

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**D-SORBİTOL KULLANILARAK NADİR ŞEKERLERDEN
L-SORBOZUN FERMANTASYONLA ÜRETİM İMKANLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Hazal ÖZHANLI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**D-SORBİTOL KULLANILARAK NADİR ŞEKERLERDEN
L-SORBOZUN FERMANTASYONLA ÜRETİM İMKANLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Hazal ÖZHANLI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**D-SORBİTOL KULLANILARAK NADİR ŞEKERLERDEN
L-SORBOZUN FERMANTASYONLA ÜRETİM İMKANLARININ
ARAŞTIRILMASI**

**Hazal ÖZHANLI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 118O859 nolu proje kodu ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

D-SORBİTOL KULLANILARAK NADİR ŞEKERLERDEN
L-SORBOZUN FERMANTASYONLA ÜRETİM İMKANLARININ
ARAŞTIRILMASI

Hazal ÖZHANLI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 09/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Dr. Öğr. Üyesi Reha Onur AZİZOĞLU

ÖZET

D-SORBİTOL KULLANILARAK NADİR ŞEKERLERDEN L-SORBOZUN FERMANTASYONLA ÜRETİM İMKANLARININ ARAŞTIRILMASI

Hazal ÖZHANLI

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

Temmuz 2021; 69 sayfa

L-sorboz, $C_6H_{12}O_6$ kapalı formülüne sahip ketoz bir monosakkarittir. Doğada nadir bir şeker olarak doğal kaynaklarda oldukça düşük miktarda bulunan L-sorboz yaygın olarak *Gluconobacter* veya *Acetobacter* türleri kullanılarak D-sorbitolün mikrobiyal oksidasyonu yoluyla üretilmektedir. L-sorbozun gıda endüstrisinde en önemli kullanım alanı C vitamini sentezinde başlangıç veya ara materyal olarak kullanımı olup, dünya genelinde üretilen L-sorbozun çoğunluğu C vitamini üretiminde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak D-sorbitolden fermantasyon ile L-sorboz üretimi üzerine etkili olan fermantasyon koşullarının optimize edilmesi amaçlanmış ve optimizasyon işlemi çalkalamalı inkübatör ve biyoreaktör ölçeğinde olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında; çalkalamalı inkübatörde L-sorboz üretimi üzerine etkili olan D-sorbitol konsantrasyonu, besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık ve çalkalama hızı parametrelerinin yanıt yüzey metodu kullanılarak optimize edilmesi amaçlanmıştır. Fermantasyon koşullarının optimizasyonu için bağımsız değişkenlerin sınır değerleri; D-sorbitol konsantrasyonu için 90 ila 170 g/L, başlangıç pH değeri için 6 ila 8, sıcaklık için 25 ila 35°C ve çalkalama hızı için 150 ila 250 rpm olarak belirlenmiştir. Belirlenen parametreler ile merkezi kompozit tasarım istatistik yöntemi ile orta noktanın 3 kere tekrarlandığı toplam 27 üretimlik bir deneme deseni kullanılmıştır. Fermantasyon süresince yapılan örneklemeler ile optik yoğunluk, D-sorbitol ve L-sorboz miktar analizleri yapılmıştır.

Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen tüm fermantasyon denemeleri sonunda L-sorboz üretim miktarı üzerine; D-sorbitol konsantrasyonunun, başlangıç pH değerinin, sıcaklığın, D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık, pH-sıcaklık ve sıcaklık-çalkalama hızı interaksiyonlarının ve D-sorbitol konsantrasyonu, pH değeri ve çalkalama hızı karelerinin önemli ($p < 0.01$; $0.01 < p < 0.05$) seviyede etkili oldukları ancak çalkalama hızının istatistiksel olarak önemli ($p > 0.05$) bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Çalkalamalı inkübatör denemeleri sonucunda L-sorboz üretimi için optimum fermantasyon koşulları 127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, 7.20 besiyeri başlangıç pH değeri, 35°C sıcaklık ve 224 rpm çalkalama hızı olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen 168 saatlik doğrulama fermantasyonuyla %89.95 dönüşüm oranı ile L-sorboz üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucu elde edilen optimum koşullar kullanılarak, 1.5 L çalışma hacminde ve 700 rpm karıştırma hızında biyoreaktörde 0.5, 1.0 ve 1.5 vvm hava akım koşullarında 1x3 faktöriyelik yeni bir deneme gerçekleştirilmiş ve 118 saat süren fermantasyonlar boyunca elde edilen örneklemeler ile belirlenen optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri ile fermantasyonlara ait kinetik parametreler hesaplanmıştır.

Farklı hava akım hızlarında gerçekleştirilen denemeler sonucunda, L-sorboz üretim miktarı üzerine hava akım hızının önemli ($p<0.01$) seviyede etkili olduğu tespit edilmiştir. Biyoreaktör denemeleri sonucunda optimum hava akım hızı %98.33 verim ile en yüksek miktarda L-sorboz üretiminin gerçekleştirildiği 1.5 vvm hava akım hızı olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen tüm biyoreaktör denemelerinde ortamın pH değeri takip edilmiş ve fermantasyon ortamının pH değeri 5 değerinin altına düşmeden L-sorboz üretiminin başlamadığı ve L-sorboz üretiminin ancak 72 ila 95 saat kadar sonra başladığı tespit edilmiştir.

Fermantasyon süresi üzerine besiyeri başlangıç pH değerinin etkisi göz önünde bulundurularak belirlenen optimum koşullar, besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan iki farklı üretim ile doğrulanmıştır. Doğrulama fermantasyonları sonucunda her iki pH değerinde L-sorboz üretim veriminin neredeyse eşit ve ortalama %99.36 olduğu ancak başlangıç pH değeri 7.2 olan üretim 118 saat sürerken, başlangıç pH değeri 5.0 olan üretimin 56 saat gibi kısa bir sürede tamamlandığı belirlenmiştir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde ise biyoreaktörde 700 rpm karıştırma hızında D-sorbitolden L-sorboz üretimi için optimum koşulların; 127.58 g/L besiyeri başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu, 5 başlangıç pH değeri, 35°C fermantasyon sıcaklığı ve 1.5 vvm hava akım hızı olduğu ve bu optimum koşullarda 56 saatte, %99.21 verim ile L-sorboz üretilbildiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez C vitamini üretim amaçlı L-sorboz üretimi de gerçekleştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: L-sorboz, D-sorbitol, *Gluconobacter oxydans*, Fermantasyon, Optimizasyon, Nadir şeker, C vitamini

JÜRİ: Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Dr. Öğr. Üyesi Reha Onur AZİZOĞLU

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PRODUCTION POSSIBILITIES OF RARE SUGAR L-SORBOSE BY FERMENTATION USING D-SORBITOL

Hazal ÖZHANLI

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

July 2021; 69 pages

L-sorbose is a ketose monosaccharide with the formula $C_6H_{12}O_6$. The most common method to produce L-sorbose, which is found in very low amounts in natural sources as a rare sugar in nature, is the bio-oxidation of D-sorbitol to L-sorbose using *Gluconobacter* or *Acetobacter* species. The most important use of L-sorbose in the food industry is its use as a starting or intermediate material in the synthesis of vitamin C, and L-sorbose is mostly produced worldwide for use in the production of vitamin C.

In this thesis, it was aimed to optimize the fermentation conditions that are effective on L-sorbose production by fermentation from D-sorbitol by using *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 strain, and the optimization process was carried out in two stages, in a shaking incubator and bioreactor scale.

In the first stage of the study, it was aimed to optimize the D-sorbitol concentration, initial pH value, temperature, and agitation speed parameters, which are effective on L-sorbose production in a shaking incubator, by using the response surface method. The limit values of the independent variables for the optimization of the fermentation conditions were determined as 90 to 170 g/L for the D-sorbitol concentration, 6 to 8 for the initial pH value, 25 to 35°C for the temperature, and 150 to 250 rpm for the agitation speed. A trial design of 27 productions, in which the midpoint was repeated 3 times, was used with the determined parameters and the central composite design statistical method. A trial design consisting of 27 productions, in which the midpoint was repeated 3 times, was used with the determined parameters and the central composite design statistical method. With the samples made during the fermentation, optical density, biomass, D-sorbitol, and L-sorbose amount analyzes were made.

On the amount of L-sorbose production at the end of all fermentation experiments carried out in the shaking incubator; D-sorbitol concentration, initial pH value, temperature, D-sorbitol concentration-temperature, pH-temperature, and temperature-agitation speed interactions, and D-sorbitol concentration, pH value, and agitation speed squares were significant ($p < 0.01$; $0.01 < p < 0.05$), but the agitation speed was not statistically significant ($p > 0.05$) effect. As a result of shaking incubator experiments, optimum fermentation conditions for L-sorbose production were determined as 127.58 g/L D-sorbitol concentration, initial pH value of 7.20, 35°C temperature and 224 rpm agitation speed. L-sorbose was produced with %89.95 conversion rate with 168 hours of fermentation carried out under the determined optimum conditions.

In the second stage of the study, a new 1x3 factorial trial was carried out at 0.5, 1.0, and 1.5 vvm airflow conditions in the bioreactor, using the optimum conditions obtained from the fermentation experiments carried out in the shaking incubator. The kinetic parameters of the fermentations were calculated with the optical density, biomass, D-sorbitol, and L-sorbose amount data determined by the samples obtained during the 118 hours of fermentation.

As a result of the experiments carried out at different airflow rates, it was determined that the airflow rate had a significant ($p<0.01$) effect on the amount of L-sorbose production. At the end of the bioreactor trials, the optimum air flow rate was determined as 1.5 vvm air flow rate, where the highest amount of L-sorbose production was realized with %98.33 yield. In all bioreactor experiments carried out, the pH value of the medium was followed, and it was determined that L-sorbose production did not start before the pH value of the fermentation medium fell below 5 and L-sorbose production started only after 72 to 95 hours.

As a result, it was determined that optimum conditions for L-sorbose production by fermentation from D-sorbitol using *G. oxydans* ATCC 621 strain were 127.58 g/L D-sorbitol concentration, 7.2 initial pH value, 35°C temperature, 224 rpm agitation speed, and 1.5 vvm airflow rate, and L-sorbose was produced with a yield of %99.51 from the fermentation carried out under optimum conditions.

The optimum conditions determined by considering the effect of the initial pH value of the medium on the fermentation time were confirmed by two different productions with the initial pH value of the medium 7.2 and 5.0. As a result of the fermentations, it was determined that the production yield of L-sorbose at both pH values was almost equal and the average yield was %99.36, but the production with the initial pH value of 7.2 was completed for 118 hours, the production with the initial pH value of 5.0 was completed in a shorter time, such as 56 hours.

When all the results are evaluated, the optimum conditions to produce L-sorbose from D-sorbitol at 700 rpm agitation speed in the bioreactor are 127.58 g/L initial D-sorbitol concentration, 5 initial pH values, 35°C temperature and 1.5 vvm air flow rate, and under these optimum conditions L-sorbose could be produced with a yield of %99.21 in 56 hours. With this study, L-sorbose production for the purpose of vitamin C production was also carried out for the first time in Turkey.

KEYWORDS: L-sorboz, D-sorbitol, *Gluconobacter oxydans*, Fermentation, Optimization, Rare sugar, Vitamin C

COMMITTEE: Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ

Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Asst. Prof. Dr. Reha Onur AZİZOĞLU

ÖNSÖZ

Nadir şekerlerden biri olan L-sorboz, gıda endüstrisinde henüz katkı maddesi olarak kullanılmamasına rağmen, C vitamini (L-askorbik asit) üretiminde doğrudan kullanımı sebebiyle gıda sektörü için ticari önemi yüksek bir bileşiktir. Dünya çapında üretilen L-sorboz çoğunlukla C vitamini üretiminde kullanılmaktadır.

L-sorboz dünyada üretilmekte olan bir bileşik olmasına rağmen ülkemizde henüz üretimi yapılmamakta ve L-sorboz üretimi üzerine yapılmış bilimsel bir araştırma da bulunmamaktadır. Bu nedenle L-sorbozun üretiminin ve L-sorboz üretimi üzerine etkili olan fermantasyon koşullarının optimize edilmesinin ülkemiz için bir yenilik niteliği taşıdığı değerlendirilmiştir.

Gluconobacter cinsine ait bazı doğal veya rekombinant suşlar kullanılarak elde edilebilen L-sorbozun üretiminde çeşitli faktörler L-sorboz üretim miktarını ve verimini kısıtlamaktadır. L-sorboz üretim verimi fermantasyonda kullanılan üretici mikroorganizmanın substrat inhibisyonuna uğraması nedeniyle besiyerinde bulunan D-sorbitol miktarından, oksidasyon için mikroorganizmanın sentezlediği enzimlerin aktivite gösterebileceği ortam pH değerinden, ortam sıcaklığından ya da mikroorganizmanın zorunlu aerob karakterde olması nedeniyle ortamda bulunan oksijen miktarından etkilenmektedir. Bu gibi etkiler sebebiyle en yüksek miktarda L-sorboz üretiminin gerçekleştirilebileceği fermantasyon koşullarının belirlenmesine yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, L-sorboz üretimi üzerine etkili olan D-sorbitol konsantrasyonu, başlangıç pH değeri, sıcaklık, çalkalama hızı ve hava akım hızı gibi parametrelerin optimize edilmesi amaçlanmıştır.

Ayrıca bu çalışma bir çatı proje olarak C vitamini üretimi üzerinde tasarlanmış ve TÜBİTAK tarafından 118O859 numara ile desteklenmiş olan proje kapsamında gerçekleştirilmiş olup, bu proje ve bu tez çalışmasının katkısı ile Türkiye’de ilk kez C vitamini üretimi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, tezin tüm aşamalarında yardım ve destekte bulunan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa ERBAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince gece geç saatlere denk gelen örneklemelerim dahil bana yardımcı olan Arş. Gör. Ceren MUTLU’ya, biyoreaktörde gerçekleştirdiğim üretimlere yardımcı olan Arş. Gör. Fatma ERSÖZ’e, çalışmama destek olan Öğr. Gör. Cihadiye Candal USLU’ya ve diğer tüm çalışma grubu arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesine 118O859 numaralı 1005 projesi aracılığıyla verdikleri destek nedeniyle Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her anında maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan çok değerli aileme de teşekkürlerimi sunarım.

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “D-Sorbitol Kullanılarak Nadir Şekerlerden L-Sorbozun Fermantasyonla Üretim İmkanlarının Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

09/07/2021

Hazal ÖZHANLI

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. L-sorboz.....	3
2.1.1. L-sorbozun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	3
2.1.2. L-Sorbozun bulunduğu kaynaklar	4
2.1.3. L-sorbozun sağlık üzerine etkileri	5
2.1.4. L-sorbozun kullanım alanları.....	6
2.1.5. L-sorbozun üretimi	7
2.1.5.1. Kimyasal yöntemlerle L-sorboz üretimi.....	7
2.1.5.2. Mikrobiyal yöntemlerle L-sorboz üretimi	8
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Kimyasal malzemeler	12
3.1.2. Mikroorganizma	12
3.2. Metot	12
3.2.1. Araştırma planı, örnekleme ve istatistiksel yöntemler	12
3.2.2. Ön kültür besiyerinin hazırlanması ve inkübasyonu	14
3.2.3. Zenginleştirme besiyerinin hazırlanması ve inkübasyonu.....	15
3.2.4. L-Sorboz üretiminin optimizasyonu	16
3.2.4.1. Çalkalamalı inkübatörde L-sorboz üretiminin optimizasyonu	16
3.2.4.2. Biyoreaktörde L-sorboz üretimi	17
3.3. Analiz Yöntemleri	18
3.3.1. D-sorbitol ve L-sorboz analizi	18
3.3.2. <i>G. oxydans</i> hücrelerinin kuru ağırlıklarının belirlenmesi	19
3.3.3. <i>G. oxydans</i> hücrelerinin optik yoğunluğunun ve biyokütle miktarının belirlenmesi.....	19

3.3.4. Kinetik parametrelerin hesaplanması	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1. Çalkalamalı İnkübatörde L-sorboz Üretiminin Optimizasyonu	21
4.1.1. Uygun model seçimi	34
4.1.2. Bağımsız değişkenlerin L-sorboz üretimi üzerine etkisi	37
4.1.2.1. D-sorbitol konsantrasyonunun etkisi	37
4.1.2.2. pH değerinin etkisi.....	39
4.1.2.3. Sıcaklığın etkisi	40
4.1.2.4. Çalkalama hızının etkisi	41
4.1.2.5. D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık, pH-sıcaklık ve çalkalama hızı-sıcaklık interaksyonlarının etkisi	42
4.1.3. Çalkalamalı inkübatörde L-sorboz üretimi için optimum koşulların belirlenmesi.....	44
4.2. Biyoreaktörde L-sorboz Üretimi için Hava Akım Hızının Optimizasyonu	47
4.2.1. Biyoreaktörde L-sorboz üretimi için optimum hava hızının belirlenmesi...	55
5. SONUÇLAR	61
6. KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
kcal	: Kilokalori
kg	: Kilogram
L	: Litre
mL	: Mililitre
OD	: Optik yoğunluk
pH	: Hidrojen iyonları konsantrasyonunun (mol/L) eksi logaritması
rpm	: Dakikada devir sayısı
sa	: Saat
vvm	: Dakikada birim hacim besiyerinden geçen L olarak hava miktarı (L/L/dk)

Bu tez kapsamında ondalık ayırıcı olarak “.” kullanılmıştır.

Kısaltmalar

2-KLG	: 2-keto-L-gulonik asit
ATCC	: American Type Culture Collection, Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CCD	: Merkezi Kompozit Tasarım
CV	: Varyasyon Katsayısı
EC	: Enzim komisyonu

F	: İstatistiksel F Değeri
FDA	: Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HCl	: Hidroklorik asit
HKT	: Hata Kareler Toplamı
HPLC	:High Performance Liquid Chromatography, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ISRS	: Uluslararası Nadir Şekerler Derneği
KO	: Kareler Ortalaması
LiAlH ₄	: Lityum Alüminyum Hidrür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NAD-SLDH	: NAD bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz
NADP-SLDH	: NADP bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz
Pred-R ²	: Tahmini Belirleme Regresyon Katsayısı
PRESS	: En Düşük Tahmin Edilen Hata Karelerinin Toplamı
PQQ-SLDH	: Pirolokinolin Kinon bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz
R ²	: Regresyon Katsayısı
R ² dzl	: Düzeltilmiş Regresyon Katsayısı
RID	: Refraktif İndeks Dedektörü
rRNA	: Ribozomal RNA
SD	: Serbestlik Derecesi
SH	: Standart Hata
SLDH	: D-sorbitol dehidrogenaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. L-sorbozun kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2.2. α -L-sorbopiranozun kimyasal yapısı	3
Şekil 2.3. D-sorbitol ve L-sorbozun yapıları ve enzimatik dönüşümleri.....	8
Şekil 2.4. <i>G. oxydans</i> mikroorganizmasının sitoplazma membranında bulunan pirolokinolin kinon bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz (PQQ-SLDH) enziminin D-sorbitolden L-sorboz üretimi.....	10
Şekil 3.1. Fermantasyon öncesi zenginleştirme besiyerinin hazırlanma görüntüleri a) Besiyeri bileşenlerinin tartılması b) Besiyeri pH değerinin ayarlanması c) Aseptik koşullarda 24 saat geliştirilmiş ön kültür besiyerinden zenginleştirme besiyerine inokülasyon işlemi d) Zenginleştirme besiyerinin çalkalamalı inkübatörde inkübasyona alınması.....	15
Şekil 3.2. Inkübatörde gerçekleştirilen denemelere ait bazı görüntüler a) Erlen ölçüğünde gerçekleştirilen üretim denemelerinin çalkalamalı inkübatörde geliştirilmesi b) Fermantasyon ortamından alınan santrifüj edilmiş örnek c) 72 saat sonunda fermantasyon işlemi tamamlanmış üretim denemeleri.....	17
Şekil 3.3. Biyoreaktörde L-sorboz üretim denemeleri.....	18
Şekil 3.4. HPLC cihazında D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının tayini için oluşturulan kalibrasyon kurveleri a) L-sorboz miktarının belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon kurvesi b) D-sorbitol miktarının belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon kurvesi	19
Şekil 4.1. <i>G. oxydans</i> mikroorganizmasının 0-176. saatler arasında optik yoğunluk, biyokütle miktarı, pH değişimi, D-sorbitol tüketim ve L-sorboz üretim miktarlarının zamanla değişim grafiği	22
Şekil 4.2. <i>G. oxydans</i> mikroorganizmasının ortalama optik yoğunluk ve biyokütle miktarının zamanla değişim grafiği	22
Şekil 4.3. En yüksek L-sorboz dönüşümünü sağlayan 9 numaralı fermantasyon denemesinden elde edilen 72. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı	33
Şekil 4.4. En yüksek L-sorboz dönüşümünü sağlayan 9 Numaralı fermantasyon denemesine ait biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının zamanla değişim grafiği	33
Şekil 4.5. L-sorboz üretimi için deneysel ve hesap edilen verilerin uyum grafiği	37
Şekil 4.6. D-sorbitol konsantrasyonu ve karesinin L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları	38
Şekil 4.7. Besiyeri başlangıç pH değerinin ve karesinin L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları.....	39
Şekil 4.8. Fermantasyon sıcaklığının L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları	40
Şekil 4.9. Çalkalama hızının L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları.....	41

Şekil 4.10. L-sorboz üretimi üzerine D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık interaksiyonunun etkisi	42
Şekil 4.11. L-sorboz üretimi üzerine pH değeri-sıcaklık interaksiyonunun etkisi	43
Şekil 4.12. L-sorboz üretimi üzerine çalkalama hızı-sıcaklık interaksiyonunun etkisi	44
Şekil 4.13. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonundan elde edilen 72. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı	46
Şekil 4.14. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonundan elde edilen 168. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı	46
Şekil 4.15. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonundan elde edilen ortalama biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamanla değişim grafiği	47
Şekil 4.16. Biyoreaktörde tüm hava akım hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının zamanla değişim grafiği.....	52
Şekil 4.17. Farklı hava akım hızlarında biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm fermentasyon denemelerinden elde edilen ortalama pH, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	54
Şekil 4.18. Optimum koşullarda biyoreaktörde besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan doğrulama fermentasyonunda pH, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamanla değişim grafiği	57
Şekil 4.19. Besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan doğrulama fermentasyonunda pH, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamanla değişim grafiği	58
Şekil 4.20. Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermentasyondan elde edilen 118. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarına ait analiz kromatogramı	59
Şekil 4.21. Besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermentasyondan elde edilen 56. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarına ait analiz kromatogramı	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. L-sorbozun bazı fizikokimyasal özellikleri	4
Çizelge 3.1. D-sorbitolden fermentasyon ile L-sorboz üretimi için uygulanan deneme deseni	13
Çizelge 4.1. Çalkalamalı inkübatör denemelerine ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri (I. ve II. tekerrür)	23
Çizelge 4.2. Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen 27 denemeye ait ortalama optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri (I. ve II. tekerrür)	32
Çizelge 4.3. Bağımsız değişkenlerin L-sorboz miktarı üzerine etkisini gösteren varyans analizi verileri	34
Çizelge 4.4. Kuadratik modelin çoklu regresyon istatistik değerleri	35
Çizelge 4.5. L-sorboz üretim miktarının deneysel ve hesap edilen (Eşitlik 4.1) verileri	36
Çizelge 4.6. L-sorbozun optimum üretim koşulları ve bu koşullarda üretilmesi hesaplanan L-sorboz miktarı	44
Çizelge 4.7. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonlarına ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri (I. ve II. tekerrür)	45
Çizelge 4.8. Biyoreaktör denemelerine ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri	48
Çizelge 4.9. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermentasyon zamanının, optik yoğunluk ve biyokütle miktar verileri üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları	49
Çizelge 4.10. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermentasyon zamanının, optik yoğunluk ve biyokütle miktar verileri üzerine etkisine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	49
Çizelge 4.11. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermentasyon zamanının, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları	50
Çizelge 4.12. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermentasyon zamanının, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri üzerine etkisine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	51
Çizelge 4.13. Biyoreaktör denemelerine ait kinetik parametreler	53
Çizelge 4.14. Optimum doğrulama fermentasyonlarına ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri	56

Çizelge 4.15. Biyoreaktörde optimum koşullarda iki farklı başlangıç pH değerinde gerçekleştirilen üretilere ait kinetik parametreler	60
---	----



1. GİRİŞ

Karbonhidratlar, doğada oldukça yaygın bulunan, bitki ve hayvan metabolizmasında temel rol alan organik bileşiklerdir. Karbonhidratlar, polihidroksi alkollerin aldehit veya keton türevleri olan bileşiklerin monomerik, oligomerik veya polimerik formları olarak tanımlanabilmektedir. Glikanlar veya sakkaritler olarak da isimlendirilen karbonhidratlar, temel enerji kaynağı olmalarının yanı sıra tat ve tekstür gibi gıdaların duyuşal ve teknolojik özelliklerini etkilemekte ve besinsel lif kaynağı olarak da beslenmede önem taşımaktadır (Saldamlı 2017). Beslenmede geçmişten günümüze sıklıkla kullanılmakta olan şekerler ise; duyuşal olarak tatlı tada sahip, suda çözünürlüğü yüksek ve molekül ağırlıkları düşük karbonhidratlar olarak tanımlanabilmektedir (Özhanlı vd. 2021). Şekerler özellikle gıda sanayinde gıda maddelerinin tatlandırılması, donma veya erime noktalarının değiştirilmesi, renklendirilmesi ve korunması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gil-Campos vd. 2015).

Beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak dünyada ve ülkemizde obezite, hiperlipidemi, hipertansiyon veya diyabet gibi hastalıkların görülme sıklığı ve bu hastalıklara bağlı oluşan komplikasyonlar son yıllarda artmıştır. Beslenmede temel besin ögesi olan karbonhidratlar ve şekerler ise yüksek glisemik indeks değerine sahip olmalarından dolayı prevalansı artmakta olan obezite, diyabet gibi hastalıklar ile yakından ilişkili bulunmaktadır. Bu sebeple günümüzde; enerji içeriği yüksek karbonhidratların ve şekerlerin tüketiminin azaltılması veya düşük kalorili tatlandırıcılar ile ikame edilmesi yönünde araştırmalara ihtiyaç duyulmuştur (Noronha vd. 2018). Gıda sektöründe kullanılan tatlandırıcıların ve şeker alkollerinin yanı sıra son yıllarda nadir şekerler de yaygın şekerler için ikame edici bir bileşen haline gelmiştir.

Nadir şekerler, Uluslararası Nadir Şekerler Derneği (ISRS) tarafından, doğada yaygın olmayan ve az miktarda bulunan monosakkaritler veya türevleri olarak tanımlanmaktadır (Zhang vd. 2017). Doğada sınırlı bulunabilirlikleri ve yüksek üretim maliyetlerine rağmen, sahip oldukları olumlu fizyolojik faydaları ve/veya teknolojik önemleri nedeniyle nadir şekerler kimya, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Nadir şekerler çoğunlukla düşük kalori içeriğine sahip olup, insan vücudunda oldukça düşük miktarda metabolize edilebilmektedirler. Aynı zamanda nadir şekerler genel olarak sakkarozun yaklaşık %70 ila 92 eşdeğer tatlılığında olup, gıda olarak kullanılabilenler düşük kalorili tatlandırıcı veya hacim artırıcı bileşenler olarak ilave edilebilmektedirler (Carvalho ve Fernandes 2019).

Tüm heksoz ve pentoz formundaki monosakkaritler arasından yalnızca D-glukoz, D-galaktoz, D-mannoz, D-fruktoz, D-ksiloz, D-riboz ve L-arabinoz olmak üzere 7 tanesi yaygın şekerler olarak sınıflandırılırken kalan tüm heksoz ve pentoz monosakkaritler doğal kaynaklarda oldukça az miktarlarda bulunmaları nedeniyle nadir şekerler olarak sınıflandırılmaktadır (Beerens vd. 2012). Nadir şekerlerin büyük kısmını polarize ışığı sola çeviren L izomeri yapısındaki monosakkaritler oluşturmaktadır (Zhang vd. 2017). Özellikle 6 karbon atomuna sahip nadir şekerler olan L-heksoz monosakkaritler, sahip oldukları terapötik etkiler ile çoğunlukla farmakoloji ve tıp alanında antiviral ve antikanser ilaçları geliştirmek için kullanılmaktadır (Perali vd. 2011). Gıda sektöründe ise L-sorboz, katkı maddesi olarak kullanılamamakla birlikte, C vitamini (L-askorbik asit)

üretiminde ara bileşen veya hammadde olarak kullanımı nedeniyle en yaygın kullanılan L-heksoz monosakkarittir (Chen vd. 2016). Bu nedenle doğada iz miktarda bulunmasına rağmen L-sorboz endüstriyel olarak en çok üretilen ve kullanılan L-heksoz nadir şekerdir.

L-sorboz üretimi; kimyasal, enzimatik ve mikrobiyal yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. L-sorbozun endüstriyel üretiminde çoğunlukla maliyeti düşük ve verimi yüksek bir yöntem olan mikrobiyal yöntem kullanılmakta ve bu yöntem *Gluconobacter* veya *Acetobacter* türlerinin çeşitli karbonhidrat kaynaklarını L-sorboza fermente etmesiyle gerçekleştirilmektedir (Zebiri vd. 2011). Dünyada yıllık yaklaşık 60.000 ton L-sorboz üretimi, *Gluconobacter oxydans* mikroorganizması kullanılarak bir şeker alkolü olan D-sorbitolün oksidasyonu ile yapılmakta ve bu oksidasyon işlemi *G. oxydans* mikroorganizmasında bulunan sorbitol dehidrogenaz enzimi ile gerçekleştirilmektedir (Šefčovičová vd. 2009; Kim vd. 2019).

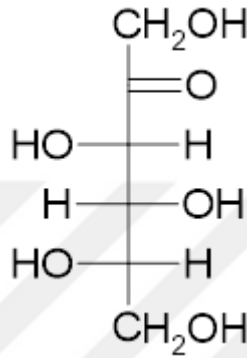
Dünyada D-sorbitolün oksidasyonu ile L-sorboz üretimi gerçekleştirilmesine rağmen, ülkemizde L-sorbozun endüstriyel üretimi henüz gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca L-sorboz üretimi ile ilgili ülkemizde yapılmış herhangi bir araştırma veya tez çalışması da bulunmamaktadır. C vitamini üretiminde önemli bir bileşen olan L-sorbozun üretim parametrelerinin çalışılarak belirlenmesinin ülkemizde henüz üretimi gerçekleştirilmeyen ve gıda, kimya ve ilaç sektörleri gibi birçok alanda kullanım imkânı bulunan C vitamini üretimi için de önemli bir aşama olacağı değerlendirilmiştir.

Bu nedenlerle bu tez çalışmasında; D-sorbitolden, L-sorboz üretimi için *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak en yüksek verimde üretimi sağlayacak optimum fermentasyon koşullarının (başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu, besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık ve çalkalama hızı) öncelikle çalkalamalı inkübatörde belirlenmesi ve daha sonra ise bu şartların biyoreaktörde de optimize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, merkezi kompozit tasarım istatistik yöntemi ve orta noktanın 3 kere tekrarlanması ile toplam 27 üretimlik bir deneme deseni kullanılmış ve buradan elde edilen optimum şartlarda 3 farklı hava akım hızında biyoreaktörde de optimizasyon çalışması yapılmıştır. Gerçekleştirilen tüm fermentasyon üretimlerinde belirli aralıklarla alınan örneklerle D-sorbitol tüketimi, L-sorboz üretimi ve biyokütle gelişimi takip edilmiş ve biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm üretimler için elde edilen veriler kullanılarak kinetik parametreler de hesaplanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. L-sorboz

Nadir bir şeker olan L-sorboz, $C_6H_{12}O_6$ kapalı formülüne sahip bir ketoheksozdur. Kimyasal adı L-ksilo-heksüloz olan L-sorboz, D-fruktozun karbon-5 epimeridir. L-sorboz, doğal kaynaklarda oldukça az miktarda bulunması nedeniyle nadir şeker olarak sınıflandırılmaktadır. Doğada monosakkaritlerin çoğunluğu doğal olarak D izomeri halinde bulunurken, sorboz doğada L izomeri olarak bulunmaktadır. L-sorbozun yapısal formülü Şekil 2.1’de verilmiştir.

