

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



**DOLGULU KOLON BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE GLUKONİK
ASİT ÜRETİMİ**

Gülcan SÜTSATAN

Yüksek Lisans Tezi

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Bilim Dalı

EYLÜL 2020

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

DOLGULU KOLON BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ

Tez Yazarı
Gülcan SÜTSATAN

Danışman
Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI

EYLÜL 2020
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı: Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sisteminde Glukonik Asit Üretimi
Yazarı: Gülcan SÜTSATAN
İlk Teslim Tarihi: 21.08.2020
Savunma Tarihi: 21.09.2020

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Hasan TOĞRUL Batman Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza
Doç. Dr. Kürşat Esat ALYAMAÇ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Dolgu Kolon Biyoreaktör Sisteminde Glukonik Asit Üretimi” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

21.09.2020

Gülcan SÜTSATAN



ÖNSÖZ

Bu çalışmada şeker pancarı işletmelerinden elde edilen yan ürünler kullanılarak dolgulu kolon sisteminde glukonik asit üretiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Katı substrat ortamında yüksek oksijen transferini amaçlayan Raimbault kolonlarının bu amaçla kullanımı bilimsel literatüre sağlayacağı katkı açısından bir ilk olması bizi motive eden en önemli nedenlerden biridir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, tez süresince değerli bilgilerini paylaşan, mesleki tecrübe açısından gelişmeye yardımcı olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI'na teşekkürler ederim. Çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve değerli fikirlerini paylaşan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN'ne, yüksek lisans eğitimim boyunca akademik açıdan gelişmemi sağlayan tüm hocalara ve deneylerim süresince benden yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım doktora öğrencisi Kübra KOÇAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP) tarafından MF.19.23 protokol numaralı proje ile tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada kullanılan Raimbault kolon sistemi TÜBİTAK 117R003 projesi tarafından temin edilmiştir.

Gülcan SÜTSATAN
ELAZIĞ, 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Glukonik Asit Hakkında Genel Bilgi	4
2.1.1. Glukonik Asit Kullanım Alanları	7
2.1.2. Üretim Yöntemleri	9
2.1.3. Fermantasyon Yöntemleri	16
2.1.4. KHF.....	17
2.2. KHF Biyoreaktör Çeşitleri.....	24
2.2.1. Dolgulu Yatak Biyoreaktörleri Tasarımı	28
2.2.2. Dolgulu Yatak Reaktöründe Engeller	31
2.2.3. Dolgulu Yatak Biyoreaktörün Pilot ve Büyük Ölçekli Uygulamaları	35
2.2.4. Laboratuvar Ölçekli Dolgulu Yataklar	37
2.3. Şeker Pancarı Melası ve Küşpesi Hakkında Genel Bilgi	37
2.3.1. Şeker Pancarı ve Melas	37
2.3.2. Şeker Pancarı Küşpesi	41
2.4. Literatürde Yapılmış Çalışmalar.....	43
3. MATERYAL VE METOT	49
3.1. Materyal.....	49
3.2. Mikroorganizmanın in Vitro Kültürü	50
3.3. Metot	51
3.3.1. Glukonik Asit Üretiminin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım	51
3.4. Analiz Yöntemleri	54
3.4.1. Glukonik Asit Analizleri	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	56
5. SONUÇLAR.....	67
ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sisteminde Glukonik Asit Üretimi

Gülcan SÜTSATAN

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Eylül 2020, Sayfa: ix + 76

Bu çalışmada hammadde kaynağı olarak önemli bir maliyet unsuru olan glukoz yerine pancardan şeker üretimi esnasında oluşan yan ürünlerden melas ve küspe ile *Aspergillus niger* kullanılarak Raimbault kolonda ticari olarak en fazla üretilen organik asitlerden glukonik asit üretimi araştırılmıştır. Raimbault kolonlarında biyoreaktör işletme koşullarının incelenmesi ve bu değişkenlerin glukonik asit üretimine etkilerinin gözlenmesi bu çalışmanın temel amacıdır. Glukonik asit üretimi amacıyla Raimbault kolonda radyal sıcaklık gradyanlarını azaltmak için 3 cm kolon çapı seçilmiştir ve 20 cm yükseklikte tasarlanmıştır. Çalışmada, Raimbault kolon biyoreaktörde glukonik asit üretimi üzerine fermentasyon sıcaklığı, tanecik boyutu, dolgu miktarı ve havalandırma hızı olmak üzere 4 işletme parametresinin etkisi Merkezi Kompozit Tasarım yardımıyla incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak aynı program ile analiz edilmiştir. Belirli zamanlarda alınan örneklerdeki glukonik asit miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak tayin edilmiştir.

Sonuç değişkeni olarak glukonik asit konsantrasyonu ve glukonik asit verimliliği ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Glukonik asit konsantrasyonunun cevap değişkeni olarak belirlendiği deney sonuçlarıyla istatistiksel olarak önerilen uygun matematiksel ifadenin kuadratik formda olduğu görülmüştür. Sonuç değişkeni olarak zamanın da etkisinin olduğu verimlilik sonuç değişkenine önerilen uygun model ise lineer matematiksel denklem formunda elde edilmiştir.

DeneySEL sonuçlarının istatistiksel analizleri sonucunda reaktör dolgu miktarındaki artış ve tanecik boyutundaki azalma, glukonik asit üretiminde önemli bir artışa neden olduğu görülmüştür. Kolon içeriğindeki dolgu miktarı önemli bir reaktör işletme parametresidir. Dolgu miktarındaki artış ile glukonik asit konsantrasyonu ve verim miktarı lineer olarak arttığı görülmüştür. Raimbault kolon sıcaklığının glukonik asit üretiminde önemli bir parametre olduğu, en uygun ortam sıcaklığının merkez nokta civarında (29 °C) olduğu görülmüştür. En yüksek glukonik asit konsantrasyonu (40 g/L) hava besleme hızının ve dolgu miktarının üst (0,5 L/sa, 10 g), tanecik boyutun alt (0,6 mm) ve ortam sıcaklığının merkez noktasında elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dolgulu kolon, Glukonik asit, Katı hal fermentasyon, *Aspergillus niger*, Raimbault kolon

ABSTRACT

Gluconic Acid Production in Packed Bed Bioreactor

Gülcan SÜTSATAN

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering

September 2020, Pages: ix + 76

In this study, gluconic acid production with *Aspergillus niger* was investigated by using molasses and pulp from the by-products formed during sugar production from beet instead of glucose, which is an important cost element as a raw material source in the Raimbault columns. The main purpose of this study is to determine the bioreactor operating conditions in the Raimbault columns and to observe the effects of these variables on gluconic acid production. Column diameter was chosen 3 cm to reduce radial temperature gradients in the Raimbault column and it was designed with a height of 20 cm production. In the study, the effect of operating parameters such as fermentation medium temperature, particle size of pulp, filling amount in column and aeration rate, on gluconic acid production in the Raimbault column bioreactor was examined via Central Composite Design and the results were analyzed statistically. Gluconic acid amounts in samples taken at certain times were determined using high performance liquid chromatography.

As result variables, gluconic acid concentration and gluconic acid efficiency were analyzed separately. With the experimental results in which the gluconic acid concentration was selected as the response variable, it was seen that the appropriate mathematical expression that was statistically suggested was a model as quadratic form. The appropriate model proposed for the efficiency result variable, which also has the effect of time as the result variable, was obtained in the form of linear mathematical equations.

An increase in gluconic acid production was observed with the increase in the filling amount and the decrease in the particle size. The filling amount in the column content is an important reactor operating parameter. It was observed that gluconic acid concentration and productivity increased linearly with the increase in filling amount. It has been observed that the bath temperature in which the Raimbault column system is kept is an important parameter in gluconic acid production, and the optimum ambient temperature is around the center point (29 °C). The highest gluconic acid concentration (40 g /L) was obtained at the center point of the air feed rate and filling amount (0.5 L / hr, 10 g), lower particle size (0.6 mm) and ambient temperature.

Keywords: Packed column, Gluconic acid, Solid state fermentation, *Aspergillus niger*, Raimbault column

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. GA formülü ve Glukono- δ -lakton.....	4
Şekil 2.2. Genel glukonat yolları.....	6
Şekil 2.3. GA, glukono- δ -lakton ve glukono- λ -lakton yapıları.....	7
Şekil 2.4. GA biyosentezi.	12
Şekil 2.5. Petride çoğaltılmış <i>A. Niger</i>	16
Şekil 2.6. Besleyici taşıyıcı substratın iç yapısı.....	17
Şekil 2.7. Deney düzeneğinin şeması.....	25
Şekil 2.8. Tepsi Reaktörü.....	26
Şekil 2.9. Döner tambur reaktör	27
Şekil 2.10. Sürekli vida reaktörü.....	28
Şekil 2.11. Dolgulu yatak biyoreaktörü.....	29
Şekil 2.12. Dolgulu yatak biyoreaktörlerin temel tasarım özellikleri ve muhtemel tasarımlar.....	30
Şekil 2.13. Geleneksel dolgulu yatakların temel tasarımı ve çalışma özellikleri.....	31
Şekil 2.14. Dolgulu kolon reaktörlerinde kanallaşma.....	34
Şekil 2.15. Koji endüstrisinde soya sosu üretimi için kullanılan geleneksel dolgulu yatak biyoreaktör tasarımı.....	36
Şekil 2.16. Şeker pancarı küspesinin endüstriyel kullanım alanları	42
Şekil 2.17. Şeker pancarı küspesinde bulunan pektin, selüloz ve lignin maddelerine ait yapı gösterimleri.....	43
Şekil 3.1. Reaktör sistemi.....	49
Şekil 3.2. Kolonların doldurulması ve reaktör sistemi.....	53
Şekil 3.3. Kolondan alan numunenin su eklenerek ekstraksiyona hazır hale getirilmesi.....	54
Şekil 3.4. HPLC organik asitlerin kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.1. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından KHF ile GA üretimi deneyleri için elde edilen model ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum.....	62
Şekil 4.2. Bağımsız değişkenlerin eş zamanlı etkileri	63
Şekil 4.3. Fermantasyon sırasında karşılaşılan sorunlar	66
Şekil 4.4. Maksimum GA üretimi için sayısal çözümlemesi sonucunda elde edilen çözüm noktaları.....	66

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. GA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
Tablo 2.2. Gıda katkı maddeleri olarak kullanılan GA türevleri.....	8
Tablo 2.3. Bazı <i>Aspergillus</i> türlerinin vejetatif büyüme koşulları.....	15
Tablo 2.4. KHF tarihçesi ve gelişimi	19
Tablo 2.5. KHF için fermentör tasarımındaki gelişmeler	20
Tablo 2.6. KHF ile DF'nin karşılaştırılması	22
Tablo 2.7. KHF avantaj ve dezavantajları	23
Tablo 2.8. Şeker pancarının kimyasal bileşimi	38
Tablo 2.9. Sakkarozun sudaki çözünürlüğü	38
Tablo 2.10. Şeker pancarı melasının bileşimi	40
Tablo 2.11. Şeker pancarı küspesinin yaklaşık bileşimi.....	41
Tablo 3.1. PDA besi yeri bileşimi.....	50
Tablo 3.2. GA üretiminin incelendiği MKD'ına uygun deneysel matris.....	52
Tablo 3.3. Deneysel tasarımda verilen dolgu miktarına göre hazırlanan ortam	53
Tablo 3.4. HPLC koşulları.....	54
Tablo 4.1. KHF ile GA üretimi için oluşturulan MKD dizayn matrisi ve elde edilen GA konsantrasyonları.....	57
Tablo 4.2. GA konsantrasyonunun sonuç olarak belirlendiği deneysel verilerle önerilen matematiksel modellerin istatistiksel uyumunun incelenmesi.....	58
Tablo 4.3. GA verimliliğinin sonuç olarak belirlendiği deneysel verilerle önerilen matematiksel modellerin istatistiksel uyumunun incelenmesi.....	58
Tablo 4.4. GA üretimi için önerilen indirgenmiş kuadratik formdaki model ifadelerine ait istatistiksel değerler.....	59
Tablo 4.5. GA üretimi için önerilen model ifadelerin ANOVA test sonuçları.....	60
Tablo 4.6. Deney sırasında karşılaşılan sorunlar.....	65

1. GİRİŞ

Glukonik asit (GA), hafif, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmayan bir organik asittir. GA üretimi, fizyolojik ve kimyasal özellikleri nedeniyle gıda, kimya ve ilaç endüstrileri için önemlidir. GA basitçe oksidasyon yoluyla glikozdan üretilir. Ayrıca GA tuzları birçok endüstriyel uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Ergul, 2013).

Küresel GA pazarının bileşik yıllık büyüme oranı (CAGR) 2018-2027 döneminde % 5,0 civarında genişlemesi beklenmektedir. 2027 yılına kadar 1.0 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Artan nüfus ile birlikte artan sağlık bilinci, gıda ürünlerine olan talebi arttırmaktadır. Bu da küresel GA pazarının tahmin süresi boyunca büyümesini teşvik etmektedir. Örneğin, Asya-Pasifik bölgesinin toplam nüfusu 2016 yılında 4741,4 milyon iken, 2017 yılında 4912,3 milyon olmuştur. Dolayısıyla, bölgedeki yüksek nüfusun bölgedeki genel pazarın büyümesini teşvik edecektir.

Bir araştırma firması olan Orbis Research'ün son verilerine dayanarak GA, yiyecek ve içecek, ilaç, kimyasallar, tarım ve diğerleri olarak alt gruplara ayrılmıştır. Yiyecek ve içeceklerin öncü alt segment olması beklenmektedir. Çeşitli gıda tezgâhları içeren perakende sektörünün genişlemesinin, alt segmentin tahmin döneminde büyümesinin ana nedeni olacağı öngörülmektedir.

Bölgelere göre, küresel GA pazarı Kuzey Amerika, Asya-Pasifik, Latin Amerika, Avrupa, Orta Doğu ve Afrika'ya bölünmüştür. Asya-Pasifik'in tahmin süresi boyunca küresel GA pazarı için en büyük pazar payına sahip olması beklenmektedir. Bunun, inşaatta kullanılan kimyasallarla ilgili artan tüketici bilinci sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Gıda katkı maddelerine yönelik artan talebin, bölgedeki küresel GA pazarının büyümesinin bir diğer önemli nedeni olacağı düşünülmektedir. Avrupa bölgesindeki gıda ve içecek endüstrisinin giderek genişlemesinin, tahmin süresi boyunca küresel GA pazarının büyümesini sağlayan ana neden olacağı öngörülmektedir (Anonim 1).

Kimyasal, biyokimyasal ve biyoelektrokimyasal yöntemler gibi GA üretmek için çeşitli yöntemler vardır. Bununla birlikte, diğer yöntemlere kıyasla hafif çalışma koşulları, düşük enerji gereksinimi, az miktarda yan ürün oluşması ve çevresel açıdan zararsız atıklar oluşturması gibi nedenlerden dolayı ticari GA üretiminde fermantasyon yöntemi etkin ve baskın yöntem olarak değerlendirilir. Bu nedenle, fermantasyon ile GA üretimi en popüler yöntemdir. Fermantasyon süreçleri arasında mantarların kullanıldığı yöntemde mikroorganizma olarak *Aspergillus niger* (A. niger) yaygın olarak kullanılmaktadır (Ergul, 2013).

Katı hal fermantasyonu (KHF), çözünmeyen katı substratların bulunduğu ortamda mikroorganizmaların doğal ortamlarına benzer bir gelişme ortamı sağladığından bu çalışmada seçilmiştir. Bu süreçte mikroorganizmalar substrat olarak ucuz atık maddeleri kullanması bu

yöntemin en büyük avantajlarından. Özellikle gıda endüstrisinde üretilen atık maddeler sitrik asit üretimi için mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılmaktadır. Bunlar şeker kamışı ve şeker pancarı küspesi; üzüm, elma ve ananas posaları; tapyoka, hindistan cevizi, muz, portakal ve ceviz kabukları; peynir altı suyu gibi atıklardır (Hang ve Woodams, 1984; 1998; Murad vd., 2003; Kumar vd., 2003; Hamdy, 2013; Kareem ve Rahman, 2013). Bu yapılan çalışmada ise içeriği ve mikroorganizma için oldukça elverişli olan şeker pancarından şeker eldesi sırasında oluşan yan ürünlerden küspe katı destek materyali olarak ve melas ise karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan katı hal biyoreaktörleri arasında bulunan Raimbault kolonları, 1975-1980 arasında geliştirilen ve patentli olan bir ekipmandır. Önceden aşılınmış ve termoregülasyonlu su banyosuna yerleştirilmiş ortamla doldurulmuş küçük kolonlardan (çap 4 cm, uzunluk 20 cm) oluşur. 1980'lerde Maurice Raimbault tarafından kullanılmasından sonra "Raimbault kolonları" olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Her bir kolondan suya doymuş hava geçirilir. Bu ekipman birçok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Üretim ortamını havalandırma imkanı ile birlikte her bir kolonu rutin olarak örnekleyen otomatik bir numune alıcı ile kolonları gaz kromatografisine bağlayarak mikroorganizma solunumunu analiz etme imkanı sunmaktadır. Bu ekipman, tarama çalışmaları, ortam kompozisyonunun optimizasyonu ve üretilen CO₂'nin ölçümü için uygundur. Kullanılan az miktarda ortam (birkaç gram) ve cam kolonun geometrisi, reaktörlerdeki sıcaklığı korumak için uygundur. Bu ekipman, zorla havalandırma, ucuz, nispeten kolay kullanım gibi avantajları ile araştırma açısından elverişlidir (Anonim 2).

Kullanılan mikroorganizma *A. niger* GA üretimi için gerekli olan glukoz oksidaz (GOD), katalaz, laktonaz ve mutarotaz gibi enzimleri üretebildiğinden glukonik asit üretimi için oldukça yararlı bir mikroorganizmadır. Üretilmesi amaçlanan (GA) asidin çok geniş kullanım alanları olmakla birlikte ticari açıdan değeri oldukça yüksektir. Ucuz substratın etkin bir şekilde kullanımı amaçlanan bu çalışmada elde edilen çıktılar sonucunda şeker fabrikası artıklarının kullanılarak değerli bir organik asidin üretim prosesinin şeker teknolojisine katkısı olacağı düşünülmektedir. Fermantasyonla GA üretiminde oksijen hem hücre gelişimi hem de GA üretimi için kullanılmaktadır. Katı substratlarda yüksek oksijen transferini amaçlayan Raimbault kolonlarının bu amaçla kullanımı bilimsel literatüre sağlayacağı katkı açısından bir ilk olacaktır. Elde edilecek verilerle Türkiye'de üretimi gerçekleştirilmeyen GA üretim prosesi için ekonomik bir üretim prosesi ve bilgi birikimi elde edilecektir.

Bu çalışmada dolgu kolon biyoreaktör sisteminde *A. niger* suşu ile GA üretiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Katı substrat ve karbonhidrat kaynağı olarak şeker pancarından şeker eldesinde oluşan yan ürünlerden melas ve küspe kullanılmıştır ve optimum besiyeri bileşimi kullanılarak Raimbault kolon reaktörü işletme parametrelerinin GA üretimine etkisi

araştırılmıştır. Hava besleme hızı, fermentasyon sıcaklığı, dolgu miktarı ve partikül boyutu bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. GA konsantrasyonu (g/L) ve GA verimi (g/Lsa) olmak üzere iki farklı cevap değişkeni kullanılmıştır. Raimbault kolon 3cm çap ve 20 cm yükseklik şeklinde tasarlanmıştır.

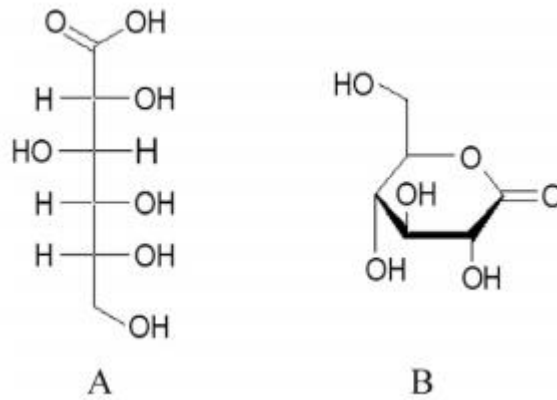


2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde ilk olarak glukonik asit hakkında genel bilgi, kullanım alanları ve üretim yöntemleri hakkında bilgi verilecektir. Daha sonra *A. niger*'a değinilecek ve akabinde fermantasyon yöntemleri hakkında genel bilgilendirme yapıp katı hal fermantasyonu ile birlikte katı hal biyoreaktörlere odaklanılacaktır. Son olarak şeker pancar melası ve küspesiyle ilgili bilgilendirme yapıp literatürde yapılmış çalışmaların bir özeti sunulacaktır.

2.1. Glukonik Asit Hakkında Genel Bilgi

GA, şeker, polisakkarit ve selüloz için temel yapı taşlarından biri olan D-glukozun oksitlenmiş formundan oluşan, yaygın kullanım alanlarına sahip bir organik asittir. GA, 1870 yılında Hlasiwetz ve Habermann tarafından glukozun klor ile oksidasyonu sonucunda keşfedilmiştir (Roehr vd., 1996). Formülü Şekil 2.1'de görülmektedir. 2,3,4,5,6-penta hidroksi hekanoik asidin 16 stereoizomerinden biri olan GA, D-glukoz içerisindeki aldehit grubunun katalizörler, enzimler veya mikroorganizmalar (mantar veya bakteri) tarafından oksidasyonu ile elde edilmektedir.



Şekil 2.1. GA formülü (A) ve Glukono-δ-lakton (B) (Roehr vd., 1996)

Susuz GA beyaz, kokusuz, kristal bir tozudur. Serbest D-glukonik asiti kristal formda hazırlamak zordur. Milsom ve Meers'e göre, susuz maddenin kristalizasyonu 30 °C'nin altında mümkündür. GA'nın erime noktası 120-131 °C aralığındadır. Suda serbestçe çözünür, alkolde az çözünür, eterde ve diğer birçok organik çözücünde çözünmez. 20 °C'de ticari % 50'lik glukonik asit çözeltisinin pH'ı 1,82 dir. GA yoğunluğu 25 °C'de 1.23 g/cm³'tür. Bu konsantrasyon bölgesinde, artan konsantrasyon ile çözelti yoğunluğu neredeyse doğrusal olarak artar. GA'nın

oda sıcaklığında bir kurutucu madde üzerinde saklanması veya 50 °C'nin üzerinde ısıtılması laktonların oluşumuna yol açar. Piroliz, 200 °C'nin üzerinde gerçekleşir. GA'nın bazı özellikleri Tablo 2.1'de görülmektedir. GA'nın iki laktonu bilinmektedir; 1,5-lakton (gluko-δ-lakton) ve 1,4-lakton (gluko-γ-lakton). Bunlar hem katı halde hem de sulu çözelti içinde, birbirleriyle ve serbest asitle dengede bulunurlar. Bu kompleks denge aynı zamanda serbest asitin ayrışmasından da etkilenir; 25 °C'de 1.99×10^{-4} Ka ve 3.70 pKa değerinde bir ayrışma sabitine sahiptir. GA 1,5-lakton, 153 °C'lik erime noktasına sahip, hafif tatlı beyaz kristal maddedir. 1,4-lakton ince iğneler halinde kristalleşir (erime noktası 134-136 °C).

Tablo 2.1. GA'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Ramachandran vd., 2006)

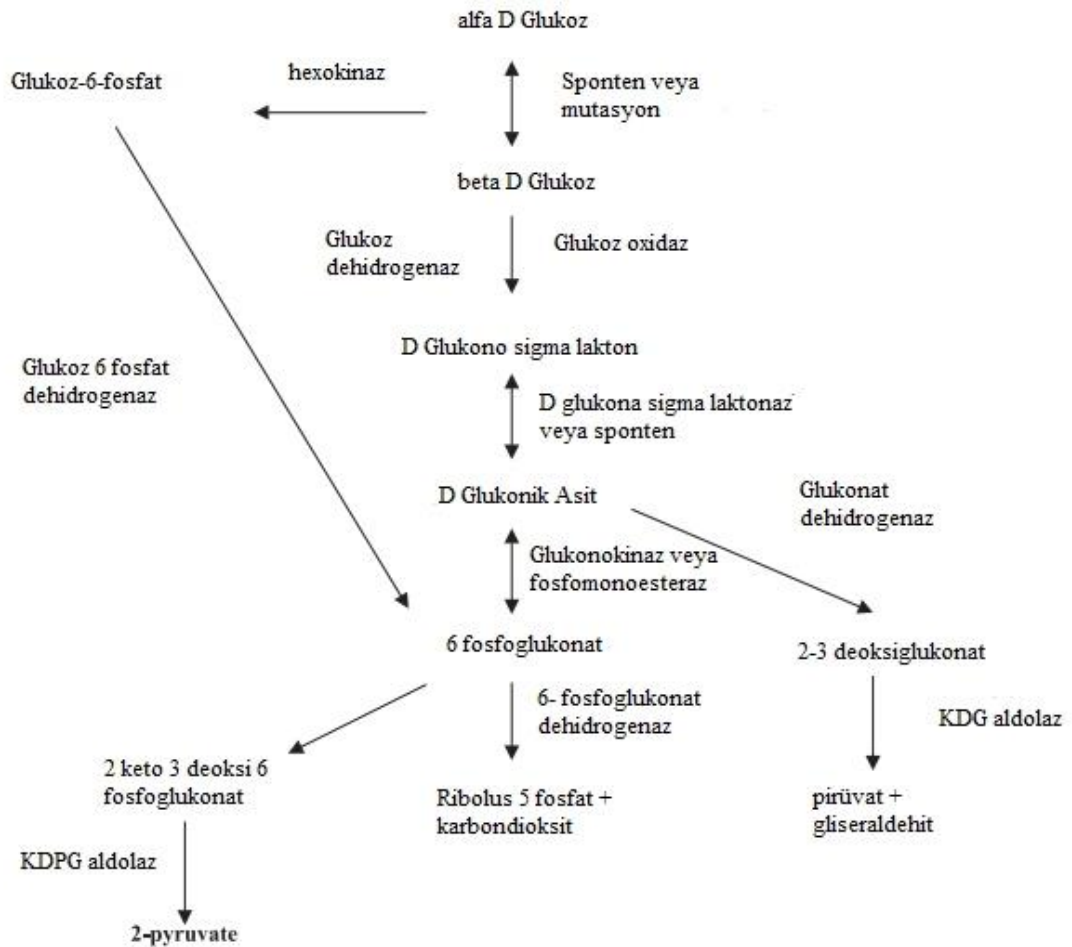
Formül	C ₆ H ₁₂ O ₇ (2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanoik asit)
Doğa	Aşındırıcı olmayan, hafif asidik, daha az tahriş edici, kokusuz, toksik olmayan, kolayca biyobozunur, uçucu olmayan organik asit
Molekül Ağırlığı	196,16
Kimyasal Formül	C ₆ H ₁₂ O ₇
Anlam	2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanoik asit
pKa	3,7
Erime Noktası	120-131 °C
Kaynama Noktası	(%50 çözelti) 100 °C den fazla
Özgül ağırlık	1,24-1,26
Görünüm	Açık kahverengi (%50 çözelti)
Çözünürlük	Suda çözünür
Tat	Ekşi yumuşak tazeleyici tat, hafif ekşi
Ekşi Derecesi	(Sitrik asit 100 olarak kabul edildi) 29-35
Toksosite	Sıçan oral LD 50, 90 mL/kg dan fazla

GA hem asit hem de alkol olduğundan 1,5 molekül içi esterleşme reaksiyonu oluşturur. Asidik ortamlarda sıklıkla bir ester olan anhidro gluko-δ-lakton vermek üzere bir molekül su uzaklaşır. Sulu çözeltilerde GA ile laktonları denge durumundadır. Zayıf bir asit olan GA (25°C'de $K_a=1.99 \times 10^{-4}$) sulu çözeltilerindeki tüm türlerin %55-60'ını oluşturmaktadır. Ortama baz ilavesiyle aldonik halka açılarak glukonat iyonu oluşturur ve tuzları glukonat olarak adlandırılır. Bu iyon iki ve üç değerlikli metallerle kolayca bağ oluşturur ve oluşan yapı sadece nitrik asit veya hidrojen peroksit gibi güçlü oksitleyicilerle reaksiyona girebilen bir kararlılığa sahiptir. Oksidasyon sonucunda 2- ve 5-keto-glukonatları, bazı aşırı şartlarda 2-5-diketo-glukonatları değişik oranlarda içerir (Rodríguez vd., 2016).

Mikroorganizmalarla GA üretimi, laktik asit fermentasyonu üzerine yapılan çalışmalarda Boutroux tarafından 1880 yılında gözlenmiş ve bazı araştırmacılar tarafından asetik asit bakterilerinin etkisi olarak doğrulanmıştır. 1922'de Molliard, *Sterigmatocystis nigra* (A. niger) kültürlerinde GA saptamıştır. Ardından, çok sayıda mikroorganizmada, özellikle filamentöz

mantarlarda (örn., *Penicillium*) ve *Asetobacter*, *Gluconobacter*, *Zymomonas* gibi oksidatif bakterilerle GA üretimi gözlemlendi. Bernhauer (1940) tarafından yapılan sistematik çalışmalar, oluşan asidin kalsiyum karbonat ilavesiyle nötralize edilmesi durumunda *A. niger*'in glukozu GA'ya yüksek verimle dönüştürebileceğini ortaya çıkarmıştır (Roehr vd., 1996).

