

**FARKLI XANTHOMONAS TÜRLERİNİN ATIK
EKMEKLERDEN KSANTAN GAM ÜRETİMİ
VE KALİTE ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Demet APAYDIN

Doktora Tezi

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ
2019**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**FARKLI XANTHOMONAS TÜRLERİNİN ATIK EKMEKLERDEN
KSANTAN GAM ÜRETİMİ VE KALİTE ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Demet APAYDIN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır.

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Demet APAYDIN

İMZA

Bu tez TÜBİTAK tarafından TOVAG-114O429 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ danışmanlığında, Demet APAYDIN tarafından hazırlanan “Farklı *Xanthomonas* Türlerinin Atık Ekmeklerden Ksantan Gam Üretimi ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 01.11.2019 tarihinde Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Muhammet ARICI

İmza:

Üye : Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

İmza:

Üye : Prof. Dr. Mustafa MİRİK

İmza:

Üye : Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

İmza:

Üye : Doç. Dr. Fatih TÖRNÜK

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç.Dr.Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI *XANTHOMONAS* TÜRLERİNİN ATIK EKMEKLERDEN KSANTAN GAM ÜRETİMİ VE KALİTE ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet APAYDIN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

Bu araştırmada gıda atıklarının önemli bir kısmını oluşturan atık ekmeklerin ekonomik olarak değerlendirilmesi amacıyla atık ekmeklerden farklı *Xanthomonas* izolatları ve standart üretici izolatı ile optimum koşullarda ksantan gam üretilmesi ve elde edilen gamların reolojik, teknolojik özellikleri, kimyasal kompozisyonu ve model gıdalarda kullanım olanakları araştırılmıştır. Ekmek hidrolizati seyreltilerek ksantan gam fermentasyonunda tek karbon kaynağı olarak kullanılmış, böylece yüksek verimde ksantan gam üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon boyunca, besiyerindeki glukoz azaldıkça biyokütle ve polimer üretimi artış göstermiştir. Kantan gam üretimleri ise genel olarak 72. saatte maksimum seviyelere ulaşmış ve fermentasyon sonuna kadar aynı seviyelerde kalmıştır. *X. hortorum* pv. *pelargonii*, *X. axonopodis* pv. *begoniae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *X. campestris* DSM 19000 için optimum ksantan gam verimi sırasıyla 12,5 gL⁻¹, 10,3 gL⁻¹, 14,3 gL⁻¹ ve 12,9 gL⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Atık ekmek substratında *X. campestris* DSM 19000 tarafından üretilen gamların sulu çözeltileri en iyi viskozite özelliği gösterirken, izolatların ürettiği gamların model gıdada daha iyi kıvam verdiği belirlenmiştir. En yüksek viskozite *X. campestris* DSM 19000 tarafından üretilen gamların %2 konsantrasyonunda 10,57 Pa.sⁿ olarak belirlenmiştir. Model gıda olarak üretilen pudingte *X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *begoniae* tarafından üretilen gam daha iyi viskozite sağlamıştır. Üretilen bütün gamların ksantan gamın tipik monomerleri olan glukoz, mannoz ve glukuronik asit içerdiği ve bu açıdan ticari gam ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Gamların glukoz içerikleri %19,88-31,67 arasında, mannoz içerikleri 2,90-6,71 arasında, pirüvik asit içerikleri %2,17-%4,82 arasında, asetik asit içerikleri %3,45-%7,61 arasında ve ortalama moleküler ağırlıkları ise 1,41x10⁶-1,76x10⁶ g/mol arasında belirlenmiştir. Pirüvik asit içeriği ve moleküler ağırlık artışının viskozitenin gelişimi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; tez çalışmasında kullanılan izolatlar içerisinde atık ekmeklerden gam üretim miktarı açısından en iyi bakteri *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* olurken, gam kalite özellikleri açısından *X. axonopodis* pv. *begoniae* ön plana çıkmıştır. Ayrıca elde edilen sonuçlar atık ekmeklerin, düşük maliyetli ve verimli ksantan gam üretimi için güçlü potansiyeli ve umut veren özellikleri olduğunu göstermektedir. Bu yüzden atık ekmeklerden üretilen ksantan gam, endüstriyel ve ticari uygulamalar için güçlü bir aday olarak değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Atık ekmek, ksantan gam, *Xanthomonas*, reoloji

2019, 125 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

XANTHAN GUM PRODUCTION FROM WASTE BREAD USING DIFFERENT *XANTHOMONAS* SPECIES AND DETERMINATION OF QUALITY CHARACTERISTICS

Demet APAYDIN

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ

In this study, in order to economically utilize from waste breads constituting a significant part of food waste, xanthan gums were produced under optimum conditions with different *Xanthomonas* isolates and standard producer strain from waste breads, and the rheological, technological properties, chemical composition and utilization possibilities of the obtained gums were investigated. Bread hydrolyzate was diluted and used as the sole carbon source in the xanthan gum fermentation. By using waste bread as a substrate, high efficiency xanthan gum production has been achieved. During fermentation, biomass and polymer production were increased as glucose was decreased in the medium. Xanthan gum production reached maximum levels at 72 hours and remained at the same levels until the end of fermentation. Optimum yields were detected as 12.5 gL⁻¹, 10.3 gL⁻¹, 14.3 gL⁻¹ and 12.9 gL⁻¹ for *X. hortorum* pv. *pelargonii*, *X. axonopodis* pv. *begoniae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* DSM 19000, respectively. While the aqueous solutions of the gums produced by *X. campestris* DSM 19000 showed the highest viscosity, it was determined that the gums produced by the isolates gave better consistency to the model foods. The highest consistency of aqueous solutions was obtained by gum from standard bacteria with 10.57 Pa.sⁿ at 2% concentration. For instance *X. hortorum* pv. *pelargonii* and *X. axonopodis* pv. *begoniae* in pudding sample provide better viscosities. It was determined that all the produced gums contain glucose, mannose and glucuronic acid, which are typical monomers of xanthan gum, and show similarity with commercial xanthan gum in this respect. Glucose contents of the gums were changed between 19.88 and 33.60%, while mannose ranged from 2.90 to 6.71%. The pyruvate contents of the gums ranged from 2.17% to 4.82%, the acetic acid contents varied from 3.45% to 7.61% and the average molecular weights ranged from 1.41x10⁶ to 1.76x10⁶ g/mol, with the pyruvate content and molecular weight increase being related to the development of viscosity. As a result; among the isolates used in the study, the best bacteria in terms of amount of gum production from waste breads was *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, however, in terms of gum rheological properties *X. axonopodis* pv. *begonia* is in the foreground. In addition, the results obtained in our study show that waste breads are potent and promising properties for low cost and efficient xanthan production. Therefore, it can be regarded as a strong candidate for industrial and commercial applications.

Key words: Waste bread, xanthan gum, *Xanthomonas*, rheology

2019, 125 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Ksantan Gamın Biyosentezi ve Kimyasal Yapısı	4
2.2. Ksantan Gamın Fizikokimyasal Özellikleri	7
2.3. Ksantan Gamın Endüstriyel Kullanım Alanları	10
2.4. <i>Xanthomonas campestris</i>	16
2.5. Ksantan Gamın Endüstriyel Üretimi	17
2.6. Ksantan Gamın Üretim Parametreleri	20
2.7. Farklı Hammaddelerin Kullanılmasıyla Ksantan Gam Üretimi.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Atık Ekmek	28
3.1.2. Ticari Gam	28
3.1.3. Mikroorganizmalar	28
3.1.4. Enzimler.....	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Atık Ekmeklerin Kimyasal Bileşimin Belirlenmesi ve Enzimatik Hidrolize Hazırlanması	29
3.2.2. Toplam Şeker ve İndirgen Şeker Analizi.....	30
3.2.3. Ekmeğin Enzimatik Hidrolizi	31
3.2.4. Kültürlerin Muhafazası	34
3.2.5. Bakteri İnokulantlarının Hazırlanması	34
3.2.6. Ksantan Gam Üretim Optimizasyonu (Deneysel Metodoloji)	35
3.2.7. Ksantan Gam Üretimi	36
3.2.8. Bakteriyel Gelişimin Tespiti.....	40

3.2.9. Ksantan Gam Örneklerinin Fizikokimyasal, Kompozisyonel, Moleküler, Teknolojik ve Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	40
3.2.10. Elde Edilecek Ksantan Gamlar ile Model Gıdalar (Puding) Yapılması ve Bu Model Gıdaların Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Gam İlavesiz Örnekler ile Karşılaştırılması	46
3.2.11. İstatistiksel Analiz	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	48
4.1. <i>Xanthomonas</i> İzolatları Kullanılarak Atık Ekmek Hidrolizatından Ksantan Gam Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Fermentasyon Şartlarının Gam Üretim Verimine Etkisi	48
4.2. Fermentasyon Şartlarının, <i>Xanthomonas</i> İzolatlarının Substrat Olarak Atık Ekmek Hidrolizati Kullanarak Ürettiği Ksantan Gamların Reolojisine Etkisi	65
4.3. <i>Xanthomonas</i> İzolatlarından Substrat Olarak Atık Ekmek Kullanılarak Maksimum Viskozite Sağlayacak Şartlarda Elde Edilen Ksantan Gamların Sulu Çözeltilerinin Reolojik Karakterizasyonu	76
4.3.1. Yatışkan Kayma (Steady Shear) Reolojik Özellikleri	76
4.3.2. Viskoelastik Özellikleri	79
4.4. <i>Xanthomonas</i> İzolatlarından Substrat Olarak Atık Ekmek Kullanılarak Maksimum Viskozite Elde Edilen Şartlardaki Fermentasyon Kinetikleri (Zamana Göre Besiyerindeki Şeker Tüketimi, Gam ve Biyokütle Üretimi)	85
4.5. En Yüksek Viskozite Sağlanan Şartlarda Üretilen Gamların Fizikokimyasal Özellikleri	89
4.6. En Yüksek Viskozite Sağlayan Şartlarda Üretilen Gamların Kimyasal Kompozisyonları ve Fiziksel Özellikleri	90
4.6.1. Monosakkarit Kompozisyonu	90
4.6.2. En Yüksek Viskozite Sağlayan Şartlarda Üretilen Gamların Pirüvik Asit, Asetik Asit İçeriği ve Moleküler Ağırlığı	92
4.7. En Yüksek Viskozite Sağlayan Şartlarda Üretilen Gamların Teknolojik Özellikleri	95
4.7.1. Su ve Yağ Tutma Kapasiteleri	95
4.7.2. Köpük Oluşturma Kapasite ve Stabiliteleri	96
4.7.3. Çözünürlükleri	97
4.8. Ksantan Gam Örneklerinin Model Gıda Olarak Pudingte Kullanım İmkanlarının Belirlenmesi	98
5. SONUÇ	103
KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	125

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ticari ksantan gamın tipik fiziksel özellikleri.....	8
Çizelge 2.2. Ksantan gamın fonksiyonları ve kullanım alanları	14
Çizelge 2.3. Farklı hammaddelerin kullanılmasıyla elde edilen ksantan gam verimleri.....	27
Çizelge 3.1. Atık ekmeklerin kimyasal kompozisyonuna ait ortalama değerler (%).....	28
Çizelge 4.1. Substrat olarak hidrolize atık ekmeğin kullanıldığı denemelerde glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızının Yüzey Yanıt Yöntemi ile optimizasyonu sonucu elde edilen Box-Behnken deney dizaynı	49
Çizelge 4.2. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>)	51
Çizelge 4.3. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>)	54
Çizelge 4.4. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>).....	57
Çizelge 4.5. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. campestris</i> DSM 19000)	60
Çizelge 4.6. Substrat olarak hidrolize atık ekmeğin kullanıldığı denemelerde glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızının Yüzey Yanıt Yöntemi ile belirlenen deneme noktalarında elde edilen gamların K (Pa s ⁿ) kıvam katsayıları	66
Çizelge 4.7. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>).....	67
Çizelge 4.8. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>).....	70
Çizelge 4.9. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>).....	72
Çizelge 4.10. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (<i>X. campestris</i> DSM 19000)	74
Çizelge 4.11. Farklı bakterilerden elde edilen ksantan gamların değişik konsantrasyon oranlarının 20 °C’de Power Law parameterlerine olan etkisi.....	82
Çizelge 4.12. Farklı bakterilerden elde edilen ksantan gamların değişik konsantrasyon oranlarının farklı sıcaklıkta Arrhenius model parametrelerine üzerine etkisi	83
Çizelge 4.13. Farklı bakterilerden elde edilen ksantan gamların değişik konsantrasyon oranlarının 20 °C’de birikim ve kayıp modülüs parametrelerine olan etkisi.....	84
Çizelge 4.14. En yüksek viskozite sağlanan şartlarda fermentasyon başlangıcında ve sonunda besiyerindeki pH.....	89
Çizelge 4.15. En yüksek viskozite sağlanan şartlarda üretilen gamlar ve ticari gamın fizikokimyasal özellikleri	90

Çizelge 4.16. En yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen ksantan gam örneklerinin monosakkarit kompozisyonu.....	91
Çizelge 4.17. En yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen ksantan gam örneklerinin pirüvik asit ve asetik asit içerikleri ile ortalama moleküler ağırlıkları.....	92
Çizelge 4.18. Ksantan gam örneklerinin su ve yağ tutma kapasiteleri.....	96
Çizelge 4.19. Ticari gam örneğinin köpük stabilitesi ve köpük oluşturma kapasitesi	97
Çizelge 4.20. Ksantan gam örneklerinin çözünürlük değerleri	98
Çizelge 4.21. Farklı bakteriler ile atık ekmeklerden üretilen ksantan gamların, puding model gıdalarının 20°C’de Ostwald de Waele parameterlerine olan etkisi.....	100
Çizelge 4.22. Farklı bakteriler ile atık ekmeklerden üretilen ksantan gamların,puding model gıdalarının 20°C’de birikim ve kayıp modülüs parametrelerine olan etkisi.....	102

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>X. campestris</i> hücre membranında ksantan sentezi	5
Şekil 2.2. Ksantan gamın kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3. <i>X. campestris</i> 'in elektron mikroskobundaki görüntüsü.....	16
Şekil 2.4. Geleneksel karıştırma tank fermentöründe ksantan üretim akış şeması.....	20
Şekil 3.1. Atık ekmeklerin enzimatik hidrolizinde kullanılan enzimler.....	29
Şekil 3.2. Kurutulmak üzere ufak parçalara kesilmiş ekmekler	30
Şekil 3.3. Enzimatik hidroliz prosesi.....	33
Şekil 3.4. YM agar ve broth da geliştirilen <i>Xanthomonas</i> kültürleri.....	35
Şekil 3.5. Ksantan gam üretim akım şeması.....	39
Şekil 3.6. Santrifügasyon sonrası izopropanol ile ksantan gamın eldesi.....	40
Şekil 3.7. Masa tipi su aktivite cihazı	41
Şekil 3.8. Reometre cihazı	43
Şekil 3.9. Köpük oluşturma kapasite ve stabilitelelerinin belirlenmesi	46
Şekil 4.1. Glukoz oranı ve inokulum hacminin <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.2. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.3. Glukoz oranı ve inokulum hacminin <i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	55
Şekil 4.4. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin <i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	55
Şekil 4.5. Glukoz oranı ve inokulum hacminin <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	58
Şekil 4.6. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	58
Şekil 4.7. Glukoz oranı ve inokulum hacminin <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	61
Şekil 4.8. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin <i>X. campestris</i> DSM 1900 izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi	61
Şekil 4.9. <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> izolatı ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi	68
Şekil 4.10. <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> izolatı ile yapılan çalışmalardaki karıştırma hızı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi	69

Şekil 4.11. <i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> izolatu ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi	71
Şekil 4.12. <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> izolatu ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve karıştırma hızı parametrelerinin ksantan gam K (kıvam katsayısı) üzerine etkisi	73
Şekil 4.13. <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatu ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi	75
Şekil 4.14. <i>Xanthomonas</i> izolatları ve <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 1-100 1/s aralığındaki viskozite reogramı.....	77
Şekil 4.15. <i>Xanthomonas</i> izolatları ve <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 5-60 °C aralığındaki viskozite eğrileri	78
Şekil 4.16. <i>Xanthomonas</i> izolatları ve standart <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 1-100 rad/s açısal hız aralığındaki birikim ve kayıp modülü eğrileri.....	80
Şekil 4.17. <i>Xanthomonas</i> izolatları ve standart <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 5-60 °C aralığındaki birikim ve kayıp modülü eğrileri.....	81
Şekil 4.18. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri	86
Şekil 4.19. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak <i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i> ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri	87
Şekil 4.20. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri	87
Şekil 4.21. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak <i>X. campestris</i> DSM 19000 ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri	88
Şekil 4.22. <i>Xanthomonas</i> izolatları ve <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamlarla hazırlanan puding model gıdalarının 1-100 1/s aralığındaki viskozite reogramı	99
Şekil 4.23. <i>Xanthomonas</i> izolatları ve <i>X. campestris</i> DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamlarla hazırlanan puding model gıdalarının 1-100 rad/s açısal hız aralığındaki birikim ve kayıp modülü eğrileri	101

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$: Derece santigrat
Da	: Dalton
E_a	: Aktivasyon enerjisi
g	: Gram
G'	: Elastikiyet modülü
G''	: Vizkozite modülü
$\dot{\gamma}$: Kayma hızı
j	: Joule
η	: Görünür vizkozite
K	: Kelvin sıcaklık birimi
K	: Kıvam katsayısı
kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
mL	: Mililitre
n	: Akış davranış indeksi
η_0	: Arrhenius eşitliği sabiti
Pa	: Pascal
R	: Evrensel gaz sabiti
rad	: R
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
s	: Saniye
σ	: Kayma gerilimi
σ_0	: Akma gerilimi
T	: Sıcaklık
TMO	: Toprak Mahsulleri Ofisi
δ	: Tanjant

ω : Açısal frekans

YM : Yeast Malt besiyeri

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen, deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet Şükrü DEMİRCİ başta olmak üzere, tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam sayın Doç. Dr. İbrahim PALABIYIK' a desteklerinden dolayı tez komitesi üyelerine, daha önceki çalışmalarında izole edip morfolojik ve genetik tanımlamalarını yapmış olduğu mikroorganizmaları paylaşan değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa Mirik'e ve bu güzel çalışma ortamını bizlere sunan N.K.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü Başkanı saygı değer hocam sayın Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

"Farklı *Xanthomonas* Bakterileri Kullanılarak Atık Ekmeklerden Optimum Koşullarda Ksantan Gam Üretimi ve Gamların Çeşitli Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi ve Optimizasyonu" isimli ve TOVAG-1140429 nolu proje ile tez çalışmasına destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca her konuda beni destekleyen, maddi, manevi fedakârlıklar yaparak benim bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım babama, anneme ve kardeşime minnet ve şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım esnasında bana her zaman destek olan sevgili eşim ve mesai arkadaşım Gıda Yük. Müh. Hakan APAYDIN' a, canım kızım Defne APAYDIN' a içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2019

Demet APAYDIN
Gıda Yüksek Mühendisi

1. GİRİŞ

Gam; su afinitesine sahip, su ve diğer organik/inorganik materyalleri bağlama özelliği gösteren hidrokolloidal jeller-polisakkaritler için kullanılan yaygın bir terimdir. Son yıllarda polisakkaritler içeren doğal polimerler; biyoyumluluk, biyoçözünürlük, toksik olmama ve yenilenebilirlik gibi öne çıkan özellikleri sebebiyle dikkat çekmektedir (Zia, Zia, Zuber, Kamal ve Aslam, 2015; Niknezhad, Asadollahi, Zamani ve Biria, 2016).

Ksantan gam; glukoz, mannoz ve glukuronik asit birimlerinden oluşan suda çözünür bir heteropolisakkarittir. Endüstriyel olarak Gram negatif *Xanthomonas campestris* bakterisiyle, esas olarak glukoz ve sakkarozca zengin besiyerlerinin kullanılmasıyla elde edilmektedir (Yoo ve Harcum, 1999; García-Ochoa, Santos, Casas ve Gómez, 2000).

1940'lı yılların başlarında keşfedilen ve ilk ticarileşen mikrobiyal polisakarit dekstran; ticari olarak satılan ikinci mikrobiyal polisakarit, ksantan gamdır. Ksantan gam ilk olarak önemli biyopolimerleri incelerken, 1963 yılında United States Department of Agriculture (USDA)'ın Northern Regional Research Center (şimdiki ismiyle The National Center for Agricultural Utilization Research)'da Allene Rosalind Jeans başkanlığında bir Amerikan araştırma ekibi tarafından keşfedilmiştir ve o tarihten beri kullanılmaktadır (Margaritis ve Zajic, 1978; Kang ve Pettit, 1993; Sutherland, Swings, ve Civerolo, 1993). Ksantan gam, 1969'da, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından gıda endüstrisinde kullanılacak ilk endüstriyel olarak üretilen biyopolimer olarak onaylanmış ve 1980 yılında Avrupa Birliği'nden E-415 kodu ile onay almıştır (FAO/WHO, 1990; Pollock ve Thorne, 2003; Sworn, Kerdavid, Chevallereau, Fayos, 2012).

Günümüzde ksantan gam, eşsiz reolojik özellikleri sebebiyle gıda, farmakoloji, kozmetik, petrol gibi çok çeşitli endüstrilerde sayısız uygulamalara sahiptir. Gam kalınlaştırıcı, stabilize edici ve jelleştirme ajanı gibi birçok avantaja sahip olması sebebiyle gıda sektöründe; krema, yapay meyve suları, salata sosları, et, tavuk veya balık yanı sıra şuruplar, dondurma ve tatlıları kaplamada vb. kullanılmaktadır. Günümüzde, ticari ksantan gam karbon kaynağı glukoz ve sakkaroz, uygun bir azot kaynağı, potasyum fosfat ve diğer iz elementlerin bulunduğu steril bir ortamda *Xanthomonas* spp. kullanılarak daldırılmalı aerobik fermentasyon ile üretilmektedir. Ksantan gamın endüstriyel üretimi, kullanılan hammaddeler dolayısıyla oldukça pahalıya mal olmaktadır. Ksantan gam üretiminde hammadde maliyetini düşürebilmek için daha ekonomik karbon kaynakları gerekmektedir. Günümüzde

Xanthomonas türleri kullanılarak fermentasyonla ksantan gam üretimi konusunda gerçekleştirilen araştırmalarda temel amaç üretim besiyerinde ucuz karbon ve nitrojen kaynakları kullanmak ve üretim şartlarının optimize edilerek mümkün olan en düşük maliyetle en yüksek faydayı sağlayacak gam üretmektir. Ksantan gamın ticari başarısı sadece reolojik özellikleri üzerine değil aynı zamanda ekonomik faktörler üzerine de temel alınmalıdır (Yoo ve Harcum 1999; Ben Salah vd., 2010; Gunasekar, Reshma, Treesa, Gowdhaman ve Ponnusami, 2014).

Gıda atıkları; ksantan gam gibi katma değeri yüksek biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde kullanılabilir en uygun substratlar olarak ön plana çıkmaktadır. Ekmek tüketilmediğinde, hem miktar hem de ekonomik değer açısından gıda atıklarının ana kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Dünya genelinde başta Avrupa olmak üzere çoğu ülkede ekmek temel gıda atığıdır. Günümüzde neredeyse atık ekmeklerin tamamı kentsel çöp tanklarında toplanmakta ve %95'ten fazlası anaerobik arıtma ile metan gazına dönüştürölmektedir.

TMO (2013) tarafından gerçekleştirilen “Türkiye Ekmek İsrافی Araştırması”na göre Türkiye’de bir yılda 2,1 milyar adet ekmek israf edilmektedir. Hanelerde satın alınan ekmeğın %3’ü israf edilmektedir. Ekmek israfı sebebiyle yıllık ekonomik kaybımız, dünyada önemli bir yere sahip olduğumuz un ihracatından elde ettiğımız gelire eşdeğerdır. Ülkemizde bir yılda çöpe atılan ekmekle 542 bin ton buğday israf edilmektedir (TMO, 2013). Bu sebeple, ekmek israfının önlenmesi veya israf edilen ekmeklerin değerlendirilerek ekonomiye kazandırılma çalışmaları çok büyük önem kazanmıştır. Ekmek israfına yol açan etkenlerin tümünün ortadan kaldırılması mümkün değildir. Ancak, tüketilemeyecek duruma gelmiş ekmeğın farklı şekillerde değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması ekmek israfının önlenmesini de sağlayacaktır.

Atık ekmekler hem miktar hem de kimyasal kompozisyonu açısından biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde eşsiz bir kaynak olarak gözükmektedir. Ekmeğın besin içeriğı ekmek çeşidine göre değışmekle birlikte genel olarak 100 g beyaz ekmek yaklaşık 50 g karbonhidrat (47 g’ı nişasta formunda), 37 g su ve yaklaşık 8 g protein içermektedir. Bu kompozisyon ekmeğı birçok mikroorganizma için çok uygun besin kaynağı yapmakta ve dolayısıyla katma değeri yüksek ürünlerin eldesinde kullanımı için ucuz, bol ve uygun bir substrat haline getirmektedir (Melikoglu ve Webb, 2013).

Ekmeğin besin bileşiminin zengin olması ve ülkemizde israf edilen ekmeklerin çok yüksek miktarlarda olmasından dolayı atık ekmekler ksantan gam üretimi için potansiyel ve düşük maliyetli bir hammadde olarak öngörülmüştür.

Bu çalışmada farklı *Xanthomonas* türleri kullanılarak, hidrolize atık ekmeklerden optimum koşullarda ksantan gam üretilmesi ve elde edilen gamların fizikokimyasal, kompozisyonel, teknolojik ve reolojik özelliklerinin detaylı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, atık ekmeklerin ksantan üretimi için tek karbon kaynağı olarak kullanılması hem atık ekmeklerin ekonomik olarak değerlendirilmesi hem de ithal edilen bu ürünün düşük maliyetle ve istenilen kalitede üretilerek ekonomiye katkısı bakımından oldukça önemlidir.

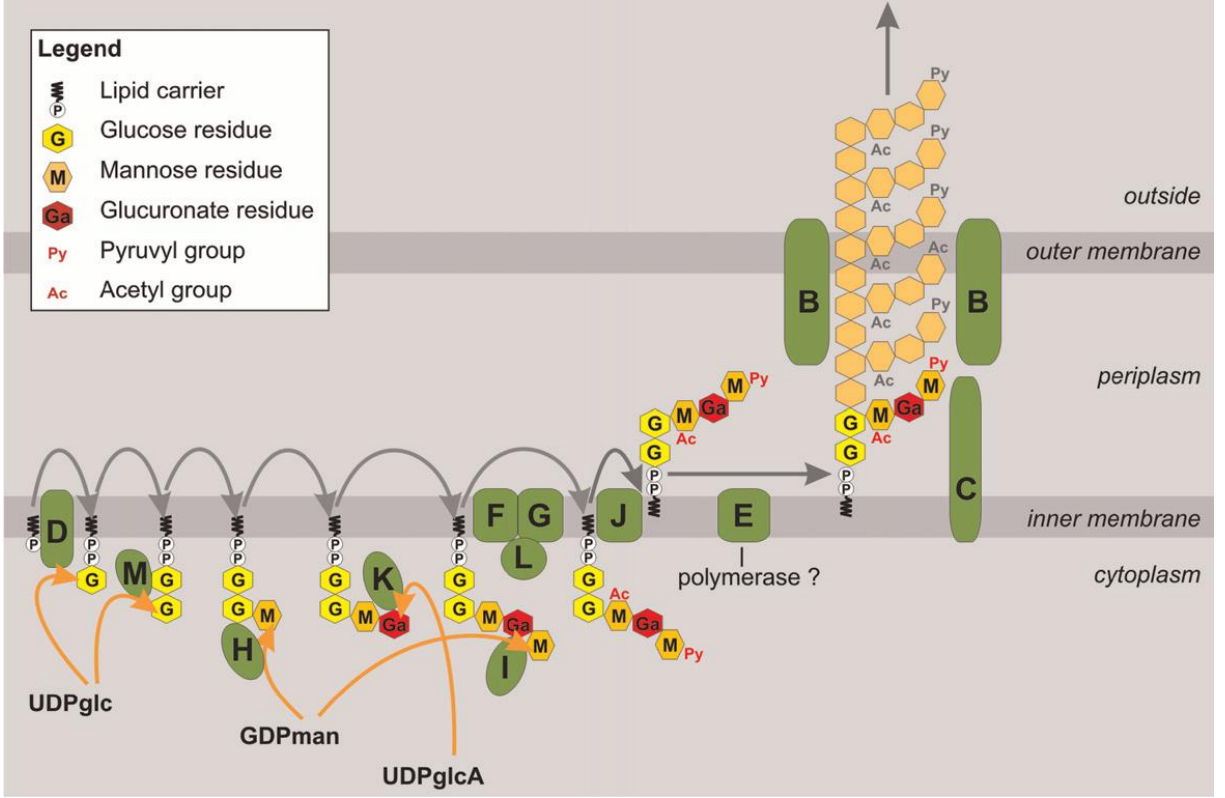
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Ksantan Gamın Biyosentezi ve Kimyasal Yapısı

Ksantan biyosentezi, çok sayıda enzimin direk veya indirek olarak yer aldığı enerji harcanan bir süreçtir. Glukoz temel olarak, biyokütle oluşumu ve enerjice zengin ara ürünler oluşturmak için Entner-Doudoroff metabolik yolu ve sitrik asit döngüsü ile metabolize olmaktadır (Becker, Katzen, Puhler ve Lelpi, 1998). Şekil 2.1 ksantan sentezinin bir modelini göstermektedir.

Ksantan gamın sentezi diğer Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritlere benzemektedir. Sentez metabolik yol üç bölüme ayrılabilir:

1. Basit şekerlerin alımı ve nükleotit türevlerine dönüşümü
2. İzopentil pirofosfat taşıyıcıya bağlı pentasakkarit alt ünitelerinin birleşmesi
3. Tekrarlayan pentasakkarit birimlerinin polimerizasyonu ve polimerin salgılanması



Şekil 2.1. *X. campestris* hücre membranında ksantan sentezi

(Yeşil harfler ile gösterilen alanlar ksantan üretiminde yer alan enzimleri göstermektedir) (Hublik, 2016)

Ksantanın temel yapısı, 2 mol UDP-D-glukozdan D-glukoz-1-fosfat ve D-glukozun ardışık olarak eklenmeleri ile oluşur. Daha sonra, D-mannoz ve D-glukuronik asit sırasıyla GDP-mannoz ve UDP glukuronik asitten eklenir. Asetil-CoA'dan transfer edilen asetil gruplar iç taraftaki mannoza ve fosfoenolpirüvattan gelen pirüvat uçtaki mannoza eklenir. Bu basamakların herbiri spesifik substratları ve spesifik enzimleri gerektirmektedir. Eğer substratlardan veya enzimlerden biri olmaz ise üretim gerçekleşmez (Rosalam ve England, 2006). Ksantan sentezi ile direkt olarak alakalı genler; gam-operon üzerinde yer alan, gum B'den gum M'e kadar isimlendirilen 12 gen kümesidir (Becker vd., 1998).

Ksantan gamın birincil yapısı ilk kez 1975 yılında saptanmıştır (Jansson, Kenne ve Lindberg, 1975). Ksantan molekülünün ana zinciri selüloz molekülü ile aynı yapıya sahiptir. Bu sebeple ksantan selüloz türevi olarak tanımlanabilir. Ana zincir 1,4-b-glukopiranoz kalıntısından oluşmuştur (Garcia-Ochoa vd., 2000). Ksantan gamın kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Ksantan gam, 2:2:1 molar oranlarında D-glukoz, D-mannoz ve D-glukuronik asitten oluşan bir heteropolisakarittir. Yapısındaki organik asitler sebebiyle

kullanılan fermentasyon koşullarının değişkenliği, ksantanın moleküler ağırlığını etkileyen en önemli faktördür (Papagianni vd., 2001; Sanchez, Ramirez, Torres ve Galindo, 1997).

2.2. Ksantan Gamın Fizikokimyasal Özellikleri

Ksantan gamın fiziksel özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Ksantan gam tatsız ve beyaz-krem rengindedir. Higroskopik bir üründür. Nem içeriği çevre neminden etkilenmektedir. Bu yüzden kuru ve soğuk ortamda saklanması gerekmektedir. Genel olarak gam %8-15 nem ve %7-12 kül değerlerine sahiptir (Garcia-Ochoa, Santos ve Casas, 1999). Sıcak ve soğuk suda çözünebilirken, çoğu organik çözücüde çözünmezdir. Bu davranış onun polielektrolit özelliği ile alakalıdır. Endüstriyel önemi su bazlı sistemlerin reolojisini kontrol edebilme yeteneğine dayanmaktadır. Diğer hidrokolloidlerle karşılaştırıldığına ksantan gamın sahip olduğu eşsiz özellikler şu şekildedir:

- Newtonsal olmayan akış davranışı
- Düşük konsantrasyonda yüksek viskozite gösterebilmesi
- Geniş bir shear aralığında yüksek psödoplastik özellik
- İyi termal stabilite
- Geniş bir pH aralığında stabilite
- Birçok enzim tarafından parçalanmaya karşı dirençli
- Tuz çözeltilerinde çözünür ve stabil olması
- Bioparçalanabilir ve çevre dostu ürün olması
- Galaktomannan ile sinerjistik etki göstermesi (Rosalam ve England, 2006; Hublik, 2016).

Çizelge 2.1. Ticari ksantan gamın tipik fiziksel özellikleri
(Garcia-Ochoa vd., 1999)

Özellik	Değer
Fiziksel Durum	Kuru, krem renkli toz
Nem (%)	8-15
Kül (%)	7-12
Nitrojen (%)	0,3-1
Asetik asit içeriği (%)	1,9-6,0
Pirüvik asit içeriği (%)	1,0-5,7
Monovalent Tuzlar (gL ⁻¹)	3,6-14,3
Divalent Tuzlar (gL ⁻¹)	0,085-0,17
Viskozite (cP) (15,8 s ⁻¹ , C _p = 1 gL ⁻¹ , T _D =25 °C, T _M =25 °C)	13-35

Ksantan gam sıcak veya soğuk suda çözünebilir, düşük konsantrasyonlarda yüksek viskozite sağlar, viskozdur. Geniş pH ve sıcaklık aralığında çözünürlüğü stabil olup asidik sistemlerde çözünür ve stabildir. 0-100 °C arasında çözelti viskozitesi stabildir. Tuz ile kusursuz uyum sağlar. Birçok tuz, gıda katkı maddesi ve diğer polisakkaritlerle uyumludur. Keçiboynuzu gamı vb. diğer gamlarla interaksiyona girer, süspansiyon ve emülsiyonları stabilize etme özelliklerine sahiptir. Ayrıca donma çözünme aşamalarından sonra çözültide stabiliteyi sağlar (Kalogiannis, Iakovidou, Liakopoulou-Kyriakides, Kyriakidis ve Skaracis, 2003; Saldamlı, 2007). Geniş bir pH sınırında iyi bir stabiliteye sahiptir (Erve Glicman, 1972). Farklı hidrokolloid türleri arasında güçlü interaksiyon gösterir. %0,2 gibi düşük konsantrasyon bile jel formu için yeterlidir (Christense, 1991).

Özellikle düşük konsantrasyonlarda yüksek viskozite göstermesi ksantan gamı ekonomik açıdan çok iyi bir kıvam verici ve stabilize edici yapmaktadır. Ksantan gam çoğu hidrokolloide nazaran çok daha yüksek psödoplastik özelliğe sahiptir, viskozitesi kesme hızının artması ile düşmektedir. Sulu çözeltilerde, ksantan düzensiz yapıdan (yüksek sıcaklık ve düşük iyon güçlerinde) düzenli bir yapıya (fizyolojik uygun sıcaklık ve tuz konsantrasyonları) yapısal bir dönüşüm gösterir. Ksantan gamın dallanmış yapısı, onun psödoplastik davranış ile kıvamlaştırıcı özellikler göstermesini mümkün kılmaktadır. Bu

özelliğini geniş pH ve sıcaklık aralığında ve enzimatik bozulmalara karşı stabil yapmakta ve sonuç olarak ksantan gam, keçiyoynuzu gam veya guar gam gibi diğer doğal gamlardan daha iyi özellikler sergilemektedir (Kang ve Pettitt, 1993). Ksantan gam çözeltilerinin özellikleri polimerin yapısına göre değişiklik göstermektedir. Bunun anlamı; moleküler ağırlık, asetat ve pirüvat içerikleri gamın davranışlarını etkilemektedir (Kang ve Pettitt, 1993; Peters, Suh, Schumpe ve Deckwer, 1993). Ksantan gam moleküler yapısındaki asetik asit ve pirüvik asit miktarları, üretimde kullanılan *Xanthomonas* türleri (Cadmus vd., 1976; Tait, Sutherland ve Sturman, 1986; Silva vd., 2009), proses şartları (Peters vd., 1993) ve ayrıca bakteri gelişme şartlarına göre (Cadmus vd., 1976; De Vuyst ve Vermeire, 1994) değişmektedir.