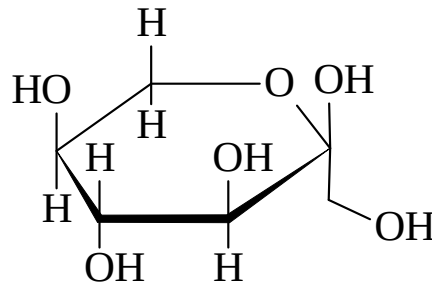


Şekil 2.1. L-sorbozun kimyasal yapısı

Enerji içeriği 2.2 kcal/g değerinden düşük olan L-sorboz gıda, kimya ve ilaç sektörlerinde kullanım alanı bulunan bir bileşendir. Gıda sanayinde L-sorbozun en önemli kullanım alanlarından birisi C vitamini üretiminde başlangıç veya ara materyal olarak kullanılabilmesidir. Aynı zamanda endüstriyel olarak üretilmiş olan L-sorboz kullanılarak düşük kalorili, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanım potansiyeli olan L-tagatoz ve L-iditol gibi diğer nadir şeker ve şeker alkolleride üretilmektedir (Zebiri vd. 2011).

2.1.1. L-sorbozun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Molekül ağırlığı 180.16 g/mol olan L-sorboz; beyaz, kristal yapıda ve kokusuz bir bileşiktir. L-sorboz, 27°C sıcaklıktaki suda çözündüğünde yaygın olarak α -L-sorbopiranoz (Şekil 2.2) izomeri halinde bulunmaktadır (Guzik ve Stachowicz 2016).



Şekil 2.2. α -L-sorbopiranozun kimyasal yapısı

L-sorboz duyusal olarak sakkarozun %90 eşdeğer tatlılığında bir monosakkarittir. L-sorbozun suda çözünürlüğünün D-glikozun suda çözünürlüğüne eşdeğer olduğu bildirilmiştir. Tüm monosakkaritler gibi higroskopik yapıda bir bileşik olan L-sorbozun higroskopisite özelliği, D-fruktoz ve D-sorbitolün higroskopisitesine kıyasla oldukça düşüktür. İndirgen bir monosakkarit olması nedeniyle Maillard reaksiyonlarına girebilmekte olan L-sorboz, kimyasal olarak fruktoza göre daha kararlı ve yavaş reaksiyona giren bir bileşiktir (Zimmermann 1978; Guzik ve Stachowicz 2016). L-sorbozun bazı fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. L-sorbozun bazı fizikokimyasal özellikleri

Özellik	Değer
CAS Numarası	87-79-6
Molekül formülü	C ₆ H ₁₂ O ₆
Molekül ağırlığı	180.16 g/mol
Fiziksel form	Kristal beyaz
Yoğunluk	1.65 g/cm ³
Erime sıcaklığı	159-165°C
Optik çevirme	[α] ²⁰ /D=43.4° (%12 (w/w) solüsyonda)
Çözünürlük	%45.90 w/w (20°C), %65 w/w (90°C)
Tatlılık	90

2.1.2. L-Sorbozun bulunduğu kaynaklar

L-sorboz bitkisel kaynaklarda doğal olarak çok az miktarda bulunan bir nadir şekerdir. L-sorboz, ilk defa Théophile-Jules Pelouze tarafından 1852 yılında üvez ağacı ismiyle bilinen *Sorbus aucuparia* L. bitkisine ait özsuynun 14 ay süresince açıkta bırakılması sonucu bu sıvıdan izole edilerek tanımlanmıştır (Zimmermann 1978). Daha sonraki yüzyılda ise Gabriel Bertrand, L-sorbozun üvez ağacında doğal olarak bulunmadığını ancak üvez ağacı meyvelerinde doğal olarak bulunan ve bir şeker alkolü olan D-sorbitolün *Acetobacter xylinum* bakterisi tarafından fermentasyon sürecinde yükseltgenmesiyle oluştuğunu tespit etmiştir (Karabinos 1952). McComb (1975) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da *Acetobacter* cinsi bakterileri kullanılarak elde edilen elma sirkesinde elmanın doğal olarak içerdiği D-sorbitolden 0.6 g/L miktarında L-sorboz oluştuğu bildirilmiştir.

Martin ve Reuter (1949) ise gerçekleştirdikleri çalışmada *Sorbus* cinsine ait türlerin yanı sıra ülkemizde de son yıllarda yetiştirilmesine başlanmış olan ve çarkıfelek olarak adlandırılıp genellikle süs bitkisi olarak kullanılan *Passiflora* bitkisinin (*Passiflora edulis* L.) kabuklarının doğal olarak L-sorboz içerdiğini bildirmişlerdir.

Bitkisel kaynaklarda tespit edilen L-sorboz miktarı, L-sorbozun endüstriyel olarak üretimi için yetersiz olması sebebiyle, günümüzde çoğunlukla L-sorboz üretimi için hammadde olarak D-sorbitol kullanılmaktadır (Guzik ve Stachowicz 2016).

2.1.3. L-sorbozun sağlık üzerine etkileri

Enerji içeriği değeri 1.5 ila 2.2 kcal/g arasında olduğu bilinen L-sorboz, vücutta metabolize edilme hızı oldukça yavaş olması nedeniyle yaygın monosakkaritlere göre düşük enerji içeriğine sahiptir (Tamura vd. 1991; Guzik ve Stachowicz 2016). İnsan vücuduna alınından sonra L-sorbozun ince bağırsaklarda oldukça düşük miktarda absorbe edildiği, %12-14 kadarının metabolize edilmeden idrar ile uzaklaştırıldığı ve kalan L-sorbozun kalın bağırsakta mikroorganizmalar tarafından düşük miktarda fermente edilebildiği bildirilmiştir (Schiweck ve Ziesenitz 1996).

Sato vd. (2017) in vitro yöntemle gerçekleştirdikleri bir çalışmada yetişkin ve sağlıklı erkek bireylerin fekal kültürü ile L-sorboz ve ksilitolün kalın bağırsakta kısa zincirli yağ asitlerine fermentasyonunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda L-sorbozun kalın bağırsakta bulunan *Anaerostipes* cinsine ait türler tarafından fermente edilebildiğini ve fermentasyon sonucunda L-sorbozdan kolon kanserine karşı fizyolojik faydaları olduğu bilinen bütirik asitin üretildiğini, bu nedenle de L-sorbozun prebiyotik etkiye sahip bir bileşen olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca L-sorboz düşük metabolize olma hızı nedeniyle vücutta kan glikoz seviyesini yükseltmediği için antihiperglisemik, ağız mikroflorası tarafından fermente edilemediği için antikaryojenik (Schiweck ve Ziesenitz 1996) ve kanda insülin konsantrasyonunun azalmasını sağladığı için ise antidiyabetik özelliklerde olduğu rapor edilmiştir (Siebert vd. 1980; Mitsuhiro vd. 1989).

Yapılan bir çalışmada diyabetik fareler 6 hafta boyunca %20'si L-sorboz ve kontrol olarak ise %20'si D-glikoz olan bir diyet ile beslenmiştir. L-sorboz ile beslenen deneklerde kontrol grubuna kıyasla kan glikoz seviyesinin ve idrarla atılan glikoz miktarının azaldığı ve buna bağlı olarak da Tip 2 diyabet hastalarının L-sorboz tüketiminin hastalığı kontrol altına almada etkili olabileceği bildirilmiştir (Furuse vd. 1993).

L-sorbozun insan sağlığı üzerine yukarıda verilen fizyolojik faydalarının tersine yapılan bazı çalışmalarda L-sorbozun olumsuz fizyolojik etkileri de tespit edilmiştir. Sindirim sisteminde ince bağırsak tarafından metabolize edilmeden kalın bağırsağa geçen L-sorbozun bir kısmının kalın bağırsakta fermentasyon ile propiyonik ve bütirik asit gibi organik asitlere dönüştürülmesi ve kalan L-sorbozun ise ishal, kramp veya şişkinlik gibi bağırsak sorunlarına neden olduğu bildirilmiştir (Würsch vd. 1979).

L-sorboz tüketiminin insan metabolizması üzerine etkisini belirlemek üzere gerçekleştirilen bir çalışmada 10 gün boyunca günde iki defa 20 g L-sorboz tüketiminin diyare ve şişkinlik gibi bağırsak rahatsızlıklarına neden olduğu belirlenmiştir (Würsch vd. 1979). Yapılan bir başka çalışmada da L-sorboz tüketiminin köpeklerde eritrositleri olumsuz etkileyerek hemolize neden olduğu tespit edilmiş ve L-sorbozun gıdalarda kullanımının sakıncalı olabileceği bildirilmiştir (Kistler ve Keller 1978).

Siebert vd. (1980) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 90 gün boyunca fareler %10 D-glikoz içeren kontrol grubuna karşı %10 L-sorboz içeren bir diyet ile beslenmişler ve kontrol grubuna göre L-sorbozun glikojene dönüşmesi nedeniyle karaciğer ağırlığını

ve inflamasyona neden olduğu için de plazma laktat dehidrogenaz (LDH) enzim miktarını arttırdığı belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada ise diyabet ve obezite indükleyici olarak altın tiyoglukoz enjekte edilmiş fareler iki eşit gruba ayrıldıktan sonra 2 hafta boyunca gruplardan biri 200 g/kg L-sorboz diyeti, diğeri ise kontrol grubu olarak 200 g/kg sakkaroz diyeti ile beslenmiştir. Kontrol grubu farelerinin vücut ağırlığı 9 g kadar artar iken, L-sorboz ile beslenen farelerde gıda alımının kontrol grubuna kıyasla %43 kadar ve vücut ağırlıklarının ise 10 g kadar azaldığı belirlenmiştir (Kazumi vd. 1992).

Çeşitli çalışmalarda L-sorbozun sağlık üzerinde olumsuz etkilerinin belirlenmesi sonrasında güncel literatürde L-sorbozun fizyolojik etkilerine dair çalışmalar kısıtlı kalmıştır. Aynı zamanda gerçekleştirilen çalışmalarda belirlenen olumsuzluklar nedeniyle gıdalarda L-sorbozun kullanımına ait bazı belirsizlikler oluşmuş ve bu da gıda endüstrisinde bu bileşiğin kullanımını sınırlandırmış bulunmaktadır.

2.1.4. L-sorbozun kullanım alanları

L-sorboz, yüksek erime noktası, düşük higroskopisitesi, karyojenik etkiye sahip olmaması gibi özellikleri ile sakkarozla ikame bir bileşen olarak gıda endüstrisinde yiyecek ve içeceklerde kullanımında teknolojik avantajlara sahip bir monosakkarit olduğu değerlendirilmektedir. Sahip olduğu fizikokimyasal özellikleri ile L-sorbozun şekerlemelerde, çikolatada, sakızlarda, fırıncılık ürünlerinde, reçel ve marmelatlar, dondurmada veya alkolsüz içeceklerde kullanımı üzerine çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sakızlarda yüzey kaplama karışımı içerisinde L-sorboz kullanılarak, yapışkanlığa karşı koruma sağlanabileceği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra L-sorboz, higroskopisitesi düşük bir bileşen olması nedeniyle yumuşak şekerlemelerde dış kaplama bileşeni olarak kullanımı ile bu ürünlerin formunun korunmasını sağlama potansiyeline sahip olduğu da belirlenmiştir (Zimmermann 1978). L-sorbozun şeker alkoller gibi sakkaroz ikamelerinin yanı sıra kullanım potansiyeli belirlenmiş olmasına rağmen fizyolojik etkileri konusunda var olan belirsizlikler nedeniyle günümüzde L-sorboz endüstride doğrudan bir gıda maddesi olarak henüz kullanılmamaktadır.

Buna rağmen dolaylı bir gıda maddesi olarak L-sorbozun kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından 1977 yılında Genel Olarak Güvenilir (GRAS) kategorisinde kabul edilmiştir (Siebert vd. 1980). Bu nedenle gıda endüstrisinde L-sorboz, İyi Üretim Uygulamaları (GMP, Good Manufacturing Practices) standartlarına uygun olacak şekilde gıda bileşenlerinin ambalajlanmasında kullanılan kağıt, karton veya pamuktan yapılmış materyallere ilave edilebilmektedir (Moore 1981).

Dünyada L-sorbozun en önemli ve yaygın kullanım alanı Reichstein-Grüssner yöntemi ile C vitamini sentezinde başlangıç veya ara materyal olarak kullanılabilmesidir (de Muynck vd. 2007). Bu yöntemde göre L-sorboz *Ketogulonicigenium vulgare* ve yardımcı mikroorganizma olarak genellikle *Bacillus megaterium* kullanılarak fermente edilip 2-keto-L-gulonik aside (2-KLG) oksitlenmekte ve elde edilen 2-KLG bileşiği esterifikasyon ve laktonizasyon işlemlerine tabi tutularak gıda, kimya ve ilaç sektörleri gibi birçok alanda kullanım imkânı bulunan C vitaminine dönüştürülmektedir (Pappenberger ve Hohmann 2014; Mutlu ve Erbaş 2020; Shan vd. 2020).

C vitamini üretiminin yanı sıra L-sorboz kullanılarak düşük kalorili, gıda endüstrisinde kullanım potansiyeli olan bazı nadir şekerler ve şeker alkollerinin üretimi de gerçekleştirilmektedir (Zebiri vd. 2011). L-sorbozdan D-tagatoz 3-epimeraz enzimi kullanılarak L-tagatoz eldesi sağlanabileceği gibi; L-sorboz *Candida famata*, *Candida boidini* gibi mikroorganizmalar ile fermente edilerek L-iditol de üretilebilmektedir (Vongsuvanlert ve Tani 1988; Itoh ve Izumori 1996; Kim vd. 2019).

Aynı zamanda L-sorbozdan farmakoloji alanında glikozidaz enzim inhibitörü olarak kullanılan 1-deoksialaktonojirimisinin eldesi sağlanabilmektedir (Behling vd. 1991; Bilal vd. 2018).

2.1.5. L-sorbozun üretimi

2.1.5.1. Kimyasal yöntemlerle L-sorboz üretimi

L-sorboz nadir bir monosakkarit olması nedeniyle doğada yaygın bulunan karbonhidratlar ve bunların türevlerinden L-sorbozun üretilmesi için çeşitli kimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

Talen (1925) tarafından yapılan bir çalışmada; D-sorbitol, brom çözeltisi içerisinde 12 saat boyunca 60°C sıcaklıkta okside edilerek D-sorbitolden düşük miktarda L-sorboz elde edilebileceği tespit edilmiştir.

Gatzi ve Reichstein (1938) tarafından yapılan bir çalışmada; 2,4:3,5-dietiliden-L-ksilonil klorid, diazometan ile muamele edilerek L-sorboz üretilbildiği bildirilmiştir. Bu yöntemle L-sorboz üretimi için 3,5:4,6-dietiliden-L-gulitol okside edilerek dietiliden-L-ksilonik asit elde edilmiş ve ortama diazometan ilave edildikten sonra çözelti seyreltik sülfirik asit ile hidroliz edilerek L-sorboz içeren bir şurup elde edilmiştir.

Sullivan (1945) tarafından D-sorbitol türevi bileşenlerinin 5. karbon atomu okside edilip, diğer karbon atomlarının uygun kimyasal bileşenlerle korunması yöntemiyle L-sorboz üretim metodu geliştirilmiştir. Bu metotla trietlen sorbitolün kısmi hidrolizi ile elde edilen 1,3:2,4-dietiliden-D-sorbitol bileşiği tolüen sülfonil klorür ile işleme tabi tutulmuş, daha sonra elde edilen bileşiğin 5. karbon atomu kromik asitle okside edilmiş ve asit hidrolizi işleminin ardından L-sorboz eldesi gerçekleştirilmiştir.

L-sorboz üretimi için son yıllarda geliştirilen kimyasal yöntemlerden biri de karbonil translokasyonu yöntemi ile D-glikoz gibi yaygın bulunan karbonhidratlardan L-sorboz üretilmesidir. Wu vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada başlangıç materyali olarak metil- α -D-glukopiranozid kullanarak karbonil translokasyonu yöntemi ile 5 kimyasal aşamada L-sorboz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla metil D-glukopiranozidin anomerik karbonu diol türevi verecek şekilde LiAlH_4 ile indirgenmiş, indirgenme sonucunda elde edilen birincil alkol seçici olarak korunup ikincil alkol eldesi gerçekleştirilmiş ve ikincil alkolün oksidasyonu sonrasında koruyucu grupların uzaklaştırılmasıyla %55 verimle L-sorboz üretimi gerçekleştirilmiştir.

L-sorbozun üretimi için geliştirilen kimyasal üretim yöntemlerinin fonksiyonel grupların korunması ve koruyucu bileşenlerin uzaklaştırılması gibi çoklu işlem basamakları ile karmaşık saflaştırma aşamaları gerektirmesi, kimyasal atık ve yan ürün

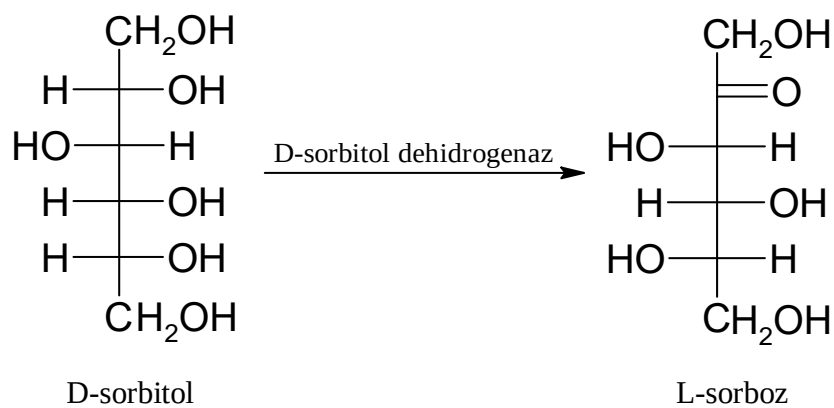
oluşumuna neden olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenlerle L-sorbozun kimyasal yöntemlerle büyük ölçekli üretimi maliyetli ve düşük verimli olmaktadır.

2.1.5.2. Mikrobiyal yöntemlerle L-sorboz üretimi

Günümüzde, L-sorboz yaygın olarak mikrobiyal yöntemler ile üretilmektedir. L-sorboz üretiminde kullanılan kimyasal üretim yöntemlerinde çoğunlukla nihai üründe sorbozun D ve L izomerinin bulunduğu rasemik bir karışım elde edilmektedir. Kullanılan mikrobiyal yöntemlerde ise oksidasyon ile sorboz doğrudan L izomeri formunda üretilmektedir. L-sorbozun mikrobiyal fermentasyonla üretiminde yüksek dönüşüm verimi ile elde edilen nihai ürünün kararlı bir yapıda olmasının, C vitamini gibi endüstriyel olarak önemli bir ürünün sentezinde doğrudan kullanım imkânı sağlaması gibi avantajları bulunmaktadır (Giridhar ve Srivastava 2002).

L-sorboz üretiminde kullanılan mikrobiyal yöntemde temel olarak *Gluconobacter*, *Acetobacter* veya *Pseudomonas* cinslerine ait türler kullanılarak fermentasyon ile D-sorbitol L-sorboza okside edilmektedir. Dünyada L-sorbozun mikrobiyal üretiminin büyük bir kısmı *Gluconobacter* cinsine ait türler ile, yaygın olarak ise *Gluconobacter oxydans* suşu veya bu suşun genetik modifikasyonu ile elde edilen rekombinant suşlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Azar ve Alemzadeh 2020). Taksonomik sınıflandırmada *Gluconobacter* cinsi bakterileri yapılan filogenetik çalışmalarda 16S rRNA analizleri ile belirlenen farklılıklar nedeniyle *Acetobacter* cinsinden ayrılarak yeni bir gram negatif bakteri grubu olarak sınıflandırılmıştır (Gupta vd. 2001; Takahashi vd. 2006).

Gluconobacter cinsi bakterileri ile D-sorbitolden L-sorboza oksidasyon işlemi uygun bir karbon ve nitrojen kaynağının varlığında mikroorganizmanın sitoplazmik zarına bağlı bir enzim olan D-sorbitol dehidrogenaz (EC 1.1.1.14, SLDH) aktivitesi ile gerçekleşmektedir (de Wulf vd. 2000). L-sorbozun D-sorbitol dehidrogenaz enzimi aracılığı ile D-sorbitolden dönüşümü Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. D-sorbitol ve L-sorbozun yapıları ve enzimatik dönüşümleri

Gluconobacter oxydans

Gluconobacter oxydans, *Acetobacteraceae* familyasına ait gram negatif bir bakteridir. *G. oxydans* hücreleri morfolojik olarak elipsoid veya çubuk şeklinde olup, hücreler çoğunlukla tek veya çiftler halinde bulunurken nadiren zincir halinde bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlarda patojenik etkiye sahip olmayan *G. oxydans* suşu, doğada şeker içeriği yüksek olan elma, üzüm, hurma gibi meyvelerde ve çiçeklerde gelişebilmektedir. *G. oxydans* zorunlu aerob bir bakteri olup, solunumda oksijeni terminal elektron alıcısı olarak kullanmaktadır (Gupta vd. 2001).

G. oxydans suşunun büyümesi ve çoğalması için besiyeri ortamında karbon kaynağı olarak çoğunlukla D-mannitol ve bunun yanı sıra tiamin, niasin, pantotenik asit ve p-aminobenzoik asit gibi bileşenlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda mikroorganizma karbon kaynağı olarak D-sorbitol, gliserol, D-fruktoz ve D-glikoz da kullanabilmektedir (Gossele vd. 1980). Ancak uygun besiyeri ortamı ve fermentasyon koşulları sağlansa da *G. oxydans* hücrelerinin büyüme ve çoğalma hızı yavaş olabilmekte ve bu nedenle fermentasyon ortamında biyokütle gelişimi sınırlı kalabilmektedir (Kulhanek 1989).

G. oxydans mikroorganizması şekerleri, şeker alkollerini veya şeker asitlerini çeşitli oksidasyon reaksiyonları ile yeni ürünlere fermente edebilmektedir (Dwivedi 2020). Bu oksidasyon reaksiyonları mikroorganizmanın sahip olduğu enzimlerin aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Bu enzimler *G. oxydans* hücrelerinin sitoplazmasında veya sitoplazma membranında lokalize olması sebebiyle iki farklı grupta yer almaktadır (Kerstens vd. 1965; Kulhánek 1989).

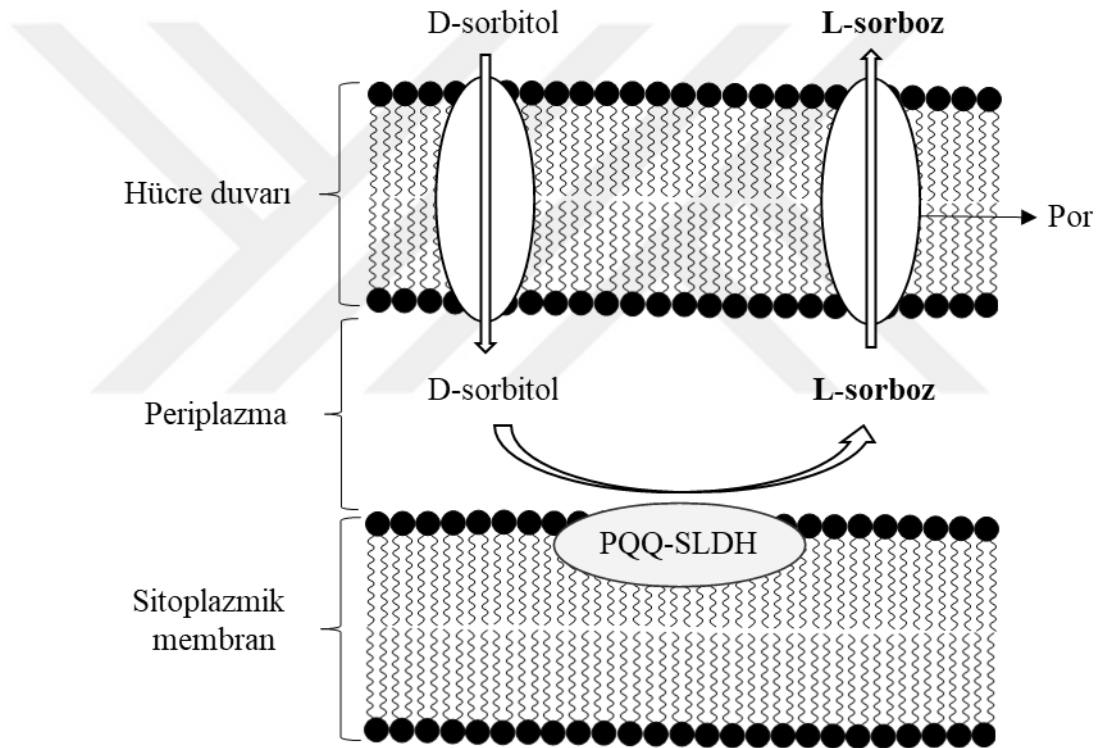
G. oxydans mikroorganizmasının sitoplazmasında bulunan enzimler, intrasellüler aktivite göstermektedir. Bu enzimlerden biri olan NADP⁺ bağımlı D-glikoz dehidrogenaz enzimi pentoz fosfat yolağı ile D-glikozun metabolize edilmesini sağlamaktadır (Gupta vd. 2001).

G. oxydans mikroorganizmasının sitoplazma membranında bulunan enzimler ise ekstrasellüler aktivite göstermektedir. Bu enzimler çoğunlukla flavoprotein yapıda olup, sitokrom içermektedir. *Gluconobacter* cinsine ait türler sitoplazma membranında bulunan enzimler ile şeker alkollerini ketoz monosakkaritlere veya monosakkaritleri şeker asitlerine okside edebilmekte ve *Gluconobacter* cinsi bu özellikleri ile *Acetobacteraceae* familyasına ait diğer cinslerden ayrılmaktadır (Macauley vd. 2001). *G. oxydans* mikroorganizması, D-sorbitol dehidrogenaz enzimi ile D-sorbitolden L-sorboz, NADP⁺ bağımsız D-glikoz dehidrogenaz enzimi ile D-glikozdan D-glukonik asit, 2-ketoglukonik asit veya 5 ketoglukonik asit ve gliserol dehidrogenaz ile gliserolden dihidroksiaseton üretimi gerçekleştirilebilmektedir (Kerstens ve De Ley 1963; Matsushita vd. 1979; Shinagawa vd. 1982).

Özellikle L-sorboz üretiminde aktivite gösteren SLDH enzimi hücre içerisinde NAD bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz (NAD-SLDH), NADP bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz (NADP-SLDH) ve pirolokinolin kinon bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz (PQQ-SLDH) olmak üzere 3 farklı yapıda bulunabilmektedir (Macauley vd. 2001).

NAD-SLDH ve NADP-SLDH enzimlerinin *G. oxydans* hücrelerinin sitoplazmasında bulunduğu ve enzimlerin aktivite gösterebileceği optimum pH değerinin 8.0 ila 8.5 aralığında olduğu bildirilmiştir. Özellikle NAD-SLDH enzimi D-sorbitolden intrasellüler olarak D-fruktozu oksidasyon yoluyla üretebilmektedir (Macauley vd. 2001).

PQQ-SLDH ise *G. oxydans* hücrelerinin sitoplazma membranında yüksek konsantrasyonda bulunmakta ve D-sorbitolün L-sorboza tek aşamalı oksidasyonunu gerçekleştirmektedir. Oksidasyon reaksiyonlarında PQQ-SLDH enziminde prostetik grup olarak bulunan pirolokinolin kinon bileşiği, hücrenin elektron taşıma sisteminde rol almaktadır. Yapılan çalışmalarla PQQ-SLDH enziminin aktivite gösterebileceği optimum pH değerinin 4.5 ila 5 aralığında olduğu bildirilmiştir (Kerstens ve De Ley 1963). *G. oxydans* mikroorganizmasının sitoplazma membranında bulunan PQQ-SLDH enziminin D-sorbitolden L-sorboz üretimi Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. *G. oxydans* mikroorganizmasının sitoplazma membranında bulunan pirolokinolin kinon bağımlı D-sorbitol dehidrogenaz (PQQ-SLDH) enziminin D-sorbitolden L-sorboz üretimi

Sitoplazma membranında bulunan SLDH enzimlerinin aktif bölgelerinin periplazmik boşluğa yönelik olması nedeniyle D-sorbitol, sitoplazma içerisine taşınmadan okside edilip, elde edilen ürün hücre zarında bulunan porlar ile hücre dışına salgılanmaktadır. Böylece üretilen L-sorboz bileşiğinin geri kazanımı kolaylaşmakta ve karmaşık saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyulmamaktadır (Deppenmeier vd. 2002).

Endüstride *G. oxydans* mikroorganizması şekerler veya şeker alkollerinin üretimi için kullanımının yanı sıra, mikroorganizmanın kendisi veya sahip olduğu enzimler bazı

alkollerin, şekerlerin veya şeker alkollerinin belirlenmesi amacıyla biyosensör olarak da kullanılabilmektedir (De Muynck vd. 2007).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Bu çalışma kapsamında fermantasyon ortamı için saf karbon kaynağı olarak D-sorbitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, S1876), azot kaynağı olarak maya ekstraktı (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 92144) kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan diğer besiyeri malzemeleri ve kimyasal maddeler niteliklerine uygun olarak mikrobiyolojik ve analitik saflıklarda Merck (Darmstadt, Germany) ve Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) firmalarından temin edilmiştir.

3.1.2. Mikroorganizma

D-sorbitol kullanılarak mikrobiyal yolla L-sorboz üretimi için *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 suşu, Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK, Ankara) Laboratuvarı'ndan liyofilize formda temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Araştırma planı, örnekleme ve istatistiksel yöntemler

Bu tez kapsamında, *G. oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak D-sorbitolden en yüksek verimle L-sorboz üretimini sağlayacak fermantasyon koşullarının optimize edilmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon denemeleri çalkalamalı inkübatörde erlen ölçeğinde ve elde edilen optimum koşulların daha büyük ölçekte doğrulanması ve ayrıca hava hızı koşullarının belirlenmesi için biyoreaktör ölçeğinde olacak biçimde iki aşamalı olarak uygulanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında; çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde gerçekleştirilen fermantasyon koşullarının optimizasyonu için değişken parametreler; besiyerinde kullanılacak başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu (g/L), besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık (°C) ve çalkalama hızı (rpm) olarak belirlenmiş ve değişken faktörlerin sınır değerleri; D-sorbitol konsantrasyonu için 90-170 g/L, pH değeri için 6-8, sıcaklık için 25-35°C ve çalkalama hızı için ise 150-250 rpm olarak uygulanmıştır. Optimizasyon için kullanılan bu sınır değerler literatürde yapılan çalışmalar incelenerek düzenlenmiştir. Belirlenen bu deneysel parametrelerin optimizasyonu amacıyla Design-Expert® programı (Version 10.0.1, Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) kullanılarak, Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design, CCD) yöntemi ile Çizelge 3.1'de verilen ve orta noktanın 3 kere tekrar edilmesi ile toplam 27 denemeden oluşan deneme deseni oluşturularak kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri Çizelge 3.1'de verilen koşullara uygun olacak şekilde çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde, 100 mL çalışma hacminde ve iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. D-sorbitolden fermentasyon ile L-sorboz üretimi için uygulanan deneme deseni

Deneme no	D-sorbitol konsantrasyonu (g/L)	pH	Sıcaklık (°C)	Çalkalama hızı (rpm)
1	170	7	35	200
2	130	6	25	200
3	90	8	30	200
4	130	8	25	200
5	170	8	30	200
6	130	8	30	150
7	130	8	35	200
8	130	6	30	150
9	130	7	35	250
10	130	6	30	250
11	130	7	25	250
12	130	7	30	200
13	90	7	30	250
14	90	6	30	200
15	130	8	30	250
16	90	7	35	200
17	170	6	30	200
18	170	7	30	150
19	170	7	25	200
20	170	7	30	250
21	90	7	30	150
22	130	6	35	200
23	90	7	25	200
24	130	7	30	200
25	130	7	25	150
26	130	7	35	150
27	130	7	30	200

Çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde gerçekleştirilen tüm fermentasyonlar, ön denemelerde L-sorboz miktarının tespiti ile belirlenmiş olan 72 saat süresiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm fermentasyon denemelerinden 0., 24., 28., 32., 36., 48. ve 72. saatlerde aseptik koşullarda 3.0 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerde mikroorganizma gelişimi için optik yoğunluk ölçülmüş ve toplam D-sorbitol ve L-sorboz miktarları kromatografik olarak belirlenmiştir.

