

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecem Gizem KIZILKAYA

**DOĞAL *Aspergillus* sp. İZOLATLARI KULLANILARAK
GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA- 2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL *Aspergillus sp.* İZOLATLARI KULLANILARAK GLUKONİK
ASİT ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

**Ecem Gizem KIZILKAYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 30/07/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Sadık DİNÇER
DANIŞMAN

.....
Prof.Dr.Osman GÜLNAZ
ÜYE

.....
Prof.Dr.Sevil TOROĞLU
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2017-8732**

Not:Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge,
şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve
Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞAL *Aspergillus sp.* İZOLATLARI KULLANILARAK GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

Ecem Gizem KIZILKAYA

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Yıl: 2019, Sayfa: 75
Jüri :Prof. Dr. Sadık DİNÇER
:Prof.Dr.Osman GÜLNAZ
:Prof.Dr.Sevil TOROĞLU

Bu çalışmada, soğan kabuğu, sarımsak kabuğu ve ekmek gibi küflenmiş çeşitli gıda materyallerinden izole edilen *Aspergillus sp.* suşları ve substrat olarak dekstroz monohidrat kullanılarak glukonik asit in batık kültür (submerged) fermentasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Fermentasyon ürününün HPLC’de kalitatif ve kantitatif analizleri yapılarak glukonik asit fermentasyonu için optimum şartlar belirlenmiştir.

Doğal izolat *Aspergillus sp.* kullanılarak yapılan glukonik asit üretimindeki optimum şartlar; % 10 dekstroz monohidrat içeren fermentasyon ortamında 600 rpm, pH 5.5, 30°C sıcaklık, 0.5 vvm%100 oksijen ilavesi ile fermentasyon süresi 8 gün olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonucu % 69’luk verimle glukonik asit üretimi elde edilmiştir. Ayrıca fermentasyon besiyeri ortamına 3000 ünite glukoz oksidaz ve 500 ünite katalaz ilavesinin fermentasyon süresini 3 güne indirdiği ve %95 verimle glukonik asit üretimi elde edildiği gözlemlenmiştir.

Bu sonuçlara göre çalışmada kullanılan doğal izolat *Aspergillus sp.*, dekstroz monohidratın belirlenen optimum koşullar altında tamamına yakını glukonik aside dönüştürdüğü söylenebilir. Elde edilen glukonik asit inşaat, tarım, sağlık ve gıda gibi birçok sektörde güvenle kullanılabilir, doğada kolaylıkla biyodegrade olabilir bir üründür.

Anahtar Kelimeler: Glukonik asit, *Aspergillus sp.*, Optimizasyon, HPLC

ABSTRACT

M.Sc.THESIS

BY USING NATURAL ISOLATED *Aspergillus sp.* PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF GLUCONIC ACID

Ecem Gizem KIZILKAYA

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Year: 2019, Pages:75
Jury : Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof.Dr.Osman GÜLNAZ
: Prof.Dr.Sevil TOROĞLU

In this study, submerged fermentation and optimization of gluconic acid was performed by using *Aspergillus spp.* strains isolated from moldy food materials such as onion peel, garlic peel, bread and dextrose monohydrate as substrate. The qualitative and quantitative analyzes of the fermentation product were performed on HPLC to determine the optimum conditions for gluconic acid fermentation.

By using natural isolated *Aspergillus sp.* optimum conditions for the production of gluconic acid was determined as at 600 rpm, pH 5.5, 30°C with addition 0.5 vvm pure oxygen on the 7th day including in fermentation medium containing 10% dextrose monohydrate. As a result of the optimization, gluconic acid production was obtained with a yield of 69%. In addition, it was observed that the addition of 3000 units of glucose oxidase and 500 units of catalase to the fermentation medium reduced the fermentation time to 3 days and yielded 95% yield of gluconic acid.

According to these results, it can be said that using by natural isolated *Aspergillus sp.* almost completely of dextrose monohydrate converted gluconic acid under the determined optimum conditions. Gluconic acid is a product that can be used safely in many sectors such as construction, agriculture, health, food and can be easily biodegraded in nature.

Key Words: Gluconic Acid, *Aspergillus sp.*, Optimization, HPLC

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada çeşitli soğan kabuğu, sarımsak kabuğu ve ekmek gibi küflenmiş çeşitli gıda materyallerinden izole edilen *Aspergillus spp.* ile glukonik asitin batık kültür (submerged) fermentasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Yağ fabrikası yan ürünü olan dekstroz monohidrat karbon kaynağı olarak tercih edilmiştir.

Aspergillus sp. ile substrat miktarı 10 günlük fermentasyonsüresince, hacimce %10, %20, %30 dekstroz monohidrat kullanılarak gözlenmiştir. Hacimce %10'luk dekstroz monohidrat kullanılarak %11, %16, %36, %51, %54, %54, %55, %59, %59, %59 glukonik asit verimi elde edilmiştir. Hacimce %20 dekstroz monohidrat kullanıldığında %11, %11, %11, %12, %13, %18, %21, %21, %24, %24, %23 üretimverimi sağlanmıştır. Hacimce %30'luk dekstroz monohidrat kullanımında glukonik asit üretim veriminin %10, %10, %10, %11, %12, %12, %11, %12, %12, %13 olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre optimum dekstroz monohidrat miktarı hacimce %10 olarak belirlenmiştir.

Optimum sıcaklık miktarını tespit etmek amacıyla 10 günlük fermentasyon süresince 25°C, 30 °C ve 35 °C sıcaklık parametreleri ile çalışılmıştır. Glukonik asit üretim verimi 25°C'de %11, %16, %17, %17, %23, %25, %24, %23, %23, %23, %22 olarak gözlenmiştir. 30°C'de %11, %16, %36, %51, %54, %54, %55, %59, %59, %59 glukonik asit üretim verimi elde edilmiştir. 35 °C'ta %10, %12, %13, %14, %23, %24, %24, %23, %22, %21 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre optimum sıcaklığın 30°C olduğu belirlenmiştir.

pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0'da optimum koşulları belirlemek amacıyla 10 gün süresince fermentasyon yapılmıştır. pH 5.0'da %11, %11, %11, %17, %19, %19, %25, %29, %31, %31, glukonik asit üretimi elde edilmiştir. pH 5.5'te verim %11, %16, %36, %51, %54, %54, %55, %59, %59, %59 olmakla birlikte pH 6.0'da %11, %11, %12, %24, %29, %32, %44, %43, %45, %45'tir.

Oksijen, glukonik asit fermentasyonunda glukozoksidaz ve katalazın substrat olmakla birlikte reaksiyon için sınırlayıcı faktördür. 0.5 vvm atmosferik havalandırma (%21 oksijen) ile fermentasyon süresinin 8. gününde %59'luk glukonik asit verimi elde edilmiştir. 1.0 vvm %100 oksijen ilavesi ile %72'lik üretim verimi elde edilmiştir.

Ortamda biriken hidrojen peroksidinglukoz oksidaz üzerindeki tersinmez inaktive etme özelliği bilindiği için besiyeri ortamına 500 ünite katalaz ilave edilmiş ayrıca reaksiyon verimini arttırmak amacıyla 3000 ünite glukoz oksidaz ilavesi yapılmıştır. Sonuçta fermentasyon süresi 3 güne düşmüş ve %95'lik glukonik asit verimi elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre doğal izolat *Aspergillus sp.*, ile glukonik asit üretiminde optimum koşullar 8 gün fermentasyon süresinde % 10 dekstroz monohidrat içeren fermentasyon besiyeri ortamında pH 5.5, 30°C sıcaklık, % 69'luk glukonik asit üretim oranı elde edilmiştir. Glukoz oksidaz ve katalaz ilavesi ile artan üretim maliyeti göz ardı edildiğinde fermentasyon periyodu 3 güne düşmüştür ve %95 verim ile glukonik asit üretimi elde edilmiştir.

Elde edilen glukonik asit inşaat, tarım, sağlık ve gıda gibi birçok sektörde güvenle kullanılabilir, doğada kolaylıkla biyodegrade olabilir bir üründür.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım süresince bilgi birikimi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Sadık DİNÇER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi, deneyim ve duruşuyla örneğim olan değerli hocam Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e ve çalışmalarımda sabırla bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a ve Prof. Dr. Sevil TOROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Uzm.Biyolog Esra Sündüz YİĞİTTEKİN ve Biyolog Fatih SEZER'e her şeyden önce dostlukları ve tüm yardımları için teşekkürü bir borç bilirim.

Biyoloji, Mikrobiyoloji, Genetik, Hayvan Fizyolojisi ve Toprak Laboratuvarında Yüksek Lisans ve Doktora yapan tüm arkadaşlarım ve hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında bana maddi destek sağlayan Çukurova Üniversitesi BAP Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla her zaman mutlu olduğum, gurur duyduğum, hayatım boyunca her konuda desteklerini gördüğüm babam Mehmet Baybars KIZILKAYA ve annem Emine KIZILKAYA'ya minnettarım. Kardeşlerim Kemal Saygın KIZILKAYA ve Utku Mert KIZILKAYA'ya sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ışığım, Dorukhan Mehmet ERK'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1.GİRİŞ	1
1.1.Fermantasyon.....	2
1.1.1. Fermantasyon Teknikleri	3
1.1.1.1.Yüzeysel veya Üstel Fermantasyon Metodu.....	3
1.1.1.2. Batch Fermantasyon Metodu	4
1.1.1.2.(1). Kesikli Fermantasyon	4
1.1.1.2.(2). Yarı Kesikli Fermantasyon	4
1.1.1.2.(3).Sürekli Fermantasyon	5
1.2.Fermentör (Biyoreaktör)	6
1.3.Organik Asitler.....	7
1.4.Enzimler.....	8
1.4.1.Enzimlerin Yapısı	9
1.4.2.Glukoz Oksidaz	10
1.4.2.1.Glukoz Oksidaz Kullanım Alanları	12
1.4.3. Katalaz	13
1.4.3.1.Katalaz Kullanım Alanları.....	14
1.5.Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	14
1.6.Glukonik Asit.....	15
1.6.1.Glukonik Asit Üretim Yöntemleri	18

1.6.1.1.Kimyasal Üretim	19
1.6.1.2.Mikrobiyolojik Üretim	20
1.6.1.2.(1).Bakteriler	21
1.6.1.2.(2).Mayalar	22
1.6.1.2.(3).Mantarlar	22
1.6.2.Glukonik Asit Tarihçesi	24
1.6.3.Glukonik Asit'in Endüstriyel Alanlarda Kullanımı	25
1.6.3.1.Çimento Sanayi	25
1.6.3.2.Farmasötik Endüstri	25
1.6.3.3.Gıda Endüstrisi	26
1.6.3.4.Tekstil Endüstrisi	28
1.6.3.5.Metalurji	28
1.6.3.6.Kimya	28
1.6.3.7.Ziraat	28
1.7. Funguslar	29
1.7.1. <i>Aspergillus spp.</i>	29
1.8.Kromatografi	31
1.8.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	31
1.8.1.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Bileşenleri	32
1.8.1.1.(1).Mobil Faz	33
1.8.1.1.(2).Degazör	34
1.8.1.1.(3).Pompa	34
1.8.1.1.(4).Örnekleyici (numune enjeksiyon sistemi)	35
1.8.1.1.(5).Kolon- Kolon Fırını	35
1.8.1.1.(6).Dedektör	36
1.8.1.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Türleri	36
1.8.1.2.(1).Ters Faz (Reverse Phase) HPLC	36
1.8.1.2.(2).Normal Faz (Normal Phase) HPLC	37

1.8.1.3.Standartlarla Yapılan Kalibrasyon	37
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	39
3.MATERYAL METOD	43
3.1. Materyal	43
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri	43
3.1.1.1. Potato Dextrose Agar (PDA).....	43
3.1.1.2.Czapex Dox Agar (CZ)	44
3.1.1.3.Malt Extrakt Agar (MEA)	45
3.1.1.4.Dekstroz Monohidratlı Fermantasyon Besiyeri.....	45
3.1.2. Glikoz Oksidaz ve Katalaz Dozaj Hasabı.....	46
3.1.2.1. Glikoz Oksidaz Dozajı	46
3.1.2.2. Katalaz Dozajı	47
3.2. Metod	49
3.2.1. Aspergillus sp. İzolasyonu.....	49
3.2.2.Spor Sayımı	49
3.2.3.Biyoreaktör Hazırlığı ve İnokülasyon.....	50
3.2.4.Fermente Ürün Eldesi ve Saklama Koşulları.....	51
3.2.5.HPLC Koşulları	51
3.2.6.HPLC Standart Çözelti Hazırlama.....	52
3.2.7.HPLC Kalibrasyon Grafiği Hazırlanması.....	52
4.BULGULAR ve TARTIŞMA.....	53
4.1.Glukonik Asit Üretim Optimizasyonu	53
4.1.1. Optimum Fermantasyon Süresi	54
4.1.2. Dekstroz Monohidrat Derişimi	55
4.1.3.Sıcaklık	56
4.1.4.pH	58
4.1.5. Oksijen.....	59
4.1.6.Glukoz Oksidaz ve Katalaz İlavesi.....	62
4.1.7. Priz Süresi ve Hidrojen Verimliliğine Etki.....	63

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	75



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Batch fermantasyon çeşitleri	5
Çizelge 1.2. Glukonik asit isimleri	17
Çizelge 1.3. Glukonik asitin fiziksel ve kimyasal özellikleri	18
Çizelge 1.4. Katkı maddesi olarak glukonik asit ve türevleri.....	27
Çizelge 3.1. PDA Besiyerinin Bileşimi	43
Çizelge 3.2. CZ Besiyerinin Bileşimi	44
Çizelge 3.3. MEA Besiyerinin Bileşimi	45
Çizelge 3.4. Dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyeri bileşimi.....	45
Çizelge 3.5. GC 199 Glikoz oksidaz karakteristik özellikleri	46
Çizelge 3.6. Glukoz oksidaz dozaj hesabı	47
Çizelge 3.7. Optimase Katalaz 800L karakteristik özellikleri	48
Çizelge 3.8. Katalaz dozaj hesabı.....	48
Çizelge 3.9. HPLC koşulları.....	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Biyoreaktör (fermentör).....	7
Şekil 1.2 Enzim yapısı	10
Şekil 1.3 Glukoz oksidaz yapısı.....	11
Şekil 1.4. Glukoz oksidaz ve glukonik asit.....	12
Şekil 1.5. Hidrojen peroksit ve katalaz	15
Şekil 1.6. Glukonik asit.....	16
Şekil 1.7. Glukonik asit reaksiyon yolu	17
Şekil 1.8. Glukonik asit oluşumunda enzimatik farklılık	21
Şekil 1.9. Glukonik asit formasyonu.....	23
Şekil 1.10. HPLC bileşenleri	33
Şekil 3.1. Petroff hausser lamı	50
Şekil 3.2. Korelasyon grafiği	52
Şekil 4.1. Optimum fermentasyon süresi	54
Şekil 4.2. Optimum Glukoz derişimi	56
Şekil 4.3. Optimum sıcaklık.....	57
Şekil 4.4. Optimum pH	59
Şekil 4.5. Optimum oksijen derişimi	61
Şekil 4.6. GOX ve katalaz etkisi	63



SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol
µL	: Mikrolitre
A.	: <i>Aspergillus</i>
sp.	: Species (tür, tekil)
spp.	: Species (tür, çoğul)
CO ₂	: Karbondioksit
CZ	: Czapek Dox Agar
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IUPAC	: The International Union of Pure and Applied Chemistry
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
L	: Litre
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
mM	: Milimolar
mU/ml	: Milli units per milliliter
PDA	: Potato Dextrose Agar
U/mg	: Unit/miligram
U/mL	: Units per milliliter
v/v	: Hacim/Hacim (volume/volume)
w/v	: Ağırlık/Hacim (weight/volume)
GOX, GOD	: Glukoz Oksidaz
GA	: Glukonik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
CAT	: Katalaz
Pt	: Platin

Pd	: Paladyum
Au	: Altın
kDa	: Kilodalton
MPa	: Megapaskal
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
vvm	:Biyoreaktör kültürü için kullanılır. İlk “v” hava hacmi, ikinci “v” besiyeri hacmi, “m” dakika ifadelerini simgeler.Örneğin 5vvm; bir dakikada bir litre besiyeri içinden geçen 5 litre hacimli hava anlamındadır.

1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar tüm canlı formların hayat döngüsünde önemli rol oynamaktadır. Boyutlarının küçük olması nedeniyle biyosferde kolayca her yere ulaşabilmektedirler. Krater ağzından buzullara uzanan ekstrem çevre koşulları da dahil hemen hemen her ortama uyum sağlamak ve kolayca üreyebilmektedirler. Bu özellikleri nedeniyle mikroorganizmalar, M.Ö.3000’lerde biyoteknolojinin başlangıcı olan ekmek ve bira mayalama işleminde karşımıza çıkarken günümüzde büyük ölçekteki endüstriyel üretimlerde kullanılmaktadır. Sağlıktan gıdaya, inşaattan zirai sektörlere kadar uzanan geniş bir faaliyet alanına sahiptirler. Mikroorganizmalar bazen uzun raf ömrü sağlayan gıda koruyucusu olarak bazen tadı veya kokusuyla büyülediğimiz katkı maddelerinin üretimini üstlenen uzmanlardır. Bugün tükettiğimiz hemen hemen her üründe mikrobiyal üretimin etkisi görülmektedir.

Mikroorganizmalarca üretilen organik asitlerden birisi de glukonik asittir. Glukonik asit; tükettiğimiz meyve suları ve şaraplardaki ferahlatıcı ekşi tadın sahibi olmakla birlikte acı tadı gideren, kalsiyum glukonat formu ile kalsiyum ihtiyacımızı karşılayan, su içtiğimiz şişelerdeki kireç lekelerini yok eden, çimentonun hızlı kurumasını sağlayıp daha dayanıklı hale getirmek gibi gözle görünmeyen büyük katkıları bulunmaktadır.

Endüstriyel üretimlerde maliyet en önemli kriter olması nedeniyle az substrata karşı çok ürün ve hızlı üretim öncelikli hedeflerden biridir. Bu çalışmadaki glukonik asit üretiminde maliyeti yüksek kimyasal ve fiziksel yöntemler yerine mikrobiyal yol tercih edilmiştir. Elde edilen bulgular çerçevesinde mikrobiyal glukonik asit üretim yönteminin daha verimli ve etkili hale gelmesi amacı edinilmiştir.

1.1.Fermantasyon

Fermantasyon, organik substratlarda enzim etkisi ile kimyasal değişiklikler meydana gelmesini sağlayan metabolik katabolizma sürecidir. ATP bu süreçte substrat düzeyinde fosforile edilirken organik maddeler hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi görevini üstlenir.

Endüstriyel anlamda fermantasyon, mikroorganizmalar veya mikroorganizma enzimleri kullanılarak üretilen, ticari değeri olan, büyük ölçekli üretimleri ifade eder. Mikroorganizmalar endüstriyel fermantasyon proseslerinde şekerler, nişasta, selüloz ve proteinler gibi organik bileşenleri ayrıştırır ve bunları çeşitli nihai ürünlere dönüştürür. Mikroorganizmaların gerçekleştirmiş oldukları fermantasyon sonucu elde edilen ürün “fermente ürün” adını alır. Fermente ürünler basit probiyotik yiyeceklerden alkollü fermente içeceklere veya gıda katkı maddelerinden kimyasal maddelerin üretimi ve hatta antibiyotik üretimine kadar değişkenlik gösterir. Örneğin, turşu ve yoğurt gibi fermente ürünlerin üretimi için laktik asit bakterileri görev alırken süreç laktik asit fermantasyonu adını alır. Ayrıca şarap ve bira gibi alkollü içecekler de fermente ürünler olup yapım aşamasında fermantasyon tekniği kullanılır.

Endüstriyel fermantasyon için kullanılan mikroorganizmalar ağırlıklı olarak bakteriler ve mantarlar olmakla birlikte bir mikrobiyal suş endüstriyel amaçla kullanılacak ise belli başlı özelliklerinin olması gerekir. Bunlar;

- Patojenik olmama,
- Büyük ölçekli kültürde üreme ve fermentöre kolayca inoküle edilebilme,
- İstenilen ürünü kısa zamanda üretebilme yeteneğidir.

Mikroorganizmaları doğrudan etkileyen çevresel faktörler yani büyüme ortam koşulları fermantasyon süreci üzerinde de etkilidirler. Bunlar arasında sıcaklık, pH, oksijen düzeyi, substrat içerik ve miktarı sayılabilir. Fermantasyon için kullanılan büyüme ortamları çeşitlilik gösterse de değişmez bileşenler; karbon

kaynağı, azot kaynağı, su, tuzlar ve mikro besinlerdir. Karbon kaynağı olarak şeker, şeker kamışı melası veya diğer karbonhidratlar kullanılır. Organizmaların proteinler, nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenleri sentezlemesi için sabit azot kaynağı gereklidir. Azot kaynağı olarak pepton, tripton amonyak veya nitrat tuzları kullanılır. Fosfor ise hücresel membranın yapısına katılan fosfolipidlerin üretimi ve nükleik asitlerin üretimi için gereklidir.

Bu çalışmada ağırlıklı olarak mikrobiyal fermantasyon yolu ile elde edilen, ticari değeri yüksek Glukonik Asit'in optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma olarak patojenik olmayan, büyük ölçekli üretimde rahatlıkla kullanılabilen ve istenilen ürünü kısa zamanda üretebilen *Aspergillus sp.* tercih edilmiştir.