Çözeltide tuzların varlığı ksantan viskozitesini etkilemektedir. Ksantan gamın gıda uygulamalarında tuzun etkisi gıdada kullanılan gam konsantrasyonuna bağlıdır. %0,25 (w/v) gam konsantrasyonunda veya altında, sodyum klorid gibi tek değerlikli (monovalent) tuzlar viskozitede çok az oranda düşüşe sebep olmaktadır. Düşük polimer konsantrasyonunda, çözeltiliye az miktarda tuz ilavesi ile viskozite çok az düşüş göstermektedir. Bu etki, moleküller arası elektrostatik güçlerin düşmesinden dolayı moleküler boyutun azalması sebebiyledir (Smith ve Pace, 1982). Bununla beraber, daha yüksek ksantan konsantrasyonlarında tuz ilavesi ile viskozite artmaktadır. Bu etki muhtemelen, polimer molekülleri arasındaki etkileşimin artmasından kaynaklanmaktadır (Smith ve Pace, 1982; Milas, Rinaudo ve Tinland, 1985). Kalsiyum ve magnezyum gibi çift değerlikli tuzların (divalent) viskozitedeki etkisi de benzerdir. Üç değerlikli iyonlar ksantan gam jelatinasyonunu arttırmaktadır. Optimal reolojik ve üniform çözeltili özellikleri elde etmek için bazı çeşit tuzların varlığı gerekmektedir; genellikle çeşme suyunda doğal olarak bulunan tuzlar bu etkileri sağlamak için yeterli olmaktadır (Milas ve Rinaudo, 1986; Kang ve Pettitt, 1993). Ksantan viskozitesi, tuz içeriği %0,1'i geçtiğinde tuz konsantrasyonundan bağımsızdır (Kang ve Pettitt, 1993).

Ksantan yüklü bir polimerdir ve pH'daki değişiklikler ksantan gamın yük yoğunluğunda değişikliklere neden olmaktadır. Bu durum da ksantan moleküllerinin kendi aralarında ve diğer gıda ingredientleri arasındaki moleküler birliktelikleri etkilemektedir (Agoub, Smith, Giannouli, Richardson ve Morris, 2007; Rinaudo ve Moroni, 2009). Genel olarak, ksantan çözeltilerinin viskoziteleri pH 1-13 arasındaki değişikliklerden etkilenmezler. pH 9 ve üstünde ksantan gam yavaş yavaş deasetile olurken (Tako ve Nakamura, 1984), pH 3'ün altında ksantan gam pirüvik asit ve asetil gruplarını kaybeder (Bradshaw vd., 1983).

Deasetilasyon ve depirüvülasyonun birbirlerinden ayrı olarak gerçekleşmesinin ksantan viskozitesi üzerinde hemen hemen hiçbir etkisi bulunmamaktadır.

Ksantan çözeltilerinin viskozitesi hem viskozitenin tespit edildiği hem de ksantanın çözüldüğü sıcaklığa bağlıdır. Ksantan gam çözeltilerinin viskozitesi, moleküler yapısal değişiklikler sebebiyle sıcaklığın artması ile düşüş göstermektedir. Bu davranış 10 °C'den 80 °C'ye kadar tamamen geri dönüşümlüdür. Çözelti viskozitesi ayrıca polimer çözünme sıcaklığına da bağlıdır; çözünme sıcaklığı 40°C'nin üzerine yükseldiğinde viskozite düşmektedir. 40-60 °C arasında, sıcaklığın yükselmesi ile viskozite artmaktadır. 60 °C üzeri sıcaklıklarda, sıcaklık yükselmesi ile viskozite azalmaktadır. Bu özellik ksantan molekülünün düzensiz durumdan düzenli duruma geçişinden kaynaklanan yapısal değişikliği ile alakalıdır. Viskozite düşüşleri geri dönüşümlüdür ve soğutma ile yüksek viskozite geri kazanılabilir. Ksantan gamın sıcaklık değişimleri boyunca gösterdiği bu özelliği, diğer kıvam verici maddelere karşı üstün ve eşsiz bir gam olmasının en önemli sebeplerinden biridir (Morris, Rees, Young, Walkinshaw ve Darke, 1977; Milas ve Rinaudo, 1979; Rochefort ve Middleman, 1987; García-Ochoa ve Casas, 1994).

Gıdalarda kullanılan ksantan gamın yaklaşık %60'ı selüloz gam, guar gam ve keçiyoynuzu gam gibi diğer hidrokolloidlerle beraber kullanılmaktadır. Ksantan gam bu hidrokolloidlerle birlikte sinerjistik etki göstermektedir (Hublik, 2016).

Çözelti viskozitesinin sıcaklıkla çok fazla değişmemesi, yani soğutulduğunda kıvamının artmaması nedeniyle ksantan salata sosları ve çikolata şurupları gibi buzdolabından çıkar çıkmaz tüketilecek ürünlerde kullanım açısından çok uygundur. Bu ürünler buzdolabından çıkar çıkmaz oda sıcaklığındaki kadar kolay dökülebilmelidir. Normal salata soslarında ksantan gam kıvam verici olarak kullanılır ve partiküler yapıdaki süspansiyonu stabilize eder. Ksantan genellikle propilen glikol aljinatla birlikte kullanılır. Birlikte kullanıldıklarında daha az psödoplastik özellikte ve viskozitesi daha az olan çözelti verirler. Elde edilen ürün daha iyi dökülebilirlik ve krem benzeri pürüzsüz bir yapıya sahip olur (Saldamlı, 2007).

2.3. Ksantan Gamın Endüstriyel Kullanım Alanları

Ticari olarak üretilen başlıca mikrobiyal polisakkarit olan ksantan gamın çeşitli endüstriyel alanlarda uygulama alanı bulmasının sebebi düşük konsantrasyonlarda (%0,05 -1),

geniş pH aralığında ve sıcaklık stabilitesinde viskoz çözeltiler oluşturan reolojik özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu reolojik özellikler ksantanın dallanma gösteren yapısı ve yüksek moleküler ağırlığından kaynaklanmaktadır (Rottova vd., 2009). Ksantan bu özelliklerinden dolayı başta gıda olmak üzere ilaç, kozmetik, tarım ve petrol endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (García-Ochoa vd., 2000). GRAS (Genel olarak güvenli / güvenilir kabul edilen) bir ürün olan ksantan gıdanın çeşitli alanlarda kullanımı ve fonksiyonları Çizelge 2.2’de gösterilmektedir. Ksantan gıda endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.2). Gıda ürünlerinde kullanılan ksantan konsantrasyonu, son ürünün tadını bozmayacak ve gerekli özellikleri sunmaya olanak sağlayacak şekilde çok az miktarlardadır.

Ksantan gıdanın psödoplastik davranışı ve yüksek viskozitesi gibi spesifik özellikleri, gıda ürünleri (fırıncılık, hazır gıdalar, içecekler), tablet ve süspansiyonlardaki ilaç formülasyonları, seramik sırları, kâğıt yapımı, tarım kimyasallarını da kapsayan farklı endüstrilerde kullanım alanlarını genişletmiştir. (Funahashi, Yoshida ve Taguchi, 1987; Garcia-Ochoa vd., 2000; Rosalam ve England 2006; Silva vd., 2009). Ksantan gıda sanayinde özellikle ürünlerde kullanılan aromayı ön plana çıkartması ve en düşük kullanım oranında dahi sağlayabildiği yüksek kıvam bakımından tercih sebebidir (Dziezak, 1991). Ksantan gıda tek olarak veya çeşitli gıdalar ile kombinasyonları dondurma, fırın ürünleri, içecekler, düşük kalorili gıdalar, salça, dondurulmuş ürünler ve süt ürünleri gibi çok sayıda üründe farklı amaçlarla (emülsifier, stabilizatör, tekstür düzenleyici, jelleştirici, şeker-yağ ikame maddesi, kalınlaştırma vb.) kullanılabilir. Ksantan gıdanın akış özelliği bilhassa fırıncılık ürünlerinde, yoğurma ve şekil vermede büyük önem taşımaktadır (Demirci, 2010).

Geleneksel ürünlerimizden olan salep ve benzer tarzda üretilen toz içecek karışımları, fırın ürünleri, konserve gıdalar, sakız, hazır çorbalar ve yoğurt, dondurma gibi pek çok üründe kullanılmaktadır. Psödoplastiklik özelliği, özellikle pompalama ve karıştırma işlemlerinde kolaylık sağlar. Ksantan çözeltilerinin akışla incelleme özellikleri, molekülün ana zinciriyle yan zincirler arasındaki etkileşimin, akış esnasında zayıflamasından kaynaklanmaktadır (Dziezak, 1991).

Ksantan gıda endüstrisinde; sosların hazırlanmasında, sucuk ve sosis için kullanılan stabilizörlerin harmanlanmasında kullanılmaktadır. Ksantanın düşük kalorili ürünlerde de su bağlama ve tekstürü geliştirme özellikleri ile çok yaygın uygulama alanları vardır (García-Ochoa vd., 2000; Rosalam ve England, 2006; Hublik, 2016). Yağı azaltılmış et ürünlerinde su

kaybını önlemede ksantan gamın karagenan, keçiyoynuzu gamı ve düşük metoksilli pektinden daha etkili olduğu belirtilmektedir. Gam ilavesinin ürünlerin lezzetini olumsuz yönde etkilemediği saptanmıştır (Grigelmo-Miguel, Abadias-Seros ve Martin-Bellosa, 1999).

Fırıncılık endüstrisinde, pişirme ve depolama boyunca su tutma kapasitesini arttırmak ve fırınlanmış ürünler ile soğutulmuş hamurların raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, yumuşak fırın ürünlerinde yumurta beyaz içeriği, ürün görünüş ve tadını etkilemeden yumurta ikamesi olarak kullanılmaktadır. Az miktarlardaki ksantan keklerde yüksek pişirme hacmi vermektedir. Kuru üzüm, fındık gibi katı parçacıkların pişirme sırasında çökmesi engellenir. Glutensiz ekmekek ksantan ile iyi bir gözenek yapısı ve elastik yüzey sağlanarak yapılabilmektedir (Çizelge 2.2). Mohammadi, Sadeghnia, Azizi, Neyestani ve Mortazavian (2014), ksantan gam ve karboksimetil selülozu glutensiz ekmekek formülasyonunda kullanmışlardır. Ksantan, nem oranında artışa ve yapıda sertliğin azalmasına neden olmuştur. Ksantan gam konsantrasyonunun artırılması ile sertlikteki azalma ve elastikiyetin artması daha fazla gerçekleşmiştir. Ksantan gam diğer hidrokolloidlerle karşılaştırıldığında, glutensiz ekmekekler için en uygun olarak gözükmektedir. Chaiya, Pongsawatmanit ve Prinyawiwatkul, (2014), farklı oranlardaki buğday unu, tapyoka nişastası ve ksantan gamın pandispanya keklerin tekstürel ve duyuşsal özelliklerini etkilediğini bildirmişlerdir. %16 terayağ, %11,09-11,88 tapyoka nişastası ve %0,1-0,11 ksantan gam ile hazırlanan kek maksimum hacim, minimum sertlik ve iyi duyuşsal kalite bakımından en iyi formülasyon bulunmuştur.

Ksantan gam süt endüstrisinde de çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Genellikle karagenan veya diğer hidrokolloidlerle beraber milkshake, yoğurt ve sütlü tatlıları stabilize etmek amacıyla değerlendirilmektedir. Ayrıca, sürülebilir peynirlerin psödoplastik özelliklerini geliştirmektedir (Çizelge 2.2). Ksantan gam, guar gam ve/veya keçiyoynuzu gam ile birlikte dondurma, şerbet, sulu buz gibi ürünlerde daha fazla etkili olmaktadır (Sharma, Naresh, Dhuldhoya, Merchant ve Merchant, 2006). Ksantan gam, karagenan, galaktomannanların karışımı; dondurulmuş ve soğutulmuş süt ürünleri (dondurma, ekşi krema, steril çirpılmış krema ve rekombine süt) için iyi stabilizatörlerdir. Bu karışım optimum viskoziteyi sağlamak, proses sırasında ısı transferini arttırmak, ürünün stabilitesini uzun süre korumak ve buz kristallerinin kontrolünü sağlamak gibi yararları bulunmaktadır (Sworn, 2002). Ksantan gam-sodyum aljinat kombinasyonunun milşeyklerde iyi bir stabilize edici olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Bahramparvar ve Mazaheri Tehrani, 2011). Caciato, Noreña,

Bayarri ve Costell (2014), inülin ve ksantan gam kombinasyonunun (%0,25 w/w) kremalı tatlının elastikiyet özelliklerini arttırdığını belirlemişlerdir.

Sos, spagetti veya patates cips vb. ürünlere eklendiğinde, ksantan varlığı sosun üründe iyi bağlanmasını sağlamakta ve dağılmasını engellemektedir. Dondurulmuş gıdalarda, donma/çözünme döngüleri boyunca mükemmel stabilite ve su tutma etkisi göstermekte ve kontrolsüz buz kristallerinin oluşumunu azaltmaktadır. Bir çalışmada, buğday ruşeymi protein izolatı (BRPİ) ve ksantan gam, düşük kolesterolü mayonez yapımı için yumurta sarısı ikamesi olarak kullanılmıştır. Reolojik ve mikroyapısal analiz sonuçları; BRPİ ve ksantan gam içeren düşük kolesterolü mayonezin kontrol örneği ile benzer özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. %7,87 BRPİ, %0,2 gam ve %0,93 yumurta sarısı (%9 yumurta sarısı yerine) formülasyonu ticari mayoneze en benzer özellikler sergilemiştir (Rahbari vd., 2014).

Sahip olduğu reolojik özelliklerinden dolayı ticari olarak gıda sanayi dışında ilaç ve yağ endüstrisi tarafından da kullanılmaktadır (Jampala vd., 2005). Düşük yağ içeren gıdalarda ksantan gamın rolü yağı direk olarak ikame etmek değil, viskozite ve yapısal özellikleri kontrol altına alan ve fazla suyu bağlayan bir araç olmasıdır. Unlu mamullerde su bağlayıcı olarak %0,1-%0,2 oranlarında kullanılır (Khouryieh, Aramouni ve Herald, 2005).

Çizelge 2.2. Ksantan gamın fonksiyonları ve kullanım alanları

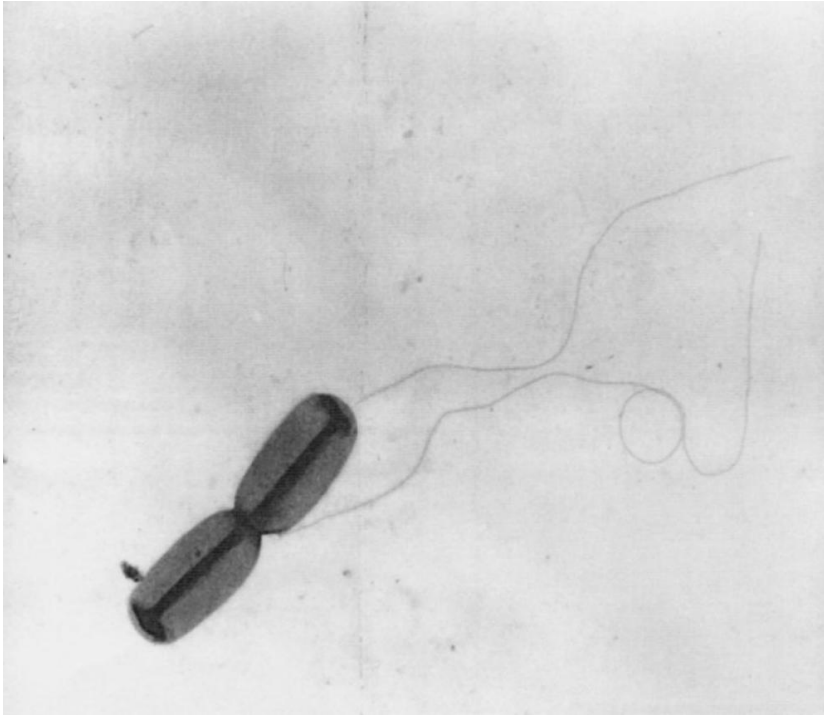
	Kullanım oranı (%)	Fonksiyonu	Referanslar
Gıda Uygulamaları			
Salata sosları	0,1-0,5	Akma kabiliyeti, hızlı ve yüksek viskozite sağlaması, yağ oranının azaltılması	Rosalam ve England, 2006; Sharma vd., 2006
Fırıncılık ürünleri	0,05-0,3	Su bağlama, tekstürü iyileştirme, yumurta ikamesi, retrogradasyonu inhibe etmesi, raf ömrünü uzatması	Sharma vd., 2006; Kaur, Sandhu, Arora ve Sharma, 2014
İçecekler	0,05-0,2	Ağızaki hissi iyileştirmesi, meyve parçalarını suspende etmesi, iyi ürün görünüşü ve tekstürü	Rosalam ve England, 2006; Kim, Yoo ve Yoo, 2014b; Cho ve Yoo, 2015
Et ürünleri	0,2-0,5	Su tutma kapasitesini arttırma, su salınımını önleme, yağ ikamesi	Rosalam ve England, 2006; Sharma vd., 2006
Süt ürünleri	0,05-0,2	Emülsiyonların stabilizasyonu, optimal viskozite, su salınımını önleme, proses boyunca ısı transferini arttırma, ısıl şoklara karşı koruma, buz kristal gelişiminin kontrolü	Rosalam ve England, 2006; Sharma vd., 2006
Dondurulmuş gıdalar	0,05-0,2	Stabilite, buz kristalleri oluşumunun engellenmesi,	Garcia-Ochoa vd., 2000; Sharma vd., 2006
Çorba ve soslar	0,05-0,5	Yüksek viskozite, hacim artışı, su salınımını önleme, iyi sıcaklık stabilitesi	Rosalam ve England, 2006; Kim, Yoo ve Yoo, 2014a
Çikolata	0,3-2	Kakao yağına alternatif, yağ ve kaloriyi düşürme,	Syafiq, Amir ve Sharon, 2014
Tatlılar	0,25	Kıvam arttırma, elastikiyeti arttırma, ağızdaki hissi geliştirme	Caciano vd., 2014
Kişisel Bakım Uygulamaları			

Diş macunu	0,7-1	Akışın kolaylaşması	Rosalam ve England, 2006
Krem ve losyonlar	0,2-0,5	Emülsiyon stabilizasyonu, krem kıvamı	
Şampuanlar	0,2-0,5	Reoloji kontrolü, çözünmeyen maddeleri suspende etme	
Endüstriyel Uygulamalar			
Zirai kimyasallar	0,1-0,3	Aktif ingredientleri suspende etme, yapışmayı önleme	Flickinger ve Draw, 1999
Temizleyiciler	0,2-0,7	İyi bir pH stabilitesi, etki süresini uzatmak	
Parlaticılar	0,2-0,7	Aşındırıcı maddeleri suspende etme	
Su bazlı boyalar	0,1-0,3	Reoloji kontrolü, pigment stabilitesi, penetrasyon	
Tekstil	0,2-0,5	Prosesi iyileştirme, renk akmasını önleme	
Yapıştırıcılar	0,1-0,3	Reoloji kontrolü ve penetrasyon	
Kâğıt endüstrisi	0,1-0,2	Reoloji kontrolü	
Seramik	0,3-0,5	Suspende etme	
Petrol sondaj	0,1-0,4	Tuz ve sıcaklığa karşı iyi stabilite	Katzbauer, 1998
Geliştirilmiş petrol üretimi	0,05-0,2	Akışkanlık kontrol ajanı	Byong, 1996
Hayvan Besleme			
Hayvan yemi	0,1-0,4	Su salınımını önleme	
Tıbbi Ürünler			
Süspansiyon ve emülsiyonlar	0,1-0,5	Mükemmel stabilite ve akış	
Tabletler ve pastiller	1,0-3,0	Aktif ingredientlerin etki süresini uzatması	

2.4. *Xanthomonas campestris*

Xanthomonas, *Pseudomonaceae* familyasına ait bir cinstir. Bu cinsteki bütün organizmalar bitki patojenidir. *Xanthomonas* izolatları, lahana, kaba yonca, fasulye gibi bitkileri de kapsayan çok geniş bir bitki grubunu enfekte etmektedir (Garcia-Ochoa vd., 2000).

Xanthomonas hücreleri, tekli düz çubuk şeklinde, 0,4- 0,7 µm genişliğinde ve 0,7-1,8 µm uzunluğundadır. (Şekil 2.3). Hücreler hareketli, Gram negatif ve 1,7-3 µm uzunluğunda polar bir flagellaya sahiptirler. Mikroorganizma kemoorganotrofik ve zorunlu aerobtur. Bakteri nitrojeni taşıyamaz ve katalaz pozitif, oksidaz negatiftir. Koloniler genellikle sarı, pürüzsüz ve yapışkan yapıdadır (Bradbury, 1984). *Xanthomonas* türleri glukozu okside edebilme yeteneğindedir ve glukoz yıkımı için Entner- Doudoroff yolu yaygın olarak kullanılan bir metabolik yoldur. Trikarboksilik asit ve glikosilat döngülerinin her ikisi de mevcuttur (Garcia-Ochoa vd., 2000).



Şekil 2.3. *X. campestris*'in elektron mikroskobundaki görüntüsü (x 12000)

(Garcia-Ochoa vd., 2000)

X. campestris endüstriyel ksantan üretiminde en yaygın olarak kullanılan mikroorganizmadır (Silman ve Rogovin, 1972). *X. campestris* gelişimi için kullanılan bütün besiyerleri kompleks bileşimdedirler. En yaygın olarak Yeast Malt (YM) besiyeri kullanılmaktadır (Jeanes, Rogovin, Cadmus, Silman ve Knutson, 1976).

Jackson, Frymier, Wilkinson, Zorner ve Evans (1998), *Xanthomonas campestris* MB245'in çimlerde gelişen yabancı zararlı bir böcek ve bioherbisit gibi geliştiklerini, kültürün beslenme ve çevre faktörleri hakkında çalışmalar yaptıklarını bildirmişlerdir. *Xanthomonas campestris*'in optimum gelişme sıcaklığının 27 ile 30 °C olduğunu (optimum 30 °C) tespit etmişlerdir. Sakkaroz, glukoz gibi karbon kaynağını ve çeşitli organik nitrojen kaynaklarını optimum olarak kullanabildiklerini, çeşitli vitamin ilavesinin ortam herhangi bir etki yapmadığını belirtmişlerdir.

2.5. Ksantan Gamin Endüstriyel Üretimi

Endüstriyel ksantan gam üretiminde ilk adım, yüksek verimli suşun seçilmesi ve izole edilmesidir. *Xanthomonas campestris*, iyi viskoziteye sahip ksantan gamı etkili bir şekilde sentezler ve verimli bir türdür. Ksantan gam üretiminde bir sonraki adım ise karbonhidrat bakımından zengin bir ortamda fermentasyon işlemidir. Endüstriyel ölçekli üretimde en çok glukoz veya sakkaroz gibi şekerlerin kullanılması tercih edilmekte olup, ksantan gam veriminde maksimal artış elde edilmektedir (Chatterji vd., 2015).

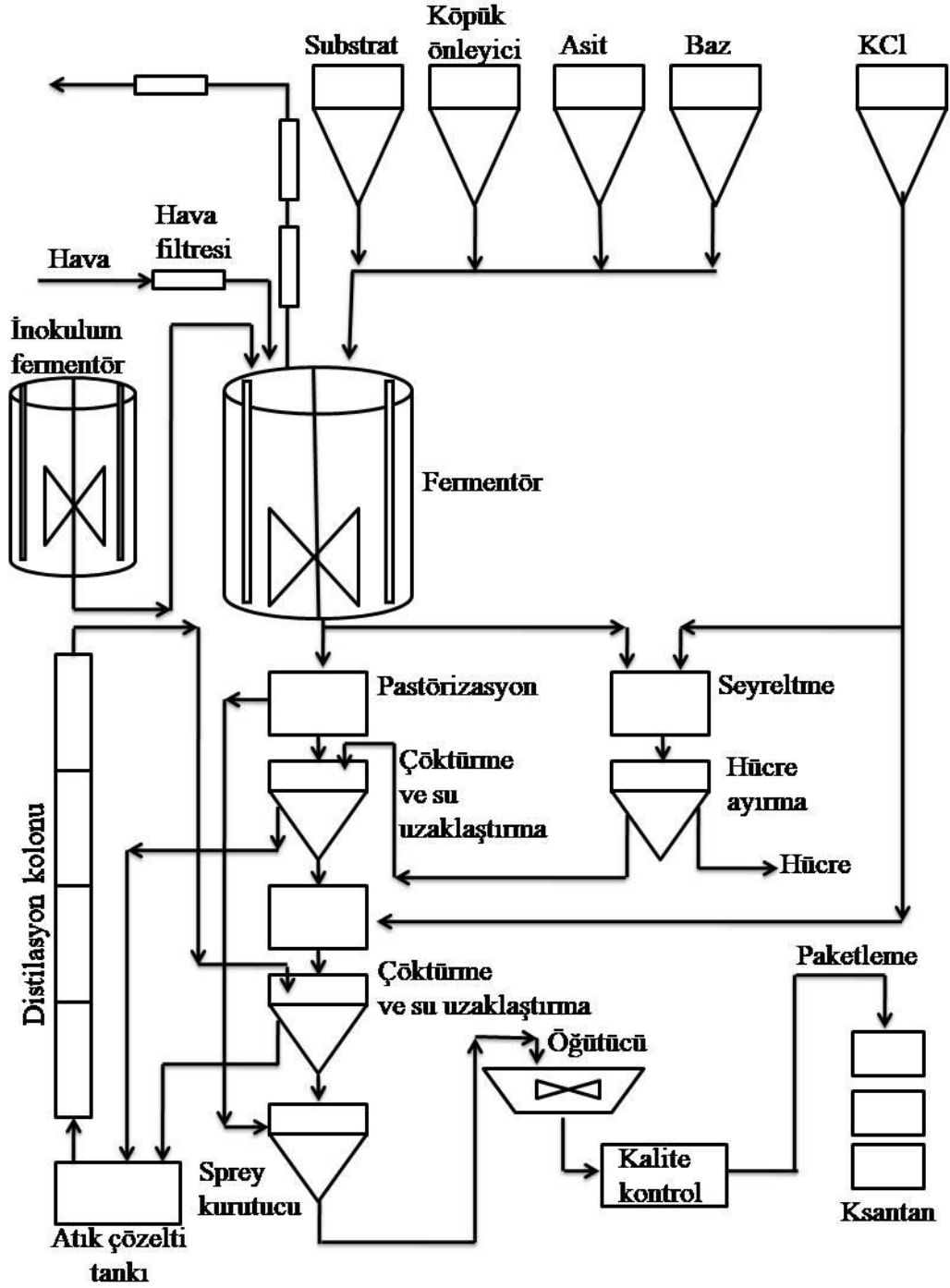
Endüstriyel ksantan gam üretiminde öncelikle seçilen mikrobiyal suş, arzu edilen özelliklerin devamını sağlamak amacıyla kanıtlanmış metodlarla olası uzun dönem depolama için muhafaza edilmektedir. Muhafaza edilen kültürün küçük bir miktarı, katı yüzeyde ya da sıvı ortamda büyük biyoreaktörler için inokulum elde etmek için geliştirilerek çoğaltılırlar. Mikroorganizmanın üremesi ve ksantan üretimi; kullanılan biyoreaktör tipi, operasyon modu (kesikli ya da sürekli), besiyeri bileşimi ve sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi kültür şartları gibi faktörlerden etkilenmektedir (Nasr, Soudi ve Haghighi, 2007; Rosalam, Krishnaiah ve Bono, 2008; Borges, Moreira, Vendruscolo ve Ayub, 2008; Papagianni vd., 2001). Fermentasyonun sonunda sıvı besiyeri; ksantan, bakteri hücreleri ve diğer birçok kimyasalları içermektedir. Ksantanın geri kazanılması için, genellikle filtrasyon ya da santrifüj ile önce hücreler uzaklaştırılır (Flores-Candia ve Deckwer, 1999). Dahası saflaştırma işlemi, suyla karışabilir çözünen olmayan maddeler (izopropil alkol, etil alkol, aseton) kullanılarak, tuz ya da pH düzenleyici kullanılan çöktürme içerebilmektedir (Flores-Candia ve Deckwer, 1999). Saflaştırmadan sonra, üründen su uzaklaştırılır ve ürün kurutulur. Kuru ürün öğütülür ve düşük su geçirgenlikli kap (ambalaj) içerisinde paketlenir.

Ksantanın endüstriyel ölçekli üretimi pahalı olmayan hammadde ve bileşenler ile gerçekleştirilmektedir. Sakkaroz, şeker kamışı pekmezi ve peynir altı suyu gibi karbonhidrat kaynaklar (Silva vd., 2009) besiyeri ortamında başarıyla kullanılmaktadır.

Ekim yapılan örneklerin gelişmesi için 2 gün gerekmektedir. *X. campestris* stok kültürünün muhafazası ksantan üretiminin kalitesi için önemlidir, çünkü varyasyon *Xanthomonas* türlerinin tanınan bir özelliğidir. Polisakkarit birikimi gelişme fazının başlangıcında başlar ve geliştirme sürecinden sonra da devam eder. Fermentasyon süresince organik asit oluşumu nedeniyle pH düşer. Eğer pH 5,0 altına düşerse, ksantan oluşumunu büyük ölçüde azaltır. Bu sebeple fermentasyon ortamını optimum pH değeri olan 7.0'de tutmak için proses süresince ortama tampon çözelti veya baz eklenmelidir. Ortamda havanın yeterli şekilde dağılması için çalkalama işlemi yapmak gerekmektedir. Çalkalama mikroorganizmaların gelişmesini destekleyen besinlerin hücre duvarlarından geçişini de kolaylaştırmaktadır (Psomas, Liakopoulou-Kyriakides ve Kyriakidis, 2007; Kerdsup, Tantratian, Sanguandeeul ve Imjongjirak, 2009; Silva vd., 2009; Gumus, Demirci, Mirik, Arici ve Aysan, 2010).

Ksantan gam üretiminde glukoz veya invert şekerler kullanılmaktadır ve çoğu işletme sürekli sistemler yerine kesikli (yığın) sistemleri tercih etmektedir (Letisse, Chevallereau, Simon ve Lindley, 2001; Leela ve Sharma, 2000). Sakkaroz, hidrolize pirinç, arpa ve mısır unu, peynir altı suyu, şeker kamışı pekmezi, hindistan cevizi suyu, şeker kamışı gibi diğer substratlar da test edilmiştir, fakat glukoz hala ürün verimi, tedarik ve ürün kalitesi açısından en iyisidir (El-Salam, Fadel ve Murad, 1994; Garcia-Ochoa, Santos ve Alcon, 2004; Kongruang, 2005; Rosalam ve England, 2006). Tipik ksantan üretim süreci mekanik karıştırma yapan geleneksel kesikli sisteme, fermentasyon ortamında gelişmeye uygun olarak hazırlanmış *X. campestris* ilavesi ile başlar. Sıcaklığı yaklaşık olarak 28–30 °C, pH=7, havalandırma oranı 0,3 (hacim/hacim)'den yüksek, karıştırma için spesifik güç 1 kW m⁻³'den yüksek olan aerobik ortamda havalandırılmış kültür uygun şekilde gelişmektedir. Fermentasyon prosesi yaklaşık 100 saatte gerçekleşir ve bu süre içerisinde ortamdaki glukozun yaklaşık %50'si ürüne dönüşmüş olur. Hammaddelerin tank içerisine eklenmesi birkaç aşamada gerçekleşir, genellikle 10 L'lik reaksiyon tankına başlangıçta 100m³ ürün tanka beslenir, yani tank kapasitesinin 10'da biri kadar ürün eklenir. Fermentasyon ilerledikçe hücreler azot kaynağını azaltarak hızla çoğalır. Fermentasyon aşaması sonlandıktan sonra süreç aşağıdaki adımları takip ederek devam eder. Endüstriyel amaçlı ksantan gam üretiminde

kullanılan Şekil 2.4'te gösterilen süreç devam eder (Rosalam ve England, 2006). Endüstriyel ölçekte ksantan üretiminde fermentasyon tankında steril bir ortam hazırlamak ve istenmeyen bakteri gelişimini ve enzim faaliyetlerini durdurmak amacı ile pastörizasyon işlemi uygulanır. Bu procesten sonra genellikle alkol kullanılarak ksantan gam çöktürölür, daha sonra çöken ksantan gam sprey kurutucuda kurutulur veya su ile re-süspanse edilerek tekrar çöktürölülebilir. Hücre içermeyen ksantan gam elde edilmek istediğinde santrifölj kullanılarak hücrelerin ortamdandan uzaklaştırılması kolaylaştırılır. Islak katı bir formda elde edilen ksantan gama suyun uzaklaştırılması ve yıkama işlemleri uygulanmalıdır (Balows ve Truper, 1991).



Şekil 2.4. Geleneksel karıştırma tank fermentöründe ksantan üretim akış şeması (Rosalam ve England, 2006)

2.6. Ksantan Gaminin Üretim Parametreleri

a. Karbon Kaynağının Etkisi

Hücrelerin çoğalmak, üretken olmak amacıyla membran, protein, hücre duvarı, kromozom ve diğer bileşenleri üretmek için gerekli besinleri almaları gerekmektedir

(Davidson, 1978). Ksantan gam üretiminde glukoz ve sakkaroz en sık kullanılan karbon kaynaklarıdır. Farklı kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilen, farklı optimum koşullar gerektiren işlemler ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Davidson, 1978; Souw ve Demain, 1979; Garcia-Ochoa, Santos ve Fritsch, 1992; Letisse vd., 2001). Laktoz bakteriyel gelişim için çok zayıf bir karbon kaynağı olarak görülürken en yüksek verim (kuru ağırlık) $11,99 \text{ gL}^{-1}$ ile sakkarozdan elde edilmiş olup, ikinci en yüksek verim $10,8 \text{ g L}^{-1}$ ile glukozdan elde edilmiştir (Palaniraj ve Jayaraman, 2011).

Karbon kaynağının konsantrasyonu ksantan verimine etki etmekte olup, konsantrasyon genellikle % 2-4 olarak tercih edilmektedir (Souw ve Demain, 1980; De Vuyst, Vermiere, Van Loo ve Vandamme, 1987a; Funahashi, Yoshida ve Taguchi, 1987). Bu substratların daha yüksek konsantrasyonda olması üremeyi sınırlandırmaktadır.

b. Azot Kaynağının Etkisi

Esansiyel bir besin maddesi olan azot hem organik hem de inorganik bileşikler olarak sağlanabilir (Moraine ve Rogovin, 1973; Slodki ve Cadmus, 1978; Pinches ve Pallent, 1986; Davidson, 1978; Souw ve Demain, 1979; Tait vd., 1986; De Vuyst vd., 1987a; De Vuyst, Van Loo ve Vandamme, 1978b). Genellikle, üretim besiyerinde kullanılan C / N oranı, gelişme sırasında kullanılanlardan daha azdır (Moraine ve Rogovin, 1971, 1973; Davidson, 1978; Souw ve Demain, 1979; De Vuyst vd., 1987a,b).

Casas, Santos ve Garcia-Ochoa, (2000), sıcaklık, başlangıç azot konsantrasyonu ve oksijen kütlesi transfer hızının etkileri üzerine çalışma yapmışlardır. Başlangıç azot konsantrasyonunun biyokütle gelişimini, ksantan üretimini, ksantanın moleküler yapısını ve özelliklerini etkilediğini belirtmişlerdir. Kennedy, Jones, Barker ve Banks (1982), yaptıkları çalışmada azot konsantrasyonu arttığında pürivilasyon derecesinin arttığını tespit etmişlerdir.

Souw ve Demain (1979), en iyi azot kaynağının 15 mM konsantrasyondaki glutamat olduğunu belirtmişlerdir.

Saied, Gabr, Hamed ve Hefnawy (2002), ksantan gam üretim fermentasyon besiyerinde ekonomik azot kaynağı olarak inorganik amonyum nitrat ($11,19 \text{ gL}^{-1}$) kullanımını tavsiye etmişlerdir.

c. Sıcaklığın Etkisi

Ksantan gam üretiminde sıcaklığın etkisi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışılan sıcaklık değeri 25–34 °C arasında değişmektedir fakat yaygın olarak 28–30 °C arasındaki sıcaklık değerinde çalışılmaktadır (Çizelge 2.3). Birçok araştırmacı (Borges vd., 2008; Gumus vd., 2010; Psomas vd., 2007; Silva vd., 2009; Kerdsup vd., 2009) 28 °C'nin ksantan gam üretiminde optimum sıcaklık olduğunu belirtmiştir (Palaniraj ve Jayaraman, 2011). Esgalhad, Roseiro ve Amaral (1995) *X. campestris* gelişmesi için optimum sıcaklığın 25–27 °C olduğunu, ksantan gam üretimi içinse optimum sıcaklığın 25–30 °C olduğunu belirtmişlerdir. Cadmus vd., (1978) yüksek kültür sıcaklığının ksantan gam üretimini arttırdığını, ancak pürivat içeriğini azalttığı sonucuna varmışlardır. Garcia-Ochoa vd. (1992), ksantan gam üretim besiyeri için optimum sıcaklığın 28 °C olduğunu göstermişlerdir.

d. pH'nın Etkisi

Çoğu araştırmacı (Psomas vd., 2007; Silva vd., 2009; Kerdsup vd., 2009; Gumus vd., 2010; Mirik, Demirci, Gumus ve Arıcı, 2011), nötral pH değerinin *X. campestris* gelişimi için optimum pH değeri olduğu konusunda hemfikirdir. Ksantan gam üretimi sırasında, ksantan gamda bulunan asit gruplar sebebiyle pH nötral değerden 5 değerine doğru azalmaktadır (Borges vd., 2008). Esgalhado vd. (1995) kültür gelişimi için optimum pH değerinin 6–7,5, ksantan gam üretimi için optimum pH değerinin 7–8 olduğunu belirtmiştir. Garcia-Ochoa, Santos ve Alcon (1996), *Xanthomonas*'ın nötr pH'da kültürlenebileceğini önermektedir. pH'nın etkileri üzerine yapılan çalışma, pH kontrolünün hücre gelişmesini arttırdığı, fakat ksantan gam üretimine etkisinin olmadığını göstermiştir.

e. Kütle Transferi Oranının Etkisi

Ksantan üretiminde çok çeşitli bioreaktörler kullanılmasına rağmen dağıtarak karıştıran tank en yaygın kullanıma sahip olmaktadır. Karıştırılan reaktörlerde oksijen kütle transfer hızı, hava akış hızından ve karıştırıcı hızından etkilenmektedir.