Deneme deseninde gerçekleştirilen her bir denemenin 72. saatinden elde edilen L-sorboz miktar analizi sonuçları yanıt olarak kullanılmış ve elde edilen bu sonuçlarla Design-Expert® programı kullanılarak optimum başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu (g/L), besiyerinin başlangıç pH değeri, sıcaklık (°C) ve çalkalama hızı (rpm) değerleri belirlenmiştir. Belirlenen optimum şartlar kullanılarak çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde yine iki tekerrürlü olarak tekrar edilen üretimlerle optimizasyon koşulları doğrulanmıştır.

Araştırmanın ikinci aşamasında ise; çalkalamalı inkübatörde yapılan denemeler sonucunda elde edilip, doğrulanan en yüksek verimde L-sorboz üretim şartları (D-sorbitol konsantrasyonu (g/L), pH değeri, sıcaklık (°C) ve çalkalama hızı (rpm)) kullanılarak 1.5 L hacmindeki besiyeri ile 3 farklı hava akım hızında (0.5, 1.0 ve 1.5 vvm) 5 L Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe 1x3 faktöriyel deneme deseninde yeni bir deneme yapılmış ve biyoreaktör ölçeğinde L-sorboz üretimi için de maksimum üretim şartları belirlenmiştir. Fermentör denemelerinde 0., 3., 9., 24., 48., 72., 95., 97., 100., 103., 106., 109. ve 118. saatlerde aseptik koşullarda 4.0 mL örnek alınarak, örneklerle optik yoğunluk, D-sorbitol ve L-sorboz analizleri gerçekleştirilmiştir.

Biyoreaktör denemeleri sonucunda belirlenen optimum hava akım hızında bir doğrulama fermentasyonu daha gerçekleştirilmiş ve bu optimum üretimde de 0., 3., 9., 24., 48., 72., 95., 97., 100., 103., 106., 109. ve 118. saatlerde aseptik koşullarda alınan 4.0 mL hacminde örneklerle yukarıdaki analizlere ilave olarak kuru hücre ağırlığı (g/L) analizi de yapılmıştır.

Ayrıca optimum fermentasyon sonunda elde edilen ferment, santrifüj edilip (7100xg, 10 dk) üstte kalan sıvı kısım 0.45 µm gözenek boyutunda filtrelerden geçirilmiş, ardından iyon değiştirici reçine dolgulı kolonlardan geçirilen sıvı ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius Stedim, Sartoclon Slice 200, Goettingen, Almanya) ve farklı polietersülfon ultra filtreleme kasetleri (50, 5 ve 1 kD) kullanılarak biyokütle ve diğer safsızlıklardan ayrıldıktan sonra +4°C sıcaklıkta depolanmıştır.

Tüm fermentasyon denemeleri süresince ortamdan belli aralıklarla alınan örneklerle uygulanan analizler paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca biyoreaktör denemelerinden alınan örneklerden elde edilen verilere SAS istatistik programı (SAS Institute, Cary, NC, USA) kullanılarak varyans analizi ve önemli bulunan parametrelere ait ortalamalara ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır.

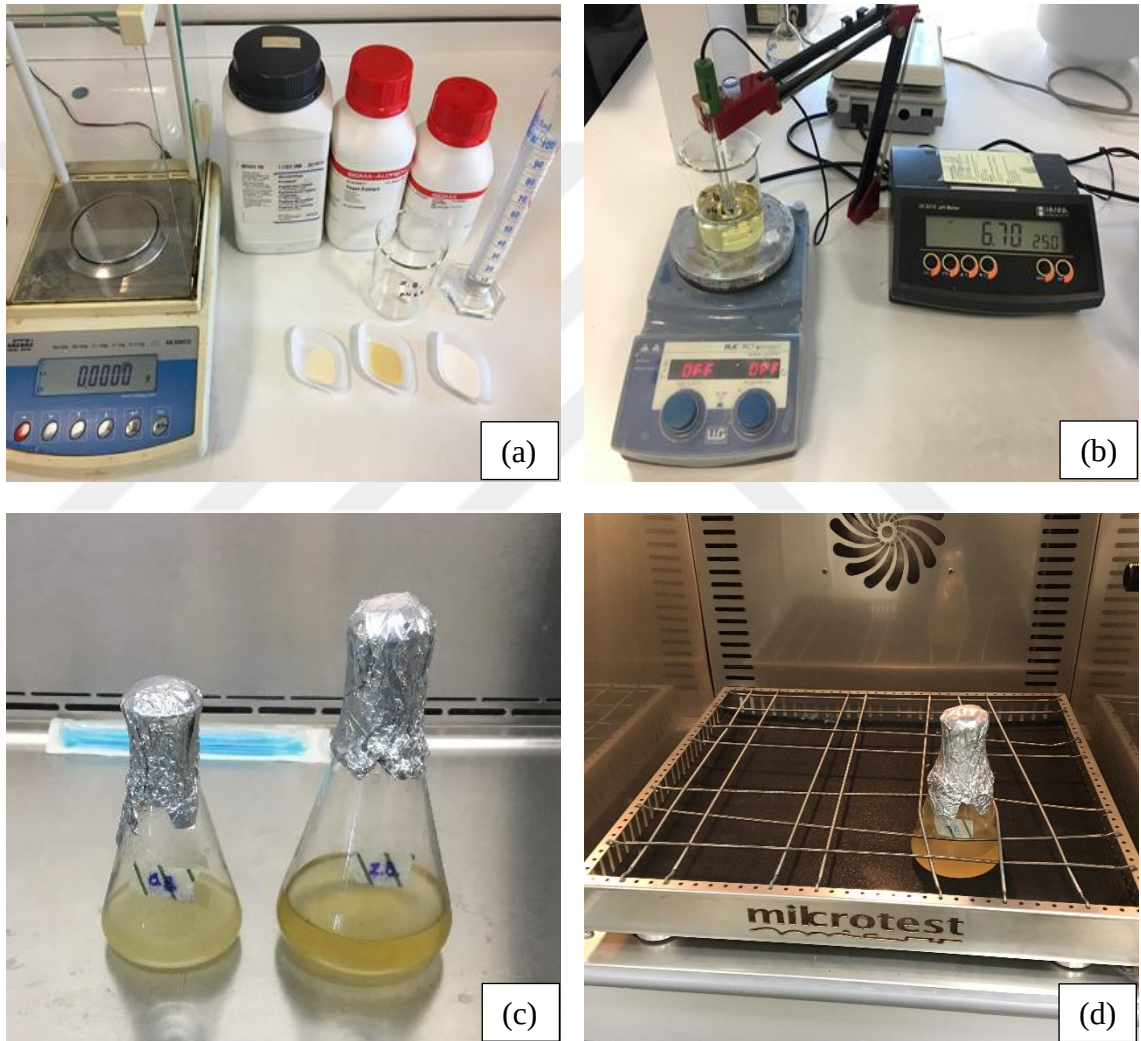
3.2.2. Ön kültür besiyerinin hazırlanması ve inkübasyonu

Liyofilize formda temin edilen *G. oxydans* ATCC 621 suşu, öncelikle erlenler içerisinde canlandırılıp, çoğaltılarak ön kültür elde edilmiştir. Bu işlem için ATCC kültür koşullarına uygun olacak şekilde, 25 g/L D-mannitol, 5 g/L maya ekstraktı, 3 g/L pepton içeren ön kültür besiyeri hazırlanıp, pH değeri 6.70'e ayarlanmıştır. Hazırlanan 100 mL besiyeri otoklavda (Nüve, NC 40M, Ankara, Türkiye) 121°C sıcaklıkta 15 dakika steril edildikten sonra, steril kabin (Esco, Class II Type A2, Singapur) içerisinde besiyerine liyofilize *G. oxydans* ATCC 621 suşu inoküle edilmiştir. İnokülüm işlemi yapılmış besiyeri 26°C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızı ile 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatöre (Mikrotest MSI-120, İstanbul, Türkiye) alınmış ve mikroorganizma canlandırılıp, geliştirilmiştir (Anonim 1). İnkübasyon sonrası 24 saat geliştirilen kültür +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiş ve her 15 günde bir kendisinden tazelenmiştir.

Aynı zamanda mikroorganizmanın uzun süreli muhafazası amacıyla kültür %50 konsantrasyonunda gliserol içerisine alınarak stok kültür olarak -80°C sıcaklıkta saklanmıştır.

3.2.3. Zenginleştirme besiyerinin hazırlanması ve inkübasyonu

Zenginleştirme besiyerinin hazırlanması için; 25 g/L D-sorbitol, 5 g/L maya ekstraktı ve 3 g/L pepton içeren 100 mL hacminde besiyeri hazırlanarak, pH değeri 6.70'e ayarlanmış ve hazırlanan besiyeri otoklavda sterilize edilmiştir. Steril besiyeri içerisine aseptik koşullar altında Bölüm 3.2.2'deki yöntemle göre geliştirilmiş ön kültür besiyerinden %7.5 inokülasyon oranında inokülüm gerçekleştirilmiştir. İnokülüm işlemi yapılmış besiyeri 30°C sıcaklıkta ve 200 rpm hızla yapılan çalkalama ile 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde geliştirilerek, zenginleştirilmiştir (de Wulf vd. 2000). Zenginleştirme besiyerinin hazırlanması ve inkübasyona alınmasına ait görüntüler Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Fermantasyon öncesi zenginleştirme besiyerinin hazırlanma görüntüleri **a)** Besiyeri bileşenlerinin tartılması **b)** Besiyeri pH değerinin ayarlanması **c)** Aseptik koşullarda 24 saat geliştirilmiş ön kültür besiyerinden zenginleştirme besiyerine inokülasyon işlemi **d)** Zenginleştirme besiyerinin çalkalamalı inkübatörde inkübasyona alınması

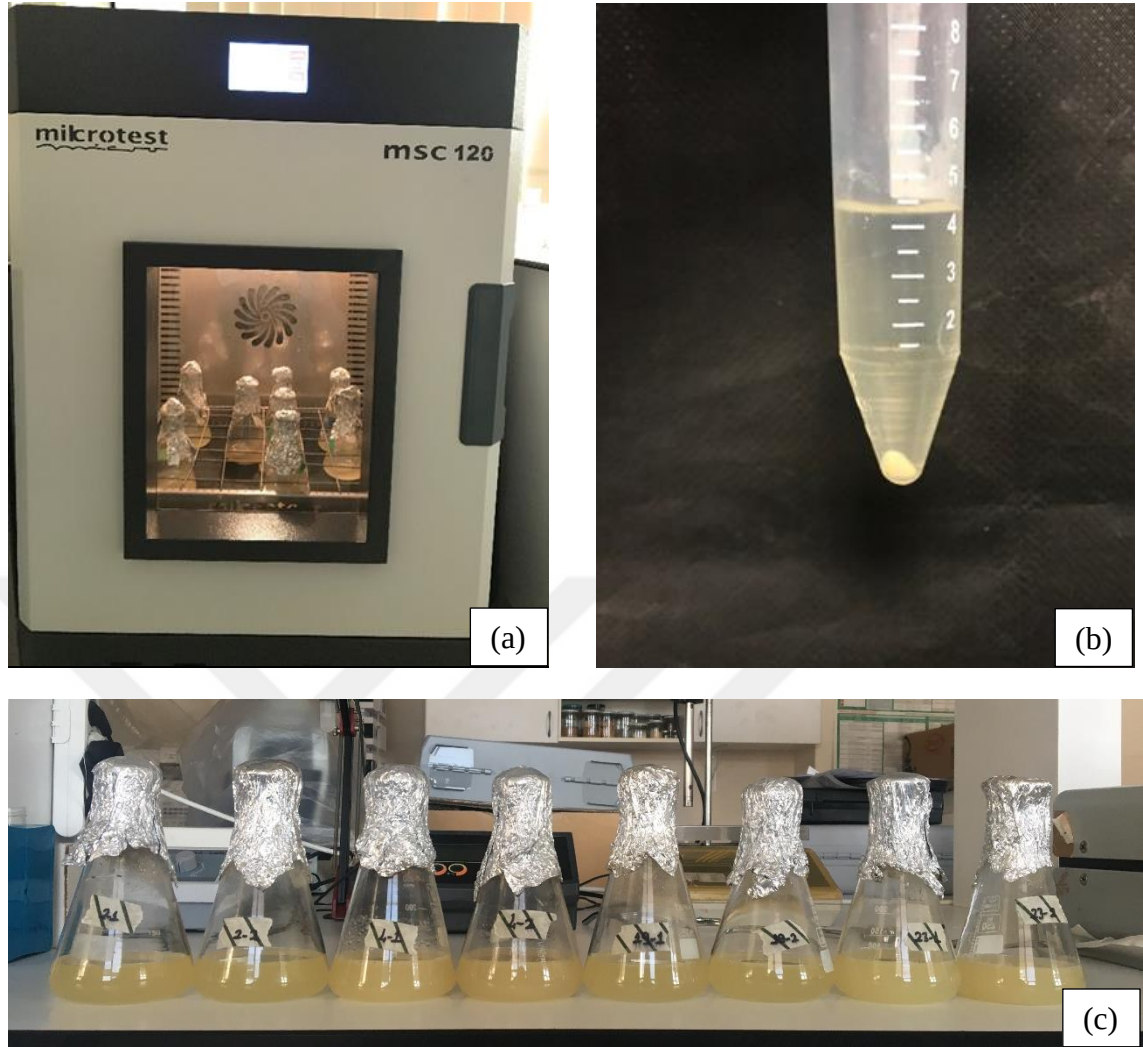
3.2.4. L-Sorboz üretiminin optimizasyonu

3.2.4.1. Çalkalamalı inkübatörde L-sorboz üretiminin optimizasyonu

G. oxydans ATCC 621 suşu kullanılarak D-sorbitolden en yüksek verimle L-sorboz üretim koşullarının tespit edilmesi amacıyla ilk aşamada çalkamalı inkübatörde erlenler içerisinde fermentasyon denemeleri Çizelge 3.1’de verilen 27 üretimden oluşan deneme desenine göre gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon denemeleri için çalkalamalı inkübatörde kullanılan 100 mL hacmindeki besiyerleri; 0.5 g maya ekstraktı, 0.1 g K₂HPO₄ ve Çizelge 3.1’de verilen deneme deseninde belirtilen oranlarda D-sorbitol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerlerinin pH değeri deneme deseninde (Çizelge 3.1) belirtilen değere uygun olacak şekilde HCl ve NaOH kullanılarak ayarlandıktan sonra 250 mL hacmindeki erlenlere aktarılmış, besiyerlerine otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilizasyon işlemi uygulanmış ve erlenler oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Soğutulan erlenler içerisine zenginleştirme (Bölüm 3.3.2) besiyerinden %10 oranında aseptik koşullarda *G. oxydans* ATCC 621 suşu inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. İnokülüm işlemi yapılmış erlenler, çalkalamalı inkübatörde deneme deseninde belirtilen sıcaklık ve karıştırma hızında inkübasyona alınmıştır (de Wulf vd. 2000; Wang vd. 2013). İnkübatörde gerçekleştirilen denemelere ait bazı görüntüler Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. İnkübatörde gerçekleştirilen denemelere ait bazı görüntüler **a)** Erlen ölçeğinde gerçekleştirilen üretim denemelerinin çalkalamalı inkübatörde geliştirilmesi **b)** Fermantasyon ortamından alınan santrifüj edilmiş örnek **c)** 72 saat sonunda fermantasyon işlemi tamamlanmış üretim denemeleri

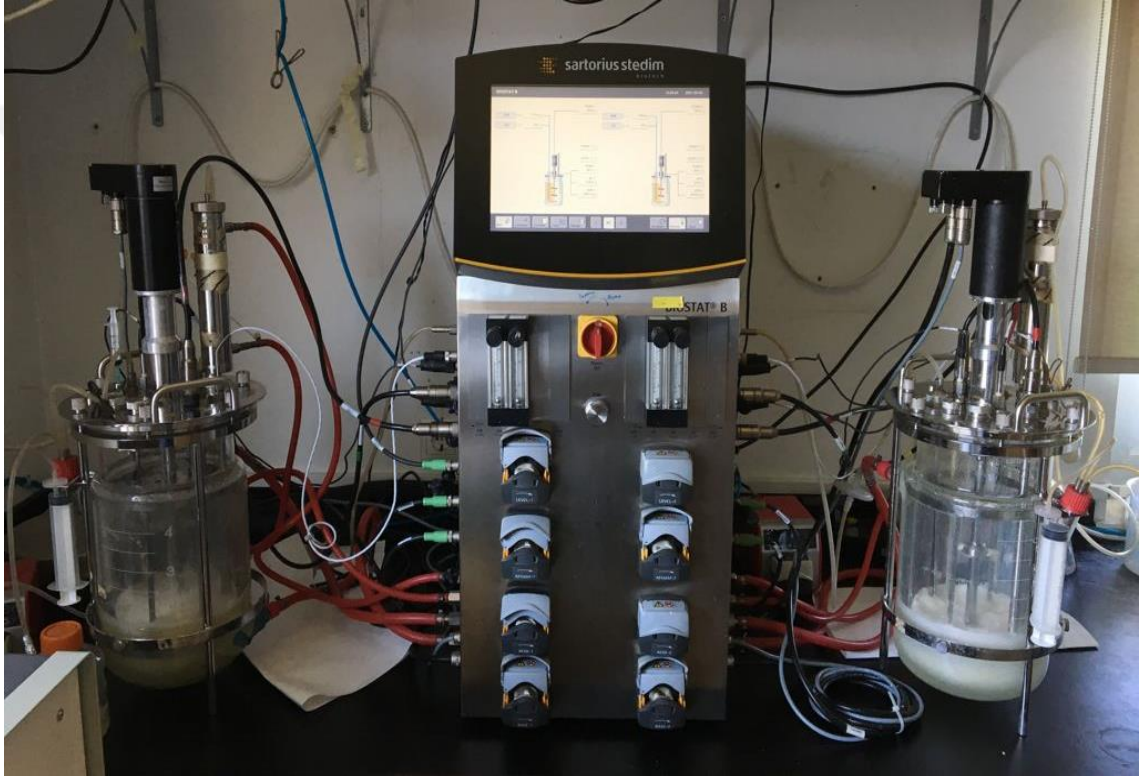
3.2.4.2. Biyoreaktörde L-sorboz üretimi

L-sorboz üretimi için, çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen denemeler sonucunda optimize edilen fermantasyon parametreleri (D-sorbitol konsantrasyonu (g/L), besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık (°C) ve çalkalama hızı (rpm)) belirlendikten sonra bu şartlarda 5 L hacmindeki Biostat B (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) biyoreaktöründe çalışma hacmi 1.5 L olacak şekilde fermantasyon denemeleri gerçekleştirilerek, biyoreaktör üretimi için de optimum üretim şartları belirlenmiştir.

Fermantasyon denemeleri, çalkalamalı inkübatör denemelerinden elde edilen optimum şartlara göre başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu 127.58 g/L olan 1.5 L besiyeri ile 35°C sıcaklıkta, 700 rpm karıştırma hızında, 3 farklı hava akım hızında (0.5, 1.0 ve 1.5 vvm) biyoreaktörde 1x3 faktöriyel deneme deseninde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan besiyerinin başlangıç pH değeri 7.20 olacak şekilde ayarlanmış ve inokülüm

sonrası başlatılan fermentasyonlarda pH kontrolü yapılmamıştır. Fermentasyon denemelerinde kesikli (batch) sistem kullanılmış ve fermentasyonlar süresince çözünmüş oksijen düzeyi takip edilmiştir. Fermentasyonlar öncesinde biyoreaktör 1.5 L hacmindeki besiyeri ile 121°C sıcaklıkta 30 dakika sterilize edilmiştir.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyonlar, zenginleştirme (Bölüm 3.3.2) besiyerinden %10 oranında aseptik koşullarda *G. oxydans* ATCC 621 suşunun inoküle edilmesi ile başlatılmıştır. Yapılan ön denemelerle fermentasyon ortamındaki karbon kaynağı olan D-sorbitolün *G. oxydans* hücreleri tarafından yaklaşık 118 saatte tamamen tüketildiği tespit edilmiş ve bu nedenle biyoreaktör ölçeğindeki tüm fermentasyonlar 118. saatte sonlandırılmıştır. Biyoreaktörde gerçekleştirilen denemelere ait görüntü Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Biyoreaktörde L-sorboz üretim denemeleri

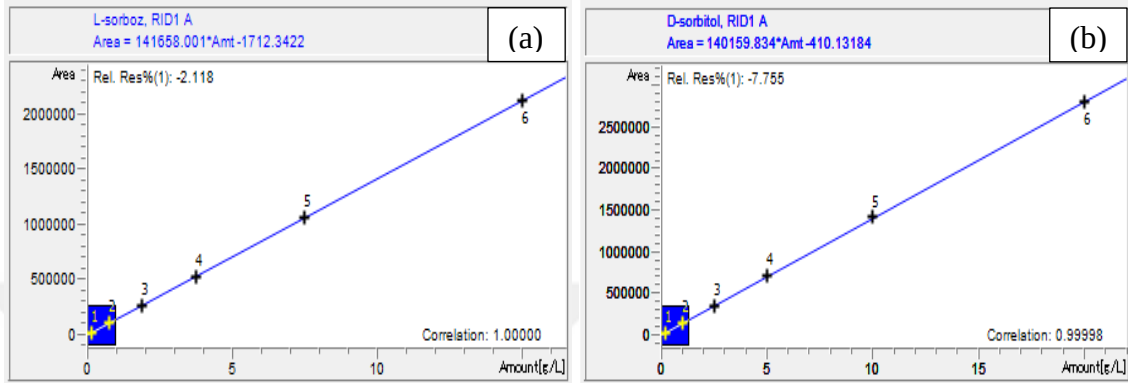
Biyoreaktörde farklı hava akım hızlarında gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri sonucunda maksimum L-sorboz üretiminin elde edildiği 1.5 vvm hava akım hızı kullanılarak doğrulama fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3. Analiz Yöntemleri

3.3.1. D-sorbitol ve L-sorboz analizi

D-sorbitol ve L-sorboz bileşenleri HPLC cihazı (Agilent, 1260 Infinity II), refraktif index dedektör (RID) ve Hi-Plex Ca kolon (Agilent, 300x7.7 mm) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla fermentasyon sonrası örnekler 7100xg hızda 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant fazı 0.45 µm gözenek boyutlu membran filtreden

geçirilerek mobil faz ile uygun oranda seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler 10 µL enjeksiyon hacmi ile cihaza enjekte edilmiştir. Mobil faz olarak izokratik akışta ultra saf su 0.6 mL/dk akış hızı ile sisteme verilmiştir. Kolon sıcaklığı 75°C ve dedektör sıcaklığı ise 30°C olarak ayarlanmıştır. D-sorbitol ve L-sorboz bileşenlerinin tanımlanması ve miktar tayini dış standart yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Zhu vd. 2012). D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının belirlenmesi için HPLC cihazında oluşturulan kalibrasyon kurveleri Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4. HPLC cihazında D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının tayini için oluşturulan kalibrasyon kurveleri **a)** L-sorboz miktarının belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon kurvesi **b)** D-sorbitol miktarının belirlenmesi için kullanılan kalibrasyon kurvesi

3.3.2. *G. oxydans* hücrelerinin kuru ağırlıklarının belirlenmesi

G. oxydans hücrelerinin kuru hücre ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla önceden ağırlıkları belirlenmiş ependorf tüplerine alınan 1 mL hacmindeki örnekler 15000xg hızda 10 dakika süreyle santrifüj edilerek, süpernatant ortamdan ayrılmış ve mikroorganizma pelletleri elde edilmiştir. Mikroorganizma pelletleri yıkama ile dağıldığı için yıkama işlemi yapılamamıştır. Elde edilen pelletler 65°C sıcaklıkta sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. Bakterilerin kuru ağırlık miktarları Eşitlik 3.1 kullanılarak g/L olarak hesaplanmıştır (de Wulf vd. 2000).

$$\text{Kuru hücre ağırlığı} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Dolu tüp ağırlığı (g)} - \text{Boş tüp ağırlığı (g)}}{\text{Örnek hacmi (mL)} \times 10^{-3}} \quad (3.1)$$

3.3.3. *G. oxydans* hücrelerinin optik yoğunluğunun ve biyokütle miktarının belirlenmesi

Tüm fermentasyon ortamlarından alınan örnekler spektrofotometrik olarak analiz edilerek bakteri hücrelerinin optik yoğunlukları (OD) belirlenmiştir. Bu amaçla; çalkalamalı inkübatör denemelerinde ve biyoreaktör ölçeğinde üretimlerde inokülasyon anından itibaren alınan örnekler uygun oranlarda seyreltikten sonra, 600 nm (de Wulf vd. 2000) dalga boyunda spektrofotometrede (Agilent, Cary 60 UV-Vis, Santa Clara, USA) okuması yapılmıştır. Elde edilen değer seyreltme faktörü ile çarpılarak bakteri hücrelerinin optik yoğunlukları (OD₆₀₀) belirlenmiştir.

Örneklere ait biyokütle miktarının hesaplanması amacıyla fermantasyon ortamından alınan örneklerle belirlenen optik yoğunluk ve kuru hücre ağırlığı analiz verileri kullanılarak absorbans-kuru hücre ağırlığı kurve grafiği oluşturulmuştur. Grafikten elde edilen Eşitlik 3.2 yardımıyla fermantasyon ortamındaki biyokütle gelişim miktarı g/L olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Biyokütle miktarı} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = (0.7274 \times (\text{OD}_{600})) + 0.0079 \quad (3.2)$$

3.3.4. Kinetik parametrelerin hesaplanması

Biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm fermantasyon denemelerinden elde edilen örneklerin D-sorbitol, L-sorboz ve biyokütle verileri kullanılarak D-sorbitol tüketimi (g/L) (Eşitlik 3.3), L-sorboz üretimi (g/L) (Eşitlik 3.4), L-sorboz verimi (%) (Eşitlik 3.5), D-sorbitol kullanım oranı (%) (Eşitlik 3.5), maksimum D-sorbitol tüketim hızı (g/L/sa) (Eşitlik 3.6), maksimum L-sorboz üretim hızı (g/L/sa) (Eşitlik 3.7) ve spesifik üreme hızı (1/sa) (Eşitlik 3.8) kinetik parametreleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).

$$A; \text{D-sorbitol tüketimi} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = S_0 - S_1 \quad (3.3)$$

S_0 = Başlangıç D-sorbitol miktarı

S_1 = Fermantasyon sonunda kalan D-sorbitol miktarı

$$B; \text{L-sorboz üretimi} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = P_1 - P_0 \quad (3.4)$$

P_0 = Başlangıç L-sorboz miktarı

P_1 = Fermantasyon sonunda üretilen maksimum L-sorboz miktarı

$$\text{L-sorboz verimi} (\%) = \frac{B}{A} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{D-sorbitol kullanım oranı} (\%) = \frac{A}{S_0} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Maksimum D-sorbitol tüketim hızı (g/L/sa)} = \text{Zamana bağlı D-sorbitol tüketim eğrisinin en dik parçasının eğimi} \quad (3.7)$$

$$\text{Maksimum L-sorboz üretim hızı (g/L/sa)} = \text{Zamana bağlı L-sorboz üretim eğrisinin en dik parçasının eğimi} \quad (3.8)$$

$$\text{Spesifik üreme hızı (1/sa)} = \text{Biyokütle miktar verilerinin n değerleri ile zamana karşı oluşturulan kurvenin en dik parçasının eğimi} \quad (3.9)$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalkalamalı İnkübatörde L-sorboz Üretiminin Optimizasyonu

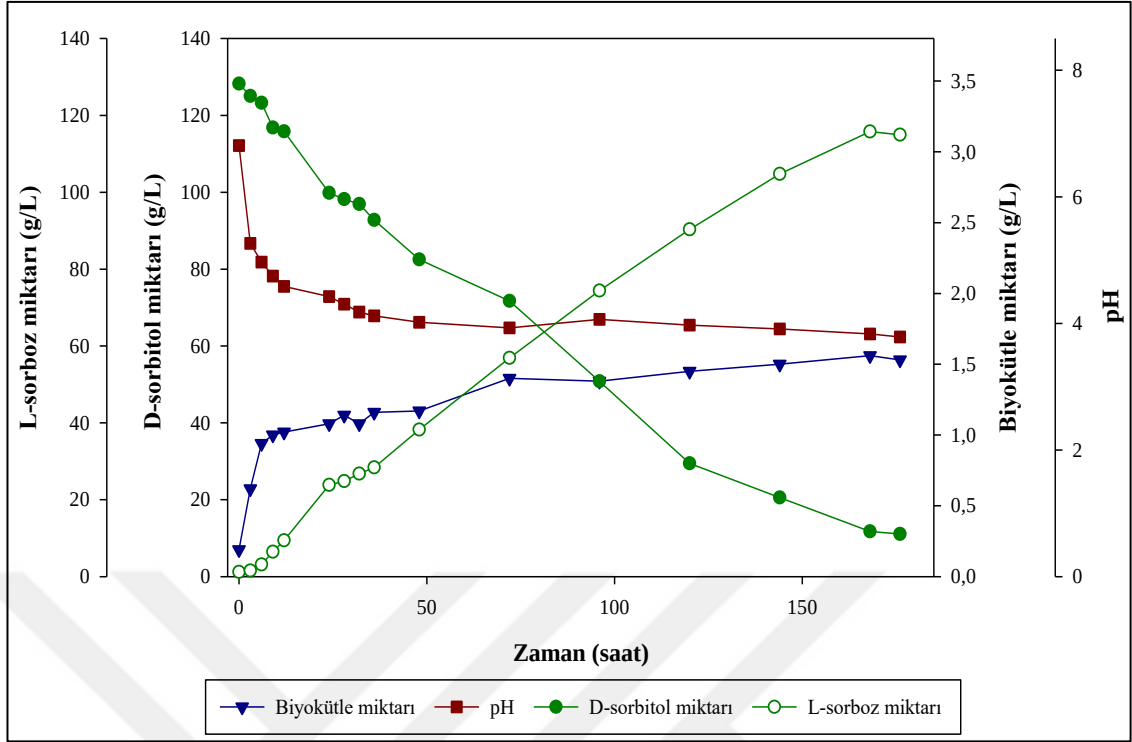
Araştırmanın ilk aşamasında, D-sorbitolden *G. oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak L-sorboz üretimi üzerine etkili olan fermantasyon koşullarının optimizasyonu çalkalamalı inkübatörde erlen ölçeğinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bağımsız değişkenler olan başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunun (90-170 g/L), besiyeri başlangıç pH değerinin (6-8), sıcaklığın (25-35°C) ve çalkalama hızının (150-250 rpm) yanıt değişkeni olan 72. saat L-sorboz üretim miktarı üzerine etkilerini belirlemek için yanıt yüzey metodunun merkezi kompozit tasarım yöntemi ile oluşturulan ve Çizelge 3.1’de verilen toplam 27 denemeden oluşan bir deneme deseni kullanılmıştır.