1.1.1. Fermantasyon Teknikleri

Fermantasyon yolu ile ürün eldesinde kullanılan metotlar iki grupta toplanabilir.

1.1.1.1. Yüzeysel veya Üstel Fermantasyon Metodu

Yüzeysel fermantasyon tekniğinde mikroorganizmalar katı sıvı veya yarı katı besiyeri içerisinde ve yüzeyinde kolonize olabilirler. Fermantasyon işleminde katı besiyeri kullanılacaksa işlem katı hal fermantasyonu (solid state fermentation – SSF) adını alır. Katı besiyeri besleyiciliğinin yanı sıra destek görevi de üstlenir. Metot için maliyeti son derece düşük atık özelliğindeki ürünler kullanılır. Katı besiyerine şeker kamışı küspesi ve tahıl kepeği örnek olarak verilebilir. Mikroorganizma olarak katı yüzeye rahatlıkla tutunarak üretim ve gelişimlerini sürdürebildikleri için hifli yapıya sahip mantarlar tercih sebebidir.

Bu fermantasyon tekniğinde az su ihtiyacı, mantar sporların doğrudan kullanılması ve ucuz substrat kullanılması metodu avantajlı kılar. Tüm bu avantajlarının yanında yüzey alanının artırılması oksijen kullanımını arttıracığı için büyük ölçekli ürün eldesi mümkündür (Pandey, 2003).

1.1.1.2. Batch Fermantasyon Metodu

Bu yöntemde mikroorganizmalar besin çözeltisinin doğrudan içerisinde gelişir. Kesiklifermantasyon, yarı kesikli fermentasyon, sürekli fermentasyon olmak üzere 3şekilde uygulanır.

1.1.1.2.(1). Kesikli Fermantasyon

Kesikli fermentasyon sisteminde ilk olarak sıvı besiyeri hazırlanır ve biyoreaktöre doldurulur. İnokulum ile aşılır ve fermentasyon başlamış olur. Daha sonra biyoreaktöre hava beslemesi dışında hiçbir şey eklenmez. Fermantasyon ortamına besin eklenmeyip ürün çıkarma işlemi yapılmadığı için hacmen aynı kalır. İnkübasyon sırasında ortama besiyeri eklenmediği için besin konsantrasyonunda sürekli azalma meydana gelir. Yani substrat miktarı azalırken biyokütle miktarında artış gözlenir. Bununla birlikte ortamda çeşitli toksik maddeler birikir. Sistem lag fazı, log fazı, stationer faz, ölüm fazı şeklinde karakteristik büyüme eğrisi gösterir.

Fermantasyon tamamlanmasıyla birlikte biyoreaktör boşaltılır ve yeni bir işleme hazır hale getirilir. İşlem süresince ortama herhangi bir madde veya organizma ilavesi olmadığı için kontaminasyondan uzak çalışma gerçekleştirilmesi mümkündür.Düşük ürün eldesi sistemin dezavantajıdır.

1.1.1.2.(2). Yarı Kesikli Fermantasyon

Yarı kesikli fermentasyon tekniğinde sıvı besiyeri hazırlanır, biyoreaktöre eklenir ve inokulum aşılması gerçekleştirilerek fermentasyon işlemi başlatılır. Biyoreaktörefermantasyon işlemi süresince belirli aralıklarla substrat besleme yapılırken yine belli aralıklarla reaktörden ürün uzaklaştırma yapılır. Ortama sürekli substrat ilavesi yapıldığı için kültür ortamının hacmi zamanla artar. Besleme miktarı ve süreleri isteğe bağlı olarak değiştirileceği için farklı besleme metotları uygulanabilir. Bu sistemde ürün derişimi ve biyokütlerde sürekli artış gözlenir.Kesikli fermentasyona göre daha çok ürün eldesi mümkündür fakat ortama

sürekli bir girdi olduğu için kontaminasyonlara açık olması sistemin dezavantajını oluşturur.

1.1.1.2.(3).Sürekli Fermantasyon

Sürekli fermantasyon tekniği aynı zamanda açık uygulama sistemi olarak da adlandırılmaktadır.Teknikte biyoreaktöre sürekli steril besiyeri ilavesi gerçekleştirilir ve kültür ve ürün içeren ortam aynı oranda sistemden uzaklaştırılır. Böylece hacim ve kültür yoğunluğu daima sabit kalır. Kültür sürekli büyüme gösterir.Bu yöntem ile tek hücre proteini ve atık su arıtma işlemi gerçekleştirilir.

Çizelge 1.1 Batch fermantasyon çeşitleri

	Kesikli Fermantasyon	Yarı - Kesikli Fermantasyon	Sürekli Fermantasyon
Kültür Sistemi	Kapalı Sistem	Yarı Kapalı Sistem	Açık Sistem
Ortama Taze Besiyeri İlavesi	Yok	Var	Var
Kültür Hacmi	Sabit	Artar	Sabit
Atıkların Uzaklaştırılması	Yok	Yok	Var
Kontaminasyon	Minimum	Orta Düzey	Maximum
Büyüme Fazları	Lag, Log, Durgun And Ölüm Fazı	Lag, Log, Durgun And Ölüm Fazı	Lag And Log Fazı
Log Fazı	Kısa	Uzun	Uzun Ve Sürekli
Organizma Yoğunluğu	Zamanla Değişken	Zamanla Değişken	Sabit
Üretim Verimi	Düşük	Orta	Yüksek

Bu çalışmada kesikli fermantasyon tekniği kullanılmıştır. Endüstriyel fermantasyon işlemlerinde genellikle kesikli fermantasyon metodu kullanılır.

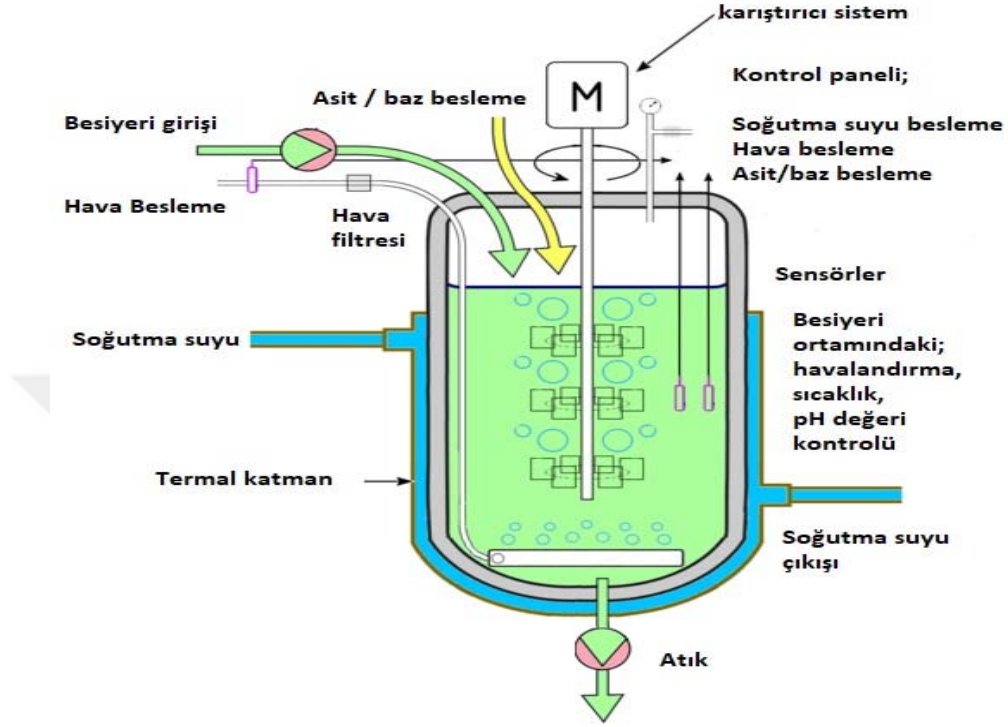
1.2.Fermentör (Biyoreaktör)

Fermentörler, fermantasyon işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılan tanklar olup biyoreaktörler olarak da bilinirler. Havalandırma, karıştırma oranı, sıcaklık, pH gibi parametrelerin doğrudan kontrol edildiği ölçüm cihazları ile donatılmış olup cam, metal malzeme kullanılarak yapılırlar. Büyük ölçekli endüstriyel fermentörler hemen hemen her zaman paslanmaz çelikten imal edilir. Fermentör üniteleri laboratuvar uygulamalı için 5 – 10 L hacimli olup büyük ölçekli endüstriyel üretimler için kullanılan tiplerinde hacim 10.000 L'ye kadar çıkar.

Anaerobik işlemler için kullanılan fermentörler tam kapalı sistemler oldukları için fermantasyon işlemi sırasında oluşan ısının uzaklaştırılması dışında fazladan ekipmana ihtiyaç duyulmaz. Aerobik fermentörler sürekli ve yeterli havalandırma gerektiği için ayrıntılı ekipman gerektirir.

Aerobik fermantasyon işlemlerinde mikrobiyal kültür ortamı yüksek popülasyon yoğunluğuna sahip olduğu için havalandırma sistemleri kritik öneme sahiptir. Bu tip üretimlerde kültür tarafından muazzam bir oksijen ihtiyacı vardır. Fermantasyon ortamı içinde zayıf bir şekilde çözünen oksijen, büyüme ortamı boyunca hızlı bir şekilde aktarılmaz. Bu nedenle, kültür boyunca oksijenin uygun şekilde havalandırılmasını sağlamak için stirrer adı verilen fermentör sistemine bağlı karıştırıcı metal aksam bulunur. Hava bu karıştırıcının alt kısmından tank içine dağılır. Karıştırma işlemi ile gaz kabarcıklarını sıvı kültür ortamına karıştırırken aynı zamanda mikrobiyal hücreler de ortam içine homojen dağılım gösterir. Sistemin bu şekilde çalışması mikrobiyal hücrelerin besin maddelerine homojen erişimini de sağlar.

Biyoreaktörler yardımıyla gerçekleştirilen endüstriyel fermantasyon işlemlerine su arıtımı ve farmasötik endüstride ilaç, antikor, aşı, antibiyotik üretimi veya mikrobiyolojik biyotransformasyon işlemleri örnek verilebilir.



Şekil1.1. Biyoreaktör (fermentör) (Lakna,2018)

1.3.Organik Asitler

Organik asitler, yapılarında daima karbon ve hidrojenin mevcut olduğu fakat oksijen, kükürt ve azot ve fosfor elementlerini de içerebilen ve asidik özellik gösteren organik bileşiklerdir. En yaygın organik asitlerden biri, RCOOH moleküler formülüne sahip olan karboksilik asittir. Organik asitler gıda endüstrisinden farmasötik endüstriye pek çok alanda kullanılırlar. Organik asitler gıda koruyucusu olarak sıklıkla karşımıza çıkar. İyonlaşmamış organik asitler bakteri hücre duvarı içine pasif olarak difüze olurlar pH duyarlılığına sahip bakterilerde bu durum bakteri iç pH'ını düşürür ve bu da bakteri büyümesini engelleyerek bir süre sonra organizmanın ölümüne neden olur. İyonize formdaki

organik asitler ise bakteri içinde birikerek metabolik işlevi bozmasının yanında ozmotik basıncın artışına neden olarak yine organizmanın ölümüne sebep olur.

Organik asitler çeşitli bitki ve hayvan substratlarında doğal olarak bulunmalarının yanı sıra doğal biyokimyasal metabolizmanın sonucu olarak ortaya çıkmaktadırlar (Theron ve Lues, 2011).

Organik asitlerde asitlik derecesi zincir uzunluğuyla ilgili olup kısa zincirli organik asitlerin asitlik derece uzun zincirli olanlara kıyasla daha fazladır.

Organik asitler zayıf asitler olup güçlü asitlerin yaptığı gibi suda tamamen çözünmezler. Fakat çoğu organik asit organik çözücülerde çok iyi çözünür.

Organik asitler yapılarındaki karboksil grubu sayısına göre sınıflandırılırlar. Buna göre organik asitler monokarboksilli, dikarboksilli ve trikarboksilli asitler olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar.

Canlı hücreler tarafından üretilen sitrik, glukonik, ikonik ve laktik asit gibi organik asitler mantar kullanılarak büyük ölçekli biyoproseslerle ticari olarak üretilir. Sitrik asit ve glukonik asit, *Aspergillus niger*'in seçilmiş suşları kullanılarak glukozdan veya sükrozdan ticari olarak üretilen mantar organik asitlerin en büyüğüdür. İtakonik asit, *Aspergillus terreus* ve *Zygomycetae fungus Rhizopus oryzae* türleri kullanılarak üretilir. Oksalik, fumarik ve malik asit gibi diğer fungal asitler şu anda küçük piyasa talebi nedeniyle daha ekonomik kimyasal dönüşüm yolları ile üretilmektedir.

1.4.Enzimler

Enzimler canlı organizmalarda reaksiyon sonunda tüketilmeyen, aktivasyon enerjisini azaltarak metabolik reaksiyon hızını arttıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin küçük bir grubu RNA katalitik birimlerinden oluşurken genellikle çoklu protein alt birimlerinden meydana gelen multiprotein komplekslerdir (Harvey ve ark, 2007). Katalize edilmemiş bir reaksiyona göre reaksiyon hızını 10^6 - 10^{14} kat arttırırlar.

Hücre içindeki organik maddelerin anabolik ve katabolik reaksiyonlarının tümü enzim etkisi ile mümkün olmaktadır. Bu nedenle yaşam, enzimlerin faaliyetleri sonucu meydana gelen sistemdir ve doğal olarak enzimler sadece canlılar tarafından sentezlenirler (Lehninger,1982).

Ekmek ve bira yapımı gibi enzimlerin başrol oynadığı işlemler ilk enzimolojik ve biyoteknolojik çalışmalar olarak tanımlanabilir. Enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak 1700'lerin sonlarında ve 1800'lerin başlarında karşımıza çıkar. 1783 yılında Spallanzani'nin etin mide salgıları ile sindirimi üzerine yapmış olduğu çalışma ve 1811 yılında Kirrchoff'un bitki özlerindeki nişastanın tükürük ile şekere dönüşümüne dair çalışması enzimoloji alanındaki ilk bilimsel çalışmalar olarak kabul edilir (Telefoncu,1999).

Endüstriyel biyoteknoloji alanında bitkisel ve hayvansal orijinli enzimler tercih edilse de genellikle maliyet ve yüksek katalitik aktiviteleri göz önüne alındığında mikroorganizma orijinli enzimler tercih sebebidir.

1.4.1.Enzimlerin Yapısı

Enzimler, üç boyutlu yapıya sahip 100-500 aminoasit uzunluğunda protein makromoleküller olup substratları için son derece spesifikler. Enzimler, laboratuvar ortamında gerçekleşmesi zorlayıcı koşullar ve bazen uzun sürelere ihtiyaç duyulan pH, sıcaklık ve basıncın yaşam sınırlarındaki alt ve üst limitlerini gerektiren reaksiyonlara kıyasla hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa süre içerisinde gerçekleşmesini mümkün kılan katalizleme yeteneğine sahiptirler (Stryer,1981).

Bazı enzimler yalnızca mevcut protein yapıları ile katalizleme işlemini yerine getirirler. Bazı enzimler ise katalizleme işlevlerini yerine getirirken mevcutta bulunan protein yapılarına ek inorganik veya organik yapılara ihtiyaç duyarlar. Bu maddelere kofaktör adı verilir. İnorganik kofaktörlere metal iyonları, organik kofaktörlere koenzim adı verilir. Oluşan enzim-kofaktör birlikteliği ise holoenzim olarak adlandırılır. Yapısına kofaktör katılmamış inaktif durumdaki

holoenzime apoenzim denir. Apoenzim yapısına kofaktör katılırsa holoenzim katalitik olarak aktif hale gelir.



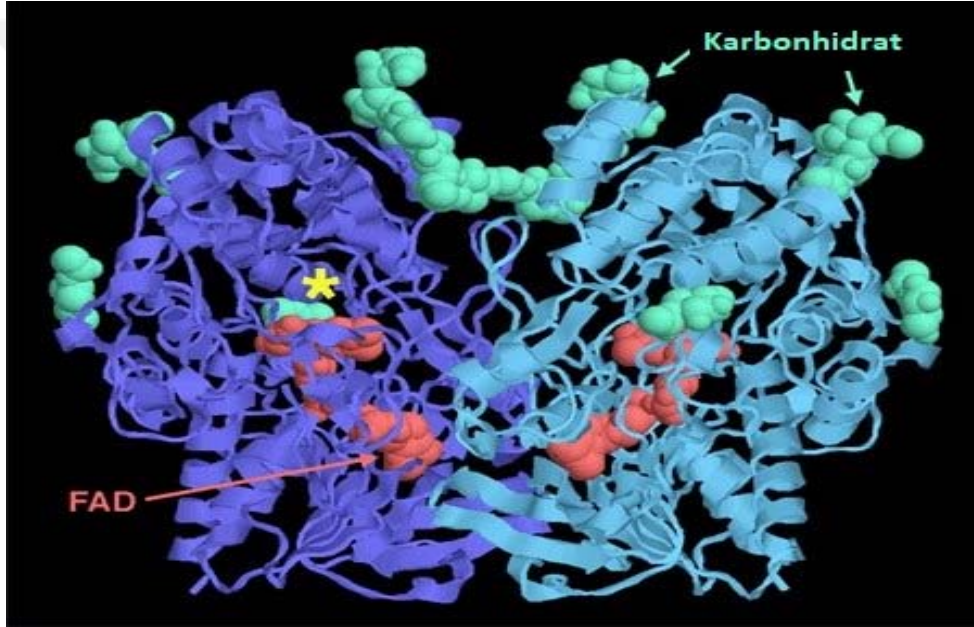
Şekil 1.2 Enzim yapısı

1.4.2. Glukoz Oksidaz

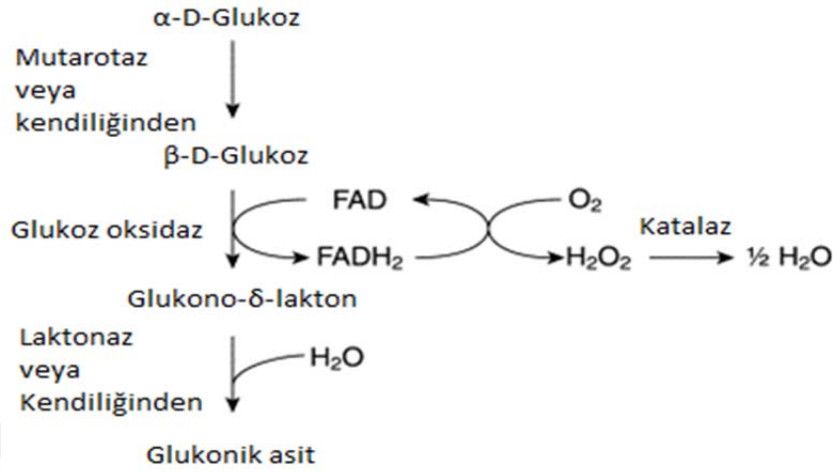
Glukoz oksidaz (β -D-glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz), moleküler oksijeni kullanarak β -D-glukozun glukonik aside oksidasyonunu katalize ederken süreç içerisinde eş zamanlı olarak hidrojen peroksit üretimi gerçekleşir. GOD gıda maddelerinin lezzeti, rengi, oksijenin ortamdan uzaklaştırılmasıyla raf ömrünün uzatılmasına kadar pek çok ticari alanda karşımıza çıkar (Pluschkell ve ark, 1996).

Glukoz oksidaz, moleküler kütlesi ve kaynağına bağlı olarak 120 kDa ile 290 kDa arasında çeşitlilik gösteren, dimerik veya tetramerik bir proteindir. Molekülde kaynak ve yapıya bağlı olarak %10-24 karbonhidrat bileşimi içerir. Yapıdaki her bir monomerin kofaktör olarak flavin adenin dinükleotid (FAD) bulunur. Bir glukoz oksidaz molekülünde iki FAD bağlanma bölgesi vardır. FAD çıkarıldığı zaman geriye kalan apoenzim yapısı biyolojik olarak aktifliğe sahip değildir. FAD kofaktörü yapay veya doğal yollardan tekrar apoenzim yapısına bağlanabilir. FAD'ın reaksiyondaki görevi elektron akseptörü gibi davranarak glukozu yükseltgemektir. Hidrojen FAD'ye aktarılırken, glukozun glikon-D-laktona dehidre edilir. Bu arada moleküler oksijeni indirger ve H_2O_2 oluşur ve böylece FAD tekrar oksitlenmiş forma dönüşür. Oluşan H_2O_2 anti

mikrobiyal aktivite gösterir (Keilin ve Hartree, 1948). Glukoz oksidazın enzimatik aktivitesi, ortamda biriken hidrojen peroksit konstanrasyonu ile doğrudan ilgilidir. Yüksek hidrojen peroksit akümülayonu glukoz oksidaz aktivitesini azaltır (Kleppet, 1966). Enzim aktivitesi sonucu ortamda akümüle olan glukonik asit, çözeltinin pH'ını düşürür bu da GOD aktivitesini azaltır. GOD'un katalizleme aktivitesi sonucu açığa çıkan hem glukonik asit hem de hidrojen akümülayonu şaşırtıcı bir şekilde GOD'un inhibisyonu ile sonuçlanabilir (Miron ve ark, 2004).



