



**ŞEKER PANCARI MELASINDAN *A.niger* KULLANILARAK
GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ**

Kübra GÖLEBATMAZ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN**

OCAK-2017

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

**ŞEKER PANCARI MELASINDAN *A.niger* KULLANILARAK
GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra GÖLEBATMAZ

(132132103)

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 20.12.2016
Tezin Savunulduğu Tarih: 05.01.2017**

Tez Danışman: Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN

Diğer Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Mehmet KALENDER

Doç. Dr. Mehmet YÜCEER

ELAZIĞ-2017

TEŞEKKÜR

Bu tez konusu TÜBİTAK tarafından 2210-C programı ile desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar FÜBAP M.F.16.17 nolu proje ile yürütülmüştür.

Mesleki gelişim için bir ara basamak sayılan yüksek lisans eğitiminin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Mesleğimi öğrenmek ve insanlığa faydalı olmak adına önümde aşmam gereken pek çok engel olduğunun da farkında olarak;

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, tez süresi boyunca değerli bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen, ahlaki ve insani değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve kullandığı her bir cümlemin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen ve değerli fikirlerini paylaştan sayın hocam Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok sevgili aileme teşekkür ederim.

Biz gençlere güvenip cumhuriyetimizi emanet ettiği, çağdaş, hür bir ülke bıraktığı için ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK' e sonsuz teşekkür ederim.

Kübra GÖLEBATMAZ
ELAZIĞ-2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GLUKONİK ASİT HAKKINDA GENEL BİLGİ.....	5
2.1. Glukonik Asidin Kullanım Alanları.....	6
Kalsiyum Glukonat.....	8
Sodyum Glukonat.....	9
Potasyum Glukonat.....	10
Mangan Glukonat.....	10
2.2. Glukonik Asit Üretimi.....	12
2.2.1. Kimyasal Kataliz Yöntemi ile Glukonik Asit Üretimi.....	12
2.2.2. Enzimatik Kataliz Yöntemi ile Glukonik Asit Üretimi.....	13
2.2.3. Mikrobiyal Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi.....	15
Funguslar ile Glukonik Asit Üretimi.....	16
Bakteriler ile Glukonik Asit Üretimi.....	19
2.3. Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Fermantasyon Çeşitleri ve Sistemleri.....	22
2.3.1. Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Fermantasyon Çeşitleri.....	22
Kıatı Hal Fermantasyonu.....	22
Yarı Kıatı Hal Fermantasyon.....	23
Derin Fermantasyon.....	24
İmmobilize Hücre Fermantasyonu.....	24
2.3.2. Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Fermanatsyon Sistemleri.....	25

Kesikli Sistem	25
Yarı kesikli Sistem	25
Sürekli Sistem	27
2.4. Glukonik Asit Fermantasyon Prosesinin Değerlendirilmesi	28
2.4.1. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	28
2.4.2. İz Elementlerin Etkisi.....	28
2.4.3. Oksijenin Etkisi	29
2.4.4. pH'nın Etkisi	30
2.4.5. Sıcaklığın Etkisi	31
2.5. Fermantasyon Ortamından Glukonik Asitin Kazanımı.....	31
3. ŞEKER PANCARI MELASI VE KÜSPESİ HAKKINDA GENEL BİLGİ.....	33
3.1. Pancardan Şeker Üretimi.....	34
3.2. Küspe.....	36
3.3. Melas.....	37
4. GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ KONUSUNDA YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR.....	39
5. MATERYAL VE METOT.....	52
5.1. Materyaller.....	52
5.2. Mikroorganizmanın in vitro kültürü	53
5.3.Ön Denemeler	53
5.4. Glukonik Asit Üretiminin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım	55
5.5. Deneylerin Yapılışı	57
5.5.1. Derin Fermantasyon Deneyleri.....	57
5.5.2. Yarı Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri	58
5.5.3. Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri	58
5.6. Analiz Yöntemleri.....	59
5.6.1. Melasa İlişkin Analizler.....	59
5.6.2. Küspeye İlişkin Analizler	60
5.6.3. Çözeltilerde Sakkaroz ve İndirgen Şeker Tayini	61
5.6.4. Glukonik, Sitrik ve Oksalik Asit Analizleri.....	62
6. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	63

6.1. Ön Deneme Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	64
6.2. Deneysel Tasarım Sonuçları.....	68
6.2.1. Derin Fermantasyon Çalışmaları.....	68
6.2.2. Yarı Katı Hal Fermantasyon Çalışmaları.....	75
6.2.3. Katı Hal Fermantasyon Çalışmaları.....	81
6.3. Küspe Partikül Boyutunun Etkisi.....	87
6.3.1. Yarı Katı Hal Fermantasyonuna Küspe Partikül Boyutunun Etkisi.....	88
6.3.2. Katı Hal Fermantasyonuna Küspe Partikül Boyutunun Etkisi.....	88
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	92
8. KAYNAKLAR.....	95
9.EKLER.....	105
10. ÖZGEÇMİŞ.....	119

ÖZET

Bu çalışmada pancardan şeker üretimi sırasında bir yan ürün olarak elde edilen melastan *A.niger* kullanılarak fermantasyonla glukonik asit üretimi araştırılmıştır. Glukonik asit üretimi amacıyla derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon yöntemleri için deneysel şartlar, cevap yüzey yöntemi (CYY) ve merkezi kompozit dizayn (MKD) tekniği kullanılarak optimize edilmiştir. Derin fermantasyonla glukonik asit üretimi için optimum şartlar, 257,8 g/L melas konsantrasyonu, 30 g/L CaCO_3 miktarı, 31,8 °C sıcaklık ve 135,2 d/dk çalkalama hızı olarak belirlenmiş olup bu şartlarda elde edilen maksimum glukonik asit konsantrasyonu 192 saatlik bir fermantasyonla 58,76 g/L'dir. Yarı katı hal fermantasyonu için optimum şartlar 245 g/L melas konsantrasyonu, 15,5 g/L küspe miktarı, 30 g/L CaCO_3 miktarı, 30,2 °C sıcaklık ve 145,7 d/dk çalkalama hızı olup, elde edilen maksimum glukonik asit konsantrasyonu 74,64 g/L'dir. Katı hal fermantasyonunda ise optimum şartlar 0,18 melas kesri, 0,22 küspe kesri, 0,03 CaCO_3 kesri ve 30,9 °C sıcaklık olup, bu şartlarda maksimum glukonik asit üretimi 9 gün sonunda 0,262 g/g salt katı madde'dir. Her üç fermantasyon biçiminde glukonik asit oluşumuna eşlik eden önemli seviyede sitrik ve oksalik asit oluşumunun da var olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, ayrıca yarı katı hal ve katı hal fermantasyonunda kullanılan küспенin partikül boyutunun glukonik asit üretimine etkisi de incelenmiş ve azalan küspe boyutuyla üretimin bir miktar arttığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Şeker Pancarı, Melas, Küspe, Glukonik Asit, *A. niger*, Fermantasyon

ABSTRACT

Gluconic Acid Production from Sugar Beet Molasses by Using *A. niger*

In this study, gluconic acid production by fermentation has been investigated from molasses which is obtained as a by-product during sugar production from beet by using *A. niger*. The experimental conditions have been optimized for gluconic acid production by deep, semi solid state and solid state fermentation routes by using Response Surface Methodology (RSM) and Central Composite Design (CCD) technique. The optimum conditions for gluconic acid production by deep fermentation were determined as 257.8 g/L of molasses concentration, 30 g/L of CaCO_3 amount, 31.8 °C of temperature and 135.2 rpm of shaking speed and the maximum gluconic acid concentration was obtained as 58.76 g/L under this conditions for 192 h of fermentation period. The optimum conditions for semi solid state fermentation were determined as 245 g/L of molasses concentration, 15.5 g/L beet pulp amount, 30 g/L CaCO_3 amount, 30.2 °C of temperature and 145.7 rpm of shaking speed and the maximum gluconic acid concentration was 74.64 g/L under these conditions at the end of 192th hour of fermentation period. For the solid state fermentation, maximum gluconic acid production was obtained as 0.262 g/g absolute solid substrate at the end of 9-day fermentation period under the conditions of 0.18 of molasses ratio, 0.22 of beet pulp ratio, 0.03 of CaCO_3 ratio and 30.9 °C of temperature. It has been determined that citric and oxalic acid productions together with gluconic acid are being occurred in the significant levels for all three fermentation shapes. It was also investigated that the effect of beet pulp particle size on the gluconic acid production by semi solid and solid state fermentation and it was determined that the production increases in a moderate extent by the decreasing of particle size.

Keywords: Sugar Beet, Molasses, Pulp, Gluconic Acid, *A. niger*, Fermentation

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Glukonik Asidin Bazı Karakteristik Özellikleri	5
Tablo 2.2. Glukonik Asit ve Türevlerinin Kullanım Alanları	8
Tablo 2.3. Glukonik Asit ve Türevlerinin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanımı	9
Tablo 2.4. Glukonik Asit ve Türevlerinin Dünya Çapında Endüstriyel Alanlarda ki Tüketim Oranları	11
Tablo 2.5. Glukonik Asidin Yıllara Göre Küresel Pazar Büyüklüğü	11
Tablo 2.6. GA ve Türevlerine Duyulan Yıllık İhtiyaç	11
Tablo 2.7. Glukonik Asit ve Türevlerinin Piyasa Değerleri	12
Tablo 3.1. Dünya Şeker Üretimi	33
Tablo 3.2. Şeker Pancarının Kimyasal Bileşimi	34
Tablo 3.3. Pancar ve Kamış Melası İçerikleri.....	38
Tablo 4.1. Mikrobiyal Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Karbon Kaynakları	44
Tablo.4. 2. Kesikli Kültür ile Glukonik Asit Üretimine Dair Bazı Çalışmaları.....	51
Tablo 5.1. PDA Besi Yeri Bileşimi	54
Tablo 5.2. Besiyeri-1	54
Tablo 5.3. Besiyeri-2	55
Tablo 5.4. Besiyeri-3	55
Tablo 5.5. Derin Fermantasyon için Belirlenen Değişkenler ve MKD ile İncelenen Değer Aralıkları.....	56
Tablo 5.6. Yarı Katı Hal Fermantasyonu için Değişkenlerin Değer Aralıkları	56
Tablo 5.7. Katı Hal Fermantasyonu için Değişkenlerin Değer Aralıkları	57
Tablo 6.1. Çalışmada kullanılan Şeker Pancarı Melası ve Küspesinin Analiz Sonuçları.....	63
Tablo 6.2. Derin Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi için Oluşturulan MKD Dizayn Matrisi ve Elde Edilen Glukonik Asit Konsantrasyonları	69
Tablo 6.3. <i>A. niger</i> ile Melastan Derin Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler	70
Tablo 6.4. <i>A. niger</i> ile Melastan Derin Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları	70

Tablo 6.5. Yarı Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Oluşturulan MKD Dizayn Matrisi ve Elde Edilen Glukonik Asit Konsantrasyonları	76
Tablo 6.6. <i>A. niger</i> ile Melastan Yarı Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler	77
Tablo 6.7. <i>A. niger</i> İle Melastan Yarı Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları.....	77
Tablo 6.8. Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Oluşturulan MKD Dizayn Matrisi ve Elde Edilen Glukonik Asit Konsantrasyonları	83
Tablo 6.9. <i>A. niger</i> İle Melastan Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler	84
Tablo 6.10. <i>A. niger</i> İle Melastan Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları.....	84

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Glukonik asitin sulu çözeltideki laktonları ve kimyasal GA eşitliği	7
Şekil 2.2. Glukonik asit tuzlarının yapıları	7
Şekil 2.3. Glukozun enzimatik yöntem ile glukonik asit üretim yolağı	15
Şekil 2.4. Glukozdan glukoz oksidaz aracılığıyla glukonik asit üretim aşamaları.....	18
Şekil 2.5. <i>A. niger</i> ile glukozdan glukonik asit üretim yolağı	18
Şekil 2.6. Glukoz dehidrogenaz enzimi ile glukonik asit üretim basamakları	21
Şekil 2.7. <i>Gluconobacter</i> 'de glukonik asit üretim yolağı	22
Şekil 2.8. Fermantasyon Sistemleri.....	26
Şekil. 2.9. Kesikli-beslemeli prosesde zamana bağlı biyokütle konsantrasyon değişimi	27
Şekil 3.1. Şeker üretim prosesi	36
Şekil 3.2. Küspenini kimyasal yapısı	37
Şekil 4.1. Elektro katalitik reaktör sistemi	40
Şekil 4.2. Selülozdan hidroliz ve oksidasyon işlemleriyle glukonik asit eldesi.....	41
Şekil 4.3. Pt / AC-SO ₃ H katalizörü ile nişastanın glukonik aside dönüştürülmesi	41
Şekil 4.4. Aktif karbon destekli altın katalizörü ile sellebiyozların glukonik aside dönüşümü	42
Şekil 4.5. Sellebiyozların glukonik aside oksidatif dönüşümünün kinetik modeli	42
Şekil 4.6. Harici hava kaldırmalı kabarcık kolon.....	51
Şekil 6.1. <i>A. niger</i> 'in farklı besi yeri ortamlarında glukonik asit üretimi gerçekleştirmesine yönelik ön deneme sonuçları	64
Şekil 6.2. Karşılaştırmalı olarak Besi Yeri-2 ve melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi ön deneme sonuçları.....	65
Şekil 6.3. Melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi üzerine melas konsantrasyonunun etkisinin incelendiği ön deneme sonuçları.	66
Şekil 6.4. Melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisinin incelendiği ön deneme sonuçları	68
Şekil 6.5. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından derin fermantasyonla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum.....	71

Şekil 6.6. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından derin fermantasyonla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri	72
Şekil 6.7. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından derin fermantasyonla glukonik asit üretimi için önerilen modelden maksimum üretim şartlarındaki çözüm noktası için elde edilen süreye bağlı deney sonuçları	74
Şekil 6.8. <i>A.niger</i> 'de glukonik asit, oksalik asit ve sitrik asit üretiminin metabolik yolağı.....	74
Şekil 6.9. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum	78
Şekil 6.10. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri.....	79
Şekil 6.11. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonla glukonik asit üretimi için önerilen modelden maksimum üretim şartlarındaki çözüm noktası için elde edilen süreye bağlı deney sonuçları.....	81
Şekil 6.12. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum	85
Şekil 6.13. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri.....	86
Şekil 6.14. <i>A. niger</i> ile şeker pancarı melasından katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi için önerilen modelden maksimum üretim şartlarındaki çözüm noktası için elde edilen süreye bağlı deney sonuçları.....	87
Şekil 6.15. <i>A niger</i> ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi üzerine küspe partikül büyüklüğünün etkis	89
Şekil 6.16. <i>A niger</i> ile şeker pancarı melasından katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi üzerine küspe partikül büyüklüğünün etkisi	90

1. GİRİŞ

$C_6H_{12}O_7$ kapalı formülüne sahip olan glukonik asit, esasen glukozun oksidasyonu neticesinde oluşmaktadır. Doğal olarak insanlarda, bitkilerde ve diğer organizmalarda bulunmasının yanı sıra meyve, fermante çaylar, şarap (% 0,25), bal (% 1), et gibi doğal kaynaklarda da bulunduğu bilinmektedir İnsanlarda, glukozun metabolize edilmesi ile günlük 25-30 gr glukonik asit üretimi doğal olarak gerçekleşmektedir (Initial Assessment Report For SIAM 18, 2004). Alkali çözeltilerde iki ve üç değerlikli metal iyonlarıyla birlikte bulunan glukonik asit, sulu çözeltilerde ortamda bulunan metal iyonlarının etkisiyle glukonat iyonu oluşturmaktadır.

Ticari olarak en fazla üretilen üçüncü organik asit olan glukonik asit başta çimento endüstrisi olmak üzere, gıda, tekstil, farmasötik, deterjan gibi endüstrilerde kullanılmaktadır. Dünya genelinde her yıl ortalama 100,000 ton glukonik asit ihtiyacı vardır. Ülkemiz ne yazık ki glukonik asit üretimini gerçekleştirmemekte, bu ihtiyacını ithalat yöntemiyle karşılamaktadır. Bir araştırma firması olan Orbis Research ile yapılan görüşme neticesinde, Türkiye'nin 2015 yılında glukonik aside duyduğu ihtiyaç 1800 ton iken 2016 yılı başında bu talebin % 8'lik bir artış ile 1950 tona ulaştığı aktarılmıştır. Ülkemiz glukonik asit ve türevlerine her yıl ortalama 10 milyon \$ harcamaktadır. 2014 verilerine göre bu rakamın 13,9 milyon \$ olduğu bilinmektedir. Gelişen teknoloji ve büyüyen endüstrileşme neticesinde artan nüfusa paralel olarak glukonik aside duyulan talebin zamanla artacağı bir gerçektir. Glukonik asidin, çok yeni olmamakla birlikte 2004 piyasa verilerine bakacak olursak, bu organik asidin en fazla inşaat ve gıda endüstrisi tarafından talep gördüğü, bununla birlikte bu endüstrilerde birim fiyatın ortalama 3 \$/kg olduğu görülmüştür. İhtiyaç duyulan endüstrilere göre uygulanan saflaştırma prosesleri neticesinde bu rakam 8 \$/kg'a kadar çıkmaktadır. Glukonik asit üretiminin yaklaşık % 85'i, çoğu ilaç endüstrisinde kullanılan glukonat formundadır.

Mevcut glukonik asit üretim yöntemlerini göz önünde bulundurduğumuzda temel olarak kimyasal ve enzimatik kataliz olarak iki ana başlık altında inceleyebiliriz. Kimyasal glukonik asit üretimi endüstriyel amaçla kullanılmamakla birlikte ürün verimi % 80 civarındadır. Alkali koşullarda gerçekleştirilen kimyasal kataliz prosesinde, glukoz içeren ortama uygun bir katalizörün eklenmesiyle oksidasyon işlemi gerçekleşir. Çözeltiye oksijen, ozon, hidrojen peroksit gibi oksidantların ilavesi ve 3-10 bar basınç altında oksidantların taşınması ile proses tamamlanır.

Enzimatik kataliz ile glukonik asit proseslerinde, enzim direk olarak ortama katılarak üretim gerçekleştirilebileceği gibi mikroorganizmalar vasıtasıyla ortama salgılanan enzimler aracılığıyla da üretim gerçekleştirilebilir. Biyoteknolojik üretim yöntemleri dışındaki yöntemlerde istenmeyen yan ürünlerin oluşması, ürün izolasyonu, işletme maliyeti, katalizör stabilizasyonu ve saflaştırma işlemlerindeki güçlükler nedeniyle endüstriyel olarak üretim ağırlıklı olarak (% 60) mikrobiyal fermentasyonla gerçekleştirilmektedir. Biyoteknolojik işlemler, yüksek glukonik asit verimi (% 90), ılımlı çalışma şartları, düşük enerji gereksinimleri, az miktarda yan ürün oluşması ve çevresel açıdan zararsız atıklar oluşturması tercih nedenleridir. Mikrobiyal fermentasyonu fungal ve bakteriyel glukonik asit üretimi olarak ikiye ayırmamız mümkündür. Endüstriyel ölçekte funguslarla glukonik asit üretimi genellikle *Aspergillus niger* küfü kullanılarak derin fermentasyon tekniği ile yarı kesikli sistemde gerçekleştirilmektedir. *A. niger* glukonik asit üretimi için gerekli temel enzimleri (glukoz oksidaz ve katalaz) bünyesinde bulundurmaktadır.

Funguslarla glukonik asit üretiminde ortam pH'sının ve kullanılabilir oksijen miktarının iki önemli parametre olduğu bilinmektedir. Glukonik asit üretimi, oksidasyonu sağlayan glukoz oksidaz enziminin etkinliği ile doğrudan ilişkilidir. Reaksiyon sonucu asidik ürün artışı gerçekleşir ve nötralize edici madde ilavesi (kalsiyum karbonat, sodyum hidroksit vb.) ile ortam nötralize edilir. Aksi halde asitliğin artmasıyla glukonik asit üretimi için gerekli olan glukoz oksidaz enzimi inaktif hale gelerek oksidasyon mekanizması bloke olur. Mantarlarla glukonik asit üretimi, yüksek miktarda çözünmüş oksijen gereksinimi duyulan aerobik bir fermentasyon prosesidir. Oksijen ihtiyacı hem fungusların gelişimi için hem de glukozun glukonik aside biyodönüşümü için önem arz etmektedir. *A. niger* suşunun kullanıldığı proseslerde ortamın % 90 hava doygunluğuna ulaşması gerektiği bilinmektedir. Saf oksijen beslenerek glukonik asit üretim hızının hava beslemesine göre 4 kat daha fazla olmasının yanı sıra (Ikeda vd., 2006) büyüme hızında da yaklaşık 1,5 kat artış olduğu bilinmektedir (Bankar vd., 2009).

Bakterilerde glukonik asit üretimi funguslardan farklı olarak glukoz dehidrogenaz enzimi ile gerçekleşir. Funguslarda olduğu gibi glukozun oksidasyonu büyük ölçüde ortam pH'sına bağlıdır (Velizarov vd., 1998; Olijve vd., 1979). Fungusların aksine bakteriyel üretimde ortam pH'sının asidik olması istenir. Endüstriyel üretimlerde pH 3,5-4,0 değerlerinde glukozdan glukonik aside dönüşüm daha yüksektir (yaklaşık % 87). Optimal

endüstriyel koşullar altında, *Gluconobacter oxydans*'ın pH, glukoz konsantrasyonu ve havalandırma derecesine belirgin derecede bağlı olarak, glukonik asit verimlerinin ortalama %75-80 (Ramachandran vd., 2017) arasında olmasına rağmen, oksoglukonik asitlere yol açan ikincil reaksiyonlar oluşturması nedeniyle, bakteriyel glukonik asidin endüstriyel ölçekteki üretim başarısı sınırlıdır (Ramachandran vd., 2006).

Herhangi bir fermantasyon endüstrisinin düzenli çalışması, büyük ölçüde üretim maliyetine bağlıdır ve bu da hammadde seçimi ile ilişkilidir. Mikrobiyal fermantasyon prosesleri ile enzim ve organik asit üretimlerinde tarımsal ve endüstriyel atıklar ile yan ürünler substrat olarak değerlendirilmektedir. Tarım ülkesi olan Türkiye'de sakkaroz esaslı şeker üretimi pancardan sağlanmaktadır. Ülkemiz pancar şekeri üreten ülkeler arasında dünyada dördüncü, Avrupa'da ise Almanya ve Fransa'dan sonra gelen üçüncü ülkedir. Şeker fabrikasyonu sırasında elde edilen şeker oranı yüksek melas ve küspe gibi yan ürünlerin fermantasyon ve yem sanayinin önemli girdileri olması nedeniyle, pancar tarımının ülke ekonomisi açısından büyük öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

Türkiye'de endüstriyel boyutta glukonik asit üretiminin gerçekleştirilmemesi ve önemli bir sanayi prosesi olan şeker üretimi sırasında oluşan melasın bu amaç için daha önce kullanılmamış olma fikri ile yola çıkılan bu çalışmanın, ülkemiz için önemli bir katma değer oluşturabilecek nitelikte olduğu söylenebilir. Endüstriyel üretimlerde sıklıkla kullanılan *A.niger* suşu, bu tez çalışması kapsamında kullanılan mikroorganizma olarak seçilmiştir.

Zengin bir enzim kaynağı olan *A. niger*, glukonik asit üretimi için gerekli olan glukoz oksidaz ve katalaz enzimleri dışında bir takım enzimleri de bünyesinde barındırmaktadır. Örneğin sahip olduğu invertaz enzimi sayesinde sakkarozu metabolize ederek glukoz ve fruktoza parçalanmayı gerçekleştirebilir. Karbon kaynağı olarak kullanılan melasın neredeyse tüm şeker içeriğinin sakkaroz olduğu düşünüldüğünde, *A. niger*'in sahip olduğu bu enzim bizim için melasa uygulanacak ön hidroliz aşamaları gereksinimini ortadan kaldırmıştır. Ayrıca *A. niger* suşunun tüm karbon kaynakları içerisinde üretim yeteneğine baktığımızda, glukoz oksidaz enzim salınımının temel iki karbon kaynağı olan glukoz ve sakkarozda önemli seviyelerde gerçekleştiği bilinmektedir (Hatzinikolaou ve Macris, 1995). Glukozun (saf halde veya mikroorganizma içerisindeki invertaz enzimi ile sakkaroz hidrolizinin bir ürünü olarak) glukoz oksidaz geni için temel bir uyarıcısı olduğu söylenebilir.

A. niger, sahip olduğu diğerk bir enzim olan glukoz izomeraz (ksiloz izomeraz) sayesinde glukozun fruktoza dönüşümünü sağlayabilir. Fosfofruktokinaz enzimi ile düşük pH değerlerinde ve Mn^{+2} iyonlarının varlığında sitrik asit döngüsünü (Krep çemberi) aktif kılarak sitrik asit üretimini gerçekleştirir. Ayrıca, önemli olduğunu düşündüğümüz diğerk bir enzim olan oksaloasetat asetilhidrolaz enzimi sayesinde yüksek pH değerlerinde (6 ve yukarısı) çeşitli karbon kaynaklarında oksalik asit üretimini gerçekleştirebilir. Oksalik asit esasen toksik etki göstermesi ve istenen ürün verimliliğini azaltması gibi nedenlerden dolayı istenmeyen bir yan ürün olarak da nitelendirilebilir.

Bu çalışmada *A. niger* suşu kullanılarak glukonik asit üretimini gerçekleştirmek için kesikli sistemde derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon tekniklerinin glukonik asit üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada temel substrat ortamı olarak melas, katı destek materyali olarak yine bir başka şeker üretim fabrikasyon çıktısı olan küspe kullanılmıştır. Cevap Yüzey Yöntemi ile ortam şartlarının optimizasyonu sağlanarak maksimum glukonik asit üretim noktaları tespit edilmiştir. Ayrıca glukonik asit prosesi sırasında meydana gelen oksalik asit, sitrik asit ile glukoz, fruktoz ve sakkaroz konsantrasyonlarında ki değişim takip edilmiştir. Laboratuvar ölçeğinde tasarlanan bu çalışmadan elde edilen bulguların, büyük ölçekli sistemlerin tasarlanması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

2. GLUKONİK ASİT HAKKINDA GENEL BİLGİ

Glukonik asit ($C_6H_{12}O_7$) aldonik asit ailesine bağlı bir şeker asididir. Glukozun oksidasyonu sonucu oluşan bu asit, doğal olarak insanlarda, bitkilerde ve diğer organizmalarda bulunmasının yanı sıra meyve, fermante çaylar, şarap (% 0,25), bal (% 1), et gibi doğal kaynaklarda da bulunduğu bilinmektedir (Ramachandran vd., 2006). Glukonik asidin (GA) genel karakteristik özellikleri Tablo 2.1’de verilmiştir. Uçucu ve aşındırıcı olmayan glukonik asit, aynı zamanda kostik ve toksik etkiler göstermeyen hafif bir organik asittir. Su ve alkolde çözünmesinin yanı sıra, biyolojik olarak kolayca parçalanabilir ve hafif asidik tadı ile neredeyse renksiz olan açık kahverengi şurubumsu bir sıvıdır.

Konsantre glukonik asit çözeltisi nötr glukono delta lakton (GDL) içerir. Oda sıcaklığında bulunan % 50’lik glukonik asit çözeltisi yaklaşık % 5 oranında GDL içermektedir (Anonim1). Glukonik asidin Şekil 2.1’de gösterildiği gibi mevcut 2 laktonu bulunmaktadır. Bunlar hem katı formda, hem de sulu çözeltide birbirleriyle ve serbest asit ile denge halinde bulunurlar. 1,5-lakton hafif tatlımsı bir tada sahip beyaz kristal bir madde iken, 1,4-lakton küçük iğnesel görünümlü kristalize bir maddedir.