Çalkalamalı inkübatörde 27 farklı koşulda uygulanan fermantasyon denemelerinden elde edilen optik yoğunluk, biyokütle miktarı, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı değerlerine ait analiz sonuçlarının I. ve II. tekerrür verileri Çizelge 4.1’de, tüm denemelerden elde edilen ortalama optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol, L-sorboz miktar (g/L) ve D-sorbitol tüketim ve L-sorboz üretim oran (%) verileri (I. ve II. tekerrür) Çizelge 4.2’de verilmiştir.

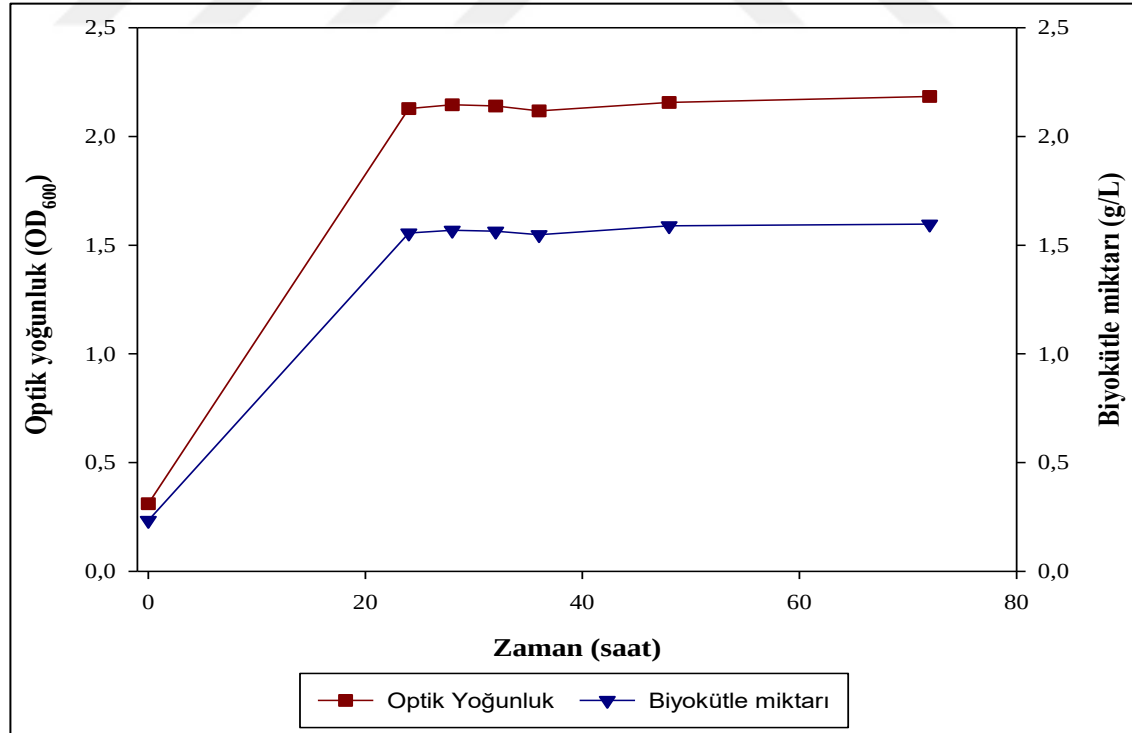
Analiz sonuçlarına göre fermantasyon başlangıcında 0.28 ila 0.35 absorbans aralığında olan *G. oxydans* hücrelerinin optik yoğunluğunun 72. saatte minimum ve maksimum değerlerinin 1.56 ve 2.91 absorbans değerinde olduğu ve fermantasyon başlangıcında 0.21 ila 0.26 g/L aralığında olan biyokütle miktarının ise 72. saatte minimum ve maksimum değerlerinin 1.14 ve 2.12 g/L aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre deneme şartlarında *G. oxydans* mikroorganizmasının 72 saatlik fermantasyon sonunda optik yoğunluk değerinin ortalama 7.02 kat arttığı ve biyokütle miktarının ise ortalama 6.82 kat arttığı belirlenmiştir. Ancak bu artışların önemli bir kısmının mikroorganizma ilk 24 saatlik zamanda logaritmik artış gösterirken gerçekleştiği ve devam eden 48 saatte ise optik yoğunluk ve biyokütle miktarlarında gelişimin durağan ilerlediği tespit edilmiştir.

Çalkalamalı inkübatörde deneme deseninin orta nokta koşulları olan 130 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda, 7.0 besiyeri başlangıç pH değerinde, 30°C sıcaklıkta ve 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen ön denemelerle belirlenen *G. oxydans* mikroorganizmasının 0-176. saatler arasında ortalama optik yoğunluk, biyokütle miktarı, pH değişimi, D-sorbitol tüketimi ve L-sorboz üretimine ait grafik Şekil 4.1’de verilmiştir. Ayrıca *G. oxydans* mikroorganizmasının zamana bağlı olarak ortalama optik yoğunluk ve biyokütle miktar değişim grafiği Şekil 4.2’de verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre zenginleştirme besiyerinin inokülasyonu ile fermantasyon başlangıcında 0.70 ila 1.44 g/L aralığında olan L-sorbozun, D-sorbitolden 72. saatte üretim miktarının minimum ve maksimum değerlerinin 4.69 ve 67.73 g/L olduğu, L-sorboz üretim oranının ise minimum ve maksimum değerlerinin %3.15 ve %52.21 değerlerinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. *G. oxydans* mikroorganizmasının 0-176. saatler arasında optik yoğunluk, biyokütle miktarı, pH değişimi, D-sorbitol tüketim ve L-sorboz üretim miktarlarının zamanla değişim grafiği



Şekil 4.2. *G. oxydans* mikroorganizmasının ortalama optik yoğunluk ve biyokütle miktarının zamanla değişim grafiği

Çizelge 4.1. Çalkalamalı inkübatör denemelerine ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri (I. ve II. tekerrür)

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
1	0	0.30	0.23	166.14	-	0.70	-
		0.30	0.23	169.75	-	0.71	-
	24	1.43	1.05	137.06	18.39	13.45	7.59
		1.45	1.06	141.97	15.47	15.99	9.10
	28	1.54	1.13	141.47	15.77	17.06	9.74
		1.49	1.09	144.86	13.75	16.44	9.37
	32	1.47	1.08	139.10	17.18	18.04	10.32
		1.47	1.08	143.86	14.34	17.57	10.04
	36	1.46	1.07	136.49	18.73	17.59	10.05
		1.51	1.11	145.99	13.08	20.46	11.76
	48	1.58	1.16	132.57	21.06	27.04	15.68
		1.60	1.17	140.95	16.08	26.19	15.17
	72	1.63	1.20	120.32	28.36	38.41	22.45
		1.56	1.14	122.26	27.20	39.29	22.97
2	0	0.30	0.23	126.27	-	0.98	-
		0.30	0.23	126.32	-	1.01	-
	24	2.00	1.46	103.81	17.80	16.88	12.58
		1.94	1.42	106.43	15.73	17.91	13.40
	28	1.95	1.43	101.43	19.69	19.35	14.53
		2.04	1.49	105.34	16.59	20.51	15.46
	32	2.00	1.46	100.71	20.26	22.19	16.78
		1.94	1.42	101.88	19.33	22.05	16.67
	36	1.78	1.30	96.77	23.37	24.78	18.84
		1.76	1.29	97.59	22.73	24.30	18.46
	48	1.90	1.39	84.76	32.89	34.59	26.61
		1.88	1.38	91.04	27.91	33.36	25.63
	72	2.02	1.47	64.41	49.00	57.36	44.63
		1.89	1.38	66.50	47.35	51.00	39.60
3	0	0.34	0.26	90.99	-	1.24	-
		0.34	0.26	91.01	-	1.24	-
	24	2.47	1.80	69.19	23.97	6.51	5.79
		2.54	1.85	73.70	19.01	8.05	7.49
	28	2.72	1.99	78.86	13.34	7.75	7.15
		2.74	2.00	79.45	12.70	7.46	6.84
	32	2.65	1.94	78.24	14.02	7.23	6.59
		2.70	1.97	79.33	12.83	7.20	6.55
	36	2.67	1.95	80.90	11.10	7.34	6.70
		2.58	1.88	82.51	9.32	7.03	6.36
	48	2.64	1.93	79.96	12.14	6.97	6.30
		2.82	2.06	81.56	10.37	6.50	5.77
	72	2.85	2.08	78.09	14.19	6.29	5.55
		2.91	2.12	79.59	12.53	6.16	5.40

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
4	0	0.31	0.23	131.27	-	0.98	-
		0.31	0.23	130.32	-	1.01	-
	24	2.70	1.97	120.40	7.94	5.97	3.81
		2.51	1.83	117.94	9.82	7.88	5.27
	28	2.53	1.85	121.61	7.02	6.11	3.92
		2.51	1.83	121.01	7.48	8.05	5.40
	32	2.49	1.82	123.45	5.61	5.89	3.74
		2.45	1.79	121.81	6.87	7.48	4.96
	36	2.37	1.73	123.56	5.53	5.95	3.79
		2.58	1.88	122.20	6.57	8.41	5.67
	48	2.51	1.83	119.89	8.33	6.82	4.46
		2.50	1.83	120.95	7.52	8.82	5.99
	72	2.65	1.93	114.98	12.09	11.48	8.02
		2.71	1.98	109.49	16.29	13.36	9.46
5	0	0.35	0.26	167.82	-	1.24	-
		0.35	0.26	169.90	-	1.24	-
	24	2.16	1.58	155.52	7.90	5.55	2.55
		2.10	1.54	154.12	8.73	6.02	2.83
	28	2.38	1.74	158.65	6.05	6.05	2.85
		2.12	1.55	157.61	6.66	5.98	2.81
	32	2.16	1.58	155.63	7.83	5.59	2.57
		2.23	1.63	157.98	6.44	5.62	2.59
	36	2.28	1.67	160.03	5.23	5.83	2.72
		2.34	1.71	158.80	5.96	5.92	2.77
	48	2.51	1.83	158.41	6.19	6.17	2.92
		2.42	1.77	158.35	6.22	6.25	2.97
	72	2.47	1.80	155.37	7.99	6.40	3.05
		2.63	1.92	156.13	7.54	6.72	3.25
6	0	0.28	0.21	130.04	-	1.24	-
		0.28	0.21	131.06	-	1.31	-
	24	1.96	1.43	119.04	8.82	10.42	7.01
		1.93	1.42	119.32	8.60	10.08	6.74
	28	1.99	1.45	115.06	11.86	11.49	7.82
		1.97	1.44	116.96	10.41	11.18	7.59
	32	2.01	1.47	109.76	15.92	12.13	8.32
		2.13	1.56	115.79	11.31	12.47	8.57
	36	2.19	1.60	111.41	14.66	13.50	9.36
		2.22	1.62	115.68	11.39	14.07	9.80
	48	2.28	1.67	107.41	17.73	18.08	12.87
		2.35	1.72	110.45	15.39	18.26	13.01
	72	2.38	1.74	100.22	23.24	24.67	17.92
		2.65	1.93	102.61	21.40	26.52	19.34

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
7	0	0.33	0.25	126.38	-	0.70	-
		0.33	0.25	127.47	-	0.71	-
	24	1.83	1.34	102.07	19.58	13.33	9.94
		1.82	1.33	112.18	11.61	13.58	10.14
	28	1.79	1.31	104.86	17.38	15.70	11.81
		1.83	1.34	112.77	11.15	15.23	11.44
	32	1.74	1.28	106.09	16.41	18.44	13.97
		1.75	1.28	111.62	12.06	16.98	12.82
	36	1.73	1.26	104.45	17.70	20.06	15.25
		1.75	1.28	110.88	12.64	18.83	14.28
	48	1.67	1.22	99.39	21.69	28.17	21.63
		1.68	1.23	101.74	19.84	26.12	20.03
	72	1.73	1.26	78.74	37.96	43.54	33.75
		1.77	1.29	83.94	33.87	40.92	31.68
8	0	0.29	0.22	126.04	-	1.24	-
		0.28	0.21	127.48	-	1.31	-
	24	2.01	1.47	111.68	11.90	10.51	7.29
		2.07	1.51	112.99	10.86	10.20	7.04
	28	2.04	1.49	110.94	12.48	11.21	7.84
		2.01	1.47	111.18	12.29	12.80	9.09
	32	2.08	1.52	104.52	17.54	12.30	8.70
		1.94	1.42	106.10	16.30	12.48	8.83
	36	2.14	1.56	101.18	20.18	17.19	12.56
		2.26	1.65	110.66	12.70	15.89	11.53
	48	2.34	1.71	102.53	19.11	18.76	13.79
		2.14	1.56	105.45	16.81	20.73	15.34
	72	2.58	1.89	97.66	22.96	25.79	19.34
		2.44	1.78	94.44	25.50	25.95	19.46
9	0	0.29	0.22	125.74	-	1.44	-
		0.30	0.23	126.81	-	1.41	-
	24	1.76	1.29	100.13	20.70	22.36	16.58
		1.73	1.27	99.17	21.47	22.66	16.82
	28	1.77	1.30	97.49	22.79	25.17	18.81
		1.78	1.30	98.42	22.06	25.91	19.40
	32	1.81	1.32	94.37	25.26	28.71	21.61
		2.05	1.50	95.71	24.20	29.34	22.11
	36	1.78	1.30	90.45	28.37	31.30	23.66
		1.77	1.29	93.15	26.23	32.40	24.54
	48	1.89	1.38	79.17	37.30	44.33	33.98
		1.83	1.34	79.28	37.21	42.92	32.87
	72	1.94	1.42	52.04	58.78	69.01	53.53
		1.97	1.44	55.51	56.04	66.43	51.49

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
10	0	0.30	0.23	127.67	-	1.06	-
		0.32	0.24	130.92	-	1.09	-
	24	2.63	1.92	119.01	7.95	8.55	5.78
		2.75	2.01	121.30	6.18	9.59	6.59
	28	2.59	1.89	119.21	7.80	9.76	6.72
		2.73	2.00	118.97	7.98	9.46	6.49
	32	2.58	1.88	117.08	9.44	9.71	6.68
		2.63	1.92	115.10	10.97	9.77	6.72
	36	2.49	1.82	117.48	9.14	9.89	6.82
		2.51	1.83	117.32	9.26	10.32	7.15
	48	2.47	1.80	113.32	12.35	13.78	9.83
		2.50	1.83	114.06	11.78	11.98	8.43
	72	2.53	1.85	109.31	15.45	15.03	10.79
		2.54	1.86	111.58	13.70	17.19	12.47
11	0	0.32	0.24	126.75	-	1.43	-
		0.30	0.23	127.76	-	1.44	-
	24	2.52	1.84	102.54	19.42	20.66	15.11
		2.64	1.93	107.55	15.49	17.92	12.96
	28	2.52	1.84	99.07	22.15	21.96	16.12
		2.70	1.97	107.28	15.70	18.83	13.67
	32	2.75	2.01	101.41	20.31	24.15	17.84
		2.71	1.98	107.22	15.75	20.12	14.68
	36	2.81	2.05	100.40	21.10	25.10	18.59
		2.82	2.06	107.38	15.62	20.49	14.97
	48	2.76	2.02	97.38	23.48	27.09	20.16
		2.83	2.07	103.61	18.58	21.24	15.56
	72	2.65	1.93	94.09	26.07	28.59	21.34
		2.74	2.00	98.37	22.70	21.28	15.59
12	0	0.31	0.23	126.31	-	1.09	-
		0.29	0.22	128.30	-	1.09	-
	24	1.93	1.41	105.37	17.23	16.80	12.34
		1.94	1.42	106.91	16.02	15.72	11.50
	28	1.90	1.39	103.90	18.39	18.49	13.67
		1.87	1.37	105.14	17.41	18.52	13.69
	32	1.79	1.31	103.67	18.57	21.23	15.82
		1.93	1.41	102.20	19.73	19.85	14.74
	36	1.77	1.29	104.24	18.12	22.43	16.76
		1.72	1.26	103.88	18.41	21.45	15.99
	48	1.76	1.28	98.85	22.36	26.87	20.25
		1.80	1.32	97.28	23.59	27.34	20.62
	72	1.73	1.27	83.59	34.34	40.42	30.90
		1.71	1.25	79.43	37.61	42.15	32.26

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
13	0	0.33	0.25	88.05	-	1.02	-
		0.31	0.23	90.95	-	1.07	-
	24	2.90	2.12	85.11	4.90	2.88	2.05
		3.10	2.26	85.32	4.67	3.28	2.50
	28	2.81	2.05	84.60	5.48	3.82	3.10
		2.83	2.07	87.80	1.89	2.98	2.17
	32	2.75	2.01	84.54	5.54	4.26	3.60
		2.73	1.99	86.26	3.62	2.94	2.12
	36	2.62	1.91	85.11	4.90	3.13	2.34
		2.59	1.89	85.11	4.90	3.13	2.34
	48	2.89	2.11	83.77	6.40	5.98	5.51
		2.70	1.97	83.58	6.61	3.72	2.99
	72	2.78	2.03	80.01	10.60	5.46	4.94
		2.70	1.97	83.33	6.90	3.92	3.21
14	0	0.29	0.22	91.22	-	1.24	-
		0.29	0.22	91.50	-	1.24	-
	24	2.56	1.87	76.00	16.81	5.69	4.87
		2.67	1.95	75.26	17.62	6.55	5.81
	28	2.59	1.89	75.07	17.83	5.37	4.52
		2.68	1.96	74.30	18.67	6.79	6.07
	32	2.58	1.88	76.74	16.01	5.90	5.10
		2.72	1.99	77.14	15.56	6.68	5.95
	36	2.59	1.89	77.48	15.19	5.81	5.01
		2.67	1.95	76.31	16.48	6.73	6.01
	48	2.83	2.07	76.37	16.41	6.39	5.64
		2.87	2.09	84.56	7.44	8.27	7.70
	72	2.31	1.69	76.32	16.47	7.62	6.99
		2.22	1.62	77.03	15.68	8.14	7.55
15	0	0.33	0.25	131.28	-	1.00	-
		0.34	0.26	128.64	-	0.94	-
	24	2.67	1.95	119.38	8.14	2.64	1.28
		2.66	1.95	125.12	3.72	3.12	1.65
	28	2.61	1.91	127.59	1.83	2.69	1.32
		2.59	1.89	126.47	2.69	3.11	1.65
	32	2.61	1.90	128.92	0.80	2.52	1.19
		2.60	1.90	126.08	2.98	3.24	1.74
	36	2.55	1.87	125.55	3.39	2.52	1.19
		2.49	1.82	123.07	5.30	3.70	2.10
	48	2.36	1.72	126.34	2.78	5.00	3.10
		2.40	1.75	122.22	5.95	6.99	4.63
	72	2.39	1.74	120.31	7.43	6.25	4.06
		2.39	1.74	116.02	10.73	8.22	5.58

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
16	0	0.32	0.24	88.98	-	1.18	-
		0.32	0.24	89.87	-	1.23	-
	24	1.87	1.37	72.20	19.26	13.02	13.21
		1.85	1.36	69.32	22.47	12.11	12.20
	28	1.83	1.34	65.46	26.79	14.00	14.31
		1.83	1.34	71.77	19.73	14.80	15.20
	32	1.80	1.31	69.49	22.29	17.13	17.81
		1.78	1.30	74.76	16.39	18.21	19.02
	36	1.77	1.29	65.72	26.50	19.14	20.05
		1.77	1.29	68.31	23.61	19.70	20.68
	48	1.76	1.29	54.21	39.38	25.29	26.93
		1.77	1.30	60.11	32.77	27.10	28.96
	72	1.79	1.31	40.02	55.25	44.01	47.87
		1.80	1.32	41.91	53.13	44.03	47.89
17	0	0.28	0.21	168.31	-	1.09	-
		0.29	0.22	169.30	-	1.09	-
	24	2.29	1.67	142.28	15.72	8.19	4.21
		2.30	1.68	147.46	12.65	8.59	4.44
	28	2.33	1.70	143.32	15.10	9.32	4.88
		2.34	1.71	139.30	17.48	9.12	4.76
	32	2.22	1.62	138.50	17.95	10.57	5.62
		2.17	1.59	143.18	15.18	10.73	5.71
	36	2.26	1.65	138.75	17.81	11.90	6.40
		2.23	1.63	142.43	15.62	11.99	6.46
	48	2.03	1.49	132.02	21.79	17.20	9.54
		2.09	1.53	135.68	19.63	17.67	9.82
	72	2.11	1.54	125.28	25.78	28.64	16.32
		2.08	1.52	125.79	25.48	28.66	16.33
18	0	0.28	0.21	169.24	-	1.24	-
		0.30	0.23	169.86	-	1.31	-
	24	1.07	0.79	154.47	8.89	11.32	5.92
		1.12	0.82	153.82	9.28	10.32	5.34
	28	1.64	1.20	150.82	11.04	12.60	6.68
		1.51	1.11	151.19	10.83	13.58	7.26
	32	1.63	1.19	143.74	15.22	14.49	7.79
		1.91	1.40	147.34	13.10	13.47	7.19
	36	1.68	1.23	141.99	16.25	17.04	9.30
		1.81	1.32	145.70	14.06	15.99	8.68
	48	1.69	1.24	140.07	17.39	20.48	11.33
		1.64	1.20	142.07	16.21	19.21	10.57
	72	1.60	1.17	131.85	22.24	30.82	17.42
		1.57	1.15	130.80	22.86	29.37	16.57

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
19	0	0.29	0.22	168.27	-	0.98	-
		0.29	0.22	169.32	-	1.01	-
	24	1.90	1.39	151.51	10.24	15.51	8.60
		1.74	1.27	151.06	10.50	12.20	6.64
	28	1.84	1.35	150.22	11.00	17.50	9.78
		1.71	1.25	148.94	11.76	14.12	7.78
	32	1.91	1.39	149.07	11.68	19.44	10.93
		1.72	1.26	148.92	11.77	15.47	8.58
	36	1.87	1.37	143.22	15.15	21.30	12.03
		1.71	1.25	146.95	12.94	17.76	9.93
	48	1.89	1.38	135.10	19.96	28.85	16.50
		1.73	1.27	138.90	17.71	25.11	14.29
	72	1.96	1.44	118.43	29.83	43.26	25.04
		1.79	1.31	122.45	27.46	40.49	23.40
20	0	0.33	0.25	167.18	-	0.92	-
		0.31	0.23	167.11	-	1.03	-
	24	2.63	1.92	150.22	10.12	16.43	9.24
		2.59	1.89	152.38	8.83	17.46	9.86
	28	2.54	1.86	150.00	10.26	18.43	10.44
		2.50	1.82	152.06	9.02	19.82	11.27
	32	2.64	1.93	151.21	9.53	17.89	10.12
		2.74	2.00	152.29	8.88	19.98	11.37
	36	2.56	1.87	145.64	12.86	18.70	10.60
		2.61	1.91	147.70	11.63	19.97	11.36
	48	2.46	1.80	140.75	15.79	22.86	13.09
		2.52	1.84	142.70	14.62	24.93	14.33
	72	2.51	1.83	128.99	22.82	32.97	19.14
		2.54	1.86	132.35	20.81	34.35	19.97
21	0	0.32	0.24	91.04	-	1.24	-
		0.33	0.25	90.06	-	1.31	-
	24	1.88	1.38	77.44	14.48	9.63	9.23
		1.89	1.38	81.50	9.99	12.05	11.90
	28	2.05	1.50	69.30	23.47	11.85	11.67
		2.11	1.54	75.64	16.46	12.17	12.03
	32	2.22	1.62	73.84	18.45	12.76	12.69
		2.15	1.57	70.43	22.22	14.48	14.58
	36	2.35	1.72	69.85	22.86	13.60	13.61
		2.38	1.74	75.51	16.61	13.57	13.58
	48	2.59	1.89	67.73	25.20	13.53	13.53
		2.64	1.92	73.99	18.29	14.25	14.32
	72	2.67	1.95	69.13	23.66	14.87	15.02
		2.67	1.95	67.54	25.41	14.32	14.41

Çizelge 4.1'in devamı

Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
22	0	0.31	0.23	123.53	-	0.70	-
		0.31	0.23	124.73	-	0.71	-
	24	1.86	1.36	99.40	19.92	12.24	9.29
		1.91	1.40	104.77	15.59	13.66	10.44
	28	1.78	1.31	98.88	20.34	13.36	10.19
		1.86	1.36	105.26	15.21	15.59	11.99
	32	1.77	1.29	100.87	18.74	15.29	11.75
		1.78	1.30	106.29	14.37	17.37	13.43
	36	1.68	1.23	97.89	21.14	16.20	12.48
		1.70	1.24	102.18	17.68	17.70	13.69
	48	1.66	1.21	98.70	20.49	23.31	18.21
		1.73	1.26	96.43	22.32	24.53	19.19
	72	1.73	1.27	83.86	32.44	35.80	28.27
		1.76	1.29	80.95	34.79	36.98	29.22
23	0	0.32	0.24	89.27	-	0.98	-
		0.32	0.24	88.32	-	1.01	-
	24	3.00	2.19	79.78	10.15	5.77	5.38
		3.09	2.26	81.80	7.88	6.59	6.31
	28	2.97	2.17	80.88	8.91	6.22	5.89
		2.89	2.11	79.71	10.22	6.63	6.35
	32	2.78	2.03	81.66	8.03	6.00	5.65
		2.83	2.06	81.03	8.74	6.71	6.44
	36	2.69	1.96	79.05	10.97	6.66	6.39
		2.72	1.99	81.30	8.43	6.28	5.96
	48	2.70	1.98	79.00	11.03	6.47	6.18
		2.66	1.94	77.45	12.78	7.37	7.18
	72	2.91	2.12	76.68	13.64	7.40	7.22
		2.86	2.08	75.95	14.46	8.47	8.43
24	0	0.31	0.23	127.41	-	1.09	-
		0.29	0.22	126.47	-	1.09	-
	24	1.99	1.45	110.75	12.75	16.13	11.85
		1.97	1.44	110.00	13.34	13.68	9.92
	28	1.99	1.45	106.69	15.95	17.93	13.27
		1.98	1.45	109.50	13.74	13.41	9.71
	32	1.81	1.33	106.31	16.25	20.49	15.28
		1.95	1.42	105.87	16.60	18.34	13.59
	36	1.80	1.31	104.91	17.36	21.41	16.01
		1.80	1.31	106.15	16.38	20.16	15.02
	48	1.78	1.30	98.00	22.80	28.73	21.77
		1.79	1.31	97.36	23.30	29.36	22.27
	72	1.74	1.28	79.70	37.21	43.50	33.41
		1.74	1.28	84.99	33.05	40.19	30.80

Çizelge 4.1'in devamı

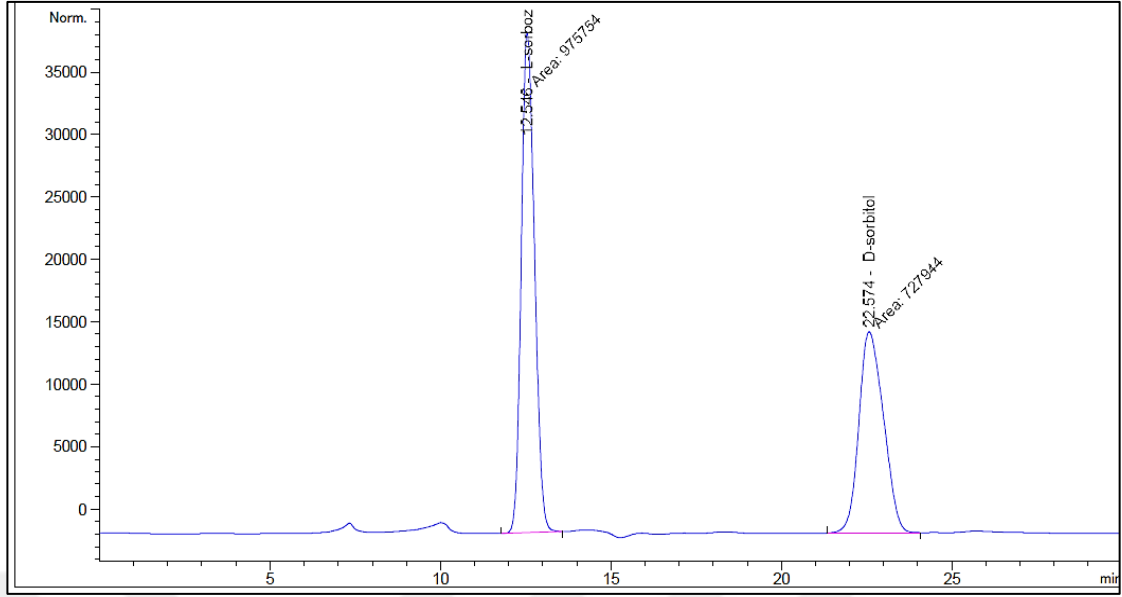
Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
25	0	0.33	0.25	125.97	-	1.46	-
		0.30	0.23	126.88	-	1.39	-
	24	1.85	1.35	112.63	9.76	8.54	5.63
		1.79	1.31	114.51	7.91	8.72	5.77
	28	1.73	1.26	110.94	8.59	9.45	6.35
		1.67	1.23	113.82	12.31	9.98	6.77
	32	1.69	1.24	111.06	11.31	10.51	7.19
		1.66	1.21	113.78	11.38	10.94	7.53
	36	1.71	1.25	110.96	12.16	11.48	7.95
		1.70	1.25	113.69	11.13	12.20	8.53
	48	1.82	1.33	105.88	15.77	16.60	12.01
		1.78	1.30	108.16	16.41	16.89	12.23
	72	1.95	1.42	94.05	24.78	25.71	19.21
		1.94	1.42	96.61	23.77	27.66	20.75
26	0	0.32	0.24	127.94	-	1.39	-
		0.34	0.26	128.90	-	1.34	-
	24	1.62	1.19	116.09	14.97	8.03	5.19
		1.69	1.24	118.42	12.59	8.24	5.35
	28	1.57	1.15	117.56	15.49	9.36	6.22
		1.65	1.21	112.86	14.00	9.12	6.04
	32	1.62	1.19	114.13	17.00	10.39	7.02
		1.60	1.17	114.03	16.16	10.57	7.17
	36	1.54	1.13	113.04	17.40	11.49	7.88
		1.57	1.15	114.34	16.19	11.94	8.23
	48	1.67	1.23	108.48	21.45	16.52	11.80
		1.70	1.24	107.67	21.75	16.97	12.15
	72	1.59	1.16	97.09	32.94	27.73	20.53
		1.60	1.17	98.37	36.04	28.95	21.47
27	0	0.34	0.26	125.94	-	1.09	-
		0.34	0.26	126.79	-	1.09	-
	24	1.88	1.38	107.14	15.21	17.19	12.75
		1.81	1.33	110.19	12.80	16.33	12.06
	28	2.02	1.48	106.47	15.74	19.01	14.19
		1.94	1.42	108.38	14.23	17.93	13.33
	32	1.88	1.38	104.53	17.28	21.50	16.16
		1.93	1.41	105.61	16.42	23.48	17.72
	36	1.83	1.34	104.02	17.68	22.72	17.12
		1.87	1.37	105.57	16.45	21.35	16.04
	48	1.84	1.34	98.81	21.80	28.80	21.93
		1.84	1.34	98.43	22.11	28.78	21.91
	72	1.79	1.31	84.05	33.48	40.56	31.24
		1.83	1.34	80.08	36.63	41.75	32.18