Şekil 1.3Glukoz oksidaz yapısı (Goodsell,2006)



Şekil 1.4. Glukoz oksidaz ve glukonik asit(Sauer ve ark, 2013)

1.4.2.1.Glukoz Oksidaz Kullanım Alanları

Glukoz oksidaz gıda endüstrisinde genellikle antioksidan, koruyucu ve stabilizatör özellikleri ile sınıflandırılır. Glukoz oksidaz, likid ya da toz formda gıda maddelerine eklenmektedir. Gıda maddesi içerisindeki glukozun glukonik asit ve hidrojen peroksit katalizlendiği için meydana gelen hidrojen peroksit anti-fungal ve anti-bakteriyel özellik göstererek ürünün bozulmasını engeller. Glukoza glukonik aside ve H₂O₂'ye oksitlendiği için genellikle şeker ihtiva eden içeceklerin raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılır. Glukoz oksidaz fırıncılıkta da kullanılır. Süne nedeniyle gluten çapraz bağları bozulan unlar ekmek yapımında kullanılamaz. Glukoz oksidaz aktivitesi sonucu açığa çıkan hidrojen peroksit bu çapraz bağları onararak unu tekrar işlevsel hale getirir ve ekmeğin dokusunu güçlendirerek hacim kazanmasına yardımcı olur.

Glukoz oksidaz tarafından katalize edilen reaksiyonda glukonik asit molekülü üretimi için glukoz ve oksijen molekülü tüketimi gerçekleşir. Bu durum GOD'un aktif bir oksijen tutucu rol kazanmasını sağlar. Gıda maddelerine GOD ilavesi ile oksijen giderimi sağlanır. Örneğin konserve, yüksek yağ içeren mayonez ve salata gibi ürünler ortamda oksijenin olması bakteriyel büyümeyi teşvik ettiği

içinçabuk bozulma gerçekleşir. Bu nedenle anaerobik bir ortamı korumak veya var olan oksijeni minimum düzeye indirmek amacıyla GOD ile oksijen uzaklaştırılır.

Kuru yumurta tozu hazırlamak için de glukoz oksidazdan yararlanılır. GOD kullanılmadan üretilen yumurta tozlarında protein ve aminoasitlerin aminoşeker gruplarıbozunarak istenmeyen esmerleşmeye ve istenmeyen tat oluşumuna neden olmaktadır. Bu durumun giderimi için glukozun yapıdan uzaklaştırılması gerekir.GOD kullanılarakglukoz giderimi ile istenilen görüntü ve tada kavuşulurkenhidrojen peroksit etkisi ile gelişen mikrobik tolerans avantajı uzun raf ömrü eldesi sağlar.Patates ürünlerinde de aynı sorun mevcuttur.GOD, glukoz içeriğini azaltarak kızarıırken kahverengileşmeyi azaltmak için kullanılabilir (Low ve ark, 1989).

1.4.3.Katalaz

Katalaz, aerobik solunumun bir yan ürünü olarak üretilen hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene ayrıştırılmasını sağlayan oksidoredüktaz enzimidir. Dolayısıyla bir antioksidan görevi görerek hücreyi oksidatif strese karşı korur.Katalaz, her biri 500 aminoasit uzunluğunda olan dört polipeptid zincirinin bir tetrameridir. Enzimin hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesini sağlayan dört porfirin demir grubu içerir. pH 4 - 11 aralığında oldukça geniş bir çalışma aralığına sahip olup 240 kDa ağırlığa sahip bir enzimidir. Katalaz aerobik organizmaların tamamında karşımıza çıkar (Bergmeyer ve Grabl, 1983). CAT'ın başlıca fonksiyonu, ortamda moleküler oksijen bulunması durumundametabolizma faaliyeti sonucu sentezlenenen hasar verici radikal türü olan hidrojen peroksidin giderimini sağlamaktır. Hidrojen peroksit hücresel membranlarda geri dönüşü olmayan hasarlara sebep olabilir. CAT bu hasarı engelleyen bir enzimidir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Hidrojen peroksit sadece metabolizma faaliyeti sonucu oluşmakla kalmayıp suyun iyonize radyasyona maruz kalması sonucu da meydana gelebilmektedir.Yarılanma ömrü oldukça kısadır fakat karşılaştığı her biyomolekül ile tepkimeye girerek hasar oluşturur.Öncelikli hedefi pürin-pirimidin gibi nükleik

asitler, aromatik aminoasitler gibi elektronca zengin bileşiklerdir (Halliwell ve Gutteridge., 1989).

1.4.3.1.Katalaz Kullanım Alanları

Gıda sektöründe pastörizasyon işleminde uygulanan yüksek ısı, peynire lezzet kazandıran enzimlerin yapısını bozduğu için pastörizasyon yerine yapım aşamasında doğal süt enzimlerini korumak için güçlü oksitleyici özelliği olan ve hücreler üzerindeki toksik etkisi ile hidrojen peroksit kullanılır. Bu işleme soğuk pastörizasyon denir. Bununla birlikte uygulama sonrası sütteki hidrojen peroksit kalıntıları, gerçek peynir üretim işlemi için gerekli olan bakteri kültürlerini engelleyebilir. Bu nedenle tüm H_2O_2 kalıntılarının uzaklaştırılması gerekir. Uzaklaştırma işlemi için karşımıza katalaz çıkar. Bu işlem pastörizasyona oranla son derece düşük maliyet gerektirir (Geciova ve ark, 2002).

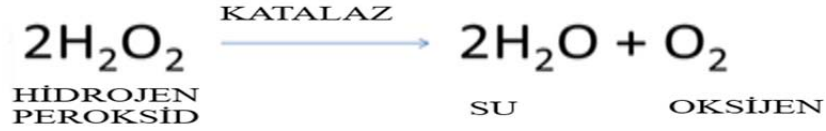
Gıda bozulmalarının temeli bileşenlerin oksidasyonu veya bakteri, küf gibi mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu meydana gelir. Gıda maddelerinin muhafazası için oksijenden arınmayı sağlayacak glukoz oksidaz - katalaz bazlı gıda ambalajları veya ambalaj malzemeleri kullanılabilir. Bu uygulamada glukoz oksidaz aktivitesi sonucu hidrojen peroksit giderimi gerekeceği için ortama katalaz ilavesi zorunluluk arz eder (Floros ve ark, 1997).

Tekstil endüstrisinde kumaş ağartma işleminde ağartma maddesi olarak hidrojen peroksit kullanılır bunu parçalamak için katalaz kullanımı gereklidir. Bu işlemde sıcaklığın $60^{\circ}C$ 'nin üzerinde ve yüksek pH değerlerinde gerçekleşir. Bu nedenle bu ekstrem koşullar için alkali organizma katalazından faydalanılır.

1.5.Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Biyolojik sistemlerdeki en toksik radikaldir. Karşılaştığı tüm biyomoleküllerle reaksiyona girer. En büyük hasarı zar yapısındaki lipitlere verir. Lipitlerin zarar görmesi sonucu zar geçirgenliğini artar ve bu kontrolsüzlük hücre ölümüne neden olabilir (Nishiyama ve ark, 1998). Organizmalarda hidrojen

peroksidi ortamdan kaldırmanın en bilinen yolu katalazla su ve oksijen molekülüne ayrıştırmaktır.

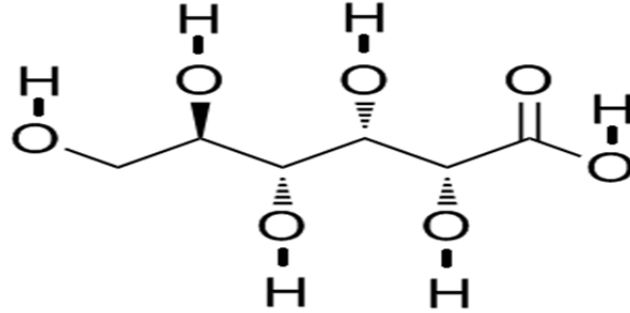


Şekil 1.5. Hidrojen peroksit ve katalaz

Hidrojen Peroksit güçlü bir ağartıcı ve oksitleyicidir. Bu nedenle tekstil endüstrisinde kumaş ağartma ve kâğıt endüstrisinde geri dönüşüm kâğıt ağartma işleminde, şeker endüstrisinde parlak şeker eldesi için kullanılır. Ayrıca gıda endüstrisinde ürünlerin raf ömrünü uzatan anti mikrobiyal madde olarak ve sütte, buğday ununda, yemeklik yağda beyazlatıcı ajan olarak kullanılır. Kozmetik ve ilaç endüstrisinde ise antiseptik özelliği nedeniyle kontakt lens çözeltisinde ve enfeksiyon önlemek amacıyla, dezenfektan özelliği nedeniyle cerrahi aletler için kullanılır. Kozmetikte diş beyazlatma, saç ağartma solüsyonları için kullanılır.

1.6.Glukonik Asit

Glukonik asit, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$ moleküler formülüne sahip organik bir bileşiktir. 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanoik asidin 16 stereoizomerinden biridir. Yoğunlaştırılmış yapısal formülü $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})4\text{COOH}$ 'dir. Nötr pH'lı sulu çözeltilerde glukonat iyonunu oluşturur. Glukonik asidin tuzları glukonatlar olarak bilinir.



Şekil 1.6. Glukonik asit

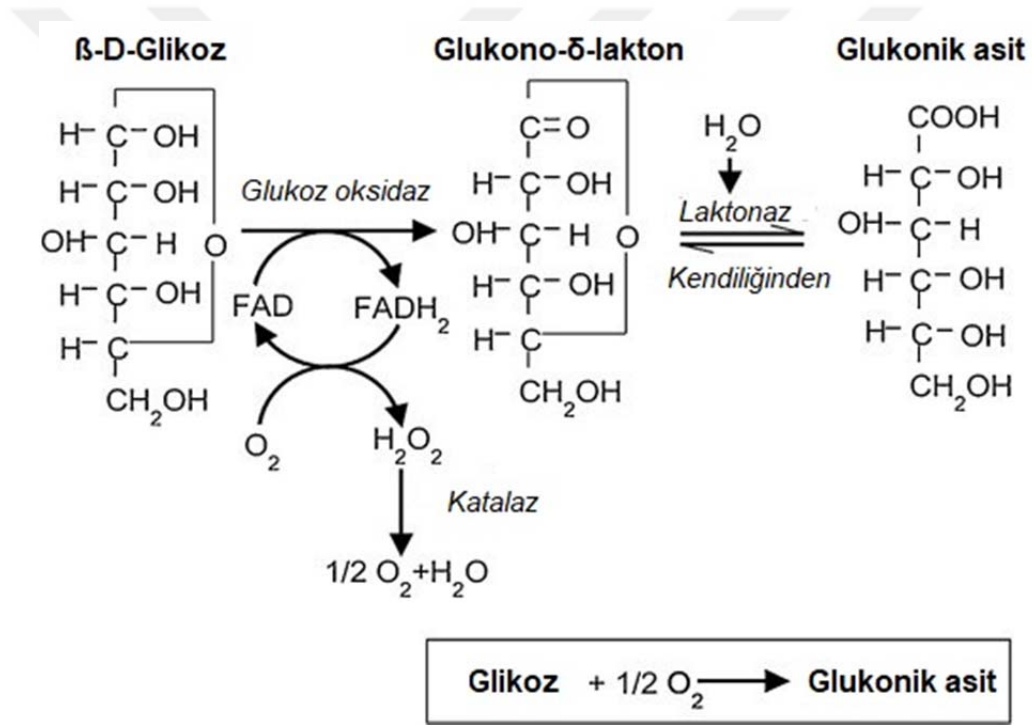
Glukonik asit ve türevleri pek çok endüstriyel ürünlerde ve proseslerinde kullanılırlar. Kozmetik ürünleri, deterjanlar, beton üretimi, zirai ürünler, metal ve yüzey kaplamaları, mikro elektronik sektörü bu ürünlerin kullanıldıkları sektörlere örnek olarak sayılabilir.

Glukonik asit ve türevleri pek çok endüstriyel uygulamada kullanılırlar. Özellikle, endüstriyel temizleyicilerde, su şartlandırma ürünlerinde, şişe yıkama ajanlarında, deri, kağıt ve tekstil sanayisinde “kompleks yapıcı” ve “demir bağlayıcı” olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar.

Glukonik asit (pentahydroxycaproic asit) glukoz oksidaz ile katalize edilen basit bir dehidrojenasyon reaksiyonu yoluyla glukozdan elde edilir. β -D-glukozun 1.C atomu üzerindeki aldehit grubunun bir karboksil grubuna oksidasyonu sonucu Glukono- δ -lakton ($C_6H_{10}O_6$) ve hidrojen peroksit üretimi ile sonuçlanır. Ayrıca hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından su ve oksijene ayrıştığı zaman Glukono- δ -lakton, kendiliğinden veya lakton hidrolize edici enzim yoluyla glukonik aside hidrolize olur. Glukozun yaklaşık %100’ü, uygun koşullar altında glukonik aside dönüştürülür.

Çizelge 1.2. Glukonik asit isimleri

GUKONİK ASİT İSİMLERİ	
IUPAC	D-Gluconic acid
Sistematik IUPAC	(2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-Pentahidroksiheksanoik asit
Diğer	Dextronic acid Maltonik Asit Pentahidroksikaproik asit



Şekil 1.7. Glukonik asit reaksiyon yolu (Ramachandran ve ark, 2006)

Yenilenen ham madde kaynaklarındaki glukozun oksidasyonu sonucu oluştuğu için glukonik asit ve türevleri doğada yaygın olarak bulunurlar ve rahatlıkla parçalanabilirler. Bu özellikleri nedeniyle güvenli maddeler olarak kabul

edilirler. Glukonik asit, meyvelerde, bitkilerde ve bal gibi doğal ürünlerde ve şarapta doğal olarak bulunan yumuşak bir organik asittir.

Çizelge 1.3. Glukonik asitin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Ramachandran ve ark, 2006)

GLUKONİK ASİDİN FİZİKSEL ve KİMYASAL ÖZELLİKLERİ	
Kimyasal formülü	C ₆ H ₁₂ O ₇
Pka	3.7
Moleküler ağırlık	196.16 g/mol
Erime noktası (% 50 çözelti halinde)	12 °C'den düşük
Kaynama noktası (% 50 çözelti halinde)	100 °C'den yüksek
Yoğunluk	1.24 g/mL
Görünüm	Temiz kahverengi
Kristal hali	Beyaz, toz (susuz)
Çözünürlük	Suda iyi, alkolde çok az çözünür, organik çözücülerde çözünmez
Tadı	Yumuşak, ferah
E numarası	574 (asitlik düzenleyici)
pH	1,8 (% 50'lik çözeltisinde)

1.6.1. Glukonik Asit Üretim Yöntemleri

Ticari olarak, glukonik asit üretiminin kimyasal, elektrokimyasal, biyokimyasal ve spesifik mikroorganizmalar ile fermentasyon gibi farklı yöntemleri vardır.

Diğer işlemler fermentasyon ile karşılaştırıldığında daha masraflı ve daha az verimli görünmektedir. Bu durumda, fermentasyon glukonik asit üretimi için

etkili ve baskın tekniklerinden biri olmuştur. Çeşitli mikrobiyal fermentasyonsüreçlerinin arasında *Aspergillus niger* ile kullanan yöntem en yaygın kullanılanlardan biridir (Ramachandran ve ark, 2006).

Glukonik asit kimyasal ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak elde edilebilse de biyoteknolojik yöntemler endüstriyel ölçekteki üretimlerde daha çok tercih edilir.

1.6.1.1.Kimyasal Üretim

Glukonik asit üretimi için kimyasal, elektrokimyasal, biyokimyasal ve biyo-elektrokimyasal metotlar bulunmaktadır. Atmosferik oksijenle birlikte katalizör olarak Pt, Pd veya Au kullanılması ile glukoz oksidasyonu sonucu glukonik asit eldesi mümkündür. Reaksiyonda katalizörün inaktif olmasını engellemesi ve reaksiyon hızını arttırıcı özellik göstermesi nedeniyle alkali pH (9-10) tercih edilir.Reaksiyonda Bizmut elementinin kullanılması katalitik aktiviteyi arttırsa da katalizörlerin sızıntıya karşı zayıf stabilite göstermeleri elde edilen glukonatın farmasötik ve beslenme amacıyla kullanımını engeller.

Au,kararlı olmasının yanı sıra yüksek seçiciliği ile ideal katalizör olarak kabul edilir (Zhang ve ark, 2012). Ishida ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre atmosferik oksijen kullanılmış ve Au katalizörlüğünde 50 °C'lik bir reaksiyon sıcaklığında % 98 verimle glukozun glukonik aside oksidasyonunu raporlamışlardır. Au katalizörlüğündeki glukonik asit oksidasyon reaksiyonlarında etkinlik ikinci katalitik döngü sonrası azalır. Bu durum endüstriyel kullanımı engelleyen en önemli faktördür.

Pd ve Pt katalitik oksidasyonlarında istenmeyen yan reaksiyonlar meydana geldiği için tercih edilmezler. Reaksiyon hızını artıran ve katalizörün inaktivasyonunu önleyen alkalın pH (9-10) tercih edilir.

Katalizör maliyetinin yüksek oluşu, deaktive olmaları, sızıntı ihtimali ve katalizörün geri kazanımın zor olması kimyasal üretimin dezavantajıdır.

Fermantasyon ile üretime kıyasla kimyasal üretimde daha az verim elde edilir ve proses oldukça maliyetlidir.

Benzer problemler, çoğu halojen oksidasyon potansiyeline dayanan elektrokimyasal proseslerde de karşımıza çıkar. Proseste 1 - 20 A / dm² akım yoğunluğunda bromid içeren bir glukoz çözeltisi (glukoza göre yaklaşık% 10 mol) elektrolize edilir. Meydana gelen asidi nötralize etmek için kalsiyum karbonat gibi karbonatlar veya hidroksit eklenir. Ürün verimi% 80 - 97'dir. Son yıllarda elektrik maliyetindeki hızlı artış, elektrolitik süreci rekabetsiz hale getirmiştir.

1.6.1.2.Mikrobiyolojik Üretim

Aspergillus spp., *Penicillium spp.*, *Gliocladium spp.*, *Fusarium spp.*, ve *Mucorspp.*, gibi özellikle ipliksi mantarlar başta olmak üzere *Gluconobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, veya *Acetobacterspp.*, cinsinin bakteri türleri gibimikroorganizmaların geniş bir grubu glukonik asit üretebilmektedir (Cochrane, 1958; Lockwood, 1975). Endüstriyel fermantasyon açısından baktığımızda özellikle *Aspergillus niger* glukonik asit üretiminde büyük önem taşır. *Aspergillus niger*, glukozun glukonik aside dönüştürülmesi için gerekli olan glukoz oksidaz, katalaz, laktonaz ve mutarotazı da kapsayan bütün enzimleri üretir (Ramachandran ve ark, 2006).

Mikrobiyolojik üretim proseslerindemısırs nişastası hidrolizatları, pirinç nişastası hidrolizatları, yoğunlaştırılmış peynir altı suyu, hidrolize patates, selülozik madde, şeker kamışı melası, muz ve üzüm pekmezi gibi tarıma dayalı (Agro) sanayi yan ürünlerindeki sükroz, fruktoz, glukoz, maltoz ve ksiloz gibi farklı karbon kaynaklarısubstrat olarak kullanılabilir. Bu prosesi son derece ekonomik hale getirir.Bununla birlikte bu substratların fermantasyonda kullanılması için önce sıvılaştırma ve sterilizasyon gibi ilave işlemlere ihtiyaç duyulması maliyetin artmasına neden olur.Glukozdan glukonik asit üretimi için mikroorganizma kullanılarak fermantasyon işlemi, bilinen en kolay ve ekonomik işlemdir. Bununla

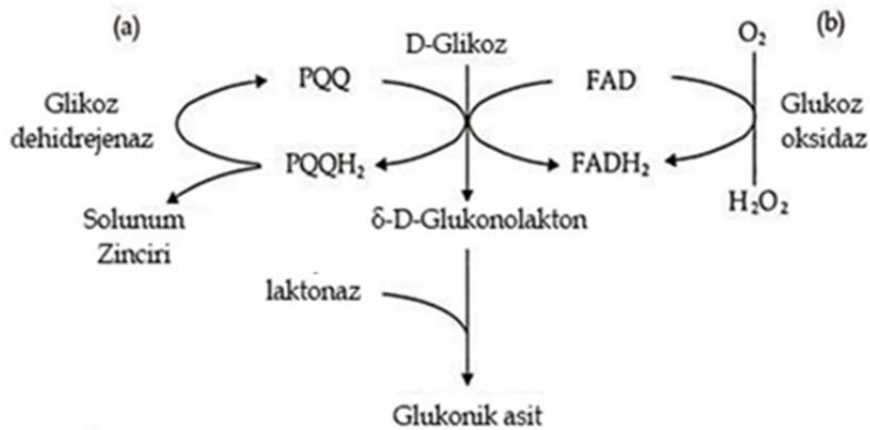
birlikte, sentezi gerçekleştiren mikroorganizma ve ürünün separe işleminin zorlukları ve yan ürün sentezinin kontrolü gibi dezavantajları bulunmaktadır.

1.6.1.2.(1).Bakteriler

Glukoza glukonik aside metabolize edebilen *Pseudomonas* spp.,ve *Zymomonas* spp., gibi çeşitli bakteri grupları bulunmaktadır.Reaksiyonda hücre zarına konumlanmış olan glukonik asit dehidrojenaz (GADH), glukoz dehidrojenaz (GDH) ve 2-ketoglukonat dehidrojenaz (KGDH) enzimleri görev alır.