Karıştırıcı tanklar kullanıldığında hava akış hızı sabit olarak 1 L/L dakika olarak uygulanmaktadır. Buna karşılık, çalkalama hızı geniş bir aralıkta değişmektedir. Düşük karıştırma hızı oksijeni sınırlandırmasından dolayı, düşük ksantan gam üretim oranına sebep olmaktadır. Ksantan üretim oranı, oksijenin kullanılabilmesi ile doğrudan ilişkilidir (Suh, Herbst, Schumpe ve Deckwer, 1990; Suh, Schump ve Deckwer, 1992; Amanullah, Satti ve

Nienow, 1998). Çalkalama, ksantan üretimi üzerinde zamandan daha fazla olumlu etkiye sahiptir. 1000 rpm'de 50 saat fermentasyonda daha yüksek üretim elde edilmiştir (Amanullah vd., 1998). Çalkalama ksantan üretimine pozitif etkide bulunmaktadır (Peters vd., 1989). Cacik, Dondo ve Marques (2001) maksimum ksantan üretimini 600 rpm'de, 35 °C'de ve 72 saatte olduğunu gözlemlemiştir.

2.7. Farklı Hammaddelerin Kullanılmasıyla Ksantan Gam Üretimi

Endüstriyel ölçekli ksantan gam üretiminde en çok glukoz veya sakkaroz gibi şekerler tercih edilmekte olup, ksantan gam veriminde maksimal artış elde edilmektedir (Chatterji vd., 2015). Saf glukoz pahalı olduğundan dolayı toplam ürünün maliyetini azaltmak için maltoz, dekstroz, nişasta, arabinoz ve galaktoz (Souvw ve Demain, 1979) gibi diğer şeker alternatifleri ve şeker kamışı, peynir altı suyu ve artık atık pekmez gibi (Gomes vd., 2015; Niknezhad, Asadollah, Zamani, Biria ve Doostmohammadi, 2015; Gilani, Najafpour, Heydarzadeh ve Zare, 2011) pahalı olmayan substratlar kullanılabilir.

Nitschke, Thomas ve Knauss (1997), *Xanthomonas campestris* izolatları ile peynir altı suyundan (hidrolize edilmemiş ve filtre edilmemiş) laktöz kullanılarak ksantan gam ürettiklerini, üretimde %0,5 K₂HPO₄, %0,01 MgSO₄ ve %1 peynir altı suyundan oluşmuş besiyerinde 14 g/kg ksantan gam elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Papi, Ekateriniadou, Beletsiotis, Typas ve Kyriakidis (1999), *X. campestris*'in gelişimi ve ksantan gam üretimi için çeşitli dilüsyonlardaki (%10, 25, 35, 50, 75) şeftali posası denemişlerdir. Bu dilüyonları hem işlenerek saf hale getirilen hem de işlenmemiş şeftali posası ile hazırlamışlardır. Saf şeftali posasının *X. campestris*'in gelişimi ve ksantan gam üretimi için çok iyi bir substrat olduğunu bulmuşlar, en yüksek ksantan gam verimini %50'lik saf şeftali posası ile elde etmişlerdir.

Yoo ve Harcum (1999), *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile ksantan gam üretimi için, ek bir substrat olarak atık şeker pancarı pulpunun kullanılabilirliğini incelemişlerdir. Fermentasyon sonrasında şeker pancarı pulpunun ksantan gam eldesi için verimli bir substrat olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Letisse vd. (2001), ksantan gam üretimi için *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 ile bir kesikli fermentasyon stratejisi geliştirmişlerdir. Temel ortam bileşenlerinin tümünü başlangıçta sağlamışlar, tek şeker kaynağı olarak sakkaroz kullanmışlardır. Ardışık olarak

tüketilen azot kaynaklarının, (soya fazulyesi hidrolizatları, amonyum ve nitrat tuzları) ortamın optimizasyonunu daha fazla kolaylaştırdığını saptamışlardır. Bu çalışmada ksantan gamın sakkarozdan yeterli miktarda üretilebileceğini, fermentasyon süresince mümkün olduğu kadar az ilave yapılması ve aynı zamanda ürün değerlerine karşı ekonomik önceliklerin göz önünde tutulması gerektiğini vurgulamışlardır.

Kalogiannis vd. (2003), karbon kaynağı olarak şeker pancarı melasının kullanıldığı K_2HPO_4 , maya ekstarktı, triton 80 ile desteklenmiş besiyerinde *X. campestris* ATCC 1395 ile ksantan gam üretimini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, besin ortamına K_2HPO_4 ilavesi gam üretimine önemli bir pozitif etki göstermiş ve maksimum verimi 175 gL^{-1} melas ve $4 \text{ gL}^{-1} K_2HPO_4$ varlığında nötr pH 'da 24 saat sonunda 53 gL^{-1} olarak bulmuşlardır.

Woiciechowski, Soccol, Rocha ve Pandey (2004), manyok küspesi hidrolizatından *Xanthomonas campestris* ile farklı azot kaynakları kullanarak ksantan gam üretimi gerçekleştirmişlerdir. Manyok küspe başlangıç konsantrasyonu yaklaşık 20 g/L olan besiyerinin ksantan gam üretimi için en iyi substrat konsantrasyonu olduğunu belirlemişlerdir. Potasyum nitrat destekli besiyeri ile 72 saat fermentasyon sonundaki gam verimini 14 gL^{-1} olarak saptamışlardır.

Mesomo vd. (2009) karbon kaynağı olarak peynir altı suyu kullanarak *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 ile ksantan gam üretimi fermentasyon şartlarının optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek verimi $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 390 rpm çalkalama hızında, $1,5 \text{ vvm}$ havalandırmada tezgah bioreaktöründe optimize koşullarda $7,2$ başlangıç pH 'da 72 saat fermentasyon sonunda gam verimi $35,3 \text{ gL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. En yüksek viskozite değerini 30 gL^{-1} gam ile $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de $1831,34 \text{ mPas}$ olarak elde etmişlerdir.

Rottava vd. (2009), 10 farklı *Xanthomonas* türü ile ksantan gam üretimi gerçekleştirmişler ve en iyi verimi sırasıyla *X. campestris* pv. *campestris* 1078 ($9,67 \text{ gL}^{-1}$), *X. campestris* pv. *campestris* 254 ($9,49 \text{ gL}^{-1}$) ve *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 1230 ($8,93 \text{ gL}^{-1}$) ile elde etmişlerdir. *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* kullanılarak elde edilen gamlarda en iyi viskoziteyi saptamışlardır.

Silva vd. (2009) yaptıkları çalışmada ksantan gam üretiminde peyniraltı suyunu substrat olarak kullanarak besin ortamının $\% 0,1 \text{ (w/v)}$ $MgSO_4 \times 7H_2O$ ve $\% 2 \text{ (w/v)}$ K_2HPO_4 ile desteklenmesi ile 72 saat sonunda maksimum verimi 25 gL^{-1} olarak tespit etmişlerdir.

Demirci (2010), çalışmasında substrat olarak hidrolize edilmiş pirinç kepeği kullanılarak, *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile lahanalardan izole edilen *X. campestris* pv. *campestris* ve *X. axonopodis* pv. *vesicotaria* bakterileri ile ksantan gam üretimi gerçekleştirmiş ve en yüksek ortalama verimleri sırasıyla 21,87, 17,10, 5,60 gL⁻¹ olarak belirlemiştir. Elde ettiği ksantan gamları mayonez yapımında kullanmıştır. Ticari ve pirinç kepeğinden üretilen gamlar kullanılarak yapılan mayonezlerin viskozite ölçümlerinde en yüksek değerler % 1 oranında gam ilave edilmiş mayonezlerde ticari gam için 4640 mPas, *X. campestris* NRRL B-1459 için 3020 mPas ve *X. campestris* pv. *campestris* için 3120 mPas olarak belirlemiştir.

Faria, Vieira, Resende, Ribeiro ve Cardoso (2010) yaptıkları çalışmada *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile başlangıç sakkaroz konsantrasyonları 15.0, 25.0 ve 35.0 gL⁻¹ olan seyreltilmiş şeker kamışını kullanarak ksantan gam üretmişlerdir. 35.0 gL⁻¹ şeker konsantrasyonunda en yüksek ksantan verimini (20.3 gL⁻¹) elde etmişlerdir.

Ben Salah vd. (2010) yaptıkları çalışmada hurma suyu atık ürünlerini karbon kaynağı olarak kullanarak *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 ile ksantan gam üretmişlerdir. Central Composite Orthogonal Design ile tamamlanmış Response Surface Methodology kullanarak optimum koşulları 84,68 gL⁻¹ karbon kaynağı, 2,7 gL⁻¹ azot kaynağı ve 30,1 °C sıcaklık olarak belirlemişlerdir. Maksimum ksantanın deneysel verimini 43.35 gL⁻¹ olarak bulmuşlardır ki bu değer öngörülen (42,96 gL⁻¹) ile iyi bir uyum içinde olduğunu saptamışlardır.

Moosavi ve Karbassi (2010), karbon kaynağı olarak şeker pancarı melası kullanarak farklı *Xanthomonas* türleri ile ksantan gam üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarında şeker pancarı melası bazlı 50g/kg sakkaroz konsantrasyonundaki besiyerinde *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* kullanarak en yüksek gam verimini (19,8 gL⁻¹) elde etmişlerdir. Farklı izolatlardan elde edilen gamlar ve ticari gam kullanılarak hazırlanan mayonez örneklerinin viskozitelerini karşılaştırmışlar ve farklılık belirlememişlerdir.

Gilani vd. (2011), *Xanthomonas campestris* PTCC 1473 ile şeker kamışından ksantan gam üretmişlerdir. 32 °C'de 500 rpm'de 30 gL⁻¹ toplam şeker içeriğine sahip besiyerinde maksimum 17.1 gL⁻¹ gam verimi elde etmişlerdir. Elde ettikleri ksantan gamın FTIR spektrumunu ticari ksantan ile karşılaştırmışlardır.

Faria vd. (2011), şeker kamışı suyundan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459 ile ksantan gam üretmişlerdir. 750 rpm çalkalama hızında ve 0,35 vvm havalandırmada 24 saat süren fermentasyon süresi sonunda ksantan gamın glukoz, mannoz ve glukuronik asit oranını sırasıyla 1,79:1,33:1, gamın molekül ağırlığını $4,172 \times 10^6$ Da olarak saptamışlardır.

Savvides, Katsifas, Hatzinikolaou ve Karagouni (2012) yaptıkları çalışmada, süt endüstrisinin atık bir ürünü olan peynir altı suyunu karbon kaynağı olarak kullanarak *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 suşu ile ksantan gam üretmişlerdir. 43 gL^{-1} karbon kaynağı konsantrasyonunda 96 saat gelişme sonunda ksantan veriminin 8.72 ile 12.46 gL^{-1} arasında değiştiğini saptamışlardır.

Gomes vd. (2015) yaptıkları çalışmada ksantan gam üretiminde hammadde kaynağı olarak şeker kamışı küspesi gibi lignoselülozik malzemeler kullanmışlardır. Bu çalışmanın amacı, ksantan gam üretmek için en iyi şeker kamışı küspesi konsantrasyonunu seçmek ve elde edilen biyopolimerin özelliklerini analiz etmektir. %2, %4, %6, %8 ve %10 konsantrasyonlarda şeker kamışı küspesi ile çalışılmış olup ksantan gam verimi $0,54 \text{ gL}^{-1}$ ile $8,44 \text{ gL}^{-1}$ arasında değişmiştir. Hem üretim açısından hem de polimer karakterizasyonu açısından en iyi sonuç %4 konsantrasyon oranında elde etmişlerdir.

Niknezhad vd. (2015) *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii* ksantan ile ksantan gam üretimi çalışmalarında karbon kaynağı olarak peynir altı suyu laktozunu kullanmışlardır. Bu çalışmada proteinler çöktürülmüş ve fermentasyondan önce peynir altı suyundan uzaklaştırılmıştır. Ksantan gam üretimini en üst düzeye çıkarmak için kültür ortamındaki karbon, magnezyum ve fosfat kaynağı konsantrasyonlarının optimizasyonu için Box-Behnken tepki yüzey metodolojisi kullanılmıştır. *X. campestris*'in 48 saatlik fermentasyonundan sonra, $65,2 \text{ gL}^{-1}$ peynir altı suyunda ($39,1 \text{ gL}^{-1}$ laktoz), $14,8 \text{ gL}^{-1}$ fosfat (KH_2PO_4) ve $1,1 \text{ gL}^{-1}$ of magnezyum ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) konsantrasyonlarında en yüksek ksantan gam konsantrasyonunu ($16,4 \text{ gL}^{-1}$) elde etmişlerdir. Ksantan gam verimini *X. campestris* için 0,42, *X. pelargonii* için 0,27 (g ksantan gam/g laktoz) olarak tespit etmişlerdir.

Ghashghaei, Soudi ve Hoseinkhani (2016) yaptıkları çalışmada, ksantan gam üretimi için düşük dereceli üzüm suyu konsantresini karbon kaynağı olarak kullanmışlardır. Optimize

edilmiş koşullar altında 28 °C'de 72 saat içinde ortalama ksantan verimini ve üretimini sırasıyla %35 ve 14,35 gL⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.

Li vd. (2016) çalışmalarında yalnızca mutfak atıklarını kullanarak ksantan gam üretiminin mümkün olduğunu göstermişlerdir. 5 L'lik bir fermantörde dönüşüm oranı ve indirgeyici şeker kullanım oranı sırasıyla % 67,07 ve % 94,82'ye ulaştığı durumuda ksantan veriminin 11,73 gL⁻¹'ye ulaştığını saptamışlardır.

Çizelge 2.3'te farklı hammaddelerin kullanılmasıyla elde edilen ksantan gam verimleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı hammaddelerin kullanılmasıyla elde edilen ksantan gam verimleri

Substrat	Ksantan Gam Verimi(gL ⁻¹)	Referans
Şeker kamışı küspesi	0,54 gL ⁻¹ ile 8,44 gL ⁻¹ arasında	Gomes vd. (2015)
Peynir altı suyu laktozunu	Maks. 16,4 gL ⁻¹	Niknezhad vd. (2015)
Düşük dereceli üzüm suyu konsantresi	14,35 gL ⁻¹	Ghashghaei vd. (2016)
Peynir altı suyu	35,3 gL ⁻¹	Mesomo vd. (2009)
Mutfak atıkları	11,73 gL ⁻¹	Li vd. (2016)
Şeker pancarı melası	19,8 gL ⁻¹	Moosavi ve Karbassi (2010)
Peynir altı suyu	8,72-12,46 gL ⁻¹	Savvides vd. (2012)
Şeker kamışı	17,1 gL ⁻¹	Gilani vd. (2011)
Hurma suyu atık ürünleri	43,35 gL ⁻¹	Ben Salah vd.(2010)
Şeker kamışı	20,3gL ⁻¹	Faria vd. (2010)
Manyok küspesi	14 gL ⁻¹	Woiciechowski vd. (2004)
Pirinç kepeği	21,87 gL ⁻¹	Demirci (2010)
Peyniraltı suyu	25 gL ⁻¹	Silva vd. (2009)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Atık Ekmek

Tez kapsamında materyal olarak kullanılmak üzere bayatlamış ve raf ömrü tükenmiş buğday ekmekleri Tekirdağ'daki bir ekmek fırınından temin edilmiştir. Ekmeklerde küflenme olmamasına dikkat edilmiştir. Çalışmada kullanılan atık ekmeklerin kimyasal kompozisyonu Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Atık ekmeklerin kimyasal kompozisyonuna ait ortalama değerler (%)

Bileşen	Oran (%)
Toplam Karbonhidrat	54
Nem	38
Protein	6
Kül	1

3.1.2. Ticari Gam

Ticari gam, AS Kimya Sanayi ve Dış Ticaret A.Ş'den temin edilmiştir.

3.1.3. Mikroorganizmalar

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Mirik'in daha önceki çalışmalarında sırasıyla sardunya (*Pelargonium hybrida* L), biber (*Capsicum annuum* L) ve begonya (*Begonia X tuber hybrid*)'dan izole edip morfolojik ve genetik tanımlamalarını yapmış olduğu *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (sardunya-3), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (XCVA3-1) ve *X. axonopodis* pv. *begonia* (Xcb-9) izolatları hidrolize atık ekmeklerden ksantan gam üretiminde kullanılmıştır.

Standart ksantan gam üreticisi *Xanthomonas campestris* DSM 19000 (NRRL B-1459) izolatu, The Leibniz Institute DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Almanya)'den temin edilmiş olup, ksantan gam üretim denemelerinde kontrol olarak kullanılmıştır. Kùltürler koruyucu ortam (gliserol %30 (v/v)) içerisinde derin dondurucuda (-40 °C) muhafaza edilmiştir.

3.1.4. Enzimler

Bacillus licheniformis tarafından üretilen Termostabil alfa-amilaz (EC 3.2.1.1) enzimi (Termamyl 120 L) (Novozyme, Danimarka, enzim aktivitesi 120 KNU/g (KNU=Kilo Novo Units α -amilaz–Novozyme standart metoduna göre saatte 5.26 g nişasta parçalayan enzim miktarı), genetik olarak modifiye edilmiş *Aspergillus* türleri tarafından üretilen amiloglukozidaz enzimi (EC 3.2.1.3) (AMG 300 L) (Novozyme, Danimarka, enzim aktivitesi 300 AGU/mL (AGU= belirtilen şartlar altında dakikada 1 μ mol maltozu hidrolize eden enzim miktarı) (şekil 3.1) Sigma-Aldrich temsilcisi Interlab firmasından satın alınmıştır.



şekil 3.1. Atık ekmeklerin enzimatik hidrolizinde kullanılan enzimler

3.2. Yöntem

3.2.1. Atık Ekmeklerin Kimyasal Bileşimin Belirlenmesi ve Enzimatik Hidrolize Hazırlanması

Atık ekmekler 2-5 cm'lik ufak parçalara kesildikten sonra sabit nem miktarına gelinceye kadar 50 °C'de kurutulmuştur (şekil 3.2). Daha sonra ekmekler laboratuvar tipi öğütücüde öğütülerek toz haline getirilmiş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Ekmeğin kimyasal kompozisyonunun belirlemek amacıyla; nem miktarı tayini standart kurutma metodu ile materyalin 95 °C’de 24 saat, sabit ağırlığa gelinceye kadar tutulması ile gerçekleştirilmiştir.

Kül miktarı ekmeklerin bir gece boyunca 550 °C sıcaklıktaki kül fırınında sabit ağırlığa gelinceye kadar yakılması ve yakılan örneklerin desikatörde soğutulduktan sonra tartılması ile hesaplanmıştır (AOAC, 2000).



Şekil 3.2. Kurutulmak üzere ufak parçalara kesilmiş ekmekler

3.2.1.1. Nişasta Analizi

Atık ekmeklerdeki nişasta miktarı ISO 10520 (1997) metodu ile belirlenmiştir. Kuru ekmek içerisindeki nişasta miktarı ortalama %87 olarak tespit edilmiştir.

3.2.2. Toplam Şeker ve İndirgen Şeker Analizi

Ekmeğin hidrolizatlarının glukoz miktarı, refraktif index detektörüne (RID) sahip Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile, Johansen vd. (1996)'nin önerdiği metoda göre belirlenmiştir. Bu metoda göre, 1 g örnek (ekmek hidrolizat süzüntüsü) 25 mL hacimli erleninde tartıldıktan sonra 10 mL % 80 (v/v) etanol ilave edilmiştir. Erlen termostatlı su banyosunda manyetik karıştırıcıda 80 °C’de 30 dk bekletilmiştir. Örnek soğutulduktan sonra 10 mL’lik plastik tüplere alınarak 10.000 g, 10 dk sentrifüj edilmiştir. Supernatant toplanmış ve 0,45 µm PTFE membrandan filtre edilmiştir. Filtre edilen çözülden 20 µL

HPLC sistemine enjekte edilmiştir. HPLC karbonhidrat kolonu VA 300/7.7 NUCLEOGEL SUGAR 810 H, hareketli faz akış hızı 0,6 mL/dk, kolon fırın sıcaklığı 35 °C.

3.2.3. Ekmeğin Enzimatik Hidrolizi

Ekmekteki nişastanın fermentasyon ürünleri üretiminde kullanılabilmesi için fermente edilebilir basit şekere dönüşürülmesi gerekmektedir.

Enzimatik hidroliz asit veya alkali hidrolizlerle karşılaştırıldığında; düşük toksisite, düşük maliyet ve düşük korozyon gibi nedenlerle avantajlı bir uygulamadır. Ayrıca enzimatik hidrolizde inhibitör yan ürünler de oluşmaz. Asit hidrolizi sonucunda asetik asit, furfural ve 5 hidroksimetilfurfural gibi çeşitli yan ürünler meydana gelmektedir. Bu ürünler; biyolojik aktiviteleri inhibe etme, enzim aktivitesini düşürme, DNA'yı parçalama, protein oluşumunu ve RNA sentezini inhibe etme gibi mekanizmalarla mikroorganizmaya ve dolayısıyla fermentasyon prosesine zarar vermektedir. Dolayısıyla fermentasyon için kullanılacak hidrolizatların detoksifiye işlemine tabi tutulması gerekmektedir (Sarkar, Ghosh, Bannerjee ve Aikat, 2012; Gunasekar, Reshma, Treesa, Gowdhaman ve Ponnusami, 2014).

Atık ekmeğin hidrolizinde kullanılan değerler Demirci, Palabıyık, Gumus ve Ozalp (2017)'nin yapmış oldukları enzimatik hidroliz optimizasyon çalışması sonuçları doğrultusunda belirlenmiş olup, atık ekmeğin enzimatik hidrolizi bu çalışmanın yöntemine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler ışığında ekmeğin enzimatik hidrolizi 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

Hidrolizin ilk aşamasında; jelatinize nişasta çözeltisinin viskozitesini düşürmek ve amiloz ve amilopektin zincirinin ortasındaki α -1.4 glikozidik bağları kırarak kısa zincirli dekstrinleri oluşturmak için sıcaklığa dayanıklı α -amilaz (EC 3.2.1.1) enzimi (Termamyl 120 L) kullanılmıştır. Ekmeğin enzimatik sıvılaştırma işlemi 1 litrelik erlenlerde mekanik karıştırıcı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş atık ekmeğin distile su ile karıştırılmış ve pH'sı 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ veya NaOH çözeltileri kullanılarak 6.0' ya ayarlanmıştır. Erlenler su banyosunda 45°C'de 20 dk ön ısıtmaya tabi tutulmuştur. Ekmeğin bulamacının sıcaklığı 60°C'ye ulaştığında Termamyl 120 L enzimi ilave edilmiş ve toplam ağırlık distile su ile 200 gr'a tamamlanmıştır. Daha sonra örnekler 90°C'ye getirilmiş ve sıvılaştırma işlemi 150 rpm çalkalama hızında 60 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler 50°C'ye soğutulmuştur.

Nişasta hidrolizinin ikinci basamağında (sakkarifikasyon), dekstrinler monomer şekerler (glukoz) elde etmek amacıyla glukoamilaz (amiloglukozidaz) (EC3.2.1.3) (AMG 300 L) enzimi ile sakkarifikasyon işlemi geręekleřtirilmiřtir. Sıvılaştırılmış sũspansiyonun pH'sı $1 \text{ molL}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ çözeltisi ile 5.0'e ayarlanmıştır. Sakkarifikasyon denemeleri çalkalamalı inkũbatörde, 55°C sıcaklıkta ve 200 rpm karıştırma hızında geręekleřtirilmiřtir. Sakkarifikasyon 24 saat boyunca yũrütũlmũř ve sũre sonunda sũspansiyon hemen 20°C 'ye soğutulmuştur. Ekmeğin enzimatik hidroliz prosesi Şekil 3.3'te gũsterilmiřtir:

Enzimatik hidroliz prosesi

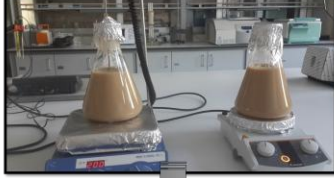
Atık ekmeklerin küçük parçalara doğranması ve 50°C'de 24 saat kurutma



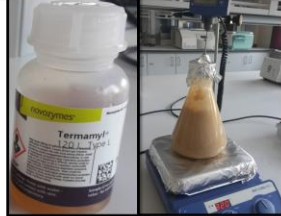
Kurutulan ekmekleri öğütücüde un haline gelecek şekilde öğütme



Atık ekmek süspansiyonunun hazırlanması (200 g ekmek, 800 gr saf su), pH ayarlama (1 mol L⁻¹ H₂SO₄ veya NaOH ile pH 6.0)
Ön ısıtma (su banyosunda 45°C'de 20 dk)



Sıvılaştırma aşaması
(Ekmek bulamacının sıcaklığı 60°C'ye ulaştığında Termamyl 120 L enzimi (0.03 KNU/g substrat) ilave edildi. Daha sonra örnekler 90°C'ye getirilerek sıvılaştırma işlemi 150 rpm karıştırma hızında 60 dk boyunca gerçekleştirilmiştir.



Sakkarifikasyon aşaması
(Sıcaklık: 60°C, pH: 5.0, süre: 24 s, glukoamikaz AMG 300 L (1.2 AGU/g substrat))



Soğutma 20°C

Şekil 3.3. Enzimatik hidroliz prosesi

3.2.4. Kùltürlerin Muhafazası

a. Koruyucu ortamda muhafaza

Kùltürleri muhafaza etmek ve genetik profilindeki değişim riskini azaltmak amacıyla izolatlar -40 °C'de dondurularak korunmaktadır. Kùltürler, Yeast Malt Broth (YM broth) besiyerinde (içerik Çizelge 3.2'de gösterilmektedir) 28±2 °C'de inkübe edildikten sonra steril kriyokoruyucu gliserol (%30 v/v) ilave edilmiş ve karışım iyice homojenize edilmiştir. Daha sonra süspansiyon uygun steril mikrotüplere (1.5 mL) aktarılmış ve hızlı bir şekilde -40 °C'de dondurulmuştur. Bütün prosedürler aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir (Stanbury, Whitaker ve Hall, 2000).

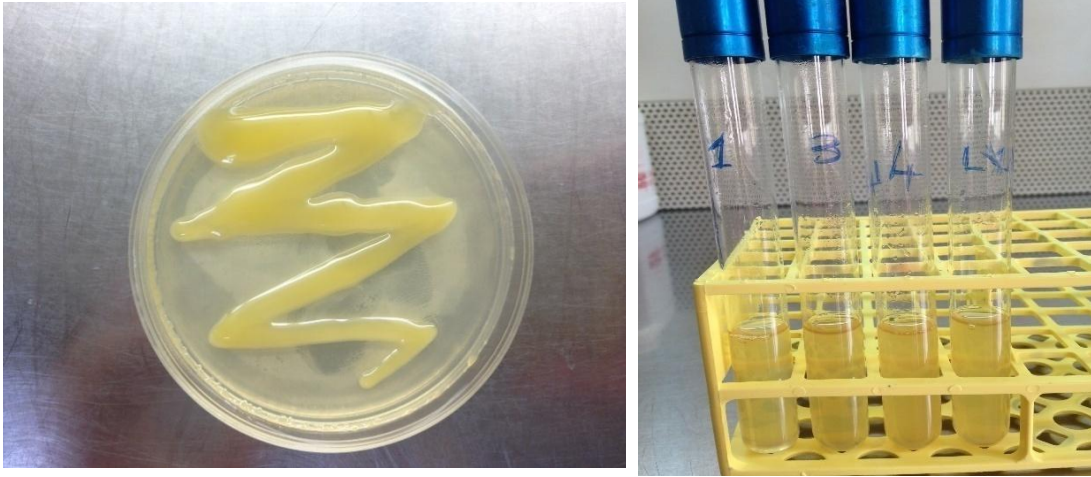
b. Yatık Agarda Muhafaza

Kısa süreli muhafazalar için bakteri kùltürleri Yeast Malt (YM) agar (içerik Çizelge 3.2'de gösterilmektedir) içeren tüplere öze ile çizim yapılmış ve 28 °C±2°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yatık agar kùltürleri buzdolabında muhafaza edilmiştir. Yatık agar kùltürleri 14 günde bir tazelenmiştir.

3.2.5. Bakteri İnokulantlarının Hazırlanması

Ksantan fermentasyonu için bu basamak gerçekten önemlidir, çünkü ksantan bakterinin kapsülüdür ve gam mikroorganizma gelişirken üretilmektedir. Hücrelerin besinleri almasına çok büyük bir engel olması sebebiyle, bu basamakta ksantan gam üretimi istenmez. Üretimde kullanılacak inokulumun üssel üreme fazında olması ve ksantan gamsız, önemli biyokütle konsantrasyonuna sahip olması gerekmektedir. Bu sebeplerden dolayı inokulum 2 aşamada hazırlanmıştır:

İlk aşamada; taze yatık agar kùltürlerinden (24 saat) bir öze dolusu hücrenin 7 mL YM broth (pH 7,0) içeren tüplere transfer edilmiştir ve tüpler 28 °C, 180 rpm de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu kùltür, 20 mL YM broth içeren erlenlere transfer edilmiş ve 6 saat 28 °C'de 180 rpm'de inkübe edilmiştir. Hücre konsantrasyonu McFarland ile tespit edilmiştir. Elde edilen inokulum (hücre konsantrasyonu yaklaşık 10⁸ hüce/mL) ksantan gam üretim denemelerinde kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. YM agar ve broth da geliştirilen *Xanthomonas* kültürleri

3.2.6. Ksantan Gam Üretim Optimizasyonu (Deneysel Metodoloji)

Bu aşamada incelenen 3 faktörün (glukoz oranı, bakteri inokulum hacmi ve karıştırma hızı) çalışılan izolatlardan gam eldesi üzerine etkisinin bulunması ve faktörlerin optimizasyonu 14 deneme noktasından oluşan Box-Behnken deney (BBD) tasarımından elde edilmiştir. Burada amaç daha az sayıda deney noktası ile gam verimini maksimum yapan faktör seviyelerinin tespit etmek ve matematiksel ve istatistiksel optimizasyon işlemini gerçekleştirip izolatların gam üretim verimlerini kıyaslamaktır. Box-Behnken deney tasarımına göre deneme noktaları Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. BBD analizi ve optimizasyon işlemi sonucunda en yüksek gam üretim veriminin hangi *Xanthomonas* türünden ve çalışılan 3 faktörün hangi seviyelerinden elde edildiği saptanmıştır. Optimizasyonda faktörlerin lineer ve interaksiyon etkileri Denklem 3.1’de gösterilen denkleme uyarlanmıştır.

$$\gamma = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

Burada γ , tahmini yapılan sonuç değeri; β_0 , β_i , β_{ij} regresyon katsayıları; X_i ve X_j , kodlu bağımsız değişkenlerdir.

Çizelge 3.2. Atık ekmek hidrolizatlarının substrat olarak kullanıldığı, BBD deneme dizaynına göre 14 farklı deney noktası

Deneme noktaları	Deneme faktörlerinin kodlu seviyeleri		
	Glukoz oranı (%)	Bakteri inokulum miktarı (%)	Karıştırma Hızı (rpm)
1	8	5	300
2	12	10	150
3	8	10	225
4	12	5	225
5	8	15	150
6	4	15	225
7	12	10	300
8	4	5	225
9	12	15	225
10	8	5	150
11	8	10	225
12	8	15	300
13	4	10	150
14	4	10	300

3.2.7. Ksantan Gam Üretimi

Ksantan gam üretiminde; karbon kaynağı olarak ekmek hidrolizatı, azot kaynağı, potasyum fosfat ve diğer iz elementlerin bulunduğu steril bir ortamda bitkilerden izole edilmiş 3 farklı *Xanthomonas izolatları* ve *X. campestris* DSM 19000 (NRRL B-1459) izolatı kullanılarak 1000 mL'lik erlenler içerisinde, çalkalamalı inkübatörde aerobik fermentasyon ile üretilmiştir. Fermentasyon besiyerinde karbon kaynağı olarak atık ekmek hidrolizatı kullanılmıştır.

3.2.7.1. Ksantan gam üretim besiyeri

Ksantan gam üretmek için kullanılan besiyerinin bileşimi Çizelge 3.3'te verilmektedir (Liakopoulou-Kyriakides vd., 1999).

Çizelge 3.3. *Xanthomonas* kültürlerinin muhafazası, inokulum ve ksantan gam üretimi besin ortamı kompozisyonu (g L^{-1})
(Liakopoulou-Kyriakides, Psomas ve Kyriakidis, 1999)

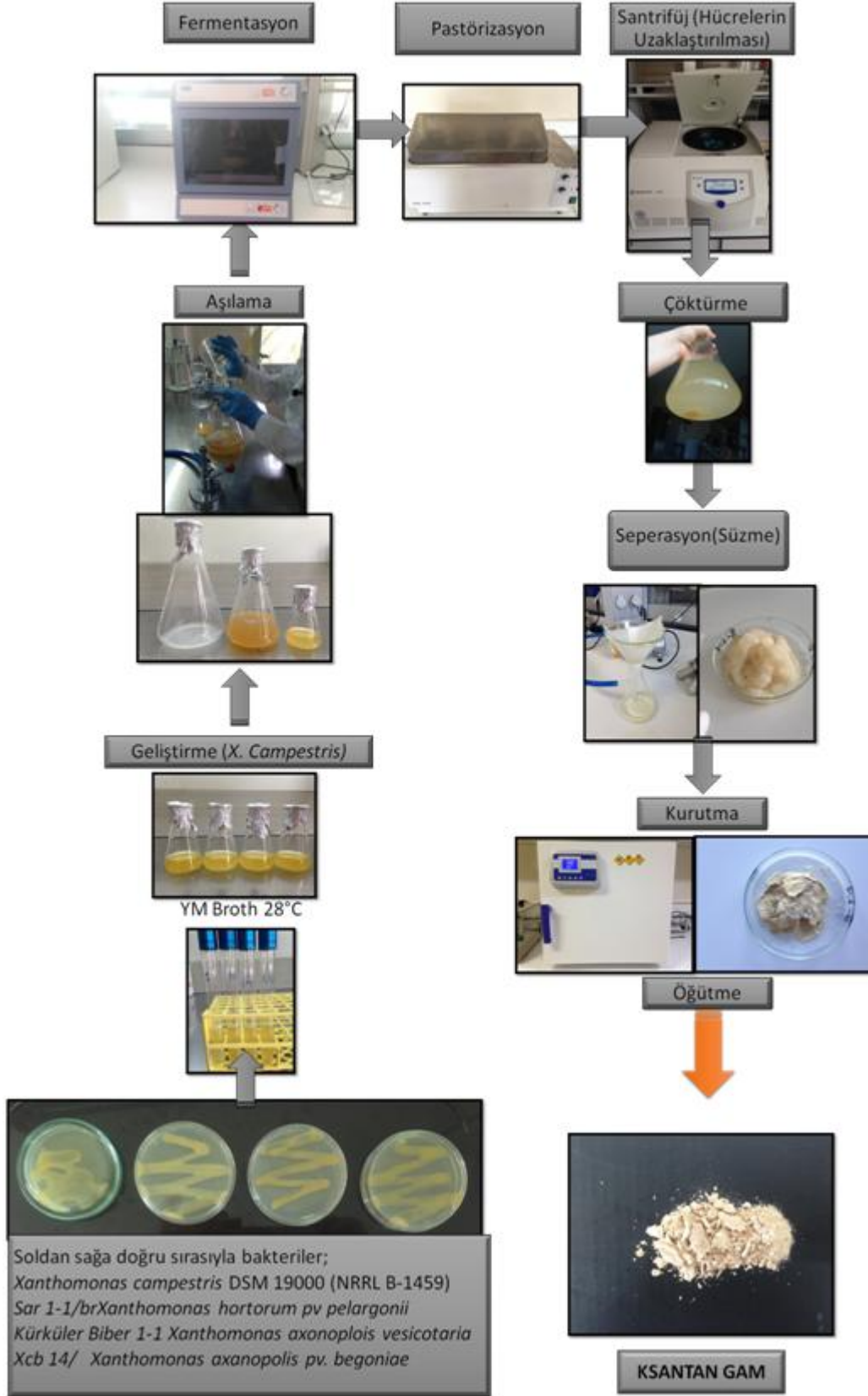
Bileşen	YM broth	YM agar	Standart Fermentasyon besiyeri	Atık ekmekli fermentasyon besiyeri
Glukoz	20,0	20,0	40	Farklı glukoz oranlarında (40-80-120) ayarlanmış ekmek hidrolizatları
Pepton	5,0	5,0	-	-
Yeast Ekstrakt	3,0	3,0	-	-
Malt Ekstrakt	3,0	3,0	-	-
Agar	20,0	20,0	-	-
Citric acid	-	-	2,1	2,1
KH ₂ PO ₄	-	-	2,866	2,866
MgCl ₂	-	-	0,507	0,507
Na ₂ SO ₄	-	-	0,089	0,089
H ₃ BO ₃	-	-	0,006	0,006
ZnO	-	-	0,006	0,006
FeCl ₃ 6 H ₂ O	-	-	0,020	0,020
CaCO ₃	-	-	0,020	0,020

Çizelge 3.3'te belirtilen maddeler 1000 mL hacimli erlen içerisinde 400 mL üretim besiyeri olacak şekilde hazırlanmış pH'sı 7,0 ayarlanmıştır. Ekmek hidrolizatındaki glukoz konsantrasyonu distile su ile farklı glukoz konsantrasyonları (40, 80 ve 120 g L^{-1}) olacak şekilde seyreltilmiştir. Besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra (ekmek hidrolizati ayrı steril edilmiştir) bakteri farklı oranlarda inoküle edilmiş ve

fermentasyon işlemi çalkalamalı inkübatörde, farklı karıştırma hızlarında 72 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık 28 °C’de sabit tutulmuştur.