Çizelge 4.2. Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen 27 denemeye ait ortalama optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri (I. ve II. tekerrür)

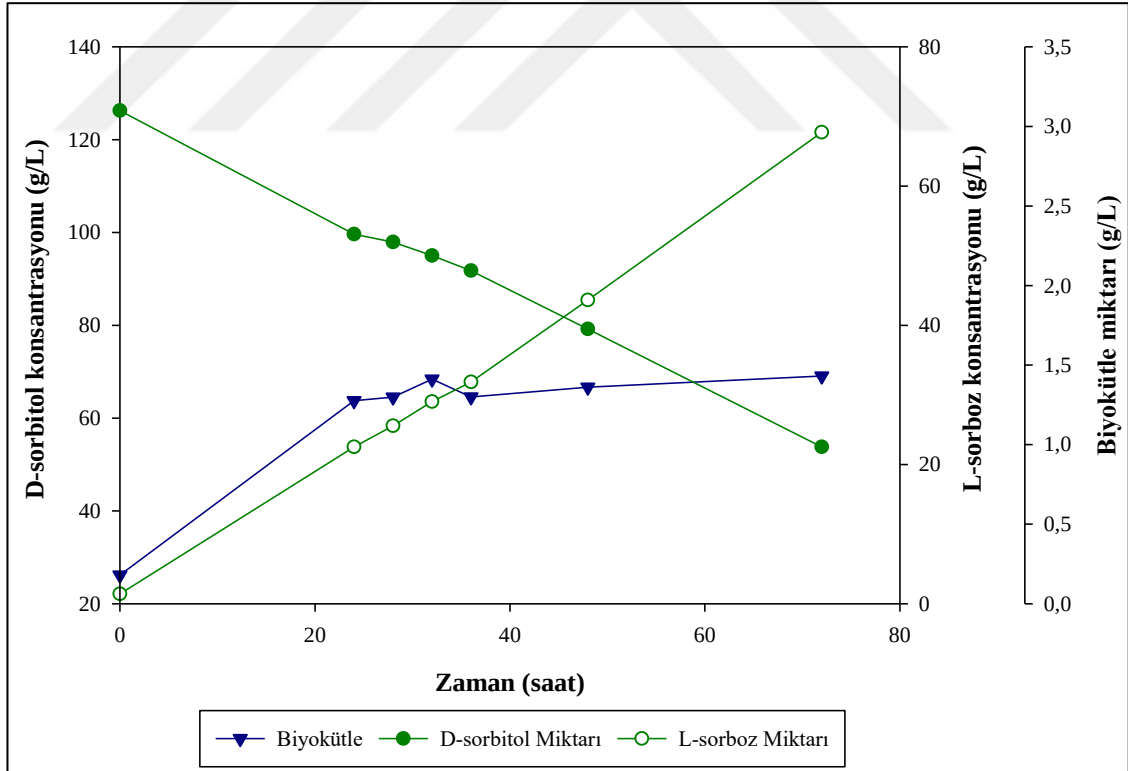
Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
Üretim ortalamaları	0	0.31	0.23	127.96	-	1.11	-
		0.31	0.23	128.73	-	1.13	-
	24	2.12	1.55	111.12	13.81	11.27	7.97
		2.13	1.56	113.13	12.18	11.43	8.15
	28	2.15	1.57	110.75	14.17	12.63	9.03
		2.14	1.57	112.44	12.68	12.58	9.02
	32	2.13	1.55	109.95	14.61	13.88	10.03
		2.15	1.58	111.54	13.46	13.83	10.05
	36	2.11	1.54	108.54	15.74	14.96	10.87
		2.13	1.55	111.12	13.75	14.88	10.81
	48	2.16	1.58	104.40	19.00	19.43	14.28
		2.15	1.58	106.45	17.38	19.29	14.22
	72	2.18	1.60	94.61	26.63	28.21	21.03
		2.18	1.60	95.33	26.26	27.87	20.77

L-sorboz üretiminin optimizasyonu için uygulanan toplam 27 fermantasyon denemesinden elde edilen analiz sonuçlarına göre en yüksek L-sorboz üretim oranının 9 numaralı deneme ile %10 oranında inokülasyon sonrası 126.27 g/L D-sorbitol başlangıç konsantrasyonunda, besiyeri başlangıç pH değeri 7.00 iken, 35°C sıcaklıkta ve 250 rpm çalkalama hızı koşullarında sağlandığı tespit edilmiştir. Deneme desenindeki 9 numaralı fermantasyon denemesi ortalama 0.22 g/L biyokütle miktarı ile başlatılmış ve 72 saat süren fermantasyon sonunda biyokütle miktarı yaklaşık 6.54 kat artarak 1.43 g/L miktarına ulaşmıştır. Zenginleştirme besiyerinin inokülasyonu ile başlangıçta ortalama 1.42 g/L olan L-sorboz miktarı fermantasyon sonunda %52.51 üretim oranı ile 67.72 g/L miktarına ulaşmıştır.

En yüksek miktarda L-sorboz üretimini sağlayan 9 numaralı fermantasyon denemesi sonunda elde edilen D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı Şekil 4.3'te ve fermantasyon süresince yapılan tüm örneklemelerle elde edilen biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz (g/L) miktar verilerine ait grafik ise Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. En yüksek L-sorboz dönüşümünü sağlayan 9 numaralı fermantasyon denemesinden elde edilen 72. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı



Şekil 4.4. En yüksek L-sorboz dönüşümünü sağlayan 9 Numaralı fermantasyon denemesine ait biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının zamanla değişim grafiği

4.1.1. Uygun model seçimi

Çalkalamalı inkübatörde uygulanan deneme deseninde yanıt değişkeni olarak, Çizelge 4.1’de verilen tüm fermentasyon denemelerinin 72. saat örneklerinden elde edilen L-sorboz miktar (g/L) verileri kullanılmıştır. Optimizasyon için en uyumlu modelin belirlenmesi amacıyla her bir denemeye ait yanıt değişkenleri ve Design Expert® programı kullanılarak doğrusal, iki faktörlü interaksiyon (2FI), kuadratik ve kübik modellerin uygunluğu test edilmiştir.

Model uygunluğunun istatistiki olarak değerlendirilmesinde önem değeri (p), uyum eksikliği (lack of fit), saf hata, varyasyon katsayısı (CV), en düşük tahmin edilen hata karelerinin toplamı (PRESS), en yüksek regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı (R^2_{diz}), tahmini belirleme regresyon katsayısı (Pred- R^2) ve yeterli hassasiyet parametreleri kullanılmıştır. Uygulanan deneme deseni için bu parametrelerin en iyi ifade edildiği model olan kuadratik modelin deneme şartlarında istatistiki olarak ($p < 0.01$) en uygun model olduğu tespit edilmiştir. Uygun olarak seçilen modele ve optimizasyon işleminde uygulanan bağımsız değişkenlere ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Bağımsız değişkenlerin L-sorboz miktarı üzerine etkisini gösteren varyans analizi verileri

Varyasyon kaynağı	HKT	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Model (Kuadratik)	6077.23	14	434.09	5.66	0.0023**
A (D-sorbitol konsantrasyonu)	741.61	1	741.61	9.67	0.0090**
B (pH)	394.49	1	394.49	5.14	0.0426*
C (Sıcaklık)	667.92	1	667.92	8.71	0.0121*
D (Çalkalama hızı)	0.84	1	0.84	0.011	0.9183
AB	104.38	1	104.38	1.36	0.2661
AC	382.22	1	382.22	4.98	0.0454*
AD	45.41	1	45.41	0.59	0.4565
BC	566.52	1	566.52	7.38	0.0187*
BD	18.52	1	18.52	0.24	0.6320
CD	422.97	1	422.97	5.51	0.0368*
A ²	1052.31	1	1052.31	13.72	0.0030**
B ²	973.35	1	973.35	12.69	0.0039**
C ²	193.31	1	193.31	2.52	0.1384
D ²	430.65	1	430.65	5.61	0.0354*
Artık hata	920.61	12	76.72		
Uyum eksikliği	920.43	10	92.04	1046.63	0.0010**
Saf hata	0.18	2	0.088		
Toplam	6997.84	26			

HKT: Hata kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Çizelge 4.3'te verilen varyans analizi sonuçlarına göre; başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunun, besiyeri başlangıç pH değerinin ve sıcaklığın, D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık, pH-sıcaklık ve sıcaklık-çalkalama hızı interaksiyonlarının ve D-sorbitol konsantrasyonu, pH değeri ve çalkalama hızı karelerinin L-sorboz üretimi üzerine önemli ($p<0.01$; $0.01<p<0.05$) seviyede etkili oldukları tespit edilmiştir. Önemsiz parametrelerin değerlendirmeden çıkarılması ile elde edilen çoklu regresyon istatistik değerleri ise Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kuadratik modelin çoklu regresyon istatistik değerleri

Parametre	Değer
R^2	0.82
R^2_{dzt}	0.72
Pred- R^2	0.47
%CV	30.96
PRESS	3744.48
Yeterli hassasiyet	9.82

R^2 : Regresyon katsayısı, R^2_{dzt} : Düzeltilmiş regresyon katsayısı, Pred- R^2 : Tahmini belirleme regresyon katsayısı, CV: Varyasyon katsayısı, PRESS: Tahmin edilen hataların karelerinin toplamı

Çizelge 4.3 ve 4.4'te verilen varyans analizi verilerine göre kullanılan deneme deseninde L-sorboz miktarının kuadratik model ile iyi bir uyum ($R^2 = 0.82$) içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Yeterli hassasiyet değeri 9.82 olarak belirlenmiş ve bu değerın sınır değeri olan 4 değerinden büyük olması da modelin uygunluğunu ve gürültüden etkilenmediğini göstermiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen L-sorboz verileri kullanılarak gerçekleştirilen varyans analizi ile önemsiz olduğu tespit edilen değişkenler çıkarılıp, önemli bulunan bağımsız değişkenlere göre oluşturulan kuadratik modelin genel regresyon eşitliği, Eşitlik 4.1'de verilmiştir.

$$\text{L-sorboz miktarı (g/L)} = -431.13 + 4.20A + 133.82B - 18.65C - 0.05AC + 2.38BC + 0.05CD - 9.75 \cdot 10^{-3}A^2 - 15.07B^2 - 3.68 \cdot 10^{-3}D^2 \quad (4.1)$$

A: Başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu

B: Besiyeri başlangıç pH değeri

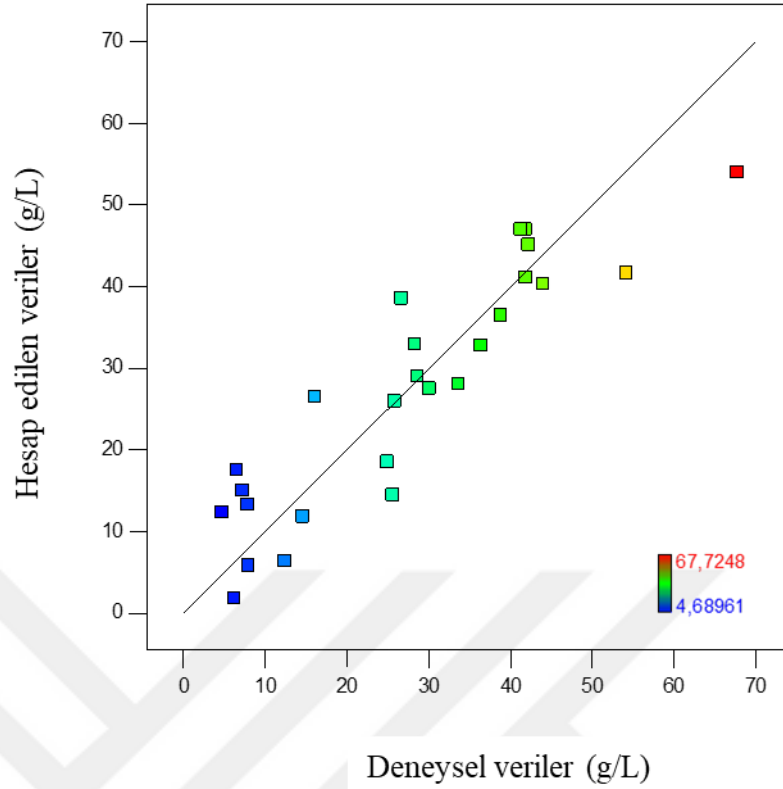
C: Sıcaklık

D: Çalkalama hızı

Deneyssel olarak elde edilen L-sorboz miktar verileri ile kuadratik modelin (Eşitlik 4.1) kullanılmasıyla hesap edilen L-sorboz miktar verileri Çizelge 4.5'te ve deneyssel veriler ile hesap edilen veriler arasındaki uyum grafiği ise Şekil 4.5'te verilmiştir. Deneyssel ve hesap edilen verilerin ortalama L-sorboz üretim miktarlarında yakınlık gösterdiği ve bu nedenle de model ve model denkleminin deneme koşullarında L-sorboz üretiminin tahmini için sistem dışı hatalardan etkilenmediği ve genel olarak başarılı olduğu Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5 değerlendirildiğinde anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.5. L-sorboz üretim miktarının deneysel ve hesap edilen (Eşitlik 4.1) verileri

Deneme no	Deneysel (g/L)	Hesap edilen (g/L)	Fark (g/L)
1	38.85	35.73	3.13
2	54.18	40.89	13.29
3	6.23	1.52	4.71
4	12.42	5.62	6.80
5	6.56	17.24	-10.68
6	25.60	15.63	9.97
7	42.23	44.35	-2.12
8	25.87	27.09	-1.23
9	67.72	56.49	11.23
10	16.11	27.40	-11.29
11	24.93	16.98	7.95
12	41.29	45.79	-4.50
13	4.69	13.27	-8.58
14	7.88	12.98	-5.10
15	7.23	15.93	-8.70
16	44.02	39.56	4.46
17	28.65	28.71	-0.06
18	30.09	28.69	1.41
19	41.87	40.36	1.52
20	33.66	28.99	4.67
21	14.60	12.96	1.64
22	36.39	32.01	4.37
23	7.94	5.08	2.86
24	41.84	45.79	-3.94
25	26.68	41.27	-14.58
26	28.34	31.59	-3.25
27	41.75	45.79	-4.03



Şekil 4.5. L-sorboz üretimi için deneysel ve hesap edilen verilerin uyum grafiği

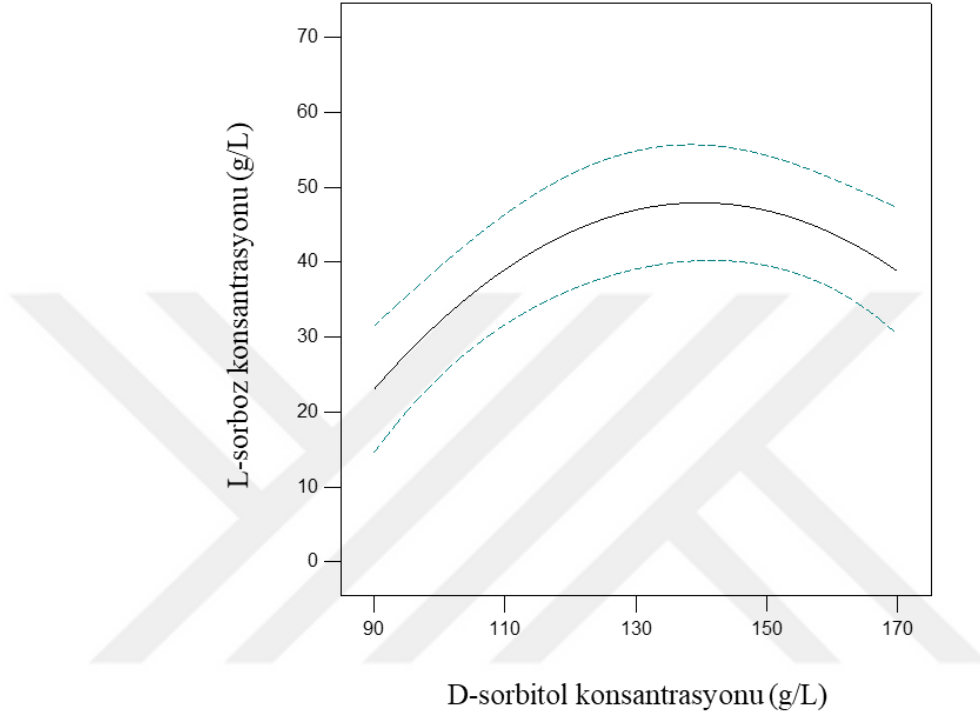
4.1.2. Bağımsız değişkenlerin L-sorboz üretimi üzerine etkisi

4.1.2.1. D-sorbitol konsantrasyonunun etkisi

Merkezi kompozit tasarım kullanılarak çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinde başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu bağımsız değişkenine ait en düşük ve en yüksek noktalar sırasıyla 90 ila 170 g/L olarak belirlenmiştir. Uygulanan fermantasyon denemeleri sonucunda L-sorboz üretim miktarı üzerine D-sorbitol konsantrasyonu ($p < 0.01$) ve D-sorbitol konsantrasyonunun karesinin ($p < 0.05$) istatistiksel olarak önemli bir etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. D-sorbitol konsantrasyonunun ve karesinin pH 7.00 değerinde, 30°C sıcaklıkta ve 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen fermantasyon işleminde L-sorboz üretim miktarı üzerine etkisi Şekil 4.6'da verilmiştir.

Şekil 4.6 incelendiğinde besiyeri başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunun 90 g/L değerinden 130 g/L değerine artırılması ile L-sorboz üretim miktarının ve verimin arttığı, ancak 130 g/L D-sorbitol konsantrasyonundan 170 g/L konsantrasyonuna artışın L-sorboz üretim miktarında ve üretim veriminde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. L-sorboz ortalama üretim miktarları; 90 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda 14.23 g/L, 130 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda 32.84 g/L ve 170 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda ise 29.95 g/L olarak tespit edilmiştir. L-sorboz ortalama üretim verimleri ise; 90, 130 ve 170 g/L besiyeri başlangıç D-sorbitol konsantrasyonları için sırasıyla %14.37, %24.95 ve %17.50 olarak belirlenmiştir. Bu değerler incelendiğinde de 130 g/L D-sorbitol

konsantrasyonunda *G. oxydans* mikroorganizmasının en yüksek oranda L-sorboz üretimini sağladığı tespit edilmiştir. Düşük D-sorbitol konsantrasyonunda mikroorganizmanın besiyeri ortamında D-sorbitol ile karşılaşma ihtimalinin düşük olması ve yüksek D-sorbitol konsantrasyonunun ise koligatif etkileri nedeniyle besiyeri ortamının su aktivitesini düşürmesi sebebiyle L-sorboz verim değerinin düşük olduğu değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6. D-sorbitol konsantrasyonu ve karesinin L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları

Yapılan bir çalışmada besiyerinin içerdiği D-sorbitol konsantrasyonunun 170 g/L miktarından daha fazla olmasının besiyeri serbest su konsantrasyonunu, su aktivitesi değerini ve ortamın difüzyonunu düşürdüğü ve buna bağlı olarak da fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen miktarının azalmasına neden olduğu ve aynı zamanda fermantasyon ortamında çözünmüş madde konsantrasyonunun yüksek olmasının ise hücrelerin biyokatalitik aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Mihaljevic ve Bosnjak, 2003).

G. oxydans mikroorganizması kullanılarak yapılan bir çalışmada, 100 ila 300 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunda, 30°C sıcaklıkta ve pH 6.00 değerinde sabit tutularak gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinde D-sorbitol konsantrasyonunun 100 g/L değerinden 300 g/L değerine yükseltilmesinin mikrobiyal gelişimi önemli ölçüde inhibe ettiği ve buna bağlı olarak fermantasyon süresinin artıp, nihai L-sorboz üretim veriminin azaldığı belirlenmiştir (Giridhar ve Srivastava 2002).

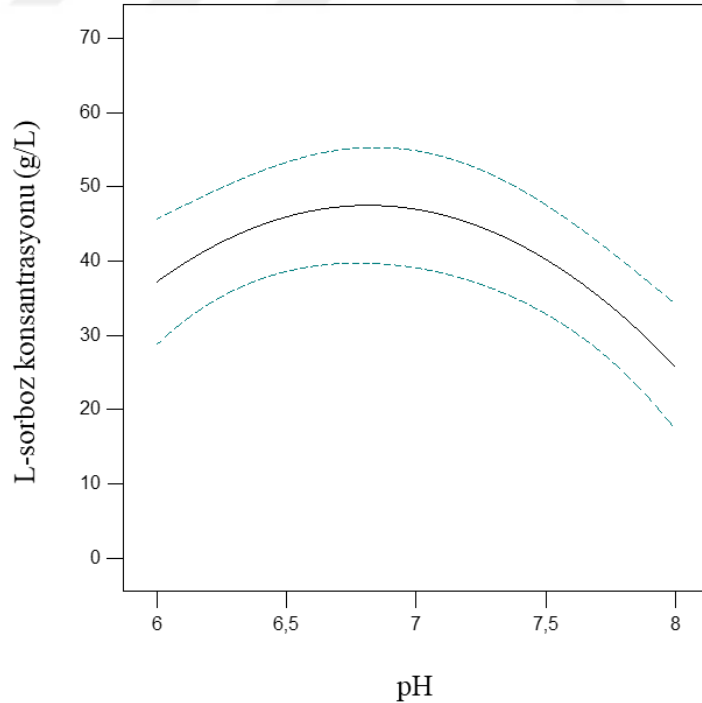
Azar ve Alemzadeh (2020) tarafından *G. oxydans* mikroorganizması kullanılarak yapılan bir çalışmada; 120 ila 180 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunda, 6 ila 18

g/L başlangıç maya ekstraktı konsantrasyonunda ve %5 ila 10 inokülüm oranında, 28°C sıcaklıkta, pH 5.10 değerinde fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve maksimum L-sorboz üretimine 153.42 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunda 42.26 g/L nihai sorboz miktarı ile ulaşıldığı bildirilmiştir. Aynı araştırmada optimum L-sorboz üretimi için başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunun 150 g/L olduğu belirlenmiş ve daha yüksek ve daha düşük D-sorbitol konsantrasyonlarında L-sorboz üretim veriminin düştüğü tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 10 ila 600 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda, pH 3 ila 8 değerinde, 10°C ila 50°C sıcaklık aralığında fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve D-sorbitol konsantrasyonu 200 g/L ve daha yüksek miktarlarda olan denemelerde *G. oxydans* hücrelerinin oksijen kullanım oranının düştüğü, buna bağlı olarak D-sorbitol dönüşüm oranının azaldığı belirlenmiştir (Rosenberg vd. 1993).

4.1.2.2. pH değerinin etkisi

Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde bağımsız değişkenlerden biri olan besiyeri başlangıç pH değerine ait en düşük ve en yüksek noktalar sırasıyla 6 ila 8 olarak belirlenmiştir. Uygulanan fermentasyon denemeleri sonucunda L-sorboz üretim miktarı üzerine besiyeri başlangıç pH değeri ve pH değerinin karesinin istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bir etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. L-sorboz miktarı üzerine 130 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda, 30°C sıcaklıkta ve 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen fermentasyon işleminde besiyeri başlangıç pH değerinin ve karesinin etkisi Şekil 4.7’de verilmiştir.



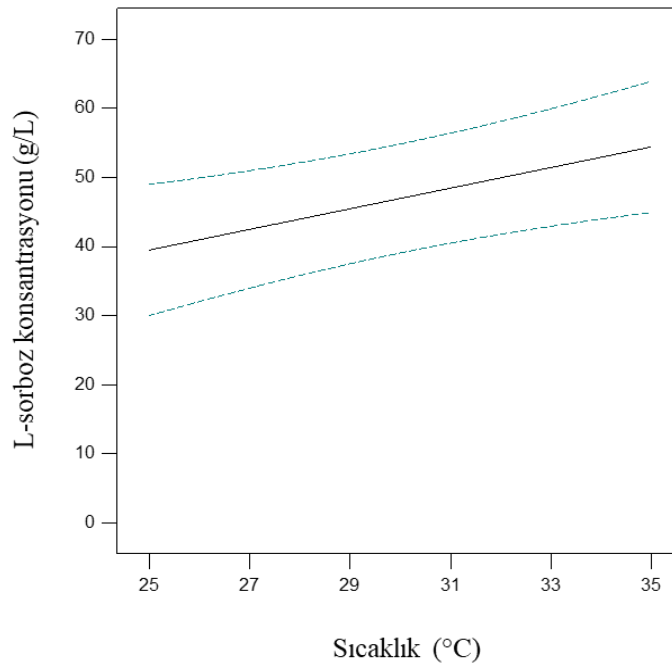
Şekil 4.7. Besiyeri başlangıç pH değerinin ve karesinin L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları

Şekil 4.7 incelendiğinde pH 6-7 değerleri arasındaki besiyeri başlangıç pH değerinin L-sorboz üretim miktarını önemli düzeyde etkilemediği ancak pH değerinin 7 değerinden 8 değerine arttırılması ile L-sorboz üretim miktarının azaldığı belirlenmiştir. L-sorboz ortalama üretim miktarları; besiyeri başlangıç pH değeri 6, 7 ve 8 iken sırasıyla 28.18, 32.55 ve 16.71 g/L olarak tespit edilmiştir. L-sorboz ortalama üretim verimleri ise; besiyeri başlangıç pH değeri 6, 7 ve 8 iken sırasıyla %21.13, %24.34 ve %12.27 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre besiyeri başlangıç pH değerinin yaklaşık 7 olmasının yüksek verimle L-sorboz üretimini sağladığı ve pH 8 değerinde ise mikroorganizma faaliyetlerini baskılandığı için L-sorboz veriminin düştüğü değerlendirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada immobilize *G. oxydans* suşu kullanılarak L-sorboz üretimi gerçekleştirilmiş ve besiyeri başlangıç pH değeri 3 ila 7.5 değerinde, 100 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunda, 30°C sıcaklıkta ve 220 rpm çalkalama hızında erlenler içerisinde fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve pH 3 değerinde L-sorboz üretilmediği ve pH 4.5 ila 7.5 değeri aralığında ise D-sorbitolden L-sorboz üretim hızının önemli düzeyde değişmediği belirlenmiştir (Trifonov vd. 1991).

4.1.2.3. Sıcaklığın etkisi

Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde bağımsız değişkenlerden biri olan sıcaklık değeri için düşük ve yüksek noktalar sırasıyla 25 ila 35°C olarak belirlenmiştir. Uygulanan fermentasyon denemeleri sonucunda L-sorboz üretim miktarı üzerine fermentasyon sıcaklığının istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. L-sorboz miktarı üzerine 130 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda, pH 7 değerinde ve 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen fermentasyon işleminde sıcaklığın etkisi Şekil 4.8’de verilmiştir.



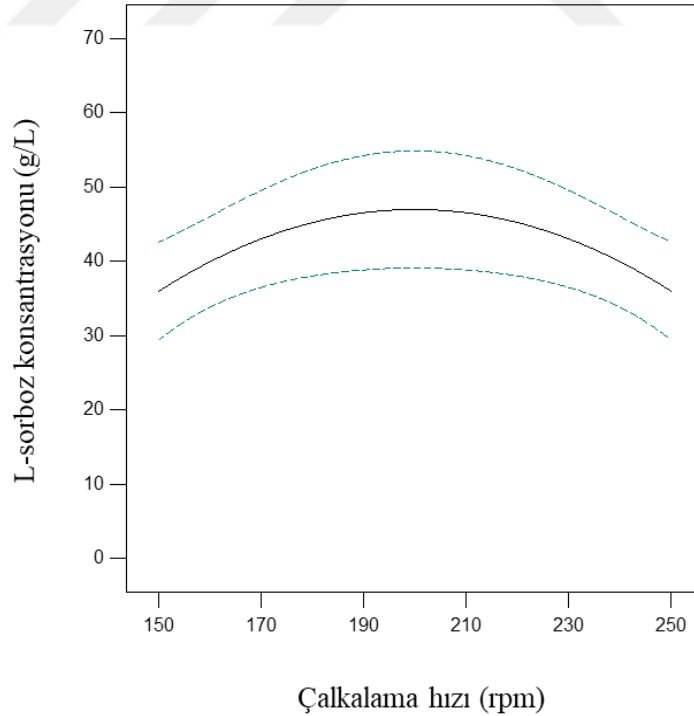
Şekil 4.8. Fermentasyon sıcaklığının L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları

Şekil 4.8 incelendiğinde sıcaklığın 25°C değerinden 35°C değerine arttırılması ile L-sorboz üretim miktarının arttığı belirlenmiştir. L-sorboz ortalama üretim miktarları; 25°C değerinde 28.00 g/L, 30°C değerinde 22.14 g/L ve 35°C değerinde ise 42.93 g/L olarak tespit edilmiştir. L-sorboz ortalama üretim veriminin ise; 25°C değerinde %20.22, 30°C değerinde %15.94 ve 35°C değerinde ise %34.18 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre deneme şartlarında sıcaklık değerinin ortalama 35°C olmasının en yüksek verimle L-sorboz üretimini sağladığı değerlendirilmiştir.

G. oxydans suşu kullanılarak L-sorboz üretiminin optimizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada 10°C ila 50°C arasında sıcaklıkta, pH 3 ila 8 değerinde, 10 ila 600 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve maksimum L-sorboz üretim verimi için optimum sıcaklığın 35 ila 40°C arasında olduğu tespit edilmiştir (Rosenberg vd. 1993).

4.1.2.4. Çalkalama hızının etkisi

Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde çalkalama hızı bağımsız değişkenine ait en düşük ve en yüksek noktalar 150 ila 250 rpm olarak belirlenmiştir. Uygulanan fermentasyon denemeleri sonucunda L-sorboz üretim miktarı üzerine çalkalama hızının istatistiksel olarak önemli ($p>0.05$) bir etkisinin olmadığı ancak çalkalama hızı karesinin L-sorboz üretimini etkilediği ($p<0.01$) belirlenmiştir. L-sorboz miktarı üzerine 130 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda, pH 7 değerinde ve 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilen fermentasyon işleminde çalkalama hızının etkisi Şekil 4.9'da verilmiştir.