Bakteriyel glukonik asit sentezi gerçekleştikten sonra glukonik asit hücre içine alınarak pentoz fosfat yolundaki reaksiyonlar ile katabolize edilir.Enzimlerin aktivasyonu ortamdaki glukozkonsantrasyonu ile ilişkilidir. Konsantrasyon 15 mM'den büyük olduğunda pentoz fosfat yolu bastırılır ve glukonik asit birikimi gerçekleşir.

Bakteriler tarafından glukonik asit üretimi mantarların glukonik asit üretiminden oldukça farklı bir metabolik yol izler.Bakteriyel glukonik asit sentezinde glukoz dehidrojenazın koenzimi PQQ (pirolokinolin kinin)'dur. Fungal glukonik asit sentezinde glukoz oksidazın koenzimi FAD' dır.



Şekil 1.8. Glukonik asit oluşumunda enzimatik farklılık (a) *G.suboxydans* (b) *A.niger*

Gluconobacter oxydans, fosforilasyon ve oksidasyon yolu ile glukozu okside ederek glukonik asit ve ketoglukonik asitin sentezini gerçekleştiren iki farklı yolağa sahiptir. Glukozu hidrojen peroksit oluşumu olmadan doğrudan glukonolaktona dönüştüren iki tip glukoz dehidrojenaz içerir. *Gluconobacter oxydans* ile optimum koşullar altında % 75-80 arasında glukonik asit üretimi elde edilmiştir. *Gluconobacter oxydans* optimum şartlar sağlanamasa dahi yüksek oksidatif aktiviteye sahip olması nedeniyle biyoteknolojik üretim için son derece uygun (Olijve ve Kok, 1979) olsa da üretim sırasında glukonik asidin işlenmesini ve izole edilmesini zorlaştıran nispeten büyük miktarda keto asit ürettiği bulunmuştur (Anastassiadis ve ark,1999).

Bakteriyel glukonik asit üretimi, istenilenden farklı organik asit sentezine yol açan ikincil reaksiyonlarla ilerlediğinden endüstriyel ölçekte sınırlı bir başarıya sahiptir.

1.6.1.2.(2).Mayalar

Anastassiadis ve arkadaşlarının (2005) *Aureobasidium pullulans* kullanılarak yapmış oldukları optimizasyon çalışmalarında pH 6.5'da % 87.1'lik ürün verimi elde edilmiştir. pH 4.5'te verim çok düşmüş ve sırasıyla % 67.8 ve % 20.7 olmuştur. 29 ila 31°C sıcaklık aralığının, maya ile glukonik asit üretimi için optimum sıcaklık olarak saptanmıştır. 31°C üzerindeki bir derece artışın biyokütle ve ürün veriminde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

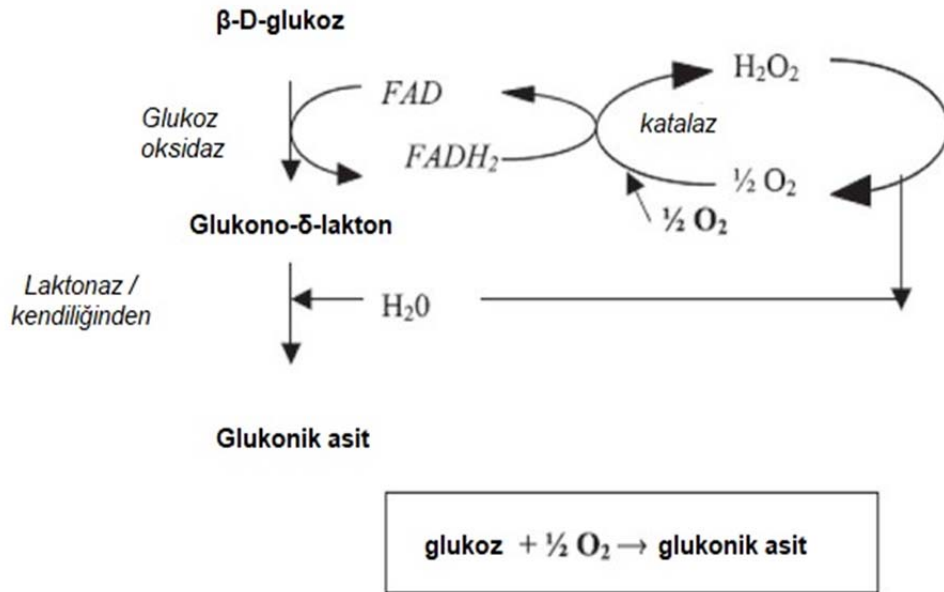
1.6.1.2.(3).Mantarlar

Mantarların temel özelliklerinden biri, ekolojik açıdan son derece önemli olan, büyüme sırasında organik asitler üretme kabiliyetleridir. Habitatın asitleşmesi konak bakterilere karşı rekabet avantajı anlamına gelir (Ruijter ve ark, 2004)

Filamentli mantarlar tarafından gerçekleştirilen glukozun glukonik aside oksidasyonu, yüksek oksijen gerektiren aerobik fermentasyon prosesidir. Prosesi glukozoksidaz katalize eder. Glukoz oksidaz, ağırlıklı olarak hücre duvarı ve hücre

dışı sıvı içinde bulunan bir flavoproteindir. Bu biyotransformasyonda glukoz oksidazın katalizörlüğünde; D-glukoz, hidrojen giderme reaksiyonu ile d-Glukono- δ -Lakton'a dönüştürülür ve hidrojen peroksit açığa çıkar. Hidrojen Peroksit daha sonra katalaz etkisi ile oksijen ve suya ayrıştırılır. Laktonun kendiliğinden(nötr veya alkali pH'da) veya katalitik hidroliz yolu ile ayrışır ve glukonik asit açığa çıkar.

Endüstriyel üretimlerde en yaygın kullanılan mikroorganizma, *Aspergillus niger*'dir (Silvia ve ark, 2008). *A. niger* kullanılarak endüstriyel fermentatif glukonik asit üretiminde farklı glukoz besleme stratejileri veya daha uygun suşları deneyerek üretim verimini artırma konusunda çalışmalar devam etmektedir. Ekstraselüler olarak yüksek düzeyde glukoz oksidaz salgılayan mutant çalışmaları bunlara örnek verilebilir.



Şekil 1.9. Glukonik asit formasyonu (Ramachandran ve ark, 2006).

Aspergillus niger, glukozun glukonik aside biyotransformasyonu için gereken glukoz oksidaz, laktonaz, katalaz ve mutarotaz içeren tüm enzimleri üretir.

Organizma yapısındaki laktonaz dönüşüm reaksiyonuna dahil oluşu için kendiliğinden dönüşüm için fazladan zaman gerekmez. Glukonik asit primer metabolit olmadığı için sürekli ürün eldesi mümkün olmaz. Bu nedenle proses partiler halinde gerçekleştirilir. *Aspergillus niger* kullanılan endüstriyel proseslerin çoğunda, az miktarda azot bileşiği ($> 20 \text{ mM N / P}$) kullanılarak pH4,5-6,5 aralığındaki fermantasyon ortamında partiler halinde gerçekleştirilir. *A. niger* ile glukozun glukonik aside biyo-transformasyonunda optimum koşullar altında glukozun neredeyse tamamı glukonik aside transforme olur fakat miseller proses boyunca hızla gelişeceği için oksijenden faydalanmayı dolayısıyla prosesi inhibe eder. Bu nedenle homojen havalandırma ve misel morfolojisinin kontrolü için karıştırma hızı büyük önem taşır.

Alternatif mikrobiyal suşlar ve glukoz besleme yöntemleri de değerlendirilmiştir. *Penicillium* ile yapılan üretimlerde azot kaynağı olarak çeşitli mineral tuzları ve mikolojik pepton ile kullanılırsa saatte 2.02 g GA dönüşüm oranı elde edilebilir (Crognale ve ark,2008).

1.6.2.Glukonik Asit Tarihçesi

Glukonik asit üretimi, Hlasiwetz ve Habermann keşfi ile 1870 yıllarına kadar uzanmaktadır. 1922 yılında Molliard şimdi adı *Aspergillus* olarak bilinen *Sterigmatocystis nigr*a 'da glukonik asit üretimini tespit etti. Daha sonra, *Pseudomonas*, *Gluconobacter*, *Acetobacter* gibi bakteriyel türlerde ve çeşitli mantar türlerinde glukonik asit üretimi gösterilmiştir. Bernhauer'in çalışmaları yüksek pH'nın kalsiyum karbonat ile önlendiğinde glukonik asit üretim veriminin arttığını göstermiştir.

Currie ve arkadaşları (1931), *Penicillium Luteum* ve *A. Niger*'in 48 - 60 saat arasında % 90'a kadar glukonik asit verimi veren, submerged kültürünü içeren bir patent başvurusunda bulunmuştur. Daha sonra Moyer ve arkadaşları (1937), pilot çalışmalarında *A. niger*'i kullandı ve 24 saatte 150 ila 200 g / L'lik glukoz solüsyonunda teorik verimin % 95'ini kadar yüksek bir oranda üretti.

Mevcut sodyum glukonatın ticari üretimi Blom ve arkadaşları (1952), tarafından geliştirilen, *A. niger* ile submerged fermantasyon prosesine dayanır. Bu proses feed-back glukoz beslemeli kültürasyon ve nötralize edici ajan olarak sodyum hidroksit kullanımını içerir. pH 6.0-6.5'te ve sıcaklık yaklaşık 34 ° C'de tutulur. Bu işlemin verimliliği çok yüksektir, çünkü glukoz saatte 15 g / L oranında glukonik aside dönüştürülür.

1.6.3.Glukonik Asit'in Endüstriyel Alanlarda Kullanımı

Glukonik asit aşındırmayan, toksik olmayan, kokusuz, tahriş etmeyen, kolaylıkla biyolojik olarak bozunabilir, hafif asidik, uçucu olmayan bir organik asittir. Multifonksiyonel bir karbonik asit olarak, glukonik asit ve onun kalsiyum glukonat ve sodyum glukonat gibi alkali tuzları kimyada, farmasötik, yiyecek, meşrubat ve inşaat endüstrilerinde yaygın olarak kullanılır (Ramachandran ve ark, 2006).

1.6.3.1.Çimento Sanayi

Glukonik asit betonun priz süresin gecikmesi ile birlikte çatlamaya dirençli beton eldesini mümkün kılan çimento katkı maddesi olarak uygulama alanı bulmaktadır.

1.6.3.2.Farmasötik Endüstri

Kalsiyum glukonat, oral ya da intravenöz uygulama ile kalsiyum eksikliği tedavisi için bir kalsiyum kaynağı olarak farmasötik endüstride hipokalsemiye karşı kullanılır. Aynı zamanda hayvan beslemede de yer bulurken erkek köpek kısırlaştırılması için de kullanılır. Demir glukonat ve demir fosfoglukonat anemi tedavisinde kullanılır. Çinko glukonat soğuk algınlığı, yara iyileşmesi ve cinsel olgunlaşma gecikmesi, mental letarji, cilt değişiklikleri, enfeksiyonlarda, derin doku nekrozlarını önlemek için kullanılmasının yanında çinko yetersizliğinin neden olduğu çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi için de kullanılır. Kinin glukonat,

sıtmanın tedavisinde intramüsküler enjeksiyon için kullanılan bir glukonik asit ve kinin tuzudur.

1.6.3.3.Gıda Endüstrisi

Şarap, meyve suları, vb gibi birçok besin öğeleri bir serinletici ekşi tadı kazandırır. Gıda maddeleri içinde asitlik düzenlemek, acı tadı inhibe etmek gibi ilginç bir özelliğe sahiptir.

Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Direktifi No 95/2/EC içinde Glukonik asit, genel olarak izin verilen Gıda katkı maddesi (E 574) olarak listelenir. ABD FDA (Food and Drug Administration - Gıda ve İlaç İdaresi) Sodyum Glukonat GRAS (generally recognized as safe - genel olarak güvenli kabul edilen)statü verilmiştir ve gıda maddelerinde kullanımında herhangi bir sınırlama olmadan izin verilmiştir(Ramachandran ve ark, 2006).

Glukonik asit salamura yiyeceklerde kullanılır. Meyve suları ve balın doğal bir bileşenidir. Glukonik asitin iç esteri glukono-δ-lakton gıda maddelerine başlangıçta tatlı bir tat katar sonra hafif asidik hale dönüşür. Et ve süt ürünlerinde özellikle de fırınlanmış ürünlerde, ön mayalanma ürünleri için mayalanma ajanı bileşeni olarak kullanılır. Tatlandırıcı ajan olarak (örneğin, şerbetlerde) kullanılır ve ayrıca donut ve külahlarda yağ emilmesini azaltmak için uygulama alanı bulur. D-glukono-δ-lakton içeren gıda maddeleri soya peyniri, yoğurt, süzme peynir, ekmek, şekerleme ve ettir. Glukono-δ-lakton; Kuru pastalarda ve mayalı ekmek karışımlarında kullanılan kabartma tozlarındaki gizli asittir, sosis gibi et işleme işlemlerinde yavaş asitleştirici, tofu üretiminde soya proteini pıhtılaştırıcı, süt sektöründe lor oluşumu ve ısıya dayanıklı süt geliştirilmesi için kullanılır.

FAO / WHO (2014), Katkı Maddeleri Ortak Uzman Komitesinin JECFA şartnamesine göre Codex Alimentarius'ta bulunan gıda katkı maddesi olarak kullanılan glukonik asit türevleri çizelge 1.4'te mevcuttur.

Çizelge 1.4. Katkı maddesi olarak glukonik asit ve türevleri (Cañnete-Rodríguez,2016)

KATKI MADDESİ	INS KOD U	GÖRÜNÜM	TEKNOLOJİK FONKSİYON	BULUNDUĞ U GIDALAR
Glukonik Asit	E-574	Açık sarı, berrak şurup	Asitlik düzenleyici	Meyveve sebzeler (doğal kökenli), süt ürünleri
Glukono-δ-Lakton	E-575	Beyaz, kokusuz, kristalveyapudra	Asitlik düzenleyici, ayırma ajanı	Doğal fermente süt, peynir altı suyu, taze makarna ve erişte
Sodyum Glukonat	E-576	Beyaz, ince kristal toz	Ayırma ajanı, stabilizatör, yoğunlaştırıcı	Turşu ve salamura, kurutulmuş makarna ve erişte, kahve, çay ve tahıl bazlı sıcak içecekler
Potasyum Glukonat	E-577	Kokusuz, sarımsıbeyaz, granül veyakristal toz	Asitlik düzenleyici, maya besini, gıda takviyesi	Mozzarella peyniri, bisküvi ve pandispanya, soğuk et
Kalsiyum Glukonat	E-578	Kokusuz, beyaz kristal granüllerveyapudra	Asitlik düzenleyici ayırma ajanı, gıda takviyesi	
Ferröz Glukonat	E-579	Yeşilimsi sarı granüller hafif yanmış şeker benzeri bir kokuya sahip kristal toz	Renk koruyucu, stabilizatör, gıda takviyesi	Turşu ve salamura ürünler
Magnezyum D-Glukonat	E-580	Kirli beyaz, kokusuz ince pudra	Asitlikdüzenleyici , sıkılaştırıcı ajan, maya besin besin takviyesi	Ekmek yapım ürünleri

1.6.3.4.Tekstil Endüstrisi

Geniş bir pH aralığında Glukonik asitin demir ayırma özelliğinden tekstil endüstrisinde; demir tortularının önlenmesinde ve polyester ve polyamid kumaşlarda haşıl sökmeye faydalanılır.

1.6.3.5.Metalurji

Korozyona neden olmadan metal karbonat presipitatların uzaklaştırılması gibi alkaline ile pas gidermede kullanılır. Temizleyici ajan olarak ve kireç giderme işlemlerinde Glukonat anyonu Ca^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3} ve diğer metalleri şelatlayıcı özelliğe sahiptir. Bu özelliği nedeniyle özellikle alkali çözeltilerde mineral birikintileri çözdüğü için temizlik ürünlerinde kullanılır. Şişe yıkama bileşiklerinde bulunarak kireç oluşumu önlenmesi ve camdan uzaklaştırılmasına yardım eder. Galvanizli demir ya da paslanmaz çelik üzerinde süt veya bira ölçeklerini de içeren metaller ve diğer yüzeylerden kireç çökeltilerini çıkarmak için uygundur. Alüminyum kutuların temizliğinde kullanılır. Aynı zamanda, gargara gibi temizlik bileşenlerinde de kullanılır.

1.6.3.6.Kimya

Glukonik asit sodyum tuzu, kalsiyum ve diğer iki ve üç değerlikli metal iyonlarını şelat haline getirmek için üstün bir özelliğe sahiptir. Sodyum glukonat alkali pH seviyelerinde EDTA gibi şelatörlere nazaran daha iyi bir şelatördür.

1.6.3.7.Ziraat

Glukonik asitin demir tuzu, bahçecilikte yapraktan gübreleme formülasyonlarına katılır.

Global fermentasyon pazarında organik asitler antibiyotik ve aminoasitler sonra en büyük üçüncü kategoriyi temsil etmektedir. Bu organik aside olan genel talep büyümekle birlikte son zamanlarda yılda 60.000 ton üretim miktarıyla

yaklaşık 20 yıldır artmıştır (Singh ve ark, 1999; El-Enshasy, 2003).Glukonik asit kütlece % 50'si sulu çözelti halinde piyasada mevcut olan bir organik asittir.

1.7.Funguslar

Fungusların çok sayıda ve farklı karbon kaynakları kullanarak çeşitli kimyasal maddeleri sentezleyebilme yetenekleri uzun yıllardan beri biyoteknolojinin odağında olmalarına neden olmuştur. Funguslar kullandıklarını besin maddelerini öncelikle metabolik faaliyetleri için ihtiyaç duyacakları enerjiye, üremek ve büyümek için kullanacakları maddelere çevirirler. Bu maddelere birincil metabolitler adı verilir. Primer metabolitler mikroorganizmalar için hayatsal öneme sahiptir ki bunların başlıcaları aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve organik asitlerdir. Glukonik asit de primer metabolitlerden birisidir. Primer metabolitlerin dışında mikroorganizmalar Sekonder metabolit olarak adlandırılan ve olmayışları kendilerine hayatsal herhangi bir kısıtlama getirmeyen metabolitler de üretmektedirler. Antibiyotikler, toksinler, hormonlar, alkaloitler ve pigmentler belli başlı Sekonder metabolitlerdir. Her iki grupta ticari olarak büyük öneme sahiptir. Primer metabolitlerle Sekonder metabolitleri birbirinden ayıran en önemli özelliklerden biri de sentezlenme dönemleridir. Primer metabolitlerin üretimi mikroorganizmaların üreme eğrilerinin lag ve logaritmik fazında gerçekleştirilirken, Sekonder metabolitlerin üretilmesi ise logaritmik fazın sonunda ve durgunluk fazında başlar.

1.7.1.*Aspergillus spp.*

Aspergillus spp. dünyanın her yerine yayılmış yaklaşık 200 mantar (küf) türünden oluşan hifolarak adlandırılan yapılara sahip ipliksi mantar türleridir. Rengi ağırlıklı olarak siyah veya kahverengimsidir. Sporları siyah renkli olup ultraviyole ışınlarına karşı korunmasını sağlar. Doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalidir. Doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidirve biyodegradasyonda rol alırlar. *Aspergillus* türleri aerobiktirler ve bol

oksijenli hemen her ortamda rastlanırlar. Glukoz, fruktoz, maltoz ve nişasta gibi karbon kaynakları ile büyüebilmelerinin yanı sıra çoğu *Aspergillus* spp., türü besin maddelerinin çok düşük konsantrasyonda olduğu veya başka organizmaların kullanmadığı besin kaynaklarının olduğu ortamlarda da büyüme yeteneğine sahiptir. Minimum gelişme sıcaklığı 6-8°C, optimum 35-37°C ve maksimum 45-47°C'dir.

Aspergillus spp., verimli organik asit üreticisi birçok tür içeren çeşitli bir cinstir. *Aspergillus* cinsinden filamentöz mantarlar, biyolojik bazlı organik asit üretimi için çok önemlidir. *Aspergillus* cinsinin farklı türleri gıda katkı maddeleri, farmasötikler ve deterjanlar gibi endüstriyel uygulamaları olan geniş ve değerli metabolit spektrumuna sahiptir. *Aspergillus* sp. 'nin doğal olarak çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak yüksek miktarda organik asit akümüle edebilme yetenekleri raporlanmıştır (Papagianni, 2007; Brown ve ark, 2013;). Biyolojik aktiviteleri olan pek çok ikincil metabolitlerin, bir dizi enzimin ve proteinin *Aspergillus* spp., tarafından üretimi bu cinsin endüstriyel anlamda ne kadar önemli olduğunu gösterir (Frisvad and Larsen, 2015). Şimdiye kadar *Aspergillus* spp'nin izolatlarından organik asitlerin (örneğin sitrik asit, glukonik asit ve kojik asit) , enzimlerin (örn., Amilazlar, selülazlar ve hemiselülazlar) ve fermente edilmiş gıdaların (örn., Soya sosu) üretimi için bir dizi endüstriyel proses geliştirilmiştir (Botella ve ark, 2007). *A. niger*'inen önemli kullanımı sitrik asit üretimidir; bu organizma dünya çapındaki üretiminin %99'u olan yılda 4,5 milyon ton sitrik asitten sorumludur. *A.niger* ayrıca hem kendisine hem başka organizmalara ait enzimlerin üretimi için kullanılır, glukoz oksidazbuna örnektir. Bu tür üretimlerde kültür katı yüzey üzerinde değil sıvı ortam içinde, biyoreaktörde gerçekleştirilir. Bu sayede elde edilmek istenen kimyasal veya enzimi kültür ortamından ayırtmak çok daha kolay ve ekonomiktir.

