarar vermemesi ve ekonomiye katkı sağlamak amacıyla çeşitli biyoteknolojik çalışmalarda kullanılması giderek yaygınlaşmıştır. Bu şekilde hem çevreci hem de ekonomik bir yaklaşım sergilenerek hem dünya ekonomisine hem de çevreye büyük katkılar sağlanmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalarda karbon kaynağı olarak saf karbon kaynağına alternatif kullanımı yaygınlaşmış olan birçok atık vardır. Arpa kepeği, yulaf kepeği, buğday kavuzu, çavdar kavuzu, mısır küspesi, keçiboynuzu atığı, melas, çay atığı gibi birçok örnek verilebilmektedir. Bu kaynaklardan inülinaz enzim üretim denemeleri birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Ülkemiz inülinaz enzimini üretmemekte bunun yerine ithal ederek kullanmaktadır. İnülinaz enzimi frukroz şurubu, fruktooligosakaritler ve inulooligosakaritlerin üretiminde kullanılan katma değeri oldukça yüksek olan bir hidrolitik enzimdir. Fakat bu hammadde kaynaklarının özellikle de lignoselülozik içerikli atıkların karbon kaynağı olarak kullanılabilmesi için boyut küçültme ve hidroliz işlemi gerekmektedir. Tüm bu işlemler sonrasında fermentasyon ortamında inhibitör olarak etki gösteren, çoğu zaman birden fazla, yan ürün meydana gelmektedir. İnhibitör bileşiklerin uzaklaştırılmadan hidrolizatın kullanılması durumunda bazen mikroorganizma gelişimi engellenmekte ve katmadeğeri yüksek ürün oluşumunu sınırlanmaktadır. Bu sebeple çeşitli detoksifikasyon yöntemleri geliştirilmiş olup bu proseslerin çoğu yüksek maliyet ve enerji kaybına sebep olmaktadır. Geliştirilmiş olan detoksifikasyon yönteminin seçimi inhibitör bileşiklerin çeşidi ve konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir. Çoğu zaman kombine sistemler ile bu bileşiklerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu aşamada mikroorganizmanın hangi konsantrasyonlardaki inhibitörü tolere edebileceği veya edemeyecenin bilinmesi detoksifikasyon yönteminin seçimi ve hatta gerekli olup olmadığına karar verme aşamasında önemli bir noktadır. *Aspergillus niger* ile inülinaz enziminin saf karbon kaynaklarına alternatif olarak görülen yenilenebilir kaynaklardan üretilmesi dünyada yaygınlaşmıştır. Fakat inhibitörlerin konsantrasyonlarının ve ortamda aynı anda birlikte bulunma etkilerini araştıran kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması bu açıktan yola çıkılarak yapılmıştır.

Bana bu konuyu araştırma fırsatı tanıyan, tüm bilgilerini benimle paylaşan, her sorun yaşadığımda yanına hiç çekinmeden gidebilme imkânı tanıyan, her zaman güler yüzü ve samimiyeti ile kıymetli vaktini sakınmadan bana ayıran, her konuşmamızda mutlaka bir cümlesiyle hayatıma yön verici anlamlar katan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan, yorulduğum zamanlarda benden desteklerini esirgemeyen, iyi günlerimde ve kötü zamanlarımda ellerini hep omzumda hissettiğim sevgili arkadaşlarım Selime Benemir ERKAN, Duygu Gizem BİLGİN ve Cansu YILMAZER'e çok teşekkür ederim. Diğer laboratuvar arkadaşlarım ve lisansüstü ofisi paylaştığım diğer tüm arkadaşlarıma özellikle teknik konularda bana her zaman destek olan Emrah EROĞLU'na teşekkür ederim. Pratik ve kolay çözümleriyle ufkumu genişleten saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ (Akdeniz Üniversitesi

Göynük Meslek Yüksek Okulu) ve pozitif enerjisi, güler yüzü ile bana mutluluk veren sevgili eşi Öğr. Gör. Dr. Hanife Aydan YATMAZ'a (Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi) teşekkür ederim. Bana yeni şeyler öğrenmemde yardımını hiçbir zaman esirgemeyen ve bildiği her şeyi paylaşmaktan asla geri durmayan hocam Mustafa GERMEÇ'e de çok teşekkür ederim.

Bu çalışmayı mali yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve TÜBİTAK BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlar Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bana karşı olan sonsuz sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan, bazen sadece analiz yapmamı bekleyerek benimle vakit geçiren, bana olan inancını her daim belli eden, düşmemem için her zaman elimi tutan sevgili arkadaşım Halil Furkan TUFAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak bana karşı her zaman sabırlı ve anlayışlı olan, maddi ve manevi her yönden benden desteklerini asla sakınmayan, sonsuz sevgileriyle benim her daim yanımda olan, beni doğru yola yönlendirmek için tavsiye ve öğütlerini benden asla sakınmayan, hayatıma her zaman ışık ve sevgi saçan canım annem Nurten GÜRLER, canım babam Aydın GÜRLER ve canım ağabeyim Volkan GÜRLER'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ.....	xxi
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Mikrobiyal İnülinaz Enzimi ve Kullanım Alanları	3
2.1.1. Fruktooligosakaritlerin üretimi	6
2.1.2. Yüksek fruktoz şurubu üretimi	6
2.2. Lignoselülozik Materyaller ve Gıda Atıklarının Fermentasyonda Kullanımı.....	7
2.2.1. Lignoselülozik materyallere uygulanan ön işlemler	7
2.2.2. Hidrolizatta oluşan inhibitör bileşikler.....	10
2.3. İnhibitör Bileşiklerin Fermentasyon Üzerine Etkisi.....	11
2.4. Matematiksel Modelleme	15
2.5. İstatistiksel Analizler	16
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizma ve Spor Sayımı	19
3.3. İnülinaz Fermentasyonu	21
3.4. Deneme Deseni.....	21
3.4.1. Kontrol ve inhibitör fermentasyonları.....	22
3.4.2. İnhibitör bileşiklerin karıştırılarak besiyerine ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar.....	22
3.4.3. Hidrolizat fermentasyonları	23
3.4.4. Lignoselülozik maddelerin seyreltik asit ile hidrolizi.....	23
3.4.4.1. Hidrolizatlarda organik asit tayini	24
3.4.4.2. Hidrolizatlarda furan ve fenoliklerin tayini	24
3.5. Fermentasyon Sıvısından Alınan Örneklerle Uygulanan Analizler	25
3.5.1. Toplam şeker analizi	25

3.5.2. İnülinaz ve invertaz-tip aktivite analizi.....	25
3.5.3. Toplam kuru biyokütle analizi	26
3.5.4. Hidrojen iyonu konsantrasyonunun (pH) belirlenmesi.....	27
3.6. Kinetik Parametreler.....	27
3.7. Matematiksel Modelleme	28
3.8. İstatistiksel Analizler.....	30
3.9. Görüntü Analizi.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Kontrol Fermentasyonu.....	31
4.1.1. Kontrol besiyerine ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi	33
4.2. HMF'nin İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar.....	36
4.2.1. 1.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon	36
4.2.2. 2.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon	37
4.2.3. 3.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon	38
4.2.4. 4.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon	39
4.2.5. 5.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon	40
4.2.6. 6.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon	41
4.2.7. HMF'nin besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi.....	42
4.2.8. Besiyerine HMF ilavesiyle gerçekleştirilen ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi.....	46
4.3. Furfural'ın İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar	49
4.3.1. 0.1 g/L furfural ilave edilen fermentasyon.....	49
4.3.2. 0.5 g/L furfural ilave edilen fermentasyon.....	50
4.3.3. 1.0 g/L, 1.5 g/L ve 2.0 g/L furfural ilave edilen fermentasyonlar	51
4.3.4. Furfuralın besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi.....	52
4.3.5. 0.1 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi.....	56
4.4. Fenol'ün İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar	59
4.4.1. 0.1 g/L fenol ilave edilen fermentasyon.....	59
4.4.2. 0.5 g/L fenol ilave edilen fermentasyon.....	60
4.4.3. 0.75 g/L fenol ilave edilen fermentasyon.....	61
4.4.4. 1.0 g/L fenol ilave edilen fermentasyon.....	62

4.4.5. 5.0 g/L fenol ilave edilen fermentasyon.....	63
4.4.6. Fenolün besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi.....	64
4.4.7. 0.1 g/L fenol ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi.....	68
4.5. Asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlar.....	71
4.5.1. 2.5 g/L asetik asit ilave edilen fermentasyon.....	71
4.5.2. 5.0 g/L asetik asit ilave edilen fermentasyon.....	72
4.5.3. 7.5, 10.0 ve 12.5 g/L asetik asit ilave edilen fermentasyonlar.....	72
4.5.4. Asetik asidin besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi.....	73
4.5.5. 2.5 g/L asetik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi.....	77
4.6. Formik Asidin İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar	80
4.6.1. 1.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	80
4.6.2. 1.5 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	81
4.6.3. 2.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	82
4.6.4. 2.5 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	83
4.6.5. 3.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	84
4.6.6. 4.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	85
4.6.7. 5.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	86
4.6.8. 7.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon	87
4.6.9. Formik asidin besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi.....	88
4.6.10. 7.0 g/L formik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi.....	92
4.7. İnhibitör Bileşiklerin Karıştırılarak Besiyeri Ortamına Eklenmesi ile Gerçekleştirilen Fermentasyonlar.....	95
4.7.1. Optimize inhibitör karışımı ile gerçekleştirilen fermentasyon.....	97
4.8. Görüntü Analizleri.....	101
4.9. Buğday Kepeği, Çavdar Kepeği, Yulaf Kavuzu ve Arpa Kavuzu Hidrolizatları Kullanılarak Gerçekleştirilen Fermentasyonlar	108
4.9.1. Buğday kepeği hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon.....	110
4.9.2. Çavdar kepeği hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon.....	110

4.9.3. Yulaf kepeği hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon	111
4.9.4. Arpa kavuzu hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon	112
4.9.5. Arpa kabuzu, yulaf kavuzu, avdar kepeği ve buğday kepeği hidrolizatları gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametrelerin değerlendirilmesi	113
5. SONUÇLAR.....	117
6. KAYNAKLAR.....	123
7. EKLER	131
ÖZGEçMİş	

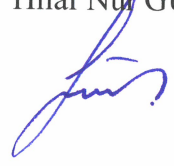


AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İnülinaz Enziminin Fermentasyonla Üretiminde İnhibitör Bileşiklerin Etkisi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

18/12/2019

Hilal Nur GÜRLER



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
A_0	: Düşük asimptot (U/mL veya g/L)
A_m	: Yüksek asimptot (U/mL veya g/L)
A_t	: “t” inci zamanda tahmin edilen değerler
B_t	: Geçiş parametresi
d	: Birimsiz bir dizayn parametresi
e	: Euler sayısı, sabit (2.718)
g	: Gram
h_0	: Hücrenin başlangıç fizyolojisini hesaplayan birimsiz bir parametre
H_t	: Geçiş parametresi
k/s	: katı/sıvı oranı
$k_{1,2,3}$	: Cevap değişkeninin potansiyel yüksek değerine yaklaşma oranı
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
N	: Normal
pH	: Hidrojen iyonlarının eksi logaritması
pK_a	: Asitlik sabitinin eksi logaritması
P_{Iase}	: Maksimum inülinaz aktivitesi (U/mL)
P_{Sase}	: Maksimum invertaz aktivitesi (U/mL)
Q	: Yüksek üretim ve tüketim hızları

Q_{lase}	: Maksimum inülinaz üretim hızı (U/mL/gün)
Q_s	: Maksimum şeker tüketim hızı (g/L/gün)
Q_{Sase}	: Maksimum invertaz üretim hızı (U/mL/gün)
R^2	: Belirleme katsayısı
Rpm	: devir/dakika
t	: Süre(gün)
T_L	: $A_t = A_m/2$ olduğu nokta
U/mL	: Unit/mL, Enzim birimi
$v_{1,2,3}$	: Şekil parametresi, birimsiz.
B	: Gelişimi kaydırma değeri
ΔS	: Şeker tüketimi (g/L)
λ	: Gecikme süresi

Tez kapsamında ondalık sayıların ayırımında ‘.’ kullanılmıştır.

Kısaltmalar

AA.	: Asetik Asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Abs	: Absorbans
ADH	: Aldehitdehidrogenaz
AF	: Kesinlik faktörü
AK	: Arpa kavuzu
ALDH	: Aldehit dehidrogenaz
ANOVA	: Varyans analizi
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)

ATP	: Adenozintrifosfat
BF	: Ön yargı faktörü
BK	: Buğday kepeği
ÇK	: Çavdar kepeği
Dk	: dakika
DNSA	: 3,5-dinitrosalisilik asit
DNSA	: DinitrosalisilikAsit
DOE	: Deneme tasarımı
Düz.KO	: Düzeltilmiş karaler ortalaması
Düz.KT	: Düzeltilmiş karaler toplamı
FA	: Formik asit
FOS	: Fruktooligosakaritler
HCl	: Hidroklorik asit
HMF	: 5-Hidroksimetil2-furfuraldehit
I/S	: İnülinaz/Sükraz oranı
<i>Iase</i>	: İnülinaz
İK	: İnhibitör konsantrasyonu
MAE	: Ortalama mutlak hata
MGM	: Modifiye Gompertz model
MLM	: Modifiye Lojistik model
MMF	: Morgan-Mercer Flodin
MRM	: Modifiye Richards model
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NaOH	: Sodyum hidroksit

NRRL	: ARS Culture Collection
P	: Olasılık
PBD	: Plackett-Burman Dizayn
PDH	: Piruvat dehidrogenaz
RMSE	: Ortalama karesel hata
<i>Sase</i>	: İnvvertaz-tip
SH	: Saf hata
ŞTO	: Şeker kullanım oranı
T	: Toplam
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
YK	: Yulaf kavuzu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnülinin kimyasal yapısı (Das vd. 2019).....	4
Şekil 2.2. İnülin üzerinde inülinazın etki mekanizması (Singh ve Singh 2010).....	5
Şekil 2.3. İnülinaz enziminin farklı alanlardaki uygulamaları (Mohan vd. 2018).....	6
Şekil 2.4. Lignoselülozik biyokütlenin ön muamele ile parçalanması (Adıgüzel 2013)	8
Şekil 2.5. Lignin, selüloz ve hemiselüloz kaynaklı inhibitörler	10
Şekil 3.1. <i>Aspergillus niger</i> ATCC® 204407'nin petri plakasında gelişmiş halinin görünümü (a) Petri plakasında gelişmiş görünümü (b) Petri plakasının alttan görünümü	20
Şekil 3.2. Spor sayımı için kullanılan mikroskop	20
Şekil 3.3. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen fermentasyonlar	21
Şekil 3.4. Sülfürik asit eklenmiş lignoselülozik hammaddeler (a) Sülfürik asit ile muamele edilmiş lignoselülozik hammaddelerin otoklav öncesi görüntüsü (b) Sülfürik asit ile muamele edilmiş lignoselülozik hammaddelerin otoklav sonrası görüntüsü.....	23
Şekil 3.5. Organik asit ve fenolik analizlerinde kullanılan HPLC cihazı	24
Şekil 3.6. İndirgen şeker analizi yapılan ve spektrofotometrede absorbansları ölçülen örnekler.....	25
Şekil 3.7. İnülinaz analizi yapılmış örnekler sırasıyla kontrol, 1.paralel ve 2.paralel.....	26
Şekil 3.8. Toplam kuru biyokütle analizi için süzülen fermentasyonu tamamlanmış örnekler.....	27
Şekil 3.9. Görüntü analizinde kullanılan mikroskop	30
Şekil 4.1. Fermentasyonun 2. ve 10.gününde tekerrürlü olmak üzere kontrol fermentasyonuna ait görüntüler.....	31
Şekil 4.2. HMF'nin inhibitör olarak ilavesiyle kullanılan fermentasyonlara ait görüntüler	36
Şekil 4.3. 1 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	37
Şekil 4.4. 2g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	38
Şekil 4.5. 3 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	39
Şekil 4.6. 4 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	40
Şekil 4.7. 5 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	41
Şekil 4.8. 6 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	42
Şekil 4.9. HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktivitelerin en yüksek olduğu günlere ait sonuçlar	43
Şekil 4.10. Furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait bazı flask fotoğrafları.....	49

Şekil 4.11. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	50
Şekil 4.12. 0.5 g/L furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	51
Şekil 4.13. Sırasıyla 1.0 g/L (a), 1.5 g/L (b) ve 2.0 g/L (c) furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlara ait sonuçlar	52
Şekil 4.14. Furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar	53
Şekil 4.15. Fenolün inhibitör olarak eklendiği fermentasyonlara ait bazı flask fotoğrafları	59
Şekil 4.16. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	60
Şekil 4.17. 0.5 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	61
Şekil 4.18. 0.75 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	62
Şekil 4.19. 1.0 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	63
Şekil 4.20. 5 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	64
Şekil 4.21. Fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar	66
Şekil 4.22. 2.5 g/L asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	71
Şekil 4.23. 5 g/L asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	72
Şekil 4.24. 7.5 g/L (a), 10.0 g/L (b) ve 12.5 g/L (c) asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlara ait sonuçlar	73
Şekil 4.25. Asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar	75
Şekil 4.26. Formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı bazı fermentasyonlara ait fotoğraflar.....	80
Şekil 4.27. 1 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	81
Şekil 4.28. 1.5 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	82
Şekil 4.29. 2 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	83
Şekil 4.30. 2.5 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	84

Şekil 4.31. 3 g/L formik asitin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	85
Şekil 4.32. 4 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	86
Şekil 4.33. 5 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	87
Şekil 4.34. 7 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar	88
Şekil 4.35. Formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar	89
Şekil 4.36. İnhibitör bileşiklerin karıştırılarak besiyeri ortamına katıldığı fermentasyona ait flask fotoğrafı	95
Şekil 4.37. İnhibitörlerin karışım olarak fermentasyon ortamına eklenerek gerçekleştirilen diğer denemelere ait sonuçlar	96
Şekil 4.38. Optimize inhibitör karışımı denemesine ait analiz sonuçları	97
Şekil 4.39. İnülinaz için inhibitör etkilerinin grafiği veri ortalamaları.....	98
Şekil 4.40. Standartlaştırılmış etkilerin Pareto grafiği. $\alpha=0.05$	98
Şekil 4.41. Kontrol fermentasyonuna ait küf gelişimini gözlemlendiği ilk ve son güne ait görüntüler	101
Şekil 4.42. HMF'nin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait görüntüler ilk ve son görüntüler (a): 1 g/L, (b): 2 g/L.....	101
Şekil 4.43. HMF'nin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait görüntüler ilk ve son görüntüler (c) 3 g/L, (d) 4 g/L, (e) 5 g/L ve (f) 6 g/L	102
Şekil 4.44. Furfuralın inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a) 0.1 g/L ve (b) 0.5 g/L....	103
Şekil 4.45. Fenolün inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a) 0.1 g/L, (b) 0.5 g/L, (c) 0.75 g/L ve (d) 1.0 g/L.....	104
Şekil 4.46. Asetik asitin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a) 2.5 g/L ve (b) 5.0 g/L....	105
Şekil 4.47. Formik asidin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a)1.0 g/L, (b)1.5 g/L, (c) 2.0 g/L, (d) 2.5 g/L.....	106
Şekil 4.48. Formik asidin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (e) 3.0 g/L (f) 4.0 g/L (g) 5.0 g/L ve (h) 7.0 g/L.....	107
Şekil 4.49. Optimize inhibitör karışımı fermentasyonuna (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit) ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler.....	108
Şekil 4.50. Lignoselülozik hidrolizatların fermentasyonundan bir fotoğraf.....	109

Şekil 4.51. Buğday kepeği hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar	110
Şekil 4.52. Çavdar kepeği hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar	111
Şekil 4.53. Yulaf kavuzu hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar	112
Şekil 4.54. Arpa kavuzu hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar...	113
Şekil 4.55. Detoksifiye edilmemiş hidrolizatlar ile yapılan fermentasyonların inülinaz ve invertaz-tip aktivite karşılaştırması	114



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Lignoselülozik biyokütleler üzerine uygulanan farklı ön işlem yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Brodeur vd. 2011).....	9
Çizelge 3.1. İnhibitör bileşikler ve konsantrasyonları	22
Çizelge 3.2. Plackett-Burman Dizayn deneme deseni (karışım fermentasyonları)	22
Çizelge 3.3. Kullanılan lignoselülozlar ve hidroliz şartları	23
Çizelge 3.4. Tüm inhibitörler ile gerçekleştirilen besiyerlerinde en yüksek aktivitenin elde edildiği konsantrasyona ait fermentasyonların deneysel verilerini modellemek için kullanılan matematiksel modeller (Germec vd. 2019)	29
Çizelge 4.1. Kontrol besiyerinde gerçekleştirilen inülinaz fermentasyonuna ait sonuçlar	32
Çizelge 4.2. Kontrol fermentasyonuna ait kinetik parametreler	32
Çizelge 4.3. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel verilerin matematiksel modellenmesi sonucu modellerin karşılaştırılması için hesaplanan model kriterleri	35
Çizelge 4.4. HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri	44
Çizelge 4.5. Besiyerinde farklı HMF konsantrasyonlarına ait fermentasyonların kinetik değerleri	45
Çizelge 4.6. 1.0 g/L HMF ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri	48
Çizelge 4.7. Furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri.....	53
Çizelge 4.8. Furfurala ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri	55
Çizelge 4.9. 0.1 g/L furfural ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri	58
Çizelge 4.10. Fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri.....	64
Çizelge 4.11. Fenole ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri.....	67
Çizelge 4.12. 0.1 g/L fenol ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri	70
Çizelge 4.13. Asetik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri.....	74
Çizelge 4.14. Asetik aside ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri	76
Çizelge 4.15. 2.5 g/L asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri.....	79
Çizelge 4.16. Formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri.....	88
Çizelge 4.17. Formik aside ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri.....	91
Çizelge 4.18. 7 g/L formik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri.....	94
Çizelge 4.19. İnülinaz için inhibitör bileşiklerin tahmini etkileri ve katsayıları	99

Çizelge 4.20. İnhibitör bileşiklerin katılmasıyla belirlenen model denklemindeki üretim oranının varyans analizi.....	99
Çizelge 4.21. Karışım denemelerinin inülinaz, invertaz-tip aktivite sonuçları ve I/S oranları.....	100
Çizelge 4.22. Placket Burman denemesinde verilen 3.fermentasyona ait kinetik değerler.....	100
Çizelge 4.23. Hidrolizatlarda tespit edilen HMF, asetik asit, furfural, formik asit ve fenol miktarları.....	109
Çizelge 4.24. AK, YK, ÇK ve BK hidrolizatıyla gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri.....	113
Çizelge 4.25. Detoksifiye edilmemiş AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatlarıyla yapılmış fermentasyonlara ait kinetik değerler.....	115



1. GİRİŞ

Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğine sahip protein yapıdaki maddelerdir (Saldamlı 1998). Enzimler kimyasal katalizörler ile karşılaştırıldığında sıcaklık, pH ve basınç gibi özellikler yönünden nispeten ılımlı sayılabilecek ortam koşullarında işlev görebilirler. Ayrıca enzimler istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olmayan spesifik katalizörlerdir (Turhan, 2015).

Günümüzde her yıl tonlarca ticari enzim üretimi yapılmaktadır ve bunların maliyeti 1.5 milyon ABD dolarından yüksektir. Artık birçok ticari enzim bitki ve hayvan kökenli olmasının yanı sıra mikrobiyal kaynaklardan da elde edilmektedir (Turhan, 2015). Üretilen bu enzimler arasında inülinazın gıda endüstrisinde kullanımı önemli bir paya sahiptir.

Aspergillus niger, GRAS (Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli Kabul edilir) statüsünde olduğundan dolayı biyoteknoloji alanında en çok kullanılan mikroorganizmalardan birisidir. Alfa-amilaz, selüloz, amiloglukosidaz, katalaz, lipaz, pektinaz ve inülinaz gibi birçok enzim *A. niger* tarafından fermentasyon ile üretilmektedir (Schuster vd. 2002).

Doğal ve düşük kalorili şekerlerin tüketimi son yıllarda büyük ölçüde artmıştır. Talepler doğrultusunda sakaroz alternatif olarak sağlıklı ve tatlılığı yüksek tatlandırıcıların üretimi ilgi görmeye başlamıştır. Fruktoz ise alternatif şekerler arasında en sağlıklı ve güvenilir olarak kabul edilmektedir (Singh vd. 2018b).

Niştastadan sonra fruktanlar bitkilerde en yaygın olarak bulunan polisakkaritlerdir. İnülin sakaroz birimiyle sonlanmış β -(2-1)-D-fruktozil-fruktoz yapısını içeren bir fruktandır (Altunbaş 2013). İnülinazlar inülini hidrolize eden enzimlerdir. Mikrobiyal inülinazlar ile tek adımlı bir enzimatik hidroliz ile %95'e kadar fruktoz elde edilebilmektedir. Bu nedenle mikrobiyal inülinazların ticari inülin hidrolizinde kullanılması önemli bir yere sahiptir (Atlıhan, 2011).

Yüksek şeker içeriğine sahip olup yeterince değerlendirilemeyen tarım ürünlerinin ve gıda atıklarının günümüzde biyoteknoloji alanında karbon kaynağı olarak kullanılması gittikçe yaygınlaşmış ve önem kazanmıştır. Bu atıklar genel olarak lignoselülozik materyaller olarak adlandırılmaktadır. Lignoselülozun başlıca bileşenleri selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Lignoselülozik biyokütle fermentasyon ortamına girmeden önce lignin, hemiselüloz ve selülozun matriksini parçalayan çeşitli ön işlemler kullanılmaktadır. Bu ön işlemlerin amacı lignin ve hemiselülozu uzaklaştırmak, selülozun kristallenmesini azaltmak ve lignoselülozun gözenekliliğini arttırmaktır. Bu işlemler sırasında fermente edilebilir şekerlerin kimyasal tahribatının ve inhibitör etkiye sahip bileşiklerin oluşumunun en az olması istenmektedir (Almeida vd. 2007).

Lignoselülozik bileşiklerin ön işlemlerle hidrolizinden sonra alınan süzüntüye hidrolizat denir. Hidrolizatta fermentasyon ortamını etkileyecek çeşitli yan ürünler oluşabilmektedir. Bu inhibitör bileşikler lignin, hemiselüloz ve selüloz kaynaklıdır.

Bunlar furfural ve hidroksimetilfurfural (HMF) gibi furanları, vanilin ve 4-hidroksibenzoik asit gibi fenoller ve asetik asit, formik asit ve levulinik asit gibi zayıf organik asitleri içermektedir (Narayanan vd. 2017). Oluşan bu maddeler fermentasyon ortamında mikroorganizmaların gelişimi üzerine inhibitör etki göstermekte ve ürün verimini yüksek oranda düşürebilmektedir. Aynı zamanda hidroliz öncesi sterilizasyon basamağında da doğrudan substrat kaynaklı inhibitör bileşikler açığa çıkabilmektedir. Bu bileşikler de inhibitör etki gösterme potansiyeline sahiptir.

Bu çalışmada GRAS statüsünde kabul edilen *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) küfü kullanılarak inülinaz enzimi üretiminde farklı konsantrasyonlarda HMF (1.0-6.0 g/L), furfural (0.1-2.0 g/L), fenol (0.1-5.0 g/L), asetik asit (2.5-12.5 g/L) ve formik asidin (1.5-7.0 g/L) fermentasyon ortamındaki etkileri araştırılmıştır. Fermentasyonlar sonucunda denenen konsantrasyonlardaki inhibitör bileşiklerin mikroorganizma üzerindeki pozitif veya negatif etkileri tespit edilmiştir. İnhibitörler ile gerçekleştirilen tüm fermentasyon denemelerinden elde edilen en iyi *Iase* üretimi olan verilere 10 farklı matematiksel model uygulanmış ve en uyumlu modeller belirlenmiştir. Ayrıca, Plackett-Burman Dizayn ile besiyeri kompozisyonuna inhibitör bileşiklerin karışım olarak eklenmesiyle fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlar ile inhibitör bileşiklerin karışım olarak besiyerinde bulunması durumunda *Iase* üretimine etkileri incelenmiştir. Deneme sonuçlarına göre *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204447) ile *Iase* üretiminde optimum karışım fermentasyonu 3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit içeren bir hidrolizatın detoksifiye edilmeden besiyeri olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Gerçekleştirilen tüm fermentasyonlarda günlük örnekler alınmış olup fermentasyon sıvısında *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407)'nin gelişiminin ilk gözlemlendiği gün ve fermentasyonun son gününe ait örneklerle görüntü analizi uygulanmıştır. Bu analiz ile inhibitör bileşiklerin hücre gelişimi üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir. İnhibitör bileşiklerin tek tek besiyerine eklenmesi ve karışım halinde eklenmesiyle yapılan fermentasyonlarda mikroorganizmanın inhibitörlere karşı olan tolerans aralıkları belirlenmiştir.

Lignoselülozik biyokütlelerin fermentasyon ortamı olarak kullanılması için hidroliz işlemi gereklidir. Bu işlem sonucunda inhibitörler ortaya çıkmaktadır. Suni bir hidrolizat ortamı olarak düşünülen karışım fermentasyonlarından sonra gerçek hidrolizat ortamlarında da inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Arpa kavuzu, yulaf kavuzu, çavdar kepeği ve buğday kepeği seyreltik sülfürik asit ile otoklavda hidroliz edilmiştir. Hidrolizatlarda doğal olarak bulunan inhibitör bileşenlerin tayini yapılmıştır. Hidrolizatlar fermentasyon sıvısı olarak kullanılmış ve böylece gerçek bir hidrolizat ortamında *Aspergillus niger* ile inülinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı lignoselülozik maddeler ile gerçekleştirilen bu fermentasyonlardan inülinaz üretmi için en iyi karbon kaynağı belirlenmiştir. Karışım denemesinden alınan sonuçlar ile hidrolizat fermentasyonlarının sonuçları karşılaştırılarak gerçekleştirilen karışım fermentasyonun doğrulanması yapılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Mikrobiyal İnülinaz Enzimi ve Kullanım Alanları

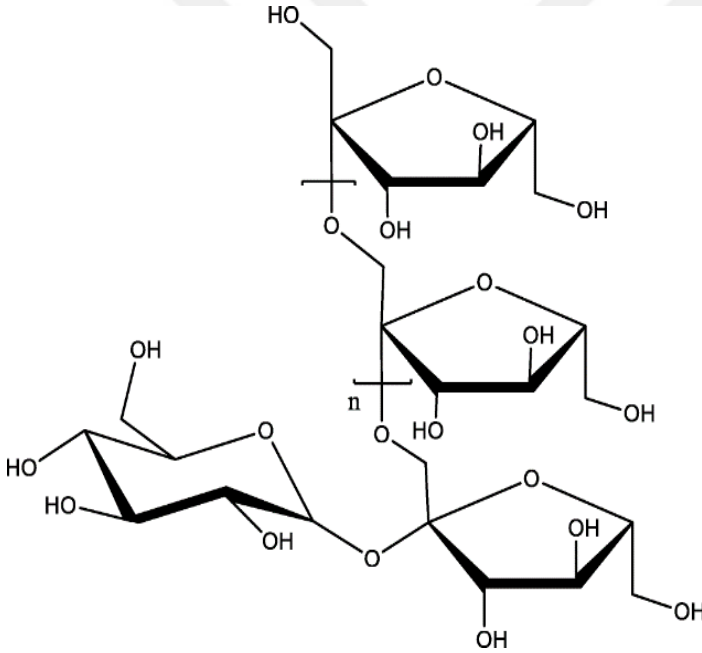
Mikrobiyal inülinazlar küfler, mayalar ve bakteriler gibi birçok mikroorganizma tarafından fermentasyon ile üretilmektedir. Mikrobiyal inülinazlar inülin üzerindeki etki tarzlarına göre hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki farklı şekilde üretilen enzimlerdir. Bazı mikroorganizmalar inülinazı hücre içi üretirken bazıları da hücre dışı üretebilmektedir. Fakat inülinaz enzimini her iki formunu üretebilen mikroorganizmaların da olduğu bilinmektedir. Endoinülinazlar (2,1- β -d-fruktan fruktanohidrolaz; EC 3.2.1.7) ana ürün olarak fruktooligosakarit elde etmek için β -2,1-fruktofuranosidik bağlarını rastgele hidrolize ederler. Ekzoinülinazlar (β -d-fruktan fruktohidrolaz; EC 3.2.1.80) ise inülini indirgen olmayan terminal uçlarından parçalayarak fruktoz ünitelerini serbest bırakırlar (Singh ve Chauhan 2017). İnülinazlar, başlıca yüksek fruktoz şurubu, fruktooligosakaritler, biyoetanol, biyoyakıtlar, sitrik asit, laktik asit gibi karbonhidrat türevli ürünlerin üretilmesinde kullanılan çok yönlü enzimler olarak da bilinmektedir (de Moura vd. 2015; Petrova vd. 2015; Singh vd. 2011; Singh ve Singh 2014; Singh vd. 2017).

Bir enzimin karakteristik ve biyokimyasal özellikleri her şeyden önce kaynağına ve aslına bağlıdır. İnülinaz üretiminin hayvanlar, bitkiler ve çeşitli mikroorganizma kaynaklı olabileceği bilinmektedir. Bir böcek türü olan *Grylodes sigillatus*'un tükürük bezlerinde ve bağırsak simbiyozlarında keşfedilmiştir. Bitkilerde ise ilk kez; bitki fruktanlarını hidrolize edebilen *Helianthus tuberosus*'un kök yumrularında rastlanmıştır. Hayvan ve bitki kaynaklı olan inülinaz enziminde verimin düşük olması, elde edinme yönteminin zor ve maliyetli olmasından dolayı ticari olarak kullanımı çok fazla tercih edilmemektedir. Bundan dolayı küfler (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. ve *Rhizoctonia solani*), mayalar (*Kluyveromyces* sp., *Pichia* sp. ve *Cryptococcus* sp.) ve bakteri (*Streptomyces* sp. ve *Xanthomonas* sp.) gibi mikrobiyal kaynaklardan inülinaz üretimi tercih edilmiştir. Mikrobiyal inülinaz üretimi için en yaygın küfler ve mayalar kullanılmaktadır. Buna nazaran bakteri kaynaklı inülinazlar hakkında çok az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bakteri kaynaklı inülinazların yüksek ısıl direnç ve basit moleküler birleşmeye sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm bu ilave özellikleri nedeniyle bakteriyel inülinaz üretimi de hızla artmaktadır (Singh vd. 2017; Verma ve Prasad 1975).

İnülinden dakikada 1 μ mol fruktoz salgılayan enzim miktarı bir birim inülinaz aktivitesi olarak tanımlanır. Dakikada 1 μ mol sakarozu hidrolize eden enzim miktarı ise bir birim invertaz-tip aktivite olarak tanımlanır (Das vd. 2019; Ettalibi ve Baratti 1987; Sharma vd. 2006).

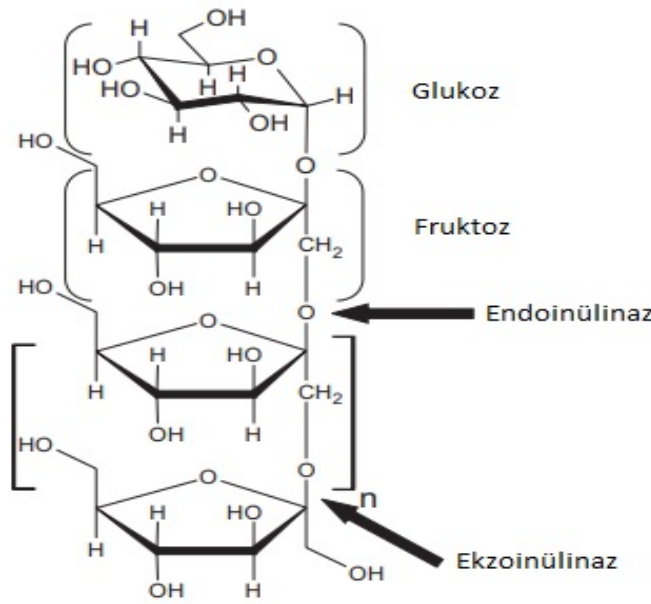
İnülin, yağ ve şekeri ikame etmesi ve diyet inülin lif içeriğinden dolayı kullanılan önemli bir besindir. Nişastadan sonra en bol bulunan depo karbonhidratı olarak bilinmektedir. β -2,1 glukozidik bağlar ile yaklaşık olarak 10 fruktoz ünitesinin bağlanması ile meydana gelmiş bir polimerdir. Polimerizasyon derecesi 2 ile 60 arasında değişiklik gösterebilir. Bunun sebebi bitkinin çeşidine, hasadına ve bitki yaşam döngüsüne göre değişiklik göstermesidir (Vandamme ve Derycke 1983).

İnülin doğal olarak hindiba, yerelması, soğan yıldızçiçeği kökü, kuşkonmaz, pırasa, muz, sarımsak, buğday gibi bitkilerin yapısında depo polisakkariti olarak bulunmaktadır. Genel olarak diyet lif olarak bilinmekle beraber diğer bilinen diyet lif kaynakların yanı sıra ağızda pütürlülük hissi vermez ve yumuşak bir kıvam alır. Su ile karıştırılması durumunda yağ ikamesi olarak kullanılabilir. Düşük zincirli fraksiyonları doğal inüline göre çözünürlüğü daha güçlü ve yüksek tatlılığa sahiptir. Diğer kalorili olmayan tatlandırıcılarla karıştırıldığında sakarozun yerini kısmen veya tamamen almak için kullanılabilir. Uzun zincirli fraksiyonlar ise daha fazla termostabil ve viskoz olarak bilinmektedir. Yağı azaltılmış ürünlerde de yağ ikamesi olarak kullanımı gerçekleştirilmektedir. İnülin bakımından zengin bitkisel kaynaklar fruktoz şurubu ve fruktooligosakaritlerin üretimi için kullanılabilir (Singh vd. 2018a). İnülin yaygın şekilde prebiyotik olarak da kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra yağ ikamesi, şeker ikamesi, tekstür geliştirici ve fonksiyonel gıda üretiminde de kullanılmaktadır. Mide sağlığında da faydalı bir etki gösterdiği bilinmektedir (Shoaib vd. 2016). İnülinaz enzimi ise yaygın olarak inülinin hidrolizinde kullanılmaktadır. İnülinin kimyasal yapısının gösterimi Şekil 2.1’de verilmiştir (Das vd. 2019).



Şekil 2.1. İnülinin kimyasal yapısı (Das vd. 2019)

Endoinülinazlar invertaz-tip aktivite göstermezken ekzoinülinazlar inülinaz ve invertaz-tip aktivitenin her ikisini de göstermektedirler. İnülinaz ve invertaz-tip arasında olan ilişki genel olarak I/S oranı ile ayırt edilir. I/S oranı 10^{-2} 'den büyük olduğunda fermentasyon sıvısındaki aktivite daha çok inülinaz aktivitesi olan enzim üretimine, 10^{-4} 'ten küçük ise yüksek invertaz-tip aktiviteye sahip enzim üretimine sahip olduğunu işaret eder (Das vd. 2019). İnülinazın inülin üzerindeki etkisini gösteren mekanizma Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Singh ve Singh 2010).



Şekil 2.2. İnülin üzerinde inülinazın etki mekanizması (Singh ve Singh 2010)

İnülinaz daha çok fruktoz üretimi için kullanılmaktadır. Fruktoz inülinin asit hidrolizi veya nişastanın enzimatik hidrolizi ile elde edilebilmektedir. Geleneksel olarak fruktoz, α -amilaz, amiloglikozidaz ve glukoz izomeras içeren çoklu enzim işlemine tabii tutularak nişastadan üretilmektedir. Bu yöntemler kullanıldığında difruktoz anhidrid gibi istenmeyen yan ürünlerin oluşması ve çok adımlı bir proses içermesinin yanı sıra yalnızca %45 fruktoz üretimi gerçekleştirilmektedir. Fruktoz veriminin yaklaşık %90'nın üzerinde olan şuruplar elde etmek için iyon değiştirme tekniği gibi çeşitli yöntemler denenmiştir. Fakat bu teknikler üretim maliyetinde artışa sebep olmaktadır. Tek adımda gerçekleşen mikrobiyal inülinazların kullanıldığı bir enzimatik reaksiyon ile yaklaşık %95 fruktoz üretilmektedir ve maliyeti geleneksel yöntemlere kıyasla daha düşüktür (Mohamed vd. 2015; Singh ve Chauhan 2017).

Geleneksel inülin hidrolizinin aksine mikrobiyal inülinazlar ile gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin fruktoz üretiminde önemli bir paya sahip olduğu ortaya konmuştur. Sakaroz ile karşılaştırıldığında fruktoz alternatif bir tatlandırıcı olarak kabul edilmektedir. Tatlılık kapasitesi sakarozla göre daha yüksektir. Fruktozun bu tatlandırıcı gücü gıda ürünlerinde lezzet kalitesinden ödün vermeden az miktarda fruktoz ile ürünün yeterince tatlandırılmasına olanak sağlar ve böylece diyet ürünlerin üretimini mümkün kılmaktadır (Lima vd. 2011). Diyabet hastaları üzerinde olumlu etkileri vardır ve çocuklarda demir emilimini arttırdığı bilinmektedir (Vandamme ve Derycke 1983). Ayrıca inülinaz uygulaması ile açığa çıkan fruktooligosakaritler düşük kalorili bir diyet lif kaynağı ve güçlü bir prebiyotik olarak fonksiyonel besinsel özelliklere sahiptir. Bu nedenle gıda endüstrisinde çikolata ve süt ürünleri endüstrisinde sakaroz yerine yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen vd. 2009). İnülinaz enziminin en çok kullanıldığı alanlar fruktooligosakaritlerin üretimi ve yüksek fruktoz şurubu üretimi olarak bilinmektedir. İnülinaz eniminin kullanım alanları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. İnülinaz enziminin farklı alanlardaki uygulamaları (Mohan vd. 2018)

2.1.1. Fruktooligosakaritlerin üretimi

Fruktooligosakaritler (FOS); birbiriyle bağlantılı bir terminal glukoz kısma sahip olan ya da olmayan fruktoz moleküllerinden oluşan bir karbonhidrat grubudur. Fruktooligosakaritler prebiyotik aktiviteye sahiptir. Birçok araştırmacının incelemeleri sonucunda FOS'un insan bağırsağındaki faydalı bakterilerin sayısını arttırabildiği ortaya koymuştur (Kondepudi vd. 2012; Salazar vd. 2015). İnsanlar ve hayvanlar üzerinde prebiyotik etkinliğinin yanında ayrıca kabızlığın azalması, mineral emiliminin iyileştirilmesi gibi önemli sonuçları da belirlenmiştir. Tüm bu sebepler FOS'un fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kullanılmasında etkili olmuş ve FOS üretimine olan ilginin artmasına sebep olmuştur (Wang vd. 2016).

2.1.2. Yüksek fruktoz şurubu üretimi

1980'lerin sonlarında yüksek fruktoz şurubu, düşük fiyat ve yüksek tatlılık kapasitesi nedeniyle önemli bir şeker ikamesi olarak ortaya konmuştur. Dahası, çıktı birimi başına daha az girdi gerektirdiği bildirilmiştir. 1987 yılında ilk kez, A. E. Staley Manufacturing Company gıda yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılmamış olan fruktoz uygulamalarını denemiştir. Şirket, Avrupa pancar şekeri üreticisi Finnsugar'dan fruktoz kristalizasyon teknolojisini lisansını almış ve yüksek fruktoz şurubunu ABD'deki farklı endüstrilere pazarlamaya başlamıştır. Yüksek fruktoz şurubu, mısır

nişastasından veya inülinin enzimatik hidrolizi ile üretilir. Bunun yanı sıra kimyasal tepkimeler kullanılarak asit hidrolizi ile de bu üretim gerçekleştirilebilmektedir. Ancak fruktoz şurubunda istenmeyen renk maddelerinin oluşması ile hidrolizatta bir bozulma olacağından dolayı asit hidrolizinin kullanımı pek tercih edilmemektedir. Bu nedenle, yüksek fruktoz şurubu üretimi için en uygun ve etkili yöntem olarak enzimatik yöntemler kabul edilmiş ve ticari olarak kullanıma ilgi artmıştır (Singh vd. 2018b).

2.2. Lignoselülozik Materyaller ve Gıda Atıklarının Fermentasyonda Kullanımı

Dünya çapında; tarımsal atıklar, tarımsal sanayi atıkları, odunsu atıklar, ormanlık atıkları, gıda işleme atıkları gibi lignoselülozik biyokütller günümüzde yenilenebilir kaynaklar olarak sınıflandırılan ve bol miktarda bulunan düşük maliyetli kaynaklardır. Lignoselülozik biyokütle selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır. Bu nedenle biyoteknolojik işlemlerle katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülen ksiloz, heksoz, pentoz, glukoz gibi şekerler bakımından zengin kaynaklar olarak bilinmektedir (Germec vd. 2017; Pienkos ve Zhang 2009; Ravindran ve Jaiswal 2016).

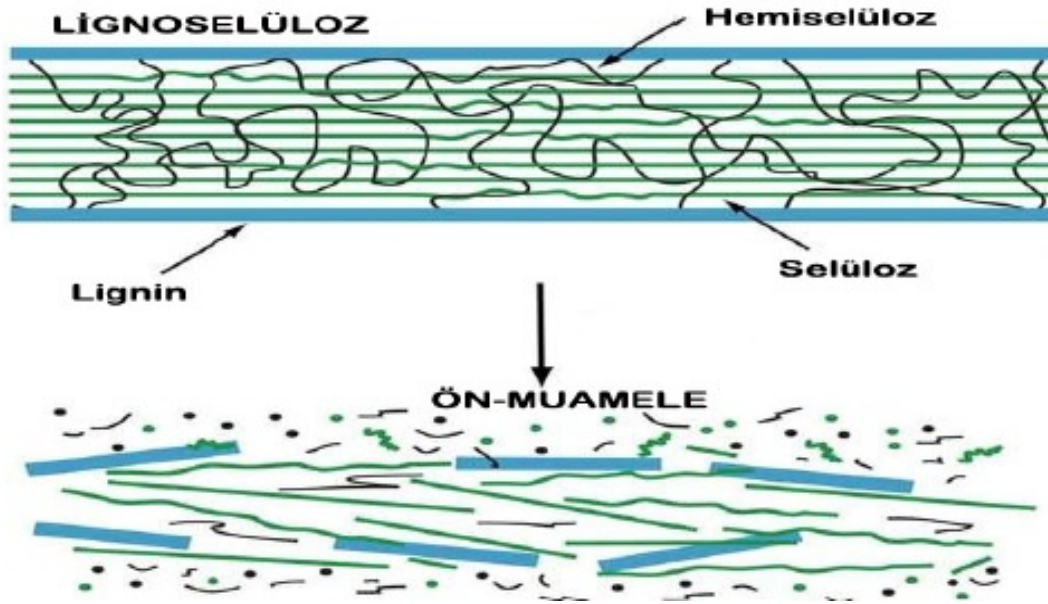
Yapısal bileşenler arasında dünyada en bol bulunan organik bileşik olan selüloz bir homopolisakarittir. β -1,4 glukoz bağlantısı olan doğrusal zincirlerden oluşur ve lignoselülozik materyalde genel olarak hücre duvarında yer alır. Hemiselüloz, hidrojen bağlarıyla selüloza ve kovalent bağları ile lignine bağlanan bir heteropolisakarittir (Şekil 2.3). 5 farklı monosakariti bünyesinde bulundurur. Bunlar D-glukoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-ksiloz ve L-arabinoz olarak sıralanabilir. Diğer taraftan lignin, p-kumarik alkol, sinapil alkol ve koniferil alkolden oluşan kompleks bir aromatik heteropolimerdir. Lignin lignoselülozik biyokütlerde hücre duvarına sağlamlık ve mikrobiyal saldırıya karşı hücre bütünlüğünü sağlamayı sağlayan amorf bir polimerdir. Hidrolizden sonra açığa çıkan hidrolizat bileşimi, lignoselülozik biyokütlenin yapısal bileşenlerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Germec vd. 2017; Loow vd. 2016; Pienkos ve Zhang 2009; Ravindran ve Jaiswal 2016).

2.2.1. Lignoselülozik materyallere uygulanan ön işlemler

Yüksek şeker içeriğine sahip olup yeterince değerlendirilemeyen tarım ürünlerinin ve gıda atıklarının günümüzde biyoteknoloji alanında substrat olarak kullanılması gittikçe yaygınlaşmış ve önem kazanmıştır. Bu atıklar genel olarak lignoselülozik materyaller olarak adlandırılmaktadır. Lignoselülozun başlıca bileşenleri selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Lignoselülozik biyokütle fermentasyon ortamına girmeden önce lignin, hemiselüloz ve selülozun matriksini parçalayan çeşitli ön işlemlere tabii tutulmaktadır. Bu ön işlemlerin amacı, lignin ve hemiselülozu uzaklaştırmak, selülozun kristallenmesini azaltmak ve lignoselülozik gözenekliliği arttırmaktır. Bu işlemler sırasında fermente edilebilir şekerlerin kimyasal tahribatının en az olması istenmektedir (Almeida vd. 2007).

Lignoselülozik malzemelerin ön işlemlerinde fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal, biyolojik ve kombine yöntemler kullanılmaktadır. Ön işlemler sonucunda lignin, hemiselüloz ve selüloz parçalanmaktadır (Şekil 2.4). Bu şekilde oluşan son ürüne hidrolizat adı verilmektedir. Ön işlem; selülozun kristalleşme derecesini azaltmak, biyokütle gözenekliliğini arttırmak ve enzim erişilebilirliğini arttırmak için gerekli bir

işlemdir. Etkili bir ön işlem ile enzim verimliliği artırılmalı, karbonhidrat kayıpları en aza indirilmeli ve yan ürün oluşumu engellenmelidir. Lignoselülozik hidrolizatta en yaygın olarak bulunan inhibitör bileşikler asetik asit, formik asit, levulinik asit, furfural, 5-hidroksimetil-2-furaldehit (HMF), vanilin, siringaldehit ve koniferil aldehit olarak sıralanabilir. Lignoselülozik biyokütlenin ön işlemler ile parçalanması Şekil 2.4'te verilmiştir. Ön işlem yönteminin seçimi kullanılacak olan hammaddenin özelliklerine ve son ürünün ihtiyaçlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ön işlem tüm bahsedilenlerden dolayı fermentasyon öncesi işlemlerin kilit noktası olarak kabul edilmektedir (Parawira ve Tekere 2011; Wyman vd. 2005; Zhang vd. 2016b). Çizelge 2.1.'de lignoselülozik biyokütleler üzerine uygulanan bazı ön işlem yöntemlerinin avantaj ve dezavantajlarını gösterilmiştir (Brodeur vd. 2011).



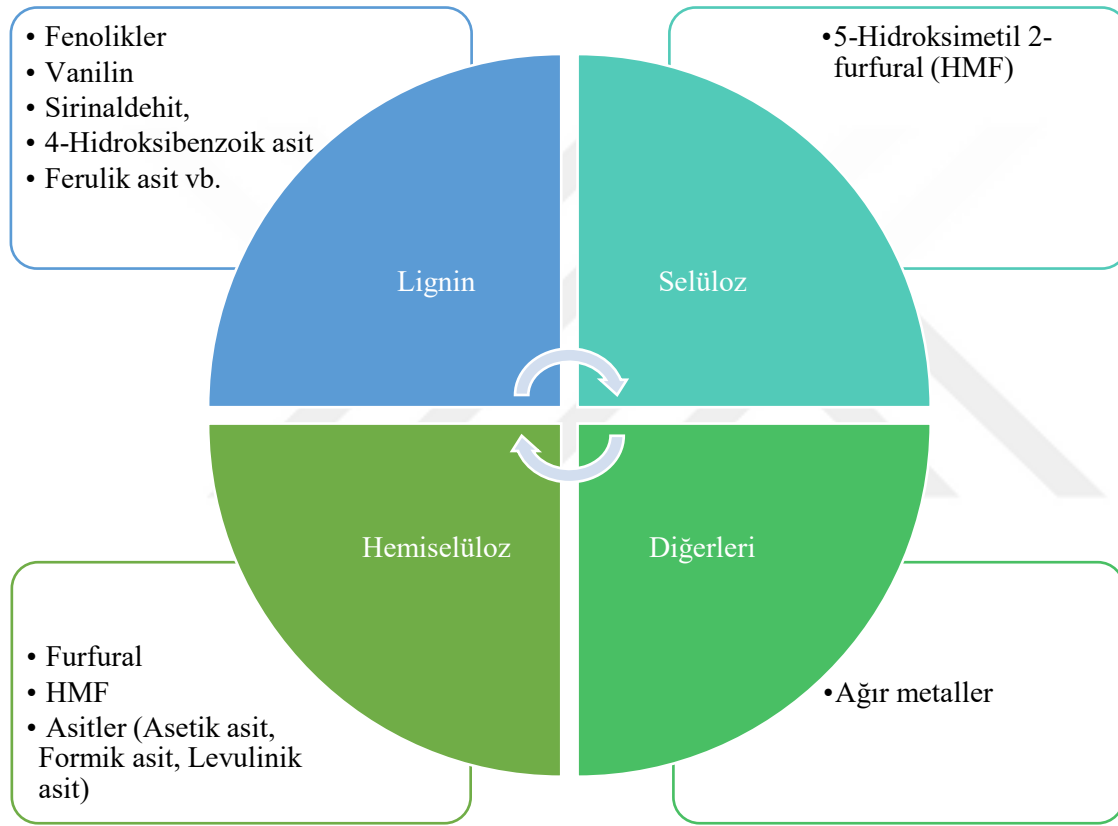
Şekil 2.4. Lignoselülozik biyokütlenin ön muamele ile parçalanması (Adıgüzel 2013)

Çizelge 2.1. Lignoselülozik biyokütleler üzerine uygulanan farklı ön işlem yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Brodeur vd. 2011)

Ön işlem yöntemleri	Avantajlar	Dezavantajlar
Alkali	- Ligninin etkili ayrılması - Düşük inhibitör konsantrasyonu	- Yüksek maliyet (Alkali katalizörü) - Lignin yapısının değiştirilmesi
Asit	- Yüksek glukoz verimi - İyi çözünmüş hemiselüloz	- Yüksek asit maliyeti ve geri kazanma ihtiyacı - Aşındırıcı maddeye dayanıklı ekipmanların yüksek maliyeti - Inhibitörlerin oluşumu
Organik Çözücü	- Lignin ve hemiselüloz hidrolizi - Ilımlı proses koşulları	- Çözücü için yüksek maliyet - Çözünün geri kazanımı ihtiyacı
Buhar	- Uygun maliyet - Lignin ve hemiselülozun parçalanması - İki aşamalı işlemde yüksek glukoz ve hemiselüloz verimi	- Yüksek lignin içerikli biyokütle için gerekli asit katalizörü ihtiyacı - Toksik bileşen oluşumu
LHW	- Hemiselülozun ayrılması - Katalizör ihtiyacının olmaması	- Yüksek enerji ve su girişi gereksinimi - Amonyak geri dönüşümü gerekmesi
AFEX	- Otsu maddeler ve düşük lignin içerikli biyokütle için yüksek verim - Selülozun daha kullanılabilir hale gelmesi - Düşük inhibitör oluşumu	- Yüksel lignin içeriğinde etkili olmaması - Amonyak maliyetinin yüksek olması
ARP	- Ligninin büyük oranda uzaklaştırılması - Muameleden sonra yüksek selüloz içeriği - Otsu bitkilerin yüksek oranda etkilenmesi	Yüksek enerji maliyeti ve sıvı yüklemesi ihtiyacı
Süperkritik akışkan	- Düşük maliyet - Düşük şeker degradasyonu	- Yüksek basınç gereksinimi - Lignin ve hemiselüloza etki etmemesi

2.2.2. Hidrolizatta oluşan inhibitör bileşikler

Hidrolizatta fermentasyon ortamında mikrobiyal gelişimi etkileyecek çeşitli yan ürünler oluşmaktadır. Bu inhibitör bileşikler lignin, hemiselüloz ve selüloz kaynaklıdır. Bunlar; furfural ve hidroksimetilfurfural (HMF) gibi furaldehitleri, vanilin ve 4-hidroksibenzoik asit gibi fenolikleri ve asetik asit, formik asit, levulinik asit gibi zayıf organik asitleri içermektedir (Narayanan vd. 2017). Oluşan bu yan ürünler fermentasyon ortamında inhibitör etki göstermekte ve ürün verimini yüksek oranlarda düşürmektedir. Aynı zamanda hidroliz öncesi sterilizasyon basamağında da doğrudan substrat kaynaklı inhibitör bileşikler açığa çıkabilmektedir. Lignin, selüloz ve hemiselüloz kaynaklı inhibitörlere örnekler Şekil 2.5’ te verilmiştir.



Şekil 2.5. Lignin, selüloz ve hemiselüloz kaynaklı inhibitörler

Hemiselüloz yapısal olarak bozunduğunda; ksiloz, mannoz, asetik asit, galaktoz ve glukoz açığa çıkar. Selüloz, glukozu hidroliz edilir. Yüksek basınç ve sıcaklık etkisiyle ksiloz, furfural konsantrasyonunu artırır. HMF ise heksoz bozunmasından oluşur. Formik asit, furfural ve HMF’nin parçalanmasıyla ortaya çıkan bir bileşiktir (Ulbricht vd. 1984). Levulinik asidin de aynı şekilde HMF’nin bozunması ile açığa çıktığı bilinmektedir. Karbonhidrat degradasyonu ve ligninin parçalanmasıyla ise fenolik bileşiklerin oluştuğu bildirilmiştir (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000; Popoff ve Theander 1976).

İnhibitör bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması için yapılan işlemler detoksifikasyon olarak bilinmektedir. Detoksifikasyon işleminde fiziksel (vakumlu evaporasyon), kimyasal (aktif kömür, diatomlu toprak, iyon değişim reçineleri, asit (H_2SO_4 , H_3PO_4) ve bazlar ($NaOH$, $Ca(OH)_2$, CaO , $NH_4(OH)$) ile besiyeri pH'ı ayarlama), biyolojik yöntemler (lakkaz ve peroksidaz) ve bunların kombinasyonu hidrolizattaki inhibitör bileşiklerin uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Detoksifikasyon yönteminin etkinliği mikroorganizmaların farklı inhibitörlere karşı tolerans aralıkları, mikroorganizmaya ve lignoselülozik biyokütleyle uygulanmış olan hidroliz yöntemine göre seçilmektedir (Germec ve Turhan 2018; Larsson vd. 1999; Mussatto ve Roberto 2004). Seçilen detoksifikasyon yöntemi kullanıldığında yüksek miktarda şeker kaybına neden olmayacak yöntemler seçilmektedir. Maliyet, süre ve enerji kaybının en az olacağı detoksifikasyon yöntemleri araştırılmaktadır.

Hidroliz işleminden sonra hidrolizatta meydana gelen inhibitör bileşiklerin tamamını tek başına ayırabilen bir detoksifikasyon işlemi bulunmamaktadır. Bu nedenle farklı detoksifikasyon yöntemleri kombine olarak uygulanmaktadır. Bu şekilde maliyet, süre ve enerji kaybı oldukça artmakta ve bu ticari olarak büyük bir sorun yaratmaktadır.

2.3. İnhibitör Bileşiklerin Fermentasyon Üzerine Etkisi

Asitler ayrışma sabitlerine bağlı olarak, negatif logaritması pKa olarak ifade edilen K_a 'ya bağlı olarak güçlü veya zayıf asit olarak sınıflanırlar. pKa, asitin ayrılmamış ve ayrılmış formunu konsantrasyonlarını eşit olduğu ve dolayısıyla asidin tamponlama kapasitesinin en yüksek olduğu pH değeridir (Atkins ve Overton 2010). Ayrılmamış asidin konsantrasyonu pH ve pKa'nın bir fonksiyonudur ve azalan pH ile artar. Asetik asit, oktanik asit, levulinik asit gibi zayıf asitler oldukça yüksek pKa değerlerine sahiptir. Bu asitlerin sıfır iyonik noktadaki pKa değerleri sırasıyla 4.75 (25°C), 4.89 (25°C) ve 4.66 (25°C)'dir. Formik asit ise bu asitlere kıyasla daha düşük pKa değerine (pKa= 3.75 (20°C)) sahiptir. Zayıf asitler hücre içerisinde ayrılmamış haldedir ve hücre içi genellikle nötrdür (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000; Soni vd. 1982). Ayrılmamış halleri hücre içinde aynı pH'da düşük konsantrasyonlarda bulunursa hücre için daha az bir toksik etki gösterir (Almeida vd. 2007). Hücrenin içerisindeki zayıf asitlerin ayrışması, sitozölü asitleştirir ve membran boyunca elektrokimyasal gradyanın bozulmasına neden olur. Hücre içi asitliğin artması durumunda hücrenin protonlarını pompalayan membran ATP hidrolizi ile ATPaz kullanılarak asitliği dengelemektedir. Bu durumda ATP miktarı azaldığı için biyokütle oluşumu azalmaktadır. Düşük konsantrasyonlardaki zayıf asit (asetik asit, levulinik asit, formik asit vb.) miktarının ATP'nin üretimine teşvik ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlardaki zayıf asitlerin ATP talebinin çok yüksek olması nedeni ile hücre sitozölünün asitlenmesinin önlenemeyeceği bildirilmektedir (Almeida vd. 2007). Formik asit de HMF yıkımının bir ürünü olarak bilinmektedir. Furfural genellikle HMF'den daha düşük seviyelerde bulunmasına rağmen çoğu zaman daha etkili bir inhibe edici etki göstermektedir. Çoğu fenolik bileşik hidroliz işlemi sırasında ligninin parçalanması veya şeker yıkımının sonucunda ortaya çıkan yan ürünlerdir (Jönsson ve Martín 2016).

Furfural ve HMF, pentoz ve heksozların hidroliz ürünleridir. Bu nedenle pentoz ve/veya heksozların ısıyla ön işleminden geçirildiği birçok biyoteknolojik işlemin

ortamında veya bu şekerlerin bulunduğu lignoselülozik malzemelerden elde edilen hidrolizatta doğal olarak oluşmaktadır. Katma değeri yüksek ürünlerin üretimi için gerçekleştirilen fermentasyonlarda kullanılan lignoselülozik hidrolizattaki bu inhibitör bileşiklerin varlığının mikroorganizmanın metabolizması üzerinde inhibe edici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Furfural ve HMF genellikle memeli hücreler, küfler, mayalar ve bakteriler gibi birçok farklı organizma üzerinde toksik etki gösterdiği kabul edilmektedir (Modig vd. 2002)

Furanlardan HMF; ADH (alkol dehidrogenaz), PDH (piruvat dehidrogenaz) ve ALDH (aldehit dehidrogenaz) enzimleri üzerine inhibisyon etkisi yapar. Furfural, HMF ile aynı etkileri göstermekle birlikte vakuol ve hücre membranı hasarına da sebep olmaktadır (Almeida vd. 2007).

Düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler veya tuzlar hücre zarına nüfus eder. Yüksek molekül ağırlıklı fermentasyon inhibitörleri, hücre zarındaki şeker ve iyon taşıyıcıların ekspresyonunu ve aktivitesini etkiler (Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000). Düşük molekül ağırlıklı fenoliklerin mikroorganizmalar için yüksek molekül ağırlıklı polifenoliklerden daha toksik olduğu fermentasyonu engellediği gösterilmiştir (Clark ve Mackie 1984; Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000; Ranatunga vd. 1997). Fenolik bileşikler hücre membranında bütünlük kaybına neden olur ve bu durum seçici geçirgenlik özelliğini etkiler. Hücre membranının enzim matriksi olarak görev yapma yeteneği etkilenir. Fenolik bileşiklerin suda çözünürlüğü sınırlı olduğunda yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin konsantrasyonları daha yüksek oranlarda denenmiştir. Çözünürlük sıvının bileşimine bağlıdır ve hidrolizatta veya tanımlanmış ortamda farklı olabilir. Bu nedenle, belirli bir bileşiğin yüksek konsantrasyonu kullanıldığında mikroorganizma tarafından gerçekten maruz kaldığı konsantrasyonun daha düşük olması mümkündür (Klinke vd. 2004; Palmqvist ve Hahn-Hägerdal 2000).