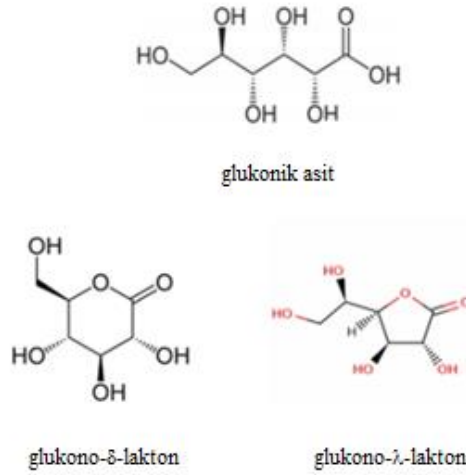
Gluko- β - δ -lakton, GA' nın bir iç esteridir. Başlangıçta tatlı ve ardından hafif asit tadı verir. Sulu sodyum glukonat çözeltilerinin oksidasyona ve yüksek sıcaklıklarda indirgenmeye karşı dirençli oldukları bilinmektedir. GA etkin bir plastikleştiricidir. Kolayca biyolojik olarak parçalanabilir (48 saatte % 98). Konsantre GA çözeltisi, belirli lakton yapıları (nötr siklik ester) içerdiğinden antiseptik özellik gösterir. Sodyum glukonat, yüksek bir sekestrasyon gücüne sahiptir (Pandey vd., 2016). Glukonat yolu, Şekil 2.2' de detaylandırılmıştır (Ramachandran vd., 2006).



Şekil 2.2. Genel glukonat yolları (Ramachandran vd., 2006)

2.1.1. Glukonik Asit Kullanım Alanları

Organik asitler; kendi yapılarına bağlı olarak geniş ölçüde değişen, farklı kullanımlara sahip, oldukça heterojen bileşik grubunu içermektedir. Şekil 2.3’de GA ve türevlerinin yapıları verilmiştir. GA türevleri, yükseltme, sekestrasyon, sertleştirme ve lezzet arttırıcı özelliklere sahip asitlik düzenleyicilerdir (E574 – E580) (Tablo 2.2). Bu nedenle, GA ve türevleri (glucono- α -lakton hariç) temel olarak gıda, ilaç, hijyen ve inşaat endüstrileri tarafından katkı maddesi olarak kullanılır. Genel olarak duyuusal özelliklerini korumak veya arttırmak için süt ürünlerine ve alkolsüz içeceklere eklenirler (Ramachandran vd., 2006, Rogers vd., 2006). 1986’da, Amerika Birleşik Devletler (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) genel olarak GA türevlerine, glikon- α -lakton ve sodyum glukonat’a güvenli statü kazandırmış ve gıda ürünlerinde sınırsız kullanımlarını yetkili kılmıştır (Rodríguez vd., 2016). Buna paralel olarak, Birleşik Milletler’in (BM), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), GA ve türevlerinin (glikon- α -lakton ve D-glukonatlar), Kodeks Gıda Katkı Maddeleri Genel Standartlarında belirlenen iyi üretim uygulamaları ile gıda katkı maddesi olarak kullanımını düzenlemiştir. Tablo 2.2’de FAO tarafından gıda katkı maddesi olarak kabul edilen GA türevleri gösterilmektedir (Rodríguez vd., 2016).



Şekil 2.3. GA, glukono- δ -lakton ve glukono- λ -lakton yapıları (Ergul, 2013)

Tablo 2.2. Gıda katkı maddeleri olarak kullanılan GA türevleri (Rodríguez vd., 2016)

Katkı	E Kodu	Açıklama	Son değişiklik yılı	Teknolojik işlev	Katkı maddesi içeren gıdalar
Glukonik asit	E-574	Renksiz ile açık sarı, berrak şurup sıvısı (sulu glukonik asit çözeltisi (% 55-60) ve glukono- δ -lakton)	-	Asitlik düzenleyici Yetiştirme ajanı	Meyve ve sebzeler (Doğal kökenli) Süt ürünleri
Glucono- δ -lakton	E-575	Beyaz, kokusuz veya neredeyse kokusuz kristaller veya kristal toz	1998	Asitlik düzenleyici Mayalama maddesi Kenetleme maddesi	Doğal fermente süt (Doğal kökenli) Peynir altı suyu protein peyniri Taze makarna, erişte ve ilgili ürünler Emzirenler ve bebekler için ek gıdalar
Sodyum glukonat	E-576	Beyaz ile ten rengi, tanecikli ila ince kristal toz	1998	Kenetleme maddesi stabilizatör yoğunlaştırıcı	Fermente bahçe sebzeleri veya deniz yosunu içeren ürünler Susuz makarna, erişte ve ilgili ürünler Tuz ikameleri Kahve ve ikameleri, çay, bitkisel infüzyonlar ve diğer tahıl bazlı sıcak içecekler
Potasyum glukonat	E-577	Kokusuz, sarımsı beyaz granüllü veya kristal tozu	1998	Asitlik düzenleyici Maya besin maddesi Besin takviyesi	Mozzarella peyniri Bisküvi ve pandispanya Soğuk et
Kalsiyum glukonat	E-578	Kokusuz, beyaz kristal granüller veya toz	1998	Asitlik düzenleyici Sertleştirici Kenetleme maddesi Besin takviyesi	
Demirli glukonat	E-579	Yeşilimsi sarı granüller, soluk gri granüller veya hafif yanmış şeker benzeri bir kokuya sahip kristal toz	1999	Renk koruyucu stabilizatör Besin takviyesi	Bahçe sebzeleri ve deniz yosunu sirke, yağ, tuzlu su veya soya sosunda
Magnezyum D-glukonat	E-580	Beyaz ile kirli beyaz, kokusuz ince toz	1999	Asitlik düzenleyici Sıkılaştırıcı ajan Maya besin maddesi Besin takviyesi	Ekmek yapım ürünleri Su

GA, yiyecek ürünlerinin duyu özelliklerini acı ama tazeleyici bir tat vererek geliştirmeye ek olarak, içeceklerde potansiyel olarak mevcut bazı metalleri (meyve sularında Ca ve Fe gibi) bağlayarak bulutlanmayı önler. GA ayrıca turşu gibi gıdalar için gıda koruyucu olarak kullanılır. Kurutulmuş et ve sosis gibi ürünler için koruyucu olarak glucono- α -lakton kullanılır. Bazı gıda işleme tesisleri ve endüstriyel tesislerinde temizlik maddesi olarak GA türevlerini kullanır (Ramachandran vd., 2006; Milsom vd., 1985). Cam eşyayı temizlemek için alkalın sodyum glukonat çözeltileri kullanılır, ancak metal (çelik, alaşımlı) bileşenler için GA tercih edilir. Ek olarak, fırın endüstrisinde, yağlı bileşiklerin emilimini azaltmak için bir asitleyici ve kimyasal fırın mayası olarak glukono- α -lakton kullanır (Ramachandran vd., 2006).

Mango (Davidzon vd., 2010), şeftali (De Cal vd., 2013), üzüm (Jackson vd., 2008; König vd., 2009), elma (Hadas vd., 2007; Prusky vd., 2004) ve portakal (Vilanova vd., 2014) üzerinde yapılan araştırmalar, meyvelerde bu bileşiklerin aşırı miktarda bulunması biyolojik patojenlerin neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanan bir kalite kaybına neden olduğunu göstermektedir. GA'nın belirlenmesi, üzüm olgunluğunu ve şarap kalitesini değerlendirmede yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Uluslararası Bağ ve Şarap Örgütü (OİV)'ne göre, şarabın GA içeriği asla 300 mg/L'yi geçmemelidir.

Bununla birlikte bu bileşiklerin ilave kullanımları vardır. Farmasötik endüstrisi, sırasıyla hipokalsemiyi, hipomagnezemi ve anemiye tedavi etmek için Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Fe^{+2} gibi iki değerli metallerin glukonatlarını mineral takviyesi olarak kullanmaktadır. Ek olarak, sodyum glukonat sertliği ve aşırı çevresel koşullara direnci artırmak için bir çimento katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Hustede vd., 2012; Sawyer, 1964). GA kullanım alanları günümüzde hala genişlemeye devam etmektedir.

2.1.2. Üretim Yöntemleri

GA ve tuzlarının ticari üretiminin çoğu, glukozun veya glukoz içeren ham maddelerin oksitlenmesiyle gerçekleştirilir. Oksidasyon yöntemi kimyasal, elektrolitik, katalitik veya biyokimyasal olabilir (Isabell vd., 1932; de Wilt, 1972). GA kimyasal ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak elde edilebilse de, biyoteknolojik yöntemler endüstriyel ölçekte baskındır (Bernhauer vd., 1924). Mevcut birçok farklı oksitleyici ajan vardır, ancak yine de işlem fermantasyon işlemlerine kıyasla daha pahalı ve daha az verimlidir. Diğer yöntemlere kıyasla hafif çalışma koşulları, düşük enerji gereksinimi, az miktarda yan ürün oluşması ve çevresel açıdan zararsız atıklar oluşturması gibi nedenlerden dolayı ticari GA üretiminde etkin ve baskın yöntem olarak değerlendirilir (Ramachandran vd., 2006).

Spesifik olarak, *Penicillium* mantarları ile derin fermantasyona dayanan metotlar, *A. niger* gibi filamentli mantar kültürleri veya asetik asit bakterileri (AAB) (özellikle *Gluconobacter oxydans*) kullanılarak, (yüksek düzeyde seçici ve teknik açıdan etkili olanların kullanılmasıyla)

diğerlerine oranla etkisiz hale gelmiştir. *Acetobacter diazotrophicus* ve *Zymomonas mobilis* dahil olmak üzere, glukozu GA'ya metabolize edebilen diğer bakteri türleri de tanımlanmıştır. Ek olarak, immobilize hücre veya enzim kullanan yeni fermentasyon yöntemleri yakın zamanda ortaya çıkmıştır ve gelecekte GA üretimi için rekabetçi seçenekler haline gelebilir (Rodríguez vd., 2016).

Oksidasyon İçeren Yöntemler

Oksidasyon içeren yöntemleri üç alt gruba ayırabiliriz. Bunlar; kimyasal oksidasyon, elektrokimyasal oksidasyon, katalitik oksidasyondur.

Kimyasal Oksidasyon; kontrolü zor olan ve optimize edilmiş reaksiyon koşullarında bile az verim sağlayan (% 60 - 80) ve istenmeyen yan ürünler açığa çıkaran sınırlı ürün dezavantajına sahip bir yöntemdir (Hustede vd., 2005). Ürünün izolasyonu ve saflaştırılması zordur. Hidrojen peroksit, ozon (Kagaku vd., 1974) ve oksijen (Soap Co, 1973), diğer oksitleyici maddelerin ve bunların indirgenme ürünlerinin bağlantılı olduğu ekolojik problemler nedeniyle tercih edilen oksidanlar olmuştur (Hustede vd., 2005).

Elektrokimyasal Oksidasyon; benzer problemler, çoğu halojenlerin oksidasyon potansiyeline dayanan elektrokimyasal prosedürlere eşlik eder. Genel yaklaşım, 1-20 A/dm² akım yoğunluğunda bromid içeren bir glukoz çözeltisini (glukoza göre yaklaşık % 10 mol) elektrolize etmektir. Meydana gelen asidi nötrleştirmek için karbonat (tercihen kalsiyum karbonat) veya hidroksit eklenir (Udupa vd., 1974). Elektrik akımı verimleri % 80-86'dır; glukozu dayalı ürün verimi % 80-97'dir. Elektrik maliyetindeki hızlı artış, elektrolitik süreci rekabet edemeyecek hale getirmiştir (Hustede vd., 2005).

Katalitik Oksidasyon; yaşanan gelişmeler, glukozu oksijen veya hava ile oksitleme tekniğinde büyük gelişmelere yol açmış ve bu stratejinin endüstriyel ölçekte benimsenmesine ciddi önem verilmiştir. Yükseltgenme, uygun bir katalizör yardımıyla, konsantrasyonu 1-2 mol/L olan bir glukoz çözeltisi üzerinde gerçekleştirilir. Sürekli alkalın çözelti ilavesiyle pH 8 ile 11 arasında (tercihen 9-10) tutulur. Başlangıçta kullanılan katalizörler; aktif kömür, alüminyum oksit ya da başka bir taşıyıcıya asılmış ince platin grubu metallerdir (Hustede vd., 2005). Katalitik reaksiyon ile ilgili en önemli gözlemler,

- ✓ Katalizörün aktivitesinde başlangıç seviyelerinden hızlı bir şekilde azalması (yeniden etkinleştirme çabalarına rağmen tamamen geri çevrilemeyen bir düşüş),
- ✓ Yüksek oranda saflaştırılmış glukoz çözeltilerine olan ihtiyaç ve yetersiz katalizör spesifikliği,
- ✓ Substratın reaksiyon koşulları altında yan reaksiyonlara girme eğiliminin bir sonucu olarak çeşitli yan ürünlerin oluşumudur.

Sürecin ekonomik olarak uygulanabilirliği büyük ölçüde katalizörün aktivitesine, seçiciliğine, ömrüne, maliyetine ve ayrıca ürün saflaştırması için gereken yöntemlere ve enerji taleplerine bağlıdır. Aksine daha önceki önerilere rağmen, glukoz fotokimyasal olarak GA'ya oksitlenemez (Degelmann vd., 1982).

Son yıllarda, yeni hammaddeler ile daha ucuz ve çevreye zarar vermeyen reaktifler kullanarak önceki prosedürlerin endüstriyel adaptasyonunu kolaylaştırmaya odaklanılmıştır. Örneğin, sulu hidrojen peroksit alternatif bir reaktif olarak kullanılmıştır (Bujak vd., 2012; Moreno vd., 2012). Ek olarak, yeni bir katalitik yöntem, reaksiyonu hızlandırmak için düşük frekanslı (20 kHz) ultrasonla birlikte FeSO₄ katalizörü kullanarak 25 °C'de %99 glukoz dönüşümünü sağlamışlardır (Rinsant vd., 2014). Katalizörün yüksek maliyetleri ve deaktivasyonu, ayrıca bazı sızıntı problemleri, kimyasal prosesleri fermantasyon proseslerinden daha az rekabetçi kılmaktadır (Pal vd., 2016).

Mikrobiyolojik Yöntemler

Mikrobiyolojik temelli dönüşüm yöntemlerinin günümüzdeki önemi, büyük ölçüde, birçok biyolojik sistemin farklı substratları seçici olarak dönüştürme kabiliyeti ve sonraki işlemlerin ekonomik fizibilitesi nedeniyle (Rodríguez vd., 2016). Mikrobiyolojik yöntemleri üç farklı mikroorganizmaya ayırabiliriz. Bunlar;

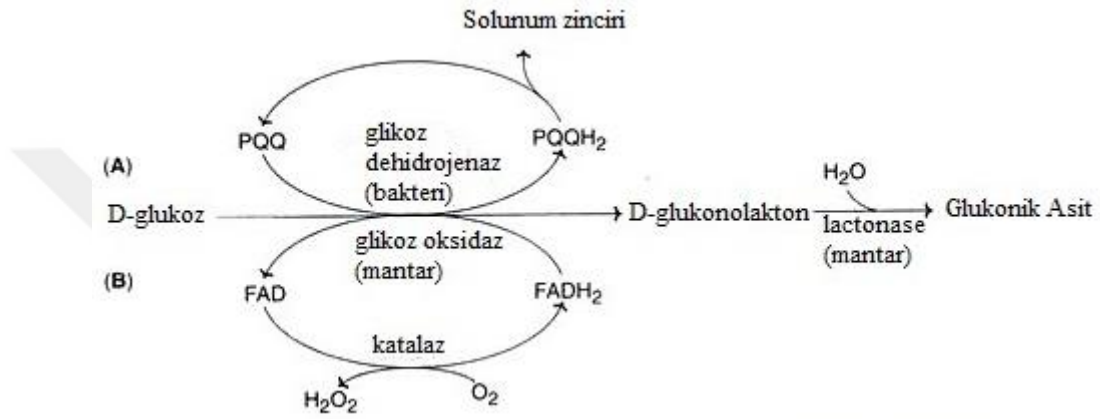
- ✓ Bakteri,
- ✓ Maya,
- ✓ Mantar.

AAB ve *Pseudomonas savastanoi*, başlangıçta GA üretmek için gözlenen kültürlerdi. Mantarların aksine, bakterilerde, reaksiyon glukozu GA'ya okside eden glukoz dehidrogenaz (GDH; EC 1.1.99.17) ile gerçekleştirilir; GA dehidrogenaz ile 2-ketoglukonat okside edilir. 2,5 diketoglukonik asite olan oksidasyon basamağına 2-ketoglukonat dehidrogenaz aracılık eder. Her üç enzim, hücrelerin membranlarında lokalize olur ve yüksek glukoz konsantrasyonları ile indüklenir (> 15 mM). GDH, hücre dışı bir proteindir ve bir koenzim olarak pirolokinolin kinona (PQQ) sahiptir (Pandey vd., 2016).

Ortamdaki glukoz konsantrasyonu 15 mM'den büyük olduğunda, pentoz fosfat yolu bastırılır ve böylece GA birikimi gerçekleşir. *Gluconobacter oxydans*, glukozu iki alternatif yolla okside eden zorunlu bir aerobik bakteridir. İlk yol, bir başlangıç fosforilasyonunu ve ardından pentoz fosfat yoluyla oksidasyonu içerir. İkincisi, GA ve ketoglukonik asit oluşumuna yol açan “doğrudan glukoz oksidasyon” yoludur (Pandey vd., 2016).

Anastassiadis vd. (1999, 2003, 2005) GA üretimi için maya benzeri bir dimorfik mantar türü olan *Aspergillus pullulans* kullanmıştır. pH, oksijen, sıcaklık, ortam bileşimi, hava

doğunluğu gibi sürekli ve süreksiz GA üretimi için çeşitli işlem parametreleri incelemişlerdir. % 94'lük en yüksek glukoz dönüşümü ve % 87.1'lik ürün verimi, optimum pH 6.5'te elde etmişlerdir. pH 4.5'te, ürün seçiciliği ve verimi, sırasıyla % 67.8 ve % 20.7'ye ulaşmıştır ve bu değerin çok düşük olduğu bildirilmiştir. Maya ile GA üretimi için 29-31 °C'lik bir sıcaklık aralığı uygun bulmuşlardır. 32 °C'lik bir sıcaklıkta, yani 1 °C'lik bir artış, biyokütle ve ürünün kararlı durum konsantrasyonunda önemli ölçüde bir azalma meydana getirdiği görülmüştür (Pandey vd., 2016). Bakteri ve mantardaki GA sentezi Şekil 2.4'de görülmektedir.



Şekil 2.4. GA biyosentezi (A: *Gluconobacter suboxidans*, B: *A. niger*) (Goldberg vd., 2009)

Filamentli Mantarlar ile Glukonik Asit Üretimi

Filamentli mantarlar tarafından glukozun GA'ya oksidasyonu, yüksek oksijen ihtiyacı olan aerobik bir fermentasyon prosesidir (Gibson vd., 1964; Reuss vd., 1986). İşlem, GOD ile katalize edilir. Bu enzim, ağırlıklı olarak hücre duvarı ve hücre dışı sıvı içinde bulunan bir flavoproteindir. Toplam enzim aktivitesinin yaklaşık % 80'inin *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinde bu iki lokasyonla ilişkili olduğu bulunmuştur (Bankar vd., 2009, Witteveen vd., 1992).

A. niger glukozun GA'ya dönüştürülmesi için gerekli tüm enzimleri; GOD, katalaz, laktonaz ve mutarotaz içerir. Glukoz dönüşüm süreci sırasında, *A. niger*'de bulunan GOD, iki hidrojenin çıkarılmasıyla kendini indirgemeye maruz kalır. Enzimin indirgenmiş şekli, moleküler oksijenle daha da oksitlenir, bu da reaksiyonda bir yan ürün olan hidrojen peroksidin oluşumuyla sonuçlanır. *A. niger*, hidrojen peroksit üzerinde etki gösteren, su ve oksijen salgılayan katalaz üretir. Glukon-δ-laktonun GA'ya hidrolizi laktonaz ile kolaylaştırılır. Reaksiyon, nötre yakın bir pH'ta kendiliğinden gerçekleşebilmektedir ki bu, kalsiyum karbonat veya sodyum hidroksit ilavesiyle sağlanabilmektedir. Laktonun ortamdaki birikimi GA üretimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olması nedeniyle ortamdaki lakton çıkarılması tavsiye edilmektedir. Glukonolaktonaz enziminin de *A. niger* (Cho vd., 1977)'de mevcut olduğunu belirten raporlar vardır, bu da glukoz-

δ -laktonun GA'ya dönüşüm oranını artırır. GA üretimi, doğrudan GOD aktivitesi ile bağlantılıdır. Uygulamaya bağlı olarak, sodyum glukonat veya kalsiyum glukonat içeren fermantasyon sıvıları, nötralizasyon için sırasıyla sodyum hidroksit veya kalsiyum karbonat çözeltileri ilave edilerek üretilir (Pandey vd., 2016).

A. niger, optimum koşullar altında glukozun neredeyse kantitatif dönüşümüne izin vermesine rağmen, genellikle ortamın viskozitesini artıran ve bunun sonucunda ortamın havalandırılmasını ve homojenleşmesini engelleyen miselini oluşturur (Larroche vd., 1997). Bununla birlikte, inokulum hazırlığı sırasındaki ajitasyon hızına bağlı olan tohum morfolojisi kontrol edilerek işlem iyileştirilebilir (Lu vd., 2015).

Bu alandaki genetik mühendisliği çalışmaları, işlemin verimliliğini artırmak ve GA üretim maliyetlerini azaltmak için endüstriyel kullanımda mantar suşlarını değiştirmeye odaklanmıştır. ORS-4.410, GA elde etmek için en yaygın şekilde kullanılan modifiye *A. niger* suşudur. Yapılan bir çalışmada doğal soy, *A. niger* ORS-4, başlangıçta şeker kamışı endüstriyel atıklardan (Singh vd., 1999) izole edilmiş ve art arda UV ışınmasıyla mutasyona uğratılmış. Artan hücre büyüme hızları sergilemesine ek olarak, *A. niger* ORS-4.410'un, vahşi suşun hem serbest hücreler (GA verimi 6 gün sonra %88), hem de immobilize hücreler (12 gün sonra %78) olarak daha iyi performans gösterdiği Sing vd. (2001) tarafından bulunmuştur. Bu tür, aynı zamanda hem kesiklide (Singh vd., 2005) hem de yarı kesikli işlemlerde (endüstriyel) atıklardan (üzüm ve muz) elde edilen şekerler için mükemmel fermantasyon kabiliyetlerine sahip olduğu bildirilmiştir.

A. niger ARNU-4'ün, şeker kamışı sanayi atıklarının fermantasyonu için benzer şekilde etkili olduğu ve verimin %85,2 değerinde olduğu Sharma vd. (2008) tarafından kanıtlanmıştır. Ek olarak, soğandan izole edilen ve UV ışınımı ile mutasyona uğramış *A. niger* suşu UV-112, glukozda ana suşundan daha yüksek GA verimini sağladığı bildirilmiştir (0,66 vs. 0,25 gGA/gkatı) (Prabu vd., 2012).

GA üretimi için genel optimum şartlar aşağıdaki gibidir:

- ✓ 110-250 g/L arasındaki konsantrasyonlarda glukoz,
- ✓ Azot ve fosfor kaynakları çok düşük bir konsantrasyonda (20 mM),
- ✓ 4.5 ila 6.5 civarında ortamın pH değeri,
- ✓ Yüksek hava basıncı uygulamasıyla (4 bar) çok yüksek havalandırma oranı (Ramachandran vd., 2006).

GA üretimini etkileyen iki önemli parametre vardır. Bunlar oksijen ve kültür ortamının pH'ıdır. GOD, glukozun biyodönüşümünde oksijen kullandığından, glukozun oksidasyonundaki ana substratlardan biri oksijendir. Oksijen gradyanının konsantrasyonu ve hacimsel oksijen transfer katsayısı, ortamdaki oksijenin varlığını izleyen kritik faktörlerdir. Bu iki faktör, oksijenin gazdan sulu faza transfer oranını oldukça etkiler. Bu açıdan çeşitli raporlar mevcuttur.

Havalandırma oranı ve çalkalama hızı, ortamdaki oksijenin varlığını etkileyen iki önemli parametredir. GA üretimi, çözünmüş oksijen konsantrasyonundan kuvvetli bir şekilde etkilenen, biyolojik dönüşüm reaksiyonu için yüksek oksijen talebine sahip son derece oksijen tüketen bir süreçtir. Oksijen, genel olarak atmosferik hava formunda tedarik edilir; bununla birlikte, bazı çalışmalarda yüksek basınçlı saf oksijen de sağlanmıştır (Ramachandran vd., 2006). Örneğin, Sakurai vd. (1989) reaktöre yüksek basınçlı oksijen sağlamıştır. Çözünmüş oksijen 150 ppm'de ve 6 barda tutmuşlar ve saf oksijen kullanılarak yetiştirilen, immobilize *A. niger* miselinin, serbest miselyuma kıyasla yüksek miktarda GA ürettiğini bulmuşlardır. Kapat vd. (2001) 420 rpm'lik bir çalkalama hızında ve 0,25 vvm'lik bir havalandırmada, çözünmüş oksijen konsantrasyonunun GOD üretimi için optimal olduğunu bulmuşlardır. Oksijen için GOD'ın Km değeri sudaki hava doygunluğu aralığındadır (Schmid vd.,1988). Lee vd. (1987) nispeten yüksek basınç (2-6 bar) kullanarak yüksek hacimsel GA üretkenliği elde etmiş ve bu da çözünmüş oksijende 150 mg/L'ye kadar bir artışa yol açmıştır.

Genel olarak, mantar büyümesi sırasında, oksijen kabarcıklarının dağılımı arttıkça, oksijen kaynağı yetersiz olduğundan, oksijen dağılımı dengesiz hale gelir. Oksijen emilim oranı, kültürün viskozitesinden de etkilenir. Misel konsantrasyondaki artış ile oksijenin absorpsiyon oranında hızlı bir azalma gözlenir (Steel vd., 1962).

pH, GA üretimini etkileyen bir diğer önemli parametredir. *A. niger*; sitrik asit, GA ve oksalik asit gibi zayıf organik asitler üretir ve bunların birikimi, besiyerinin pH'ına bağlıdır (Lockwood, 1979). 3,5'in altındaki pH, trikarboksilik asit döngüsü (TCA) döngüsünü tetikler ve sitrik asit oluşumunu kolaylaştırır. Mantarların GA üretimi için pH aralığı 4,5 ila 7,0 'dır. pH 5,5, genellikle *A. niger* için optimum olarak kabul edilir (Znad vd., 2004). Franke vd. (1963) farklı pH seviyelerinde glukoz oksidazın nispi aktivitesi ile ilgili bazı veriler toplamışlar ve pH 5,6'daki %100 aktivitesine dayanarak sırasıyla pH 2,0 ve 3,0'da %5 ve %35 aktivite bildirmişlerdir. Heinrich vd. (1982) tarafından bildirilen raporda, GA üretiminin, sabit yataklı ve karıştırılmış yataklı reaktörlerde, muhtemelen hücre içi ve hücre dışı pH'taki fark nedeniyle, manganez varlığında pH 2,5'de bile gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Aspergillus niger

Aspergillus, 260 (Geiser vd., 2007; Samson vd., 2009) ve 837 tür (Hawksworth, 2011)'den oluşan bir anamorf türdür. Bu türler yaklaşık on farklı teleomorf cinsinde sınıflandırılmıştır (Geiser, 2009). Örneğin *A. nidulans*, teleomorf cinsi *Emericella*'nın bir parçasıdır, *A. fumigatus* ve *A. flavus* sırasıyla *Neosartorya* ve *Petromyces* cinslerine aittir. Bu, *Aspergillus*'un çeşitli bir mantar grubu olduğunu gösterir.

Aspergillus türleri dünya çapında en bol mantarlar arasındadır. Abiyotik büyüme koşullarına göre çok seçici değildirler. Örneğin geniş bir sıcaklık aralığında (6-55 °C) ve nispeten düşük nemde büyüeyebilirler. Bazı *Aspergillus* türlerinin büyüme koşulları Tablo 2.3'de görülmektedir. *A. penicilloides* en kerofilik mantarlar arasındadır (Williams vd., 2009). Ayrıca, *Aspergillus* türleri hayvan dışkıları ve insan dokusu da dahil olmak üzere çok çeşitli substratlar üzerinde beslenir. Bununla birlikte, bunlar çoğunlukla karmaşık bitki polimerleri üzerinde bulunurlar (Bennett, 2010) ve yaygın gıda bozulma mantarları olarak kabul edilirler. *Aspergillus*'un başarısı, etkili dağılımlarıyla da açıklanmaktadır. Bu cinsin sporları havadaki en baskın fungal yapılar arasındadır ve uzun mesafelere dağılır (Bennett, 2010).

Tablo 2.3. Bazı *Aspergillus* türlerinin vejetatif büyüme koşulları (Bennett, 2010)

Tür	Optimum Sıcaklık (°C)	Sıcaklık Aralığı (°C)	Optimum pH	pH Aralığı	Minimum Su Aktivitesi	Optimum Su Aktivitesi	Minimum Bağıl Nem (%)	Optimum Bağıl Nem (%)
<i>A.Niger</i>	35-37	6-47	6.0	1.5-9.8	0.77	0.97	88-89	96-98
<i>A.Oryzae</i>	30-37	7-47	6.0-7.5	4-8		0.99		
<i>A.Fumigatus</i>	37	10-55	5.5-6.5	3-8	0.82	0.97	85	98-99
<i>A.Clavatus</i>	20-25	5-42			0.88		88	98
<i>A.Terreus</i>	37	15-42	5.0		0.78			
<i>N.Fischeri</i>	26-45	11-52				0.98		
<i>A.Nidulas</i>	35-37	6-51	7.0	2-12	0.78		80	95

Aspergillus sadece saprobik yaşam tarzı nedeniyle bilinmemektedir. *A. niger*'in (Şekil 2.5) zencefil bitkisinin bir patojeni olduğu bildirilmiştir (Pawar vd., 2008). Hayvanların ve insanların patojenleri olarak bilinmektedirler. Sağlıklı bireyleri enfekte etmezler, ancak bireylerin bağışıklık sistemi zayıfsa bu bireylerin bağışıklık sistemini istila ederler (Pitt, 1994; Brakhage, 2005).