Tablo 2.1. Glukonik Asidin Bazı Karakteristik Özellikleri (Hustede vd., 1989)

Doğası	Aşındırıcı değildir. Az tahriş edici, kokusuzdur. Kolayca biyolojik olarak parçalanabilen uçucu olmayan organik asittir.
Molekül ağırlığı, g/gmol	196,16
Kimyasal formülü	$C_6H_{12}O_7$
pKa	3,7
Erime noktası (% 50’lik çözelti)	12 °C den daha düşük
Kaynama noktası (% 50’lik çözelti)	100 °C den daha yüksek
Yoğunluk (% 50’lik çözelti)	1,24 g/mL
Görünüş	Açık kahverengi sıvı
Çözünürlük	Suda ve alkolde çözünür
Tadı	Hafif asidik, yumuşak ve ferahlatıcı

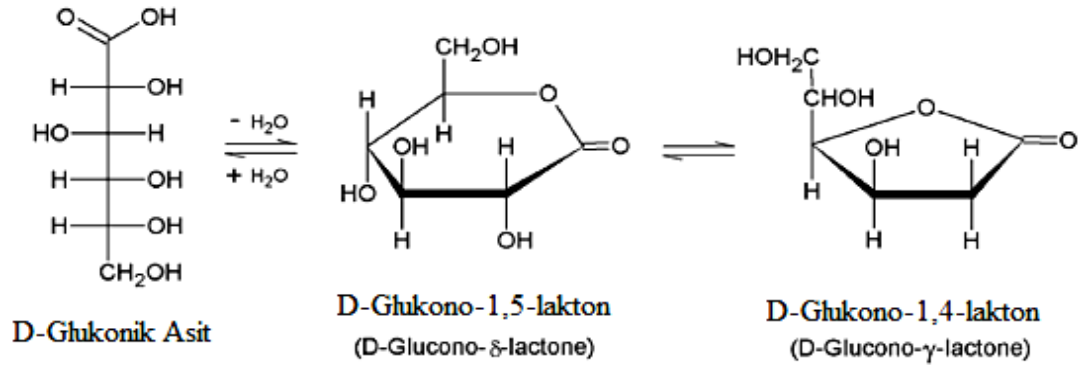
Glukonik asidin altı fonksiyonel grubu esasen alkoller, asitler gibi çeşitli reaktif maddelerle tepkimeye girebilir. Bununla birlikte, elde edilen türevleri reaksiyonu tamamlamak için kararlı olma eğilimi gösterirler. Kısmi reaksiyonlar hidrolize duyarlı olan ve üniform olmayan karışımlara yol açar. Bu tür reaksiyonlar çok az öneme sahiptir (Hustede vd., 1989).

Glukonik asit, alkali çözeltilerde iki ve üç değerlikli metal iyonlarıyla birlikte bulunur. GA sulu çözeltilerde glukonat iyonu oluşturur ve tuzları da glukonatlar olarak anılır. Bunlar açık kimyasal yapıları Şekil 2.2’de verilmiş olan, kalsiyum glukonat (A), ferro glukonat (B), bakır glukonat (C), çinko glukonat (D), mangan glukonat (E) ve sodyum glukonattır (F) (Brookes ve Neville, 2005). Glukonik asit mevcut piyasada %50 sulu çözelti formunda bulunurken, glukonatlar ve glukono-lakton formları %97-103 saflıkta bulunmaktadır. Glukonik asit, glukonat tuzları ve glukonat esterleri, glukozun oksidasyonu sonucu oluştukları için doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Henk, 1972).

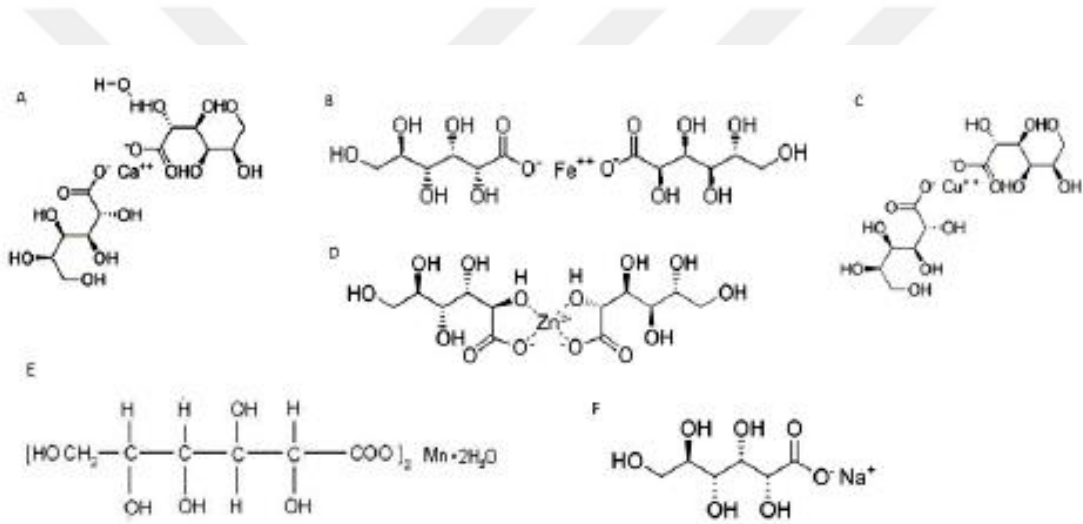
2.1. Glukonik Asidin Kullanım Alanları

Glukonik asit sahip olduğu önemli karakteristik özellikleri nedeniyle çoğu endüstride kullanımı mevcuttur. Örneğin metal veya metal olmayan yüzeylerde reaksiyon oluşturmaksızın suda çözünebilir formda olması nedeniyle, metal kaplamalarda ve metallerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Multifonksiyonel bir organik asit olan glukonik asidin, tuzlarının (özellikle sodyum glukonat) ve laktonlarının, fizyolojik ve kimyasal karakteristikleri ve sahip oldukları hidroksil ve karboksil grupları nedeniyle gıda, yem, içecek, kozmetik, tekstil, ilaç ve inşaat sektörlerinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Singh vd., 1999; Hustede vd., 1989; Singh, 1976; Roehr vd., 1996). Tablo 2.2.’de glukonik asit ve türevlerinin uygulama alanları verilmiştir.

Glukonik asit, Amerika Birleşik Devletleri’nde FDA’ya (Gıda ve İlaç İdaresi) göre GRAS (Generally recognized as safe) statüsüne sahiptir. Aynı zamanda Avrupa Birliği’nde kullanımına izin verilmiş gıda katkı maddelerinden biri olarak kabul edilmektedir (Kubicek vd., 2010). Tablo 2.3.’de glukonik asit ve türevlerinin gıda katkı maddesi olarak kullanımına dair bilgiler verilmiştir. İçecek sanayinde gıda katkı maddesi olarak şarap ve meyve suyu gibi içeceklerin tadının iyileştirilmesi amacıyla kullanılır. Glukono delta lakton, ekmek, tofu, mozerella, deniz ürünleri gibi çeşitli gıdalarda asitlik düzenleyici ve



Şekil 2.1. Glukonik asitin sulu çözeltideki laktonları ve kimyasal GA eşitliği (Rodríguez vd., 2016c)



Şekil 2.2. Glukonik asit tuzlarının yapıları (Brookes ve Neville, 2005)

tatlandırıcı olarak, çörek ve külahlarda yağ emilimini azaltma amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Znad vd., 2004).

Glukonik asit ve türevleri, su bazlı boya formülasyonlarında ve alkali boya çıkarma formülasyonlarında, şişe yıkamada, metal yüzlerin temizlenmesinde pas ve leke çıkarmada sıklıkla kullanılır (Ramachandran vd., 2006). Bunun yanında tekstil sektöründe boya banyolarında ve ağartma banyolarında stabilizatör, kağıt ve deri sektöründe kompleks yapıcı olarak rol alır. Ayrıca kalsiyum, sodyum, potasyum, mangan gibi glukonat tuzlarının üretiminde hammaddedir. Tablo 2.4 ve 2.5’de glukonik asit ve türevlerinin kullanıldıkları endüstrilere göre sırasıyla tüketim miktarları ve pazar büyüklükleri verilmiştir.

Tablo 2.2. Glukonik Asit ve Türevlerinin Kullanım Alanları (Ramachandran vd., 2006)

Komponentler	Uygulama alanları
Glukonik asit	Süt endüstrisinde süt taşının önlenmesi
Glukono 1,5 lakton	Alüminyum kutuların temizlenmesi, Kuru pastalarda kullanılmak üzere pişirme tozlarında gizli asit olarak kullanılır. Sosis gibi et ürünlerinde asitleştirici olarak, Soya üretiminde soya proteinlerinin koagülasyonunda, Peynir lor oluşumunu iyileştirmek ve sütün ısı stabilitesini sağlamak için süt endüstrisinde
Sodyum glukonat	Metallerde paslanmayı önleyici ajan, İnşaat endüstrisinde harç katkı maddesi, Tekstil endüstrisinde ağır metallerin uzaklaştırılması ve boya banyolarında stabilizatör,
Kalsiyum glukonat	Kalsiyum terapileri,
Ferro glukonat	Hayvan yemi ıslahı, Anemi hastalığı tedavisi, Gıda ve içecek endüstrisinde katkı maddesi

Glukonik asit ilaç sanayinde genellikle glukonat formda kullanılmaktadır. Farklı glukonik asit tuzları, kendilerine ait özellikleri nedeniyle farklı uygulama alanlarına sahiptir. Örneğin kalsiyum glukonatlar kalsiyum terapilerinde kullanılırken, demir glukonatlar anemi hastalıkları tedavisinde kullanılabilir. İlaç sanayinde yaygın olarak kullanılan glukonat tuzları hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir.

Kalsiyum Glukonat

İlaç sanayisinde genellikle kalsiyum terapilerinde kullanılır. Annenin gebelik ve emzirme dönemlerinde maternal kemiklerden kalsiyum sapması gerçekleştiğinde, bebek tarafından kalsiyum ihtiyacı doğar. Bu amaçla kalsiyum preparatları genellikle bebek gelişiminde kullanılır (Anonim 2). Gıda endüstrisinde ise besin/sağlık değeri nedeniyle katkı maddesi olarak bebek mamalarına, bisküvilere ve meyve sularına eklenir (Brookes ve Neville, 2005). Glukonik asit türevleri arasında önemli bir ürün olup, diyet takviyeleri için tablet, toz ve sıvı olarak kullanılabilir. Sudaki çözünürlüğü oda sıcaklığında 35 g/L'dir.

Sodyum Glukonat

Daha çok inşaat sektöründe beton prizi için geciktirici ve su düşürücü olarak kullanılır. Metal tedavisinde, metal iyonları için bir bağlama maddesi olarak, tekstil sanayinde ise ağır metallerin alıkonmasında kullanılır (Brookes ve Neville, 2005). 25°C deki suda çözünürlüğü 590 g/L olarak bilinmektedir.

Tablo 2.3. Glukonik Asit ve Türevlerinin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanımı (Rodríguez vd., 2016c)

Katkı maddesi	INS kodu	Son revizyon tarihi	Fonksiyonu	Eklendiği gıdalar
Glukonik Asit	E-574	-	Asit düzenleyici Yükseltgen ajan	Meyve ve sebzeler, Süt ürünleri
Glukono-1,5 lakton	E-575	1998	Asit düzenleyici Ayırma ajanı	Doğal fermente edilmiş sütler Whey protein peyniri Emzikli bebekler ve yeni doğanlar için ek gıda
Sodyum glukonat	E-576	1998	Ayırma ajanı Stabilizatör Yoğunlaştırıcı	Fermente edilmiş bahçe sebzeleri ada deniz yosunu içeren gıdalarda Kurutulmuş makarna ve nodullarda Tuzların yerine Sıcak içeceklerde(kahve, çay ve bitkisel içeceklerde)
Potasyum glukonat	E-577	1998	Asit düzenleyici Doğal takviye	Mozerella peyniri, bisküviler Pandispanya Soğuk et
Kalsiyum glukonat	E-578	1998	Asit düzenleyici Sertleştirici	Bisküvi ve meyve sularında Diyet takviyelerinde
Demir glukonat	E-579	1999	Renk koruma Stabilizatör Doğal takviye	Bahçe sebzeleri, deniz yosunu Soya sosu, sirke, salamura
Magnezum D-glukonat	E-580	1999	Asit düzenleyici Sıkılaştırıcı ajan Doğal takviye	Ekmek ve ekmek ürünlerinde su

Potasyum Glukonat

Potasyum glukonatlar, potasyum tükenmesinin olduğu ve potasyum eksikliğinin olduğu her durumda kullanılır. Potasyum kaybı diyabetik asidoz, ishal, kusma gibi durumlara neden olabilir. Potasyum glukonat hafif tuzlu tadı olması nedeniyle potasyum klorüre göre daha çok tercih edilir (Anonim 2).

Mangan Glukonat

Mangan glukonatlar kozmetikte mineral kaynağı olarak ve aynı zamanda hipomanganizm tedavisi için tablet formunda bulunmaktadır. Birincil olarak vitamin, mineral ve diyet preparatlarına eklenir. Aynı zamanda yeterli mangan iyonlarını sağlamak için hayvan yemine de eklenmektedir (Anonim 2).

Organik asitler, küresel fermantasyon pazarında antibiyotik ve amino asitlerden sonra üçüncü büyük ürün grubunu oluşturur. İzole edilmiş mikroorganizmalar tarafından üretilen glukonik asit, oksalik asit ve sitrik asitten sonra en yaygın üretilen organik asittir. Ancak nispeten pazar payı daha küçüktür. Glukonik asit ve türevlerine duyulan talebin yıllık ortalama 100,000 ton olduğu bilinmektedir (Anastassiadis vd., 2007). Üretimin büyük bir kısmı (% 85'i), sodyum glukonat ve diğer alkali glukonat tuzları formundadır (Hustede vd., 1989). Yıllık GA ve türevlerine duyulan ihtiyacın ürünlere göre dağılımı Tablo 2.6'da, farklı sektörlerde kullanılan ürünlerin piyasa değerleri ise Tablo 2.7'de verilmiştir.

GA'nın ilk sanayi üretimi, Birleşik Devletler Tarım Bölümü laboratuvarlarında pilot tesis çalışmaları sonrasında gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak glukonik asitin temin edilebileceği kuruluşlar; Sigma Chemicals (ABD), ADM-Decatur (ABD); Akzo (ABD); Penta Mfg. (ABD) ve PMP (ABD)'dir. Başlıca glukonik asit üreticileri; Pfizer Inc., (New York/ABD), Bristol-Meyers Co. (New York/ABD), Premier Malt Products Inc. (Wisconsin/ABD) Roquette Freres (Fransa), Pfizer (İrlanda), Benckiser (Almanya), Fujisawa (Japonya, Kyowa Hakka'dır (Japonya).

Tablo 2.4'de görüldüğü gibi glukonik asit ve türevleri % 46'lık bir oranla en fazla inşaat sektöründe ve daha sonra yiyecek sektöründe kullanılmakla birlikte, % 9,2'lik bir oranla ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Birim fiyatı ortalama 3 \$ diyebileceğimiz GA ve tuzlarına harcanan bütçe dünya genelinde ortalama 300 milyon \$ olduğu söylenebilir. 2015

verilerine göre Türkiye'nin GA ve tuzlarına duyduğu talep 1800 ton iken 2016 verilerine göre bu talep 1950 tonu bulmuştur (Orbis Research, 2016). GA'ya duyulan ihtiyacın bir önceki yıla göre % 8 oranında artış gösterdiği görülmektedir. Ülkemiz bu talebin tamamını yurt dışından ithal etmektedir. 2014 verilerine göre Türkiye 13,9 Milyon \$ ile, Asya ülkeleri arasında Hindistan'dan sonra ikinci, dünya genelinde ise Hindistan ve ABD'den sonra üçüncü büyük ithalatçı rolündedir (Anonim 3). Literatürdeki veriler esas alındığında, Türkiye'nin GA ve türevlerinin ithalatı için her yıl yaklaşık 10 milyon \$ harcadığını söylemiz mümkündür. Artan nüfus ve endüstrileşme ile glukonik asit ve glukonatlarla duyulan talebin daha da artacağı ön görülmektedir.

Tablo 2.4. Glukonik Asit ve Türevlerinin Dünya Çapında Endüstriyel Alanlardaki Tüketim Oranları (BCC, 2004; Singh vd., 2007'den)

Uygulama	Miktar (ton)	Toplam tüketim (%)
İlaç endüstrisi	8,000	9,2
Yiyecek endüstrisi	30,000	34,5
İnşaat endüstrisi	40,000	46,0
Diğerleri	9,000	10,3
Toplam	87,000	100,0

Tablo 2.5. Glukonik Asidin Yıllara Göre Küresel Pazar Büyüklüğü (BCC, 2004; Singh vd., 2007'den)

Uygulama	2004 (ABD \$, milyon)	2009 (ABD \$, milyon)	% YOBO (2004-2009)
İnşaat	60	76	4,8
Yiyecek	150	153	0,4
İlaç	63	51	-5,6
Diğerleri	55	31	-10,8
Toplam	333	311	-1,4

*YOBO: Yıllık Ortalama Büyüme Oranı

Tablo 2.6. GA ve Türevlerine Duyulan Yıllık İhtiyaç (Initial Assessment Report For SIAM 18, 2004)

Ürün	Yıllık ihtiyaç (ton)
Glukonik Asit	4.000- 6.000
Glukono-delta-lakton	10.000-20.000
Sodyum glukonat	50.000-70.000
Kalsiyum glukonat	4.000-6.000
Potasyum glukonat	1.000-2.000

Tablo 2.7. Glukonik Asit ve Türevlerinin Piyasa Değerleri (BCC, 2004; Singh vd., 2007'den)

Ürün ve tuzlar	Uygulama alanları	Ortalama fiyat(\$/ kg)
Glukonik asit	Çimento endüstrisi	1,20
Sodyum glukonat	Çimento endüstrisi	2,00
Saf sodyum glukonat	Yiyecek endüstrisi	3,00
Sodyum glukonat ve 1,5 lakton	Yiyecek ve ilaç endüstrisi	8,50

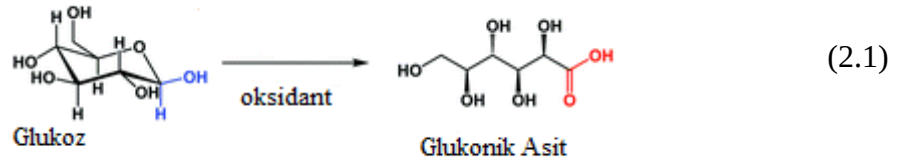
2.2. Glukonik Asit Üretimi

Glukozdan glukonik asit üretiminde mikrobiyal fermantasyon, enzimatik kataliz, kimyasal, biyokimyasal, elektrokimyasal ve biyoelektrokimyasal gibi çeşitli üretim yöntemleri mevcuttur (Rao vd., 1995; Roehr vd., 1996; Sahasrabudhe vd., 2001; Bao vd., 2001; Biella vd., 2002). Kimyasal ve elektrokimyasal katalitik yöntemler, biyoreaktörlerde serbest ya da immobilize enzimler ile gerçekleştirilen enzimatik katalitik üretimler ve immobilize edilmiş ya da serbest büyüme gösteren *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Gluconobacter* gibi çeşitli mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen enzimatik üretimler, kesikli ya da sürekli proseslerde yürütülmektedir.

Endüstride glukonik asit ve türevlerine duyulan talebin karşılanmasında geliştirilen mevcut üretim yöntemlerini genel olarak, kimyasal kataliz ve enzimatik kataliz olarak iki başlık altında inceleyebiliriz. Proses maliyeti ve etkinliği göz önünde bulundurulduğunda enzimatik kataliz yöntemleri arasında yer alan mikrobiyal fermantasyonun glukonik asit üretimi için en iyi yöntem olduğu tespit edilmiştir.

2.2.1. Kimyasal Kataliz Yöntemi ile Glukonik Asit Üretimi

Glukozun glukonik aside kimyasal oksidasyonunun sağlandığı bu yöntemde oksidasyon işlemi, alkali ortamda 1-2 mol/L konsantrasyondaki bir glukoz çözeltisine uygun bir katalizörün eklenmesi ile gerçekleştirilir. Oksijen, ozon ve hidrojen peroksit gibi oksidantlar sayesinde gerçekleştirilen yükseltgeme işlemi, 3-10 bar arasındaki bir basınç değerinde oksidantların taşınması ile sağlanır (Deller vd., 1992). Glukozun oksidantlar ile glukonik aside kimyasal dönüşümü aşağıdaki eşitlikle temsil edilebilir.



Reaksiyon sırasında alkali çözelti ilavesi ile pH 8-11 (tercihen 9) arasında tutulur. Daha aktif ve daha seçici olan kurşun, selenyum, talyum, bizmut ve platin grubu metalleri veya altın destekli katalizörler varlığında glukonik asit üretimi gerçekleştirilebilir (Besson vd., 1995; Biella vd., 2002; Ishida vd., 2008). Başlangıçta kullanılan katalizörler aktif karbon, alüminyum oksit veya başka bir adsorbent ile ortamdan etkin bir şekilde ayrılır. Bu yöntem sonunda katalitik aktivite kaybı minimum seviyededir (Hustede vd., 1989).

pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen miktarı gibi çeşitli fiziksel parametreler glukozun glukonik aside oksidasyonu için büyük önem arz etmektedir. Reaksiyon koşulları optimize edilip kontrol altına alınsalar bile, bu optimum şartların korunması oldukça güçtür. İstenmeyen yan ürün oluşturabilir ve ürünün saflaştırılması ve izolasyonu da oldukça zordur. Her ne kadar dönüşümü kolay ve tek bir adımda gerçekleşse de bu etmenlerden dolayı kimyasal yöntemlerin kullanımı avantajlı olarak kabul edilmemekle birlikte, ürün veriminin % 60-80 arasında olduğu bilinmektedir (Hustede vd., 1989).

Elektrokimyasal kataliz yöntemi ile glukonik asit üretiminin gerçekleştirildiği proseslerde oksidasyon vasıtası olarak halojenler kullanılır. Dönüşüm, halojen oksidasyon potansiyeline bağlı olduğu için kimyasal yöntemlerdeki benzer sorunlar elektrokimyasal proseslerde de kendini gösterir. Bu yöntemde bromür içeren glukoz çözeltisi (yaklaşık glukozun molce % 10'u) 1-20 A/dm² akım yoğunluğunda elektroliz edilir. Karbonatlar (tercihen kalsiyum karbonat) ya da hidroksitler (Sodyum hidroksit), elde edilen asidi nötralize etmek için ortama ilave edilir. Glukoza dayalı verim % 80-97 arasındadır (Hustede vd., 1989).

2.2.2. Enzimatik Kataliz Yöntemi ile Glukonik Asit Üretimi

Enzimatik prosesler, konvensiyonel fermantasyon proseslerine göre daha az zaman gerektirir ve dönüşüm verimi % 100'e oldukça yakındır. Glukonik asidin enzimatik üretimi için sürekli bir sistem uygulamasında, sürekli pH ve sıcaklık kontrollerinin

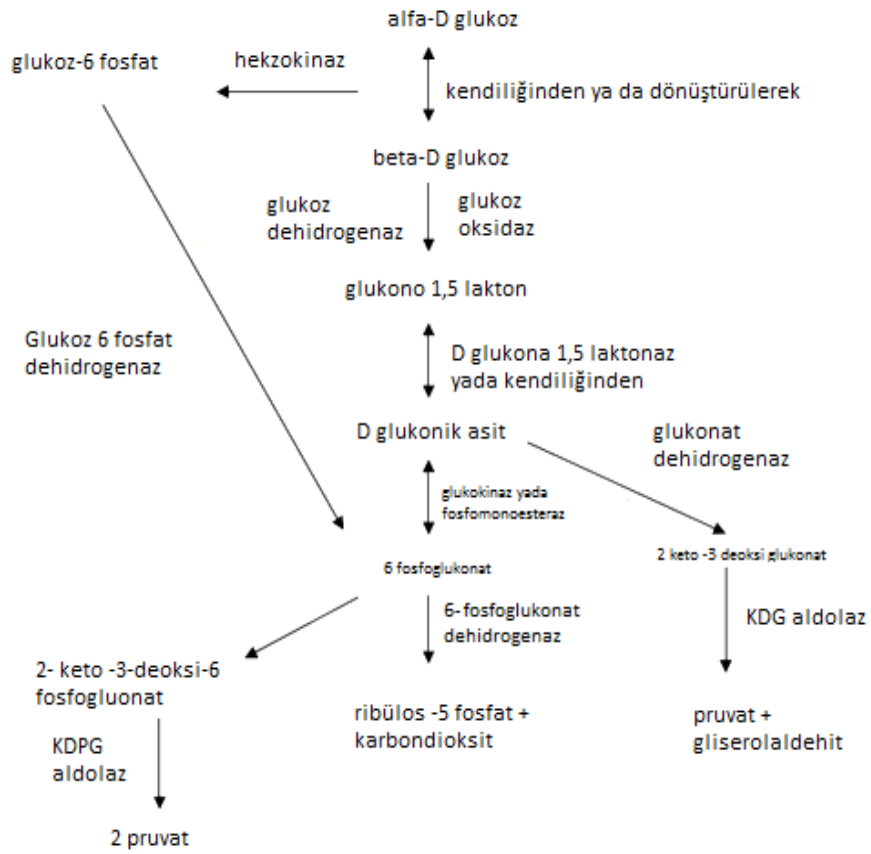
uygulandığı şartlar altında glukoz oksidaz (GO) enzimi (EC 1.1.3.4) kullanılarak üretim gerçekleştirilir.

İmmobilize enzimlerin kullanıldığı enzimatik proseslerde ise ürün saflaştırma adımlarına ihtiyaç duyulmaması büyük bir avantaj olarak belirtilmiştir. Çeşitli teknikler ile tüm hücrenin ya da sadece GO enziminin immobilizasyonunun, metabolit üretimi ya da glukonik asit üretimi için oldukça kullanışlı olduğu bazı patent (US 4,572,897, US 5,916,789) çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Markussen vd., 1978; Amotz vd., 1986).

Büyük ölçekte glukonik asidin enzimatik üretimi, enzimlerin stabil olmaması ve prosesin yüksek maliyet gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı ekonomik olarak uygun bulunmamaktadır. Enzimatik olarak glukonik asit üretimine dair genel akış şeması Şekil 2.3'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi alfa formunda olan kristal glukoz monohidrat, beta formuna kendiliğinden dönüşebilmektedir. *A. Niger*, mutarotaz enzimini içerdiği için bu dönüşüm *A. niger*'da daha hızlı gerçekleşmektedir (Ramachandran vd., 2006).

Glukozun, glukonik aside oksidasyonunu sağlayan GO enziminin, yüksek maliyeti nedeniyle glukonik asit üretiminde ticari kullanımı hemen hemen yoktur. Bazı patentlerde (US 4460686 ve US 3050444) çözünebilir GO/katalaz karışımları, invert şekerlerden (glukoz ve fruktoz karışımı) glukonik asit üretimi için araştırılmıştır (Holstein vd., 1962; Hartmeier, 1984).

Enzimatik üretimlerde mikroorganizmalar vasıtasıyla glukozun glukonik aside dönüşümü, mikroorganizmalarda mevcut olan fungal enzim GO ya da bakteriyel enzim olan glukoz dehidrogenaz (GDH) yardımı ile gerçekleşmektedir (Hustede vd., 1989). *Aspergillus*, *Penicillium* gibi bazı mikroorganizmalarda, glukonik asit üretimi için gerekli olan GO/katalaz enzim kompleksi mevcuttur (Hayashi ve Nakamura, 1981). *Aspergillus niger*'da, enzimlerin her ikisinin de hücre duvarında yer alan hiflerin dış yüzeyinde bulunduğu bilinmektedir (Witteveen vd., 1992). Bakterilerde oksidasyon yolağı funguslardan biraz daha farklıdır. Örneğin *G.oxydans* hidrojen peroksidaz olmaksızın glukozu glukonolaktone çeviren iki tip GDH enzimi içermektedir.



Şekil 2.3. Glukozun enzimatik yöntem ile glukonik asit üretim yolağı (Hustede vd., 1989)

2.2.3. Mikrobiyal Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi

Mikrobiyal fermantasyon yöntemleri diğer yöntemlere kıyasla hafif çalışma koşulları, düşük enerji gereksinimleri, az miktarda yan ürün oluşması ve çevresel açıdan zararsız artıklar oluşturması, ucuz karbon kaynağı temini gibi nedenlerden dolayı ticari glukonik asit üretimi için etkili ve baskın yöntemler olarak değerlendirilmektedir (Hustede vd., 1989). Glukonik asit üretiminde genellikle karbon kaynağı olarak, glukozun yanı sıra tarımsal endüstri yan ürünleri/atıkları gibi önemli biyokütle kaynakları kullanılabilir.

Geniş bir mikroorganizma grubu, özellikle ipliksi funguslar glukonik asit üretim yeteneğine sahiptir (Cochrane, 1958; Lockwood, 1975). Günümüzde *Aspergillus* ya da *Gluconobacter* suşları kullanılarak ticari glukonik asit üretimi mikrobiyal fermantasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlere dair bilgiler aşağıda verilmiştir.