Fermentasyondan sonra hücrelerin öldürülmesi için besiyeri 100 °C’de ısıtılma tabii tutulmuştur. Bu ısıtılma işlemi ayrıca ksantanın izolasyonunu kolaylaştırmakta, enzimleri inaktive etmekte ve ksantan reolojik özelliklerini geliştirebilmektedir (Borges, de Paula, Feitosa ve Vendruscolo, 2009).

Fermentasyon sonunda besiyeri; ksantan gam, bakteriyel hücreler ve birçok diğeri kimyasalları içermektedir. Gıda katkı olarak kullanılan ksantan, biyokütleden ve geri kazanım prosesinde kullanılan ayıraçlardan arınmış olmalıdır (Flores-Candia ve Dechwer, 1999). Ksantan gamın elde edilebilmesi için ilk önce hücreler, santrifüj yöntemi ile (10.000 rpm, 30 dk 4 °C) uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, supernatant içerisindeki gama, izopropanol kullanılarak (1:3 v/v) çöktürme işlemi uygulanmıştır (Şekil 3.6). Çökeltilmeden sonra, ürün mekanik olarak sudan uzaklaştırılmış ve etüvde 50 °C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulup, ksantan gam verimi hesaplanmıştır. Ksantan gam üretim akış şeması Şekil 3.5’te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Ksantan gam üretim akım şeması



Şekil 3.6. Santrifügasyon sonrası izopropanol ile ksantan gamın eldesi

3.2.8. Bakteriye Gelişimin Tespiti

Kuru hücre ağırlığı belirlenmesi amacıyla, 5 mL fermentasyon brothu belirli aralıklarda (0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde) alınmıştır. 10.000 rpm, 10 dk'lık santrifüjden sonra supernatant kısmı ayrılmış ve çöken biyokütle 105 °C'de 3 saat kurutulmuş ve son olarak, farklı zamanlardaki kuru hücre ağırlığı gL^{-1} olarak hesaplanmıştır (Niknezhad, Asadollahi, Zamani ve Biria, 2014).

3.2.9. Ksantan Gam Örneklerinin Fizikokimyasal, Kompozisyonel, Moleküler, Teknolojik ve Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.9.1. Fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi

Ksantan gam örneklerinin su aktiviteleri Beta Laboratuvar Cihazları Ltd. Şti. Aqua Lab 4TE masa tipi su aktivite cihazıyla (Şekil 3.7) $25,00 \pm 0,2$ °C'de tespit edilmiştir.

Kül miktarı gamların bir gece boyunca 550 °C sıcaklıktaki kül fırınında sabit ağırlığa gelinceye kadar yakılması ve yakılan örneklerin desikatörde soğutulduktan sonra tartılması ile hesaplanmıştır. Gamların pH değerleri dijital pH metre (WTW 330) kullanılarak tespit edilmiştir (AOAC, 2000).



Şekil 3.7. Masa tipi su aktivite cihazı (Aqua Lab 4TE)

3.2.9.2. Kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

a. Monosakkarit kompozisyonun ve glukuronik asit miktarının belirlenmesi

Gam örneklerinin monosakkarit kompozisyonu ve glukuronik asit miktarı, refraktif index detektörüne (RID) sahip Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile, Benhura ve Chidewe (2004)'nin önerdiği metoda göre belirlenmiştir. 10 mg gam örneği, 1 mL 2M trifloroasetikasit ile karıştırılarak 120 °C'de 3 saat süreyle hidrolize edilmiştir. Fazla asit uçurulduktan sonra 1'e 3 oranında saf su eklenmiştir. Hidrolize edilmiş ürün, 0.45 µm filtre ile süzöldükten sonra 0,02 mL örnek, şeker kolonuna sahip HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Hareketli faz olarak asetonitril:su (80:20) karışımı kullanılmış ve hareketli fazın akış hızı 2 mL/dakika olmuştur. Kolon sıcaklığı 30 °C' ye ayarlanmıştır. Monosakkaritler; glukoz, mannoz ve ramnoz şekerlerinin ve glukuronik asit alıkonma zamanlarıyla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu şekerler için oluşturulacak kalibrasyon grafikleriyle de gamda bulunan şeker miktarları hesaplanmıştır. HPLC karbonhidrat kolonu VA 300/7.7 NUCLEOGEL® SUGAR 810 H, hareketli faz akış hızı 0,6 mL/dk, kolon fırın sıcaklığı 35 °C.

b. Pirüvik asit içeriğinin belirlenmesi

Ksantan gam örneklerinde piruvat miktarı pirüvik asit enzimatik kitiyle (Sigma-Aldrich, Pyruvate Assay Kit MAK071) hesaplanmıştır. Gam örnekleri pirüvik asit tampon çözeltisi içinde 4'e 1 hacim oranında homojenize edilmiştir. Bu karışımın 46 mikrolitresi, 2 µL pirüvik asit prob solusyonu ve 2 µL piruvat enzim karışımıyla 50 mikrolitrelik hacime

tamamlanıp, elde edilen karışım, ölçüm yuvalarına pipet yardımıyla doldurulmuş ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Son olarak 570 nm absorbansta kolorimetride tespit edilmiştir (Cheetman ve Punruckvong, 1985).

c. Asetik asit içeriğinin belirlenmesi

Ksantan gam örneklerinde asetik asit miktarı asetik asit kolorimetrik kitiyle (Sigma-Aldrich, Acetate Assay Kit, MAK086) hesaplanmıştır. 10 mg gam örneği 100 mikrolitre buzlu-soğuk asetik asit tampon çözeltisinde homojenize edilmiştir. Bu karışımın 42 µL'si, 2 µL'lik asetik asit enzim karışımı, 2 µL'lik ATP, 2 µL'lik asetik asit substrat karışımı ve 2 µL'lik kolorimetrik proba 50 µL'lik hacme tamamlanmış ve bu karışım ölçüm yuvalarına pipet yardımıyla doldurulup oda sıcaklığında 40 dk inkübe edilmiştir. Son olarak 450 nm absorbansta asetik asit içeriği tespit edilmiştir.

3.2.9.3. Fiziksel özelliklerinin belirlenmesi

a. Moleküler ağırlığının belirlenmesi

Ksantan gamların ortalama moleküler ağırlığı farklı kayma hızlarında ve gam konsantrasyonlarında (c) (0,5-3 gL⁻¹) tespit edilen gam çözeltilerinin görünür viskozitesiyle (η_{sp}) belirlenmiştir. Çözücü olarak 1 gL⁻¹'lik NaCl'li distile su kullanılmıştır. Denklem 3.2'ye göre her bir ksantan gam çözeltisi için 0 kayma hızında (γ) öz viskozite (η_{sp0}) belirlenmektedir.

$$\eta_{sp} = \frac{1}{\frac{1}{[\eta_{sp0}] + k^{-1}\gamma^{1-n}} + \eta_{\infty}} \quad (3.2)$$

Farklı Ksantan gam çözeltileriyle elde edilen öz viskozite değerleri, denklem 3.3'te kullanılarak özgün viskozite (η) değeri belirlenmektedir.

$$\eta_{sp0} = c[\eta] + 0.44(c[\eta])^2 + 1.73 * 10^{-2}(c[\eta])^{4.24} \quad (3.3)$$

Bulunan özgün viskozite Mark-Howink denklemine göre ortalama moleküler ağırlıkla (M_g) bağlantılanmaktadır (Milas vd., 1985; Stokke ve Elgsaeter, 1992). Ksantan gam için kullanılan denklem 3.4'tür ve bundaki değerler literatürde bildirilmiştir.

$$\eta = 1.7 * 10^{-4} < M_g >^{1.14} \quad (3.4)$$

3.2.9.4. Reolojik özelliklerinin belirlenmesi

Üretilen ksantan gamların kütlece %0,5, 1 ve 2 oranlarında konsantrasyona sahip su-gam solüsyonlarının reolojik özellikleri iki farklı deformasyon testi uygulanarak (steady shear (sabit kayma) ve dynamic shear (dinamik kayma)) sıcaklık kontrollü (peltier sistemli) hassas gerilim reometre cihazı (TA DHR-2, ABD) (Şekil 3.8) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reolojik analizler, belirli bir paralel plaka konfigürasyonunda (çapı 40mm), test edilen ürüne göre 1-100s⁻¹ kayma hızı ve açılal frekansta, 5 ila 60 °C'ler arasında hassas olarak gerçekleştirilmiştir. 2,0 mL örnek, paralel plaka arasına yerleştirilmiş ve 10 saniye aralıklarla toplam 100 veri alınmıştır. Analizler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.8. Reometre cihazı (TA DHR-2, ABD)

a. Yatışkın kesme (Steady shear) akış davranış parametrelerinin belirlenmesi

Elde edilen reolojik verilerin, Power-law (Ostwald de Waele) modeline uyumu test edilmiş ve determinasyon katsayısı (R^2), kıvam katsayısı ve akış davranış indeksi değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Power law model: } \sigma = K (\dot{\gamma})^n \quad (3.5)$$

Burada σ kayma gerilimi (Pa), K kıvam katsayısı (Pa sⁿ), $\dot{\gamma}$ kayma hızı (s⁻¹), n akış davranış indeksi, σ_0 akma gerilimi (Pa) (Denklem 3.5)

Ürünlerin görünür vizkozite (apparent viscosity) değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Arrhenius model ile tanımlanmıştır (Denklem 3.6):

$$\eta = \eta_0 e^{(E_a/R(T+273.2))} \quad (3.6)$$

Burada η görünür vizkozite (Pa s), η_0 Arrhenius eşitliği sabiti (Pa s), E_a aktivasyon enerjisi (J mol⁻¹), R evrensel gaz sabiti (8.314 J mol⁻¹K⁻¹), T sıcaklıktır [°C].

b. Dinamik kayma (Dynamic shear) akış davranış parametrelerinin belirlenmesi

Süpürme frekansı testleri (Frequency sweep), dynamic oscillatory shear (dinamik titreşimli kayma) modu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Osilasyon (titreşim) testlerinde, örnekler sinus eğrisi gibi bir osilasyon gerilimine veya deformasyonuna tabi tutulmuş ve bu şekilde elastikiyet modülü (G') ve vizkozite modülü (G'') değerleri belirli frekans değerlerine karşı aşağıdaki gibi belirlenmiştir (Denklem 3.7 ve 3.8).

$$G' = G^* \cos \delta \quad (3.7)$$

$$G'' = G^* \sin \delta \quad (3.8)$$

İncelenen örneğin katı veya sıvı mı özellik gösterdiğini açık bir şekilde belirten loss tangent (Kayıp tanjant açısı, $\tan \delta$) değerleri, aşağıdaki denkleme göre belirlenmiştir (Denklem 3.9).

$$\tan \delta = G''/G' \quad (3.9)$$

Açısal frekans değerlerine karşı belirlenen dinamik reoloji parametreleri G' ve G'' , lineer regresyon analizine tabi tutularak ve intercept (kesme) değerleri (K' ve K''), eğim değerleri (n' ve n'') ve R^2 değerleri aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$G' = K'(\omega)n' \quad (3.10)$$

$$G'' = K''(\omega)n' \quad (3.11)$$

Burada ω açısal frekanstır (rad/s).

3.2.9.5. Teknolojik özelliklerinin belirlenmesi

a. Su tutma kapasitelerinin belirlenmesi

1 g ksantan gam örneği, 10 mL saf su içerisine koyularak 2 dk vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 3000 g'de 30 dk santrifüj edilmiş ve serbest su miktarı belirlenerek 100 g gam tarafından absorbe edilen su miktarı hesaplanmıştır (Galla ve Dubasi, 2010).

b. Yağ tutma kapasitelerinin belirlenmesi

1 g ksantan gam örneği, 10 mL rafine edilmiş ayçiçek yağı içerisine konulmuş ve 3000 g'de 30 dk santrifüj edildikten sonra 100 g gam tarafından absorbe edilen yağ miktarı belirlenmiştir (Galla ve Dubasi, 2010).

c. Çözünürlüklerin belirlenmesi

%0,1'lik ksantan gam çözeltisi 25 °C'de, 30 dk boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve işlem sonunda çözelti 6000 g'de 30 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak, 105 °C'de 24 saat süreyle kurutulmuş ve üst faz konsantrasyonu belirlenmiştir. Çözünürlük değeri, belirlenen üst faz konsantrasyon değerinin başlangıçtaki konsantrasyon değerine oranlanmasıyla yüzde olarak hesaplanmıştır (Dakia, Blecker, Roberta, Watheleta ve Paquota, 2008).

d. Köpük oluşturma kapasite ve stabilitelerinin belirlenmesi

1 g gam 100 mL saf su ile 13.000 rpm'de 5 dk karıştırıldıktan sonra 250 mL'lik ölçü silindirine aktarılarak, köpük hacmi 1, 10, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kaydedilmiştir. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi denklem 3.12 ve denklem 3.13 formülleri kullanılarak hesaplanmıştır (Coffman ve Garcia, 1977).



Şekil 3.9. Köpük oluşturma kapasite ve stabilitelerinin belirlenmesi

Köpük oluşturma kapasitesi

$$= - \frac{((Whipping \text{ sonrası hacim}) - whipping \text{ öncesi hacim))}{(whipping \text{ öncesi hacim})} \times 100 \quad (3.12)$$

$$Köpük \text{ stabilitesi} = \frac{(t \text{ zaman sonraki köpük hacmi})}{(başlangıç köpük hacmi)} \times 100 \quad (3.13)$$

3.2.10. Elde Edilecek Ksantan Gamlar ile Model Gıdalar (Puding) Yapılması ve Bu Model Gıdaların Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Gam İlavessiz Örnekler ile Karşılaştırılması

3.2.10.1. Puding örneklerinin hazırlanması

Puding örnekleri, 250 mL tam yağlı süt (%3 yağ), 6,25 g nişasta, 37,5 g şeker ve 0,5 g ksantan gam ile hazırlanmıştır. Kuru bileşenler süt ile manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Karışım ısıtılarak 3 dk boyunca kaynatılmış ve kaplara ilave edildikten

sonra 4 °C'ye soğutulmuştur. Hazırlanan puding örnekleri 24 saat 4 °C'de bekletildikten sonra reolojik analizleri yapılmıştır.

3.2.10.2. Puding örneklerinin reolojik özelliklerinin belirlenmesi

Bir önceki aşamada optimum reolojik özelliğe sahip olduğu belirlenen gam örneklerinin ilave edilmesiyle hazırlanan pudinglerin steady shear (sabit kayma), dynamic shear (dinamik kayma) ve creep-recovery (sürünme toparlanması) deformasyon testleri peltier sistemli kontrollü gerilim reometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve gam ilavesiz örnekler ile karşılaştırılmıştır. Puding örneklerinin steady shear, dynamic shear ve creep-recovery özelliklerinin belirlenmesinde uygulanacak işlem ve metodlar, matematiksel modelleme ve simülasyon analizleri, solüsyon halindeki ksantan gam örneklerinin reolojik özelliklerinin belirlenmesinde uygulanan olanlarla aynıdır.

3.2.11. İstatistiksel Analiz

Denemeler sonucunda toplanan veriler Windows tabanlı SPSS 17.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US) istatistik paket programı kullanılarak gruplar arasında istatistiksel olarak fark olup olmadığı tek yönlü ANOVA Tukey testi ile uygulanarak belirlenmiştir ($p < 0,05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Xanthomonas* İzolatları Kullanılarak Atık Ekmek Hidrolizatından Ksantan Gam Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Fermentasyon Şartlarının Gam Üretim Verimine Etkisi

Elde edilen atık ekmek hidrolizatları distile su ile farklı glukoz konsantrasyonlarında olacak şekilde (40, 80 ve 120 gL⁻¹) seyreltilmiş ve fermentasyon besiyerinde tek karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Substrat olarak hidrolize atık ekmeğin kullanıldığı ön optimizasyon denemelerinde (bu denemelerde glukoz oranı % 2-6 arasında çalışılmıştır), kullanılan mikroorganizmalar için glukoz oranının artırılması ile ksantan gam veriminin artış gösterdiği görülmüştür. Bu sebeple literatürde belirtilen glukoz oranlarından daha yüksek olacak şekilde glukoz oranı % 4-12 arasında olan yeni bir optimizasyon deneme deseni hazırlanmış ve denemeler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

Bir biyoteknolojik prosesin başarısı için proses parametrelerinin kontrolü ve düzenlenmesi çok büyük önem arz etmektedir (Dodic vd., 2011). Substrat olarak hidrolize atık ekmeğin kullanıldığı denemelerde glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızının Yüzey Yanıt Yöntemi ile optimizasyonu sonucu elde edilen Box-Behnken deney dizaynı ve sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmektedir. Her bakteri için elde edilen sonuçların değerlendirmeleri alt başlıklar altında verilmiştir.

Çizelge 4.1. Substrat olarak hidrolize atık ekmeğin kullanıldığı denemelerde glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızının Yüzey Yanıt Yöntemi ile optimizasyonu sonucu elde edilen Box-Behnken deney dizaynı

Deneme	Glukoz oranı (%)	İnokulum hacmi (%)	Karıştırma hızı (rpm)	Ksantan gam (gL ⁻¹)			
				<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>X. campestris</i> DSM 19000
1	4,00	10,00	150,00	5,95	3,60	3,77	4,40
2	8,00	15,00	300,00	10,03	8,85	9,10	11,20
3	8,00	5,00	300,00	10,75	9,70	2,70	11,40
4	8,00	10,00	225,00	7,89	9,69	14,10	9,95
5	4,00	10,00	300,00	7,20	4,80	6,90	4,20
6	4,00	15,00	225,00	0,90	4,60	5,30	4,40
7	12,00	10,00	300,00	11,30	5,40	2,50	5,60
8	8,00	10,00	225,00	8,00	9,00	13,00	10,00
9	8,00	15,00	150,00	2,20	1,80	2,30	2,40
10	12,00	5,00	225,00	1,80	6,20	1,80	4,80
11	8,00	5,00	150,00	11,30	10,36	9,60	13,02
12	4,00	5,00	225,00	5,30	3,57	4,55	6,40
13	12,00	15,00	225,00	1,70	6,85	1,50	6,90
14	12,00	10,00	150,00	6,60	4,80	14,37	6,80

***X. hortorum pv. pelargonii*:**

Yüzey yanıt yöntemi kullanılarak *X. hortorum pv. pelargonii*'nin tek karbon kaynağı atık ekmek hidrolizatları ile kesikli kültüründe; glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızının ayrı ayrı ve bunların interaktif etkilerinin ksantan üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Uygulanan yüzey yanıt yöntemi optimizasyonu sonucunda elde edilen istatistiksel değerler Çizelge 4.2'de verilmektedir. p-değeri 0,05'in altındaki faktörler önemli bulunmuş, böylelikle oluşturulan model etkili bulunup, inokulum hacmi, karıştırma hızı, glukoz oranı karesi ve karıştırma hızının karesi önemli etkenleri teşkil etmişlerdir ($p < 0,05$).

Optimizasyon sonucunda 2FI (İki faktörlü İnteraksiyon) modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre glukoz oranının ve karıştırma hızının çalışan aralık değerlerinin en üst seviyesinde olması, *X. hortorum pv. pelargonii* izolatının atık ekmeklerden gam üretim veriminde sırasıyla çok etkili düşüşe ve artışa sebep olmaktadır. Parametreleri ayrı ayrı incelediğimiz zaman, genel eğilim olarak inokulum hacminin azaltılıp karıştırma hızını arttırmanın verime olumlu yansıdığı sırasıyla aldıkları negatif ve pozitif değerden anlaşılmaktadır.

Karıştırma hızının, kütle transfer özelliklerini arttırarak gelişme ve mikrobiyal hücrelerin performansı açısından yararlı olacağı beklenilmektedir (Garcia-Ochoa vd., 2000). Karıştırma hızının arttırılması bazı araştırmacılar tarafından yapışkan tabakanın inceltilmesi, besin maddeleri ve oksijen transferinin arttırması sebebiyle önemli bulunmuştur (Papagianni vd., 2001). Bazı araştırmacılar da farklı bakteri türlerini kullandıkları çalışmalar sonucunda daha yüksek karıştırma hızının ksantan gam üretimi için gerekli olduğunu belirtmişlerdir (Mesomo vd., 2009; Borges vd., 2009; Gilani vd., 2011).

Çizelge 4.2. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. hortorum* pv. *pelargonii*)

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	159,67	7	22,81	7,48	0,0129
A-Glukoz oranı	0,51	1	0,51	0,17	0,6968
B-Inokulum hacmi	25,63	1	25,63	8,40	0,0274
C-Karıştırma hızı	21,78	1	21,78	7,14	0,0369
BC	17,56	1	17,56	5,75	0,0534
A ²	31,95	1	31,95	10,47	0,0178
B ²	17,82	1	17,82	5,84	0,0521
C ²	28,51	1	28,51	9,34	0,0223

2FI Denklem:

$$\begin{aligned} X. hortorum \text{ pv. } pelargonii \text{ verim} = & \\ & +7,95 \\ & +0,25 * A \\ & -1,79 * B \\ & +1,65 * C \\ & +2,09 * B * C \\ & -3,16 * A^2 \\ & -2,36 * B^2 \\ & +2,98 * C^2 \end{aligned}$$

Ayrıca optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

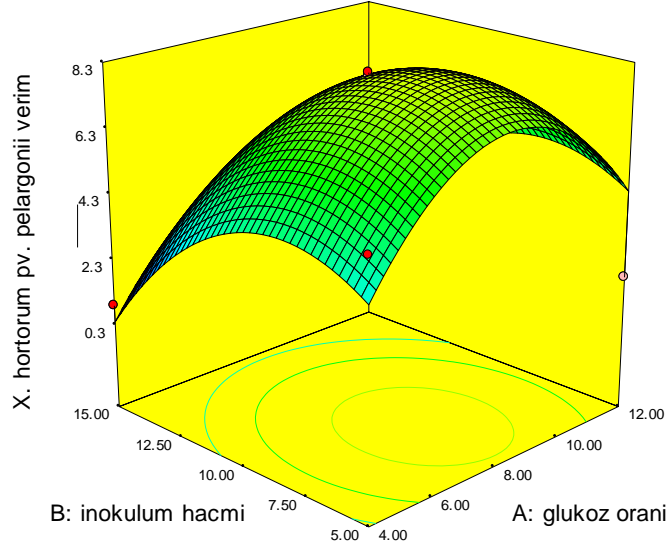
Design-Expert® Software

X. hortorum pv. pelargonii verim



X1 = A: glukoz oranı
X2 = B: inokulum hacmi

Actual Factor
C: karisitima hizi = 225.00



Şekil 4.1. Glukoz oranı ve inokulum hacminin *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

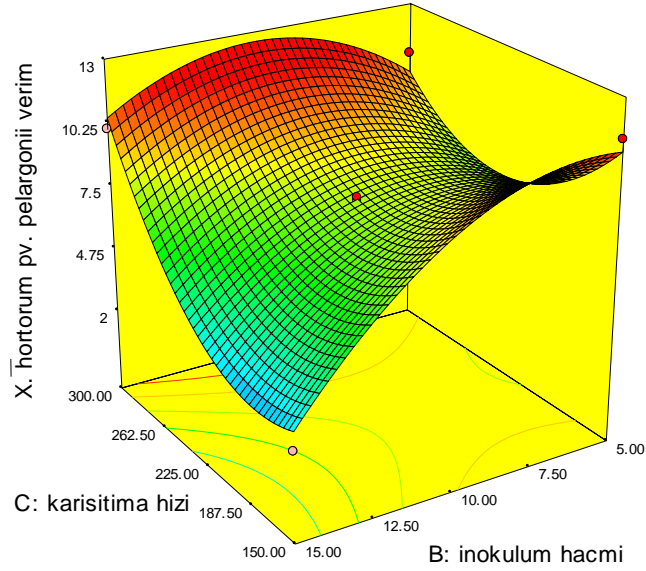
Design-Expert® Software

X. hortorum pv. pelargonii verim



X1 = C: karisitima hizi
X2 = B: inokulum hacmi

Actual Factor
A: glukoz oranı = 8.00



Şekil 4.2. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

Model denklemiyle oluşturulan 3 boyutlu verim grafiklerine bakıldığında; *X. hortorum* pv. *pelargonii*'nin atık ekmeklerden ksantan gam üretim veriminde optimum glukoz oranının %8 civarı olduğu görülmekte ve bu orandan azaltma veya yükseltmenin verimde ciddi düşümlere yol açtığı görülmektedir. İnokulum hacminin ise %7,5 civarında olması ile optimum verim ürettiği tespit edilmiştir. Karıştırma hızının optimum miktarının inokulum hacmine göre değiştiği gözlenmiştir; inokulum hacmi yüksek ise karıştırma hızının çalışılan şartlar aralığında en yüksek olması gerektiği, inokulum hacmi çok düşük ise karıştırma hızının en düşük olması gerektiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2).

En yüksek ksantan gam konsantrasyonunun ise 12,5 gL⁻¹ ile glukoz oranı %7,5, inokulum hacmi %10,2 ve karıştırma hızı 300 rpm şartlarında elde edileceği model numerik optimizasyonuyla tespit edilmiştir. Bu gam konsantrasyonunun tekabül ettiği ürün verimi ise 0,166 g g⁻¹ ekmekten gelen başlangıç şekerdir.

***X. axonopodis* pv. *begoniae* :**

X. axonopodis pv. *begoniae* izolatının atık ekmeklerden ksantan gam üretiminin yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu sonucunda elde edilen istatistiksel değerler Çizelge 4.3'te verilmektedir. Glukoz oranı, inokulum hacmi, karıştırma hızının ve B*C (inokulum hacmi *karıştırma hızı) interaksyonunun gam verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz (p>0,05) bulunmuştur. Sadece glukoz oranı karesi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

Optimizasyon sonucunda 2FI modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre B*C interaksyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Buradan, inokulum hacmi ve karıştırma hızı parametrelerinin her ikisinin artırılması veya azaltılması ile verimin pozitif yönde etkileneceği tahmin edilmektedir. Ortamdaki hücre konsantrasyonunun artması durumunda, hücrelerin çözünmüş oksijene ve besin maddelerine daha iyi bir şekilde ulaşması karıştırma hızının artırılması ile daha mümkün olabilmektedir.

Model denklemine göre, glukoz oranının çalışılan değer aralıklarının en üst seviyelerinde olması *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatına ait gam üretim veriminde düşüşe sebep olmaktadır. Ayrıca, denklemden parametrelerin etkisini ayrı ayrı incelediğimiz zaman; glukoz oranı (%9'a kadar) ve karıştırma hızının artırılmasının, inokulum hacminin düşürülmesinin gam verimine pozitif etki yapacağı görülmektedir.

Çizelge 4.3. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. axonopodis* pv. *begoniae*)

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	72,64	5	14,53	4,82	0,0250
A-Glukoz oranı	5,58	1	5,58	1,85	0,2109
B-Inokulüm hacmi	7,47	1	7,47	2,48	0,1542
C-Karıştırma hızı	8,38	1	8,38	2,78	0,1340
BC	14,86	1	14,86	4,93	0,0572
A ²	36,34	1	36,34	12,05	0,0084

2FI Denklem:

$$\begin{aligned} X. axonopodis \text{ pv. } begoniae \text{ verim} = & \\ & +8,23 \\ & +0,83 * A \\ & -0,97 * B \\ & +1,02 * C \\ & +1,93 * B * C \\ & -3,26 * A^2 \end{aligned}$$

Ayrıca optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.3 ve 4.4'te gösterilmektedir.

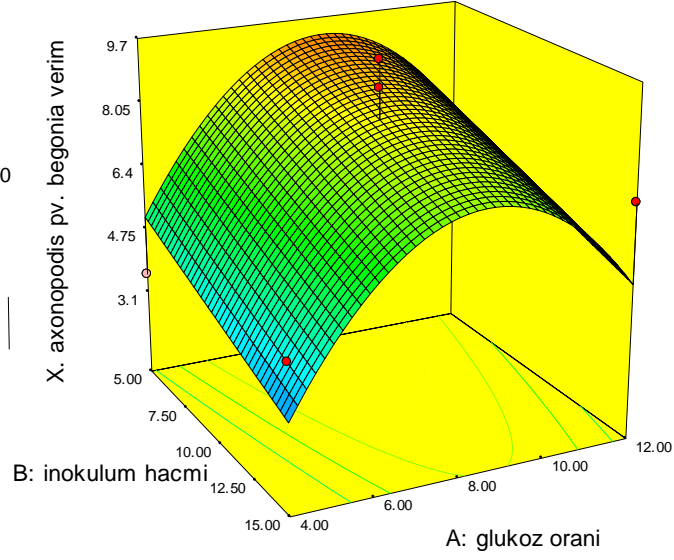
Design-Expert® Software

X. axonopodis pv. begonia verim

10.36
1.8

X1 = B: inokulum hacmi
X2 = A: glukoz oranı

Actual Factor
C: karisitima hizi = 225.00



Şekil 4.3. Glukoz oranı ve inokulum hacminin *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

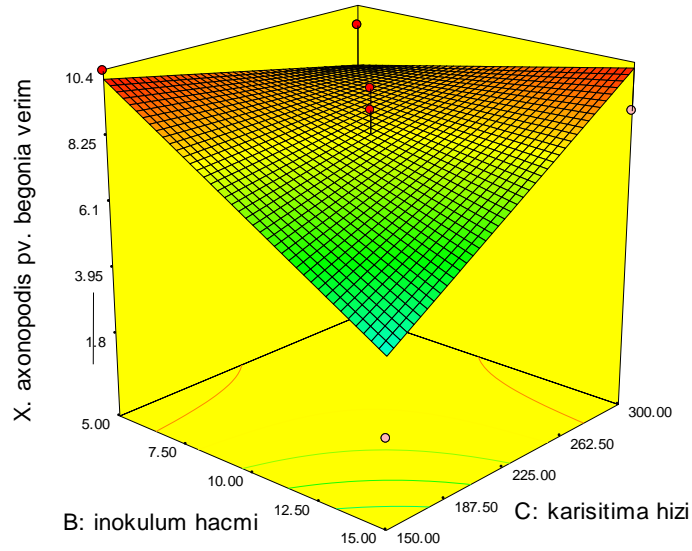
Design-Expert® Software

X. axonopodis pv. begonia verim

10.36
1.8

X1 = B: inokulum hacmi
X2 = C: karisitima hizi

Actual Factor
A: glukoz oranı = 8.00



Şekil 4.4. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

Model denklemiyle oluşturulan 3 boyutlu verim grafiklerine bakıldığında; 225 rpm karıştırma hızında, her bir glukoz konsantrasyonunda inokulum hacminin artışı verimin düşmesine sebep olmuştur. Bu nedenle madde yoğunluk artışının bu izolatın gam üretiminde olumsuz etki ettiği ve kütle transferiyle glukozun izolata ulaşmasının bu izolat için en önemli kriterlerden olduğu düşünülmektedir. Nitekim 300 rpm karıştırma hızına gelindiğinde en yüksek verimin %15 inokulum hacmiyle sağlandığı görülmüş ve yüksek kütle transferi ve inokulum hacmi verimi maksimum kılmıştır. Glukoz oranının %8 civarının altında veya üstünde olması ise verimin düşmesine neden olmuştur (Şekil 4.3 ve 4.4).

En yüksek ksantan gam konsantrasyonunun ise 10.3 gL^{-1} ile başlangıç glukoz oranı %8.5, inokulum hacmi %15 ve karıştırma hızı 300 rpm şartlarında elde edileceği model numerik optimizasyonu ile tespit edilmiştir. Bu gam konsantrasyonunun tekabül ettiği ürün verimi ise 0.121 g g^{-1} ekmekten gelen başlangıç şekerdir.

X. *axonopodis* pv. *vesicatoria* :

X. *axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatı ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen verilere uygulanan yüzey yanıt yöntemi optimizasyonu sonucunda belirlenen istatistiksel değerler Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. X. *axonopodis* pv. *vesicatoria*'dan ksantan gam üretiminde; A*C (glukoz oranı*karıştırma hızı), B*C (inokulum hacmi*karıştırma hızı) intraksiyonları ile glukoz oranı karesi ve inokulum hacmi karesi istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p < 0,05$), glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızı istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0,05$) olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon sonucunda 2FI modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre; glukoz oranının ve inokulum hacminin çalışılan değer aralığının en üst seviyelerinde olması, bir başka deyişle çok fazla arttırılması gam veriminde önemli düşümlere neden olmaktadır. İnokulum hacmi ve karıştırma hızı interaksiyonu (B*C) pozitif olarak belirlenerek, inokulum hacminin arttırılması ile karıştırma hızının da arttırılması gerektiği görülmüştür. Bu durum, ortamdaki hücre konsantrasyonunun artması ile hücrelerin yeterli oksijen ve besin maddelerine ulaşma imkanının ancak karıştırma hızının artışı ve dolayısıyla kütle transferinin artması ile mümkün olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	242,59	7	34,66	4,75	0,0380
A-Glukoz oranı	0,015	1	0,015	$2,10 \times 10^{-3}$	0,9649
B-Inokulüm hacmi	0,025	1	0,025	$3,47 \times 10^{-3}$	0,9549
C-Karıştırma hızı	9,77	1	9,77	1,34	0,2910
AC	56,25	1	56,25	7,72	0,0321
BC	46,92	1	46,92	6,44	0,0443
A ²	60,17	1	60,17	8,25	0,0283
B ²	90,43	1	90,43	12,41	0,0125

2FI Denklem:

X. axonopodis pv. *vesicatoria* verim =

$$\begin{aligned} &+11,94 \\ &-0,044 * A \\ &-0,056 * B \\ &-1,10 * C \\ &-3,75 * A * C \\ &+3,42 * B * C \\ &-4,25 * A^2 \\ &-5,21 * B^2 \end{aligned}$$

Optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmektedir.

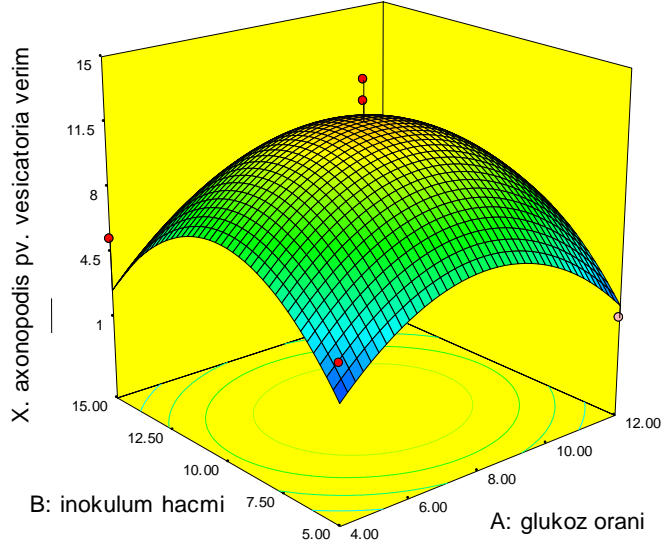
Design-Expert® Software

X. axonopodis pv. vesicatoria verim

14.37
1.5

X1 = A: glukoz oranı
X2 = B: inokulum hacmi

Actual Factor
C: karisitima hizi = 225.00



Şekil 4.5. Glukoz oranı ve inokulum hacminin *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

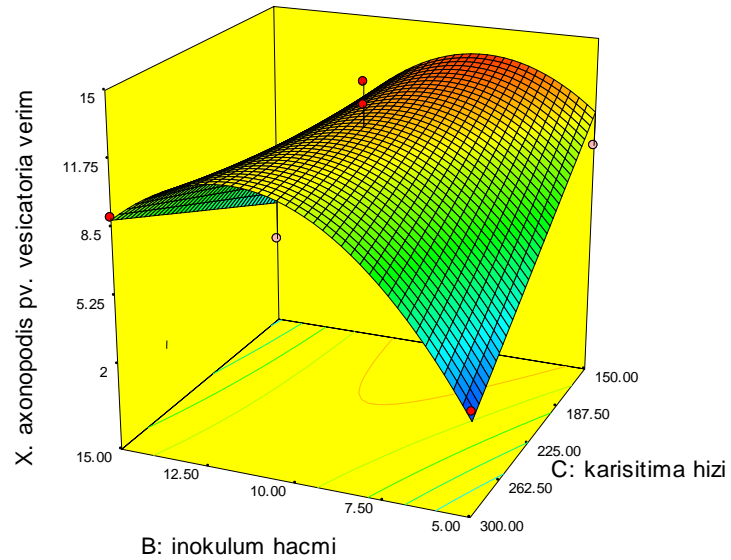
Design-Expert® Software

X. axonopodis pv. vesicatoria verim

14.37
1.5

X1 = B: inokulum hacmi
X2 = C: karisitima hizi

Actual Factor
A: glukoz oranı = 8.00



Şekil 4.6. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

Model denklemiyle oluşturulan 3 boyutlu verim grafiklerine bakıldığında 225 rpm karıştırma hızında çalışılan aralıkta orta seviyede glukoz yüzdesi ve inokulum hacminin en yüksek verime sebep olduğu görülmüştür. Genel olarak ise, en yüksek verim en düşük rpm'de gözlenmiştir. Bundan dolayı, bu izolatin çalışılmış diğer izolatlarla göre kayma hızıyla oluşan hidrodinamik kuvvetlere en dayanıksız izolat olduğu görülmüştür. Ghashghaei vd., (2016), üzüm suyu konsantresi kullanarak ksantan gam üretimi çalışmalarında en yüksek gam verimini 200 rpm'de elde etmişlerdir.

En yüksek ksantan gam konsantrasyonu ise $14,3 \text{ gL}^{-1}$ ile başlangıç glukoz oranı %9.6, inokulum hacmi % 8,5 ve karıştırma hızı 150 rpm şartlarında elde edileceği model numerik optimizasyonuyla tespit edilmiştir. Bu gam konsantrasyonunun tekabül ettiği ürün verimi ise $0,149 \text{ g g}^{-1}$ ekmekten gelen başlangıç şekerdir.