Şekil 2.5. Petride çoğaltılmış *A. niger*

Doğada, *Aspergillus* katı substratlar içinde ve üzerinde büyür. Bir koloni, tek bir cinsel veya aseksüel spordan kaynaklanabilir, fakat aynı zamanda, birbirine yakın olan konidia veya mikropların kaynaşmasından sonra da ortaya çıkabilir (Krijgsheld vd., 2013). *A.niger*, glukozun GA'ya dönüştürülmesi için gerekli olan; GOD, katalaz, laktonaz ve mutarotaz gibi enzimlerin tamamını üretir (Ramachandran vd., 2006).

2.1.3. Fermantasyon Yöntemleri

Havalı veya havasız mikrobiyal süreçlere fermantasyon denir. Fermantasyon, bireyler ve endüstri için son derece yararlı olan çok çeşitli maddelerin üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu gelişmenin bir sonucu olarak iki farklı fermantasyon tekniği ortaya çıkmıştır: derin fermantasyon (DF) ve katı hal fermantasyonu (KHF). Mikroorganizmalar hem katı (küçük ölçekli agar plakaları) hem de sıvı ortamlarda (birkaç yüz metreküpe kadar büyük ölçekli kültürasyon için şişeler veya biyoreaktörler) yetiştirilir.

DF, yarı katı hal fermantasyonu (YKHF) ve KHF gibi çeşitli fermantasyon yöntemleriyle glukonik asit üretimi yapılabilir.

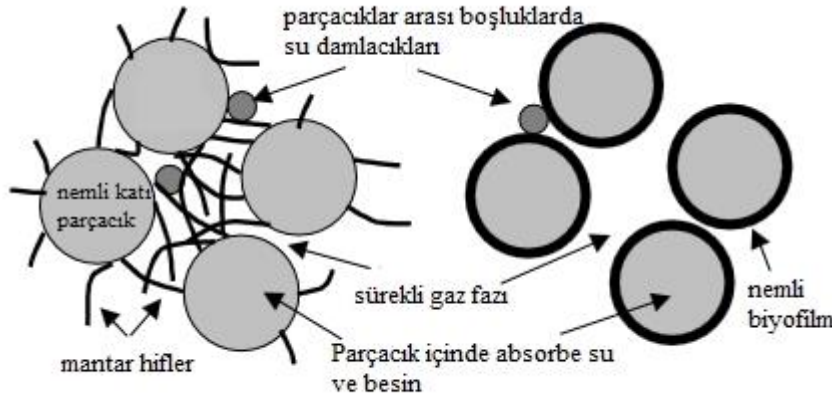
Üretim proseslerinde sıklıkla kullanılmakta olan DF, sıvı bir fermantasyon ortamı içeren kapalı kaplarda seçilen mikroorganizmaların (bakteri, mayalar ve mantarlar) büyümesini içerir. Endüstriyel enzimler ve diğer metabolitler bu işlem kullanılarak üretilir. Gerekli oksijen

uygun bir gazlaştırma sistemi ile verilir. Mikroorganizmalar besinleri sindirir ve istenen enzimleri kùltivasyon çöztisine salar.

Büyük ölçekli fermantasyon teknolojilerinin gelişmesi nedeniyle, mikrobiyal enzimlerin üretimi biyoteknoloji endüstrisinin toplam üretiminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Endüstriyel fermantasyon işlemi, hacimleri 1000 m³'e kadar olan büyük fermantörlerde gerçekleşir. Steril fermantasyon ortamı, mısır, şeker veya soya gibi yenilenebilir hammaddelere dayanan besinler içerir (Chen, 2013).

2.1.4. KHF

KHF, mikroorganizmaların, serbest sıvı bulunmadan katı materyaller üzerinde büyüdüğü fermantasyon süreci olarak tanımlanır (Bhargav vd., 2007). Bir başka tanım ise; parçacıklar arasındaki boşluklarda sürekli bir gaz fazı bulunduğu ve minimum su içeriğinin olduğu durumlarda, nemli katı parçacıklar üzerinde mikroorganizmaların büyümesini içeren süreçtir (Mitchell vd., 2006). Şekil 2.6'da substratın iç yapısı görölmektedir.



Şekil 2.6. Besleyici taşıyıcı substratın iç yapısı (Liu vd., 2006; Zambra vd., 2011)

Katı substratları kullanma kavramı, mikroorganizmalardan üretim için kullanılan en eski yöntemdir. Binlerce yıl önce, hem batı (ekmek ve peynir) hem de doğu (koji) ülkelerinde ağırlıklı olarak gıda işleme için KHF kullanılmıştır. Arkeolojik keşifler, Mısırlıların M.Ö. 2600 yılında bile fermantasyon süreci kullanarak ekmek yaptığını göstermektedir. Peynir yapımı, hayvansal ürünlerin korunması, sirke ve gallik asit üretimi gibi gıda fermantasyonlarında KHF kullanımı yüzlerce yıldan beri varlığını sürdürmektedir. Son yıllara gelindiğinde, diğerlerinin yanı sıra gıda, ilaç, tekstil, biyokimyasal ve biyoenerji dahil olmak üzere birçok endüstri için önemli

biyomoleküllerin ve ürünlerin üretilmesinde de kullanılmaya başlanmıştır (Pandey vd., 2001).

Aflatoksin, orakotoksin ve protein bakımından zengin sığır yemleri (tek hücre proteini) gibi mikotoksinlerin üretimi 1960-1980 döneminde meydana gelen önemli gelişmelerdi. 1980-90 yıllarında, çeşitli birincil ve ikincil metabolitlerin üretiminde, kolon tipi fermenterlerin geliştirilmesinde, kinetiğin ve modellemenin yeni teorilerinin formüle edilmesinde KHF teknolojisi üzerine yapılan araştırma faaliyetlerinde dikkate değer bir artış olmuştur. 1990'dan bu yana, biyoremidasyon ve tehlikeli maddelerin biyodegradasyonu, tarımsal endüstriyel atıkların biyodetoksikasyonu, bitkilerin biyolojik dönüşümleri ve besin zenginleştirilmesi için ürün artıkları, biyoaktif ikincil metabolitlerin, antibiyotikler ve alkaloidler, selüloz, fitaz, proteazlar ve lipazlar gibi enzimler, sitrik asit, laktik asit, oksalik asit, fumarik asit ve gallik asit gibi organik asitler, biyopestisitler, biyosürfaktanlar, biyofarmasötikler, biyoyakıtlar ve aromatik bileşiklerin büyük ölçekli üretimi gibi biyoproseslerin gelişimine daha fazla vurgu yapılmıştır.

KHF, geleneksel doğu yiyeceklerin ve alkollü içeceklerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda fermantasyonu ve enzim üretimi, KHF proses teknolojisinin geliştirdiği önemli alanlardır. KHF'nin tarihsel gelişimi Tablo 2.4'de, katı hal fermentörlerinin gelişimi Tablo 2.5'de görülmektedir.

Tablo 2.4. KHF tarihçesi ve gelişimi (Aidoo vd., 1982; Pandey vd., 2008)

PERİYOT	GELİŞME
M.Ö 2600 Asya'da Mesih'in doğumu öncesinde (Kaydedilen tarih M.Ö 1000)	Mısırlılar tarafından yapılan ekmek <i>Penicillium roqueforti</i> tarafından yapılan peynir
M.Ö 2500	Balık fermentasyonu / şekerle koruma, nişasta, tuz vb.
M.Ö 2500	Koji prosesi
7. Yüzyıl	Budist rahipler tarafından Çin'den Japonya'ya Koji prosesi
18. yüzyıl	Üzüm sirkesi
18. yüzyıl	Tabaklama baskı vb kullanılan gallik asit
1860-1900	Kanalizasyon arıtma
1900-1920	Fungal enzimler, kojik asit
1920-1940	Fungal enzimler, glukonik asit, döner tamburlu fermenter, sitrik asit
1940-1950	Fermantasyon endüstrisinde fantastik gelişme. KHF ve batık fermentasyon ile penisilin üretimi
1950-1960	Mantar kültürleri ile steroid dönüşümü
1960-1980	Mikotoksin üretimi, protein zenginleştirilmiş yem
1980 - Günümüz	Alkol, gibberellik asit gibi çeşitli ürünler
Biyoproses	Tehlikeli bileşiklerin biyoremidasyonu ve biyodegradasyonu, agro-endüstriyel kalıntıların biyolojik detoksifikasyonu, biyotransformasyonlar, vb.
Ürünler	Biyoaktif bileşikler: Aflatoksin, okratoksin, bakteriyel endotoksinler, gibberellik asit, zearalenon, ergot alkaloidler, penisilin, sefalosporin, sefalosin C Enzimler: Selüloz, p-glukosidaz, CMCaz, lakkaz, ksilanaz, poligalakturonaz, ligninaz, ksilanazlar, p-ksilosidaz, α-arabinofuranosidaz, lakkaz, asitler: Sitrik asit, fumarik asit, laktik asit, oksalik asit, gallik asit Diğer ürünler: L-glutarnik asit, pigmentler, karotenoid, ksantan sakızı, süksinoglikan, etanol, aroma bileşikleri, B-12 vitaminleri,

Tablo 2.5. KHF için fermentör tasarımıındaki gelişmeler (Pandey vd., 2008)

Fermenter Türü	Tarih	Proses / Ürün	Mikroorganizma
Ahşap tepsiler	1923	Koji fermentasyonu	<i>Aspergillus oryzae</i>
Döner tambur	1962	Kompostlama	Karışık kültürler
Döner tambur	1964	Koji fermentasyonu	<i>A. oryzae</i>
Döner tambur	1969	Enzimler	<i>A. oryzae</i>
Fernbach flask	1966, 1968, 1983	Aflatoksinler, sporlar	<i>A. oryzae</i>
Alüminyum tencere	1943	Enzimler	<i>A. oryzae</i>
Yatay kap	1975	Okratoksin	<i>A. ochraceus</i>
Yatay tambur	1976	Sürekli beslemeli proses	Mantar suşları
Çimento karıştırıcı	1977	Mısır fermentasyonu	Mantar ve maya suşları
Çimento karıştırıcı	1975	Saman fermentasyonu	<i>Trichoderma, Candida</i>
Ekmek yapımı karıştırıcısı	1979	Protein zenginleştirme	<i>A. niger</i>
Alüminyum tepsiler	1980	Ligno selüloz fermentasyonu	Mantar suşları
Valmik torbalar (gözenekli filmler)	1985	Mikotoksinler	<i>A. flavus</i>
Sabit yataklı diferansiyel reaktör	1989	Spor üretimi	<i>Penicillium rougeforii</i>
Cam kolonlar	1980, 1991, 1992	Enzim üretimi	<i>A. niger</i>
Cam kolonlar	1999, 2000	Sitrik asit, gibberellik asit	Mantar suşları
Katı hal odası	2006	Conidia üretimi	Mantar suşları
Dolgulu yatak	1992, 2006	Modelleme	<i>G. fujikuroi</i>
Hava akışlı dinamik reaktör	2005	Selüloz	<i>Penicillium decumbens</i>
Dolgulu yatak		Modelleme	Mantar suşları

Biyoteknolojik Potansiyel

KHF, serbest suyun yokluğunda, mikroorganizmaların büyümesini ve metabolik aktivitesini sağlamak için gerekli nem ile gerçekleştirilen bir biyoprosesdir. Bu koşullar, içinde bulundukları ve mikroorganizmaların izole edildiği doğal ortama benzemektedir. Son yıllarda, KHF endüstriyel olarak önemli ürünler üretme potansiyeli ile akademik ve endüstriyel sektörlerden dikkat çekmiştir. KHF'nin, enzimler, sporlar ve sekonder metabolitler gibi bazı biyolojik ürünlerin laboratuvar düzeyinde üretilmesi açısından DF'ye göre bazı avantajları vardır. Bununla birlikte, katı ortamlarda fermentasyonun çalıştırılması ve kontrolündeki teknik zorluklar, bu tekniğin endüstriyel üretim için kullanımını cesaretlendirmiştir. Araştırmacıları, KHF'nin biyokimyasal mühendislik yönlerinin incelenmesi için motive etmiştir. Bu sistemi endüstriyel düzeyde başarıyla uygulamak için biyoreaktörlerin tasarımı ve KHF'deki çalışma değişkenlerini kontrol edebilen bir biyoproses gereklidir (Poltronieri vd., 2016).

KHF'nin Zorlukları ve Avantajları

KHF, mantar kültürleri kullanılan enzim üretiminin yüksek titreleri nedeniyle son yıllarda hızla artmaktadır. KHF'nin, genellikle, DF'ye kıyasla daha fazla ham enzim üretimi sağladığı bildirilmiştir. KHF ve DF karşılaştırması Tablo 2.6'da görülmektedir. Brijwani vd. (2010), KHF'nin hem karbon hem de enerji kaynağı olarak görev yapan buğday samanı gibi lignoselülozik biyokütleyi yeteri kadar sakarrifize edebilen dengeli aktiviteleri olan bir enzim şeması üretmek için etkili bir teknik olduğunu iddia etmiştir. Kumar vd. (2012), DF ve KHF sistemlerinde pektinaz ve selülaz üretimini yanıt yüzey modellemesi ile karşılaştırmış ve optimize etmişlerdir ve her iki teknik de substrat olarak agro endüstriyel atıklar kullanıldığında aynı derecede etkili olduğunu savunmuşlardır.

Yukarıdaki gerçeklere rağmen, mikrobik selülazlar, indüksiyon ve baskı mekanizmalarına maruz kalmaktadır. KHF'nin lehine olan önemli bir biyolojik faktör, DF'de *A. niger* tarafından enzim üretimini sınırlayan düşük katabolit baskısıdır. Ayrıca, bir KHF işlemi, hem hidroliz hem de fermantasyon için tek bir reaktörün kullanılmasını kolaylaştırır ve sıvı besiyeri içindeki etanolün varlığı nedeniyle kirlenme riskini en aza indirir. Bununla birlikte, bu işlemin dezavantajı, işletim koşullarının her iki adım için eş zamanlı olarak optimize edilememesidir (Beheraa vd., 2017).

Tablo 2.6. KHF ile DF'nin karşılaştırılması (Chen, 2013)

Katı Hal Fermantasyonu	Sıvı Fermantasyon
✓ Serbest su yoktur ve substratın su içeriği düşüktür.	✓ Su kültürün ana bileşenidir
✓ Mikroorganizmalar ıslak katı substrattan besinleri emer; bir besin konsantrasyonu gradyanı var	✓ Mikroorganizmalar sıvı kültürden besinleri emer; besin konsantrasyonu gradyanı yok
✓ Kültür sistemi üç fazdan (gaz, sıvı, katı) oluşur ve gaz sürekli fazdır	✓ Kültür sistemi esas olarak sıvıdan oluşur; sıvı sürekli fazdır
✓ Aşılama miktarı % 10'dan fazladır.	✓ Aşılama miktarı % 10'dan azdır.
✓ Gerekli oksijen gaz fazındandır; Düşük enerji tüketimi	✓ Gerekli oksijen çözülmüş oksijendir; daha büyük miktarda çözülmüş oksijen var
✓ Mikroorganizmalar katı substratı adsorbe eder veya içine nüfuz eder	✓ Mikroorganizmalar kültür sisteminde eşit olarak dağılır
✓ Fermantasyonun sonunda, ortam ıslak bir substrattır ve ürünlerin konsantrasyonları yüksektir.	✓ Fermantasyonun sonunda, ortam sıvıdır ve ürünlerin konsantrasyonları düşüktür.
✓ Yüksek üretim oranı ve yüksek ürün verimi	✓ Düşük üretim oranı ve düşük ürün verimi
✓ Karıştırma zordur ve mikroorganizmaların büyümesi besin difüzyonu ile sınırlıdır.	✓ Karıştırma kolaydır ve mikroorganizmaların büyümesi besin difüzyonu ile kısıtlanmaz.
✓ Metabolik ısıнын çıkarılması zordur	✓ Sıcaklık kontrolü kolaydır
✓ Heterojenite	✓ Homojenite
✓ Fermantasyon sürecini online tespit etmek ve kontrol etmek zordur	✓ Fermantasyon süreci online olarak tespit edilebilir ve kontrol edilebilir
✓ Ekstraksiyon işlemi basit ve kontrol edilebilir; az miktarda atık organik su vardır.	✓ Ekstraksiyon işlemi genellikle karmaşıktır; büyük miktarda atık organik su vardır.
✓ Düşük su aktivitesi	✓ Yüksek su aktivitesi
✓ Basit fermentör	✓ Daha kompleks fermentör tasarımı
✓ Enerji tüketimi ve ekipman yatırımı yüksek	✓ Enerji tüketimi ve ekipman yatırımı düşük
✓ Düşük hammadde maliyeti	✓ Yüksek hammadde maliyeti

KHF, günümüzde çoğunlukla laboratuvar ölçeğinde olmasına rağmen, daha yüksek fermantasyon verimliliği, daha yüksek ürün konsantrasyonu, daha yüksek ürün stabilitesi, daha düşük katabolik baskı, suda çözünmeyen substratlar için uzmanlaşmış mikroorganizmaların yetiştirilmesi veya çeşitli mantarların karışık ekimi ve KHF'de kullanılan düşük su aktivitesi ile daha düşük sterillğe olan talep gibi çeşitli biyoteknolojik avantajlara sahip olduğu görülmektedir. KHF'nin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.7'de görülmektedir.

González vd. (2003), KHF ve DF kullanan enzimlerin üretkenliğinin karşılaştırılması için genel bir yaklaşım geliştirmeye ve KHF'de daha yüksek üretimin nedenini açıklamaya çalışmışlardır. Daha yüksek biyokütle, yüksek enzim üretimi ve daha düşük protein yıkımı, KHF'nin daha iyi üretim yapmasını sağlar. Son ürünlerin saflaştırılması ve biyokütle tahmini, çözüm bulmak için çok çaba sarf edilmesine yol açan en büyük zorluklardır. KHF'ye göre

ölçeklendirme uzun zamandan beri sınırlayıcı bir faktör olmuştur, ancak son zamanlarda biyokimyasal mühendisliğin gelişmesiyle birlikte, ölçeklendirme problemlerinin üstesinden gelebilecek bir dizi biyoreaktör tasarlanmıştır. Ürün geri kazanımı ve saflaştırma süreçleri doğal destekler kullanıldığı için daha pahalı olmasına rağmen, kullanımları ile üretim maliyetlerinde bir düşüş olduğu ve genellikle daha yüksek aktivitelerin elde edildiği düşünülmektedir. KHF sistemi, enzim gibi yüksek değerli ürünlerin üretimi için özellikle uygundur (Singhania vd., 2009).

Tablo 2.7. KHF avantaj ve dezavantajları (Hölker vd., 2004)

Avantajları	Sonuçlar	Çözülmesi Gereken Problemler
Biyolojik avantajlar		
✓ Düşük su talebi	✓ Daha az atık su ✓ Yüksek su ihtiyacı olan mikroorganizmaların kullanılamaması	✓ Nem gradyanları oluşumu
✓ Son ürünün yüksek konsantrasyonu	✓ Düşük altakım işlemleri maliyeti	
✓ Katabolitik represyon düşük veya yok	✓ Kolay metabolize edilebilen kaynakların kullanımı	
✓ Katı substratın kullanılması		✓ Substrat ve pH gradyanları oluşması
✓ Daha düşük sterilite talepleri		
✓ Mikroorganizma için katı destek	✓ İmmobilizasyonun avantajlarının sağlanması	✓ Taşınım sorunları
✓ Doğal ortamın simülasyonu	✓ Mikroorganizmaların doğal ortamlarında daha iyi gelişmesi	
✓ Karışık mikroorganizma kültürü	✓ Metabolik performansın sinerjisi	
İşletme (proses) avantajları		
✓ Yüksek hacimli verimlilik	✓ Daha küçük fermentör hacimleri	
✓ Kolay havalandırma		✓ Büyük ölçekte oksijen gradyanlarının oluşumu
✓ Artık kaynakların kullanılması	✓ Ucuz ve bol karbon kaynakları	
✓ Köpük önleyici kimyasallar yok	✓ Fermantasyon sırasında buna bağlı mikroorganizma kaybı olmaz	

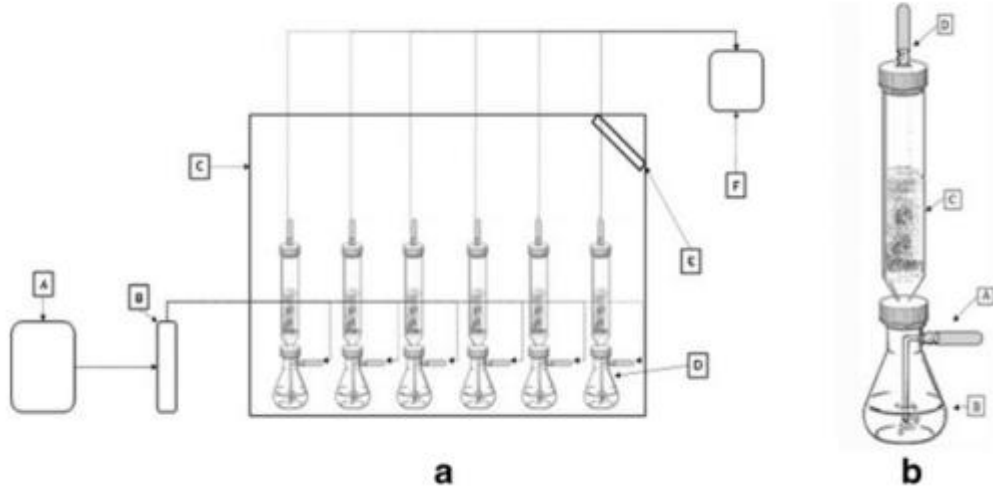
2.2. KHF Biyoreaktör Çeşitleri

KHF ile ilgili küçük çaplı araştırmaların çoğu, petri kapları, erlenmeyer şişeleri ve Roux şişeleri gibi standart laboratuvar camları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu sistemler basit, ucuz ve çok sayıda deneysel koşulu aynı anda araştırmaya izin verir. Bununla birlikte, işletme değişkenleri hakkında çok az bilgi sağlarlar ve süreci büyütmek için uygun değildirler. Smalland büyük ölçekli KHF'deki proses değişkenlerini izlemek ve kontrol etmek için birkaç biyoreaktör tasarlandı. Bu biyoreaktörler statik veya karışık, kuvvetli havalandırmalı veya kuvvetsiz havalandırmalı olabilmektedir. KHF biyoreaktörlerinin çoğu kesikli modda çalışır. Ancak, sürekli çalışabilen KHF sistemleri tasarlamak için bazı girişimlerde bulunulmuştur. Aşağıda, en çok kullanılan biyoreaktörlerden bazılarını açıklanmaktadır.

Kolon Biyoreaktörleri

Dolgulu yatak kolonu reaktörü, karıştırılmamış kuvvetle havalandırılmış bir reaktördür. Bir su banyosuna yerleştirilmiş küçük sütunları içeren bu sistem (Şekil 2.7), 1980'lerde Maurice Raimbault tarafından kullanılmasından sonra "Raimbault kolonları" olarak adlandırılmıştır. Genellikle ince (1-2 cm) ve kısa (10-20 cm) cam kolonlardan oluşur, ancak esas olarak ısı transfer olaylarını incelemek için daha büyük kolonlar tasarlanmıştır. En tipik haliyle, kolon, belirli sıcaklıktaki bir su banyosunda dikey olarak durmaktadır. Kolon alttan ve üstten deliklidir. Fermente edilmiş malzeme, kolonun içine paketlenir. Bir hava pompası, bir valf sistemi ve bir nemlendirici yardımıyla, doymuş hava alttan kolondan geçirilir. Üst kısım genellikle hava akımının geçmesine izin vermek için delikli bir tıpa ile kaplıdır. Çoğu durumda, çıkış havası kurutulur ve gaz kromatografisi veya elektronik sensörler ile analiz edilir.

Dolgulu kolon biyoreaktörleri, özellikle kültür koşullarını optimize etmek ve kinetik deneyler için yararlıdır. Kompakt tasarımı nedeniyle, kolon reaktörleri aynı anda çok sayıda deney koşulunun test edilmesine izin verir. Bu sistem, substrat yatağının havalandırılmasına izin verir ve bu nedenle, yatak içindeki gaz fazının bileşiminin, şişelerde yapılan fermentasyonlarla elde edilebileceğinden daha iyi kontrolünü sağlar. Bununla birlikte, erlenmeyer şişelerinden farklı olarak, mikrobiyal büyümenin ölçüsü olarak kullanılabilen çıkış gazlarının çevrimiçi izlenebilmektedir (Mitchell ve Krieger, 2006). Aynı zamanda, kolon biyoreaktörlerinin ticari ölçekte kullanımları için büyük bir dezavantajı vardır. Büyük ölçeklerde ısıyı dağıtma problemleri nedeniyle ölçeklendirmek zordur. Örneğin, Saucedo-Castañeda vd. (1990) manyok ıslak küspe ile paketlenmiş ve *A. niger* ile aşılınmış 1L biyoreaktörde (6cm çap) ısı transferini araştırmıştır. İncelenen deney koşulları altında, yaklaşık 5 °C/cm'lik bir maksimum radyal gradyan bulmuşlardır. Radyal sıcaklık gradyanlarını en aza indirmek için kolonların çaplarının az, muhtemelen sadece 2-4 cm genişliğinde olması gerekmektedir.



Şekil 2.7. a Deney düzeneğinin şeması: Bir dental kompresör, B rotametre, C bakteriyolojik inkübatör, D dolgulu yatak kolonları ve hava nemlendiricisi, E fan ve F oksimetre. b Cebri havalandırma sistemine sahip dolgulu yatak: Nemlendiriciye bir giriş havası, B distile su, C substrat yatağı ve D kolonlardan hava çıkışı (Anonim 2)

Kolondaki yatağın kurumasını en aza indirmek için gelen havayı doydurmak önemlidir, çünkü fermentasyon sırasında yatağa su eklemek pratik değildir. Tipik olarak bu en az iki nemlendirme adımı gerektirir. Sıcaklık kontrolünün buharlaşmayı en aza indirmede de önemli olduğuna dikkat edilmelidir, çünkü yatak sıcaklığının giriş hava sıcaklığının üzerine çıkmasına izin verilirse; hava girişte doymuş olsa bile ısınır ve yataktan su buharlaşır. Ayrıca, her hatta ayrı bir rotametre ile her bir kolona hava akışını bağımsız olarak düzenlemek önemlidir. Bütün kolonlar yataktan çıkarılır ve bir kolonun tamamı tek numune olarak kullanılır.

Her bir kolondan çıkan çıkış gazı ayrı olarak analiz edilebilir, bu da büyüme işleminin yani O_2 tüketimi veya CO_2 oluşumunun izlenmesini sağlar. Çıkış havasının her birinin analizörden sırayla çıkması için otomatik bir anahtarlama sistemi mevcutsa, bu çok daha basit olacaktır.

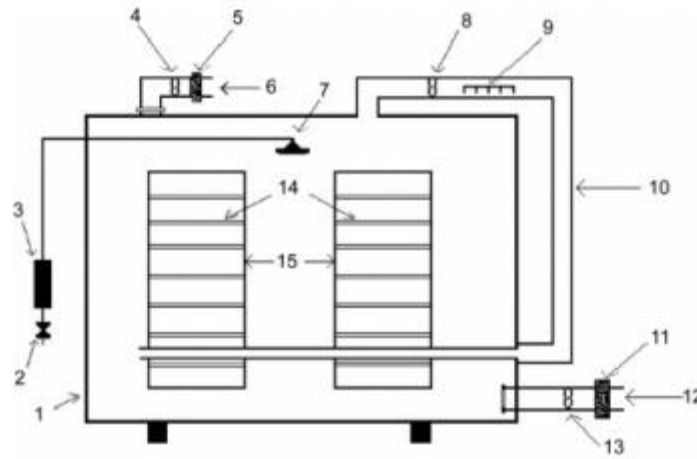
Kolon sisteminde gaz metabolizması yoluyla büyümenin çevrimiçi izlenmesi avantajlıdır, çünkü gaz metabolizması (özellikle O_2 tüketimi), ısı üretimi ile yakından bağlantılıdır ve biyoreaktör modelindeki enerji dengesi içinde ısı üretim oranı ile ilgili verilere ihtiyaç duyulacaktır.

Tepsi Biyoreaktörleri

Tepsi biyoreaktörleri KHF için kullanılan en basit reaktörlerdir (Şekil 2.8). Bu biyoreaktörler eski zamanlardan beri koji ve soya sosu gibi geleneksel Asya gıdalarının üretimi için kullanılmaktadır. Tepsi biyoreaktörleri, altta delinebilen ahşap, plastik veya metal tepsilerden oluşur. Tepsiler, 5-15 cm'lik bir yatak yüksekliğine kadar nemlendirilmiş ve aşılınmış katı substrat ile doldurulur. Tepsiler, arabalarda üst üste istiflenir ve kontrollü sıcaklık ve neme sahip bir odaya taşınır (Krishna, 2005). Bu teknoloji kolayca ölçeklendirilebilir; yalnızca tepsi sayısını artırmak gerekir. Bu nedenle, özellikle Asya ülkelerinde, endüstriyel düzeyde başarıyla kullanılmıştır. Ancak, bu teknoloji geniş alanlar gerektirir ve manuel işlemler yoğunudur. Ayrıca tepsi reaktörlerini aseptik olarak çalıştırmak zordur (Durand, 2003).