Funguslar ile Glukonik Asit Üretimi

Glukonik asit üretimine dair alınmış ilk patent *Penicillium luteum* ve *Aspergillus niger* suşları kullanılarak, derin fermantasyon tekniği ile Curie tarafından gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel uygulaması olan bu çalışma sonunda 48-60 saatleri arasında glukonik asit veriminin % 90 olduğu belirtilmiştir (Curie vd.,1931). Mevcut sodyum glukonat üretim prosedürüne baktığımızda, Blom ve ekip arkadaşları (1952) tarafından geliştirilen proste *Aspergillus niger* suşu kullanılarak pH 6.0-6.5'da, 34°C sıcaklıkta glukozdan, kesikli-beslemeli sistem ile derin fermantasyon tekniği kullanılmaktadır.

Daha önce de belirtildiği gibi *A. niger* glukonik asit için gerekli olan temel enzimleri (GO ve katalaz) içermektedir. *A. niger*'in kullanıldığı endüstriyel glukonik asit üretimlerinde optimum verim için ortam şartları 100-250 g/L glukoz, çok düşük konsantrasyonlarda (20 mM) azot ve fosfor kaynağı, 30 g/L MnSO₄, 4.5-5.5 civarında pH olarak belirlenmiştir (Röhr vd., 1983).

Funguslarla glukonik asit üretiminde, Şekil 2.4'de görüldüğü gibi koenzim olarak flavin adenin dinükleotit (FAD) bağlı glukoz oksidaz enzimi (GO) ve hidrojen peroksidi hidrolize eden katalaz enzimi üretimde rol almaktadır. Bunun yanı sıra üretimi artırmaya yönelik laktonaz ve mutarotaz enzimleri de üretim ortamına eklenebilir (Ramachandran vd., 2006).

Glukonik asit üretiminde verimliliği etkileyen iki önemli parametre mevcuttur (Hustede vd., 1989; Ramachandran vd., 2006). Bunlar kültür ortamının pH'sı ve kullanılabilir oksijen miktarıdır. Glukonik asit üretimi, oksidasyonu sağlayan GO enziminin etkinliğine doğrudan bağlıdır. Reaksiyon sonucu asidik ürün artışı gerçekleşir ve nötralize edici madde ilavesi ile ortam nötralize edilir. Aksi halde asitliğin artmasıyla glukonik asit üretimi için gerekli olan glukoz oksidaz enzimi inaktif hale gelerek oksidasyon mekanizması bloke olur. Uygulamaya bağlı olarak, fermantasyon ortamında nötralizasyon işlemi sodyum hidroksit veya kalsiyum karbonat ilavesiyle sağlanır (Ramachandran vd., 2006; Znad vd., 2004). Böylece sodyum glukonat veya kalsiyum glukonat üretimi gerçekleşir. Buna karşın mikroorganizmanın büyüme ortamına % 4-5 oranında CaCO₃ ilavesinin glukoz oksidaz aktivitesini indüklediği de bilinmektedir.

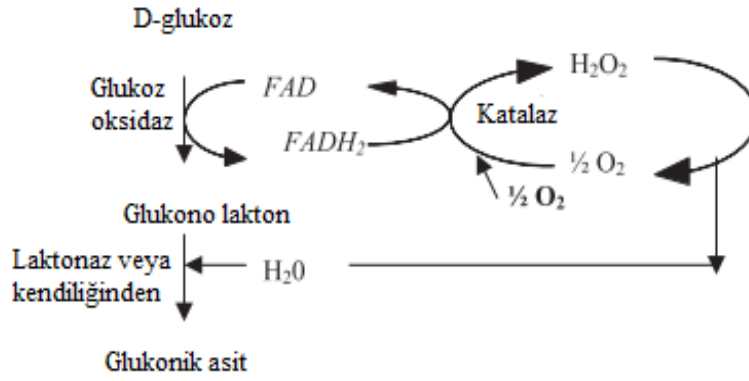
Mantarlarla glukonik asit üretimi, yüksek miktarda çözünmüş oksijen gereksinimi duyulan aerobik bir fermantasyon prosesidir (Gibson vd., 1964; Reuss vd., 1986;

Ramachandran vd., 2006). Oksijen gradyen konsantrasyonu ve hacimsel oksijen transfer katsayısı ortamdaki oksijenin kullanılabilirliğini izlemek için önemlidir. Bu faktörler gazdan sulu faza geçen oksijen transfer oranını etkiler. Mantar büyümesi sırasında, yetersiz oksijen kaynağı nedeniyle oksijen dağılımı eşit olmaz. Oksijen ihtiyacı hem fungusların gelişimi için hem de glukozun glukonik aside biyodönüşümü için önem arz etmektedir. Glukonik asit üretimi, aşırı oksijen tüketen bir biyodönüşüm prosesi olarak bilinmektedir. Literatürde saf oksijen kullanımına yönelik çalışmalarda, yüksek verim elde edildiği belirtilmekle birlikte hem hücre kayıpları hem de maliyet açısından sorunlar oluşturabildiği de ifade edilmiştir (Ikeda vd., 2006).

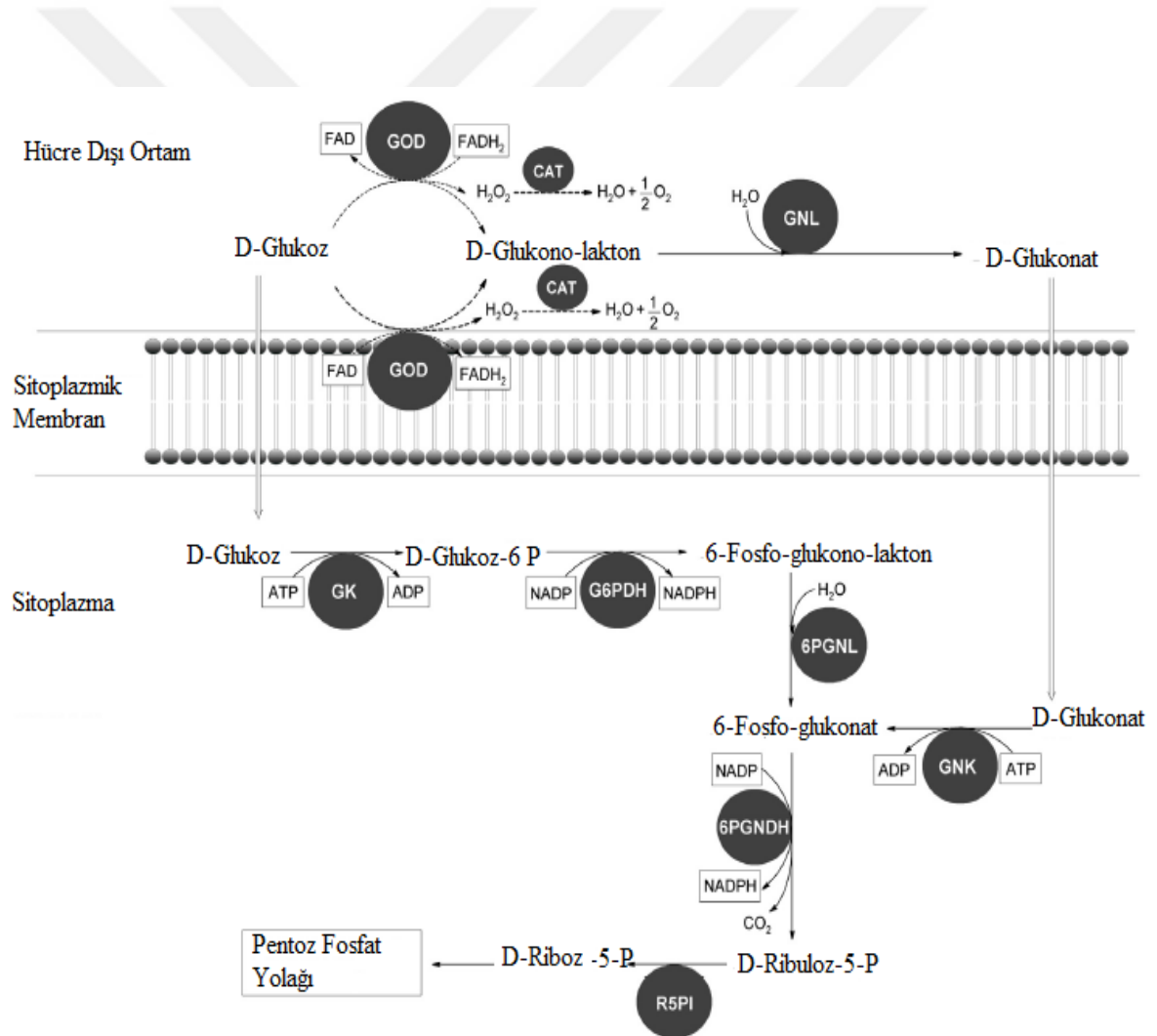
Bir flavoprotein olan GO enzimi hücre duvarında ve ekstrasellüler sıvıda yer almakla birlikte %16-25 karbonhidrat kütle yüzdesine sahiptir (Pazur vd., 1964; Swoboda vd., 1965). Enzim ilk kez Müller tarafından meyve suyundan *Penicillium glaucum* ile üretilerek izole edilmiştir (Müller, 1928). Enzimin ilk kristalizasyon çalışması ise Kusai vd. (1960) tarafından *P. amagasakiense* suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *A. niger*'da bulunan glukoz oksidaz enzimi, disülfid bağlarıyla kovalent olarak bağlanan iki aynı polipeptid zincir alt biriminden (80,000 Da) oluştuğu bilinmektedir (Malley vd., 1972). Her alt birim 1 mol Fe ve 1 mol FAD içermesinin yanı sıra molekülün yaklaşık % 74'ü protein, % 16'sı nötr şeker ve % 2'si amino şekerlerden meydana gelmektedir (Tsuge vd., 1975). *A. niger* için glukoz oksidazın aktif olduğu pH aralığı 4 ile 7 olmakla birlikte optimum olduğu değer 5,5'dir (Bright vd., 1969).

A. niger suşunun tüm karbon kaynakları içerisinde üretim yeteneğine baktığımızda, glukoz oksidaz enziminin sadece iki karbon kaynağında (glukoz ve sükroz) önemli seviyelerde üretiminin gerçekleştiği bilinmektedir (Hatzinikolaou ve Macris 1995). Glukozun (saf halde veya mikroorganizma içerisindeki invertaz enzimi ile sükroz hidrolizinin bir ürünü olarak) glukoz oksidaz geninin temel bir uyarıcısı olduğu söylenebilir.

Glukoz oksidaz enzimi hidrojen peroksit yardımıyla glukozun karboksil grubundan iki hidrojen atomunu oksijene transfer eder. Glukonik asit, laktonun doğal yollarla ya da laktonun katalitik hidrolize uğraması sonucu oluşur. Lakton nötral ve alkali pH'larda doğal yollarla hidrolize olur. Açığa çıkan hidrojen peroksit, katalaz enzimi aktivitesi ile su ve oksijene dönüşür. Şekil 2.5'de *A.niger*' dan glukonik asit üretimi yolağı gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Glukozdan glukoz oksidaz aracılığıyla glukonik asit üretim aşamaları (Ramachandran vd., 2006)



Şekil 2.5. *A. niger* ile glukozdan glukonik asit üretim yolağı (Rodríguez vd.,2016c)

A.niger tarafından üretilen katalaz ve GO enzimlerine ekstraselüler olarak FAD eşlik etmektedir ve neredeyse glukozun tamamını glukonik aside dönüştürür. FAD'a hidrojen transfer edilirken, β -D-glukozu GO enzimi tarafından glukono-1,5-laktona katalitik olarak oksitlenir. Elde edilen FADH₂ hidrojen peroksit oluşturmak için hidrojen ve oksijen iletimi ile yeniden FAD'a dönüştürülür.

Fungal büyüme ve GA oluşumu arasında bir lineerlik olmadığı için, sürekli prosesler GA üretimi için elverişli değildir. Bu amaçla *A. niger* içeren endüstriyel proseslerde kesikli sistemler kullanılır (Rodríguez vd., 2016c). Genellikle fermantasyon ortamı yüksek miktarda glukoz (100-250 g/L) ve eser miktarda da azot kaynağı içermektedir (>20mM N/P). Reaksiyon sonucu asidik ürün artışı gerçekleştiği için nötrale edici madde ilavesi ile ortam nötrale edilir (Znad vd., 2004; Ramachandran vd., 2006).

A.niger; glukoz oksidaz, mutarotaz ve katalaz enzimleri dışında, sakkarozun glukoz ve fruktoza hidrolize olmasını sağlayan invertaz enzimini de içermektedir (Peberdy, 1993; James vd., 1996; Vargas vd., 2004). Genel olarak mantarlarda invertaz, intraselüler ve ekstraselüler olarak bulunmaktadır. *A. niger*' da bu enzimin birden fazla formunun var olduğu ve yaklaşık % 40-60'ının intraselüler formda olduğu bilinmektedir (Vainstein ve Peberdy, 1991; Peberdy, 1993).

Bakteriler ile Glukonik Asit Üretimi

Bakteriler ile glukonik asit üretimine dair birçok çalışma literatürde yer almakla birlikte bunların pek azı büyük ölçekte endüstriyel amaçla kullanılmaktadır. Bakteriye glukonik asit üretimine dair yapılan ilk patent çalışmaları Verhave (1930), Currie ve Carter (1933) gibi araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen *Gluconobacter oxydans* (*Acetobacter suboxydans*) suşunun kullanıldığı fermantasyon çalışmalarıdır. Currie ve Finaly (1993) derin fermantasyon ile bakteriyel GA üretimine dair ilk patenti almışlardır. Bütün bu patent çalışmaları, endüstriyel ölçekte optimum bakteriyel glukonat üretimi için yüksek glukoz konsantrasyonu, düşük pH değerleri ve yüksek oksijen konsantrasyonlarına ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır.

Bakterilerde de funguslarda olduğu gibi glukoz oksidasyonu büyük ölçüde ortam pH'sına bağlıdır (Velizarov vd., 1998; Olijve vd., 1979). Fungusların aksine bakteriyel üretimde ortam pH'sının asidik olması istenir. Endüstriyel üretimlerde pH 3,5-4,0

değerlerinde glukozdan 5-KGA'ya dönüşümün daha yüksek olduğu (yaklaşık %87) bilinmektedir (Ano vd., 2011). Glukoz konsantrasyonu 15mM'ın üstünde ve pH değeri 3,5'in altında keto-asitlerin oluşumu ise baskılanır. (Olijve vd., 1979; Roehr vd., 1996).

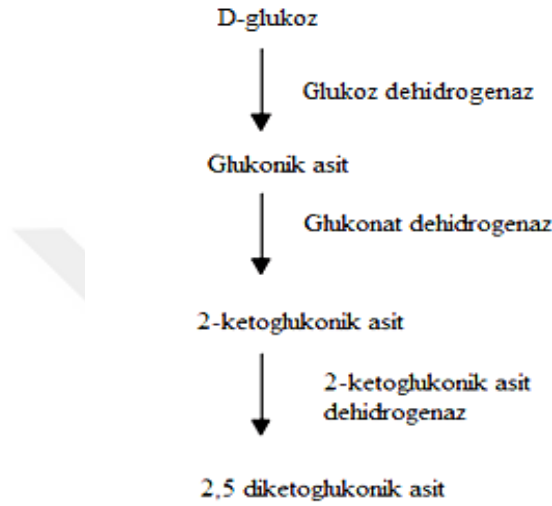
Optimal endüstriyel koşullar altında, *G. oxydans*'ın pH, glukoz konsantrasyonu ve havalandırma derecesine belirgin derecede bağlı olarak, GA verimlerinin ortalama % 75-80 arasında olduğunu bilinmektedir (Ramachandran vd., 2017). Buna rağmen oksoglukonik asitlere yol açan ikincil reaksiyonlar oluşturmaları nedeniyle, bakteriyel glukonik asidin endüstriyel ölçekteki üretim başarısı sınırlıdır (Ramachandran vd.2006). *Gluconobacter suboxydans* fermantasyonu, *Aspergillus niger* ile glukonik asit üretimine göre oksijene daha fazla gereksinim duyar. Fakat *G. oxydans* 621H (DSM 2343) suşunun büyüme olmayan koşullar altında bile yüksek oksidatif aktiviteye sahip olmasından dolayı endüstriyel üretimlerde kullanımı için uygun olduğu söylenebilir (Olijve vd.,1979; Sievers vd., 2005).

Mantarların aksine, bakterilerde glukonik asit üretimi glukozu okside eden GDH enzimi aracılığı ile gerçekleştirilir. Prostetik bir grup olan pirolo kinolin kinon (PQQ) ile birlikte GDH sitoplazmik membranın yüzeyinde yer alır. Bazı *Gluconobacter* suşları glukonatları keto-asitlere metabolize ederek, oksidatif prosesi daimi kılar. Flavoprotein olan glukonat dehidrogenaz enzimi (GADH) aracılığı ile GA, 2-ketoglukonik aside (2-KGA) dönüşür. Dönüşüm mekanizması Şekil 2.6'da verilmiştir. Son olarak 2,5-diketo glukonik asit (2,5-DKG), 2-ketoglukonat dehidrogenaz (2KGDH) enzimi ile elde edilir. Bu enzim sitoplazmada yer alan NADP-bağlı bir proteindir (Klasen vd., 1995). Glukozun intraselüler oksidasyonu NAPH⁺ bağlı çözünebilir dehidrogenazlar (GDH, GADH) tarafından katalizlenir. *Gluconobacter*'de glukonik asit üretim yolağı Şekil 2.7'de verilmiştir.

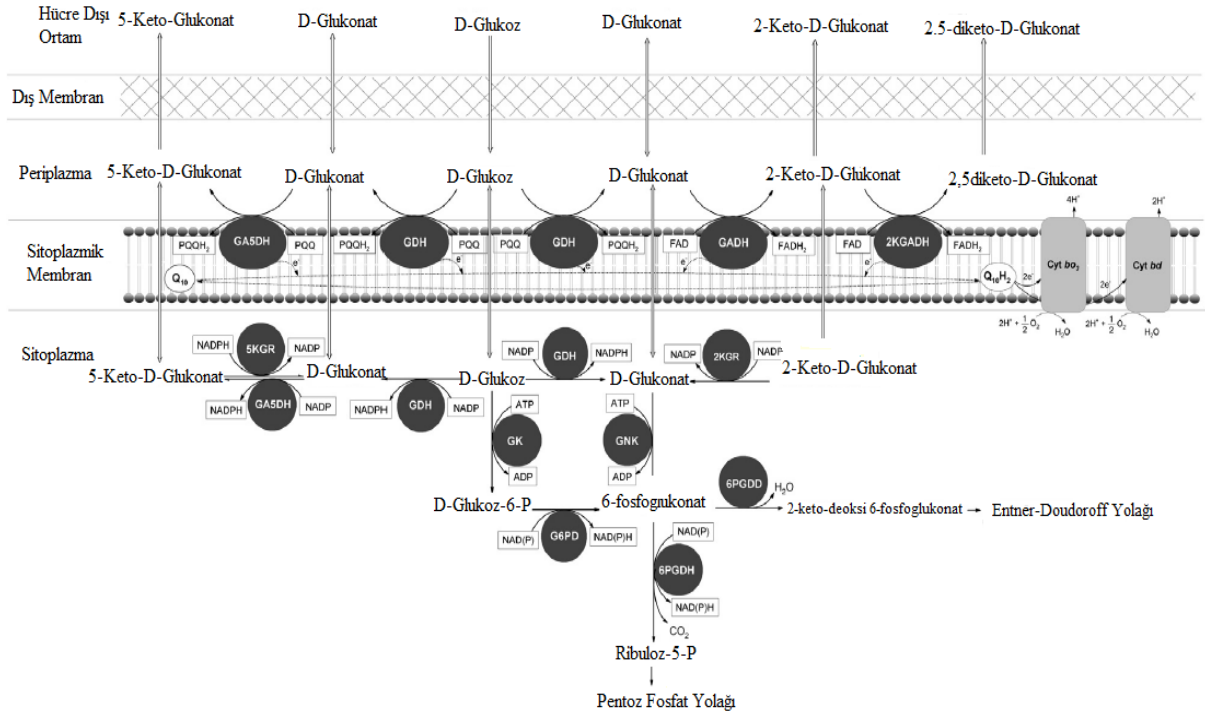
Bakteriyel GDH genellikle periplazmik membranın dış yüzeyinde yer alır. Glukoz dehidrogenaz enzimi, PQQ varlığına bağlı olarak glukozu GA okside eder. *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* gibi bazı organizmalar apo-GDH sentezleyebilirler fakat enzimin aktif olmasını sağlayan PQQ sentezini gerçekleştiremezler. Bu ve benzeri organizmalarda ekstraselüler PQQ ilavesi, apo-GDH'ın aktif formu olan holo-GDH forma dönüşmesini sağlar (Ameyama vd., 1986; Hommes vd, 1984; Van Schie vd., 1987). *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı organizmalar holo-GDH sentezleyebilir (Neijssel vd., 1983). Bakteriyel GA üretiminde rol alan PQQ sentezini gerçekleştiremeyen bakterilere,

pqq gen aktarım çalışmaları son yıllarda popüler olan metabolik mühendislik sayesinde gerçekleştirilmektedir.

Üretilen GA, metabolik olarak pentoz fosfatla katabolize edilir ve reaksiyon ürünleri hücre içine verilir. Ortamda glukoz konsantrasyonu 15 mM'dan daha büyük olduğunda pentoz fosfat baskılanır ve böylece GA birikimi gerçekleşir (Ramachandran vd., 2006).



Şekil 2.6. Glukoz dehidrogenaz enzimi ile glukonik asit üretim basamakları (Ramachandran vd., 2006)



Şekil 2.7. *Gluconobacter*'de glukonik asit üretim yolağı (Rodríguez vd., 2016c)

2.3. Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Fermantasyon Çeşitleri ve Sistemleri

Fermantasyon genel olarak bakteri ya da funguslar gibi mikroorganizmalar vasıtasıyla kompleks substratların basit bileşiklere biyolojik olarak dönüşümüdür. Bu dönüşüm sırasında alkol, karbondioksit gibi fermantasyon olağan ürünlerinden başka, sekonder metabolit olarak adlandırılan antibiyotiklerden büyüme faktörlerine kadar birçok ek bileşikler de ortama salınır (Balakrishnan vd., 1996; Machado vd., 2004; Robinson vd., 2001). Fermantasyon teknikleri ekonomik ve çevresel avantajlarından dolayı zamanla daha önem kazanmıştır. Bununla birlikte eski teknikler zamanla verimliliği artırmak için modifiye edilmiştir. Bu süreç aynı zamanda yeni makinelerin ve proseslerin gelişmesini de sağlamıştır. Glukozdan glukonik asit üretimi için fermantasyon prosesleri ekonomik ve kolay olması nedeniyle oldukça tercih edilen yöntemlerdir. Literatür tarandığında GA ve glukonatların üretimi için çeşitli fermantasyon teknik ve sistemlerinin kullanıldığı görülmektedir.

2.3.1. Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Fermantasyon Çeşitleri

Katı Hal Fermantasyonu

Katı hal fermantasyon (KHF), serbest sıvının olmadığı veya çok az olduğu ortamlarda mikroorganizmanın çözünmeyen katı bir destek materyal üzerinde büyümesinin gerçekleşmesi esasına dayanır (Mitchell vd., 2002; Pandey, 2003). Mikrobiyal büyümenin gerçekleşmesi için ortamda yeteri miktarda nem olması gerekmektedir (Pandey, 2003). Katı hal fermantasyonun daha az nem içeriği gerektiren funguslar gibi mikroorganizmaların kullanıldığı çalışmalar için oldukça ideal olduğu, buna karşın bakteriler gibi yüksek su aktivitesine gereksinim duyan mikroorganizmaların bulunduğu çalışmalarda bu yöntemin kullanımının uygun olmadığı bilinmektedir (Babu ve Satyanarayana, 1996).

KHF yaygın olarak endüstriyel enzimlerde ve organik asit üretimlerinde kullanılmaktadır (Ramachandran vd., 2005; Pandey vd., 2000; Pandey, 1992). Katı destek materyali olarak; limon kabuğu, buğday kepeği (El-Bendary vd., 2008; Kagliwa vd., 2009), portakal kabuğu, elma ezmesi, fıstık kabuğu, (Orzua vd., 2009), buğday samanı (Dinis vd., 2009), pirinç samanı (Yu vd., 2009; Huang vd., 2009), kahve posası (Orozco vd., 2008) gibi malzemelerin kullanıldığı bilinmektedir.

KHF proses değişkenleri; havalandırma, pH, sıcaklık, inokulum miktarı, su aktivitesi, nem içeriği, büyüme ortamına ilaveler, KHF ortamının sterilizasyonu ve ortam malzemeleri olarak tanımlanabilir (Nigam ve Pandey, 2009). Katı hal fermantasyonda, düşük su hacminin kullanılmasının yanı sıra, fermantör boyutunun küçüklüğü, az miktarda karıştırma ve sterilizasyon maliyetlerinin düşüklüğü gibi faktörlerin proses maliyeti üzerine büyük bir etkisinin olduğu söylenebilir (Hölker vd., 2005; Nigam, 2009).

Fermantasyon proseslerinde katı hal fermantasyon ve derin fermantasyon en çok çalışma yapılan fermantasyon şekilleri olup, yapılan çalışmalar sonucunda katı hal fermantasyonunun yüksek verim sağladığı ve derin fermantasyona göre işletme yatırımı ve işletme maliyetinin düşük olması gibi bazı üstünlüklere sahip olduğu için tercih edildiği belirtilmektedir. Tarımsal ve endüstriyel atıkların substrat olarak kullanıldığı bu prosesin enzim ve organik asit üretiminde sıklıkla tercih edildiği bilinmektedir (Ramachandran vd., 2006; Pandey vd., 2000; Pandey vd., 1992). Daha küçük reaktör ile aynı miktarda substratın varlığı için kullanılabilir olması, kültür ortamlarının oldukça basit ve substratların genellikle mikroorganizma büyümesi için gerekli besinleri içermesi gibi özellikleri nedeniyle derin fermantasyona göre daha avantajlıdır. Buna karşın katı hal fermantasyon, sadece düşük nem seviyelerinde büyüeyebilen mikroorganizmaların kullanılabilir olması, genellikle substratlara bir ön işlem uygulanması (fiziksel, kimyasal, enzimatik hidroliz, öğütme ile boyutların ayarlanması, buhar ile muamele vb.), yüksek inokulum hacimlerine ihtiyaç duyulması ve istenmeyen funguslar tarafından kontaminasyon riskinin olması gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Perez-Guerra vd., 2003). Katı hal fermantasyon ile büyük ölçeklerde oksijen ve kütle transferindeki zorlukları aşmaya yönelik reaktör tasarımı son yıllarda üzerinde çalışma yapılan konular arasındadır.

Yarı Katı Hal Fermantasyon

Katı hal fermantasyonun sahip olduğu dezavantajlar göz önüne alındığında fermantasyon ortamında besin bulunabilirliğini artırmak ve fermantasyon kontrolünü kolaylaştırmak için ortamdaki serbest sıvı içeriği artırılmıştır. Bu tip fermantasyon yarı katı hal fermantasyon olarak adlandırılır (Rodriguez-Couto, 2012; Economou vd., 2010). Bu tip fermantasyonda mikroorganizmanın büyümesi katı hal fermantasyona göre daha kolaydır. Derin fermantasyon prosesleriyle karşılaştırıldığında üretim maliyetlerinin çok daha düşük olmasının yanı sıra üretim veriminin daha fazla olabileceği bilinmektedir (Machado vd., 2013). *Trametes pubescens* ile lakkaz enzim üretiminin incelendiği bir çalışmada üretim

maliyetlerinin derin fermantasyona göre 50 kat daha düşük olduğu belirtilmiştir (Osmaa vd., 2011).