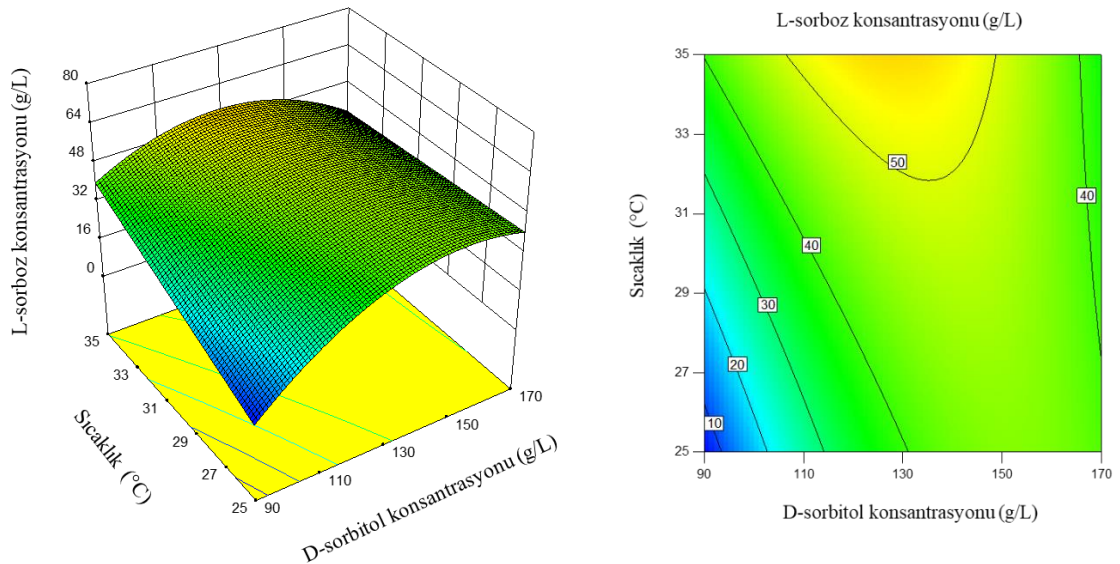
Şekil 4.9. Çalkalama hızının L-sorboz üretimi üzerine etkisi ve standart hata bantları

Şekil 4.9 incelendiğinde 150 rpm ve 250 rpm çalkalama hızlarında L-sorboz üretim miktarlarının 200 rpm ile yapılan denemelerin L-sorboz üretim ortalamalarından daha düşük olduğu belirlenmiştir. L-sorboz ortalama üretim miktarları; çalkalama hızı 150, 200 ve 250 rpm iken sırasıyla 25.20, 30.14 ve 25.73 g/L olarak tespit edilmiştir. L-sorboz ortalama üretim verimleri ise; çalkalama hızı 150, 200 ve 250 rpm iken sırasıyla %18.54, %22.88 ve %18.51 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre çalkalama hızı değerinin ortalama 200 rpm olmasının en yüksek verimle L-sorboz üretimini sağladığı değerlendirilmiştir. Ancak gerçekleştirilen 27 farklı üretim denemesinde en yüksek verimle üretimin yapıldığı 9 numaralı deneme deseninin çalkama hızı 250 rpm olarak uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre 9 numaralı deneme fermentasyonunda L-sorboz üretim miktarı üzerine çalkalama hızının tek başına etkili olmadığı, üretim miktarının D-sorbitol konsantrasyonu (130 g/L), pH (7) ve sıcaklık (35°C) faktörlerinden etkilendiği değerlendirilmiştir.

Zorunlu aerob bir bakteri olan *G. oxydans* için sorbitolün sorboza oksidasyonu işlemi sırasında gerçekleşen ardışık oksidasyon tepkimelerinde oksijen yüksek miktarda gerekmede ve bu nedenle fermentasyon ortamında yeterli çözünmüş oksijenin bulunabilmesi için çoğunlukla yüksek çalkalama hızına ihtiyaç duyulmaktadır (Elenkov vd. 1989; Zhou vd. 2019).

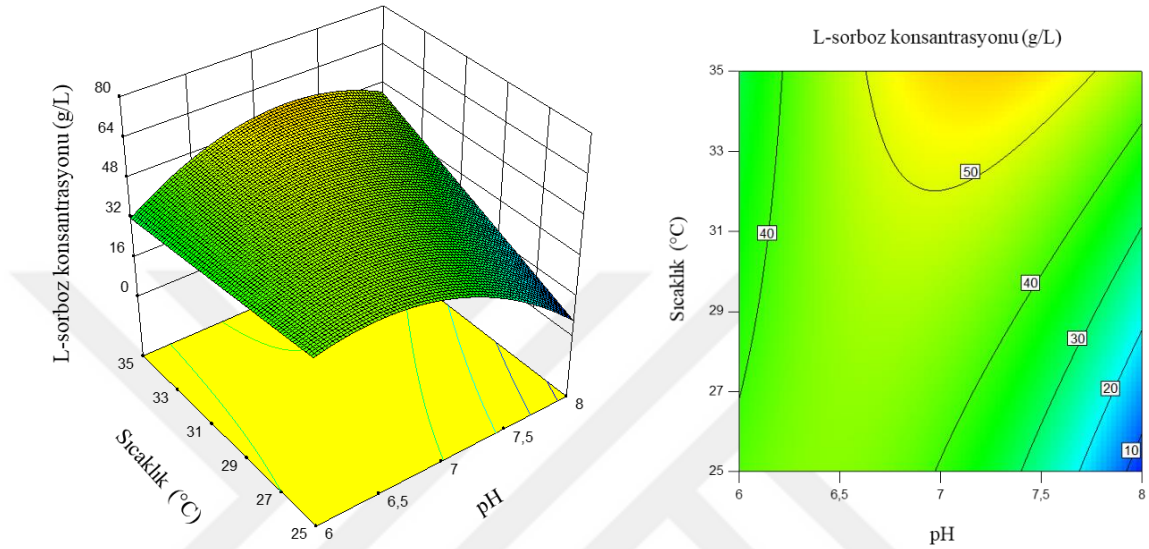
4.1.2.5. D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık, pH-sıcaklık ve çalkalama hızı-sıcaklık interaksiyonlarının etkisi

D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık interaksiyonuna ait grafik (pH 7.00 ve çalkalama hızı 200 rpm) Şekil 4.10'da, pH-sıcaklık interaksiyonuna ait grafik (D-sorbitol konsantrasyonu 130 g/L ve çalkalama hızı 200 rpm) Şekil 4.11'de ve sıcaklık-çalkalama hızı interaksiyonuna ait grafik (D-sorbitol konsantrasyonu 130 g/L ve pH 7.00) ise Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.10. L-sorboz üretimi üzerine D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık interaksiyonunun etkisi

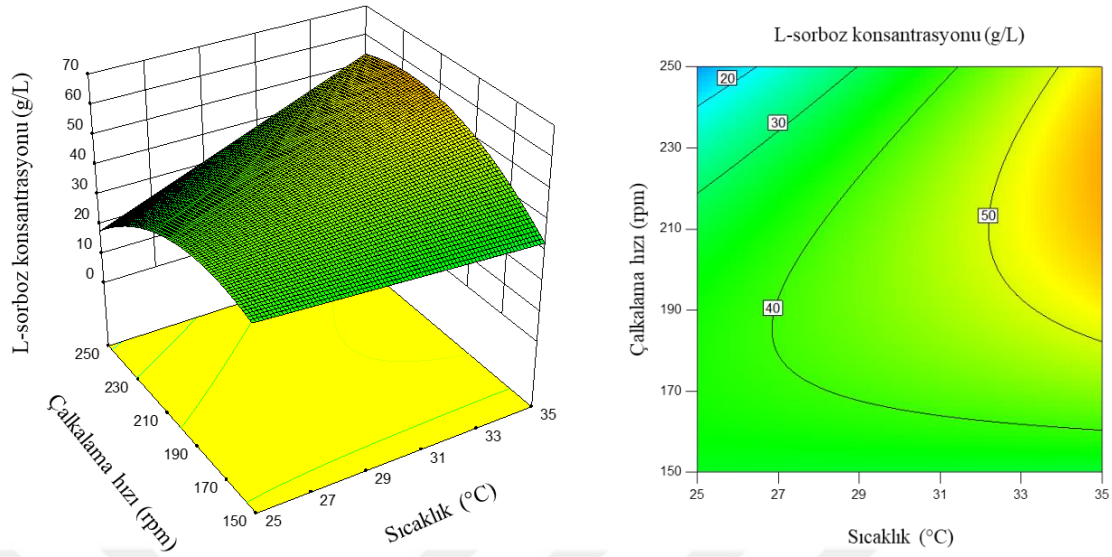
D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık interaksyonu grafiği incelendiğinde; D-sorbitol konsantrasyonu ve sıcaklığın minimum değerlerinde (90 g/L ve 25°C) L-sorboz üretim miktarının düşük olduğu ve D-sorbitol konsantrasyonunun 130 g/L ve sıcaklığın 35°C değerlerinde olması durumunda ise L-sorboz üretim miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir. D-sorbitol miktarının 130 g/L konsantrasyonundan daha yüksek olması durumunda ise sıcaklık artışı ile L-sorboz üretiminin önemli miktarda değişmediği belirlenmiştir.



Şekil 4.11. L-sorboz üretimi üzerine pH değeri-sıcaklık interaksyonunun etkisi

Şekil 4.11 incelendiğinde; pH değerinin en yüksek ve sıcaklığın en düşük olduğu değerlerde (8 ve 25°C) L-sorboz üretim veriminin düşük olduğu ve pH değerinin 7.00 ve sıcaklığın 35°C değerlerinde olması durumunda ise L-sorboz üretim miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık en yüksek değerinde tutulduğunda pH 6.00 ve 8.00 değerleri arasında L-sorboz üretimi açısından önemli bir miktar değişimi olmazken, sıcaklığın 25°C olması durumunda pH 6.00 değerinde elde edilen L-sorboz üretim miktarlarının, pH 8.00 değerinde elde edilen L-sorboz üretim miktarlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.12’de verilen sıcaklık-çalkalama hızı interaksyonu grafiği incelendiğinde ise; sıcaklığın ve çalkalama hızının maksimum değerlerinde (35°C ve 250 rpm) L-sorboz üretim miktarının yüksek olduğu, ancak sıcaklığın 25°C olması durumunda ise çalkalama hızı maksimum değerde olsa dahi L-sorboz üretim miktarının düşük olduğu belirlenmiştir. 25°C sıcaklıkta yaklaşık 200 rpm çalkalama hızına kadar L-sorboz üretim miktarının arttığı ancak bu değerden sonra artan çalkalama hızı ile L-sorboz üretiminin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. L-sorboz üretimi üzerine çalkalama hızı-sıcaklık interaksiyonunun etkisi

4.1.3. Çalkalamalı inkübatörde L-sorboz üretimi için optimum koşulların belirlenmesi

Merkezi kompozit tasarım cevap yüzey yöntemiyle oluşturulan deneme deseninin önerdiği koşullarda 27 farklı fermantasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucunda L-sorboz üretimi için bağımsız değişkenler olarak kullanılan D-sorbitol konsantrasyonu, besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık ve çalkalama hızının üretilen L-sorboz miktarı üzerine etkileri ve en yüksek istenebilirlik değeri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve L-sorboz üretiminin en yüksek miktarda gerçekleştirilebileceği optimum koşullar oluşturulmuştur. Elde edilen optimum fermantasyon koşulları ve bu koşullarda üretilmesi beklenen L-sorboz miktarı (g/L) Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. L-sorbozun optimum üretim koşulları ve bu koşullarda üretilmesi hesaplanan L-sorboz miktarı

Koşullar	D-sorbitol konsantrasyonu (g/L)	Sıcaklık (°C)	pH	Çalkalama hızı	L-sorboz (g/L)	İstenebilirlik (%)
Minimum	90	25	6.00	150	4.69	-
Optimum	127.58	35	7.20	224	57.51	84.00
Maksimum	170	35	8.00	250	67.72	-

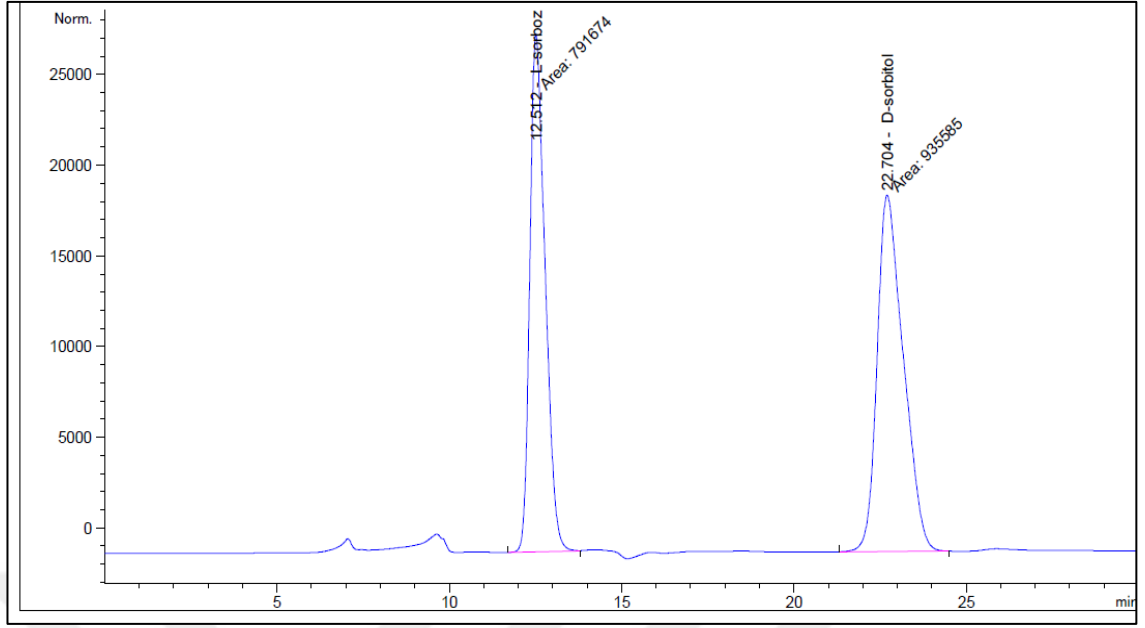
Elde edilen optimum koşulların doğrulanması amacıyla konsantrasyonu 127.58 g/L olan D-sorbitol çözeltisi ile 7.20 başlangıç besiyeri pH değeri, 35°C sıcaklık ve 224 rpm çalkalama hızı koşullarında 2 tekerrürlü olarak üretim gerçekleştirilmiştir. Doğrulama fermantasyonlarında *G. oxydans* hücrelerinin %10 oranında inokülasyonu sonrasında alınan 0. saat örneğinde D-sorbitol konsantrasyonunun ortalama 126.29 g/L olduğu belirlenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen bu üretimlerin 72. saatinde ortalama %42.60 dönüşüm oranı ile 55.01 g/L konsantrasyonunda L-sorboz üretildiği tespit edilmiştir.

Doğrulama fermentasyonlarında fermentasyon işlemi 72. saatten sonra da sürdürülmüş ve üretimin 168. saatinde ortalama %89.95 verim ile 114.81 g/L konsantrasyonunda L-sorboz üretimi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir.

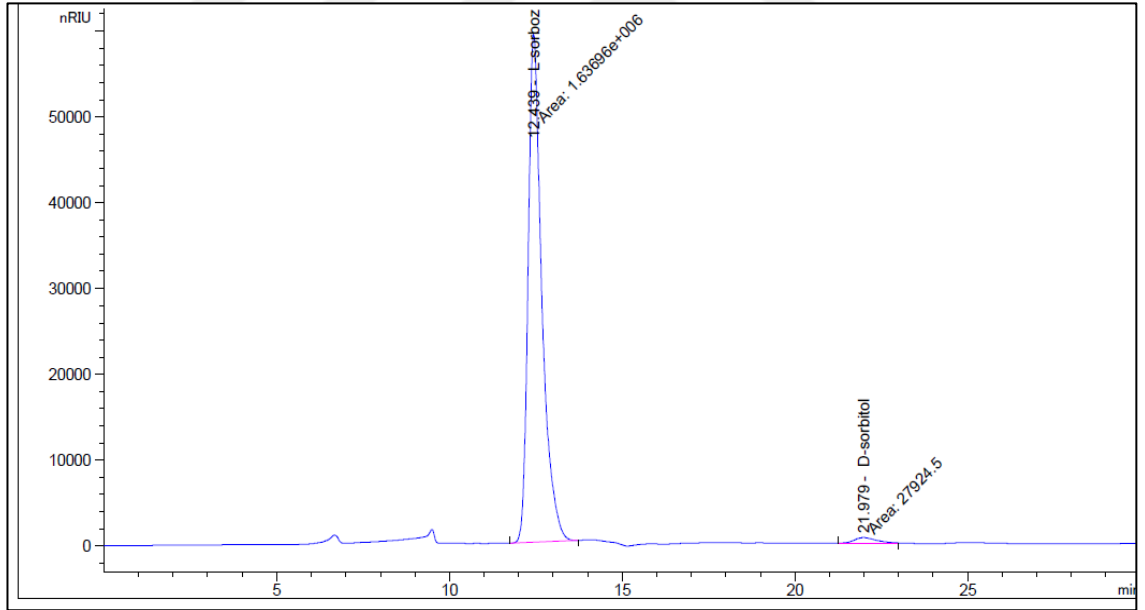
Çalkalamalı inkübatörde optimum koşullarda uygulanan doğrulama fermentasyonlarından elde edilen optik yoğunluk, biyokütle miktarı, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı değerlerine ait analiz sonuçlarının I. ve II. tekerrür verileri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonun 72. saat örneğinde yapılan D-sorbitol ve L-sorboz analizine ait kromatogram Şekil 4.13’te, fermentasyonun 168. saat örneğinde yapılan D-sorbitol ve L-sorboz analizine ait kromatogram Şekil 4.14’te ve doğrulama fermentasyonları süresince yapılan tüm örneklemelerden elde edilen ortalama biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerine ait grafik ise Şekil 4.15’te verilmiştir.

Çizelge 4.7. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonlarına ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri (I. ve II. tekerrür)

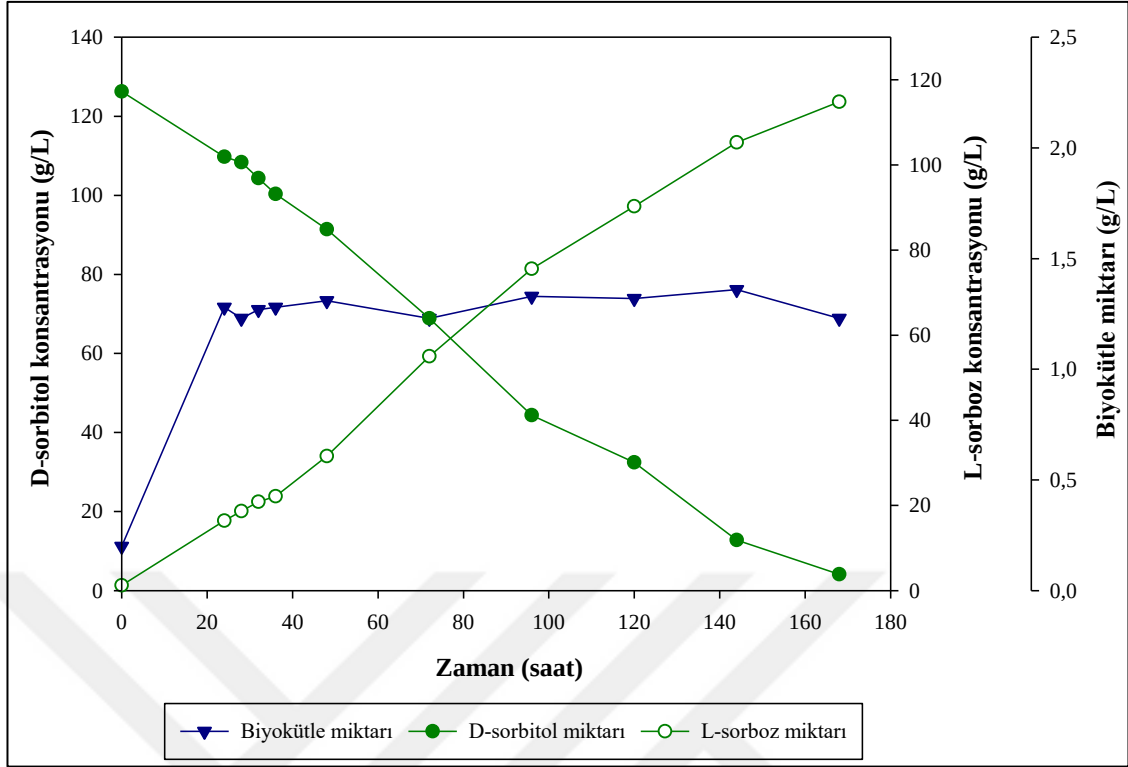
Deneme no	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
Optimum üretim	0	0.26	0.20	126.85	-	1.20	-
		0.26	0.20	125.72	-	1.24	-
	24	1.74	1.27	108.93	13.74	17.33	12.76
		1.77	1.29	110.54	12.47	15.51	11.31
	28	1.65	1.21	107.53	14.86	18.94	14.04
		1.72	1.26	109.25	13.50	18.40	13.60
	32	1.70	1.24	102.41	18.91	21.70	16.22
		1.78	1.30	106.26	15.86	20.05	14.91
	36	1.74	1.27	99.44	21.26	23.64	17.76
		1.76	1.29	101.29	19.79	20.67	15.40
	48	1.82	1.33	90.02	28.72	33.21	25.34
		1.77	1.29	92.78	26.53	29.95	22.75
	72	1.63	1.20	66.78	47.12	56.01	43.38
		1.73	1.26	70.98	43.80	54.02	41.81
	96	1.71	1.25	43.77	65.34	76.01	59.23
		1.91	1.40	44.94	64.42	75.20	58.58
	120	1.73	1.26	31.50	75.06	91.42	71.43
		1.87	1.37	33.32	73.61	89.14	69.62
	144	1.83	1.34	11.51	90.89	106.89	83.68
		1.89	1.38	14.10	88.84	103.68	81.13
	168	1.60	1.17	2.02	98.40	115.68	90.63
		1.75	1.28	1.62	98.72	113.95	89.26



Şekil 4.13. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonundan elde edilen 72. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı



Şekil 4.14. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonundan elde edilen 168. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz analiz kromatogramı



Şekil 4.15. Optimum koşullarda gerçekleştirilen doğrulama fermentasyonundan elde edilen ortalama biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamanla değişim grafiği

4.2. Biyoreaktörde L-sorboz Üretimi için Hava Akım Hızının Optimizasyonu

Araştırmanın ikinci aşamasında, çalkalamalı inkübatörde yapılan optimizasyon denemeleri sonunda elde edilen optimum L-sorboz üretim koşulları (127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, besiyeri başlangıç pH değeri 7.20, 35°C sıcaklık) kullanılarak biyoreaktörde 1.5 L hacmindeki besiyeri ile 3 farklı hava akım hızında (0.5, 1.0 ve 1.5 vvm) 1x3 faktöriyel deneme deseninde 118 saatlik fermentasyon denemeleri yapılmıştır.

Çalkalamalı inkübatörde yapılan denemeler sonucunda optimum çalkalama hızı 224 rpm olarak belirlenmiş fakat yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalkalama hızı parametresinin optimizasyon için önemli ($p > 0.05$) bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple biyoreaktörde gerçekleştirilen deneme fermentasyonlarında literatürde yapılan çalışmalara dayanarak karıştırma hızı 700 rpm olarak uygulanmıştır (Giridhar ve Srivastava 2000; de Wulf vd. 2000; Sugisawa ve Hoshino 2002).

Biyoreaktörde 3 farklı hava akım hızı koşulunda uygulanan fermentasyon denemelerinden elde edilen optik yoğunluk, biyokütle miktarı, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı değerlerine ait analiz sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Biyoreaktör denemelerine ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri

Hava hızı (vvm)	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₆₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
0.5	0.	0.29	0.22	126.69	-	0.15	-
	3.	1.48	1.08	125.84	0.67	0.15	0.00
	9.	3.24	2.37	125.60	0.86	0.17	0.01
	24.	3.55	2.59	123.13	2.81	0.17	0.01
	48.	3.22	2.35	122.44	3.35	0.17	0.01
	72.	3.40	2.48	122.82	3.05	0.24	0.06
	95.	4.07	2.97	63.91	49.55	57.08	44.93
	97.	4.20	3.06	48.25	61.92	73.13	57.60
	100.	4.38	3.20	27.30	78.45	93.20	73.45
	103.	4.52	3.29	12.13	90.43	108.11	85.21
	106.	4.84	3.53	3.85	96.96	115.29	90.88
	109.	4.81	3.51	3.24	97.44	116.31	91.69
	118.	4.48	3.27	0.24	99.81	120.86	95.28
1.0	0.	0.27	0.20	129.09	-	0.16	-
	3.	1.43	1.05	129.08	1.53	0.18	0.01
	9.	3.21	2.34	128.37	2.08	0.21	0.04
	24.	3.33	2.43	127.51	2.73	0.34	0.13
	48.	3.42	2.50	126.87	3.22	0.46	0.23
	72.	3.38	2.47	125.62	4.17	0.99	0.64
	95.	4.19	3.06	60.70	53.70	66.10	51.08
	97.	4.35	3.17	45.44	65.33	82.23	63.57
	100.	4.46	3.25	28.48	78.28	97.58	75.46
	103.	4.46	3.25	15.69	88.03	107.63	83.25
	106.	4.61	3.36	6.97	94.68	117.89	91.19
	109.	4.85	3.54	1.40	98.94	118.65	91.79
	118.	4.53	3.30	0.61	99.53	125.19	96.85
1.5	0.	0.27	0.21	128.38	-	1.13	-
	3.	0.75	0.55	127.79	0.46	1.19	0.04
	9.	1.39	1.02	126.66	1.34	1.33	0.15
	24.	2.70	1.97	127.41	0.75	1.35	0.17
	48.	3.25	2.37	126.82	1.21	1.54	0.32
	72.	3.39	2.47	125.15	2.51	2.56	1.11
	95.	3.69	2.69	120.86	5.86	7.16	4.69
	97.	3.00	2.19	118.90	7.38	10.05	6.95
	100.	3.35	2.45	105.95	17.47	20.43	15.03
	103.	3.64	2.65	101.70	20.78	26.23	19.55
	106.	3.94	2.87	62.72	51.14	65.01	49.76
	109.	3.94	2.87	7.99	93.78	118.42	91.36
	118.	3.95	2.88	0.96	99.26	126.42	97.59

Biyoreaktörde 3 farklı hava akım hızı koşulunda uygulanan fermantasyon denemelerinden elde edilen optik yoğunluk ve biyokütle miktar verilerine uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.9’da ve varyasyon kaynakları ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ise Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermantasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermantasyon zamanının, optik yoğunluk ve biyokütle miktar verileri üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	SD	Optik Yoğunluk (OD ₁₀₀)		Biyokütle miktarı (g/L)	
		KO	F	KO	F
Hava akım hızı (vvm)	2	4.37	1657.63**	2.31	1616.91**
Zaman (saat)	12	10.02	3796.40**	5.29	3709.15**

** $p < 0.01$

Çizelge 4.10. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermantasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermantasyon zamanının, optik yoğunluk ve biyokütle miktar verileri üzerine etkisine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Hava akım hızı	N	Optik yoğunluk (OD ₁₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)
0.5	26	3.58 ^a ± 0.26	2.61 ^a ± 0.19
1.0	26	3.58 ^a ± 0.26	2.61 ^a ± 0.19
1.5	26	2.87 ^b ± 0.24	2.09 ^b ± 0.18
Zaman (saat)	N		
0.	6	0.28 ^m ± 0.00	0.21 ^m ± 0.00
3.	6	1.22 ^l ± 0.15	0.89 ^l ± 0.11
9.	6	2.62 ^k ± 0.39	1.91 ^k ± 0.28
24.	6	3.20 ^j ± 0.16	2.33 ^j ± 0.12
48.	6	3.30 ⁱ ± 0.04	2.41 ⁱ ± 0.03
72.	6	3.39 ^h ± 0.03	2.48 ^h ± 0.02
95.	6	3.98 ^f ± 0.10	2.91 ^f ± 0.07
97.	6	3.85 ^g ± 0.27	2.81 ^g ± 0.20
100.	6	4.07 ^e ± 0.23	2.97 ^e ± 0.16
103.	6	4.20 ^d ± 0.18	3.06 ^d ± 0.13
106.	6	4.46 ^b ± 0.18	3.25 ^b ± 0.13
109.	6	4.53 ^a ± 0.19	3.31 ^a ± 0.14
118.	6	4.32 ^c ± 0.12	3.15 ^c ± 0.08

Varyans analizi sonuçlarına göre optik yoğunluk ve biyokütle miktar verileri üzerinde farklı hava akım hızlarının ve fermantasyon zamanının istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bir etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10’da verilen Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları incelendiğinde 0.5 ve 1.0 vvm hava akım hızlarında optik yoğunluk ve biyokütle miktar verileri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı, 1.5 vvm hava akım hızında ise ortalama optik yoğunluk ve biyokütle miktar verilerinin diğer hava akım hızlarından yaklaşık %20 kadar düşük olduğu ve istatistiksel olarak bunun önemli olduğu belirlenmiştir.

Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları, fermantasyon zamanına göre incelendiğinde ise ortalama optik yoğunluk ve biyokütle miktarının ilk 24 saat yüksek hızda arttığı, bu saatten sonra 109. saate kadar düşük hızda artmaya devam ettiği ve daha sonra ise bu değerlerin düşmeye başladığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen deneme şartlarında optik yoğunluk ve biyokütle miktarlarının fermantasyonun 109. saatinde maksimum seviyeye ulaştığı belirlenmiş olup, *G. oxydans* mikroorganizmasının maksimum değerinde başlangıca göre optik yoğunluk değerinin 16.18 kat ve biyokütle miktarının ise 15.76 kat arttığı belirlenmiştir.