Tepsi biyoreaktörlerinin bir diğer dezavantajı kütle ve ısı aktarımıdır. Tepsi biyoreaktörlerinde, O_2 ve CO_2 yalnızca yatak içinde ve tepe boşluğunda difüzyonla hareket edebilir. Yatak yüzeyinin sıcaklığı, tepsi yüzeyleri arasındaki hava hızından etkilenen yatak-hava bileşeninin ısı transfer katsayısına bağlıdır (Ali ve Zulkali, 2011).

Chen vd. (2013) yeni bir tepsi biyoreaktörü kullanarak havalandırmanın yatak yüksekliği içindeki sıcaklık gradyanı üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Dahili hava sirkülasyonu ve hava basıncı titreşimi kullanarak ısı transferini geliştirmişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında, maksimum sıcaklık gradyanı $0.12\text{ }^{\circ}\text{C/cm}$ olarak bulunmuştur. Bu, geleneksel bir statik tepsi biyoreaktörü için elde edilen $3\text{ }^{\circ}\text{C/cm}$ den çok daha düşüktür.

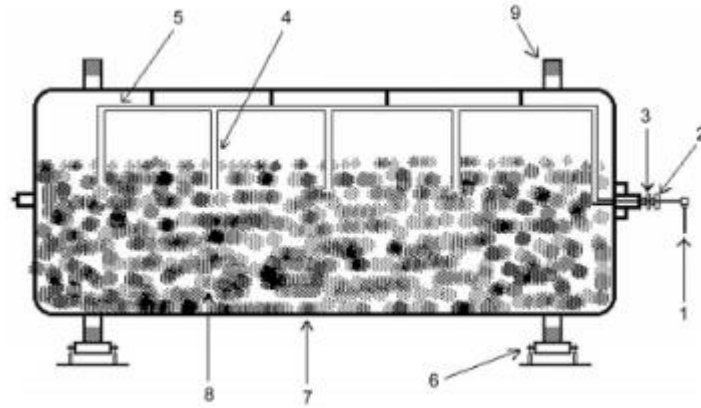


Şekil 2.8. Tepsi Reaktörü (Durand, 2003)

Döner Tambur Biyoreaktörleri

Döner tamburlu reaktör, tercihen bölmeleri olan yatay veya yataya yakın bir tamburdan oluşur (Şekil 2.9). Substrat yatak genellikle reaktör hacminin % 10-40'ını kaplar ve reaktöre üstünden hava verilir. Bu reaktör sürekli veya aralıklı olarak dönebilir. Reaktör hızının karıştırma sıklığı ve dönme hızı kontrol edilebilir (Mitchell vd., 2000). Bu tip biyoreaktör mikrobiyal büyüme sırasında oluşan ısıyı dağıtmada etkilidir. Bununla birlikte, karıştırma mantar kültürlerinde miselyuma zarar verebilir. Bu nedenle, genellikle düşük dönme hızları (1-15 rpm) kullanılır. Aralıklı ajitasyon ayrıca miselyum için daha az zararlıdır (Krishna, 2005).

Döner tamburlu biyoreaktörler ilk olarak 1900'lerin başlarında buğday kepeği kullanılarak *Aspergillus oryzae* tarafından KHF'de amilaz üretimi için kullanılmıştır. Daha sonra, 1940'larda döner tamburlu biyoreaktörler geliştirilmiştir ve ticari ölçekte penisilin üretiminde uygulanmıştır. O zamandan beri, bu tür biyoreaktörlerde çok az teknolojik gelişme sağlanmıştır (Mitchell vd., 2000).

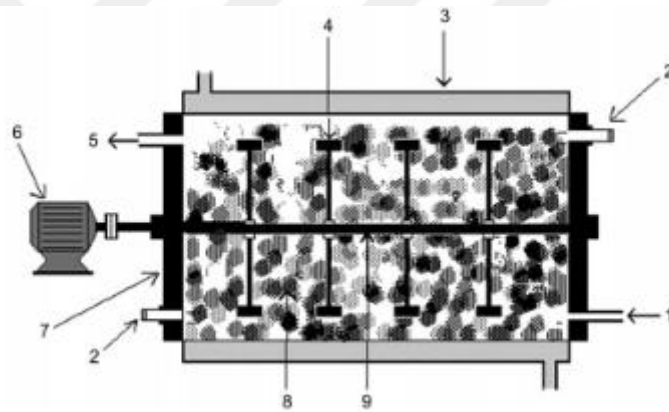


Şekil 2.9. Döner tambur reaktör (Durand, 2003)

Sürekli Vida Biyoreaktörleri

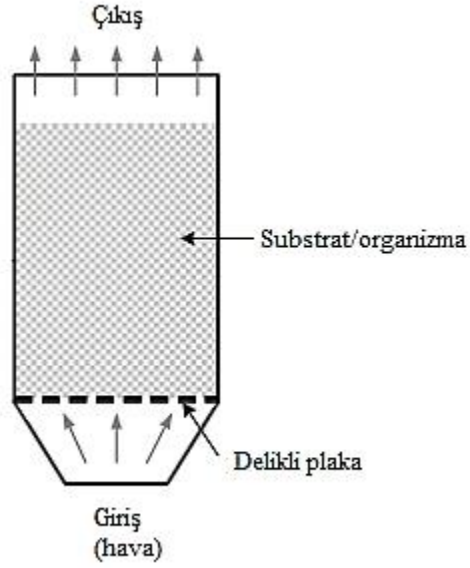
Sürekli vidalı reaktörler (Şekil 2.10) vidalı konveyörlere dayanır. Katıları akış yönünde neredeyse sıfır karıştırarak hareket ettirebilirler. Karıştırmanın statik veya dinamik olması istendiğinde, karıştırıcılar ilave edilebilir. Geri karıştırma yoksa harici aşılama gereklidir. Aşılama, fermente edilmiş ürünün bir kısmı geri dönüştürülerek yapılabilir. Böylece aşı üretimi için ayrı bir işleme ihtiyaç duyulması önlenir (Sánchez vd., 2006). Sürekli vidalı reaktörler kesikli veya sürekli modda çalıştırılabilir. Sürekli çalışma modu, reaktörün yüklenmesi, boşaltılması ve temizlenmesi için gereken süreyi azaltabilir. Buna ek olarak, sürekli işlemler, alt akım işlemlerinde daha küçük ekipmanların kullanılmasına izin verir (Khanahmadi vd., 2006). Ne yazık ki, sürekli vidalı KHF biyoreaktörlerinin kullanımı hakkında sınırlı deneysel veri bulunmaktadır. Gibbons vd. (1984, 1986) orta ölçekli (yaklaşık 85 L) sürekli vidalı bir KHF

Daha yakın zamanlarda, Varzakas vd. (2008) sürekli karşı akım reaktörü kullanılarak KHF'de *A. niger* tarafından glukoamilazların üretimini incelemiştir. Reaktör, dokuz bölmeye ayrılmış 3,4 metrelik paslanmaz çelik bir borudan oluşmaktaydı. Fermantasyon malzemesi, sürekli paslanmaz çelik bir vida ile hareket ettirildi ve havalandırma, doğal konveksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Sürekli bir glukoamilaz üretimi (40 U/g) gözlemlemiştir. Bununla birlikte, son bölmede ısı birikimi ve kurutma problemleri de gözlemlemiştir. Bu problemlerin zorlamalı nemli hava ile çözülebileceğini bildirmiştir. Sürekli vidalı bir reaktör Şekil 2.9'da gösterilmektedir.



Çalışmada kullanılmış olan Raimbault kolon reaktörleri dolgulu yatak biyoreaktörleri kısmına girmesi nedeniyle dolgulu yatak biyoreaktörleri üzerinde daha ayrıntılı durulacaktır.

Dolgulu yataklı biyoreaktörler, substrat ve mikroorganizma ile doldurulmuş ve dolgu malzemelerini desteklemek için delikli bir tabana sahip olan silindir şeklindeki kaplardır. Dolgulu bir biyoreaktörde, dolgu malzemeleri genellikle karıştırılmaz ve zorlamalı havalandırma sağlanır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Dolgulu yatak biyoreaktörü (Larroche, 2017)

Tasarımdaki bazı olası varyasyonlar şunları içerir:

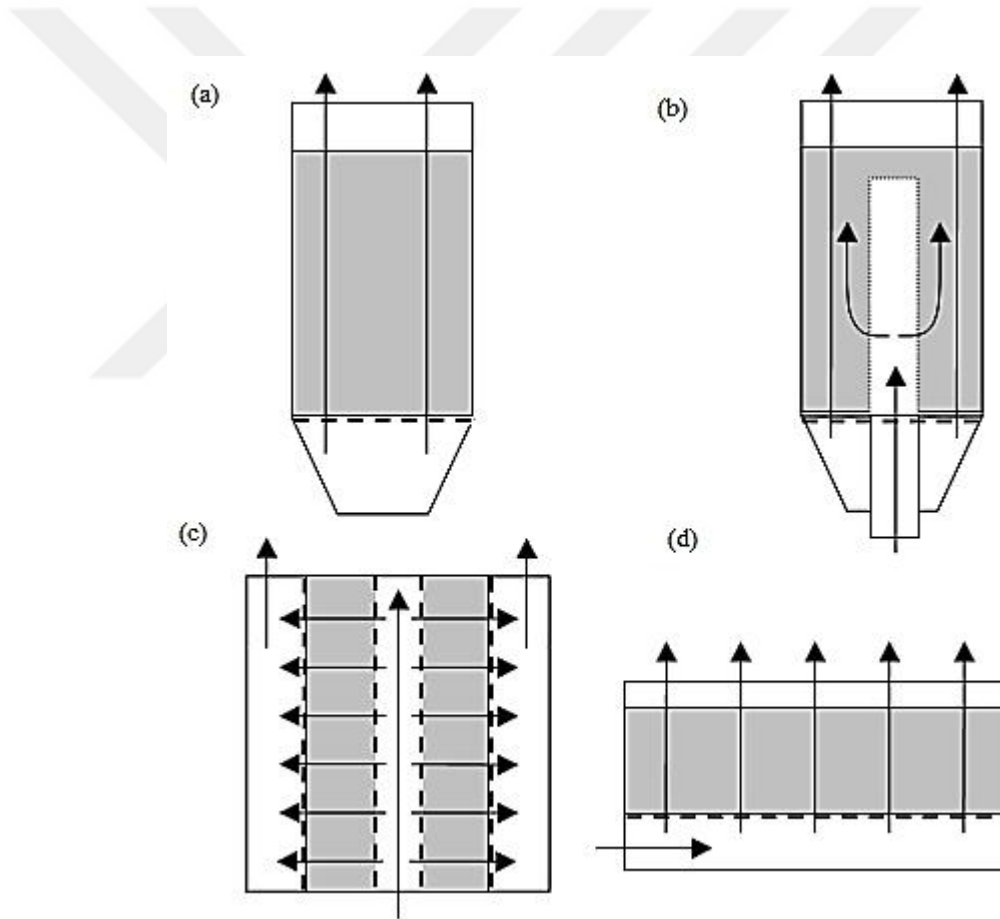
- ✓ Kolon dairesel olmayan bir kesite sahip olabilir.
- ✓ Kolon yatay veya herhangi bir açıda olabilir. Bu, yer çekimi ve hava basıncı nedeniyle kuvvetlerin göreceli yönlerini değiştirir.
- ✓ Kolon her iki uçtan da havalandırılabilir. Dikey bir kolon için, hava yatağa üstten veya alttan girebilir. Üst taraftan havalandırılması, parçacıkların yüksek hava hızlarında akışkanlaşmasını önler, ancak hava akışının yerçekimi ile aynı doğrultuda olduğu için yatak sıkışmasına katkıda bulunacaktır.
- ✓ Kolonun merkez eksenini boyunca yerleştirilen delikli bir borusu olabilir ve uçtan uca havalandırmaya ek olarak ilave bir hava beslemesi sağlanabilir (Şekil 2.12 (b)). Bununla birlikte, bu sadece çok küçük biyoreaktör çapları için etkili olacaktır.
- ✓ Kolon suyla kaplı olabilir veya ısı transfer levhaları yatağa yerleştirilebilir.
- ✓ Roussos vd. (1993) tarafından iç ısı transfer plakaları içeren dolgulu biyoreaktörler, "Zymotis dolgulu yataklar" olarak, bu tür plakalardan yoksun olanlar ise "geleneksel dolgulu yataklar" olarak adlandırılmıştır.

En yaygın tasarım, yani yatağın tabandan havalandırılan ve iç delikli tüpler olmadan dikey bir kolonun kullanıldığı, dolgulu bir yatak için mevcut tasarım değişkenleri:

- ✓ Soğutma ceketli veya iç ısı transfer plakaları olabilir veya olmayabilir.
- ✓ Biyoreaktörün yüksekliği ve genişliği farklı boyutlarda tasarlanabilir. Yüksekliğin çapa oranı oldukça geniş bir aralıkta değişebilir.
- ✓ İç soğutma plakaları kullanılıyorsa, bunların yüksekliği ve aralarındaki boşluk farklı boyutlarda olabilir.

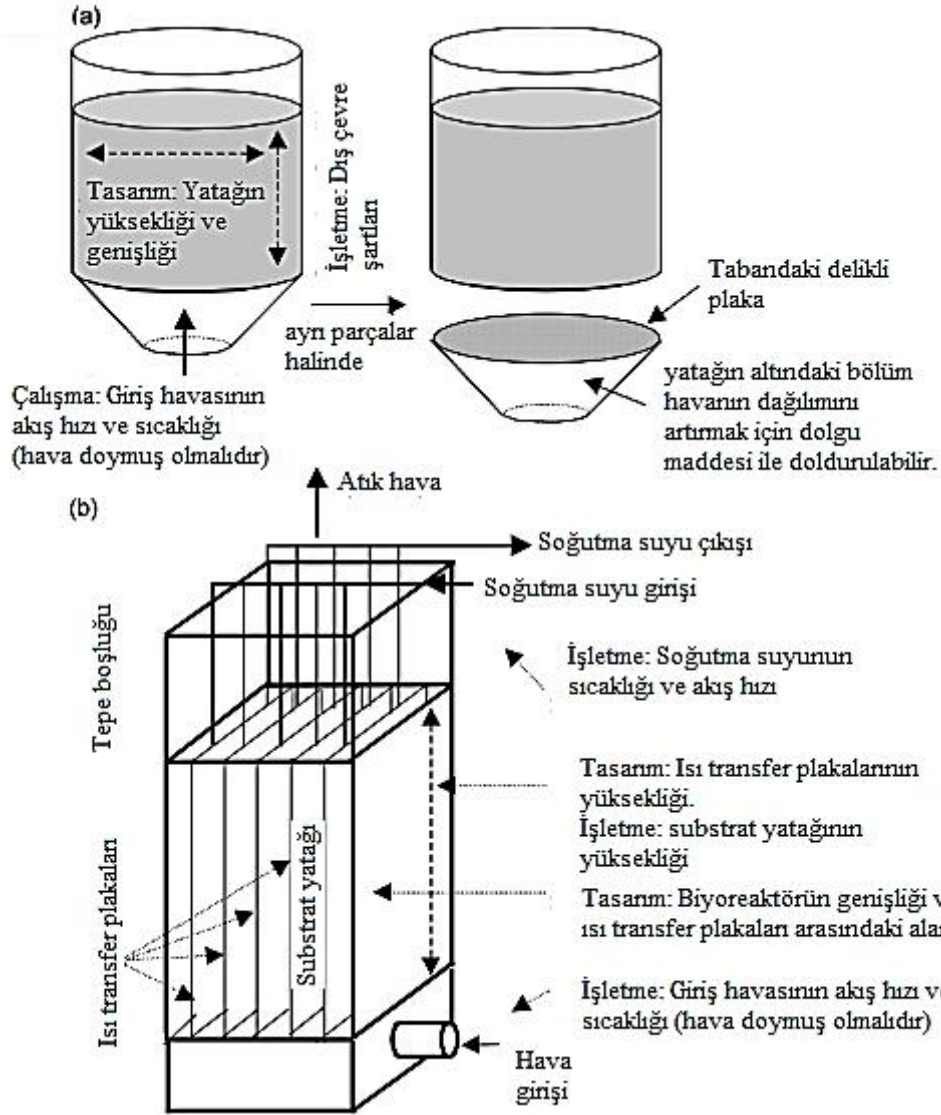
Mevcut işletme değişkenleri:

- ✓ Havalandırma oranı,
- ✓ Giriş havasının sıcaklığı,
- ✓ “çevrenin” sıcaklığıdır(soğutma suyu olabilir) (Mitchell vd., 2006).



Şekil 2.12. Dolgulu yatak biyoreaktörlerin temel tasarım özellikleri ve muhtemel tasarımlar (a) : basit “geleneksel” dolgulu yatak tasarımı (b) merkezine delikli tüp yerleştirilmiş bir dolgulu yatak: bu sistem küçük yarıçaplı yataкта uygun iken, daha geniş çaplarda uygun olması için daha fazla sayıda delikli tüp yerleştirilmelidir. Bu nedenle havalandırma aksiyal yönde yapılır ve radyal yöne tüp vasıtasıyla aktarılır. (c) radyal akışlı dolgulu yatak. Bu tasarımın diğerlerine göre üstünlüğü hava akışı yatağa daha yakın yapılır ve daha homojen bir hava dağılımı olur. Yatak yüksekliğinin daha küçük olmasıyla “geleneksel” dolgulu yatak biyoreaktörlere benzer. (d) “kısa yataklı” bir dolgulu yatak (Mitchell vd., 2006)

Dolgulu yatağın kurumasını önlemek için, giriş havasının su ile doyurulması gerekmektedir. Bir su ceket, örneğin, 20 cm'den daha büyük çapa sahip bir yatağın sadece dış tabakasını etkileyebilir. Bu nedenle, büyük ölçekli uygulamalar için normalde iç ısı transfer plakaları gereklidir (Larroche vd., 2017). Şekil 2.13'de geleneksel dolgulu yatak gösterilmiştir.



Şekil 2.13. (a) Geleneksel dolgulu yatakların temel tasarımı ve çalışma özellikleri (b) Zymotis dolgulu yatak biyoreaktörün tasarımı ve çalışma özellikleri (Roussos vd., 1993)

2.2.2. Dolgulu Yatak Reaktöründe Engeller

Dolgulu yatak reaktörlerindeki sıcaklık gradyanı, üstesinden gelinmesi gereken ilk engeldir. Diğer bir engel olan oksijen gradyanına kıyasla, dolgulu yatak biyoreaktör içindeki sıcaklık gradyanı mikroorganizmalara daha fazla zarar verir. Dolgu yüksekliğindeki artış ve havalandırma oranındaki düşüş ile biyoreaktör sıcaklık gradyanı kademeli olarak artmaktadır

(Sangsurasak ve Mitchell, 1998). Sıcaklık belirli bir değeri aştığında, mikroorganizmaların büyümesi baskılanır ve mikrobiyal ölüm meydana gelebilir. Mikroorganizmanın dayanabileceği en yüksek sıcaklığa, fermentörün substrat dolgu yüksekliğini belirleyen kritik sıcaklık denir. Bu sıcaklık problemiyle ilgili olarak, araştırmacılar temel olarak zorlamalı havalandırmayı seçerler. Suyun buharlaşması hava sirkülasyonu ile güçlendirilir, böylece tüm biyoreaktörün soğutulması ve eksensel sıcaklık gradyanının azaltılması sağlanır. Buharlaşma, dolgulu yatak biyoreaktörlerindeki ısı transferinde önemli bir rol oynar. Uygulamada, ısının yaklaşık % 65-78'i su buharlaşması ile alınır. Sıcaklığın su buharlaştırılması ile uzaklaştırılması iyi bir metot olmasına rağmen, katı substratın hızla kurummasına sebep olur. Aşırı su kaybı KHF için zararlıdır. Dolayısıyla, doymuş havanın kullanılması daha iyi bir alternatif olabilir. Öte yandan, giriş havasının sıcaklığının azaltılmasında iyi bir alternatiftir.

Uygulamada, hava girişinin sıcaklığı, mikrobiyal optimum sıcaklığın 10 ila 15 °C altındadır. Girişin yakınındaki mikroorganizmaların büyümesi, düşük sıcaklık nedeniyle engellenecektir. Biyoreaktörün çapı genellikle havalandırma etkisini güçlendirmek için azaltılır. Daha küçük çaplı dolgulu biyoreaktörde, reaktörün altındaki sıcaklık düşüktür ve bu mikroorganizma gelişimi için uygundur.

Dolgulu Yataklarda Basınç Gradyanları

Zorlanmış havalandırma ile statik işlem kombinasyonundan dolayı dolgulu yataklarda basınç gradyanı önemlidir. Statik işlem, partiküller arası boşluklarda büyüyen hifler'in bozulmadığı veya partikül yüzeyinde ezilmediği anlamına gelir ve bu nedenle bu hifler, basınç düşüşünü arttırarak hava akışına ekstra bir engel teşkil eder. Fermantasyon sırasında beklenen maksimum basınç düşüşü önemli bir husustur, çünkü kompresörün tedarik edebilmesi gereken havayı etkileyecektir. Aşırı basınç düşüşü, aralıklı olarak karıştırılmış dolgulu yataklarda sorun olmaz çünkü çalkalama, hifin substrat yatağını büyük bir kütleye bağlamasını önler ve aynı zamanda hifleri partikül yüzeyinin üzerinde sıkıştırır. Aslında, aralıklı karıştırma, basınç düşüşünü azaltmak amacıyla büyük yataklarda kullanılabilir. Büyük ölçekli yataklarda büyük bir sorun olan basınç düşüşü küçük ölçekli yataklarda büyümeyi ölçmek için kullanılmıştır.

Auria vd. (1993), 6,5 cm yükseklikte ve 2 cm iç çapta bir kolon ile 0,435 cm/s yüzeysel bir hız kullanmışlardır. Substrat, besleyici maddeler ile emprenye edilmiş bir amberlit reçinesinden oluşmaktadır. Fermantasyon sırasında gözlenen maksimum basınç düşüşü, çeşitli farklı başlangıç besin konsantrasyonları için 0,21 ila 0,69 cm H₂O/cm yatak arasında değiştiğini bulmuşlardır. Substrat olarak küspe ve 0,379 cm/s yüzeysel hız kullanılan kolonda fermantasyonun başlangıcında basınç düşüşü 0,45 cm H₂O/cm yatak olmuştur. Fermantasyon sonunda elde edilen maksimum basınç düşüşü 2,75 cm H₂O/cm yatak bulunmuştur. 15 cm yüksekliğinde ve 4 cm çapında daha büyük bir kolonda, buğday kepeği substratı kullanılarak ve 0,675 cm/s yüzeysel bir

hız ile maksimum 0,12 cm H₂O/cm yatak basınç düşüşü elde etmişlerdir. Gumbira-Sa'id vd. (1993) çok daha yüksek bir yüzeysel hız olan 11,2 cm/s, pişmiş sago boncuklara dayanan bir substrat ile 1,38 cm H₂O/cm yatak basınç düşüşü elde etmişlerdir.

Henüz büyük çaplı bir fermentasyon sırasında beklenebilecek basınç düşüşlerini tahmin etmek için yeterli bilgi bulunmamakla birlikte, bahsedilen çalışmalarda elde edilmiş olan deneysel değerler, beklenebilecek büyüklük dereceleri hakkında bir fikir vermektedir. İlk basınç düşüşü substrata ve substratın nasıl hazırlandığına bağlı olacaktır. Fermentasyon sırasında ulaşılan maksimum basınç düşüşü, aynı zamanda yüzeysel hızın bir fonksiyonu olmasına rağmen, mikroorganizmanın yatak içinde nasıl büyüdüğüne bağlı olacaktır. Basınç düşüşü, yatak duvarlarından uzaklaşarak havanın içinden geçebileceği bir boşluk bırakarak meydana gelebilir (Gumbira-Sa'id vd., 1993). Bu istenmeyen bir durumdur çünkü yatak içinde ısı ve kütle transferi sınırlamalarına yol açacaktır.

O₂ beslemesi ve dolgulu biyoreaktörlerde CO₂ giderimi, tepsi biyoreaktörlerinde olduğu kadar kritik değildir, çünkü kuvvetli havalandırma, O₂ ve CO₂ konsantrasyon gradyanlarını etkili bir şekilde azaltabilir. Örneğin, Gowthama vd., 35 cm yüksekliğinde dolgulu biyoreaktördeki (buğday kepeği üzerinde *A. niger* yetiştirmek için) çıkış O₂ konsantrasyonunun 5 L/dk kadar düşük hava akış hızlarında bile %18'den (v / v) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, giriş havası su ile doymuş olsa bile, dolgulu biyoreaktörlerde buharlaşma kaçınılmaz olarak gerçekleşir (Larroche vd., 2017).

Sella vd. (2009) *Bacillus atrophaeus* kullanarak dolgulu bir biyoreaktörde spor üretimi üzerinde çalışmışlardır. Çapı 4 cm, yüksekliği 20 cm olan bir kolon biyoreaktör kullanmışlardır. Fermentasyon sıcaklığı, su banyosu ile yaklaşık 36 °C'de tutulmuş ve nemli hava alttan kolona beslenmiştir. Fermentasyon 9 gün boyunca devam etmiş ve sonuçlar, fermentasyon işlemi sırasında, eğer su içeriği maksimum su içeriğinin % 88'inden fazla olsaydı, hücre büyümesinin önemli ölçüde etkileneceğini göstermiştir.

Weber vd. (1999) endüstriyel ölçekli dolgulu yataklı katı hal fermentasyon biyoreaktörünün matematiksel bir modelini oluşturmuştur. Suş olarak *Coniothyrium minitans* ve *A. oryzae* kullanarak, haşhaş, yulaf, şeker kamışı ve perlit substratın fiziksel özelliklerinde yapılan değişiklikleri, ölçeklenebilirlik ve geçirgenliği karşılaştırmışlardır. İşlem ve optimum çalışma koşulları test etmişlerdir (Chen, 2013).

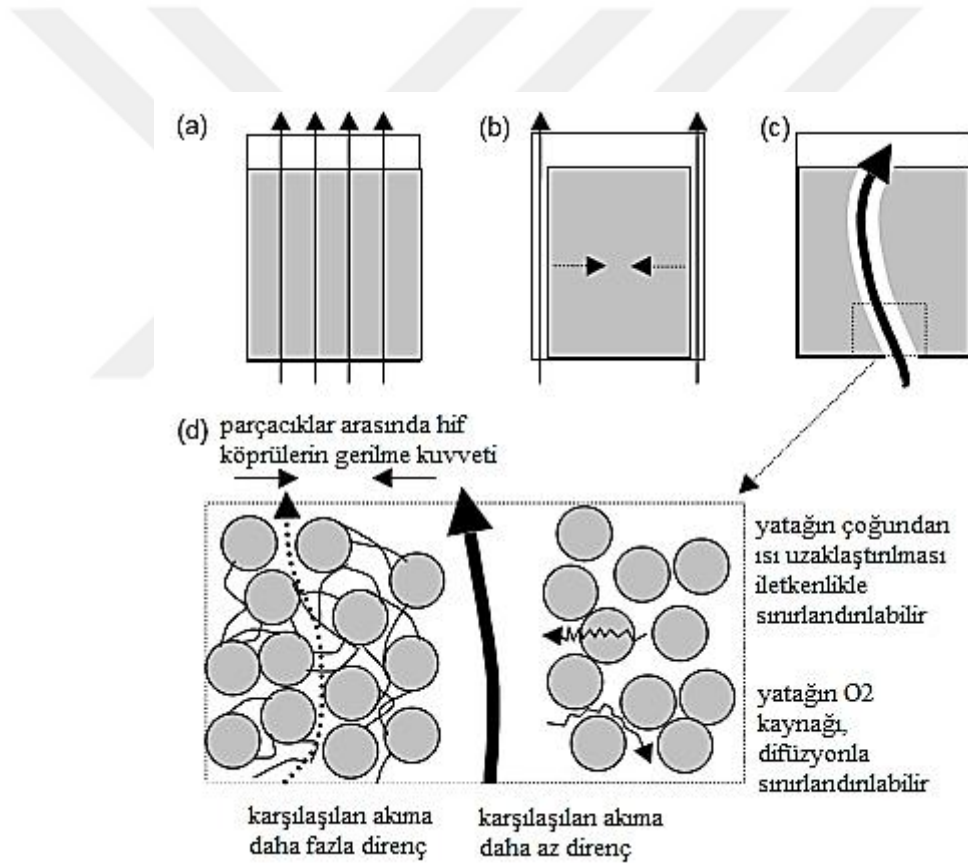
Dolgulu Yatak Biyoreaktörlerinde Kanallaşma

Basınç düşüşü yatak içerisinde havanın kolaylıkla geçebileceği kanallar oluşturabilir. Bu istenmeyen bir durumdur, çünkü yatak içinde ısı ve kütle transferi sınırlamalarına yol açacaktır.

Kanallaşma önemli bir problemdir. Kolona beslenen hava çatlakların içinden akmayı tercih edecek böylece diğer bölgelerde O₂ transferi ve ısı transferi moleküler taşınım ile oluşacaktır.

Konvektif yığın hareketleri meydana gelmeyecektir. Şekil 2.14'de kanallaşma şematize edilmiştir.