Derin Fermantasyon

Daldırılmış koşullar altında mikroorganizmalar kullanılarak yapılan rutin fermantasyon işlemleri, GA üretimi için derin fermantasyon prosesinin gelişmesine yol açmıştır. Bu proseste mikroorganizma tamamen sıvı bir ortamda büyümetedir. Derin fermantasyonda ortam genellikle melas ya da besiyeri gibi substratlardan oluşmakla birlikte biyoaktif bileşenlerin fermantasyon ortamına salınması esasına dayanır. Katı hal fermantasyonla kıyaslandığında substratlar daha hızlı tüketilir. Bu yüzden sürekli olarak ortama besin maddelerinin eklenmesi ya da değıştirilmesi gerekir (Subramaniyam vd., 2012). Derin fermantasyonun rekombinant mikorganizmaların kullanımı için uygun olması ve büyük ölçekli sistemlere uyarlanabilir olması nedeni ile endüstriyel uygulamalarda oldukça sık kullanılmaktadır (Subramaniyam vd., 2012). Endüstriyel enzim üretimin yaklaşık %75'inin derin fermantasyon ile yapıldığı bilinmektedir. Yüksek nem ihtiyacı olan bazı mikroorganizmalar için oldukça uygun bir yöntem olmasına rağmen yüksek enerji tüketimi, bakım masrafları ve sürekli eklenen nötrale ajanları bu yöntemi zorlu kılar. İlave edilen nötrale ajanlar fermantasyonun verimli çalışmasını tehlikeye atar. Bu nedenlerden dolayı derin fermantasyona alternatif yöntemler aranmıştır (Singh ve Kumar, 2007).

İmmobilize Hücre Fermantasyonu

İmmobilizasyon teknolojisi, organik asitlere karbonhidratların hızlı bir şekilde dönüşümünü gerçekleştirmede yüksek hücre yoğunlukları elde etmede cazip bir yöntemdir (Vasillev ve Vasilleva, 1992; Vasillev vd., 1993; Sankpal ve Kulkarni, 2002). Mikroorganizmaların kullanıldığı endüstriyel prosesler fermantasyon ortamında bulunan hücrelerin kullanılması esasına dayanır. Polimerik ağılarda fiziksel olarak immobilizasyon, önceden oluşturulmuş bir taşıyıcıya bağlanma veya adsorpsiyon, membran tutma, mikrokapsülleme gibi çeşitli metotlar mevcuttur. Bu tekniklerin amacı, biyoreaktör içerisindeki yüksek hücre konsantrasyonunu kaybetmemek ya da hücreleri dış ortamdan gelecek zararlara karşı korumaktır.

İstenen bileşiklerin biyoteknolojik fermantasyonu, genel olarak fermantasyon ortamındaki canlı mikrobiyal hücre yoğunluğuna bağlıdır (Singh ve Kumar, 2007). Buna ek olarak, serbest hücrelerle gerçekleştirilen sürekli fermantasyon hücre ölümleri ve hücre lizizleri tarafından olumsuz etkilenir. Bu yüzden immobilize sistemler genellikle kemostatik ortam şartlarında çalıştırılmak için uygundur. Bu teknikte biyokütle, destek materyali üzerine immobilize edilebileceği gibi bazı durumlarda da kültürden izole edilen enzimler immobilize edilir.

2.3.2. Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Fermantasyon Sistemleri

Glukonik asit üretiminin kesikli, yarı kesikli ve sürekli sistemler kullanılarak genellikle hava kaldırmalı reaktörler ve karıştırmalı reaktörlerde gerçekleştiği bilinmektedir. Hava beslemesi, pH kontrolü ve ısı kontrolü ile donatılmış bir fermantör, *A.niger* ya da *Gluconobacter oxydan* gibi bazı mikroorganizmalar ile endüstriyel boyutta glukonik asit üretimi amacıyla kullanılır (Anastassiadis vd., 1999). Şekil 2.8’de kesikli, sürekli ve yarı kesikli sistemler gösterilmiştir.

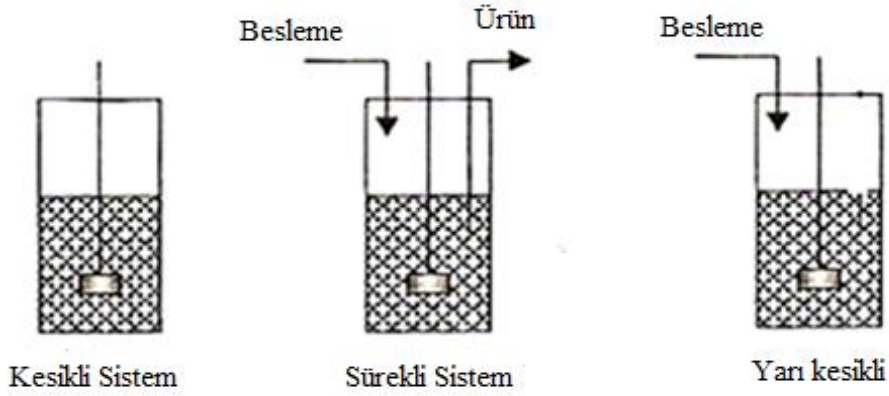
Kesikli Sistem

Kesikli sistemlerde fermantasyon ortamı hazırlanır ve mikroorganizma ortama aşılanır. Sistemin pH, sıcaklık ve diğer değerleri ayarlandıktan sonra ortama yeni substrat veya mikroorganizma ilavesi gerçekleşmez. Proses sırasında giriş ve çıkış akışı gerçekleşmemektedir (Enfors vd., 2000). Fermantasyon, ortamdaki besin elementleri tükeninceye kadar veya çevresel koşullarda gözlemlenen değişikliklere göre sonlandırılır. Kesikli sistemler nonlinear özellikler gösterme eğilimindedirler. Yüksek işçilik maliyeti gerektirmesiyle birlikte zamanın bir kısmı sterilizasyon ve mikroorganizmanın büyümesi gibi işler ile boşa geçmektedir. Buna karşın her şeyin steril olması nedeniyle oldukça güvenlidir. Mikroorganizma ve ortam kontaminasyon riskinin çok düşük olması ve substratın tamamının ürüne dönüşme ihtimali gibi avantajlara sahiptir.

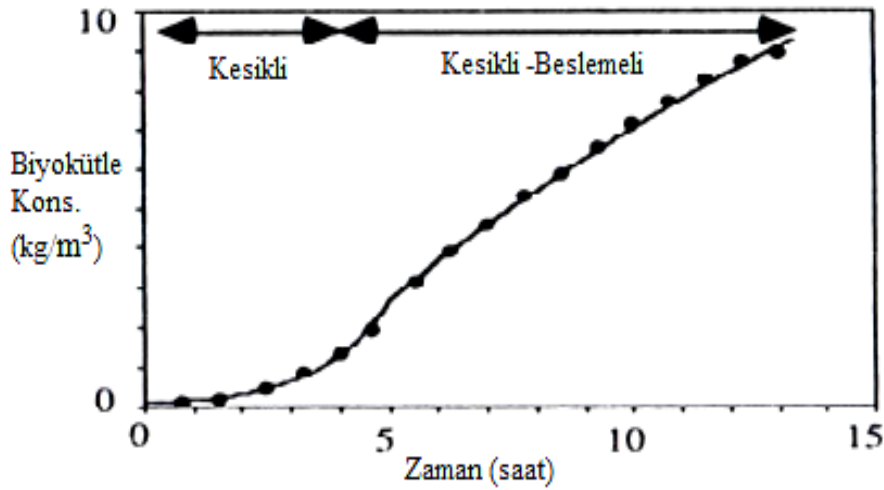
Yarı kesikli Sistem

Yarı kesikli sistemlerde, proses sırasında reaktörden hiçbir çıkış sağlanmaz. Bu sistem konsantrasyon ile reaksiyon hızını kontrol etmek amacıyla substrat bileşenlerinin ortama eklenmesi esasına dayanır. Fermantörler kesikli ve sürekli sistemlerin avantajlarını

birlikte taşıdığı için endüstride yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Enfors vd., 2000). Şekil 2.9'da görüldüğü gibi proses başlangıçta kesikli olarak başlar ve besin elementleri tükenmeye başlayınca substrat, fermentasyon sırasında belirli zaman aralıklarıyla ortama ilave edilir. Giriş substrat beslemesi seyreltmeyi minimize etmek amacıyla mümkün olduğunca konsantre olmalıdır.



Şekil 2.8. Fermantasyon Sistemleri



Şekil. 2.9. Yarı kesikli prosesde zamana bağlı biyokütle konsantrasyon değişimi (Enfors vd., 2000)

Yarı kesikli prosesler, substrat besleme hızı sayesinde hem reaksiyon hızını hem de metabolik reaksiyonları kontrol etme avantajına sahiptir. Oksijen transferinin ve soğutmanın neden olduğu sınırlamalar, reaksiyon oranının kontrol edilmesi ile önlenabilir (Enfors vd., 2000).

Sürekli fermantasyonda anahtar değişkenler sabit tutulurken, yarı kesikli fermantasyon tekniğinde proses ilerledikçe hemen hemen her önemli değişken değişim göstermektedir. En iyi büyüme koşullarını sağlamak amacıyla pH ve sıcaklık seviyeleri genellikle bu sistemlerde sabit tutulur (Gregersen vd., 1999). Fermantasyon sistemleri, çalışma koşullarındaki anormal değişikliklere karşı çok hassastır. Fermentasyonun performansı, sistemin sorunsuz çalışabilmesine bağlıdır (Lennox vd., 2000). Böylelikle sistemin performansı ve ürün verimi daha yüksek olacaktır (Lennox vd., 2001).

Yarı kesikli proseslerde farklı substrat sınırlamaları kullanılabilir. Örneğin azot, fosfat ya da şeker kaynaklarının büyüme hızını baskılamak için kullanıldığı bilinmektedir. Eğer reaksiyonun hızı kontrol altına alınmaz ve hücreler katlanarak büyümeye devam ederse, reaksiyon oksijen veya ısı ile sınırlandırılmış olacaktır. Yarı kesikli olduğu proseslerde metabolizma kontrolü, antibiyotikler gibi sekonder metabolitlerin üretimi için de kullanılır. Hücre büyümesinin kontrol altına alınmaması durumunda antibiyotik sentezi baskılanacaktır (Enfors vd., 2000).

Sürekli Sistem

Bu sistemlerde hem giriş hem de çıkış akımı bulunmasının yanı sıra ortam hacmi sabit tutulur (Enfors vd.,2000). Steril besin biyoreaktöre ilave edilirken, eşit miktarda ürün ve onunla birlikte mikroorganizma sistemden alınır. Ürünün alımı sırasında kaybedilen mikroorganizmalar, reaktördeki hücre bölünmesiyle dengelenir. Sürekli sistemlerde yüksek maya konsantrasyonu ve karıştırma olduğu için kesikli sisteme kıyasla fermantasyon daha hızlı gerçekleşir. Kontrol ve test edilecek tek bir fermantasyon sistemi olması nedeniyle işçilik ve yatırım maliyetleri düşüktür. Bunun yanı sıra mikrobiyolojik saflığın korunması oldukça güçtür. Sürekli sistemler glukonik asit ve tuzlarının sanayi üretimi için alternatif bir uygulama olarak görülmektedir. Sitrik asit ve glukonik asit üretiminde sürekli fermantasyon işlemlerinin geliştirilmesi, geleneksel sürekli olmayan işlemlere göre bir çok avantaj göstermiştir (Anastassiadis vd., 1999-2001).

2.4. Glukonik Asit Fermantasyon Prosesinin Değerlendirilmesi

Tüm fermantasyon proseslerinde olduğu gibi glukonik asit fermantasyonu için de temel besin maddelerinin varlığı, substrat konsantrasyonu, iz elementler, çözünmüş oksijen miktarı, pH ve sıcaklık proses üzerine etkili olan en önemli parametreler olarak değerlendirilebilir. Bu bölümde bu parametrelerin glukonik asit fermantasyonuna etkileri hakkında bilgiler verilecektir.

2.4.1. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Herhangi bir fermantasyon endüstrisinin düzenli çalışması, büyük ölçüde üretim maliyetine bağlıdır ve bu da hammadde seçimi ile ilişkilidir. % 10-15 konsantrasyondaki glukoz, (ya glukoz monohidrat kristalleri ya da fruktoz / dekstroz şurubu biçiminde) % 90-95 verim ile glukonik asit üretimi için ana karbon kaynağı olduğu bilinmektedir. Başlangıç glukoz konsantrasyonu glukonik asidin mikrobiyal büyümesi ve üretimi için oldukça önemli bir parametredir. Yüksek glukoz konsantrasyonunun bakteriyel glukonik asit üretimi için inhibe edici özelliği olduğu bilinmektedir. Kesikli proseslerde başlangıç glukoz konsantrasyonun 20-400 g/L olduğu bir çalışmada *A. pullulans* için glukonik asit üretiminde optimum konsantrasyonun 150 g/L olduğu belirtilmiştir (Anastassiadis vd., 1999).

Ayrıca yapılmış birkaç çalışma fermantasyon ortamındaki yüksek glukoz konsantrasyonlarının glukoz oksidaz enzimini indüklediğini göstermektedir (Petrucchioli ve Federica, 1993; El- Enshasy, 2003).

2.4.2. İz Elementlerin Etkisi

Farklı substratların kullanılması sonucu mikroorganizmaların gelişimi açısından ihtiyaç duyulan bir takım inorganik birleşikler vardır. Bu nedenle, inorganik bileşenlerin dengelenmesi, GA üretimi için ortam hazırlamada önemlidir.

Demir, manganez, magnezyum gibi eser elementlerin uygun konsantrasyonları, ortamdaki azot konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Ortamdaki 3 g/L NH_4Cl e karşılık, demir, manganez ve magnezyum miktarları 0,5 mM ile 3 mM arasında (demir iyonu), 2,5

ile 5 mM arasında (manganez iyonu için) ve son olarak 1 mM ile 2 mM arasında (magnezyum iyonu) olması gerektiği belirtilmiştir (Anastassiadis vd., 1999).

Her mikroorganizma fermantasyon ortamına sahip olduğu özellikler temelinde uyum sağlar. Fermantasyon reaksiyonu için gerekli olan birkaç temel besin vardır. Magnezyum, potasyum ve fosfat tuzlarının varlığı *A.niger* ile olan üretimlerde gereklidir.

A. pullulans suşu ile glukonik asit üretimi için, yaklaşık 3 g/L NH₄Cl içeren bir azot konsantrasyonu ve 1 mM ve 2 mM (magnezyum iyonları) arasında değişen magnezyum iyon konsantrasyonu ile ekonomik bir glukonik asit üretimi gerçekleştirildiği bilinmektedir (Anastassiadis vd., 1999). Ortamdaki metal iyon konsantrasyonuna ek olarak, fosfat konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Her mikroorganizma fermantasyon ortamına sahip olduğu özellikler temelinde uyum sağlar. Fermantasyon reaksiyonu için gerekli olan birkaç temel besin vardır. Magnezyum, potasyum ve fosfat tuzlarının varlığı *A.niger* ile olan üretimlerde gereklidir.

Besin ortamı aynı zamanda, çinko, kobalt, bakır, kalsiyum, iyot, klor, borik asit, sülfat ve molibden iyonlarının yanı sıra tiamin, biyotin, pantotenat ve nikotinik asit ve piridoksin gibi vitaminleri de içermelidir (Anastassiadis vd.,1999).

2.4.3. Oksijenin Etkisi

Oksijen kaynağı mikroorganizmalar için önemli bir parametredir. Oksijen, glukoz oksidaz-katalaz enzim kompleksinin substratıdır ve fungal glukonik asit üretim için en önemli parametre olarak literatürde yer almaktadır. (Hartmeier ve Döppner, 1983; Moresi vd., 1991) Bütün aerobik organizma hücrelerinde var olan katalaz enzimi tarafından suya ve oksijene bozulan yan ürün olan hidrojen peroksit ve FADH₂ formları, glukozun oksidasyonu sonucu glukonolakton aracılığıyla glukonik asit eldesini gerçekleştirmek amacıyla direk elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır.

Oksijen kaynağı ile bağlantılı problemler, özellikle viskoz fermantasyon besi yerlerinde ve yüksek oksijen tüketimine sahip, çok miktarda hücre içeren kültürlerde ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu problemler farklı yollar ile çözülebilir. Basitçe, yüksek çalkalama hızı bu problemleri ortadan kaldırmak için yeterlidir. Çalkalama hızının artması besi yerinde oluşan hava kabarcıklarının daha küçük hava kabarcıklarına dönüşmesi ile gaz

ve sıvı arasında ki ara yüzün artmasına neden olarak havalandırma verimliliğini artırır. Karıştırma hızının artması ile glukoz oksidaz üretiminin arttığı bazı çalışmalarla bildirilmiştir (Zetelaki ve Vas, 1968). Glukoz oksidaz enzim aktivitesinin artması neticesinde glukonik asit üretimi de artacaktır. Hava besleme hızındaki artışla glukonik asit üretim hızının önemli ölçüde arttığı bilinmektedir (Zhang vd., 2016; Dronovat vd., 1995).

Havalandırmanın ana kaynağı olarak atmosferik havadan alınan O₂'nin kullanılmasının yanı sıra saf oksijen, hidrojen peroksit ve yüksek basıncın alternatif olarak uygulandığı durumlar da mevcuttur. Saf oksijen beslenerek glukonik asit üretim hızının hava beslemesine göre 4 kat daha hızlı artmasının yanı sıra (Ikeda vd., 2006) büyüme hızının da yaklaşık 1,5 kat arttığı bilinmektedir (Bankar vd., 2009).

A.niger için optimal glukonik asit üretiminde %90'dan fazla hava doygunluğunun olması gerektiği bilinmektedir (Rehm, 1980).

2.4.4. pH'nın Etkisi

Ortam pH'sı, glukonik asit fermentasyonunun yürütülebilmesi için önemli olan etmenlerden biridir. *A. niger* nötr ortamlarda sitrik asit, glukonik asit ve oksalik asit gibi hafif asitlerin üretimini gerçekleştirebilir. pH 3,5'in altında TCA çemberi aktif hale gelir ve sitrik asit üretimi tetiklenir. Fungal glukonik asit üretimi için gerekli olan glukoz oksidaz enzimi yalnızca nötr pH değerinde aktiftir. *A. niger* ile maksimum glukonik asit üretimi için ortam pH'sı 5,5 olarak verilmiştir (Znad vd., 2004). Franke (1963) yaptığı bir çalışmada glukoz oksidaz enziminin farklı pH ortamlarındaki aktivitesini incelemiştir. Yaptığı çalışmada pH 2 ve 3 için sırasıyla % 5 ve % 35 enzim aktivitesi olduğu belirtilirken, pH 5,6'da % 100 enzim aktivitesi gözlemlendiği ifade edilmektedir.

Genellikle nötralize edici madde olarak fermentasyon ortamına, kalsiyum karbonat veya sodyum karbonat eklenir ve bu durumda glukonik asidin çoğunluğu glukonat forma dönüşür. Dikkat edilmesi gereken nokta, kalsiyum glukonatin (30 °C 'de % 4) ve sodyum glukonatin sudaki çözünürlüğüdür (30 °C'de 36 g/L). CaCO₃'in olmadığı duruma göre, CaCO₃ varlığında *A. niger* miseli içerisinde glukoz oksidaz enziminin birikimi gerçekleşmektedir (Hatzinikolaou ve Macris, 1995; Rogalski vd., 1988).

2.4.5. Sıcaklığın Etkisi

Mikroorganizmanın iç sıcaklığının ortam sıcaklığına eş olması gerektiği bilinmektedir. Mikrobiyal aktivitenin çevre sıcaklığına karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir.

A. niger, *Penicillium janthinellum*, *P. luteum*, *P. purpurogenum*, *Z. mobilis* gibi mikroorganizmaların kullanıldığı fungal proseslerde, uygun sıcaklığın 24-32 °C, özellikle 29-30 °C'nin ideal sıcaklık olduğu literatürde belirtilmiştir (Anastassiadis, vd., 1999; Scopes vd., 1988). Optimum sıcaklıkta yüksek GA üretiminin gerçekleşmesi, ortamdaki enzim aktivitesinin artması ve enzim salgılanması ile açıklanabilir.

2.5. Fermantasyon Ortamından Glukonik Asitin Kazanımı

Ham fermantasyon çözeltilerinden elde edilen glukonik asit, çoklu saflaştırma basamaklarına tabi tutulur. Biyokütlenin uzaklaştırılması (filtrasyon), aktif karbon muamelesi (dekolorizasyon), buharlaştırma (konsantre etme), kristalizasyon (saflaştırma) işlemleriyle yüksek saflıkta glukonik asit eldesi mümkündür (Anastassiadis ve Morgunov, 2007).

Esasen bu basamakları ikiye ayırabiliriz. İlk adımda biyokütlenin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır. Bu adımda biyokütlenin ortamdan uzaklaştırılma işlemi çapraz akışlı mikrofiltrasyon tekniği ile gerçekleştirilir. Filtrede kalan biyokütle, mikroorganizmanın ölmesi için buhar verilerek veya ısıtılarak temizlenmelidir. Diğer adım ise sıvı ortamdan glukonik asit kazanılmasıdır. Filtrasyon işlemi sonrasında iyon değiştirici kolonlar kullanılır. Nihai ürünün kalitesini düşüren inorganik maddeler ortamdan anyon ve kation değiştirici reçineler vasıtasıyla uzaklaştırılır. Daha sonra glukonik asit içeren çözelti vakum altında buharlaşmaya tabi tutularak konsantre glukonik asit elde edilir. Nihai ürün olarak elde edilen glukonik asit nötralizasyon, kristalizasyon, filtrasyon, santrifüj ve kurutma gibi basamaklardan geçerek gerekli metallerin de ilavesiyle farklı glukonatlar elde edilir.

Günümüzde, sodyum glukonat glukonik asidin esas imal şeklidir. Serbest glukonik asidin iyon değiştiriciler yardımıyla sodyum tuzundan hazırlandığı bilinmektedir. (Kubicek vd., 2010) Sodyum glukonat, pH'ın 7,5'e yükseltilmesi ile % 45'e (ağırlık/hacim) çözelti konsantre edildikten sonra çökeltirilir. Kation değiştirici ve elektrodiyaliz ile

sodyum tuzlarından glukonik asit eldesi gerçekleştirilir. Daha sonra güçlü bir anyon değiştirici reçine kullanılarak glukonatın adsorplanması sağlanır (Hustede vd., 1989).

Bunun yanı sıra Glukona-1,5 lakton 36 °C ve 57 °C’de doğun sulu glukonik asit çözeltilisinden kristalize edilebilir. Kristalizasyon işlemi 2 basamakta gerçekleştirilir, birinci adımda doğun glukonik asit çözeltilisi 65-75 °C ye kadar ısıtılarak kristalin süspansiyonu (% 3-10 kristalin materyali) sağlanır, ikinci adımda ise kontrollü olarak 40-45 °C ye kadar soğutma işlemi gerçekleştirilerek kristalizasyon işlemi tamamlanmış olur (Hustede vd., 1989).



3. ŞEKER PANCARI MELASI VE KÜSPESİ HAKKINDA GENEL BİLGİ

Dünyada 2013/14 pazarlama yılı itibariyle şekerin % 80'i kamıştan, % 20'si pancardan üretilmektedir. Dünya şeker üretimini yıllara göre dağılımı Tablo 3.1'de verilmiştir. Kamış ve pancardan elde edilen şekerler arasında kalite bakımından bir farklılık bulunmadığı bilinmektedir. Türkiye'de sakaroz kökenli ve nişasta kökenli olmak üzere iki tür şeker üretimi mevcuttur. Sakaroz kökenli olarak pancar şekeri üretimi yapılırken, nişasta kökenli olarak glukoz şurubu, izoglukoz, (yüksek fruktozlu mısır şurupları) ve kristal fruktoz üretimi yapılmaktadır. Ülkemiz pancar şekeri üreten ülkeler arasında dünya da dördüncü, Avrupa'da ise Almanya ve Fransa'dan sonra gelen üçüncü ülkedir. Şeker pancarının kimyasal içeriği Tablo 3.2'de verilmiştir. Üretimin % 70 i Orta Anadolu bölgesinde gerçekleşmektedir. Ülkemiz şeker sektörünün yıllık ekonomik büyüklüğü 3 Milyar \$ olup, dünya pancar şekeri üretimindeki payı, 2012/13 dönemi itibariyle % 6'dır (Anonim 4).

Türkiye, tarih boyunca çeşitli uygarlıklara ev sahipliği yapmış bir coğrafyadır. Bu uygarlıklarda tarımsal faaliyetler, bölgenin iklim çeşitliliği nedeniyle çeşitli alanlarda yoğun bir şekilde yapılmıştır. Tarımın Türkiye ekonomisindeki önemi nispeten azalmış olmakla birlikte, yurt içi gıda gereksiniminin karşılanması, sanayi sektörüne girdi temini, ihracat ve yarattığı istihdam olanakları açısından halâ büyük önem taşımaktadır. Bir dönem ülke tarımında önemli bir yere sahip olan şeker pancarının, yurt dışından daha ucuza şeker temin edilmesi nedeniyle tarımının önemli seviyelerde azaldığı görülmektedir. Öte yandan şeker fabrikasyonu sırasında elde edilen melas ve küspe gibi yan ürünlerin fermantasyon ve yem sanayinin önemli girdileri olması nedeniyle, pancar tarımının ülke ekonomisi açısından büyük öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

Tablo 3.1. Dünya Şeker Üretimi (Milyon ton) (Tosun, 2015)

	1970'ler	1980'ler	1990'lar	2000'ler	2013/14	2014/15	2014/15
Dünya Üretimi	81,9	101,8	118,4	140,2	171,4	171,2	163,9
Pancardan	32,6	37,9	37,4	32,0	33,8	36,4	32,7
Kamıştan	49,3	63,9	81,0	108,2	137,6	134,8	131,2
Kamış Şekeri Payı %	60,2	62,8	68,4	77,2	80,3	78,7	80,1

Tablo 3.2. 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

3.1. Pancardan Şeker Üretimi

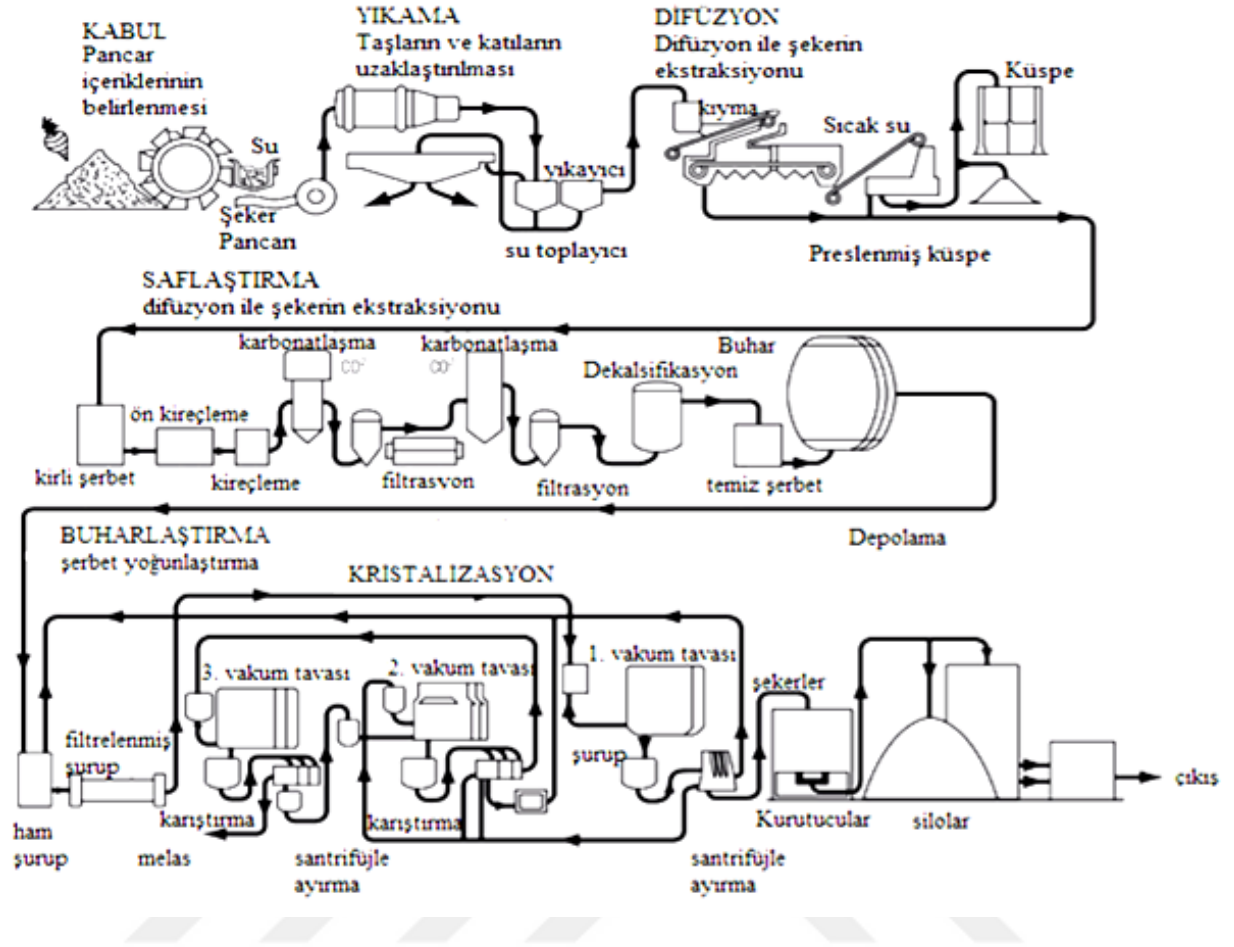
Çiftçiden alınarak fabrikaya sevk edilen pancar, tartımı yapıp toprak firesi hesaplandıktan sonra silolara boşaltılır. Boşaltma işlemi basınçlı suyla veya mekanik boşaltma ile gerçekleştirilir. Silolarda bulunan pancar, yüzdürme kanallarıyla fabrikaya sevk edilir. Bu kanallar sayesinde pancar içinde bulunan otlar ot tutucuda, taşlar ise taş tutucuda ayrışır. Kısmi temizlikten sonra döner kollu yıkama teknesinde 10-15 dakika kadar yıkanır. Yıkama teknesinin tabanında bulunan süzgeç sayesinde kum, çamur ve bulunan yabancı maddelerin temizlenmesi sağlanmaktadır. Daha sonra kıyım makinelerine alınan pancar, hücre dokusu bozulmadan kıyma işlemine tabii tutulur. Kıyılan pancar tartımı alındıktan sonra haşlama ünitelerine verilir. Burada kule difüzöründen çekilen sirkülasyon şerbet ile kıyılan pancarlar ısıtılarak difüzyon sıcaklığı olan 70-72 °C'ye getirilip, pancar hücrelerinin denatürasyonu sağlanarak şeker çıkışının aktif hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Haşlama teknesinde şerbet ile karıştırılan pancarlar difüzyon kulesinin alt süzgecine basılır ve burada ters akım prensibine göre su ile şekerin ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Ters akım prensibine göre çalışan difüzörde pancar posası (küspe) içindeki şekeri çözen sıcak su ile prese suyu difüzörün posa giriş tarafındaki süzgeçten ham şerbet olarak çıkar. Daha sonra birinci kireçleme ünitesine gelen ham şerbet, içindeki şeker dışı maddelerin kireç sütü ile pH 11 e getirilerek çöktürülmesi ile süzülüp ikinci kireçleme ünitesine girer. Bu üniteye pH 12,6 ya çıkarılarak 10-15 dakikalık süre zarfında bakteri faaliyetlerini durdurmak ve şerbet içerisindeki invert şekerleri parçalamak

amaçlanmaktadır. Bu üniteden sonra ham şerbet 1. karbonatlama ünitesine girer. Yine ters akım prensibiyle şerbet üstten karbondioksit gazı alt kısımdan verilerek, şerbet pH 10,8-11,2 arasında bu üniteyi terk eder.