İnhibitör bileşiklerin birçok mikroorganizmanın gelişimi ve fermentasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ancak literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sıklıkla *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol üretimi üzerinde etkilerinin çalışıldığı görülmüştür. Ancak lignoselülozik materyallerin fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılan çalışmalar etanol üretimi kadar inülinaz enzimi üretimi için de çalışılmıştır. Lignoselülozik biyokütlelerin çeşitli yöntemlerle hidrolizi ile inhibitör bileşiklerin oluştuğu da yaygın olarak bilinmektedir. Ancak *Aspergillus niger* ile inülinaz enzimi üretimi üzerinde metal iyonları dışındaki inhibitör bileşiklerin etkilerini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Literatürdeki bu açıklıktan yola çıkılarak bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir. Yine *S. cerevisiae* ile etanol üretimi üzerinde inhibitör etkilerin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde inhibitörlerin glikoliz evresinde inhibe edici etkisinin olduğu görülmektedir. *Aspergillus niger* ile inülinaz enzimi üzerinde inhibitörlerin etki mekanizmasını ortaya koyan bir çalışma olmadığı için literatür taraması yapılırken ve sonuçlar tartışılırken diğer mikroorganizmaların inhibitör bileşiklerden etkilenme biçimleri ve oranları göz önüne alınmıştır. İnhibitör bileşiklerin fermentasyon üzerine etkilerini araştıran çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Lignoselülozik biyokütle, yüksek sıcaklıkta seyreltik asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz ile ham maddeye göre değişkenlik göstermekle birlikte glukoz, ksiloz, arabinoz ve galaktoz içeren şekerlerin karışımını oluşturur. Asidin çeşidine, uygulanma süresine

ve sıcaklığa bağlı olarak asetik asit, HMF ve furfural gibi birçok inhibe bileşik meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada 0.8 g/L konsantrasyonda asetik asit bulunan ortamda *Aspergillus terreus* NRRL 1972 ile itakonik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. 0.8 g/L konsantrasyondaki asetik asit itakonik asit üretiminde inhibe edici etki gösterirken 1.0 g/L asetik asit varlığı mikroorganizmayı tamamen inhibe etmiştiği ortaya konmuştur. 0.1 g/L HMF varlığında *Aspergillus terreus* NRRL 1972'nin %17 oranında inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (Saha vd. 2019).

Modig vd. (2002)'nin yaptığı çalışmada HMF ve Furfural'ın ADH, PDH ve ALDH üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Hem ALDH hem de PDH'nin furfural tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildiği ortaya konmuştur. Bu üç enzimin HMF tarafından inhibisyon etkisi de incelenmiş olup enzimlerin HMF'den furfurala kıyasla daha az etkilendiği belirtilmiştir.

Singh vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada *Kluyveromyces marxianus* YS-1'den elde edilen ekzo-inülinaz kısmi saflaştırmadan sonra Duolite A568 üzerinde immobilize edilmiştir. Immobilize ekzo-inülinaz kullanılarak yüksek fruktoz şurubu üretimi üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada ek olarak metal iyonlarının immobilize enzim sistemi üzerindeki etkisi farklı konsantrasyonlarda farklı iyonlar (Mg^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2}) kullanılarak incelenmiştir. Enzim aktivitesindeki maksimum artış (1.6 kat olmak üzere) metal iyonlarının eklenmediği kontrole kıyasla Mn^{+2} (5,0mM) ve Co^{+2} (2,5mM) ilavesi ile gözlemlenmiştir. Bu metal iyonlarını, aktiviteyi 1.3 kat arttıran Ca^{+2} (10mM) izlemiştir. Hg^{+2} ve Ag^{+2} kullanılan en düşük 1 mM konsantrasyonda bile immobilize inülinazın güçlü inhibitörleri olarak bulunmuştur. Zn^{+2} , Fe^{+2} ve EDTA immobilize enzimin başlangıç aktivitesini sırasıyla %35, %20 ve %49'una inhibe ettiği görülmüştür.

Chen vd. (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Ag^{+} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , K^{+} , Cu^{+2} , Li^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} gibi metal iyonlarının *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 ile üretilen inülinaz enzimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bahsedilen çalışmada Ag^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} 'nin inülinaz aktivitesini yüksek oranda inhibe ettiği görülmüştür. Cu^{+2} iyonunun inülinaz aktivitesi üzerine kısmen bir etkisi olduğu, Mn^{+2} ve Zn^{+2} 'nin düşük oranda etkisi gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra K^{+} , Ca^{+2} , Li^{+2} ve EDTA'nın inülinaz aktivitesi üzerinde önemli bir etki yapmadığı belirlenmiştir.

Alriksson vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus* D15 ile rekombinant endoglukanaz üretimi için fermentasyon denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerden biri mikroorganizmanın lignoselülozik hidrolizatta şeker olmayan bileşikleri metabolize edip edemeyeceğini görmek için tasarlanmıştır. Fermentasyon ortamına inhibitör bileşikler eklenerek aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. İnhibitör bileşik olarak asetik asit (5.0 g/L), furfural (1.0 g/L), HMF (2.0 g/L), vanilin (0.5 g/L), koniferil aldehit (0.2 /L) kullanılmıştır. Standart besiyeri bileşimi (kontrol) ile yapılan fermentasyonda 590 ± 4 nkat/mL aktivite gözlemlenmiştir. İnhibitör maddeler eklenerek gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde ise aktivite sırasıyla 1200 nkat/mL, 340 ± 33 nkat/mL, 500 ± 20 nkat/mL, 840 ± 79 nkat/mL ve 670 ± 2 nkat/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlara bakıldığında asetik asit, vanilin ve koniferil aldehitin endoglukanaz aktivitesini arttırdığı görülürken furfural ve HMF'nin fermentasyonu inhibe edici etkisi olduğu belirlenmiştir.

Aspergillus niger SIIM M276 ile mısır küspesi kullanılarak glukonik asit fermentasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada hücre büyümesi, glukonik asit üretkenliği (g/L/h) ve glukonik oksidaz aktivitesi üzerine inhibitör toleransı belirlenmiştir. İnhibitör bileşik olarak seyreltik asit ön işleminden elde edilen dokuz inhibitör bileşen (furfural, HMF, formik asit, asetik asit, levulinik asit, vanilin, siringaldehit, 4-hidroksibenzaldehit ve koniferilaldehit) kullanılmıştır. Furfural, *A. niger* SIIM M276'nın glukonik asit fermentasyonu üzerindeki en toksik inhibisyonu göstermiştir. Diğer taraftan, bir başka furan türeği HMF, *A. niger* SIIM M276 üzerinde daha az toksik inhibisyon göstermiştir. Formik asit düşük konsantrasyon aralığında (1.0 g/L ve 2.0 g/L,) tetikletici bir etki gösterirken artan konsantrasyonlarda (4.0 g/L) inhibe edici etki göstermiştir. *A. niger* SIIM M276'nın fermentasyonu, artan asetik asit ve levulinik asit konsantrasyonları ile azalmış, ancak 10 g/L asetik asit ve levulinik aside kadar hücre büyümesi, glukonik asit üretkenliği ve glukoz oksidaz aktivitesini korumuştur. Fenolik inhibitörler için, koniferaldehit, *A. niger* SIIM M276'nın fermentasyonu üzerinde en güçlü inhibisyonu göstermiştir (Gill vd. 2006).

Rawat vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada yeni izole edilmiş bir *Aspergillus niger* NFCCI 3879 ile karahindiba kökü kullanılarak ekzo-inülinaz üretimi gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak optimize edilmiştir. Ekzo-inülinaz kalsiyum aljinat ile immobilize edilmiş ve hindiba ŞTOundan ekstrakte edilen inülininden furuktoz eldesi için kullanılmıştır. Çalışmada ek olarak metal iyonlarının ve bazı inhibitör bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. 2 mM'lık MgSO₄, ZnSO₄, BaCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CuCl₂, FeCl₃ ve HgCl₂ solüsyonları fermentasyon ortamına eklenmiştir. İnhibitör bileşik olarak (2 mM) fenilmetilsülfonil florür (PMSF), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) kullanılmıştır. Bu çalışmada EDTA, PMSF, pCMB ve Hg⁺ nın serbest ve immobilize inülinazın inülinaz aktivitesi üzerinde güçlü bir şekilde inhibe edici etkisi olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra Mn⁺²'nin enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir.

Bir çalışmada 8 farklı organik asidin (propiyonik asit, formik asit, laktik asit, tartarik asit, sitrik asit, okzalik asit ve malik asit)'in antifungal ajan olarak 4 farklı küf (*Aspergillus flavus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus nigricans* ve *Fusarium oxysporum*) üzerindeki etklileri araştırılmıştır. *A. flavus* üzerinde en yüksek inhibisyon %45.21 olmak üzere asetik asit (%10) ile gözlemlenmiştir. Ancak tartarik asit (%5) ve sitrik asit (%5) aynı ve en düşük inhibisyon etkisini (%0.42 inhibisyon) göstermiştir. *R. nigricans* üzerinde formik asit (%10), asetik asit (%10), laktik asit (%10), tartarik asit (%10) ve sitrik asit (%10)'in etkisi sırasıyla %28.65, %26.57, %26.38, %26.19, %23.53 ve %24.48 olarak verilmiştir. Laktik asit en yüksek inhibisyon etkiyi %34.45 oranında *F.oxysporum* üzerinde göstermiştir. Çalışma kapsamında en yüksek inhibisyon formik asit ile *R.nigricans* üzerinde gözlemlenmiştir ve inhibisyon oranı %50 olarak belirtilmiştir (Hassan vd. 2015)

de Souza Abud vd. (2017) tarafından çalışmada besiyerine eklenen inhibitörlerin *Pichia stipitis* ile etanol üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmada inhibitör madde olarak asetik asit, HMF ve furfural karışımının etkisi incelenmiştir. Fermentasyon ortamını inhibe eden ana etkinin asetik asitten kaynaklandığı görülmüştür. Bu bileşenin fermentasyon inhibisyonunu önlemek için en düşük konsantrasyonda tutulması gerektiği bildirilmiştir. Furfural ve HMF, analiz edilen

konsantrasyonlardaki asetik asit ile karşılaştırıldığında etanol üretimini önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür. Bu çalışma lignoselülozik biyokütleden etanol fermentasyonunda inhibitörlerin etkisini ortaya koymuş olup verimli ve ekonomik bir etanol üretimi için gerekli detoksifikasyon yöntemleri seçimine öncü olmaktadır.

Saccharomyces cerevisiae ile etanol fermentasyonu üzerine formik asit, asetik asit, levulinik asit, furfural, HMF, siringaldehit, vanilin ve fenolün etkileri incelenmiştir. Fermentasyon ortamına eklenecek konsantrasyonlar formik asit, asetik asit ve levulinik asit için 40, 80, 120, 160 mM, furfural, HMF, siringaldehit, vanilin ve fenol için 5, 10, 20, 30 mM olarak belirlenmiştir. Etanol fermentasyonu üzerine inhibitör etkiyi belirlemek için 23.31 mM asetik asit, 8.69 mM formik asit, 5.21 mM levulinik asit, 6.24 mM furfural, 4.76 mM HMF, 0.22 mM siringaldehit, 0.26 mM vanilin ve 0.07 mM fenol karıştırılıp fermentasyon ortamına eklenmiştir. Bu çalışma sonucunda inhibitör maddelerin fermentasyon üzerindeki etkisi en güçlüden en zayıfa doğru vanilin>fenol>siringaldehit>HMF>furfural>levulinik asit>asetik asit>formik asit şeklinde bulunmuştur (Li vd. 2017).

Bu tez çalışmasında kullanılacak olan inhibitör bileşiklerin konsantrasyonları yukarıda verilen çalışmalar göz önüne alınarak belirlenmiştir.

2.4. Matematiksel Modelleme

Model, çalışmakta olan bir sistemdeki ilgilenilen değişkenler arasındaki ilişkiyi açıklamaya yardımcı olduğu bilinmektedir. Çalışılmakta olan sistem; bir biyoreaktör, tek hücre, enzim, santrifüj, HPLC kolonu gibi herhangi bir birim veya işlem ekipmanı olabilmektedir. Çalışılmakta olan alanın değişkenleri besleme hızı, sıcaklık, pH, inokülasyon oranı gibi değişkenler olduğu bilinmektedir. Bir model, matematiksel olsun ya da olmasın, çalışılan ortamda yapılan değişikliklere karşın sistemin nasıl davranacağını açıklamaya yaramaktadır (Mavituna ve Sinclair 2008).

Laboratuvar ölçekli kesikli fermentasyondan elde edilen verilere bakılarak modelleme yapılabilir. Bir bileşik veya hücrenin konsantrasyonundaki değişimlerinin zamana karşı değişikliği grafik edildiğinde dahi bir modelleme yapılabilir. Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar dahil olmak üzere bir mikroorganizmanın farklı türülleri varsa, bunların spesifik gelişim hızları, proteinin spesifik üretim hızı gibi basit modellere dayanan nicel tanımlar kullanılarak bu türler karşılaştırılabilir. Böyle bir nicel karşılaştırma mikroorganizma türüne göre istenilen özellerinkilerini geliştirmek için hangi türün seçileceği ve hangi genetik modifikasyonların yapılacağı konusunda yardımcı olabileceği bilinmektedir. Matematiksel model temelli tanımları ve terimleri kullanılarak farklı geçmişlerden bilim insanları ve mühendislerle iletişim kurulabilmekte ve tartışılabilir. Tüm bu nedenlerden dolayı matematiksel model, bilimsel bir iletişim dili olarak kabul edilmektedir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Fermentasyon ortamına yapılacak inokülasyon miktarının bir erlenmayer veya bir biyoreaktörde ne kadar hızlı gelişeceğini tahmin edebilecek bir model olduğu zaman ne kadar inokülasyon yapılacağını ve gelişimin ne zaman başlayacağını bilerek denemeler planlanabilmekte ve zaman kaybetmeden denemeler

gerçekleştirilebilmektedir. Eğer bir model varsa, neyi ölçüleceği daha önceden bilinir ve bazen bir model düşünülmeyen veya göz ardı edilen faktörlerin önemini fark etmeye yaramaktadır (Mavituna ve Sinclair 2008).

Matematiksel modeller, sistem değişkenleri, parametreleri ve ortamdaki değişkenlere cevaben sistemin davranışını tanımlamaktadır. Deney sonuçlarını yorumlamada, deney tasarlamada, hipotez oluşturmada ve test etmede kullanılmaktadırlar. Endüstriyel biyoprosesler küçük ölçekli laboratuvar deneylerinden yapılan modeller kullanılarak tasarlanmaktadır (Mavituna ve Sinclair 2008).

2.5. İstatistiksel Analizler

Deneme tasarımı (DOE) olarak da bilinen istatistiksel deney tasarımı, en az sayıda analiz ile maksimum bilgiyi elde etmek için deneylerin nasıl yapıldığını ve planlandığını gösteren bir metodolojidir (Vanaja ve Shobha Rani 2007). Bu yöntemler arasında Plackett-Burman dizayn (PBD) R.L. Plackett ve J.P. Burman tarafından 1946'da geliştirilmiştir. Daha iyi kararlar alınsın diye tasarım parametrelerinin sistem durumu üzerindeki etkilerini incelemek için tasarlanmıştır. Plackett ve Burman tarafından tasarlanan diziler, mümkün olan en küçük deneme sayısı ile ana etkilerin tahminleri için kullanılan bir tarama yöntemidir. Denemeler 4'ün katları olacak şekilde tasarlanır. Deneme sayısı faktör sayısının 1 fazlasına eşit olacak şekilde kurulur. Örneğin 8 faktörlü bir tasarımda deneme sayısı 9 olacaktır (Vanaja ve Shobha Rani 2007).

Bir PBD'de yer alan adımlar aşağıdaki gibi özetlenir (Vanaja ve Shobha Rani 2007).

- Faktörlerin seçimi
- Faktörlerin seviyelerinin tanımlanması
- Ölçülecek olan cevapların seçimi
- PBD tasarım matriksinin oluşturulması
- Rastgele ve deney düzeneğinde açıklanan deneylerin gerçekleştirilmesi
- Tasarımın çoğaltılması
- Bir model geliştirilmesi
- Etkilerin istatistiksel veya grafiksel analizi
- İstatistiksel analiz sonuçlarının yorumlanması
- Doğrulama ürünlerinin oluşturulması

Modelin iyiliğini göstermek amacıyla dört test yapılır. Bu testler uyum iyiliği, uyum eksikliği, kalıntı analizi ve model katsayılarının istatistiksel önemini içerir. Uyum iyiliği, önerilen polinom modelinde mevcut sonuçların nasıl tekrarlanabileceğini açıklar. Uyum eksikliği, temel tasarıma dahil edilmeyen deney noktaları için model ile ilgili hataların deneysel hatalara benzer olup olmadığını belirtir. Model katsayılarının önemi, cevaplara gerçek etkileri olan bağımsız değişkenleri tanımlamak, polinom denklemini azaltmak ve incelenen sistemin çıkarımlarını değerlendirmek için kullanılır. Kalıntı analizi kalıntıların normal olarak dağılıp dağılmadığını göstermek için yapılır (Sindhu vd. 2017).

Lignoselülozik maddelerin ve gıda atıklarının katma değeri yüksek son ürünlerin üretiminde kullanımı hammadde maliyetini azaltmaya yönelik önemli olarak görülmektedir. Fakat bu hammadde kaynaklarının karbon kaynağı olarak kullanılabilmesi için boyut küçültme ve hidroliz işlemi gerekmektedir. Tüm bu ön işlemler sonrasında fermentasyon ortamında inhibitör olarak etki gösteren çoğu zaman birden fazla yan ürün meydana gelmektedir. İnhibitör bileşimler uzaklaştırılmadan hidrolizatın doğrudan fermentasyon besiyeri olarak kullanılması durumunda mikroorganizma dolayısı ile de son ürün oluşumu olumsuz yönde etkilenmektedir. Detoksifikasyon yöntemleri ile bu maddeler ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Fakat bu yöntemler çoğu zaman tek başına bütün inhibitörlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayamaz dolayısı ile kombine yöntemler kullanılmak durumunda kalınır. Tek bir detoksifikasyon prosesi bile fermentasyon öncesi işlemlere dahil olduğu durumunda maliyet, süre ve enerji kayıplarında artışa neden olmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmada *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407)'nin fermentasyon ortamına ilave edilen farklı inhibitör bileşiklere ve konsantrasyonlarına karşı tolerans aralıkları belirlenip uygun matematiksel modellerle tanımlanmıştır. Bu konsantrasyonlar HMF (1.0-6.0 g/L), furfural (0.1-2.0 g/L), fenol (0.1-5.0 g/L), asetik asit (2.5-12.5 g/L) ve formik asit (1.5-7.0 g/L) olarak belirlenmiştir.

İnhibitörler besiyerine önce ayrı ayrı eklenerek tüm fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Her bir inhibitör için en iyi *Iase* aktivitesi elde edilen fermentasyonun verilerine 10 farklı matematiksel model uygulanmıştır. İnülinaz enzim aktivitesi, invertaz-tip enzim aktivitesi ve toplam indirgen şeker miktarı için en uygun modeller belirlenmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonlardan günlük örnekler alınmıştır. Mikroorganizmanın gelişmeye başladığı ilk gün ve fermentasyonun sonlandığı gün alınan örneklerle görüntü analizi yapılmıştır. Böylece inhibitör bileşiklerin söz konusu mikroorganizmanın gelişimi üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra Plackett-Burman Dizayn kullanılarak inhibitör bileşiklerin karışım durumunda besiyeri optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PBD tarafından verilen denemeler doğrultusunda optimum karışım besiyeri belirlenmiştir. Son olarak arpa kavuzu, yulaf kavuzu, buğday kepeği ve çavdar kepeği hidrolizatları besiyeri olarak kullanmış ve inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatların inhibitör bileşen içerikleri fermentasyon öncesi HPLC ile belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen tüm fermentasyonlar, alternatif karbon kaynağı olarak kullanılabilecek maddelerin hidrolizi sonucunda açığa çıkabilecek muhtemel inhibitör bileşiklerin *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) için oluşturabilecek pozitif veya negatif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında söz konusu mikroorganizma için inhibitör karışımlarından oluşan optimum besiyeri ortamı belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

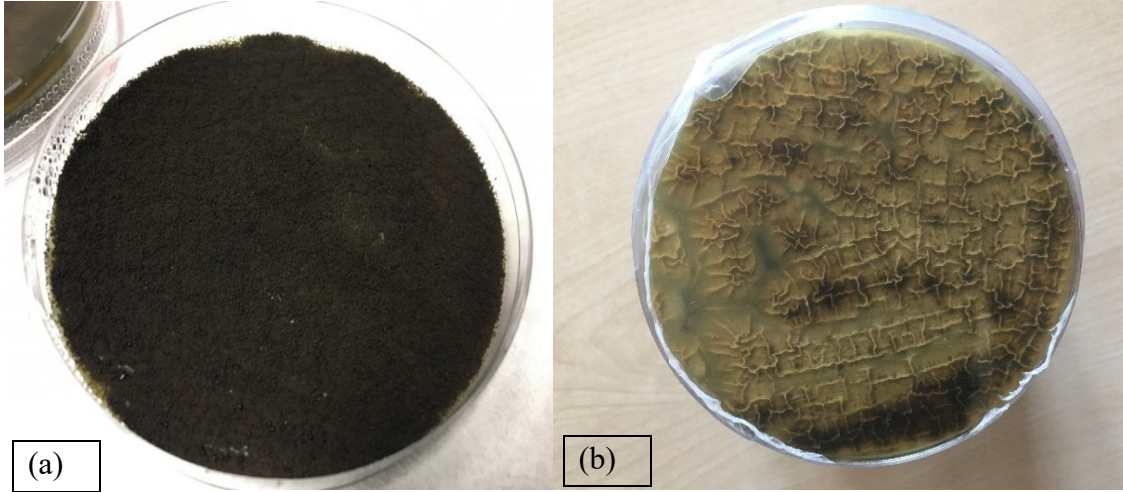
Çalışma kapsamında fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak yerel bir marketten temin edilen sakaroz (DOĞUŞ, şeker pancarından üretilen toz şeker), azot kaynağı olarak maya ekstraktı (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.03753.0500) kullanılmıştır. Bunun yanı sıra inhibitör madde olarak HMF (abcr GmbH, Germany, Lot.1222814), furfural (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot.SHBJ4422), fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot.SZBA1870V), asetik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot.SZBF1200V), ve formik asit ekstraktı (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.00264.2500) kullanılmıştır. İnülinaz enzim analizinde inülin (Acros Organics, New Jersey, USA, Lot.A0351887) kullanılmıştır. Mikroorganizma inokülasyonunda kullanılacak solüsyonu hazırlamak için Tween-80 (Merck, Schuchardt, Germany, Lot.8.22187.0500) kullanılmıştır.

3.2. Fermentasyonda Kullanılan Mikroorganizma ve Spor Sayımı

Bu çalışmada inülinaz enziminin üretiminde Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC) satın alınan *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) kullanılmıştır.

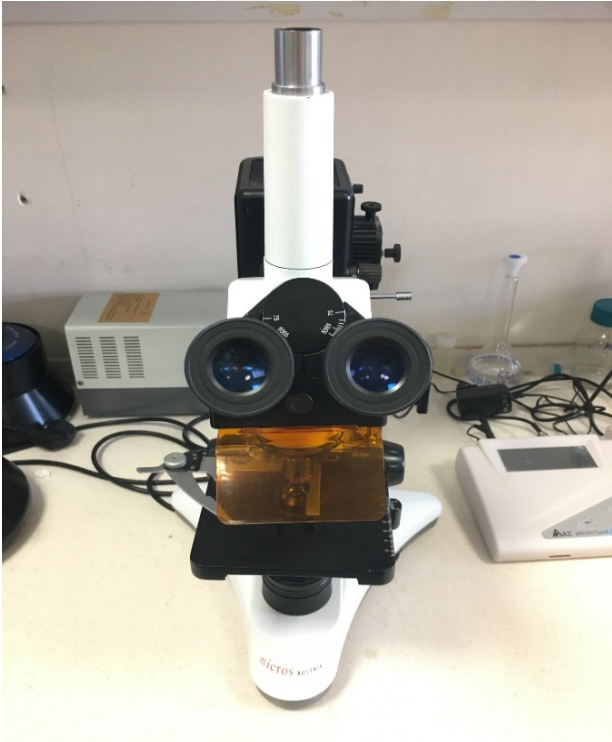
Kültürlerin ekimi malt ekstrakt agar (48 g/L) üzerinde yapılmış ve 4 gün boyunca 30°C'de etüvde (Memmert, UF 110 Plus, Schwabach, Germany) inkübasyona bırakılmıştır. Agar üzerinde gelişimini tamamlamış mikroorganizmanın petri plakasındaki ön ve arka görüntüsü Şekil 3.1'de verilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler +4°C'de depolanmış ve canlılığın korunabilmesi için on beş günde bir aynı şekilde ekim yapılmıştır. Stok kültürler %20'lik gliserol çözeltisi içerisinde uzun süreli muhafaza için -80°C'depolanmıştır.

Mikroorganizmanın fermentasyon ortamına inokülasyonu için gerekli olan %0.0001'lik Tween-80 çözeltisi hazırlanıp otoklavlanarak steril edilmiştir. İnokülasyon için gelişmiş petrilerden birinin yüzeyine hazırlanmış olan Tween-80 çözeltisinden 10 mL (2 kere) pipet yardımı ile dökülüp gezdirildikten sonra sporlar hazırlanan Tween-80 çözeltisi içerisine aktarılmıştır. Yapılacak tüm fermentasyonlar için inokülasyon yukarıda açıklanan şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır (Öngen-Baysal ve Sukan 1996).



Şekil 3.1. *Aspergillus niger* ATCC® 204407'nin petri plakasında gelişmiş halinin görünümü (a) Petri plakasında gelişmiş görünümü (b) Petri plakasının alttan görünümü

Fermentasyon ortamına inokülasyon için hazırlanan solüsyonda spor sayımı yapılmıştır. Bu sayım Thoma lamı kullanılarak mikroskop (Micros, MCX300, Austria) yardımı ile belirlenmiştir. Spor sayımında küf miselyumlarının birbirinden daha rahat ayrılmasını sağlamak amacıyla dilüsyon için %10'luk asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Thoma lamı ile mikroskopta gerçekleştirilen sayım sonucunda *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) spor sayısı 2.9×10^7 spor/mL olarak belirlenmiştir. Spor sayımında kullanılan mikroskopun görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



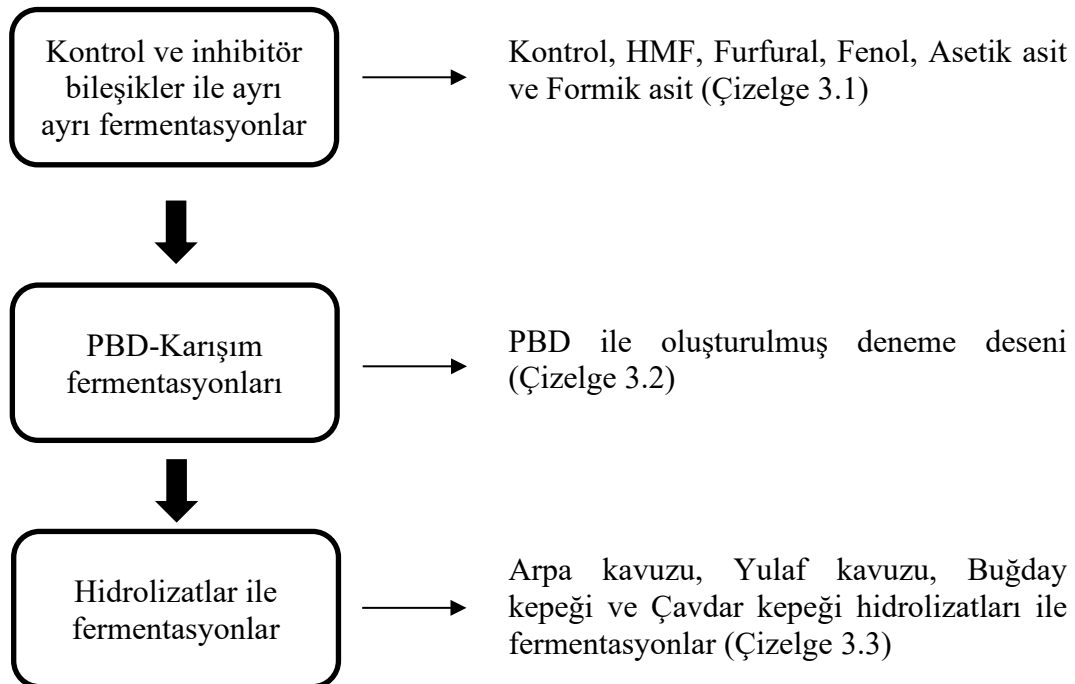
Şekil 3.2. Spor sayımı için kullanılan mikroskop

3.3. İnülinaz Fermentasyonu

Fermentasyonda karbon kaynağı olarak sakaroz kullanılmıştır. Besiyerinin başlangıç pH'si 5.0 olarak ayarlanmıştır. Maya ekstraktı (%1) ve sakaroz (%10) içeren besiyeri hazırlanmış olup bu ortam kontrol besiyeri olarak kullanılmıştır. Diğer fermentasyonlar belirlenmiş olan inhibitör bileşiklerinin besiyeri ortamına farklı konsantrasyonlarda eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Erlenler 121°C'de 15 dk boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. Steril kabinde inokülasyon yapıldıktan sonra 30 °C'de 250 rpm hızla çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Edison, Excella E24R, New Jersey, USA) fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon 10-15 gün süresince devam etmiş olup her 24 saatte bir steril kabin içerisinde erlenlerden 1 mL fermentasyon sıvısı alınıp günlük olarak analiz edilmiştir.

3.4. Deneme Deseni

Çalışmanın ilk aşamasında diğer fermentasyonların kıyaslamasında kullanılacak olan kontrol fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Kontrol fermentasyonlarından sonra 5 farklı inhibitör bileşiğin farklı konsantrasyonlarda besiyerine ayrı ayrı eklenmesiyle fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sonucunda mikroorganizmanın söz konusu inhibitör bileşiklere karşı tolerans aralıkları belirlenmiştir. Her inhibitör için Plackett-Burmann Dizayn tasarımında kullanılacak olan maksimum ve minimum noktalar belirlenmiştir. Bu noktalara göre bir deneme deseni oluşturulmuş ve karışım fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın son aşamasında arpa kavuzu, yulaf kavuzu, buğday kepeği ve çavdar kepeği hidroliz edilmiş ve hidrolizat fermentasyon sıvısı olarak kullanılmıştır. Hidrolizatların inhibitör içeriği HPLC ile belirlenmiştir. İnülinaz üretimi için en iyi hidrolizat belirlenmiştir. Şekil 3.3'te çalışma kapsamında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait bir akış şeması verilmiştir.



Şekil 3.3. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen fermentasyonlar

3.4.1. Kontrol ve inhibitör fermentasyonları

Kontrol fermentasyonu (%10 Sakaroz, %1 Maya Ekstraktı, %3 inokülasyon, 150 mL tanımlanmış besiyeri) inhibitörler ile gerçekleştirilen fermentasyonların etkisini karşılaştırabilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra 5 farklı inhibitör bileşik eklenerek fermentasyonlar ayrı ayrı yapılmıştır. İnhibitör bileşikler ve konsantrasyonları Çizelge 3.1’de verilmiştir. İnhibitör bileşiklerin konsantrasyonları literatür taraması yapılarak belirlenmiştir (Alriksson vd. 2009; de Souza Abud vd. 2017; Hasunuma ve Kondo 2012; Li vd. 2017; Lin vd. 2015; Ling vd. 2014; Lyra Colombi vd. 2018; Zhang vd. 2016a; Zou vd. 2017).

Çizelge 3.1. İnhibitör bileşikler ve konsantrasyonları

Fermentasyonlar	İnhibitör Konsantrasyonu (g/L)
Kontrol fermentasyonu	0
HMF ilavesiyle	1.0, 2.0 3.0, 4.0 ve 5.0
Furfural ilavesiyle	0.1, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0
Fenol ilavesiyle	0.1, 0.5, 0.75, 1.0 ve 5.0
Asetik asit ilavesiyle	2.5, 5.0, 7.5, 10.0 ve 12.5
Formik asit ilavesiyle	1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 ve 7.0

3.4.2. İnhibitör bileşiklerin karıştırılarak besiyerine ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar

İnhibitör bileşiklerin karışım olarak besiyerine ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar Placket-Burman dizayn ile optimize edilmiştir. Deneme deseni Çizelge 3.2’de verilmiştir. Çalışmanın bu kısmına kadar inhibitör bileşiklerin fermentasyon ortamındaki ayrı ayrı etkileri incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kısımda ise inhibitörlerin karışım olarak fermentasyon sıvısında olması durumundaki pozitif veya negatif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.2. Plackett-Burman Dizayn deneme deseni (karışım fermentasyonları)

Deneme	HMF	Furfural	Fenol	AA	FA
1	3.0	0.5	0.5	5.0	3.0
2	4.0	0.5	0.1	2.5	4.0
3	3.0	0.1	0.1	2.5	3.0
4	4.0	0.5	0.5	2.5	3.0
5	3.5	0.3	0.3	3.75	3.5
6	3.0	0.1	0.5	2.5	4.0
7	4.0	0.1	0.1	5.0	3.0
8	3.5	0.3	0.3	3.75	3.5
9	3.5	0.3	0.3	3.75	3.5
10	3.0	0.5	0.1	5.0	4.0
11	4.0	0.1	0.5	5.0	4.0

AA: Asetik asit, FA: Formik asit

3.4.3. Hidrolizat fermentasyonları

Son aşama olarak buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve arpa kavuzunun %1'lik sülfürik asit ile %12.5 k/s oranında hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatlardan örnekler alınmış olup HPLC ile inhibitör bileşen tayini gerçekleştirilmiştir. Hidrolizatlar besiyeri ortamı olarak kullanılmış olup %1 maya ekstraktı ilavesi ve %3 inokülasyon ile inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.3'te kullanılan lignoselülozik maddeler ve hidroliz koşulları verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan lignoselülozlar ve hidroliz şartları

Lignoselülozik materyal	Hidroliz şartları
Arpa Kavuzu	%1 H ₂ SO ₄ , %12.5 k/s, 121 °, 15dk
Yulaf Kavuzu	%1 H ₂ SO ₄ , %12.5 k/s, 121 °C, 15dk
Buğday Kepeği	%1 H ₂ SO ₄ , %12.5 k/s, 121 °C, 15dk
Çavdar Kepeği	%1 H ₂ SO ₄ , %12.5 k/s, 121 °C, 15dk

3.4.4. Lignoselülozik maddelerin seyreltik asit ile hidrolizi

Buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve arpa kavuzu %12.5 katı/sıvı oranında %1'lik sülfürik asitle otoklavda (Hirayama HG-50, Saitama, Japan) 120°C de 15 dk hidroliz edilmiştir (Germec ve Turhan 2018). Şekil 3.4'te hidroliz öncesi ve sonrasında ait görüntüler verilmiştir. Otoklavdan çıkartılan hammaddeler kaba filtre kâğıdı ile süzülerek besiyeri olarak kullanılacak hidrolizat elde edilmiştir. Hidrolizatlar kullanılacağı zamana kadar +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. Sülfürik asit eklenmiş lignoselülozik hammaddeler (a) Sülfürik asit ile muamele edilmiş lignoselülozik hammaddelerin otoklav öncesi görüntüsü (b) Sülfürik asit ile muamele edilmiş lignoselülozik hammaddelerin otoklav sonrası görüntüsü

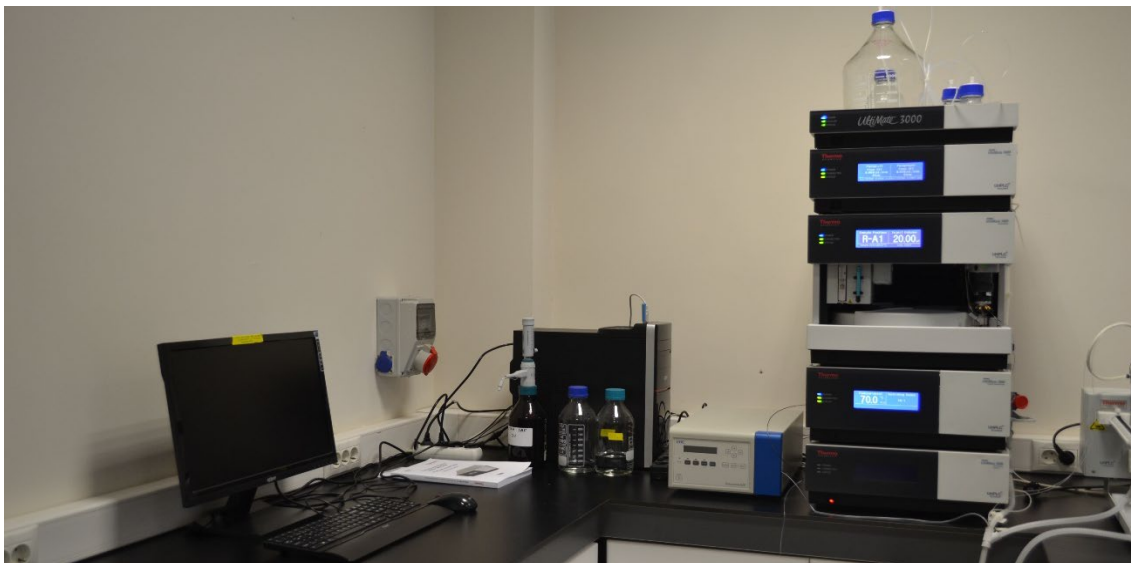
3.4.4.1. Hidrolizatlarda organik asit tayini

Arpa kavuzu, yulaf kavuzu, çavdar kepeği ve buğday kepeği hidrolizatlarından organik asit profili tayini yapılmak üzere örnek alınmıştır.

0.5 mL örnek üzerine 9.5 mL ultra saf su ile seyreltme yapılmıştır. Seyreltilmiş örnekler 0.45µm'lik filtreden geçirilerek 2mL hacmindeki viallere doldurulmuştur. Viallar otomatik örnekleyici kısmına yerleştirildikten sonra RefractoMax 520 kırılma indeksi dedektörü, otomatik örnekleyici, kolon fırını ve bilgisayar denetleyicisi ile donatılmış bir HPLC (ThermoScientific, Ultimate 3000, Waltham, MA, ABD) kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Transgenomik ICSep ICE-ORH-801 kolonunda (Apple Valley, MN) 0.01 N H₂SO₄ mobil faz ,70°C kolon sıcaklığında, 0.5 mL/dk'lık bir akış hızında, 20µL enjeksiyon hacminde 20 dk süre ile analiz edilmiştir (Germec ve Turhan 2018). Elde edilen pik alanları ile inhibitör bileşen miktarları g/L cinsinden hesaplanmıştır.

3.4.4.2. Hidrolizatlarda furan ve fenoliklerin tayini

0.5 mL örnek üzerine 9.5 mL ultra saf su ile seyreltme yapılmıştır. Seyreltilmiş örnekler 0.45µm'lik filtreden geçirilerek 2 mL hacmindeki viallere doldurulmuştur. Viallar otomatik örnekleyici kısmına yerleştirildikten sonra DionexUltimate 3000 diyot dedektörü, otomatik örnekleyici, kolon fırını ve bilgisayar denetleyicisi ile donatılmış bir HPLC (ThermoScientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. HMF ve Furfuralı örneklerden ayırmak için ODS-2 Hypersil C18 kolonu (250 x 4.6 mm, 5 µm partikül boyutu) ve mobil faz olarak 60/40 Asetonitril/H₂O çözeltisi kullanılmıştır. Mobil faz 0.4 mL/dk akış hızında 50°C kolon sıcaklığında akıtılarak kullanılmıştır. Analiz süresi 10dk olarak belirlenmiştir (Germec ve Turhan 2018). Elde edilen pik alanları ile inhibitör bileşen miktarları g/L cinsinden hesaplanmıştır. Hidrolizatlarda inhibitör bişen tayininde kullanılan HPLC cihazına ait görüntü Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Organik asit ve fenolik analizlerinde kullanılan HPLC cihazı

3.5. Fermentasyon Sıvısından Alınan Örneklerle Uygulanan Analizler

3.5.1. Toplam şeker analizi

Alınan tüm fermentasyon örneklerinin şeker analizi 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) metoduna göre yapılmıştır (Miller, 1959). Şeker analizinde kullanılan DNSA çözeltisi; 10g/L NaOH, 10 g/L 3,5-dinitrosalisilik asit ve 0.5g/L sodyum sülfidin önce saf suda çözündürülüp 1 L'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Potasyum sodyum tartarat çözeltisi ise 400 g tartılıp saf suda çözündürülüp üzeri 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Toplam şeker analizi 2 paralelli olacak şekilde çalışılmıştır. 50 µL örnek üzerine 1.95 saf su eklenip ardından 40 µL 12M HCl asit ile karıştırıldıktan sonra 90 °C'lik su banyosunda 10dk bekletilerek örneğin hidrolize edilmesi sağlanmıştır. 1. inkübasyondan sonra tüplere 100 µL 5 N KOH ilave edilip karıştırılmıştır. Daha sonra her bir tüp içerisinden 640 µL sıvı geri çekilip atılmış ve kalan karışımın üzerine 1.5 DNSA çözeltisi eklenmiştir. Aynı anda da 1.5 mL saf su üzerine 1.5 mL DNSA eklenerek kör hazırlanmıştır. Tüpler 90 °C'lik su banyosunda 15dk bekletilmiştir. Renk stabilizasyonunu sağlamak için 500 µL %40'lık potasyum sodyum tartarat çözeltisi ilave edildikten sonra solüsyonlar soğutulurak 575 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer, Şangay, Çin) absorbans değerleri belirlenerek standart sakaroz çözeltisi ile hazırlanmış kurveden örneklerin şeker miktarları hesaplanmıştır. Şeker analizi yapılan örneklerin spektrofotometre kuvvetlerindeki görüntüsü Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Şeker analizinde kullanılan standart sakaroz kurvesi EK-1'de verilmiştir.

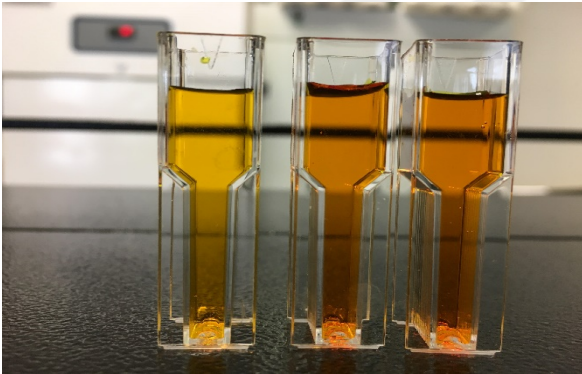


Şekil 3.6. İndirgen şeker analizi yapılan ve spektrofotometrede absorbansları ölçülen örnekler

3.5.2. İnülinaz ve invertaz-tip aktivite analizi

Erlenlerden günlük alınan örneklerin analizi yapıp inülinaz ve invertaz-tip aktivite değerleri belirlenmiştir. Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde DNSA metodu kullanılmıştır (Miller 1959). Analizde kullanmak için 0.1 M Na-asetat tamponunda (pH 4.8) %2'lik inülin ve sakaroz çözeltisi hazırlanmıştır. Enzim solüsyonu 0.1 M Na-asetat tamponu ile seyreltilmiştir. 0.1 M Na-asetat tamponu ile seyreltilmiş enzim solüsyonu karıştırılıp 100 µL'si pipet yardımı ile alınıp test tüpüne aktarılıp üzerine 900 µL inülin veya sakaroz çözeltisi eklenmiştir. Test tüpleri tekrar iyice karıştırılıp su banyosunda 60°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra test tüplerinin üzerine 1.5 mL

DNSA çözeltisi eklenmiştir. Bununla beraber kontrol örneği ile kör hazırlanmıştır. Kontrol örneği, test tüpünün içerisine 900 µL substrat (inülin veya sakaroz çözeltisi), 100 µL enzim solüsyonu ve 1.5 mL DNSA eklenerek hazırlanmıştır. Kör ise test tüpünün içerisine 900 µL inülin veya sakaroz çözeltisi, 100 µL saf su ve 1.5 mL DNSA çözeltisi eklenerek hazırlanmış ve karıştırılmıştır. 60 °C'deki inkübasyona kontrol örneği ve kör dahil edilmemiştir. Kontrol örneğinin hazırlanıp analiz edilmesinin sebebi örneklerden gelen indirgen şekerlerin absorbans değerlerinin ölçülmesidir ($Abs_{kontrol}$). Kontrol örneği ile kör ve enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tüpler 10 dk boyunca 100 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Gerçekleştirilen ikinci inkübasyonun nedeni, enzimatik reaksiyonu durdurmak ve enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimini sağlamaktır. Tüm bu işlemlerden sonra soğuyan test tüpleri köre karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution, Şangay, Çin) absorbans ölçülerek renk değişimine bağlı olarak tüm örnekler için absorbans değerleri elde edilmiştir. Enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin absorbans değeri test tüplerinden elde edilen absorbans değerlerinden kontrol örneğinin absorbans değerinden çıkarılması ile hesaplanmıştır. Bu değer standart fruktoz kurvesinde yerine koyularak enzim aktivitesi belirlenmiştir. İnülinaz analizi yapılmış örneklerin spektrofotometrik ölçüm öncesine ait bir görüntü Şekil 3.7'de verilmiştir. Enzim analizinde kullanılan standart fruktoz kurvesi EK-2'de verilmiştir.



Şekil 3.7. İnülinaz analizi yapılmış örnekler sırasıyla kontrol, 1.paralel ve 2.paralel

İnülinaz aktivitesinin belirlenmesinde Denklem 1 kullanılmıştır.

$$\text{İnülinaz aktivitesi} = \frac{Y \times RV \times DF}{t} \quad \text{Denklem (1)}$$

DF: Dilüsyon faktörü

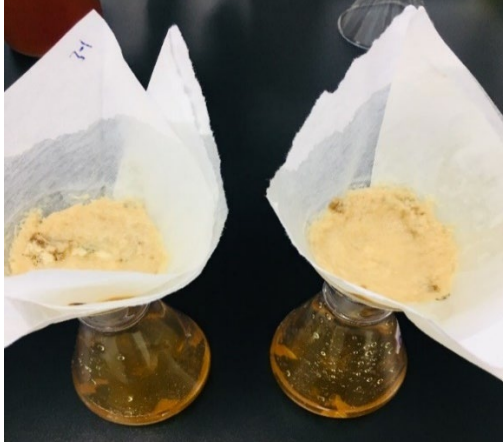
RV: test tüpündeki toplam hacim/enzim solüsyonunun hacmi

t: reaksiyonda kalma zamanı (dk)

3.5.3. Toplam kuru biyokütle analizi

Her fermentasyondan sonra 65°C etüvde toplam kuru biyokütle analizi yapılmıştır. Şekil 3.8'de analiz için süzülen örneklere ait bir görüntü verilmiştir. Analizden önce kullanılacak olan petri+filtre kâğıdı 65°C'de kurutulmuş ve darası

alınmıştır. Erlenler kaba filtre kağıdından süzülerek petri üzerinde 65°C’de sabit tartıma gelene kadar her 24 saatte bir tartım alınmıştır (Öztürk, 2008).



Şekil 3.8. Toplam kuru biyokütle analizi için süzülen fermentasyonu tamamlanmış örnekler

3.5.4. Hidrojen iyonu konsantrasyonunun (pH) belirlenmesi

Besiyeri hazırlandıktan sonra sıvının pH’ı 5’e ayarlanmıştır. Fermentasyon süresi boyunca pH kontrolü gerçekleştirilmemiş olup fermentasyonun son günü biyokütlesi ayrılan fermente sıvının pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. (Metler-Toledo AG, 8603 Achwezenbacj, Switzerland).

3.6. Kinetik Parametreler

Tüm veriler doğrultusunda her fermentasyon için şeker tüketimi, enzim üretimi, maksimum tüketim hızı, maksimum üretim hızı ve şeker tüketim oranı hesaplanmıştır. Bahsedilen parametrelerin hesaplanmasında kullanılan ilgili denklemler aşağıda verilmiştir.

$$\text{Şeker tüketimi: } \Delta S \text{ (g/L)} = S_0 - S_{\min} \quad \text{Denklem (2)}$$

$$\text{Şeker tüketim oranı: (\%)} = ((S_0 - S_{\min}) / S_0) \times 100 \quad \text{Denklem (3)}$$

$$\text{Maksimum tüketim hızı (Q}_s\text{, g/L/h)} = (-ds/dt)_{\max} \quad \text{Denklem (4)}$$

$$\text{Maksimum üretim hızı (Q}_p\text{, U/mL/gün)} = (dp/dt)_{\max} \quad \text{Denklem (5)}$$

$$\text{Enzim üretimi: P (U/mL)} = P_{\max} \quad \text{Denklem (6)}$$

S_0 : Başlangıç şeker konsantrasyonu (g/L)

$S_{\min}$: En düşük şeker konsantrasyonu (g/L)

$(-ds/dt)_{\max}$: Zamana göre maksimum şeker tüketim hızı

$(dp/dt)_{\max}$: Zamana göre maksimum enzim üretim hızı

$P_{\max}$: Maksimum enzim üretimi (U/mL)

3.7. Matematiksel Modelleme

Kontrol fermentasyonu (%10 sakaroz, %1 maya ekstraktı, %3 inokülasyon) ve inhibitör bileşiklerin besiyeri ortamına eklenerek yapılan diğer bütün fermentasyonlarda analiz sonuçlarına göre en yüksek inülinaz aktivitesi alınan fermentasyon denemelerine matematiksel modeller yapılmıştır. Belirlenen fermentasyonlarda toplam indirgen şeker miktarı ve enzim üretimi (inülinaz ve invertaz-tip) sonuçları 10 farklı modele (MGM, MLM, MRM, Stannard, Weilbull, MMF, Asimetrik, Baranyi, Huang, Fitzhugh) uygulanmış olup her ürün için en iyi model belirlenmiştir. Çizelge 3.4’te modeller için kullanılan denklemler verilmiştir.

Modellerin değerlendirilmesinde RMSE, MAE, R^2 , AF ve BF değerleri kullanılmıştır. Bu değerlerin hesaplamaları Microsoft Office Excel 2017 programı yardımıyla hesaplanmıştır. RMSE, biyoteknolojik işlemlerde veya diğer işlemlerde modelin verileri tahmin etmede uyumlu olup olmadığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda MAE de model değerlendirilmesinde kullanılan bir veridir. RMSE ve MAE hesaplamasında kullanılan eşitlikler aşağıda verilmiştir.

$$RMSE = \sqrt{[\sum_{i=1}^n (xi - yi)^2]/n} \quad i=1,2,\dots \quad \text{Denklem (7)}$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |xi - yi| \quad i=1,2,\dots \quad \text{Denklem (8)}$$

Tahmin edilen veriler matematiksel modeller kullanılarak belirlendikten sonra deneysel verilere göre grafiğe edildi ve buna göre R^2 değerleri belirlendi. Bunun yanı sıra modelleri doğrulamak için AF ve BF değerleri de kullanıldı. AF, deneysel ve tahmin edilen veriler arasındaki ortalama farkın bir ölçüsüdür. BF bir modelden elde edilen tahmin edilen değerler ile deneysel değer arasındaki farkı ifade etmektedir. BF ve AF değerlerinin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler aşağıda verilmiştir.

$$BF = 10^{\sum_{i=1}^n \frac{\log (xi/yi)}{n}} \quad \text{Denklem (9)}$$

$$AF = 10^{\sum_{i=1}^n \frac{|\log (yi/xi)|}{n}} \quad \text{Denklem (10)}$$

Germec vd. (2019) tarafından farklı modellerin değerlendirilmesi için inülinaz ve invertaz enzim üretimi ve toplam indirgen şeker miktarı ile ilgili deneysel ve tahmin edilen veriler kullanılarak RMSE, MAE, R^2 , BF ve AF değerleri hesaplanmıştır. RMSE ve MAE’nin en düşük, R^2 ’nin 1’e en yakın olduğu modeller iyi olarak kabul edilmektedir. Bu kriterler yanı sıra AF ve BF değerlerinin de 1’e yakın olması modelin uyumlu olduğu anlamına gelmektedir. Tipik olarak, $1.00 \leq AF < 1.20$ ise, model “iyi” dir; $1.20 \leq AF \leq 1.30$ ise, model “kabul edilebilir”; ve eğer $AF > 1.30$ ise, model “kabul edilemez” dir. Matematiksel modellerin başarısını belirlemek için, BF değerleri $0.95 \leq BF \leq 1.11$ ise, model “iyi” dir; $0.87 \leq BF < 0.95$ veya $1.11 < BF \leq 1.43$ ise, model “kabul edilebilir”; ve eğer $BF < 0.87$ veya $BF > 1.43$ ise, model “kabul edilemez” dir (Germec vd. 2019).

Çizelge 3.4. Tüm inhibitörler ile gerçekleştirilen besiyerlerinde en yüksek aktivitenin elde edildiği konsantrasyona ait fermentasyonların deneysel verilerini modellemek için kullanılan matematiksel modeller (Germec vd. 2019)

Modeller	Model denklemi	Kaynak
MGM	$A_t = A_o + (A_m - A_o) \times \exp \left[-\exp \left\{ \frac{Q \times e \times (\lambda - t)}{A_m} + 1 \right\} \right]$	(Zwietering vd. 1990)
MLM	$A_t = A_o + \frac{A_m - A_o}{1 + \exp \left(\frac{4 \times Q \times (\lambda - t)}{A_m} + 2 \right)}$	(Zwietering vd. 1990)
MRM	$A_t = A_o + \frac{A_m - A_o}{\left\{ 1 + v_1 \times \exp(1 + v_1) \times \exp \left(\frac{Q \times (1 + v_1)^{(1 + \frac{1}{v_1})} \times (\lambda - t)}{A_m} \right) \right\}^{\left(\frac{1}{v_1} \right)}}$	(Zwietering vd. 1990)
Stannard	$A_t = A_o + \frac{A_m - A_o}{\left[1 + \exp \left(-\frac{\beta + Q \times t}{v_2} \right) \right]^{v_2}}$	(Stannard vd. 1985)
Weibull	$A_t = A_m - (A_m - A_o) \times \exp[-(k_1 \times t)^{\delta_1}]$	(Weibull 1951)
MMF	$A_t = A_m - \frac{(A_m - A_o)}{1 + (k_2 \times t)^{\delta_2}}$	(Morgan vd. 1975)
Asimetrik	$A_t = A_o + (A_m - A_o) \times \left[1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{T_L} \right)^d} \right]$	(Dantigny vd. 2011)
Baranyi	$A_t = A_o + Q \times B_t - \ln \left[1 + \frac{\exp(Q \times B_t) - 1}{\exp(A_m - A_o)} \right]$ $B_t = t + \frac{1}{Q} \times \ln[\exp(-Q \times t) + \exp(-h_o) - \exp(-Q \times t - h_o)]$	(Baranyi ve Roberts 1994)
Huang	$A_t = A_o + A_m - \ln[\exp(A_o) + [\exp(A_m) - \exp(A_o)] \times \exp(-Q \times H_t)]$ $H_t = t + \frac{1}{a} \times \ln \left[\frac{1 + \exp(-a \times (t - \lambda))}{1 + \exp(a \times \lambda)} \right]$	(Huang 2013)
Fitzhugh	$A_t = A_o + (A_m - A_o) \times [1 - \exp(-k_3 \times t)]^{v_3} \quad (10)$	(Fitzhugh Jr 1976)

3.8. İstatistiksel Analizler

İnhibitör bileşiklerin karıştırılarak kullanıldığı fermentasyonlara ait deneme deseni Minitab İstatistiksel yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA, USA) kullanılarak yapılmıştır. Program tarafından oluşturulan modelin deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı ANOVA ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her faktörün cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güven aralığında tespit edilmiştir. Ayrıca inhibitörler ile ayrı ayrı gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinin analiz sonuçlarına ait kinetik verilerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması SAS İstatistiksel yazılımı (Version 9; SAS Institute Inc.) kullanılarak yapılmıştır. Çizelgelerde verilen değerler arasında karşılaştırmalar sütunlar arası yapılmıştır. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi %95 önem seviyesinde gerçekleştirilmiştir ($P=0.05$). Tüm kinetik değerler en az iki tekerrürün ortalaması şeklinde verilmiş olup tablolarda ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edilmiştir.

3.9. Görüntü Analizi

Kontrol fermentasyonu ve inhibitörlerin ayrı ayrı fermentasyon ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda küf gelişiminin gözle görülür olarak başladığı ilk gün ve fermentasyonun son günü örnekler alınmış olup mikroskop yardımıyla (Zeiss, Stemi 2000-c, Almanya) görüntü analizi gerçekleştirilmiştir. Görüntüler mikroskoba entegre bir fotoğraf makinesi ile çekilmiştir. Görüntü analizlerinde kullanılan mikroskop Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.9. Görüntü analizinde kullanılan mikroskop

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kontrol Fermentasyonu

Çalışma kapsamında inhibitör bileşiklerin inülinaz fermentasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kullanılan inhibitör bileşenlerin fermentasyon üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla tekerrürlü olmak üzere 3 kere kontrol fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde karbon kaynağı olarak sakaroz (%10) ve azot kaynağı olarak maya ekstraktı (%1) kullanılmış olup 150 mL çalışma hacminde %3 inokülasyon oranı ile çalışılmıştır. Bu fermentasyonlar besiyeri ortamına hiçbir inhibitör bileşen dahil edilmeden kontrol besiyeri ortamında gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyonun başında küf hücreleri boncuk formda iken fermentasyonun devamında hifler parçalanarak sıvı içerisinde dağılmış bir görüntü almaktadır. Kontrol fermentasyonuna ait 2.gün ve 10.günde çekilen flask fotoğrafları Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Fermentasyonun 2. ve 10.gününde tekerrürlü olmak üzere kontrol fermentasyonuna ait görüntüler

Optimum besiyeri koşulunda gerçekleştirilen ve kontrol olarak kullanılan inülinaz fermentasyonuna ait sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Sonuçlar maksimum *Iase* aktivitesinin 202.95 U/mL, maksimum *Sase* aktivitesinin ise 156.91 U/mL olduğunu göstermektedir. I/S oranlarından enzimin inülinaz doğasında olduğu açıkça ($I/S=1.55$, yani $I/S>10^{-2}$) anlaşılmaktadır. Başlangıç şeker içeriği 85.77 g/L iken fermentasyonun son gününde şeker miktarının 0.94 g/L’ye düştüğü hesaplanmıştır. Fermentasyon sonunda süzülen ortamda pH ölçümü gerçekleştirilmiş ve pH’nın 5.0 başlangıçtan 3.02’ye düştüğü belirlenmiştir. Toplam kuru biyokütle miktarı 5.532 g/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Kontrol besiyerinde gerçekleştirilen inülinaz fermentasyonuna ait sonuçlar

Fermentasyon süresi (Gün)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S oranı	Şeker (g/L)
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	85.77±1.64
1	11.30±0.00	2.24±2.24	3.22±0.97	81.73±0.18
2	22.00±6.36	18.13±8.19	1.21±0.07	79.66±0.30
3	56.82±3.79	42.59±0.10	1.33±0.12	72.74±0.15
4	81.01±3.01	84.06±0.49	0.96±0.05	63.20±1.25
5	126.45±0.72	105.55±10.23	1.20±0.11	51.82±0.63
6	134.05±3.62	149.06±20.12	0.90±0.09	43.53±0.31
7	146.57±0.28	156.91±10.53	0.93±0.06	41.02±0.77
8	163.80±7.91	145.11±11.79	1.13±0.17	29.66±1.12
9	202.95±9.48	130.83±3.65	1.55±0.06	22.34±0.14
10	198.81±12.40	146.43±26.56	1.36±0.13	15.20±0.05
11	191.99±8.27	88.68±8.28	2.16±0.07	7.73±0.00
12	155.20±13.61	62.13±9.50	2.50±0.07	1.90±0.29
13	126.45±11.20	16.81±9.50	3.87±1.29	0.94±0.02

Koyu renk ile gösterilmiş değerler fermentasyon süresi boyunca alınan en yüksek enzim aktiviteleridir.

Başlangıç şeker miktarı 85.77 g/L'den fermentasyonun sonunda 0.94 g/L'ye düşmüştür. Mikroorganizmanın şekeri neredeyse tamamen tükettiği açık bir şekilde görülmekte ve şeker tüketim oranı %98.9 olarak hesaplanmıştır. Maksimum tüketim hızı 11.60 g/L/gün, maksimum inülinaz üretim hızı ve maksimum invertaz üretim hızı sırasıyla 34.82 ve 30.37 U/mL/gün olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon sonu sıvı süzölmüş toplam kuru biyokütle analizi ve fermentasyon sıvısının nihai pH'ı ölçülerek sırasıyla 5.53 g/L ve 3.02 olarak kaydedilmiştir. Çizelge 4.2'de verilen kontrol fermentasyonuna ait kinetik parametreler diğer gerçekleştirilen fermentasyonlar ile karşılaştırılmada kullanılmıştır.

Kontrol besiyeri ortamında gerçekleştirilen fermentasyona ait kinetik parametreler incelendiğinde en yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivite değerleri sırasıyla 202.95 U/mL ve 156.91 U/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Kontrol fermentasyonuna ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	
QS (g/L/gün)	11.60 ± 2.22
<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/gün)	34.82 ± 1.92
<i>Q_{Sase}</i> (U/mL/gün)	30.37 ± 3.55
ΔS (g/L)	84.83 ± 0.68
<i>Iase</i> (U/mL)	202.95 ± 9.48
<i>Sase</i> (U/mL)	156.91 ± 10.53
ŞTO (%)	98.9 ± 0.06
Toplam kuru biyokütle (g/L)	5.53 ± 0.03
Nihai pH	3.02 ± 0.03

Iase: İnülinaz aktivitesi, *Sase*: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, *Q_{Iase}*: Maksimum inülinaz üretim hızı, *Q_{Sase}*: Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı.

4.1.1. Kontrol besiyerine ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi

Sakarov ile kontrol besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase*, *Sase* ve toplam indirgen şeker miktarına ait deneysel verilere 10 farklı model uygulanmış olup model değerlendirme kriterleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Iase için en düşük RMSE (10.49 U/mL) ile MAE (6.75 U/mL), MGM ve Asimetrik modelde elde edilmiştir. *Iase* için en yüksek RMSE (17.41 U/mL) ile MAE (13.99 U/mL) değerleri Weibull modelinde hesaplanmıştır. En yüksek R^2 değeri (0.9850) MGM ile bulunurken en düşük R^2 değeri (0.9662) Weibull modeli ile bulunmuştur. Modellerin kabul edilip edilmediğini değerlendirmede AF ve BF değerlerinden yararlanılmıştır. 1'e yakın AF ve BF değerleri en uygun modeli temsil ettiği düşünülerek 10 model arasındaki en uygun model seçilmiştir. $1.00 \leq AF < 1.20$ ise, model "iyi" dir; $1.20 \leq AF \leq 1.30$ ise, model "kabul edilebilir"; ve eğer $AF > 1.30$ ise, model "kabul edilemez" dir. Matematiksel modellerin başarısını belirlemek için, BF değerleri $0.95 \leq BF \leq 1.11$ ise, model "iyi" dir; $0.87 \leq BF < 0.95$ veya $1.11 < BF \leq 1.43$ ise, model "kabul edilebilir"; ve eğer $BF < 0.87$ veya $BF > 1.43$ ise, model "kabul edilemez" dir. MLM (0.92) ve MRM (0.92) modelleri için BF değerine bakıldığında 1'den küçük olduğu görülmektedir. 1'den daha düşük bir BF değeri modelin genel olarak başarısız ve uyumsuz olduğunu göstermektedir. Diğer modeller incelendiğinde 1'e en yakın BF değeri sırasıyla Stannard (1.00), MGM (1.05), Huang (1.05) ve Fitzhugh (1.05) modellerinden elde edilmiştir. Diğer yandan AF değerleri ile ortalama olarak tahmini değerlerin deneysel değerlerden farklılığı ortaya konmuştur. Çizelge 4.3'te AF değerleri ile MGM için %9, MLM için %15, MRM için %15, Stannard için %16, Weibull için %53, MMF için %13, Asimetrik için %16, Baranyi için %269, Huang için %5 ve Fitzhugh için %5 oranında farklılık olduğu ortaya konmuştur. Düşük RMSE, MAE, yüksek R^2 ve 1'e yakın BF ve AF değerleri ile en uygun model MGM olarak seçilmiştir.