Dolgulu yataklarda kanallaşmanın ana nedenlerinden biri, katı malzemenin tüketiminden dolayı partiküllerin büzülmesidir. Diğer neden ise, birçok mantar fermentasyonunda, substrat yatağının "partiküller arası hif köprüleri" ile birbirine bağlanmış olmasıdır. Bu iki olay yatak hacmi azaldıkça, parçacıkların basitçe aşağı doğru yerleşmeyeceği, bunun yerine yatağın içeriye çekileceği ya da ortadan çatlayacağı anlamına gelmektedir. Bu hif köprüleri üretmeyen mantarlar için, substrat parçacıkları, yatak küçüldükçe ya da çatlaklar ortaya çıktıkça serbestçe akmaya devam eder, fakat sadece yüksekliği azalır. Mantarın parçacıkları birbirine bağladığı mantar fermentasyonları için büzülme sorunları, besinlerle emprenye edilen "atık" haşhaş kullanılarak en aza indirilebilir (Weber vd., 1999).



Şekil 2.14. Kanallaşma (a) İstenilen durum, yatağın tüm kesiti boyunca düzgün bir akış mevcuttur. (b) Yatağın duvardan uzaklaştığı durumda, yatak ve duvar arasında tercih edilen akış. (c) Yataktaki bir çatlaktan tercihli akış. (d) Kanalin mikro ölçekli görünümü, Kanal boyunca tercih edilen akışın, partiküller arasındaki boşluğun kısmen biyokütle ile doldurulmasından kaynaklandığını gösterir. Aşırı kanallaşma durumlarında, tanecikler arası boşluklardan hiçbir kütle akışının olamayacağına, kütle transferinin difüzyonla ve ısı iletimin iletkenliğe iletilmesiyle sınırlı olduğuna dikkat edin (Mitchell vd., 2006)

Tepe Boşluğundaki Biyoreaktör Duvarları Üzerinde Yoğunlaşma

Genellikle, tepe boşluğundaki biyoreaktör çeperi, yataktan çıkan gazların sıcaklığından daha soğuktur; bu, tepe boşluğundaki biyoreaktör duvarlarının iç yüzeylerinde suyun yoğunlaşmasına neden olabilir. Bu durum bölgedeki O₂ transferini büyük oranda engeller.

Statik Yataklarda Eksenel ve Radyal Sıcaklık Gradyanları

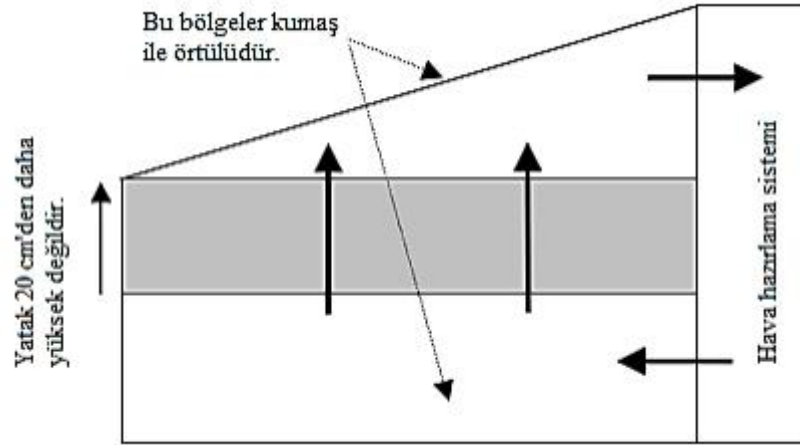
Kanallaşma problemlerinden muzdarip olmayan dolgulu bir biyoreaktörün yatağındaki gaz akış modeli, eksenel dağılım ile piston akışına muhtemelen en yakındır. Bununla birlikte, bunu doğrulamak ya da eksenel dağılım derecesini ölçmek için çalışmalar yapılmamıştır. Gaz fazının bu akışının, dolgulu yatakların çalışmasında etkileri vardır. Büyük ölçekli dolgulu yatakların tasarlanması ve işletilmesindeki en büyük zorluklardan biri, aşırı eksenel sıcaklık gradyanlarını önlemek olacaktır. Havanın yatağın içinden akarken sıcaklığındaki artış, su taşıma kapasitesini artırır ve bu nedenle buharlaşma meydana gelmektedir. Hava girişinde doymuş hava kullanılsa bile buharlaşma olacağına dikkat edilmelidir. Genel olarak, hava akımı yönünde eksen boyunca iletim, konvektif ve buharlaşan ısı giderimi ile karşılaştırıldığında ihmal edilebilir (Córdova-López vd., 1996). İletimin normal hava akış yönüne katkısı dolgulu yatağın tasarımına bağlı olacaktır.

Eksenel ve radyal sıcaklık derecelerinin görünmesinin biyoreaktörün tasarımına ve çalışmasına nasıl bağlı olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bunlar aşağıda açıklanmaktadır.

Saucedo-Castaneda vd. (1990), manyok yaş posa ile doldurulmuş ve *A. niger* ile aşılınmış 1 L statik biyoreaktörde (6 cm yarıçap 35 cm uzunluğunda) ısı transferini incelemişler. Yatağın eksen boyunda 0 ila 5 cm arasında keskin bir sıcaklık artışı (toplamda 2,4 °C/cm, 12 °C'ye kadar) görülmüştür. Bununla birlikte, 5 ila 35 cm arasında, sıcaklık gradyanı daha küçüktür (0,17 °C/cm). Merkez ile reaktörün duvarı arasında sıcaklık gradyanı yaklaşık 5 °C/cm olmuştur. Bu eksenel sıcaklık gradyanından yaklaşık 30 kat daha büyüktür. Genel olarak sıcaklık, yatak yüksekliğindeki artış veya hava akış hızındaki azalma ile doğrusal olarak artmıştır.

2.2.3. Dolgulu Yatak Biyoreaktörün Pilot ve Büyük Ölçekli Uygulamaları

Tüm ekim periyodu boyunca dolgulu yatak reaktörleri büyük ölçekli olarak nadiren işletilmektedir, ancak aralıklı olarak karıştırılan tasarımlar oldukça başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Statik dolgulu yatak reaktörü koji üretiminde büyük çapta kullanılmıştır, ancak kullanılan biyoreaktörlerin çalışması ve performansı hakkında detaylar mevcut değildir. Sadece çok kısa ve genel açıklamalar mevcuttur. Basit bir tasarım (Şekil 2.15) 1000 kg koji kapasitesine sahiptir ve alt tabaka kullanımı için özel bir cihazı yoktur. Ayrıca tamamen aseptik fermantasyon için tasarlanmıştır (Sato ve Sudo 1999).



Şekil 2.15. Koji endüstrisinde soya sosu üretimi için kullanılan geleneksel dolgulu yatak biyoreaktör tasarımı. Bu tip reaktörler bir ton üzerinde substrat işleme kapasitesine sahiptir. Bu diyagram Sato ve Sudo (1999) tarafından basitleştirilmiştir (Sato ve Sudo, 1999)

Roussos vd. (1993) “Zymotis” biyoreaktör olarak adlandırılan iç ısı transfer plakaları bulunan pilot ölçekli dolgulu yatak biyoreaktör geliştirmiştir. Dış gövde akriliktir ve 65 cm yüksekliğinde, 50 cm genişliğinde ve 40 cm derinliğindedir. Bu, 100 L’lik bir çalışma kapasitesi ile toplam 130 L’lik bir hacim demektir. Havalandırma hızı, 0,1 ila 0,2 L/h.g.sa arasında değişmektedir. Paslanmaz çelik ısı transfer plakaları 60 cm yüksekliğinde, 38 cm genişliğindedir ve 0,46 cm kalınlığındadır. Kullanılan plaka 10 adettir ve oluşan hacimlerin her birinde 9,44 L biyoreaksiyon hacmi oluşmuştur. Her bir plaka seri halde bulunan borular vasıtasıyla su sirkülasyonu sağlamaktadır. Biyoreaktör içindeki plakaların sayısı ve yeri değiştirilebilmektedir. 4 ila 12 kg kuru substrat (15 kg kuru için toplam ıslak ağırlık 55 kg) aralığında çalışmalar yapılmış ancak üretilen enzime ait bilgiler dışında detaylı bilgiler verilmemiştir. Fermantasyonun ilk 10 saati sirküle edilen suyun ısıtılması daha sonrasında ise soğutulması gerekmektedir. Soğutma suyunun sıcaklığını ölçmek için farklı bölgelere termistör yerleştirmişlerdir. Mikrobiyal aktivitelerin optimum olması ve sıcaklık gradientini önlemek için plakalar arasındaki mesafe 5 cm’den daha az olmasını önermişlerdir, ancak pilot ölçekli deney çalışmalarında bulunan sonuçlar bunu tam olarak desteklememiştir. Ayrıca çalışma sonucunda başlangıç nem içeriği çok değişmediği ve %5 civarında kaldığı bildirilmiştir.

KHF biyoreaktörlerinden aralıklı karıştırmalı tasarımlar büyük ölçekte başarılı bir şekilde uygulanmaktayken dolgulu yataklar için durum aynı değildir. Kısa dolgulu yatak biyoreaktörleri, koji üretimi için büyük ölçekte uygulanmakta ve genel özellikleri bilinen bu prosesin işletimi ile performansı hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır.

2.2.4. Laboratuvar Ölçekli Dolgulu Yataklar

Makro ölçeğin taşınım olaylarının biyoreaktör performansını nasıl etkileyebileceğini araştırmak için 30 cm yüksekliğinde ve 5 ila 15 cm çapında bir dizi biyoreaktörler kullanılmıştır. Araştırmacılar çalışmalarında gösterdiği gibi, küçük ölçekte bile taşınım olayları ile büyümenin sınırlanması mümkündür.

Fermantasyon sırasında gerçekleşen taşınım olaylarını önemli ölçüde etkileyen tasarım ve işletme parametreleri;

- ✓ Substrat yatağında aksiyal ve radyal yöndeki sıcaklık gradientleri.

Dolgulu yataklarda yatak yüksekliği arttıkça ortaya çıkan sıcaklık gradiyenti minimize etmek amaçlanır.

- ✓ Substrat yatağındaki suyun buharlaşması.

Tasarım ve işletme parametreleri belirlenirken yatağın kurumasına sebep olan bu problem minimize edilmeye çalışılmalıdır.

- ✓ Substrat yatağındaki basınç düşüşü.

Bu parametre yatak yüksekliğine ve partiküller arası alanın mikroorganizma ile doluluk derecesine bağlıdır. Basınç düşüşü; havalandırma sisteminin tasarımını ve işletme maliyetlerini etkiler, diğer yandan substrat yüksekliğini sınırlayabilir. Substrat partiküllerine yapılan O₂ beslemesi genelde tasarım ve işletme parametreleri arasında sayılmaz. Isı uzaklaştırma hesaplamalarında temel alınan hava akış hızı, genellikle gerekli olan O₂ beslemesinin daha fazlasını karşılar. Bununla birlikte, yatağın büyük bölümünde O₂ transferi sınırlamaları bulunabilir (Mitchell vd., 2006).

2.3. Şeker Pancarı Melası ve Küspesi Hakkında Genel Bilgi

2.3.1. Şeker Pancarı ve Melas (Yaşar, 2003)

Beta Vulgaris Saccharifera (şeker pancarı) bitkisinin en önemli özelliği 2 yıllık olmasıdır. 1. yılda kök kısmında besin maddeleri toplanır. 2. yılda çiçek ve tohumlar oluşur. Çok fazla soğuk veya sıcak olmayan bölgelerde yıllık yağış miktarının 600 mm olduğu yerlerde yetiştirilir. Şeker pancarının su ihtiyacı oldukça fazladır ve bu değer 1g şeker için 250-300 g sudur. Yetiştirme koşullarına ve çeşidine bağlı olarak ağırlığı 200 ile 2000 g arasında değişir. Tablo 2.8' de şeker pancarının kimyasal bileşimi verilmiştir.

Tablo 2.8. Şeker pancarının kimyasal bileşimi (Yaşar, 2003)

Bileşen	% Taze Pancarda	% Kuru Maddede
Su	76,5	-
Toplam Kuru Madde	23,5	100
Sakkaroz	16,5	70,2
Pektin	2,5	10,7
Selüloz	1,2	5,1
Azotlu maddeler	1,1	4,6
Madensel maddeler	1,7	7,2
Lipidler	0,1	0,4
Diğerleri	0,4	1,8

Şeker pancarı içeriğine ayrıntılı olarak bakacak olursak;

Sakkaroz: Özellikle şekerin kristalizasyonu sırasında sakkaroz kolaylıkla kristalize olur. Ortamdaki mineral maddeler (Na, K) sakkarozun kristalizasyonunu güçleştirir. Sakkarozun sudaki çözünürlüğü sıcaklıkla doğru orantılıdır. Bu konuyla ilgili Tablo 2.9 aşağıda görülmektedir.

Tablo 2.9. Sakkarozun sudaki çözünürlüğü (Yaşar, 2003)

Sıcaklık (°C)	Çözünürlük
0	64,2
50	72,3
100	62,9

Şekerin renk değişimine etkili faktörler:

- ✓ Karamelizasyon
- ✓ Maillard reaksiyonu
- ✓ Polifenollerin demirle birleşmesi.

İnvert şeker: Ortamda % 0,1 oranında bulunabilir. Özellikle hasat edilen pancarlar dona maruz kalırsa invert şeker miktarında artış meydana gelir. Eğer pancar hasat edilmediyse toprak üstünde kalan ve toprak üstüne yakın kısımlarda invert şeker miktarı fazladır. 2 nedenden dolayı istenmez;

- ✓ Maillard reaksiyonu (renk değişimi)
- ✓ Kristallenmeyi güçleştirir.

- İnversiyon sıcaklıkla doğru, pH ile ters orantılıdır. Asidik ortamda meydana gelir. Şeker üretimde ortama kireç ilave edilir ve pH artırılır. Sakkaroz kendine 4 tane su bağlayarak hidrat formuna gelebilir.

- İnvrt şekerler diğer şekerlerle karşılaştırıldığında hidroskopik özellikleri azdır.

Rafinoz: (Trissakarit: glukoz-fruktoz-galaktoz) Normal pancarda %0,3-0,5 arasında bulunur, uygunsuz depolama şartlarında ve dona maruz kalması sonucunda bu miktar artar. Doğrudan doğruya melasta kaldığı için şeker kaybına yol açar.

Azotlu maddeler: (%1,1 civarı) Bu maddeler şekerin işlenmesini güçleştirir. Bu bakımdan miktarının düşük olması arzu edilir.

Pektik maddeler: Hücre duvarı ve hücreler arasında bulunan, olgunlaşmaya bağlı olarak bileşimi değişen bu maddeler şeker üretimi sırasında sıcaklığın gerekenden fazla olması durumunda problem oluştururlar.

Glikozidler: Şeker pancarında % 0,14 civarında bulunan en önemli glikozid saponindir. Bu maddenin 1/3 ü şerbete geçer ve işlem sırasında şerbetin köpürmesine neden olur. Bu bakımdan işlemeyi zorlaştıran maddeler arasında yer alır.

Madensel maddeler: (kül) CL, P, Ca, Si oksit formunda bulunduklarında şekerin kristallenmesini olumsuz yönde etkilerler.

Melas, şeker endüstrisinin yan ürünüdür. Şeker fabrikasyonu teknolojisinde teknik olanaklar ile içinden şeker elde edilemeyen kısımdır. Buharlaştırma ve kristalizasyon işlemi genellikle üç defa tekrarlanır. Bu tekrarlama ham şeker, şeker olmayan organik maddeler ve melasın yüksek viskozitesinin sakkarozun daha ileri düzeyde kristallenmeye izin vermemesine kadar yapılıdır (Çetinkaya, 2002).

Şeker fabrikalarında şeker pancarından ve şeker kamışından sakkaroz elde edilirken, kullanılan yöntem, hasat şekli ve depolanma koşuluna bağlı olmak üzere kristallenmeyen kısmın neredeyse %4'ü melas olarak çıkar (Muhtar, 2000). Melasın bileşimindeki maddeler makro ve mikro maddeler olarak ayrılabilir. Makro maddeler su, şeker ve şekersiz maddeler; mikro elementler ise iz elementler, vitaminler ve gelişme faktörleri olarak sayılabilir. Melas fermente olabilen sakkaroz, fruktoz, glukoz ve rafinozla birlikte fermente olmayan indirgeme maddelerini de içerir. Melasın fermente olmayan indirgeyici içeriği %5-17 aralığında olabilir. Şeker fabrikalarında yüksek ısı ile işleme ve güneş altında depolama, melasın fermente olmayan maddelerinin miktarını arttırmaktadır (Çetinkaya, 2002). Melasın yaklaşık olarak %15'i su, %50'si sakkaroz ve %35'i de sakkaroz dışı maddelerden oluşmaktadır. Melasın bileşimi Tablo 2.10'da verilmiştir.

Tablo 2.10. Şeker pancarı melasının bileşimi (Çetinkaya, 2002)

Şeker %	Şeker Dışı Maddeler		
	Inorg. Mad. %	Org. Mad. %	Vitaminler µg/kg
Sakkaroz 48-50	Kül 10,09	Toplam N 2,2	İnozit 5000- 8000
Rafinoz 0,8- 1,2	Sülfat 11,73	Glutamik Asit 0,53	Biotin 0,04- 0,15
Kestoz 0,5- 0,8	Potasyum 4,68	Asparagin 0,23	Pantotenik Asit 50-110
Galaktoz 0,3	Sodyum 0,73	Lösin 0,41	Vitamin B1 1,3
İnd. şeker 0,3	Kalsiyum 0,35	Glikokol 0,27	Vitamin B2 0,41
	Magnezyum 0,08	Alanin 0,22	Vitamin B3 5,4
	Demir 0,04	Valin 0,22	Folik Asit 0,29
	Alüminyum 0,12	Aminobütrikasit 0,26	Niyosin 51
	Sülfat 0,03	Aminoasit 0,6	
	Fosfor 0,06	Betain 5,5	
	Nitrat 0,29	Laktik asit 1,88	
	Nitrat(µg/kg) 50- 400	Asetik asit 0,81	
	SO2(µg/kg) 10-2	Stearik Asit 0,29	
	Klor 1,03	Formik Asit 0,23	
		Bütrik asit 0,18	
		Propiyonik asit 0,11	
		Okzalik asit 0,068	

Melastaki sakkaroz dışı maddeler organik ve inorganik maddeler olmak üzere ikiye ayrılabilir.

Organik Maddeler

- ✓ Organik maddeler içinde en önemlisi azotlu maddelerdir. Bunların %20'si aminoasit azotudur.
- ✓ Melastaki asitler arasında en fazla glutamik asit bulunur.
- ✓ Protein yaklaşık %0,6'lık kısmını oluşturur. Bu da toplam azotun %1,6'sını geçmez.
- ✓ Melasta bulunan azotsuz organik maddeler ise pektin, dikarboksilik asitleri (okzalik, malonik, süksinik, glutarik, adipinik asitler) ve oksikarboksilik asitleri (glikolik, laktik, malik, tartarik asitler) sayılabilir.
- ✓ Uçucu asitlerden (formik, bütrik, propiyonik asitler) de melasta az miktarda bulunur (Çetinkaya, 2002).

İnorganik Maddeler

Bu maddelerin miktarı ve bileşimi toprak ve meteoroloji koşullarına ve pancar çeşidine bağlıdır. Sodyum, potasyum, kalsiyum miktarları mikroorganizma gelişimi için yeterli olmakla beraber magnezyum ve fosfor miktarı yetersizdir (Çetinkaya, 2002). Melasın %3,1'i çiftçilere, %54,6'sı sanayiye, %37,6'sı Türkiye Şeker Fabrikalarına ait 4 alkol fabrikasında işlenmekte ve

%4,7'si melaslı kuru k     imali için k     kurutma tesislerine verilmektedir. Türkiye'de melas çok çeşitli kullanım alanına sahip bir yan üründür (Tuik, 2008).

2.3.2.   eker Pancarı K      

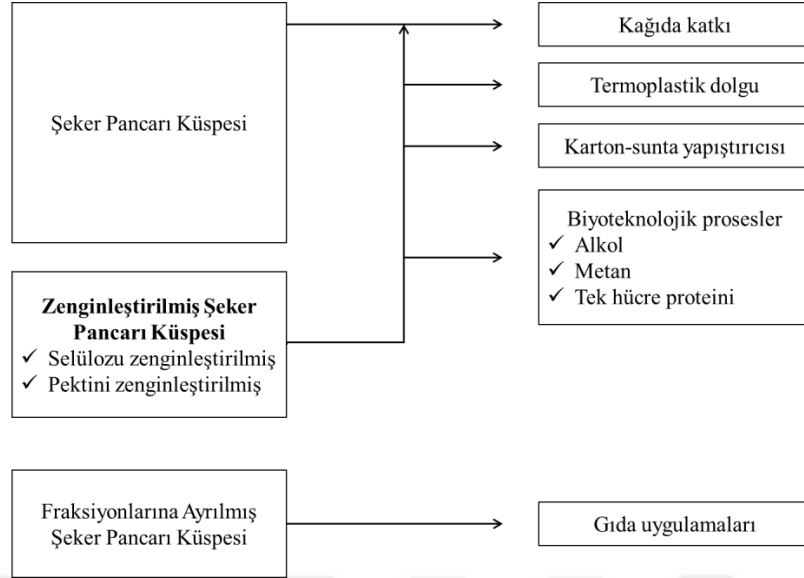
Pancar k       suda            çok sınırlı olan hemiselüloz, selüloz ve pektin gibi karbonhidratlardan meydana gelmiştir. Bunun yanısıra k      de kendi ağırlığının % 2-4'   kadar lignin ve % 8'i kadar ham protein ve % 3-5'i kadar ekstraksiyon işleminde kalan sakkaroz bulunmaktadır (Vogel, 1991).   eker pancarı k        n  n içeriği ve yaklaşık bileşimini Tablo 2.11'de verilmiştir. Selüloz sıcak suda ışığı ve seyreltik asitlerden ve bazlardan çok az etkilenir. Bu özelliklerinden dolayı, şekerin ekstraksiyonu esnasında k      de kalır (Bozok vd., 1971).

Tablo 2.11.   eker pancarı k        n  n yaklaşık bileşimi (  zer, 1995)

���������� Fraksiyon				�������� Fraksiyon
Bileşen	Selüloz	Hemiselüloz	Pektin	Sakkaroz
% Ağırlıkça	19-23	28-31	15-18	3-5
Yapı Birimleri	D-Glukoz	L-Arabinoz	D-Galakturanik Asit	Fruktoz
% Ağırlıkça		19-20	11-23	Glukoz

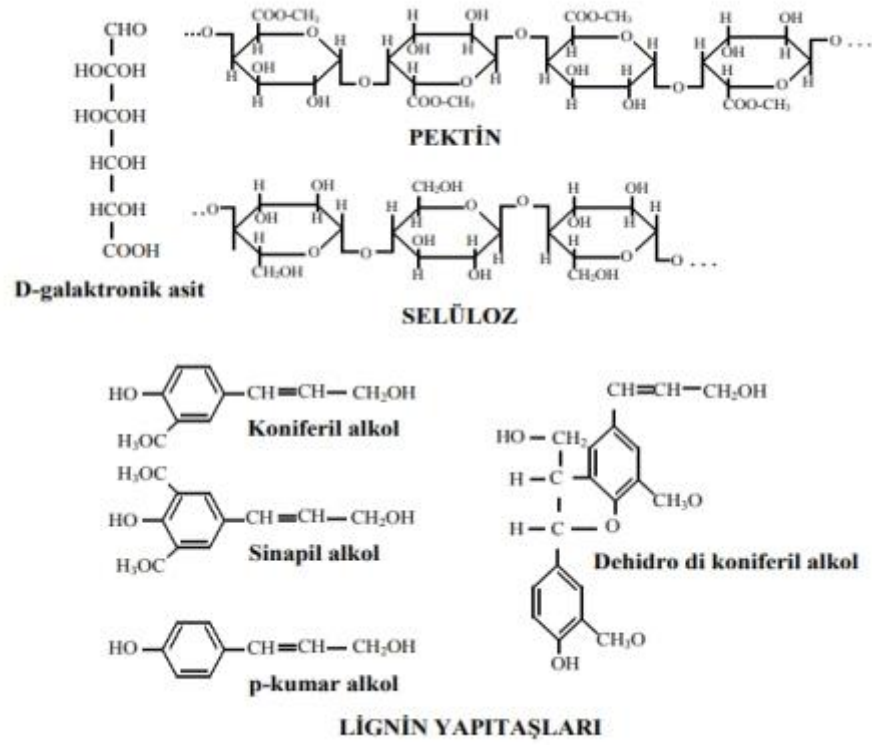
Pektin, hücre duvarında   imento görevi gören bir maddedir. Hemiselüloz ise, yüksek oranda L-arabinoz içerir. Araban olarak da bilinen hemiselüloz çok dallanmı  tır ve yapısı çok komplekstir. Arabanda, L-arabinozun C-1 ve C-5 karbonlarından ba  lanarak oluşturduğu esas zincire ba  lanan diğer karbonhidratların (L-rammoz, D-mannoz, D-galaktoz, D-ksiloz ve D-glukoz) ba  lanmış olduğu çok çeşitli yan zincirler vardır (Bozok vd., 1971; McReady, 1966;   zer, 1995).

  eker fabrikasyonu sırasında difüzörden % 6-7 kuru maddeli sulu k     çıkar. Bu kış sıkılarak elde edilen prese suyu difüzör birimine geri alınır. Genel olarak 100 ton pancardan (mark kapsamı 4,5 ise) 28 ton civarında % 16 kuru maddeli sıkılmış k     elde edilir. Eğer bu kış bir kurutma sisteminde kurutulacaksa, ikinci bir k     sıkma sisteminde yaklaşık % 23-24 kuru madde kapsamına kadar yeniden sıkılır.   eker pancarı k      , olduğu gibi veya kurutulduktan sonra, hayvan yemi olarak değerlendirilir.   eker pancarı k        n  n   retimi Avrupa Birliği   lkelerinde toplam 14 milyon tona ulaşmıştır (Dronnet vd., 1997). Şekil 2.16'da şeker pancarı k        n  n endüstriyel kullanım alanları verilmiştir.



Şekil 2.16. Şeker pancarı küspesinin endüstriyel kullanım alanları (Röper, 2002)

Şekil 2.17’de şeker pancarı küspesinde bulunan pektin, selüloz ve lignin maddelerine ait yapı gösterimleri verilmiştir. Şeker pancarı bitkisine mukavemet kazandıran selüloz ve lignindir. Selüloz Şekil 2.16’da görüldüğü gibi bir glukoz polimeridir. Taze bitkide selüloz zarı oldukça saftır. Zaman ilerledikçe odunlaşır, sertleşir ve araya yabancı maddeler girer. Araya gelen bu maddelerin en önemlileri lignin ve hemiselülozlardır. Bunların dışında protein ve tuzlar da bulunur. Pektinin yapıtaşı ise şekilde formülü verilen D-galakturonik asittir. Galakturonik asidin polimerleşmesi ve karboksil gruplarının kısmen esterleşmesi sonucunda pektinler meydana gelmiştir. Pektinler suda belirli miktarlarda çözünür. Bitkiye odun karakteri veren yani mukavemet kazandıran lignindir. Lignin asitle hidroliz olmayan aromatik yapılu bir bileşik sınıfıdır. Bütün ligninler birbirine yakın üç bileşikten meydana gelmiştir. Şekil 2.16’da verildiği gibi bunlar koniferil alkol, sinapil alkol ve p-kumar alkoldür. Bu moleküller, aralarından su çıkarmak suretiyle makromoleküller haline gelir. Tipik bir ilk kondensasyon ürünü dehidrodikoniferil alkoldür (Alpar, 1969; Bozok vd., 1971).



Şekil 2.17. Şeker pancarı küspesinde bulunan pektin, selüloz ve lignin maddelerine ait yapı gösterimleri (Bozok vd., 1971; Alpar, 1969; Arslanoğlu, 2008)

2.4. Literatürde Yapılmış Çalışmalar

Raimbault vd. (1980) manyok bitkisinden elde edilen unu substrat olarak kullanarak *A. niger*'in Raimbault kolonda gelişimini incelemişlerdir. Substrat kütesinde homojen misel gelişimi, sporülasyon olmadan meydana geldiği belirtilmiştir. Fizyolojik çalışmalardan, katı halde manyokta *A.niger* büyümesi için en uygun koşullar % 50 - 55 nem, % 35 amonyum ve % 40 üre (azot esasında) ve 2×10^7 spor/g substrat içeren % 35 bir azot kaynağıdır. Büyüme kinetiği oluşturulmuş ve inkübasyon sırasında pH, protein, karbonhidrat ve su içeriğindeki değişiklikler belirlenmiştir. Büyüme oranı ve verim, optimum koşullarda sıvı ortamda yetiştirilen *A. niger* için literatürde tarif edilenlere oldukça benzer olduğu belirtilmiştir.