Çamurlu şerbet, dekantörde yoğunluk farkı dolayısıyla çamurun dibe çökmesi ile çöktürülür. Daha sonra pompa yardımıyla döner ya da pres filtrelele gönderilen çamur, şerbetten ayrılır. Süzölüp ısıtılan şerbet 2. karbonatlama ünitesine basılır. Filtre edilen şerbet içinde kalan kirecin alınabilmesi için bu ünite, 92-95 °C de filtrelerden süzölerek sulu şerbet elde edilir. Sulu şerbetin koyulaştırıldığı bölüm olan buharlaştırma ünitesinde, kademeli olarak basınç düşürölür ve şerbetin kaynaması kolaylaşır. Pişirilmeye uygun hale geldiği için rafineriye yollanır.

Rafineride ki ilk iş % 60-65 kuru maddeli şerbetin süzölmesidir. Bu işlem için basınçlı filtrelele kullanılmaktadır. Süzme işlemi sonunda akış tersi yönünde hava-su karışımı verilerek temizlenme işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra şeker pişirme ünitelerine geçilir. Pişirim için gerekli olan şurup buharlaştırılarak aşırı doygun hale gelinceye kadar koyulaştırılır. Aşırı doygun hale gelen şuruba pudra şekeri maya olarak verilerek kristal taneler oluşturulur.

Lapanın kuru maddesi % 92-94'e gelince pişirme işlemine son verilir. Lapa içerisindeki şekerin yaklaşık % 50'si kristal kalıntı, diğler %50'si sıcaklık yüksek olduğu için sıvı haldedir. 40-45 °C deki lapa kristalizasyon işlemi bittikten sonra 800-1000 d/dk hızla santriföljenerek şurup ve kristal şekere ayrılır. Ayrılan bu şuruba, artık şurup veya yeşil şurup adı verilir. İlk elde edilen şekere I ham şeker bundan sonra elde edilen şekerlele sırasıyla II ve III ham şeker denir. Ham şeker % 96 oranında şeker % 1-2 oranında su, % 1 kül ve % 2 diğler maddeleri içerir. Rengi sarımtırak olup kristal büyüklüğü 2-4 cm arasındadır. Şekerin nötr pH'da olması mikroorganizma, etkinliğini arttırdığından ve şekerin inversiyona uğramasına neden olduğundan pH bazik tarafta tutulur (Yaşar, 2003; Anonim 5). Şeker üretim prosesi Şekil 3.1'de verilmiştir. Şeker pancarının şeker üretimi ve hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra biyopolimer, biyoyakıt, farmasotik maddelerin üretimi gibi proseslerde substrat olarak değlerlendirildiği de bilinmektedir (Khardenavis vd., 2009).



Şekil 3.1. Şeker üretim prosesi (Anonim 6)

3.2. Köspe

Şeker fabrikalarında yan ürün olarak bertaraf edilmesi bir hayli güç olan, yüksek miktarda melas ve köspe oluşmaktadır (Nigam ve Vogel, 1991; Anonim 4). Düşük ekonomik değere sahip olan köspe doğrudan veya melas ile karıştırılarak hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (Olmos ve Zuniga-Hansen, 2012; Michel, 1988). Köspe, kuru ağırlığının yaklaşık % 22-24'ü selülozdan, % 30'u hemiselülozdan ve %15-25'lik kısmı da pektinden oluşan bir polisakkarittir (Sun ve Hughes, 1998; McCready, 1966). Kösphenin kimyasal yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir. Ayrıca yüksek miktarda “düşük enerjili besinsel lif” içermesi, nişasta ve fitat içermemesi nedeniyle buğday kepeğiyle kıyaslandığında önemli bir lif kaynağı olarak kabul edilmektedir (Bertin vd., 1988). Üretim miktarı işlenen pancar miktarı ile paralellik göstermektedir.

Daha öncede söylendiği gibi kamış ve pancardan elde edilen şekerler arasında kalite bakımından bir farklılık bulunmamasına rağmen, fabrikasyon yan ürünü olan melasın kimyasal bileşimleri oldukça farklıdır. Tablo 3.3’de bu farklılıklar gösterilmiştir. Bu farklılıklardan en önemlisi % 51 sakkaroz içeren pancar melasında toplam indirgen şeker (glukoz+fruktoz) miktarı % 1’in altında iken, kamış melasında % 30’dur.

Yaklaşık % 50 şeker içeren melas, ekmek mayası üretiminde, ilaç sanayinde, sirke yapımında, briket kömür imalinde, inşaat harçlarında, kozmetik sanayinde ve doğrudan hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Yaşar, 2003; Anonim 4). Ayrıca melasın özellikle alkol üretimi (Nurhayati vd., 2016; Taskin vd., 2016; Tosun, 2015) ve biyopolimer üretimi (Lazaridou vd., 2002; Kalogiannis vd., 2003) gibi fermentasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak kullanıldığı da bilinmektedir.

Tablo 3.3. Pancar ve Kamış Melası İçerikleri (Olbrich, 1963)

Bileşenler	Pancar Melası(%)	Kamış Melası (%)
Su	16,5	20,0
Organik Bileşikler		
Şekerler:	53,0	62,0
Sakkaroz	51,0	32,0
Glukoz	<0,1	14,0
Fruktoz	<0,1	16,0
İnvert Şeker Toplamı	1,0	30,0
Rafinoz	1,0	-
Şeker olmayan bileşikler: azotlu maddeler, serbest ve bağlı asitler	19,0	10,0
İnorganik Bileşikler	11,5	8,0
SiO ₂	0,1	0,5
K ₂ O	3,9	3,5
CaO	0,26	1,5
MgO	0,16	0,1
P ₂ O ₅	0,06	0,2
Na ₂ O	1,3	
Fe ₂ O ₃	0,02	
Al ₂ O ₃	0,07	
Soda ve karbonat kalıntıları (CO ₂)	3,5	
Sülfat kalıntıları (SO ₂ olarak)	0,55	1,6
Klorürler	1,6	0,4
Toplam	100,0	100,0

4. GLUKONİK ASİT ÜRETİMİ KONUSUNDA YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR

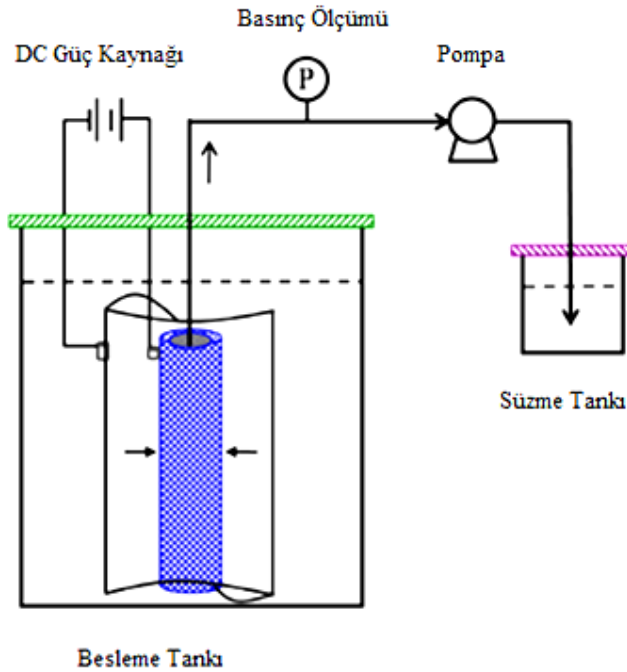
Glukonik asit üretim yöntemleri, daha önce genel olarak kimyasal kataliz ve enzimatik kataliz yöntemleri olarak ikiye ayrılmıştı. Bu nedenle glukonik asit üretimi konusunda yapılan çalışmalar verilirken önce kimyasal kataliz yöntemleriyle glukonik asit üretimine ilişkin çalışmalardan bahsedilecektir. Literatürdeki kimyasal kataliz yöntemleriyle glukonik asit üretimi konusunda yapılan bir patent çalışmasında paladyum-bizmut katalizörü aktif karbon ile desteklenerek alkali çözeltilerde, oksijen ile yükseltgenerek glukozdan glukonik asit üretiminin gerçekleştirildiği açıklanmıştır. Çalışmada ortam pH'sı 10, çalışma sıcaklığının 50-55 °C olduğu şartlarda % 2 paladyum/aktif karbon ve ağırlıkça % 10 glukoz çözeltisi kullanılarak 5-8 saat arasında optimum glukonik asit üretiminin gerçekleştirildiği belirtilmektedir. % 99'a varan glukoz dönüşümünün gerçekleştirildiği bu çalışmada, taşıyıcı karbonun hazırlanmasında önce bizmutu daha sonra paladyumu adsorbe ettiği belirtilmiştir (Saito vd., 1989).

Yapılan başka bir çalışmada, elektrokatalitik reaktör kullanılarak glukozun glukonik aside oksidasyonu incelenmiştir. Elektrokimyasal reaktörün, katot olarak paslanmaz çelik ağ ve anot olarak da nano MnO₂ yüklenmiş boru biçiminde gözenekli bir titanyum (Ti) elektrot (MnO₂/Ti elektrot) olduğu belirtilmektedir. Reaktörün şematik yapısı Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu sistemde glukoz oksidasyonuna, MnO₂ yüklemenin, pH değerinin, glukoz konsantrasyonunun, reaksiyon sıcaklığının, bekleme süresinin ve akım yoğunluğunun etkisi incelenmiştir. Belirli çalışma koşulları altında % 98 dönüşüm gerçekleştiği belirtilmiştir. Toplam glukozdan GA üretiminde MnO₂ yüklemesi arttıkça dönüşümün arttığı fakat MnO₂ yüklemesinin ağırlıkça % 4,5 üstüne çıkıldığında dönüşümün azaldığı ifade edilmektedir. Elde edilen glukoz dönüşümlerinin, asidik veya alkali koşullardan bağımsız bir şekilde % 90'dan yüksek bir seviyede olduğu belirtilmektedir (Bin vd., 2014).

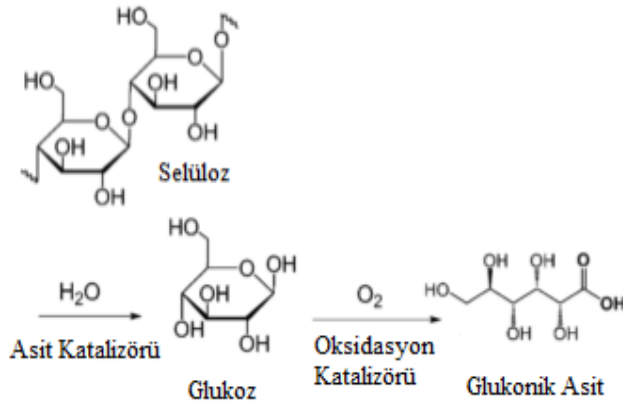
Oksijen basıncı altında, su içerisinde selüloz/sellebiyozlardan direk glukonik asit eldesi mümkündür. Hidroliz ve oksidasyon reaksiyonlarının birleştirildiği bu proseslere yönelik çalışmalar ise oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmalar arasında, duvarlarına pristin ve nitrik asit fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüp destekli altın nanopartiküller (Tan vd., 2009) ya da Keggin-tipli poliozometalatlar kullanılarak GA üretiminin sağlanabileceği belirtilmektedir (An vd., 2012).

An. vd. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada, poliokzametalat destekli altın nanopatiküllerin katalizör olarak kullanılarak oksijen varlığında su içerisinde selüloz ve sellebiyozlardan glukonik asit üretimini araştırmışlardır. Dönüşüm mekanizması Şekil 4.2’de verilmiştir. Çalışma sonunda 415 K sıcaklıkta, 11 saat sonunda GA üretim veriminin % 85 olduğu belirtilmiştir.

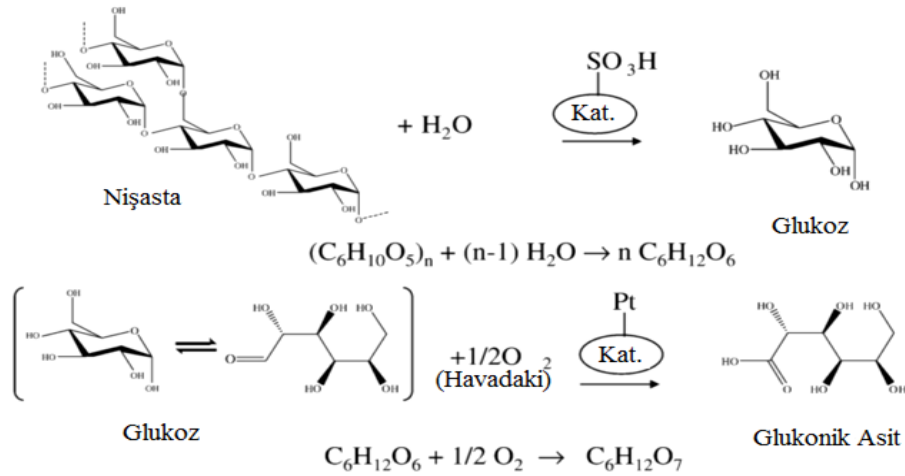
Başka bir çalışmada, Onda vd. (2011) sülfonatlanmış karbon destekli platin kullanarak selülozların glukonik aside oksidatif dönüşümünü araştırmışlardır. Yeni bir yaklaşım barındıran bu yöntemde glukonik asit, bifonksiyonel sülfone aktif karbon destekli platin ($Pt/AC-SO_3H$) katalizörü kullanılarak atmosferik şartlarda sulu çözeltide tek bir adımda 393 K’de, nişasta gibi polisakkaritlerden üretilmiştir. Şekil 2.3’de oksidasyon mekanizması gösterilmiştir. ($Pt/AC-SO_3H$) Pt/AC ’nin sülfatlanması ve AC üzerine platin emdirilmesi ile hazırlanmıştır. Çalışmada katalizörün suya son derece dayanıklı olduğu ve polisakkaritlerin sıcak suda hava oksidasyonu ile glukonik aside dönüşümünün gerçekleşebileceğini göstermişlerdir (Onda vd., 2011).



Şekil 4.1. Elektro katalitik reaktör sistemi (Bin vd., 2014)



Şekil 4.2. Selülozdan hidroliz ve oksidasyon işlemleriyle glukonik asit eldesi (An vd., 2012)

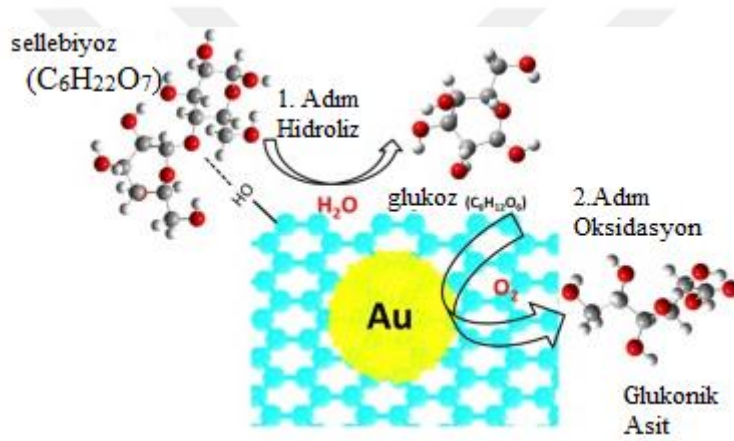


Şekil 4.3. Pt / AC-SO₃H katalizörü ile nişastanın glukonik aside dönüştürülmesi (Onda vd., 2011)

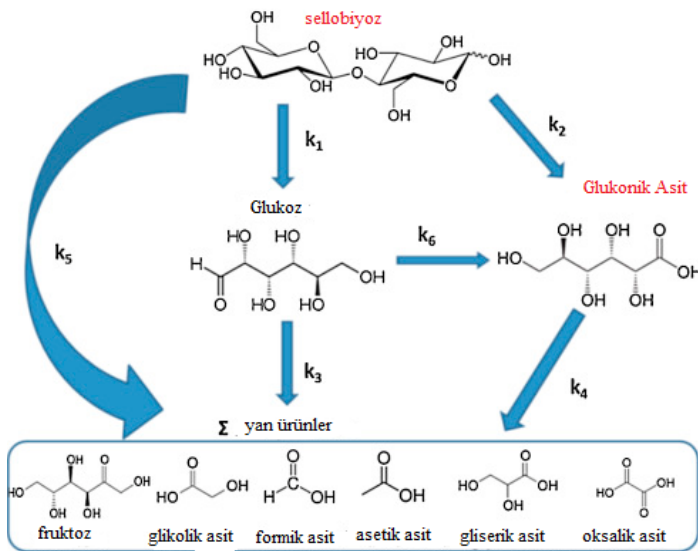
Eblagon vd. (2016) yapmış oldukları bir çalışmada, aktif karbon destekli bi fonksiyonel altın katalizör kullanarak sellobiyozların glukonik aside oksidasyonunu incelemişlerdir. Fonksiyonelleştirilmiş karbon kserojel üzerine ağırlıkça % 1 Au içerecek şekilde altın yüklenerek aktif ve seçiciliği yüksek bifonksiyonel bir katalizör elde edilmiştir. Şekil 4.4’de katalizörün kullanımıyla gerçekleşen hidroliz ve oksidasyon adımları gösterilmektedir. Su içersinde 418 K ve 5 bar oksijenin bulunduğu ortam şartlarında, sadece 75 dakika gibi kısa bir zaman içerisinde % 80 seçicilik ile GA üretimini gerçekleştirmeyi başardıklarını açıklamışlardır. Dönüşüm sırasında formik asit, glikolik

asit, fruktoz, asetik asit, gliserik asit ve oksalik asitin de olduğu belirtilerek Şekil 4.5’de gösterilen kinetik model önerilmiştir.

Oldukça yeni bir çalışmada Amaniampong vd. (2014) tarafından geliştirilen yöntem de ise Au ve TiO₂ arasında bir etkileşim oluşturularak, % 92 sellobiyoz dönüşümü ve % 71 GA seçiciliği ile yüksek GA veriminin elde edildiği bir yöntem önerilmektedir (Amaniampong vd., 2014). Yine aynı araştırmacıların yaptıkları bir çalışmada bimetalik Cu-Au/TiO₂ katalizörü kullanılarak umut verici sonuçlar elde edildiği ifade edilmektedir (Amaniampong vd., 2015).



Şekil 4.4. Aktif karbon destekli altın katalizörü ile sellobiyozların glukonik aside dönüşümü (Eblagon vd., 2016)



Şekil 4.5. Sellobiyozların glukonik aside oksidatif dönüşümünün kinetik modeli (Eblagon vd., 2016)

Diğer bir üretim yöntemi olan enzimatik kataliz yöntemlerinde kullanılan mikroorganizmaların çeşitli karbonhidrat kaynaklarında gelişebilmeleri nedeniyle tarım ve gıda endüstri yan ürünleri, glukonik asit fermantasyonu için ekonomik bir karbonhidrat kaynağı olarak kabul edilir. En önemli tarım-gıda endüstri yan ürünleri arasında, yüksek oranda şeker içeren şeker kamışı/pancarı melası ve üzüm şırası gelir. Bunların yanı sıra alternatif karbonhidrat kaynakları olarak mısır nişastası, üzüm şırası, muz şırası, gıda işleme artıkları, incir, peynir altı suyu, pancar melası ve şekerleştirilmiş atık kağıt çözeltisi de kullanılabilir (Kundu ve Das, 1984; Roukas ve Harvey, 1988; Buzzini vd., 1993; Rao ve Panda, 1994; Roukas, 2000; Fischer ve Bipp, 2005; Singh vd., 2005; Ikeda vd., 2006). Tablo 4.1’de GA üretimi amacıyla araştırılmış bazı karbonhidrat kaynakları verilmiştir.

Glukonik asit üretimi daha önce de belirtildiği gibi bakteriler ve funguslar ile gerçekleştirilir. Bakteriyel glukonik asit üretiminde Asetik asit bakterileri (AAB) ve *Pseudomonas savastanoi* kullanılan ilk kültürlerdir. Daha sonraları *Pseudomonas ovalis*, (Bull ve Kempe, 1970; Tsao ve Kempe, 1960) *P.fluorescens* (Haug vd., 1990), *P. acidovorans* (Haug vd., 1990), *P. putida* (Haug vd., 1990), *P.rubra* (Haug vd., 1990), *Streptococcus acidovorans* (Haug vd., 1990), *Streptococcus faecium* (Haug vd., 1990), *Acetobacter methanolicus* (Loffhagen ve Babel, 1993) *Azospirillum brasiliense*, (Rodriguez vd., 2004) *Zymomonas mobilis* (Kim ve Kim, 1992; Haug vd., 1990; Mattey, 1992), *Acetobacter diazotrophicus* (Attwood vd., 1991) gibi bakterilerle de çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca *Acetobacter methanolicus* suşunun glukozu glukonik aside katalizlediği de bilinmektedir. Bu mikroorganizmanın kullanımındaki en önemli avantaj, bu suşun diğer bakterilerin aksine substrat olarak metanolü metabolize edebilmesidir. Böylece ortamdaki glukoz, mikroorganizmanın büyümesi için kullanılmayarak teorik verim katsayısı artacaktır (Ramachandran vd., 2006).

Tsao ve Kempe (1960) *Pseudomonas ovalis* tarafından glukozun glukonik aside dönüşümü sırasında oksijen transferine yönelik çalışmalarda bulunmuştur. Çalışma sonunda oksijen transferinin dönüşüm hızını etkileyen bir parametre olduğunu, hücre konsantrasyonu ve oksijen transfer hızı arasında lineer bir ilişki olduğunu belirtmiştir.

Zymomonas mobilis’in kullanıldığı bir çalışmada, eş zamanlı olarak glukozdan glukonik asit, fruktozdan sorbitol üretimi araştırılmıştır. Toplam şeker konsantrasyonunun

Tablo 4.1. Mikrobiyal Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretiminde Kullanılan Karbon Kaynakları (Rodríguez vd., 2016c)

Karbon kaynağı	Mikroorganizma veya kullanılan enzim	Kültür metodu	Substrat ön işlemi	GA verimi (%)	Referans
Mısır nişastası	<i>A.niger</i> ORS-4	Kesikli kültür/yüzey fermantasyonu	Yok	24,39	Singh ve Singh, 2002
	İmmobilize <i>A.niger</i> JCM 5549	Kesikli kültür/derin fermantasyon	Hidroliz	35,92	Matsui vd., 2013
Nişasta	İmmobilize glukoamilaz ve glukoz oksidaz (<i>A.niger</i> dan)	Kesikli kültür/derin fermantasyon	Hidroliz	82,00	Zhao vd., 2014
Lignoselülozik biyokütle	<i>A.niger</i> SIIM M276	Kimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit(CRGO) Kesikli kültür /derin fermantasyon	Hidroliz	94,83	Zhang vd., 2016
Şeker kamışı melası	<i>A.niger</i> ORS-4	Kesikli kültür/yüzey fermantasyon	Yok	8,27	Singh ve Singh., 2002
			Temizleme	38,47	
	<i>A.niger</i> ORS-4410(mutant)	Kesikli kültür/derin fermantasyon	Yok	15,30	Singh vd., 2005
	<i>A.niger</i> ARNU-4 (mutant)	Kesikli kültür/katı hal fermantasyon	Temizleme	61,30	Sharma vd., 2008
			Yok	85,20	
Peynir altı suyu	<i>A.niger</i> NCIM 548	Kesikli kültür/derin fermantasyon	Deproteinizasyon	69,00	Mukhopadhyay vd., 2005
				92,00	
	İmmobilize <i>A.niger</i> NCIM 548	Kesikli kültür/derin fermantasyon			
Atık kağıt	<i>A.niger</i> IAM 2094	Kesikli kültür/derin fermantasyon	Hidroliz	84,84	İkeda vd., 2006
İncir	<i>A.niger</i> ATCC 1057	Kesikli kültür/katı hal fermantasyon	Sterilizasyon	63,00	Roukas, 2000
		Kesikli kültür/yüzey fermantasyonu	Ekstraksiyon/sterilizasyon	79,70	Roukas vd., 2002
Üzüm şırası	<i>A.niger</i> ORS-4410(mutant)	Kesikli kültür/derin fermantasyon	Yok	60,40	
			Rektifikasyon	80,60	
	İmmobilize <i>A.niger</i> ORS-4410	Yarı kesikli kültür/derin fermantasyon	Rektifikasyon	89,50	Singh, 2008
Çilek püresi	<i>G. japonicus</i> CECT 8443	Kesikli kültür/derin fermantasyon	pastorizasyon	95,00	Rodríguez vd., 2016a; 2016b; 2015

(300 g/L glukoz ve 300 g/L fruktoz) % 60'ından 15 saat içinde, 290 g/L sorbitol ve 283 g/L glukonik asit üretimi gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Prosesin kesikli olarak tolüenle muamele edilmiş serbest hücreler tarafından gerçekleştirildiği vurgulanmıştır. Sürekli bir proseste immobilize hücreler kullanılarak 120 saat sonra enzim aktivitesinin % 5 den çok daha az miktarda kayba uğradığı da açıklanmıştır (Chun vd., 1988).

Başka bir çalışmada, 20 L mekanik karıştırırmalı reaktörde çalışma hacmi 12 L olarak belirlenmiş, *Pseudomonas fluorescens* AR4 suşu vasıtasıyla mısır nişastası hidrolizatından 2-ketoglukonik asit (2KGA) üretimi araştırılmıştır. 30 °C sıcaklık, % 2 inokulum miktarı, pH 5,0-6,5 beslenen glukoz konsantrasyonu 180 g/L olarak belirlenen kesikli ortam şartlarında optimum üretimin 16 saat içerisinde gerçekleştiği belirtilmektedir. Bu şartlarda 135,92 g/L konsantrasyonunda ve 8,83 g/L.st hacimsel verimlilikle üretim verimliliğinin 0,95g KGA/g glukoz olarak elde edildiği ifade edilmektedir (Sun vd., 2013).