Sase için en düşük RMSE (7.38 U/mL) ile MAE (5.50 U/mL) değerleri MMF modelinde hesaplanmıştır. En yüksek RMSE (15.63 U/mL) ile MAE (9.91 U/mL) sırasıyla Baranyi ve MLM modellerinde hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra en yüksek R^2 (0.9835) ve en düşük R^2 (0.9618) sırasıyla MMF ve Huang modellerinden elde edilmiştir. *Sase* için hesaplanan BF değerleri incelendiğinde MGM (0.88), MLM (0.75), MRM (0.76), Asimetrik (0.89), Huang (0.88) ve Fitzhugh (0.90) modelleri 1'den düşük olduğu için bu modeller genel olarak deneysel verileri tahmin etmede başarısız bulunmuştur. Stannard (1.01), Weibull (1.08) ve MMF (1.00) modellerinde BF değeri 1'e çok yakın hesaplanmış olup bu durum modellerin deneysel verileri tespit etmede başarılı olduğunu göstermektedir. Baranyi modelinde BF değeri 4.59 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç Baranyi modeli ile tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu gösterir. *Sase* için hesaplanan AF değerleri incelendiğinde MGM %18, MLM %37, MRM %37, Stannard %13, Weibull %20, MMF %6, Asimetrik %15, Baranyi %23, Huang %16, Fitzhugh %25 oranında sapma gösterdiği görülmüştür. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında Stannard, Weibull ve MMF modellerinin deneysel verileri tahmin etmede başarılı olduğu görülürken en uyumlu model düşük RMSE (7.38 U/mL), MAE (5.50 U/mL), yüksek R^2 (0.9835) ve 1'e yakın BF (1.00) ile AF (1.06) değerlerinden dolayı MMF model olarak seçilmiştir.

Toplam indirgen şeker miktarı için en düşük RMSE (4.11 U/mL) ile MAE (3.37 U/mL) değerleri Fitzhugh modelinde hesaplanmıştır. En yüksek RMSE (13.00 U/mL) ile MAE (11.28 U/mL) değerleri Asimetrik modelde hesaplanmıştır. Diğer yandan en yüksek R^2 (0.9793) ve en düşük R^2 (0.9232) sırasıyla Baranyi ve Weibull modellerinden elde edilmiştir. 1'e yakın BF ve AF değerleri modelin genel olarak deneysel veriler ile uyumlu ve başarılı olduğunu göstermektedir. MGM (0.91), MLM (0.94), MRM (0.91), Weibull (0.89), Asimetrik (0.79), Huang (0.91), Fitzhugh (0.93) modelleri için BF değeri 1'den düşük hesaplanmış olup modellerden elde edilen tahmini verilerin deneysel veriler ile uyumlu olmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca, Stannard (1.00) modeli 1'e eşit çıkmış olup deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında bir sapma olmadığı belirlenmiştir. Baranyi modeli için BF değeri 1.27 olarak hesaplanmış olup nispeten 1'e yakın kabul edilmiştir. AF değerleri incelendiğinde MGM için %11, MLM için %10, MRM için %11, Stannard için %9, Weibull için %12, MMF için %10, Asimetrik için %27, Baranyi için %28, Huang için %15 ve Fitzhugh için %9 oranında sapma hesaplanmıştır. Düşük RMSE (4.29 U/mL), MAE (4.16 U/mL) ve yüksek R^2 (0.9676), 1'e yakın BF (1.00) ile AF (1.09) oranlarından dolayı deneysel verilerle en uyumlu model Stannard olarak seçilmiştir.

Tüm modeller için hesaplanan RMSE, MAE, R^2 , BF ve AF değerlerine Çizelge 4.3'ten ulaşılabilir. Kontrol fermentaysonuna ait *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için tüm model verileri ile deneysel verilerin kıyaslandığı grafikler EK-3, EK-4 ve EK-5'te verilmiştir. Ayrıca *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için hesaplanan model parametreleri EK-6, EK-7 ve EK-8'de verilmiştir.

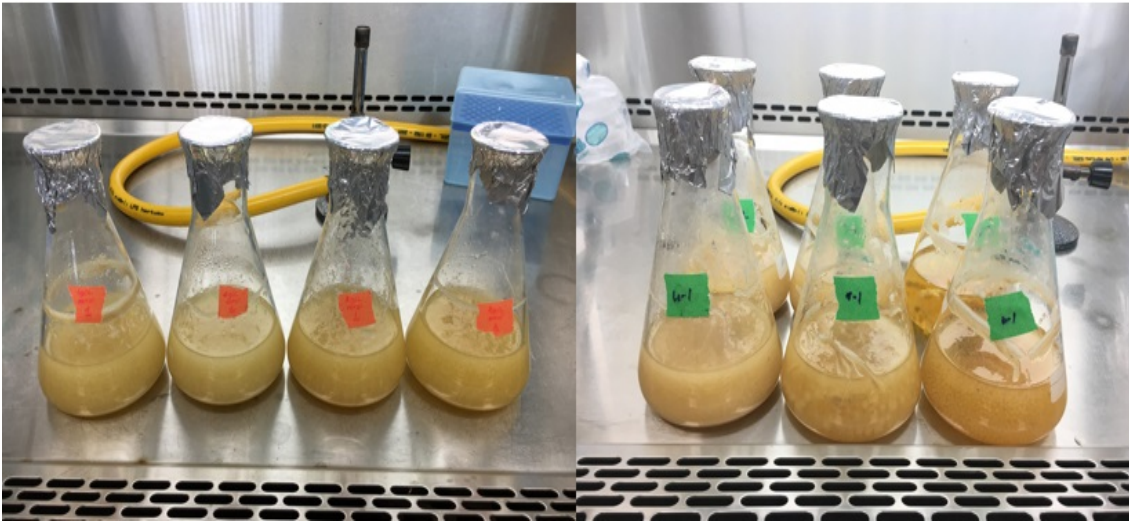
Çizelge 4.3. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel verilerin matematiksel modellenmesi sonucu modellerin karşılaştırılması için hesaplanan model kriterleri

Model/ Kontrol	İnülinaz oluşumu					İnvertaz oluşumu					Toplam indirgen şeker miktarı				
	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (g/L)	MAE (g/L)	R ²	BF	AF
MGM	10.49	7.39	0.9850	1.05	1.09	8.97	6.59	0.9805	0.88	1.18	5.47	4.39	0.9721	0.91	1.11
MLM	10.97	9.90	0.9805	0.92	1.15	12.60	9.91	0.9718	0.75	1.37	4.81	4.16	0.9676	0.94	1.10
MRM	10.97	9.88	0.9805	0.92	1.15	10.90	9.80	0.9719	0.76	1.37	5.46	4.38	0.9720	0.91	1.11
Stannard	16.19	12.92	0.9841	1.00	1.16	11.77	7.34	0.9802	1.01	1.13	4.29	3.63	0.9552	0.99	1.09
Weibull	17.41	13.99	0.9662	1.42	1.53	14.75	9.79	0.9637	1.08	1.20	8.61	6.30	0.9232	0.89	1.12
MMF	10.55	8.19	0.9806	1.13	1.18	7.38	5.50	0.9835	1.00	1.06	4.47	3.76	0.9503	0.97	1.10
Asimetrik	11.02	6.75	0.9787	1.16	1.23	7.64	5.96	0.9838	0.89	1.15	13.00	11.28	0.9654	0.79	1.27
Baranyi	14.76	10.65	0.9759	3.40	3.69	15.63	9.01	0.9621	4.59	5.23	11.53	8.50	0.9793	1.27	1.28
Huang	14.65	10.46	0.9759	1.05	1.30	15.62	8.80	0.9618	0.88	1.16	8.07	5.03	0.9288	0.91	1.15
Fitzhugh	10.90	8.44	0.9820	1.05	1.11	8.13	7.32	0.9804	0.90	1.25	4.11	3.37	0.9634	0.93	1.09

Koyu renkle gösterilmiş değerler belirlenen en uygun modellerdir.

4.2. HMF'nin İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar

Kontrol besiyeri bileşimine (%10 sakaroz, %1 maya ekstraktı, %3 inokülasyon) 1.0 /L, 2.0 g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L, 5.0 g/L ve 6.0 g/L konsantrasyonlarında HMF inhibitör madde olarak ayrı ayrı eklenmiş, her fermentasyon tekerrürlü olmak üzere 5 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2'de bu fermentasyonlara ait fotoğraflar verilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca her gün örnek alınmıştır ve örneklerde günlük olarak şeker ve enzim analizi yapılmıştır. Her fermentasyon için analiz sonuçları toplam indirgen şeker miktarına göre *Iase* ve *Sase* üretimi olarak grafik edilmiş olup aşağıda verilmiştir. İnülinaz aktivitesinde düşüş gözlemlendikten sonra fermentasyonlara son verilmiştir ve ardından besiyeri süzülerek süzüntü pH'ı kaydedilip toplam kuru biyokütle analizi yapılmıştır.

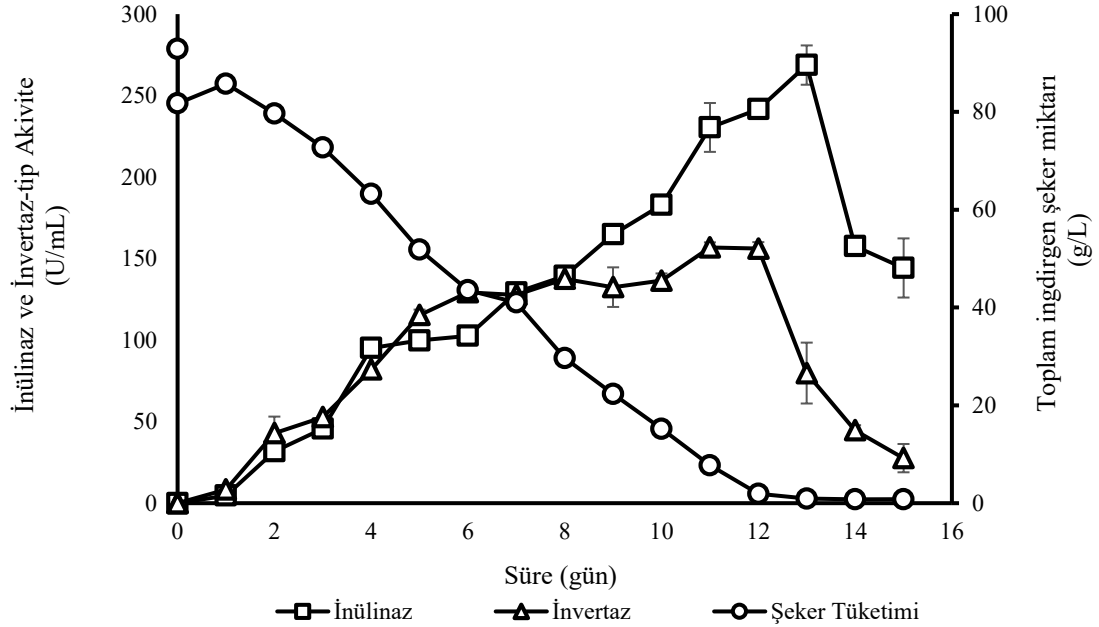


Şekil 4.2. HMF'nin inhibitör olarak ilavesiyle kullanılan fermentasyonlara ait görüntüler

4.2.1. 1.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon

Şekil 4.3'te 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar verilmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktiviteleri sırasıyla 268.74 U/mL (13.gün) ve 156.86 U/mL (11.gün) olarak belirlenmiştir. Toplam şeker tüketimi 80.93 g/L olmuştur. Fermentasyon boyunca şeker tüketimine göre enzim miktarının da aynı doğrultuda arttığı görülmektedir. İnülinaz enzim aktivitesinin 1.günden 4.güne kadar arttığı, 4, 5 ve 6. günlerde ise aktivitenin neredeyse aynı olduğu görülmektedir. 6-13. günler arasında enzim aktivitesinde hızlı bir artış gözlemlenmiştir. Maksimum inülinaz enzim aktivitesine (268. 74 U/mL) 13.günde ulaşılmıştır. 13.günden sonra inülinaz aktivitesinde keskin bir düşüş görülmektedir. İnvertaz enzimine bakıldığında ise 1.günden 6.güne kadar artış gözlemlenmektedir. 7-10.günler arasında enzim aktivitesinin neredeyse değişmediği, 11.günde ise en yüksek enzim aktivitesine (156.86 U/mL) ulaşıldığı görülmektedir. 12.günden sonra enzim aktivitesinde keskin bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Fermentasyon sonunda tüketilmiş ve kalan şeker miktarı 0.80 g/L olarak analiz edilmiştir. Besiyeri ortamındaki 1.0 g/L HMF ile gerçekleştirilen fermentasyon kontrol ile karşılaştırıldığında mikrobiyal

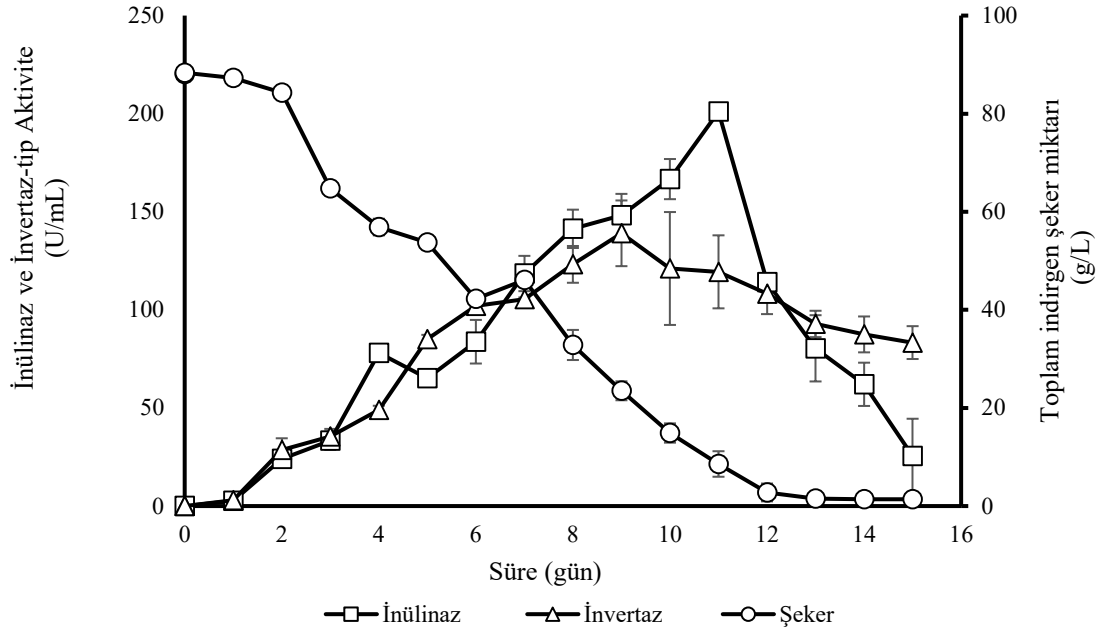
gelişmenin inhibitörden etkilenmediğini ve sorunsuz bir şekilde şeker tüketimi ve enzim üretimlerinin gerçekleştiği görülmüştür. Fermentasyon sonundaki toplam kuru biyokütle 4.23 g/L ve ortamın pH'sının başlangıç 5.0'dan 3.76'ya düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 1 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.2.2. 2.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon

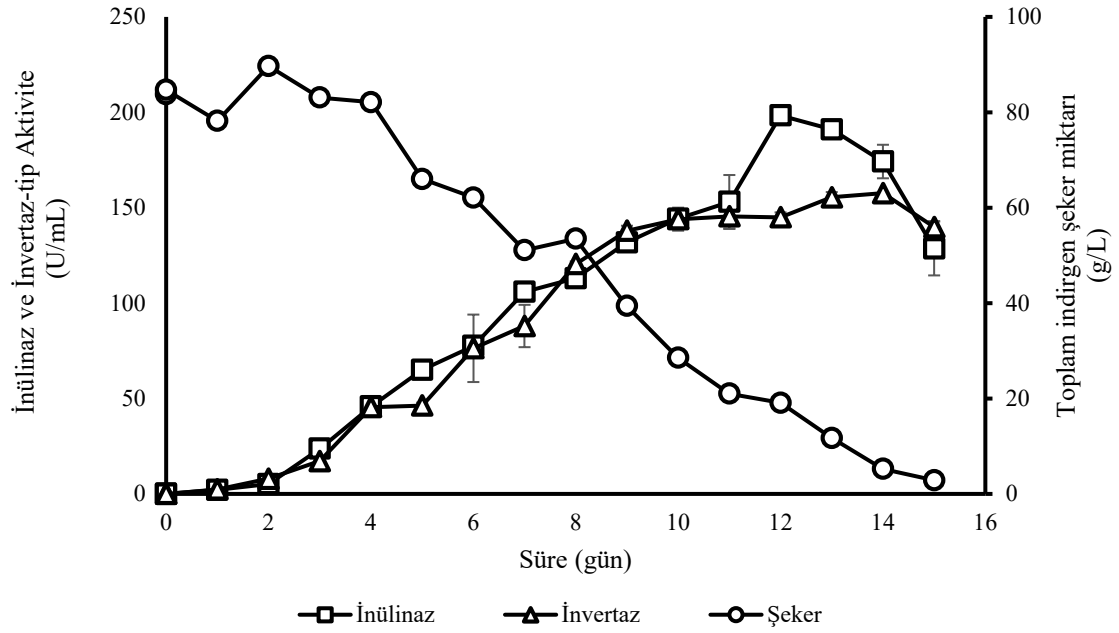
Şekil 4.4'te HMF 2.0 g/L konsantrasyonda inhibitör bileşik olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar verilmiştir. Fermentasyon sonuçları incelendiğinde en yüksek inülinaz aktivitesi 201.00 U/mL iken invertaz-tip aktivitenin 132.54 U/mL olduğu belirlenmiştir. Şeker tüketimi ise 86.96 g/L olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon sonunda toplam kuru biyokütle 4.19 g/L ve besiyeri ortamının son pH'ı 2.97 olarak ölçülmüştür. En yüksek inülinaz enzim aktivitesine (201.00 U/L) fermentasyonun 11. gününde ulaşılmıştır. 11.günden sonra inülinaz enzimi aktivitesinde bir artış olmamıştır. Enzim oluşumunun artışına paralel olarak toplam indirgen şeker miktarı azalmıştır. En yüksek invertaz-tip enzim aktivitesine (132.54 U/mL) fermentasyonun 9.gününde ulaşılmıştır. İnülinaz üretiminde olduğu gibi invertaz enzimi de toplam indirgen şeker tüketimine paralel olarak artış göstermiştir. 9. Günden sonra invertaz-tip aktivitede azalarak giden bir eğilim olduğu gözlemlenmiştir. Mikroorganizma ortamdaki 2.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak bulunmasına rağmen gelişim göstermiş, şekerin neredeyse tamamını kullanarak inülinaz ve invertaz enzimlerinin üretimini gerçekleştirmiştir. 1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon ve 2.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* aktivitesi açısından istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.05$). 2.0 g/L HMF ilavesiyle *Iase* aktivitesinde 1.0 g/L'ye göre yaklaşık 67 U/mL'lik bir düşüş tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol fermentasyonu ile arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$).



Şekil 4.4. 2g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.2.3. 3.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon

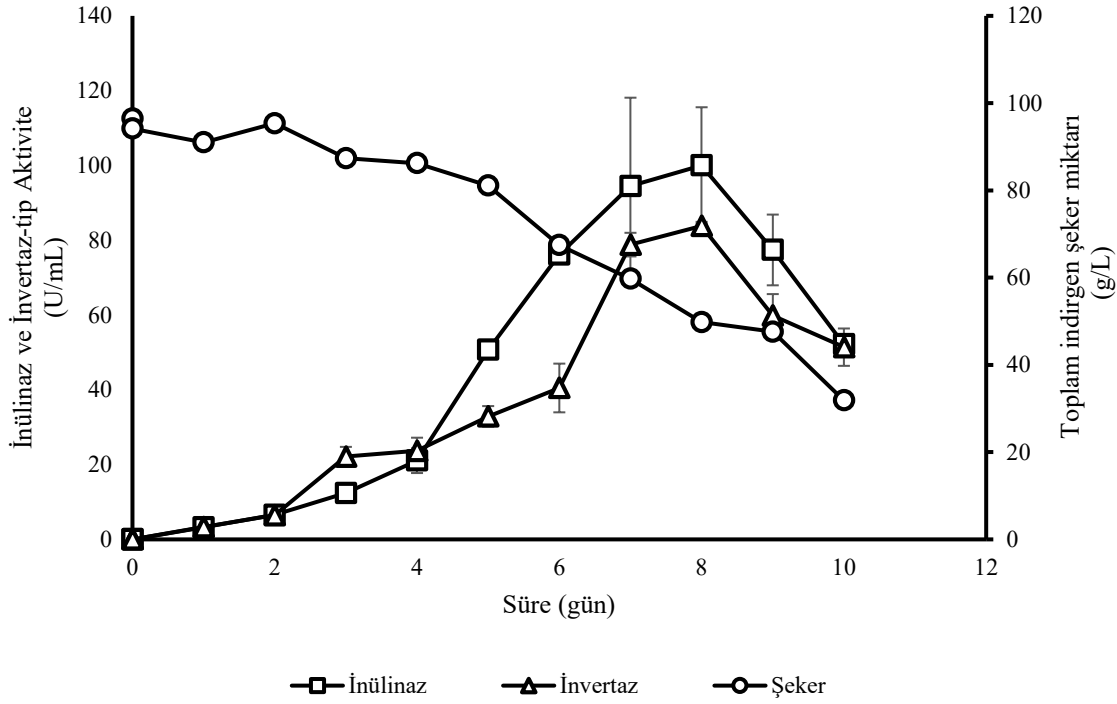
Şekil 4.5' te 3 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı toplam indirgen şeker miktarına göre enzim üretim sonuçları verilmiştir. Maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivitelerinin sırasıyla 198.32 U/mL ve 157.64 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun 2-6.günleri arasında enzim aktivitesi artış gösterirken 7 ve 8.günde değişim olmamış ve sonraki günlerde azalan oranda artışa devam eden bir eğilim gözlemlenmiştir. En keskin artış 10 ile 12.günler arasında görülmüştür. En yüksek inülinaz enzim aktivitesine ise 12.günde ulaşılmıştır. Enzim aktivitesindeki artışa paralel olarak toplam indirgen şeker miktarında azalma olduğu görülmektedir. İnvertaz enziminin aktivite değerleri incelendiğinde 2. günden 4.güne kadar bir artış gözlemlenirken 4 ve 5.gün arasında durağan bir fazda olduğu ve ardından yine artmaya başladığı gözlemlenmiştir. En keskin artışı 5-8.günler arasında göstermiş olup fermentasyonların sonlarına doğru 9-12. gün arasında aktivitede artış çok az olmuştur. En yüksek invertaz-tip enzim aktivitesi 14.günde analiz edilmiştir. Fermentasyon 15 gün sonunda bitirilmiştir. Fermentasyon sonunda yapılan toplam kuru biyokütle analizi sonucu 4.17 g/L olarak belirlenmiştir. Fermentasyon ortamında son pH 3.54 olarak ölçülmüştür. Mikroorganizmanın 3 g/L HMF'nin ortamda bulunmasına rağmen gelişimini devam ettirdiği ve şekeri sorunsuz bir şekilde tüketip ürüne çevirdiği görülmektedir. 3.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon ve kontrol fermentasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). 2.0 g/L ve 3.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında da *Iase* aktivitesi açısından bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 4.5. 3 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.2.4. 4.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon

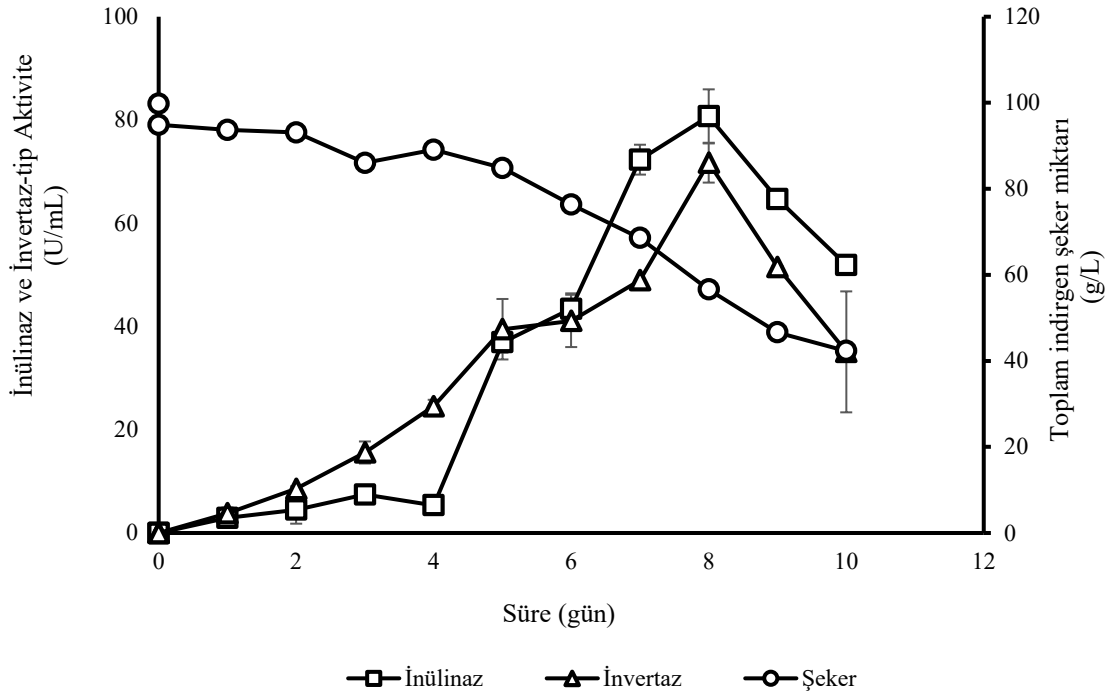
4.0 g/L HMF'nin fermentasyon ortamında inhibitör olarak eklendiği fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.6.'da verilmiştir. Maksimum inülinaz aktivitesinin 99.99 U/mL, invertaz-tip aktivitenin ise 83.81 U/mL olduğu belirlenmiştir. Toplam şeker tüketimi 62.29 g/L olarak bulunmuştur. Enzim miktarı artarken toplam indirgen şeker miktarının azaldığı Şekil 4.6'da görülmektedir. En yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivite fermentasyonun 8.gününde elde edilmiştir. Sonrasında her iki enzim aktivitesi de net bir şekilde azalış göstermiştir. Enzim aktivitelerinde yüksek oranda düşüş meydana geldiği için diğer HMF konsantrasyonları ile gerçekleştirilen fermentasyonların aksine çalışma 10.günde bitirilmiştir. 10 günün sonunda mikroorganizmanın şekeri tam olarak tüketmediği fakat yine de enzim üretiminin olduğu belirlenmiştir. 10.günde ortamdaki kalan şeker miktarı 31.86 g/L olarak analiz edilmiştir. Fermentasyon sonrası ortamın pH'ı 3.32, toplam kuru biyokütle miktarı ise 3.17 g/L olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma ortamdaki 4 g/L HMF konsantrasyonundan etkilenmeye başlamış hücre gelişimi ve dolayısıyla biyokütlede diğer fermentasyonlara göre düşüş meydana gelmiştir. Aynı şekilde mikroorganizma gelişimi etkilendiği için enzim üretimi de azalmış ve 4 g/L'nin altında yapılan diğer fermentasyonlara göre hem inülinaz hem de invertaz-tip aktivitede düşüş meydana gelmiştir. Kontrol fermentasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş ilk olarak 4.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir. *Iase* aktivitesinde kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık olarak 100 U/mL azalma meydana gelmiştir.



Şekil 4.6. 4 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.2.5. 5.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon

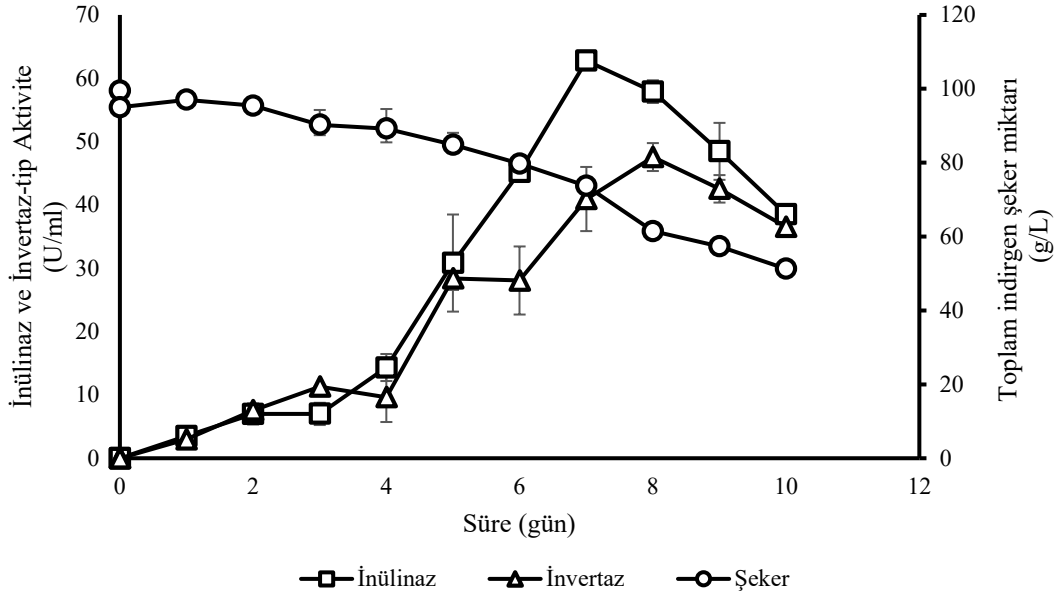
5.0 g/L konsantrasyondaki HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi 80.69 U/mL iken invertaz-tip aktivite 71.73 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyon örneklerinde toplam şeker tüketimi 52.59 g/L olarak bulunmuştur. Fermentasyon boyunca inülinaz ve invertaz-tip aktivite artarken kısmen de olsa toplam indirgen şeker miktarında azalma olduğu görülmektedir. En yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivite fermentasyonun 8.gününde elde edilmiştir. 8.günden sonra her iki enzim üretimi de durmuş ve düşüş göstermiştir. Bu nedenle 10.günde fermentasyon bitirilmiştir. Fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı 42.28 g/L olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma ortamdaki şekeri tamamen kullanamamış olmasına rağmen her iki enzim için de 70 U/mL üzerinde enzim aktivitesi elde edilmiştir. Fermentasyon sonunda ortam pH'ı 3.21 olarak kaydedilirken toplam kuru biyokütle 2.99 g/L olarak bulunmuştur. İnhibisyon arttıkça şeker tüketiminde azalma meydana geldiği sonuçlardan anlaşılmaktadır. Mikroorganizma şekeri yaklaşık olarak %55 oranında tüketmiştir. 5.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* aktivitesi kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık olarak 120 U/mL oranında daha düşük elde edilmiştir. Enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.05$). HMF artan konsantrasyonlarda mikroorganizma üzerindeki inhibisyon etkisini de arttırmıştır.



Şekil 4.7. 5 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.2.6. 6.0 g/L HMF ilave edilen fermentasyon

6 g/L HMF konsantrasyonunun inhibitör olarak eklendiği fermentasyona ait veriler Şekil 4.8'de verilmiştir. Analizlere göre en yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivite sırasıyla 62.76 U/mL ve 47.56 U/mL olarak bulunmuştur. Fermentasyon ortamındaki toplam şeker tüketiminin 43.74 g/L olduğu belirtilmiştir. İnülinaz aktivitesinde 1.günden 4.güne kadar düşük oranlarda artış gözlemlenirken, 4 ile 7.gün arasında en keskin artışını göstermiştir. En yüksek inülinaz aktivitesinin (62.76 U/mL) 7.günde olduğu görülmektedir. 7.günden sonra inülinaz aktivitesinde yüksek eğimli bir düşüş gözlemlenmektedir. Fermentasyon sonunda ortamda 51.26 g/L şeker kaldığı analiz edilmiştir. İnvertaz-tip aktivite artışı incelendiğinde en yüksek aktivitenin (47.56 U/mL) ise fermentasyonun 8.gününde elde edildiği görülmektedir. Fermentasyon sonunda toplam kuru biyokütle miktarı 2.47 g/L, ortamının pH'ı 3.26 olarak kaydedilmiştir. Mikroorganizma gelişimi 6 g/L HMF konsantrasyonundan olumsuz olarak etkilenmiştir. Artan konsantrasyonlarda HMF'nin inhibisyon etkisinin yavaş yavaş arttığı gözlemlenmiştir. 6.0 g/L HMF için denenmiş olan son konsantrasyondur ve kontrol fermentasyonuna göre Iase aktivitesinde yaklaşık olarak 140 U/mL azalma meydana gelmiştir. Kontrol fermentasyonu ile arasında inülinaz ve invertaz-tip aktivite açısından önemli bir düşüş olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Artan HMF konsantrasyonu mikroorganizma gelişimini etkilediği için toplam kuru biyokütle miktarında da kontrol fermentasyonuna göre yüksek miktarda düşüş gözlemlenmiştir.

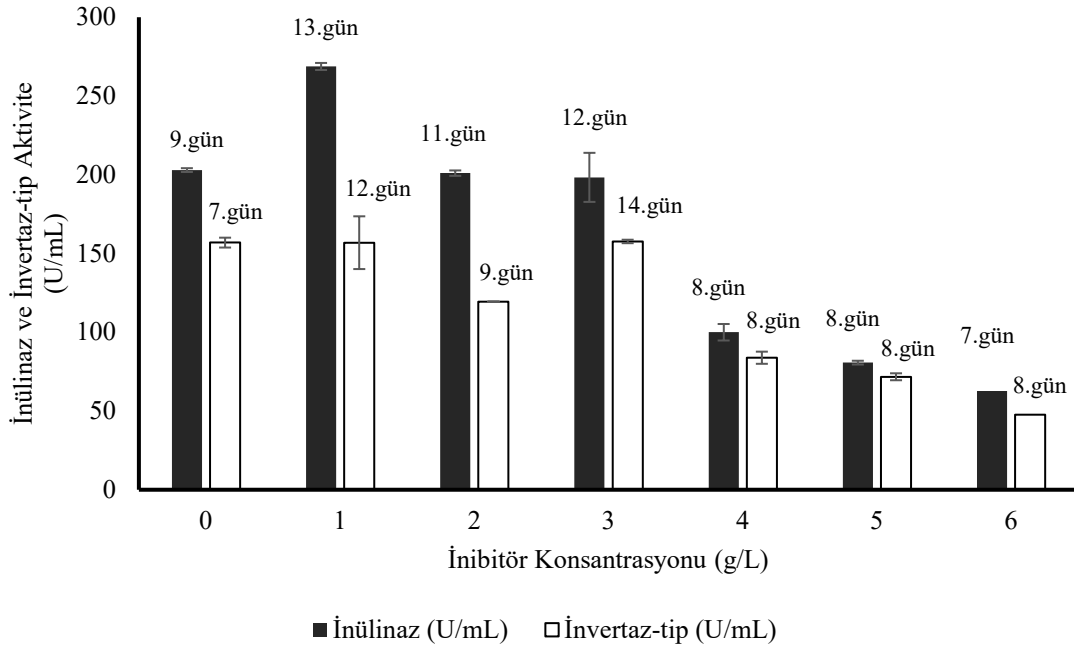


Şekil 4.8. 6 g/L HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.2.7. HMF'nin besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Farklı konsantrasyonlarda HMF'nin inhibitör olarak besiyerine ilave edildiği fermentasyonlara ait kinetik değerler Çizelge 4.5'te verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi (268.74 U/mL), 1 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına ilave edildiği fermentasyon denemesinden elde edilmiştir. En düşük inülinaz aktivitesi ise 6 g/L HMF'nin bulunduğu besiyerinde 62.76 U/mL olarak elde belirlenmiştir. En düşük ve en yüksek inülinaz aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Kontrol fermentasyonu ile 2.0 g/L ve 3.0 g/L HMF'nin ortama ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait inülinaz aktivitesi sonuçları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($P > 0.05$). 4.0 g/L, 5.0 g/L ve 6.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

İnvertaz-tip aktivite değerlerine bakıldığında maksimum ve minimum Sase değerleri sırasıyla 3.0 g/L HMF ve 6.0 g/L HMF fermentasyonlarında 156.91 U/mL ve 47.558 U/mL olarak ölçülmüş olup aralarındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). HMF'nin inhibitör olarak besiyerine ilavesiyle gerçekleştirilen tüm fermentasyonlara ait inülinaz ve invertaz-tip aktivite sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. HMF'nin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktivitelerin en yüksek olduğu günlere ait sonuçlar

HMF eklenerek gerçekleştirilen fermentasyonlar için maksimum inülinaz üretim hızı en çok ve en az olmak üzere sırasıyla 31.11 U/mL/gün (4.0 g/L HMF) ve 18.86 U/mL/gün (6.0 g/L HMF) olarak hesaplanmış olup değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$). Kontrol fermentasyonu ile 4.0 g/L HMF eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyon arasında Q_{lase} için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). Maksimum invertaz-tip üretim hızı için en yüksek değer 1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda 29.29 U/mL/gün olarak hesaplanmıştır. En düşük değer ise 13.12 U/mL/gün olarak 6.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyondan hesaplanmış olup değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Kontrol, 1.0 g/L, 2.0 g/L ve 3.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda mikroorganizma şekerin neredeyse tamamını kullanmıştır. Bununla birlikte bu fermentasyonlar arasında şeker tüketimi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P > 0.05$). Ancak diğer HMF konsantrasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonlar ile aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu ortaya konmuştur ($P < 0.05$). En düşük şeker tüketim oranı 6.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda %46 olarak hesaplanmıştır.

HMF ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonların her biri için I/S değerleri hesaplanmış olup Çizelge 4.4'te verilmiştir. I/S değerinin her bir HMF fermentasyonu için 10^{-2} 'den büyük olduğu görülmektedir. Bu durum fermentasyondan elde edilen enzimin inülinaz doğasında olduğunu göstermektedir (Das vd. 2019).

Çizelge 4.4. HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri

Konsantrasyon(g/L)	İnülinaz Aktivite (U/mL)	İnvertaz Aktivite (U/mL)	I/S
1.0	268.737	156.856	1.713
2.0	201.004	132.541	1.517
3.0	198.324	157.636	1.258
4.0	99.990	83.812	1.193
5.0	80.693	71.727	1.125
6.0	62.761	47.558	1.320

Toplam kuru biyokütle sonuçları incelendiğinde maksimum ve minimum biyokütle sırasıyla 5.53 g/L, 2.47 g/L olarak kontrol ve 6.0 g/L HMF ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda bulunmuş olup aralarındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında en yüksek biyokütle miktarı 1.0 g/L HMF fermentasyonundan 4.23 g/L olarak elde edilmiş olup kontrol fermentasyonu ile arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$). Artan HMF konsantrasyonlarının biyokütle miktarında düşüşe neden olduğu saptanmıştır.

Fermentasyonlar sonlandırıldığında besiyerinin son pH ölçümü gerçekleştirilmiş olup minimum ve maksimum pH değerleri sırasıyla kontrol ve 1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon ile 3.02 ve 3.76 olarak ölçülmüş olup aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$).

HMF eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametreler Çizelge 4.5'te detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.5. Besiyerinde farklı HMF konsantrasyonlarına ait fermentasyonların kinetik değerleri

İK (g/L)	Iase (U/mL)	Sase (U/mL)	ΔS (g/L)	QS (g/L/gün)	Q_{Iase} (U/mL/gün)	Q_{Sase} (U/mL/gün)	ŞTO (%)	Toplam Kuru Biyokütle (g/L)	Nihai pH
0.0	202.95 ^b ±9.48	156.91 ^{ab} ±10.53	84.83 ^{ab} ±0.68	11.6 ^{ab} ±2.22	34.82 ^a ±1.92	30.37 ^a ±3.55	98.90 ^a ±0.06	5.53 ^a ±0.03	3.02 ^b ±0.01
1.0	268.74 ^a ±1.21	156.86 ^{ab} ±3.14	80.93 ^c ±0.18	8.63 ^{bc} ±0.66	31.04 ^{ab} ±2.17	29.29 ^{ab} ±2.79	99.02 ^a ±0.00	4.23 ^b ±0.18	3.76 ^a ±0.04
2.0	201.004 ^b ±2.24	132.54 ^b ±9.30	86.96 ^a ±0.80	13.69 ^a ±0.53	26.35 ^{bc} ±2.66	26.56 ^{abc} ±2.45	98.44 ^a ±0.45	4.19 ^c ±0.22	2.97 ^b ±0.47
3.0	198.32 ^b ±1.72	157.64 ^a ±0.17	81.83 ^{bc} ±1.12	10.83 ^{ab} ±0.15	25.92 ^{bc} ±2.34	18.78 ^{cd} ±1.98	96.62 ^b ±0.02	4.17 ^b ±0.12	3.54 ^{ab} ±0.02
4.0	99.99 ^c ±1.72	83.81 ^c ±1.10	62.29 ^d ±0.64	9.47 ^{bc} ±1.51	31.11 ^{ab} ±3.18	20.75 ^{bcd} ±1.36	66.16 ^c ±0.19	3.17 ^c ±0.16	3.32 ^{ab} ±0.01
5.0	80.69 ^d ±5.24	71.727 ^c ±3.86	52.59 ^e ±0.28	10.09 ^{bc} ±0.43	20.74 ^c ±1.04	17.42 ^d ±2.98	55.44 ^d ±0.38	2.99 ^c ±0.03	3.21 ^{ab} ±0.01
6.0	62.76 ^e ±1.21	47.558 ^d ±2.21	43.74 ^f ±1.90	6.89 ^c ±0.07	18.86 ^c ±2.40	13.12 ^d ±1.40	46.00 ^e ±1.17	2.47 ^d ±0.01	3.26 ^{ab} ±0.01

Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). İK: İnhibitör konsantrasyonu, Iase: İnülinaz aktivitesi, Sase: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, Q_{Iase} : Maksimum inülinaz üretim hızı, Q_{Sase} : Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı.

4.2.8. Besiyerine HMF ilavesiyle gerçekleştirilen ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi

HMF ile gerçekleştirilen denemelerde en yüksek inülinaz aktivitesi elde edilen 1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyona 10 farklı model uygulanmıştır. Modeller inülinaz oluşumu, invertaz oluşumu ve toplam indirgen şeker miktarı için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase*, *Sase* ve toplam indirgen şeker miktarına ait deneysel verilere 10 farklı model uygulanmış olup model değerlendirme kriterleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6'da verilen sonuçlar doğrultusunda *Iase* için en düşük RMSE (16.38 U/mL) ile MAE (12.16 U/mL) Huang ve Baranyi modellerden elde edilmiştir. *Iase* için en yüksek RMSE (23.45 U/mL) ile MAE (18.52 U/mL) değerleri Weibull modelinde hesaplanmıştır. En yüksek R^2 değeri (0.9860) Huang modeli ile bulunurken en düşük R^2 değeri (0.9501) MMF modeli ile bulunmuştur. Çizelge 4.6'daki BF ve AF değerleri de modellerin değerlendirilmesi için hesaplanmıştır. BF değeri 1'den uzaklaştıkça model başarısız olarak kabul edilmektedir. 1'e eşit BF değeri modelde hesaplanan tahmini veriler ile deneysel veriler arasında yapısal bir sapma olmadığı anlamına gelmektedir. BF değerleri incelendiğinde MGM (0.86), MLM (0.78), MRM (0.80), Baranyi (0.94) ve Huang (0.91) modellerinde 1'den düşük seviyede oldukları bulunmuş olup bu modeller deneysel verileri hesaplamak için uygun bulunmamıştır. Stannard (1.00) modelinde BF değeri 1'e eşit olarak hesaplanmış olup model tam uyumlu kabul edilmiştir. MMF (1.18) ve Fitzhugh (1.19) modelleri için de nispeten 1'e yakın BF değerleri hesaplanmıştır. Weibull (1.70) ve Asimetrik (1.59) modelleri için BF değeri 1'den nispeten uzak kabul edilmiştir. AF değerleri MGM için %23, MLM için %31, MRM için %31, Stannard için %19, Weibull için %80, MMF için %30, Asimetrik için %63, Baranyi için %9, Huang için %12 ve Fitzhugh için %30 oranında sapma olduğunu göstermektedir. *Iase* üretimi için tüm sonuçlar değerlendirildiğinde düşük RMSE (16.62 U/mL), MAE (12.93 U/mL), yüksek R^2 (0.9743) ve 1'e eşit BF değeri ile 1'e yakın AF (1.19) değerlerinden dolayı Stannard model deneysel verileri tahmin etmeden en uygun model olarak seçilmiştir.

Sase için en düşük RMSE (3.72 U/mL) ile MAE (3.07 U/mL) değerleri sırasıyla MGM ve Asimetrik modelinde, en yüksek RMSE (12.24 U/mL) ile MAE (6.47 U/mL) sırasıyla Weibull ve MRM modellerinde hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra en yüksek R^2 (0.9992) ve en düşük R^2 (0.9769) sırasıyla Fitzhugh ve Weibull modellerinden elde edilmiştir. AF değerleri incelendiğinde MGM (0.94), MLM (0.87), MRM (0.89), Baranyi (0.97) ve Huang (0.96) 1'den düşük olarak hesaplandığı için modeller deneysel verilerle uyumlu bulunmamıştır. Stannard (1.03), MMF (1.03) ve Fitzhugh (1.05) 1'e en yakın BF değeri gösteren modeller olarak bulunmuştur. Weibull modeli diğer modellere kıyasla 1'den nispeten daha büyük olarak hesaplanmıştır. 1'den daha büyük BF değeri tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve bu modelin tahminlerinin düşük bir güven seviyesinde olduğunu göstermektedir. AF değerleri MGM modelinde %9, MLM modelinde %16, MRM modelinde %16, Stannard modelinde %6, Weibull modelinde %30, MMF modelinde %7, Asimetrik modelde %10, Baranyi modelde %6, Huang modelde %5 ve Fitzhugh modelde %5 oranında deneysel veriler ile tahmin edilen değerler arasında bir sapma olduğunu ortaya

koymuştur. Bu şartlar altında *Sase* üretimi için en uygun modeller sırasıyla Stannard, MMF ve Fitzhugh olarak belirlenmiştir.

Toplam indirgen şeker miktarı için en düşük RMSE (2.82 g/L) ile MAE (1.96 g/L) değerleri Huang modelinde, en yüksek RMSE (7.38 g/L) ile MAE (6.15 g/L) değerleri MGM modelinde hesaplanmıştır. Diğer yandan en yüksek R^2 (0.9959) ve en düşük R^2 (0.9752) sırasıyla Baranyi ve Stannard modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MGM (0.50), MLM (0.87), MRM (0.50), Stannard (0.80), MMF (0.62), Asimetrik (0.56), Baranyi (0.84), Huang (0.84), Fitzhugh (0.53) olup 1'den oldukça küçük olduğu için toplam indirgen şeker miktarı için uygun modeller değildir. Weibull modelinde BF değeri 1'e yakın olduğu için (1.04) tahmin edilen değerler ile deneysel değerler uyumlu olup yapısal bir sapma görülmemektedir. AF değeri MGM için %101, MLM için %85, MRM için %101, Stannard için %50, Weibull için %25, MMF için %71, Asimetrik için %77, Baranyi için %19, Huang için %19 ve Fitzhugh için %101 oranında bir sapma olduğunu göstermektedir.

1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait matematiksel model parametreleri Çizelge 4.6'da detaylı bir şekilde verilmiştir. 1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için tüm model verileri ile deneysel verilerin kıyaslandığı grafikler EK-9, EK-10 ve EK-11'de verilmiştir. Ayrıca *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için hesaplanan model parametreleri EK-12, EK-13 ve EK-14'te verilmiştir.

Çizelge 4.6. 1.0 g/L HMF ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri

Modeller/HMF	İnülinaz oluşumu					İnvartaz oluşumu					Toplam indirgen şeker miktarı				
	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (g/L)	MAE (g/L)	R ²	BF	AF
MGM	18.11	15.64	0.9670	0.86	1.23	3.72	3.29	0.9986	0.94	1.09	7.38	6.15	0.9943	0.50	2.01
MLM	19.93	18.14	0.9754	0.78	1.31	7.89	6.30	0.9937	0.87	1.16	6.04	5.52	0.9914	0.87	1.85
MRM	19.74	18.20	0.9760	0.80	1.31	7.67	6.47	0.9940	0.89	1.16	7.35	6.13	0.9943	0.50	2.01
Stannard	16.62	12.93	0.9743	1.00	1.19	4.23	3.30	0.9958	1.03	1.06	5.23	4.30	0.9752	0.80	1.50
Weibull	23.45	18.52	0.9585	1.70	1.80	12.24	8.03	0.9769	1.21	1.30	5.42	3.93	0.9757	1.04	1.25
MMF	19.52	17.03	0.9501	1.18	1.30	5.50	4.23	0.9941	1.03	1.07	4.52	3.39	0.9826	0.62	1.71
Asimetrik	22.63	17.43	0.9613	1.59	1.63	4.57	3.07	0.9968	1.10	1.10	7.60	6.44	0.9907	0.50	2.01
Baranyi	16.53	12.16	0.9859	0.94	1.09	11.22	6.36	0.9810	0.97	1.07	2.85	2.02	0.9959	0.84	1.19
Huang	16.38	15.64	0.9860	0.91	1.12	11.10	6.21	0.9812	0.96	1.05	2.82	1.96	0.9957	0.84	1.19
Fitzhugh	17.63	15.64	0.9587	1.19	1.30	5.00	4.01	0.9992	1.05	1.05	7.19	5.90	0.9816	0.53	2.01

Koyu renkle verilmiş değerler en uyumlu modeli göstermektedir.

4.3. Furfural'ın İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar

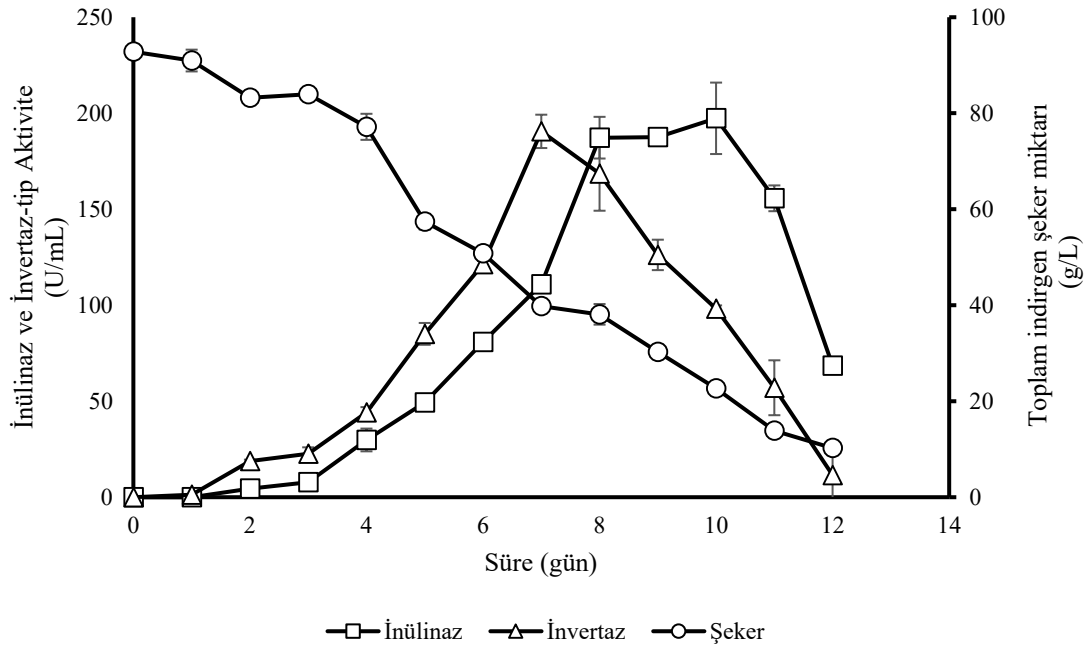
Kontrol besiyeri bileşimine (%10 sakaroz, %1 maya ekstraktı, %3 inokülasyon) 0.1 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L ve 2.0 g/L konsantrasyonlarda furfural eklenerek tekerrürlü olmak üzere 5 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca günlük alınan örneklerde şeker ve enzim analizi yapılmıştır. Fermentasyon sonlarında toplam kuru biyokütle analizi ve pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlara ait bazı görüntüler Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait bazı flask fotoğrafları

4.3.1. 0.1 g/L furfural ilave edilen fermentasyon

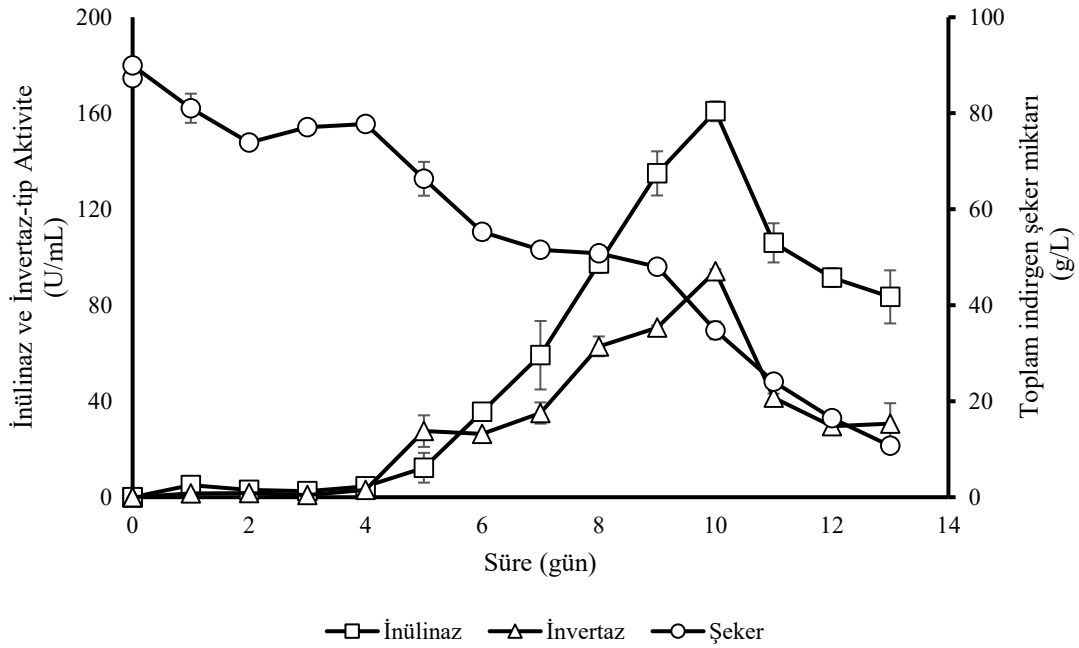
Besiyeri ortamına inhibitör bileşik olarak ilave edilen 0.1 g/L konsantrasyonundaki furfuralın fermentasyona etkisini gösteren sonuçlar Şekil 4.11.'de verilmiştir. Fermentasyonda alınan örneklerin analiz sonuçlarına göre maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivite sırasıyla 197.35 U/mL ve 192.31 U/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam şeker tüketim miktarı 85.82 g/L olarak bulunmuştur. İnülinaz fermentasyonunun ilk 3 gününde enzim aktivitesinin oldukça düşük olduğu ve 4.günden itibaren bu aktivitenin arttığı görülmektedir. Maksimum inülinaz aktivitesine (197.55 U/mL) fermentasyonun 10.gününde ulaşılmıştır. İnvertaz-tip aktivite sonuçları incelendiğinde fermentasyonun 2.gününden 7.gününe kadar hızlı bir artış gözlemlenmiş ve maksimum invertaz-tip aktivite 7.günde 192.31 U/mL olarak analiz edilmiştir. 8.günden itibaren invertaz-tip aktivitede keskin bir azalış gözlemlenmektedir. 10.günden sonra her iki enzim konsantrasyonu da azalan yönde hızlı bir artış gösterdiği için fermentasyon 12 günde tamamlanmıştır. 12.günde ortamdaki şeker miktarı 10.23 g/L olarak analiz edilmiştir. Mikroorganizma ortamdaki düşük konsantrasyondaki furfuralı tolere edebilmiş ve enzim üretimleri sorunsuz bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sonunda besiyerinde pH ölçümü ve toplam kuru biyokütle analizi yapılmıştır. Sonuçlar sırasıyla 5.21 g/L ve 3.37 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.3.2. 0.5 g/L furfural ilave edilen fermentasyon

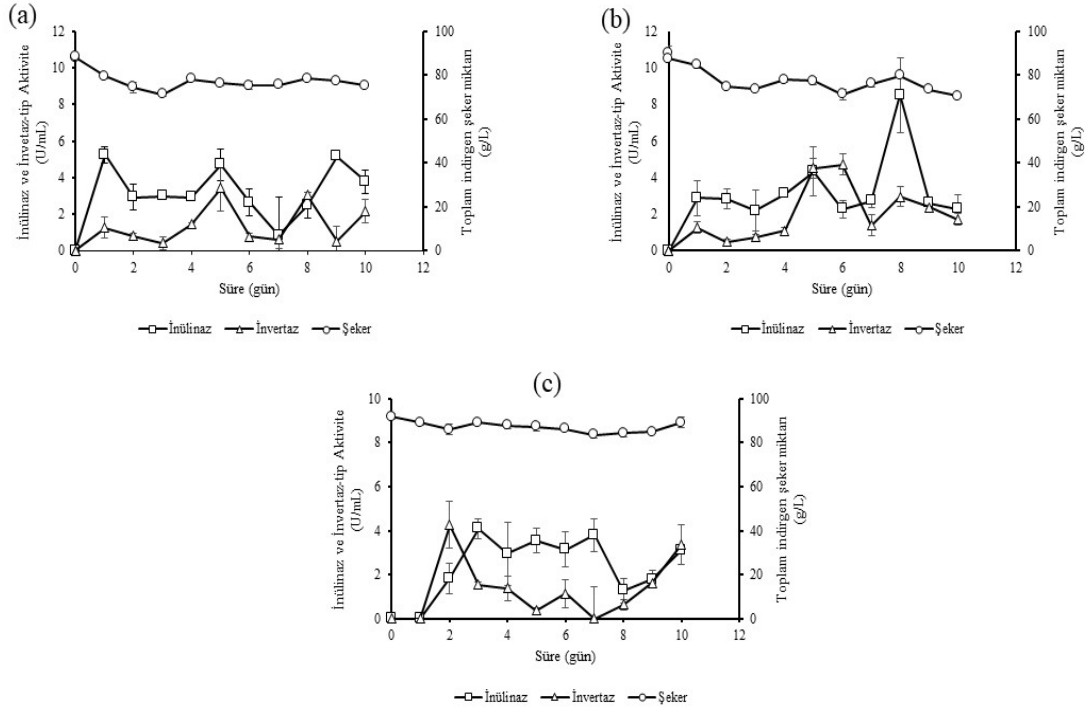
Besiyeri bileşimine 0.5 g/L furfural eklenerek gerçekleştirilen fermentasyona ait veriler Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. En yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivitelerinin sırasıyla 160.80 U/mL ve 94.14 U/mL olduğu görülmektedir. Fermentasyon boyunca toplam şeker tüketimi 79.24 g/L olarak bulunmuştur. İnülinaz ve invertaz-tip enziminin analiz sonuçları incelendiğinde fermentasyonun 5.gününe kadar enzim üretimi gerçekleşmediği görülmektedir. 5.günden itibaren ortamda enzim konsantrasyonunun arttığını ve bu artışın hızlı bir şekilde 10.güne kadar devam ettiği izlenmiştir. Maksimum inülinaz ve invertaz-tip enzim aktivitesi fermentasyonun 10.gününde elde edilmiştir. 10.günden itibaren ortamdaki enzim aktivitesinin hızlı bir şekilde düştüğü görülmektedir. İlk 4 gün enzim üretimi olmamasına rağmen toplam indirgen şeker miktarında azalma olduğu görülmektedir. Toplam indirgen şeker miktarındaki azalma ile ortamdaki enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Fermentasyon sonunda ortamının pH'ı 2.99, toplam kuru biyokütle miktarı ise 4.45 g/L olarak bulunmuştur. Mikroorganizma besiyeri ortamında 0.5 g/L furfuralın inhibitör olarak bulunmasına rağmen gelişimini göstermiştir. Ancak bu gelişim fermentasyonun 5.gününden itibaren olmuştur. İlk 4 gün erlenmayerlerde gözle görülebilen bir gelişim olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda 0.5 g/L furfuralın fermentasyon sırasında bulunmasıyla lag fazının uzun sürdüğü görülmektedir.



Şekil 4.12. 0.5 g/L furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.3.3. 1.0 g/L, 1.5 g/L ve 2.0 g/L furfural ilave edilen fermentasyonlar

Fermentasyon ortamına 1.0 /L, 1.5 g/L, 2.0 g/L furfuralın inhibitör olarak katılmasıyla gerçekleştirilen denemelerin sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde her 3 fermentasyon için de enzim aktivitesinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Toplam indirgen şeker miktarında neredeyse hiç azalma olmadığını dolayısıyla mikroorganizmanın şekeri kullanamadığı tespit edilmiştir. *Aspergillus niger* ile furfural ilavesiyle gerçekleştirilen tüm fermentasyonların enzim analiz sonuçları incelendiğinde mikroorganizmanın ortamındaki furfuralı 0.5 g/L konsantrasyon dahil olmak üzere tolere edebildiği görülürken 1.0 g/L'den fazla konsantrasyonlarda gelişimin olmadığı ve enzim aktivitesinde büyük bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Furfuralın 0.1 g/L ve 0.5 g/L gibi düşük konsantrasyonlarda fermentasyon ortamına ilavesiyle 197.35 ve 160.80 U/mL inülinaz aktivitesi elde edilmiştir. 1.0, 1.5 ve 2.0 g/L gibi artan furfural konsantrasyonlarında mikroorganizmanın inhibe olması sebebiyle inülinaz enzim aktivitesi düşmüş olup sırasıyla 5.14, 8.50, 3.80 U/mL olarak bulunmuştur. Besiyeri ortamında 0.5 g/L konsantrasyondan daha yüksek oranlarda furfural bulunması durumunda ortamın detoksifikasyona ihtiyacı olduğu belirlenmiştir. 0.1 g/L ve 0.5 g/L oranında furfuralın besiyerinde bulunması durumunda ortamın detoksifikasyon işlemine ihtiyacı olmadığı ve fermentasyon işlemleri sırasında bu aşamanın atlanarak maliyet, enerji ve iş yükü kazancı sağlanabileceği ortaya konmuştur.



Şekil 4.13. Sırasıyla 1.0 g/L (a), 1.5 g/L (b) ve 2.0 g/L (c) furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlara ait sonuçlar

4.3.4. Furfuralın besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Çalışmanın bu kısmında furfural 5 farklı konsantrasyonda (0.1 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L ve 2.0 g/L) inhibitör bileşik olarak fermentasyon ortamına ayrı ayrı ilave edilerek inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Ve mikroorganizmanın farklı furfural konsantrasyonlarına karşı toleransı incelenmiştir. 0.1 ve 0.5 g/L furfural varlığında hala enzim üretiminin devam ettiği ancak 1.0 g/L ve üstü konsantrasyonlarda mikroorganizma gelişiminin durmasıyla enzim üretiminin de durduğu belirlenmiştir.