Hamrouni vd. (2017) *A. niger*'in Raimbault kolonda farklı tarımsal yan ürünler kullanılarak, daha çevre dostu olmasının yanı sıra ekonomik açıdan bakıldığında sentetik olanlardan daha ucuz substratlar oluşturan sporlar ve N₇P'lerin üretimini incelemişlerdir. Kültürler biyoreaktörde, 3 g katı dolu Raimbault cam kolonları (çap: 4 cm, uzunluk: 20 cm) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve başlangıçtaki nem içeriği % 75, nemli havalandırma oranı 60 ml/dk'dır. Optimize edilmiş fermantasyon şartları sırasıyla şeker kamışı küspesi, buğday kepeği ve patates unu karışımı kullanılarak 27 °C'de 10 gün KHF'den sonra N₇P verimini 8,12 mg/g

kuru madde olarak elde etmişlerdir. Mantarların ürettiği ergosterol spesifik sterol ile biyokütle marker-NyP içerikleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Soccol vd. (2017) yayınladıkları derleme makalede Raimbault biyoreaktör modelinin, metabolizmanın anlaşılması için mikroorganizmanın respirometrisinin (tütilen O_2 ve CO_2 üretimi) değerlendirilmesi yoluyla zorlanmış havalandırma işleminin büyüme üzerindeki etkisinin çalışılmasında kolaylık sağlayacağını bildirmişlerdir. Kolon reaktörlerinin kullanımının, reaktöre giren havanın neden olduğu konveksiyondan dolayı sıcaklık gradyanları ile ilgili problemleri minimize edeceğini ancak bununla birlikte, fermentasyonun ilerlemesiyle, yatağın gözenekliliğindeki azalma, bu tür biyoreaktörlerde aşılması gereken bir problemi teşkil edeceğini belirtmişlerdir.

Vandenbergh vd. (1999) *A. niger* kültürü ile sitrik asit üretiminde, şeker kamışı küspesi, kahve kabuğu ve manyok küspesi olmak üzere verimlilik açısından üç farklı tarımsal-endüstriyel atık kullanarak Raimbault kolonda deneyi gerçekleştirmişlerdir. Mantar suşunun substrata iyi bir şekilde adapte olduğunu ve fermente maddede protein içeriğini (23 g/kg) artırdığını göstermiştir. Sitrik asit üretimi, 26 °C’de başlangıç neminin % 62 olan manyok küspesi ile fermentasyon yapılırken 120 sa.’de maksimum (88 g/kg kuru madde) seviyesine ulaştığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda sadece sınırlı büyüme altında yüksek bir sitrik asit konsantrasyonuna ulaşıldığını ve yüksek protein içeriğinin, fermente edilmiş substratın (sitrik asit ekstraksiyonundan sonra) hayvan yemi olarak kullanma olasılığını düşündürmektedir ifadelerini kullanmışlardır.

Spier vd. (2011) *A. niger* FS3 tarafından sitrik hamur fermentasyonunda yeni bir fitaz üretmek ve saflaştırmak için bir proses geliştirmişler. Bu proses için Raimbault kolon kullanılmışlardır. Fitaz, katyonik değişim, anyonik değişim kromatografisi ve kromato-odaklama aşamaları ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizinden, saflaştırılmış fitazın moleküler ağırlığı $1,8 \times 10^{-19}$ g olarak hesaplanmış. Fitazın optimum pH değeri 5,0-5,5 ve optimum sıcaklık 60 °C olduğunu ve fitazın, fitat için yüksek afinite gösterdiğini ve K_m , 0,52 mM olduğunu bildirmişlerdir.

Spier vd. (2011) yayınladıkları derleme makalede Raimbault kolonla ilgili “birkaç gram katı ortam kullanılması ve kolonların geometrisi nedeniyle, yatak sıcaklığı fermentasyonu kolayca sağlanabilir, çünkü kolon çeperi tarafından ısının çıkarılması verimli görünmektedir. Bu tip reaktörün dezavantajı, numuneyi kolondan geri çekmenin imkansızlığıdır. Belirli aralıkta numune için bir kolon alınır, fazla ekim gereklidir.” şeklinde bildiride bulunmuşlardır.

Motta vd. (2013) palm yağı işleminin az kullanılmış bir atık ürünü olan boş meyve demetini (EFB), Raimbault kolonlarında KHF yoluyla *Trichoderma reesei* suşu tarafından hümik asitlerin üretimi için bir substrat olarak incelenmişlerdir. Hem HA üretimi hem de mantar gelişimi, 0 ila 72 sa.’lık fermentasyon sırasında gerçekleşmiştir. EFB’nin KHF’de kullanımıyla ilgili temel fiziksel-kimyasal parametreleri bakımından karakterizasyonu, substrat ve katı destek

olarak kullanım için uygun olduğu görülmüştür. 120 sa. sonra, üç log spor üretimi elde edilmiş ve biyokütle verimliliğinden daha büyük bir ürün üretkenliği sağlanmıştır; bunun, substratın, KHF'deki mantar tarafından etkili bir şekilde kullanıldığı anlamına geldiğini belirtmişlerdir.

Pandey vd. (1992) *A. niger* (RRL izolatu) ile glukoamilaz enzimi üretimi için bir dolgu kolon biyoreaktör (7 cm çapında ve 20 cm uzunluğunda) kullanmışlardır. Kolon 0,35 g substrat /cm doldurulduğunda maksimum enzim aktivitesine ulaşılmış ve $0,1 \pm dk$ havalandırma ile 48 sa. boyunca 30 ± 1 °C'de fermente edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi, 0,35 g/ml substrat ile 721 IU/gram kuru substrat aktivitesi (31,78 ünite spesifik aktifleştirme) elde edilmiştir. Bu durumda, ürün geri kazanımı (ilk kuru substrat bazından elde edilen fermente ürün yüzdesi) % 63 olmuştur.

Sharma vd. (2007) KHF'yi, *A. niger* (ARNU-4) suşu ile katı destek olarak çay atığı kullanılarak ve melas bazlı fermantasyon ortamıyla GA üretimi için değerlendirmişlerdir. Maksimum (76,3 g/l) GA üretimi için % 70 nem seviyesi, 30 °C sıcaklık, % 3 aşırı ve 2,5 L/dk havalandırma kullanmışlardır. KHF ile ilgili şu bilgilendirmeleri yapmışlardır: KHF süreci, çeşitli faktörlerden önemli ölçüde etkilenir. Bunlar arasında uygun bir suş, substrat ve işlem parametrelerinin seçimi çok önemlidir. Katı substratın doğası, KHF için ana faktördür. Bu sadece besin maddelerini kültüre sağlamakla kalmaz, aynı zamanda işlem sırasında mikrobiyal hücre için bir ankraj görevi görür. Bu nedenle partikül büyüklüğü ve substratın kimyasal bileşimi fermantasyon sürecini kritik olarak etkilemiştir. Çay atığının çeşitli kimyasal bileşenleri, esas olarak fenoller, şekerler ve katı destek olarak çay atığı ortamı emer ve fungal miseller için kolayca kullanılabilir kılar. Ayrıca, çay partikülü, miselinin yalancı immobilizasyonuna yol açan bağlanma için mantar miselinin yüzeyinde artış sağlar.

Singh vd. (2003) DF, YKHF ve KHF fermantasyonlarında değişen substrat konsantrasyonlarına göre GA üretimi analiz etmişlerdir. Tüm işlemlerde, 120 g/dm³'lük bir başlangıç glukoz konsantrasyonunda maksimum hücre büyümesi elde edilmiştir. GA üretimi ve pH'daki değişim, değişen zaman aralıklarında analiz edilmiş ve DF ve YKHF işlemlerinin 6 günlük inkübasyonda tamamlandığı, en yüksek verimin 12 günlük inkübasyondan sonra gözlemlendiği ve KHF işleminden sonra da devam ettiği gözlenmiştir. KHF koşulları altında en yüksek seviyede % 94,7 verimle GA (106,5 g/L) elde edilmiştir.

Ramachandran vd. (2007) *A. niger* sporlarının KHF sırasında katı ortama salınmadan sentezlenen enzim rezervuarı olarak kullanarak GA üretimini çalışmışlardır. *A. niger* sporlarının (200 sa.), KHF sırasında miselyum tarafından sentezlenen tüm GOD tamamen koruduğu gösterilmiştir. Katalizör olarak hareket etmişler ve biyolojik dönüşüm reaksiyonunu etkili bir şekilde gerçekleştirmişlerdir. GOD aktivitesinin, tekrarlanan yıkamalardan sonra bile sporlarda tutulduğu bulunmuştur. Ortalama reaksiyon hızı, yaklaşık olarak 100 g/L glukozdan üretilen 102 g/L GA ile 1-5 g/Lsa'dır.

GA üretiminde genellikle karbon kaynağı olarak, glukozun yanı sıra tarımsal endüstri yan ürünleri/atıkları gibi önemli biyokütle kaynakları kullanılabilir. Araştırılan substratlar itibariyle yapılmış çalışmalar incelendiğinde, alternatif karbonhidrat kaynakları olarak mısır hidrolizati (Kundu ve Das, 1984), mısır nişastası hidrolizati (Vasilev vd., 1993), atık kağıtlarından elde edilen farklı glukoz konsantrasyonlarına sahip hidrolizatlar (Ikeda vd., 2006), üzüm şırası (Buzzini vd., 1993; Singh ve Singh, 2006), şeker kamışı melası (Rao ve Panda, 1994), gıda işleme artıkları (Fischer ve Bipp, 2005), incir (Roukas, 2000), peynir altı suyu (Mukhopadhyay vd., 2005) ve şeker pancarı melası (Roukas ve Harvey, 1988) gibi materyallerden fermantasyon yöntemleriyle GA üretiminin araştırıldığı görülmektedir.

Pek çok çalışma sonunda biyoteknolojik yöntemlerin daha etkili ve daha verimli olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında fungusların gerek glukozdan gerekse çeşitli biyokütlelerden GA üretimi için en yaygın olarak araştırılan mikroorganizma grubu olduğu görülmektedir. GA üretimi için, *Penicillium luteum* (Curie vd., 1931), *P. variable* (Petrucchioli vd., 1994), *A. niger* (May vd., 1934; Moyer, 1940; Stubbs vd., 1940; Wells vd., 1937) en çok kullanılan funguslardır. Bu grup içerisinde de en çok öne çıkan *A. niger*'dir.

Fermantasyon proseslerinde KHF ve DF en yaygın çalışma yapılan fermantasyon şekilleri olup, yapılan çalışmalar sonucunda katı hal yüzey fermantasyonunun yüksek verim sağladığı için tercih edildiği belirtilmektedir. Bu nedenlerden dolayı KHF, son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Öte yandan GA üretimi için KHF ile yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Yapılan bu çalışmalardan birinde, incirden KHF ile *A.niger* kullanarak GA üretimini araştırmışlardır. %63'lük bir verimle, 1 kg kuru incir için 490 g GA üretimi elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra %8 sitrik asit verimi ile 64 g/kg konsantrasyonunda üretim gerçekleştirilmiştir. Nem içeriğinin %75 olarak belirlendiği, başlangıç pH'sının 7 olduğu ve ortam sıcaklığının 30 °C olarak belirlendiği bu çalışmada fermantasyon süresi 15 gündür. Şeker kullanımı %90, substrata %6 metanol ilavesi ile GA konsantrasyonu 685 g/kg'a, sitrik asit konsantrasyonunu ise 96 g/kg'a yükseldiği belirtilmiştir (Roukas vd., 2000). Yine Roukas vd. (2000) kuru incirden *A. niger* ATCC 10577 suşu kullanılarak yüzey fermantasyonu ile sitrik asit ve GA üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum sitrik asit ve GA konsantrasyonlarının sırasıyla 20,5 ve 97,0 g/L olduğu belirtilmiştir. Sitrik asit verimi %12 şeker kullanımı %85 başlangıç şeker konsantrasyonu 200 g/L, pH 7,0 iken GA veriminin %79,7 başlangıç şeker konsantrasyonunun 100 g/L olduğu belirtilmiştir. Incir ekstraktına %4 metanol ilavesi ile sitrik asit konsantrasyonu 30,7'ye GA konsantrasyonu ise 145,5 g/L'ye arttığı bildirilmiştir. Vasilev vd. (1993) poliüretan köpük üzerine immobilize edilmiş *A. niger* tarafından GA üretimi için fermente edilebilir şeker olarak mısır nişastası hidrolizati kullanmışlardır. Immobilize hücreler serbest hücrelere göre, daha uzun süre (65-70 sa.) muhafaza edilerek ürün oluşumu için başarılı bir şekilde yeniden kullanılmıştır. Optimum GA konsantrasyonunun yaklaşık 143 g/L olarak bulunduğu

belirtilmektedir. Yapılan başka bir çalışmada, bazı yerel mantarlar ile derin fermentasyonda GA üretimi araştırılmış ve en fazla üretimin 58 L olarak, *A. niger*'de, pH 6'da 30°C sıcaklıkta, inkübasyon süresinin 7 gün olduğu optimum şartlarda elde edildiği belirtilmektedir (Shindia vd., 2006).

Farklı konsantrasyonlardaki peynir altı suyu, küspe, soya yağı, maya özü gibi katkı maddelerinin mikroorganizmanın üretim yeteneğine etkisini incelemek üzere ilave edilmiştir. Maya ekstrakt ilavesinin (%0,5) GA üretimini (82,2 g/L) geliştirmek için indükleyici olduğu sonucu ortaya konulmuştur (Sharma vd., 2008). Singh vd. (2003), yaptıkları bir çalışmada çeşitli fermantasyon şekilleriyle *A. niger* tarafından GA üretimini incelemiştir. Çalışmada derin fermantasyon, yarı katı hal fermantasyonu, yüzey fermantasyonu ve katı hal fermantasyonu yöntemleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada optimum şartlar olarak glukoz konsantrasyonunun 120 g/L, pH'nın 6,6, sıcaklığın 30°C ve inokulum oranının da %2 olduğu ortaya konulmuştur. Bu şartlarda, GA üretiminin katı hal fermantasyonunda 106,5 g/L, yüzey fermantasyonunda 62 g/L, yarı katı hal fermantasyonda 86 g/L ve derin fermantasyonda 85,9 g/L olduğu belirtilmektedir.

Bir çalışmada türbin bıçaklı bir reaktör kullanılarak ofis atığı kâğıtlardan GA sentezi araştırılmıştır. Erlenlerde tekrarlanan kesikli kültürlerde, kâğıt hidrolizatı ortamı ile glukoz ortamı karşılaştırıldığında, hidrolizat ortamının GA üretimi üzerine inhibe edici bir etki göstermediği belirtilmektedir. Bu çalışmada, çoğunda olduğu gibi *A. niger* suşu kullanılmıştır. Ortalama GA verimleri hidrolizat ortamı için %92 ve glukoz ortamı için %80 olarak ifade edilmektedir. Aynı zamanda saf oksijenin beslendiği ortamdaki üretim hızının, hava beslenen ortama göre 4 kat daha fazla olduğu da tespit edilmiştir (Ikeda vd., 2006).

Yapılan çoğu çalışmada, oluşan GA'nın ortam asiditesini artırması nedeniyle nötrale edici materyallerin ortama ilave edildiği görülmektedir. Ayrıca oksijenin etkin kullanımını artırmaya yönelik araştırmalar da yapılmaktadır. Zhang vd., (2016) mısır koçanından *A. niger* SIIM M276 suşu kullanarak erlenlerde ve biyoreaktörde GA üretim şartlarını optimize etmeye yönelik yaptıkları bir çalışmada, maksimum verimin % 94,9 olduğu ve 76,67 g/L konsantrasyonunda ürün elde edilebildiği belirtilmektedir. Bu çalışmada hem erlenlerde çalkalama hızının hem de reaktörde karıştırma hızının üretim verimini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir. Ayrıca reaktör şartlarında hava besleme hızındaki artışla GA üretim hızının önemli ölçüde arttığı da vurgulanmaktadır.

Curie vd. (1931) yaptıkları bir çalışmada *Penicillium luteum* ve *A. niger* kullanarak derin fermantasyonda GA üretimini araştırmışlar ve GA veriminin 48-60 saat içinde %90'a çıktığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada %15 glukoz içeren ortamda, *Penicillium puberulum* tarafından %3 CaCO₃ varlığıyla pH 6.1'de fermantasyon başlangıcından 7 gün sonra glukozdan %91 GA dönüşümü gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Elnagy vd., 1975). Diğer bir çalışmada,

Petruccioli vd., (1994) *P. variable* P16 suşunu farklı taşıyıcılar (Ca-aljinat, agar ve poliüretan sünger) üzerine immobilize ederek tekrarlanan kesikli proseslerde glukonat, glukoz oksidaz ve katalaz üretimini incelemişlerdir. Çalışmada taşıyıcıların mekanik stabilitesi, Ca-aljinat, agar ve poliüretan sünger ile elde edilmiştir. Çalışma sırasında poliüretan süngerin glukoz oksidaz ve katalaz enzim aktivitesi için iyi bir taşıyıcı olduğu belirtilmiştir. Poliüretan sünger ile elde edilen hacimsel verimlilik katalaz için, 123,8 U/Lsa; glukoz oksidaz için 10,9 U/Lsa ve son olarak glukonat için 0,118 g/Lsa'dır.

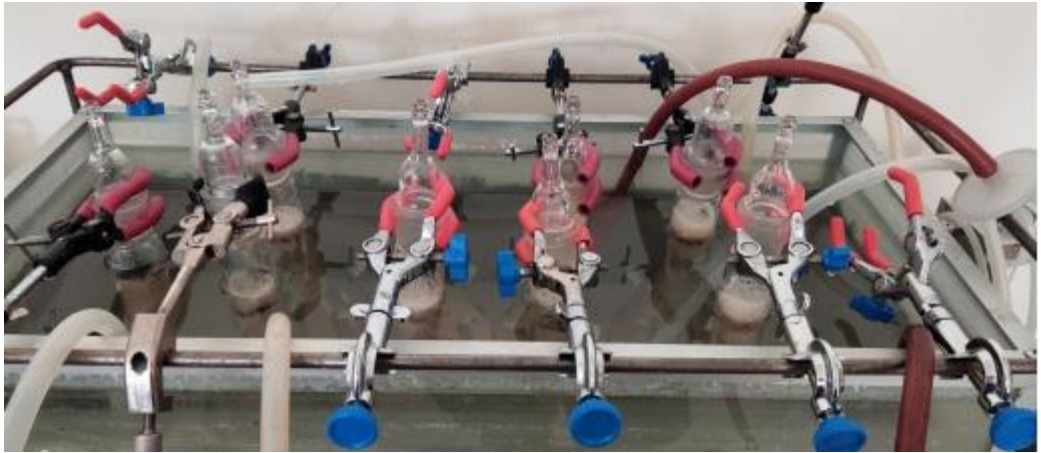
3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde öncelikle çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve malzemeler hakkında daha sonra deneyde kullanılan metot hakkında bilgi verilecektir.

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan melas ve küspe Elazığ Şeker Fabrikası'ndan temin edildi. Çalışma süresince melas plastik kapalı kaplarda +4 °C sıcaklıktaki dolapta muhafaza edildi. Kullanılan küspe ise kapalı plastik kaplarda 20 °C sıcaklıktaki odada muhafaza edildi. Islak halde alınan küspe, plastik branda üzerine yayılarak ve üfleçler yardımıyla beş gün boyunca kaba neminin uzaklaştırılması için kurutuldu. Daha sonra cam kaplara alınarak 60 °C sıcaklığındaki etüvde 24 saat kurutma işlemine tabi tutuldu. Ayrıca farklı partikül boyutlarında küspe örnekleri hazırlamak için kurutulmuş küspeye, öğütme ve eleme işlemleri uygulandı. Öğütme amacıyla laboratuvar ölçekli bir blender kullanıldı (Spice & Herb Grinder, IC-10B-25000 d/dk). Küspe blenderde öğütüldükten sonra, Amerikan Test ve Malzeme Kurumu (ASTM) serisi bir elek serisinde elenerek, -8+16; -16+30; -30+50 mesh fraksiyonlarında örnekler hazırlandı.

Çalışmanın yapılacağı reaktör sistemi; kompresör, rotametre, bakteriyolojik inkübatör, dolgulu yatak kolonları ve hava nemlendiricisinden oluşmaktadır. Raimbault reaktör bölümümüzde yapılan TÜBİTAK projesi yardımıyla temin edilmiştir. Raimbault reaktör, erlen ve kolon olmak üzere iki ana bölümden oluşup; kolonları 3 cm çap 20 cm yükseklik ölçülerinde, şiliftli erlen ise 250 ml'lik hacimde yaptırılmıştır. Şekil 3.1'de sistem görülmektedir.



Şekil 3.1. Reaktör sistemi

Çalışmaya konu edilen mikroorganizma (*A.niger* NRRL-3) bölümümüzde daha önce yapılmış çalışmalar için uluslararası American Type Culture Collection (ATCC) hücre kültür koleksiyonundan temin edilmiş olup çoğaltılarak dondurulup -80 °C’de saklandı. Deneylerde besi ortamı hazırlamada kullanılan PDA (Potato Dextrose Agar) (Lab M, LAB098), kalsiyum karbonat (Honeywell/Fluka) mikrobiyolojik saflıktadır. Deney ortamlarının pH ayarlamalarında kullanılan hidroklorik asit (Merck, 1.00314) ve sodyum hidroksit (Sigma, 06203) analitik saflıktadır. HPLC analizlerinde standart ve mobil faz olarak kullanılan sakkaroz (Carlo-erba, 477187), glukoz (Merck, 1.08342), fruktoz (Merck, 1.04007), glukonik asit (Merck, 8.220507), sitrik asit (Merck, 10523643) oksalik asit (Merck,2349897) ve sülfürik asit (Sigma, 30743) HPLC saflığındadır. Numunelerin analizi öncesi uygulanan filtrasyon işlemi için ISOLAB marka PTFE 0,45 µm’lik filtreler kullanıldı. Çalışmada yapılan tüm tartım işlemleri, 0,0001 g’lık bir hassasiyete sahip bir analitik terazi ile (Radwag AS 220 R.2) gerçekleştirildi. pH okuma ve ayarlama işlemleri için Thermo Scentific marka pH metre kullanıldı. Sterilizasyon amaçları için Model otoklav, sabit sıcaklıkta çalkalama amaçları için çalkalayıcı inkübatörler ve mikrobiyolojik ekim çalışmaları için laminar hava kabini kullanıldı.

3.2. Mikroorganizmanın in Vitro Kültürü

-80 °C’de muhafaza edilen *A. niger* NRRL-3 oda sıcaklığında çözününceye kadar bekletildi. PDA (39 g/L) besiyeri (Tablo 3.1), 121 °C de 15 dakika otokolavda sterilizasyona tabi tutuldu. Sterilize edilmiş agar petrilere dökülerek donduktan sonra, mikroorganizma ekimi gerçekleştirildi. Mikroorganizma ekilmiş petrilere, 30 °C’de etüvde inkübasyona bırakılarak çoğalması sağlandı. Hücreler petri yüzeyini tamamen kapladığında, pasajlanarak yeni besi ortamı içeren erlenlere aktarıldı. Etüvde 5 gün boyunca çoğalan mikroorganizma çalışmalarda kullanılmak üzere, +4 °C’de depolandı.

Tablo 3.1. PDA Besi Yeri Bileşimi

İçerik	Konsantrasyon (g/L)
Patates İnfüzyonu	4,0
D-Glukoz	20,0
Agar	15,0

3.3. Metot

3.3.1. Glukonik Asit Üretiminin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım

İncelenen literatür çalışmalarında Raimbault kolonda üretimde etkin parametreler ve katı hal fermentasyonunda glukonik asit üretimi üzerine etkin parametrelerin neler olduğu ve hangi aralıklarda önemli olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanımı ile etkin parametrelerin değiştirilerek glukonik asit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. CYY, proseslerin optimizasyonunda matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir (Myers ve Montgomery, 1995). En çok kullanılanları CYY dizaynı Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ve Box-Behnken Dizaynıdır. MKD’da α , -1, 0, +1, $+\alpha$ olarak adlandırılmak suretiyle bir faktörün 5 farklı seviyesi incelenir. 0 merkez nokta yani literatürden ve ön denemelerden yola çıkılarak bulunan optimum deney ortam değerleri iken $-\alpha$ ve $+\alpha$ iki uç değerleri ifade etmektedir. -1 ve +1 noktaları ise düşük ve yüksek seviyeyi ifade eder.

Hava besleme hızı, partikül boyutu, dolgu miktarı ve fermentasyon sıcaklığı değişkenlerinin etkileri MKD yöntemi ile tasarlanan deneylerle incelenerek sonuçlar istatistiksel olarak Analysis Of Variance (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Raimbault kolonda KHF ile glukonik asit üretimi için tasarlanmış deneyler Tablo 3.2 de verilmiştir.

MKD ile KHF için 4 bağımsız değişken ve 4 tekrarlanan merkez nokta ile toplam 28 deney gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2.). Değişen parametrelere göre elde edilen glukonik asit miktarları cevap olarak kullanılmıştır. Deneylerin tasarımında ve elde edilen sonuçların analizinde DesignExpert 10.0 yazılımı kullanılmıştır. Varyans analizleri ve değişkenlerin etkileşimli olarak cevap üzerine etkileri üç boyutlu grafikler halinde elde edilmiştir.

Tablo 3.2. GA üretiminin incelendiği MKD'ına uygun deneysel matris

Deney No	Hava besleme hızı (L/dk)	Fermentasyon sıcaklığı (°C)	Dolgu miktarı (g)	Boyut (mm)
1	0,1	27	5	0,6
2	0,5	27	5	0,6
3	0,1	33	5	0,6
4	0,5	33	5	0,6
5	0,1	27	10	0,6
6	0,5	27	10	0,6
7	0,1	33	10	0,6
8	0,5	33	10	0,6
9	0,1	27	5	2,4
10	0,5	27	5	2,4
11	0,1	33	5	2,4
12	0,5	33	5	2,4
13	0,1	27	10	2,4
14	0,5	27	10	2,4
15	0,1	33	10	2,4
16	0,5	33	10	2,4
17	0,1	30	7,5	1,5
18	0,5	30	7,5	1,5
19	0,3	27	7,5	1,5
20	0,3	33	7,5	1,5
21	0,3	30	5	1,5
22	0,3	30	10	1,5
23	0,3	30	7,5	0,6
24	0,3	30	7,5	2,4
25	0,3	30	7,5	1,5
26	0,3	30	7,5	1,5
27	0,3	30	7,5	1,5
28	0,3	30	7,5	1,5

A. niger kullanılarak melastan KHF yöntemiyle GA üretiminin incelendiği bu çalışmada, optimum besin ortamı bölümümüzde daha önce yapılan çalışmadan alınmıştır (Gölebatmaz, 2016). Tasarlanmış deneyler (Tablo 3.2), belli zamanlarda örnek alınmak üzere zamana bağlı olarak yürütülmüştür. Tasarlanan deneylerin ne şekilde gerçekleştirildiği bu bölümde anlatılacaktır.

Hücreler petrilerin içine 30 ml Tween 80 karışımı (50 ml %0,9 NaCl + 1 ml %1 Tween 80) eklenerek öze yardımı ile kazındı ve steril gazlı bez ile süzülerek hifleri uzaklaştırıldı.

KHF deneyleri için farklı partikül boyutuna sahip küspe, melas, distile su ve CaCO₃ sterilizasyonu yapıldıktan sonra deneysel tasarımın ön gördüğü farklı oranlarda (Tablo 3.3) iyice karıştırılıp hücre ekimi yapılarak kolonlara dolduruldu (Şekil 3.2).

Tablo 3.3. Deneysel Tasarımda verilen dolgu miktarına göre hazırlanan ortam

Ortama eklenen bileşenler	-1	0	1
Küspe, g	5	7,5	10
Melas, g	4,1	6,15	8,2
CaCO ₃ , g	0,68	1,02	1,36
Hücre, ml	2,3	3,41	4,6
İlave Su, ml	5	7,5	10
Toplam kütle/ katı madde , g/g	3,4	3,4	3,4



Şekil 3.2. Kolonların doldurulması ve reaktör sistemi

Belli zaman aralıklarında alınan kolonlar, 250 mL’lik erlenlerde su içeriği 100 ml olacak şekilde distile su ilavesi ile ekstrakte edildi (Şekil 3.3). Ekstraksiyon işlemi çoklu manyetik karıştırıcı yardımıyla 200 d/dk hızda 2 saat süreyle karıştırarak gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonunda elde edilen karışımdan, 2 ml numune alınarak 10000 rpm’de 5 dk santrifüje tabi tutuldu. Elde edilen süzöntüler 0,45 µm’lik filtrelerden geçirilerek GA üretimini tespit etmek için HPLC de analiz edildi.