1.8.Kromatografi

Kompleks karışımlarda bulunan bileşenleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Tüm kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı halde bulunan bir mobil faz ile taşınır. Bu mobil faz, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş sabit bir faz içinden geçmeye zorlanır. Sabit ve mobil fazlar, numune bileşenlerinin bu fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Kromatografik ayırma sırasında sabit faz tarafından kuvvetle tutunan numune bileşenleri, mobil fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, sabit faz tarafından zayıfça tutunan bileşenler, hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen farklı bantlar ve bölgeler şeklinde ayrılırlar.

İlk kez Rus botanikçi Mikhail Tswett(1903) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Tsvett bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanılmıştır.Tswett, Klorofil ve ksantofiller gibi çeşitli pigmentleri içeren bir çözeltiyi, toz halinde kalsiyum karbonatla doldurulmuş bir cam kolondan geçirerek birbirinden ayırmayı başardı. Ayrılan maddeler kolonda renkli bölgeler halinde gruplar oluşturdu; Bu nedenle ayırma yöntemine, renkli fotoğraf anlamına gelen kromatografi (chromatography) adını verdi (Ettre, 2003).

Glukonik asit ve sodyum glukonatın derişiminin belirlenmesi için kağıt kromatografisi, izotakoforetik metot, 13-C NMR spektroskopi ve kapiller elektroforez, gaz kromatografisi, iyonik kromatografi ve HPLC gibi metotlar kullanılabilir. Bu çalışmada HPLC çok fazla örneğin ayrı ayrı analiz edilebildiği, daha ucuz ve zamandan tasarruf sağlayan bir metot olduğu için tercih edilmiştir.

1.8.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), karışımdaki bileşenleri ayırmak, tanımlamak ve ölçmek için kullanılan analitikbir tekniktir. HPLC bir numunedeki trilyonda bir kadar kadar düşük iz konsantrasyonlardakibileşikleri ayırma ve tanıma yeteneğine sahiptir. Bu çok yönlülüğü nedeniyle HPLC;

farmasötik, adli tıp ve kimya gibi çeşitli endüstriyel ve bilimsel uygulamalarda kullanılır.

HPLC kromatografik bir teknik olup bu teknikte temel prensip analitlerin hareketli bir faz ile sabit faz üzerinden hızlarına göre taşınmaları veya sürüklenmeleridir. Kolon kromatografisinde analizi yapılacak karışımı taşıyan hareketli faz adsorbanla doldurulmuş bir kolondan basınç altında ilerler. Bu nedenle HPLC gelişmiş bir kolon kromatografisidir. Sisteme bağlı pompa, hareketli fazı yüksek basınç altında bir kolon boyunca hareket ettirmek için zorlar. Kolon içi materyalsabit faz olup bu adsorban tipik olarak silika veya polimerler gibi katı parçacıklardan yapılmış bir granül malzemedir. Sabit faz küçük granüllerden oluştuğu için yüzey alanı daha genişler ve kolon içinden geçen hareketli fazın taşıdığı karışıma ait bileşenlerin daha iyi ayrılmasını sağlar.

Hareketli faz olarak genellikle su, asetonitril veya metanol kullanılır. Bu karışım mobil faz olarak adlandırılır.

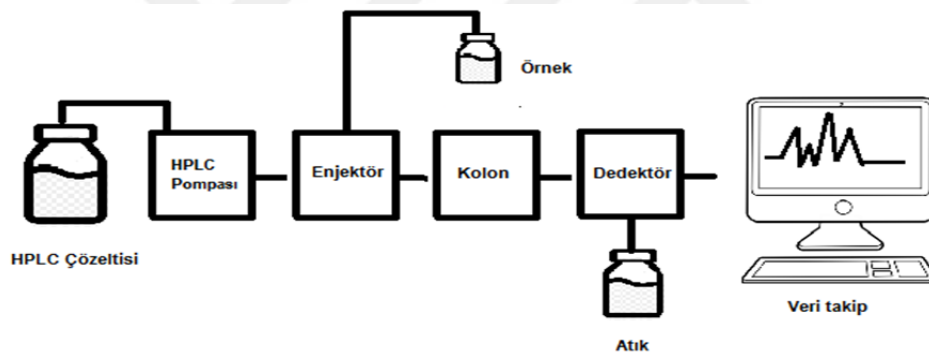
Numunenin kolonda kalma süresi, sabit faz ile analiz edilen moleküller ve kullanılan solvent veya solventler arasındaki etkileşime bağlı olarak değişir. Numune kolondan geçerken, iki faz arasında, esas olarak analitlerdeki farklı kutuplardan dolayı farklı hızlarda etkileşime girer. Sabit faz ile en az etkileşime sahip olan ya da mobil faz ile en fazla etkileşime sahip olan analitler sütundan daha hızlı çıkmaktadır.

1.8.1.1.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Bileşenleri

HPLC sistemindeki ana bileşenleridegazör, pompa, kolon, kolon fırını, enjektör sistemi ve dedektördür.

Sistemde mobil fazın kullanılmadan önce degazör yardımı ile çözünmüş gazlardan arındırılması gerekir. Bu işlem sağlıklı analiz için son derece önemlidir. Mobil fazın belirli bir akıştailelmesini sağlamak için pompa kullanılır. Numunelerin manueleneksiyonu mümkün olsa da, çoğu HPLC’de, artık bu işlem tamamen otomatiktir ve bilgisayar tarafından kontrol edilir. Enjeksiyon sistemini

kolon sistemi takip eder.Sistem içerisinde pompalar tarafından sağlanan belli bir basınç altında akışa sahip mobil faza numune enjeksiyonu gerçekleştirilir ve numune mobil fazda çözünerek sabit faz olan ve asıl ayırma işleminin gerçekleştirildiği kolona taşınır. Kolon içi basınç 400 bara kadar ulaşabilir.Kolonun iç çapı genelde 4 ile 10 mm arasında olup içindekipartikül büyüklüğü 3,5 ve 10 µm arasında değişir. Çoğu analizlerde daha iyi bir kromatogram elde etmek için kolon fırınları kolonu sabit bir sıcaklıkta tutar. Kolondan çıkan numune içindeki maddeleri tespit edecek bir detektör sistemi vardır. Dedektör ayrılmak istenilen numune içindeki maddenin belli bir dalga boyunda absorbansını ölçen UV detektör bulunur. Veriler dedektörden bilgisayara aktarılır. Mobil faz dedektörden çıktıktan sonra ya bir atığa gönderilir ya da istenirse toplanır (Skoog ve ark 1971)



Şekil 1.10.HPLC bileşenleri

1.8.1.1.(1).Mobil Faz

Analiz Edilecek maddeleri taşıyan ve sistemde yüksek basınç altında ilerleyen mobil fazdır. Mobil faz genellikle su ya da sulu tampon çözeltiler, bunların metanol veya asetonitrille hazırlanan çözeltilerinden oluşur. Mobil fazın bileşimi, sıcaklık ve pH değeri ayırımı doğrudan etkiler. Mobil faz kullanılan tekniğe, numune tipine ve kolona göre seçilmelidir. Mobil faz, HPLC'de en önemli parametredir. Kullanılan mobil faza bağlı olarak analit moleküllerinin

iyonlaşmasını desteklenebilir veya bastırabilir ya da sabit fazda kalıntı oluşturabilir.

HPLC analizlerinde kullanılacak mobil faz çok saf olmalıdır. İz miktardaki kirletici varlığı kolonu etkileyerek analiz sisteminde olumsuz sonuçlara neden olabilirler. Mobil fazın degaze edilmesi zorunludur. Mobil fazda gaz bulunması durumunda kolonda kabarcık oluşmasına ve buna bağlı olarak pik yayılmasına sebep olur.

Hareketli faz tipleri izokratik ve gradiyent olmak üzere iki çeşittir. Bunlar;

İzokratik faz: Tek tip mobil fazın kullanıldığı, tüm bileşenlerin aynı kolonda fakat farklı hızlarda göç ettiği tekniktir.

Gradiyent faz: Polar özelliği farklı iki veya ikiden fazla mobil fazın kullanıldığı tekniktir. Mobil faz bileşimi sürekli veya değişik zamanlarda kademeli olarak değiştirilir. Bu sayede analizin süresi ve kalitesi artırılır veya azaltılır.

1.8.1.1.(2).Degazör

HPLC analizi için kullanılan mobil faz gözle görülemeyecek kadar küçük gazlar içerebilir. Bu gazlar dengesiz pik oluşumuna sebep olarak analizi olumsuz etkiler. Ağırlıklı olarak gaz giderimi için ısıtma, karıştırma işlemlerinin yanı sıra sonikatör sistemleri de tercih edilir. Ayrıca uzun süreli analiz işlemlerinde mobil faz dinlenmeye bırakıldığında gaz kendi kendine çözünerek mobil fazı terk eder ve atmosfere karışır. Gaz giderimi sağlıklı analiz sonucu için önemli unsurlardan birisidir.

1.8.1.1.(3).Pompa

HPLC sistemindeki en önemli parçalardan birisi pompadır. Pompa, eluentin sistem içinde istenilen akış hızında ilerlemesini sağlar. Sistemin kullanıldığı ilk dönemlerde yüksek basınç elde edebilmek en önemli gereksinimlerden birisiyken günümüzde kontrol edilebilir akış hızı sağlamak için

her koşulda tutarlı basınç sağlayabilmektedir. Akış hızındaki küçük bir değişiklik, analizi büyük ölçüde etkileyebilir.

1.8.1.1.(4).Örnekleyici (numune enjeksiyon sistemi)

Akış halindeki mobil faza numune bir enjektör yardımıyla enjekte edilir. Bu işlem için manuel enjektörler veya zaman ayarlı programlanabilen, tekrarlı enjeksiyonlara izin veren otomatik örnekleyici sistemler kullanılabilir.

Numuneler enjeksiyondan önce mobil fazda çözülerek filtre edilir. Bu işlem kolon kirlenmelerinin önüne geçer. Numune bir şırıngaya manuel olarak çekilir ve valf yardımıyla enjekte edilir. Numune enjeksiyon işlemi sonrası yüksek basınç altında, istenilen akış hızına sahip mobil faza karışır. Mobil faz yardımıyla taşınan ve hacmi ağırlıklı olarak 5-1000 µL arasında değişen numune doğrudan kolona ulaşır. Enjeksiyon sırasında yapılan hatalar HPLC’de analizi doğrudan etkiler.

1.8.1.1.(5).Kolon- Kolon Fırını

Çalışılmak istenilen numune tipi ve uygulanacak çalışma prensibine göre kolon tipi belirlenir.Kolon kromatografik sistemin sabit fazını oluşturur. Numunedeki bileşenlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden faydalanılarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar.

Kolon genellikle çeşitli çözücülere karşı toleranslı olması nedeniyle çelik kullanılır. Biyomolekül veya iyonik bileşiklerin analizi için metal temasından sakınılması gereken analizler için polietilen eter keton (PEEK) kolonlar tercih edilir. Kolon içi silika veya polimer gibi belli miktarlarda sabit fazla doldurulur.Asıl sabit fazı kolonun bu dolgu maddesi oluşturur.

Sabit faz ile mobil faz içindeki çözünmüş numunenin etkileşimleri ile kolon içinde göç etme derecesi numune bileşenlerinin ayrılmasını sağlar. HPLC analizi için tutarlı sıcaklık koşullarını sağlamak ve korumak önem arz eder. Çünkü farklı sıcaklıktaki analizler farklı sonuçların eldesine neden olur.

Kolon fırını analizin gerçekleşeceği sabit sıcaklıkla tutmanın yanı sıra kolonu dış etkenlere karşı koruma görevi de üstlenir. Organik asit veya şeker bazlı analizler için sıcaklık çözünürlüğü arttıran bir faktör olduğu için 50°C - 80°C sıcaklıklar tercih edilir.

1.8.1.1.(6).Dedektör

Numune bileşenleri kolonun içinde ayrılır ve bu ayrımı gözlemlemek için analit dedektöre taşınır. Dedektör, analit yokluğunda tutarlılık gösterirken analit varlığında sistemde elektronik sinyaller oluşur. Bu sinyaller kromatogramda pik olarak ifade edilirler. Dedektörün belirli özelliklere sahip olması gerekir. Bunlar; Gürültü, sıcaklık, basınç gibi çeşitli dış etkenlere karşı analiz sonucuna olumsuz etki oluşturmada kolondan geçen analite karşı yüksek duyarlılığa sahip olmalıdır. Dedektör numuneye uygun olarak seçilse de sıklıkla ultraviyole dedektörler tercih edilir. Bu çalışmamada da ultraviyole dedektörden faydalanılmıştır.

1.8.1.2.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Türleri

- Normal Faz (Normal Phase)
- Ters Faz (Reverse Phase)
- Boyut Dışlama (Size Exclusion)
- İyon Değişirme (Ion Exchange)

1.8.1.2.(1).Ters Faz (Reverse Phase) HPLC

En yaygın HPLC türü olmakla birlikte sabit faz apolar özellikteki silika veya nötr polimerik taneciklere bağlı oktadesil veya oktilsilan ligandları gibi hidrofobik özellikli maddeler kullanılır. Mobil faz genellikle su olmakla birlikte metanol ya da organik çözücü özelliğindeki su ile karışabilen polar özellikli karışımlar tercih edilir. Numune yüksek polar özellikli mobil fazda iyi çözünür ve kolondan erken ayrılır ve apolar sabit faz ile etkileşim oluşturarak

kolondaki alıkonma süresi uzayabilir. Mobil fazın polaritesi arttırılırsa alıkonma zamanı artar benzer şekilde alıkonma süresi uzun tutulmak isteniyorsa mobil fazın polaritesi azaltılabilir.

1.8.1.2.(2).Normal Faz (Normal Phase) HPLC

Normal faz kromatografi sıklıkla kullanılmaz. Sabit faz olarak genellikle silika kullanılır ve polardır. Mobil faz ise hekzan veya kloroformun kullanıldığı apolar çözücüdür. Düşük polariteye sahip analitler kolonu erken terk ederken yüksek polariteye sahip analitler kolonu geç terk ederler. Bunun nedeni polar bileşiklerin apolar bileşiklerden daha uzun süre polar silikaya yapışıp kalmasıdır.

1.8.1.3.Standartlarla Yapılan Kalibrasyon

Kantitatif kromatografik analizde en çok uygulanan yöntem örnekteki maddelerin bileşimine yakın bileşimlerdeki bir seri standart çözelti ile çalışılmasıdır. Standartların kromatogramları alınarak pik yüksekliklerinin veya alanlarının, madde konsantrasyonlarına göre " kalibrasyon grafiği" çizilir.Grafik orijinden geçen bir doğru şeklindedir. Örneğin analizi bu grafiğe göre yapılır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Çok sayıda mikroorganizma grubu, özellikle filamentli mantarlar, glukonik asit üretimi kabiliyetine sahiptir (Cochrane, 1958; Lockwood, 1975).

Genel olarak, mantar büyümesi sırasında oksijen dağılımı düzensiz olur, gaz kabarcıkları artar ve yetersiz oksijen ile sonuçlanır (Philips ve Johnson, 1959).

Oksijen absorpsiyon oranı da kültürün viskozitesitesi tarafından etkilenir. Misel yoğunluğunda artışa oksijen absorpsiyon oranında hızlı düşüş eşlik eder (Steel ve Maxon 1962).

Nitrat tuzunun ortamdaki düşük konsantrasyonu *A. niger*'de glukoz oksidaz indüksiyonuna yol açtığı için glukonik asit üretimini doğrudan engellemesinin yanında % 0.25'ten daha büyük bir azot konsantrasyonu istenmeyen organik asit akümülyasyonunu engelleyerek istenilen glukoz oksidaz enzim aktivasyonunu sağlar (Gupta ve ark, 1976 ; Ray ve Banik, 1999).

A. niger ile optimal glukonik asit üretimi için % 90'dan fazla hava doygunluğu gereklidir (Rehm, 1980).

Oksijenin sınırlayıcı faktör olma nedeni fermantasyon ortamında karbon, azot kaynaklarının ve diğer besinlerin çözünürlüğüyle karşılaştırıldığında düşük çözünürlükte olmasıdır. Oksijen genellikle atmosferik hava şeklinde temin edilir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda, yüksek basınçlı saf oksijen de ihtiyacı karşılar. Yaklaşık olarak 6 bar ve 150 ppm yüksek basınçlı çözünmüş oksijen ihtiyacını karşılar (Sakurai ve ark, 1989).

Karbon kaynağı seçimi mikrobiyal büyümeyi ve glukonik asit üretimini etkileyen önemli bir faktördür. *A. niger* için farklı karbon kaynaklarının glukoz oksidaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. *A. niger* test edilen tüm karbon kaynakları üzerinde büyürken yalnızca glukoz, sükroz ve melas kullanıldığında

önemli miktarda glukoz oksidaz eldesinin mümkün olduğunu raporlamıştır (Hatzinikolaou ve Macris 1995).

Glukozun biyolojik dönüşümünde moleküler oksijen kullanılır. Oksijen fungal glukonik asit sentez reaksiyonlarında doğrudan glukonik asit üretimini ve spesifik fermantasyon parametrelerini etkileyen en önemli sınırlayıcı faktördür (Anastassiadis ve ark, 1999).

Flamentli mantarların glukonik asit sentezi için optimum pH aralığı yaklaşık 4,5 - 7,0'dır. *Aspergillus niger* için optimum pH 5,5 olarak kabul edilir. pH 2-3 aralığında ise enzim aktivitesinin %5-%35 civarında olduğu belirtilmiştir. pH 5,5 ve 23 saatte 4,583 g/L oranında bir glukonik asit üretimi gerçekleştirilmiş ve glukonik asitin 55 saatlik reaksiyon sonu konsantrasyonu 150 g/L olarak bulunmuştur. Herhangi bir fermantasyon endüstrisinin akıcı çalışması büyük ölçüde üretim maliyetine ve bu da hammadde seçimine bağlıdır. Glukozun glukoz monohidrat kristalleri veya fruktoz / dekstrozu şerbet formu % 10-15'lik bir konsantrasyonda % 90-95 verim ile glukonik asit üretimi için ana karbon kaynağı olarak önerilmiştir (Znad ve ark, 2004).

Günümüzde, dünya genelinde yıllık olarak üretilen 50.000 - 60.000 ton glukonik asidin neredeyse tamamı fermantasyon yoluyla elde edilmektedir (Anastassiadis ve ark, 2005).

A.niger tarafından glukozun glukonik aside biyotransformasyonu basit bir dehidrojenasyon reaksiyonudur. D-glukoz, FAD koenzim ile iki bağlı olarak karakterize edilen glukoz oksidaz (GOD) tarafından; D-Glukonolakton ve hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit, katalaz (CAT) tarafından su ve oksijene ayrıştırılırken; D- Glukonolakton kendiliğinden veya laktonaz (LAC) tarafından hidrolize edilir. GOD, CAT ve LAC *A.niger*'in misel duvarına bağlı ekstraselüler enzimlerdir. Glukonik asit üretimini etkileyen diğer önemli parametre olan pH, besin çözünürlüğünü ve alımını, enzim aktivitesini, hücre zarı morfolojisini, ürün oluşumunu ve oksidatif indirgeyici reaksiyonları etkileyerek bir

mikroorganizmanın fizyolojisini etkileyen önemli bir faktördür. Glukonik asit üretiminde faydalanılan organizma ne olursa olsun reaksiyon sonucu ortam pH'ının kontrol altında tutulması gerekir. Asitlik düzeyi arttıkça reaksiyon katalizörü olan glukoz oksidaz inaktive olur ve glukonik asit üretim reaksiyonu durur. Bu durumu önlemek amacıyla broth uygulamalarda ortama nötralize edici ajan olarak sodyum hidroksit veya kalsiyum karbonat çözeltileri eklenir. Reaksiyon sonucu kalsiyum glukonat ve sodyum glukonat elde edilir. Glukonik asit üretimi için genel optimal durum aşağıdaki gibidir :

- Glukozun 110-250 g / L arasındaki konsantrasyonu
- Çok düşük bir konsantrasyonda azot ve fosfor kaynakları (20 mM)
- 4,5 ila 6,5 civarında ortam pH değeri

Yüksek hava basıncı (4 bar) uygulanması ile çok yüksek havalandırma oranı Glukonik asit üretimini etkileyen iki önemli parametre vardır. Bunlar, oksijen kullanılabilirliği ve kültür ortamının pH değeridir. Ortam pH'ına bağlı olarak *Aspergillus niger*, glukonik asitin yanında sitrik asit ve oksalik asit gibi zayıf organik asitler de üretir. pH 3,5'in altındaki durumda TCA döngüsünü uyarılır ve sitrik asit sentezi başlar. pH 3.5 ve altındayken sitrik asit, bu değer üzerinde ise glukonat dominant üründür. Bu nedenle Glukonik asit sentezi isteniyorsa pH 3.5 üzerinde çalışılmalıdır. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Gluconobacter* gibi organizmalarla yapılan çalışmalar pH 5- 6.5 arasındaki değerlerin aktif glukonik asit oluşumunda etkili olduğunu ve sentezde rol oynayan glukoz oksidaz veriminin %100'e dayandığını ortaya koymuştur (Ramachandran ve ark, 2006).