***X. campestris* DSM 19000 (NRRL B 1459):**

X. campestris DSM 19000 izolatinın atık ekmeklerden gam üretiminin yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu sonucunda elde edilen istatistiksel değerler Çizelge 4.5'te verilmektedir. Oluşturulan model etkili bulunmuş, inokulum hacmi*karıştırma hızı interaksiyonu ve glukoz oranı karesi önemli etkenleri teşkil etmiştir ($p < 0,05$).

Optimizasyon sonucunda 2FI modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre; çalışmada kullanılan izolatlarda olduğu gibi; glukoz oranının çalışılan değerler aralığının en üst seviyelerinde olmasının, ksantan gam verimi üzerine etkisinin negatif yönde olacağı belirlenmiştir. Ayrıca yine inokulum hacmi*karıştırma hızı interaksiyonunda, her ikisinin birden arttırılmasının veya azaltılmasının gam verimini arttıracağı, aldıkları pozitif değerden anlaşılmaktadır.

Denklemden parametrelerin etkisi ayrı ayrı incelendiği zaman; glukoz oranı (belli bir seviyeye kadar) ve karıştırma hızının arttırılması, inokulum hacminin azaltılması ile daha yüksek gam verimi elde edilebileceği öngörülmektedir.

Çizelge 4.5. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. campestris* DSM 19000)

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	109,62	5	21,92	5,81	0,0148
A-Glukoz oranı	2,76	1	2,76	0,73	0,4172
B-Inokulüm hacmi	14,36	1	14,36	3,81	0,0868
C-Karıştırma hızı	4,18	1	4,18	1,11	0,3235
BC	27,14	1	27,14	7,19	0,0278
A ²	61,18	1	61,18	16,21	0,0038

2FI Denklem:

$$\begin{aligned} X. \text{ campestris DSM 19000 verim} = & \\ & +9,66 \\ & +0,59 * A \\ & -1,34 * B \\ & +0,72 * C \\ & +2,60 * B * C \\ & -4,22 * A^2 \end{aligned}$$

Optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterilmektedir.

Design-Expert® Software

X.campestris

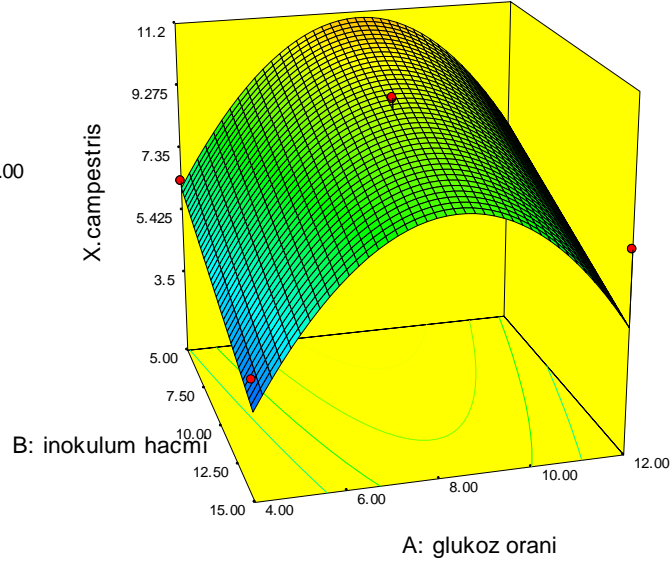
13.02
2.4

X1 = B: inokulum hacmi

X2 = A: glukoz oranı

Actual Factor

C: karisitima hizi = 225.00



Şekil 4.7. Glukoz oranı ve inokulum hacminin *X. campestris* DSM 19000 izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

Design-Expert® Software

X.campestris

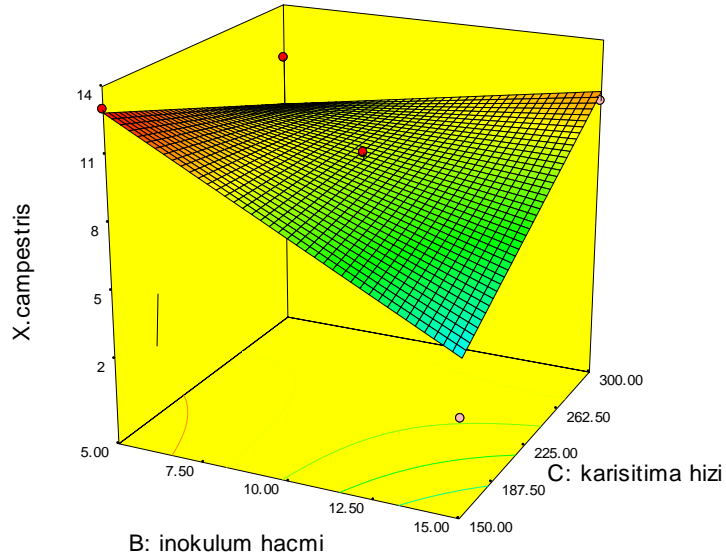
13.02
2.4

X1 = B: inokulum hacmi

X2 = C: karisitima hizi

Actual Factor

A: glukoz oranı = 8.00



Şekil 4.8. Karıştırma hızı ve inokulum hacminin *X. campestris* DSM 1900 izolatının atık ekmekten ksantan gam üretim verimi üzerine etkisi

Model denklemiyle oluşturulan 3 boyutlu verim grafiklerine bakıldığında; *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatına benzer bir şekilde, 225 rpm'de bütün glukoz oranlarında inokulum hacminin yükselmesi gam veriminin düşmesine yol açmıştır. Ancak en yüksek verim %8 glukoz oranında %5 inokulum hacmi ve en düşük rpm (150 rpm) kullanıldığında gözlenmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8).

En yüksek gam üretimi ise $12,9 \text{ gL}^{-1}$ ile başlangıç glukoz oranı %8,3, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 150 rpm şartlarında elde edileceği grafik merkez noktasında görülen şekilde, model numerik optimizasyonuyla tespit edilmiştir. Bu gam konsantrasyonunun tekabül ettiği ürün verimi ise $0,155 \text{ g g}^{-1}$ ekmekten gelen başlangıç şekerdir.

Kullanılan mikroorganizmaların, substrat olarak atık ekmek hidrolizati kullanılan fermentasyon ortamında ksantan gam üretim yeteneklerinin belirlenmesi ve fermentasyon şartlarının gam üretim verimine etkisi çalışmaları genel olarak değerlendirildiğinde şu sonuçlara varılmaktadır:

Üç izolat ve standart tür ile atık ekmeklerden ksantan gam üretim optimizasyonu çalışmalarında en yüksek gam konsantrasyonları, türler arasındaki fizyolojik farklılıklardan dolayı 10,3 ile 14,3 $12,9 \text{ gL}^{-1}$ arasında tespit edilmiştir.

Ksantan üretiminde karbon kaynağının önemli etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Ksantan gam üretiminde, atık ekmekten elde edilen optimum glukoz oranının %8 ile %9 aralığı olduğu tespit edilmiştir. Mikrobiyal fermentasyon boyunca, karbon kaynağı sadece hücrel materyallerin inşası için önemli bir öge olarak etki etmez, aynı zamanda gelişme ile bağlantılı polisakkarit sentezi ve enerji kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Daha düşük veya daha fazla glukoz oranının ise mikroorganizmaların atık ekmeklerden ksantan gam verimi üzerine etkisi olumsuz olmuştur.

Mikroorganizmaların sekonder metabolitleri olan ekstraselüler heteropolisakkaritlerin biyosentezi için fermentasyon besiyerindeki şeker içeriği büyük önem arz etmektedir (Dodic vd., 2011). Lo, Yang ve Min (1997) ve Dodic vd. (2011), yaptıkları çalışmalarda, fermentasyon besiyerindeki şeker oranının artması ile gam veriminin arttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde; Faria vd. (2010), şeker kamışı ile ksantan gam üretimi çalışmasında, başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun yüksek olmasının ksantan verimini arttırdığını belirtmişlerdir.

Moreno, Lopez, Vargas-Garcia ve Vazquez (1998)'de tarımsal atıklardan ksantan gam üretiminde, atık konsantrasyonunun artması ile ksantan veriminin arttığını bildirmişlerdir. Ben Salah vd. (2010), hurma suyunu substrat olarak kullandıkları çalışmada en yüksek verimi 86.68 gL^{-1} glukoz içeren besiyerinde elde etmişlerdir. Bir diğer çalışmada besiyerindeki sakkaroz konsantrasyonunun artırılması daha yüksek ozmotik basınca neden olmuş ve gam üretimini arttırmıştır. Yazarlar bu durumun muhtemelen biyokütlenin gam biyosentezi enzimlerinin indüklenmesi ile alakalı olabileceğini belirtmişlerdir (Carignatto, Oliveira, de Lima ve Neto 2011).

Karbon kaynağı konsantrasyonu, *Xanthomonas* hücreleri içerisine aktif şeker taşınması için önemli bir faktördür. Düşük konsantrasyonda karbonhidratın, ksantan üretiminde olumsuz etkisi, besiyerinden hücre içerisine karbonhidrat taşınmasının azalmasından ve maksimum hücre gelişimi için yeterli olmamasından kaynaklanabilmektedir. Yüksek konsantrasyonda karbonhidratın ksantan üretiminde olumsuz etkisi ise; büyük ihtimalle katabolik represyon etkisinden kaynaklanabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda karbon kaynağı, ksantan üretimini inhibe edebilir (Leela ve Sharma, 2000). Ayrıca başlangıçtaki yüksek şeker konsantrasyonu karbon kaynağı israfına neden olmaktadır.

Kullanılan izolatların, karbon kaynağı olarak atık ekmek substratı kullanıldığında yüksek verimde ksantan gam üretebildikleri görülmektedir. Yapılan denemeler sonucunda; kullanılan izolatların atık ekmeklerden ksantan gam verimleri standart bakteri *X. campestris* DSM 19000 ile karşılaştırıldığında verimlerin yakın veya daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek verimi *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatı sergilemiştir. Farklı *Xanthomonas* türleri ile karbon kaynağı olarak ticari glukoz içeren besiyerinde yapılan çalışmalarda; Nitschke ve Thomoas (1995), 5 farklı *X. campestris* izolatı kullanmış ve $10,6-14,5 \text{ g/kg}$ arasında değişen verim elde etmiştir. Rodriguez ve Aguilar (1997), farklı mutantlar ile çalışmış ve $7,4-11,4$ $12,9 \text{ gL}^{-1}$ arasında ksantan gam verimi belirlemişlerdir. 10 farklı *Xanthomonas* türünün kullanıldığı bir çalışmada, en yüksek üretimin *X. campestris* pv. *campestris* 1078 ($9,67 \text{ gL}^{-1}$) ile elde edildiği görülmüştür (Rottova vd., 2009). Karnabahar, lahana, havuç ve cevizden izole edilen 7 farklı izolat ile yapılan çalışmada, ksantan verimlerinin $5,9$ ile $8,0 \text{ gL}^{-1}$ arasında olduğu belirlenmiştir (Torrestiana, Fucikovskiy ve Galindo, 1990). 18 yeni *X. campestris* pv. *pruni* ile yapılan çalışmada verimler $2,3$ ile $8,3 \text{ gL}^{-1}$ arasında olmuştur (Moreira, Vendruscolo, Gil-Tunes ve Vendruscolo, 2001). Leela ve Sharma

(2000) yerel izolat ile 15,65 gL⁻¹ verim elde ederken, Borges ve Vendruscolo (2007), 3,8-9,2 gL⁻¹ arasında verim elde etmişlerdir.

Bununla beraber, atık ekmeklerin ksantan gam üretimi için çok uygun substratlar olabileceğini çalışma sonuçları göstermektedir. Çalışma sonuçlarına göre, kullanılan bakteriler en yüksek 10,36 ile 14,37 gL⁻¹ arasında değişen verimler sergilemişlerdir. Daha önce ksantan gam üretimi için farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı çalışmalarda şu sonuçlar elde edilmiştir: pirinç kepeği (17,10 gL⁻¹ ve 21,87 gL⁻¹), kestane ekstraktı (33 gL⁻¹), hurma suyu (24,5 gL⁻¹ ve 43,35 gL⁻¹), şeker pancarı melası (19,8 gL⁻¹), şeker kamışı küspesi (0,54 gL⁻¹ ile 8,44 gL⁻¹ arasında), şeker kamışı (20,3 gL⁻¹), düşük dereceli üzüm suyu konsantresi (14,35 gL⁻¹), peynir altı suyu (35,3 gL⁻¹), kavun atığı (1,6 gL⁻¹), narenciye atıkları (12 gL⁻¹), zeytin yağı atık suyu (7,71 gL⁻¹), pekmez (17,1 gL⁻¹), manyok küspesi (14 gL⁻¹) mutfak atıkları (11,73 gL⁻¹) ve peynir altı suyu (25 gL⁻¹, 12,8 gL⁻¹ ve 14 gL⁻¹), peynir altı suyu (8,72 ile 12,46 gL⁻¹) (Demirci, Arıcı ve Gümüş, 2012; Liakopoulou-Kyriakides vd., 1999; Ben Salah vd., 2010; Ben Salah, Chaari, Besbes, Blecker ve Attia, 2011; Moosavi ve Karbassi, 2010; Moreno vd., 1998; Gilani vd., 2011; Bilanovic, Shelef ve Green, 1994; Mesomo vd., 2009; Lopez ve Ramos-Cormenzana, 1996; Gomes vd., 2015; Faria vd., 2010; Ghashghaei vd., 2016; Woiciechowski vd, 2004; Li vd., 2016; Silva vd., 2009; Niknezhad vd., 2015; Molina, Fitzsimons ve Perotti, 1993; Savvides vd., 2012).

Genelde yüksek verimin inokulum hacmi ve karıştırma hızının her ikisinin aynı anda azaltılması veya artırılmasıyla elde edildiği gözlenmiştir. Bu da en yüksek gam verimi için bakteri sayısı ile besine ulaşmasına neden olan kütle transferi arasında optimum bir değer olduğunu ortaya koymaktadır. Örnek olarak; bakteri sayısı artışında karıştırma hızı yükseltilerek yeterli kütle transferinin sağlanması, bakteri sayısı azalmasında ise karıştırma hızının azaltılarak optimum değer üzerinde kütle transferinden kaçınılması gerektiği saptanmıştır. Yüksek miktardaki inokulumda, mikroorganizmaların aktif olarak gelişmeleri için ihtiyaç duydukları besinlere, yüzey alanına ve oksijene yeterli olarak ulaşabilmeleri için kütle transferinin artması gerekmekte, bu da karıştırma hızının artması ile mümkün olmaktadır.

Türe bağlı olarak optimum inokulum hacmi ve karıştırma hızı değişiklik gösterebilmektedir (Ben Salah vd., 2011). Ön deneme çalışmaları (glukoz aralığı %2-%6) sonuçlarında genel olarak karıştırma hızının artışının gam üretim verimine etkisi olumsuz olarak belirlenirken bu çalışma döneminde yapılan denemelerde genel olarak karıştırma hızı

artışının gam üretim verimini arttırdığı belirlenmiştir. Bu durum; denemelerde glukoz oranının ve dolayısıyla madde yoğunluğunun artması sebebiyle kütle transferini hızlandıracak karıştırma hızının da artması gerekliliğinin ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır.

Fermentasyon denemeleri, başlangıç pH'sı 7,0'a ayarlanmış ve pH kontrolsüz üretim gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon boyunca pH değişimleri incelendiğinde pH'nın fermentasyon boyunca çok fazla değişmediği ve fermentasyon sonunda da 6,5-7,0 civarlarında olduğu görülmüştür. Bu da fermentasyon besiyerinin iyi tamponlandığını ve bu deneysel şartlar altındaki proses boyunca tampon çözeltilerle pH kontrolüne gerek olmadığını göstermektedir.

4.2. Fermentasyon Şartlarının, *Xanthomonas* İzolatlarının Substrat Olarak Atık Ekmek Hidrolizatı Kullanarak Ürettiği Ksantan Gamların Reolojisine Etkisi

Bu kısımda, Box-Behnken deney dizaynı ile oluşturulmuş 14 farklı fermentasyon koşulunda (Çizelge 4.6) üretilen gamlardan %2 (w/w) olarak hazırlanmış su-gam çözeltisine 20 °C'de yatışkan kayma (steady shear) reolojik analizi uygulanmış ve kayma gerilimi (shear stress) değerleri kayma hızına (shear rate) karşı çizilip oluşan eğri power law modeline uyarlanmıştır. Çözelti kıvamını gösteren önemli model parametrelerinden K değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmektedir. Her bakteri için K değerlerinin Yüzey Yanıt Yöntemi ile optimizasyonu ve elde edilen sonuçların değerlendirmeleri alt başlıklar altında verilmiştir.

Çizelge 4.6. Substrat olarak hidrolize atık ekmeğın kullarıldığı denemelerde glukoz oranı, inokulum hacmi ve karıştırma hızının Yüzey Yanıt Yöntemi ile belirlenen deneme noktalarında elde edilen gamların K (Pa sⁿ) kıvım katsayıları

Deneme	Glukoz oranı (%)	İnokulum hacmi (%)	Karıştırma hızı (rpm)	K kıvım katsayısı (Pa s ⁿ)			
				<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>X. campestris</i> DSM 19000
1	4,00	10,00	150,00	0,054	0,066	0,015	0,023
2	8,00	15,00	300,00	0,029	0,019	0,039	0,27
3	8,00	5,00	300,00	0,03	0,005	0,00001	0,15
4	8,00	10,00	225,00	0,014	0,098	0,011	0,037
5	4,00	10,00	300,00	0,048	5,7	1,1	1,04
6	4,00	15,00	225,00	0,021	1,28	0,12	0,21
7	12,00	10,00	300,00	0,012	0,0006	0,0001	0,006
8	8,00	10,00	225,00	0,014	0,098	0,011	0,037
9	8,00	15,00	150,00	0,011	0,0062	0,0086	0,01
10	12,00	5,00	225,00	0,011	0,0065	0,00001	0,0088
11	8,00	5,00	150,00	0,175	0,0085	0,0001	0,009
12	4,00	5,00	225,00	0,24	24,5	0,86	11,2
13	12,00	15,00	225,00	0,011	0,01	0,0001	0,009
14	12,00	10,00	150,00	0,07	0,0066	0,006	0,0083

X. hortorum pv. *pelargonii* :

Uygulanan yüzey yanıt yöntemi optimizasyonu sonucunda elde edilen istatistiksel değerler Çizelge 4.7'de verilmektedir. p değeri 0,05 in altındakiler önemli faktör bulunmuş böylelikle oluşturulan model etkili bulunup, A-glukoz oranı, B-inokulum hacmi ve AB interaksiyonu önemli etkenleri teşkil etmişlerdir ($p < 0,05$).

Optimizasyon sonucunda 2FI (İki faktörlü İnteraksiyon) modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre; glukoz oranı ve inokulum hacminin aldığı eksi değerlerden anlaşılacağı gibi; bu parametrelerin sayısal değerlerinin artırılması, *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatından üretilen gamların K değerinde düşüşe sebep olmaktadır. Karıştırma hızının ise aldığı pozitif değerden anlaşılacağı üzere değerinin artması K değerinde pozitif etkiye sebep olacağı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.7. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. hortorum* pv. *pelargonii*)

Kaynak	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	0,01	6,5	0,01
A-Glukoz oranı	0,0083	5,45	0,04
B-Inokulum hacmi	0,018	11,99	0,008
C-Karıştırma hızı	0,0045	2,97	0,12
AB	0,012	7,8	0,023
BC	0,0066	4,32	0,0713

2FI Denklem:

$$\begin{aligned} X. hortorum \text{ pv. } pelargonii \text{ K değeri} = & \\ & +0,053 \\ & -0,032 * A \\ & -0,048 * B \\ & +0,024 * C \\ & +0,055 * A * B \\ & +0,041 * B * C \end{aligned}$$

Ayrıca kıvam katsayısı (K) optimizasyonu sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.9 ve 4.10’da verilmiştir.

Design-Expert® Software

1-pelargonii-K

0.24

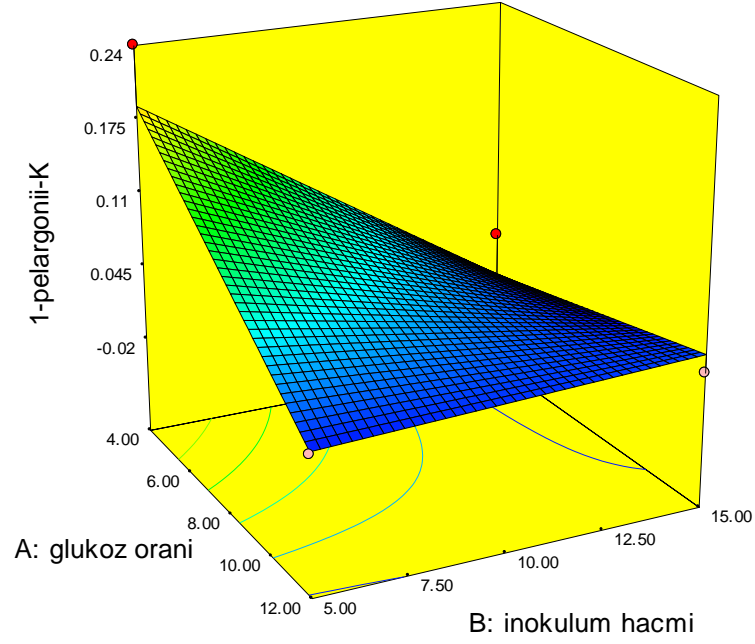
0.011

X1 = A: glukoz oranı

X2 = B: inokulum hacmi

Actual Factor

C: karışıtıma hızı = 225.00



Şekil 4.9. *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatu ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi

Design-Expert® Software

1-pelargonii-K

0.24

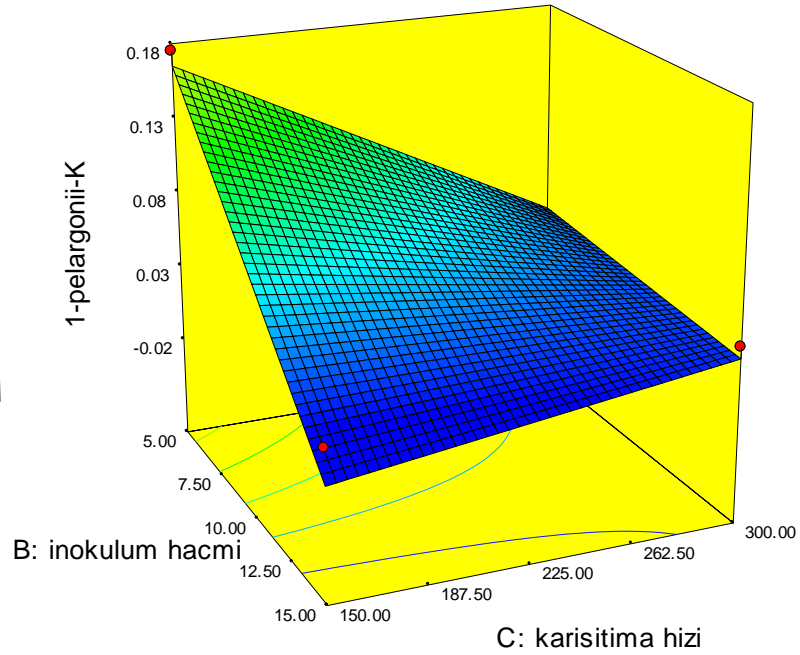
0.011

X1 = B: inokulum hacmi

X2 = C: karisitima hizi

Actual Factor

A: glukoz orani = 8.00



Şekil 4.10. *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatu ile yapılan çalışmalardaki karıştırma hızı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi

Model denkleminle oluşturulan 3 boyutlu kıvam katsayısı grafiklerine bakıldığında; *X. hortorum* pv. *pelargonii*'nin ürettiği gamların en yüksek K değerinin %4 glukoz oranında ve %5 inokulum hacminde üretildiği takdirde olduğu görülmekte ve bu oranlardan yükseltmenin K değerinde ciddi düşüslere yol açtığı görülmektedir. K değerinin aynı gam verimine benzer şekilde; karıştırma hızının optimum miktarının inokulum hacmine göre değiştiği gözlenmiş; inokulum hacmi yüksek ise karıştırma hızının çalışılan şartlar aralığında en yüksek olması gerektiği, inokulum hacmi çok düşük ise karıştırma hızının en düşük olması gerektiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10).

Optimum K değerini *X. hortorum* pv. *pelargonii* için sağlayan fermentasyon koşulları model numerik optimizasyonu ile şöyle bulunmuştur: glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 175 rpm.

***X. axonopodis pv. begoniae* :**

X. axonopodis pv. begoniae izolatının ürettiği gam ile hazırlanan çözeltilerin K değerinin yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu sonucunda elde edilen istatistiksel değerler Çizelge 4.8'de verilmektedir. Buna göre A-glukoz oranı ve AB interaksiyonunun gam verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

Optimizasyon sonucunda 2FI modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre sadece A*B interaksiyonun pozitif değer aldığı tespit edilmiştir. Buradan, inokulum hacmi ve karıştırma hızı parametrelerinin her ikisinin artırılması veya azaltılması ile K değerinin pozitif yönde etkileneceği öngörülmektedir.

Model denklemine göre glukoz oranının ve inokulum hacminin çalışılan değer aralıklarının en üst seviyelerinde olması, *X. axonopodis pv. begoniae* izolatına ait gam çözeltilerinin K değerinde düşüşe sebep olmaktadır.

Çizelge 4.8. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. axonopodis pv. begoniae*)

Kaynak	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	108,78	4,61	0,028
A-Glukoz oranı	124,21	5,27	0,044
B-Inokulum hacmi	67,31	2,85	0,12
AB	134,8	5,72	0,037

2FI Denklem:

$$\begin{aligned} X. axonopodis \text{ pv. } begoniae \text{ K değeri} = & \\ & +2,27 \\ & -3,94 * A \\ & -2,90 * B \\ & +5,81 * A * B \end{aligned}$$

Ayrıca optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.11'de gösterilmektedir.

Design-Expert® Software

3-begonia-K

24.5

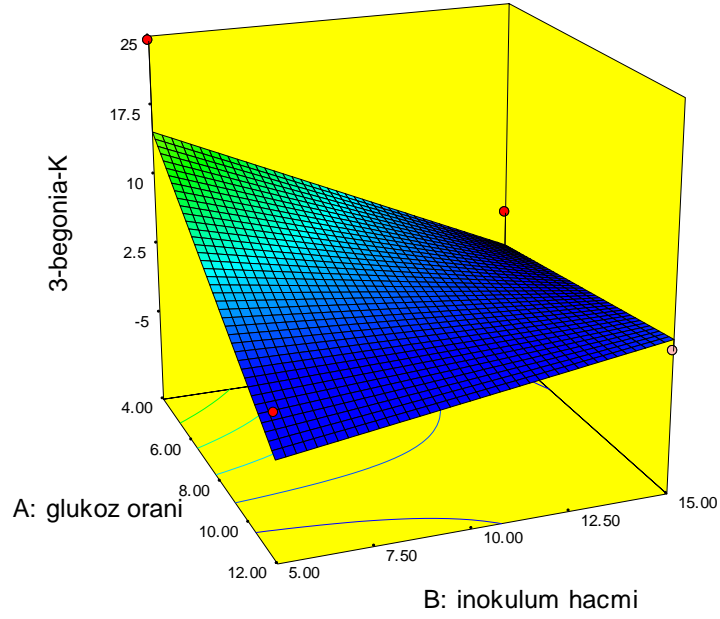
0.0006

X1 = A: glukoz oranı

X2 = B: inokulum hacmi

Actual Factor

C: karisitima hizi = 225.00



Şekil 4.11. *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatu ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi

Model denkleminle oluşturulan 3 boyutlu kıvam katsayısı grafiğine baktığımızda; en yüksek kıvamın çalışma aralığı içinde en düşük glukoz oranı ve inokulum hacmi seviyesinde üretilen gamlardan elde edileceği ön görülmüştür (Şekil 4.11).

Optimum K değerinin ise glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 250 rpm şartlarında elde edileceği model numerik optimizasyonuyla tespit edilmiştir.

***X. axonopodis* pv. *vesicatoria* :**

X. axonopodis pv. *vesicatoria* izolatu ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen K (kıvam katsayısı) verilerine uygulanan yüzey yanıt yöntemi optimizasyonu sonucunda belirlenen istatistiksel değerler Çizelge 4.9'da gösterilmektedir. A-glukoz oranı ve A*C (glukoz oranı*karıştırma hızı) intraksiyonunun *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*'dan üretilen

gamdan oluşturulan çözeltilerin K değerini istatistiksel olarak önemli bir şekilde etkilediği görülmüştür ($p < 0,05$).

Optimizasyon sonucunda 2FI modeli uygulanarak elde edilen denkleme göre; glukoz oranının çalışılan değer aralığının en üst seviyelerinde olması, bir başka deyişle çok fazla artırılması gam K değerinde önemli düşüşlere neden olmaktadır. Glukoz oranı ve karıştırma hızı interaksyonu (A*C) negatif olarak belirlenmiş, karıştırma hızı artarken glukoz oranının düştüğü takdirde K değerinin yükseleceği öngörülmüştür.

Çizelge 4.9. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*)

Kaynak	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	0,33	5,25	0,019
A-Glukoz oranı	0,55	8,62	0,014
C-Karıştırma hızı	0,15	2,43	0,15
AC	0,30	4,70	0,055

2FI Denklem:

$$\begin{aligned} X. axonopodis \text{ pv. } vesicatoria \text{ kıvam katsayısı} = & \\ & +0,16 \\ & -0,26 * A \\ & +0,14 * C \\ & -0,27 * A * C \end{aligned}$$

Optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.12'de gösterilmektedir.

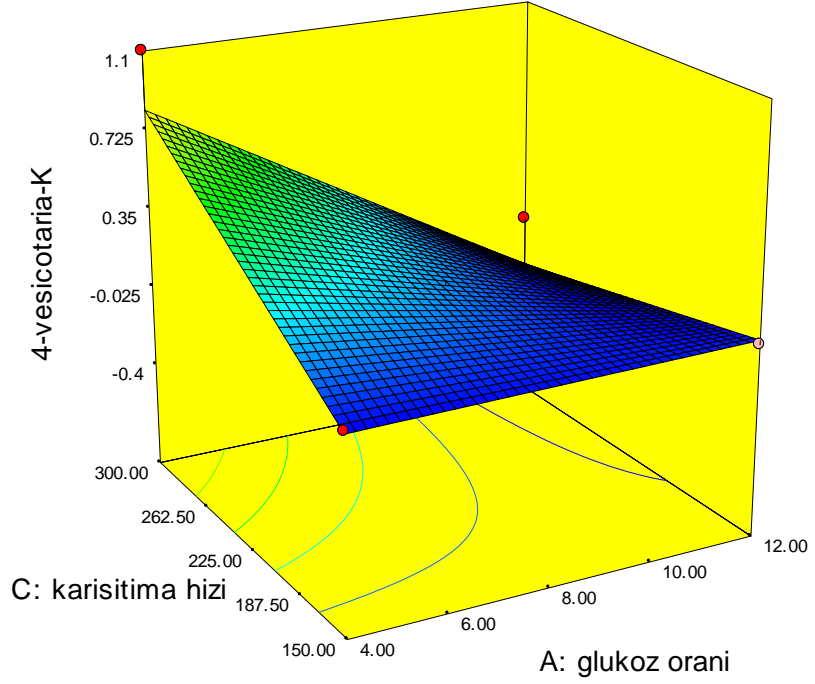
Design-Expert® Software

4-vesicotaria-K

1.1
1E-005

X1 = A: glukoz oranı
X2 = C: karisitima hizi

Actual Factor
B: inokulum hacmi = 10.00



Şekil 4.12. *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatı ile yapılan çalışmalarındaki glukoz oranı ve karıştırma hızı parametrelerinin ksantan gam K (kıvam katsayısı) üzerine etkisi

Model denkleminin oluşturulan 3 boyutlu K değeri grafiğine bakıldığında; 2FI model denkleminin uygun olarak karıştırma hızının en yüksek değeri olan 300 rpm'de olması ve glukoz oranının en düşük değeri olan %4'te olması ile K değeri en yüksek değeri almıştır.

Maksimum K değerinin ise glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5,5 ve karıştırma hızı 300 rpm şartlarında elde edileceği model numerik optimizasyonu ile tespit edilmiştir.

***X. campestris* DSM 19000 (NRRL B 1459):**

X. campestris DSM 19000 bakterisi ile atık ekmeklerden üretilen gam çözeltilerinin K değeri optimizasyonu sonucunda elde edilen istatistiksel değerler Çizelge 4.10'da verilmektedir. Oluşturulan model etkili bulunmuş, *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatından

üretilen gama benzer şekilde AB interaksiyonunun gam verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur. Buna paralel olarak 2FI modeli sonucunda yine glukoz oranı ve inokulum hacmi negatif değer almış ve bu iki faktörün artırılmasıyla K değerinin azalacağı öngörülmüştür.

Çizelge 4.10. ANOVA yüzey yanıt 2FI Model varyans analiz çizelgesi (*X. campestris* DSM 19000)

Kaynak	Ortalama Kare	F değeri	p-değeri tahmini>F
Model	21,44	4,27	0,035
A-Glukoz oranı	19,35	3,85	0,078
B-Inokulum hacmi	14,77	2,94	0,117
AB	30,20	6,01	0,034

2FI Denklem:

X. campestris DSM 19000 kıvam katsayısı =
+0.93

$$\begin{aligned} & -1,56 * A \\ & -1,36 * B \\ & +2,75 * A * B \end{aligned}$$

Optimizasyon sonucunda elde edilen denklemden oluşturulan yüzey grafikleri Şekil 4.13'te gösterilmektedir.

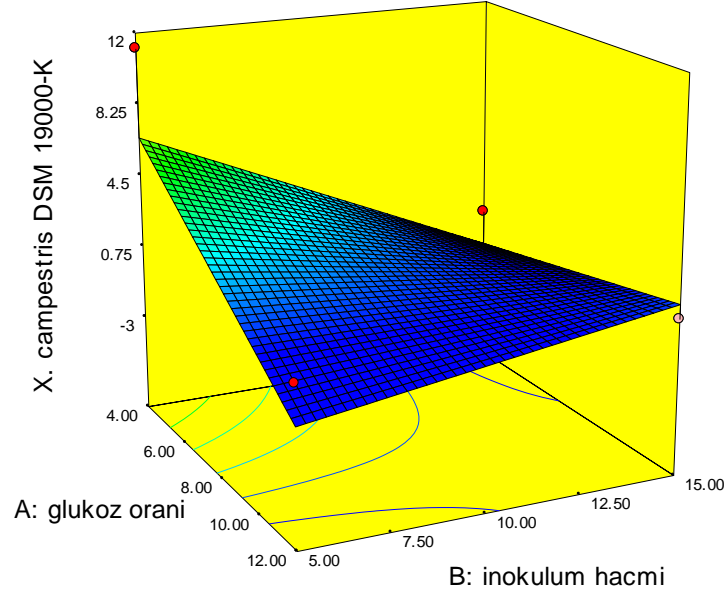
Design-Expert® Software

X. campestris DSM 19000-K

11.2
0.006

X1 = A: glukoz oranı
X2 = B: inokulum hacmi

Actual Factor
C: karisitima hizi = 225.00



Şekil 4.13. *X. campestris* DSM 19000 izolatu ile yapılan çalışmalardaki glukoz oranı ve inokulum hacmi parametrelerinin ksantan gam kıvam katsayısı üzerine etkisi

Model denkleminle oluşturulan 3 boyutlu K değeri grafiğine bakıldığında 2FI modeline uygun olarak glukoz oranı ve inokulum miktarı azaldıkça maksimum K değerine ulaşılacağı öngörülmüştür (Şekil 4.13).

Optimum K değerinin ise glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 225 rpm şartlarında elde edileceği model numerik optimizasyonuyla tespit edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarından genel olarak elde edilen sonuçlara göre; en yüksek gam üretimi ile sonuçlanan fermentasyon koşullarının en yüksek gam viskozitesine sebep olan koşullardan farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, Mesomo vd. (2009) bulduğu sonuçla ters düşmemiştir ve bu veriler üretilen gamın uygulama alanlarına bakış açısı ile çok alakalıdır, çünkü bazı durumlarda yüksek gam verimi istenebilirken bazı uygulamalarda yüksek viskozite tercih sebebi olabilmektedir. Önceki çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, çeşitli viskozitelerdeki ksantan gamın farklı uygulama alanları vardır. Yüksek viskoziteli ksantan gam, çoğunlukla petrol endüstrisinde, tarım endüstrisinde ve su bazlı boylarda

kullanılır (Rosalam ve England, 2006; Palaniraj ve Joyaraman, 2011). Tam tersi, düşük viskoziteli gam yüksek doza ve geçirgenlik özelliğine sahiptir bu yüzden gıda ve diğer alanlarda potansiyel olarak kullanılabilir (Dikeman ve Fahey, 2006; Li ve Feke, 2015). Bununla beraber düşük viskozite, ksantan gamın diğer katkılarla ve gamlarla daha iyi sinerjistik etki göstermesini sağlamaktadır (Fitzpatrick, Meadows, Ratcliffe ve Williams, 2013; Renovet vd., 2013).

4.3. *Xanthomonas* İzolatlarından Substrat Olarak Atık Ekmek Kullanılarak Maksimum Viskozite Sağlayacak Şartlarda Elde Edilen Ksantan Gamların Sulu Çözeltilerinin Reolojik Karakterizasyonu

Polimerik çözeltilerin reolojik davranışlarının bilinmesi; onların prosesi, değerlendirilmesi, kalite kontrolü ve endüstriyel kabul edilebilirliği açısından gereklidir. Viskozite bir akışkanın direk kalitesini tespit etmek için kullanılmasına ilaveten, akışkanın polimerizasyon, emülsifikasyon ve homojenizasyon gibi prosesler boyunca akışkanın yapısındaki temel değişikliklerle ilgili de önemli bilgiler sağlamaktadır (Nery, Cruz ve Druzian, 2013).