Şekil 3.3. Kolondan alan numunenin su eklenerek ekstraksiyona hazır hale getirilmesi

3.4. Analiz Yöntemleri

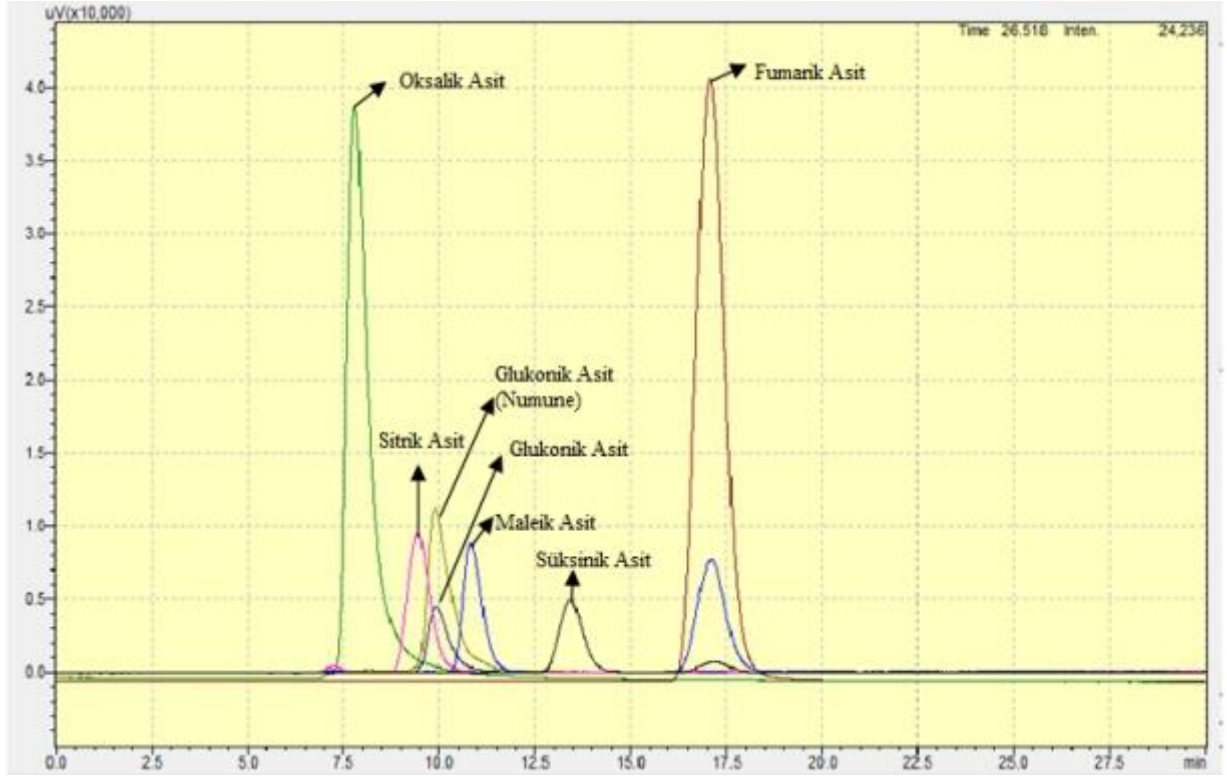
3.4.1. Glukonik Asit Analizleri

GA’nın kantitatif analizleri, Shimadzu LC20 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ile tayin edilmiştir. HPLC çalışma koşulları Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.4. HPLC koşulları

Kolon	300 mm/7.8 mm Coregel-87H3 Organik asit kolonu
Dedektör	UV Dedektör
Mobil faz	0.005 M H ₂ SO ₄
Akış hızı	0.6 ml/dk
Kolon sıcaklığı	45 °C
Dalga boyu	210 nm
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Hesaplama kriteri	Pik Yüksekliği

Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması için (Şekil 3.4), standartlarının seyreltilmesiyle farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC sisteminde yürütülerek her organik asit için elde edilen pik alanları ve konsantrasyonları arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. Kolon kirliliğinin önlenmesi için çözeltiler ve numuneler cihaza 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek 5 µl enjeksiyon hacmi ile verildi.



Şekil 3.4. HPLC organik asitlerin kalibrasyon grafiği

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada dolgulu kolon biyoreaktör sisteminde *A. niger* ile GA üretiminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla katı substrat olarak şeker pancarı artıkları ile gerçekleştirilen çalışmalarda optimum besiyeri bileşimi kullanılarak dolgulu reaktör işletme parametrelerinin GA üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Aerobik şartlarda gerçekleştirilen bir fermantasyon işlemi olan GA üretimi aynı zamanda enzimatik bir oksidasyon işlemidir. Ortamda aşırı bulunacak oksijen konsantrasyonu hem mikrobiyal büyüme hem de enzimatik dönüşümü destekleyeceği düşünülmektedir. Bu amaçla daha önceden laboratuvarlarımızda petrilere incelenen besi yeri bileşimi verileri kullanılarak oksijen miktarının yüksek olacağı dolgulu kolon sistemlerinin özel bir şekli olan Raimbault kolonlarında biyoreaktör işletme koşullarının incelenmesi ve bu değişkenlerin GA üretimine etkilerinin gözlenmesi bu çalışmanın temel amacıdır.

Gölebatmaz (Gölebatmaz, 2016) tarafından önerilen ve Tablo 3.3’de verilen besi yeri bileşimi kullanılarak Tablo 3.2’de verilen hava besleme hızı, fermantasyon ortam sıcaklığı, dolgu miktarı ve tanecik boyutu reaktör işletme parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Seçilen bu bağımsız değişkenlerin incelenecek aralıkları literatürde yapılmış benzer çalışmalarda (Spier vd., 2011; Motta vd., 2013) ve yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmiştir. Design Expert 10.0 (deneme versiyonu) yazılımı ile hazırlanan deneysel araştırma şablonu ve bu şartlarda yapılmış deneysel çalışma sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Tabloda cevap değişkeni olarak deneysel çalışma süresince elde edilen en yüksek GA konsantrasyonu ve GA verimliliği değerleri verilmiştir. Her iki cevap değişkeni için istatistiksel değerlendirmeler yazılım yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Tablodan görüldüğü üzere maksimum GA konsantrasyonu 49 g/L olarak bulunmuştur. Sharma vd. (2007), *A. niger* ile KHF’de glukonik asit üretimi üzerine yaptığı çalışmada GA konsantrasyonunu 76,3 g/L bulmuştur. Shindia vd. (2005), derin fermantasyonda gerçekleştirdiği GA üretimi çalışmasında 58,46 g/L GA konsantrasyonu bulmuşlardır. Ve son olarak Roukas vd. (2000) kuru incir ve *A. niger* ile yaptıkları GA üretim prosesinde 97 g/L GA konsantrasyonu bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre deneyde elde ettiğimiz konsantrasyonun düşük olduğu görülmektedir.

Tablo 4.1. KHF ile GA üretimi için oluşturulan MKD dizayn matrisi ve elde edilen GA konsantrasyonu ve verimi

Deney No	Hava Besleme Hızı (L/dk)	Ferm. ortam sıcaklığı (°C)	Dolgu miktarı (g)	Partikül boyutu (mm)	GA verim (g/Lsa)	GA kons. (g/L)
1	0,10	27,00	5,00	0,60	0,31	22,50
2	0,50	27,00	5,00	0,60	0,20	19,50
3	0,10	33,00	5,00	0,60	0,32	22,98
4	0,50	33,00	5,00	0,60	0,30	21,89
5	0,10	27,00	10,00	0,60	0,61	44,00
6	0,50	27,00	10,00	0,60	0,68	49,00
7	0,10	33,00	10,00	0,60	0,60	43,20
8	0,50	33,00	10,00	0,60	0,61	37,03
9	0,10	27,00	5,00	2,40	0,17	19,88
10	0,50	27,00	5,00	2,40	0,17	20,90
11	0,10	33,00	5,00	2,40	0,19	17,99
12	0,50	33,00	5,00	2,40	0,14	8,57
13	0,10	27,00	10,00	2,40	0,24	28,56
14	0,50	27,00	10,00	2,40	0,29	34,87
15	0,10	33,00	10,00	2,40	0,32	23,00
16	0,50	33,00	10,00	2,40	0,50	23,99
17	0,10	30,00	7,50	1,50	0,39	27,75
18	0,50	30,00	7,50	1,50	0,30	21,75
19	0,30	27,00	7,50	1,50	0,14	13,42
20	0,30	33,00	7,50	1,50	0,34	20,92
21	0,30	30,00	5,00	1,50	0,22	16,00
22	0,30	30,00	10,00	1,50	0,44	32,00
23	0,30	30,00	7,50	0,60	0,45	32,21
24	0,30	30,00	7,50	2,40	0,33	15,79
25	0,30	30,00	7,50	1,50	0,36	17,25
26	0,30	30,00	7,50	1,50	0,22	17,25
27	0,30	30,00	7,50	1,50	0,23	16,50
28	0,30	30,00	7,50	1,50	0,25	18,00

MKD'ye göre hazırlanan deneysel matrise uygun elde edilen deneysel çalışma sonuçları Design Expert 10.0 (deneme sürümü) yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uyumluluğu istatistiksel olarak incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te görülmektedir. GA konsantrasyonunun cevap değişkeni olarak belirlendiği deneysel sonuçlara uygun model ifadelerin istatistiksel test sonuçlarının verildiği Tablo 4.2'de, kuadratik formdaki denklemin tamamlayıcılığının yeterli olduğu görülmektedir. Benzer şekilde sonuç değişkeni olarak zamanında etkisinin olduğu verimlilik değerlerine uygun model olarak lineer matematiksel denklem formu önerilmektedir. Tablodan görüldüğü üzere lineer formdaki denklemin istatistiksel değerleri kısmen daha düşüktür. Ancak program yardımıyla indirgenmiş kuadratik formda düzenlenen denklem yapısı ile model ifadenin istatistiksel değerleri artırılmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.2. GA konsantrasyonunun sonuç olarak belirlendiği deneysel verilerle önerilen matematiksel modellerin istatistiksel uyumunun incelenmesi

Kaynak	Ardışık p-değeri	Uyum eksikliği p-değeri	Ayarlanmış R^2	Tahmin edilen R^2	
Lineer	< 0.0001	0,0012	0,6291	0,5323	
2FI	0,4187	0,0012	0,6356	0,2837	
Kuadratik	0,0019	0,0045	0,8601	0,6420	Önerilen
Kubik	0,3079	0,0035	0,8989	-2,4491	

Tablo 4.3. GA verimliliğinin sonuç olarak belirlendiği deneysel verilerle önerilen matematiksel modellerin istatistiksel uyumunun incelenmesi

Kaynak	Ardışık p-değeri	Uyum Eksikliği p-değeri	Ayarlanmış R^2	Tahmin edilen R^2	
Lineer	< 0.0001	0,3588	0,7064	0,6227	Önerilen
2FI	0,2542	0,3927	0,7371	0,4986	
Kuadratik	0,0997	0,5147	0,8035	0,5111	
Kubik	0,5894	0,3526	0,7869	-3,0029	

Önerilen model ifadenin istatistiksel değerleri Tablo 4.4’de görülmektedir. Seçilen her iki cevap değişkeni içinde regresyon katsayılarının (R^2) 0,9’un üzerinde olduğu tablodan görülmektedir. Yüksek regresyon katsayısı, incelenen bağımsız değişkenlerin incelenen aralıklarında sonuç üzerine değişimlerin %90’ından fazlasının önerilen formdaki denklem tarafından açıklanabileceğini göstermektedir. Modellerin değerlendirilmesinde daha anlamlı bir istatistiksel veri olan ayarlanmış R^2 (Adj R^2) değeri her iki sonuç içinde oldukça yüksek değerlere sahiptir. Model içerisinde önemsiz değişkenlere ait terimlerin çıkarılması durumunda ulaşılan regresyon değerindeki kısmen yüksek değer önerilen bu model ifadenin deneysel sonuçlarını açıklamada yeterli olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.4. GA üretimi için önerilen indirgenmiş kuadratik formdaki model ifadelerine ait istatistiksel değerler

	GA konsantrasyon, g/L	GA verimlilik , g/Lsa
Standart sapma	3,56	0,064
Ortalama	24.53	0.33
R ²	0.93	0.90
Adj. R ²	0.86	0,83
Varyans (C.V.)	15.0	19,13
Pred. R ²	0.69	0.65
Adeq Precision	14,42	12,26

Önerilen matematiksel model ifadelerin program yardımıyla elde edilen ANOVA test sonuçları Tablo 4.5'te görülmektedir. ANOVA tablosunda *P*-değeri 0,05'den daha düşük değerlere sahip değişkenlerin sonuç değişkenine etkisinin önemli olduğu, 0,1'den daha büyük değerlere sahip terimlerin sonuca etkisinin düşük olduğu bilinmektedir. Lineer sonuçlara baktığımızda hava besleme hızının etkisinin her iki sonuç içinde önemli olmadığı, fermantasyon sıcaklığının etkisinin GA konsantrasyonu için daha etkili olduğu ve dolgu miktarı ile tanecik boyutunun her iki sonuç değişkeni içinde çok önemli olduğu (*P*-değeri < 0.0001) görülmektedir. Eş zamanlı etkilere bakacak olursak hava besleme hızı ve fermantasyon sıcaklığının eş zamanlı etkisi GA verimliliğinin model uyumunun artması için modelden çıkarılmıştır. Aynı şekilde hava besleme hızı ve tanecik boyutunun eş zamanlı etkisi GA konsantrasyonunun model uyumluluğu için modelden çıkarılmıştır. Hava besleme hızı ve dolgu miktarı GA verimliliği için daha önemli, fermantasyon sıcaklığı ve tanecik boyutunun eş zamanlı etkisi yine GA verimliliği için çok daha önemlidir. Dolgu miktarı ve tanecik boyutunun eş zamanlı etkisi GA konsantrasyonu için oldukça önemli olduğu görülmektedir. Üssel etkilere baktığımızda hava besleme hızının üssel etkisi her iki sonuç değişkeni içinde önemli olduğunu (*p*-değeri <0,1) ve dolgu miktarının üssel etkisinin GA verimliliği için önemli olduğunu görmekteyiz. Hava besleme hızının üssel etkisinin önemli olmadığı görülmektedir. Bunun nedeninin deneysel aksaklıkların olduğu düşünülmektedir. Dronavat vd. (1995) *A. niger* ile yaptıkları GA üretim çalışmasında havalandırma hızının etkili olduğunu ve artan havalandırma hızı ile orantılı olarak GA konsantrasyonunun arttığını bildirmişlerdir.

Sonuçlara baktığımızda görüyoruz ki etkileşim terimlerinin önemi seçilen cevap değişkenlerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Seçilen cevap değişkenleri deneysel çalışmada ulaşılan maksimum değerlerdir. Zamanında bir değişken olarak girdiği durumda bu değerlerdeki değişimden dolayı farklılıklar meydana gelmektedir.

Tablo 4.5. GA üretimi için önerilen model ifadelerin ANOVA test sonuçları

Kaynak	GA kons., g/L		GA verimlilik, g/Lsa	
	F Değeri	P-değeri Prob> F	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	14,81	< 0.0001	11,610	< 0.0001
A, Hava besleme hızı	0,67	0,426	0,070	0,794
B, Fermantasyon sıcaklığı	4,81	0,046	3,510	0,081
C, Dolgu miktarı	92,95	< 0.0001	70,400	< 0.0001
D, Tanecik boyutu	42,86	< 0.0001	41,740	< 0.0001
AB	3,1	0,100	-	-
AC	1,71	0,212	3,520	0,080
AD	-	-	0,860	0,368
BC	1,57	0,230	-	-
BD	2,13	0,166	7,300	0,342
CD	9,27	0,009	0,740	0,016
A ²	3,89	0,069	3,280	0,404
B ²	2,1	0,169	0,360	0,090
C ²	2,67	0,124	3,910	0,560
D ²	2,67	0,125	11,610	0,067

MKD'ye göre yapılan deneysel çalışmaya uygun olarak önerilen modifiye kuadratik denklemlerin gerçek değişkenler cinsinden katsayıları Eşitlik 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

GA g/L =

-332.12

-8.22 * hava besleme hızı

+23.42 * fermentasyon ortam sıcaklığı

+0.12 * dolgu miktarı

+3.95 * partikül boyutu

-2.61 * hava besleme hızı * fermentasyon ortam sıcaklığı

+2.33 * hava besleme hızı * dolgu miktarı

-0.15 * fermentasyon ortam sıcaklığı* dolgu miktarı

-0.49 * fermentasyon ortam sıcaklığı* partikül boyutu

-1.21 * dolgu miktarı * partikül boyutu

+109.23 * hava besleme hızı²

-0.36 * fermentasyon ortam sıcaklığı²

+0.58 * dolgu miktarı²

+4.47 * partikül boyutu²

(4.1.)

GA g/Lsa =

-6.67

-1.06 * hava besleme hızı

+0.48 * fermentasyon ortam sıcaklığı

+4.38⁻³ * dolgu miktarı

-0.45 * partikül boyutu

+0.059 * hava besleme hızı * dolgu miktarı

+0.08 * hava besleme hızı * partikül boyutu

+5.78⁻³ * fermentasyon ortam sıcaklığı* partikül boyutu

-0.02 * dolgu miktarı * partikül boyutu

+0.85 * hava besleme hızı²

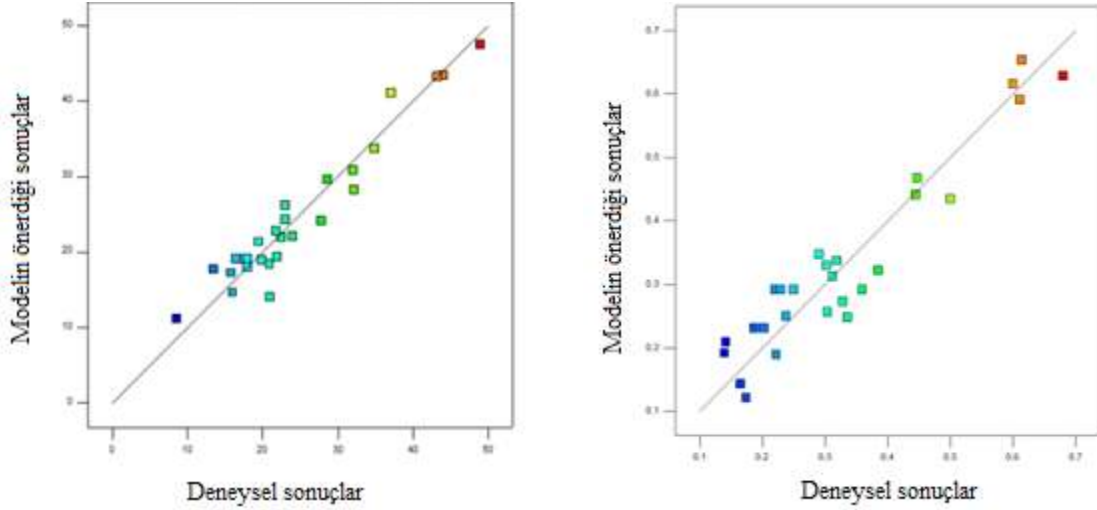
-7.98⁻³ * fermentasyon ortam sıcaklığı²

+3.78⁻³ * dolgu miktarı²

+0.09 * partikül boyutu²

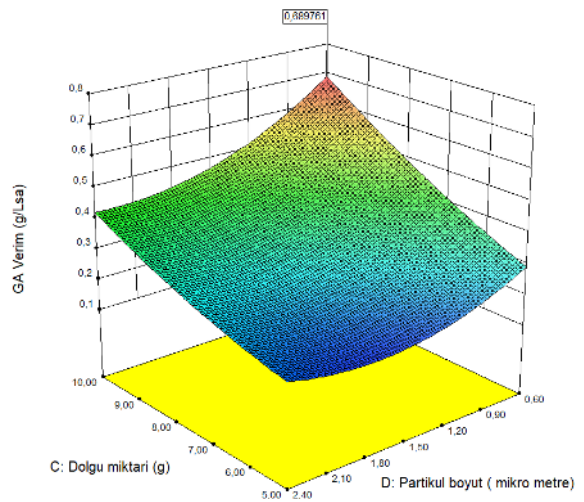
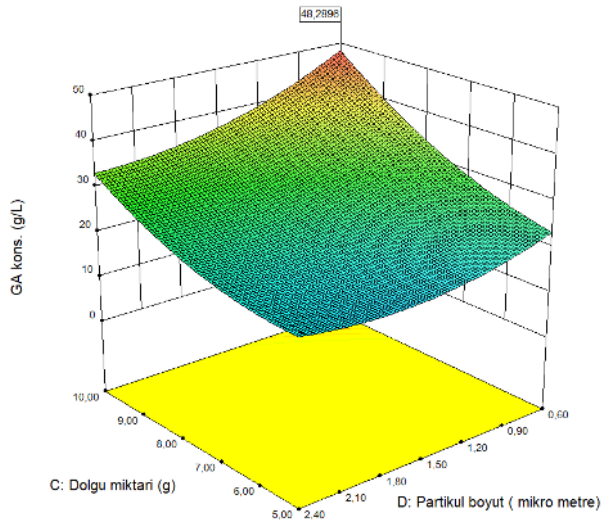
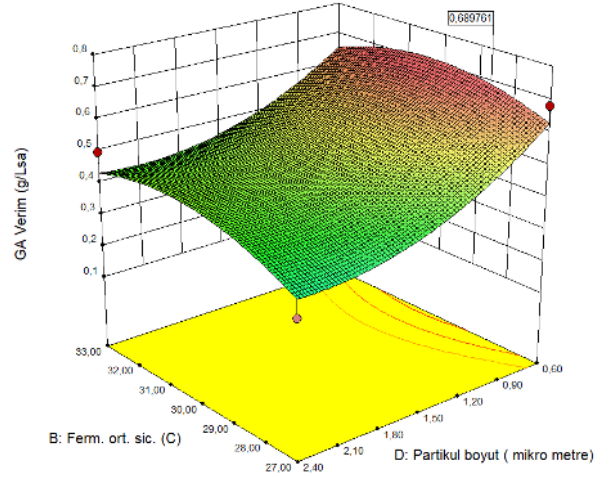
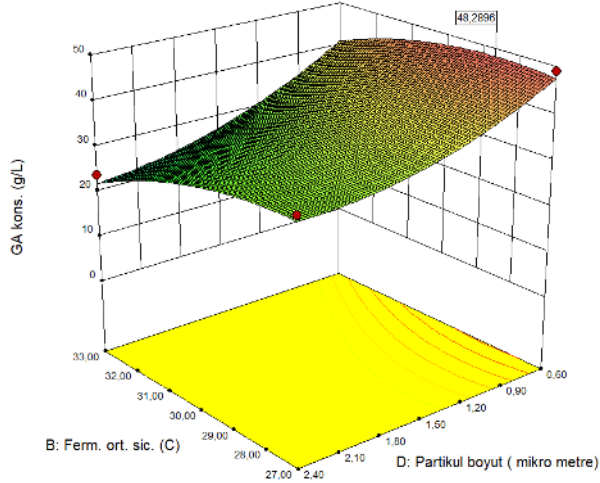
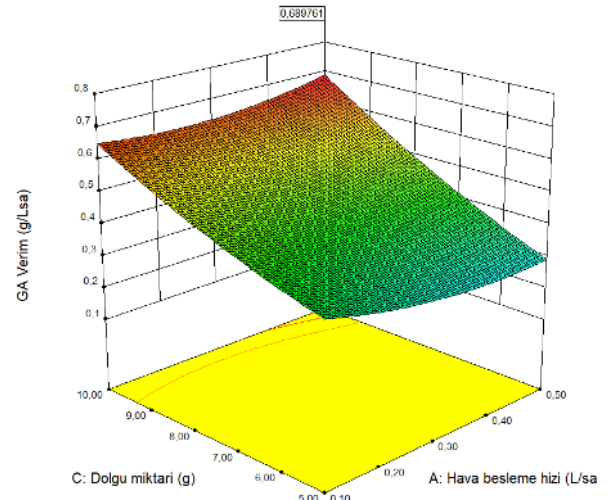
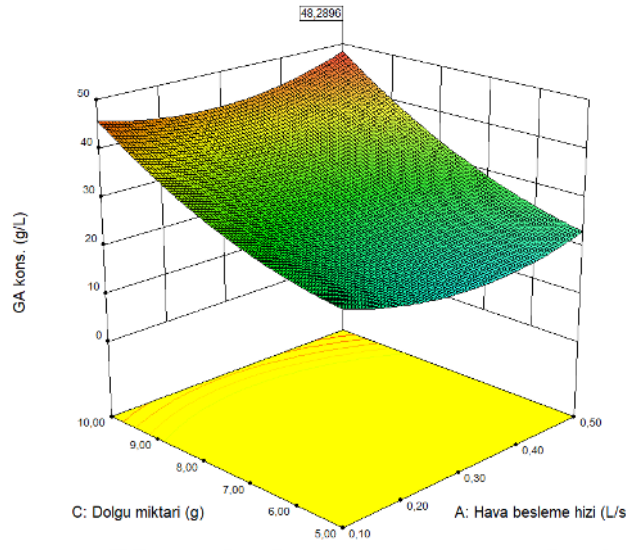
(4.2.)

Eşitlikte terimlere ait katsayılardan pozitif işaretlilerinin sonuç değişkenine etkisin olumlu, negatif işaretlilerinin olumsuz etkiye sahip olduğu görülmektedir. Tasarlanan matrise uygun şartlarda gerçekleştirilen deneysel sonuçlar ile model ifadelerden elde edilen değerleri gösteren grafikleri Şekil 4.1’de verilmiştir. Her iki cevap değişkeni içinde diyagonal etrafında toplanmış olan veri dağılımı deneysel verilerle model ifadelerin uyumunu göstermektedir. Şekildeki renkli kutuların her biri farklı şartlardaki deney sonuçlarını göstermektedir.

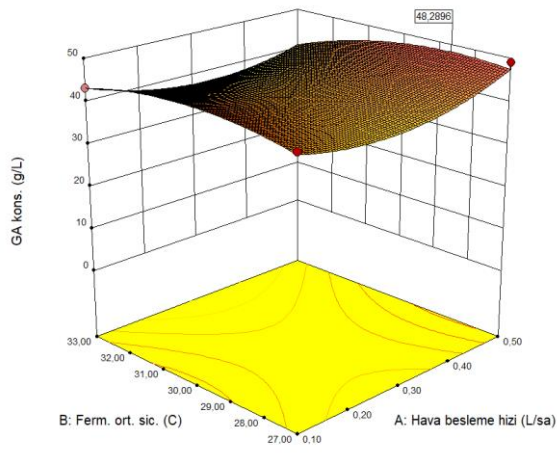
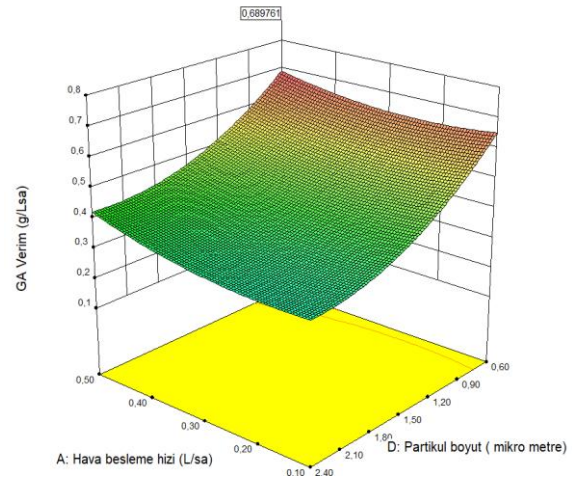
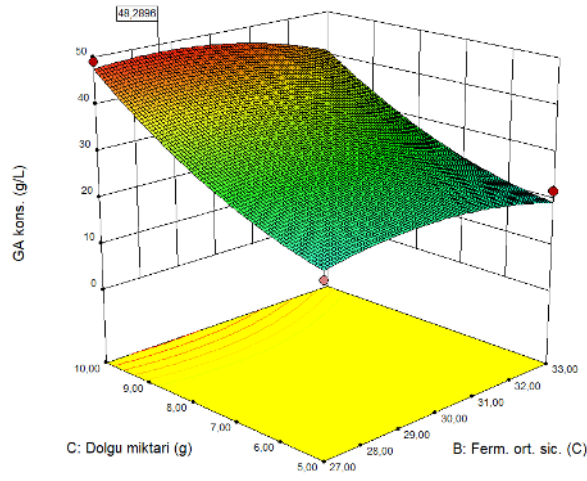


Şekil 4.1. *A.niger* ile şeker pancarı melasından KHF ile GA üretimi deneyleri için elde edilen model ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum (a, GA verimi (g/Lsa); b, GA konsantrasyonu (g/L))

Model ifadenin içerdiği bağımsız değişkenlerin seçilen cevap değişkenine etkisinin eş zamanlı etkileri kontur ve/veya 3 boyutlu grafikler yardımıyla görülmektedir. Program yardımıyla elde edilen 3 boyutlu grafikler Şekil 4.2’de görülmektedir. Dolgu miktarındaki artışla birlikte partikül boyutundaki azalış GA konsantrasyonu lineer olarak artmaktadır. Hava besleme hızının en yüksek partikül boyutunun en düşük olduğu noktada, fermentasyon sıcaklığının orta noktası ile dolgu miktarının en yüksek olduğu noktada ve yine fermentasyon sıcaklığının orta noktası ile partikül boyutunun en düşük olduğu noktada en yüksek GA konsantrasyonu ve GA verimliliği elde edilmiştir. Katı substratın tanecik boyutundaki azalma ile GA konsantrasyonunda artma tüm grafiklerde görülmektedir. Bu durum katı substratın büyüyen yüzey alanı sonucu hücrelerin substrata daha kolay ulaşmasını sağlamaktadır.



Şekil 4.2. Bağımsız değişkenlerin eş zamanlı etkileri

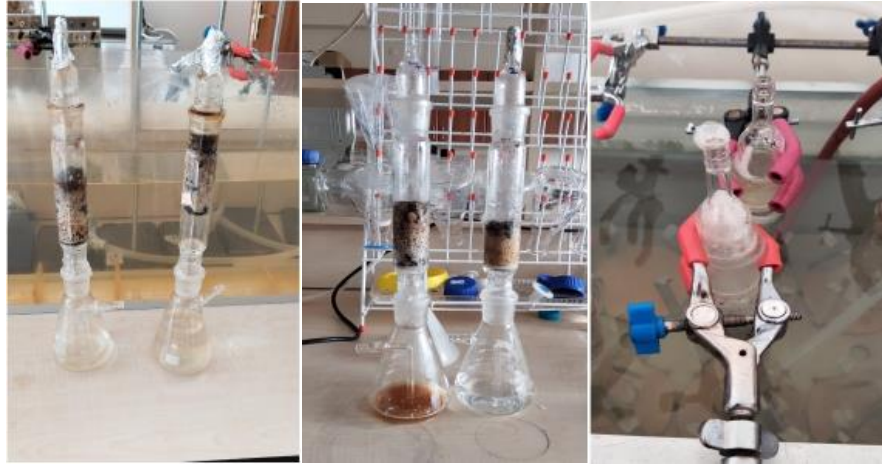


Şekil 4.2. (Devamı)

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi hava besleme hızının incelenen aralıkta GA konsantrasyonu üzerine önemli bir etkisi yoktur. Bu durum incelenen aralıkta yaşanan bazı yapısal sorunlardan kaynaklanabilir. Hava besleme hızının ve sıcaklığın yüksek olduğu noktalarda nemlendirme amacıyla kullanılan steril su çabucak kolon tepesine taşınmakta ve su birikimi kolonun üzerinde gözlenmektedir. Yüksek havalandırma hızlarının incelendiği dolgulu kolonlarda katı ortam sürüklenmektedir ve kolon içerisinde kanallaşma veya basınç oluşumundan dolayı hava beslenmesinde sorunlar gözlemlenmiştir. Hava besleme hızının düşük olduğu dolgulu kolonlarda sporlaşmalar oluşmaktadır. Belirlenen bazı sorunların fotoğrafları Şekil 4.3’de ve yaşanan bazı sorunlar Tablo 4.6’da verilmiştir. Katı substratın tanecik boyutundaki azalma ile GA konsantrasyonunda artma tüm grafiklerde görülmektedir.