Gluconabacter Oxydans tarafından glukonik asit üretimi gerçekleştirildiği bir çalışmada, sıcaklık 32 °C, havalandırma hızı 2 ml/ml.dk, çalkalama hızı 1000 d/dk olarak belirlenen ortam şartları altında pH kontrolü yapılmaksızın maksimum spesifik büyüme hızı, 0,39 st/L, hacimsel verimlilik 53 mmol/st ve maksimum dönüşümün % 90,4 olarak elde edildiği belirtilmektedir (Velizarov vd., 1998).

Başka bir çalışmada *Gluconobacter oxydans*'ın 4 suşu (ATCC 621H, DSM 3503, DSM 3504, NCIMB 8084) ile glukozdan ketoglukonatların üretimi araştırılmıştır. Vahşi tipe kıyasla mutant suşların, endüstriyel olarak ketoglukonat üretiminde yüksek verim gösterdiği belirtilmiştir. Vahşi suş 24 saatte 85,5 mM GA üretimi gerçekleştirirken, mutant suşların 93 mM GA üretimi gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Elfari vd., 2005).

Fungal glukonik asit üretimi amacıyla yapılan çalışmalarda, *Penicillium luteum*, (Curie vd., 1931) *P. Variabile*, (Petruccioli vd., 1994) *Aspergillus niger* (May vd. 1934; Moyer 1940; Stubbs vd.1940; Wells vd. 1937), sıklıkla kullanılan funguslar arasında yer almaktadır. *Aspergillus niger* işleme kolaylığı, yüksek verim sağlaması, mayalanma yeteneği, ucuz ve kolay bulunması gibi özelliklerinden dolayı fermentasyon işlemlerinde en çok çalışılan ve yaygın olarak kullanılan bir mikroorganizma olmakla birlikte glukonik asit üretimi için de oldukça sık kullanılan bir mikroorganizmadır (El-Enshasy, 2003; Roukas, 2000; Sankpal vd., 1999; Sankpal vd., 2002; Kazemi ve Papari, 2013). Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* (Kapat vd., 2001), *Aureobasidium pullulans* (Anastassiadis vd.,

2005), *Tricholoma robustum* (Iwase, 1991), *Candida tenuis* (Haug vd., 1990), *Talaromyces flavus* (Kay vd., 1990), *Phanerochaete chrysosporium* (Kelly vd., 1986), *Penicillium chrysogenum* (Richter, 1983; Ramachandran vd., 2006), *Penicillium notatum* (Richter, 1983; Ramachandran vd., 2006), *Penicillium glaucum* (Richter, 1983; Ramachandran vd., 2006), *Penicillium luteum purpurogenum* (Mattey, 1992) gibi funguslarla da glukonik asit üretim çalışmalarının yapıldığı bilinmektedir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında fungusların gerek glukoz gerekse çeşitli biyokütlelerden glukonik asit üretimi için yaygın olarak araştırılan mikroorganizma grubu olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, bazı yerel mantarlar ile derin fermentasyonda glukonik asit üretimi araştırılmış ve en fazla üretimin *Aspergillus niger* ile 58 g/L olarak, % 14 (ağırlık/hacim) glukoz konsantrasyonu, pH değerinin 6, ortam sıcaklığının 30 °C, inkübasyon süresinin 7 gün olduğu şartlarda elde edildiği belirtilmektedir. Bu çalışmada klasik optimizasyon uygulanmış pH, sıcaklık, çalkalama hızı, inkübasyon süresi, karbon kaynakları, fermentasyonda kullanılan erlenlerin boyutu, glukoz konsantrasyonunun yanı sıra azot, pepton, magnezyum sülfat, potasyum dehidrojen fosfat ve potasyum klorür konsantrasyonunun glukonik asit üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Derin fermentasyon ile kesikli şartlar altında gerçekleştirilen bu çalışmada başlangıç konsantrasyonu % 10 (ağırlık/hacim) olarak belirlenen farklı karbon kaynaklarından glukoz 60 g/L glukonik asit verimi sağlarken, sakkarozun yaklaşık 40 g/L glukonik asit verimi sağladığı ifade edilmiştir (Shindia vd., 2006).

Singh vd. (2003) yaptıkları bir çalışmada çeşitli fermentasyon şekilleriyle *Aspergillus niger* tarafından glukonik asit üretimini incelemişlerdir. Çalışmada derin fermentasyon, yarı katı hal fermentasyonu, yüzey fermentasyonu ve katı hal fermentasyonu yöntemleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada optimum şartlar glukoz konsantrasyonu için 120 g/L, pH 6,6, sıcaklık 30 °C ve inokulum oranı % 2 olarak belirlenmiştir. Bu şartlar altında glukonik asit üretiminin katı hal fermentasyonunda 106,5 g/L, yüzey fermentasyonunda 62 g/L, yarı-katı hal fermentasyonda 86 g/L ve derin fermentasyonda 85,9 g/L olduğu belirtilmektedir.

Curie vd. (1931) yaptıkları patent çalışmasında *Penicillium luteum* ve *A. niger* kullanarak derin fermentasyonda glukonik asit üretimini araştırmışlar ve glukonik asit veriminin 48-60 saat içinde % 90'a çıktığını belirtmişlerdir. Bu çalışma mevcut endüstriyel glukonik asit üretim prosedürü olarak bilinmektedir. Başka bir çalışmada %15 glukoz

içeren ortamda, *Penicillium puberulum* tarafından % 3 CaCO₃ ilavesi ile pH 6,1'e ayarlanarak 7 gün içerisinde glukozdan % 91 glukonik asit dönüşümü gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Elnagy vd., 1975).

Glukozdan glukonik asit üretimi için tercih edilen fermantasyon çeşitlerine bakıldığında, katı hal fermantasyonunun diğer fermantasyon türlerine göre, daha etkili olduğu görülmektedir. Buna karşın katı hal fermantasyon ile yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Buna neden olarak katı destek materyalinin ortamdan uzaklaştırılması, fermantasyonun daha uzun ve yavaş ilerlemesi gösterilebilir. Yapılan bu çalışmalardan birinde, incirden katı hal fermantasyonu ile *Aspergillus niger* kullanarak glukonik asit üretimini araştırmışlardır. % 63 lük bir verimle, 1 kg kuru incir için 490 gr maksimum glukonik asit 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'nın 7 olduğu ve ortam sıcaklığının 30 °C olarak belirlendiği bu çalışmada fermantasyon süresi 15 gündür. Şeker kullanımı % 90 olan bu çalışmada, substrata % 6 metanol ilavesi ile glukonik asit konsantrasyonu 685 g/kg'a, sitrik asit konsantrasyonunu ise 96 g/kg'a yükseldiği belirtilmiştir (Roukas vd., 2000).

Yine Roukas vd. (2002) kuru incirden *Aspergillus niger* ATCC 10577 suşu kullanılarak yüzey fermantasyonu ile sitrik asit ve glukonik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum sitrik asit ve glukonik asit konsantrasyonlarının sırasıyla 20,5 ve 97,0 g/L olduğu belirtilmiştir. Sitrik asit veriminin %12 olarak bulunduğu ortamda başlangıç şeker konsantrasyonu 200 g/L iken, glukonik asit veriminin % 79,7 olarak tespit edildiği başlangıç şeker konsantrasyonun 100 g/L olduğu belirtilmiştir. İncir ekstraktına %4 metanol ilavesi ile sitrik asit konsantrasyonun 30,7'ye, glukonik asit konsantrasyonun ise 145,5 g/L'ye yükseldiği bildirilmiştir.

Karbon kaynağı olarak şeker kamışı melası, katı destek materyali olarak da çay atığı kullanılarak glukonik asidin katı hal fermantasyon ile üretiminin incelendiği bir çalışmada, % 70 nem seviyesi, 30 °C sıcaklık, % 3 inokulum miktarı ve 2,5 L/dak havalandırma hızının maksimum glukonik asit üretimi (76,3 g/L) için uygun olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada 8-12 günlük fermantasyon döngüsü gerçekleştirilmiştir ve *Aspergillus niger* ARNU-4 suşu kullanılmıştır. Aynı çalışmada 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) glukonik asit üretimini (82,2 g/L) geliştirmek için indükleyici olduğu sonucu ortaya konulmuştur (Sharma vd., 2008).

Moksia vd. (1996) yaptıkları bir çalışmada, destek materyali olarak karabuğdayın kullanıldığı katı hal fermantasyon çalışmasında, glukozdan glukonik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada mikroorganizma olarak *A. niger* NRRL 3, 567 ve 599 suşları kullanılmıştır. 750 mL çalışma hacmine sahip karıştırmalı reaktörde gerçekleştirilen fermantasyon çalışmasında optimum değerler olarak, karıştırma hızı 600 d/dk, havalandırma hızı 0,1 ml/ml.dk, çalışma sıcaklığı 33,5°C olarak belirlenmiştir. Fermantasyon sonunda 1,06 g GA/g glukoz verimi ile NRRL 3 suşunun glukonik asit üretim yeteneğinin diğerlerine göre daha iyi olduğu tespit edilerek, 200 saat içerisinde 190 g/L glukoz beslenmesi sonucu 200 g/L GA üretimi gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Moksia vd. 1996).

Zhang vd. (2016) *Aspergillus niger* SIIM M276 suşu kullanarak erlenlerde ve biyoreaktörde mısır koçanından glukonik asit üretim şartlarını optimize etmeye yönelik yaptıkları bir çalışmada, maksimum verimin % 94,99 olduğunu ve 76,67 g/L konsantrasyonunda ürün elde edilebildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada hem erlenlerde çalkalama hızının hem de reaktörde karıştırma hızının üretim verimini olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir. Ayrıca reaktör şartlarında hava besleme hızındaki artışla glukonik asit üretim hızının önemli ölçüde arttığı da vurgulanmaktadır. 3 L'lik biyoreaktörlerde 33°C sıcaklıkta pH'nın 6.0 ve havalandırma hızının 1.6 mL/mL.dk olduğu şartlarda maksimum glukonik asit üretimi için 800 d/dk karıştırma hızı, yine 33 °C, pH 6,0 ve karıştırma hızı 500 d/dk olan ortam şartlarında maksimum glukonik asit üretimi için havalandırmanın 2.4 ml/ml.dk olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada glukonik asidin yanı sıra farklı miktarlarda HMF, asetik asit, furfural, formik asit, vanilin gibi kimyasalların da hidrolizat ortamında bulunduğu belirtilmektedir.

Fermantasyon amacıyla immobilizasyon tekniklerinin kullanımı konusunda oldukça önemli gelişmeler olmasına rağmen, glukonik asit üretimi amacıyla bu tekniklerin kullanılması konusunda çok fazla çalışmaya rastlanmamaktadır. *A. niger* kullanılarak cam halkalar üzerine (Heinrich vd., 1982), sentetik elyaf malzemeler üzerine (Sakurai vd., 1989) ve Ca-aljinat üzerine (Moresi vd., 1991; Rao ve Panda, 1994) immobilizasyon çalışmalarının gerçekleştirildiği bilinmektedir. Tam bir hücrenin ya da çeşitli teknikler ile glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile glukonik asit veya diğer metabolitlerin

üretiminin gerçekleştirilebileceği bazı çalışmalarda belirtilmiştir (Hartmeier ve Döppner, 1983; Pronk vd., 1989; Sakurai vd., 1989; Gromada ve Fiedurek, 1997; Nakao vd., 1997; Kara ve Bozdemir, 1998; Velizarov ve Beschkov, 1998; Anastassiadis vd., 1999).

İmmobilize enzim hücrelerin kullanıldığı bir çalışmada, saf oksijen beslemesiyle % 15 çözünmüş glukozdan % 95 verim ile GA üretiminin *A. niger* suşu kullanılarak 24 saat içerisinde gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Linko, 1981; Linko ve Linko, 1983).

Vasillev vd. (1993) poliüretan köpük üzerine immobilize edilmiş *Aspergillus niger* suşu ile glukonik asit üretimi için fermente edilebilir şeker olarak mısır nişastası hidrolizatı kullanmışlardır. İmmobilize hücreler serbest hücrelere göre, daha uzun süre (65-70 saat) muhafaza edilerek ürün oluşumu için başarılı bir şekilde yeniden kullanılmıştır. Çalışma sonunda optimum glukonik asit konsantrasyonunun yaklaşık 143 g/L olarak bulunduğu belirtilmiştir.

Serbest ve immobilize *Aspergillus niger* ile peynir altı suyundan glukonik asit üretiminin araştırıldığı bir çalışmada ise immobilize miseller ile serbest miseller glukonik asit üretim miktarları itibariyle karşılaştırıldığında, % 9,5 laktoz ve % 0,5 glukoz içeren peynir altı sulu ortamda serbest hücreler ile 92 g/L ve immobilize hücreler ile 69 g/L glukonik asit üretimi gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Mukhopadhyay vd. 2005).

Başka bir çalışmada El-Enshasy vd. (2003) serbest ve immobilize rekombinant *Aspergillus niger* tarafından glukonik asit üretimini incelemişler ve vahşi tipe kıyasla rekombinant suşlarla hacimsel üretim veriminin (% 43) ve spesifik üretim veriminin (% 61) daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Vahşi tipde 96 saat içerisinde gerçekleşen maksimum üretimin rekombinant suşda 48 saat içerisinde gerçekleştiği ifade edilmiştir. 20 ile 160 g/L arasında değişen glukoz konsantrasyonlarında yapılan çalışmalarla, 160 g/L glukoz varlığında yaklaşık 135 g/L maksimum glukonik asit eldesinin gerçekleştiği belirtilmiştir. Cam halkalar üzerine immobilize edilen hücrelerle % 90 glukonik asit dönüşüm verimi sağlandığı belirtilmektedir.

Diğer bir çalışmada, Petruccioli vd. (1994) *P. variable* P16 suşunu farklı taşıyıcılar (kalsium aljinat, agar ve poliüretan sünger) üzerine immobilize ederek tekrarlanan kesikli proseslerde glukonat, glukoz oksidaz ve katalaz üretimini incelemişlerdir. Çalışmada taşıyıcıların mekanik stabilitesi, kalsiyum 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/L.st; glukoz oksidaz için 10,9 U/L.st ve son olarak glukonat için 0,118 g/L.st 'dir.

Glukonik asit üretiminde kesikli, sürekli ve kesikli-besleme sistemlerinin kullanıldığı bilinmektedir. Tablo 4.2'de yapılmış bazı çalışmalar özetlenmiştir. Yapılan bir çalışmada kesikli fermantasyon sisteminde üzüm şırası ve konsantre üzüm şırasında *A. niger* suşu kullanarak GA üretimi incelenmiştir. Derin fermantasyon teknikleri altında 120 d/dk karıştırma hızı ve 30 °C sıcaklıkta 72 saat içerisinde GA veriminin 1,60 g/L.st olarak bulunduğu bildirilmiştir (Buzzini vd., 1993).

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

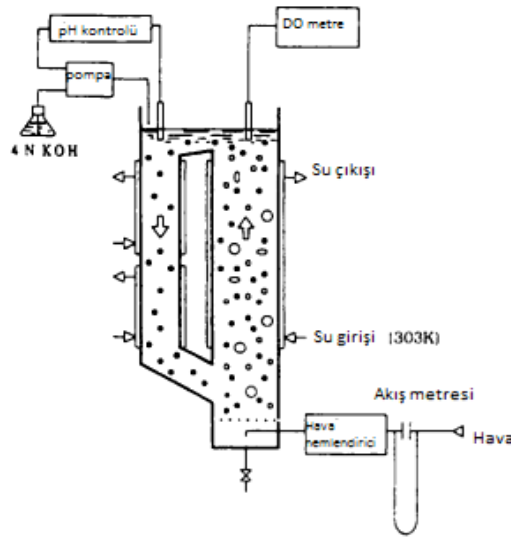
Anastassiadis (2006) yaptığı bir çalışmada sürekli sistemde karıştırmalı reaktör içerisinde *Aureobasidium pullulans* mikroorganizması ile glukonik asit üretimini incelemiştir. Çalışmada mikroorganizmanın serbest olduğu ve immobilize edildiği durumlar karşılaştırılmıştır. İmmobilizasyon işlemi karıştırmalı reaktöre monte edilen çapraz akış filtrasyon içerisine yerleştirilen gözenekli sinter cam boncuklar (yaklaşık 350 g) sayesinde gerçekleştirilmiştir. Fermantör içerisinde, serbest büyüme gösteren hücreler ile 450 g/L konsantrasyonunda glukoz ile 21 saatte 315 g/L GA üretimi gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Hücrelerin immobilize edildiği durum için ise 450 g/L glukozdan 22 saatte 375 g/L GA üretimi gerçekleştirildiği ifade edilmektedir.

Nakao vd. yaptıkları bir araştırmada, hava kaldırmalı reaktörde (Şekil 4.6), immobilize edilmiş glukoz oksidaz enzimi ile glukonik asit üretimini incelemişlerdir. Bu proste hidrojen peroksidin ayrışmasında katalaz enziminin yerine paladyum parçacıklarının kullanımının yanı sıra, glukoz oksidazın immobilize edilmesinde kalsiyum aljinat jel kullanıldığı ifade edilmiştir. 70 saat içerisinde *A. niger* suşu kullanılarak 600 g/L glukoz dönüşümü gerçekleştirilerek, ürün veriminin % 95 olduğu, üretim verimliliğinin 8,6 g/L.st olduğu belirtilmiştir (Nakao vd., 1997).

Benzer bir çalışmada hava kaldırmalı biyoreaktör kullanılarak kütle transferi incelenmiş ve glukozdan glukonik asit üretiminin avantajları ortaya konmuştur. Bu test sisteminin en önemli özelliklerinden biri büyüme olmayan koşullar altında gerçekleşmiş olmasıdır. Bu biyosistem 10 dm³ hacimli dahili hava kaldırmalı biyoreaktörde hacimsel oksijen transfer katsayısı k_La da, akış hızı ve biyokütle konsantrasyonunun etkisinin araştırılması için kullanılmıştır. k_La ölçümleri, oksijen sensörlerinin membranı ile hava kabarcıklarının sık sık temas etmesi nedeniyle çözülmüş oksijen konsantrasyon değerlerinin dağılımını göstermiştir. Sonuçlar biyotransformasyon sistemlerinin, hava kaldırmalı biyoreaktörlerde oksijen transfer hızını belirlemede başarılı olacağını göstermiştir. Biyokütlenin artmasıyla üretim hızının sabit bir şekilde azaldığı belirtilmiştir (Klein vd., 2002).

Tablo.4. 2. Kesikli Kültür ile Glukonik Asit Üretimine Dair Bazı Çalışmalar (Ramachandran vd., 2017'den)

Kültür Metodu	Glukonik Asit (g/L)	Hacimsel Verimlilik (g/L.h)	Kaynak
Tekrarlanan Kesikli Kültür	143	1,44	Vassilev vd., 1993
Hava kaldırmalı biyoreaktörde kesikli kültür	150	2,30	Klein vd., 2002
Sürekli Reaktör	158	6,00	Tsao ve Kempe, 1960
Kesikli Kültür	80	0,50	Singh vd., 2003
Türbin Bıçaklı Reaktörde Kesikli Kültür	100	1,13	Ikeda vd., 2006
Kesikli Kültür	150	4,58	Znad vd., 2004



Şekil 4.6. Harici hava kaldırmalı kabarcık kolonu (Nakao vd., 1997)

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyaller

Bu çalışmada kullanılan melas Torku Şeker Fabrikası'ndan (Konya) temin edildi. Çalışma boyunca melas ışıktan görmeyen plastik kapalı kaplarda 20 °C sıcaklıkta bulunan odada muhafaza edildi. Katı hal ve yarı katı hal fermantasyon deneylerinde kullanılan küspe ise kampanya döneminde Elazığ Şeker Fabrikası'ndan temin edildi. Islak halde alınan küspe, plastik branda üzerine yayılarak ve üfleçler yardımıyla bir 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 boyut fraksiyonlarında küspe örnekleri hazırlamak için kurutulmuş küspeye, öğütme ve eleme işlemleri uygulandı. Öğütme amacıyla laboratuvar ölçekli bir blender kullanıldı (Waring, IC-10B-25000 d/dk). Küspe blenderde öğütüldükten sonra, ASTM serisi bir elek serisinde elenerek, -8+16; -16+30; -30+50; -50+100 ve -100 mesh fraksiyonlarında örnekler hazırlandı. Hazırlanan bu farklı boyut fraksiyonundaki küspe örnekleri, tekrar 60 °C'de 4 saat süreyle etüvde kurutularak, deneylere kadar kapaklı plastik kaplarda muhafaza edildi.

Çalışmaya konu edilen mikroorganizma (*A.niger* NRRL-3 suşu) uluslararası American Type Culture Collection (ATCC) hücre kültür koleksiyonundan temin edildi. Deneylerde besi ortamı hazırlamada kullanılan PDA (Potato Dextrose Agar) (Lab M, LAB098), glukoz (Merck, 1.08342), kalsiyum karbonat (Tekkim, TK200.200), sodyum nitrat (Tekkim, TK210.00), potasyum dihidrojen fosfat (Merck, 1.048.73), magnezyum sülfat hepta hidrat (Duchefa, M05.13), potasyum klorür (Tekkim,TK.150440), demir (II) sülfat hepta hidrat (Merck, 1.03.965), diamonyum hidrojen fosfat (Tekkim, TK.201796), amonyum sülfat (Tekkim,TK.010020), disodyum hidrojen fosfat (Tekkim, TK50230) 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 kullanılmıştır.

Çalışmada yapılan tüm tartım işlemleri, 0,0001 g'lık bir hassasiyete sahip bir analitik terazi ile (Radwag AS220.R2) gerçekleştirildi. pH okuma ve ayarlama işlemleri

için Thermo Scintific marka pH metre kullanıldı. pH metre'nin kalibrasyonu üç noktali olarak düzenli aralıklarla yapıldı. Sterilizasyon amaçları için Nuaer ST-G Model otoklav, sabit sıcaklıkta çalkalama amaçları için Zhecheng ZHWY-200B çalkalayıcılı inkübatörler ve mikrobiyolojik ekim çalışmaları için Bilser Class I laminar hava kabini kullanıldı.

5.2. Mikroorganizmanın in vitro Kültürü

Liyofilize halde temin edilen suş (*A. niger* NRRL-3) % 0.05 NaCl sıvı ortamında oda sıcaklığında çözününceye kadar bekletildi. PDA dehidre besiyeri, 39 g/L olacak şekilde distile suda çözüldükten sonra, 121 °C de 15 dakika otokolavda sterilizasyona tabi tutuldu. Sterilize edilmiş agar 100x15 mm lik petrilere dökülerek donduktan sonra, mikroorganizma ekimi gerçekleştirildi. Mikroorganizma ekilmiş petriler, 30 °C de etüvde inkübasyona bırakılarak çoğalması takip edildi. Hücreler petri yüzeyini tamamen kapladığında, pasajlanarak yeni besi ortamı içeren erlenlere aktarıldı. Etüvde 7 gün boyunca çoğalan mikroorganizma çalışmalarda kullanılmak üzere, stok çözelti ortamında +4°C'de depolandı. Stok çözelti bileşimi Tablo 5.1'de verilmiştir. İkinci ve üçüncü pasajdan sonra hücreler dondurularak bir sonraki kullanım için saklandı. Hücreler % 20 gliserol % 80 serum içeren kriyo tüplerde -80 °C şartına, +4 °C'de 1 saat ve -20 °C'de 2 saat tutularak aşamalı bir şekilde alındı.

5.3. Ön Denemeler

A. niger NRRL-3 suşunun glukonik asit üretim yeteneğine sahip olup olmadığını belirlemek için bazı ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla üç farklı sentetik besi yeri ortamında glukozdan glukonik asit üretimine yönelik deneyler yapıldı. Bunun için, ön denemeler daha önce yapılan araştırmalarda belirlenmiş olan optimum şartlarda gerçekleştirildi. Bu nedenle sıcaklık 30 °C, pH 6,6, aşılama miktarı % 2 (hacim/hacim) ve çalkalama hızı 150 d/dk olarak seçildi. Bu parametreler her üç ortam için de aynı tutulmuş, farklı ortam bileşenleri ve konsantrasyonlarıyla glukonik asit üretimindeki değişim takip edilmiştir. Ön denemeler için kullanılan besi yeri bileşenleri Tablo 5.2, 5.3 ve 5.4'de verilmiştir.

Ön denemeler, 250 mL'lik erlenlerde 50 mL çalışma hacminde kesikli derin fermentasyon şeklinde gerçekleştirildi. Hazırlanan karışımlar belirtilen oranda aşı ilavesi gerçekleştirildikten sonra orbital çalkalamalı bir inkübatörde yürütüldü. Fermentasyon karışımlarının pH'sı, otoklavlanmadan önce 0,1M HCl ile 5,5'e ayarlandı. Besi yerleri ve

ilave edilen CaCO_3 ayrı ayrı otoklavlanarak steril hale getirildi. Sterilizasyon işlemi sonrası besi yerine CaCO_3 ilave edilerek, ortam pH'sı 6,6'ya getirilip orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 24 saatte bir numune alınarak, pH ölçümü yapılarak, örneklerde glukonik asit ve şeker analizleri yapıldı.

Benzer şartlarda karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı ön denemeler de gerçekleştirilmiştir. Bunun için melasın içeriği göz önünde bulundurularak sentetik ortam bileşenlerinin hepsini içeriyor olması nedeniyle, herhangi bir besi yeri bileşeni ilave edilmeksizin ve yaklaşık % 50 şeker içeriği göz önünde bulundurularak 240 g/l melas içeren çözeltiler destile suda çözülüp hazırlanarak aynı şekilde deneyler yapıldı. Bunun yanı sıra farklı melas konsantrasyonlarının glukonik asit üretimi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla melas 120,240 ve 360 g/L'ye seyreltildi.

Ön denemelerde son olarak, melaslı besi yerinden glukonik asit üretimi üzerine otoklav sterilizasyonu öncesi kritik bir parametre olan pH'nın etkisini gözlemlemek üzere bazı deneyler yapılmıştır. Bunun için otoklav öncesi konsantre HCl ile melaslı ortamların pH değerleri 1,0-5,5 arasında farklı değerlere ayarlanarak deneyler yapıldı. Ayrıca bir grup deneyde de, hazırlanan melaslı ortamlar sterilizasyon öncesi herhangi bir pH ayarlaması yapılmaksızın fermentasyon deneyleri gerçekleştirildi.

Tablo 5.1. PDA Besi Yeri Bileşimi

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

Tablo 5.2. Besiyeri-1 (Ahmed vd., 2015)

Besi Yeri Bileşimi	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	120,0
NaNO_3	3,0
KH_2PO_4	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
KCl	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01

Tablo 5.3. Besiyeri-2 (Roehr vd., 1996)

Besi Yeri Bileşimi	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	130,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,388
KH ₂ PO ₄	0,18
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,156
CaCO ₃	26,0

Tablo 5.4. Besiyeri-3 (Ikeda vd., 2006)

Besi Yeri Bileşimi	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	70,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,35
Na ₂ HPO ₄	0,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15
CaCO ₃	60,0

5.4. Glukonik Asit Üretiminin Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım

Yapılan ön denemeler ve incelenen literatür ışığında glukonik asit üretimi üzerine etkin değişkenlerin 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, esasen proseslerin optimizasyonunda matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir (Myers ve Montgomery, 1995). CYY'nin çeşitli dizaynları mevcuttur. En çok kullanılanları Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ve Box-Behnken Dizaynıdır. MKD'da α , -1, 0, +1, + α 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 - α ve + α iki uç değerleri ifade etmektedir. -1 ve +1 noktaları ise düşük ve yüksek seviyeyi ifade eder. Kesikli olarak gerçekleştirilen derin, yarı katı hal ve katı hal fermentasyon deneyleri için etkin olan parametrelerin sonuç değişkeni üzerine etkilerinin ortaya konulması amacıyla yapılacak deneylerin tasarımı Merkez kompozit dizayn (MKD) ile gerçekleştirilmiştir.