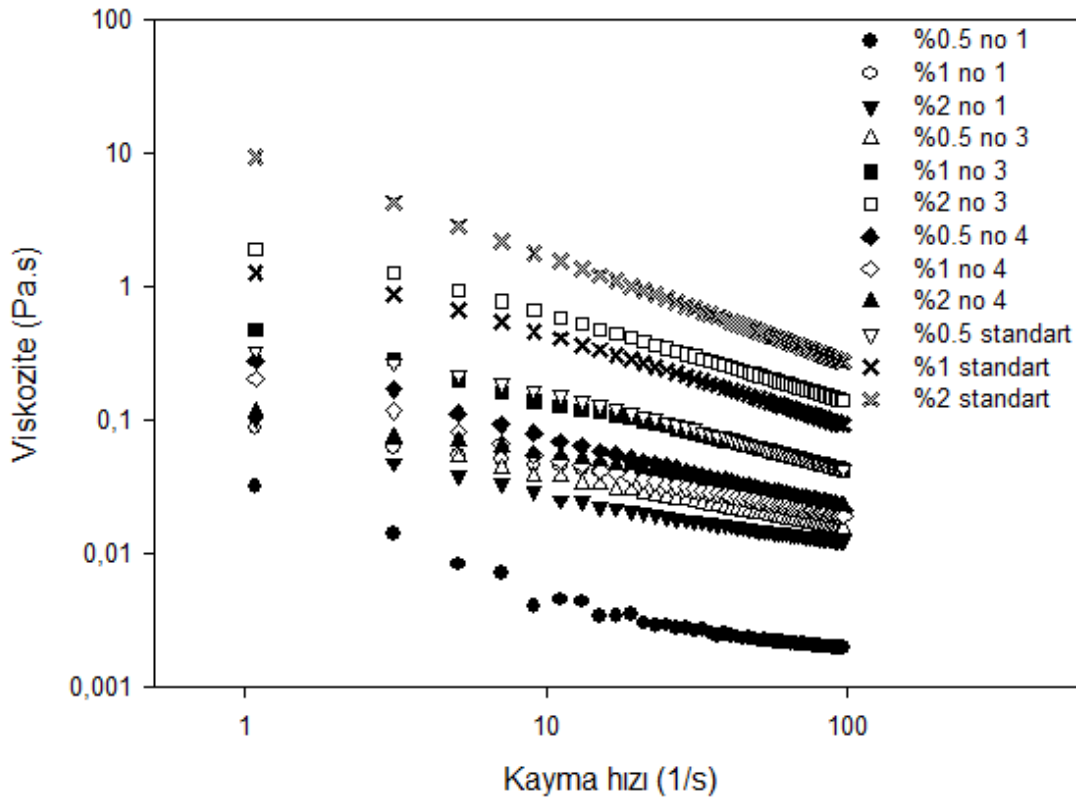
4.3.1. Yatışkan Kayma (Steady Shear) Reolojik Özellikleri

Substrat olarak atık ekmek kullanılarak, çalışma konusu olan izolatlardan elde edilen gamların reolojik karakterizasyonu kapsamında ilk olarak yatışkan kayma (steady shear) halindeki viskozite değerleri 20 °C’de incelenmiş olup reogramları Şekil 4.14’te gösterilmiştir. Genel olarak *Xanthomonas* izolatları ve *Xanthomonas campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gam-su karışımlarının benzer akış davranış özelliği gösterdiği görülmüştür ve kesme hızı artışı ile viskozite değerleri tüm örnekler için düşmüştür. Bu durum gam-su karışımlarının genel olarak kayma ile incelen (shear thinning) davranış göstermesiyle açıklanabilir.

Ayrıca gam su solusyonlarının kayma gerilimi değerlerine Power law modeli uydurulmuş olup model parametreleri Çizelge 4.11’de verilmiştir. R² değerinin 0.98 ve 0.99 arası çıkması modelin akış davranışlarına tam uyduğunu göstermiştir. Model

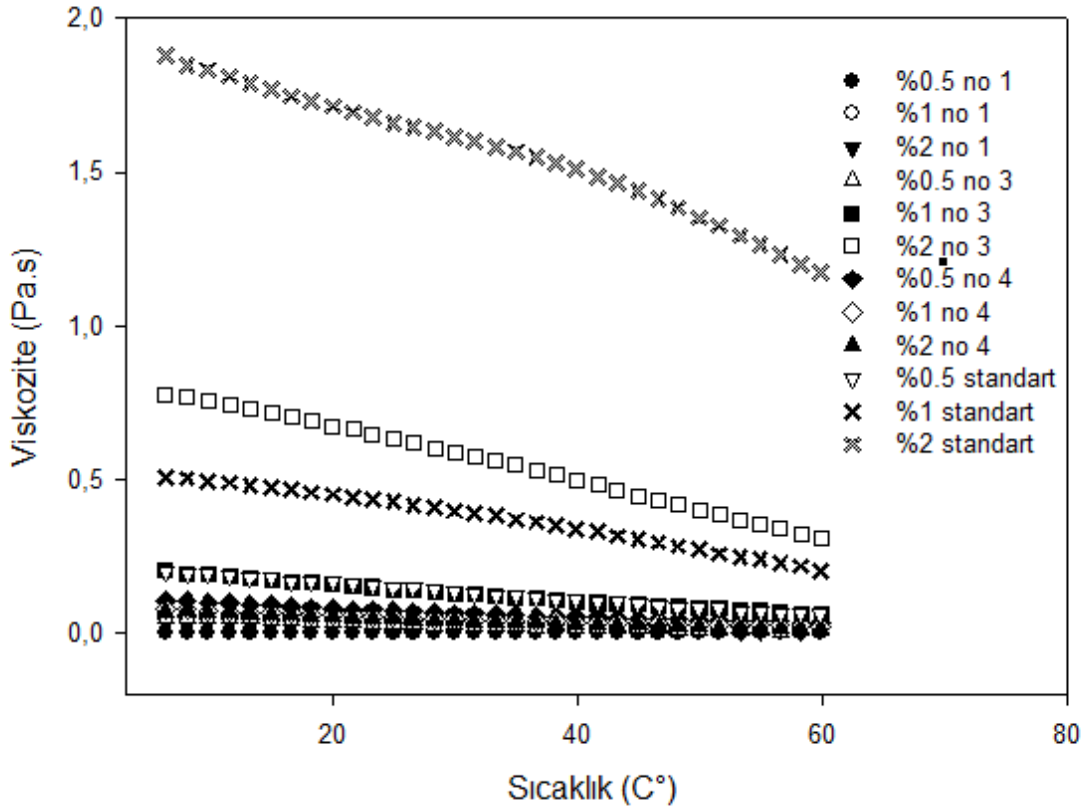
parametrelerinden olan akış davranış indeksi n ; bütün örneklerde 1 değerinin altında bulunmuştur. Bunda moleküler ağırlığı yüksek olan gam hidrokolloidinin akış yönü doğrultusunda hizalanması ve konfigürasyon durumunun akış yönüne paralel hale gelerek akmaya karşı direncin azalması rol oynamaktadır. Kıvam katsayısı olan K değerlerine baktığımızda gam konsantrasyonunun %0.5'ten %2'ye artışıyla gum-su karışımlarının viskozitelerinde beklendiği üzere genel olarak artış görülmüştür.

Substrat olarak atık ekmek kullanıldığında bütün çalışılan konsantrasyon oranlarında en yüksek K değerine sahip örneğin ticari olarak ksantan gam üretilmesinde kullanılan *X.campestris* DSM 19000 izolatından sağlanan gam-su karışımı olduğu tespit edilmiştir. Delme işleminde kullanılabilir ksantan gamın delme işleminde istimal edilen sıvılarda kullanılabilmesi için n değerinin 0.5'i K (Pa.s^n) değerinin 1'in üstünde olması istenmektedir (Nery vd., 2013). Bu yönüyle %2'lik *X. axonopodis* pv. *begoniae* ve *X. campestris* DSM 19000 izolatlarından elde edilen gamlar bu limitlerin içinde yer almıştır.



Şekil 4.14. *Xanthomonas* izolatları ve *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 1-100 1/s aralığındaki viskozite reogramı(no 1-*X. hortorum* pv. *pelargonii*, no 3-*X. axonopodis* pv. *begoniae*, no 4-*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, standart-*X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen gama aittir).

Şekil 4.15'te ksantan sulu çözeltilerinin sıcaklığa bağlı olarak viskozite değişimleri verilmiştir. Genel olarak bütün karışımlarda sıcaklığın etkisiyle viskozitede düşüş gözlenmiştir. Sıcaklıkla viskozitenin düşmesi moleküler mobilitenin artıp moleküller arası boşluğun fazlalaşmasından kaynaklandığı söylenebilir. Çizelge 4.12'de ise, viskozite değerlerinin Arrhenius modeline uygulanması ile elde edilen aktivasyon enerjisi ve A sabiti değerleri verilmiştir. Bütün konsantrasyon değerlerinde aktivasyon enerjisinin en düşük olduğu gam-su karışımının ticari üretici olan *X. campestris* DSM 19000 izolatına ait olduğu gözlenmiştir böylece sıcaklığa en dayanıklı yani viskozitenin kendini koruyabildiği gam bu olmuştur. Genel olarak konsantrasyon artışıyla aktivasyon enerjilerinin azaldığı görülmüştür ve gam molekülleri arası etkileşimin sıcaklığın etkisini bastırdığı görülmüştür.

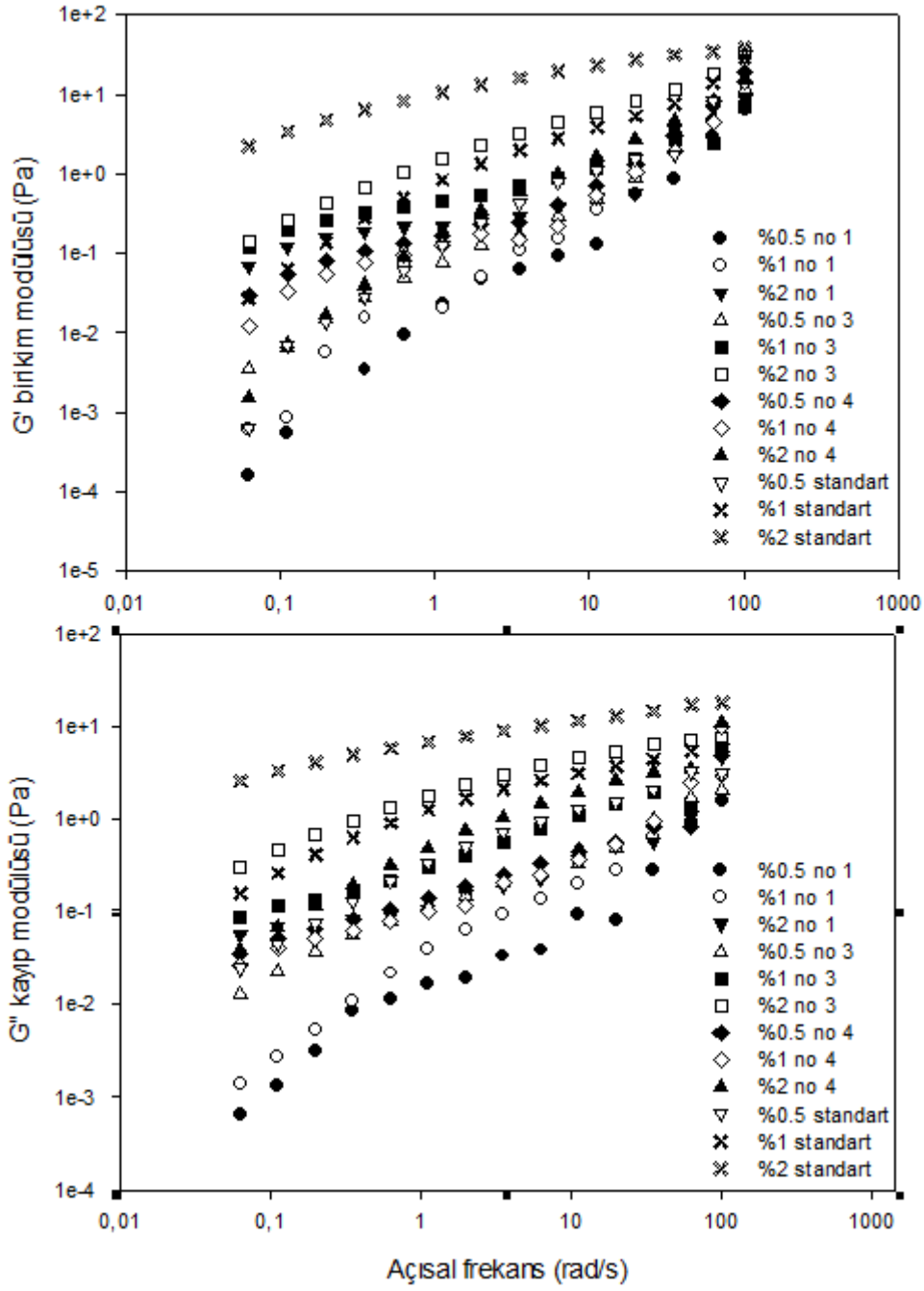


Şekil 4.15. *Xanthomonas* izolatları ve *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 5-60 °C aralığındaki viskozite eğrileri (no 1-*X. hortorum* pv. *pelargonii*, no 3-*X. axonopodis* pv. *begoniae*, no 4-*X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, standart-*X. campestris* DSM 1900 izolatından elde edilen gama aittir).

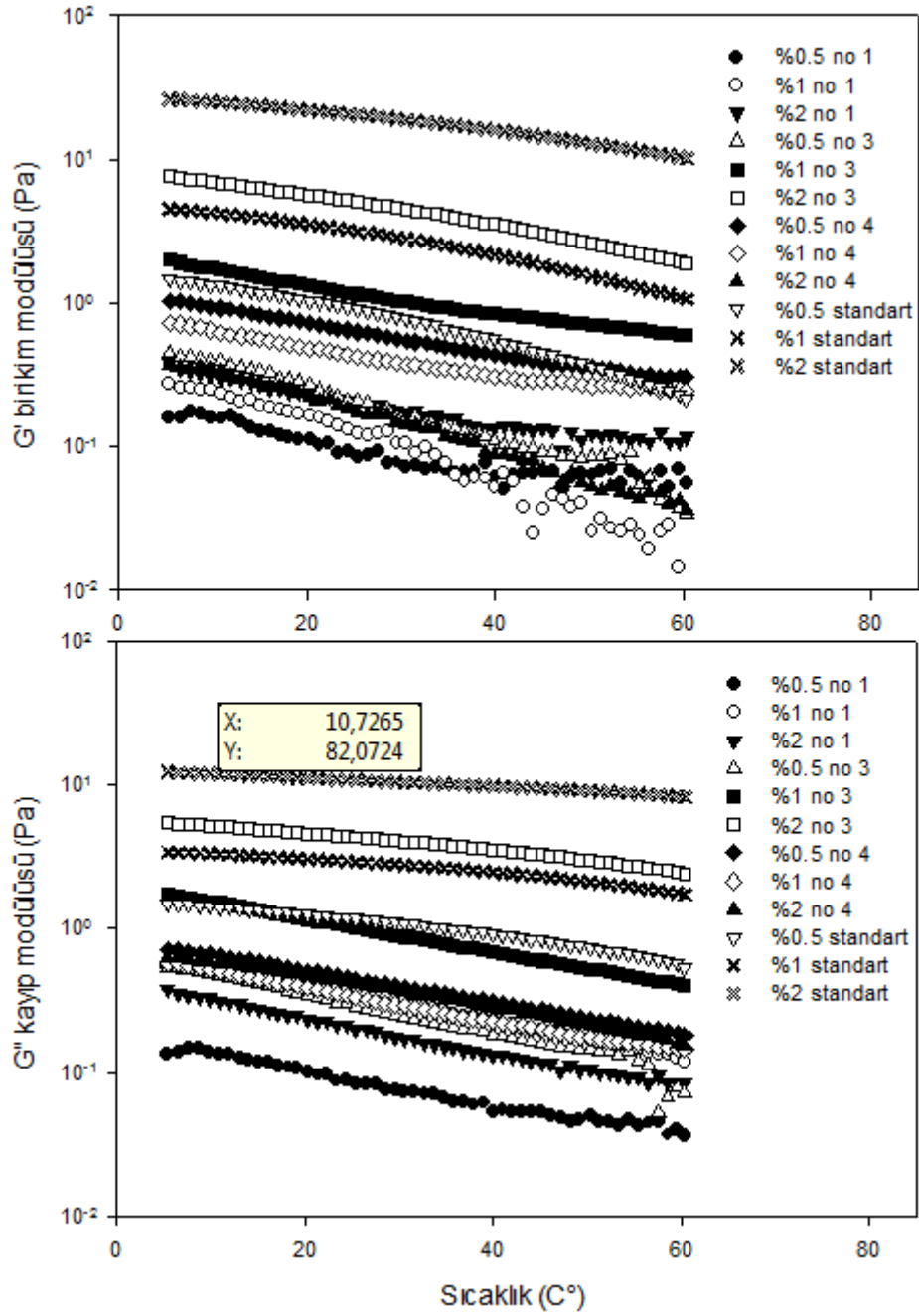
4.3.2. Viskoelastik Özellikleri

%0,5, %1 ve %2 konsantrasyon oranlarında hazırlanan gam çözeltilerinin viskoelastik özelliği frekans tarama testiyle araştırılmış olup G' ve G'' değerlerinin frekansa bağlı değişimi Şekil 4.16'da verilmiştir. Genel olarak gam-su karışımlarında; G' (birikim modülüs) değeri G'' (kayıp modülüs) değerinden yüksek çıkması halinde karışımın zayıf jel oluşturduğu bilinmektedir. %0.5 gam konsantrasyon oranında sadece *X. hortorum* pv. *pelargonii*'nin, %1'de *X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *begoniae*'nin, %2'de ise *X. axonopodis* pv. *begoniae* dışındaki tüm izolatların zayıf jel oluşturduğu söylenebilir (Çizelge 4.13). Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler Power-law modele (Denklem 10-11) uyarlanmıştır. R^2 değerleri 0,82 ve 0,99 aralığında bulunmuştur. Genel olarak, substrat olarak ekmek kullanıldığı zaman K' değerinin en yüksek tespit edildiği gamın, *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edildiği gözlenmiştir ve bu durum bu karışımda elastiki yapının daha iyi sağlandığının göstergesidir.

Kayıp ve birikim modülüs değerleri 5 ila 60 °C aralığında sıcaklık tarama testine tabi tutulmuş ve sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir. Genel olarak sıcaklığın artmasıyla elastik modülüsü (G') ve kayıp modülüsü (G'') de azalmıştır. En yüksek yapı bozulmaları yani düşüşler %0,5 konsantrasyonda hazırlanmış karışımlarda gözlenmiştir. Yatışkan kayma deneylerinde olduğu gibi yine viskoelastik yapının ve G' ve G'' değerlerinin sıcaklık ile fazla değişmediği ve yapının en fazla korunduğu solüsyonun *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen gamla hazırlanan örnekte olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.16. *Xanthomonas* izolatları ve standart *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 1-100 rad/s açısal hız aralığındaki birikim ve kayıp modülüs eğrileri (no 1-*X. hortorum* pv. *pelargonii*, no 3-*X. axonopodis* pv. *begoniae*, no 4-*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından, standart-*X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen gama aittir).



Şekil 4.17. *Xanthomonas* izolatları ve standart *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamların 5-60 $^{\circ}\text{C}$ aralığındaki birikim ve kayıp modülüs eğrileri (no 1-*X. hortorum* pv. *pelargonii*, no 3-*X. axonopodis* pv. *begoniae*, no 4-*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından, standart-*X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen gama aittir).

Çizelge 4.11. Farklı bakterilerden elde edilen ksantan gamların değişik konsantrasyon oranlarının 20 °C’de Power Law parameterlerine olan etkisi

Gam konsantrasyonu (%)	Bakteriler	K (Pa s ⁿ)	n (-)	R^2
0,5	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,0068	0,72	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0,10	0,59	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0,27	0,45	0,99
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	0,62	0,42	0,99
1	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,11	0,64	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0,50	0,46	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0,14	0,56	0,98
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	2,10	0,32	0,98
2	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,05	0,68	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	2,83	0,36	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0,15	0,59	0,99
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	10,57	0,20	0,99

K : kıvamlılık indeksi; n : akış davranış indeksi; R^2 : saptama katsayısı

Çizelge 4.12. Farklı bakterilerden elde edilen ksantan gamların değişik konsantrasyon oranlarının farklı sıcaklıkta Arrhenius model parametrelerine üzerine etkisi

Gam konsantrasyonu (%)	Bakteriler	A (Pa s)	Aktivasyon enerjisi (kJ/mol)	R ²
0,5	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	3,76x10 ⁻⁶	15,02	0,17
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	1,06x10 ⁻⁶	25,29	0,97
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	1,21x10 ⁻⁴	12,10	0,99
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	2,78x10 ⁻⁴	15,45	0,97
1	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	6,05x10 ⁻⁶	21,65	0,98
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	2,76x10 ⁻⁴	15,42	0,98
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	5,45x10 ⁻⁵	16,98	0,99
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	4,24x10 ⁻³	11,30	0,94
2	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	7,54x10 ⁻⁶	19,75	0,97
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	4,89x10 ⁻³	11,94	0,96
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	1,20x10 ⁻⁵	20,45	0,98
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	0,15	5,95	0,95

A: Arrhenius modelinden elde edilen sabit; R²: saptama katsayısı

Çizelge 4.13. Farklı bakterilerden elde edilen ksantan gamların değişik konsantrasyon oranlarının 20 °C’de birikim ve kayıp modülüs parametrelerine olan etkisi

Gam konsantrasyonu (%)	Bakteriler	G'			G''		
		K'	n'	R^2	K''	n''	R^2
0,5	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,003	1,68	0,99	0,002	1,40	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0,006	1,64	0,99	0,06	0,76	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0,008	1,68	0,99	$2,75 \times 10^{-6}$	3,11	0,94
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	$6,6 \times 10^{-5}$	2,83	0,99	0,38	0,48	0,97
1	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,03	1,18	0,98	0,006	1,33	0,99
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0,10	0,89	0,90	0,04	1,04	0,82
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	$5,1 \times 10^{-4}$	2,22	0,99	0,06	0,75	0,99
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	0,14	1,15	0,98	1,26	0,35	0,98
2	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,077	1,04	0,97	$2,2 \times 10^{-5}$	2,66	0,97
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0,55	0,87	0,98	1,89	0,32	0,97
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0,10	1,08	0,99	0,07	1,10	0,9
	<i>X. campestris</i> DSM 19000	10,5	0,29	0,98	6,42	0,23	0,99

G' : birikim modülüsü; G'' : kayıp modülüsü; R^2 : saptama katsayısı

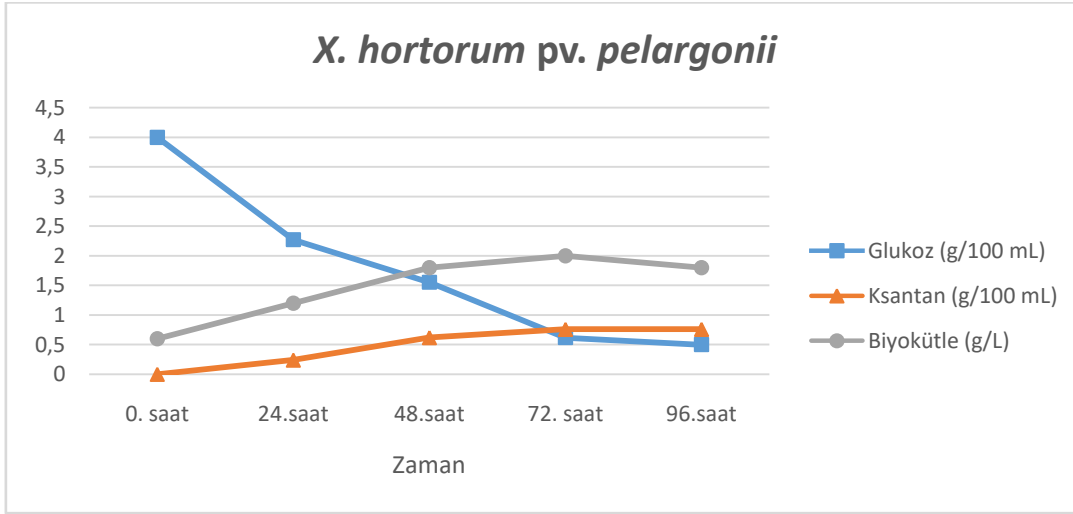
4.4. *Xanthomonas* İzolatlarından Substrat Olarak Atık Ekmek Kullanılarak Maksimum Viskozite Elde Edilen Şartlardaki Fermentasyon Kinetikleri (Zamana Göre Besiyerindeki Şeker Tüketimi, Gam ve Biyokütle Üretimi)

Çalışmada kullanılan her mikroorganizma için en yüksek viskozite sağlayan optimum şartlarda kesikli kültür ortamında fermentasyon kinetikleri incelenmiştir. Yapılan fermentasyon denemelerinde her üç izolat ve standart tür için 96 saat boyunca ksantan üretimi, glukoz tüketimi ve biyokütle üretimi incelenmiş ve fermentasyon süresi boyunca meydana gelen değişimler Şekil 4.18, 4.19, 4.19 ve 4.20’de gösterilmiştir. Genel olarak, fermentasyon boyunca tüm bakteriler benzer kinetik özellikler sergilemiştir. Elde edilen veriler, ksantan biyopolimeri üretiminin gelişme ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bunun anlamı; ürün ve hücre konsantrasyonu profilleri çoğunlukla benzer yükseliş trendlerine sahip olmuştur. Fermentasyon boyunca, besiyerindeki glukoz azaldıkça biyokütle ve polimer üretimi artış göstermiştir. Bakteriler 4-6 saatlik bir lag fazından sonra eksponansiyel üreme fazına geçmiş ve bu faz 48. saate kadar sürmüştür. Bu saatten sonra da hücre konsantrasyonu 96. saate kadar hafif azalma göstermiştir.

Ksantan gam üretimleri ise genel olarak 72. saatte maksimum seviyelere ulaşmış ve fermentasyon sonuna kadar aynı seviyelerde kalmıştır. Rajeshwari, Prakash ve Ghosh (1995), Moreira vd. (2001) ve Woiciechowski vd. (2004)’de çalışmalarında benzer şekilde maksimum ksantan gam üretimine 72. saatte ulaşıldığını bildirmişlerdir. Genellikle literatürler, çoğu biyopolimer üreticisi bakteri ile yapılan çalışmalarda en yüksek üretime logaritmik faz sonunda veya sabit fazın boyunca ulaşıldığını belirtmektedir (Konícek, Lasík ve Safár, 1993, Amanullah, Serrano, Galindo ve Nienow, 1996; Garcia-Ochoa vd., 2000; Papagianni vd., 2001; Borges vd., 2008). Çalışmamızda da genel olarak en yüksek biyopolimer üretimine gelişimin sabit fazı boyunca ulaşılmıştır. Üretim davranışının pH kontrolü ile alakalı olduğu bildirilmektedir (Garcia-Ochoa vd., 2000).

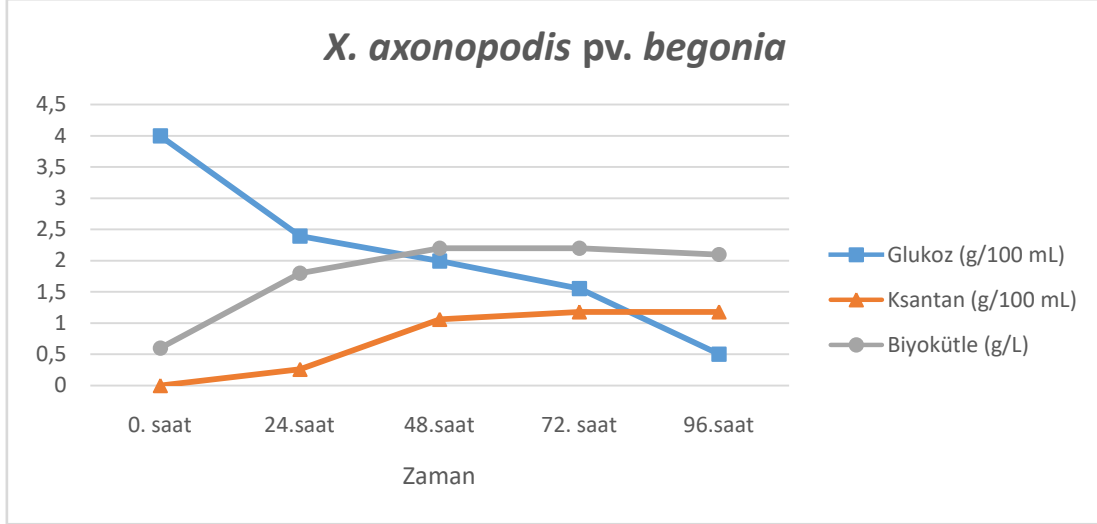
Fermentasyon prosesinde indirgen şeker, hücre bileşenlerinin yapımı ve polisakkarit ürün oluşumu için kullanılır. Bu sebepten glukoz miktarı, hücre ve ksantan artarken fermentasyon boyunca önemli derecede azalmıştır. Tüm bakteriler için başlangıç glukoz oranı %4 iken bakteriler iyi bir substrat tüketimi göstermiş ve fermentasyon sonunda bu oran %0,5- %0,7 arasında değişiklik göstermiştir.

Şekil 4.18'de *X. hortorum* pv. *pelargonii* için fermentasyon kinetikleri gösterilmektedir. 72. saat sonunda en yüksek biyokütle (2 gL^{-1}) ve ksantan ($7,6 \text{ gL}^{-1}$) seviyelerine ulaşılmıştır. Başlangıçta 4 g/100 mL olan glukoz oranı 96. saatte $0,5 \text{ g/100 mL}$ 'ye düşmüştür. Başka bir ifade ile *X. hortorum* pv. *pelargonii* 96 saat boyunca besiyerindeki şekerin %87,5'ünü kullanmıştır. En yüksek viskozite sağlayan şartlarda, bu bakteri maksimum $7,6 \text{ gL}^{-1}$ ksantan gam üretirken, glukoz dönüşüm oranı %19 olarak belirlenmiştir.



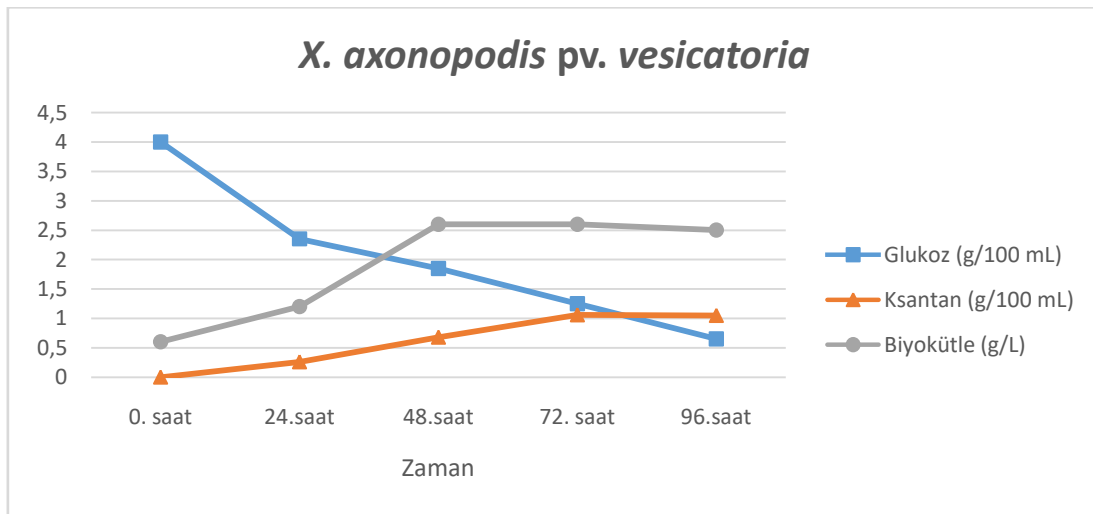
Şekil 4.18. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak *X. hortorum* pv. *pelargonii* ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri (parametreler: %4 glukoz, %5 inokulum, 175 rpm)

Şekil 4.19'da *X. axonopodis* pv. *begoniae* için atık ekmek substratındaki fermentasyon kinetikleri gösterilmektedir. Buna göre, en yüksek hücre konsantrasyonuna 48. saatte ulaşılmış ve bu değer 48-72. saatler arasında değişmeden kalmış daha sonra azalmaya başlamıştır. Bununla beraber, ksantan gam üretimi 72. saate kadar sürekli artış göstermiştir. Şeker tüketimi fermentasyon boyunca sürekli azalmış ve 96. saatte besiyerindeki glukozun %87'si değerlendirilmiştir. *X. axonopodis* pv. *begoniae* 72. saatte en yüksek ksantan üretimine ulaşmıştır ($11,18 \text{ gL}^{-1}$). Bu izolat için glukoz dönüşüm oranı %29,5'dur.



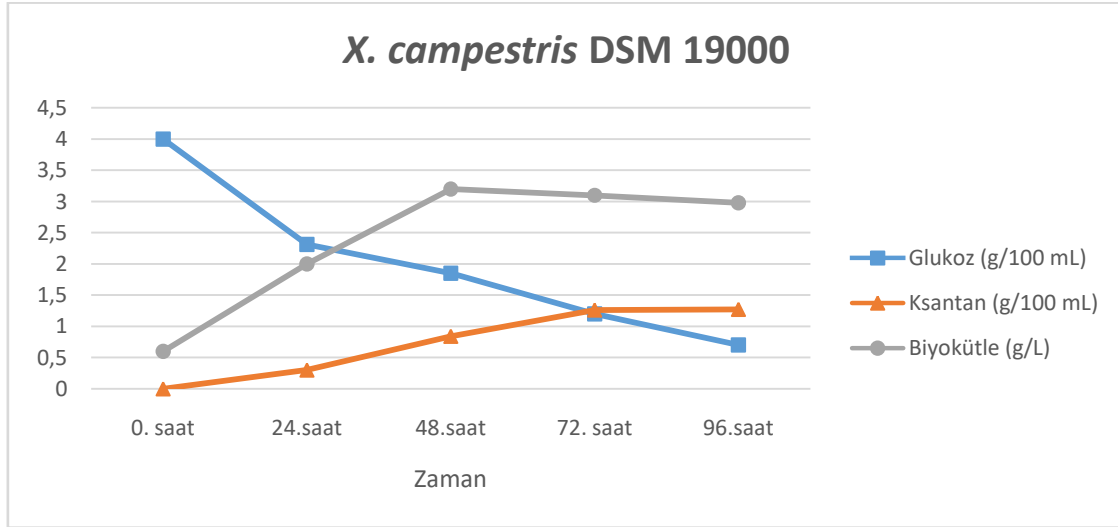
Şekil 4.19. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak *X. axonopodis* pv. *begoniae* ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri (parametreler: %4 glukoz, %5 inokulum, 250 rpm)

Şekil 4.20'de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* için atık ekmek substratındaki fermentasyon kinetikleri gösterilmektedir. 48. saatte $2,6 \text{ gL}^{-1}$ ile en yüksek biyokütle seviyesine ulaşılırken, en yüksek ksantan üretimi 72. saatte $10,6 \text{ gL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu izolat için glukoz değerlendirme oranı %87,5 ve glukoz dönüşüm oranı %26,5 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri (parametreler: %4 glukoz, %5,5 inokulum, 300 rpm)

Şekil 4.21'de standart bakteri *X. campestris* DSM 19000 için atık ekmek substratındaki fermentasyon kinetikleri gösterilmektedir. Bu bakteride de en yüksek biyokütle seviyesine 48. saatte ulaşılmıştır ($3,2 \text{ gL}^{-1}$). Maksimum ksantan üretimi 96. saatte $12,7 \text{ gL}^{-1}$ olarak tespit edilirken bu bakteri için glukoz değerlendirme oranı %82,5 ve substrat dönüşüm oranı %31,70 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Atık ekmek hidrolizatları kullanılarak *X. campestris* DSM 19000 ile en yüksek viskozite sağlayan şartlarda ksantan gam üretimi için fermentasyon kinetikleri (parametreler: %4 glukoz, %5 inokulum, 225 rpm)

Woiciechowski vd., (2004), *X. campestris*'i 250 mL'lik erlende (50 mL besiyeri) 200rpm, 28-30 °C'de 96 saat inkübe ederek yaptıkları çalışmada; besiyerinin ilk ve son şeker konsantrasyonu sırasıyla $19,5 \text{ gL}^{-1}$ ve $1,0 \text{ gL}^{-1}$ olarak tespit etmişlerdir. Maksimum ksantan gam 72 saatin sonunda 14 gL^{-1} olarak tespit edilmiş ve fermentasyonun sonuna kadar sabit kalmıştır. Buna rağmen şeker tüketimi 96 saatin sonuna dek sürmüştür. Biyokütle üretimi 48 saatin sonunda maksimum olup, $1,8 \text{ gL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Biyokütle üretimi 72 saate kadar az ya da çok stabil kalmış olup, daha sonra düşmeye başlamıştır. Chavan ve Baig (2016), *X. campestris* tarafından ksantan gam ve biyokütle üretimi ilişkisini ve optimizasyon parametrelerini incelemişlerdir. 96. saatte biyokütle üretimi $24,18 \text{ gL}^{-1}$ iken ksantan gam verimi $15,21 \text{ gL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. 96. saatten sonra ksantan gam verimi ve biyokütle üretimi azalmıştır. Biyokütle ve ksantan verimi üzerine yapılan diğer çalışmalar; Umashankar, Annadurai, Chellapandian ve Krishnan (1996), *X. campestris* NRRL B-1459 glukozlu besiyerinde maksimum ksantan gam verimini $8-9 \text{ gL}^{-1}$, biyokütle üretimini $2-3 \text{ gL}^{-1}$ olarak

tespit etmişlerdir. Gilani vd. (2011)'de pekmezlerden *X. campestris* kullanarak ksantan gam üretmişlerdir. Bu çalışmada 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda maksimum ksantan gam verimi ve biyokütle üretimi elde edilmiş olup, bu değerler sırasıyla 17,1 gL⁻¹ ve 2,5 gL⁻¹'dir. 72 saatte besiyerindeki glukoz yaklaşık olarak 30 gL⁻¹ azalmıştır.