Fermantasyon ortamı içine %0.4 KH_2PO_4 ilavesinin enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Khurshid ve ark, 2009).

Havalandırma oranı ve çalkalama hızı özellikle filamentli mantarlarda misel morfolojisini doğrudan etkileyerek ortamdaki oksijenin kullanılabilirliğini artırır(Lu ve ark,2015).



3.MATERYAL METOD**3.1.Materyal**

Bu çalışmada soğan kabuğu, sarımsak kabuğu, peynir, yer fıstığı, domates salçası gibiküflenmiş çeşitli gıda maddelerinden izole edilen *Aspergillus sp.* suşları kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri**3.1.1.1. Potato Dextrose Agar (PDA)**

Fungusların tanımlanması ve stok kültürlerin hazırlanması ve saklanması amacıyla kullanılmıştır (Ellis ve Ellis, 1997).

Çizelge 3.1. PDA Besiyerinin Bileşimi

<u>Bileşimi:</u>	<u>g/L</u>
Potato infüsiyon	4
D-Glukoz	20
Agar agar	15

Yukarda belirtilen besiyeri bileşimi distile su içerisinde çözündükten sonra (pH'sı 5.6 ± 0.2) 121°C 'de 1,2 atm basınçta 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra kullanılmıştır.

3.1.1.2.Czapex Dox Agar (CZ)

Çizelge 3.2'de bileşimi belirtilen CZ besiyeri distile su içerisinde çözündükten sonra (pH'sı 7.3 ± 0.2) 121°C 'de 1,2 atm basınçta 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra izole edilen mantarların identifikasyonu için kullanılmıştır(Ellis ve Ellis, 1997).

Çizelge 3.2. CZ Besiyerinin Bileşimi

<u>Besiyeri bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Sukroz	30
Sodyum nitrat	3
Magnezyum sülfat	0.5
Potasyum klorid	0.5
Demir 2 sülfat	0.01
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	13
Agar agar	15

3.1.1.3.Malt Extrakt Agar (MEA)

Çizelge 3.3'te bileşimi belirtilen MEA besiyeri distile su içerisinde çözündükten sonra (pH'sı 5.6 ± 0.2) 121°C 'de 1,2 atm basınçta 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra izole edilen mantarların identifikasyonu amacıyla kullanılmıştır(Ellis ve Ellis, 1997).

Çizelge 3.3. MEA Besiyerinin Bileşimi

<u>Besiyeri bileşimi</u>	<u>g/L</u>
Malt extract	30
Pepton	3
Agar agar	15

3.1.1.4.Dekstroz Monohidratlı Fermantasyon Besiyeri

Çizelge 3.4'te bileşimi belirtilen besiyeri distile su içerisinde çözündükten sonra (pH'sı 5.6 ± 0.2) fermentöre aktarılır ve otoklav içerisinde 121°C 'de 1,2 atm basınçta 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyeri bileşimi(Znad ve ark, 2004; Ramachandran ve ark, 2006;Lu ve ark,2015)

<u>Besiyeri bileşimi</u>	<u>g/L</u>
di-amonyum fosfat	1
Mono potasyum fosfat	0.5
Magnezyum sülfat	0.15
Dekstroz monohidrat	100

3.1.2. Glikoz Oksidaz ve Katalaz Dozaj Hasabı**3.1.2.1. Glikoz Oksidaz Dozajı**

Çalışmadalikid Optimase Glikoz oksidaz 1500L (Genencor) kullanılmıştır. Enzim karakteristik özellikleri çizelge 3.5'te belirtilmiştir. Kullanılan enzim 35°C vepH 5.1 test koşulları altında 15 dakika içinde 3.0 mg glikozu glukonik aside okside etme özelliğindedir. Kullanılması gereken dozaj her gram dekstroz monohidrat için 15-20 ünedir.

Çizelge 3.5. GC 199 Glikoz oksidaz karakteristik özellikleri

Aktivite	1800 - 2000 U/ml
Bağıl yoğunluk	1.17 g/ml
pH	5.2 - 5.5

Toplam hacmi 2000ml olan fermentasyon besiyerinde substrat olarak dekstroz monohidrat (100gr) kullanılmıştır. Buna karşılık kullanılması gereken Optimase Glikoz oksidaz 1500L dozajı çizelge 3.6'daki formül ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6.Glukoz oksidaz dozaj hesabı

Total hacmi 2000 ml olan fermantasyon besiyeri için kaç ünite Glikoz oksidaz kullanmak gerekir?

1 gram Dekstroz mono hidrat için 15 ünite Glukoz oksidaz gerekiyorsa
100 gram Dekstroz mono hidrat için A ünite Glukoz oksidaz gerekir.

=1 gram Dekstroz mono hidrat xA ünite Glukoz oksidaz

100 gram Dekstroz mono hidrat x 15 ünite Glukoz oksidaz

A= 1500 ünite Glukoz oksidaz gerekir.

1500 ünite glikoz oksidaz kaç gram glikoz oksidaza eşittir?

2000 ünite Glikoz oksidaz 1.0 gram Glikoz oksidaz ise

1500 ünite Glikoz oksidaz A gram Glikoz oksidazdır.

=2000 ünite Glikoz oksidaz xA ünite Glukoz oksidaz

1500 ünite Glikoz oksidaz x 1.0 gram Glikoz oksidaz

A = 0.75 gram Glikoz oksidaz'dır.

3.1.2.2. Katalaz Dozajı

Çalışmada likid Optimase Katalaz 800L (Genencor) kullanılmıştır. Enzim karakteristik özellikleri çizelge 3.7'da belirtilmiştir. Kullanılması gereken dozaj her gram glikoz için 5 ünitedir.

Çizelge 3.7. Optimase Katalaz 800L karakteristik özellikleri

Aktivite	8.500 - 10.000 U/ml
Bağıl yoğunluk	1.09 g/ml
pH	5.0 - 5.6

Toplam hacmi 2000ml olan fermentasyon besiyerinde hacimce %50 kuru madde içeren denstroz monohidrat (100gr) kullanılmıştır. Buna karşılık kullanılması gereken Optimase Katalaz 800L dozajı şekil xxxdeki formül ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.8.Katalaz dozaj hesabı

Total hacmi 2000 ml olan fermentasyon besiyeri için kaç ünite Katalaz kullanmak gerekir?	
1 gram Dekstroz mono hidrat için	5 ünite Katalaz gerekiyorsa
100 gram Dekstroz mono hidrat için	A ünite Katalaz gerekir.
$\frac{1 \text{ gram Dekstroz mono hidrat}}{100 \text{ gram Dekstroz mono hidrat}} \times A \text{ ünite Katalaz}$	
$\frac{1}{100} \times 5 \text{ ünite Katalaz}$	
A = 500 ünite Katalaz gerekir.	
500 ünite Katalaz kaç gram katalaza eşittir?	
8500 ünite Katalaz	1.0 gram Katalaz ise
500 ünite Katalaz	A gram Katalaz dır.
$\frac{8500 \text{ ünite Katalaz}}{500 \text{ ünite Katalaz}} \times A \text{ ünite Katalaz}$	
$\frac{8500}{500} \times 1.0 \text{ gram Katalaz}$	
A = 0.058gram Katalaz'dır.	

3.2.Metod

3.2.1.*Aspergillus sp.* İzolasyonu

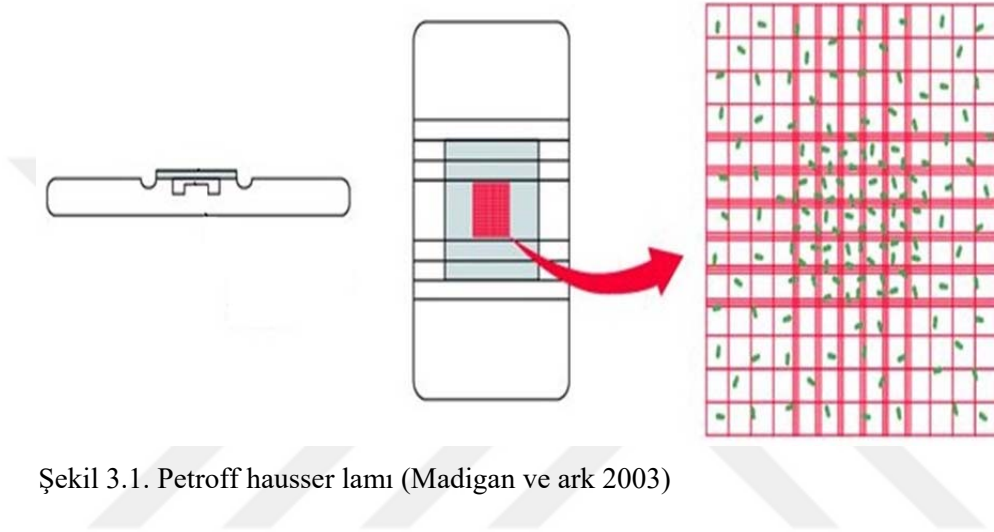
Aspergillus sp. izolasyonu için soğan kabuğu, sarımsak kabuğu, peynir, yer fıstığı, domates salçası gibi küflenmiş çeşitli gıda maddelerinden steril bistüri ve spatüller kullanılarak örnekler alınmıştır. Örnekler doğrudan MEA, CZ ve PDA besiyerlerine ekilmiş ve 30°C’de 7 gün ilk inkübasyona bırakılmıştır. İlk inkübasyon sonrası üreme gösteren örneklerle tek koloni düşürmek amacıyla 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} steril sulandırma serileri uygulanmış ve MEA, CZ ve PDA besiyerlerine yayma ekim yapılmış olup 30°C’de 2 gün ikinci inkübasyona bırakılmıştır. İkinci gün sonunda hif şeklinde görülen funguslar steril bistüriler yardımı ile bulundukları besiyerinden kesilerek yeni MEA, CZ ve PDA besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 30°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Böylece tek türden oluşan koloni elde edilmiştir. İzole edilen *Aspergillus sp.* suşlarının besiyerlerindeki farklı koloni morfolojileri ‘‘Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics’’(Pitt, 1985)’e göre doğrulanmıştır. İzole edilen 14 farklı *Aspergillus niger* suşu stok olarak katı besiyerine çekilip +4°C’de saklanmıştır. Glukonik asit üretiminde kullanılmak üzere kullanılan besiyerlerindeki büyüme hızlarına göre iki farklı suş seçilmiştir. Seçilen suşların stok kültürleri hazırlanarak buzdolabında (+4°C) saklanmıştır (Bae ve ark, 1999; Songre-Ouattara ve ark, 2008).

3.2.2.Spor Sayımı

Stok kültürler fermantasyon amacı ile kullanılacağı zaman oda sıcaklığında yaklaşık iki saat kadar bekletilmiştir. Stok kültürler steril 1% ‘lik tween 80’e steril spatüller kullanılarak kazıma metodu ile bulundukları katı besiyerinden ayrılıp spor süspansiyonu elde edilmiştir. Spor sayımı yapılacak olan bu süspansiyon sıvı özellikte olduğu için sayım her bir kare alanı belli olan petroff hausser lamı kullanılarak doğrudan ışık mikroskobu altında gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan süspansiyon ışık mikroskobunda petroff hausser lamı kullanılarak sayılmıştır.

Süspansiyon petroff hausser lamı üzerine damlatılır. Lam ile lamel arası mesafe 0.02 mm olup toplam alan 1mm², toplam hacim 0.02 mm³ 'tür ve alan içerisinde 25 kare bulunmaktadır. Lam üzerinde büyük kare içerisinde tüm sporlar sayılır. Örneğin mililitresindeki spor sayısını hesaplamak için;



Şekil 3.1. Petroff hausser lamı (Madigan ve ark 2003)

Hücre sayısı x 25 büyük kare x 50 x 10³ formülü kullanılır. Buna göre;

Hücre sayısı x 25 büyük kare = sayı / mm²

Hücre sayısı x 25 büyük kare x 50 = sayı / mm³

Hücre sayısı x 25 büyük kare x 50 x 10³ = sayı / cm³ (ml) sonucunu verir.

Bu sayım tekniğine göre çalışmada kullanılan spor sayısı 16x10⁷ spor/ml olacak şekilde belirlenmiştir.

3.2.3. Biyoreaktör Hazırlığı ve İnokülasyon

Çalışmada Sartorius Stedim Biostad B Plus biyoreaktör kullanılmıştır. Cam yapılı iki adet 5000 ml hacimli reaktörü bulunmaktadır. Dekstroz monohidratlı 2000ml sıvı besiyeri hazırlanıp biyoreaktör'e doldurulmuştur. Çalışma steril koşullar

altında gerçekleştirildiği için biyoreaktörün her bir hava giriş çıkış bölgesi çapı 0.4µm olan filtreler ile kapatılıp biyoreaktör içerisindeki besiyeri ve tüm bileşenleri ile otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon tamamlanan biyoreaktöre bağlanmış besiyeri pH'ı %50'lik NaOH ile ayarlanmıştır. Sıcaklık, rpm, oksijen seviyeleri istenilen koşullara göre şartlandırılır. Spor sayısı 16×10^7 olan spor süspansiyonundan 20 mL steril şartlarda inokülasyonu gerçekleştirilir.

3.2.4.Fermente Ürün Eldesi ve Saklama Koşulları

Glukonik asit primer metabolit olması nedeniyle organizmanın metabolik faaliyetleri başladığı andan itibaren üretim eldesi mümkündür. Fermente ürün istenilen örnekleme sıklığında 5 mL olacak şekilde alınır. *Aspergillus* sp. sporları besiyerine doğrudan inoküle edildiği için fermente üründen spor ve hif yapılarının uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla alınan örnekler 9000 rpm +4°C'de 20 dk santrifüj edilir. Üst faz alınarak analiz zamanına kadar +4 derecede bekletilir.

3.2.5.HPLC Koşulları

Çalışmada Agilent 1260 Infinity HPLC kullanılmıştır. HPLC çalışma koşulları çizelge 3.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.9. HPLC koşulları

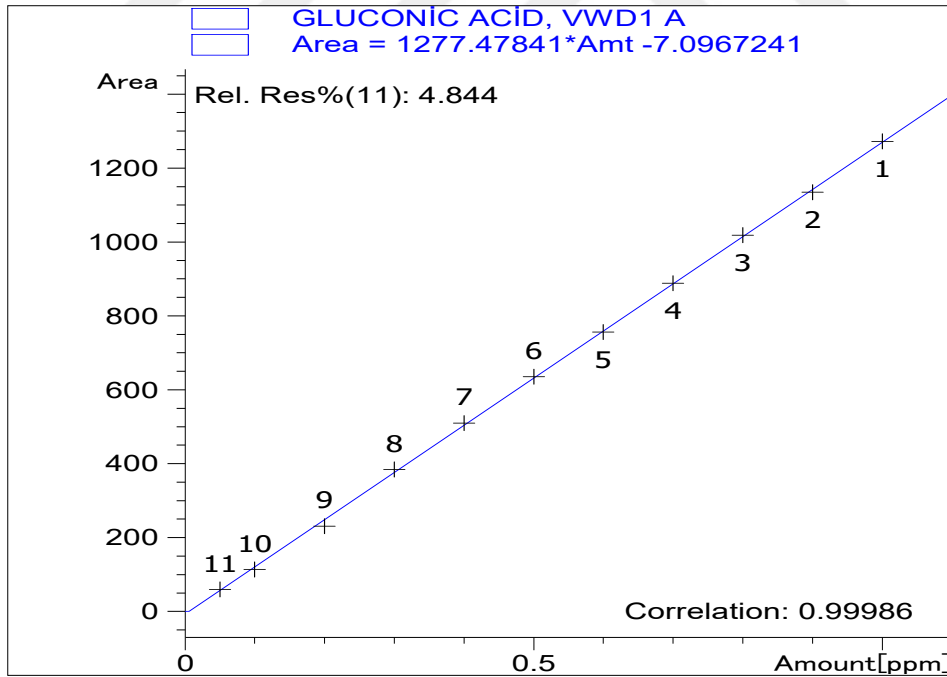
Kolon	87H3 Transgenomic (Part No: ICE-99-9861 Serial No:12916306)
Mobil Faz	1mmol/L H ₂ SO ₄
Akış hızı	1.0 mL/min
Kolon sıcaklığı	25°C
Dalga boyu	UV 210 nm
Enjeksiyon hacmi	10 µL

3.2.6.HPLC Standart Çözelti Hazırlama

Standart çözelti hazırlanırken CAS number: 526-95-4, moleküler ağırlığı 196.16, 46-53 wt. % in H₂O Sigma Aldrich glukonik asit kullanılmıştır. Mobil faz olan 1mmol/L H₂SO₄ içerisinde %1 olarak hazırlanmış %0.5 %0.1 oranlarına seyreltilmiştir.

3.2.7.HPLC Kalibrasyon Grafiği Hazırlanması

Hazırlanan %0.5, %1.0, %2.0, %3.0, %4.0, %5.0, %6.0, %7.0, %8.0, %9.0, %10.0 standart glukonik asit içeren çözeltiler mobil faz içerisinde çözünmesi için vortekslenmiş ve 0.2 µm çapındaki steril filtrelerden geçirilerek 10 µL hacimde HPLC cihazına manuel olarak enjekte edilmiştir. Analiz sonucu (analiz süresi her bir standart örnek için 11.95 dk) aşağıda korelasyonu 0.99986'a sahip kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.2.Korelasyon grafiği

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmada *Aspergillus sp.* izolasyon ve stok kültür hazırlama aşamalarından sonrastok kültürler +4°C’de saklandığı için fermantasyon amacı ile kullanılacağı zaman oda sıcaklığında yaklaşık iki saat kadar bekletilmiştir. Stok kültürler steril% 1’lik tween 80 ile kazıma metodu kullanarak bulundukları katı besiyerinden ayrılmıştır. Hazırlanan süspansiyon ışık mikroskopunda Petroff Hausser lamı kullanılarak 16×10^7 spor/ml olacak şekilde sayımı gerçekleştirilmiş ve 20ml’lik steril enjektörlere çekilerek aşılama hazır hale getirilmiştir.

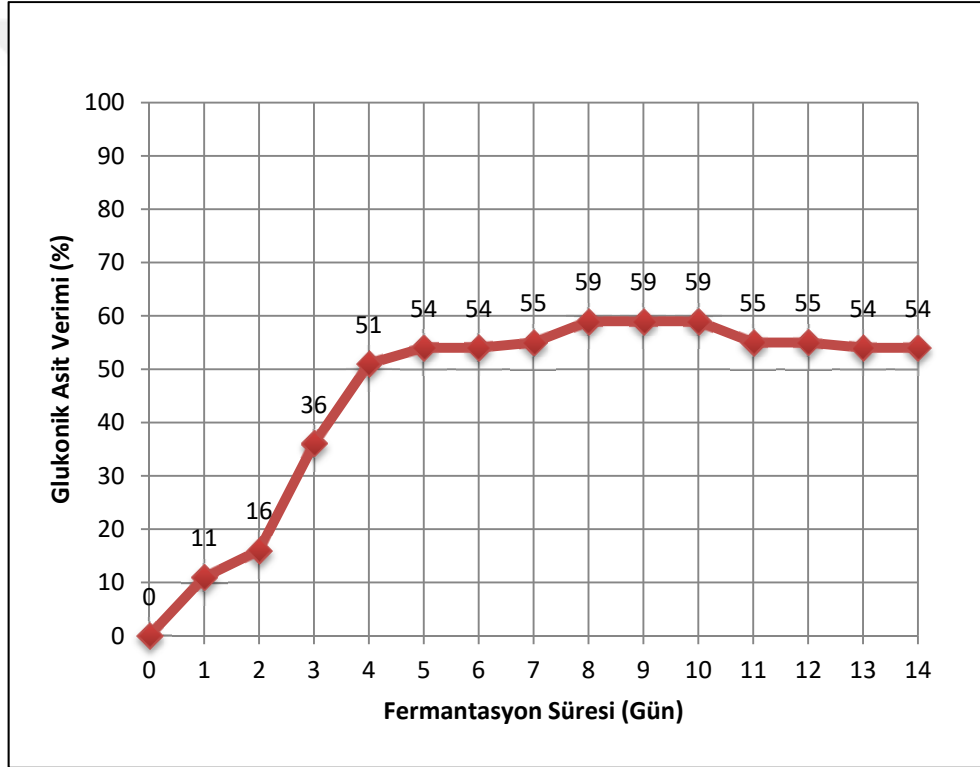
4.1.Glukonik Asit Üretim Optimizasyonu

Fungal büyüme ve fermente ürünlerin sentezi sıcaklık, inkübasyon süresi, çözünmüş oksijen miktarı gibi çeşitli çevresel faktörlerin karmaşık etkileşiminden kaynaklanır. Bu nedenle her bir çevresel faktörün anlaşılması, üst düzey verim ile ürün eldesinin temel basamağıdır.

Doğal izolat *Aspergillus sp.* suşlarının glukonik asit üretimini sağlamak amacı ile %0.1 di-amonyum fosfat, %0.05 Mono potasyum fosfat, %0.015 Magnezyum sülfat, %10 Dekstroz monohidrat oluşturduğu pH’sı 5.5 olan glukonik asit üretim ortamı kullanılmıştır. *Aspergillus sp.* suşu dekstroz monohidratlı broth besiyerinde 16×10^7 spor/ml olacak şekilde %1 v/v oranında 1000 mL’lik besiyerine steril koşullarda aşılanmıştır. Fermentör içerisinde gerçekleşen bu inkübasyon olayında başlangıçta 30 °C’de 600rpm karıştırma hızında, 0.5 vvm atmosferik oksijen (%21 oksijen) ile 14 gün boyunca fermente edilmiş ve fermantasyon süresince hergün örnek alınıp HPLC’de glukonik asit üretim verimisantamıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek glukonik asit üretimi 30°C sıcaklık, pH 5.5, %10 dekstroz monohidrat derişimi, 3000 ünite glukoz oksidaz, 500 ünite katalaz, 5 vvm %100 oksijen ile 3 günlük fermantasyon süresi optimum koşullar olarak bulunmuştur.