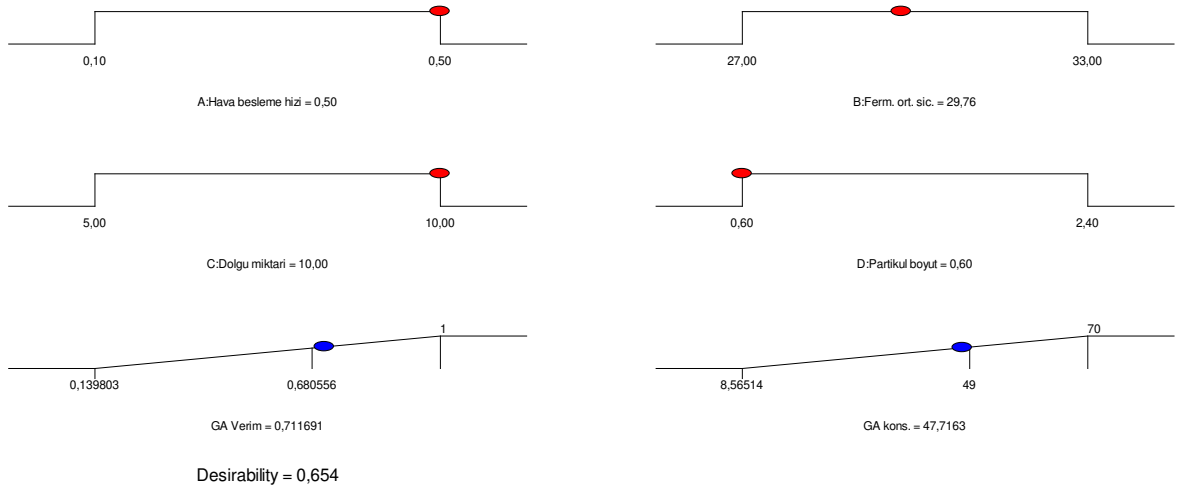
Tablo 4.6. Deney sırasında karşılaşılan sorunlar

Sıcaklık (°C)	Havalandırma Hızı (L/sa)	Partikül boyutu (mm)	Karşılaşılan Sorun
33	0,5	-30+50	Kolon içindeki aşırı sıkışmadan dolayı 2. günden sonra sistem tarafından kolon kapağı basınç etkisi ile atılmaktadır.
33	0,5	-8 +16 16 +30 -30 +50	Aşırı köpürme, 2. günden sonra hava geçişinde zorlanma olmuştur ve dolgu üst tarafa itilmiştir. Hortum girişinde hava sızmaları meydana gelmektedir.
30 33	0,5	-8 +16	Sporülasyonun fazla olduğu için kolonların delikleri tıkanmıştır.
	05		0,5 havalandırma hızında 2. günden sonra alttaki sıvıda fazla azalma ve dolgu kısmında terleme ve su taşımaya bağlı su birikintileri görülmüştür.
		-8 +16 16 +30	Bu boyuttaki küspelerin ekimi su tamamen tutulmadığı için ekstra su eklenmediği halde kolondan erlen içindeki nemlendirme sıvısına damlama meydana gelmiştir.
	0,1		Dolguda kuruma ve çatlaklar oluşmaktadır.



Şekil 4.3. Fermantasyon sırasında karşılaşılan sorunlar. A) dolgunun yukarı itilmesi, B) aşırı sıvı kaybı, C) köpük oluşumu

Önerilen model ifadelerin maksimum GA üretimi için sayısal çözümlemesi sonucunda elde edilen çözüm noktaları ve elde edilecek sonuç değerleri program yardımıyla elde edilmiş ve Şekil 4.4’de verilmiştir. Şekil 4.4’de hava besleme hızının 0,50 L/dk, ortam sıcaklığının 29,76 °C, dolgu miktarının 10 g ve partikül boyutunun 0,60 mm olduğu deneyde GA veriminin 0,71 g/Lst ve GA kons. 47,7 g/L bulunacağını öngören çözüm noktası görülmektedir. Programın önerdiği şartlarda yapılan doğrulama deneylerinde elde edilen sonuçlar ile uyumun %85 (40 g/L GA) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. Maksimum GA üretimi için sayısal çözümlemesi sonucunda elde edilen çözüm noktaları

5. SONUÇLAR

Şeker pancarı küspesi ve melasının substrat olarak kullanıldığı dolgulu kolon sisteminde *A. niger* ile GA üretiminin incelendiği deneysel çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Raimbault kolon sisteminin içerisinde tutulduğu su banyosu sıcaklığının GA üretiminde önemli bir parametre olduğu, en uygun ortam sıcaklığının merkez nokta civarında olduğu görülmüştür. Ortam sıcaklığının artırıldığı noktada (33 °C) GA üretiminin azaldığı, başlangıçta katı substrat ortamında su birikiminin olduğu sonrasında ise erlendeki suyun hızlıca tüketildiği görülmüştür. Düşük sıcaklık noktasında (27 °C) ise metabolik faaliyetlerin çok daha yavaş olduğu belirlenmiştir.
2. Kolon içerisinden beslenen steril hava hızının GA üretimindeki etkisinin incelenen aralık içerisinde seçilen sonuç değişkenlerinin çok etkilemediği belirlenmiştir. Bu durumda düşük hava hızlarının uygun ortamı sağlayamaması sonucu sporlaşma gözlemlenmiş, yüksek havalandırma hızlarında ise katı ortamın yığın şeklinde hareket etmesine neden olmuştur. Bu durum hava besleme hızlarında aşırı basınç düşmelerine ve sistemde hava kaçaklarının oluşmasına neden olmaktadır. Bazı deneylerde hava kanallarının oluşması gözlemlenmiştir.
3. Kolon içerisinde nem miktarı hava besleme hızı ve ortam sıcaklığı ile ilişkilidir. Seçilecek aralıklar daha dar olarak belirlenerek bahsedilen sorunlar aşılabılır.
4. Kolon içeriğindeki dolgu miktarı ortamda bulunan substrat miktarını, alıkonma süresini etkileyen önemli bir reaktör işletme parametresidir. Dolgu miktarındaki artış ile GA konsantrasyonu ve verim miktarı lineer olarak artmaktadır.
5. Şeker pancarı küspesinin boyutundaki azalma ile beklendiği gibi GA üretiminde artış gözlenmiştir. Ancak tanecik boyutunun azalması ile basınç düşüşündeki artıştan dolayı reaktörde sorunlar artmaktadır. Büyük tanecik boyutunda homojen bir reaktör içeriği sağlanmasına rağmen katı-sıvı arayüzeyindeki azalma GA üretiminde azalmaya neden olmaktadır.
6. Dolgu miktarındaki artış ve tanecik boyutundaki azalma ile GA üretiminde artma gözlenmektedir.
7. En yüksek GA konsantrasyonu (40 g/L) hava besleme hızının ve dolgu miktarının üst (0,5 L/sa, 10 g), tanecik boyutun alt (0,6 µm) ve ortam sıcaklığının merkez noktasında (29 °C) elde edilmiştir.

ÖNERİLER

Dolgulu kolon ile GA üretimin amaçlandığı deneysel çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında;

1. Hava besleme hızının daha dar bir aralıkta incelenmesi gereklidir. Bu şartlarda sporlaşma ve kanallaşma oluşmayacaktır ve reaktörde yaşanan sorunların seçilen sonuç değişkenine etkisi az olacaktır.
2. Kolon sıcaklığının ve besleme hızının yüksek olduğu şartlarda nemlendirme amacıyla tutulan steril su miktarı yetersiz kalmakta ve deney devam ederken steril su ilavesi yapılamamaktadır. Bu durum kolon içerisindeki şartların stabil olmamasına ve optimizasyon sonuçlarının etkilenmesine neden olmaktadır. Hava besleme hızındaki azalmaya ilaveten nemlendirme amacıyla kullanılan erlenin hacminin artırılması veya steril su ilavesi için tasarımın revize edilmesi uygun olacaktır.
3. Kolon boyutlarının bir parametre olarak tasarlanması gereklidir. Farklı yükseklik/çap oranları bağımsız bir değişken olarak planlanmalıdır.
4. Kolon içerisindeki metabolik aktivite sonrasında biyokütlenin etkisi ile kolon boyunca gerçekleşen basınç düşüşü hava besleme hızında değişimlere ve/veya sızmalara neden olabilmektedir. Gaz besleme hızının stabil olmasını sağlayacak akış kontrol üniteleri çalışmanın hassasiyeti için önemlidir.

KAYNAKLAR

- Aidoo, K.E., Hendry, R. & Wood, B.J.B. (1982). Adv. Appl. Microbial., 201-37.
- Ali, H.K.Q., Zulkali, M.M.D. (2011). Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 25, 255–266.
- Alpar, S.R. (1969). Organik Sınai Kimya, İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 1505, Kimya Fakültesi, No: 2, Şirketi Mürettibiye Basımevi, İstanbul.
- 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. (2003). Continuous gluconic acid production by isolated yeast like mould strains of Aureobasidium pullulans. Applied Microbiology and Biotechnology.
- 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. Biotechnology and Bioengineering.
- Anonim 1. <https://www.researchnester.com/reports/gluconic-acid-market/669> [Erişim tarihi: 10.03.2019].
- Anonim 2. <https://www.buffalobrewingstl.com/water-activity/experimental-systems-for-studying-kinetics.html> [Erişim tarihi: 15.05.2020].
- Arslanoğlu, H. (2008). Sitrik ve Fosforik Asitle Modifiye Edilen Şeker Pancarı Küspesinin Sulu Şerbetten Katyonların ve Renkli Maddelerin Giderilmesinde Kullanılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase – an overview, Biotechnol. Adv., 27, 489–501.
- Behera, S.S., Ray, R.C. (2017). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies, 657-658
- Bennett, J.W. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (Machida M, Gomi K, eds) Caister Academic Press, Portland, 1–17.
- Bernhauer, K. (1924). Zum Problem der Säurebildung durch *A. niger* (About the problem of acid formation by *A. niger*), Biochem. Z., 153, 517–521.
- Bernhauer, K., Skudrzyk I. (1940). Über die Darstellung von Diphenyl-dimethyl-polyenen, Journal für Praktische Chemie, 155, 310-316.
- Bhargava, S., Panda, B.P., Ali, M., Javed, S. (2007). Solid-state Fermentation: An Overview
- Bozok, O., Gökdağ, C., Oyman, E., Şendökmen, N., Taygun, N., ve Üçok, O. (1971). Şekerin Teknolojisi,
- Brakhage, A.A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. Current Drug Targets, 6, 875–886
- Brijwani, K., Oberoi H.S., Vadlani P.V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran Proc. Biochem., 45, 120-128.
- Bujak, P., Bartczak, P., Polanski, J. (2012). Highly efficient room-temperature oxidation of cyclohexene and D-glucose over nanogold Au/SiO₂ in water, J. Catal., 295, 15–21.

- Buzzini, P., Gabbbetti M., Rossi J., Ribaldi M. (1993). "Utilization of grape must and concentration rectified grape must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger*, in batch fermentation", *Biotechnol Lett.*, 15, 151–156.
- Ergul, B. (2013). *Infrared Vibrational Spectroscopy Analysis Of Selected Biomolecules*.
- Chen, H.Z., Xu, J., Li, Z.H. (2005). Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. *Biochemical Engineering Journal*, 23, 117–122
- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation Theory and Practice*
- Cho, Y.K., Bailey, J.E. (1977). Glucoamylase and glucose oxidase preparations and their combined application for the conversion of maltose to gluconic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 98-185.
- Curie 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.
- Córdova-López, J., Gutiérrez-Rojas, M., Huerta, S., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E. (1996). Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation.
- Çetinkaya, A. (2002). Şeker Pancarı Melasından Sitrik Asit Üretiminde Optimum Koşulların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 99.
- Davidzon, M., Alkan, N., Kobiler, I., Prusky, D. (2010). Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*, *Postharvest Biol. Technol.*
- De Cal, A., Sandin-Espana, P., Martinez, F., Egueen, B., Chien-Ming, C., Lee, M.H., Prusky, D. (2013). Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of *Monilinia fructicola* on peach fruit, *Postharvest Biol. Technol.*
- Wilt, H.G.J. (1972). Oxidation of glucose to gluconic acid. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*;11:370e8.
- Degelmann, P.P., Ehmig, G., Hofmann, H. (1982). *Zuckerindustrie* (Berlin), 107-117.
- Dronawat, S. N., Svihla C. K., Hanley T. R. (1995). The Effects of Agitation and Aeration on the Production of Gluconic Acid by *Aspergillus niger*.
- Dronnet, V.M., Renard, C.M.G.,C., Axelos, M.A.V. ve Thibault, J.F. (1997). Binding of divalent metal cations by sugar-beet pulp, *Carbohydrate Polymers*, 34, 73-82.
- Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 113–125
- El-naghy, M., Megalla S. (1975). Gluconic acid production by *Penicillium puberulum*. *Folia microbiology*.
- Fischer, K, Bipp H.P. (2005). Generation of organic acids and monosaccharides by hydrolytic and oxidative transformation of food processing residues. *Bioresour Technol.*, 96, 831–842.
- Franke, W. (1963). Zur Physiologie und enzymatischer Gluconsäuregärung durch *Aspergillus niger* (About physiology and enzymatic fermentation of gluconic acid by *Aspergillus niger*), *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg.*, 191, 194–200.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59, 1–10.

- Gibson, Q.H., Massey, V., Swoboda, B.E.P. (1964). Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase, J. Biol. Chem., 239, 3927–3934.
- Gibbons, W.R., Westby, C.A., Dobbs, T.L. (1984). A continuous, farm-scale, solid-phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1098–1107.
- Gibbons, W.R., Westby, C.A., Dobbs, T.L. (1986). Intermediate-scale, semicontinuous solid-phase fermentation process for production of fuel ethanol from sweet sorghum. Applied and Environmental Microbiology, 51, 115–122.
- Gölebatmaz, K., (2017). Şeker pancarı melasından *A. niger* kullanılarak glukonik asit üretimi.
- Hadas, Y., Goldberg, I., Pines, O., Prusky, D. (2007). Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples, Phytopathology.
- Hang, Y.D. and Woodams, E.E. (1984). Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, 6(11), 763-764.
- Hang, Y.D. and Woodams, E.E. (1998). Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 65(3), 251-253.
- Hamdy, H. S. (2013). Citric acid production by *Aspergillus niger* grown on orange peel medium fortified with cane molasses. Annals of microbiology, 63(1), 267-278.
- Hamrouni R., Carboue Q., Bombarda I., Molinet J., Neifar M., Dupuy N., Masmoudi A., Roussos S. (2017). Production of naphtho-gamma-pyrones by *Aspergillus niger* under solid-state-fermentation.
- Heinrich, M., Rehm, H.J. (1982). Formation of gluconic acid at low pH values by free and immobilized *Aspergillus niger* cells during citric acid fermentation, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 15, 88–92.
- Hustede, H., Benckiser, Joh. A., Haberstroh, H.J., Schinzig, E. (2005). Gluconic Acid.
- Hustede, H., Haberstroh, H.J., Schinzig, E. (2012). Gluconic acid Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. 17, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi.
- Ikeda Yuko, Park Enock Y., Okuda N. (2006). Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*, Bioresource Technology, 97, 1030–1035.
- Isabell, H.S., Frush, H.L., Bates, F.J. (1932). Manufacture of calcium gluconate by electrolytic oxidation of glucose. Industrial and Engineering Chemistry, 24, 375e8.
- Jackson, R.S. (2008). Wine Science: Principles and Applications, third ed., Academic press.
- Johnson, Matthey and Co., Ltd., GB 1 208 101, (1970) (G. J. K. Acres, A. E. R. Budd); Chem. Abstr. 74, 14 347 h.
- Kagaku, R., (1974), K. Co., Ltd., JP 7 330 618, (1973) (T. Nakagawa, Y. Murai, N. Kanai); Chem. Abstr. 80 71 052 f.
- Kapat, A., Jung, J.K., Park, Y.H. (2001). Enhancement of glucose oxidase production in batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*; Optimization of oxygen transfer condition, J. Appl. Microbiol., 90, 216–222.

- Kareem, S.O., Rahman, R.A. (2013). Utilization of banana peels for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 4(4), 384-387.
- König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 1–30
- Krijgsheld, P., Bleichrodt R., van Veluw G.J., Wang F., Müller W.H., Dijksterhuis J., Wösten H.A.B. (2013). *Filaments in Bioprocesses*.
- Kundu, P., Das A. (1984). Utilization of cheap carbohydrate sources for production of calcium gluconate by *Penicillium funiculosum* mutant MN 238, *Indian J Exp Biol*, 22, 279–281.
- Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A. (2003). Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, 38(12), 1731– 1738.
- Kumar, A., Kanwar S.S. (2012). Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.*, 6, 13-27.
- Larroche, C., Gros, J.B. (1997). Special transformation processes using fungal spores and immobilized cells, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 55, 179–220.
- Larroche, C., Sanroman, M.A., Du, G., Pandey, A. (2017). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Bioprocesses, Bioreactors and Controls*.
- Lee, H.W., Sato, S., Mukataka, S., Takahashi, J. (1987). Studies on the production of gluconic acid by *Aspergillus niger* under high dissolved oxygen concentration, *Hakkokogaku Kaishi*, 65, 501–506.
- Lockwood, L.B. (1979). Organic Acid Production. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 1 (Industrial Mycology), J.E. Smith, D.R. Berry (Eds.), Edward Arnold Ltd., London, UK;pp.140–157.
- Lu, F., Ping, K.K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z.J., Chu, J., Zhuang, Y.P. (2015). Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation, *Process Biochem.*, 50, 1342–1348.
- May, O.E., Herrick H.T., Moyer A.J., Wells P.A. (1934). Gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure, *Ind. Eng. Chem.*, 26, 575–578.
- McReady, R.M., 1966, Polysaccharides of sugar beet pulp: A review of their chemistry, *Journal of American Sugar Beet Technology*, 14, 261-270.
- Milsom, P., Meers, J.L. (1985). Gluconic and itaconic acids, in: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology: the Principles, Applications, and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture, and Medicine*.
- Mitchell, D., Berovic, M., Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: *New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 61–138.
- Mitchell, D.A., Berović, M., Krieger, N. (2006). *Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview*.
- Moreno, T., Kouzaki, G., Sasaki, M., Goto, M., Jose M. (2012). Cocero, Uncatalysed wet oxidation of D-glucose with hydrogen peroxide and its combination with hydrothermal electrolysis, *Carbohydr. Res.* 349,33–38.

- Motta, F.L., Santana, M.H.A. (2013). Solid-State Fermentation for Humic Acids Production by a *Trichoderma reesei* Strain Using an Oil Palm Empty Fruit Bunch as the Substrate.
- Moyer, A.J. (1940). Process for gluconic acid production (US patent No. 2 351 500), Chem. Abstr., 38, 53-60.
- Muhtar, S. (2000). *Aspergillus niger* Kullanılarak Melastan Sitrik Asit Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 73.
- Mukhopadhyay, R., Chatterjee S., Chatterjee B.P., Banerjee PC, Guha A.K. (2005). Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*, Int Dairy J, 15, 299–303.
- Murad, A., El-Holi Khalaf, S., Al-Delaimy, K.S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology, 2(10), 356-359.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-cook, C.M. (1995). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, John Wiley & Sons.
- Özer, A. (1995). Depektinize Edilmiş Şeker Pancarı Küspesinin Sulu Çözeltilerden Krom Adsorpsiyon Özellikleri, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Pal, P., Kumar, R., Banerjee, S. (2016). Manufacture of gluconic acid: a review towards process intensification for green production, Chem. Eng. Process., 104, 160–171.
- Pandey, A., Radhakrishnan, S. (1992). Packed-bed column bioreactor for production of enzyme.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Nigam, P. (2001). Solid-State Fermentation in Biotechnology Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, Inc. New Delhi, pp. 100– 221.
- Pandey, A., Ricardo, C., Larroche, B.C. (2008). Current Developments in Solid-state Fermentation.
- Pandey, A., Negi, S., Soccol, C. R. (2016). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products.
- Pawar, N.V., Patil, V.B., Kamble, S.S., Dixit, G. B. (2008). First Report of *Aspergillus niger* as a Plant Pathogen on *Zingiber officinale* from India. Plant Disease, 92, 1368– 1368.
- Petrucchioli M., Piccioni P., Fenice M., Federici F. (1994). Glucose oxidase, catalase and gluconic acid production by immobilized mycelium of *Penicillium variable P16*, Biotechnol. Lett., 16, 939–942.
- Pitt, J.I. (1994). The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. Journal of Medical and Veterinary Mycology 32 Suppl, 1, 17–32.
- Poltronieri, P., D'Urso, O. F., 2016, Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products The Food, Feed, Fibre, Fuel (4F) Economy, Chapter 7, 189-217.
- Prusky, D., McEvoy, J.L., Saftner, R., Conway, W.S., Jones, R. (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit, Phytopathology.
- Raimbault, M., Alazard, D. (1980). Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey A., and Larroche, C. (2006). Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production , Food Technol. Biotechnol.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey A., Larroche, C. (2007). Spores of *Aspergillus niger* as reservoir of glucose oxidase synthesized during solid-state fermentation and their use as catalyst in gluconic acid production.

- Rao D.S., Panda T. (1994). "Comparative analysis of different whole cell immobilized *Aspergillus niger* catalysts for gluconic acid fermentation using pretreated cane molasses", *Bioprocess Biosyst Eng* 11,209–212.
- Reuss, M., Frohlich, S., Kramer, B., Messerschmidt, K., Pommerening, G. (1986). Coupling of microbial kinetics and oxygen transfer for analysis and optimization of gluconic acid production with *Aspergillus niger*, *Bioprocess. Eng.* 1, 79–91.
- Rinsant, D., Chatel, G., Jerome, F. (2014). Efficient and selective oxidation of D-glucose into gluconic acid under low frequency ultrasonic irradiation, *Chemcatchem*, 3355–3359.
- Rodríguez, C.A.M., Santos-Duenas, 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.
- Roehr, M., Kubicek, C.P. (1996). *Biotechnology: Products of Primary Metabolism*, Second Edition, Chapter 10.
- Rogers, P., Chen, J.S., Zidwick, M.J. (2006). Organic acids and solvent production, Part I: Acetic, lactic, gluconic succinic and polyhydroxyalkanoic acids, in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*. Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology, vol 1, third ed., Springer, New York, pp. 511–755.
- Roussos, S., Raimbault, M., Prebois, J.P., Lonsane, B.K. (1993). Zymotis, a large-scale solid-state fermenter design and evaluation. *Appl Biochem Biotechnol.*, 42, 37–52.
- Roukas T, Harvey L. (1988). "The effect of pH on production of citric acid and gluconic acid from beet molasses using continuous culture". *Biotechnol Lett.*, 10, 295–300.
- Roukas T. (2000). Citric acid gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotech.*, 25, 298–304.
- Röper, H. (2002). Renewable raw materials in europe-industrial utilisation of starch and sugar, *Starch- Stärke*, 54, 89-99.
- 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.*, 67, 404–408.
- Sánchez, L.R., Khanahmadi, M., Mitchell, D. (2006) Continuous solid-state fermentation bioreactors. In: Mitchell, Berovič, D., Krieger, M., *Solid-State Fermentation Bioreactors*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 141–158.
- Sato, K., Sudo, S. (1999). Small scale solid state fermentations, *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 2, 61-63.
- Saucedo-Castañeda, G., Rojas, G.M., Bacquet, G., Raimbault, M., González, V.G. (1990). Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 802–808.
- Sawyer, D.T. (1964). Metal–gluconate complexes, *Chem. Rev.* 64.
- Schmid, R.D., Karube, I. (1988). Biosensors and Bioelectronics. In: *Biotechnology*, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp., 337–338.

- Sharma, A., Rajesh, V.V., Singh, P. (2007). Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support.
- Sharma, A., Vivekanand, V., Singh, R.P. (2008). Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support, *Bioresour. Technol.*, 99, 3444–3450.
- Singh, O.V., Pereira, B.M.J., Singh, R.P. (1999). Isolation and characterization of a potent fungal strain *Aspergillus niger* ORS-4 for gluconic acid production, *J. Sci. Ind. Res.*, 58, 594–600.
- Singh, O.V., Sharma, A., Singh, R.P. (2001). Gluconic acid production by *Aspergillus niger* mutant ORS-4.410 in submerged and solid state surface fermentation, *Indian J. Exp. Biol.*, 39, 691–696.
- Singh, O.V., Jain, R.K., Singh, R.P. (2003). Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*.
- Singh, O.V., Kapur, N., Singh, R.P. (2005). Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 519–524.
- Singhania, R.R., Kumar, P., Soccol, C. R., Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation.
- Soap Co, K. (1973). *DE-AS*, 2, 344-990.
- Soccol, C.R., Ferreira da Costa, E.S., Junior Letti, L.A., Karp, S.G., Woiciechowski, A. L., de Souza Vandenberghe, L. P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation.
- Spier, M.R., de Souza Vandenberghe, L.P., Medeiros A.B.P., and Soccol, C.R. (2011). Application of Different Types of Bioreactors in Bioprocesses.
- Steel, R., Maxon, W.D. (1962). Some effects of turbine size on novobiocin fermentations, *Biotechnol. Bioeng.*, 4, 231–240.
- Stubbs J.J., Lockwood L.B., Roe E.T., Tabenkin B., Ward G.E. (1940). “Ketogluconic acids from glucose”, *Ind. Eng. Chem.*, 32, 1626–1630.
- TŞFAŞ Yay. Sayı: 168, Ajans Türk Mat. San., Ankara.
- Tuik, (2008). Seçilmiş maddelerin dış ticaret bilgileri (Melas ve Sitrik Asit ile türevleri).
- Udupa et al., H.V.K. (1974). *Proc. Semin. Elektrochem.* 14th 79. R. Ohme, P. Kimmerl, DD, 104-779.
- Vandenberghe, L.P.S., Soccol Carlos R., Pandey, A., Lebeault, J.-M., 1999, Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*.
- Varzakas, T.H., Roussos, S., Arvanitoyannis, I.S. (2008). Glucoamylases production of *Aspergillus niger* in solid state fermentation using a continuous counter-current reactor. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1159–1168.
- Vassilev N., Vassileva M.C., Spassova D.I. (1993). “Production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 39, 285–288.
- Vilanova, L., Vinas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixido, N. (2014). Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*, *Int. J. Food Microbiol.*
- Vogel, M. (1991). Alternative utilization of sugar beet pulp, *Zuckerindustrie*, 116, 266-270.

- Weber FJ, Tramper J, Rinzema A. (1999). A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotechnol Bioeng.*, 65, 447–58.
- Wells P.A., Moyer A.J., Stubbs J.J., Herrick H.T., May O.E. (1937).“Gluconic acid production Effect of pressure, air flow, and agitation on gluconic acid production by submerged mold growths”, *Ind. Eng. Chem.*, 29, 635–656.
- Williams, J.P., Hallsworth, J.E. (2009). Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function. *Environmental Microbiology* 11, 3292–3308.
- Witteveen, C.F.B., Veenhuis, M., Visser, J. (1992). Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1190–1194.
- Yaşar, M.M. (2003). Şeker teknolojisi.
- Zhang H., Zhang J. (2016).“High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification”, *Bioresource Technology*, 203, 2011-2019.
- 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

Gülcan SÜTSATAN

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri : Osmaniye
Doğum Yılı : 11/09/1994
Uyruğu : TC
E-posta : glcn4294@ gmail.com
Yabancı Diller : İngilizce

ARAŞTIRMACI BİLGİLERİ

Öğrenci Orcid ID : 0000-0003-2373-7964
Danışman Orcid ID : 0000-0001-6456-1593

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 2012-2017
Lise : Şehit Binbaşı Adil Karagöz Anadolu Lisesi, Osmaniye, 2008-2012

AKADEMİK FAALİYETLER

Projeler:

1. Farklı Neem Yağı Dozlarının (Neemix 4.5) *Oenopia conglobata* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Coccinellidae), *Anthocoris minki* Dohrn, 1860 (Hemiptera: Anthocoridae) ve *Orius laevigatus* Fiere (Hemiptera: Antrecoco: Anthocoridae) Üzerine Etkilerinin Araştırılması
2. Glukonik Asit Üretim Yolağı Aktifleştirilmiş ve Endojenik Oksijen Kaynağı Sağlanmış Rekombinant Suşlar Kullanılarak Glukonik asit Üretimi (TUBİTAK 117R003)