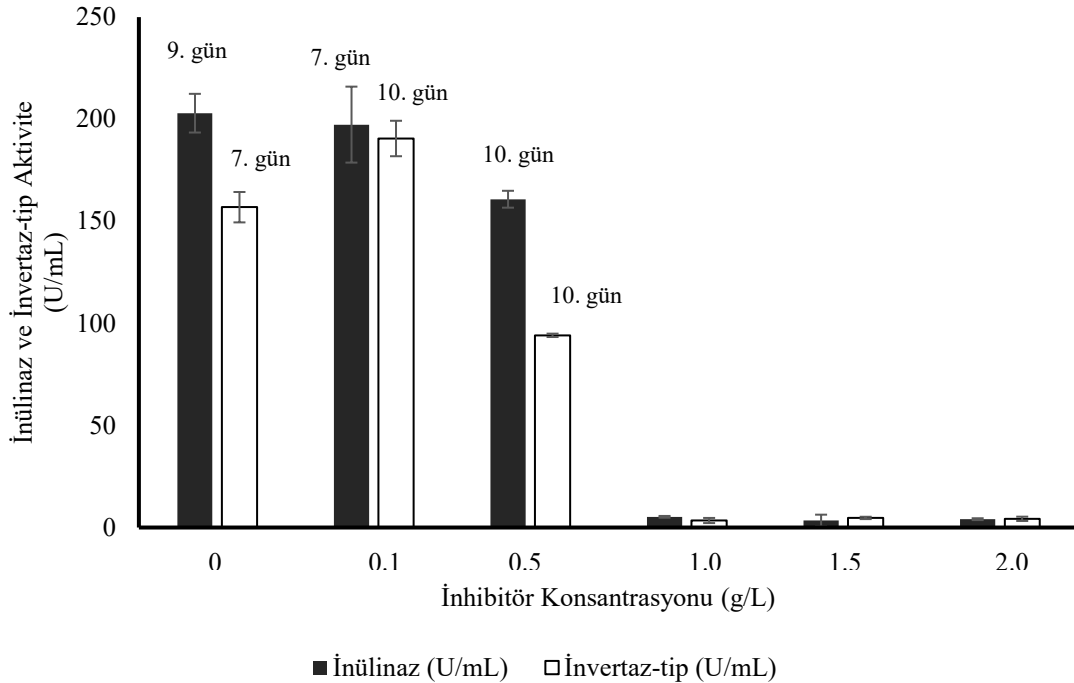
Çizelge 4.8’de furfural ile gerçekleştirilen tüm fermentasyonlara ait kinetik değerler verilmiş olup istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Değerler kontrol fermentasyonuna göre karşılaştırma yapılarak incelenmiştir. Maksimum ve minimum inülinaz aktivitesi sırasıyla kontrol ve 2.0 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilmiş olup sırasıyla 202.95 U/mL ve 3.80 U/mL olarak hesaplanmıştır ve değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). 0.1 g/L ve 0.5 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda inülinaz aktivitesi sırasıyla 197.35 U/mL, 160.80 U/mL olarak bulunmuştur. İnülinaz enzim üretimi açısından kontrol ve 0.1 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir ($P > 0.05$). Bunun yanı sıra kontrol fermentasyonu ile 0.5 g/L furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon arasındaki fark istatistiksel olarak önemli tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.7. Furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri

Konsantrasyon (g/L)	İnülinaz aktivite (U/mL)	İnvertaz-tip aktivite (U/mL)	I/S
0.1	197.35	192.31	1.03
0.5	160.80	94.14	1.71
1.0	5.14	3.44	1.49
1.5	8.50	4.51	1.88
2.0	3.80	4.26	0.89

Furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonların her birine ait I/S değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Değerler 10^{-2} ’den büyük olduğu için fermentasyonlar için hakim enzim aktivitesinin inülinaz olduğu görülmüştür (Das vd. 2019).

İnvertaz-tip aktivite incelendiğinde de inülinaz aktivitesindeki gibi davranış göstermiş olup kontrol ve 0.1 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). Bunun yanı sıra kontrol ve 0.5 g/L furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında invertaz-tip aktivite değerleri açısından fark istatistiksel olarak önemli tespit edilmiştir ($P<0.05$). Tüm denemeler sonucunda maksimum ve minimum invertaz aktivitesi sırasıyla 0.1 g/L ve 2.0 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilmiş olup değerleri sırasıyla 192.31 U/mL ve 4.26 U/mL olarak belirlenmiştir. Aralarında istatistiksel açıdan fark önemli olarak tespit edilmiştir ($P<0.05$).

**Şekil 4.14.** Furfuralın inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar

Gerçekleştirilen fermentasyonlara ait şeker tüketim hızları incelendiğinde ise kontrol, 0.1 g/L ve 0.5 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık görülmemiş olup değerler sırasıyla 11.60 g/L/gün, 14.70 g/L/gün, 11.32 g/L/gün'dür ($P>0.05$). 1.0 g/L, 1.5 g/L ve 2.0 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlara ait şeker tüketim hızları mikroorganizmanın inhibe olarak şeker tüketimini gerçekleştirememesinden dolayı hesaplanamamıştır.

Fermentasyonlara ait ŞTO (%) değerleri incelendiğinde kontrol, 0.1 g/L ve 0.5 g/L furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait değerler sırasıyla 98.90, 94.33 ve 88.10 olup aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli tespit edilmiştir ($P<0.05$). Bu sonuçlara göre 0.5 g/L konsantrasyona kadar mikroorganizmanın şekeri sorunsuz bir şekilde kullanabildiği ve ürüne dönüştürdüğü görülmektedir.

Q_{lase} ve Q_{Sase} sonuçları incelendiğinde ise kontrol, 0.1 g/L ve 0.5 g/L furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında önemli bir fark belirlenmemiştir ($P>0.05$).

Furfural ilavesiyle gerçekleştirilen tüm fermentasyonlara ait kinetik değerler Çizelge 4.8'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.8. Furfurala ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri

İK (g/L)	Iase (U/mL)	Sase (U/mL)	QS (g/L/gün)	ΔS (g/L)	Q_{Iase} (U/mL/gün)	Q_{Sase} (U/mL/gün)	ŞTO (%)	Toplam Kuru Biyokütle (g/L)	Nihai pH
0.0	202.95 ^a ±9.48	156.91 ^b ±10.53	11.60 ^a ±2.22	84.83 ^{ab} ±0.68	34.82 ^a ±1.92	30.37 ^{ab} ±3.55	98.90 ^a ±0.06	5.53 ^a ±0.03	3.02 ^c ±0.03
0.1	197.35 ^a ±26.36	192.31 ^a ±15.04	14.70 ^a ±0.18	85.82 ^a ±2.19	30.18 ^a ±1.01	38.79 ^a ±3.14	94.33 ^b ±0.05	5.21 ^b ±0.02	3.37 ^b ±0.24
0.5	160.80 ^b ±4.13	94.14 ^c ±0.83	11.32 ^a ±1.10	79.24 ^b ±0.61	42.51 ^a ±8.46	20.79 ^b ±0.23	88.10 ^c ±0.41	4.45 ^c ±0.01	2.99 ^c ±0.02
1.0	5.14 ^c ±0.19	3.44 ^d ±1.258	–	–	–	–	–	0.53 ^d ±0.01	4.88 ^a ±0.04
1.5	8.50 ^c ±2.05	4.51 ^d ±0.569	–	–	–	–	–	0.52 ^d ±0.02	4.96 ^a ±0.01
2.0	3.80 ^c ±0.76	4.26 ^d ±1.051	–	–	–	–	–	0.41 ^d ±0.01	5.08 ^a ±0.02

Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). İK: İnhibitör konsantrasyonu, Iase: İnülinaz aktivitesi, Sase: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, Q_{Iase} : Maksimum inülinaz üretim hızı, Q_{Sase} : Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı. – ile gösterilen kısımlarda kinetik değerler inhibisyondan dolayı hesaplanamamıştır.

4.3.5. 0.1 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi

Furfuralın inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase*, *Sase* ve toplam indirgen şeker miktarına ait deneysel verilere 10 farklı model uygulanmış olup model değerlendirme kriterleri Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Iase için en düşük RMSE (9.81 U/mL) ile MAE (5.74 U/mL) Weibull modelinden elde edilirken, en yüksek RMSE (19.012 U/mL) ile MAE (15.22 U/mL) değerleri MGM modelinde hesaplanmıştır. En yüksek R^2 değeri (0.9914) MLM ve MRM modeli ile bulunurken en düşük R^2 değeri (0.9732) Stannard modeli ile bulunmuştur. BF ve AF değerleri de modelleri karşılaştırmak için hesaplanmış olan değerlendirme kriterlerindendir. Bu değerlerin 1’e eşit ve yakın olması durumunda model ile hesaplanan tahmini değerlerin deneysel veriler ile uyumlu olduğu yorumu yapılmaktadır. BF değeri 1’den daha düşük olursa model ana hatları ile başarısız olarak kabul edilmektedir. 1’den büyük hesaplanan BF değeri ise tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğu kabul edilmektedir. BF değerleri MGM (2.32), MMF (2.80), Asimetrik (2.61), Baranyi (2.40), Huang (6.10) ve Fitzhugh modelinde (6.62) 1’den oldukça büyük olduğu için modeller deneysel verileri temsil etmekte başarısız bulunmuştur. AF değerleri ile tahmini deneysel verilerden yaklaşık olarak MGM için %132, MLM için %23, MRM için %23, Stannard için %22, Weibull için %29, MMF için %193, Asimetrik için %163, Baranyi için %40, Huang için %510 ve Fitzhugh için %600 oranında bir sapma olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda düşük RMSE (9.806), MAE (5.739), yüksek R^2 (0.9850), 1’e eşit BF ve 1’e yakın AF (1.22) değerleri ile Weibull model *Iase* üretimi için en uygun model olarak seçilmiştir.

Sase için en düşük RMSE (10.47 U/mL) ile MAE (6.81 U/mL) değerleri sırasıyla MLM ve MRM, en yüksek RMSE (14.29 U/mL) ile MAE (9.39 U/mL) sırasıyla Weibull ve Stannard modellerinde hesaplanmıştır. Yanı sıra en yüksek R^2 (0.9802) ve en düşük R^2 (0.9614) sırasıyla Huang ve Weibull modellerinden elde edilmiştir. BF değerleri MGM (3.29), Stannard (3.56), MMF (1.80), Asimetrik (1.95), Baranyi (3.23), Huang (3.76) ve Fitzhugh (2.20) modellerinde 1’den büyük olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle bu modellerin *Sase* için deneysel verileri tahmin etmede başarısız olarak tespit edilmiştir. MLM (1.03) ve MRM (1.03) modellerinde BF değerleri nispeten 1’e yakın olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle diğer modellere kıyasla bu iki model deneysel verileri tahmin etmede daha başarılı olarak tespit edilmiştir. AF değerleri MGM için %235, MLM için %24, MRM için %24, Stannard için %274, Weibull için %30, MMF için %82, Asimetrik için %99, Baranyi için %223, Huang için %276 ve Fitzhugh için %120 oranında bir yapısal sapma olduğunu ortaya koymuştur. Tüm bu hesaplanan kriterler doğrultusunda *Sase* üretimi için en uygun model MLM ve MRM olarak tespit edilmiştir.

Toplam indirgen şeker miktarı için en düşük RMSE (3.68 g/L) ile MAE (2.80 g/L) değerleri MMF, en yüksek RMSE (13.76 g/L) ile MAE (11.23 g/L) değerleri Asimetrik modellerinde hesaplanmıştır. Diğer yandan en yüksek R^2 (0.9926) ve en düşük R^2 (0.9660) sırasıyla Asimetrik ve Stannard modellerinden elde edilmiştir. Hesaplanan BF değerleri incelendiğinde MGM (0.89), MLM (0.96), MRM (0.94),

MMF (0.94), Asimetrik (0.68) ve Fitzhugh (0.90) modellerinde 1'in altında hesaplandığı görülmektedir. Bu durumda modeller başarısız olarak kabul edilmektedir. Stannard (1.08) ve Weibull (1.06) modellerinde BF değeri 1'e yakın olarak hesaplanmıştır. Bu durum modellerin deneysel verileri tahmin etmede diğer modellere göre daha başarılı olduğunu gösteren önemli kriterlerden biridir. Baranyi ve Fitzhugh modelleri için BF değeri 1.24 olarak hesaplanmış olup 1'den nispeten uzak olduğu düşünülerek modellerin uyumsuz olduğu sonucuna varılmıştır. AF değerleri MGM için %13, MLM için %14, MRM için %12, Stannard için %18, Weibull için %16, MMF için %13, Asietrik için %46, Baranyi için %26, Huang için %26 ve Fitzhugh için %16 oranında deneysel verilerden sapma olduğu tespit edilmiştir. Tüm hesaplanan kriterler doğrultusunda Weibull modeli en uygun model olarak seçilmiştir.

0.1 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellerine ait veriler Çizelge 4.9'da verilmiştir. 0.1 g/L furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için tüm model verileri ile deneysel verilerin kıyaslandığı grafikler EK-15, EK-16 ve EK-17'de verilmiştir. Ayrıca *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için hesaplanan model parametreleri EK-18, EK-19 ve EK-20'de verilmiştir.

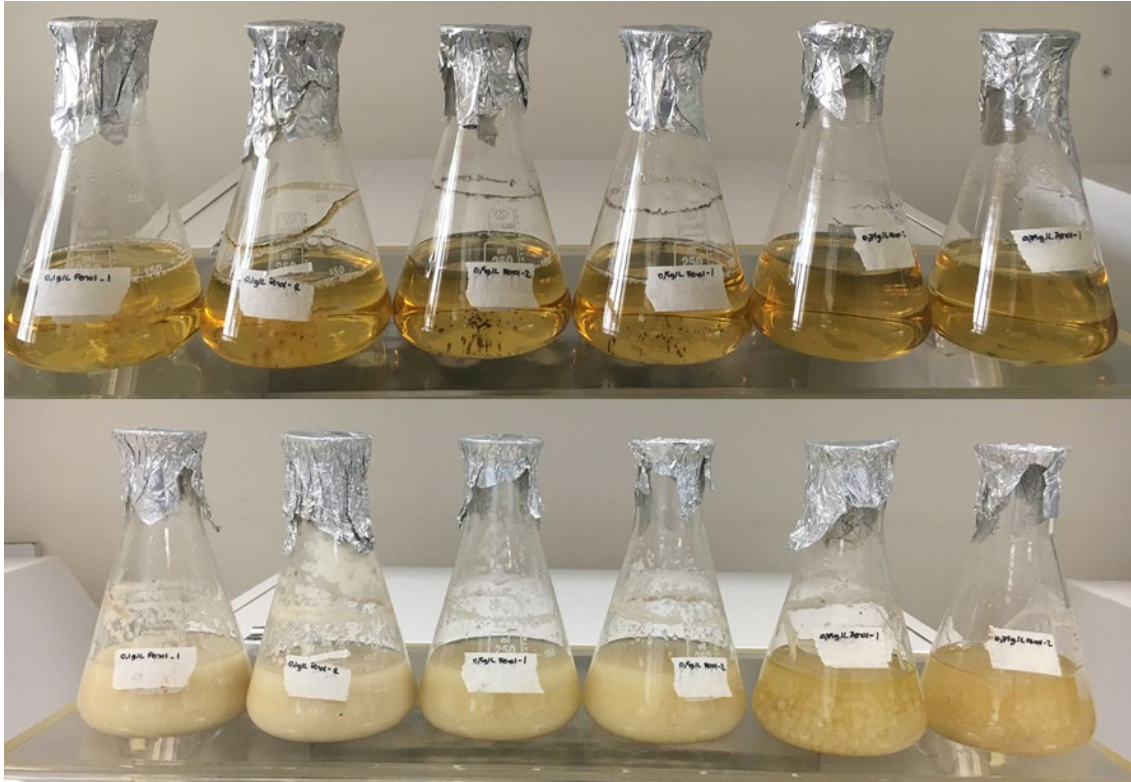
Çizelge 4.9. 0.1 g/L furfural ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri

Modeller/2-F	İnülinaz oluşumu					İnvertaz oluşumu					Toplam indirgen şeker miktarı				
	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (g/L)	MAE (g/L)	R ²	BF	AF
MGM	19.01	15.22	0.9826	2.32	2.32	13.54	8.34	0.9694	3.29	3.35	3.92	2.93	0.9898	0.89	1.13
MLM	13.62	10.69	0.9914	1.03	1.23	10.47	6.81	0.9771	1.03	1.24	4.02	3.81	0.9817	0.96	1.14
MRM	13.72	10.75	0.9914	1.03	1.23	10.47	6.81	0.9771	1.03	1.24	3.45	3.01	0.9872	0.94	1.12
Stannard	14.29	10.16	0.9732	1.00	1.22	12.99	9.39	0.9673	3.56	3.74	6.93	5.52	0.966	1.08	1.18
Weibull	9.81	5.74	0.9850	1.08	1.29	14.29	9.31	0.9614	0.83	1.30	5.92	5.03	0.9713	1.06	1.16
MMF	10.10	8.00	0.9816	2.80	2.93	12.80	8.47	0.973	1.79	1.82	3.68	2.80	0.983	0.94	1.13
Asimetrik	10.71	8.73	0.9862	2.61	2.63	13.03	9.17	0.9729	1.95	1.99	13.76	11.23	0.9926	0.68	1.46
Baranyi	14.79	11.28	0.9848	2.40	2.40	12.74	9.30	0.9778	3.23	3.39	7.68	5.08	0.9674	1.24	1.26
Huang	13.63	10.66	0.9887	6.10	6.10	11.93	8.78	0.9802	3.76	3.94	7.60	4.96	0.968	1.24	1.26
Fitzhugh	10.61	7.95	0.9762	6.62	7.00	13.33	9.10	0.964	2.20	2.36	4.69	3.55	0.9799	0.90	1.16

Koyu renkle verilmiş değerler en uyumlu modeli göstermektedir.

4.4. Fenol'ün İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar

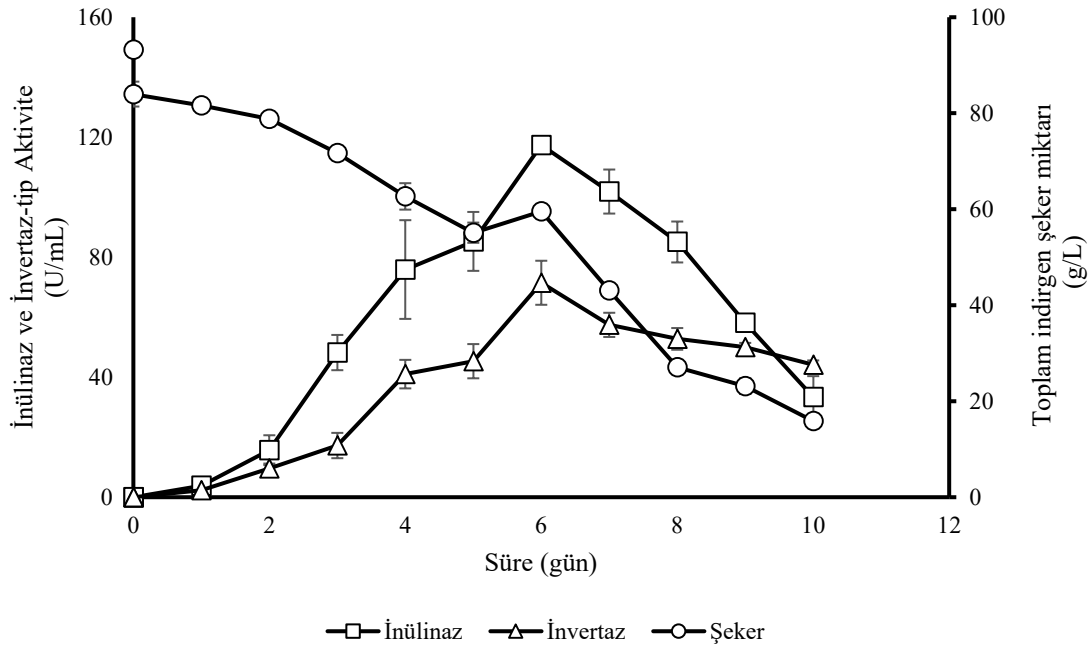
Kontrol besiyeri bileşimine (%10 sakaroz, %1 maya ekstraktı, %3 inokülasyon) 0.1 g/L, 0.5 g/L, 0.75 g/L 1.0 g/L ve 5.0 g/L konsantrasyonlarında fenol eklenerek tekerrürlü olmak üzere 5 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15'te fenol fermentasyonlarına ait bazı flask fotoğrafları verilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca her gün alınan örneklerde şeker ve enzim analizi yapılmıştır. İnülinaz aktivitesinde düşüş gözlemlendikten sonra fermentasyonlara son verilmiştir ve ardından besiyeri süzülerek toplam kuru biyokütle analizi yapılmıştır. Süzüntünün pH ölçümü gerçekleştirilerek başlangıç pH ile arasındaki fark ortaya konmuştur.



Şekil 4.15. Fenolün inhibitör olarak eklendiği fermentasyonlara ait bazı flask fotoğrafları

4.4.1. 0.1 g/L fenol ilave edilen fermentasyon

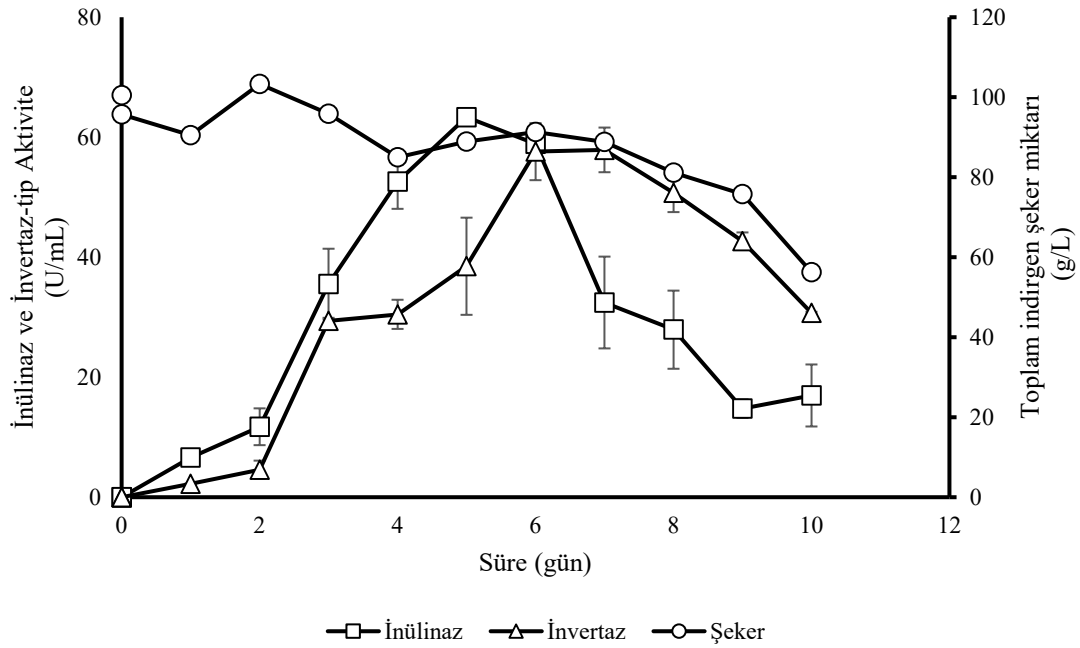
Besiyeri ortamına 0.1 g/L konsantrasyondaki fenolün eklenmesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir. Sonuçlar maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivitesinin sırasıyla 117.39 U/mL ve 71.48 U/mL olduğunu göstermiştir. Fermentasyon sonunda kalan şeker konsantrasyonu 15.86 g/L olarak belirlenmiştir. İnülinaz ve invertaz-tip enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında en yüksek enzim aktivitesine fermentasyonun 6.gününde ulaşıldığı görülmektedir. Mikroorganizma kontrol besiyerine göre daha düşük oranda inülinaz ve invertaz enzimi üretmiş olmasına rağmen yine de gelişim göstermiş ve enzim üretimi gerçekleştirebilmiştir. Fermentasyon sonunda toplam kuru biyokütle 4.88 g/L, nihai pH ise 2.73 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.4.2. 0.5 g/L fenol ilave edilen fermentasyon

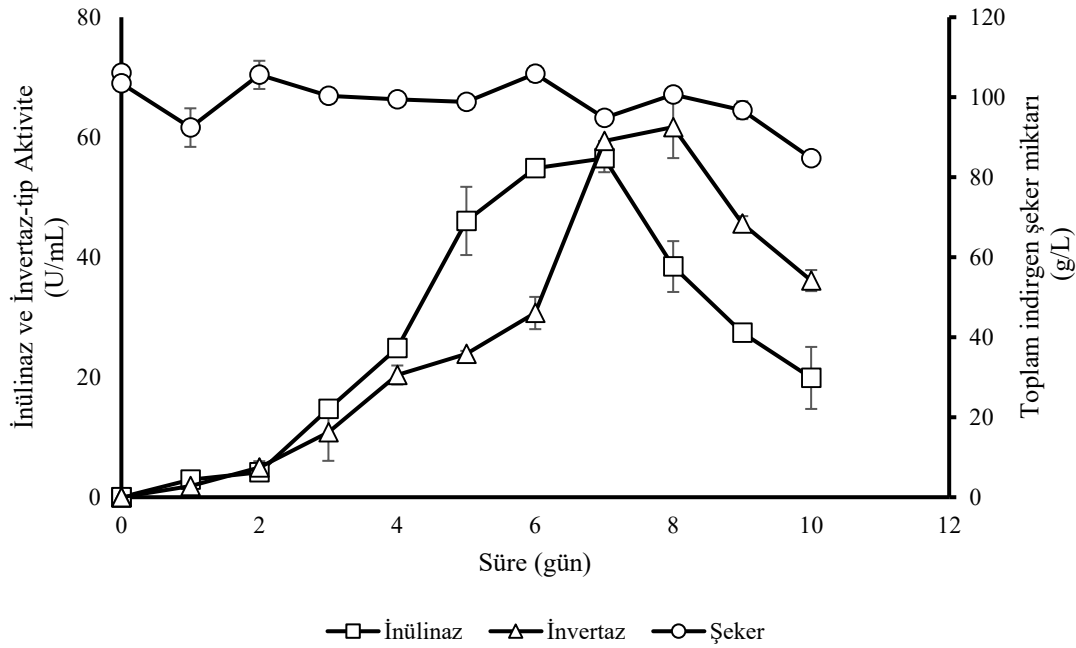
Fermentasyon besiyeri ortamına inhibitör bileşik olarak ilave edilen 0.5 g/L konsantrasyondaki fenolün fermentasyona etkisi ve bu fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.17’de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre en yüksek inülinaz aktivitesi 63.35 U/mL iken en yüksek invertaz-tip aktivite 57.89 U/mL olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon ortamında 0.gündeki şeker konsantrasyonu 95.67 g/L iken 10.gün 56.25 g/L olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre toplam şeker tüketimi 39.42 g/L olarak hesaplanmıştır. İnülinaz aktivitesi sonuçları incelendiğinde 1.günden itibaren bir artış gözlemlenmekte ve bu artış 5.güne kadar devam etmektedir. İnülinaz aktivitesinin en yüksek (63.35 U/mL) olduğu günün fermentasyonun 5.günü olduğu görülmektedir. 5.günden sonra enzim aktivitesinde önemli oranda düşüş görülmektedir. İnvertaz-tip aktivitenin sonuçları incelendiğinde ise 1.günden 3.güne kadar bir artış görülmekte 4.gün enzim aktivitesinde neredeyse bir değişiklik görülmemekte ve 4.günden sonra 6.güne kadar enzim aktivitesinin tekrar arttığı gözlemlenmektedir. 6.günden sonra invertaz-tip aktivitede de düşüş meydana gelmiştir. Fermentasyon sonunda besiyerinde toplam kuru biyokütle miktarı 3.07 g/L, pH ise 2.32 olarak ölçülmüştür. *Aspergillus niger* ile inülinaz üretimi gerçekleştirilen bu fermentasyonda besiyeri bileşiminde 0.5 g/L fenol olmasından dolayı şeker tüketimini yaklaşık %40 oranda gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Kontrol ve fenol konsantrasyonlarına kıyasla şeker tüketiminin yarıya indiği gözlemlenmiştir. 0.5 g/L fenol *Iase* aktivitesi açısından kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık 140 U/mL düşüşe sebep olmuştur. Bu sebeple fenol fermentasyonları için mikroorganizmanın inhibisyonunun başladığı konsantrasyon 0.5 g/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. 0.5 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.4.3. 0.75 g/L fenol ilave edilen fermentasyon

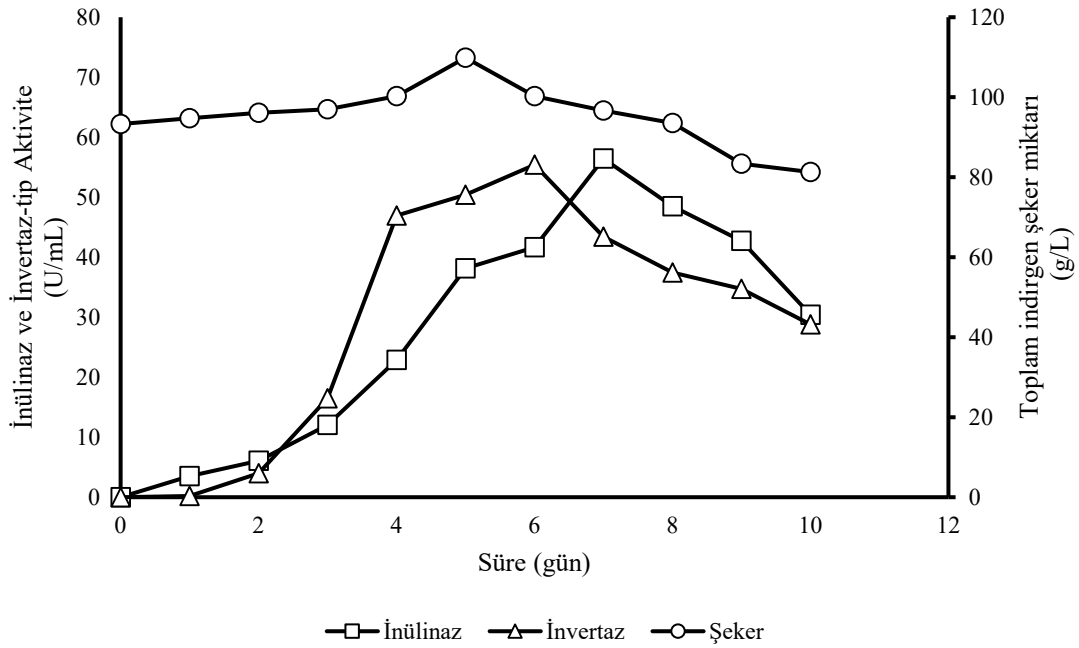
Besiyeri ortamına 0.75 g/L konsantrasyondaki fenolün inhibitör olarak eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.18’de verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi 54.82 U/mL, invertaz-tip aktivitesi ise 61.69 U/mL olarak belirlenmiştir. Besiyeri ortamındaki şeker konsantrasyonu 0.gün 103.47 g/L iken 10.gün 84.73 g/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre toplam şeker tüketimi 18.74 g/L olarak belirlenmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesine fermentasyonun 6.gününde invertaz-tip aktiviteye ise 8.günde ulaşılmıştır. 8.günden sonra enzim aktivitesinde düşüş meydana geldiği izlenmektedir. Mikroorganizmanın ortamdaki şekeri kontrol fermentasyonuna göre daha az tükettiği görülmüştür. Bu duruma rağmen her iki enzim aktivitesi de 50 U/mL’nin üzerinde elde edilmiştir. Fermentasyon sonunda ortamın pH’ı 2.34, toplam kuru biyokütle miktarı ise 2.00 g/L olarak bulunmuştur. Ortamdaki 0.75 g/L fenol içeriğinden dolayı mikroorganizmanın inhibe olduğu ve şekeri yeteri kadar kullanamadığı için (%18.10 ŞTO) biyokütlenin de az olduğu anlaşılmaktadır. Şeker tüketiminin (18.74 g/L) 0.5 g/L fenol ilavesi ile gerçekleştirilen (%41.19 ŞTO) fermentasyona göre daha az olmasına rağmen *Iase* aktiviteleri açısından aralarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Besiyerinde 0.75 g/L fenol bulunması durumunda fermentasyonun inhibisyonunun devam ettiği görülmektedir.



Şekil 4.18. 0.75 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.4.4. 1.0 g/L fenol ilave edilen fermentasyon

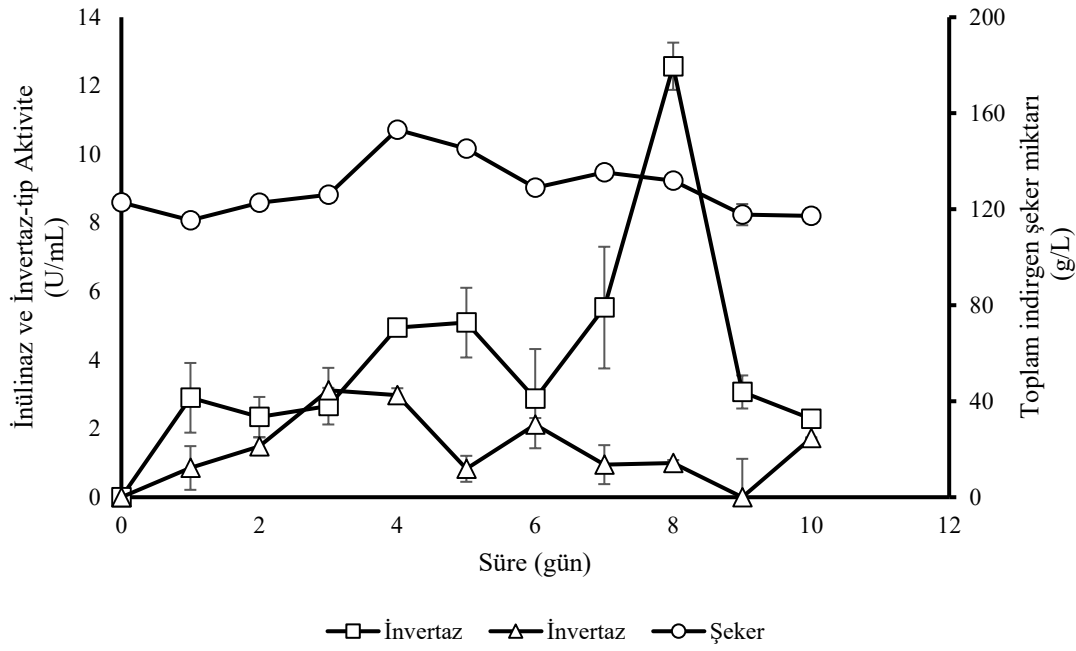
Besiyeri ortamında 1.0 g/L konsantrasyondaki fenolün inhibitör olarak eklendiği fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.19’da verilmiştir. Verilen sonuçlara göre en yüksek inülinaz aktivitesinin 56.43 U/mL (7.gün) ve en yüksek invertaz-tip aktivitenin 55.40 U/mL (6.gün) olduğu görülmektedir. *Iase* aktivitesi açısından 0.5 ve 0.75 g/L gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında büyük bir farklılık gözlemlenmemiştir. 0.günde ortamdaki şeker miktarı 94.76 g/L, 10.günde ise 81.92 g/L olarak belirlenmiştir. Toplam şeker tüketimi 12.84 g/L olmuştur. Mikroorganizma ortamdaki 1.0 g/L fenolün inhibitör olarak bulunmasından etkilenmiş ve şeker tüketimini yeterli miktarda gerçekleştirememiştir. 1.0 g/L fenolün inhibitör bileşik olarak kullanıldığı fermentasyon ortamının son pH’ı 2.50 olurken toplam kuru biyokütle miktarı 1.97 g/L olarak hesaplanmıştır. Artan fenol konsantrasyonunun fermentasyon sıvısında bulunması durumunda mikroorganizmanın gelişiminin sınırlandığı ve aynı zamanda şeker tüketiminin de azaldığı ortaya konmuştur. Tüm bunlara rağmen inülinaz ve invertaz-tip enzim aktiviteleri 1.0 g/L fenol ilavesinde dahi 55 U/mL’nin üzerinde aktiviteye ulaştığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. 1.0 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.4.5. 5.0 g/L fenol ilave edilen fermentasyon

Besiyeri ortamına 5.0 g/L konsantrasyonda fenolün eklenmesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlara Şekil 4.20’de verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi 12.57 U/mL, invertaz-tip aktivite ise 3.12 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyon süresi boyunca şeker miktarının başlangıç konsantrasyonundan daha yüksek miktarlara çıkması gibi karmaşık değişimler gözlemlenmektedir. Bu artışın fenolün şekeri bağlayıcı özelliğinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek oranlarda fenolün ortamda bulunması ile ortaya çıkan bu durum fenolün renk bağlama kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir (Miller 1959). Fermentasyon boyunca toplam şeker tüketimi 5.61 g/L olarak hesaplanmıştır. En yüksek inülinaz aktivitesine fermentasyonun 8.gününde, invertaz aktivitesine ise 3.günde ulaşılmıştır. Sonuçlar, *Aspergillus niger*’in 5.0 g/L konsantrasyonunda fenolü tolere edemediği ve mikroorganizma gelişiminin diğer fermentasyon denemelerine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Fermentasyon sonunda toplam kuru biyokütle miktarı 0.419 g/L olmuştur. Başlangıçta pH 5.0 iken fermentasyon sonunda 5.15 olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma gelişimi gerçekleşmediği için ortamda hiçbir ürün oluşumu gözlemlenmemiş ve bu sebeplerden dolayı pH düşüşü de tespit edilmemiştir.



Şekil 4.20. 5 g/L fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.4.6. Fenolün besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Çalışmanın bu kısmında fermentasyon sıvısına 0.1 g/L, 0.5 g/L, 0.75 g/L, 1.0 g/L ve 5.0 g/L fenolün inhibitör bileşik olarak eklenmesiyle fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiş olup gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik değerler Çizelge 4.11’de verilmiştir. Sonuçlara göre *Aspergillus niger* ile inülinaz ve invertaz enzimleri üretiminde ortamda 0.1 g/L, 0.5 g/L, 0.75 g/L ve 1.0 g/L gibi düşük konsantrasyonlarda fenol bulunması durumunda 50 U/mL’nin üzerinde *Iase* aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. 5.0 g/L fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda 12.57 U/mL *Iase* aktivitesi alınmış olup inhibe etki gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.10. Fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri

Konsantrasyon (g/L)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	I/S
0.1	117.39	71.48	1.64
0.5	63.35	57.89	1.09
0.75	54.82	61.69	0.89
1.0	56.47	55.40	1.01
5.0	12.57	3.12	4.02

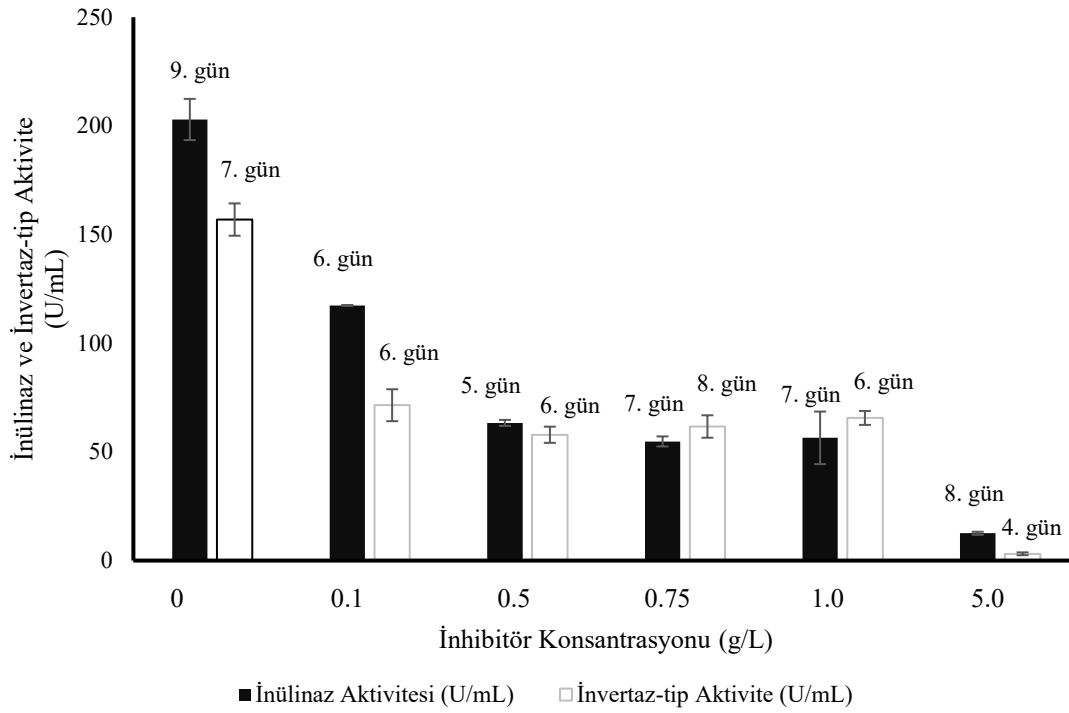
Çizelge 4.10’da fenol ilavesi ile gerçekleştirilen her bir fermentasyona hesaplanmış I/S değerleri verilmiştir. Tüm sonuçların 10^{-2} ’den büyük olmasından dolayı

fermentasyon ortamındaki enzim aktivitesinin inülinaz doğasında olduğu anlaşılmıştır (Das vd. 2019).

Kontrol fermentasyonu ile 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyon sonucuna göre inülinaz aktiviteleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$). 0.1 g/L fenolün ortamda bulunması ile gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda 117.39 U/mL inülinaz aktivitesi elde edilmiştir. En düşük inülinaz aktivitesi ortamda 5.0 g/L fenol bulunması durumunda 12.57 U/mL olarak elde edilmiştir. 0.5 g/L, 0.75 g/L ve 1 g/L fenol ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edilen inülinaz aktiviteleri Çizelge 4.11’de verilmiş olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($P>0.05$).

İnvertaz-tip aktivite sonuçları incelendiğinde fenolün 0.1 g/L konsantrasyonda fermentasyon sıvısına katılması ile gerçekleştirilen deneme kontrol fermentasyonuna göre düşüş göstermiş ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). 5.0 g/L konsantrasyonunun mikrobiyal gelişimi engelleyerek inülinaz ve invertaz-tip enzim üretimini engellediği görülmüştür. Şekil 4.21’de fenolün inhibitör olarak besiyerine eklendiği fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.11’de kontrol fermentasyonu ile 5 farklı fenol konsantrasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında şeker tüketimi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmiştir ($P<0.05$). Fenolün inhibitör madde olarak eklendiği fermentasyon sonuçlarına göre maksimum şeker tüketim hızının en fazla olduğu fermentasyon 0.1 g/L konsantrasyonda gerçekleştirilen deneme olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. Fenolün inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar

Maksimum inülinaz üretim hızı incelendiğinde kontrol fermentasyonu ile 0.1 g/L fenol ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyon için değerler sırasıyla 32.56 U/mL/gün, 31.54 U/mL/gün olarak bulunmuş ve aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Maksimum invertaz üretim hızı incelendiğinde ise kontrol fermentasyonu ile fenol ilavesi ile gerçekleştirilen denemeler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$).

Kontrol fermentasyonu ile 0.1 g/L, 0.5 g/L, 0.75 g/L, 1.0 g/L ve 5.0 g/L fenol ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda toplam kuru biyokütle miktarları sırasıyla 5.53 g/L, 4.88 g/L, 3.07 g/L, 2.0 g/L, 1.97 g/L ve 0.42 g/L olarak bulunmuştur. Miktarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. ($P<0.05$). Tüm fermentasyonların son pH ölçümleri gerçekleştirilmiş olup sırasıyla 3.02 (kontrol), 2.73 (0.1 g/L), 2.32 (0.5 g/L), 2.34 (1.0 g/L), 2.50 (1.0 g/L) ve 5.15 (5.0 g/L) olarak bulunmuştur. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu ortaya konmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.11’de fenol ile gerçekleştirilen tüm fermentasyonlar için hesaplanan kinetik parametreler verilmiştir.

Çizelge 4.11. Fenole ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri

İK (g/L)	<i>Iase</i> (U/mL)	<i>Sase</i> (U/mL)	QS (g/L/gün)	ΔS (g/L)	<i>Q_{Iase}</i> (U/mL/gün)	<i>Q_{Sase}</i> (U/mL/gün)	ŞTO (%)	Toplam Kuru Biyokütle (g/L)	Nihai pH
0.0	202.95 ^a ±9.48	156.91 ^a ±10.53	11.60 ^a ±1.26	84.83 ^a ±0.68	34.82 ^a ±1.92	30.37 ^a ±3.55	98.90 ^a ±0.06	5.53 ^a ±0.03	3.02 ^b ±0.03
0.1	117.39 ^b ±0.07	71.48 ^b ±5.19	8.74 ^b ±1.07	68.13 ^b ±3.69	31.54 ^a ±4.73	16.71 ^b ±3.37	81.00 ^b ±1.89	4.88 ^b ±0.08	2.73 ^c ±0.03
0.5	63.35 ^c ±0.97	57.89 ^c ±2.63	6.62 ^{bc} ±0.34	39.42 ^c ±4.70	16.44 ^b ±1.85	12.90 ^b ±0.42	41.19 ^c ±4.84	3.07 ^c ±0.01	2.32 ^c ±0.00
0.75	54.82 ^c ±1.64	61.69 ^{bc} ±3.65	4.70 ^c ±0.41	18.74 ^d ±1.50	17.52 ^b ±1.15	19.58 ^b ±1.04	18.10 ^d ±1.42	2.00 ^d ±0.10	2.34 ^c ±0.02
1.0	56.47 ^c ±8.55	55.40 ^c ±2.27	6.18 ^{bc} ±0.29	12.84 ^d ±1.58	11.02 ^{bc} ±0.61	19.03 ^b ±1.29	14.18 ^d ±1.55	1.97 ^d ±0.27	2.50 ^d ±0.08
5.0	12.57 ^d ±0.49	3.12 ^d ±0.46	0.37 ^d ±0.08	5.61 ^e ±0.41	2.94 ^c ±0.44	1.11 ^c ±0.03	1.65 ^e ±0.38	0.42 ^e ±0.02	5.15 ^a ±0.01

Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). İK: İnhibitör konsantrasyonu, *Iase*: İnülinaz aktivitesi, *Sase*: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, *Q_{Iase}*: Maksimum inülinaz üretim hızı, *Q_{Sase}*: Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı.

4.4.7. 0.1 g/L fenol ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi

Fenolün inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase*, *Sase* ve toplam indirgen şeker miktarına ait deneysel verilere 10 farklı model uygulanmış olup model değerlendirme kriterleri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12’de verilen sonuçlar doğrultusunda *Iase* üretimi için en düşük RMSE (5.85 U/mL) ile MAE (1.16 U/mL) MGM ve Asimetrik modelde, en yüksek RMSE (13.97 U/mL) ile MAE (11.49 U/mL) değerleri Stannard modelinde hesaplanmıştır. En yüksek R^2 değeri (0.9823) MGM modeli ile bulunurken en düşük R^2 değeri (0.9714) Stannard modeli ile bulunmuştur. BF ve AF değerleri de modelleri karşılaştırmak için hesaplanmış olan değerlendirme kriterlerindendir. Bu değerlerin 1’e eşit ve yakın olması durumunda model ile hesaplanan tahmini değerlerin deneysel veriler ile uyumlu olduğu yorumu yapılmaktadır. BF değeri 1’den daha düşük olursa model ana hatları ile başarısız olarak kabul edilmektedir. 1’den büyük hesaplanan BF değeri ise tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğu kabul edilmektedir. BF değerleri MLM (0.82), MRM (0.83), Stannard (0.75) ve Fitzhugh (0.88) için 1’in altında hesaplanmış olup modeller deneysel verileri tahmin etmede başarısız olarak kabul edilmiştir. Baranyi modeli ise 8.16 olan BF değeri ile 1’in oldukça üstünde olduğu için başarısız olarak kabul edilmiştir. MGM (1.02), Weibull (1.15), MMF (1.09), Asimetrik (1.14) ve Huang (1.14) modellerinde BF değeri 1’e nispeten yakın olarak hesaplanmıştır. AF değeri MGM için %9, MLM için %23, MRM için %23, Stannard için %42, Weibull için %21, MMF için %15, Asimetrik için %17, Baranyi için %785, Huang için %26 ve Fitzhugh için %14 oranında tahmin edilen verilerin deneysel verilerden farklı olduğunu ortaya koymuştur. Tüm hesaplanan değerlendirme kriterleri doğrultusunda *Iase* üretimi için en uygun model MGM olarak belirlenmiştir.

Sase için en düşük RMSE (4.20 U/mL) ile MAE (3.49 U/mL) değerleri Huang modelinde, en yüksek RMSE (14.15 U/mL) ile MAE (9.36 U/mL) Stannard modelinde hesaplanmıştır. Yanı sıra en yüksek R^2 (0.9746) ve en düşük R^2 (0.9355) sırasıyla Huang ve Asimetrik modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MLM (0.91), MRM (0.91), Asimetrik (0.93) ve Fitzhugh (0.77) modellerinde 1’in oldukça altında hesaplanmış olduğundan dolayı modeller deneysel verileri tahmin etmede başarısız olarak kabul edilmiştir. Baranyi modelinde BF değeri 11.34 olarak hesaplanmış olup bu değer 1’in oldukça üstünde olduğu için modelin başarısız olduğu tespit edilmiştir. Stannard modeli için BF değeri 1’e eşit olarak hesaplanmıştır ve bu durum Stannard modelin yapısal bir sapma göstermediğini ortaya koymuştur. MGM (1.30), Weibull (1.22), MMF (1.31), Huang (1.71) modellerinde BF değeri 1’e nispeten yakın olsa da Stannard modeline göre başarısız olarak kabul edilmiştir. AF değeri MGM için %36, MLM için %15, MRM için %15, Stannard için %27, Weibull için %31, MMF için %44, Asimetrik için %12, Baranyi için %1108, Huang için %83 ve Fitzhugh için %31 oranında bir sapma olduğunu belirlemede yardımcı olmuştur. %30’un üstünde kalan sapmalara sahip olan modeller başarısız olarak kabul edilmektedir. Bu veriler doğrultusunda *Sase* üretimi için en uygun model Stannard modeli olarak tespit edilmiştir.

Toplam indirgen şeker miktarı için en düşük RMSE (3.32 g/L) ile MAE (2.62 g/L) değerleri sırasıyla MRM ve Fitzhugh modellerinde hesaplanmıştır. En yüksek RMSE (7.11 g/L) ile MAE (5.69 g/L) değerleri ise Weibull modelinden hesaplanmıştır. Diğer yandan en yüksek R^2 (0.9930) ve en düşük R^2 (0.9597.) sırasıyla MGM ve Weibull modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MGM (0.89), MLM (0.95), MRM (0.89), MMF (0.94), Asimetrik (0.84) ve Fitzhugh (0.91) modelinde 1'in altında hesaplanarak modeller deneysel verileri tahmin etmede başarısız olarak kabul edilmiştir. Stannard ve Weibull modellerinde BF değeri 1'e eşit çıkmış olup yapısal bir sapma olmadığı tespit edilmiştir. Baranyi (1.16) ve Huang (1.17) modellerinde BF değerlerinin Stannard ve Weibull'a göre 1'e göre nispeten uzak olduğu görülmektedir. AF değeri MGM modelinde %8, MLM modelinde %5, MRM modelinde %8, Stannard modelinde %12, Weibull modelinde %15, Asimetrik modelde %12, Baranyi modelinde %18, Huang modelde %18 ve Fitzhugh modelde %8 oranında deneysel verilerden saptığını göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda Stannard, Weibull, Baranyi ve Huang modelleri ile deneysel verilerin tahmin edilebildiği görülmüştür. Ancak düşük RMSE, düşük MAE, yüksek R^2 ve 1'e eşit BF değerinden dolayı Stannard ve Weibull modeller toplam indirgen şeker miktarı değişimi için deneysel verileri tahmin etmede en başarılı modeller olarak tespit edilmiştir.

1.0 g/L fenol ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel verilerin model verilerinin karşılaştırılması için hesaplanan model kriterleri Çizelge 4.12'de detaylı olarak verilmiştir. 1.0 g/L fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için tüm model verileri ile deneysel verilerin kıyaslandığı grafikler EK-21, EK-22 ve EK-23'te verilmiştir. Ayrıca *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için hesaplanan model parametreleri EK-24, EK-25 ve EK-26'da verilmiştir.

Çizelge 4.12. 0.1 g/L fenol ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri

Modeller/ Fenol	İnülinaz oluşumu					İnvertaz oluşumu					Toplam indirgen şeker miktarı				
	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (g/L)	MAE (g/L)	R ²	BF	AF
MGM	5.85	3.98	0.9823	1.02	1.09	5.78	4.23	0.9635	1.30	1.36	3.45	2.73	0.993	0.89	1.08
MLM	6.74	5.44	0.98	0.82	1.23	4.94	3.89	0.9685	0.91	1.15	3.37	2.64	0.9862	0.95	1.05
MRM	6.68	5.59	0.9802	0.83	1.23	4.96	3.89	0.9685	0.91	1.15	3.32	2.65	0.9924	0.89	1.08
Stannard	13.97	11.49	0.9714	0.75	1.42	14.15	9.36	0.9658	1.00	1.27	6.26	5.05	0.966	1.00	1.12
Weibull	6.81	4.94	0.9765	1.15	1.21	4.62	3.68	0.966	1.22	1.31	7.11	5.69	0.9597	1.00	1.15
MMF	6.20	3.85	0.9786	1.09	1.15	5.41	4.18	0.9541	1.31	1.44	2.35	1.56	0.9838	0.94	1.05
Asimetrik	6.16	1.16	0.9794	1.14	1.17	7.14	4.60	0.9355	0.93	1.12	5.06	4.22	0.99	0.84	1.12
Baranyi	8.30	4.08	0.975	8.16	8.85	4.61	3.77	0.971	11.34	12.08	5.85	3.95	0.979	1.16	1.18
Huang	8.24	4.03	0.975	1.14	1.26	4.20	3.49	0.9746	1.71	1.83	5.80	3.86	0.9793	1.17	1.18
Fitzhugh	7.97	5.51	0.974	0.88	1.14	8.26	5.99	0.9152	0.77	1.31	3.78	2.62	0.975	0.91	1.08

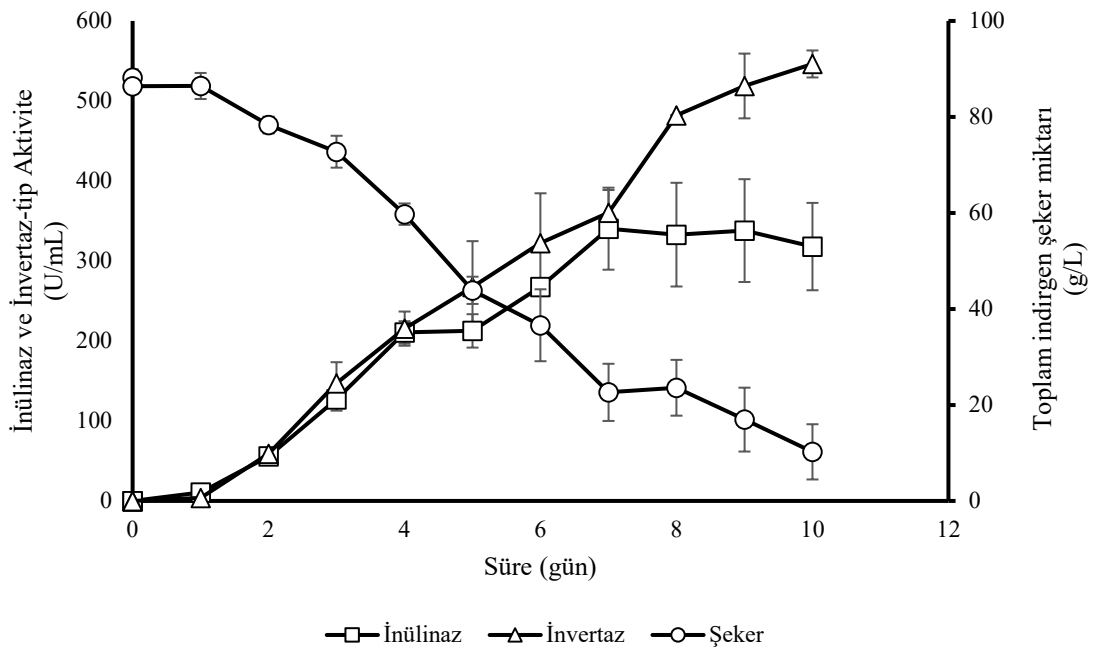
Koyu renk ile gösterilen değerler en uygunlu modelleri temsil etmektedir.

4.5. Asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlar

Kontrol besiyeri bileşimine (%10 sakaroz, %1 maya ekstraktı, %3 inokülasyon) 2.5 g/L, 5.0 g/L, 7.5 g/L, 10.0 g/L ve 12.5 g/L konsantrasyonda asetik asit eklenerek her fermentasyon tekerrürlü olmak üzere 5 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. İnülinaz aktivitesinde düşüş gözlemlendikten sonra fermentasyonlara son verilmiştir ve ardından besiyeri süzülerek toplam kuru biyokütle analizi ve pH analizleri yapılmıştır.

4.5.1. 2.5 g/L asetik asit ilave edilen fermentasyon

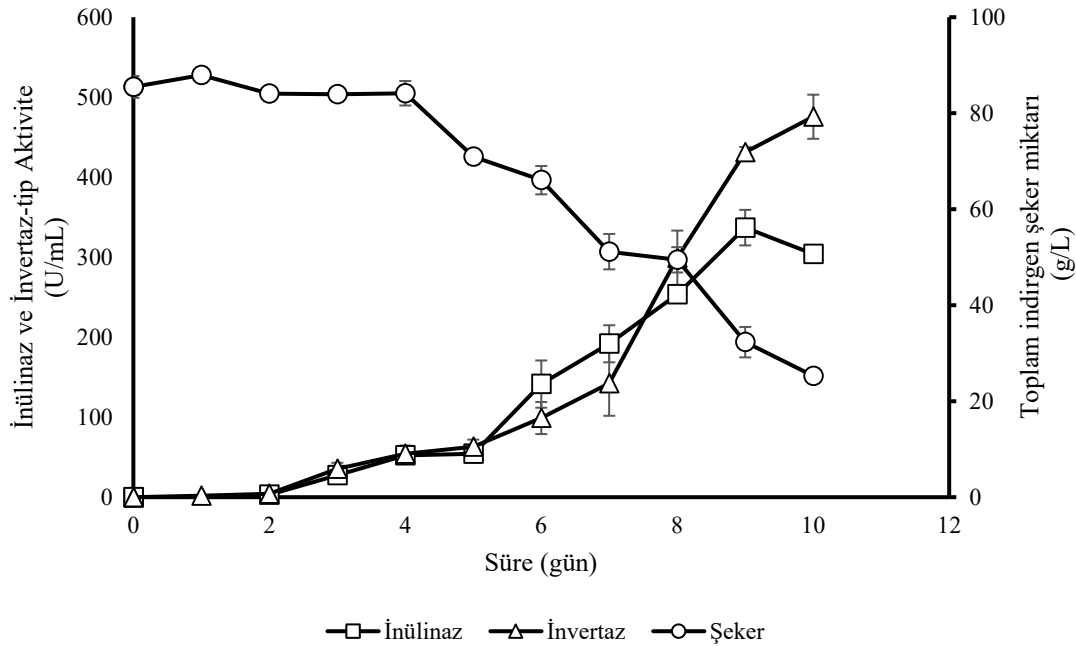
2.5 g/L asetik asit fermentasyon ortamına inhibitör olarak eklenmiş ve gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.22’de verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi 340.32 U/mL iken invertaz-tip aktivite 546.25 U/mL olarak hesaplanmıştır. Şeker analizi sonuçlarına göre şeker tüketimi 76.17 g/L olarak bulunmuştur. Enzim üretimindeki artışa bağlı olarak şeker tüketiminin de sorunsuz bir şekilde gerçekleştiği Şekil 4.22’de görülmektedir. En yüksek inülinaz aktivitesine (340.32 U/mL) 7.günde, invertaz-tip aktivitesine (546.25 U/mL) ise 10.günde ulaşılmıştır. Toplam kuru biyokütle miktarı 3.42 g/L olurken fermentasyon ortamının son pH’ı 3.05 olarak ölçülmüştür. Mikroorganizma ortamda 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak bulunmasına rağmen gelişim göstermiş ve kontrol fermentasyonundan daha yüksek enzim aktivitesine ulaşılmıştır. Bu durum besiyeri ortamı olarak kullanılacak hidrolizatlarda ön işlem sonucunda 2.5 g/L konsantrasyonda asetik asit oluşması durumunda asetik asidin ortamdan uzaklaştırılması için detoksifikasyon işleminin gerekmediğini ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra 2.5 g/L konsantrasyondaki asetik asit varlığının *Aspergillus niger* A42 ile inülinaz enzimi üretimini tetiklediği ortaya konmuştur.



Şekil 4.22. 2.5 g/L asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.5.2. 5.0 g/L asetik asit ilave edilen fermentasyon

Besiyeri ortamına inhibitör olarak 5 g/L konsantrasyonunda asetik asit eklenmesi ile elde edilen fermentasyon sonuçları Şekil 4.23'te verilmiştir. En yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivitesi sırasıyla 336.96 U/mL ve 475.59 U/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam şeker tüketimi 60.20 g/L olurken en yüksek inülinaz enzim aktivitesine (336.96 U/mL) 9.günde ulaşılmıştır. Fermentasyon 9.gününden sonra inülinaz aktivitesindeki azalma sebebiyle 11 günde sonlandırılmıştır. Fermentasyon sonunda ortamdaki şeker miktarı 25.28 g/L, toplam kuru biyokütle miktarı 2.66 g/L pH ise 3.48 olarak bulunmuştur. Besiyeri ortamında 5 g/L asetik asit inhibitör bileşik olarak bulunmasına rağmen mikroorganizma gelişim göstermiş ve enzim üretimi gerçekleşmiştir. Bu durum mikroorganizmanın 5.0 g/L asetik asit varlığında da gelişimini sürdürdüğünü hatta kontrol fermentasyonundan daha yüksek bir enzim aktivitesi elde edildiği için 5.0 g/L asetik asidin enzim üretimini tetiklediği ortaya konmuştur. 5.0 g/L asetik asit içeren bir hidrolizat için detoksifasyon prosesinin ihtiyaç olmadığı belirlenmiştir.

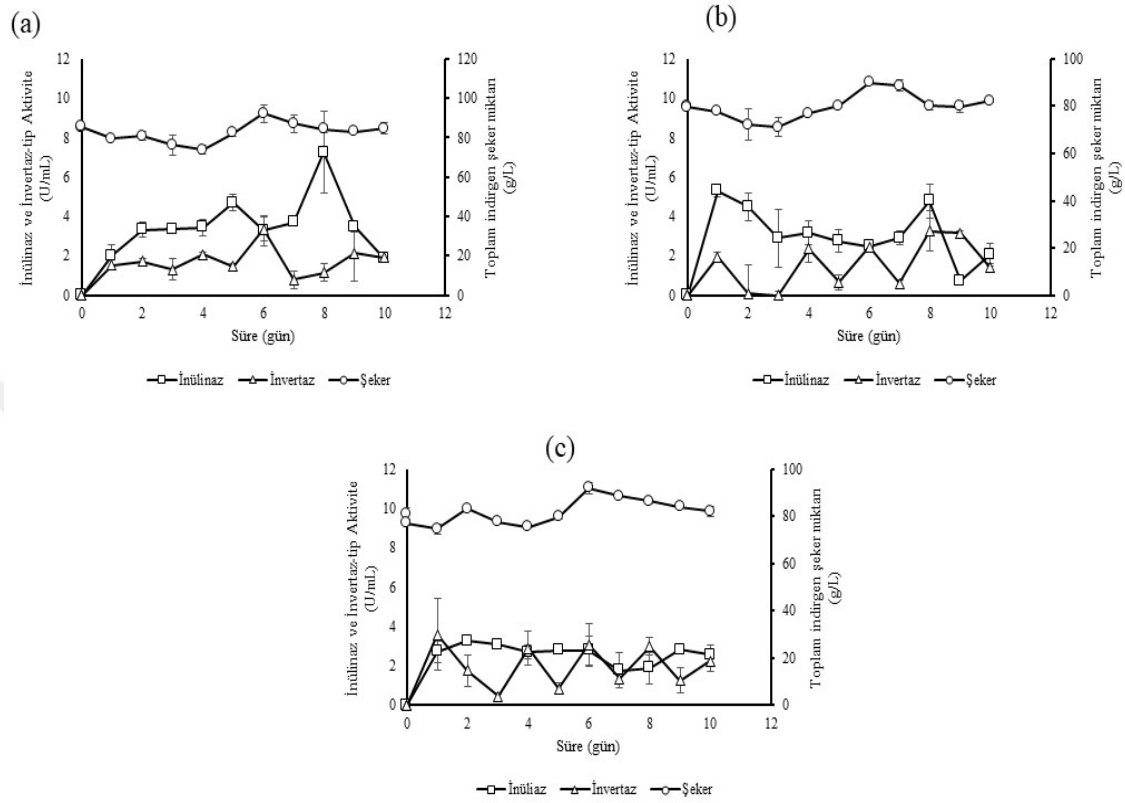


Şekil 4.23. 5 g/L asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.5.3. 7.5, 10.0 ve 12.5 g/L asetik asit ilave edilen fermentasyonlar

Fermentasyon ortamına 7.5 g/L, 10.0 g/L, 12.5 g/L asetik asidin inhibitör olarak katılmasıyla gerçekleştirilen denemelerin sonuçları Şekil 4.24'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde her 3 fermentasyon için de şeker tüketiminin neredeyse hiç olmadığını dolayısıyla mikroorganizmanın şekeri kullanmadığı görülmüştür. Analiz sonuçları düzenli bir artış veya azalış göstermemiş olduğu için kinetik parametreler hesaplanamamıştır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında *Aspergillus niger* ile inülinaz ve invertaz enzimi üretiminin 7.5 g/L konsantrasyon ve daha yüksek konsantrasyonlarda gerçekleşmediği mikroorganizmanın bu konsantrasyonları tolere edemediği ve inhibe olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizma ortamdaki şekeri kullanmadığı için ürüne de

dönüştürememiş ve fermentasyon sıvısında bulunan yüksek konsantrasyonlardaki asetik asidin mikroorganizmanın gelişimini engellediği görülmüştür. *Aspergillus niger*, fermentasyon ortamındaki 5.0 g/L ve daha düşük konsantrasyonlardaki asetik asidi tolere ederken 7.5 g/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda gelişmemektedir.