Literatür verilerinden ve ön deneme sonuçlarından yola çıkılarak, glukonik asit üretimini etkileyeceği düşünülen derin fermantasyon için, 4 (melas konsantrasyonu, sıcaklık, çalkalama hızı ve CaCO_3 miktarı), yarı katı hal fermantasyon için 5 (melas konsantrasyonu, sıcaklık, çalkalama hızı, küspe miktarı ve CaCO_3 miktarı) ve katı hal fermantasyonu için 4 (melas konsantrasyonu, sıcaklık, küspe miktarı ve CaCO_3 miktarı) değişkenin etkileri MKD yöntemi ile tasarlanan deneylerle incelenerek sonuçlar istatistiksel olarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Üç farklı fermantasyon şekli için, glukonik asit üretimini etkilediği düşünülen bağımsız parametreler ve incelenen değer aralıkları sırasıyla Tablo 5.5, 5.6 ve 5.7 de verilmiştir.

MKD ile derin fermantasyon için 5 farklı konsantrasyonda, 4 bağımsız değişken ve 3 kez tekrarlanan merkez noktası ile toplam 30 deney, yarı katı hal fermantasyonda 5 farklı konsantrasyonda, 5 farklı bağımsız değişken ve 6 tekrarlanan merkez noktası ile toplam 50 deney, son olarak katı hal fermantasyon için 5 farklı konsantrasyon, 4 bağımsız değişken ve 4 tekrarlanan merkez nokta ile toplam 30 deney gerçekleştirilmiştir. Her üç fermantasyon çeşidi için değişen parametrelere göre elde edilen glukonik asit miktarları cevap olarak kullanıldı. Deneylerin tasarımında ve elde edilen sonuçların analizinde DesignExpert 8.0 yazılımı kullanılmıştır. Varyans analizleri ve değişkenlerin etkileşimli olarak cevap üzerine etkileri üç boyutlu grafikler halinde elde edildi.

Tablo 5.5. Derin Fermantasyon için Belirlenen Değişkenler ve MKD ile İncelenen Değer Aralıkları

Faktör	Bağımsız Değişkenler	- α	-1	0	+1	+ α
A	Melas Kons. (g/L)	100	175	250	325	400
B	CaCO_3 (g/L)	10	20	30	40	50
C	Sıcaklık($^{\circ}\text{C}$)	20	25	30	35	40
D	Çalkalama Hızı (d/dk)	80	115	150	185	220

Tablo 5.6. Yarı Katı Hal Fermantasyonu için Değişkenlerin Değer Aralıkları

Faktör	Bağımsız Değişkenler	- α	-1	0	+1	+ α
A	Melas Kons. (g/L)	100	186	250	313	400
B	CaCO_3 (g/L)	10	20	30	40	50
C	Sıcaklık($^{\circ}\text{C}$)	20	25	30	34	40
D	Küspe Mikt.(g/L)	5	10	15	20	25
E	Çalkalama hızı (d/dk)	80	120	150	180	220

Tablo 5.7. Katı Hal Fermantasyonu için Değişkenlerin Değer Aralıkları

Faktör	Bağımsız Değişkenler	- α	-1	0	+1	+ α
A	Melas Kesri (g/g)	0	0,1	0,2	0,3	0,4
B	CaCO ₃ Kesri (g/g)	0	0,0125	0,025	0,0375	0,200
C	Sıcaklık(°C)	20	25	30	35	40
D	Küspe Kesri (g/g)	0,10	0,175	0,25	0,325	0,40

5.5. Deneylerin Yapılışı

A. niger kullanılarak melastan glukonik asit üretiminin incelendiği bu çalışmada, derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon biçimleriyle üretim şartlarının optimize edildiği deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi yapılan deneyler cevap yüzey yöntemi ve merkezi kompozit dizayn kullanılarak tasarlanmıştır. Tüm tasarlanmış deneyler, belli aralıklarla örnek alınmak üzere zamana bağlı olarak yürütülmüştür. Tasarlanan deneylerin ne şekilde gerçekleştirildiği bu bölümde izah edilmiştir.

5.5.1. Derin Fermantasyon Deneyleri

Derin fermantasyon deneyleri için distile su kullanılarak 250 mL’lik erlenlerde 50 mL sıvı hacmi olacak şekilde besi yerleri hazırlandı. Besi yeri bileşimleri deneysel tasarıma göre farklı konsantrasyonlarda melas içerecek şekilde oluşturuldu. Hazırlanan besi yerlerinin pH’sı otoklavda sterilizasyon öncesi 0,1M’lik HCl ile 5.5 ‘e ayarlandı. Daha sonra otoklavda 121°C’de 15 dk süreyle tutularak sterilizasyon sonrası, benzer şekilde otoklav ile steril edilen önceden tartılmış CaCO₃ ilave edildikten sonra 0,1M’lik HCl ve 0,1M NaOH kullanılarak karışımın pH’sı 6,6’ya getirildi. 30°C de 7 gün boyunca etüvde inkübe edilmiş *A. niger* NRRL-3 suşu, % 0,1’lik Tween-80 ile katı ortamdan alınarak besi ortamına Thoma lamında sayılıp 10⁸ spor/mL olacak şekilde ilave edildi. Mikroorganizma aşılması gerçekleştirilen erlenler sıcaklığı sabit tutulabilen bir orbital çalkalayıcıya yerleştirilerek deneysel dizaynın ön gördüğü sıcaklık ve hızlarda çalkalanmaya bırakıldı. Çalkalanan karışımlardan belli aralıklarla 2 ml hacminde örnekler alındı. Erlen içerisindeki buharlaşma nedeniyle gerçekleşen su kaybını minimize etmek amacıyla her numune alımı sırasında erlenler tartılarak, alınan numune miktarı hariç tutularak erlenlerde gerçekleşen kütle kaybı kadar ortama steril su ilave edildi. Böylece buharlaşmadan kaynaklanan deney

hataları minimize edildi. Ortamdan alınan 2 ml'lik numuneler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek zaman kaybedilmeden analiz edildi.

5.5.2. Yarı Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri

Yarı katı hal fermantasyon deneyleri için deneysel dizayn ile belirlenen şartlarda hazırlanan besi yerlerine -16+30 mesh partikül boyutundaki kuru küspe, ilave edilerek karışımların sterilizasyonu sağlandıktan sonra derin fermantasyon çalışmasına benzer olarak CaCO₃ ilavesi ile pH değeri 6,6'ya ayarlandı. Sıvı hacmi 50 mL olacak şekilde ayarlanan besi yerine % 2 aşılama miktarında mikroorganizma ekimi gerçekleştirilerek sıcaklığı sabit orbital çalkalayıcıda deney tasarımlarının ön gördüğü şartlarda inkübasyona bırakıldı. Derin fermantasyon deneylerine benzer olarak, belli aralıklarla örnek alınırken, erlenlerde meydana gelen buharlaşma neticesinde meydana gelen su kaybının üretim verimliliğini etkilememesi adına ortama steril saf su ilavesi gerçekleştirildi. Ortamdan alınan 2 ml'lik numuneler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek hemen analiz edildi.

Bu şekilde, glukonik asit üretiminin optimizasyonu amacıyla MKD ile tasarlanan tüm yarı katı hal deneylerine ilave olarak, küspe partikül boyutunun etkisini ortaya koymaya yönelik deneyler de gerçekleştirilmiştir. Bunun için tasarım deneyleriyle belirlenen optimum şartlarda, daha önce hazırlanan -8+16, -30+50, -50+100 ve -100 mesh fraksiyonundaki küspe örnekleriyle de benzer şekilde deneyler yapıldı.

5.5.3. Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri

Katı hal fermantasyon deneyleri için -16+30 mesh partikül boyutuna sahip küspe, melas, distile su ve CaCO₃ deneysel tasarımın ön gördüğü farklı oranlarda ve toplam kütle 50 g olacak şekilde iyice karıştırılarak 100x15 mm'lik petrilere ilave edildikten sonra otoklavlanarak steril hale getirildi. Sterilizasyon sonrası petrilere % 2 oranında olacak şekilde % 0,1 Tween-80 yardımı ile mikroorganizma ekimi gerçekleştirilerek etüvde inkübasyona bırakıldı. Aynı şartlara ait fermantasyon karışımlarından, sürenin etkisini de gözleyebilmek için 10 adet hazırlandı. Etüv içerisindeki nemliliği sağlamak amacıyla 50 ml distile su etüv içerisine yerleştirildi. Belli aralıklarla etüvden alınan petrilere, otoklavda 121°C'de 15 dk süreyle steril edildikten sonra 1000 mL'lik beherlerde 200 mL distile su ilavesi ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi çoklu manyetik karıştırıcı yardımıyla 400 d/dk hızda 6 saat süreyle karıştırarak gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sonunda elde edilen

karışımlar, mavi bant filtre kâğıdından süzöldü. Elde edilen süzöntöler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek analiz edildi.

Bu şekilde, glukonik asit üretiminin optimizasyonu amacıyla MKD ile tasarlanan tüm deneylere ilave olarak, katı hal fermantasyonuna küspe partiköl boyutunun etkisini ortaya koymaya yönelik deneyler de gerçekleştirilmiştir. Bunun için tasarım deneyleriyle belirlenen optimum şartlarda daha önce hazırlanan -8+16, -30+50, -50+100 ve -100 mesh fraksiyonundaki küspe örnekleriyle de benzer şekilde deneyler yapıldı.

5.6. Analiz Yöntemleri

5.6.1. Melasa İlişkin Analizler

Bu çalışmada melasdaki şeker içeriğı, HPLC analizleriyle belirlendi. RID dedektörü ve COREGel 87H3 iyon değıştirici esaslı kolon kullanılarak belirlendi. Bu yöntemin en büyük avantajı melastaki indirgen şekerlerin yanı sıra disakkaritlerin de analiz edilebilir olmasıdır. Bu amaçla, kolon sıcaklığı 45° C, akış hızı 0,60 ml/dk olarak belirlendiğı ortam şartlarında mobil faz olarak 0,05 M sülfürik asit çözeltisi kullanıldı. Eşit konsantrasyonlarda glukoz, fruktoz ve sakkaroz çözeltileri hazırlanarak cihazda her üç şeker için de kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Daha sonra, melas çözeltisi farklı konsantrasyonlara seyreltilerek, içerdigi şeker miktarları ve cinsleri tayin edildi.

Melasın su içeriğini tespit etmek amacıyla, Karl-Fischer titrasyon yöntemi kullanıldı. Bölümümüz laboratuvarında bulunan Mitsubishi CA-31 Karl-Fischer titrasyon cihazı kullanılarak, melasdaki su içerik tayini gerçekleştirildi. Oldukça viskoz olan ve su içeriğı itibarıyla cihazın tayin sınırlarını aşan, melas 2.0 g ağırlığında tartılıp son ağırlık 4.0 gram olana kadar glacial asetik asit (MERCK- 1.00063.2511) ilave edilmek suretiyle seyreltildi ve viskozitesi düşüröldü. Bu şekilde titratörde su içeriğı belirlendikten sonra, asetik asitle seyrelme miktarı göz önünde bulundurularak su içeriğı hesaplandı.

Melasın kuru madde içeriğı, A. Krüss Optronic Abbe refraktometre cihazı kullanılarak tespit edildi. Öncelikle cihazın sıcaklığı 20° C'ye ayarlandı. Saf su ile kırılma indisinin 1,333 olup olmadığı kontrol edildi. % kuru madde tayini için saf su ile kuru madde skalası 0'a ayarlandı. 5 kat seyreltilen melas cihazın prizma haznesine pastör pipeti yardımıyla bir iki damla damlatıldı. Okülerden bakılarak netleştirme işlemi gerçekleştirildi. Görüntüde karanlık ve aydınlık alanlar eşitlenerek kırılma indisi değeri ve % kuru madde

değerleri okundu. Daha sonra seyreltme faktörü göz önünde bulundurularak, melasın kuru madde içeriği hesaplandı.

5.6.2. Küsspeye İlişkin Analizler

Yarı katı hal ve katı hal çalışmalarında kullanılan bir biyokütle olan küспенin nem, uçucu madde, sabit karbon ve kül içeriğini belirlemek üzere, yaklaşık (*proximate*) analizleri gerçekleştirildi. Bunun için 100 g kadar kurutulmuş küspe örneği alınarak tamamı 100 mesh'lik elekten geçecek şekilde öğütüldü. Bu örneğin nem içeriği, bir etüvde 105°C'de sabit tartıma gelene kadar bekletilerek gerçekleştirildi.

Uçucu madde analizleri için, 900 °C'ye ayarlanmış kül fırını içerisine 2 adet porselen kroze konarak 90 dakika boyunca ısınması sağlandı. Böylece krozelerdeki ağırlık kaybına neden olabilecek bileşenlerin uzaklaştırılması sağlandı. Kül fırınından çıkarılan krozeler desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelene kadar soğutulup hassas terazide ağırlıkları belirlendi. Hassas bir şekilde 1.0 g kadar tartılan kuru küspe, 900 °C'ye ayarlanmış kül fırınına konularak, ağzı kapalı olmak kaydıyla 7 dakika boyunca ısıtılarak uçucu maddenin uzaklaştırılması sağlandı. Krozeler tekrar desikatör içerisine alınarak oda sıcaklığında soğutulmaya bırakılıp ağırlık kayıpları hassas terazi ile belirlendi. Tartım sonrası krozeler tekrar kül fırınına konularak 750 °C'de ağzı açık olarak 4 saat bekletildi. Krozeler desikatörde soğumaya bırakılarak ağırlık kaybı belirlenerek kül tayini gerçekleştirilmiş oldu.

Küsspeyi oluşturan temel bileşenlerin analizleri, Li vd. (2004) tarafından önerilen yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre küspede ekstraktif madde, hemiselüloz, selüloz ve lignin analizleri için kullanılan yöntemler aşağıda izah edilmiştir.

Ekstraktif madde analizi için küspeden 12 gram tartılarak, üzerine 150 ml aseton ilave edildikten sonra geri soğutucu altında 3 saat süre ile karıştırılarak ekstrakte edildi. İşlem sonunda, süzgeç kâğıdında süzülerek toplanan kalıntı bir süre oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 80 °C'de tutulan etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutuldu. Son olarak soğutulup tartılarak ekstraktif madde miktarı hesaplandı.

Hemiselüloz analizi için ekstraksiyon analizi sonucunda kalan kalıntıdan 6 gram numune balona konuldu ve üzerine 150 ml, 0,5 M NaOH çözeltisi ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 3,5 saat karıştırıldı. Atık, süzgeç kâğıdından süzildükten sonra nötral

pH'ya ulaşıncaya kadar destile su ile yıkandı. Sabit tartıma gelene kadar etüvde kurutulup desikatörde soğutulduktan sonra tartıldı. Meydana gelen ağırlık kaybından hemiselüloz miktarı belirlendi.

Lignin analizi için, ekstraksiyon analizi sonucunda kalan kalıntıdan 1 g alınarak sabit tartıma kadar kurutuldu. Balona konulan örnek üzerine daha sonra yavaşça % 72'lik 30 mL H₂SO₄ çözeltisi eklendi ve bu karışım 14 °C sıcaklıkta 24 saat bekletildi. Daha sonra 300 ml saf su ilave edilip geri soğutucu altında 1 saat kaynatıldı. Karışım soğuduktan sonra süzgeç kâğıdında süzülerek saf su ile sülfat iyonu kalmayana kadar yıkandı. Kalıntı etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulduktan sonra desikatörde soğutulup tartılarak lignin miktarı hesaplandı.

Selüloz miktarı ise, deneysel olarak belirlenen lignin, hemiselüloz ve ekstraktif madde yüzdeleri toplamının yüzden çıkarılması ile hesaplanarak belirlendi.

Küspenin şeker içeriğini belirlemek için, 2,5 gr kuru küspe tartılıp, 250 mL'lik beher içerisine alındı. Üzerine 50 mL saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda kaynayana dek ısıtıldı. Daha sonra karışım, mavi bant filtre kâğıdından süzüldü ve katı bakiye bir miktar saf su ile yıkandı. Yıkama çözeltisi de süzüntü üzerine ilave edilerek, çözelti belirli bir son hacme tamamlandı. Bu çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek HPLC ile şeker tayini için kullanıldı. Analizler sonucu belirlenen şeker miktarı başlangıçta alınan küspe miktarına oranlanarak ağırlıkça şeker içeriği hesaplandı.

5.6.3. Çözeltilerde Sakkaroz ve İndirgen Şeker Tayini

Fermante edilmiş indirgen şekerler ve sakkaroz, HPLC ile Transgenomic COREGel 87H3 kolon ve Shimadzu RID-20A (Refraktif İndeks Dedektörü) dedektörü kullanılarak tayin edildi. Kolon sıcaklığı 45°C, akış hızı 0,600 mL/dk ya sabitlenmiştir. Mobil faz olarak izokratik modda 0,05 M'lik H₂SO₄ kullanılmıştır. Shimadzu HPLC sistemi, DGU-20A5R degaz ünitesi, LC-20AT pompa ve CTO-10AS kolon fırınından oluşmaktadır. Mobil faz kullanılmadan önce ultrasonik su banyosunda degaz işlemine tabi tutuldu. Analitik saflıktaki glukoz ve fruktoz ile kalibrasyon grafiği çizilerek indirgen şeker konsantrasyonları belirlendi. Çözeltilerin hazırlanmasında filtre edilmiş distile su kullanıldı. Kolona zarar verebilecek maddelerin uzaklaştırılması için çözeltiler 0,45 µm'lik filtreden geçirildi. Şeker tayini yapılacak melas örnekleri 10 kat mobil faz ile seyreltilip,

0,45 µm'lik filtreden geçirilerek cihaza enjekte edildi. Analizlerden önce cihaza purge işlemleri iki kez uygulanarak yaklaşık 1 saat mobil faz ile kolon şartlanması gerçekleştirilmiştir. Numuneler cihaza 20 µl hacim olacak şekilde bir mikro enjektörle enjekte edildi.

5.6.4. Glukonik, Sitrik ve Oksalik Asit Analizleri

Glukonik, sitrik ve oksalik asitlerin kantitatif analizleri, HPLC Transgenomic COREGel 87H3 kolon ve Shimadzu SPD-20A UV-VIS dedektörü ile gerçekleştirildi. 210 nm'de kolon sıcaklığı 45 °C, akış hızı 0,600 mL/dk olacak şekilde ayarlanıp, yine mobil faz olarak izokratik modda 0,05 M lik H₂SO₄ kullanılarak söz konusu organik asitlerin tayini gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması için, organik asit standartlarının mobil faz ile seyreltilmesiyle farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler HPLC sisteminde yürütülerek her bir organik asit için elde edilen pik alanları ve konsantrasyonlar arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. Kolon kirliliğinin önlenmesi için çözeltiler ve numuneler cihaza 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek 20 µl enjeksiyon hacmi ile verilmiştir. Analizlerden önce purge işlemi ve mobil faz ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

6. BULGULAR VE TARTIŞMA

Her yıl dünya çapında ortalama 100.000 ton glukonik asit ve glukonat talebine karşın ülkemizde glukonik asit üretimi mevcut olmadığından bu ihtiyaç, ithalat ile karşılanmaktadır. Bu çalışmada ülkemizdeki pazar payı belli olan ve artması beklenen glukonik asidin, ülkemiz için önemli bir endüstriyel yan ürün olan şeker pancarı melasından üretimi hedeflenmiştir. Literatürde şeker kamışı melasından glukonik asit üretimi konusunda yapılmış çalışma çok olmakla birlikte, şeker pancarı melasından üretim konusunda kayda değer çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışma ayrıca derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak araştırılmasını amaçlaması yönüyle de önemlidir. Yarı katı hal ve katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi amacıyla, şeker üretimi sırasında elde edilen başka bir yan ürün olan şeker pancarı küspesinin kullanılması nedeniyle, küspenin bir katı destek materyali ve substrat olarak değerlendirilmesi açısından da çalışmanın önemli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmaya konu edilen şeker pancarı melası ve küspesinin analizleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar Tablo 6.1’de verilmiştir.

Tablo 6.1. Çalışmada kullanılan Şeker Pancarı Melası ve Küspesinin Analiz Sonuçları

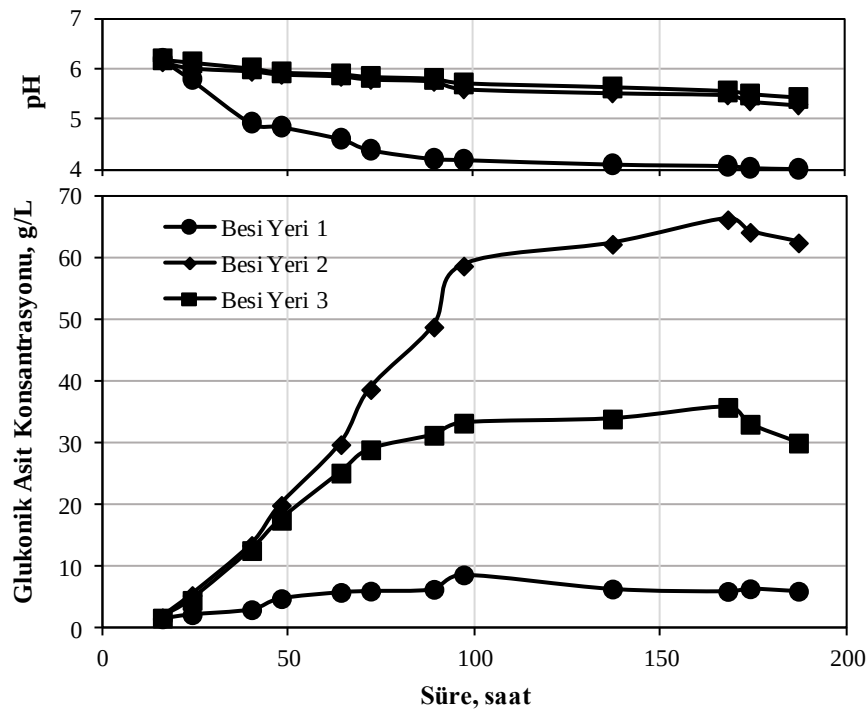
Küspe	
Yaklaşık Analizler	Ağırlıkça %
Uçucu Madde Miktarı	76,39
Sabit Karbon	12,96
Nem	6,12
Kül	4,53
Bileşen Analizleri	Ağırlıkça %
Selüloz	26,68
Hemiselüloz	32,21
Ekstraktif Madde	28,69
Lignin	12,42
Toplam şekerler	2,80
Melas	
Bileşen Analizleri	Ağırlıkça %
Kuru madde	79,84
Sakkaroz	49,35
İndirgen şekerler	1,50
Şeker dışı katı madde*	29,01
Su içeriği	20,05
Kül	8,12

*Hesapla bulunmuştur.

Bu bölümde öncelikle gerçekleştirilen ön denemelere ait bulguları takiben, deneysel dizayn yöntemleriyle incelenen derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon çalışmalarına ilişkin bulgular verilecektir.

6.1. Ön Deneme Çalışmalarına Ait Sonuçlar

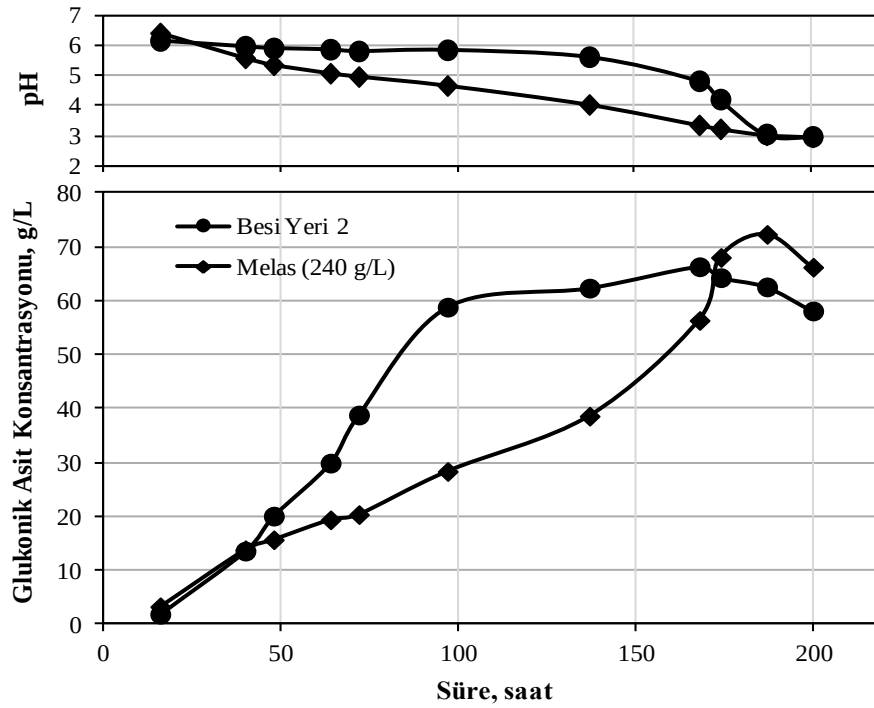
A. niger suşunun glukonik asit üretim yeteneğinin araştırılmasına yönelik yapılan ön çalışmada üç ayrı sentetik besi yerine mikroorganizmanın ekimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 6.1’de görüldüğü gibi her üç besi yeri için artan süre ile glukonik asit konsantrasyonu artmaktadır. Özellikle 2 ve 3 kodlu besi yerleriyle kayda değer bir glukonik asit üretimi gerçekleştirilirken, 1 kodlu besi yeri için ciddi bir glukonik asit üretiminin elde edilemediği görülmektedir. Bu durumun büyük ölçüde besi yerlerinin CaCO_3 içeriğiyle alakalı olduğu izlenimi oluşmuştur. Zira 2 ve 3 numaralı besi yerleri CaCO_3 içerirken, 1 numaralı besi yeri içermemektedir (Tablo 5.2, 5.3 ve 5.4). Buna bağlı olarak artan süreyle 1 numaralı besi yeri için pH’nın 4’e kadar düşmesi söz konusu olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda düşük pH’larda glukoz oksidaz enzim aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmektedir (Franke,1963). Dolayısıyla CaCO_3 içeren besi yerlerinde gerçekleşen nötralizasyon nedeniyle



Şekil 6.1. *A. niger*'in farklı besi yeri ortamlarında glukonik asit üretimi gerçekleştirilmesine yönelik ön deneme sonuçları (Sıcaklık:30°C; pH: 6,6; aşılama miktarı % 2; çalkalama hızı: 150 d/dk).

glukoz oksidaz aktivitesinin daha yüksek olduğu ve buna bağlı olarak glukonik asit konsantrasyonlarının da nispeten yüksek olduğu görülmektedir. En yüksek glukonik asit konsantrasyon değerleri 2 numaralı besi yeri için yaklaşık 7 günün 66,34 g/L ile olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca, 2 ve 3 numaralı besi yerlerinin içerdiği glukoz miktarlarının farklı olması nedeniyle, elde edilen çözeltilerin glukonik asit konsantrasyon değerlerine bu durumun yansması beklenen bir husustur.