Biyoreaktörde 3 farklı hava akım hızı koşulunda uygulanan fermantasyon denemelerinden elde edilen D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerine uygulanan varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11’de ve varyasyon kaynakları ortalamalarına ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları ise Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermantasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermantasyon zamanının, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	SD	D-sorbitol miktarı (g/L)		L-sorboz miktarı (g/L)	
		KO	F	KO	F
Hava akım hızı (vvm)	2	6871.42	2710.77**	5243.25	2894.70**
Zaman (saat)	12	15089.68	5952.87**	14158.09	7816.43**

** $p < 0.01$

Varyans analizi sonuçlarına göre D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri üzerinde farklı hava akım hızlarının ve fermantasyon zamanının istatistiksel olarak önemli ($p < 0.01$) bir etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.12’de verilen Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları incelendiğinde biyoreaktör fermantasyonlarında uygulanan tüm hava akım hızlarında ortalama D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri arasında istatistiksel olarak farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Fermantasyonda uygulanan 0.5 ve 1.0 vvm hava hızlarında L-sorboz üretiminin belirgin bir şekilde 72. saatte başlayarak fermantasyon sonunda yaklaşık ortalama 50 ila 55 g/L kadar bir seviyeye ulaştığı, 1.5 vvm hava hızında ise ortalama L-sorboz üretim miktarının yaklaşık 30 g/L kadar olduğu tespit edilmiş olup, bu değer yüksek hava hızında düşük olarak tespit edilmesinin bu hava hızında L-sorboz üretiminin daha geç başlamasından (95. saatte) kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12. Biyoreaktörde gerçekleştirilen fermantasyonlarda farklı hava akım hızlarının ve fermantasyon zamanının, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verileri üzerine etkisine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Hava akım hızı	N	D-sorbitol miktarı (g/L)	L-sorboz miktarı (g/L)
0.5	26	69.65 ^c ± 10.70	52.70 ^b ± 10.28
1.0	26	71.22 ^b ± 10.94	55.22 ^a ± 10.57
1.5	26	98.56 ^a ± 8.75	29.45 ^c ± 8.64
Zaman (saat)	N		
0.	6	128.05 ^a ± 0.97	0.48 ^h ± 0.21
3.	6	127.57 ^{ab} ± 0.75	0.51 ^h ± 0.22
9.	6	126.87 ^{abc} ± 0.72	0.57 ^h ± 0.24
24.	6	126.02 ^{bcd} ± 1.14	0.62 ^h ± 0.23
48.	6	125.38 ^{cd} ± 0.97	0.73 ^h ± 0.27
72.	6	124.53 ^d ± 0.86	1.26 ^h ± 0.43
95.	6	81.82 ^e ± 12.37	43.45 ^g ± 11.60
97.	6	70.87 ^f ± 15.20	55.14 ^f ± 14.36
100.	6	53.91 ^g ± 16.46	70.41 ^e ± 15.83
103.	6	43.17 ^h ± 18.53	80.66 ^d ± 17.22
106.	6	24.51 ⁱ ± 12.10	99.40 ^c ± 10.91
109.	6	4.21 ^j ± 1.25	117.79 ^b ± 1.10
118.	6	0.60 ^k ± 0.13	124.16 ^a ± 1.16

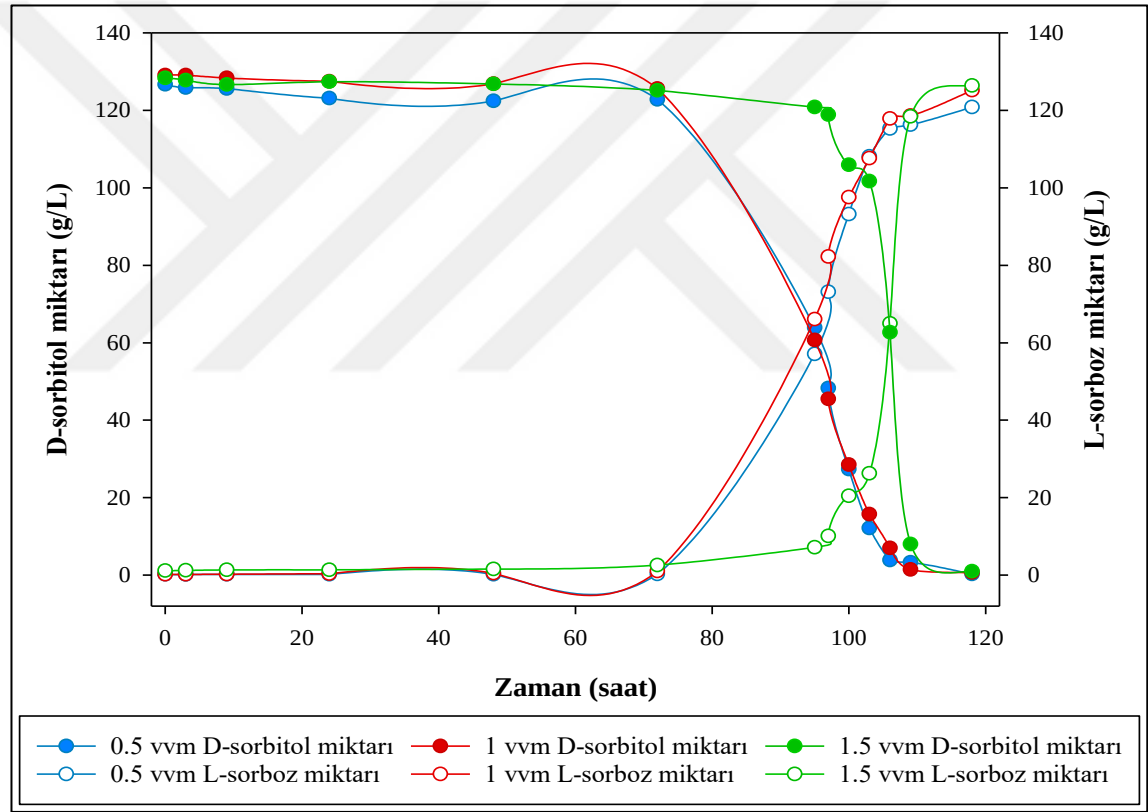
Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları, fermantasyon zamanına göre incelendiğinde ise; fermantasyonun ilk 72 saatinde L-sorboz üretiminin oldukça düşük miktarlarda (<%2) gerçekleştiği ve aralarında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir. Ancak 72. saatten sonra ise L-sorboz üretiminin oldukça yüksek bir hızla gerçekleşmeye başladığı ve örnekleme zamanına göre aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. L-sorboz üretiminin 72. saatten sonra gerçekleşmeye başlamasının mikroorganizmanın D-sorbitolden L-sorboz üretmek için gerekli enzim ve kofaktörleri sentezleme zamanından ve enzimin aktivite gösterebilmesi için fermantasyon koşullarının ilgili zamanda uygun haline gelmesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

White ve Claus (1982) tarafından *G. oxydans* mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada D-sorbitol içeren besiyeri ortamında fermantasyon süresi ilerledikçe *G. oxydans* hücrelerinin polar bölgelerinde yeni bir intrasitoplazmik membran olduğu, buna bağlı olarak hücrelerin ribozom sayısının ve sitoplazmik membrana bağlı SLDH miktarının arttığı ve artan SLDH enzimi ile doğrusal olarak L-sorboz üretiminin hızlandığı bildirilmiştir.

Fermantasyonlarda başlangıçta zenginleştirme besiyerinin inokülasyonu ile ortalama 0.48 g/L miktarında olan L-sorbozun, fermentasyonun son saati olan 118. saatinde 124.16 g/L miktarına ulaştığı belirlenmiştir. Fermantasyonlarda başlangıçta ortalama 128.05 g/L miktarında olan D-sorbitolün ise neredeyse tamamının kullanıldığı, fermentasyonun 118. saatinde ortalama 0.60 g/L D-sorbitol kaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle araştırmada uygulanan şartlarda fermentasyon süresi uzun olmakla birlikte sistemdeki neredeyse tüm D-sorbitolün L-sorboza dönüştürüldüğü belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, D-sorbitolün fermentasyon ile L-sorboza oksidasyonu işleminde elde edilen verimin çoğunlukla %100'e yakın olduğu ancak *G. oxydans* mikroorganizmasının oksidasyon hızının oldukça düşük olması nedeniyle bu durumun reaksiyon süresinin uzamasına neden olduğu bildirilmiştir (de Wulf vd. 2000).

Biyoreaktörde tüm hava akım hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait zamana bağlı D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerine ait grafik Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. Biyoreaktörde tüm hava akım hızlarında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarının zamanla değişim grafiği

Şekil 4.16'da farklı hava hızlarındaki L-sorboz üretimleri fermentasyon zamanına göre incelendiğinde 0.5 ve 1.0 vvm hava akım hızında 72. ila 95. saat arasında belirgin bir şekilde üretime başladığı, 1.5 vvm hava akım hızında ise belirgin üretimin 97. saatte itibaren başladığı ve diğerlerine göre daha yüksek hızla ilerlediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda ilk iki hava hızı şartında belirgin üretim başladıktan sonra 46 saat içinde fermentasyon sona ererken, 1.5 vvm hava hızı şartında ise belirgin üretim başladıktan sonra 21 saat içinde fermentasyon sona ermiştir.

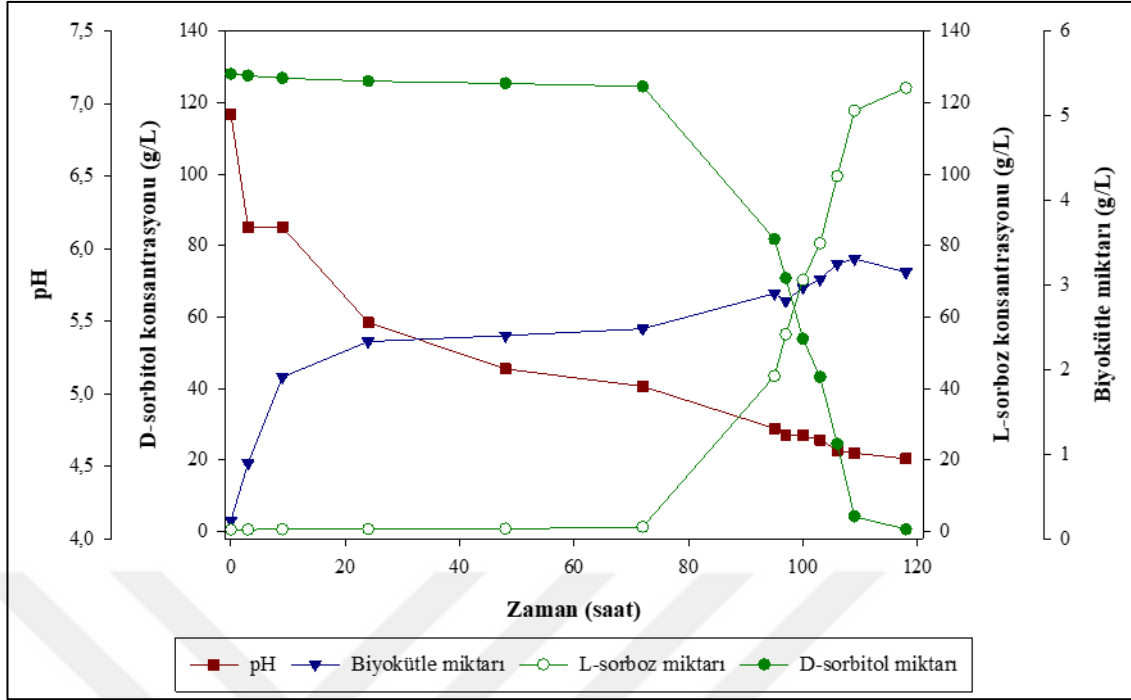
Biyoreaktörde gerçekleştirilen 3 farklı hava akım hızındaki üretim denemelerine ait veriler kullanılarak fermentasyonun kinetik parametreleri hesaplanmış ve Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Biyoreaktör denemelerine ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Hava hızı (vvm)		
	0.5	1	1.5
D-sorbitol tüketimi (g/L)	126.45	128.48	127.42
L-sorboz üretimi (g/L)	120.71	125.03	125.29
D-sorbitol kullanım oranı (%)	99.81	99.53	99.25
L-sorboz verimi (%)	95.46	97.31	98.33
Maksimum D-sorbitol tüketim hızı (g/L/sa)	3.50	3.50	7.47
Maksimum L-sorboz üretim hızı (g/L/sa)	3.39	3.44	7.37
Spesifik üreme hızı (1/sa)	0.25	0.25	0.17

Fermentasyon üretimlerine ait kinetik parametreler incelendiğinde *G. oxydans* hücrelerinin 3 farklı hava akım hızında da besiyerinin içerdiği D-sorbitolün neredeyse tamamını kullandığı ve ortalama D-sorbitol kullanım oranının %99.53 olduğu tespit edilmiştir. Maksimum D-sorbitol tüketim hızının 0.5, 1.0 ve 1.5 vvm hava akım hızında gerçekleştirilen fermentasyonlarda sırasıyla 3.50, 3.50 ve 7.47 g/L/sa olduğu; maksimum L-sorboz üretim hızının ise sırasıyla 3.39, 3.44 ve 7.37 g/L/sa olduğu tespit edilmiştir. Fermentasyonlar sonucunda hesaplanan ortalama L-sorboz üretim verimi %97.03 olup, en yüksek L-sorboz üretim verimi ise %98.33 ile 1.5 vvm hava akım hızında gerçekleştirilen fermentasyondan elde edilmiştir. *G. oxydans* mikroorganizmasının spesifik üreme hızı incelendiğinde ise 0.5 ve 1.0 vvm hava akım hızında 0.25 sa⁻¹ olarak, 1.5 vvm hava akım hızında ise 0.17 sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Biyoreaktör ölçeğindeki tüm fermentasyon denemeleri pH değeri sabit tutulmadan gerçekleştirilmiş ve fermentasyon süresince ortamın pH değeri takip edilmiştir. Elde edilen pH verilerine göre fermentasyon sırasında *G. oxydans* hücrelerinin faaliyeti sonucu ortamın pH değerinin düşmesinden mikroorganizmanın gelişim hızının, D-sorbitol tüketim ve L-sorboz üretim hızının etkilendiği tespit edilmiştir. Biyoreaktörde 3 farklı hava hızında yapılan fermentasyon denemelerinden elde edilen ortalama pH, biyokütle, D-sorbitol tüketim ve L-sorboz üretim miktarlarının zamana göre değişimine ait grafik Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Farklı hava akım hızlarında biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm fermantasyon denemelerinden elde edilen ortalama pH, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamana bağlı değişim grafiği

Tüm fermantasyon denemelerinde başlangıç pH değeri ortalama 6.93 iken, fermantasyon sonunda ortalama 4.55 değerine düştüğü tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen 3 farklı fermantasyon denemesinde de ortamın pH değerinin ilk 24 saat içerisinde pH yaklaşık 7 değerinden, yaklaşık 5.5 değerine hızla düştüğü ve aynı zamanda biyokütle miktarının da eksponensiyel bir artış gösterdiği, pH değeri 5.5 değerinin altına düştüğünde ise biyokütle miktarında belirgin bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda Şekil 4.16 incelendiğinde tüm fermantasyon denemelerinde L-sorboz üretiminin ortamın pH değeri 5'in altına düştüğünde başladığı tespit edilmiştir. *G. oxydans* mikroorganizmasının D-sorbitolden L-sorboz üretimini kataliz etmesinde görev alan SLDH enzimini sentezlemesi ve enzimin aktivite gösterebilmesi için ortam pH değerinin etkili olduğu ve bu nedenle fermantasyon denemelerinde pH değeri 5'in altına düştüğü zaman L-sorboz üretiminin başladığı değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalarla *G. oxydans* mikroorganizmasının gelişim gösterebildiği pH aralığının 3.5 ile 8 olduğu, mikroorganizmanın biyokütle miktarının optimum gelişim aralığının ise 5.5 ile 7 olduğu bildirilmiştir. *G. oxydans* hücrelerinin membran yapısında veya sitoplazmasında lokalize olmuş çeşitli enzimlerinin aktivite gösterdiği optimum pH aralığı ise mikroorganizmanın optimum gelişim gösterdiği pH değerinden farklı olabilmektedir (Macauley vd. 2001). Yapılan bazı çalışmalarla *G. oxydans* hücrelerinde bulunan ve D-sorbitolün L-sorboza oksidasyonunu sağlayan SLDH enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum pH değerinin 4.5 ile 5 arasında olduğu bildirilmiştir (Shinagawa vd. 1982; Sugisawa ve Hoshino 2002).

Yapılan bir çalışmada, *G. oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak başlangıç pH değeri 6.4 olan %10 D-sorbitol içeren besiyeri ile 30°C sıcaklıkta, 700 rpm karıştırma hızında ve 1.0 vvm hava akım hızında fermentasyon denemesi pH değeri kontrol edilmeden gerçekleştirilmiş ve fermentasyon ortamının pH değeri 5'e düşene kadar *G. oxydans* hücrelerinin logaritmik olarak geliştiği, pH değeri 5'in altına düştüğünde ise hücrelerin sabit bir gelişim gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda pH değerinin düşüşü ile *G. oxydans* hücrelerinin gelişimi durağan hale geldiğinde L-sorboz üretim hızının belirgin şekilde arttığı fakat fermentasyon ortamı pH 6.4 değerinde sabit tutulduğu zaman L-sorboz üretim hızının düştüğü ve fermentasyon süresinin 4 saat uzadığı bu nedenle fermentasyonun pH kontrolsüz ortamda gerçekleştirilmesinin daha uygun olduğu bildirilmiştir (de Wulf vd. 2000).

4.2.1. Biyoreaktörde L-sorboz üretimi için optimum hava hızının belirlenmesi

Biyoreaktörde 127.58 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunda, pH 7.2 başlangıç pH değerinde, 35°C sıcaklıkta, 700 rpm karıştırma hızı ve 3 farklı hava hızında (0.5, 1.0 ve 1.5 vvm) fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Optimum hava hızının belirlenmesinde maksimum L-sorboz üretim verimi ve maksimum L-sorboz üretim hızı verileri kullanılmıştır. Bu iki değer 1.5 vvm hava hızında maksimize olduğu (Çizelge 4.13) için biyoreaktörde gerçekleştirilen L-sorboz üretimi için fermentasyonda kullanılması gereken optimum hava akım hızının 1.5 vvm olması gerektiği değerlendirilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, *G. oxydans* mikroorganizması kullanılarak D-sorbitolün L-sorboza dönüştürülmesi işleminin, hücrelerin sitoplazmik membranında bulunan SLDH enzimi ve hücresel solunum zinciri ile bağlantılı bir oksidasyon reaksiyonu olması nedeniyle L-sorboz üretiminde terminal elektron alıcısı olan oksijen miktarının önemli olduğu bildirilmiştir (Kim vd.1999; Zhou vd. 2019). Bu nedenle bu suş için fermentasyon ortamına yeterli oksijen beslemesinin sürdürülebilmesi için çoğunlukla 1.5 ila 2.0 vvm gibi yüksek hava akım hızlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Elenkov vd. 1989).

Biyoreaktör denemeleri ile belirlenen 1.5 vvm optimum hava akım hızı ve çalkalamalı inkübatör denemeleri sonucunda istatistiksel olarak önemli bulunan optimum koşullar (127.58 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu, 7.2 başlangıç pH değeri ve 35°C sıcaklık) kullanılarak biyoreaktörde 1.5 L çalışma hacminde, 700 rpm karıştırma hızında bir doğrulama fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bunun yanı sıra farklı hava akım hızlarında gerçekleştirilen biyoreaktör denemelerinde zamana bağlı pH değişim verileri değerlendirildiğinde; fermentasyon ortamının pH değeri 7 ila 5 aralığındayken L-sorboz üretiminin gerçekleşmediği, L-sorboz üretiminin ortamının pH değeri 5 değerinin altına düştüğü zaman başladığı tespit edilmiştir. Bu nedenle belirlenen optimum koşullar besiyeri başlangıç pH değeri 5 olan ortamda da denenmiştir.

Optimum koşullarda besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan doğrulama fermentasyonlarından elde edilen optik yoğunluk, biyokütle miktarı, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı değerlerine ait analiz sonuçları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

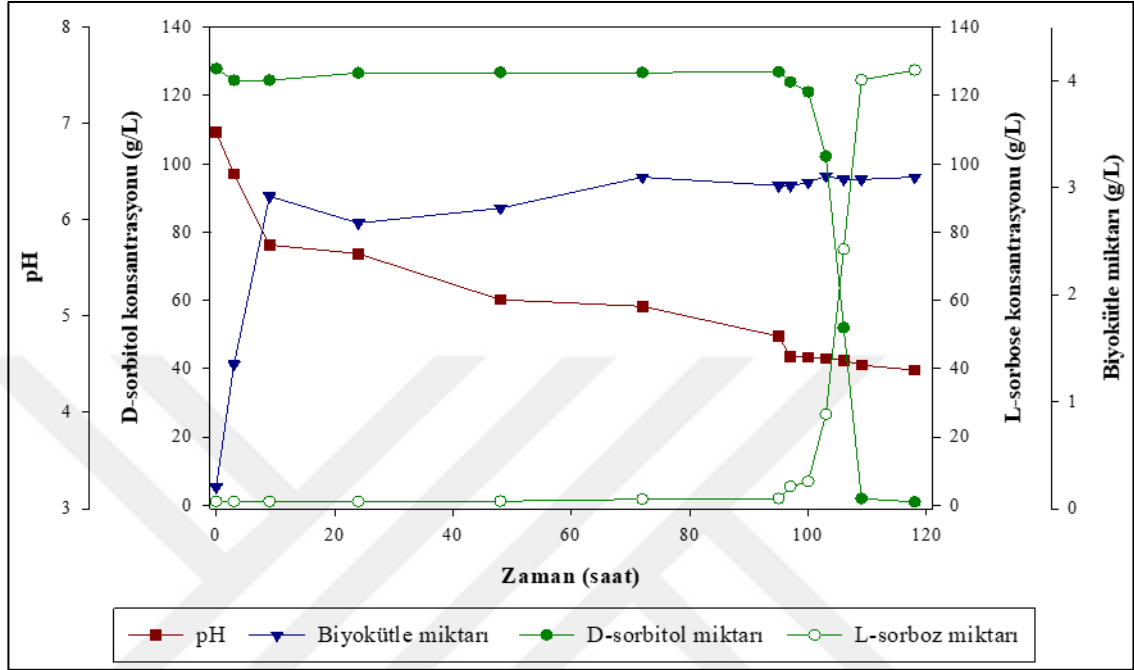
Elde edilen analiz sonuçlarına göre optimum koşullarda uygulanan besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermentasyonda başlangıçta 0.20 g/L olan biyokütle miktarının, fermentasyon sonu olan 118. saatte 3.10 g/L miktarına ulaştığı ve yaklaşık 15.24 kat arttığı; besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermentasyonda ise başlangıçta 0.12 g/L olan biyokütle miktarının, fermentasyonun sonu olan 56. saatte 1.73 g/L miktarına ulaştığı ve yaklaşık 15.59 kat arttığı belirlenmiştir. Her iki fermentasyonda da D-sorbitolün neredeyse tamamının tüketildiği ve besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermentasyonda %98.89 dönüşüm oranı ile 127.43 g/L L-sorboz üretildiği, besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermentasyonda ise %98.94 dönüşüm oranı ile 127.07 g/L L-sorboz üretildiği tespit edilmiştir.

Farklı olarak besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan doğrulama fermentasyonunun 118 saat sürdüğü, besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermentasyonun ise 56 saat gibi daha kısa bir sürede tamamlandığı belirlenmiştir. Fermentasyon ortamının pH değerinin, mikroorganizmanın enzim üretimini desteklemesinden ve bu pH değerinin L-sorboz üretimini kataliz eden SLDH enziminin aktivitesini artırarak L-sorboz üretiminin daha erken başlayıp, fermentasyonun daha kısa sürede tamamlanmasını sağladığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.14. Optimum doğrulama fermentasyonlarına ait optik yoğunluk, biyokütle, D-sorbitol miktarı, D-sorbitol tüketim oranı, L-sorboz miktarı ve L-sorboz üretim oranı verileri

Başlangıç pH değeri	Zaman (saat)	Optik yoğunluk (OD ₁₀₀)	Biyokütle miktarı (g/L)	D-sorbitol miktarı (g/L)	D-sorbitol tüketimi (%)	L-sorboz miktarı (g/L)	L-sorboz üretimi (%)
7.2	0	0.26	0.20	127.90		1.07	
	3	1.84	1.35	124.48	2.67	1.09	0.02
	9	4.00	2.92	124.48	2.67	1.09	0.02
	24	3.66	2.67	126.64	0.99	1.06	0.00
	48	3.86	2.81	126.77	0.88	1.15	0.06
	72	4.26	3.10	126.71	0.93	1.78	0.56
	95	4.15	3.02	126.93	0.76	1.96	0.69
	97	4.15	3.02	123.93	3.11	5.49	3.46
	100	4.18	3.05	121.13	5.29	7.00	4.63
	103	4.26	3.11	102.21	20.08	26.60	19.96
	106	4.23	3.08	51.99	59.35	75.04	57.83
	109	4.23	3.08	1.97	98.46	124.59	96.58
	118	4.25	3.10	0.92	99.28	127.43	98.89
5.0	0	0.16	0.12	127.57	-	0.86	-
	3	0.33	0.25	126.81	0.60	0.97	0.09
	9	0.66	0.49	125.29	1.31	1.98	0.88
	12	0.83	0.61	125.14	1.90	3.24	1.99
	24	1.73	1.27	110.65	13.27	10.14	7.28
	28	2.19	1.60	103.45	18.91	25.47	19.30
	32	2.13	1.56	79.22	37.90	48.80	37.58
	36	2.12	1.55	47.23	62.98	74.04	57.37
	40	2.15	1.57	26.17	79.48	93.79	72.85
	48	2.27	1.66	9.93	92.21	113.03	87.93
	52	2.26	1.65	3.83	97.00	118.55	92.26
	56	2.37	1.73	0.35	99.73	127.07	98.94

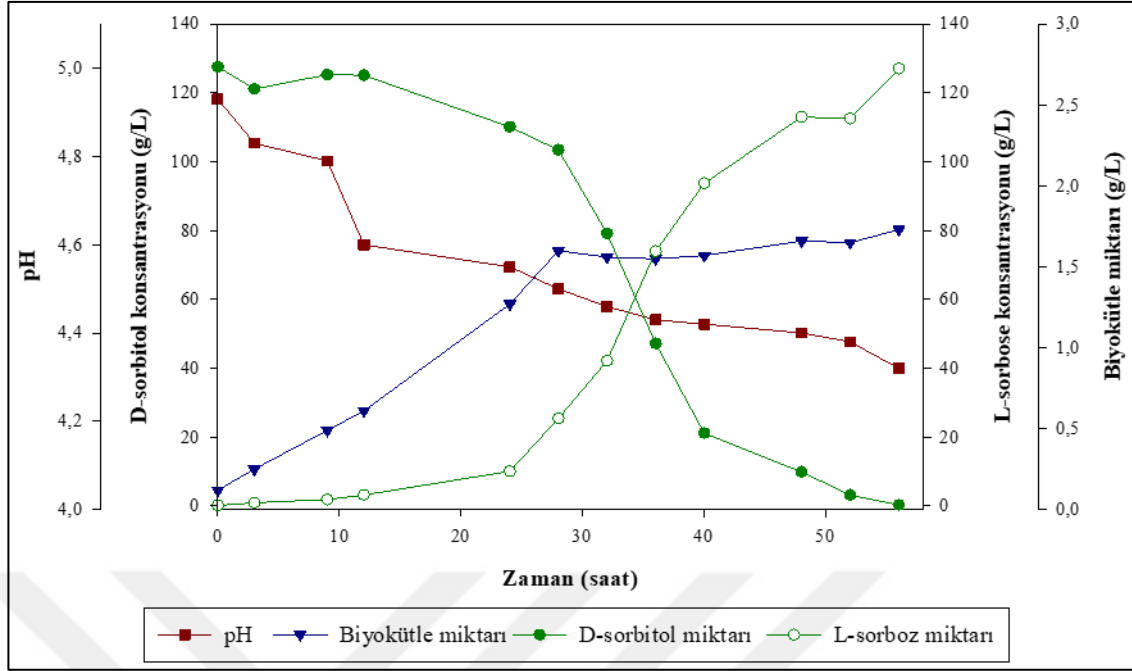
Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermantasyon süresince yapılan tüm örneklemelerle elde edilen biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz (g/L) miktar verilerine ait grafik Şekil 4.18’de, besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermantasyon süresince yapılan tüm örneklemelerle elde edilen biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz (g/L) miktar verilerine ait grafik ise Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.18. Optimum koşullarda biyoreaktörde besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan doğrulama fermantasyonunda pH, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamanla değişim grafiği

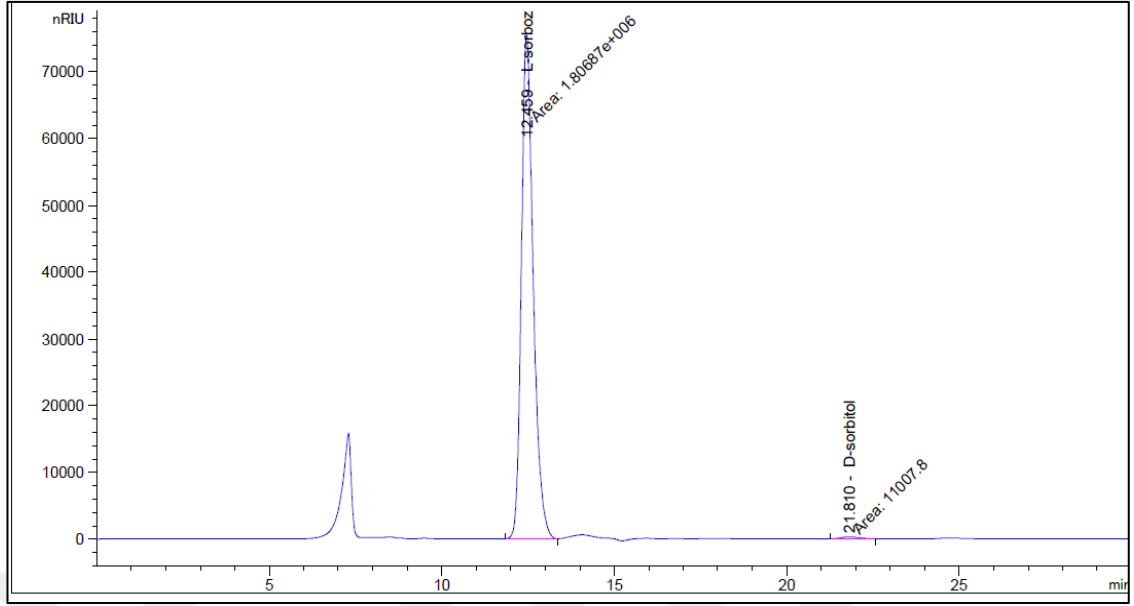
Şekil 4.18 ve Şekil 4.19 incelendiğinde besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermantasyonda belirgin L-sorboz üretimi 95. saatte fermantasyon ortamının pH değeri 5.0 değerinin altına düştüğünde başladığı, besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermantasyonda ise 9. saatten itibaren L-sorboz üretiminin başladığı belirlenmiştir. Ayrıca başlangıç pH değeri 5.0 olan fermantasyonda biyokütle gelişiminin logaritmik olarak arttığı ilk 28 saatte L-sorboz üretiminin yavaş ilerlediği, biyokütle gelişiminin durağan hale geldiği 28. saatten itibaren ise L-sorboz üretim hızının arttığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada D-sorbitol bulunan besiyeri ortamında fermantasyon süresince *G. oxydans* hücrelerinde sonradan oluşan intrasitoplazmik membranın, mikrobiyal çoğalma durağan halde ilerlemeye başladığında oluşmaya başladığı ve yeni oluşan intrasitoplazmik membran ile membrana bağlı SLDH enziminin miktarının da arttığı belirlenmiştir. Bu nedenle durağan fazdaki *G. oxydans* hücrelerinin, logaritmik fazda gelişen hücrelere kıyasla L-sorboz üretim hızının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (White ve Claus 1982).

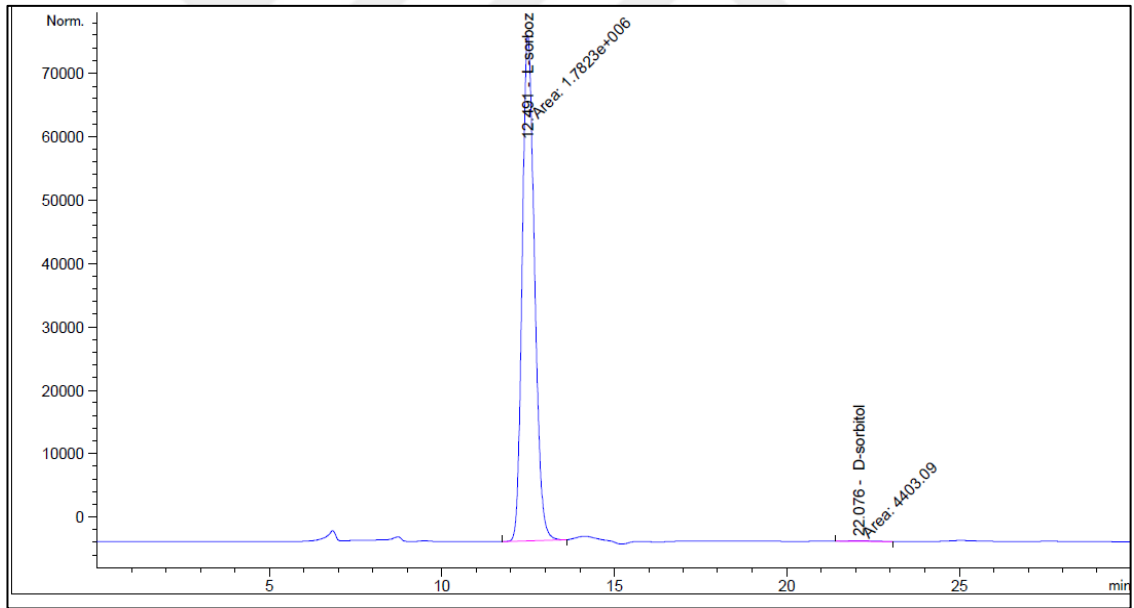


Şekil 4.19. Besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan doğrulama fermentasyonunda pH, biyokütle, D-sorbitol ve L-sorboz miktar verilerinin zamanla değişim grafiği

G. oxydans ile D-sorbitolün oksidasyonu sırasında çoğunlukla 2-keto-L-gulonik asit (2-KLG) olmak üzere bunun yanı sıra glukonik asit, 5-keto-D-glukonik asit, fruktoz, 5-ketofruktoz, L-idonik asit ve asetik asit gibi bazı yan ürünler oluşabilmektedir (Macauley-Patrick vd. 2005). Biyoreaktörde optimum koşullarda iki farklı başlangıç pH değerinde gerçekleştirilen üretimlerde ise yan ürün olarak bir miktar 2-KLG bileşiğinin oluştuğu tespit edilmiştir. Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermentasyondan elde edilen 118. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarına ait analiz kromatogramı Şekil 4.20’de, besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermentasyondan elde edilen 56. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarına ait analiz kromatogramı ise Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermantasyondan elde edilen 118. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarına ait analiz kromatogramı



Şekil 4.21. Besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan fermantasyondan elde edilen 56. saat örneğine ait D-sorbitol ve L-sorboz miktarlarına ait analiz kromatogramı

Şekil 4.20 ve Şekil 4.21 incelendiğinde iki farklı pH değeri koşulunda başlatılan fermantasyonların sonunda D-sorbitolün neredeyse tamamının tüketilip, büyük miktarda L-sorboza dönüştürüldüğü fakat her iki koşulda da yan ürün olarak 2-KLG olduğu tahmin edilen bir miktar bileşiğin oluştuğu görülmektedir. Özellikle besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 (Şekil 4.21) olan fermantasyon koşulunda oluşan yan ürünün, başlangıç pH değeri 7.2 (Şekil 4.20) olan fermantasyona göre daha düşük miktarda oluştuğu tespit edilmiştir.