Şekil 4.24. 7.5 g/L (a), 10.0 g/L (b) ve 12.5 g/L (c) asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlara ait sonuçlar

4.5.4. Asetik asidin besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Asetik asit 2.5 g/L, 5.0 g/L, 7.5 g/L, 10.0 g/L ve 12.5 g/L olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda fermentasyon sıvısına eklenmiştir. Böylece *Aspergillus niger*'den inülinaz ve invertaz enzimleri üretiminde asetik asidin inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.14'te asetik asidin fermentasyon ortamına eklenmesiyle gerçekleşen tüm denemelere ait kinetik değerler verilmiştir. *Aspergillus niger*'in asetik asidi ortamda 5.0 g/L konsantrasyona kadar tolere edebildiği gözlemlenmiş hatta enzim aktivitesini tetiklediği belirlenmiştir.

Asetik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonları her biri için I/S oranı hesaplanmış olup Çizelge 4.13'te verilmiştir. Sonuçlara göre I/S oranının 10^{-2} 'den büyük olmasından dolayı fermentasyon ortamındaki enzimin inülinaz aktivitesi doğasında olduğu anlaşılmaktadır (Das vd. 2019).

Çizelge 4.13. Asetik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri

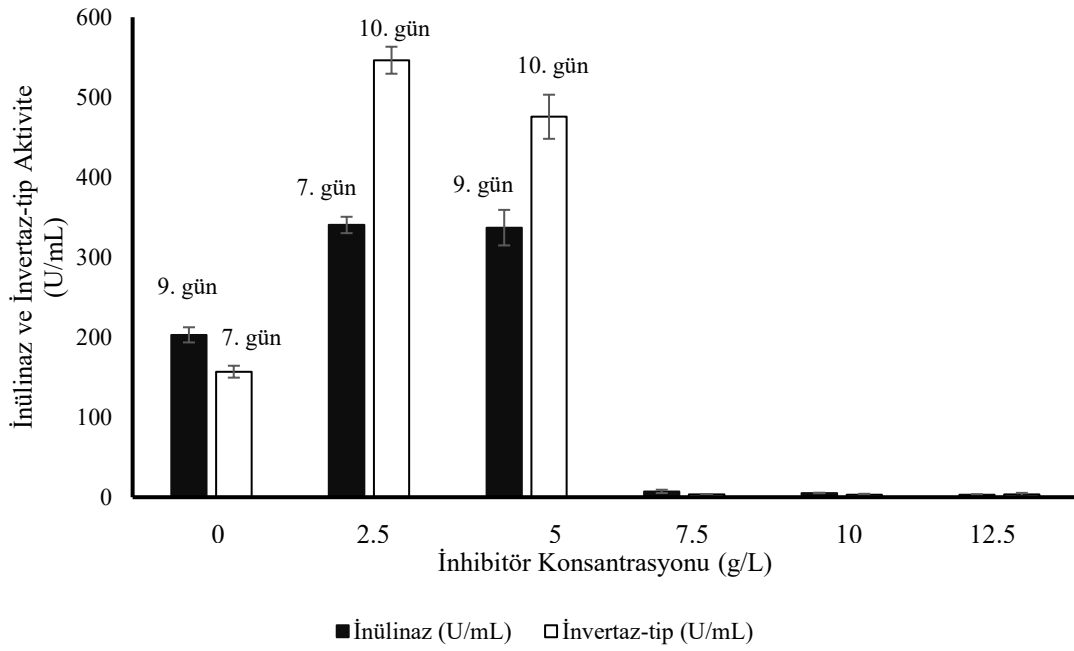
Konsantrasyon (g/L)	İnülinaz aktivite (U/mL)	İnvertaz-tip aktivite (U/mL)	I/S
2.5	340.32	546.25	0.62
5.0	336.96	475.59	0.71
7.5	7.26	3.36	2.16
10.0	5.31	3.27	1.62
12.5	3.24	3.61	0.90

İnülinaz aktivitesi kontrol fermentasyonunda 202.95 U/mL iken 2.5 g/L ve 5.0 g/L asetik asit içeren besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda inülinaz aktivitesinin sırasıyla 340.32 U/mL ve 336.96 U/mL olduğu hesaplanmıştır. Kontrol fermentasyonu ve asetik asit eklenerek gerçekleştirilen fermentasyonların tamamı arasında inülinaz üretimi açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). 2.5 g/L ve 5.0 g/L konsantrasyonlarda asetik asidin fermentasyon sıvısına eklenmesi ile inülinaz aktivitesini tetikleyici yönde etki gösterdiği sonuçlardan anlaşılmaktadır.

İnvertaz-tip aktivite sonuçları incelendiğinde 2.5 g/L ve 5.0 g/L konsantrasyonlardaki aktivite sırasıyla 546.25 U/mL ve 475.59 U/mL olarak bulunmuş olup aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Kontrol fermentasyonu ile kıyaslandığında ise sonuçlar arasında fark istatistiksel olarak önemli tespit edilmiştir ($P<0.05$). Asetik asidin 2.5 g/L ve 5.0 g/L konsantrasyonu invertaz-tip aktiviteyi yüksek oranda tetiklediği görülürken diğer 3 konsantrasyonun net bir şekilde inhibe edici etkisi olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar şeker tüketim hızı açısından değerlendirildiğinde, 2.5 ve 5.0 g/L konsantrasyonlarda besiyerine ilave edilen asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyonlar ile kontrol fermentasyonu arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$). Diğer konsantrasyonlarda analiz sonuçlarında inhibe etkiden dolayı dalgalanmalar meydana gelmesinden ötürü kinetik değerler hesaplanamamıştır (Şekil 4.24). Şekil 4.25'te asetik asidin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait inülinaz ve invertaz-tip aktivitenin sonuçları verilmiştir.

Maksimum inülinaz enzimi üretim hızı gelişim hızı açısından sonuçlar incelendiğinde asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyonlarla kontrol fermentasyonu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmuştur ($P<0.05$). Q_{lase} , kontrol fermentasyonunda 34.82 U/mL/gün iken 2.5 g/L ve 5.0g/L asetik asit varlığında 77.44 U/mL/gün ve 70.03 U/mL/gün olarak bulunmuştur. Maksimum inülinaz üretim hızı kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık 2 kat yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.25. Asetik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar

Invertaz enzimi için maksimum üretim hızı sonuçlarına bakıldığında kontrol fermentasyonu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Maksimum gelişim hızının kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık olarak 3 katına çıktığı gözlemlenmiştir.

Kontrol, 2.5 g/L ve 5.0 g/L asetik asitle gerçekleştirilen fermentasyonlarda şeker tüketimi %98.90, %88.31 ve %70.40 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanı sıra artan asetik asit konsantrasyonlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda mikroorganizmanın şekeri tüketemediği ve enzim üretimlerinin gerçekleşmediği ortaya konmuştur. 2.5 g/L asetik asit ile kontrol fermentasyonları arasında şeker tüketim oranı için istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). 5.0 g/L asetik asit ile kontrol fermentasyonu karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan önemli bir fark olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Asetik asit ile gerçekleştirilen tüm fermentasyonlara ait hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. Asetik aside ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri

İK	Iase	Sase	ΔS	QS	Q _{Iase}	Q _{Sase}	ŞTO	Toplam Kuru Biyokütle (g/L)	Nihai pH
(g/L)	(U/mL)	(U/mL)	(g/L)	(g/L/gün)	(U/mL/gün)	(U/mL/gün)	(%)		
0.0	202.95 ^b ±9.48	156.91 ^b ±10.53	84.83 ^a ±0.68	11.60 ^a ±2.22	34.82 ^b ±1.92	30.37 ^b ±3.55	98.90 ^a ±0.06	5.53 ^a ±0.03	3.02 ^c ±0.03
2.5	340.32 ^a ±51.27	546.23 ^a ±58.22	76.17 ^a ±4.78	11.77 ^a ±1.41	77.44 ^a ±3.13	94.57 ^a ±2.14	88.31 ^a ±6.53	3.42 ^b ±0.03	3.05 ^c ±0.02
5.0	336.96 ^a ±22.22	475.59 ^a ±27.57	60.20 ^b ±2.04	13.36 ^a ±0.22	70.03 ^a ±0.01	108.16 ^a ±10.18	70.40 ^b ±0.51	2.66 ^c ±0.13	3.48 ^b ±0.02
7.5	7.26 ^c ±2.10	3.36 ^c ±0.59	–	–	–	–	–	0.40 ^d ±0.05	5.06 ^a ±0.02
10.0	5.31 ^c ±0.34	3.27 ^c ±1.00	–	–	–	–	–	0.32 ^d ±0.01	5.08 ^a ±0.01
12.5	3.24 ^c ±0.14	3.61 ^c ±1.83	–	–	–	–	–	0.37 ^d ±0.02	5.10 ^a ±0.00

Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). İK: İnhibitör konsantrasyonu, Iase: İnülinaz aktivitesi, Sase: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, Q_{Iase}: Maksimum inülinaz üretim hızı, Q_{Sase}: Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı. – ile gösterilen kısımlarda kinetik değerler inhibisyonun dolayısı ile hesaplanamamıştır.

4.5.5. 2.5 g/L asetik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi

Asetik asitin inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase*, *Sase* üretimi ve toplam indirgen şeker miktarına ait deneysel verilere 10 farklı model uygulanmış olup model değerlendirme kriterleri Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15'te verilen sonuçlar doğrultusunda *Iase* üretimi için en düşük RMSE (8.28 U/mL) ile MAE (5.03 U/mL) değerleri Huang, en yüksek RMSE (13.18 U/mL) ile MAE (11.89 U/mL) değerleri ise MRM modelinde hesaplanmıştır. En yüksek R^2 değeri (0.9979) Huang modeli ile bulunurken en düşük R^2 değeri (0.9936) MMF modeli ile bulunmuştur. BF ve AF değerleri de modelleri karşılaştırmak için hesaplanmış olan değerlendirme kriterlerindendir. Bu değerlerin 1'e eşit ve yakın olması durumunda model ile hesaplanan tahmini değerlerin deneysel veriler ile uyumlu olduğu yorumu yapılmaktadır. BF değeri 1'den daha düşük olursa model ana hatları ile başarısız olarak kabul edilmektedir. 1'den büyük hesaplanan BF değeri ise tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğu kabul edilmektedir. BF değeri MGM (0.98), MLM (0.86) ve MRM (0.87) modelinde 1'den küçük olarak hesaplanmış olup modeller başarısız olarak kabul edilmiştir. Baranyi modeli için BF değeri 1'in oldukça üstünde olduğu için model tamamen başarısız olarak kabul edilmiştir. BF değeri Stannard (1.18), Weibull (1.17), MMF (1.16), Asimetrik (1.21), Huan (1.08) ve Fitzhugh (1.20) modellerinde 1'e nispeten yakın olarak hesaplanmış olup 1'e en yakın değere sahip olan modelin Huang olduğu tespit edilmiştir. AF değeri MGM modelinde %5, MLM modelinde %18, MRM modelinde %18, Stannard modelinde %21, Weibull modelinde %20, MMF modelinde %19, Asimetrik modelde %23, Huang modelinde %11 ve Fitzhugh modelinde %23 oranında deneysel verilerden sapmış olduğunu tespit etmiştir. Tüm bu veriler doğrultusunda Huang modeli *Iase* için en uyumlu model olarak seçilmiştir.

Sase üretimi için en düşük RMSE (27.72 U/mL) ile MAE (15.94 U/mL) değerleri sırasıyla Huang ve Baranyi, en yüksek RMSE (45.74 U/mL) ile MAE (30.67 U/mL) Weibull modelinde hesaplanmıştır. Yanı sıra en yüksek R^2 (0.9891) ve en düşük R^2 (0.9597) sırasıyla Huang ve Weibull modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MGM (0.78), MLM (0.70), MRM (0.70), Stannard (0.85), MMF (0.81), Huang (0.85), ve Fitzhugh (0.94) modellerinde 1'den düşük olarak hesaplanmışlardır. Bu nedenle modeller deneysel verilerin tahmininde başarısız olarak kabul edilmiştir. Weibull model ve Baranyi model için BF değeri sırasıyla 1.29 ve 1.35 olarak hesaplanmış ve 1'e nispeten yakın olarak kabul edilmekle birlikte AF değeri her ikisi için de %30'dan fazla sapma gösterdiği için modeller başarısız olarak tespit edilmiştir. Asimetrik modelde BF değeri 1.11 olarak hesaplanmış olup modeller arasında 1'e en yakın olan model olduğu görülmüştür. AF değeri MGM için %45, MLM için %61, MRM için %61, Stannard için %35, Weibull için %48, MMF için %43, Asimetrik için %25, Baranyi için %68, Huang için %24 ve Fitzhugh için %22 oranında bir yapısal sapma gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu veriler doğrultusunda *Sase* üretimi için en uygun model Asimetrik model olarak tespit edilmiştir.

Toplam indirgen şeker miktarı için en düşük RMSE (2.81 g/L) ile MAE (2.04 g/L) değerleri MMF, en yüksek RMSE (6.39 g/L) ile MAE (4.77 g/L) değerleri ise sırasıyla Asimetrik ve Stannard modellerinde hesaplanmıştır. Diğer yandan en yüksek R^2 (0.9947) ve en düşük R^2 (0.9783) sırasıyla MGM ve Baranyi modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MGM (0.92), MLM (0.99), MRM (0.93), MMF (0.95), Asimetrik (0.84), ve Fitzhugh (0.97) modellerinde 1'den düşük olarak hesaplanmıştır. 1'den düşük BF değeri modelin ana hatları ile başarısız olduğunu göstermektedir. Stannard (1.01), Weibull (1.07), Baranyi (1.15) ve Huang (1.15) modellerinde BF değeri nispeten 1'e yakın olarka hesaplanmıştır. 1'e yakın veya eşit BF değeri ise modelin deneysel verileri tahmin etmede başarılı olduğunu ve çok az veya hiç yapısal sapma göstermediğini belirtmektedir. AF değeri MGM için %9, MLM için %8, MRM için %8, Stannard için %14, Weibull için %15, MMF için %9, Asimetrik için %21, Baranyi için %19, Huang için %18 ve Fitzhugh için %11 oranında sapma olduğunu ortaya koymuştur. Tüm veriler değerlendirildiğinde Stannard ve Weibull model toplam indirgen şeker miktarı için en uygun model olarak kabul edilmiştir.

Asetik asit ilavesiyle (2.5 g/L) gerçekleştirilen fermentasyonda inülinaz aktivitesi, invertaz-tip aktivite ve toplam indirgen şeker miktarına ait hesaplanan model kriterleri Çizelge 4.15'te verilmiştir. 2.5 g/L asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için tüm model verileri ile deneysel verilerin kıyaslandığı grafikler EK-27, EK-28 ve EK-29'da verilmiştir. Ayrıca *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için hesaplanan model parametreleri EK-30, EK-31 ve EK-32'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. 2.5 g/L asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri

Model/ Asetik asit	İnülinaz oluşumu					İnvertaz oluşumu					Toplam indirgen şeker miktarı				
	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (g/L)	MAE (g/L)	R ²	BF	AF
MGM	11.42	8.11	0.9938	0.98	1.05	30.87	23.00	0.9812	0.78	1.45	3.20	2.47	0.9947	0.92	1.09
MLM	12.79	10.24	0.9953	0.86	1.18	36.58	28.62	0.9823	0.70	1.61	2.83	2.36	0.9902	0.99	1.08
MRM	13.46	11.89	0.995	0.87	1.18	36.53	28.76	0.9826	0.70	1.61	3.00	2.29	0.9945	0.93	1.08
Stannard	10.54	7.41	0.9951	1.18	1.21	27.97	20.97	0.9804	0.85	1.35	5.67	4.77	0.9797	1.01	1.14
Weibull	13.18	10.31	0.9946	1.17	1.20	45.74	30.67	0.9597	1.29	1.48	4.80	3.94	0.985	1.07	1.15
MMF	11.43	9.51	0.9936	1.16	1.19	42.26	29.72	0.962	0.81	1.43	2.81	2.04	0.9926	0.95	1.09
Asimetrik	12.43	9.74	0.9941	1.21	1.23	37.19	26.03	0.973	1.11	1.25	6.39	4.70	0.9921	0.84	1.21
Baranyi	8.83	5.69	0.9977	18.09	18.61	27.78	15.94	0.9912	1.35	1.68	5.93	3.93	0.9783	1.15	1.19
Huang	8.28	5.03	0.9979	1.08	1.11	27.72	16.25	0.9891	0.85	1.24	5.68	3.74	0.9826	1.15	1.18
Fitzhugh	10.54	8.16	0.9945	1.20	1.23	29.32	20.72	0.9771	0.94	1.22	5.20	3.19	0.9806	0.97	1.11

Koyu renk ile gösterilen değerler en uygunlu modelleri temsil etmektedir.

4.6. Formik Asidin İnhibitör Olarak Kullanıldığı Fermentasyonlar

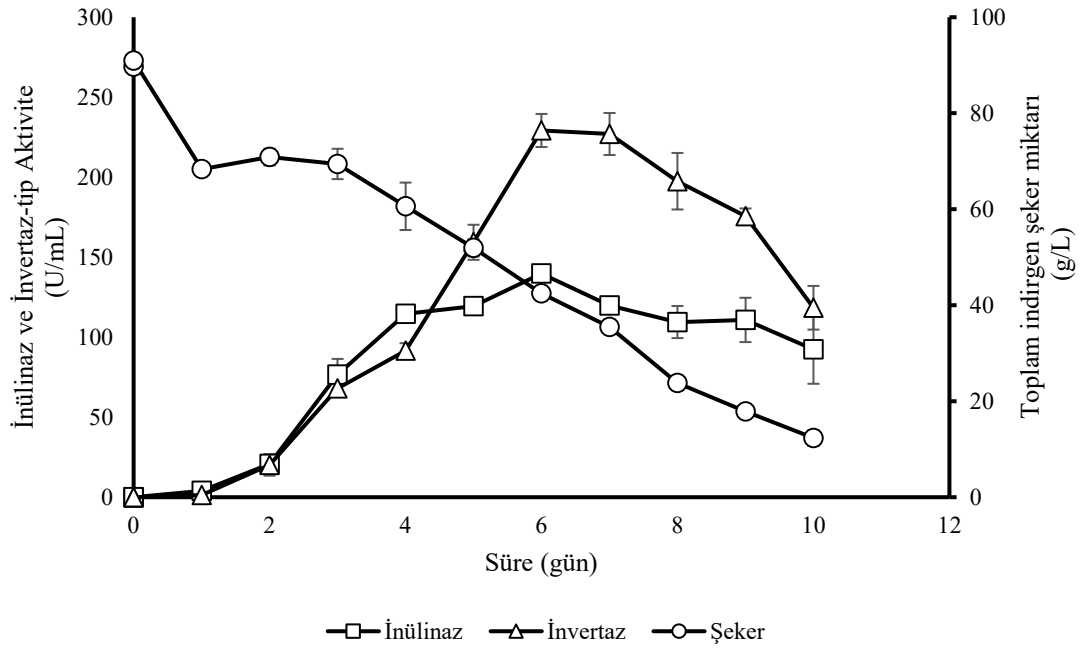
Kontrol besiyeri bileşimine (%10 sakaroz, %1 maya ekstraktı, %3 inokülasyon) 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L, 2.5 g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L, 5.0 g/L ve 7.0 g/L konsantrasyonlarda formik asit eklenerek her fermentasyon tekerrürlü olmak üzere 8 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresi boyunca günlük alınan örneklerde şeker ve enzim analizi yapılmıştır. İnülinaz aktivitesinde düşüş gözlemlendikten sonra fermentasyonlara son verilmiştir. Fermentasyon sonunda toplam kuru biyokütle ve pH analizleri gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar ait bazı görüntüler Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı bazı fermentasyonlara ait fotoğraflar

4.6.1. 1.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

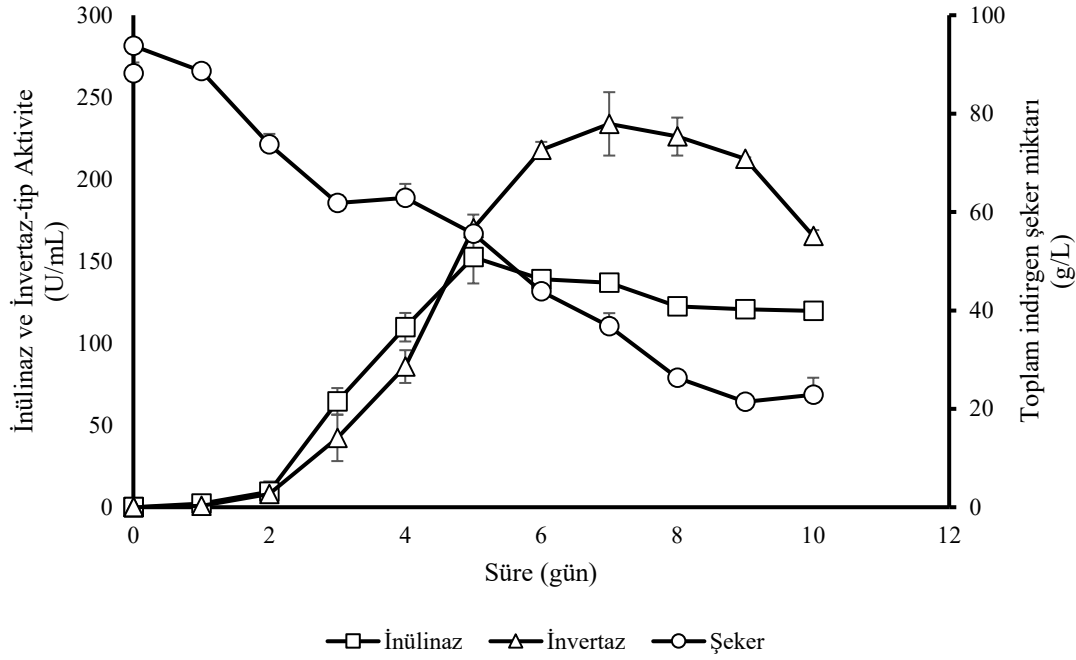
Besiyeri ortamına 1.0 g/L formik asidin inhibitör olarak ilave edildiği fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.27'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivite sırasıyla 139.75 U/mL ve 229.22 U/mL olmuştur. Şeker tüketimi 78.63 g/L olarak hesaplanmıştır. En yüksek inülinaz aktiviteye (139.75 U/mL) fermentasyonun 6.gününde invertaz-tip aktiviteye (229.22 U/mL) ise yine fermentasyonun 6.gününde ulaşılmıştır. Fermentasyon sonunda besiyerinde kalan şeker miktarı 12.35 g/L, toplam kuru biyokütle miktarı 4.34 g/L ve pH ise 2.59 olarak hesaplanmıştır. *Iase* aktivitesi açısından 1.0 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık 60 U/mL azalma tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra *Sase* aktivitesi açısından ise kontrol fermentasyonuna göre yaklaşık olarak 70 U/mL bir artış olduğu saptanmıştır. 1.0 g/L formik asidin inülinaz enzimi üretimi açısından inhibisyona sebep olurken invertaz enzim üretimini tetiklediği ortaya konmuştur.



Şekil 4.27. 1 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.2. 1.5 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

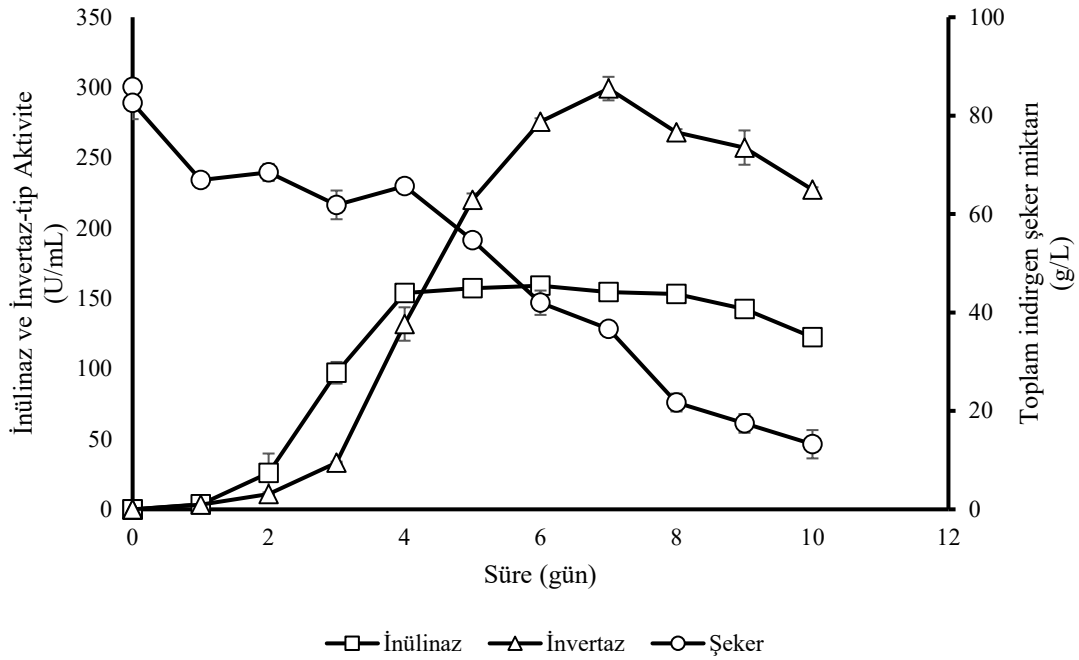
Besiyerine 1.5 g/L formik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.28'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivite sırasıyla 136.83 U/mL ve 233.75 U/mL olmuştur. Toplam şeker tüketimi 70.94 g/L olup en yüksek inülinaz aktivitesine (136.83 U/mL) fermentasyonun 5.gününe ulaşılmıştır. İnvertaz-tip aktivite sonuçlarına bakıldığında 2.günden 5.güne hızlı bir artış gözlemlenirken 5.günden 7.güne azalan oranda bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek invertaz-tip aktiviteye (233.75 U/mL) fermentasyonun 7.gününe ulaşılmıştır. Fermentasyon sonunda kalan şeker miktarı 22.84 g/L olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma gelişimi normal bir şekilde gerçekleşmiş olmasına rağmen fermentasyon sonunda şeker tüketiminin tamamen gerçekleşmediği görülmektedir. Fermentasyon sonlandırıldıktan sonra ortamın pH'ı 2.77, toplam kuru biyokütle miktarı ise 4.17 g/L olarak bulunmuştur. 1.5 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon da 1.0 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon gibi *Iase* aktivitesinde düşüşe sebep olurken *Sase* aktivitesinde artışa sebep olmuştur. 1.5 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* aktivitesi kontrol fermentasyonundan yaklaşık 65 U/mL daha az olarak bulunmuştur.



Şekil 4.28. 1.5 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.3. 2.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

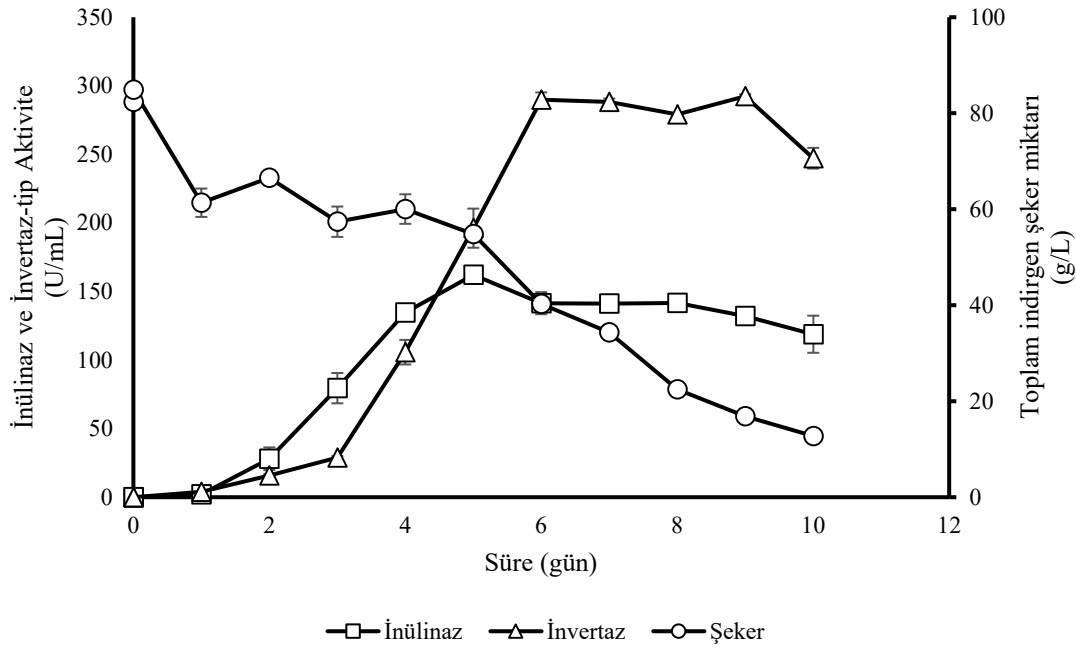
Besiyeri ortamına 2.0 g/L konsantrasyonunda formik asidin inhibitör olarak ilave edildiği fermentasyonun analiz sonuçlarına ait veriler Şekil 4.29'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre maksimum inülinaz aktivitesi 159.05 U/mL, maksimum invertaz-tip aktivitesi ise 299.24 U/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam şeker tüketimi 69.38 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek inülinaz aktivitesine (159.05 U/mL) fermentasyonun 6.gününde, invertaz-tip aktivitesine (299.24 U/mL) ise fermentasyonun 7.gününde ulaşılmıştır. Toplam kuru biyokütle miktarı 4.23 g/L, besiyeri ortamının pH'ı ise 2.82 olarak belirlenmiştir. Mikroorganizma gelişimi ortamdaki 2.0 g/L konsantrasyonda formik asit bulunmasına rağmen çok yüksek oranda etkilenmemiş ve enzim üretimini sorunsuz bir şekilde gerçekleştirmiştir. Besiyeri ortamında 2.0 g/L konsantrasyonda formik asit bulunması durumunda detoksifikasyon işleminin gerçekleştirilmediği koşullarda da enzim aktivitelerinin 150 U/mL'den yüksek olduğu ortaya konmuştur. 7. günden sonra inülinaz enzim aktivitesinin azalmaya başlamasından dolayı fermentasyon 10. günde sonlandırılmıştır. Toplam indirgen şeker miktarı değişimine göre inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar Şekil 4.29 ile verilmiştir.



Şekil 4.29. 2 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.4. 2.5 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

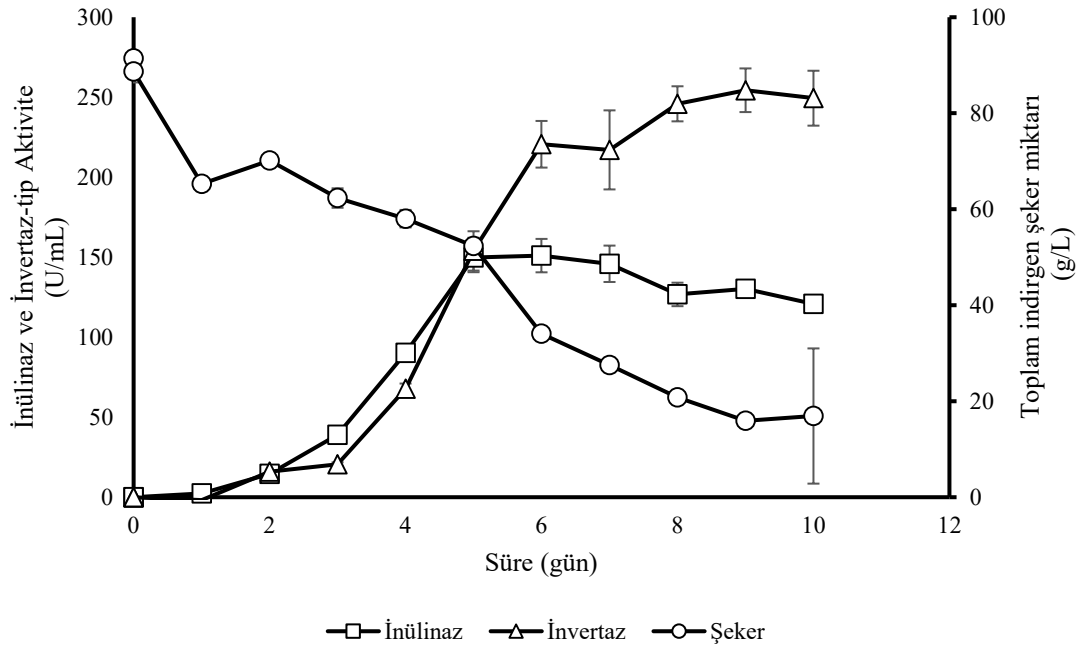
2.5 g/L konsantrasyondaki formik asidin besiyerine inhibitör olarak ilave edilmesiyle gerçekleştirilmiş olan fermentasyona ait veriler Şekil 4.30'da verilmiştir. Sonuçlar, maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivitelerinin sırasıyla 162.12 U/mL ve 289.24 U/mL olduğunu göstermiştir. Toplam şeker tüketimi 72.16 g/L olarak hesaplanmıştır. İnülinaz aktivitesi 2 ile 5.gün arasında keskin bir artış göstermiş olup en yüksek inülinaz aktivitesine (162.12 U/mL) 5.gün ulaşılmıştır. İnvertaz-tip aktivite incelendiğinde 3 ile 6.gün arasında hızlı bir artış gözlemlenmektedir. İnvertaz-tip aktivitesinin en yüksek (289.24 U/mL) olduğu günün fermentasyonun 9.gün olduğu Şekil 4.30'da görülmektedir. Toplam kuru biyokütle analizi sonucu 4.29 g/L'dir. Fermentasyon ortamının son pH'ı 3.11 olarak ölçülmüştür. Kontrol fermentasyonuna göre *Iase* aktivitesi açısından 2.5 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda yaklaşık 40 U/mL daha düşük olduğu ortaya konmuştur. Şeker tüketim oranının ise hala %80'in üzerinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.30. 2.5 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.5. 3.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

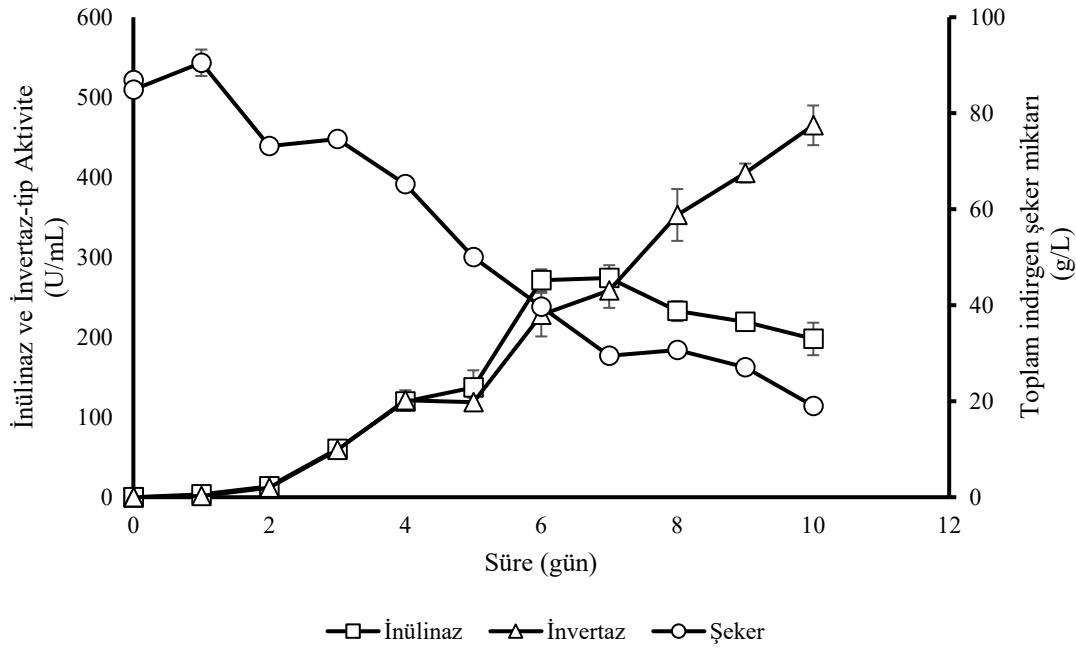
Besiyeri bileşimine 3.0 g/L konsantrasyondaki formik asitin inhibitör olarak ilave edilerek gerçekleştirilen fermentasyona ait bulgular Şekil 4.31’de verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesinin 151.01 U/mL invertaz-tip aktivitesinin ise 254.36 U/mL olduğu görülmektedir. Toplam şeker tüketimi 77.46 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek inülinaz aktivitesine 6.gün, invertaz-tip aktiviteye (254.36 U/mL) ise fermentasyonun 9.gününde ulaşılmıştır. Şeker analizi sonuçları incelendiğinde ise %87.37 oranında tükettiği belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlara bakıldığında ortamda inhibitör madde konsantrasyonu artırılmış olmasına rağmen *Aspergillus niger* tarafından inülinaz enzimi üretiminin gerçekleştirildiği görülmektedir. Mikroorganizma 3.0 g/L konsantrasyondaki formik asit ilavesini de tolere edebilmektedir. Toplam kuru biyokütle miktarı 3.65 g/L, pH ise 3.18 olarak belirlenmiştir. 2.5 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyon ile inülinaz enzim aktiviteleri arasında çok büyük bir düşüş olmamakla birlikte istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Enzim aktivitelerinin 3.0 g/L formik asit ilavesinde dahi 150 U/mL’nin altına düşmediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.31. 3 g/L formik asitin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.6. 4.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

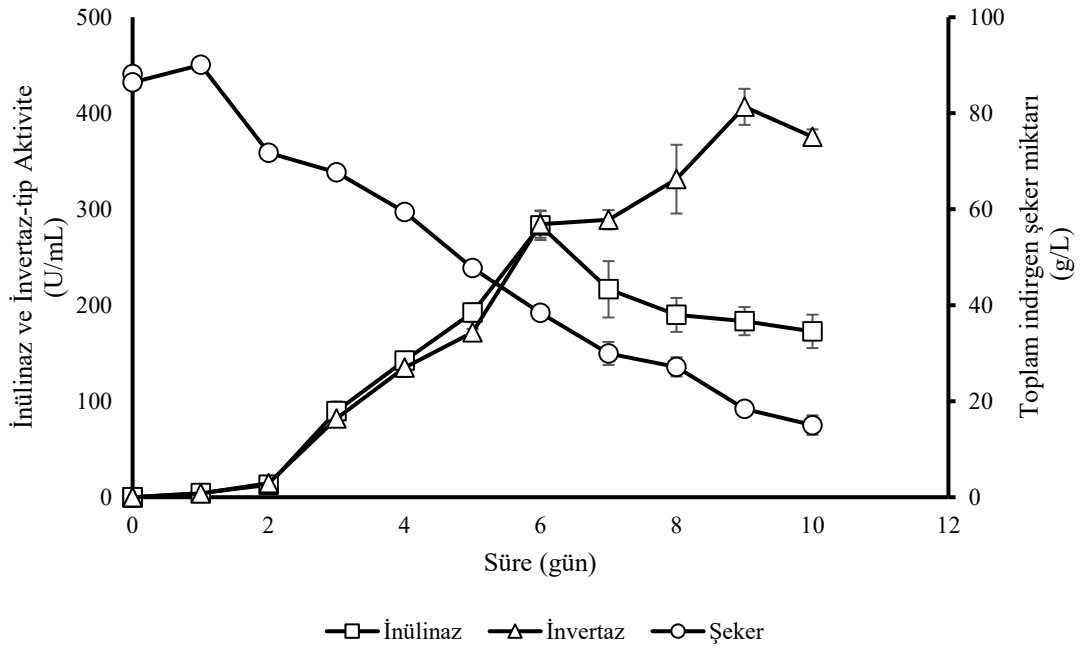
Besiyeri ortamına 4.0 g/L formik asidin eklenerek gerçekleştirildiği fermentasyona ait değerler Şekil 4.32’de verilmiştir. Analizler sonrasında en yüksek inülinaz aktivitesinin 274.05 U/mL, en yüksek invertaz-tip aktivitesinin ise 464.87 U/mL olduğu görülmektedir. Toplam şeker tüketimi 65.90 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek inülinaz aktivitesine (274.05 U/mL) fermentasyonun 7.gününde, invertaz-tip aktiviteye (464.87 U/mL) ise 10.günde ulaşılmıştır. Son gün besiyeri süzülerek toplam kuru biyokütle analizi ve son pH ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ortamın son pH’ı süzüntü ölçülerek 3.25 olarak kaydedilmiştir. Toplam kuru biyokütle miktarı ise 3.50 g/L olarak belirlenmiştir. 4 g/L konsantrasyondaki formik asit inülinaz ve invertaz enzimlerinin oluşumunu etkilememiş fakat biyokütlerde diğer fermentasyonlara göre bir düşüş gerçekleşmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde *Aspergillus niger* ile inülinaz ve invertaz enzimleri üretiminin sorunsuz bir şekilde gerçekleştirildiği görülmektedir. Mikroorganizmanın ortamdaki 4 g/L konsantrasyondaki formik asidi de tolere edebildiği açıkça gösterilmiştir. Tolere etmekle birlikte 4 g/L formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda inülinaz enzim üretiminin tetiklendiği ortaya konmuştur. 3.0 g/L ve 4.0 g/L konsantrasyonda formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.05$). 4.0 g/L formik asit ilavesiyle inülinaz enzim aktivitesinin yaklaşık 100 U/mL oranda arttığı ortaya konmuştur. Artan konsantrasyonlar formik asidin enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.32. 4 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.7. 5.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

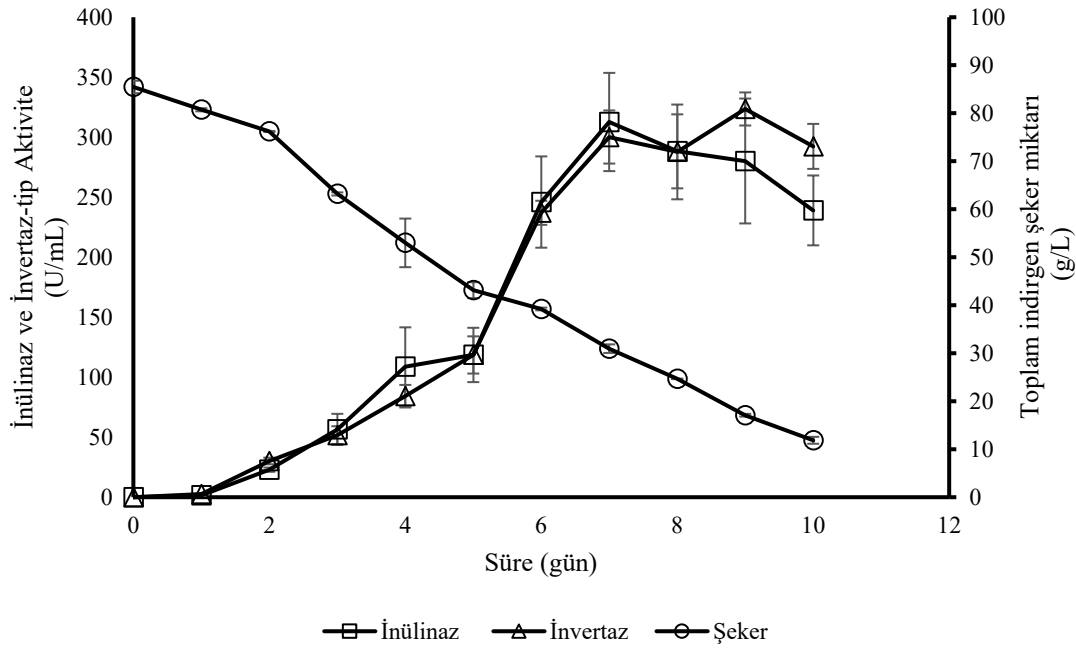
Besiyeri bileşimine 5.0 g/L konsantrasyondaki formik asit inhibitör bileşik eklenmiştir. Fermentasyona ait şeker tüketim ve enzim üretimleri Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Fermentasyon boyunca toplam şeker tüketimi 71.43 g/L olarak hesaplanmıştır. İnülinaz enziminin toplam indirgen şeker miktarındaki değişimine göre gelişimine bakıldığında şeker miktarındaki azalma ile ortamdaki inülinaz konsantrasyonunda da artış olduğu inülinaz aktivitesi sonuçlarından anlaşılmaktadır. 2.günden 6.güne kadar hızlı bir artış gösteren inülinaz aktivitesi en yüksek aktiviteye (282.94 U/mL) fermentasyonun 6.gününde ulaşmıştır. 6.günden sonra inülinaz aktivitesindeki düşüş Şekil 4.33'te görülmektedir. İnülinaz aktivitesindeki azalma sebebiyle ortamda enzim üretiminin durduğu düşünülmüş ve fermentasyon 10.günde sonlandırılmıştır. İnvertaz-tip aktivite incelendiğinde 2.günden 6.güne kadar hızlı bir artış gözlemlenmektedir. En yüksek aktiviteye (406.64 U/mL) 9.günde ulaşmıştır. Fermentasyon ortamının pH'ı ölçülerek 2.91, toplam kuru biyokütle miktarı ise 3.15 g/L olarak hesaplanmıştır. Ortamda 5.0 g/L formik asit bulunmasına rağmen inülinaz ve invertaz enzim üretimi sorunsuz bir şekilde gerçekleşmiştir. 202.95 U/mL olarak inülinaz aktivitesi elde edilen kontrol fermentasyonu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ve enzim üretiminin tetiklendiği ortaya konmuştur ($P < 0.05$).



Şekil 4.33. 5 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.8. 7.0 g/L formik asit ilave edilen fermentasyon

4 ve 5 g/L formik asidin ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda enzim aktivitesindeki artışın devam edip etmeyeceğini gözlemlemek için son olarak 7 g/L formik asit ilavesiyle inülinaz fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Besiyeri ortamına inhibitör bileşik olarak eklenen 7.0 g/L konsantrasyondaki formik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.34'te verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında en yüksek inülinaz ve invertaz-tip aktivite sırasıyla 312.69 U/mL ve 300.19 U/mL olarak bulunmuştur. Ortamdaki şeker miktarı 0.gün 85.48 g/L son gün ise 11.86 g/L olarak analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre şeker tüketimi 73.62 g/L bulunmuştur. İnülinaz aktivitesi incelendiğinde 2.günden 7.güne kadar bir artış gözlemlenmektedir. 7.günden sonra inülinaz aktivitesinde düşüş olduğu görülmektedir. En yüksek inülinaz aktivitesine (312.69 U/mL) fermentasyonun 7.gününde ulaşılmıştır. İnvertaz-tip aktivite incelendiğinde 2.günden sonra 7.güne kadar hızlı bir artış olmuş ve en yüksek invertaz-tip aktiviteye (300.19 U/mL) fermentasyonun 9.gününde ulaşılmıştır. Fermentasyon ortamında 7 g/L formik asidin bulunması enzim üretimini etkilememiştir. Denenmiş olan bütün formik asit konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* ile inülinaz enzimi üretiminin 130 U/mL'nin altına düşmediği görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda hidrolizatta yalnızca 7.0 g/L formik asit tespit edilmesi durumunda inülinaz fermentasyonunun olumlu yönde etkilendiği ve oldukça yüksek konsantrasyonda formik aside rağmen detoksifikasyon prosesinin gerekli olmadığı ortaya konmuştur. Fermentasyon sonunda yapılan toplam kuru biyokütle ve pH ölçümü sonuçları sırasıyla 3.35 g/L ve 3.19 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.34. 7 g/L formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyona ait sonuçlar

4.6.9. Formik asidin besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametrelerinin değerlendirilmesi

Çizelge 4.16'da formik asit ilavesi ile gerçekleştirilen her bir fermentasyon için hesaplanmış olan I/S oranları verilmiştir. Oranlar 10^{-2} 'den büyük olduğu için fermentasyon ortamındaki enzimin inülinaz doğasında olduğu görülmüştür (Das vd. 2019).

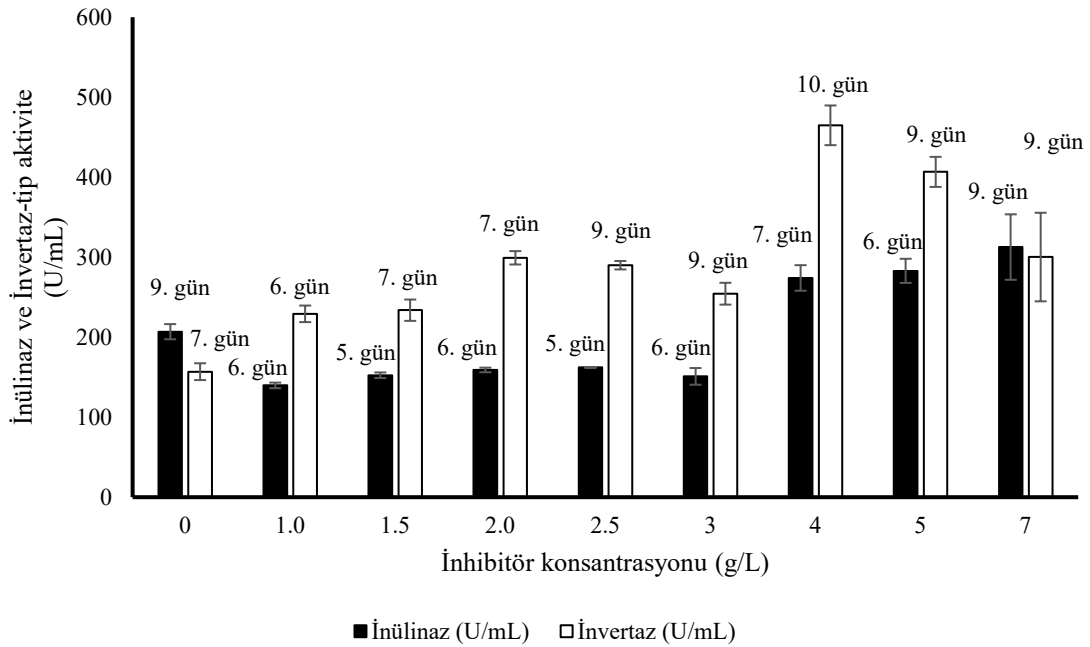
Çizelge 4.16. Formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri

Konsantrasyon (g/L)	İnülinaz aktivite (U/mL)	İnvertaz-tip aktivite (U/mL)	I/S
1.0	139.75	229.22	0.61
1.5	136.83	233.75	0.59
2.0	159.05	299.24	0.53
2.5	162.12	289.98	0.56
3.0	151.01	254.36	0.59
4.0	274.05	464.87	0.59
5.0	282.94	406.64	0.70
7.0	312.69	300.19	1.04

Formik asit fermentasyon sıvısına farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek inülinaz ve invertaz enzimlerinin üretimleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çizelge 4.17'de tüm formik asit konsantrasyonları ve kontrol fermentasyonuna ait kinetik değerler verilmiştir.

İnülinaz enzim aktivite değerleri açısından 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L, 2.5 g/L ve 3.0 g/L formik asit varlığında gerçekleştirilen denemelerde kontrol fermentasyonuna göre inülinaz enzim aktivitesinde azalma görülürken 4.0 g/L, 5.0 g/L ve 7.0 g/L inülinaz enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesine 7 g/L konsantrasyonda formik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonda ulaşılmıştır. Maksimum ve minimum inülinaz aktiviteleri sırasıyla 312.69 U/mL (7 g/L) ile 136.83 U/mL (1.5 g/L) olup aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

İnvertaz-tip aktivite sonuçları incelendiğinde kontrol fermentasyonundaki invertaz-tip aktivitesi diğer tüm denemelere göre düşük kalmıştır. Formik asidin 4.0 g/L konsantrasyonda eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum invertaz-tip aktiviteye (464.87 U/mL) ulaşılmış olup kontrol fermentasyonu ile arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Şekil 4.35'te besiyeri ortamına formik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait inülinaz ve invertaz-tip aktivite sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.35. Formik asidin inhibitör olarak kullanıldığı fermentasyonlarda inülinaz ve invertaz-tip aktiviteye ait sonuçlar

Şeker tüketimi kontrol fermentasyonunda 84.83 g/L bulunurken formik asitle gerçekleştirilen fermentasyonlarda maksimum ve minimum 78.63 ve 65.90 g/L olarak hesaplanmıştır. İnülinaz enziminin maksimum üretim hızı incelendiğinde formik asitle gerçekleştirilen fermentasyonlarda bu değer en yüksek 64.99 U/mL/gün (4.0 g/L formik asit), en düşük 44.94 U/mL/gün (7.0 g/L formik asit) olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ile kontrol fermentasyonu arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P<0.05$). İnvertaz enziminin maksimum üretim hızı incelendiğinde formik asitle gerçekleştirilen fermentasyonlarda bu değer en fazla 100.49 U/mL/gün (4.0 g/L formik asit), en az 40.96 U/mL/gün (7.0 g/L formik asit) olarak hesaplanmıştır. Formik asitle gerçekleştirilen fermentasyonlardan Q_{Sase} 'nin en düşük hesaplandığı 7.0 g/L formik

asitle gerçekleştirilen fermentasyon ile kontrol fermentasyonu arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirtilmiştir ($P>0.05$). Q_{Sase} 'nin en yüksek hesaplandığı 4.0 g/L formik asitle gerçekleştirilen fermentasyon ile kontrol fermentasyonu arasındaki fark istatistiksel önemli olmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.17'de formik asit ile gerçekleştirilen tüm fermentasyonlara ait hesaplanan kinetik parametreler gösterilmiştir.



Çizelge 4.17. Formik aside ait tüm fermentasyonların kinetik değerleri

İK	<i>Iase</i>	<i>Sase</i>	ΔS	QS	<i>Q_{Iase}</i>	<i>Q_{Sase}</i>	ŞTO	Toplam Kuru Biyokütle (g/L)	Nihai pH
(g/L)	(U/mL)	(U/mL)	(g/L)	(g/L/gün)	(U/mL/gün)	(U/mL/gün)	(%)		
0.0	202.95 ^b ±9.48	156.91 ^c ±10.53	84.83 ^a ±0.68	11.60 ^{ab} ±2.22	34.82 ^c ±3.55	30.37 ^c ±3.55	98.90 ^a ±0.06	5.53 ^a ±0.03	3.02 ^{bc} ±0.03
1.0	139.75 ^c ±3.51	229.22 ^{bc} ±10.34	78.63 ^{ab} ±1.11	6.80 ^c ±0.56	46.96 ^b ±4.02	68.80 ^b ±7.49	86.45 ^b ±1.69	4.34 ^b ±0.07	2.59 ^e ±0.06
1.5	136.83 ^c ±3.51	233.75 ^b ±13.33	70.94 ^{bc} ±4.00	10.13 ^{abc} ±1.06	47.46 ^b ±2.96	66.03 ^b ±2.52	75.60 ^d ±3.84	4.17 ^b ±0.14	2.77 ^d ±0.03
2.0	159.05 ^{bc} ±2.89	299.24 ^b ±8.37	69.38 ^{bc} ±6.20	8.28 ^{cb} ±1.11	63.91 ^a ±6.63	93.39 ^a ±2.67	83.65 ^{bc} ±4.14	4.23 ^b ±0.10	2.82 ^d ±0.01
2.5	162.12 ^{bc} ±0.10	289.98 ^b ±5.27	72.16 ^{bc} ±0.79	9.17 ^{cb} ±0.36	45.36 ^{bc} ±2.61	93.75 ^a ±5.93	84.98 ^{bc} ±0.53	4.29 ^b ±0.04	3.11 ^{ab} ±0.05
3.0	151.01 ^{bc} ±10.44	254.36 ^b ±13.65	77.46 ^{ab} ±1.40	9.25 ^{cb} ±0.63	55.44 ^{ab} ±3.02	76.37 ^b ±8.88	87.37 ^b ±0.66	3.65 ^c ±0.02	3.18 ^{ab} ±0.01
4.0	274.05 ^a ±15.99	464.87 ^a ±24.81	65.90 ^c ±1.00	10.59 ^{ab} ±1.29	64.99 ^a ±2.93	100.49 ^a ±2.83	77.61 ^{cd} ±0.29	3.50 ^{cd} ±0.07	3.25 ^a ±0.01
5.0	282.94 ^a ±15.07	406.64 ^a ±18.78	71.43 ^{bc} ±2.56	10.83 ^{ab} ±0.41	63.99 ^a ±3.15	65.35 ^b ±0.28	82.59 ^{bcd} ±2.46	3.15 ^e ±0.05	2.91 ^{cd} ±0.04
7.0	312.69 ^a ±40.934	300.19 ^b ±55.35	73.62 ^{bc} ±0.71	13.21 ^a ±0.14	44.94 ^{bc} ±1.72	40.96 ^c ±4.74	86.14 ^b ±1.16	3.35 ^d ±0.04	3.19 ^{ab} ±0.01

Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). İK: İnhibitör konsantrasyonu, *Iase*: İnülinaz aktivitesi, *Sase*: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, *Q_{Iase}*: Maksimum inülinaz üretim hızı, *Q_{Sase}*: Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı.

4.6.10. 7.0 g/L formik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyona ait inülinaz, invertaz üretimi ve toplam indirgen şeker miktarının matematiksel modellemesi

Formik asidin inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase*, *Sase* ve toplam indirgen şeker miktarına ait deneysel verilere 10 farklı model uygulanmış olup model değerlendirme kriterleri Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18’de verilen sonuçlar doğrultusunda *Iase* üretimi için en düşük RMSE (14.48 U/mL) ile MAE (11.77 U/mL) MLM ve Weibull, en yüksek RMSE (35.41 U/mL) ile MAE (29.40 U/mL) değerleri Asimetrik modelinde hesaplanmıştır. En yüksek R^2 değeri (0.9944) Huang modeli ile bulunurken en düşük R^2 değeri (0.9716) Asimetrik modeli ile bulunmuştur. BF ve AF değerleri de modelleri karşılaştırmak için hesaplanmış olan değerlendirme kriterlerindendir. Bu değerlerin 1’e eşit ve yakın olması durumunda model ile hesaplanan tahmini değerlerin deneysel veriler ile uyumlu olduğu yorumu yapılmaktadır. BF değeri 1’den daha düşük olursa model ana hatları ile başarısız olarak kabul edilmektedir. 1’den büyük hesaplanan BF değeri ise tahmin edilen değerlerin deneysel verilerden daha düşük olduğunu ve modelin tahminlerinin daha düşük bir güven seviyesinde olduğu kabul edilmektedir. BF değeri MLM (0.77) ve MRM (0.79) modellerinde 1’den düşük hesaplandığı için modeller başarısız olarak kabul edilmiştir. MGM (1.33), Stannard (1.18), MMF (1.35), Asimetrik (2.65), Baranyi (30.09) ve Fitzhugh (1.34) modellerinde BF değeri 1’den yüksek hesaplandığı için modeller deneysel verileri tahmin etmede başarısız olarak kabul edilmiştir. Weibull modelinde BF değeri 1.00 olarak hesaplanmış olup bu durum model ile deneysel veriler arasında yapısal bir sapma olmadığını göstermektedir. AF değeri tahmin edilen değerler MGM modelinde %33, MLM modelinde %35, MRM modelinde %35, Stannard modelinde %26, Stannard modelinde %26, Weibull modelinde %11, MMF modelinde %48, Asimetrik modelde %202, Baranyi modelde %4603, Huang modelinde %103, ve Fitzhugh modelinde %34 oranında deneysel verilerden saptığını göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda *Iase* üretimi için düşük RMSE (16.07 U/mL), düşük MAE (11.35 U/mL), yüksek R^2 (0.9913) ve 1’e eşit AF değerinden dolayı Weibull model deneysel verileri tahmin etmede en uyumlu model olarak seçilmiştir.

Sase üretimi için en düşük RMSE (19.76 U/mL) ile MAE (14.05 U/mL) değerleri Weibull, en yüksek RMSE (37.55 U/mL) ile MAE (26.32 U/mL) değerleri Fitzhugh modelinde hesaplanmıştır. Yanı sıra en yüksek R^2 (0.9816) ve en düşük R^2 (0.9544) sırasıyla MLM ve Fitzhugh modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MGM (19.27), MLM (1.44), MRM (1.44), MMF (2.30), Asimetrik (4.02), Huang (6.58) ve Fizthugh (1.26) modellerinde oldukça yüksek olduğu için modeller deneysel verileri tahmin etmede başarısız olarak tespit edilmiştir. Stannard (1.00), Weibull (1.12) ve Baranyi (1.08) modellerinde BF değeri 1’e yakın olarak hesaplanmış olduğu için modeller deneysel verileri tahmin etmede başarılıdır. AF değeri MGM için %1859, MLM için %47, MRM için %47, Stannard için %26, Weibull için %22, MMF için %44, Asimetrik için %302, Baranyi için %11, Huang için %575 ve Fitzhugh için %34 oranında bir sapma gösterdiğini ortaya koymaktadır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde *Sase* üretimi için en uyumlu model Baranyi olarak seçilmiştir.

Toplam indirgen şeker miktarı için en düşük RMSE (2.35 g/L) ile MAE (1.56 g/L) değerleri MMF modelinde hesaplanmıştır. En yüksek RMSE (7.11 g/L) ile MAE (5.69 g/L) değerleri Weibull modelinde hesaplanmıştır. Diğer yandan en yüksek R^2 (0.9930) ve en düşük R^2 (0.9597) sırasıyla MGM ve Weibull modellerinden elde edilmiştir. BF değeri MGM (0.89), MLM (0.95), MRM (0.89), MMF (0.94), Asimetrik (0.84) ve Fitzhugh (0.91) modellerinde 1'in altında hesaplanmıştır. Bu durum modellerin deneysel verileri tahmin etmede başarısız olduğunu göstermektedir. Stannard (1.00) ve Weibull (1.00) modellerinde BF değeri 1'e eşit hesaplanmıştır. Bu durum Stannard ve Weibull modellerinin deneysel verileri hesaplamada bir sapma göstermediğini ortaya koymaktadır. Baranyi (1.17) ve Huang (1.17) modellerinde de BF değeri 1'e nispeteden yakın hesaplanmış olup bu modellerin de deneysel verileri tahmin etmede başarılı olduğu düşünülmüştür. AF değeri modellerin deneysel verilerden MGM için %8, MLM için %5, MRM için %8, Stannard için %12, Weibull için %15, MMF için %5, Asimetrik için %12, Baranyi için %18, Huang için %18 ve Fitzhugh için %8 oranında bir sapma gösterdiğini belirtmektedir.

Formik asit (7 g/L) ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel verilerin model verilerinin karşılaştırılması için hesaplanan model kriterleri Çizelge 4.18'de verilmiştir. 7.0 g/L asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için tüm model verileri ile deneysel verilerin kıyaslandığı grafikler EK-33, EK-34 ve EK-35'te verilmiştir. Ayrıca *Iase*, *Sase* ve şeker tüketimi için hesaplanan model parametreleri EK-36, EK-37 ve EK-38'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. 7 g/L formik asit ile gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel veriler için hesaplanan model kriterleri

Model/ F.A.	İnülinaz oluşumu					İnvertaz oluşumu					Toplam indirgen şeker miktarı				
	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (U/mL)	MAE (U/mL)	R ²	BF	AF	RMSE (g/L)	MAE (g/L)	R ²	BF	AF
MGM	20.28	14.48	0.9884	1.33	1.33	28.53	22.01	0.9699	19.27	19.59	3.45	2.73	0.993	0.89	1.08
MLM	14.48	12.82	0.991	0.77	1.35	20.65	16.20	0.9816	1.44	1.47	3.37	2.64	0.9862	0.95	1.05
MRM	17.02	12.82	0.991	0.79	1.35	20.66	16.19	0.9815	1.44	1.47	3.32	2.65	0.9924	0.89	1.08
Stannard	17.32	12.09	0.9866	1.18	1.26	37.55	25.64	0.9544	1.00	1.26	6.26	5.05	0.966	1.00	1.12
Weibull	16.07	11.35	0.9913	1.00	1.11	19.76	14.05	0.9731	1.12	1.22	7.11	5.69	0.9597	1.00	1.15
MMF	16.37	13.32	0.9875	1.35	1.48	22.54	16.93	0.97	2.30	2.44	2.35	1.56	0.9838	0.94	1.05
Asimetrik	35.41	29.40	0.9716	2.65	3.02	26.42	19.75	0.9748	4.02	4.06	5.06	4.22	0.99	0.84	1.12
Baranyi	17.43	12.35	0.9937	30.09	47.03	25.41	17.97	0.9767	1.08	1.11	5.85	3.95	0.979	1.16	1.18
Huang	16.78	11.77	0.9944	1.82	2.03	24.26	17.36	0.9786	6.58	6.75	5.80	3.86	0.9793	1.17	1.18
Fitzhugh	18.40	12.71	0.9846	1.34	1.47	37.55	26.32	0.9544	1.26	1.34	3.78	2.62	0.975	0.91	1.08

Koyu renk ile gösterilen değerler en uygunlu modelleri temsil etmektedir.