4.1.1. Optimum Fermantasyon Süresi

Doğal izolat *Aspergillus sp.* biyoreaktör içerisinde steril edilmiş 2000 mL' lik 10%, dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyerine 16×10^7 spor/mL olacak şekilde %1 v/v oranında besiyerine steril koşullarda aşılanmıştır. Biyoreaktörün başlangıç pH'sı 5.5 ve sıcaklık 30°C ve 600 rpm karıştırma hızında, 0.5 vvm %21 oksijen (atmosferik oksijen) ile 14 gün inkübe edildikten sonra maksimum glukonik asit üretim verimi araştırılmıştır.



Şekil 4.1. Optimum fermentasyon süresi

Sonuç olarak şekil 4.1.'de de görüldüğü gibi en iyi fermantasyon süresinin %59 oranında glukonik asit verimi ile 8. gün olduğu tespit edilmiştir.

4.1.2. Dekstroz Monohidrat Derişimi

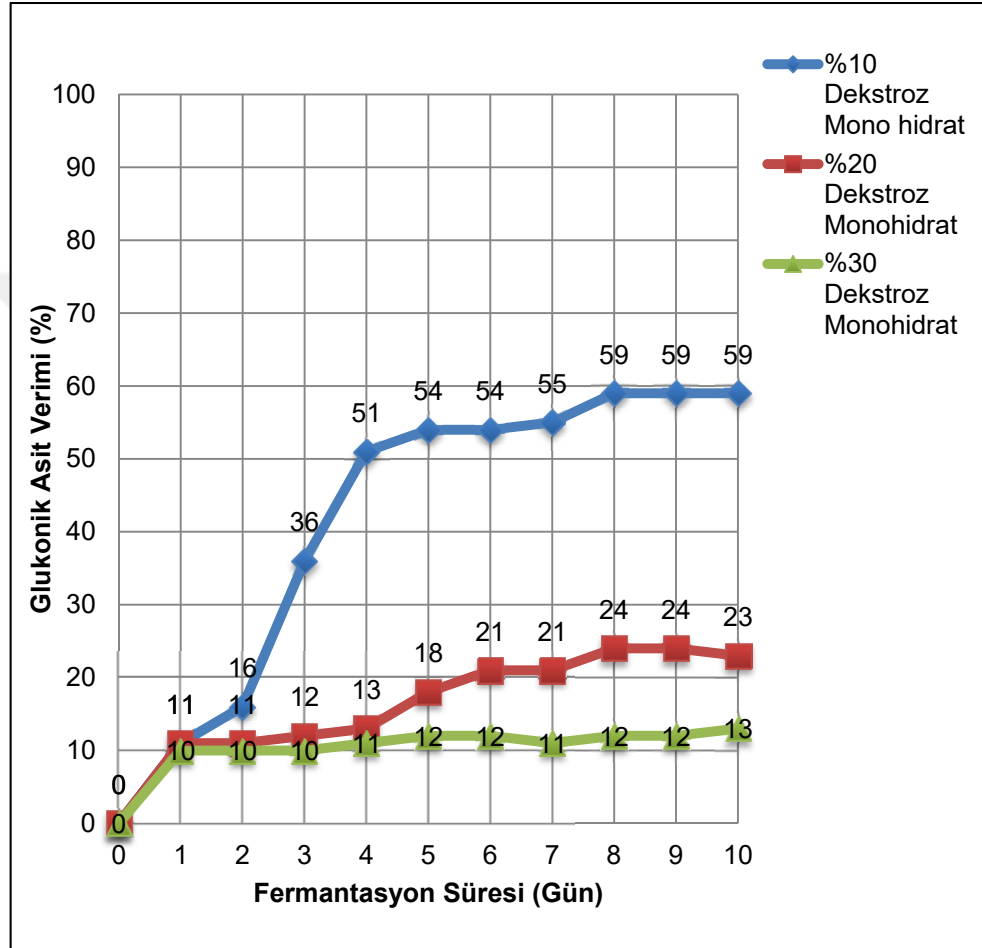
Doğal izolat *Aspergillus sp.* biyoreaktör içerisindeki steril 2000 mL’lik % 10, %20 ve %30 dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyerine 16×10^7 spor/mL olacak şekilde %1 v/v oranında besiyerine steril koşullarda aşılanmıştır. Biyoreaktörün başlangıç pH’sı 5.5 ve sıcaklık 30°C ve 600 rpm karıştırma hızında , 0.5 vvm atmosferik oksijen (%21 oksijen) ile 10 gün inkübe edildikten sonra maksimum glukonik asit üretim verimi araştırılmıştır.

Tüm endüstriyel ölçekli üretimlerde maliyet en önemli unsurlardan birisidir. Fermente endüstriyel üretimlerde maliyet hammadde kaynağına bağlıdır. Mikroorganizmalar ağırlıklı olarak karbonhidrat içeren ve maliyet açısından da engel oluşturmayan, son derece ekonomik tarım ürünleri ve bunların işlenmesi ile oluşan yan ürünleri hammadde kaynağı olarak kullanabilirler. Bu ürünlere şeker kamışı melası, üzüm pekmezi, pancar pekmezi, incir, mısır nişastası ve gıda işletme atıkları örnek verilebilir. Fakat şeker kamışı melası ve pekmez türevleri ağır metal iyonları içerirler. Bu maddeler substrat olarak kullanılacaksa ağır metal iyonları elimine edilmelidir. Eliminasyon işlemi fermantasyon öncesi gerçekleştirilir ve bu da ek maliyet demektir.

Bu çalışmada glukonik asit üretiminde karbon kaynağı olarak dekstroz monohidrat kullanılmıştır. Dekstroz monohidrat yüksek enerji kapasitesine sahip olması sebebiyle organizma için enerji kaynağı olarak kullanılır. Mısır şekeri olarak da bilinir ve fermantasyon sırasında sadece hücresel materyal oluşumuna katılmayıp polisakkarit sentezinde de görev alır. Nişastanın hidrolizi ile açığa çıkan bu hammaddemısır yağı işletmesi yan ürünü olarak likit formda kullanılmış olup fermantasyon ortamına %10, %20 ve %30’ luk derişimlerde eklenmiş ve fermantasyon sonucu glukonik asitin kantitatif analizi yapılmıştır.

Yüksek dekstroz monohidrat derişimlerinde hidrojen peroksit glukoz oksidazı çevreler ve inaktif duruma getirir. Düşük derişimlerde elde edilen yüksek verim başarısı seyreltik derişimlerde hidrojen peroksidin inaktive etme yeteneğini kaybetmesi ile ilişkilidir. Optimum dekstroz monohidrat derişimi % 10 olup

fermantasyon süresinin 8. gününde %59'luk glukonik asit üretim verimi tespit edilmiştir .



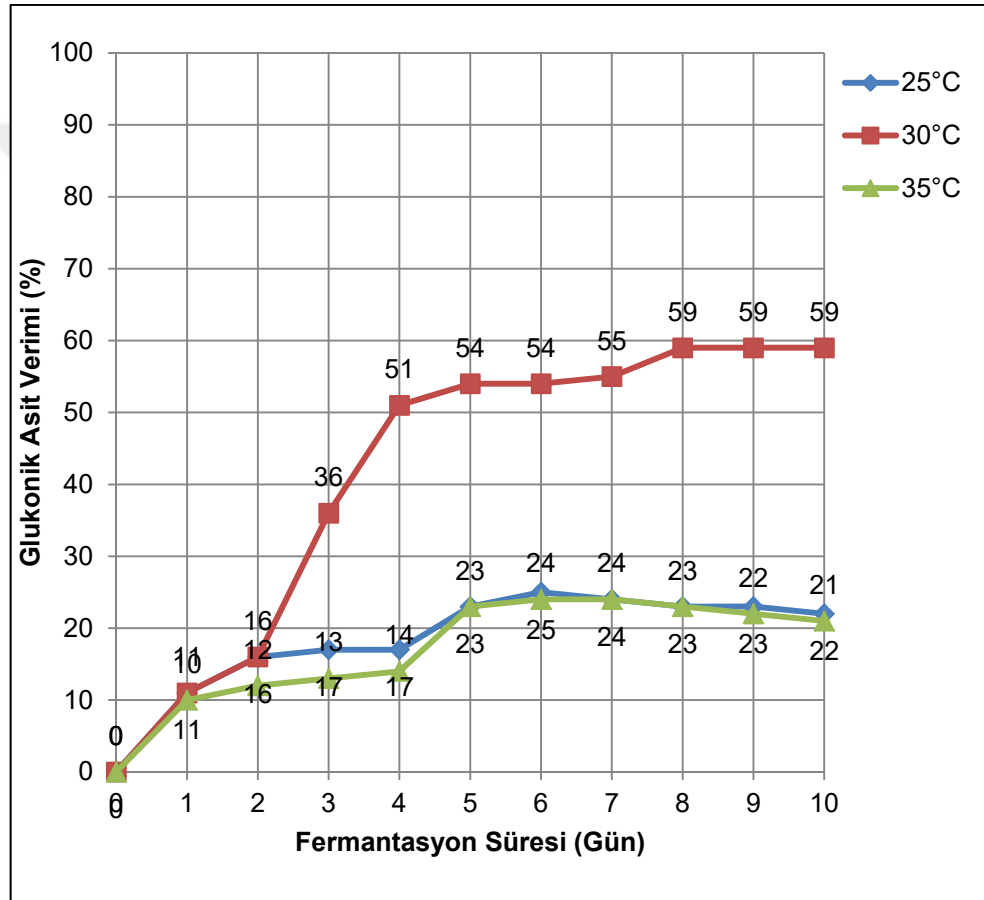
Şekil 4.2.Optimum Glukoz derişimi

4.1.3.Sıcaklık

Doğal izolat *Aspergillus sp.* biyoreaktör içerisinde steril 2000 mL' lik %10 dekstroz monohidratlı fermentasyon besiyerine 16×10^7 spor/mL olarak şekilde %1 v/v oranında steril koşullarda aşılanmıştır. Biyoreaktörün başlangıç pH'sı 5.5 ve sıcaklık 25°C, 30°C ve 35°C'de 600 rpm karıştırma hızında, 0.5 vvm atmosferik

oksijen ile 10 gün üretim sürecinden sonra maksimum glukonik asit üretim miktarı araştırılmıştır.

Sonuçta, her üç sıcaklıkta da 3. günden itibaren üretimde artış gözlenmiştir. Optimum sıcaklık 30°C olup fermentasyon süresinin 8. gününde % 59'luk glukonik asit verimi tespit edilmiştir.



Şekil 4.3.Optimum sıcaklık

Zhang ve ark (2016) *A. niger* SIIM M276 ile mısır hidrolizatı kullanılarak yapmış oldukları sıcaklık tolerans çalışmalarına göre 28-33°C aralığındaki sıcaklıklarda organizmanın hem glukoz tüketim hızı hem de glukonik asit

verimliliğinin arttığı, 37° C ve sonraki sıcaklıklar için düşüş yaşandığı belirtilmiştir. Ayrıca Shehu ve Bello (2011) *Aspergillus spp.*, ile yapmış olduğu çalışmaya göre optimal sıcaklık koşullarının 30° C ve 35° C aralığında olduğu belirtilmiştir.

4.1.4.pH

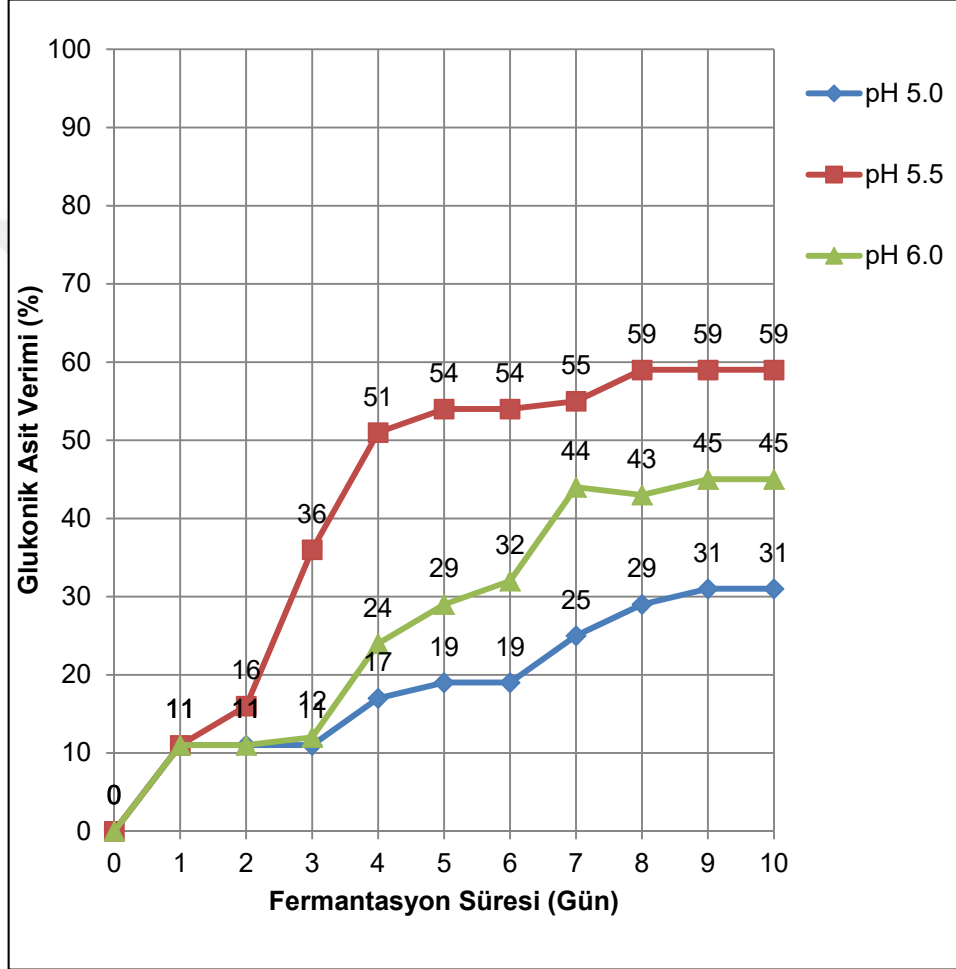
Doğal izolat *Aspergillus sp.* biyoreaktör içerisinde steril edilmiş 2000 mL' lik %10 dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyerine 16×10^7 spor/mL olacak şekilde %1 v/v oranında steril koşullarda aşılanmıştır. Biyoreaktörün başlangıç sıcaklığı 30°C ve 600 rpm karıştırma hızında, 0.5 vvm atmosferik oksijen ile pH 5.0 , pH 5.5 ve pH 6.0'da 10 günlük üretim sürecinden sonra maksimum glukonik asit üretim verimi araştırılmıştır.

pH, glukonik asit fermantasyonun devamlılığı için en önemli faktörlerden biridir. *Aspergillus sp.*, 2.5-7.5 pH aralığında hayatsal aktivitelerini etkin biçimde gerçekleştirmekle birlikte ve pH değeri 5 ila 6.5 arasında aktif glukonik asit üretimi gerçekleştirmektedir (Ramachandran ve ark, 2006). pH 5.5 veya daha yüksek değerlerde, glukonolaktonu serbest glukonik aside dönüştüren laktonazın aktivitesi önlenir. Reaksiyon laktonaz etkinliği olmadan devam etse de bu enzimin aktifliğini yitirmesi sentezin süresini ve buna bağlı olarak da fermantasyon periyodunu uzatmaktadır.

Aspergillus sp. glukozu okside ederken sitrik asit gibi zayıf organik asitler meydana getirir. Bu maddelerin besiyerindeki akümüasyonu ortam pH'sına bağlıdır. Düşük pH aralıklarında glukoz oksidaz hızla etkinliğini kaybeder. pH 3.5 ve altındayken sitrik asit, bu değer üzerinde ise glukonat dominant üründür. Düşük pH değerlerinde de glukonik asit üretimi gerçekleşir fakat yüksek derişimde glukonat eldesi isteniyorsa pH değeri daima 3.5 üzerinde olmalıdır.

Fermantasyon sonucu ortamda akümüle olan glukonik asit ortam pH'ını hızlı bir şekilde düşürür. pH değerindeki bu düşüş glukonik asitin üretim metabolizmasının sekteye uğratar (Zhou ve Xu, 2019). Çalışmada pH dengesi %50

NaOH beslemesi ile korunmuştur. Şekil 4.4'te de görüldüğü gibi pH 5'de %31 ve pH 6'da %45 oranda glukonik asit verimi mevcuttur, fakat optimum değer %59'luk glukonat verim eldesi ile pH 5.5 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4.Optimum pH

4.1.5. Oksijen

Doğal izolat *Aspergillus sp.* biyoreaktör içerisinde steril edilmiş 2000 mL'lik %10 dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyerine 16×10^7 spor/mL olarak

şekilde %1 v/v oranında steril koşullarda aşılannmıştır. Biyoreaktörün başlangıç sıcaklığı 30°C ve karıştırma hızı 600 rpm, pH 5.5 ve 0.5 vvm atmosferik oksijenle, 0.5 vvm saf oksijen (%100 oksijen), 1.0vvm saf oksijen (%100 oksijen) ilaveli olarak 10 günlük üretim sürecinden sonra maksimum glukonik asit üretim verimi araştırılmıştır.

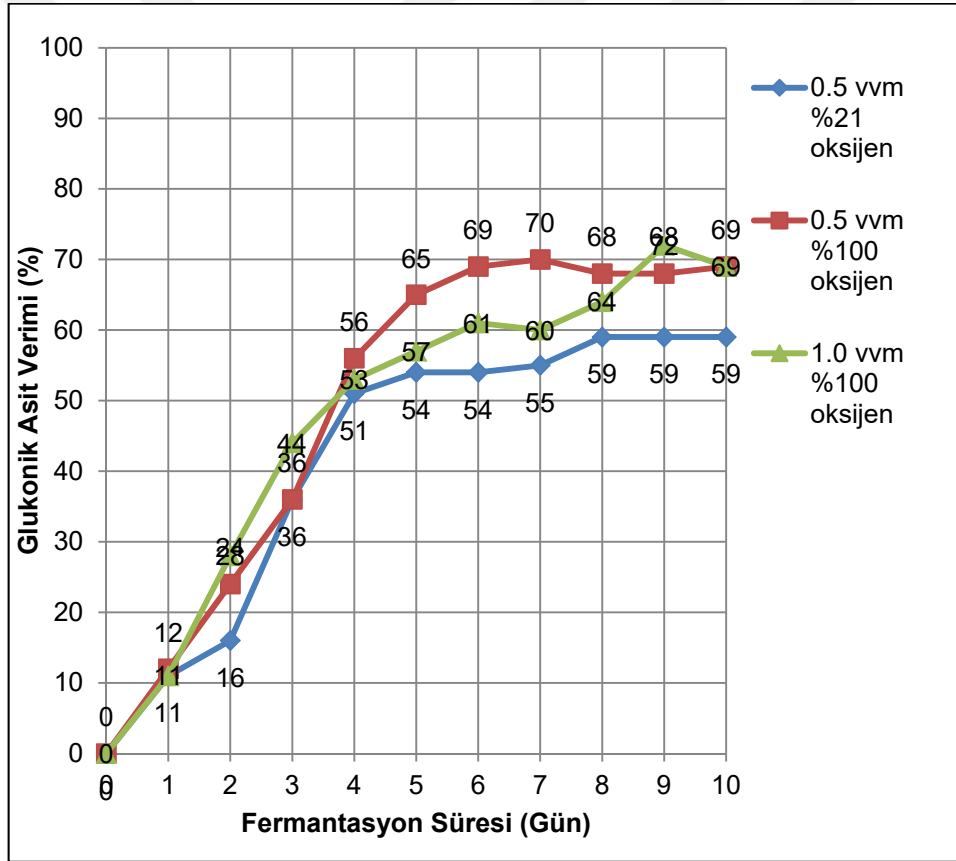
Aspergillus spp., ve *Penicillium* spp. Türlerinde glukoz dönüşümü için yüksek oranda çözünmüş oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur. % 100 hava doyunluğu, 30°C sıcaklık, 600 rpm çalkalama hızı ve 1 vvm atmosferik havalandırma oranı ile elde edilir. *A. niger* ile optimal glukonik asit üretimi isteniyorsa % 90'dan fazla hava doyunluğu gereklidir. Oksijen, genellikle atmosferik hava şeklinde sağlansa da fermentasyon ortamının yüksek basınç, saf oksijen ve hidrojen peroksit ile desteklenmesi glukozun yüksek verimle glukonik asite dönüşümü için alternatif seçenekler olarak literatürlerde sıklıkla karşımıza çıkar (Anastassiadis ve Morgunov, 2007).

Glukonik asit fermentasyonunda glukozun hücre büyümesi için kullanılırken ihtiyaç duyulan oksijen gerekliliğinin yanı sıra glukonik aside oksitlenmesi için ilave oksijen de gereklidir. Glukonik asit, glukozun oksitlenmesi sonucu oluşan bir organik asit olduğu için oksidasyon verimliliği ortamdaki çözünmüş oksijen derişimine bağlıdır. Bu çalışmada, hem şişelerde hem de fermentörlerde hücre büyümesinde çözünen oksijen seviyesi ve glukonik asit verimliliği incelenmiştir.