Çizelge 4.14'te en yüksek viskozite sağlanan koşullardaki denemelerde, fermentasyon başlangıcında ve sonunda besiyerindeki pH değerleri gösterilmektedir. Fermentasyon denemeleri, başlangıç pH'sı 7,0'a ayarlanmış ve pH kontrolsüz üretim gerçekleştirilmiştir. pH değişimleri incelendiğinde pH'nın fermentasyon boyunca çok fazla değişmediği ve fermentasyon sonunda da 6,80-6,95 aralığında olduğu görülmüştür. Denemelerde pH, literatürde belirtilen ksantan biyosentezi için kritik değer (5,5)'in (Garcia-Ochoa, 2000) üzerinde kalmıştır. Bu durum da fermentasyon besiyerinin iyi tamponlandığını ve bu deneysel şartlar altındaki proses boyunca tampon çözeltilerle pH kontrolüne gerek olmadığını göstermektedir. Ksantan fermentasyonunda pH trendi ile ilgili çalışmalar farklılıklar göstermekte olup, türe ve besiyeri kompozisyonuna bağlı olarak fermentasyon boyunca pH yükselmekte, azalmakta veya sabit değerlerde kalmaktadır (Liakopoulou-Kyriakides vd., 1997; Papagianni vd. 2001).

Çizelge 4.14. En yüksek viskozite sağlanan şartlarda fermentasyon başlangıcında ve sonunda besiyerindeki pH

	0. saat pH	96. saat pH
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	7,0	6,95
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	7,0	6,95
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	7,0	6,86
<i>X. campestris</i> DSM 19000	7,0	6,82

4.5. En Yüksek Viskozite Sağlanan Şartlarda Üretilen Gamların Fizikokimyasal Özellikleri

Çizelge 4.15'te mikroorganizmalar tarafından atık ekmekten üretilen gamların ve ticari gamın su aktivite, kül ve pH değerleri gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan üç izolat ve standart tür tarafından en yüksek viskozite sağlanan şartlarda elde edilen gamların su aktivite

değerleri $25,00 \pm 0,2$ °C'de 0,2420-0,2976 arasında değişirken ticari gamın su aktivitesi değeri $25,00 \pm 0,2$ °C'de 0,4951 olarak tespit edilmiştir. Ticari gamın su aktivite değerinin çalışmada üretilen gamlardan önemli ölçüde yüksek olduğu görülmektedir.

Gam örneklerinin kül oranları %8,74-%11,85 arasında bulunmuş olup literatürde belirtilen %7-12 aralığı ile uyum göstermektedir (Garcia-Ochoa vd., 2000). Tüm gam örneklerinin pH değerleri nötr değerlere yakın tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. En yüksek viskozite sağlanan şartlarda üretilen gamlar ve ticari gamın fizikokimyasal özellikleri

Mikroorganizmalar	Su aktivitesi (a_w)	Kül (%)	pH
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	0,2976	10,20	6,95
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	0,2525	11,50	6,98
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	0,2420	11,85	7,02
<i>X. campestris</i> DSM 19000	0,2657	10,42	6,95
Ticari gam	0,4951	8,74	7,03

4.6. En Yüksek Viskozite Sağlayan Şartlarda Üretilen Gamların Kimyasal Kompozisyonları ve Fiziksel Özellikleri

Bakteriyel türler, fermentasyon besiyeri kompozisyonu ve kültürel şartlar ksantanın sadece miktarını değil aynı zamanda kalitesini de etkiler. Bu yüzden ekzopolisakkarit kompozisyonunu belirlemek önemlidir.

4.6.1. Monosakkarit Kompozisyonu

Çalışmada kullanılan üç izolat ve standart tür tarafından en yüksek viskozite sağlayan şartlarda elde edilen gamlar ile ticari gam monosakkarit kompozisyonu Çizelge 4.16'da gösterilmektedir. Biyopolimerlerin tamamı glukoz, mannoz ve glukuronik asit içermektedir. Bu açıdan, polisakkaritlerin kimyasal kompozisyonu ticari ksantan gama benzerdir. Bununla beraber, sadece *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*'dan elde edilen ksantan gamda ramnoz tespit edilirken, *X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatlarından elde

edilen gamlarda ve ticari gamda farklı oranlarda galaktoz belirlenmiştir. Genel olarak, çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan elde edilen biyopolimerin glukuronik asit içerikleri birbirlerine yakın bulunurken, ticari gama göre belirgin bir şekilde düşük tespit edilmiştir. Üç izolattan elde edilen ksantanın glukoz oranları birbirine yakın ve standart bakteri ve ticari gama göre yüksek belirlenmiştir. Ticari ksantan gamın mannoz ve galaktoz oranlarının elde edilen diğer gamlara göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.16. En yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen ksantan gam örneklerinin monosakkarit kompozisyonu

	Konsantrasyon (%)				
	Glukoz	Mannoz	Ramnoz	Galaktoz	Glukuronik asit
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	26,26	3,85	-	6,81	4,63
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	27,06	6,71	-	-	3,64
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	31,67	2,55	5,50	3,69	3,26
<i>X. campestris</i> DSM 19000	19,88	2,90	-	-	3,98
Ticari gam	16,86	11,94	-	9,92	9,89

Karbonhidrat kompozisyonundaki farklılıklar çoğunlukla çalışılan mikroorganizma türlerinden kaynaklanmaktadır. Ksantan yapısındaki farklılıklar diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir. Birçok çalışma, farklı *Xanthomonas* türlerinin ve kültür şartlarının farklı kompozisyonlarda polimerler üretebileceğini göstermiştir (Sutherland, 1983). Ksantan gam hidrolizatlarında glukoz, mannoz ve glukuronik asit monomerlerinin baskınlığı literatür ile uyumluluk göstermektedir (Jansson vd., 1975; Morris vd., 1993; Silva vd., 2009; Hamcerencu, Desbrieres, Popa, Khoukh ve Riess, 2007; Ben Salah vd., 2011). Galaktoz, ramnoz, arabinoz ve ksiloz gibi diğer monosakkaritler de literatürdeki çalışmalarda elde edilen ksantan gamlarda belirlenmiştir. Lawson ve Symes (1977), *juglandis* pathovarından elde ettiği ksantanda ramnoz, *phaseoli*'den üretilende de ksiloz varlığını belirtmişlerdir. Heyraud vd. (1998), *X.campestris* pv. *campestris* 8396'dan elde edilen polimerin temel monosakkaritlerin yanısıra galaktoz ve ramnoz da içerdiğini belirtmişlerdir. Souza ve

Vendruscolo (1999)'da pathovar *pruni*'den üretilen ksantanda ramnoz bulmuşlardır. Silva vd. (2009), peyniraltı suyu substratından *X. campestris* 1182 ile ürettiği gamın ramnoz içermediğini fakat *X. campestris* 1230 ile üretilen gamın ramnoz ihtiva ettiğini belirlemişlerdir. Diğer bir çalışmada, *X. oryzae* BXO8 den üretilen ekzopolisakkaritte ramnoz, arabinoz, galaktoz ve ksiloz belirlenirken, *X. oryzae* BXO1'den üretilen ekzopolisakkaritte ise sadece arabinoz ve galaktoz tespit edilmiştir (Singh vd. 2006).

Tez çalışması kapsamında, ksantan gamın tipik monomerleri dışında ramnoz ve galaktoz da belirlenmiştir (*X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*). Bu sebepten, ksantan gamın kimyasal kompozisyonu türe bağlı olarak değişmektedir.

4.6.2. En Yüksek Viskozite Sağlayan Şartlarda Üretilen Gamların Pirüvik Asit, Asetik Asit İçeriği ve Moleküler Ağırlığı

Çizelge 4.17. En yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen ksantan gam örneklerinin pirüvik asit ve asetik asit içerikleri ile ortalama moleküler ağırlıkları

	Pirüvik asit (%)	Asetik asit (%)	Moleküler ağırlık (g/mol)
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	-	7,61	1,41x10 ⁶
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	2,18	3,45	1,73x10 ⁶
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	2,17	3,58	1,70x10 ⁶
<i>X. campestris</i> DSM 19000	4,82	5,67	1,76x10 ⁶
Ticari gam	5,26	8,34	1,96x10 ⁶

Çalışmada kullanılan üç izolat ve standart tür tarafından en yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen gamlar ile ticari gamın pirüvik asit ve asetik asit içerikleri Çizelge 4.17'de gösterilmektedir.

X. hortorum pv. *pelargonii* izolatından üretilen ksantan gamda pirüvik asit tespit edilemezken, diğer iki izolata pirüvik asit değerleri birbirine yakın ve standart bakteri (*X. campestris* DSM 19000)'den üretilen ve ticari gamdan daha düşük olarak belirlenmiştir. En yüksek pirüvik asit içeriği %5,26 ile ticari gamda tespit edilmiştir.

En yüksek asetil içeriğine yine ticari gam sahip olurken (%8,34) onu sırasıyla, *X. hortorum* pv. *pelargonii* (%7,61), *X. campestris* DSM 19000 (%5,67), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (%3,58) ve *X. axonopodis* pv. *begoniae* (%3,45) takip etmiştir.

Çoğu polisakkaritin temel karbonhidrat yapısı gelişme şartları ile değişmezken, temel karbonhidrat yapıya bağlanmış açıl ve ketal gibi yan gruplar genellikle değişiklik göstermektedir (Pace, 1987). Açıl veya ketal gruplardaki değişiklikler polimerin özelliklerine önemli oranda etki etmekte ve sonuç olarak çeşitli uygulamalardaki etkinliğini etkilemektedir. Örneğin; ksantan gamın pirüvik asit içeriği, besiyeri ve mikrobiyal türe göre sıfır ile % 8 arasında değişiklik gösterebilmektedir (Papagianni vd., 2001; Garcia-Ochoa vd., 2000). Genel olarak; çalışılan mikroorganizmalarlar elde ettiğimiz ksantan gamların pirüvik asit içerikleri %2,17-%4,82 arasında, asetik asit içerikleri ise %3,45-%7,61 arasında bulunmuş olup, bu değerler literatürde belirtilen değerlerle uyumluluk göstermiştir. Borges vd. (2009), *X. aroricola* pv. *pruni* 106 türünden, farklı fermentasyon koşullarında elde ettiği ksantanda pirüvik asit içeriğini %0,20-0,86, asetik asit içeriğini ise %1,81-3,78 arasında belirlemişlerdir. Mutfak atıklarının substrat olarak kullanıldığı çalışmada *X. campestris* LREL-1 ile üretilen polimerin pirüvat ve asetat içerikleri sırasıyla %6,11 ve %2,49 olarak tespit edilmiştir (Liv vd., 2016). Moreno vd. (1998), tarımsal atıklardan *X. campestris* NRRL B-1459 ile üretilen gamların pirüvat oranını %2,81-3,74, asetat oranını ise %3,33-4,83 arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Rodriguez ve Aguilar (1997), *X. campestris*'in farklı mutantlarından üretilen ksantan gamların pirüvat içeriklerinin %4,4-%6,7, asetat içeriklerinin de %3,4-%3,9 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Psomas ve ark. (2007), *X. campestris*'ten elde edilen ksantanın pirüvat içeriğini %1,5-2,9 arasında belirlemişlerdir. Bazı çalışmalarda ise ksantan gamın yapısında pirüvat tespit edilememiştir (Torrestiana vd., 1990; Kawahara ve Obata, 1998).

Ksantan gamda asetilasyon ve pirüvülasyon derecesi temel olarak mikroorganizma türüne ve besiyeri bileşimine göre değişmekle birlikte, fermentasyon koşullarından da etkilenmektedir (Liakopoulou-Kyriakides vd., 1999). Farklı gelişme besiyerleri, örneğin farklı substrat kullanımı ve sınırlı besin varlığı ksantanın ana iskelet yapısını etkilemez fakat yan zincirlerin yapısını, moleküler ağırlığı ve verimi etkilemektedir (Sutherland, 1983). Yaptığımız çalışmada elde edilen gamların pirüvat ve asetat içerikleri ticari gamdan daha düşük çıkmıştır. Bu durum ksantanın saflaştırılma yöntemlerinden kaynaklanabilmektedir. Bununla beraber, ksantan gam pirüvat içeriği öncelikle uygun tür ve besiyeri seçimine bağlı olsa da, ksantan yan zincirlerinin pirüvülasyonu mikrobiyal oksijen talebi karşılanmadığında

düşüş gösterdiği rapor edilmiştir (Liakopoulou-Kyriakides vd., 1999). Bu durum ticari gam pirüvika asit oranının çalışmamızda kullanılan bakterilerden sentezlenen gamların pirüvik asit oranından daha yüksek çıkmasının nedenlerinden bir diğeri olarak görülebilir.

Ksantanın pirüvik ve asetik asit içeriğinin, çözeltilerin viskozitesini etkileyen önemli bir faktör olduğu ve ksantan reolojik kalitesi için bir indikatör olarak kullanılabilmesi bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Ramírez, Fucikovsky, García-Jiménez, Quinteiro ve Galindo, 1988; Sandford vd., 1977). Yüksek oranda privülasyon gamın sulu çözeltisinin viskozitesini artırır, çünkü molekküler arası iş birliği desteklenir (Casas vd., 2000). Yüksek pirüvik asit içeriğine (%4 civarı) sahip ksantanlar düşük içeriğe sahip olanlara nazaran daha viskozduklar (Sandford vd., 1977; Smith, Symes, Lawson ve Morris, 1981; Borges vd., 2009). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara baktığımızda; yüksek pirüvat içeriği ile gam çözeltilerinin reolojik özellikleri arasında bir ilişki olabileceği görülmektedir. Şöyle ki; en iyi viskoz özellik gösteren *X. campestris* DSM 19000'dan elde edilen gamın pirüvik asit içeriğinin diğeri organizma gamlarına göre belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Bununla beraber; yapısında pirüvik asit tespit edilemeyen *X. hortorum* pv. *pelargonii*'den elde edilen ksantanın sulu çözeltilerde en düşük reolojik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Kawahara ve Obata (1998), yan zincirinde pirüvik asitten yoksun ksantan gamın düşük viskozite gösterdiğini belirtmiştir.

Fakat, bazı yazarlar da pirüvat içeriği ile polimer sulu çözeltilerinin reolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi destekleyecek veriler tespit etmemişlerdir (Kennedy vd., 1982; Callet, Milas ve Rinaudo, 1987; Torrestiana vd., 1990; Torres, Brito, Galindo ve Chopin, 1993; Rodriguez ve Aguilar, 1997).

Bazı araştırmacılar asetil grupların uzaklaştırılmasıyla, ksantan sulu çözeltilerinin viskozitesinin arttırılabildiğini (Sloneker ve Jeanes, 1962; Tako ve Nakamura, 1984) belirtirken, çalışmamızda olduğu gibi diğeri çoğu yazar ksantan asetik asit içeriği ile reolojik özellikler arasında ilişki tespit edememişlerdir (Bradshaw, Nisbet, Kerr ve Sutherland, 1983; Callet vd., 1987; Borges vd., 2009).

Asetik asit ve pirüvik asit konsantrasyonu; üretimde kullanılan mikroorganizma türü, besiyeri yanı sıra fermentasyon prosesinde kullanılan şartlara ve fermentasyon sonrası procese göre de farklılıklar sergileyebilmektedir. Çalıştığımız bakterilerden elde edilen gamların ticari

gama kıyasla daha düşük pirüvik asit içeriğine sahip olmasının nedenlerinden biri de ticari gamlar kadar geliştirilmiş bir saflaştırma prosesinin uygulanamamasından kaynaklanabilir.

Polimer performansını belirlemede çok önemli olan diğer faktör moleküler ağırlığıdır. Moleküler ağırlık kullanılan bakteri türleri ve gelişme koşulları ile değişebilmektedir (Papagianni vd., 2001). Bununla beraber, farklı gelişme besiyerleri, örneğin farklı substrat kullanımı ve sınırlı besin varlığı ksantanın ana iskelet yapısını etkilemez fakat yan zincirlerin yapısını, moleküler ağırlığı ve verimi etkilemektedir (Rosalam ve England, 2006). Çizelge 4.17'den de görüldüğü gibi atık ekmeklerden elde edilen ksantan gam örneklerinin ortalama moleküler ağırlıkları $1,41 \times 10^6$ - $1,76 \times 10^6$ g/mol arasında değişmiştir. Çalışmada üretilen gamlardan en yüksek molekül ağırlığına sahip olan *X. campestris* DSM 19000'den elde edilen gam olmuştur. Sanchez vd. (1997) de aynı fermentasyon koşullarında farklı izolatlar tarafından üretilen ksantan gamların farklı moleküler ağırlıklara sahip olduklarını belirlemiştir. Daha önceki çalışmalarda ksantan molekül ağırlığı değerleri 5×10^5 - $1,3 \times 10^7$ gibi çok geniş bir aralıkta değişmiştir (Borges vd., 2009). Bu, atık ekmeklerden elde edilen ksantan gamların normal moleküler ağırlığa sahip olduğunu göstermektedir. Atık ekmeklerden üretilen ksantan molekül ağırlıkları ticari gama göre daha düşük olmakla birlikte; tapyoka posasından elde edilen ksantan ile benzerlik göstermiştir (Gunasekar vd., 2014). Bununla beraber; değerlerimiz, melastan üretilen ksantan gam moleküler ağırlığı değerlerinden ($0,8$ - $1,4 \times 10^6$ Da) (Kalogiannis vd., 2003), mutfak atıklarından elde edilen gam molekül ağırlıklarından ($0,69$ - $1,37 \times 10^7$ g/mol) (Li vd., 2016) ise düşük olarak belirlenmiştir.

Ksantan gam moleküler ağırlığı, polimerin kıvam verici özellikleri açısından önemlidir. Bu çalışmada, literatüre uyumlu bir şekilde (Smith vd., 1981, Candia ve Deckwer, 1999, Borges vd., 2009, Li vd., 2016), pirüvik asit içeriği ve moleküler ağırlık artışının viskozitenin gelişimi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir.

4.7. En Yüksek Viskozite Sağlayan Şartlarda Üretilen Gamların Teknolojik Özellikleri

4.7.1. Su ve Yağ Tutma Kapasiteleri

Çalışmada kullanılan üç izolat ve standart tür tarafından en yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen gamların su ve yağ tutma kapasiteleri Çizelge 4.18'de gösterilmektedir. Elde edilen değerler ticari ksantan gam ile karşılaştırılmıştır. 100 g gam tarafından absorbe edilen su miktarı ticari gamda diğer gamlara göre en yüksek olarak tespit edilmiştir. Üretilen ksantan

gamları kıyasladığımızda, su tutma kapasitesi en yüksek *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*' dan elde edilen ksantan gamda saptanmış olup bunu sırasıyla *X. campestris* DSM 19000, *X. axonopodis* pv. *begoniae*, *X. hortorum* pv. *pelargonii*'den üretilen gamlar takip etmiştir.

100 g gam tarafından absorbe edilen yağ miktarı *X. hortorum* pv. *pelargonii*, *X. axonopodis* pv. *begoniae*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* DSM 19000'den elde edilen ksantan gamlarda ve ticari gamda sırasıyla 104, 112, 90, 156 ve 107g olarak tespit edilmiştir. Tüm gamlar kıyaslandığında yağ tutma kapasitesinin, *X. campestris* DSM 19000'den elde edilen ksantan gamda en yüksek olarak tespit edildiği görülmektedir. Üretilen ksantan gamlar ticari ksantan gam ile kıyaslandığında; su tutma kapasitesi en yüksek ticari ksantan gamda tespit edilirken, yağ tutma kapasitesi *X. campestris* DSM 19000 ve *X. axonopodis* pv. *begoniae*'den elde edilen ksantan gamlarda ticari gama göre daha yüksek tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. Ksantan gam örneklerinin su ve yağ tutma kapasiteleri

	100 g gam tarafından absorbe edilen su miktarı (g)	100 g gam tarafından absorbe edilen yağ miktarı (g)
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	210	104
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	540	112
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	710	90
<i>X. campestris</i> DSM 19000	410	156
Ticari gam	1240	107

4.7.2. Köpük Oluşturma Kapasite ve Stabiliteleri

Çalışmada atık ekmeklerden izolatlar ve standart tür ile üretilen ksantan gam örneklerinin köpük oluşturma kapasiteleri tespit edilebilir değerlerin altında belirlenmiştir. Ticari gamın köpük oluşturma kapasitesi ve zamanla değişen köpük stabilitesi ise Çizelge 4.19'da gösterilmiştir. Ticari gamın köpük oluşturma kapasitesi %4,48 olarak tespit edilmiştir. Ticari gamın köpük stabilitesi 1, 10, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda sırasıyla %100, 100,

99,05, 99,05, 98,57 ve 98,57 olarak tespit edilmiştir. Ticari gamın köpük stabilitesinde zamanla büyük değişimler gözlemlenmemiştir.

$$\text{Köpük oluşturma kapasitesi} = \frac{(105 - 100,5)}{(100,5)} \times 100$$

$$\text{Köpük oluşturma kapasitesi} = \%4,48$$

Çizelge 4.19. Ticari gam örneğinin köpük stabilitesi ve köpük oluşturma kapasitesi

Ticari gam	Köpük hacmi (mL)	Köpük stabilitesi (%)	Köpük oluşturma kapasitesi (%)
1. dk	105	100	
10. dk	105	100	
30. dk	104	99,05	4,48
60. dk	104	99,05	
90. dk	103,5	98,57	
120. dk	103,5	98,57	

4.7.3. Çözünürlükleri

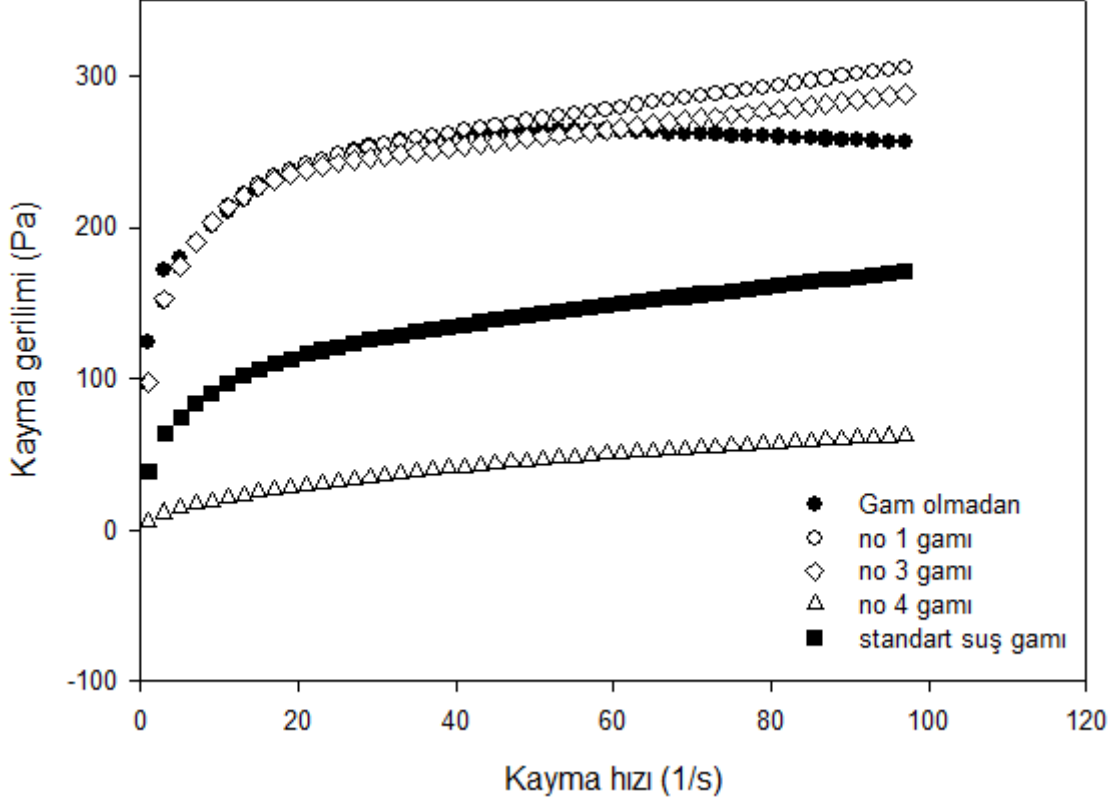
Çalışmada kullanılan üç izolat ve standart tür tarafından en yüksek viskozite sağlayan şartlarda üretilen gamların çözünürlük değerleri Çizelge 4.20'de gösterilmektedir. Elde edilen değerler ticari ksantan gam ile karşılaştırılmıştır. Ksantan gamların çözünürlük değerleri büyüklük sıralamasına göre *X. campestris* DSM 19000'den elde edilen gam, ticari gam, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *begoniae* ve *X. hortorum* pv. *pelargonii*'den elde edilen gamlar şeklindedir.

Çizelge 4.20. Ksantan gam örneklerinin çözünürlük değerleri

	Çözünürlük (%)
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	103,52x10 ⁻⁵
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	625,65x10 ⁻⁶
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	625,91x10 ⁻⁶
<i>X. campestris</i> DSM 19000	1047,56x10 ⁻⁶
Ticari gam	833,68x10 ⁻⁶

4.8. Ksantan Gam Örneklerinin Model Gıda Olarak Pudingte Kullanım İmkanlarının Belirlenmesi

Substrat olarak atık ekmeklerden *Xanthomonas* izolatları ve *X. campestris* DSM 19000 izolatı ile maksimum viskozite sağlayacak şartlarda üretilen ksantan gamlardan hazırlanan puding örneklerinin reolojik karakterizasyonu kapsamında ilk olarak yatışkan kayma (steady shear) halindeki viskozite değerleri 20 °C’de incelenmiş olup reogramları Şekil 4.22’te gösterilmiştir.



Şekil 4.22. *Xanthomonas* izolatları ve *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamlarla hazırlanan puding model gıdalarının 1-100 1/s aralığındaki viskozite reogramı (no 1-*X. hortorum* pv. *pelargonii*, no 3-*X. axonopodis* pv. *begoniae*, no 4- *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından, standart-*X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen gama aittir).

Genel olarak puding örnekleri literatürle uyumlu olarak gam-su çözeltisine benzer şekilde kaymayla incelen (shear thinning) akış davranış özelliği göstermiştir (Doublier ve Durand, 2008). Şekil 4.22'te görüldüğü üzere gam katılmadan ve *X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatlarından üretilen gamlarla hazırlanan örnekler birbirine benzer akış davranışı göstermiş ve viskoziteleri *X. campestris* DSM 19000 standart izolatı ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından üretilen gamla hazırlanan puding örneklerinden fazla olduğu görülmüştür. Gam katılmayan örnekte 50 s^{-1} kayma hızından yukarı çıkıldıkça kayma geriliminde azalma olmuş ve yapının gam katılanlara göre daha kolay bozulduğunun bir göstergesi olmuştur. Kayma gerilimi verilerinin kayma hızına karşı Ostwald de Waele modeline uyarlanmasından elde edilen parametreler Çizelge 4.21'de verilmiştir. R^2 değerinin 0,83 ve 0,99 arası çıkması modelin akış davranışlarına uygun olduğunu göstermiştir. Kıvamlilik indeksi (K), puding örneklerine ksantan gam katıldığında azalış göstermiş ve en

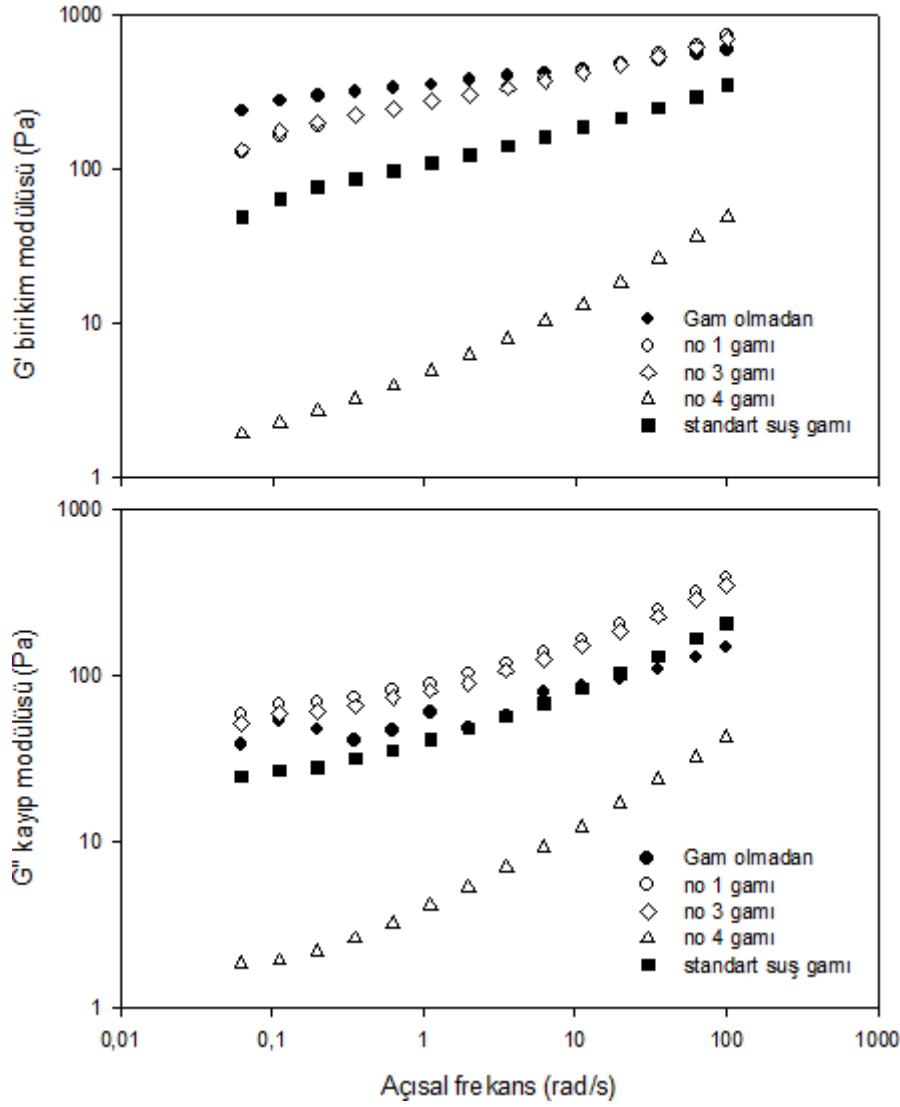
yüksek azalışın *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* ve *X. campestris* DSM 19000 izolatlarından elde edilen gamlar katıldığında oluştuğu gözlenmiştir. Bu örneklerde çarpıcı olarak K değeri sırasıyla 6,5 ve 5 Pa.sⁿ olarak gerçekleşmiştir. Bunu sırasıyla *X. hortorum* pv. *pelargonii* 133,2 Pa.sⁿ ile ve *X. axonopodis* pv. *begoniae* 139,3 Pa.sⁿ ile izlemiştir. Gam katılmayan örnekte ise K değeri 161,2 Pa.sⁿ olarak tespit edilmiştir. K (kıvam katsayısı) değerleri de aynı sırayla gerçekleştiği gözlenmiştir. n değerleri ise 0,12 ve 0,49 arası değişip gam katıldıkça yükseliş göstermiş ve kayma hızına daha fazla dayanabilen sağlam bir yapının kazanıldığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı bakteriler ile atık ekmeklerden üretilen ksantan gamların, puding model gıdalarının 20°C’de Ostwald de Waele parameterlerine olan etkisi

Çeşitler	K (Pa s ⁿ)	n (-)	R ²
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	133,2	0,18	0,97
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	139,3	0,16	0,94
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	6,5	0,49	0,99
<i>X. campestris</i> DSM 19000	5,0	0,27	0,99
Gam ilavesiz	161,2	0,12	0,83

K: kıvamlılık indeksi; n: akış davranış indeksi; R²: saptama katsayısı

Puding örneklerinin dinamik osilasyon analizleri göz önünde bulundurulduğunda (Şekil 4.23); bütün örneklerde G’>G’’ olup, puding örneklerinde elastik özelliğin sıvı özellikten baskın çıktığı ve zayıf jel özellik gösterdikleri tespit edilmiştir. Gam katılmayan, *X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *begoniae* izolatlarından elde edilen gamlarla oluşturulan puding örneklerinde G’ yani elastiklik özelliğin en yüksek olduğu görülmüştür. Fakat açısız frekansın artışıyla *X. axonopodis* pv. *begoniae* ve *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatlarından elde edilen gamla üretilen puding örneklerinin G’ değerlerinin gam katılmayan örnekten daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En düşük elastiklik özelliğin ise *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından üretilen gamın katılmasıyla oluştuğu görülmüştür. Elde edilen G’ ve G’’ verilerinin Power-law modele (Çizelge 4.22) uyarlanmasıyla genel olarak, en yüksek K’ değerinin gam katılmayan puding örneğinde olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla *X. axonopodis* pv. *begoniae*, *X. hortorum* pv. *pelargonii*, *X. campestris* DSM 19000 ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından üretilen gamla yapılan puding örneklerinin K’ değerleri izlemiştir.



Şekil 4.23. *Xanthomonas* izolatları ve *X. campestris* DSM 19000 izolatından elde edilen ksantan gamlarla hazırlanan puding model gıdalarının 1-100 rad/s açısal hız aralığındaki birikim ve kayıp modülüs eğrileri (no 1-*X. hortorum* pv. *pelargonii*, no 3- *X. axonopodis* pv. *begoniae*, no 4-*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatından, standart-*X. campestris* DSM 19000 suşundan elde edilen gama aittir).

Çizelge 4.22. Farklı bakteriler ile atık ekmeklerden üretilen ksantan gamların,puding model gıdalarının 20°C’de birikim ve kayıp modülüs parametrelerine olan etkisi

Çeşitler	G'			G''		
	K'	n'	R ²	K''	n''	R ²
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	255,3	0,22	0,99	84,6	0,32	0,98
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	259,8	0,2	0,99	75,7	0,32	0,98
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	3,67	0,55	0,99	3,47	0,54	0,99
<i>X. campestris</i> DSM 19000	103	0,25	0,99	37,5	0,36	0,99
Gam ilavesiz	343,6	0,11	0,99	53,7	0,2	0,97

G': birikim modülüsü; G'': kayıp modülüsü; R²: saptama katsayısı

Puding model gıdasının reolojik analizinden çıkan en önemli sonuç; gam katılmayan örneğin viskozite ve viskoelastik özelliklerinin gam katılan örneklerden daha iyi çıkmasına rağmen, substrat olarak atık ekmek kullanıldığında *X. axonopodis* pv. *begoniae* ve *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatlarından elde edilen gamlarla hazırlanan pudinglerin kesme hızına ve açılma frekansa daha dayanıklı olduğu ve daha sağlam jel yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Tezin ilk aşamasında; *Xanthomonas* izolatlarının ve standart bakterinin, substrat olarak atık ekmek hidrolizati kullanılan fermentasyon ortamında ksantan gam üretim potansiyellerinin belirlenmesi ve fermentasyon şartlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber fermentasyon koşullarının gamların reolojik özelliklerine etkisi araştırılmış ve reolojik özellikler için optimum şartlar belirlenmiştir.

Bu denemelerde elde edilen sonuçlara göre; yüksek verimin genelde inokulum hacmi ve karıştırma hızının her ikisinin aynı anda azaltılması veya artırılmasıyla elde edildiği tespit edilmiştir. Optimizasyon sonucunda atık ekmeklerden ksantan gam üretimi için en uygun parametreler, en yüksek ksantan gam miktarı ve ürün verimi şu şekildedir:

***X. hortorum* pv. *pelargonii* için %7,5 glukoz, 300 rpm ve %10,2 inokulum ile 12,5 gL⁻¹ ksantan gam konsantrasyonu, ksantan verimi = 0,166 g ksantan / g şeker**

***X. axonopodis* pv. *begoniae* için %8,5 glukoz, 300 rpm ve %15 inokulum ile 10,3 gL⁻¹ ksantan gam konsantrasyonu, ksantan verimi = 0,121 g ksantan / g şeker**

***X. axonopodis* pv. *vesicatoria* için %9,6 glukoz, 150 rpm ve % 9,6 inokulum ile 14,3 gL⁻¹ ksantan gam konsantrasyonu, ksantan verimi = 0,149 g ksantan / g şeker**

***X. campestris* DSM 19000 için %8,3 glukoz, 150 rpm ve %5 inokulum ile 12,9 gL⁻¹ ksantan gam konsantrasyonu, ksantan verimi = 0,155 g ksantan / g şeker**

Kullanılan izolatların, atık ekmek substratında yüksek verimde ksantan gam üretebildikleri belirlenmiştir. Ayrıca, kullanılan özgün izolatların atık ekmeklerden ksantan gam üretim potansiyellerinin standart bakteri *X. campestris* DSM 19000'e yakın veya daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Fermentasyon şartlarının, substrat olarak atık ekmek hidrolizati kullanılan fermentasyon ortamında *Xanthomonas* izolatlarının ve *X. campestris* DSM 19000 izolatının ürettiği ksantan gamların reolojisine etkisi denemeleri sonucuna göre en yüksek viskozite gösteren gamların üretildiği fermentasyon şartları şu şekilde belirlenmiştir:

***X. hortorum* pv. *pelargonii* için glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 175 rpm.**

X. axonopodis pv. *begoniae* için **glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 250 rpm**

X. axonopodis pv. *vesicatoria* için **glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5,5 ve karıştırma hızı 300 rpm**

X. campestris DSM 19000 için **glukoz oranı %4, inokulum hacmi %5 ve karıştırma hızı 225 rpm**

En yüksek gam verimine sebep olan fermentasyon koşullarının en yüksek gam viskozitesine sebep olan koşullardan farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum; gamların kullanım amacına göre farklı fermentasyon koşullarında üretilmesi gerektiğini göstermektedir. Çeşitli endüstriyel alanlarda yüksek gam verimi istenebilirken bazı uygulamalarda yüksek viskozite tercih sebebi olabilmektedir.