4.7. İnhibitör Bileşiklerin Karıştırılarak Besiyeri Ortamına Eklenmesi ile Gerçekleştirilen Fermentasyonlar

Çalışmanın şimdiye kadar olan kısmında inhibitör bileşikler besiyerine ayrı ayrı eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sıvısı olarak kullanılan hidrolizatlarda denemeleri gerçekleştirilen inhibitör konsantrasyonlarının tek başına bulunmaları durumunda detoksifikasyon prosesinin gerekli olup olmadığı ortaya konmuştur. Lignoselülozik biyokütlelerin hidrolizi sonucunda inhibitör bileşikler ortamda birden fazla çeşit olarak da oluşabilmektedir. Bu kısımda inhibitör bileşiklerin belirlenen minimum ve maksimum konsantrasyonlarda karışım şeklinde besiyerine eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde inhibitör bileşiklerin sinerjik etkisi ve inülinaz enzim üretiminin belirlenen fermentasyon denemelerinde nasıl etkileneceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

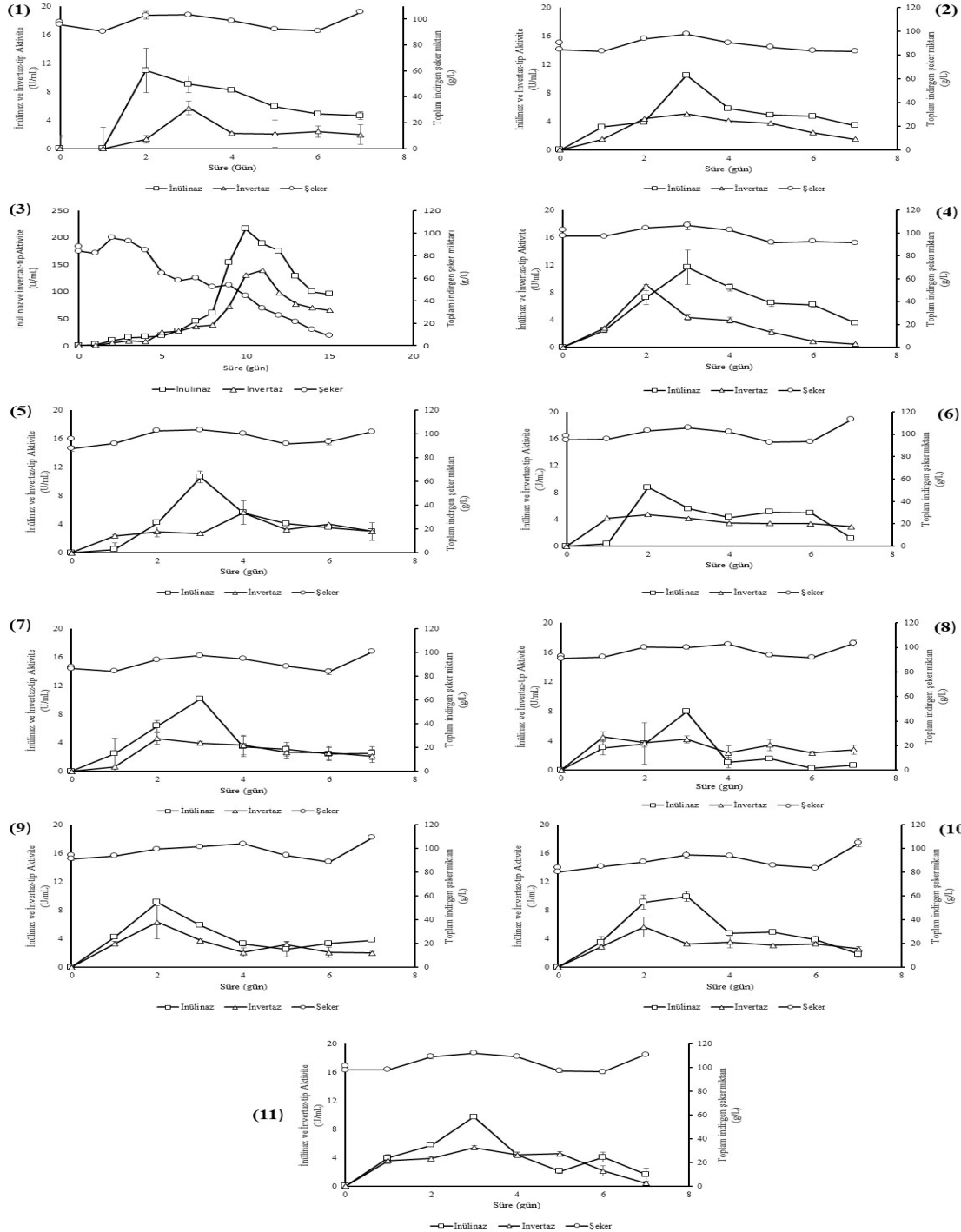
İnhibitör bileşiklerin ayrı ayrı besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonların sonuçlarına göre Plackett-Burman deneme deseni oluşturulmuştur (11 fermentasyon- 3 orta nokta, tekerrürlü). Karışım fermentasyonlarını gerçekleştirmek için belirlenen minimum ve maksimum konsantrasyonlarda Plackett-Burman Dizayn kullanılarak minimum ve maksimum noktalarda HMF (3.0-4.0 g/L), furfural (0.1- 0.5 g/L, fenol (0.1-0.5 g/L), asetik asit (2.5-5.0 g/L) ve formik asit (3.0-4.0 g/L) eklenmesiyle inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.36'da inhibitörlerin karıştırılarak besiyeri bileşimine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait bir fotoğraf verilmiştir. Karışım denemeleri tez kapsamında çalışılan inhibitör bileşiklerin besiyeri ortamında birlikte bulunması durumundaki sinerjist etkilerini görmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.36. İnhibitör bileşiklerin karıştırılarak besiyeri ortamına katıldığı fermentasyona ait flask fotoğrafı

Çizelge 3.2'de verilmiş deneme desenine göre inhibitör bileşikler karışım olarak besiyerine eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Tüm fermentasyonların sonuçları Şekil 4.40'ta verilmiştir. Sonuçlara göre 3 numaralı deneme dışındaki

fermentasyonlarda enzim aktiviteleri oldukça düşük olarak bulunmuştur. 3 numaralı deneme dışındaki denemelerin her birinde en az bir tane maksimum noktada inhibitör bileşik olduğu için inhibitörler sinerjistik etki yaparak mikroorganizmanın inhibisyonuna sebep olmuştur. 3 numaralı deneme fermentasyonu minimum noktadaki inhibitör karışımlarını içermektedir. 3 numaralı denemede 215.77 U/mL *Iase* aktivitesi saptanmış ve optimum karışım inhibitör fermentasyonu olarak belirlenmiştir.

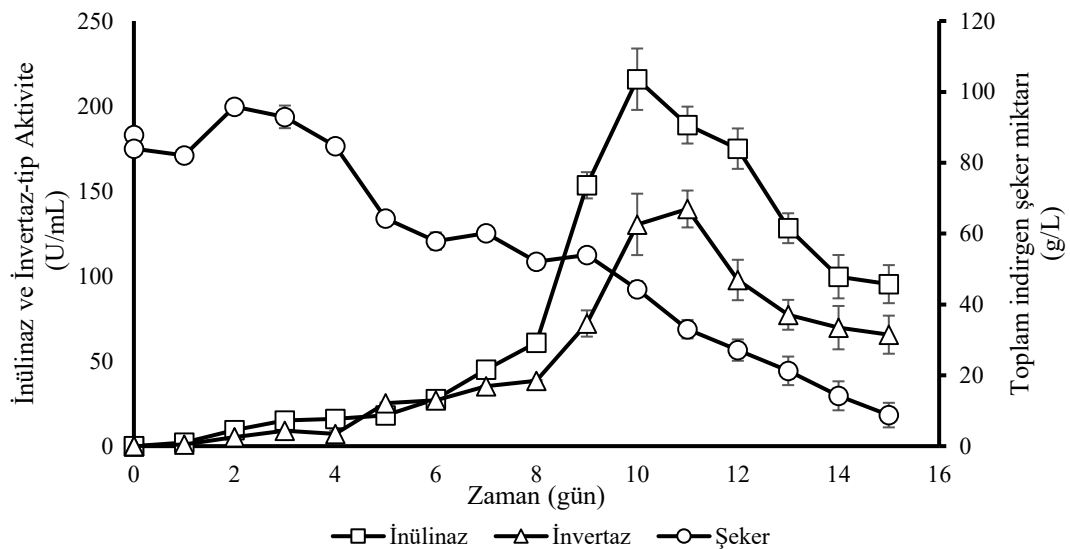


Şekil 4.37. İnhibitörlerin karışım olarak fermentasyon ortamına eklenerek gerçekleştirilen diğer denemelere ait sonuçlar

4.7.1. Optimize inhibitör karışımı ile gerçekleştirilen fermentasyon

Bu fermentasyon denemesi optimize inhibitör karışım fermentasyonu olarak belirlenmiştir. Şekil 4.40'taki grafikler ve Çizelge 4.21'deki sonuçlar incelendiğinde optimize inhibitör fermentasyonu (3 numaralı deneme) dışındaki diğer denemelerde enzim aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur. Optimize karışım fermentasyonundaki inhibitör konsantrasyonları incelendiğinde, tüm inhibitörlerin belirtilen minimum değerlerde eklendiği (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit, 3.0 g/L formik asit) fermentasyon olduğu görülmektedir. Bu denemeye ait analiz sonuçları Şekil 4.37'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre maksimum inülinaz aktivitesi 215.77 U/mL, maksimum invertaz-tip aktivite 139.46 U/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam şeker tüketimi 79.18 g/L olarak bulunmuştur. En yüksek inülinaz aktivitesine (215.77 U/mL) fermentasyonun 10.gününde ulaşılmıştır ve fermentasyon 15.günde bitirilmiştir. İnvvertaz-tip aktivitenin toplam indirgen şeker miktarındaki değişime göre durumu incelendiğinde şeker tüketimi arttıkça enzim üretiminin de arttığı görülmektedir. En yüksek invertaz-tip aktiviteye (139.46 U/mL) fermentasyonun 11.gününde ulaşılmıştır. 11.günden sonra invertaz-tip aktivitesinde düşüş olduğu görülmektedir. Son gün örneğindeki şeker miktarı 8.76 g/L olarak hesaplanmıştır. Toplam kuru biyokütle miktarı 3.63 g/L olarak kaydedilmiştir. Besiyeri ortamının son pH'ı ölçüldüğünde pH'ın 5.0'dan 3.32'ye düştüğü görülmektedir. Mikroorganizma ortamda 3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit, 3.0 g/L formik asidin bulunmasına rağmen etkilenmemiş ve enzim üretimini sorunsuz bir şekilde gerçekleştirmiştir.

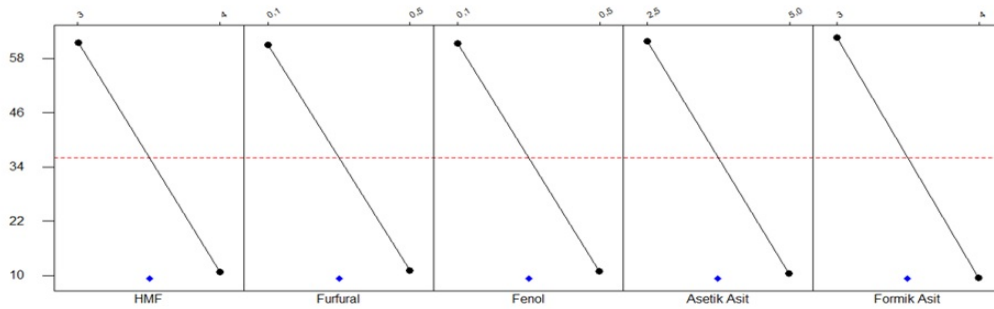
Diğer karışım denemelerinde yalnızca bir inhibitörün bile belirlenen maksimum konsantrasyonda bulunması durumunda mikroorganizmanın etkilenecek inhibe olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda *Aspergillus niger* A42 ile inülinaz fermentasyonunun gerçekleştirilebildiği tek fermentasyon 3 numaralı deneme (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit, 3.0 g/L formik asit) olarak belirlenmiştir ve optimum karışım besiyeri olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.38. Optimize inhibitör karışımı denemesine ait analiz sonuçları

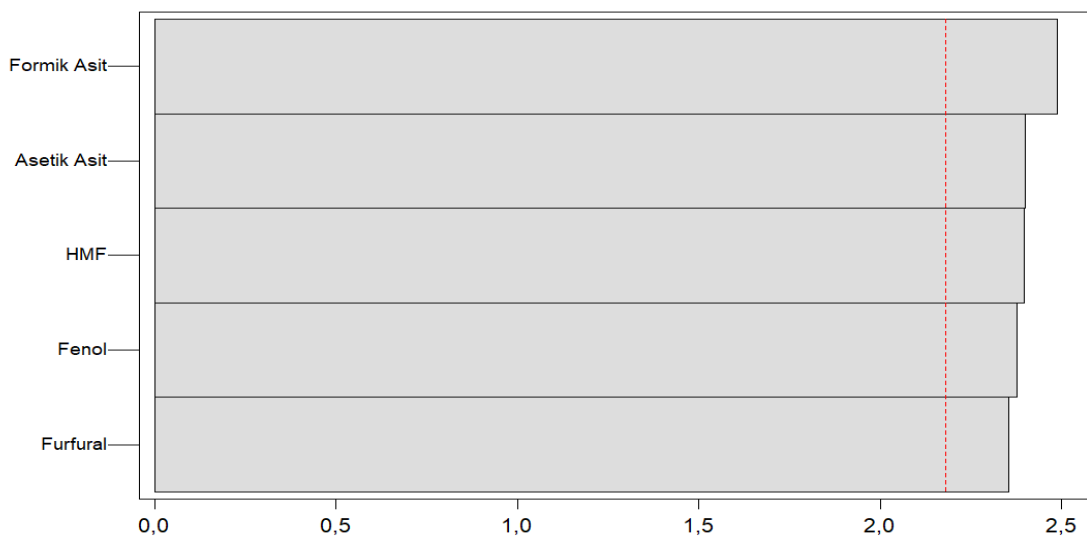
ANOVA (varyans analizi) ile değişkenlerin pozitif veya negatif etkileri belirlenmiştir. Modelde kullanılan değişkenler HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik asittir. Bu değişkenler üzerindeki istatistiksel etkiler incelenmiştir. Sonuçlar arasındaki istatistiksel fark Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile saptanmıştır.

İnülinaz için belirlenen 5 farklı faktör için seviye ortalamaları arasındaki farkları incelemek için ana etkiler grafiği kullanılmıştır. Şekil 4.39'da inülinaz için inhibitör etkilerinin grafiği veri ortalamaları verilmiştir. Bu grafik incelendiğinde her bir inhibitör bileşik için artan konsantrasyonlarda ortalamanın düştüğü görülmektedir.



Şekil 4.39. İnülinaz için inhibitör etkilerinin grafiği veri ortalamaları

Pareto grafiği bileşenlerin ortam üzerindeki etkilerinin önemini göstermek için kullanılır. Grafik üzerindeki referans çizgisini geçen çubuklar istatistiksel yönden önem taşıyor olarak nitelendirilir. Şekil 4.40'ta formik asit, HMF, asetik asit, fenol ve furfuralın referans çizgisini geçtiği görülmektedir. Bu durumda bu inhibitörler mevcut olan model koşullarında 0.05 önem seviyesinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Tüm inhibitör bileşenler fermentasyon ortamını etkilediği söylenebilmektedir. 3 numaralı deneme dışındaki tüm denemelerde enzim aktivitesi çok düşük olduğundan tüm değişkenlerin negatif etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.40. Standartlaştırılmış etkilerin Pareto grafiği. $\alpha=0.05$

Çizelge 4.19’da inülinaz için inhibitör bileşiklerin tahmini etkileri ve katsayıları verilmiş olup incelendiğinde P(Olasılık) değerlerinin tüm parametreler (HMF, Furfural, Fenol, Asetik Asit ve Formik Asit) için 0.05’ten küçük olduğu yani istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.19. İnülinaz için inhibitör bileşiklerin tahmini etkileri ve katsayıları

Terim	Etki	Katsayı	SH katsayı	T	P
Sabit		36.13	10.56	3.42	0.005
HMF	-50.88	-25.44	10.56	-2.41	0.033
Furfural	-49.96	-24.98	10.56	-2.37	0.036
Fenol	-50.45	-25.22	10.56	-2.39	0.034
Asetik Asit	-51.40	-25.70	10.56	-2.43	0.032
Formik Asit	-53.30	-26.65	10.56	-2.52	0.027

İnhibitör bileşiklerin karıştırılarak besiyeri ortamına katılmasıyla gerçekleştirilen fermentasyonların inülinaz enzimi üretim sonuçlarının regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.20’de verilmiştir. Varyans analizi sonuçları incelendiğinde model istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). Uyum eksikliğine bakıldığında istatistiksel olarak önemli çıktığı görülmektedir ($P<0.05$).

Çizelge 4.20. İnhibitör bileşiklerin katılmasıyla belirlenen model denklemindeki üretim oranının varyans analizi

Terim	SD	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Ana etki	5	52448.4	10489.7	5.88	0.006
Artık hata	12	21405.9	1783.8		
Uyum Eksikliği	2	21345.6	10672.8		0.000
Saf hata	10	60.3	6.0		
Toplam hata	18				

SD: Serbestlik derecesi, Düz. KT: Düzeltilmiş karalar toplamı, Düz. KO: Düzeltilmiş kareler ortalaması

İnhibitör bileşikler Plackett-Burman Dizayn doğrultusunda besiyerlerine eklenmiş ve tekerrürlü olmak üzere 11 fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlardan 5, 8 ve 9 numaralı deneme Plackett-Burman tarafından verilen orta noktalardır. 11 fermentasyonun sonunda yalnızca 3 numaralı denemeye (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit) ait olan fermentasyonda enzim aktivitesi alınmıştır. Bu fermentasyon optimize inhibitör karışımı olarak belirlenmiştir. 215.77 U/mL inülinaz ve 139.46 U/mL invertaz-tip enzim aktivitesi alınan optimize inhibitör karışımına ait fermentasyon denemesi dışında gerçekleştirilen fermentasyonlarda enzim aktivitesi oldukça düşüktür. Tüm fermentasyon denemelerine ait enzim aktivitesi sonuçları ve I/S oranı Çizelge 4.21’de verilmiştir. Sonuçlara göre I/S oranının 10^{-2} ’den büyük olmasından dolayı fermentasyon ortamındaki enzimin inülinaz aktivitesi doğasında olduğu anlaşılmaktadır (Das vd. 2019).

Çizelge 4.21. Karışım denemelerinin inülinaz, invertaz-tip aktivite sonuçları ve I/S oranları

Deneme numarası	<i>Iase</i>	<i>Sase</i>	I/S
1	10.964	5.701	1.923
2	10.476	5.067	2.067
3	215.770	139.460	1.547
4	11.646	9.015	1.292
5	10.623	5.628	1.887
6	8.722	4.702	1.855
7	10.184	3.947	2.580
8	7.942	4.190	1.895
9	9.112	6.334	1.438
10	9.940	5.652	1.759
11	9.745	5.457	1.786

Kontrol fermentasyonuna ait veriler ile optimize inhibitör karışımı fermentasyonuna ait veriler istatistiksel olarak analiz edilmiş olup kinetik parametreler Çizelge 4.22’de verilmiştir. *Iase* aktivitesi kontrol fermentasyonunda 202.95 U/mL iken optimize inhibitör karışımına ait denemede 215.77 U/mL olarak bulunmuş olup değerler arasında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). *Sase* aktivitesi kontrol ve optimize inhibitör karışımına ait denemede sırasıyla 156.91 U/mL ve 139.46 U/mL olarak hesaplanmış ve aralarında istatistiksel yönden önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). QS değeri kontrol fermentasyonunda 13.39 g/L/gün, optimize inhibitör karışımına ait denemede 11.60 g/L/gün olarak hesaplanmıştır. Bu değerler arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($P>0.05$). Q_{Iase} , optimize inhibitör karışımı fermentasyon denemesinde 77.44 olarak hesaplanırken kontrol fermentasyonunda 34.82 U/mL/gün olarak hesaplanmış olup değerler arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmiştir. Diğer parametrelere ait tüm sonuçlar hesaplanmış olup Çizelge 4.22’de verilmiştir.

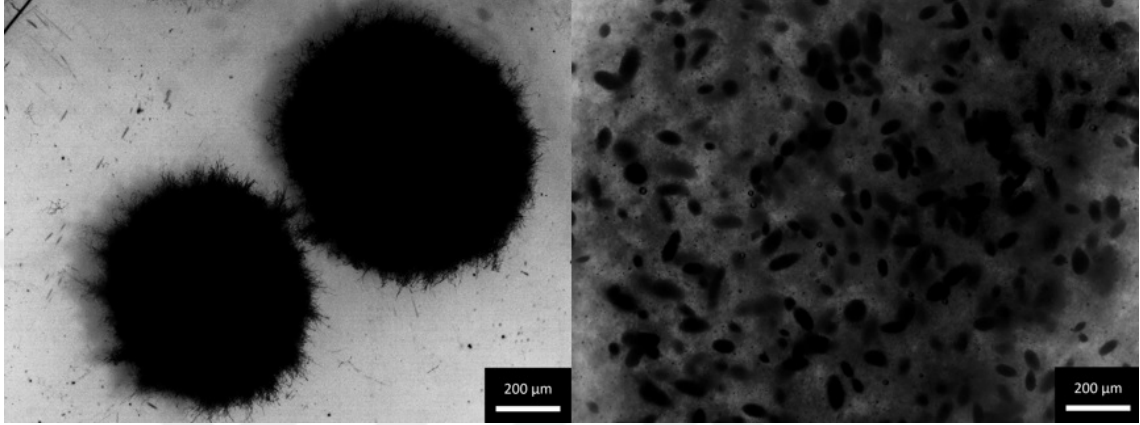
Çizelge 4.22. Placket Burman denemesinde verilen 3.fermentasyona ait kinetik değerler

Kinetik Parametreler	Optimize inhibitör karışımı fermentasyonu	Kontrol fermentasyonu
QS, g/L/gün	13.39 ^a ±1.26	11.60 ^a ±2.22
Q_{Iase} , U/ml/gün	77.44 ^a ±6.32	34.82 ^b ±1.92
Q_{Sase} , U/ml/gün	46.01 ^a ±7.13	30.37 ^a ±3.55
Şeker tüketimi (ΔS), g/L	75.20 ^a ±3.77	84.83 ^a ±0.68
Enzim üretimi (<i>Iase</i>), U/ml	215.77 ^a ±0.96	202.95 ^a ±9.48
Enzim üretimi (<i>Sase</i>), U/ml	139.46 ^a ±10.85	156.91 ^a ±10.53
Şeker tüketim oranı, %	63.14 ^b ±4.16	98.90 ^a ±0.06
Toplam kuru biyokütle (g/L)	3.63 ^b ±0.06	5.53 ^a ±0.03
Nihai pH	3.32 ^a ±0.04	3.02 ^b ±0.03

İstatistiksel olarak analiz aynı sütunlar arası yapılmıştır. Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

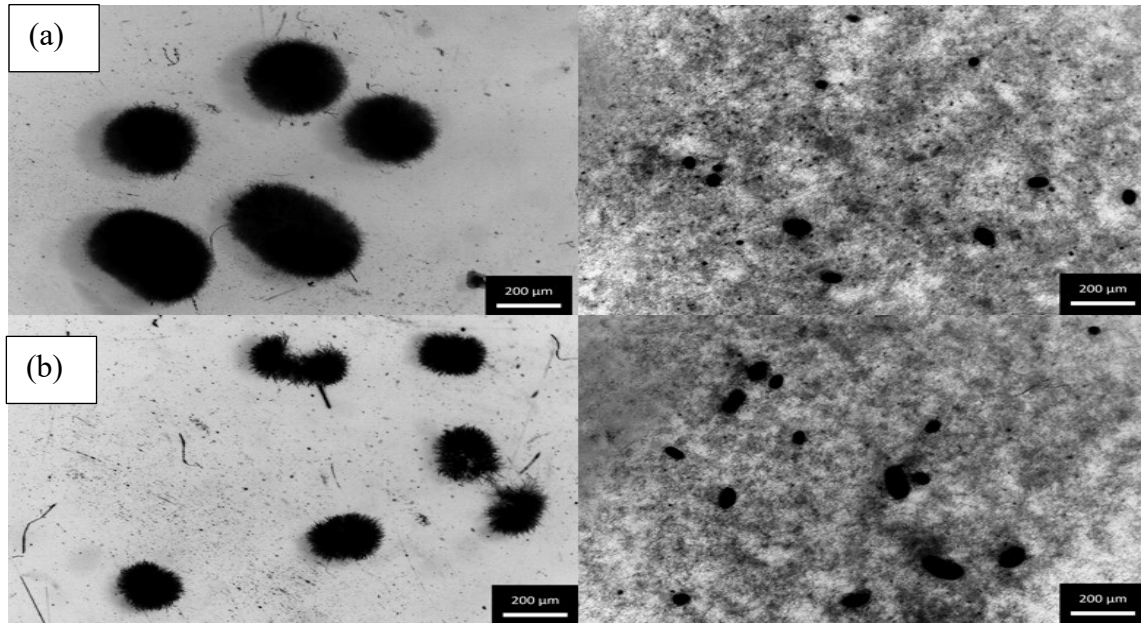
4.8. Görüntü Analizleri

Kontrol fermentasyonu ve inhibitörlerin ayrı ayrı fermentasyon ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda küf misellerinin gelişmeye başladığı ilk gün ve fermentasyonun son günü örnekler alınmış olup mikroskop yardımıyla (Zeiss, Stemi 2000-c, Almanya) görüntü analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz ile küflerin besiyeri ortamındaki inhibitör konsantrasyonuna göre nasıl bir gelişim gösterdiği incelenmiştir (Şekil 4.41).

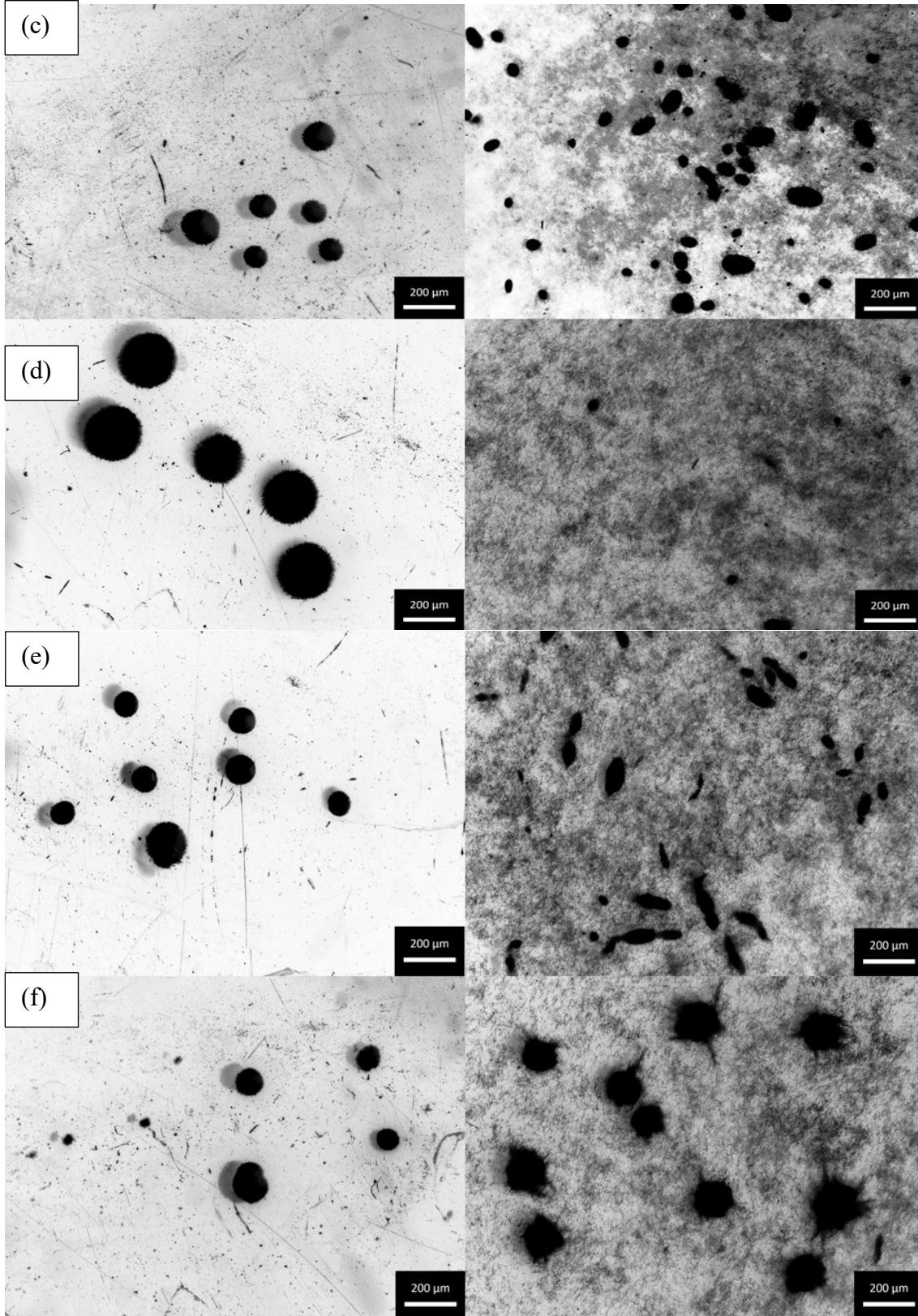


Şekil 4.41. Kontrol fermentasyonuna ait küf gelişimini gözlemlendiği ilk ve son güne ait görüntüler

Küf oluşumunun fermentasyonun ilk günlerinde kürecik şeklinde olduğu görülürken son günlerde çekilen görüntülere bakıldığında hiflerin fermentasyon sıvısına dağıldığı açık bir şekilde görülmektedir.

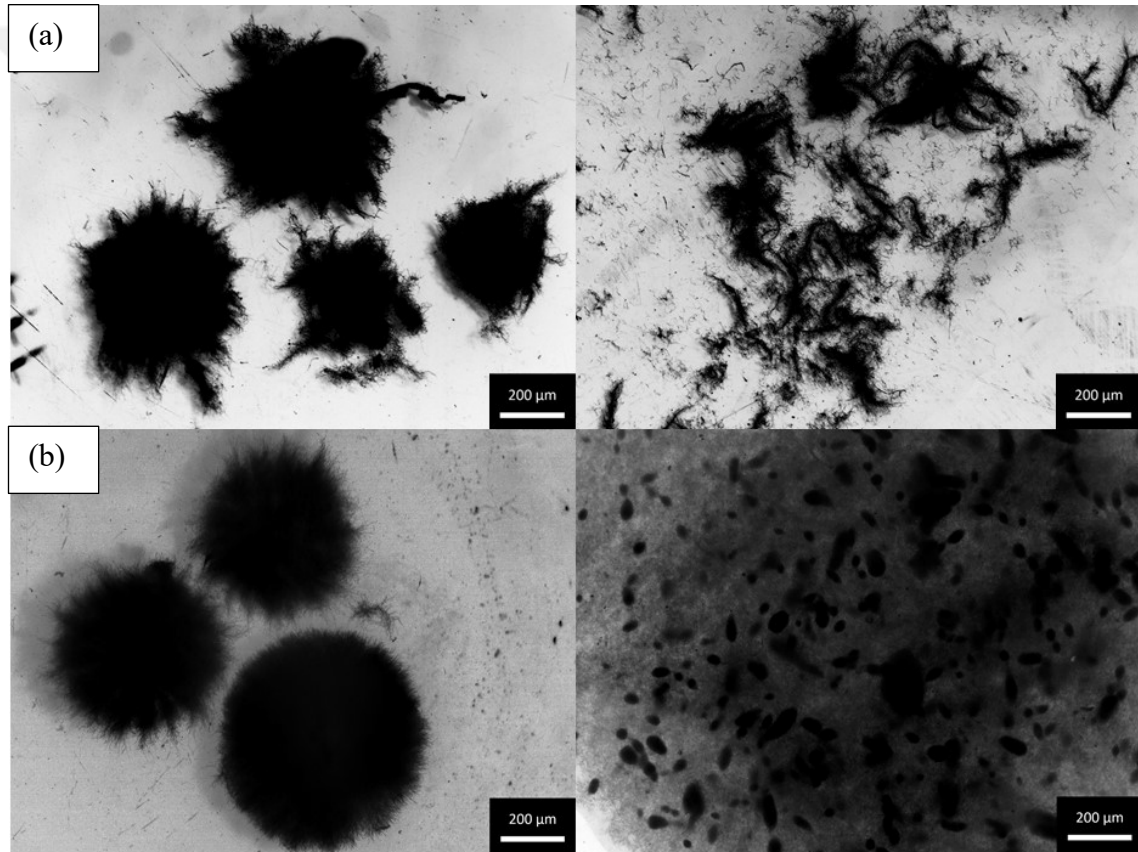


Şekil 4.42. HMF'nin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait görüntüler ilk ve son görüntüler (a): 1 g/L, (b): 2 g/L.



Şekil 4.43. HMF'nin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait görüntüler ilk ve son görüntüler (c) 3 g/L, (d) 4 g/L, (e) 5 g/L ve (f) 6 g/L

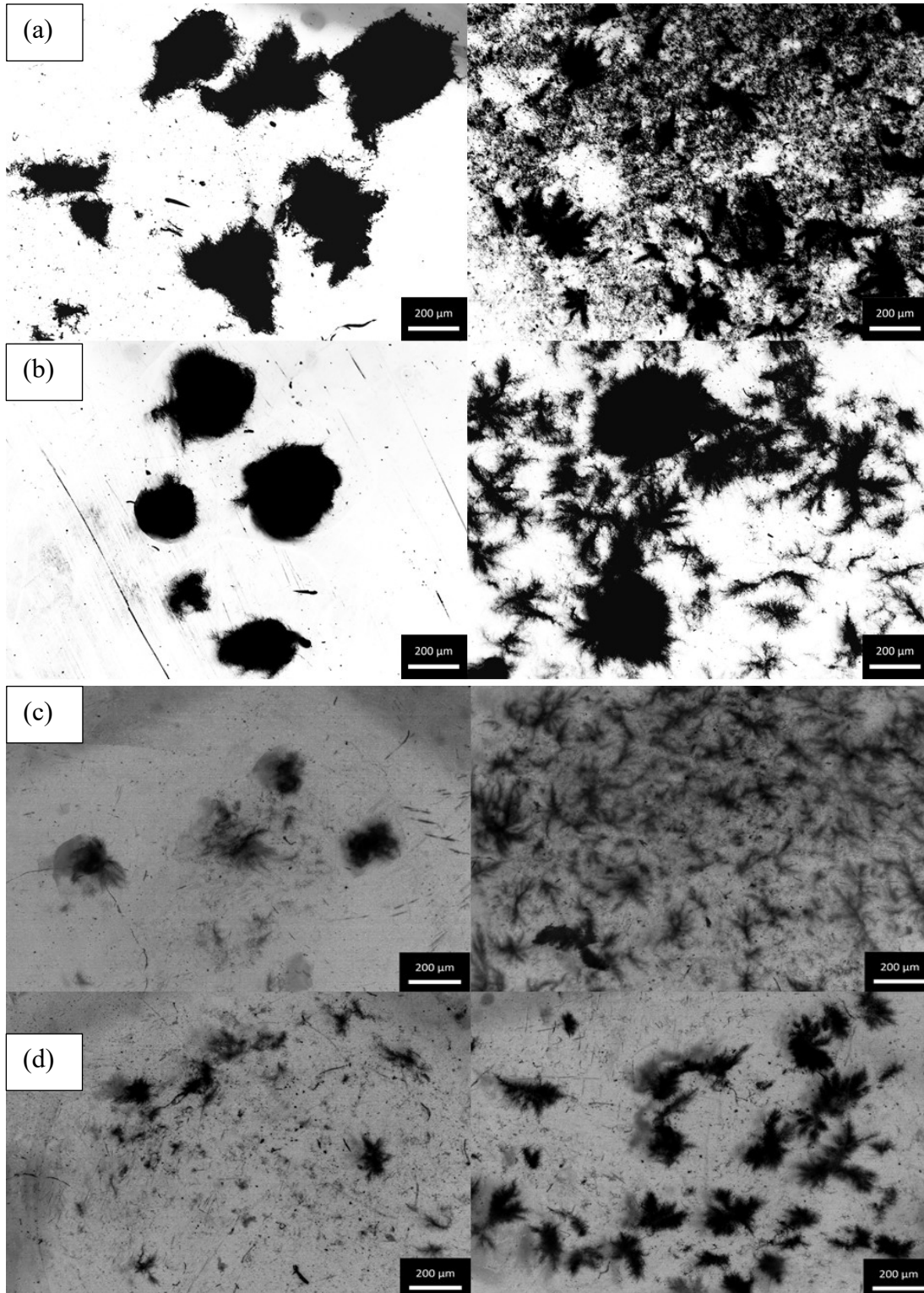
HMF'nin inhibitör olarak fermentasyon sıvısına eklendiği fermentasyonlara ait küf oluşumunu gösteren görüntüler Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te verilmiştir. a, b, c, d ve e görüntülerine bakıldığında başlangıçta küf oluşumunu görebilirken son örneklerde küflerin hiflerinden ayrılıp sıvıya dağılmış olduğu görülmektedir. Şekil 4.42 görüntüsü incelendiğinde küflerin ilk oluşum gösterdiği güne göre fermentasyonun son gününde alınan görüntüye küflerin çaplarının daha büyük olduğu görülmektedir. HMF ile gerçekleştirilen diğer fermentasyonların görüntü analizi sonuçlarının aksine görüntüsünde fermentasyonun son gününde hiflerin fermentasyon sıvısında daha az dağıldığı ve küflerin diğer fermentasyonlara göre bütün halde kaldığı açıkça görülmektedir. HMF ile gerçekleştirilen tüm fermentasyonların ilk küf oluşumları incelendiğinde kontrol fermentasyonuna göre nispeten daha küçük oldukları görülmektedir. Enzim analizi sonuçlarına göre fermentasyon ortamında küf misellerinin sıvıya dağılması durumunda aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle küflerin hiflerinin fermentasyon ortamına dağılması olumlu yönde yorumlanmıştır.



Şekil 4.44. Furfuralın inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a) 0.1 g/L ve (b) 0.5 g/L

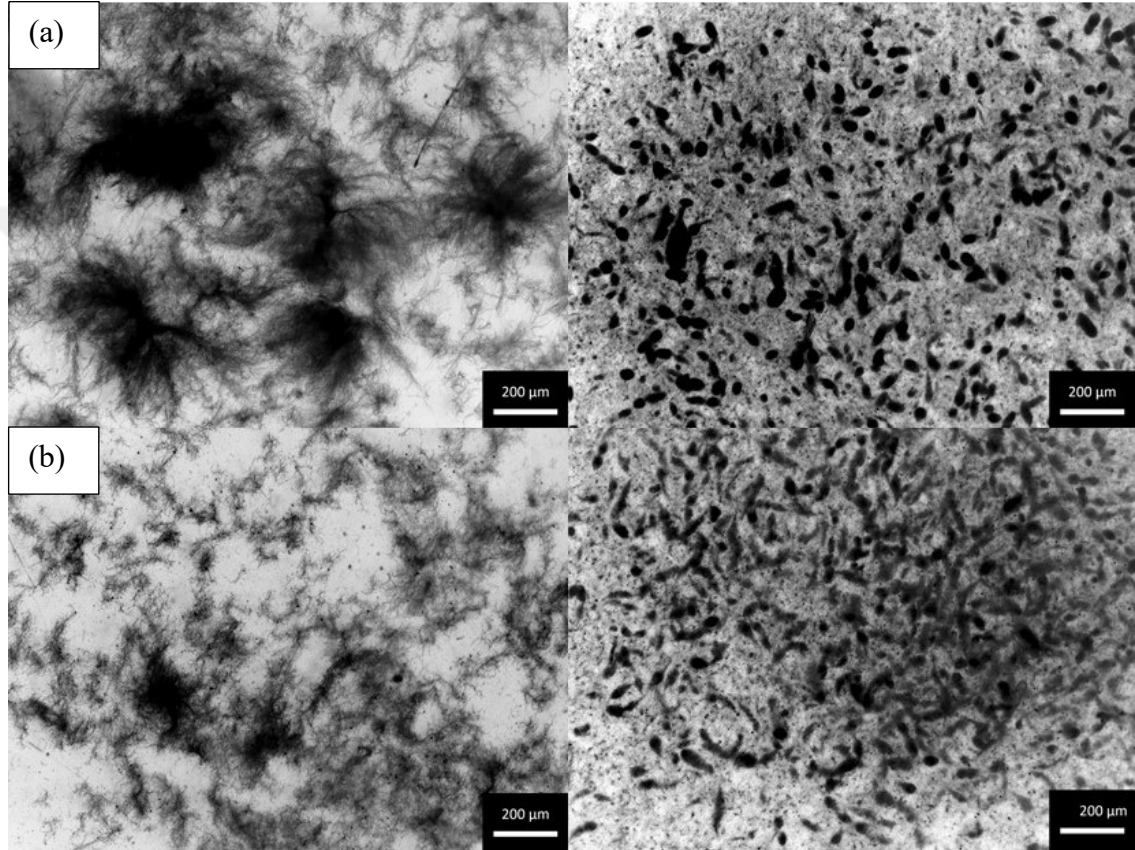
Furfuralın inhibitör olarak fermentasyon sıvısına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait küf oluşumunun ilk görüntüsü ve fermentasyonun son gününde alınan örneklerde küf oluşumunun son görüntüsü Şekil 4.44'te verilmiştir. 0.5 g/L'den sonra artan konsantrasyonlarda yapılan diğer denemelere ait görüntüler küf oluşumu gerçekleşmediği için verilmemiştir. İlk gelişimin gözlemlendiği örneklerde alınan

görüntülerde küfler belirginken fermentasyonun son gününde alınan örneklerde alınan görüntülerde hiflerin fermentasyon sıvısında dağıldığı görülmektedir.



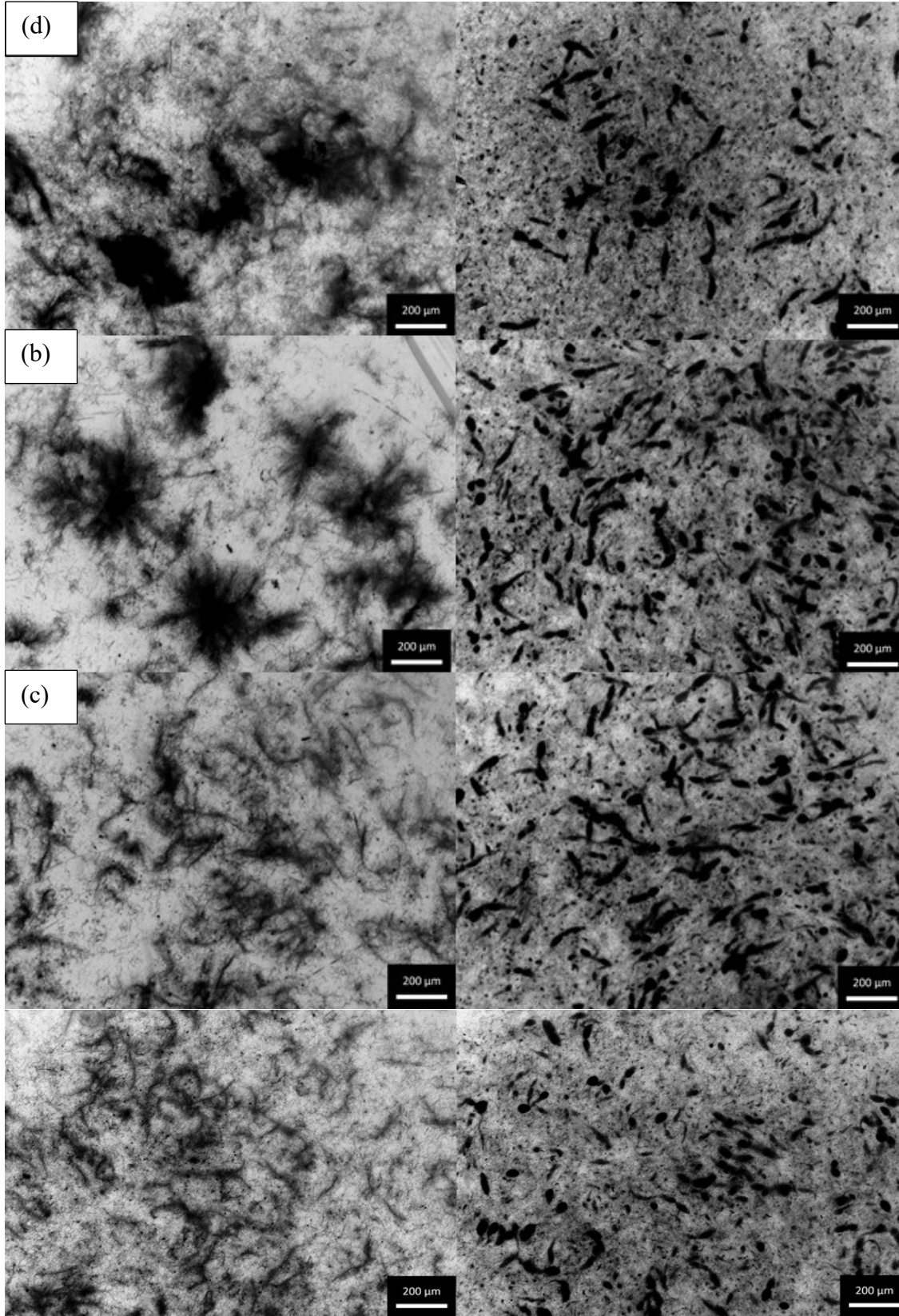
Şekil 4.45. Fenolün inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a) 0.1 g/L, (b) 0.5 g/L, (c) 0.75 g/L ve (d) 1.0 g/L

Fenolün inhibitör olarak fermentasyon ortamına eklendiği denemelerde küf oluşumuna ait görüntüler Şekil 4.45'te verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde 0.1 g/L ve 0.5 g/L fenolün eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlara ait alınan ilk görüntülerde küf boyutları daha büyük olduğu görülürken artan konsantrasyonlarda küçüldüğü görülmektedir. Fermentasyonun son gününe ait görüntüler incelendiğinde 0.1 g/L fenol ile gerçekleştirilen fermentasyonda hiflerin daha çok dağıldığı görülmektedir. 1.0 g/L fenol ile gerçekleştirilen fermentasyona ait alınan son görüntüye bakıldığında ilk küf oluşumuna göre küflerin boyutlarının büyüdüğü fakat hiflerin fermentasyon ortamına diğer fenol denemelerine göre dağılmadığı görülmektedir.

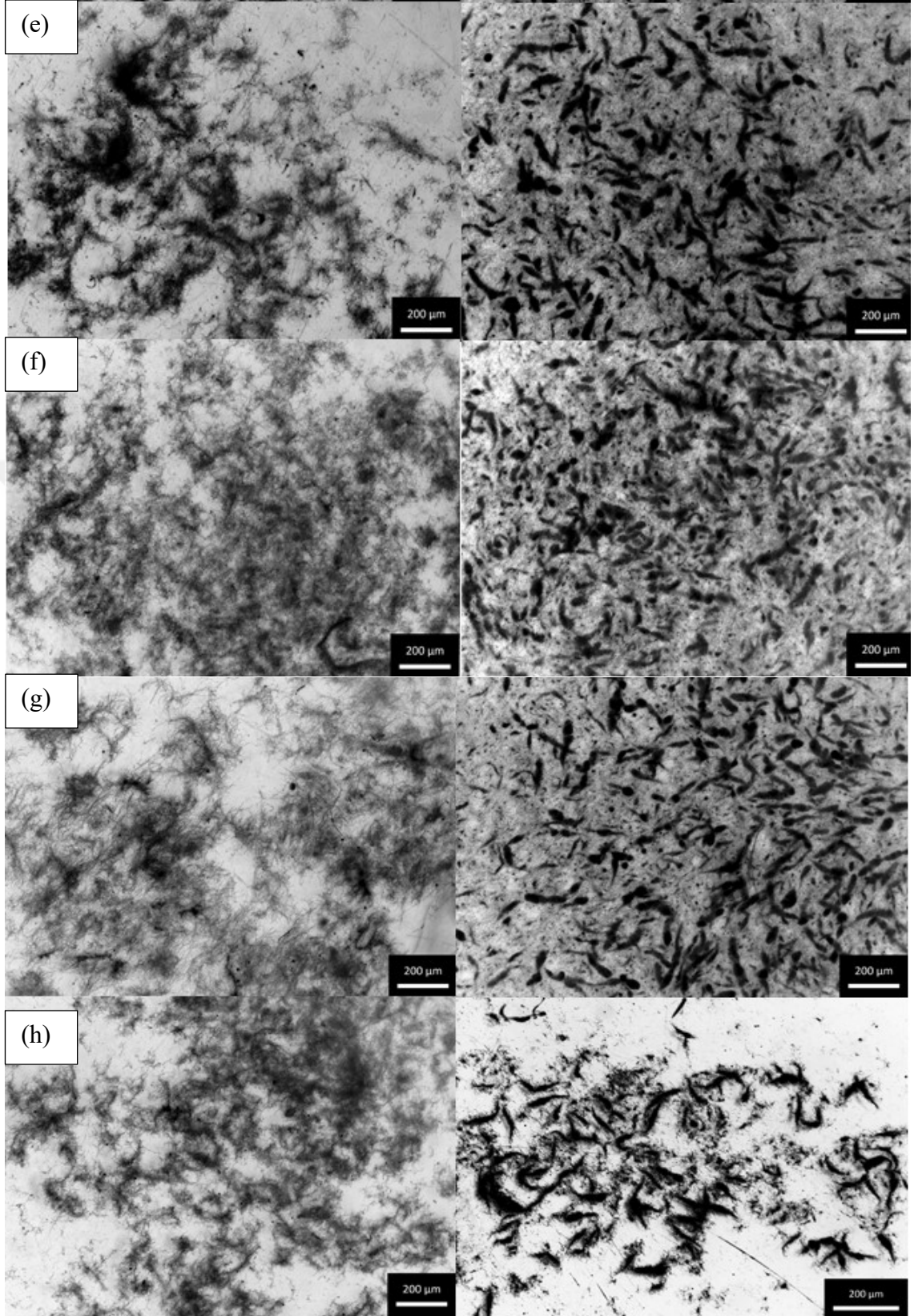


Şekil 4.46. Asetik asitin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler **(a)** 2.5 g/L ve **(b)** 5.0 g/L

Asetik asitin inhibitör olarak fermentasyon sıvısına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda küf oluşumuna ait ilk ve son görüntüler Şekil 4.46'da verilmiştir. 5.0 g/L'den sonra denenen asetik asit konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilen fermentasyonlarda mikroorganizma inhibe olduğu için herhangi bir küf gelişimi gözlenmemiştir ve görüntü analizi yapılamamıştır. 2.5 g/L ve 5.0 g/L asetik asit ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda küflerin ortamda ilk oluşumdan itibaren parçalanıp besiyeri sıvısına dağıldığı görülmektedir.

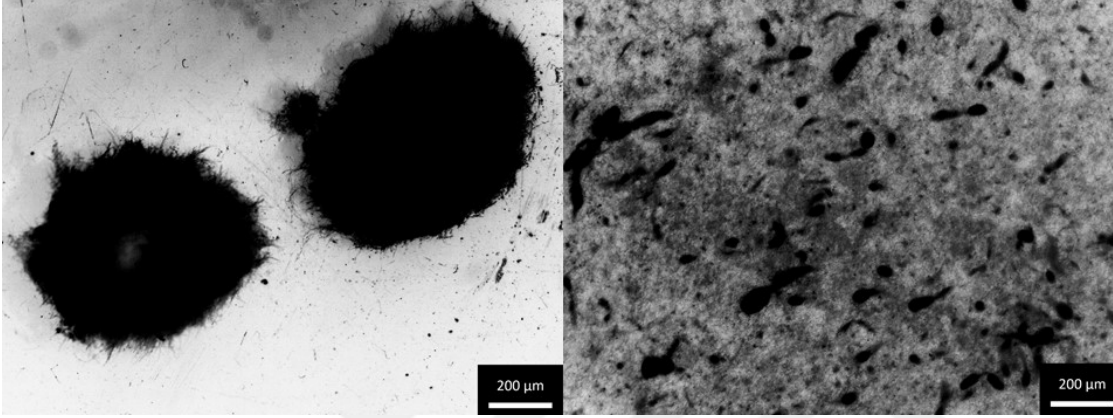


Şekil 4.47. Formik asidin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler (a)1.0 g/L, (b)1.5 g/L, (c) 2.0 g/L, (d) 2.5 g/L



Şekil 4.48. Formik asidin inhibitör olarak besiyerine katıldığı fermentasyonlara ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler **(e)** 3.0 g/L **(f)** 4.0 g/L **(g)** 5.0 g/L ve **(h)** 7.0 g/L

Formik asidin inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda ilk küf oluşumunun olduğu gün alınan örneklerle ve fermentasyonun son günü alınan örneklerle görüntü analizi yapılmış olup Şekil 4.47 ve Şekil 4.48’de görüntüler verilmiştir. 1.0 g/L ve 1.5 g/L konsantrasyonlarla yapılan denemelerde ilk küf oluşumlarında hifler az miktarda ayrılmış olsa da diğer artan konsantrasyonlarda gerçekleştirilen fermentasyonların küf görüntülerine kıyasla nispeten daha net bir şekilde görülmektedir. Fermentasyonun son gününde alınan örneklerle uygulanan görüntü analizlerindeki küf görüntüleri tüm konsantrasyonlar için neredeyse aynı olup görüntüye tamamen hifsi yapının hakim olduğu görülmektedir.



Şekil 4.49. Optimize inhibitör karışımı fermentasyonuna (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit) ait küflerin gelişiminin gözlemlendiği ilk ve son görüntüler

3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit ile gerçekleştirilen karışım denemesinde küf oluşumunun görüldüğü ilk günde kontrol fermentasyonuna benzer bir dairemsi yapıda olduğu görülmektedir. Fermentasyonun son gününde hiflerin ayrılıp fermentasyon sıvısına dağıldığı net bir şekilde Şekil 4.49’da görülmektedir. Bu görüntüler Şekil 4.36’da verilen küf görüntüleri ile hemen hemen benzer bir yapı göstermiştir.

4.9. Buğday Kepeği, Çavdar Kepeği, Yulaf Kavuzu ve Arpa Kavuzu Hidrolizatları Kullanılarak Gerçekleştirilen Fermentasyonlar

Lignoselülozik biyokütlenin fermentasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılabilmesi için lignin, hemiselüloz ve selülozun parçalanması gerekmektedir. Bu sebeple lignoselülozik maddeler çeşitli ön işlemlere tabii tutulmaktadır. Ön işlemler sonucunda ortamda fermentasyonu etkileyen inhibitör bileşikler oluşmaktadır. Çalışmanın buraya kadarki kısmında ilk olarak inhibitörler besiyeri ortamına tek tek eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu inhibitörler karışım şeklinde minimum ve maksimum konsantrasyonlarda Plackett-Burman Dizayn ile oluşturulmuş deneme desenine göre fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Karışım denemeleri suni bir hidrolizat ortamı olarak düşünülmüş ve inhibitörlerin karışım halinde bulunması durumunda fermentasyon üzerindeki etkilerinin nasıl olduğu araştırılmıştır. Çalışmanın bu kısmında ise AK, YK, BK ve ÇK hidroliz edilmiş ve gerçek bir hidrolizatta *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) ile inülinaz

fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Hidroliz ile inhibitör bileşiklerin açığa çıktığı düşünülerek hidrolizatlardan örnekler alınmış ve miktarları belirlenmiştir. Bu aşamada daha önceden gerçekleştirilen ayrı ayrı inhibitör fermentasyonları ve karışım fermentasyonları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.23. Hidrolizatlarda tespit edilen HMF, asetik asit, furfural, formik asit ve fenol miktarları

Hidrolizat	AA (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	FA	Fenol
Arpa Kavuzu	0.975	0.717	-	-	-
Buğday Kepeği	0.677	1.104	0.113	-	-
Çavdar Kepeği	0.762	0.469	-	-	-
Yulaf Kavuzu	4.174	0.398	-	-	-

AA: Asetik asit, FA: Formik asit, -: Tespit edilmemiştir.

Kullanılan hidrolizatlardaki HMF, asetik asit, furfural konsantrasyonları HPLC ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.23'te gösterilmiştir. Asetik asit miktarı yulaf kavuzunda 4.0 g/L'nin üstünde iken diğer hidrolizatlarda 1.0 g/L'nin altında tespit edilmiştir. HMF miktarı en yüksek 1.1 g/L olarak buğday kepeği hidrolizatında bulunmuş olup arpa kavuzu 0.7 g/L olarak takip etmektedir. Furfural miktarı sadece buğday kepeği hidrolizatında 0.1 g/L olarak bulunmuştur. FA ve Fenol ise hidrolizat ortamında tespit edilmemiştir.

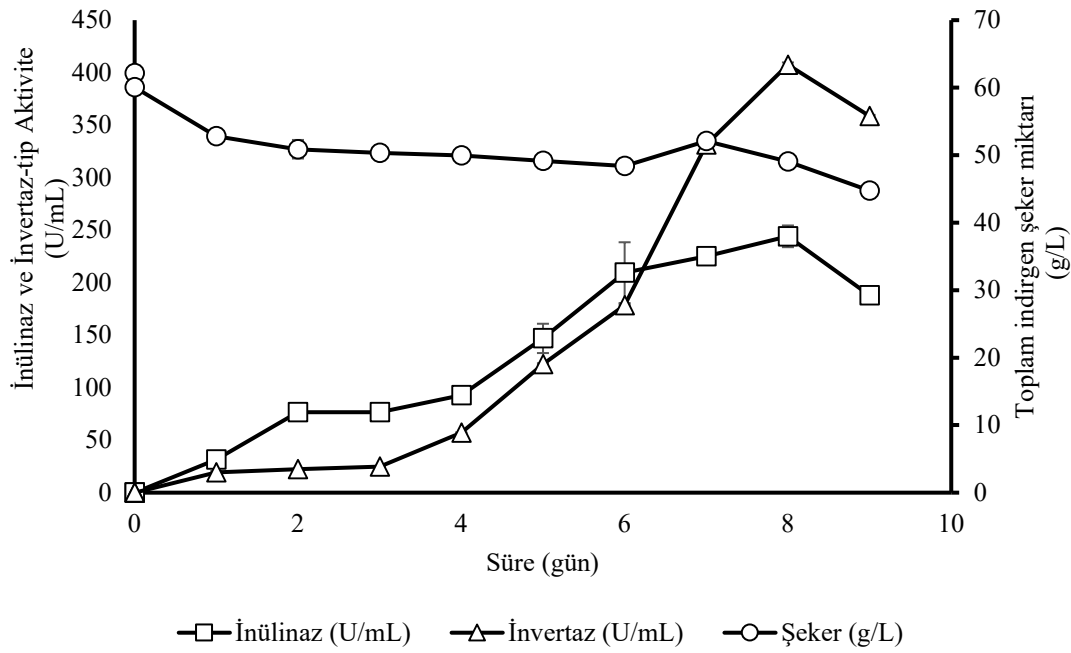
Laboratuvarında bulunan lignoselülozik biyokütleler (AK, BK, ÇK, YK) %1'lik sülfürik asit çözeltisi ile %12.5 katı/sıvı oranında otoklavda hidroliz edilmiştir. Lignoselülozik biyokütle filtre kağıdıyla süzülerek elde edilen sıvı fermentasyon sıvısı olarak kullanılmıştır. Ortama %1 maya ekstraktı ilavesi ve %3 inokülasyon ile fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Süzüntülerden örnekler alınıp HPLC ile organik asit profili ve fenolik içeriği belirlenmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonlara ait bir fotoğraf Şekil 4.50'de verilmiştir.