Biyoreaktörde optimum koşullarda iki farklı başlangıç pH değerinde gerçekleştirilen üretimlere ait veriler kullanılarak kinetik parametreler hesaplanmış ve Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. Biyoreaktörde optimum koşullarda iki farklı başlangıç pH değerinde gerçekleştirilen üretimlere ait kinetik parametreler

Kinetik Parametreler	Besiyeri başlangıç pH değeri	
	7.20	5.00
D-sorbitol tüketimi (g/L)	126.98	127.22
L-sorboz üretimi (g/L)	126.36	126.21
D-sorbitol kullanım oranı (%)	99.28	99.73
L-sorboz verimi (%)	99.51	99.21
Maksimum D-sorbitol tüketim hızı (g/L/sa)	8.72	6.63
Maksimum L-sorboz üretim hızı (g/L/sa)	8.54	6.07
Spesifik üreme hızı (1/sa)	0.27	0.10
Fermantasyon süresi (saat)	118	56

Biyoreaktörde optimum koşullarda iki farklı başlangıç pH değerinde gerçekleştirilen üretimlere ait kinetik parametreler incelendiğinde pH değeri 7.2 olan denemenin kinetik verilerinin pH değeri 5 olan denemeye göre bir miktar yüksek olmakla birlikte fermantasyon süresinin 118 saat gibi oldukça uzun bir süre olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak 127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonunda, 35°C sıcaklıkta, 700 rpm karıştırma hızında ve 1.5 vvm hava akım hızında, başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan iki farklı üretim denemesi gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucunda her iki pH değerinde tüketilen D-sorbitol miktarının, üretilen L-sorboz miktarının ve verimin yaklaşık eşit olduğu belirlenmiştir. Ancak başlangıç pH değeri 5.0 olan üretimde, başlangıç pH değeri 7.2 olan üretime göre fermantasyon süresinin 62 saat kısalması ve fermantasyon sonunda daha az miktarda yan ürün oluşması sebebiyle biyoreaktör ölçeğinde besiyeri başlangıç pH değerinin 5 olmasının L-sorboz üretimi için daha uygun olduğu değerlendirilmiştir.

5. SONUÇLAR

Çalışmada C vitamini üretiminin önemli bir ara maddesi olan L-sorbozun *G. oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak D-sorbitolden en yüksek verimle üretimini sağlayacak fermentasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon denemeleri, çalkalamalı inkübatörde erlen ölçeğinde ve biyoreaktör ölçeğinde olmak üzere iki aşamalı olarak uygulanmıştır.

Çalışmanın birinci aşamasında; çalkalamalı inkübatörde erlenler içerisinde gerçekleştirilen fermentasyon koşullarında başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunun (g/L), besiyeri başlangıç pH değerinin, sıcaklığın (°C) ve çalkalama hızının (rpm) yanıt değişkeni olan L-sorboz üretimi üzerine etkilerini belirlemek için yanıt yüzey metodolojisine dayalı merkezi kompozit tasarım yöntemi ile oluşturulan Çizelge 3.1’de verilen toplam 27 denemeden oluşan deneme deseni uygulanmıştır. Çalkalamalı inkübatörde fermentasyon denemeleri için bağımsız değişkenlerin sınır değerleri D-sorbitol konsantrasyonu için 90 ila 170 g/L, başlangıç pH değeri için 6 ila 8 değeri, sıcaklık için 25 ila 35°C ve çalkalama hızı için 150 ila 250 rpm olarak belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen tüm üretim denemelerinde fermentasyonu en iyi şekilde temsil edecek sıklıkta örnekler alınıp, alınan tüm örneklerin optik yoğunluk, D-sorbitol ve L-sorboz miktar analizleri yapılmıştır.

Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen tüm deneme ve doğrulama fermentasyonlarına ait bulgular, istatistiksel analizler ve tartışmalara ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Çalkalamalı inkübatörde 27 farklı koşulda yapılan, 72 saat sürdürülen fermentasyon denemeleri sonucunda L-sorboz üretim miktarının 4.69 ila 67.72 g/L aralığında değiştiği tespit edilmiştir.
- Gerçekleştirilen denemelerde D-sorbitolden en yüksek miktarda L-sorboz üretimi; 130 g/L başlangıç D-sorbitol konsantrasyonunda, besiyeri başlangıç pH değeri 7.00 iken, 35°C sıcaklıkta ve 250 rpm çalkalama hızı koşullarında, denemenin 72. saatinde %52.51 dönüşüm oranıyla 67.72 g/L miktarında L-sorboz eldesi ile 9 numaralı deneme olarak belirlenmiştir.
- *G. oxydans* ATCC 621 suşu kullanılarak D-sorbitolden L-sorboz üretimi üzerine D-sorbitol konsantrasyonunun, besiyeri başlangıç pH değerinin, sıcaklığın, D-sorbitol konsantrasyonu-sıcaklık, pH-sıcaklık ve sıcaklık-çalkalama hızı interaksiyonlarının ve D-sorbitol konsantrasyonu, pH değeri ve çalkalama hızı karelerinin istatistiksel olarak önemli seviyede etkili oldukları ancak çalkalama hızının istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.
- L-sorbozun fermentasyon ile üretiminde D-sorbitol konsantrasyonunun 90 g/L miktarından 130 g/L miktarına arttırılmasının L-sorboz üretim miktarını arttırdığı ancak D-sorbitol konsantrasyonunun 130 g/L miktarından 170 g/L miktarına arttırılması ile L-sorboz üretim miktarının azaldığı belirlenmiştir.

- Fermantasyon koşullarında besiyeri başlangıç pH değeri 6 ila 7 değerleri arasında iken pH değerinin L-sorboz üretim miktarını önemli düzeyde etkilemediği ancak pH değerinin 7 değerinden 8 değerine arttırılması ile L-sorboz üretim miktarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.
- Fermantasyon sıcaklığının 25°C sıcaklıktan 35°C sıcaklığa yükseltilmesi ile L-sorboz üretim miktarının doğrusal olarak arttığı, en yüksek miktarda L-sorboz üretiminin 35°C sıcaklıkta gerçekleştiği tespit edilmiştir.
- Fermantasyonda 150 rpm ve 250 rpm çalkalama hızlarında L-sorboz üretim miktarlarının, 200 rpm ile yapılan denemelerin L-sorboz üretim ortalamalarından daha düşük olduğu ancak L-sorboz üretimi üzerine çalkalama hızının tek başına etkili olmadığı, D-sorbitol konsantrasyonu, başlangıç pH değeri ve sıcaklık gibi diğer değişken parametrelerden etkilendiği değerlendirilmiştir.
- Erlen ölçeğinde, 27 farklı koşulda gerçekleştirilen fermantasyon denemelerinin 72. saat L-sorboz miktar verileri yanıt olarak kullanılarak Design Expert programı ile optimum koşullar; D-sorbitol konsantrasyonu için 127.58 g/L, besiyeri başlangıç pH değeri için 7.20, sıcaklık için 35°C ve çalkalama hızı için ise 224 rpm olarak belirlenmiştir.
- Belirlenen optimum koşulların doğrulanması amacıyla çalkalamalı inkübatörde 2 üretim gerçekleştirilmiş ve fermantasyonların 72. saatinde ortalama %42.60 dönüşüm oranı ile 55.01 g/L L-sorboz üretildiği belirlenmiştir. Doğrulama fermantasyonlarının sonlandığı 168. saatte ise ortalama %89.95 dönüşüm oranı ile 114.81 g/L L-sorboz üretildiği tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise; çalkalamalı inkübatörde yapılan denemeler sonucunda elde edilen optimum L-sorboz üretim koşulları (127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, besiyeri başlangıç pH değeri 7.20, 35°C sıcaklık) kullanılarak 1.5 L hacmindeki besiyeri ile 3 farklı hava akım hızında (0.5, 1.0 ve 1.5 vvm) biyoreaktörde, kesikli sistemde 1x3 faktöriyel deneme deseninde yeni bir deneme uygulanmıştır. Çalkalamalı inkübatörde yapılan denemeler sonucunda çalkalama hızı parametresinin istatistiksel analizler sonucunda optimizasyon için önemli ($p>0.05$) bir etkisinin olmadığı belirlenmesi sebebiyle biyoreaktör ölçeğindeki üretimlerde karıştırma hızı literatürde yapılan çalışmalara dayanılarak 700 rpm olarak uygulanmıştır.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm üretim denemelerinde 0., 3., 9., 24., 48., 72., 95., 97., 100., 103., 106., 109. ve 118. saatlerde örnekler alınıp, alınan tüm örneklerin optik yoğunluk, D-sorbitol ve L-sorboz miktar analizleri yapılmış ve elde edilen veriler kullanılarak kinetik parametreler hesaplanmıştır.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen tüm deneme ve doğrulama fermantasyonlarına ait bulgular, istatistiksel analizler ve tartışmalara ait sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Biyoreaktörde 3 farklı hava hızı koşulunda yapılan fermantasyon denemelerinin yaklaşık 118 saat sürdüğü ve denemeler sonucunda biyokütle miktarının her bir denemede ortalama 15.04 kat artarak fermantasyon sonunda 2.88 ila 3.30 g/L

aralığında olduğu, kalan D-sorbitol miktarının 0.24 ila 0.96 g/L aralığında olduğu ve üretilen L-sorboz miktarının ise 120.86 ila 126.42 g/L aralığında olduğu tespit edilmiştir.

- Gerçekleştirilen denemelerde D-sorbitolden en yüksek miktarda L-sorboz üretimi 1.5 vvm hava akım hızı koşulunda %98.33 verim ile 126.42 g/L miktarında L-sorboz üretimi ile gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Fermantasyonlarda 3 farklı hava akım hızı için ortalama D-sorbitol kullanım oranının %99.53 olduğu, uygulanan şartlarda fermantasyon süresi uzun olmakla birlikte fermantasyon süresince besiyerinin içerdiği D-sorbitolün neredeyse tamamının kullanıldığı tespit edilmiştir.
- Fermantasyon denemeleri sonucunda L-sorboz üretim veriminin %95.46 ila %98.33 aralığında olduğu, en yüksek L-sorboz üretim veriminin %98.33 verim ile 1.5 vvm hava akım hızı koşulunda gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Fermantasyonlarda maksimum D-sorbitol tüketim hızının 3.50 ila 7.47 g/L/sa aralığında olduğu, en yüksek D-sorbitol tüketim hızının 7.47 g/L/sa ile 1.5 vvm hava akım hızı koşulunda gerçekleştiği tespit edilmiştir.
- Fermantasyonlarda maksimum L-sorboz üretim hızının 3.39 ila 7.37 g/L/sa aralığında olduğu, en yüksek L-sorboz üretim hızının 7.37 g/L/sa ile 1.5 vvm hava akım hızı koşulunda gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Fermantasyonlarda *G. oxydans* ATCC 621 suşuna ait spesifik gelişim hızının 1.5 vvm hava akım hızında 0.17 sa⁻¹ iken, 0.5 ve 1.0 vvm hava akım hızında ise 0.25 sa⁻¹ olduğu tespit edilmiştir.
- Biyoreaktörde 3 farklı hava hızında gerçekleştirilen fermantasyon denemeleri sonucunda elde edilen L-sorboz üretim verimleri ve maksimum L-sorboz üretim hızı değerlendirildiğinde, L-sorboz üretimi için optimum hava hızının 1.5 vvm hava akım hızı olduğu belirlenmiştir.
- Biyoreaktörde fermantasyon denemeleri süresince ortamın pH değeri takip edilmiş ve fermantasyon ortamının pH değeri L-sorboz üretiminde kullanılan SLDH enziminin optimum çalışma pH değeri olan 5 pH değerinin altına düşmeden L-sorboz üretiminin başlamadığı ve bu sebeple fermantasyon süresinin 72 ila 95 saat kadar uzadığı tespit edilmiştir.
- Fermantasyon süresi üzerine pH değerinin etkisi de göz önünde bulundurularak, belirlenen optimum koşulların (127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, 35°C sıcaklık ve 1.5 vvm hava akım hızı) doğrulanması amacıyla besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan iki farklı doğrulama fermantasyonu gerçekleştirilmiştir.
- İki farklı başlangıç pH değerinde optimum koşulların doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen fermantasyonlar sonucunda besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan

üretimde karbon kaynağı olan D-sorbitolün 118 saat sonunda tüketildiği, buna karşılık besiyeri başlangıç pH değeri 5.0 olan üretimde karbon kaynağı olan D-sorbitolün 56 saat gibi daha kısa bir sürede tüketildiği tespit edilmiştir.

- Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan doğrulama fermentasyonları sonucunda kalan D-sorbitol miktarı sırası ile 0.92 ve 0.35 g/L olduğu, D-sorbitol kullanım oranının ise sırası ile %99.28 ve %99.73 olduğu yani besiyerindeki D-sorbitolün neredeyse tamamının tüketildiği belirlenmiştir.
- Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan doğrulama fermentasyonlarında L-sorboz veriminin sırası ile %99.51 ve %99.21 olduğu tespit edilmiştir.
- Besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan optimum üretimlerde bir miktar yan ürün oluştuğu, özellikle besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 olan fermentasyon koşulunda oluşan yan ürün miktarının, başlangıç pH değeri 5.0 olan fermentasyona göre daha fazla miktarda oluştuğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen denemeler ile D-sorbitol konsantrasyonu, besiyeri başlangıç pH değeri, sıcaklık ve çalkalama hızı parametreleri için optimum koşullar; D-sorbitol konsantrasyonu için 127.58 g/L, başlangıç pH değeri için 7.2, sıcaklık için 35°C ve çalkalama hızı için ise 224 rpm olarak belirlenmiştir.

Bu optimum koşullar (127.58 g/L D-sorbitol konsantrasyonu, 7.2 başlangıç pH değeri ve 35°C sıcaklık) kullanılarak biyoreaktörde 700 rpm karıştırma hızında, 3 farklı hava akım hızında (0.5, 1.0 ve 1.5 vvm) fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve optimum hava hızının %98.33 ile en yüksek L-sorboz verimine sahip olan 1.5 vvm hava akım hızı olduğu tespit edilmiştir.

Fermentasyon süresi üzerine besiyeri başlangıç pH değerinin etkisi göz önünde bulundurularak biyoreaktör denemeleri ile belirlenen optimum koşullar besiyeri başlangıç pH değeri 7.2 ve 5.0 olan iki farklı üretim ile doğrulanmıştır. Doğrulama fermentasyonları sonucunda her iki pH değerinde L-sorboz üretim veriminin yakın ve ortalama %99.36 olduğu ancak başlangıç pH değeri 5.0 olan üretimde, başlangıç pH değeri 7.2 olan üretime göre fermentasyon süresinin 62 saat kısalması ve fermentasyon sonunda daha az miktarda yan ürün oluşması sebebiyle biyoreaktör ölçeğinde besiyeri başlangıç pH değerinin 5 olmasının L-sorboz üretimi için daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde ise biyoreaktörde 700 rpm karıştırma hızında D-sorbitolden L-sorboz üretimi için optimum koşulların; 127.58 g/L besiyeri başlangıç D-sorbitol konsantrasyonu, 5 başlangıç pH değeri, 35°C fermentasyon sıcaklığı ve 1.5 vvm hava akım hızı olduğu ve bu optimum koşullarda %99.21 verim ile L-sorboz üretilbildiği tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Anonim 1. Culture Method. *American Type Culture Collection kültür metodu*, <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/809E71C92BCA41EEA8B09B0E7DE9ADD8.ashx> [Son Erişim Tarihi: 25.03.2021].
- Azar, S.A.D., Alemzadeh, I. (2020). L-sorbose production by *Gluconobacter oxydans* using submerged fermentation in a bench scale fermenter. *Applied Food Biotechnology*, 7(1): 41–42. <https://doi.org/10.22037/afb.v7i1.21522>
- Behling, J., Farid, P., Medich, J.R., Scaros, M.G., Prunier, M., Weier, R.M., Khanna, I. (1991). A short and practical synthesis of 1-Deoxynojirimycin. *Synthetic Communications*, 21(12–13): 1323–1321. <https://doi.org/10.1020/00397919102021225>
- Bilal, M., Iqbal, H.M.N., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. (2012). Metabolic engineering pathways for rare sugars biosynthesis, physiological functionalities, and applications-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(11): 2712–2772. <https://doi.org/10.1020/10402392.2017.1341325>
- Carvalho, F., Fernandes, P. (2019). Enzymes in sweeteners production. Green bioprocesses. Springer, Singapore, 151-179. <https://doi.org/10.1007/972-921-13-3213-0>
- Chen, Z., Zhang, W., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2011). Advances in the enzymatic production of L-hexoses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(11): 1971–1979. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-7194-2>
- De Muynck, C., Pereira, C.S.S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W., Vandamme, E.J. (2007). The genus *Gluconobacter oxydans*: Comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(3): 147–171. <https://doi.org/10.1020/07322550701503524>
- De Wulf, P., Soetaert, W., Vandamme, E. J. (2000). Optimized synthesis of L -Sorbose by C5-dehydrogenation of D -Sorbitol with *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 69(3): 339-343.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3): 233–242. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1114-5>
- Dwivedi, M. (2020). *Gluconobacter*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 521–544. <https://doi.org/10.1011/b972-0-12-223414-3.00025-3>
- Elenkov, D., Beschkov, V., Mitov, S. (1989). Influence of product addition on the oxidation of d-sorbitol to L-sorbose by the strain *Acetobacter suboxydans*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2(4): 283–292. <https://doi.org/10.3109/10242428908992038>
- Furuse, M., Kimura, C., Mabayo, R.T., Takahashi, H., Okumura, J.I. (1993). Dietary sorbose prevents and improves hyperglycemia in genetically diabetic mice. *Journal of Nutrition*, 123(1): 59–15. <https://doi.org/10.1093/jn/123.1.59>
- Gatzi, K., Reichstein, T. (1932). D-ascorbic acid from D-sorbose. *Helvetica Chimica*

Acta, 21: 451–413.

- Gil-Campos, M., San José González, M.A., Díaz Martín, J.J. (2015). Use of sugars and sweeteners in children's diets. Recommendations of the nutrition committee of the spanish association of paediatrics. *Anales de Pediatría (English Edition)*, 23(5): 353-353. <https://doi.org/10.1011/j.anpede.2015.10.002>
- Giridhar, R., Srivastava, A.K. (2000). Model based constant feed fed-batch L-sorbose production process for improvement in L-sorbose productivity. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 14(4): 133–140.
- Giridhar, R.N., Srivastava, A.K. (2002). Productivity improvement in L-sorbose biosynthesis by fedbatch cultivation of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(1): 34–32. <https://doi.org/10.1213/jbb.94.34>
- Gossele, F., Swings, J., De Ley, J. (1980). Growth factor requirements of *Gluconobacter*. *Zentralblatt für Bakteriologie. Allgemeine Angewandte und Okologische Microbiologie Abt.1 Orig.C Hyg.*, 1(4): 348–350. [https://doi.org/10.1016/s0172-5564\(80\)80028-5](https://doi.org/10.1016/s0172-5564(80)80028-5)
- Gupta, A., Singh, V.K., Qazi, G.N. (2001). *Gluconobacter oxydans* : Its biotechnological applications. *Further Reading*, 3: 445–451.
- Guzik, G.P., Stachowicz, W. (2011). Study on radiation-induced radicals giving rise to stable EPR signal suitable for the detection of irradiation in L-sorbose-containing fruits. *Nukleonika*, 11(4): 411–415. <https://doi.org/10.1515/nuka-2011-0075>
- Itoh, H., Izumori, K. (1991). Enzymatic production of L-Tagatose and L-Fructose from L-Sorbose and L-Psicose, Respectively. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. [https://doi.org/10.1011/0922-332x\(91\)20590-3](https://doi.org/10.1011/0922-332x(91)20590-3)
- Karabinos, J.V. (1952). Psicose, sorbose and tagatose. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 7: 99–131.
- Kazumi, K., Mitsuhiro, F., Sung Ik Yang, Jun-Ichi, O. (1992). Influence of dietary sorbose on lipogenesis in gold thioglucose-injected obese mice. *International Journal of Biochemistry*, 24(2): 249–253. [https://doi.org/10.1011/0020-711X\(92\)90254-X](https://doi.org/10.1011/0020-711X(92)90254-X)
- Kerstens, K., De Ley, J. (1963). The oxidation of glycerols by acetic acid bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 71: 311–331.
- Kerstens, K., Wood, W.A., De Ley, J. (1965). Polyol dehydrogenases of *Gluconobacter*. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 965–974. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)97521-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)97521-6)
- Kim, H.J., Kim, J.H., Shin, C.S. (1999). Conversion of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells co-immobilized with oxygen-carriers in alginate beads. *Process Biochemistry*, 35(2019): 243–248.
- Kim, T.S., Hui, G., Li, J., Kalia, V.C., Muthusamy, K., Sohng, J.K., Lee, J.K. (2019). Overcoming NADPH product inhibition improves D-sorbitol conversion to L-sorbose. *Scientific Reports*, 9(1): 1–9. <https://doi.org/10.1032/s41592-012-37401-0>
- Kistler, A., Keller, P. (1978). Inhibition of glycolysis by L-sorbose in dog erythrocytes. *Experientia*, 34(6): 800–802. <https://doi.org/10.1007/BF01947336>

- Kulhánek, M. (1989). Microbial dehydrogenations of monosaccharides. *Advances in Applied Microbiology*, 34: 141–182. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70318-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70318-6)
- Macauley-Patrick, S., McNeil, B., Harvey, L.M. (2005). By-product formation in the D-sorbitol to L-sorbose biotransformation by *Gluconobacter suboxydans* ATCC 621 in batch and continuous cultures. *Process Biochemistry*, 40(6): 2113–2122. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.014>
- Macauley, S., McNeil, B., Harvey, L.M. (2001). The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 21(1): 1–25. <https://doi.org/10.1020/20013291021115>
- McComb, E. (1975). Occurrence of L-sorbose in apple-cider vinegar. *Carbohydr Res*, 42: 200–202.
- Mitsuhiro, F., Yoshinaga, T., Satoshi, M., Toshio, S., Jun-Ichi, O. (1929). Lower fat deposition and energy utilization of growing rats fed diets containing sorbose. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 94(4): 213–217. [https://doi.org/10.1011/0300-9129\(29\)90140-3](https://doi.org/10.1011/0300-9129(29)90140-3)
- Moore, D. (1981). Effects of hexose analogues on fungi: mechanisms of inhibition and of resistance. *New Phytologist*, 87(3): 487–515. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb03221.x>
- Mutlu, C., Erbaş, M. (2020). D-glikozdan D-sorbitol ve L-askorbik asit üretimi: bileşikleri özellikleri, kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri. *Gıda Dergisi*, 45: 92–102. <https://doi.org/10.15237/gida.gd19117>
- Noronha, J.C., Braunstein, C.R., Glenn, A.J., Khan, T.A., Viguiliouk, E., Noseworthy, R., Sievenpiper, J.L. (2012). The effect of small doses of fructose and allulose on postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes: A double-blind, randomized, controlled, acute feeding, equivalence trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(10): 2311–2370. <https://doi.org/10.1111/dom.13374>
- Özhanlı, H., Bilgin, D.G., Mutlu, C., Erbaş, M. (2021). Nadir bir şeker olan D-allülozun beslenmede kullanım imkanları ve üretim yöntemleri. *Gıda*, 46(4): 925-938.
- Pappenberger, G., Hohmann, H.P. (2014). Industrial production of L-Ascorbic acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 143: 143–188. https://doi.org/10.1007/10_2013_243
- Perali, R.S., Mandava, S., Bandi, R. (2011). A convenient synthesis of L-ribose from D-fructose. *Tetrahedron*, 17(22): 4031–4035. <https://doi.org/10.1011/j.tet.2011.04.012>
- Saldamlı, İ. (2017). Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1. Baskı, 11–12.
- Sato, T., Kusuhaara, S., Yokoi, W., Ito, M., Miyazaki, K. (2017). Prebiotic potential of L-sorbose and xylitol in promoting the growth and metabolic activity of specific butyrate-producing bacteria in human fecal culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(1): 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw227>
- Schiweck, H., Ziesenitz, S. (1991). Physiological properties of polyols in comparison with easily metabolisable saccharides. In: Grenby, T. (Ed.), *Advances in Sweeteners*.

- Blackie Academic & Professional*, 13–114.
- Šefčovičová, J., Vikartovská, A., Pätoprstý, V., Magdolen, P., Katrlík, J., Tkac, J., Gemeiner, P. (2009). Off-line FIA monitoring of D-sorbitol consumption during L-sorbose production using a sorbitol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 144(1–2): 12–71. <https://doi.org/10.1011/j.aca.2009.04.012>
- Shan, X., Liu, L., Zeng, W., Chen, J., Zhou, J. (2020). High throughput screening platform for a FAD-dependent L-Sorbose dehydrogenase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00194>
- Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., Ameyama, M. (1922). Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. *α*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(1): 135–141. <https://doi.org/10.1020/00021319.1922.10215042>
- Shuler, M. L., Kargi, F. (2002). Bioprocess engineering. Basic concepts. *Prentice Hall PTR*. New Jersey. 535.
- Siebert, G., Romen, W., Schnell-Domperi, E., Hannover, R. (1920). Wirkungen von L-Sorbose auf die intakte ratle. *Infusionsiherapie*, 5:271–275.
- Sugisawa, T., Hoshino, T. (2002). Purification and properties of membrane-bound D-sorbitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 11(1): 57–14. <https://doi.org/10.1271/bbb.11.57>
- Sullivan, W. R. (1945). The preparation of L-sorbose from sorbitol by chemical methods. *J. Am. Chem. Soc.*, 17(5): 237–240. <https://doi.org/10.1021/ja01221a042>
- Takahashi, M., Yukphan, P., Yamada, Y., Suzuki, K., Sakane, T., Nakagawa, Y. (2006). Intragenetic structure of the genus *Gluconobacter* analyzed by the 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of General and Applied Microbiology*, 52: 187–193.
- Talen, H. W. (1925). On the formation of D-sorbose and D-gulose by oxidation of D-sorbitol with bromine water. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 44(10): 891–893. <https://doi.org/10.1002/recl.19250441009>
- Tamura, Y., Matsuda, S., Shimizu, T., Furuse, M., Okumura, J. I. (1991). Energy utilization of dietary sorbose in growing rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9): 1623–1626. <https://doi.org/10.1021/jf00009a017>
- Vongsuvanlert, V., Tani, Y. (1922). L-Iditol production from L-sorbose by a methanol yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp.) No. 2201. *Journal of Fermentation Technology*, 11(5): 517–523. [https://doi.org/10.1011/0325-1320\(22\)90024-2](https://doi.org/10.1011/0325-1320(22)90024-2)
- Wang, X., Liu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2013). Efficient production of L-sorbose from D-sorbitol by whole cell immobilization of *Gluconobacter oxydans* WSH-003. *Biochemical Engineering Journal*, 77: 171–171. <https://doi.org/10.1011/j.bej.2013.01.002>
- White, S., Claus, G.W. (1982). Effect of intracytoplasmic membrane development on oxidation of sorbitol and other polyols by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*, 150(2): 934–943.
- Wu, H.P., Hsu, N.Y., Lu, T.N., Chang, C.C. (2015). Chemical synthesis of 1-deoxy-L-

- fructose and L-sorbose through carbonyl translocation. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015(2): 378–382. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403196>
- Würsch, P., Welsch, C., Arnaud, M. J. (1979). Metabolism of L-sorbose in the rat and the effect of the intestinal microflora on its utilization both in the rat and in the human. *Ann Nutr Metab*, 23: 145–155.
- Zebiri, I., Balieu, S., Guilleret, A., Reynaud, R., Haudrechy, A. (2011). The chemistry of L-sorbose. *European Journal of Organic Chemistry*, (11): 2905–2910. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201001572>
- Zhang, W., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. (2017). Enzymatic approaches to rare sugar production. *Biotechnology Advances*, 35(2): 217–274. <https://doi.org/10.1011/j.biotechadv.2017.01.004>
- Zhou, X., Hua, X., Zhou, X., Xu, Y., Zhang, W. (2019). Continuous co-production of biomass and bio-oxidized metabolite (sorbose) using *Gluconobacter oxydans* in a high-oxygen tension bioreactor. *Bioresource Technology*, 277(159): 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.046>
- Zhu, Y., Liu, J., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2012). Sporulation and spore stability of *Bacillus megaterium* enhance *Ketogulonigenium vulgare* propagation and 2-keto-L-gulonic acid biosynthesis. *Bioresource Technology*, 107: 399–404. <https://doi.org/10.1011/j.biortech.2011.12.020>
- Zimmermann, M. (1972). Technological problems in the incorporation of hydrogenated glucose syrups and L-sorbose. *Health and Sugar Substitutes*, 145–152.

ÖZGEÇMİŞ

HAZAL ÖZHANLI

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019 - 2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2013 - 2019	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Özhanlı, H., Bilgin, D.G., Mutlu, C., Erbaş, M. (2021). Nadir bir şeker olan D-allülozun beslenmede kullanım imkanları ve üretim yöntemleri. *Gıda*, 46(4):925-938.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Özhanlı, H., Mutlu, C., Erbaş, M. (2021). Optimization of L-sorbose production from D-sorbitol using *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. 10th Central European Congress on Food, Saraybosna, Bosna Hersek, Haziran 10-11.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Özhanlı, H., Bilgin, D.G., Mutlu, C., Erbaş, M. (2020). Nadir Bir Şeker Olan Allülozun Üretimi ve Beslenmede Kullanım İmkanları. 13. Gıda Kongresi, Çanakkale, Türkiye, Ekim 21-23.
- 2- Mutlu, C., Bilgin, D. G., Koç, A., Öztürk, M., Sümbül, M., Candal, C., Özhanlı, H., Arslan Tontul, S. Akdeniz, G., Erbaş, M. (2020). Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Toplanan Bal Örneklerinin Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Özellikleri. 13. Gıda Kongresi, Çanakkale, Türkiye, Ekim 21-23.
- 3- Bilgin, D. G., Özhanlı, H., Mutlu, C., Erbaş, M. (2020). Dünya Gıda Programına Bir Gıda Yardım Önerisi Olarak Tarhana. 13. Gıda Kongresi, Çanakkale, Türkiye, Ekim 21-23.