Tezin ikinci bölümünde; bir önceki bölümde belirlenen en iyi viskozite sağlayan üretim şartlarında gam üretimleri gerçekleştirilmiş ve bu şartlarda elde edilen gamların farklı konsantrasyonlardaki sulu çözeltilerinin ayrıntılı reolojik karakterizasyonu, bakterilerin fermentasyon kinetikleri, gamların fizikokimyasal, kompozisyonel ve teknolojik özellikleri belirlenmiştir.

Ksantan gam üretiminde substrat olarak atık ekmek kullanıldığı bu çalışma, ksantan gam üretiminde diğer substratların kullanıldığı çalışmalar ile kıyaslandığında; gamların sulu çözeltilerinin reolojik özelliklerinin substrat çeşidine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Genel olarak substrat çeşidinin sentezlenen ksantan gamın kimyasal kompozisyonunda farklılığa sebep olduğu böylece gamın suda gösterdiği reolojik özelliği etkilediği sonucuna varılabilir.

Fermentasyon kinetikleri sonuçlarına göre; genel olarak ksantan gam üretiminin 72. saate maksimum seviyelere ulaştığı ve 96. saate kadar aynı seviyelerde kaldığı görülürken, glukoz tüketiminin 96. saate kadar devam ettiği belirlenmiştir. Bu şartlarda yapılan fermentasyon prosesi sonunda elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

X. hortorum pv. *pelargonii* için **kullanılan şeker oranı %87,5, maksimum 7,6 gL⁻¹ ksantan gam üretimi ve %19 glukoz dönüşüm oranı**

X. axonopodis pv. *begoniae* için **kullanılan şeker oranı %87, maksimum 11,18 gL⁻¹ ksantan gam üretimi ve %29,5 glukoz dönüşüm oranı**

X. axonopodis pv. *vesicatoria* için kullanılan şeker oranı%87,5, maksimum 10,6 gL⁻¹ ksantan gam üretimi ve %26,5 glukoz dönüşüm oranı

X. campestris DSM 19000 için kullanılan şeker oranı%82,5, maksimum 12,7 gL⁻¹ ksantan gam üretimi ve%31,70 glukoz dönüşüm oranı

Üretilen biyopolimerlerin kimyasal kompozisyonunu incelendiğinde; bütün gamların ksantan gamın tipik monomerleri olan glukoz, mannoz ve glukuronik asit içerdiği ve bu açıdan ticari gam ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bununla beraber, sadece *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*'dan elde edilen ksantan gamda ramnoz tespit edilirken, *X. hortorum* pv. *pelargonii* ve *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* izolatlarından elde edilen gamlarda ve ticari gamda farklı oranlarda galaktoz belirlenmiştir. Karbonhidrat kompozisyonundaki farklılıklar çalışılan mikroorganizma türlerinden kaynaklanabilmektedir.

Genel olarak; çalışılan mikroorganizmalarla elde edilen ksantan gamların pirüvik asit içerikleri %2,17 ile %4,82 arasında, asetik asit içerikleri ise %3,45 ile %7,61 arasında bulunmuş olup, bu değerler literatürde belirtilen değerlerle uyumluluk göstermiştir. Ksantan gam örneklerinin, bakteri türüne ve fermentasyon koşullarına bağlı olarak farklı oranlarda pirüvik asit ve asetik asit içeriğine sahip olduğu, sadece *X. hortorum* pv. *pelargonii*'den elde edilen gamların pirüvik asit içermediği tespit edilmiştir. Bununlar beraber, diğer iki izolatın pirüvik asit ve asetik asit içerikleri standart bakteriden üretilen gamdan ve ticari gamdan daha düşük seviyelerde belirlenmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara bakıldığında; yüksek pirüvik asit içeriği ile gam çözeltilerinin reolojik özellikleri arasında bir ilişki olabileceği görülmektedir. Şöyle ki; en iyi viskoz özellik gösteren *X. campestris* DSM 19000'dan elde edilen gamın, pirüvik asit içeriğinin diğer organizmalardan belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapısında pirüvik asit tespit edilemeyen *X. hortorum* pv. *pelargonii*'den elde edilen ksantanın sulu çözeltilerin ise en düşük reolojik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Ksantan gam örneklerinin ortalama moleküler ağırlıkları 1,41x10⁶ ile 1,76x10⁶ g/mol arasında değişmiş olup, literatürde belirtilen değerler ile benzerlik göstermiştir. Ksantan gam moleküler ağırlığı, polimerin kıvam verici özellikleri açısından önemlidir. Pirüvik asit içeriği ve moleküler ağırlık artışının viskozitenin gelişimi ile bağlantılı olduğu söylenebilir.

Tezin son aşamasında ise gamların model gıdalarda kullanım olanakları araştırılmıştır. Üretilen gamlardan elde edilen puding örnekleri reolojik açıdan incelendiğinde ise tüm gamların diğer kıvam verici nişastayla antagonistik etki yaptığı görülmüş ve kıvam, gam katılmadan oluşturulan örneğe göre düşüş göstermiştir. Ancak gam katılmayan örneğin viskozite ve viskoelastik özelliklerinin gam katılan örneklerden daha iyi çıkmasına rağmen, *X. axonopodis* pv. *begoniae* ve *X. hortorum* pv. *pelargonii* izolatlarından elde edilen gamlarla hazırlanan pudinglerin kesme hızına ve açılmal frekansa daha dayanıklı olduğu ve daha sağlam jel yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu da puding örneklerinin gam katılmasıyla çalkalama, karıştırma gibi fiziksel dış etkenlere karşı yapısını daha iyi korumasına sebep olabilecektir.

Ksantan üretim maliyetini belirlemede en sık bahsedilen ve üzerinde durulan konu fermentasyon besiyeri maliyetleridir. İthal edilen polimer; glukoz veya sakkarozdan elde edilmekte ve karbon kaynağı maliyeti fermentasyonda kritik faktör olmaktadır. Üretimde substrat maliyeti toplam maliyetin 1/3'ünü oluşturmaktadır. Tez çalışmasında sunulan substrat (atık ekmek) ucuz ve umut vadeden, halihazırda kullanılan substratlar olan glukoz ve sakkarozun yerini alabilecek ve son ürün maliyetlerinin azalmasına yardım edecektir. Günümüzde, 10-12 USD olan 1 kg ticari ksantan gam maliyeti, atık ekmeklerden üretilirse önemli oranda azalacaktır. Her ne kadar bu çalışmanın amacı ekonomik analiz yapmak olmasa da atık ekmeklerin ksantan gama biyodönüşümü fizibil bir alternatif olarak görülmektedir.

Sonuç olarak; mevcut çalışma, atık ekmeklerin ksantan üretimi için değerlendirilmesi ve keşfedilmesi açısından literatürde ilk çalışmadır. Atık ekmeklerin substrat olarak kullanılmasıyla çalışmada kullanılan yerel, özgün izolatlardan yüksek verimde ksantan gam üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verimler literatüre göre endüstriyel üretim için uygun verim değerleridir (10-20 gL⁻¹) (Borges ve Vendruscolo 2007). Çalışmada kullanılan izolatlar içerisinde atık ekmeklerden gam üretim miktarı açısından en iyi bakteri *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* olurken, gam kalite özellikleri açısından *X. axonopodis* pv. *begoniae* ön plana çıkmıştır. Bu izolat 100 g atık ekmekten yaklaşık olarak 24 g ksantan gam üretebilmektedir.

Ayrıca çalışmada elde edilen sonuçlar atık ekmeklerin, düşük maliyetli ve verimli ksantan üretimi için yeni yollar açacak, güçlü potansiyeli ve umut veren özellikleri olduğunu göstermektedir. Bu yüzden endüstriyel ve ticari uygulamalar için güçlü bir aday olarak değerlendirilebilir. Bu durumda, ülkemiz atık ekmek miktarı ve düşük maliyet avantajları ile

ksantan ithalatını durdurup, üretici olabilir. Bu girişim Türkiye'nin ksantan gamı uluslararası pazarda daha düşük fiyatla satışa sunar pozisyona getirebilir.

KAYNAKLAR

- Abbaszadeh, A., Lad, M., Janin, M., Morris, G., MacNaughtan, W., Sworn, G. ve Foster, T. (2015). A novel approach to the determination of the pyruvate and acetate distribution in xanthan. *Food Hydrocolloid*, 44, 162-171.
- Agoub, A., Smith, A.M., Giannouli, P., Richardson, R. ve Morris, E. (2007). Melt in the mouth gels from mixtures of xanthan and konjac glucomannan under acidic conditions: a rheological and calorimetric study of the mechanism of synergistic gelation. *Carbohydrate Polymers*, 69, 713–724.
- Amanullah, A., Satti, S. ve Nienow, A.W. (1998). Enhancing xanthan fermentations by different modes of glucose feeding. *Biotechnology Progress*, 14, 265–269.
- Amanullah, A., Serrano, L.C., Galindo, E. ve Nienow, A. (1996). Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnology Progress*, 1996, 466-73.
- AOAC (2000). Official methods of analysis (17th ed.). Washington, D.C: Assn. of Official Analytical Chemists.
- Balows, A. ve Truper, H.G. (1991). The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York.
- Bahramparvar, M. ve Mazaheri Tehrani M. (2011). Application and functions of stabilizers in ice cream. *Journal Food Reviews International*, 27, 389-407.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A. ve Lelpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 50, 145-152.
- Ben Salah, R., Chaari, K., Besbes, S., Ktari, N., Blecker, C., Deroanne, C. ve Attia, H. (2010). Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121, 627–633.
- Ben Salah, R., Chaari, K., Besbes, S., Blecker, C. ve Attia, H. (2011). Production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 by fermentation of date juice palm by-products (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Food Process Engineering*, 34, 457–474.

- Benhura, M.A.N. ve Chidewe, C.K. (2004). Emulsifying properties of polysaccharide preparation isolated from the fruit of *Cordia abyssinica*. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 579-583.
- Bilanovic, D., Shelef, G. ve Green, M. (1994). Xanthan fermentation of citrus waste, *Bioresource Technology*, 48: 169-172.
- Borges, C.D. ve Vendruscolo, C.T. (2007). Xanthan Synthesized by Strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: Production, Viscosity and Chemical Composition. *Bioscience Journal*, 23:67-73.
- Borges, C.D., Moreira, A.D., Vendruscolo, C.T. ve Ayub, M.A.Z. (2008). Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. *Revista Argentina de Microbiologia*, 40: 81–85.
- Borges, C.D., de Paula, R.C.M., Feitosa, J.P.A. ve Vendruscolo, C.T. (2009). The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv *pruni* strain 106. *Carbohydrate Polymers*, 75, 262-268.
- Born, K., Langendorff, V. ve Boulenguer, P. (2005). Xanthan. In Biopolymers online, Steinbuchel A, Ed. Wiley-VCH. Weinheim, Germany, 259–269.
- Bradbury, J.F. (1984). Genus II: *Xanthomonas*. In: Krieg NR, Holt CG, editors. *Manual of systematic bacteriology*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. pp: 199-210.
- Bradshaw, I.J., Nisbet, B.A., Kerr, M.H. ve Sutherland, I.W. (1983). Modified xanthan - its preparation and viscosity. *Carbohydrate Polymers*, 1983: 23-38.
- Brunchi, C.E., Bercea, M., Morariu, S. ve Avadanei, M. (2016). Investigations on the interactions between xanthan gum and poly(vinyl alcohol) in solid state and aqueous solutions. *European Polymer Journal*, 84: 161–172.
- Byong, H.L. (1996). *Fundamentals of Food Biotechnology*. VCH Publishers Inc, United States.
- Caciano, P., Noreña, Z., Bayarri, S. ve Costell, E. (2014). Effects of xanthan gum additions on the viscoelasticity, structure and storage stability characteristics of prebiotic custard desserts, *Food Biophysics*, 10, 116-128.

- Cacik, F., Dondo, R.G. ve Marques, D. (2001). Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. *Computers and Chemical Engineering*, 25, 409–418.
- Cadmus, M.C., Lagoda, S.P., Burton, K.A., Pittsley, J.F., Knutson, C.A. ve Jeanes, A. (1976). Colonial Variation in : *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 942-8.
- Cadmus, M.C., Knutson, C.A., Lagoda, A.A., Pittsley, J.E. ve Burton, K.A. (1978). Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 1003–1014.
- Callet, F., Milas, M. ve Rinaudo, M. (1987). Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9, 291–293.
- Candia, J.L.F. ve Deckwer, W.D. (1999). Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. *Biotechnology Progress*, 15, 446–452.
- Carignatto, C.R.R., Oliveira, K.S.M., de Lima, V.M.G. ve Neto, P.O. (2011). New Culture Medium to Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian Journal of Microbiology*, 51, 283–288.
- Casas, J.A., Santos, V.E. ve Garcia-Ochoa, F. (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 282–291.
- Chaiya, B., Pongsawatmanit, R. ve Prinyawiwatkul, W. (2014). Optimisation of wheat flour based sponge cake formulation containing tapioca starch and xanthan gum. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 532-540.
- Chatterji, B.P., Amonkar, V., Jose, A., Almeida, D., Acharya, K., Nasir, N., De O., Agera, R. ve Darne, R. (2015). Utility of Xanthan Gum Produced from Agro Food Waste. Proceedings of the India International Science Festival- Young Scientists' Meet, Paper Code: Waste-23, Department of Science and Technology, Government of India.
- Chavan. S. ve Baig, M.M.V. (2016). Relationship of Biomass and Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*: Optimization of Parameters. *British Biotechnology Journal*, 11,1-8.

- Cheetman, N. ve Punruckvong, A. (1985). An HPLC method for the determination of acetyl and pyruvyl groups in polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 5, 599–606.
- Cho, H.M. ve Yoo, B. (2015). Rheological characteristics of cold thickened beverages containing xanthan gum–based food thickeners used for dysphagia diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115, 106-111.
- Christense, S. (1991). Carrageenan, Xantan, Food Additives. The Third International Congress on Food Industry, 171-208, Kuşadası.
- Coffman, C.W. ve Garcia, V.V. (1977). Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *Journal of Food Technology*, 12, 473-484.
- Dakia, P.A., Blecker, C., Roberta, C., Watheleta, B. ve Paquota, M. (2008). Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22, 807-818.
- Davidson, I.W. (1978). Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*, 3, 347–349.
- De Vuyst, L., Vermeire, A., Van Loo, J. ve Vandamme, E.J. (1987a). Nutritional, physiological and process-technological improvements of xanthan gum fermentation process. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 1881–1900.
- De Vuyst, L., Van Loo, J., Vandamme, E.J. (1987b). Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 39, 263–273.
- De Vuyst, L. ve Vermeire, A. (1994). Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 187–191.
- Demirci, A.Ş. (2010). *Xanthomonas campestris* Kullanılarak Pirinç Kepeğinden Ksantan Gam Üretimi. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi, Tekirdağ.
- Demirci, A.S., Arici, M., Gumus, T. (2012). Xanthan Gum Production from Hydrolyzed Rice Bran as a Carbon Source by *Xanthomonas* spp. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*, 40, 356–363.

- Demirci, A.S, Palabiyik, I., Gumus, T. ve Ozalp, S. (2017). Waste Bread as a Biomass Source: Optimization of Enzymatic Hydrolysis and Relation between Rheological Behavior and Glucose Yield. *Waste Biomass Valor*, 8,775–782.
- Dikeman, C.L. ve Fahey, G.C. (2006). Viscosity as related to dietary fiber: A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 46, 649-663.
- Dodic, J.M., Vudurovid, D.G., Grahovac, J.A., Dodic, S.N., Popov, S.D. ve Jokic, A.I. (2011). Utilization of maltose enriched spend grains liquor for xanthan production. *Acta Periodica Technologica*, 42,211-221.
- Dziezak, J.D. (1991). A focus on gums. *Food Technology*, 45 (3), 116-130.
- El-Salam, M.H.A., Fadel, M.A. ve Murad, H.A. (1994). Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. *Journal of Biotechnology*, 33, 103–106.
- Esgalhado, M.E., Roseiro, J.C., Amaral, C.M.T. (1995). Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. *Process Biochemistry*, 30 (7): 667–671.
- Erve Glicman, M. (1972). Handbook of Food Additives. I. Gums. General Food Corporation Corporate Research Department Tarrytown, New York.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (1990). Production yearbook 1989. Roma, Codebook, ECON-109.
- Faria, S., Vieira, P.A., Resende, M.M., Ribeiro, E.J. ve Cardoso, V.L. (2010). Application of a model using the phenomenological approach for prediction of growth and xanthan gum production with sugar cane broth in a batch process. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 498–506.
- Faria, S., Petkowicz, C.L.O., Morais, S.A.L., Terrones, M.G.H., Resende, M.M., Franc, F.P. ve Cardoso, V.L. (2011). Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth Sandra. *Carbohydrate Polymers*, 86, 469– 476.
- Fitzpatrick, P., Meadows, J., Ratcliffe, I., Williams, P.A. (2013). Control of the properties of xanthan/glucomannan mixed gels by varying xanthan fine structure. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1018-1025.

- Flickinger, F.C. ve Draw, S.W. (1999). Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation (vol.5) s. 2706–2707.
- Flores-Candia, J.L. ve Deckwer, W.D. (1999). Xanthan gum Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, In: Flickinger, M.C., Drew, S.W. (Eds.). Wiley, New York, 2695–2711.
- Funahashi, H., Yoshida, T. ve Taguchi, H. (1987). Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation Technology*, 65, 603–606.
- Galla, N.R. ve Dubasi, G.R. (2010). Chemical and functional characterization of Gum karaya (*Sterculia urens L.*) seed meal. *Food Hydrocolloids*, 24, 479-485.
- García-Ochoa, F. ve Casas, J.A. (1994). Apparent yield stress in xanthan gum solution at low concentrations. *Chemical Engineering Journal*, 53, 41–46.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E. ve Alcon, A. (2004). Chemical structured kinetic model for xanthan production. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 284–292
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E. ve Alcon, A., (1996). Simulation of xanthan gum production by a chemically structured kinetic model. *Mathematics and Computers in Simulation* 42, 187–195.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E. ve Casas, J.A. (1999). Production and isolation of xanthan gum methods in biotechnology. *Carbohydrate Biotechnology, Protocols*, Cap 2, Volume: 10, Humana Press Inc, Bucke (Ed.). New Jersey, USA.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E. ve Fritsch, A.P. (1992). Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 991–997.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A. ve Gómez, E. (2000). Xanthangum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18, 549–579.
- Ghashghaei, T., Soudi, M.R. ve Hoseinkhani, S. (2016). Optimization of Xanthan Gum Production from Grape Juice Concentrate Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Applied Food Biotechnology*, 3 (1), 15-23.

- Gilani, S., Najafpour, G., Heydarzadeh, H. ve Zare, H. (2011). Kinetic models for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* from molasses. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly Journal*, 17, 179-187.
- Gomes, G.V.P, Assis, D.J., Silva, J.B.A., Santos-Ebinuma, V.C., Costa, L.A.S., Druzian, J.I. (2015). Obtaining xanthan gum impregnated with cellulose microfibrils derived from sugarcane bagasse. *Materials Today: Proceedings*, 2: 389 – 398.
- Grigelmo-Miguel, N., Abadias-Seros, M.I. ve Martin-Bellosa, O. (1999). Characterisation of Low-Fat High-Dietary Fiber Frankfurters. *Meat Science*, 52, 247-256.
- Gumus, T., Demirci, A.S., Mirik, M., Arici. M., Aysan, Y. (2010). Xanthan gum production of *Xanthomonas* spp. isolated from different plants. *Food Science Biotechnology*, 19 (1), 201–206.
- Gunasekar. V., Reshma, K.R., Treesa, G., Gowdhaman, D., Ponnusami, V. (2014). Xanthan from sulphuric acid treated tapioca pulp: influence of acidconcentration on xanthan fermentation. *Carbohydrate Polymers*, 102: 669–673.
- Hamcerencu, M., Desbrieres, J., Popa, M., Khoukh, A. ve Riess, G. (2007). New unsaturated derivatives of xanthan gum: Synthesis and characterization. *Polymer*, 48, 1921–1929.
- Heyraud, A., Sayah, B., Vojnov, A., Colin-Morel, P., Gey, C., Geremia, R. ve Dankert, M. (1998). Structure of an extracellular mannosylated cellulose produced by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Cellular and Molecular Biology*. 44 (3), 447–454.
- Hublik, G. (2016) Xanthan. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, 1-9.
- Jackson, M.A., Frymier, J.S., Wilkinson, B.J., Zorner, P. ve Evans, S. (1998). Growth requirements for production of stable cells of the bioherbicidal bacterium *Xanthomonas campestris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21, 237-241.
- Jansson, P.E., Kenne, L., Lindberg, B. (1975). Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45, 275–282.
- Jeanes, A., Rogovin, P., Cadmus, M.C., Silman, R.W. ve Knutson, C.A. (1976). Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures of

- culture maintenance and polysaccharide production purification and analysis. ARS-NC-51. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois.
- Johansen, H.P., Glitsø, V. ve Knudsen, K.E.B. (1996). Influence of Extraction Solvent and Temperature on the Quantitative Determination of Oligosaccharides from Plant Materials by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (6),1470–1474.
- Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D.A., Skaracis, G.N. (2003). Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses, *Process Biochemistry*, 39, 249–256.
- Kang, F.S., Pettit, D.J. (1993). Xanthan, gellan, welan, and rhamnan. Polysaccharides and their derivatives, 3rd ed., Academic Press, San Diego, USA, 341–399.
- Katzbauer B, (1998). Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 81–84.
- Kaur, M., Sandhu, K.S., Arora, A., Sharma, A. (2014). Gluten free biscuits prepared from buckwheat flour by incorporation of various gums: Physicochemical and sensory properties. *LWT- Food Science and Technology*, 62, 628-632.
- Kawahara, H. ve Obata, H. (1998). Production of xanthan gum and ice-nucleating material from whey by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49,353-358.
- Kennedy, J.F., Jones, P., Barker, S.A. ve Banks, G. (1982). Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. *Enzyme and Microbial Technol*, 4, 39-43.
- Kerdsup, P., Tantratian, S., Sanguandeeikul, R. ve Imjongjirak, C. (2009). Xanthan production by mutant strain of *Xanthomonas campestris* TISTR 840 in raw cassava starch medium. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1459-1462.
- Khouryieh, H.A., Aramouni, F.M. ve Herald, T.J. (2005). Physical and sensory characteristics of no-sugar-added/low-fat muffin. *Journal of Food Quality*, 28, 439-451.
- Kim, S.G., Yoo, W. ve Yoo, B. (2014a). Effect of thickener type on the rheological properties of hot thickened soups suitable for elderly people with swallowing difficulty. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19, 358-362.

- Kim, S.G., Yoo, W. ve Yoo, B. (2014b). Relationship between apparent viscosity and linespread test measurement of thickened fruit juices prepared with a xanthan gum-based thickener. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19, 242-245.
- Kongruang, S. (2005). Growth kinetics of xanthan production from uneconomical agricultural products with *Xanthomonas campestris* TISTR 1100. *The Journal of Applied Science*, 4(2), 78–88.
- Koníček, J., Lasík, J., Safár, H. (1993). Xanthan gum produced from whey by mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Folia Microbiologica*, 28, 403-5.
- Lawson, C.J. ve Symes, K.C. (1977). Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. *Carbohydrate Research*. 58, 433-438.
- Leela, J.K. ve Sharma, G. (2000). Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 23, 687-689.
- Letisse, F., Chevallereau, P., Simon, J.L. ve Lindley, N.D. (2001). Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 417–422.
- Li, P., Li, T., Zeng, Y., Li, X., Jiang, X., Wang, Y. ve Xie, T. (2016). Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LRELP-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydrate Polymers*, 151: 684–691.
- Liakopoulou-Kyriakides, M., Psomas, S. ve Kyriakidis, D. (1999). Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* wt fermentation from chestnut extract. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 82, 175-183.
- Liakopoulou-Kyriakides, M., Tzanakakis, E.S., Kiparissidis, C., Ekateriniadou, L.V. ve Kyriakidis, D.A. (1997). Kinetics of xanthan gum production from whey by constructed strains of *Xanthomonas campestris* in both fermentations. *Chemical Engineering & Technology*, 20, 354–360.
- Lo, Y.M., Yang S.T. ve Min D.B. 1997. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 689-694.

- Lopez, M.J. ve Ramos-Cormenzana, A. (1996). Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, 263–270.
- Margaritis, A., Zajic, J.E. (1978). Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 939–1001.
- Melikoglu, M. ve Webb, C. (2013). Use of waste bread to produce fermentation products. *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*, Kosseva, M., Webb, C. (eds.). Academic Press, London .
- Mesomo, M., Silva, M.F., Boni, G., Padilha, F.F., Mazutti, M., Mossi, A., Oliveira, D., Cansian, R.L., Luccio, M. ve Treichel, H. (2009). Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheesewhey: production optimisation and rheological characterisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2440–2445.
- Milas, M., Rinaudo, M. (1979). Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. *Carbohydrate Research*, 76, 189-196.
- Milas, M. ve Rinaudo, M. (1986). Properties of xanthan gum in aqueous solutions: role of the conformational transition. *Carbohydrate Research*, 158, 191-204.
- Milas, M., Rinaudo, M. ve Tinland, B. (1985). The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin*, 14, 157-164.
- Mirik, M., Demirci, A.S., Gumus, T., Arıcı, M. (2011). Xanthan Gum Production under Different Operational Conditions by *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* Isolated from Pepper Plant. *Food Sci. Biotechnol*, 20, 1243-1247.
- Mohammadi, M., Sadeghnia, N., Azizi, M.H., Neyestani, T.R., Mortazavian, A.M. (2014). Development of gluten-free flat bread using hydrocolloids: Xanthan and CMC. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, 1812-1818.
- Molina, O., Fitzsimons, R., Perotti, N. (1993). Effect of corn step liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Letters*, 15, 495-498.
- Moosavi, A. ve Karbassi, A. (2010). Bioconversion of sugarbeet molasses into xanthan gum. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 316-322.
- Moraine, R.A. ve Rogovin, P. (1971). Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*, 13, 381–91.

- Moraine, R.A. ve Rogovin, P. (1973). Kinetics of the xanthan fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 225–237.
- Moreno, J., Lopez, M.J., Vargas-Garcia, C. ve Vazquez, R. (1998). Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 242-246.
- Moreira, A.S., Vendruscolo, J.L.S., Gil-Tunes, C. ve Vendruscolo, C.T. (2001). Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. *Food Hydrocolloids*, 15, 469-474.
- Morris, V.J., Brownsey, G.J., Ridout, M.J. (1993). Acetan and related polysaccharides. *Polymer News*, 18, 294–300.
- Morris, E.R., Rees, D.A., Young, G., Walkinshaw, M.D. ve Darke, A. (1977). Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution: a role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. *Journal of Molecular Biology*, 110, 1–16.
- Nasr, S., Soudi, M.R. ve Haghghi, M. (2007). Xanthan production by a native strain of *Xanthomonas campestris* and evaluation of application in EOR. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (17),3010–3013.
- Nery, T.B.R., Cruz, A.J.G. ve Druzian, J.I. (2013). Use of Green Coconut Shells as an Alternative Substrate for the Production of Xanthan Gum on Different Scales of Fermentation. *Polímeros*, 23, 602-607.
- Nitschke, M. ve Thomas, R.W.S.P. (1995). Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. *World Journal of Microbiology&Biotechnology*, 11: 502-504.
- Nitschke, M., Thomas, R.W.S.P. ve Knauss, C. (1997). Production by *Xanthomonas campestris* in a whey-based medium. *Revista de Microbiologia*, 28, 148-151.
- Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A. ve Biria, D. (2014). Production of xanthan gum by *Xanthomonas* species using starch as carbon source. *Minerva Biotecnologica*, 26, 191–197.

- Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A., Biria, D. ve Doostmohammadi, M. (2015). Optimization of Xanthan Gum Production Using Cheese Whey and Response Surface Methodology. *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 453-460.
- Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A. ve Biria, D. (2016). Production of xanthan gum by free and immobilized cells of *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 751-756.
- Pace, G.W. (1987). Basic Biotechnology (Academic Press). In: Kristiansen B, Bu'lock J, editors. London.
- Palaniraj, A. ve Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*, *Journal of Food Engineering*, 106, 1–12.
- Papagianni, M., Psomas, S.K., Batsilas, L., Paras, S.V., Kyriakidis, D.A. ve Liakopoulou-Kyriakides, M. (2001). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37, 73–80.
- Papi, R.M., Ekateriniadou, L.V., Beletsiotis, E., Typas, M.A. ve Kyriakidis, D.A. (1999). Xanthan gum and ethanol production by *Xanthomonas campestris* and *Zymomonas mobilis* from peach pulp. *Biotechnology Letters*, 21, 39-43.
- Peters, H.U., Herbst, H., Hesselink, P.G.M., Lunsdorf, H., Schumpe, A., Deckwer, W.D. (1989). The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 1393–1397.
- Peters, H.U., Suh, I.F., Schumpe, A. ve Deckwer, W.D. (1993). The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotechnology Letters*, 15, 565–566.
- Pinches, A. ve Pallent, L.J. (1986). Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1484–1496.
- Pollock, T.J. ve Thorne, L. (2003). Preparation of xanthan gum using *Xanthomonas campestris* having lactose utilisation genes integrated into the chromosome. *European Patent Registry*, EP 0589205 B1.

- Psomas, S.K., Liakopoulou-Kyriakides, M. ve Kyriakidis, D.A. (2007). Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 273-280.
- Rahbari, M., Aalami, M., Kashaninejad, M., Maghsoudlou, Y. ve Aghdaei, S.S.A. (2014). A mixture design approach to optimizing low cholesterol mayonnaise formulation prepared with wheat germ protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 52:3383-3393.
- Rajeshwari, K.V., Prakash, G. ve Ghosh, P. (1995). Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 173-175.
- Ramírez, M.E., Fucikovsky, L., García-Jiménez, F., Quinteiro, R and Galindo, E. (1988). Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 5–10.
- Rinaudo, M. ve Moroni, A. (2009). Rheological behavior of binary and ternary mixtures of polysaccharides in aqueous medium. *Food Hydrocolloid*, 23, 1720-1728.
- Rocheffort, W.E. ve Middleman, S. (1987). Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. *Journal of Rheology*, 31, 337-369.
- Rodriguez, H. ve Aguilar, L. (1997). Detection of *Xanthomonas campestris mutants with increased xanthan production*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 232–234.
- Rosalam, S. ve England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 197–207.
- Rosalam, S., Krishnaiah, D. ve Bono, A. (2008). Cell free xanthan gum production using continuous recycled packed fibrous-bed bioreactor-membrane. Malays. *The Journal of Microbiology*, 4, 1–5.
- Rottova, I., Batessini, G., Silva, M.F., Lerin, L., Oliveira, D., Padilha, F.F., Toniazzo, G., Mossi, A., Cansian, R.L., Luccio, M.D. ve Treichel, H. (2009). Xanthan gum

- production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*, 77, 65-71.
- Saied, E.L., Gabr, S.A., Hamed, A.S., Hefnawy, H.T.M. (2002). Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. Annual meeting and food expo – Anaheim, California.
- Saldamlı, İ. (2007). Karbonhidratlar. Gıda Kimyası Kitabı, Hacettepe Yayınları, 3. Baskı, Ankara. s:112.
- Sanchez, A. Ramirez, M.E., Torres, L.G., Galindo, E. (1997). Characterization of xanthan from selected *Xanthomonas* strains cultivated under constant dissolved oxygen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 443–451.
- Sandford, P.A., Pittsley, J.E., Knutson, C.A., Watson, P.R., Cadmus ve M.C., Jeanes, A. (1977). Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. *Extracellular Microbial Polysaccharides*, 45, 192–209.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S. ve Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37, 19-27.
- Savvides, A.L., Katsifas, E.A., Hatzinikolaou, D.G., Karagouni, A.D. (2012). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium. *World J Microbiol Biotechnol.* 28, 2759–2764.
- Sharma, B.R., Naresh, L., Dhuldhoya, N.C., Merchant, S.U., Merchant, U.C. (2006). Xanthan gum – a boon to food industry. *Food Promotion Chronicle*, 1, 27–30.
- Silman, R.W., Rogovin, P. (1972). Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 14,23-31.
- Silva, M.F., Fornari, R.C.G., Mazutti, M.A., Oliveira, D., Padilha, F.F., Cichoski, A.J., Cansian vd. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90, 119–123.
- Singh, V.B., Kumar, A., Kirubakaran, S.I., Ayyadurai, N., Kumar, R.S. ve Sakthivel, N. (2006). Comparison of exopolysaccharides produced by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains, BXO1 and BXO8 that show varying degrees of virulence in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Phytopathology*, 154, 410–413.

- Slodki, M.E. ve Cadmus, M.C., (1978). Production of microbial polysaccharides. *Advances in Applied Microbiology*, 23, 19–49.
- Sloneker, J.H. ve Jeanes, A. (1962). Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Canadian Journal of Chemistry*, 40, 2066-2071.
- Smith, I.H., Symes, K.C., Lawson, C.J. ve Morris, E.R. (1981). Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 3, 129-134.
- Smith, J.H. ve Pace, G.W. (1982). Recovery of microbial polysaccharides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 119–129.
- Souw, P. ve Demain, A.L. (1979). Nutritional studies on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 1186–1192.
- Souw, P. ve Demain, A.L. (1980). Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation Technology*, 58, 411–416.
- Souza, A.S. ve Vendruscolo, C.T. (1999). Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepas 24 e 58. *Ciência e Engenharia* 8, 115-123.
- Stanbury, P.F. ve Whitaker, A., Hall, S.J. (2000). Principles of fermentation technology (2nd ed.). Butterworth Heinemann.
- Stokke, B.T. ve Elgsaeter, A. (1992). Rheology of xanthan and scleroglucan in synthetic seawater. *Carbohydrate Polymers*, 17, 209 –20.
- Suh, I.S., Herbst, H., Schumpe, A. ve Deckwer, W.D. (1990). The molecular weight of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotechnology Letters*, 12, 201–206.
- Suh, I.S., Schumpe, A. ve Deckwer, W.D. (1992). Xanthan production in bubble column and air lift reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 85–94.
- Sutherland, I.W. (1983). Extracellular polysaccharide. In: Dellweg H (ed) *Biotechnology*, (Vol. 3), Weinheim, Verlag Chemie.

- Sutherland, I.W., Swings JG, Civerolo EL (1993). Xanthan from *Xanthomonas campestris*. London: Chapman & Hall. 363–388.
- Syafiq, A., Amir, I. ve Sharon, W. (2014). Mixture experiment on rheological properties of dark chocolate as influenced by cocoa butter substitution with xanthan gum/corn starch/glycerin blends. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 1887-1892.
- Sworn, G. (2002). Xanthan gum. Handbook of Hydrocolloids, Phillips, G.O.; Williams, P.A. (Eds). Woodhead Publishing, 103-111.
- Sworn, G., Kerdavid, E., Chevallereau, P. ve Fayos, J. (2012). Improved Xanthan gum. European Patent Registry. EP 2413714 A1.
- Tait, M.I., Sutherland, I.W. ve Sturman, C. (1986). Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. *Journal of General Microbiology* 132, 1483–1492.
- Tako, M. ve Nakamura, S. (1984). Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 2987-2993.
- TMO (Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü Müdürlüğü) (2013). Ekmek Tüketimiyle İlgili Tutum ve Davranışlar ile Ekmek İsrafı ve İsfraf Üzerinde Etkili Olan Faktörler Araştırması, Şubat 2013, 2. baskı.
- Torres, L.G., Brito, E., Galindo, E. ve Chopin, L. (1993). Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75, 58-64.
- Torrestiana, B., Fucikovsky, L. ve Galindo, E. (1990). Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 10, 81-83.
- Umashankar, H., Annadurai, G., Chellapandian, M. ve Krishnan, M. (1996). Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess engineering*, 14, 307–309.
- Wang, Z., Wu, J., Zhu, L. ve Zhan, X. (2017). Characterization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant strain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714. *Carbohydrate Polymers*, 157, 521-526.

- Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., Rocha, S.N. ve Pandey, A. (2004). Xanthan gum production from cassava bagasse hydrolysate with *Xanthomonas campestris* using alternative sources of nitrogen. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 118, 305-312.
- Yoo, S.D ve Harcum, S.W. (1999). Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, 70: 105-109.
- Zia, F., Zia, K.M., Zuber, M., Kamal, S. ve Aslam, N. (2015). Starch based polyurethanes: A critical review updating recent literature. *Carbohydrate Polymers*, 134, 784-798.

ÖZGEÇMİŞ

27/06/1989 tarihinde Edirne İlinde doğdu, ilk, orta ve lise öğrenimini Edirne'de tamamladı. 2007-2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimini tamamladı. 2012-2015 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2012-2017 yılları arasında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı. 2017 yılından itibaren, Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.

Demet APAYDIN