Şekil 4.50. Lignoselülozik hidrolizatların fermentasyonundan bir fotoğraf

4.9.1. Buğday kepeği hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon

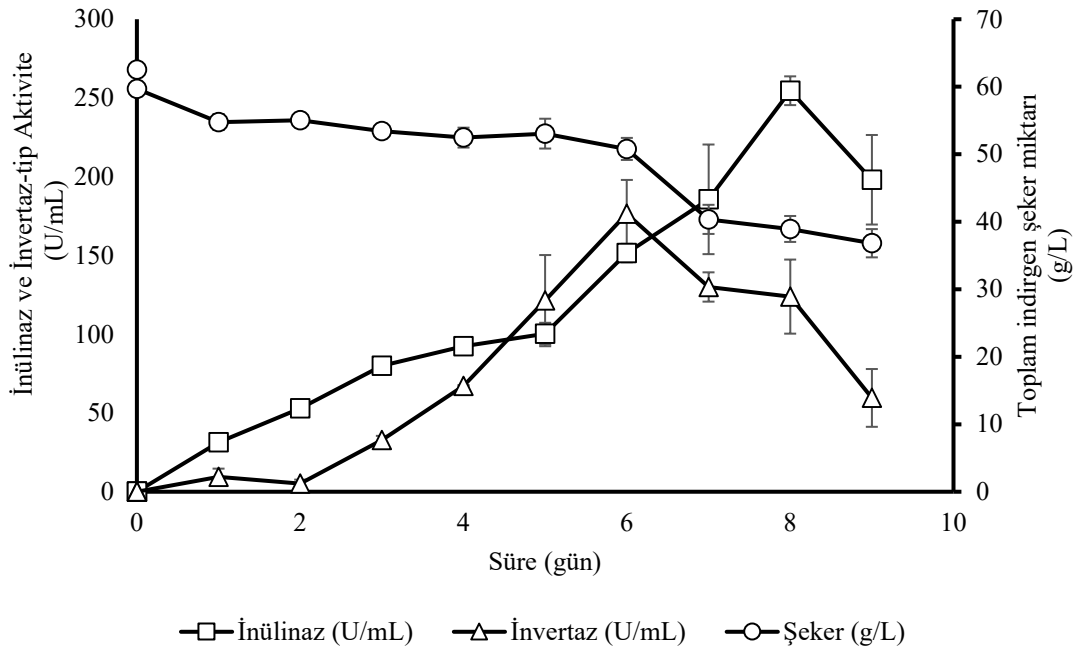
Buğday kepeği hidrolizatına %1 maya ekstraktı eklenerek, %3 inokülasyon oranında ve 150 mL hacimde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.51’de verilmiştir. Maksimum inülinaz aktivitesi 244.13 U/mL olarak analiz edilirken maksimum invertaz aktivitesi 407.49 U/mL olarak hesaplanmıştır. Maksimum inülinaz ve invertaz enzim aktivitesi fermentasyonun 8.günü elde edilmiştir. Fermentasyonun başlangıcında ortamdaki şeker miktarı 60.07 g/L iken son gününde 44.77 g/L’ye düşmüştür. Bu değerler doğrultusunda şeker tüketim miktarı 15.3 g/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.51. Buğday kepeği hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

4.9.2. Çavdar kepeği hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon

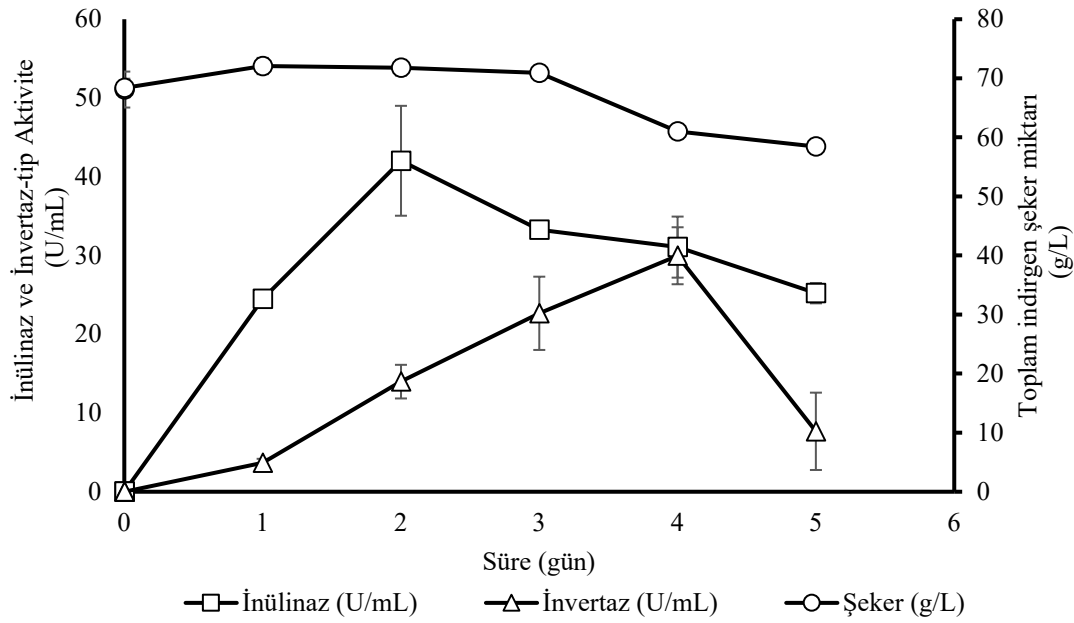
Çavdar kepeği hidrolizatına %1 maya ekstraktı eklenerek, %3 inokülasyon oranında ve 150 mL hacimde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.52’de verilmiştir. Maksimum inülinaz ve invertaz-tip aktivitesinin sırasıyla 254.61 U/mL ve 176.52 U/mL olduğu görülmektedir. En yüksek inülinaz aktivitesine fermentasyonun 8.günüde ulaşıldığı görülmektedir. En yüksek invertaz-tip aktiviteye ise fermentasyonun 6.günüde ulaşılmıştır. Şeker analizi sonuçları incelendiğinde Başlangıçta ortamdaki şeker miktarının 59.67 g/L olduğu ve fermentasyonun son gününde şeker miktarının 33.97 g/L’ye düştüğü görülmektedir. Bu sonuçlara göre şeker tüketimi 25.70 g/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.52. Çavdar kepeği hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

4.9.3. Yulaf kavuzu hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon

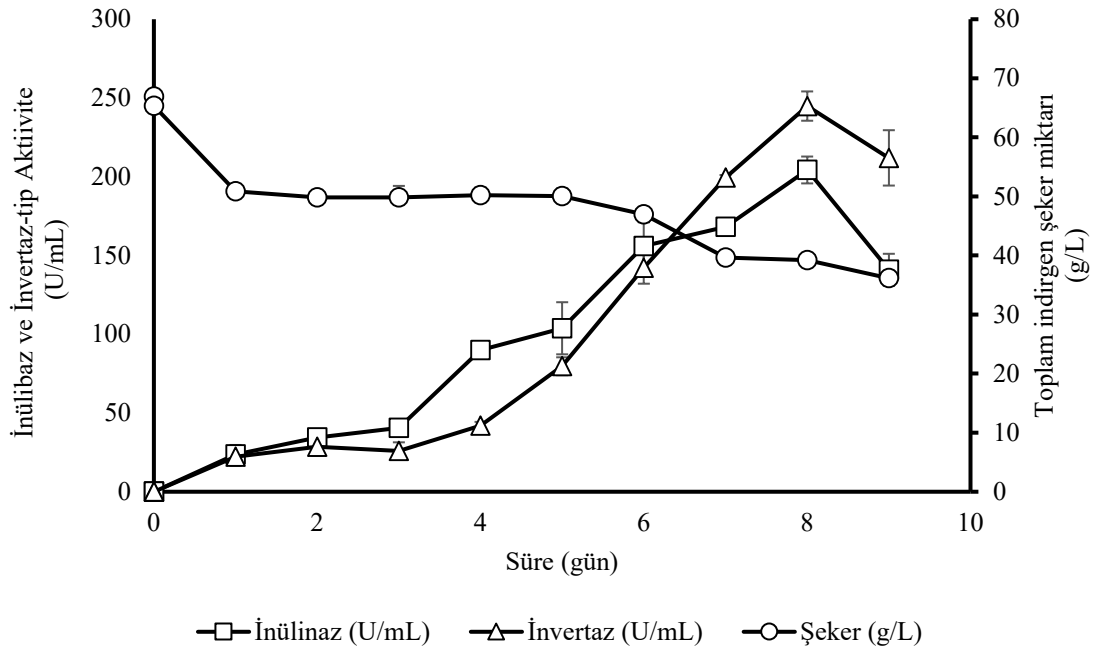
Yulaf kavuzu hidrolizatına %1 maya ekstraktı eklenerek, %3 inokülasyon oranında ve 150 mL hacimde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.53'te verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi 42.03 U/mL olarak hesaplanırken en yüksek invertaz-tip aktivite 29.97 U/mL olarak hesaplanmıştır. Fermentasyonda maksimum inülinaz aktivitesine 3.gün ulaşıldığı görülmektedir. İnvertaz-tip aktivitesinin maksimuma ulaştığı gün 4.gün olarak belirlenmiştir. 5.günde enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu görülmektedir. Başlangıç şeker miktarı 68.09 g/L fermentasyonun son günü ise 58.44 g/L olarak hesaplanmıştır. Şeker tüketim miktarı 9.65 g/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.53. Yulaf kavuzu hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

4.9.4. Arpa kavuzu hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyon

Arpa kavuzu hidrolizatına %1 maya ekstraktı eklenerek, %3 inokülasyon oranında ve 150 mL hacimde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar Şekil 4.54'te verilmiştir. En yüksek inülinaz aktivitesi 204.29 U/mL iken en yüksek invertaz-tip aktivitenin 244.86 U/mL olduğu görülmektedir. En yüksek inülinaz aktivitesine fermentasyonun 8.gününde ulaşıldığı görülmektedir. İnvertaz-tip aktivitenin maksimum olduğu zamanın fermentasyonun 8.günü olduğu görülmektedir. 8.günden sonra enzim üretiminde düşüş olduğu görülmektedir. Fermentasyonun başlangıcında ortamdaki şeker miktarı 65.33 g/L iken fermentasyonun son günü şeker miktarı 34.57 g/L olarak hesaplanmıştır. Verilen bu sonuçlar doğrultusunda şeker tüketimi 29.18 g/L olarak bulunmuştur.



Şekil 4.54. Arpa kavuzu hidrolizatında gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

4.9.5. Arpa kabuzu, yulaf kavuzu, çavdar kepeği ve buğday kepeği hidrolizatları gerçekleştirilen fermentasyonlara ait kinetik parametrelerin değerlendirilmesi

Sülfürik asit ile ön işlem görmüş lignoselülozik maddeler otoklavda hidroliz edilmiştir. Hidrolizatları fermentasyon sıvısı olarak kullanılmış olup ayrı ayrı inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Detoksifiye edilmemiş AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatlarıyla yapılmış fermentasyonlara ait kinetik değerler ise Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.24. AK, YK, ÇK ve BK hidrolizatıyla gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S değerleri

Hidrolizat	İnülinaz aktivite (U/mL)	İnvertaz-tip aktivite (U/mL)	I/S
AK	204.29	244.86	0.83
BK	244.13	407.49	0.60
ÇK	254.6	176.52	1.44
YK	42.03	29.97	1.40

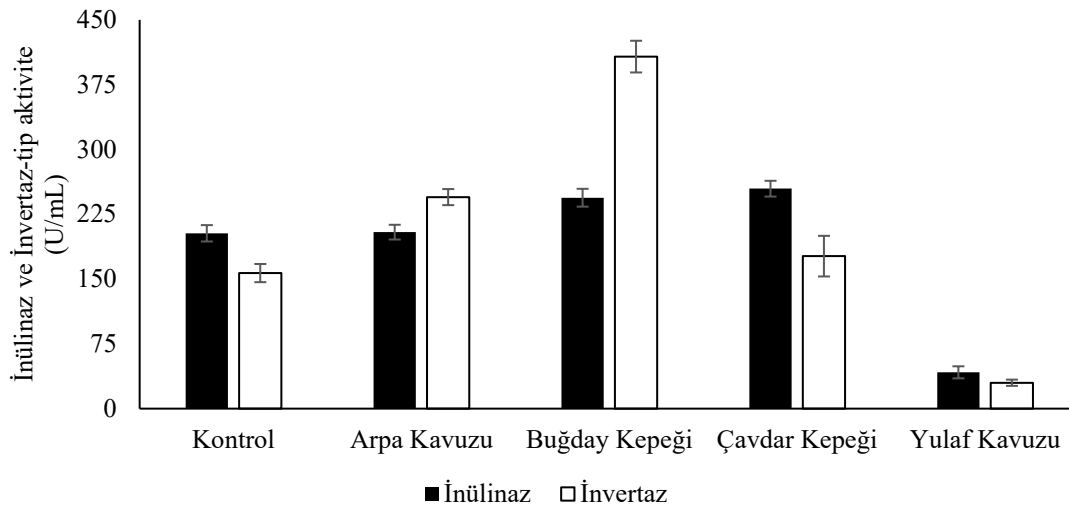
AK: Arpa kavuzu, BK: Buğday kepeği, ÇK: Çavdar kepeği, YK: Yulaf kavuzu

Çizelge 4.24'te hidrolizatlarda gerçekleştirilen fermentasyonlara ait I/S oranları verilmiştir. Sonuçlara göre I/S oranının 10^{-2} 'den büyük olmasından dolayı fermentasyon ortamındaki enzimin inülinaz aktivitesi doğasında olduğu anlaşılmaktadır (Das vd. 2019).

En yüksek *Iase* aktivitesi ÇK ile gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiş olup 254.60 U/mL'dir. ÇK hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyonu takiben en yüksek *Iase* aktivitesi BK, AK ve YK hidrolizatlarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda tespit edilmiştir. BK, AK ve YK için en yüksek *Iase* üretimi sırasıyla 244.13, 204.29 ve 42.03 U/mL olduğu görülmüştür. BK ve ÇK fermentasyonlarından elde edilen en yüksek *Iase* aktiviteleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Sonuçlara göre *Iase* üretimi için en uygun hidrolizat ÇK olarak belirlenmiştir.

En yüksek *Sase* üretimi BK fermentasyonundan elde edilmiş olup bunu AK, ÇK ve YK takip etmiştir. *Sase* aktiviteleri en yüksekten en düşüğe doğru sırasıyla 407.49, 244.86, 176.52 ve 29.97 U/mL olarak bulunmuştur. *Sase* üretimi için tüm değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Maksimum tüketim hızı en yüksek en düşüğe doğru YK, ÇK, BK ve AK'den elde edilmiş olup değerler sırasıyla 6.23, 4.33, 3.66, 3.48 g/L/gün olarak bulunmuştur. Bu değerler arasında istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$). Q_{Iase} is en yüksekten en düşüğe BK (58.35 U/mL/gün), AK (36.0 U/mL/gün), ÇK (32.26 U/mL/gün) ve YK (21.01 U/mL/gün)'den elde edilmiş olup değerler arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ($P>0.05$). Q_{Sase} miktarı en yüksek BK'de görülmüş olup 91.0 U/mL/gün olarak hesaplanmıştır. BK'yi takiben ÇK, AK ve YK'de Q_{Sase} sırasıyla 48.50, 21.40 ve 9.48 U/mL/gün olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.55. Detoksifiye edilmemiş hidrolizatlar ile yapılan fermentasyonların inülinaz ve invertaz-tip aktivite karşılaştırması

Toplam kuru biyokütle miktarı en yüksek 6.39 g/L olarak BK hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilirken en düşük YK (1.01 g/L) hidrolizatı ile gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir. BK ve YK arasında toplam kuru biyokütle açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$). ÇK ve BK fermentasyonlarında toplam kuru biyokütle miktarı 5.55 g/L ve 5.24 g/L olarak bulunmuş olup aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0.05$). Hidrolizat fermentasyonlarına ait kinetik değerler Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. Detoksifiye edilmemiş AK, BK, ÇK ve YK hidrolizatlarıyla yapılmış fermentasyonlara ait kinetik değerler

Hidrolizat	Iase (U/mL)	Sase (U/mL)	ΔS (g/L)	QS (g/L/gün)	Q _{Iase} (U/mL/gün)	Q _{Sase} (U/mL/gün)	ŞTO (%)	Toplam Kuru Biyokütle (g/L)	Nihai pH
AK	204.29 ^b ±8.53	244.86 ^b ±9.30	30.76 ^a ±0.88	3.48 ^a ±0.10	36.00 ^{ab} ±0.75	21.40 ^c ±3.20	45.97 ^a ±0.90	5.24 ^a ±0.18	3.71 ^b ±0.01
BK	244.13 ^a ±10.34	407.49 ^a ±18.35	17.41 ^b ±2.08	3.66 ^a ±0.34	58.35 ^a ±1.04	91.00 ^a ±0.31	28.02 ^b ±3.11	6.39 ^a ±0.85	3.81 ^b ±0.01
ÇK	254.60 ^a ±9.13	176.52 ^c ±23.52	25.70 ^a ±2.00	4.33 ^a ±2.13	31.26 ^{ab} ±18.11	48.50 ^b ±9.38	41.11 ^a ±3.41	5.55 ^a ±0.29	3.56 ^b ±0.15
YK	42.03 ^c ±6.98	29.97 ^d ±3.62	9.65 ^c ±2.34	6.23 ^a ±0.08	21.01 ^b ±3.49	9.48 ^c ±0.37	14.17 ^c ±3.09	1.01 ^b ±0.04	4.69 ^a ±0.00

Aynı sütunlarda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$). Iase: İnülinaz aktivitesi, Sase: İnvertaz-tip aktivite, ΔS: Şeker tüketimi, QS: Şeker tüketim hızı, Q_{Iase}: Maksimum inülinaz üretim hızı, Q_{Sase}: Maksimum invertaz üretim hızı, ŞTO: Şeker tüketim oranı.

5. SONUÇLAR

HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik asidin inhibitör madde olarak saf karbon kaynağıyla hazırlanan besiyeri ortamına eklenmesiyle *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) tarafından inülinaz enzimi üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Her bir inhibitör madde için belirlenen konsantrasyonlarda fermentasyonlar tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlarda kullanılan inhibitör bileşiklerin mikroorganizmayı tetikleyen veya inhibe eden konsantrasyonları belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında seçilen inhibitörlerin karışım olarak fermentasyon sıvısıyla eklenmesiyle de fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Karışım fermentasyonları ile suni bir hidrolizat ortamı oluşturulmuş olup inhibitörlerin birarada bulunmasının sinerjik etkisi araştırılmıştır. İnhibitörlerin mikroorganizmayı inhibe etmeye başladığı konsantrasyon minimum tamamen inhibe ettiği ilk konsantrasyon maksimum olarak seçilerek Minitab yazılımında Plackett-Burman Dizayn ile tekerrür ve orta noktalar ile toplam 22 fermentasyon olan bir deneme deseni elde edilmiştir. Gerçekleştirilen tüm fermentasyonlarda günlük örnekler alınmış olup fermentasyon sıvısında *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407)'nin ilk gelişiminin gözlemlendiği ve fermentasyonun son gününe ait örneklerle görüntü analizi uygulanmıştır. Bu analiz sayesinde inhibitör bileşiklerin hücre gelişimi üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir. Kontrol fermentasyonu, HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik asit fermentasyonlarında en yüksek *Iase* elde edilen konsantrasyonlardaki elde edilen deneysel verilerin *Iase*, *Sase* ve toplam indirgen şeker miktarına 10 farklı model uygulanmıştır. Matematiksel modellemesi yapılan her bir fermentasyon için en iyi model seçilmiştir. Bu fermentasyonlar dışında tez öneri formunda yer almayan çalışma sırasında sonradan gerçekleştirilen AK, ÇK, BK ve YK gibi lignoselülozik materyallerle de *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) ile *Iase* fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Lignoselülozik materyaller sülfürik asit muamelesi ile otoklavda hidroliz edilmiş ve hidrolizatlar fermentasyon sıvısı olarak kullanılmıştır. Hidrolizatlarda HPLC ile organik asit profili ve fenol içeriği belirlenmiştir. Belirlenen içerik ile tez çalışmasında kullanılan inhibitör konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Farklı lignoselülozik maddeler ile gerçekleştirilen bu fermentasyonlardan *Iase* için en iyi karbon kaynağı seçilmiştir.

HMF inhibitör olarak 1.0 g/L, 2.0 g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L, 5.0 g/L ve 6.0 g/L konsantrasyonlarında fermentasyon sıvısına eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek *Iase* aktivitesi 1.0 g/L konsantrasyonda HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir ve kontrol fermentasyonu ile arasında istatistiksel olarak önemli seviyede bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$). 1.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait *Iase* değeri 268.74 U/mL iken kontrol fermentasyonuna ait *Iase* değeri 202.95 U/mL olarak bulunmuştur. HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda inhibisyonun 4.0 g/L'den sonra başladığı görülmüştür. 4.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* aktivitesi 99.99 U/mL iken, 5.0 g/L ve 6.0 g/L HMF ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda sırasıyla 80.69 U/mL ve 62.76 U/mL olarak bulunmuştur. HMF'nin inhibitör olarak besiyerine eklenmesiyle gerçekleştirilen tüm fermentasyon sonuçları göz önüne alındığında *Iase* aktivitenin 60 U/mL'nin altına düşmediği ortaya konmuştur. Bu durum 6.0 g/L HMF'nin tek başına hidrolizatta bulunması durumunda dahi *Aspergillus niger* A42 ile inülinaz fermentasyonunun gerçekleştirilebileceğini ortaya koymuştur.

Furfural inhibitör olarak 0.1 g/L, 0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L ve 2.0 g/L konsantrasyonlarında fermentasyon sıvısına eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. En yüksek *Iase* aktivitesi 0.1 g/L konsantrasyonda furfural eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir. Kontrol fermentasyonunda *Iase* aktivitesi 202.95 U/mL iken 0.1 g/L furfural ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* aktivitesi 197.35 U/mL elde edilmiş olup aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilmemiştir ($P>0.05$). 0.5 g/L furfural ile gerçekleştirilen fermentasyonda 160.80 U/mL *Iase* üretimi olmuştur. Furfuralın fermentasyonu tamamen inhibe ettiği konsantrasyon 1.0 g/L olarak belirlenmiştir. 1.0 g/L furfural ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* üretimi 5.14 U/mL olarak bulunmuştur. 1.5 g/L ve 2.0 g/L konsantrasyonlardaki fermentasyonlarda da mikroorganizma inhibe olmuş ve enzim üretimi gerçekleşmemiştir.

Fenol 0.1 g/L, 0.5 g/L, 0.75 g/L, 1.0 g/L ve 5.0 g/L konsantrasyonlarda inhibitör madde olarak fermentasyon sıvısına eklenerek inülinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek *Iase* aktivitesi 0.1 g/L konsantrasyonda fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir. Kontrol fermentasyonunda *Iase* aktivitesi 202.95 U/mL iken 0.1 g/L fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda 117.39 U/mL *Iase* aktivitesi alınmıştır. Kontrol fermentasyonu ile 0.1 g/L fenol fermentasyonunda inülinaz üretimi için istatistiksel açıdan önemli bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). 0.5 g/L, 0.75 g/L, 1.0 g/L ve 5.0 g/L fenol ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda *Iase* aktivitesi sırasıyla 63.35 U/mL, 54.82 U/mL, 56.47 U/mL ve 12.57 U/mL olarak bulunmuştur. Fenol ilaveli fermentasyonlarda inhibisyonun başladığı konsantrasyonun 0.5 g/L olduğu tespit edilmiştir. İnhibisyon başlamış olmasına rağmen 0.5 g/L, 0.75 g/L ve 1.0 g/L fenol konsantrasyonlarındaki fermentasyonlarda *Iase* aktivitenin yaklaşık 55 U/mL'nin altına düşmediği tespit edilmiştir. Bu tez çalışması için denenen fenol konsantrasyonları arasında mikroorganizmanın tamamen inhibe olduğu konsantrasyon 5.0 g/L olarak tespit edilmiştir.

Asetik asit inhibitör olarak 2.5 g/L, 5.0 g/L, 7.5 g/L, 10.0 g/L ve 12.5 g/L konsantrasyonlarında fermentasyon sıvısına ilave edilerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. 2.5 g/L ve 5.0 g/L konsantrasyonda asetik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda *Iase* aktivitesi sırasıyla 340.32 U/mL ve 336.96 U/mL olarak bulunmuştur. Kontrol fermentasyonunda *Iase* aktivitesi 202.95 U/mL olarak bulunmuştur. Bu durumda asetik asit ilavesinin 5.0 g/L konsantrasyona kadar tetikleyici bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Asetik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda 7.5 g/L'den itibaren mikroorganizma tamamen inhibe olmuş ve hiçbir enzim aktivitesi göstermemiştir. Kontrol fermentasyonu ve asetik asit ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Formik asit inhibitör olarak 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L, 2.5 g/L, 3.0 g/L, 4.0 g/L, 5.0 g/L ve 7.0 g/L konsantrasyonlarda fermentasyon sıvısına eklenerek fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Formik asit için gerçekleştirilen denemelerde konsantrasyon arttıkça *Iase* aktivitesinin de arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek *Iase* aktivitesi 7.0 g/L konsantrasyonda eklenen formik asitle gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir. Kontrol fermentasyonunda *Iase* aktivitesi 202.95 U/mL iken 7.0 g/L formik ilavesiyle

gerçekleştirilen fermentasyonda *Iase* aktivitesi 312.69 U/mL olarak bulunmuş olup aralarında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.05$). Formik asit fermentasyonlarında en düşük *Iase* aktivitesinin, en düşük konsantrasyon denemesi olan 1.0 g/L (139.75 U/mL) ve 1.5 g/L (136.83 U/mL) formik asit ilavesi ile gerçekleştirilen fermentasyonlardan elde edildiği tespit edilmiştir.

HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik asitin Plackett-Burman tarafından verilen deneme denesininde gerçekleştirilen karışım fermentasyonlarından sadece 3 numaralı denemeye (3.0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.1 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit) ait olan fermentasyonda *Iase* aktivitesi alınmış olup bu değer 215.77 U/mL'dir. Bu deneme optimize inhibitör karışımı olarak tanımlanmıştır. Optimize inhibitör karışımına ait deneme tüm inhibitörlerin minimum konsantrasyonlarından oluşmaktadır. Yalnızca bir inhibitörün dahi seçilen maksimum konsantrasyonda olması sinerjistik etki oluşturmuş ve mikroorganizmayı inhibe etmiştir. Bu sebeple inülinaz aktivitesi sadece optimize inhibitör karışımına ait fermentasyon denemesinden elde edilmiştir. Optimize inhibitör karışımına ait deneme ile kontrol fermentasyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$).

AK, YK, ÇK ve BK'nin seyriltik asit hidrolizi ile gerçek bir hidrolizat ortamı oluşturularak *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) ile inülinaz fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. *Iase* aktiviteleri sırasıyla 204.29 U/mL, 42.03 U/mL, 254.60 U/mL ve 204.29 U/mL olarak elde edilmiştir.

Lignoselülozik biyokütleler yenilenebilir, bol ve ucuz karbon kaynağı oldukları için çeşitli katmadeğeri yüksek ürünlerin fermentasyon ile üretiminde kullanılmaktadır. Fermente edilebilir şekerlerin ortaya çıkması için kimyasal ve fizikokimyasal olarak sert koşullarda hidroliz işlemleri uygulanmakta ve inhibitörler oluşmaktadır. Bunlar ürün oluşumunu engelleyici bir dizi etki göstermektedir. Bu inhibitörler arasında furan türevleri (furfural ve HMF), zayıf organik asitler (formik asit, asetik asit ve levulinik asit), ve fenolik bileşikler (vanilin, ferulik asit, 4-hidroksibenzaldehit ve sirinaldehit) bulunur. Literatürde çeşitli mikroorganizmalarla lignoselülozik materyallerden fermentasyon ile farklı son ürünler oluşturmak üzere gerçekleştirilen birçok çalışma bulunmaktadır (Alriksson vd. 2009; de Souza Abud vd. 2017; Hasunuma ve Kondo 2012; Li vd. 2017; Lin vd. 2015; Ling vd. 2014; Lyra Colombi vd. 2018; Zhang vd. 2016a; Zou vd. 2017).

Genel olarak 1.0 g/L ve üzerindeki furfural konsantrasyonlarının mikroorganizmayı inhibe ettiği görülmüştür (Alriksson vd. 2009; Li vd. 2017; Lin vd. 2015; Zhang vd. 2016a). Bu tez çalışması kapsamında da 1.0 g/L ve üzerindeki furfural konsantrasyonlarında *Aspergillus niger* A42'nin inhibe olarak inülinaz enzimi gerçekleştirilemediği ortaya konmuştur.

HMF'nin yaklaşık 2.0 g/L ve üstünde olduğu (Alriksson vd. 2009; Lin vd. 2015; Zou vd. 2017) hatta 3.5 g/L'nin üstünde olduğu konsantrasyonlarda inhibe edici özellikte olduğu bildirilmiştir (Li vd. 2017). Yapılan tez çalışması kapsamında ise 1.0 g/L konsantrasyonda inülinaz enzim aktivitesinde bir artış gözlemlenirken 4 g/L konsantrasyonda inhibe olmaya başladığı fakat enzim üretiminin hala olduğu ortaya

konmuştur. Tez çalışması kapsamında en yüksek HMF konsantrasyonu 6.0 g/L olarak denenmiş olup bu konsantrasyonda dahi 62.76 U/mL *Iase* aktivitesi elde edilmiştir.

Fenol ile gerçekleştirilen bir çalışmada 0.94 g/L konsantrasyonda bulunması durumunda inhibe etkinin gözlemlendiği bildirilirken (Li vd. 2017) gerçekleştirilen bu tez çalışmasında 0.1 g/L üzerindeki fenol konsantrasyonunda bile fermentasyonun inhibe olmaya başladığı belirlenmiştir. *Aspergillus niger* A42 ile inülinaz enzimi üretimi gerçekleştirilen bu tez projesinde 5.0 g/L konsantrasyonda fenol ilavesinin mikroorganizmayı tamamen inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır.

5.0 g/L ve üzeri konsantrasyonda asetik asidin fermentasyon ortamında bulunması ile inhibisyonun gerçekleştiği gözlemlenirken (Zhang vd. 2016a) bir diğer çalışmada yaklaşık 1.5 g/L konsantrasyondaki asetik asidin inhibe edici etkisinin olduğu bildirilirken (de Souza Abud vd. 2017) bu tez kapsamında fermentasyon sıvısına 5.0 g/L konsantrasyonda asetik asit ilavesi ile *Aspergillus niger* A42 tarafından yüksek miktarda inülinaz enzim üretimi gerçekleştiği ortaya konmuştur.

Fermentasyon ortamında formik asit konsantrasyonunun artması ile ürün oluşumunda da artış gözlemlenen bir çalışmada 4.0 g/L'nin üstündeki konsantrasyonda inhibisyon etkisinin başladığı ortaya konmuştur (Zhang vd. 2016a). Bu tez çalışması kapsamında ise formik asit ilavesinin 1.0 g/L ile 3.0 g/L arasında denenilen konsantrasyonlarda az miktarda inhibisyona sebep olduğu gözlemlenmiştir. Ancak artan konsantrasyonlar ile gerçekleştirilen denemelerde (4.0 g/L ile 7.0 g/L arası) bu durumun artan enzim aktivitesine dönüştüğü ortaya konmuştur. Yani fermentasyon sıvısında 7.0 g/L formik asidin bulunması mikroorganizmanın inhibisyonuna sebep olmadığı belirlenmiş ve detoksifikasyon prosesinin bu konsantrasyonlarda gerekli olmadığı ortaya konmuştur.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) ile inülinaz fermentasyonu üzerinde inhibitör tolerans etkinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez bu yönüyle özgünlük taşımakta ve literatürdeki açığı kapatmaya yönelik önemli sonuçlar ortaya koymaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik asit varlığında fermentasyonun nasıl etkilendiği ve enzim üretiminin ne derece gerçekleştiğine dair sonuçlara ulaşılmıştır. İnhibitör ilavesiyle gerçekleştirilen ve en yüksek inülinaz enzim aktivitesi alınan fermentasyonlara 10 farklı matematiksel model uygulanmış olup karşılaştırılarak en iyi modeller seçilmiştir. Çalışma bu yönüyle de özgünlük taşımaktadır. İnhibitör bileşiklerin birarada bulunmasıyla da inülinaz fermentasyonu gerçekleştirilmiş olup inhibitörlerin sinerjistik etkileri incelenmiştir. Literatürde inhibitörlerin karışım olarak fermentasyon sıvısına eklenmesiyle *Aspergillus niger* tarafından inülinaz fermentasyonuna dair herhangi bir bildiri olmamasından dolayı da çalışma özgünlük taşımaktadır. Tüm fermentasyon gerçekleştirilmiş olup, çalışmanın esas amacı olan *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204447)'nin inülinaz enzimi üretiminde; HMF, furfural, fenol, asetik asit ve formik aside karşı tolerans aralıkları belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen fermentasyonlarda en yüksek *Iase* aktiviteleri asetik asit için 340.32 g/L (2.5 g/L AA ilavesi), formik asit için 312.69 U/mL (7 g/L FA ilavesi), HMF için 268.74 U/mL (1 g/L HMF ilavesi), Furfural için 197.35 U/mL (0.1 g/L furfural

ilavesi), fenol için ise 117.39 U/mL (0.1 g/L fenol ilavesi) olarak bulunmuştur. Ayrıca optimize edilmiş karışım fermentasyonunda (3 g/L HMF, 0.1 g/L furfural, 0.5 g/L fenol, 2.5 g/L asetik asit ve 3.0 g/L formik asit) 215.77 U/mL *Iase* aktivitesi bulunmuştur. Bu konsantrasyonlardaki inhibitörlerin karışım halinde fermentasyon sıvısında bulunması durumunda *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407) tarafından inülinaz enzimi üretiminin detoksifikasyon işlemine gerek kalmadan gerçekleştirilebileceği ortaya konmuştur. Hidrolizatlar (çavdar kepeği, buğday kepeği ve arpa kavuzu) ile yapılan inülinaz fermentasyonlarında ise *Iase* aktivitesi sırasıyla 254.60 U/mL, 244.13 U/mL ve 204.29 U/mL olarak bulunmuştur. Çavdar kepeği hidrolizatında 0.7 g/L AA, 0.5 g/L HMF; buğday kepeği hidrolizatında 0.7 g/L AA, 1.1 g/L HMF ve 0.1 g/L furfural; arpa kavuzu hidrolizatında ise 0.1 g/L AA ve 0.7 g/L HMF olduğu HPLC ile tespit edilmiştir. Bu hidrolizatların içerdikleri inhibitör bileşenleri *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204447)'nin tolere edebildiği ve detoksikasyon işlemine ihtiyaç duyulmadan doğrudan fermentasyon sıvısı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Inhibitör bileşiklerin ayrı ayrı besiyerine ilavesiyle gerçekleştirilen fermentasyonlarda mikroorganizmanın pozitif yönde etkilendiği fermentasyonlar da belirlenmiştir. Bu inhibitör konsantrasyonları HMF için 1 g/L (268.73 U/mL), asetik asit için 2.5 ve 5 g/L (340.32 ve 336.96 U/mL), formik asit için ise 4, 5 ve 7 g/L (274.05, 282.94 ve 312.69 U/mL) olarak tespit edilmiştir.

Aspergillus niger A42 (ATCC® 20447) ile inülinaz enzimi üretiminde lignoselülozik hidrolizatların kullanılmasıyla birçok çalışma gerçekleştirilmekte ve gelecekte de farklı materyallerle gerçekleştirileceği düşünülmektedir. Mikroorganizmanın muhtemel inhibitör bileşiklere karşı tolerans aralıklarının bilinmesi detoksifikasyon prosesinin gerekliliğine karar verme aşamasında önem taşımaktadır. Tez kapsamında *Aspergillus niger* A42 (ATCC® 204407)'nin inhibitör bileşiklere karşı tolerans aralığının belirlenmiş olması bu tez çalışmasının daha sonra çalışılacak birçok araştırma için önemli bir çıktı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A.O. 2013. Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Journal of Science*, 17 (3): 381-397.
- Almeida, J.R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G. and Gorwa-Grauslund, M.F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82 (4): 340-349.
- Alriksson, B., Rose, S.H., Van Zyl, W.H., Sjöde, A., Nilvebrant, N.-O. and Jönsson, L.J. 2009. Cellulase production from spent lignocellulose hydrolysates by recombinant *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (8): 2366-2374.
- Altunbaş, C. 2013. Yüksek fruktozlu şurup üretimi için Concanavalin bağlı süper makro gözenekli kriyojellere inülinaz immobilizasyonu, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 83 s.
- Atkins, P. and Overton, T. 2010. Inorganic Chemistry. Oxford University Press, USA 813 s.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4): 277-294.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. and Ramakrishnan, S. 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 2011: 17.
- Chen, H.-Q., Chen, X.-M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M., Zhao, J.-W., Chen, T.-X. and Xie, Z.-J. 2009. Purification and characterisation of exo-and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 115 (4): 1206-1212.
- Clark, T.A. and Mackie, K.L. 1984. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34 (2): 101-110.
- Dantigny, P., Nanguy, S.P.-M., Judet-Correia, D. and Bensoussan, M. 2011. A new model for germination of fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2): 176-181.
- Das, D., Bhat, R. and Selvaraj, R. 2019. Review of inulinase production using solid-state fermentation. *Annals of Microbiology*, 69 (3): 201-209.
- De Moura, F.A., Macagnan, F.T. and Da Silva, L.P. 2015. Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 50 (2): 275-281.

- De Souza Abud, A.K., Da Silva, A.D.S. and De Oliveira Junior, A.M. 2017. Effect of inhibitors on ethanol production by *Pichia stipitis* in a complex culture media. *Acta Scientiarum Technology*, 39 (2): 223-229.
- Ettalibi, M. and Baratti, J.C. 1987. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26 (1): 13-20.
- Fitzhugh Jr, H. 1976. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. *Journal of Animal Science*, 42 (4): 1036-1051.
- Germec, M., Cheng, K.-C., Karhan, M., Demirci, A. and Turhan, I. 2019. Application of mathematical models to ethanol fermentation in biofilm reactor with carob extract. *Biomass Conversion and Biorefinery* 1-16.
- Germec, M., Demirel, F., Tas, N., Ozcan, A., Yilmazer, C., Onuk, Z. and Turhan, I. 2017. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production. *Cellulose*, 24 (10): 4337-4353.
- Germec, M. and Turhan, I. 2018. Ethanol production from acid-pretreated and detoxified rice straw as sole renewable resource. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8 (3): 607-619.
- Gill, P.K., Manhas, R.K. and Singh, P. 2006. Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase. *Bioresource Technology*, 97 (2): 355-358.
- Hassan, R., El-Kadi, S. and Sand, M. 2015. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (1): 1-11.
- Hasunuma, T. and Kondo, A. 2012. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*, 30 (6): 1207-1218.
- Huang, L. 2013. Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. *Food Control*, 32 (1): 283-288.
- Jönsson, L.J. and Martín, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199: 103-112.
- Klinke, H.B., Thomsen, A. and Ahring, B.K. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66 (1): 10-26.

- Kondepudi, K.K., Ambalam, P., Nilsson, I. and Wadstr, T. 2012. Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 18 (5): 489-497.
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N.-O. and Jönsson, L.J. 1999. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77 (1-3): 91-103.
- Li, Y.-C., Gou, Z.-X., Zhang, Y., Xia, Z.-Y., Tang, Y.-Q. and Kida, K. 2017. Inhibitor tolerance of a recombinant flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain during glucose and xylose co-fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48 (4): 791-800.
- Lima, D.M., Fernandes, P., Sampaio Nascimento, D., De Cássia L Figueiredo Ribeiro, R. and De Assis, S.A. 2011. Fructose syrup: a biotechnology asset. *Food Technology and Biotechnology*, 49 (4): 424-434.
- Lin, R., Cheng, J., Ding, L., Song, W., Zhou, J. and Cen, K. 2015. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 196: 250-255.
- Ling, H., Teo, W., Chen, B., Leong, S.S.J. and Chang, M.W. 2014. Microbial tolerance engineering toward biochemical production: from lignocellulose to products. *Current opinion in biotechnology*, 29: 99-106.
- Loow, Y.-L., Wu, T.Y., Jahim, J.M., Mohammad, A.W. and Teoh, W.H. 2016. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*, 23 (3): 1491-1520.
- Lyra Colombi, B., Silva Zanoni, P.R. and Benathar Ballod Tavares, L. 2018. Effect of phenolic compounds on bioconversion of glucose to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96 (7): 1444-1450.
- Mavituna, F. and Sinclair, C.G. 2008. Modelling the kinetics of biological activity in fermentation systems. *Practical Fermentation Technology*, 167-230.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.
- Modig, T., Liden, G. and Taherzadeh, M.J. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 363 (3): 769-776.
- Mohamed, S.A., Salah, H.A., Moharam, M.E., Foda, M. and Fahmy, A.S. 2015. Characterization of two thermostable inulinases from *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13 (1): 65-69.

- Mohan, A., Flora, B. and Girdhar, M. 2018. Inulinase: An important microbial enzyme in food industry. *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer, 237-248 s.
- Morgan, P.H., Mercer, L.P. and Flodin, N.W. 1975. General model for nutritional responses of higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72 (11): 4327-4331.
- Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, 93 (1): 1-10.
- Narayanan, V., Schelin, J., Gorwa-Grauslund, M., Niel, E.W. and Carlquist, M. 2017. Increased lignocellulosic inhibitor tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* cell populations in early stationary phase. *Biotechnology for Biofuels*, 10 (1): 114.
- Öngen-Baysal, G. and Sukan, S.S. 1996. Production of inulinase by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 18 (12): 1431-1434.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74 (1): 25-33.
- Parawira, W. and Tekere, M. 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31 (1): 20-31.
- Petrova, P., Velikova, P., Popova, L. and Petrov, K. 2015. Direct conversion of chicory flour into L (+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505. *Bioresource Technology*, 186: 329-333.
- Pienkos, P.T. and Zhang, M. 2009. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*, 16 (4): 743-762.
- Popoff, T. and Theander, O. 1976. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. *Acta Chemica Scandinavica*, 30: 397-402.
- Ranatunga, T., Jervis, J., Helm, R., Mcmillan, J. and Hatzis, C. 1997. Toxicity of hardwood extractives toward *Saccharomyces cerevisiae* glucose fermentation. *Biotechnology Letters*, 19 (11): 1125-1127.
- Ravindran, R. and Jaiswal, A.K. 2016. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 199: 92-102.
- Rawat, H.K., Soni, H., Kango, N. and Kumar, C.G. 2017. Continuous generation of fructose from *Taraxacum officinale* tap root extract and inulin by immobilized

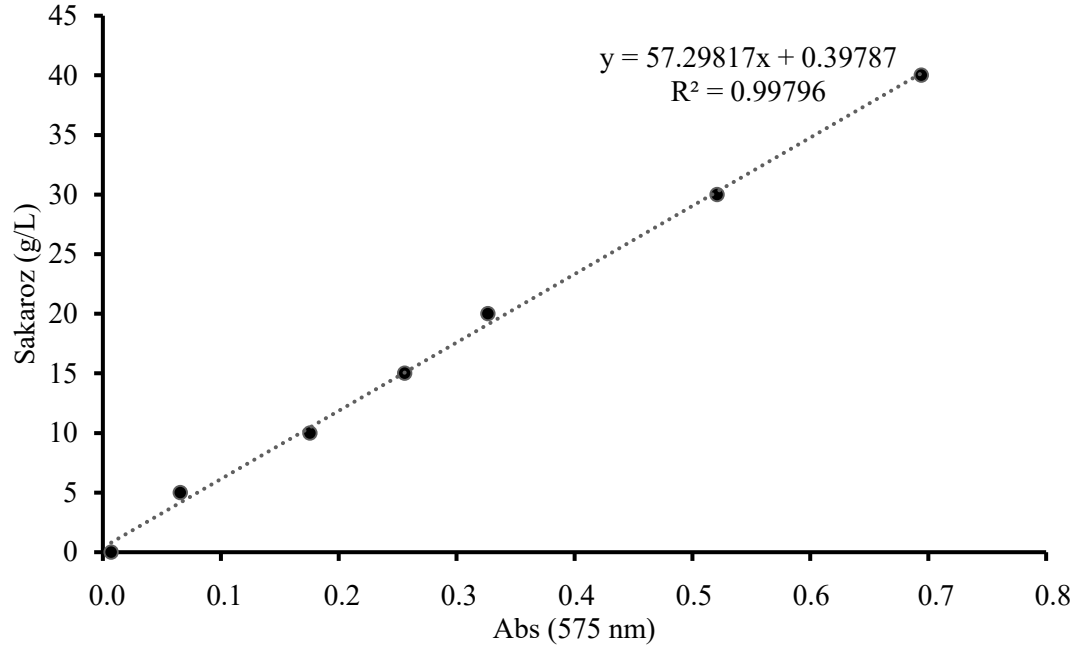
- inulinase in a packed-bed reactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9: 134-140.
- Saha, B.C., Kennedy, G.J., Bowman, M.J., Qureshi, N. and Dunn, R.O. 2019. Factors affecting production of Itaconic acid from mixed sugars by *Aspergillus terreus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187 (2): 449-460.
- Salazar, N., Dewulf, E.M., Neyrinck, A.M., Bindels, L.B., Cani, P.D., Mahillon, J., De Vos, W.M., Thissen, J.-P., Gueimonde, M. and Clara, G. 2015. Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clinical Nutrition*, 34 (3): 501-507.
- Saldamlı, İ. 1998. Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi. 489-495.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. and Van Dijck, P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4-5): 426-435.
- Sharma, A.D., Kainth, S. and Gill, P.K. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, 77 (3): 486-491.
- Shoaib, M., Shehzad, A., Omar, M., Rakha, A., Raza, H., Sharif, H.R., Shakeel, A., Ansari, A. and Niazi, S. 2016. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, 147: 444-454.
- Sindhu, R., Pandey, A. and Binod, P. 2017. Design and types of bioprocesses. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 29-43 s.
- Singh, R., Chauhan, K., Pandey, A. and Larroche, C. 2018a. Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. *Bioresource Technology*, 260: 395-403.
- Singh, R., Chauhan, K., Pandey, A. and Larroche, C. 2018b. Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. *Bioresource Technology*,
- Singh, R., Ps, P., Hk, S. and Bc, S. 2011. Enzymatic preparation of high fructose syrup from inulin. *Bioprocessing of Foods*: 77-98.
- Singh, R. and Singh, R. 2014. Response surface optimization of endoinulinase production from a cost effective substrate by *Bacillus safensis* AS-08 for hydrolysis of inulin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4): 365-372.

- Singh, R.S. and Chauhan, K. 2017. Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9: 1-10.
- Singh, R.S., Chauhan, K. and Kennedy, J.F. 2017. A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96: 312-322.
- Singh, R.S., Dhaliwal, R. and Puri, M. 2007. Production of high fructose syrup from Asparagus inulin using immobilized exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34 (10): 649-655.
- Singh, R.S. and Singh, R.P. 2010. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (4): 435.
- Stannard, C., Williams, A. and Gibbs, P. 1985. Temperature/growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 2 (2): 115-122.
- Ulbricht, R.J., Northup, S.J. and Thomas, J.A. 1984. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Toxicological Sciences*, 4 (5): 843-853.
- Vanaja, K. and Shobha Rani, R. 2007. Design of experiments: concept and applications of Plackett Burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24 (1): 1-23.
- Vandamme, E.J. and Derycke, D.G. 1983. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 139-176 s.
- Verma, P. and Prasad, M. 1975. The digestive physiology of *Gryllobates sigillatus* orthoptera gryllidae. *Indian Journal of Entomology*, 37: 19-23.
- Wang, D., Li, F.-L. and Wang, S.-A. 2016. A one-step bioprocess for production of high-content fructo-oligosaccharides from inulin by yeast. *Carbohydrate Polymers*, 151: 1220-1226.
- Weibull, W. 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 18 (3): 293-297.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. and Lee, Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96 (18): 1959-1966.

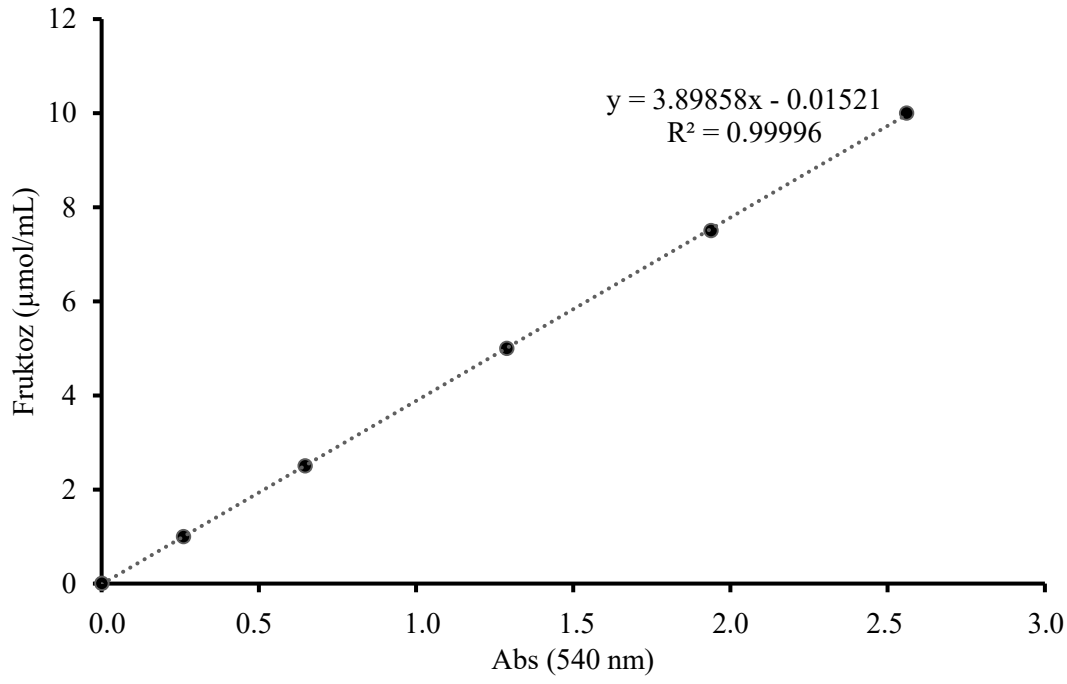
- Zhang, H., Zhang, J. and Bao, J. 2016a. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*, 203: 211-219.
- Zhang, K., Pei, Z. and Wang, D. 2016b. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. *Bioresource Technology*, 199: 21-33.
- Zou, X., Wu, G., Stagge, S., Chen, L., Jönsson, L.J. and Hong, F.F. 2017. Comparison of tolerance of four bacterial nanocellulose-producing strains to lignocellulose-derived inhibitors. *Microbial Cell Factories*, 16 (1): 229.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. and Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (6): 1875-1881.

7. EKLER

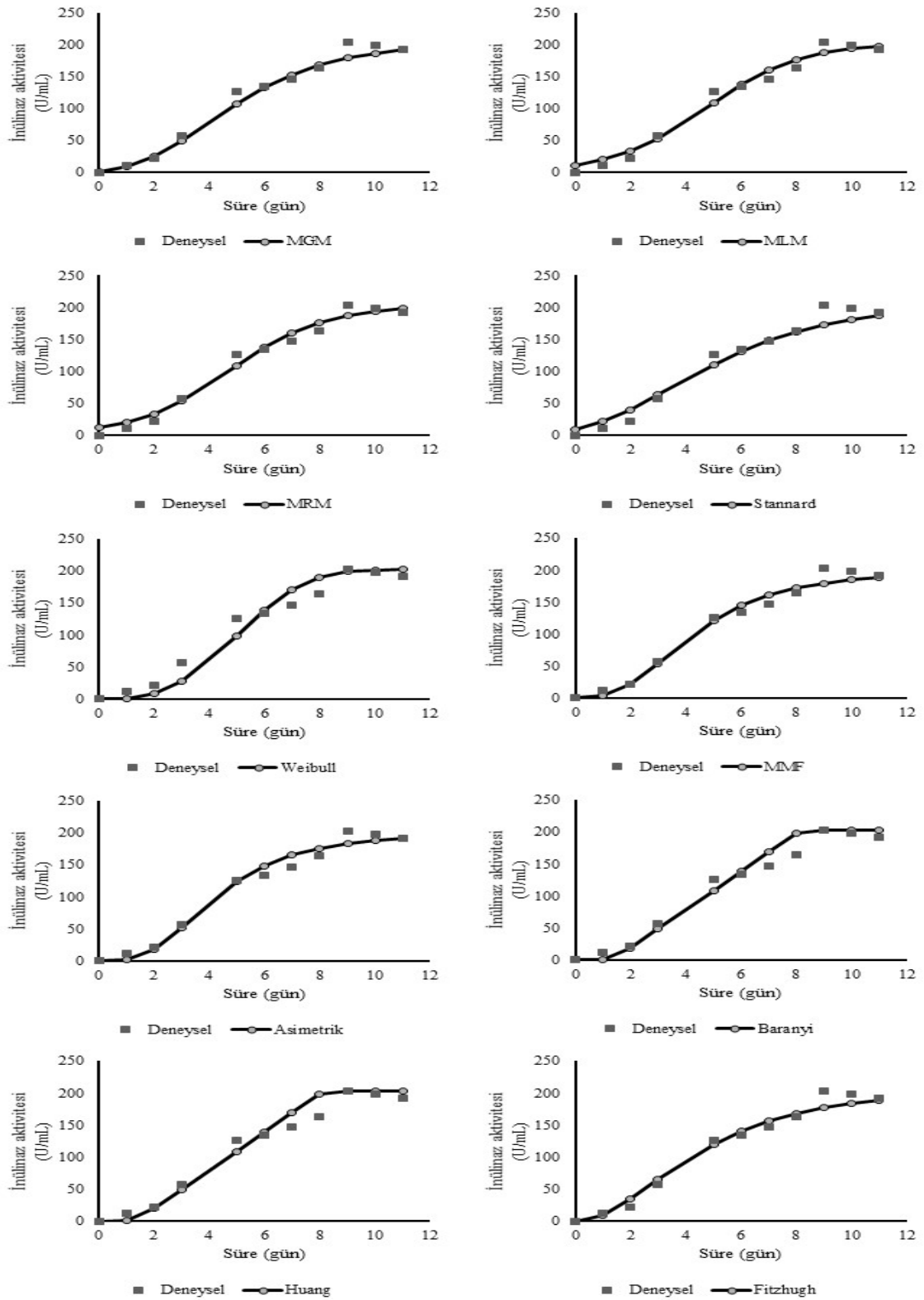
EK-1. Şeker analizinde kullanılan standart sakaroz kurvesi



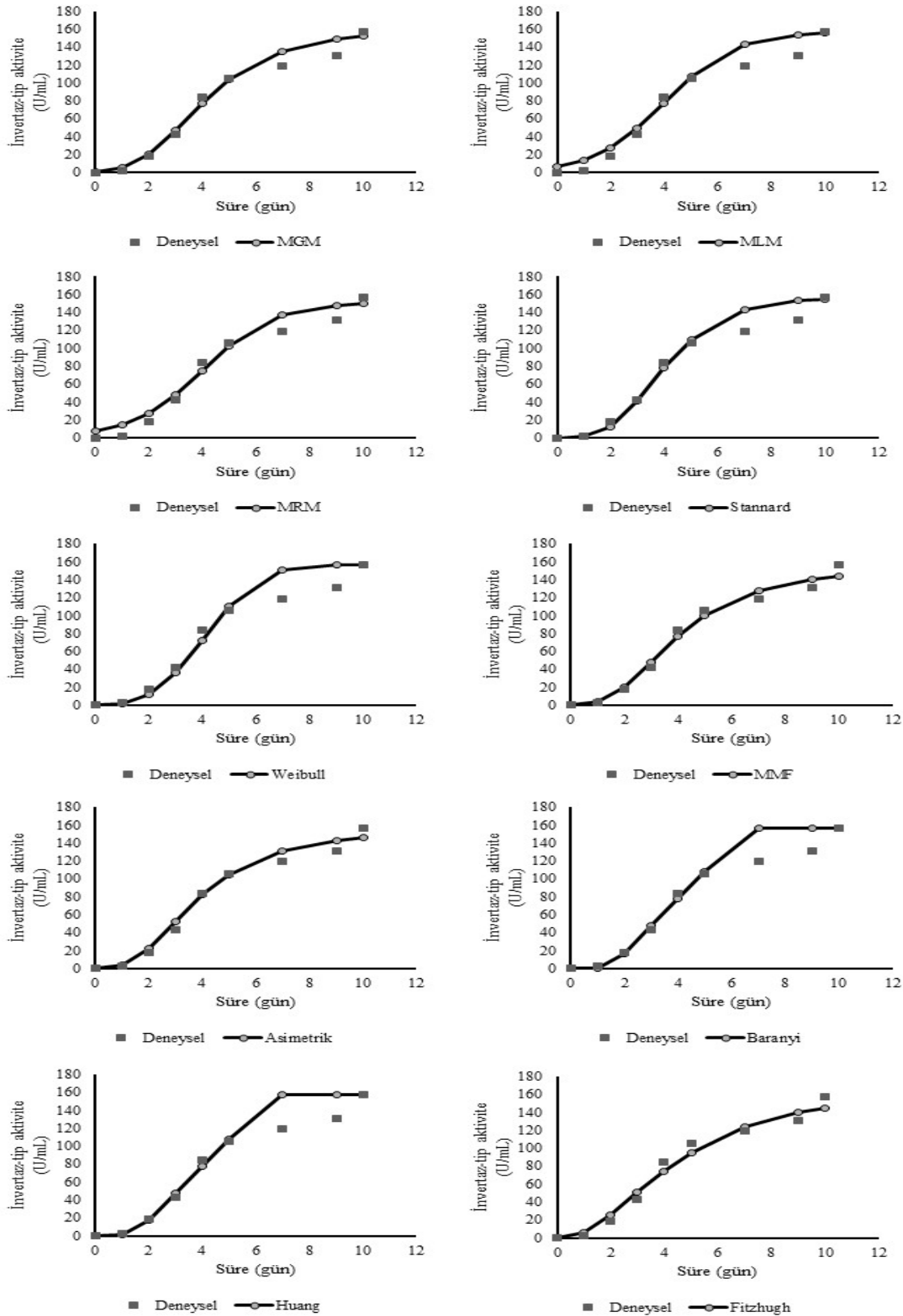
EK-2. Enzim analizinde kullanılan standart fruktoz kurvesi



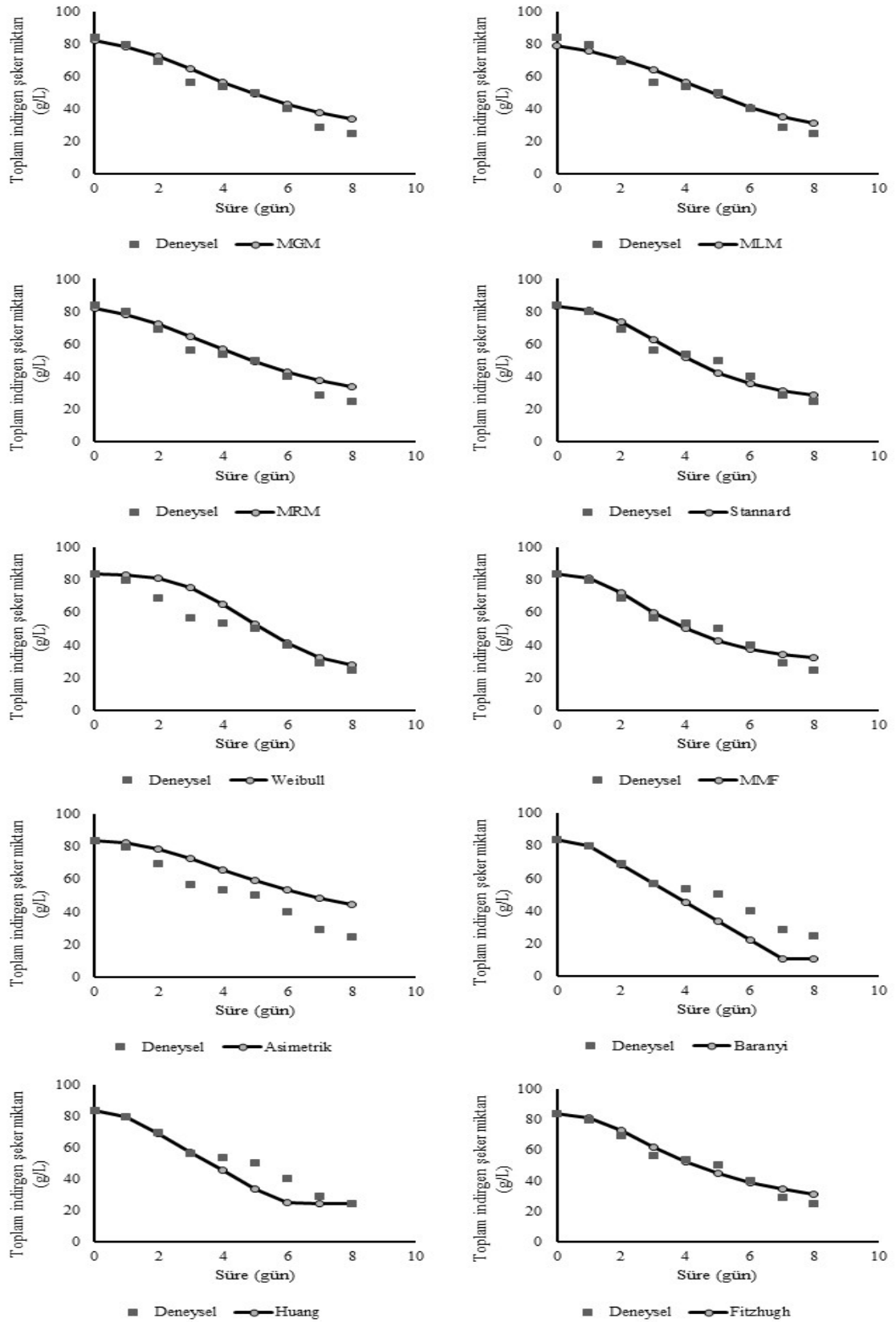
EK-3. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel inülinaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan inülinaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-4. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel invertaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan invertaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-5. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin model verileri ile karşılaştırılması



EK-6. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	202.95	1	11.30
Q (U/mL/gün)	29.99	2	22.00
λ (gün)	1.37	3	56.82
v_1	0.999	5	126.45
v_2	91	6	134.05
v_3	2.36	7	146.57
v_4	2	8	163.80
β	306	9	202.95
h_0 (U/mL)	41.03	10	198.81
d	3.01	11	191.9896
T_L	4.28		
k_1	0.175		
k_2	0.231		
k_3	0.322		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.79		
e	2.718		
a	4		

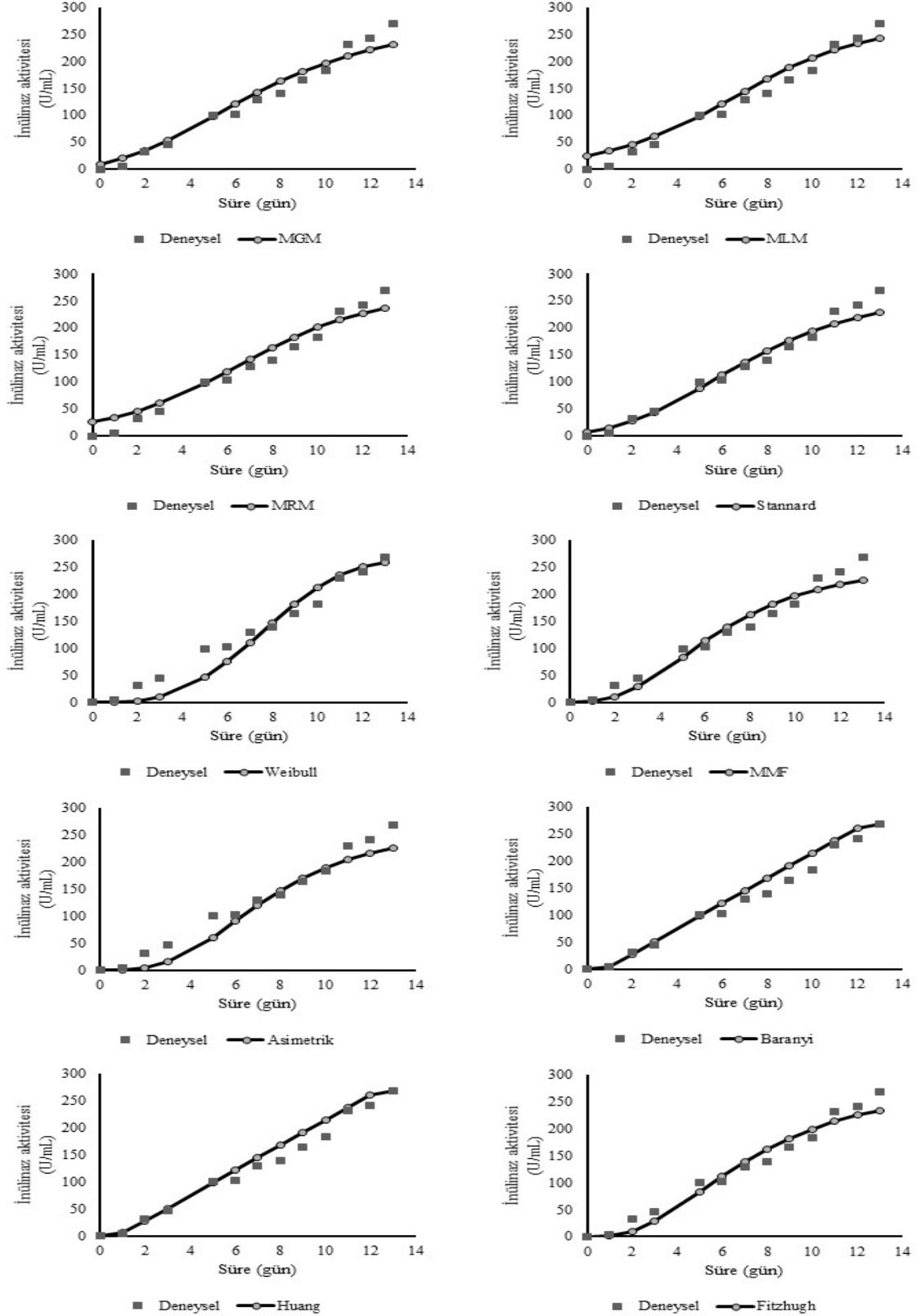
EK-7. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Sase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	156.90	1	2.24
Q (U/mL/gün)	30.37	2	18.13
λ (gün)	1.44	3	42.59
v_1	0.966	4	84.06
v_2	46	5	105.55
v_3	2.63	7	118.90
v_4	2	9	130.83
β	71	10	156.90
h_0 (U/mL)	43.72		
d	2.7		
T_L	3.86		
k_1	0.213		
k_2	0.247		
k_3	0.35		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.7		
e	2.718		
a	4		