- Fermentasyon ortamına saf oksijen ilavesi olmaksızın sadece atmosferik hava ile üretim verimi fermentasyon periyodunun 8. gününde % 59 ile sınırlı kalmıştır.
- Üretim ortamına 0.5 vvm saf oksijen ilavesi (%100 oksijen) ile üretim süreci 7 güne inmiş, üretim verimi % 70'e yükselmiştir.
- Üretim ortamına 1.0 vvm saf oksijen eklenmesi üretim süreci 9 gün olup üretim verimi % 72 olarak tespit edilmiştir.

Oksijen beslemesi glukonik asit üretiminde kilit parametredir, çünkü oksijen glukoz oksidaz ve katalaz enzimatik kompleksinin bir substratıdır ve glukonik asit oluşumu için gereklidir (Moresi ve ark, 1991). Atmosferik oksijenin sulu ortamda zayıf çözünürlüğü glukonik asit üretimini büyük ölçüde sınırlar. Bu nedenle saf oksijen takviyesi ile oksijen derişimi arttırarak verim üst noktalara taşınabilir.

Sonuç olarak şekil 4.5'te de görüldüğü gibi saf oksijen ilavesi ile giderek artan üretim miktarı ve düşen üretim süreci dikkat çekmektedir.



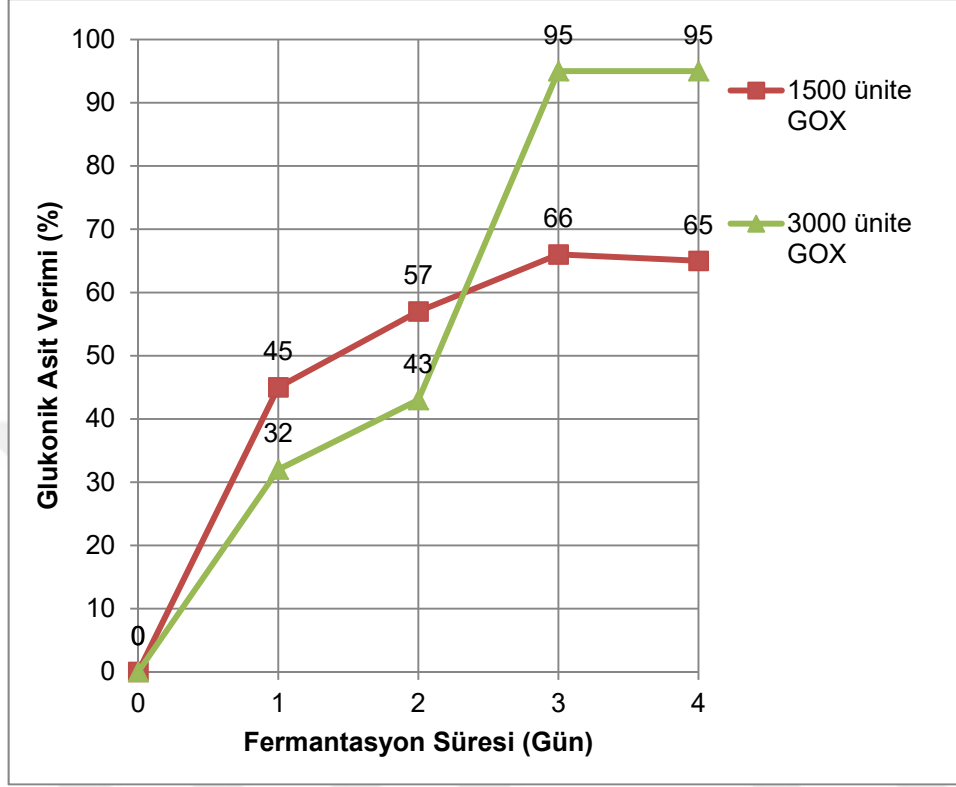
Şekil 4.5. Optimum oksijen derişimi

4.1.6.Glukoz Oksidaz ve Katalaz İlavesi

Doğal izolat *Aspergillus sp.* biyoreaktör içerisinde steril edilmiş 2000 mL'lik %10 dekstroz monohidratlı fermantasyon besiyerine mililitresinde 16×10^7 spor/mL olarak şekilde %1 v/v oranında steril koşullarda aşılantmıştır. Biyoreaktörün başlangıç sıcaklığı 30°C ve 600 rpm karıştırma hızında, pH 5.5, oksijen ilavesi 0.5 vvm oksijen ilavesi ve 1500 ünite ve 3000 ünite glukoz oksidaz ve 500 ünite katalaz fermantasyon ortamına eklenerek 3 gün inkübe edilmiştir. 8'er saat aralıklarla biyoreaktörlerden örnek alınarak maksimum glukonik asit üretim miktarı araştırılmıştır.

Hidrojen peroksit aminoasit yapısında tersinmez değışikliklere neden olur. Enzimleri inaktif etmesinin ötesinde ortamda yüksek miktarlarda akümülasyonu hücre ölümü ile sonuçlanan senaryolara neden olabilir. Glukonik asit üretiminde reaksiyon yan ürünü hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksidin ortamdaki yüksek konsantrasyondaki varlığı reaksiyonun ana katalizörü olan glukoz oksidaz yapısındaki glikoz bağlanma bölgesinde bulunan metiyoninin metiyonin sülfoksite dönüşümüne neden olur. Bu farklılaşma enzimdeki substrat tanıma, kataliz ve özgül lüğe doğrudan etki eder. Bu nedenle canlılık ve reaksiyon devamlılığı açısından hidrojen peroksidin ortamdan hızla uzaklaştırılması gerekir. Bunun en bilinen geleneksel yolu katalaz ilavesidir. Katalaz hidrojen peroksit üzerinde su ve oksijene ayırştırmak suretiyle etki eder. Oksijen beslemesinin glukonik asit üretiminde kilit bir parametre olduğu düşünülürse hidrojen peroksidin katalaz ilavesi ile su ve oksijene ayrışması sonucu glukonik asit akümülasyonundaki artış şaşırtıcı değildir.

Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi doğal izolat *Aspergillus sp.* hücre duvarına bağlı glukoz oksidaz enzimine ilave dışarıdan 3000 ünite glukoz oksidaz ve katalaz desteği üretimi %95'e yaklaşan verimle çalışır hale getirmiştir.



Şekil 4.6.GOX ve katalaz etkisi

4.1.7. Priz Süresi ve Hidrojen Verimliliğine Etki

Su tutma ajanı olan organik katkı maddeleri, beton harcı yapımında su ihtiyacını azaltıp işlenebilirliği kolaylaştırmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Su ve çimentonun birleşmesi ile betonun katılaşmasına kadar geçen süreye priz süresi adı verilir. Bu sürenin artması betonda işlenebilirliğin kolaylaştırması ile birlikte beton çatmalarını büyük oranda önler.

Zhang ve ark (2016) yapmış oldukları çalışmaya göre sodyum glukonatın priz süresini arttırarak beton akışkanlığını arttırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir.

Çalışma sonucu elde edilen glukonik asit ile yapılan beton mukavemet çalışmasında göre betonlar TS706'ya göre uygun gradasyonda konvansiyonel beton karışımı imal edilmiştir.Katkısız beton 28. günde 30.91 MPa'ya dayanabilirken %4 katkılı beton 56. günde 30,92 MPa gerilime dayanmaktadır. Çalışma glukonik asit katkısının priz süresini arttırdığını göstermektedir. Priz süresinin ile birlikte betonun işlenebilirliğinin artması soğuk derz olmadan sürekli beton dökümünü mümkün kılmaktadır.

Ayrıca çalışma sonucu elde edilen glukonik asit ile Kilincceker ve ark. (2017) glukonik asit ile hidrojen verimliliği üzerine yapmış oldukları elektrokatalitik oksidasyon çalışmasına göre gümüş kaplanmış elektrotlar kullanılarak hidrojen gazı üretiminde elektrokatalitik etki incelenmiştir.

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tarımsal sanayi ürünlerinin üretim aşamalarında ortaya çıkan atık ve kullanılamayan yan ürünlerin geri dönüştürülememesi ve çevresel sürdürülebilirliğe olumsuz etkileri başlıca problemlerdir. Bahse konu atık ürünlerin yüksek miktarda şeker içermeleri, biyoteknolojik üretimlerde potansiyel hammadde kaynakları olmalarına ve mikroorganizmalar tarafından uğrayabildikleri biyotransformasyon sonucu birçok sektörde kullanılabilen yeni ürünlerin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Önümüzdeki dönemlerde bu tip atıkların ve kullanılamayan yan ürünlerin önemli geri dönüşüm malzemesi olarak kullanılması endüstriyel atık yönetiminin gelişimi adına köşe taşı olmaya adaydır. Bu bağlamda 2008 küresel finansal krizi sonrası ortaya çıkan alternatif ekonomik sistemler arasında bulunan ve sürdürülebilir büyümenin sağlanmasını amaçlayan mavi ekonomideki; ekosistem ve biyolojik çeşitliliğin korunması, yeteri kadar üretip, üretileni sonuna kadar tüketme prensibine de hizmet eden bir üretim metodu olması geleceğin ekonomik modellerinde de yer alabileceğini göstermektedir.

Çalışmada doğada çeşitli küflenmiş gıda materyallerinden izole edilen *Aspergillus sp.* kullanılmıştır. Fiziksel ve kimyasal glukonik asit üretim yöntemlerine kıyasla daha az maliyet gerektiren glukonik asitin batık (submerged) fermantasyonu ile üretimi gerçekleştirilmiştir.

- Optimum şartlar; % 10 dekstroz monohidrat içeren fermantasyon besiyeri ortamında pH 5.5, 30°C sıcaklık, 8. günde % 5.9'luk glukonik asit üretim oranı olarak belirlenmiştir.
- Oksijen glukonik asit fermantasyon reaksiyonunda glukoz oksidazın substratı olması nedeniyle kritik parametredir. Bu sebeple oksijen beslemesi reaksiyonun verimi ve periyodunu doğrudan etkilemektedir. Yalnızca atmosferik oksijen kullanımı ile 8. günde %5.9'luk glukonik asit üretimi elde edilmiştir

Besiyerine reaksiyon boyunca 0.5vvm saf oksijen ilave edildiğinde periyodun 8. gününde glukonik asit üretim verimi %70 olup üretim artışına sebep olmakla birlikte 1.0 vvm saf oksijen ilavesi glukonik asit üretim verimini %72'ye yükseltmiştir. Tüm bu sonuçların ışığında 0.5 vvm saf oksijen ilavesinin glukonik asit üretimini arttırdığı söylenebilir.

- Ayrıca besiyeri ortamına doğrudan 3000 ünite glukoz oksidaz ve 500 ünite katalaz ilavesinin fermentasyon periyodunu 3 güne indirdiği bulunabilmektedir. Fermentasyon verimini %95'lere taşıdığı gözlemlenmiştir. Fakat endüstriyel amaçlı büyük ölçekli üretimlerde harici enzim ilavesi süreci hızlandırıp verimliliği arttırsa da bu durum üretim maliyeti açısından elverişli olmayabilir.

Bu sonuçlara göre doğal izolat *Aspergillus sp.*, dekstroz monohidratı çalışmada belirlenen optimum koşullar altında %95 verimle glukonik aside dönüştürmüştür. Elde edilen glukonik asit inşaat, tarım, sağlık ve gıda gibi birçok sektörde güvenle kullanılabilir, doğada kolaylıkla biyodegrade olabilir bir üründür.

Ülkemizde Glukonik asit ticari boyutta üretimi bulunmamaktadır. Tüm sektörlerde hakim olan firmalar; Pfizer, Bristol Mayer Co. Premier Malt, ZhongYun Bio Co, Blue Star, ülkeler ise; Fransa, İrlanda, Almanya, Japonya ve Çin'dir. Bu çalışma ile ülkemiz mikrobiyal kaynakları kullanılarak tüm endüstrilerin ihtiyacı biyoteknolojik bir ürün olan Glukonik asit üretilip kullanılarak ithalat kalemleri azaltılabilir ve ihraç edilerek katma değer yaratılabilir.

KAYNAKLAR

- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., Wandrey, C., 1999. Process for the production of gluconic acid with a strain of *Aureobasidium pullulans* Arnaud. US patent No. 5, 962, 286.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., Wandrey, C., Rehm, H.J., 2005. Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Bioeng*, 91:494-501.
- Anastassiadis, S., Morgunov, G.I. 2007. Gluconic Acid Production. Recent Patents on Biotechnology Bentham Science Publishers Ltd.
- Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.-J., Selinger, L.B., 1999. A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods* 39, 17–22.
- Bergmeyer, J., Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition, Germany, 190-302.
- Blom, R.H., Pfeifer, V.F., Moyer, A.J., Traufler, D.H., Conway, H.F., 1952. Sodium gluconate production – Fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.*, 44:435–440
- Botella, C., Diaz, A., De Ory, I., Webb, C., Blandino, A., 2007. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem.*, 42:98-101.
- Brown, S.H., Bashkirova, L., Berka, R., Chandler, T., Doty, T., McCall, K., McCulloch, M., McFarland, S., Thompson, S., Yaver, D., Berry, A., 2013. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of l-malic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97:8903-8912.

- Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-García, I., 2016. Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*. 51:1891-1903.
- Cochrane, V.W., 1958. *Physiology of fungi*. John Wiley and Sons, Inc. London.
- Crognale, S., Petruccioli, M., Fenice, M., Federici, F., 2008. Fed-batch gluconic acid production from *Penicillium variable* P16 under different feeding strategies. *Enzyme Microb. Technol.*, 42:445–449.
- Currie, J.N., Kane, J.H., Finlay, A., 1931. Process for producing gluconic acid by fungi (US patent No. 1 893 819), *Chem. Abstr.*, 27: 2249.
- El-Enshasy, H.A., 2003. Production of gluconic acid by free and immobilized cells of recombinant *Aspergillus niger* in batch cultures. *J Biotechnol., Egypt*, 13:187–201.
- Ellis, M.B., Ellis, J.P., 1997. *Microfungi on land plants*, 2nd edition. Slough: Richmond.
- Ettre, L.S., 2003. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography. In *LC-GC Europe*, s.2–7.
- Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)-2014
- Floros, J.D., Dock, L.L., Han, J.H., 1997. Active packaging technologies and applications. *Food Cosmet. Drug Packag.*, 20:10-17
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99:7859-7877.
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P., 2002. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. *Int Dairy J.* 12:541–553.
- Goodsell, D., 2006. <https://pdb101.rcsb.org/motm/77>

- Gupta, J.K., Heding, L.G., Jargensen, O.B., 1976. Effect of sugars, pH and ammonium nitrate on formation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*,23:63–67
- Halliwell, B.,Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, Clarendon Press.
- Harvey, R.A., Champe, P.C. and Ferrier, D.R., 2007. *Biyokimya*, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, s509.
- Hatzinikolaou, D.G., Macris, B.J.,1995. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* 6:530-534.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 1997. *Biyokimya*, muhtelif kısımlar. Şafak yayınevi, Erzurum, s.36.
- Keilin, D., Hartree, E.F., 1948. *Biochemical Journal*, 42: 221-229.
- Khurshid, S.,Kashmiri, M.A., Quershi, Z., Ahmad, W., 2009.Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger*.*African Journal of Biotechnology* 10: 1674-1678.
- Kilinceker, G., Karakilcik,M., Caglar,E., Sangun, M.K.,2017.The Effect of Bacteriologically Generated Carbohydrates on Electrocatalytic Oxidation and Hydrogen Efficiency
- Kleppet, K., 1966 The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Biochemistry* 5:139–143
- Lakna, 2018. <https://pediaa.com/difference-between-bioreactor-and-fermentor/>
- Lehninger, A.L.,1982. *Principles of biochemistry*. Worth Publisher, Acedemic press,NewYork,587-665
- Lockwood, L.B., 1975. Orgainc acid production in the filamentous fungi. *Industrial Mycology.*, London,s140.
- Low, N., Jiang, Z., Ooraikul, B., Dokhani, S., Palcic, M.M., 1989. Reduction of glucose content in potatoes with glucose oxidase. *J Food Sci* 54:118–121.

- Lu, F., Ping, K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z., Chu, J., Zhuang, Y., 2015. Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process Biochemistry* 50 : 1342–1348.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. *Brock-Biology of Microorganisms*. 10th ed., Prentice Hall Inc., ISBN 0-13-085264-3.
- Miron, J., Gonzalez, M.P., Vazquez, J.A., Pastrana, L., Murado, M., A., 2004. A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions. *Enzyme Microb Tech.*, 34:513–522.
- Moresi, M., Parente E., Mazzatura, A., 1991. Effect of dissolved oxygen concentration on repeated production of gluconic acid by immobilised mycelia of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 3:320-323.
- Moyer, A.J., Welss, P.A., Stubbs, J.J., Herrick, H.T., May, O.E., 1937. Gluconic acid production –Development of inoculum and composition of fermentation solution for gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure. *Ind. Eng. Chem.*, 29:777–781.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure, *American Heart Journal*, 135-115.
- Olijve, W., Kok, J.J., 1979. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch. Microbiol.*, 121:283–290.
- Pandey, A. 2003. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13:81-84.

- Papagianni, M., 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol.*, 25:244–263.
- Philips, D.H, Johnson, M.J., 1959. Oxygen transfer in agitated vessels. *Ind. Eng. Chem.*, 51:83–88.
- Pitt, J.I., 1985. Nomenclatorial and taxonomic problems in the genus *Eurotium*, in “Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics”. (Samson, R.A. and Pitt, J.I., Eds) Plenum Press, New York sf. 383–395.
- Pluschkell, S., Hellmuth, K., Rinas, U., 1996. Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng*, 51: 215-220
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C., 2006. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technol Biotechnol*, 44:185–95.
- Ray, S., Banik, A.K., 1999. Effect of ammonium and nitrate ratio on glucose oxidase activity during gluconic acid fermentation by a mutant strain of *Aspergillus niger*. *Indian, J Exp Biol*, 37:391–395
- Rehm, H.J., 1980. *Industrielle Mikrobiologie*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Ruijter, G.J.G., Kubicek, C.P., Visser, J., 2004. Production of organic acids by fungi. J.S.Tkacz, L.Lange (Edit.), *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*, Kluwer Academic, New York, 307-340.
- Sakurai, H., Lee, H.W., Sato, S., Mukataka, S., Takahashi, J., 1989. Gluconic acid production at high concentrations by *Aspergillus niger* immobilized on a nonwoven fabric. *J. Ferment. Bioeng.*, 6:404–408.
- Samson, R.A.; Pitt, J.I., 1985. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Plenum Publishers, London & New York, sf 483.
- Sauer, M., Mattanovich, D., Marx H., 2013. Microbial production of organic acids for use in food, Pages 288-320,

- Shehu,K., Bello,M.T., 2011. Effect of Environmental Factors on the Growth of *Aspergillus* Species. Associated with Stored Millet Grains in Sokoto. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 19:218-223.
- Silvia, P.J., Winterstein, B.B., Willse, J.T., Barona, C.M., Cram, J.T., Hess, K.I. 2008. Assessing creativity with divergent thinking tasks: Exploring the reliability and validity of new subjective scoring methods. *Psychology of Aesthetics, Creativity, and the Arts*. 2:68–85.
- Singh, O.V.,Pereira, B.M.J., Singh,R.P.,1999. Isolation and characterization of apotent fungal strain *Aspergillus niger* ORS-4 for gluconic acid production. *J.Sci. Ind. Res.*, 58:594–600.
- Skoog, D., Leary, J.J., 1971. *Principles of Instrumental Analysis* 4th ed.Saunders College Publishing, USA, 642-659.
- Songre-Ouattara, L.T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Verniere, C., Humblot, C., Diawara, B., Guyot, J.P., 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *International Journal of Food Microbiology* 128,395-400.
- Steel, R., Maxon, W.D., 1962. Some effects of turbine size on novobiocin fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 4:231–240
- Stryer, L.,1981. *Introduction to enzymes*. Biochemistry, W.H. Freeman and Company, San Fransisco, 103-131.
- Telefoncu, A.,1999. İmmobilize Enzimler. *Enzimoloji, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası*, 1-2-3-4-9.
- Theron, M.M., Lues, J.F.R.,2011. *Organic Acids and Food Preservation*. 1nd ed. America: CRC press, Taylor and francis group, 21-40.
- TS 706, Beton Agregaları. *Türk Standartları Enstitüsü, Ankara*.
- Zhang, H., Watanabe, T., Okumura, M., Haruta, M., Toshima, N., 2012. Catalytically highly active top gold atom on palladium nano-cluster. *Nat. Mater.*, s49

- Zhang, H.,Zhang, J., Bao. J., 2016. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*,203: 211-219.
- Zhou,X., Xu,Y., 2019.Integrative process for sugarcane bagasse biorefinery to co-produce xylooligosaccharides and gluconic acid. *Bioresour. Technol.*, 282: 81-87.
- Znad, H., Markos, J., Bales, V., 2004. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger* growth and non-growth conditions. *Process Biochem*,39:1341–1345.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Osmaniye'nin Bahçe ilçesinde doğdu. İlköğretimini Adana Kaldırım İ.Ö.O'nda, lise öğrenimini Adana Erkek Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2013 yılında aynı bölümden bölüm birinciliği ile mezun oldu. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