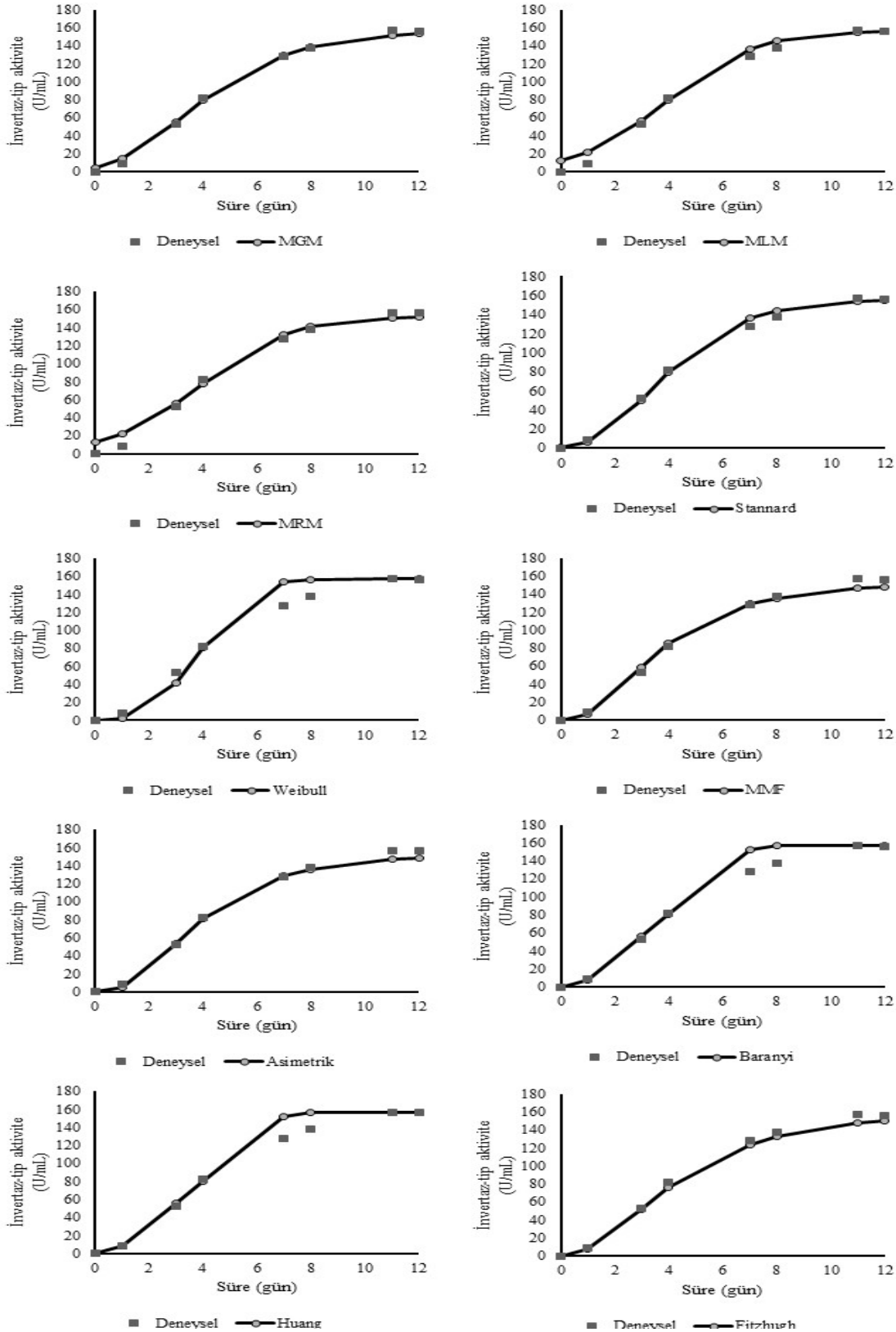
EK-8. Kontrol fermentasyonuna ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel toplam indirgen şeker miktarı verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	Toplam indirgen şeker miktarı (g/L)
A_0 (g/L)	24.62	0	83.75
A_m (g/L)	83.75	1	79.79
Q (g/L/gün)	11.60	2	69.26
λ (gün)	0.69	3	56.59
v_1	0.01	4	53.62
v_2	21.4	5	50.08
v_3	2.7	6	40.25
v_4	2	7	28.80
β	29.3	8	24.62
h_0 (g/L)	8.01		
d	2.19		
T_L	5.83		
k_1	0.18		
k_2	0.281		
k_3	0.39		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.4		
e	2.718		
a	4		

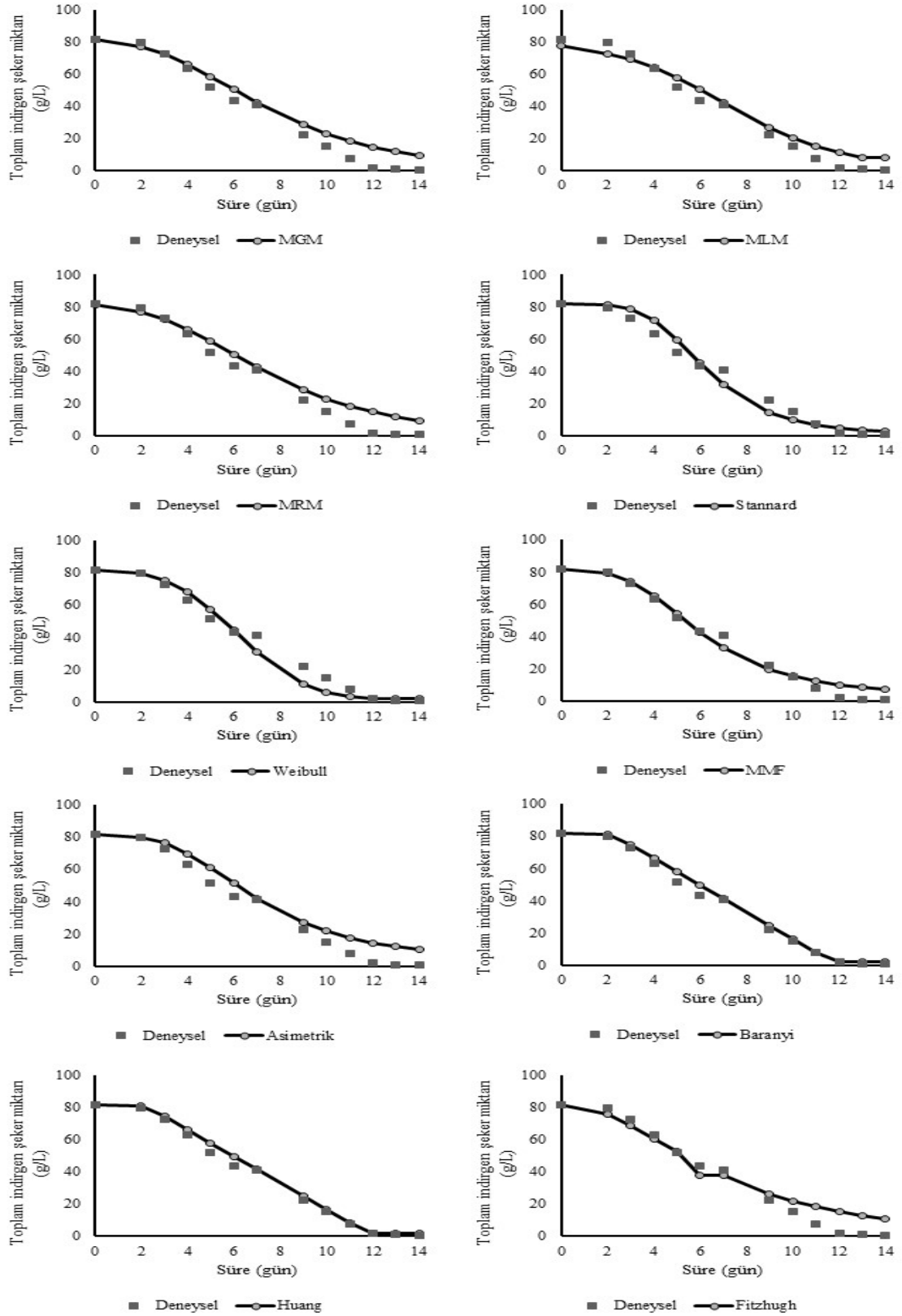
EK-9. 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel inülinaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan inülinaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-10. 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel invertaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan invertaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-11. 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişimi verileri ile model verilerinin karşılaştırılması



EK-12. 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	268.74	1	4.63
Q (U/mL/gün)	23.31	2	31.77
λ (gün)	0.80	3	45.68
v_1	0.98	5	99.77
v_2	96	6	102.62
v_3	3.36	7	129.28
v_4	2	8	139.36
β	311	9	164.90
h_0 (U/mL)	18.64	10	182.97
d	3.05	11	230.4853
T_L	7.50	12	241.6929
k_1	0.116	13	268.7374
k_2	0.15		
k_3	0.25		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.59		
e	2.718		
a	4		

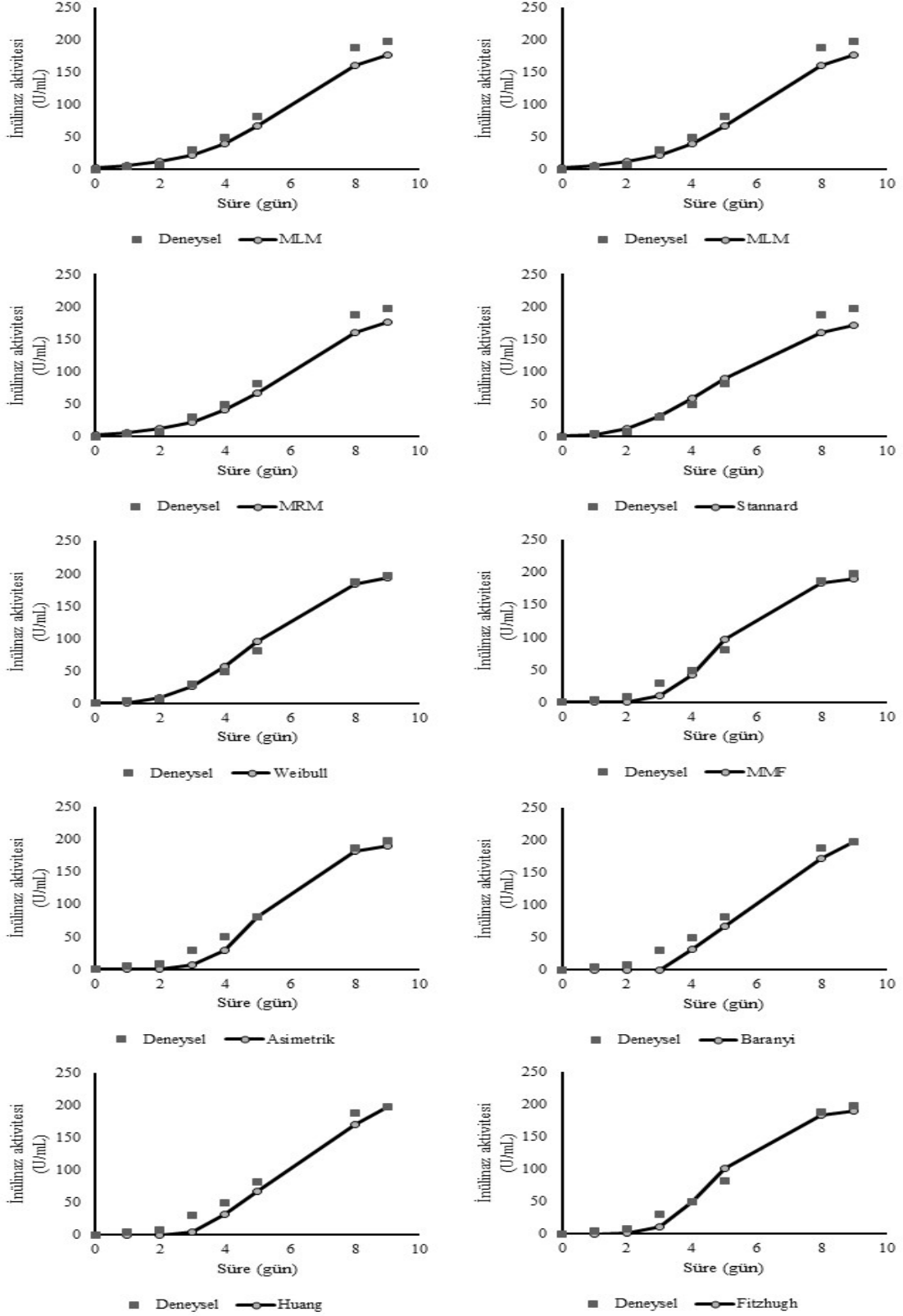
EK-13. 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellenmesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Sase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	156.86	1	8.43
Q (U/mL/gün)	24.20	3	52.77
λ (gün)	0.69	4	82.06
v_1	0.977	7	127.74
v_2	46	8	137.61
v_3	2.46	11	156.86
v_4	2	12	156.17
β	97		
h_0 (U/mL)	16.79		
d	2.6		
T_L	3.88		
k_1	0.225		
k_2	0.27		
k_3	0.34		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.4		
e	2.718		
a	4		

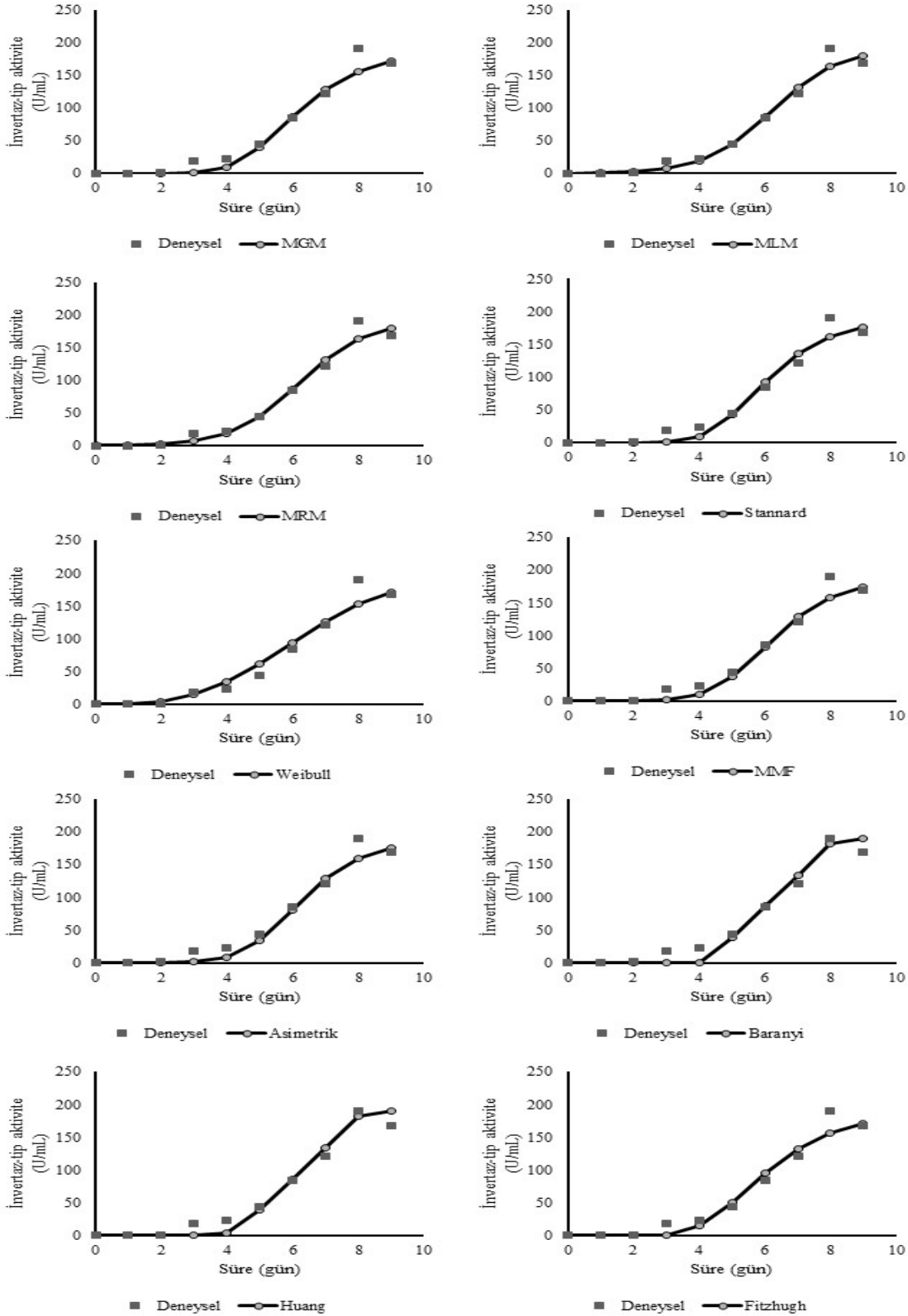
EK-14. 1.0 g/L HMF'nin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel toplam indirgen şeker miktarı verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	Toplam indirgen Şeker miktarı (g/L)
A_0 (g/L)	1.90	0	81.73
A_m (g/L))	81.73	2	79.66
Q (g/L/gün)	8.32	3	72.75
λ (gün)	2.16	4	63.20
v_1	0.01	5	51.82
v_2	16.5	6	43.53
v_3	2.5	7	41.02
v_4	2	9	22.34
β	-0.001	10	15.20
h_0 (g/L)	17.97	11	7.73
d	3.1	12	1.901973
T_L	7.02	13	0.942231
k_1	0.143	14	0.784662
k_2	0.164		
k_3	0.221		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.2		
e	2.718		
a	4		

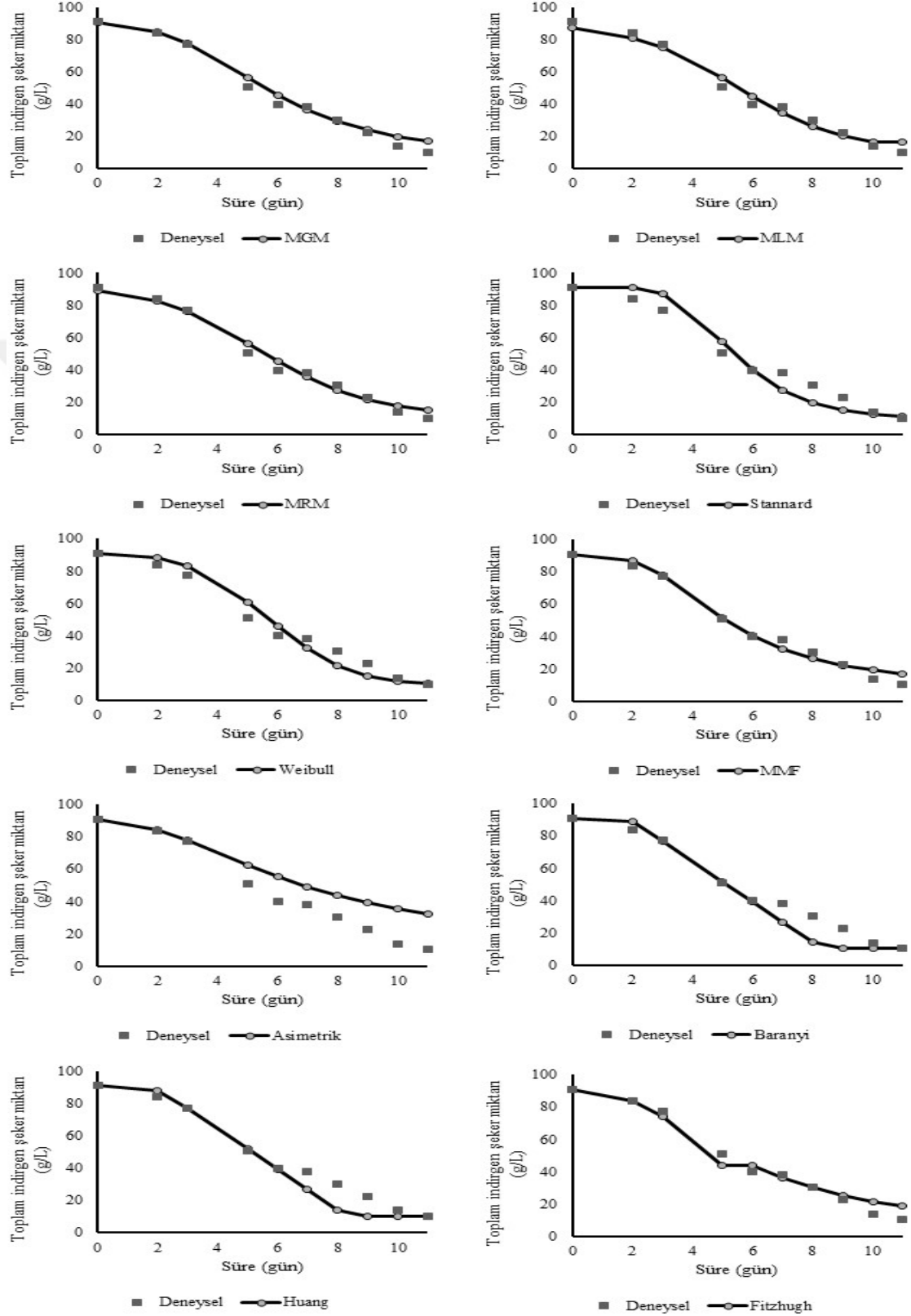
EK-15. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel inülinaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan inülinaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-16. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel invertaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan invertaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-17. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişimi verileri ile model verilerinin karşılaştırılması



EK-18. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	197.35	1	4.41
Q (U/mL/gün)	34.71	2	7.75
λ (gün)	3.08	3	29.82
v_1	0.999	4	49.34
v_2	80	5	80.84
v_3	22	8	187.26
v_4	2	9	197.35
β	196		
h_0 (U/mL)	106.99		
d	6		
T_L	5.34		
k_1	0.174		
k_2	0.199		
k_3	0.7		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	5.6		
e	2.718		
a	4		

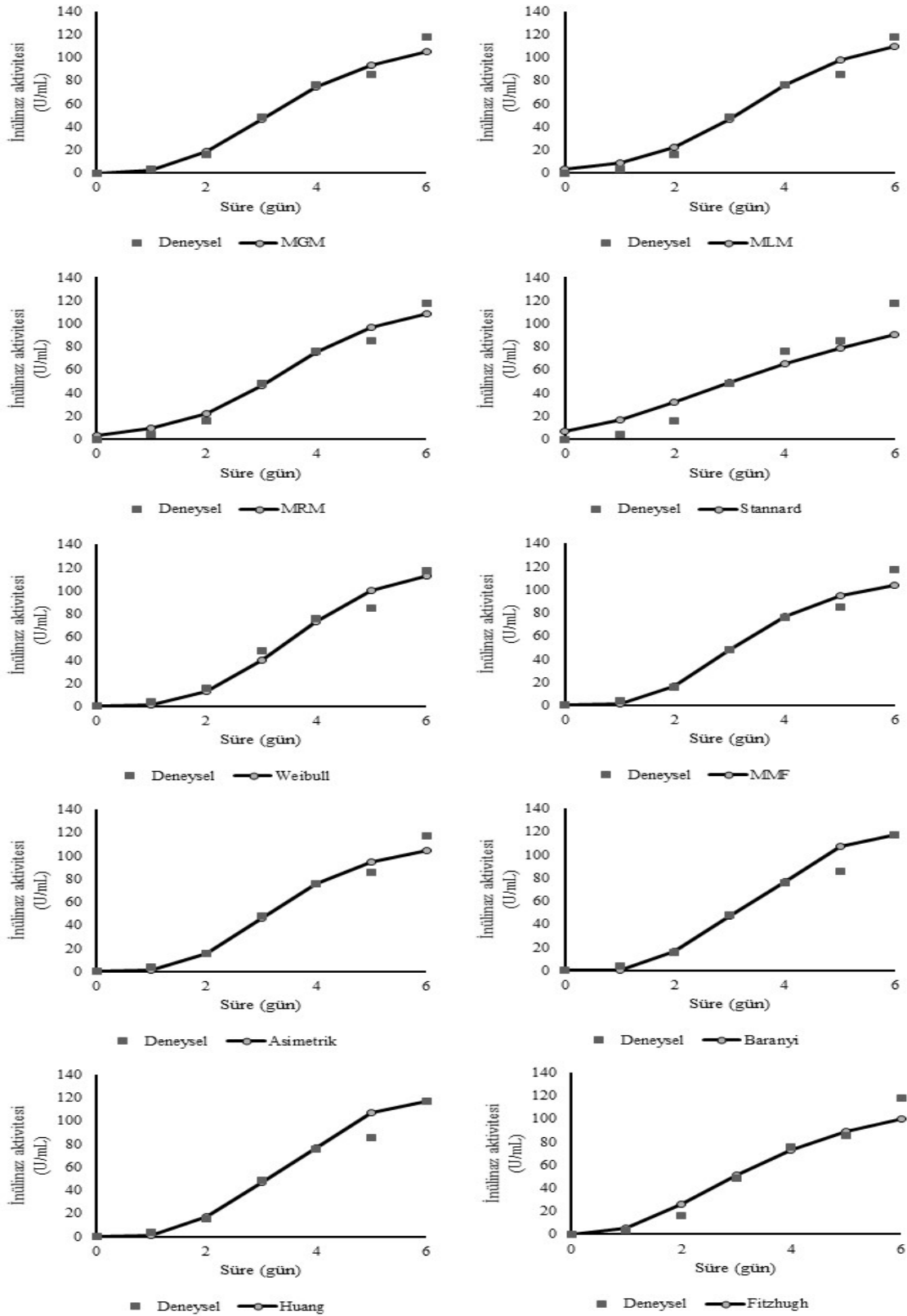
EK-19. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Sase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	190.55	1	0.00
Q (U/mL/gün)	47.57	2	1.34
λ (gün)	4.18	3	18.86
v_1	0.9999	4	22.71
v_2	64	5	44.10
v_3	30	6	85.08
v_4	2	7	121.43
β	1.9	8	190.55
h_0 (U/mL)	198.95	9	168.60
d	6.7		
T_L	6.28		
k_1	0.147		
k_2	0.16		
k_3	0.63		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	6.4		
e	2.718		
a	4		

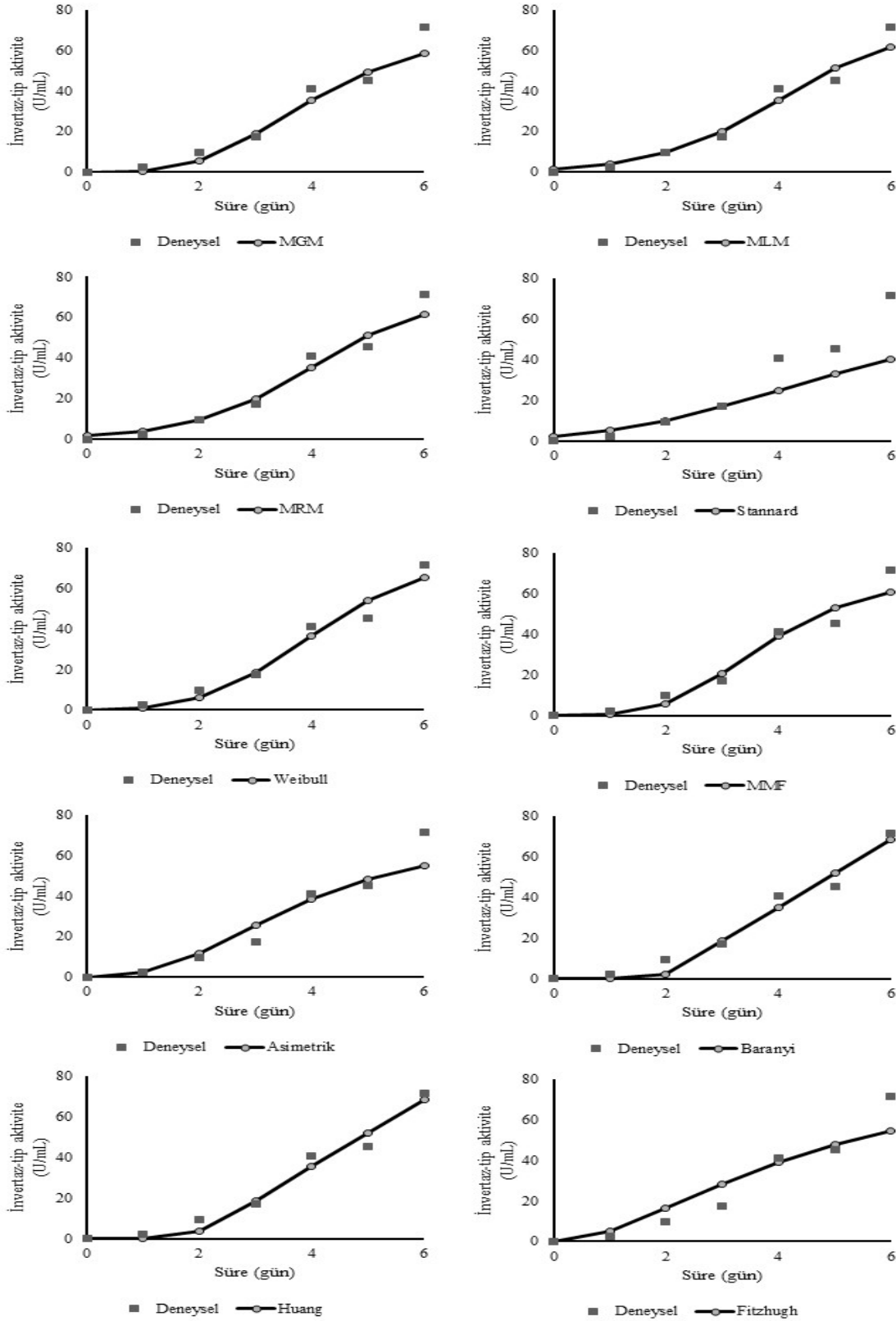
EK-20. 0.1 g/L furfuralın inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel toplam indirgen şeker miktarı verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	Toplam indirgen Şeker tüketimi (g/L)
A_0 (g/L)	10.22	0	90.98
A_m (g/L)	90.98	2	83.99
Q (g/L/gün)	12.56	3	77.17
λ (gün)	1.88	5	50.81
v_1	0.5	6	39.81
v_2	19	7	38.10
v_3	3	8	30.29
v_4	2	9	22.63
β	-5	10	13.88
h_0 (g/L)	23.55	11	10.22
d	2		
T_L	6.73		
k_1	0.156		
k_2	0.196		
k_3	0.3		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.1		
e	2.718		
a	4		

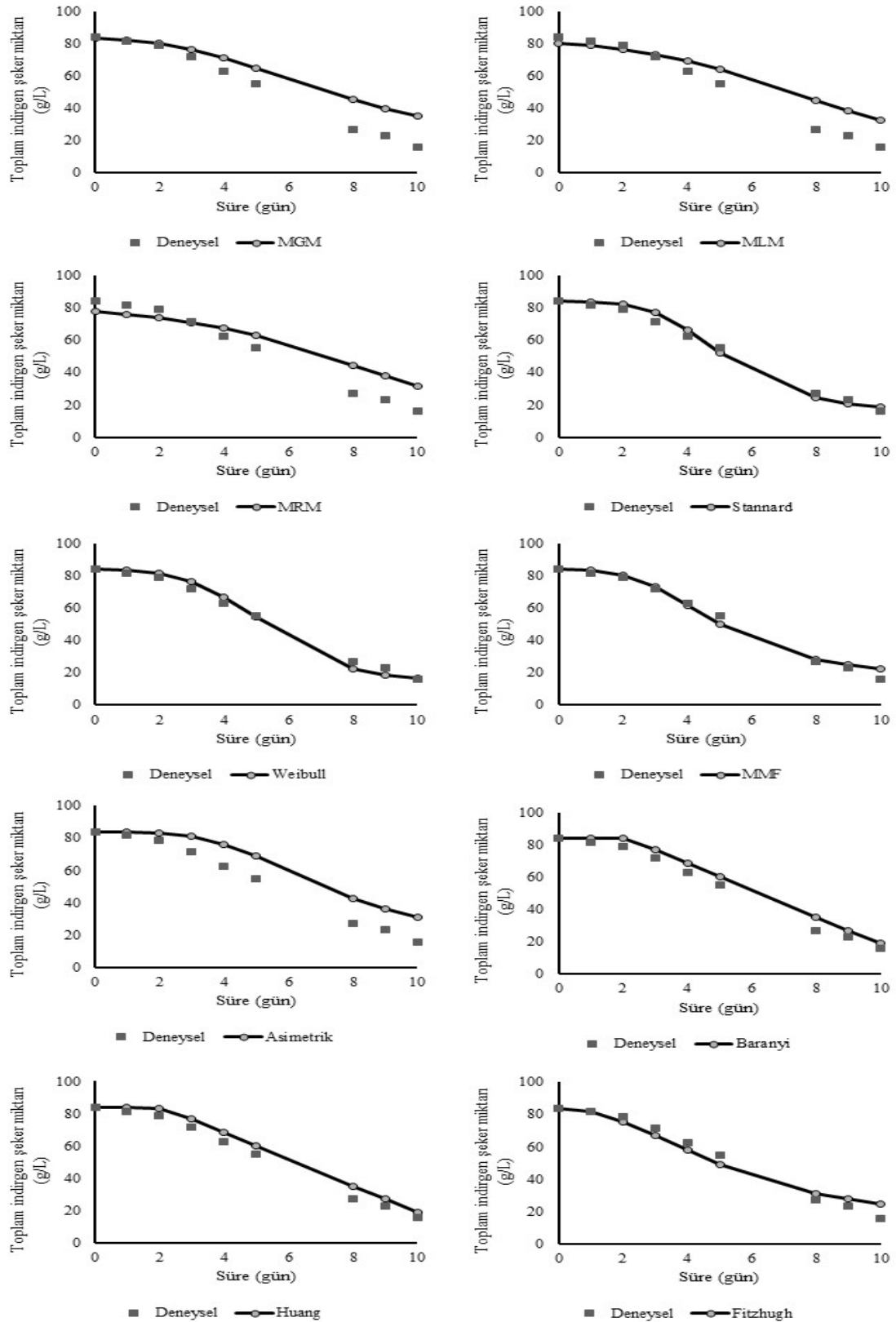
EK-21. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel inülinaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan inülinaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-22. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel invertaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan invertaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-23. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişimi verileri ile model verilerinin karşılaştırılması



EK-24. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	117.39	1	3.80
Q (U/mL/gün)	30.10	2	15.69
λ (gün)	1.45	3	48.22
v_1	0.99	4	75.89
v_2	75	5	85.27
v_3	3.4	6	117.39
v_4	2		
β	243		
h_0 (U/mL)	43.71		
d	3.6		
T_L	3.38		
k_1	0.248		
k_2	0.3		
k_3	0.51		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.5		
e	2.718		
a	4		

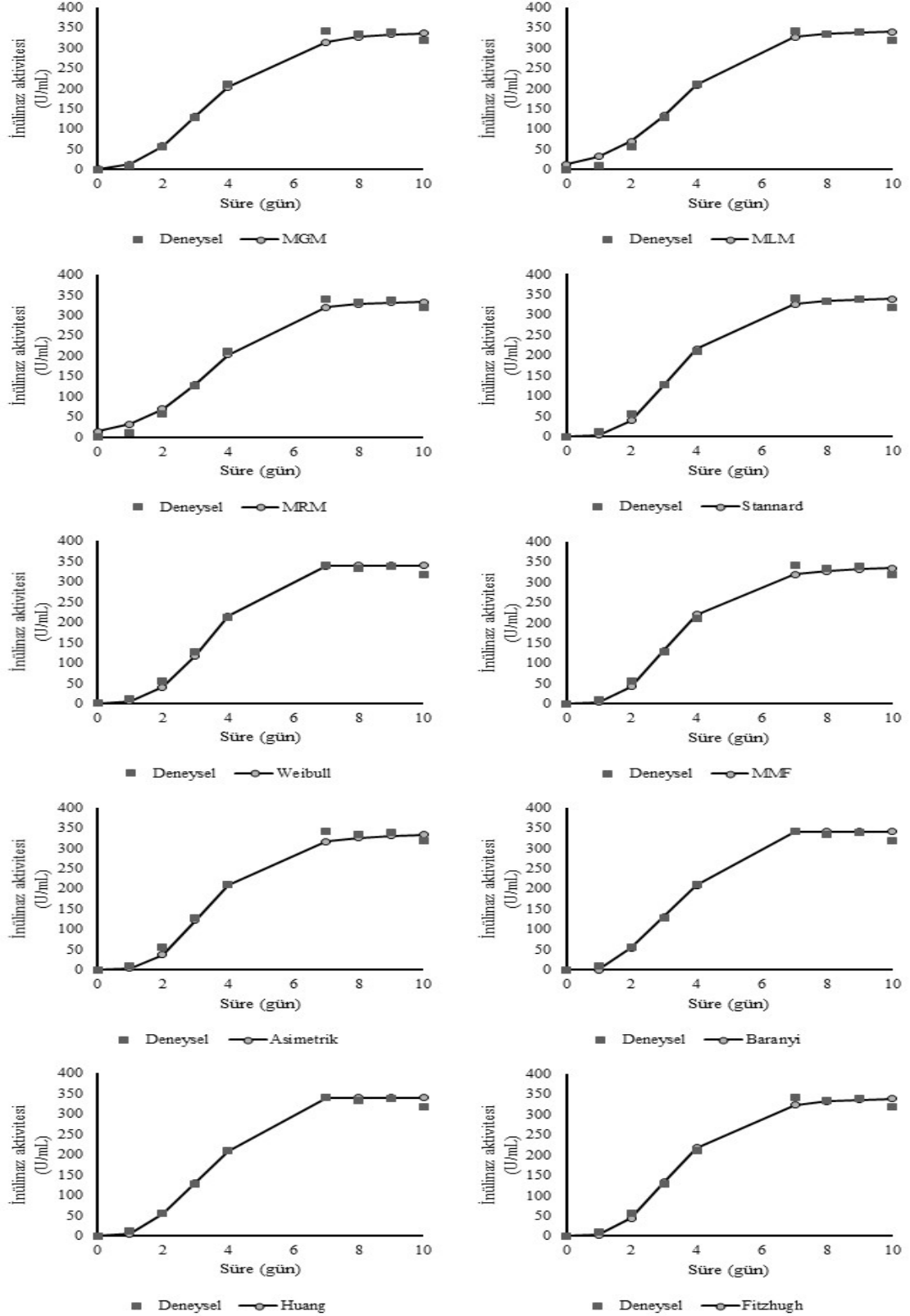
EK-25. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Sase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	71.48	1	2.34
Q (U/mL/gün)	16.71	2	9.60
λ (gün)	1.88	3	17.23
v_1	0.999	4	41.03
v_2	54	5	45.34
v_3	2.22	6	71.48
v_4	2		
β	145		
h_0 (U/mL)	31.42		
d	2.6		
T_L	3.78		
k_1	0.224		
k_2	0.263		
k_3	0.36		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.8		
e	2.718		
a	4		

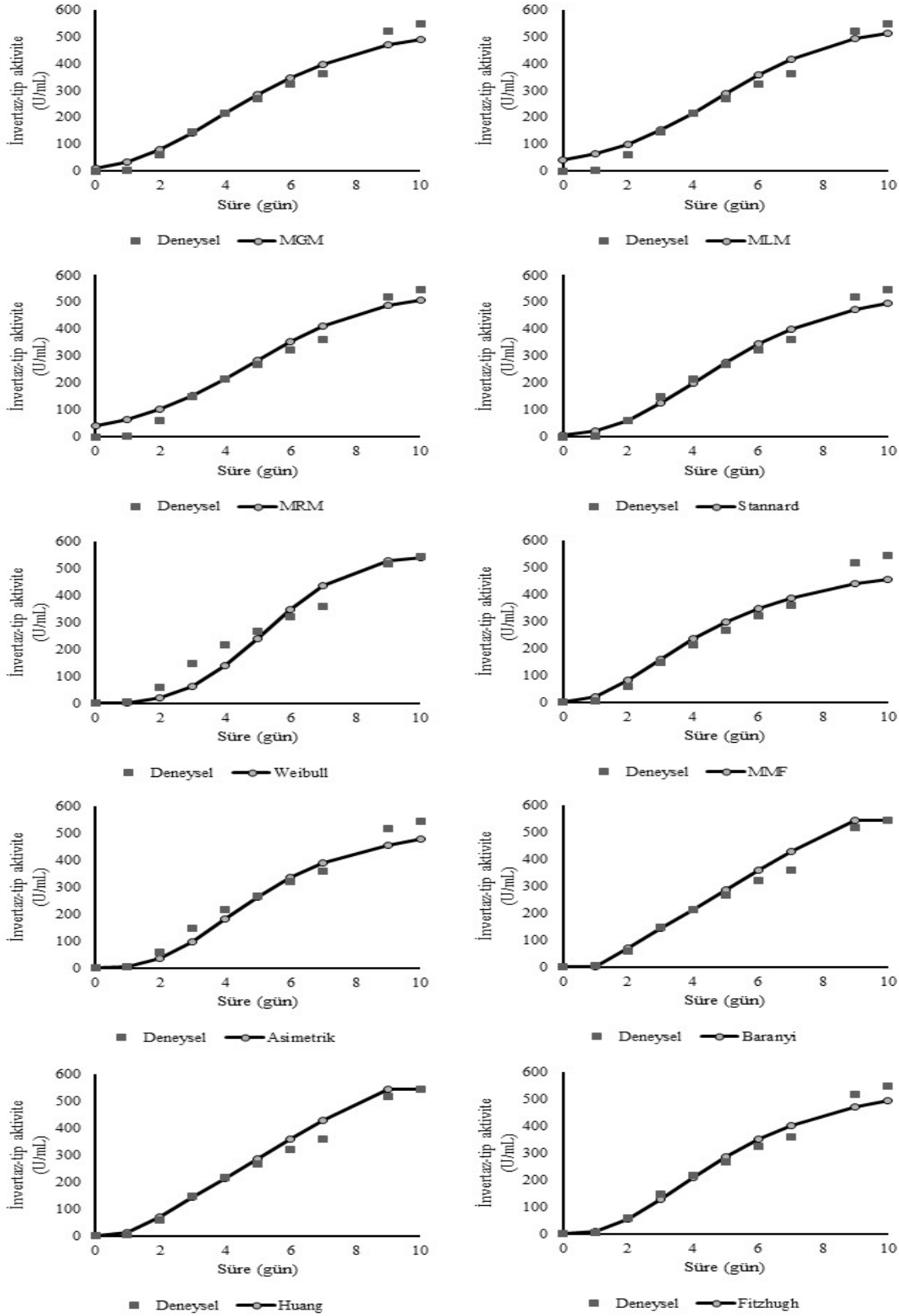
EK-26. 0.1 g/L fenolün inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel toplam indirgen şeker miktarı verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	Toplam indirgen Şeker tüketimi (g/L)
A_0 (g/L)	15.86	0	83.99
A_m (g/L)	83.99	1	81.64
Q (g/L/gün)	8.32	2	78.83
λ (gün)	2.16	3	71.67
v_1	2	4	62.67
v_2	14.3	5	55.11
v_3	2.6	8	27.03
v_4	2	9	23.14
β	-0.0001	10	15.86
h_0 (g/L)	17.97		
d	3.6		
T_L	7.08		
k_1	0.165		
k_2	0.2		
k_3	0.295		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.2		
e	2.718		
a	4		

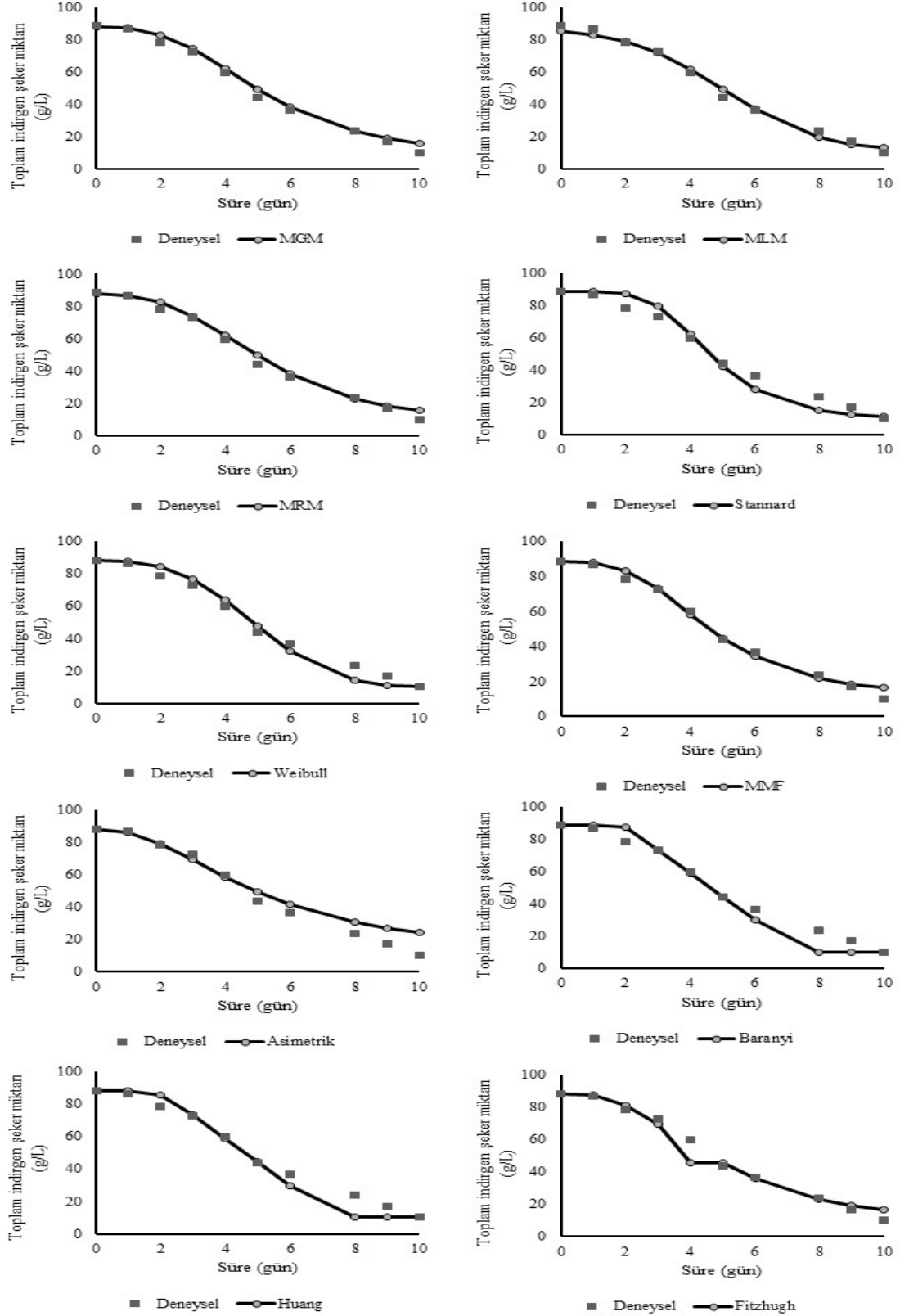
EK-27. 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel inülinaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan inülinaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-28. 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel invertaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan invertaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-29. 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişimi verileri ile model verilerinin karşılaştırılması



EK-30. 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellenmesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	340.32	1	10.70
Q (U/mL/gün)	77.44	2	55.75
λ (gün)	1.31	3	126.99
v_1	0.98	4	210.63
v_2	99	7	340.32
v_3	7.18	8	332.86
v_4	2	9	337.93
β	223	10	317.95
h_0 (U/mL)	101.21		
d	3.71		
T_L	3.52		
k_1	0.25		
k_2	0.294		
k_3	0.7		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.7		
e	2.718		
a	4		

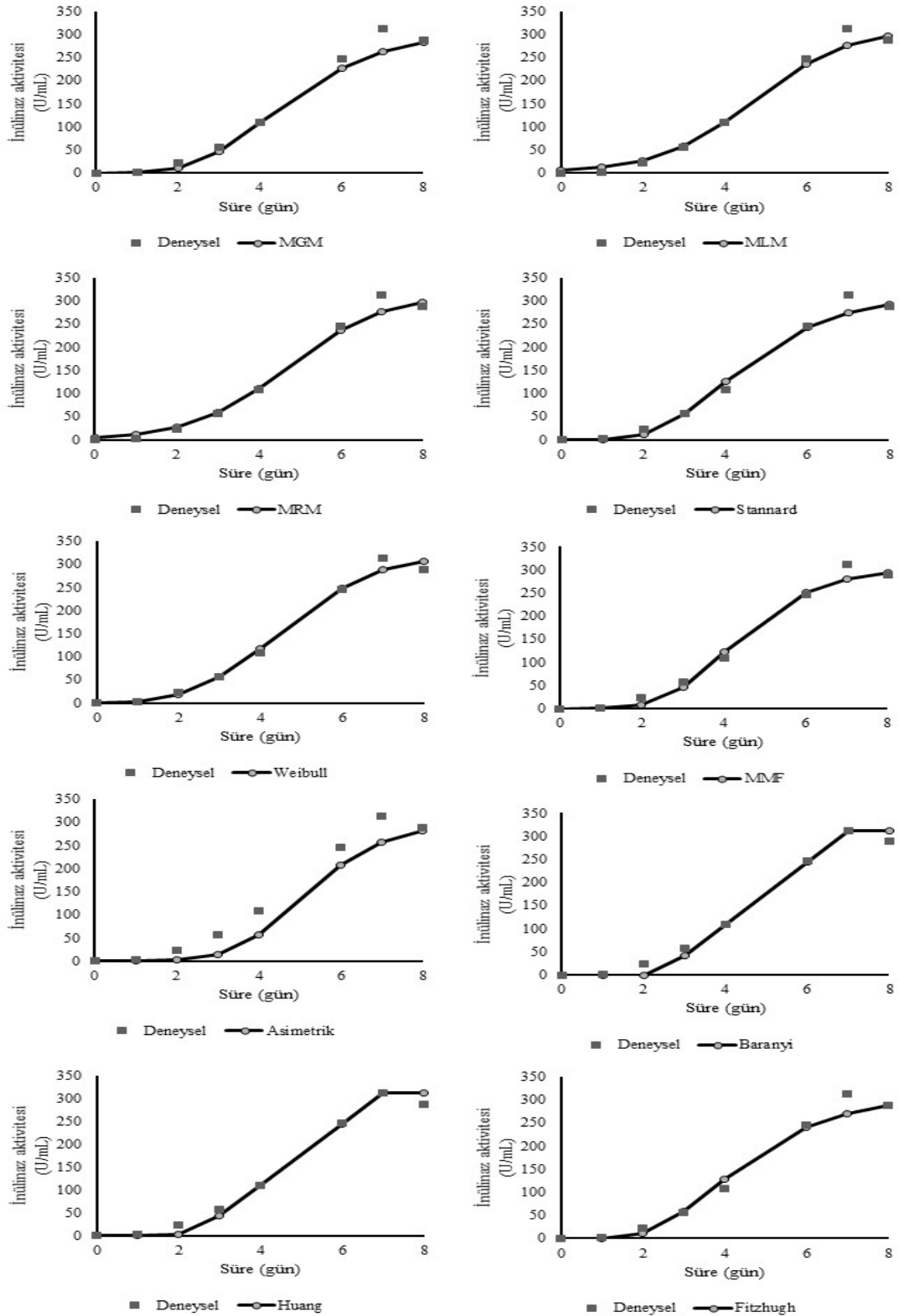
EK-31. 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellenmesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Sase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	546.25	1	3.85
Q (U/mL/gün)	72.27	2	58.86
λ (gün)	1.03	3	146.97
v_1	0.9898	4	215.38
v_2	185	5	267.37
v_3	3.4	6	322.34
v_4	2	7	360.40
β	676	9	518.72
h_0 (U/mL)	74.41	10	546.25
d	2.9		
T_L	5.10		
k_1	0.167		
k_2	0.219		
k_3	0.35		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.1		
e	2.718		
a	4		

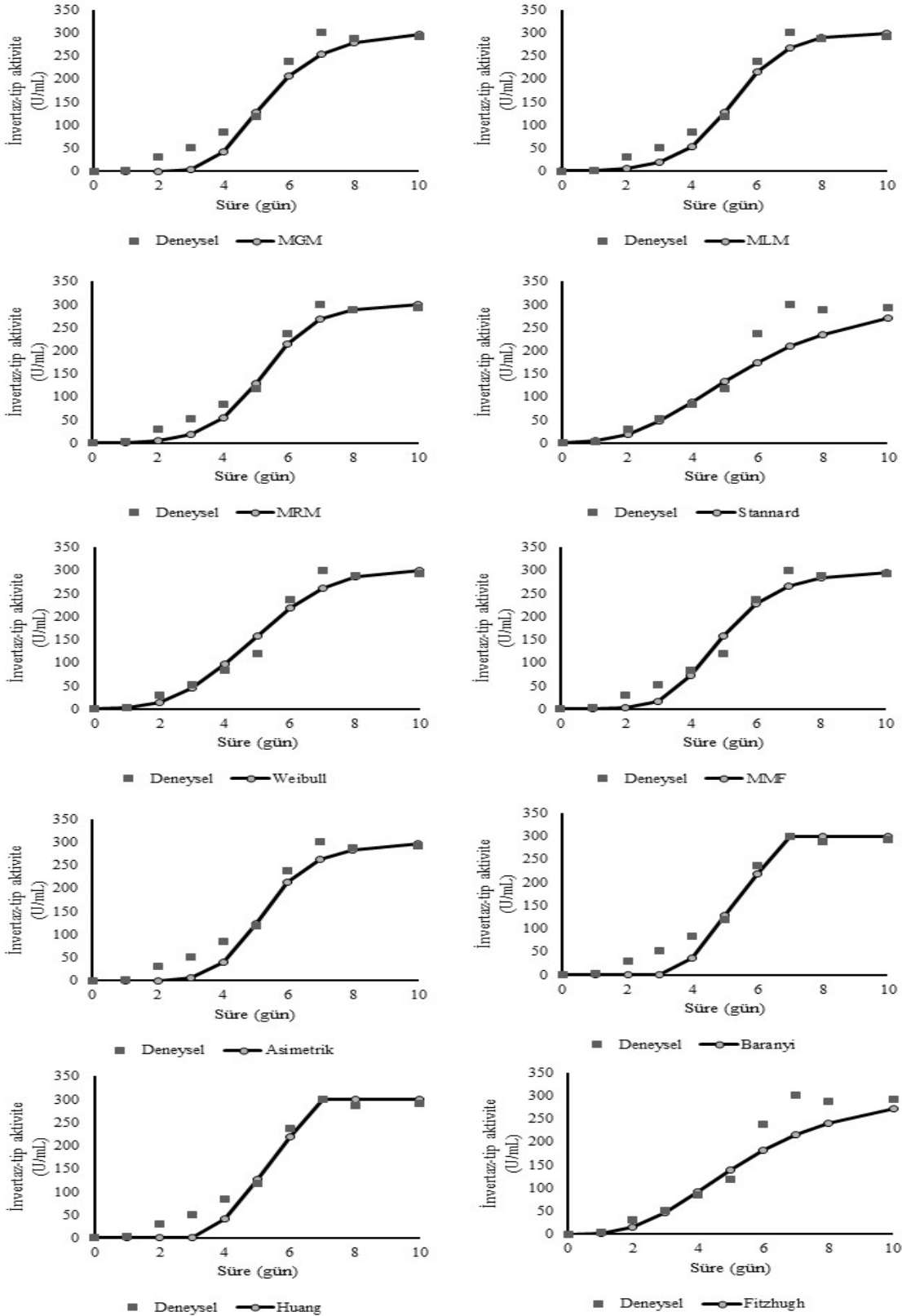
EK-32. 2.5 g/L asetik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel toplam indirgen şeker miktarı verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	Toplam indirgen Şeker miktarı (g/L)
A_0 (g/L)	10.22	0	88.23
A_m (g/L)	88.23	1	86.45
Q (g/L/gün)	14.44	2	78.31
λ (gün)	1.96	3	72.76
v_1	0.099	4	59.75
v_2	20	5	43.88
v_3	3.7	6	36.60
v_4	2	8	23.57
β	-0.001	9	16.94
h_0 (g/L)	28.32	10	10.22
d	2.2		
T_L	4.99		
k_1	0.18		
k_2	0.215		
k_3	0.38		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	3.2		
e	2.718		
a	4		

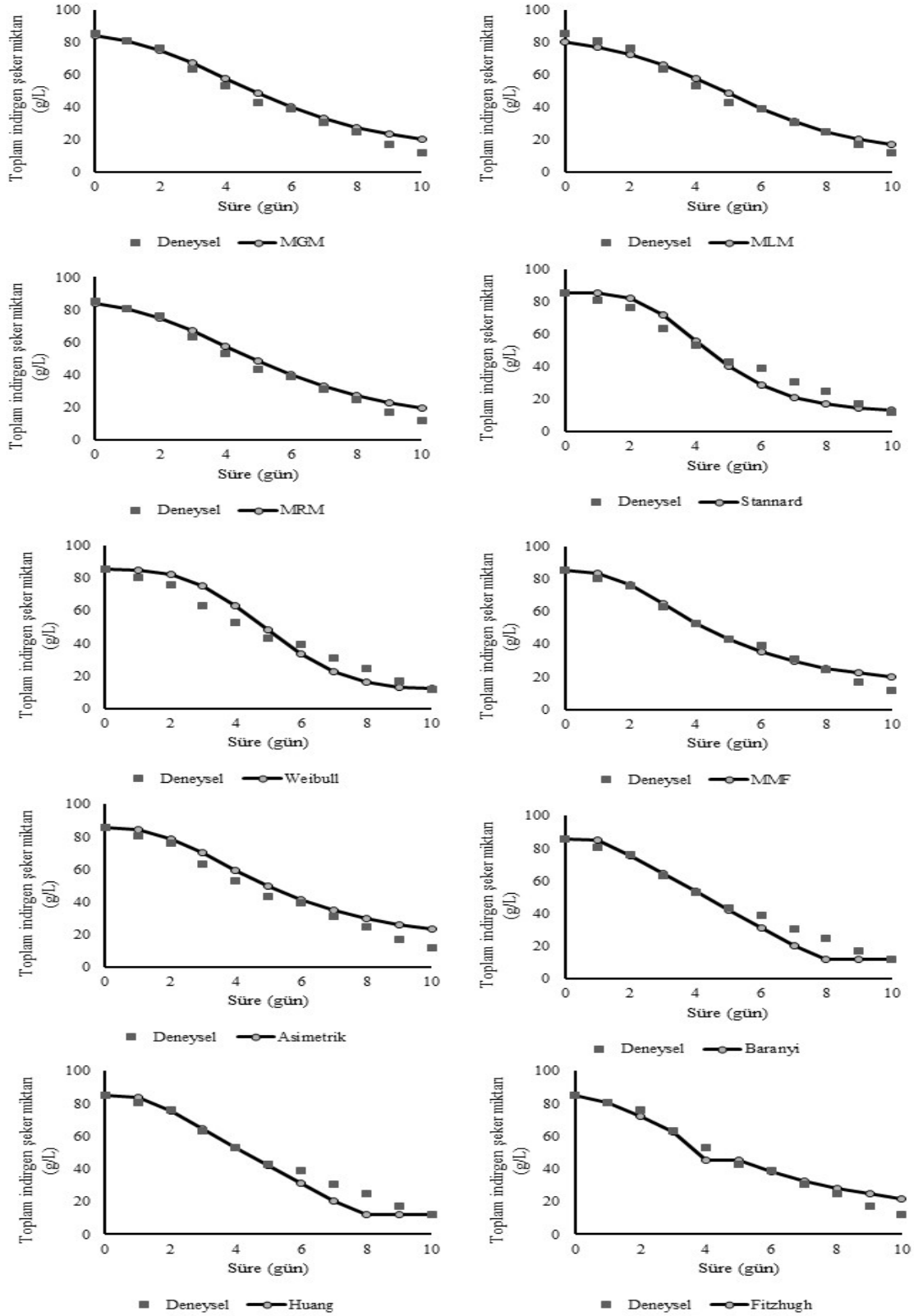
EK-33. 7.0 g/L formik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel inülinaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan inülinaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-34. 7.0 g/L formik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel invertaz aktivitesinin modeller ile hesaplanan invertaz aktivitesi verileri ile karşılaştırılması



EK-35. 7.0 g/L formik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonda deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişimi verileri ile model verilerinin karşılaştırılması



EK-36. 7.0 g/L formik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Iase* aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Iase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Iase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	312.69	1	1.66
Q (U/mL/gün)	68.10	2	22.95
λ (gün)	2.40	3	56.52
v_1	0.999999	4	108.66
v_2	106	6	245.98
v_3	9	7	312.69
v_4	2	8	288.23
β	231		
h_0 (U/mL)	163.46		
d	5.39		
T_L	5.30		
k_1	0.194		
k_2	0.227		
k_3	0.59		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	4.6		
e	2.718		
a	4		

EK-37. 7.0 g/L formik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyonun deneysel *Sase* aktivite değerlerinin matematiksel modellenmesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel *Sase* aktivite verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	<i>Sase</i> (U/mL)
A_0 (U/mL)	0.00	0	0.00
A_m (U/mL)	300.19	1	2.68
Q (U/mL/gün)	90.82	2	30.21
λ (gün)	3.59	3	51.65
v_1	0.9999	4	84.18
v_2	224	5	118.56
v_3	5	6	237.02
v_4	2	7	300.19
β	804	8	287.74
h_0 (U/mL)	326.32	10	292.37
d	6.8		
T_L	5.27		
k_1	0.182		
k_2	0.204		
k_3	0.39		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	5.7		
e	2.718		
a	4		

EK-38. 7.0 g/L formik asitin inhibitör olarak besiyeri ortamına eklenmesiyle gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel toplam indirgen şeker miktarı değişiminin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri ve deneysel toplam indirgen şeker miktarı verileri

Parametre	Değer	Süre (gün)	Toplam indirgen Şeker miktarı (g/L)
A_0 (U/mL)	11.86	0	85.48
A_m (U/mL)	85.48	1	80.72
Q (g/L/gün)	10.94	2	76.19
λ (gün)	1.07	3	63.19
v_1	0.098	4	52.99
v_2	17	5	43.13
v_3	1.9	6	39.22
v_4	2	7	30.95
β	5.5	8	24.66
h_0 (g/L)	11.68	9	17.09
d	2.5	10	11.86
T_L	5.10		
k_1	0.178		
k_2	0.227		
k_3	0.26		
k_4	1		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.5		
e	2.718		
a	4		

ÖZGEÇMİŞ

HİLAL NUR GÜRLER
hilalnurgurler@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2013-2017	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1-Germec M., **Gürler HN.**, Ozcan A., Erkan SB., Karahalil E., Turhan I. Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, pp.1-16, 2019.

2- Erkan SB., **Gürler HN.**, Bilgin DG., Germec M., Turhan I. Production and characterization of tempehs from different sources of legume by *Rhizopus oligosporus*, *LWT-Food Science and Technology*, Available online 25 November 2019.

Uluslararası kongrelerin bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1- **Gürler HN.**, Germec M., Turhan I. The effect of different phenol concentrations on inulinase production, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

2- **Gürler HN.**, Erkan SB., Ozcan A., Yilmazer C., Karahalil E., Germec M., Yatmaz E., Turhan I. A scale up processing with different microparticle agent for mannanase fermentation in bioreactor, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

3- **Gürler HN.**, Yilmazer C., Erkan SB., Ozcan A., Yatmaz E., Turhan I. Effect of mannanase enzyme treatment on yield, beta carotene content and turbidity in the carrot juice production, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

4- Erkan SB., Ozcan A., Yilmazer C., **Gürler HN.**, Karahalil E., Germec M., Yatmaz E., Turhan I. The effects of mannanase activity on viscosity in different gums, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

5- Yilmazer C., Erkan SB., Ozcan A., **Gürler HN.**, Yavuz G., Yatmaz E., Turhan I. Mannooligosaccharides production from different gums using mannanase, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

6- Erkan SB., Ozcan A., Yilmazer C., **Gürler HN.**, Yavuz G., Yatmaz E., Turhan I. Mannooligosaccharide production by mannanase enzyme application from coffee extract, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

7- **Gürler HN.**, Erkan SB., Bilgin DG., Germec M., Turhan I. Some chemical and physicochemical properties of the tempehs, *3rd International Congress on Food Technology*, Kapodokya, Turkey, October 10-12, 2018.

8- Erkan SB., **Gürler HN.**, Bilgin DG., Germec M., Turhan I. Sensory evaluation and texture profile analysis of tempehs, *3rd International Congress on Food Technology*, Kapodokya, Turkey, October 10-12, 2018.

9- Bilgin DG., Erkan SB., **Gürler HN.**, Germec M., Turhan I. Organic acid profiles of Tempeh produced alternative resources by fermentation, *3rd International Congress on Food Technology*, Kapodokya, Turkey, October 10-12, 2018.

PROJELER

1- Alternatif kaynaklardan fermentasyonla tempeh üretimi, TÜBİTAK-2209/A, Proje ortağı, Tamamlandı.

2- Mikrobiyal mannanaz üretimi için biyoreaktörde ölçek büyütme işlemleri, Üretilen enzimin saflaştırılması, gıda endüstrisinde uygulanabilirliği ve ekonomik analizi, TÜBİTAK, 115O051, Araştırmacı, Devam ediyor.

3- İnülinaz enziminin üretiminde inhibitör bileşiklerin fermentasyon üzerine etkisi, BAP-Yüksek Lisans, FYL-2019-4755, Araştırmacı, Devam ediyor.

4- Katı kültür fermentasyonunda *Aspergillus niger* ile inülinaz ve fruktooligosakkarit üretimi, BAP K. Araştırma, FKA- 2019-4686, Araştırmacı, Devam ediyor.