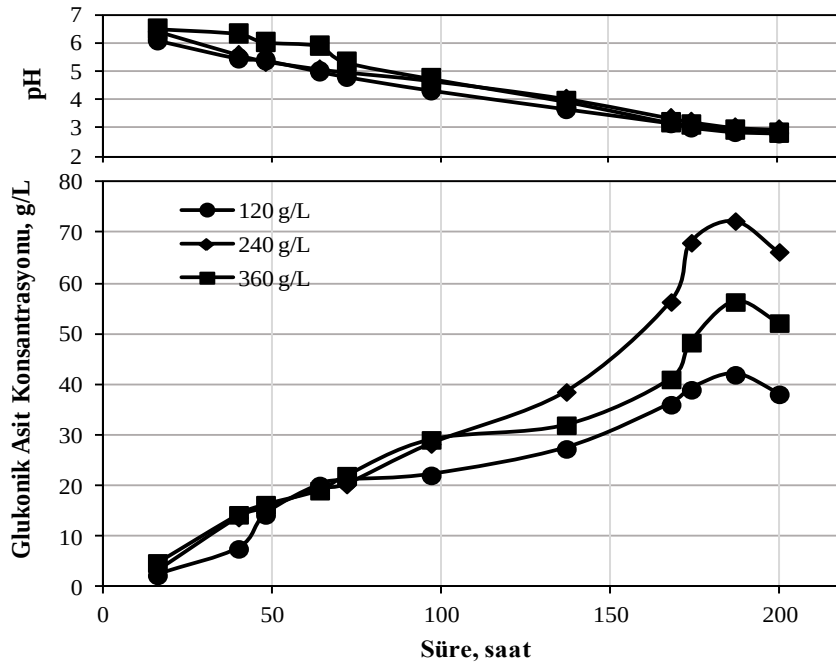
Başka bir ön deneme serisinde, sentetik besi yeri-2 ile benzer şartlarda şeker pancarı melası içeren besi yerinden glukonik asit üretimi zamana bağlı olarak incelenmiştir. Karşılaştırmalı olarak yapılan bu deneylerin sonuçları Şekil 6.2’de görülmektedir. Melasın şeker içeriğinin yaklaşık % 50 olduğu düşünülerek, melas içeren besi yerleri, besi yeri-2’de yer alan glukoz dışındaki bileşenlere ilave olarak 240 g/L melas içerecek şekilde hazırlanmıştır. Şekilden de görüldüğü gibi melas içeren besi yeri ortamında glukonik asit üretim hızı başlangıçta 2 numaralı besi yerine göre oldukça düşüktür. Ancak ilerleyen süreyle melastan glukonik asit üretim hızının yükseldiği ve daha yüksek glukonik asit konsantrasyonlarına ulaşıldığı görülmektedir. Bu durumun melasın kompleks yapısı ve başta



Şekil 6.2. Karşılaştırmalı olarak Besi Yeri-2 ve melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi ön deneme sonuçları (Sıcaklık:30°C; pH: 6,6; aşılama miktarı % 2; çalkalama hızı: 150 d/dk).

ağır metaller olmak üzere *A. niger* üzerine inhibe edici etkiler gösterebilecek bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenlerden dolayı mikroorganizmanın bir alışma evresi sergilediği ve başlangıç üretim hızının düşüklüğünün büyük ölçüde nedeninin bu olduğu söylenebilir. Ayrıca her iki ortam için de artan glukonik asit konsantrasyonu belli bir süreden sonra düşme eğilimine girmektedir. Bu durumun da yine azalan pH nedeniyle glukoz oksidaz aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığı izlenimi oluşmuştur.

Diğer bir ön deneme çalışmasında ise aynı besi yeri bileşenleri kullanılarak melas konsantrasyonunun glukonik asit üretimi üzerine etkisini ortaya koymaya yönelik deneyler yapılmıştır. Elde edilen deney sonuçları Şekil 6.3’de görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi 120, 240 ve 360 g/L konsantrasyonlarında melas içeren besi yerleri için zamana bağlı olarak elde edilen glukonik asit konsantrasyonları ilginç bir davranış sergilemektedir. Maksimum glukonik asit konsantrasyonu 240 g/L için elde edilirken, melas konsantrasyonunun 360 g/L değerine çıkarılması durumunda elde edilen glukonik asit konsantrasyonu daha düşük olmaktadır. Bilindiği üzere şeker pancarı melası neredeyse kütlesinin yarısı kadar sakkaroz içermektedir. İnvert şekerlerin toplamı ise % 1 civarındadır.

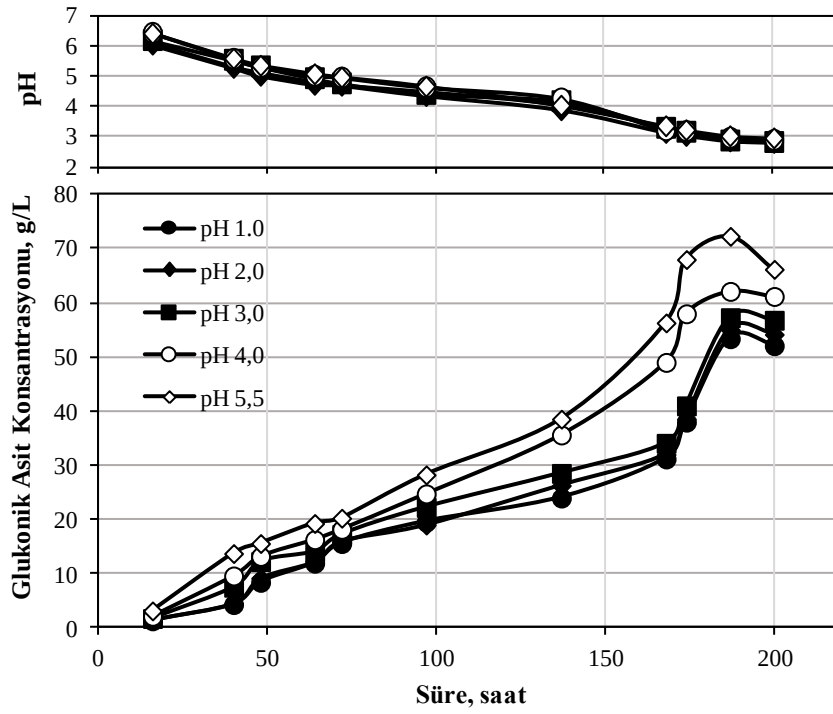


Şekil 6.3. Melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi üzerine melas konsantrasyonunun etkisinin incelendiği ön deneme sonuçları (Sıcaklık:30 °C; pH: 6,6; aşılama miktarı % 2; çalkalama hızı: 150 d/dk).

A. niger fermantasyon sırasında invertaz enzimi de oluşturabilen bir fungustur (Kulshrestha, 2013; Ahmed vd., 2014). İvertaz enzimi sakkarozu, glukoz ve fruktoza dönüştürür ve fungusun ürettiği glukoz oksidaz enzimi de glukonik aside yükseltir. Elde edilen sonuçlar, 240 g/L'nin üzerindeki yüksek melas konsantrasyonlarında, ortamdaki sakkarozun, parçalanma ürünleri olan glukoz ve fruktozun veya melasdan gelen diğer bileşenlerin inhibe edici bir etki oluşturduğu şeklinde değerlendirilebilir. Zira değişen melas konsantrasyonu ile gözlenen pH değerlerinin birbirlerine yakın oluşu sebebiyle azalmanın, düşük pH nedeniyle glukoz oksidaz enzim aktivitesindeki düşüşten kaynaklandığı söylenememektedir.

Başka bir ön deneme çalışmasında 240 g/L melas içeren besi yerlerinin başlangıç pH değerleri HCl çözeltisi ile 1,0-5,5 arasında farklı değerlere ayarlanarak, başlangıç pH değerinin üretilen glukonik asit konsantrasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.4'de görülmektedir. Anlaşılabacağı üzere, ortama eklenen CaCO_3 'ün meydana getirdiği nötralizasyon etkisi nedeniyle tüm başlangıç pH değerleri için ilk anda 6 civarında olan pH'lar, artan fermantasyon süresiyle oluşan glukonik asit konsantrasyonuna bağlı olarak yaklaşık 3 civarına kadar azalmaktadır. Bu nedenle tüm başlangıç pH değerleri için elde edilen üretim miktarlarının paralellik arz ettiği görülmektedir. Öte yandan nispeten yüksek başlangıç pH değerlerinde glukonik asit üretim hızının ve ulaşılan maksimum asit konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun yine pH'ya bağlı olarak değişen glukoz oksidaz aktivitesinden kaynaklandığı açıktır.

Yapılan ön denemeler çalışmaya konu edilen *A. niger* NRLL3 suşunun gerek sentetik besi yeri ortamlarından, gerekse melas içeren besi yeri ortamlarından glukonik asit üretme kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Ön denemeler ayrıca, melas konsantrasyonu ve CaCO_3 varlığının glukonik asit üretimi açısından kritik parametreler olduğunu açıkça göstermektedir. Öte yandan sıcaklığın ve oksijen miktarının da mikroorganizma açısından kritik parametreler olduğu düşünüldüğünde, tüm bu parametrelerin birbiri üzerine etkileşimlerini de ortaya koyabilecek çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Yapılan ön denemelerden ortaya çıkan bir diğer husus da, melasın zengin organik madde ve mineral madde içeriği nedeniyle (Tablo 3.3) sentetik besi yeri bileşenlerinin dışarıdan ilavesine ihtiyaç olmaksızın fermantasyonun yürütülebileceği kanaatine varılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki kısmında, sadece melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi amacıyla yürütülen farklı fermantasyon biçimlerinin kullanıldığı tasarım deneylerinin sonuçları verilecektir.



Şekil 6.4. Melas içeren besi yerinden glukonik asit üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisinin incelendiği ön deneme sonuçları (Melas kons.: 240 g/L; Sıcaklık: 30 °C; aşılama miktarı: % 2; çalkalama hızı: 150 d/dk).

6.2. Deneysel Tasarım Sonuçları

Materyal ve Metot bölümünde belirtildiği gibi, derin yarı katı hal ve katı hal fermantasyon türleri için etkin parametrelerin glukonik asit üretimi üzerine etkilerini belirlemek, parametrelerin birbiri üzerine etkileşimlerini ortaya koymak ve üretim prosesi üzerinde etkili olan parametrelere bağlı bir model eşitliği elde etmek üzere cevap yüzey yöntemi ve merkezi kompozit dizayn kullanılarak deneyler tasarlanmıştır. Bu amaçla DesignExpert 8.0 yazılımı kullanılarak tasarlanan deneylerin sonuçları ve yapılan değerlendirmeler, her üç fermantasyon şekli için bu bölümde verilecektir.

6.2.1. Derin Fermantasyon Çalışmaları

Derin fermantasyon ile glukonik asit üretimine yönelik MKD ile oluşturulan yazılımın önerdiği dizayn matrisi ve elde edilen maksimum glukonik asit konsantrasyonları Tablo 6.2'de görülmektedir. Etkin parametreler olarak melas konsantrasyonu, CaCO_3 miktarı, sıcaklık ve çalkalama hızı belirlenmiş olup, cevap değeri olarak da glukonik konsantrasyonları seçilmiştir. Her bir deney zamana bağlı olarak yürütülmüş olup,

Tablo 6.2. Derin Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi için Oluşturulan MKD Dizayn Matrisi ve Elde Edilen Glukonik Asit Konsantrasyonları

DENEY NO	Faktör 1 A: Melas Kons.(g/L)	Faktör 2 B: CaCO ₃ (g/L)	Faktör 3 C: Sıcaklık (°C)	Faktör 4 D: Çalkalama Hızı (d/dk)	Maksimum G.A Kons. (g/L)
1	175	20	25	115	19,24
2	325	20	25	115	18,53
3	175	40	25	115	18,93
4	325	40	25	115	18,64
5	175	20	35	115	40,21
6	325	20	35	115	35,32
7	175	40	35	115	31,21
8	325	40	35	115	46,21
9	175	20	25	185	24,31
10	325	20	25	185	19,34
11	175	40	25	185	28,36
12	325	40	25	185	18,65
13	175	20	35	185	21,06
14	325	20	35	185	17,34
15	175	40	35	185	23,34
16	325	40	35	185	18,34
17	100	30	30	150	11,98
18	400	30	30	150	26,91
19	250	10	30	150	25,03
20	250	50	30	150	22,69
21	250	30	20	150	30,93
22	250	30	40	150	27,26
23	250	30	30	80	36,83
24	250	30	30	220	18,64
25	250	30	30	150	54,32
26	250	30	30	150	55,26
27	250	30	30	150	55,51
28	250	30	30	150	57,90
29	250	30	30	150	59,61
30	250	30	30	150	55,00

glukonik asit konsantrasyonunun maksimum olduğu süredeki değeri cevap değeri olarak alınmıştır. Dolayısıyla her bir deney için elde edilen sonuçların farklı zamanlardaki glukonik asit konsantrasyon değeri olma durumu söz konusudur.

Deney sonuçlarına bakıldığında maksimum glukonik asit konsantrasyonlarının gözlemlendiği şartların, ön denemeler ve literatür bilgileri göz önünde bulundurularak belirlenmiş olan merkez noktalarda elde edildiği görülmektedir. Elde edilen deney sonuçları, yazılım yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uygulanmış olup, en uygun modelin ikinci derece (quadratic) model olduğu belirlenmiştir. Ortaya konulan ikinci

derece modele ait uygunluğun testi için kullanılan istatistik verileri ve ANOVA verileri sırasıyla Tablo 6.3 ve 6.4’de görülmektedir. Tablo 6.3’de verilen ANOVA verilerinden elde edilen Fisher-F test değeri (21,999) ve Prob>F değerinin 0,05’den küçük oluşu, önerilen modelin önemli olduğunu belirtmektedir. Ayrıca tabloda yer alan Prob>F değeri 0,05’den küçük olan terimler önemli model terimleri olarak değerlendirilmektedir.

Gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirmeler sonucunda önerilen ikinci derece model denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\begin{aligned} \text{Glukonik Asit Konsantrasyonu (g/L)} = & -636,865 + 0,823 \times A + 4,589 \times B \\ & + 20,854 \times C + 2,776 \times D + 0,001 \times A \times B \\ & + 0,003 \times A \times C - 0,001 \times A \times D - 0,032 \times C \times D \\ & - 0,002 \times A^2 - 0,081 \times B^2 - 0,272 \times C^2 - 0,006 \times D^2 \end{aligned} \quad (6.1)$$

Tablo 6.3. *A. niger* ile Melastan Derin Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler

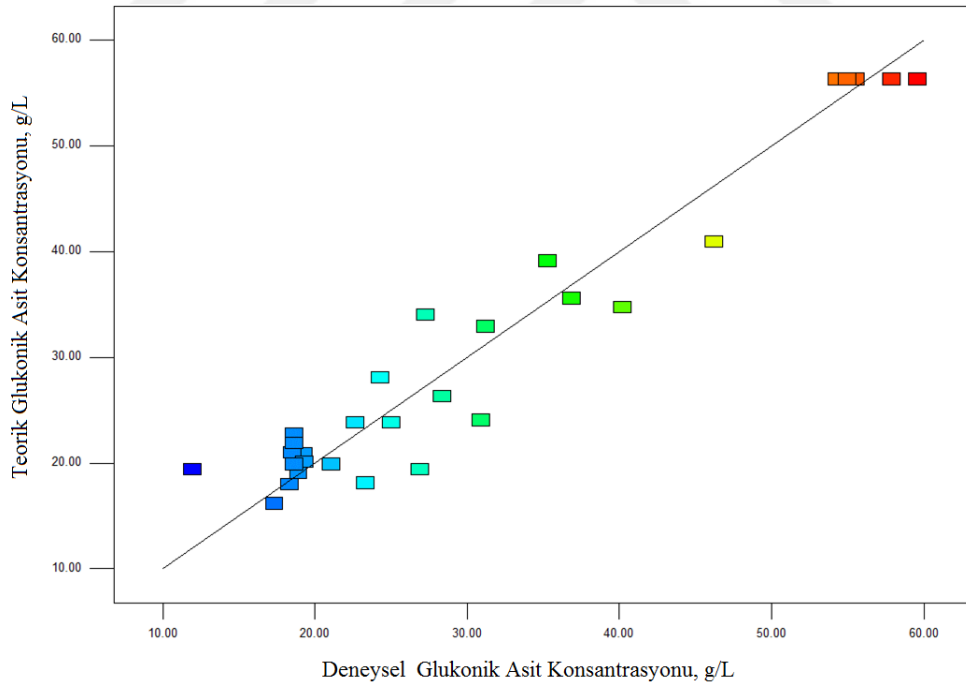
Standart sapma	4,737	R²	0,939
Ortalama	31,232	Adj. R²	0,897
Varyans (C.V.)	15,168	Pred. R²	0,734

Tablo 6.4. *A. niger* ile Melastan Derin Fermantasyon ile Glukonik Asit Üretimi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları

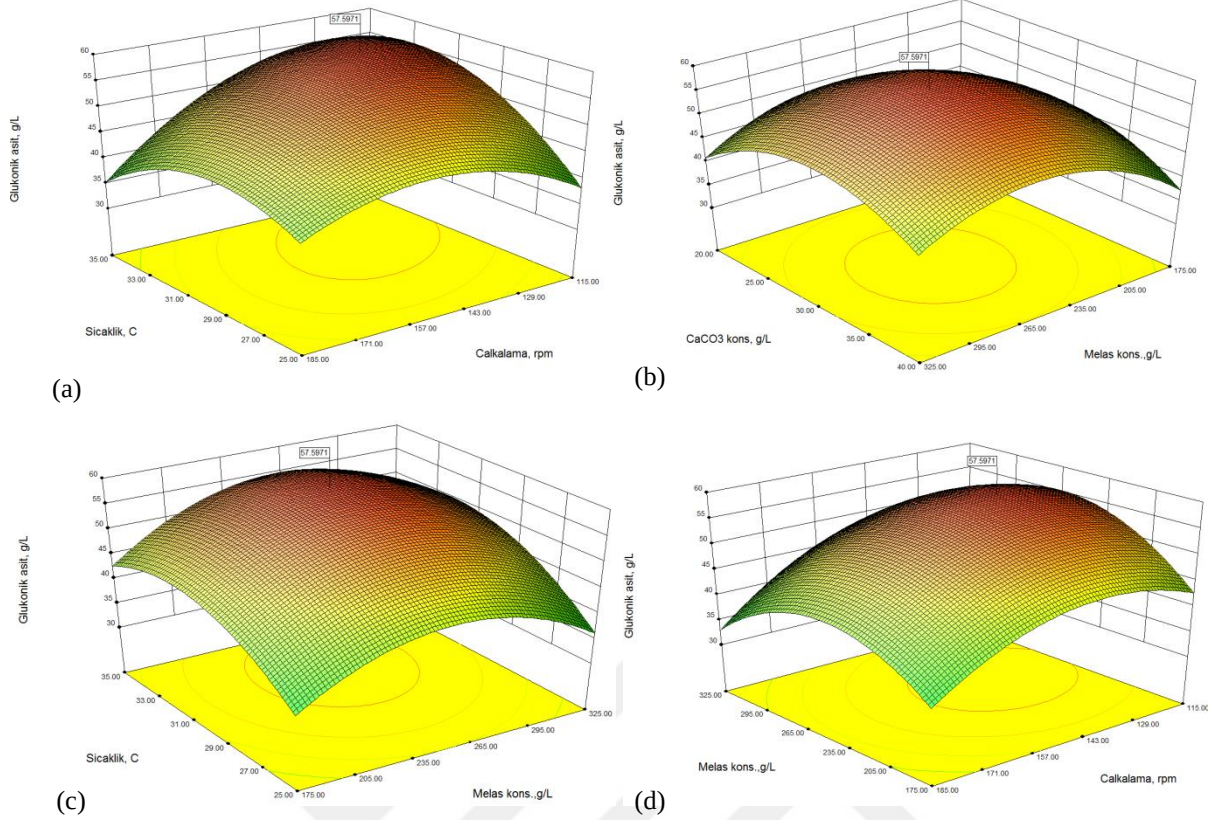
Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	5924,345	493,695	21,999	< 0.0001
A	10,101	10,101	0,450	0.5113
B	0,555	0,555	0,025	0.8769
C	148,454	148,454	6,615	0.0198
D	368,402	368,402	16,416	0.0008
AB	12,763	12,763	0,569	0.4611
AC	18,212	18,212	0,812	0.3803
AD	66,056	66,056	2,944	0.1044
CD	486,092	486,092	21,661	0.0002
A²	2332,766	2332,766	103,950	< 0.0001
B²	1807,790	1807,790	80,557	< 0.0001
C²	1271,913	1271,913	56,677	< 0.0001
D²	1399,6	1399,644	62,369	< 0.0001

Burada A, B, C ve D fermantasyon değişkenleri olup sırasıyla melas konsantrasyonu (g/L), CaCO_3 miktarı (g/L), sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) ve çalkalama hızıdır (d/dk). MKD dizayn matrisinde yer alan deneylerden elde edilen sonuçlar ile model eşitliğinden hesaplanan değerler arasındaki uyum Şekil 6.5’de görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi deneysel sonuçlarla model eşitliğinden hesaplanan değerler arasında oldukça iyi bir yaklaşım olduğu söylenebilir.

Glukonik asit üretimi üzerine etkili olan parametrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri de Şekil 6.6’da görülmektedir. Elde edilen üç boyutlu grafiklerde mevcut olan merkez noktalar civarındaki maksimum bölgelerinin uçlara doğru gidildikçe minimum değerler arz etme durumu, dört parametrenin sonuç cevabını değiştirecek ölçüde sonuç cevabı üzerine etkide bulunduğu şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan değişkenlerin birbiriyle oluşturduğu etkileşimler açısından bir değerlendirme yapıldığında, melas konsantrasyonu ile sıcaklık arasında (Şekil 6.6.c) sınırlı bir etkileşim olduğu değerlendirilebilir.



Şekil 6.5. *A. niger* ile şeker pancarı melasından derin fermantasyonla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum



Şekil 6.6. *A. niger* ile şeker pancarı melasından derin fermantasyonla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Sıcaklık-çalkalama hızı, (b) CaCO_3 miktarı-melas konsantrasyonu, (c) Sıcaklık- Melas konsantrasyonu, (d) Melas konsantrasyonu-çalkalama hızı.

DesignExpert programı, ayrıca maksimum glukonik asit konsantrasyonunun elde edildiği şartlar için çözüm değerleri de önermektedir. Program tarafından 257,8 g/L melas konsantrasyonu, 30,1 g/L CaCO_3 miktarı, 31,8 °C sıcaklık ve 135,2 d/dk çalkalama hızı şartlarında elde edilen glukonik asit konsantrasyonunun 57,59 g/L olduğuna dair bir çözüm önermektedir. Bu şartlarda yapılan bir fermantasyon çalışmasında elde edilen sonuçlar Şekil 6.7’de görülmektedir. Zamana bağlı olarak gerçekleştirilen deneylerde, glukonik asit konsantrasyonun zamanla artarak maksimum değerinin 192 saat sonunda 58,76 g/L olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen meydana gelen inhibisyon etkileri sonucu daha ileri sürelerde konsantrasyon düşmektedir. Buradan önerilen model ifadesinin deneysel sonuçlarla oldukça iyi bir uyum içerisinde olduğu söylenebilir.

Çözüm noktasında zamana bağlı olarak gerçekleştirilen fermantasyon deneyleri sırasında ortamdaki diğer önemli organik asitler ve şekerler de takip edilmiştir. Şekil 6.7’den görüldüğü gibi ilerleyen fermantasyon süresiyle belli bir süreden itibaren sitrik ve oksalik asit oluşumunun gerçekleştiği gözlenmektedir. Glukonik asit oluşumunun maksimuma ulaşmış düşme eğilimine girdiği bölgede sitrik ve oksalik asit oluşumunun artarak devam ettiği

görülmektedir. Bu durumun, fermentasyon ortamının pH'sındaki değişimle *A. niger* tarafından üretilen enzimlerin aktivitesine bağlı olduğu düşünülebilir. Düşük pH'larda glukoz oksidaz aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü bilinen bir durumdur. Glukozu substrat olarak kullanan *A.niger*'in glukonik, sitrik ve oksalik asit oluşumuna neden olan metabolik yolağı, daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konulmuş olup Şekil 6.8'de verilmiştir.

Esasen sitrik asit, bütün canlılar tarafından gerçekleştirilen oksijenli solunum neticesinde oluşan bir organik asittir. *A. niger*'in, gerçekleştirdiği oksijenli solunum basamaklarından biri olan glikolizis evresi neticesinde kreps döngüsü adı verilen döngü sırasında metabolik olarak sitrik asit üretimini gerçekleştirdiği bilinmektedir. *A. niger*, sitrik asit üretimini fosfofruktokinaz (EC 7.1.11) enzimi sayesinde gerçekleştirir.

Şeker pancarı melasının kullanımı ile oksalik asit üretiminin gerçekleştirildiği bazı çalışmalar mevcuttur (Guru vd., 2001). Oksalik asit üretimi *A. niger* suşunda bulunan okzaloasetat asetilhidrolaz enzimi sayesinde gerçekleşmektedir. Bu enzim okzaloasetatın okzalat ve asetata parçalanmasını katalizlemesine rağmen, kültür ortamında asetat bulunmamaktadır.

Ortamda bulunan substratın tüketimine ilişkin bazı değerlendirmeler yapmak mümkündür. Şekil 6.7'de organik asitlerin ve şekerlerin zamana bağlı olarak konsantrasyonlarındaki değişimlerin yanı sıra, şekerler toplamının ve asitler toplamının zamanla değişimi de verilmiştir. Görüldüğü gibi şekerler toplamı zamanla azalırken, asitler toplamı artmaktadır. Melasın şeker içeriği göz önüne alındığında başlangıçta 257,8 g/L melasın oluşturduğu toplam şeker konsantrasyonu yaklaşık 124 g/L'dir. Zamana bağlı olarak şekerler toplamı değerleri ile asitler toplamı değerlerinin toplamının bu değerden büyük olduğu görülmektedir. Bu durum iki nedenle açıklanabilir. İlk neden aşağıdaki sakkarozun inversiyonu ve glukozdan glukonik asit oluşum reaksiyonları sırasında, reaksiyon stokiometrisine bakıldığında meydana gelen artış olarak değerlendirilebilir. İkinci neden, melas bünyesinde bulunan şeker dışı organik maddelerin hidrolizi neticesinde monosakkarit ve organik asit oluşumlarının mümkün oluşudur. Zira melasın yaklaşık % 80 katı madde içeriğine sahip olduğu ve bu miktarın % 30'luk kısmının şeker dışı katılardan oluştuğu bilinmektedir. İnorganik bileşenler düştüğünde toplam melas kütlesinin % 20'ye yakın bir kısmının şeker dışı organik maddelerden oluştuğu söylenebilir. Bu organik maddelerin de azotlu bileşikler ve serbest ve bağlı asitlerden oluştuğu bilinmektedir.

6.2.2. Yarı Katı Hal Fermantasyon Çalışmaları

A. niger ile şeker pancarı melasından glukonik asit üretimi amacıyla şeker pancarı küspesi kullanılarak yarı katı hal fermantasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yine ön denemelere ve literatür bilgilerine dayalı olarak belirlenen beş farklı parametre için merkez ve uç nokta değerleri kullanılarak MKD ile bir dizayn matrisi hazırlanmış olup elde edilen deney sonuçları ile birlikte Tablo 6.5’de verilmiştir. Melas konsantrasyonu, CaCO_3 miktarı, sıcaklık, çalkalama hızı ve küspe miktarı bağımsız değişkenlerine karşı glukonik asit konsantrasyonunun cevap değişkeni olarak seçildiği deneyler, derin fermantasyon deneylerine benzer olarak süreye bağlı olarak yapılmış olup maksimum konsantrasyon değerleri baz alınmıştır.

Deney sonuçlarına bakıldığında maksimum glukonik asit konsantrasyonlarının gözlemlendiği şartların, derin fermantasyon çalışmasına benzer olarak merkez noktalar civarında elde edildiği görülmektedir. Sonuçların derin fermantasyon çalışmasında elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında katı halde küspe varlığının, elde edilen glukonik asit konsantrasyonlarını ciddi ölçüde arttırdığı görülmektedir. Derin fermantasyon ve yarı katı hal fermantasyonu için merkez nokta şartları yaklaşık aynı olup, yarı katı hal fermantasyonunda ortamda fazladan 15 g/L küspe bulunmaktadır. Bu şartlarda elde edilen glukonik asit konsantrasyonları karşılaştırıldığında glukonik asit konsantrasyonunda 18 g/L’ye varan artışlar olduğu görülmektedir. Bu durumun tamamen ortamda bulunan katı küспенin varlığının bir sonucu olduğu açıktır. Küспенin kimyasal yapısına bakıldığında, büyük ölçüde selüloz, hemiselüloz ve pektinden oluştuğu ve az da olsa bir miktar şeker içerdiği düşünüldüğünde, yarı katı fermantasyonu sırasında oldukça karmaşık biyokimyasal olayların meydana geldiği izlenimi oluşmaktadır. Örneğin bazı parçalanma ve hidroliz olaylarının oluşması ve katı yüzeylerin oksidasyon sırasında katalitik etkiler meydana getirmesi muhtemeldir.

Elde edilen deney sonuçları, yazılım yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uygulanmış olup, en uygun modelin ikinci derece (*quadratic*) model olduğu belirlenmiştir. Ortaya konulan ikinci derece modele ait uygunluğun testi için kullanılan istatistik verileri ve ANOVA verileri sırasıyla Tablo 6.6 ve 6.7’de görülmektedir. Tablo 6.6’da verilen ANOVA verilerinden elde edilen Fisher-F test değeri (18,539) ve Prob>F değerinin 0,05’den küçük oluşu, önerilen modelin önemli olduğunu belirtmektedir. Ayrıca tabloda yer alan Prob>F değeri 0,05’den küçük olan terimler önemli model terimleri olarak değerlendirilmektedir.

Tablo 6.5. Yarı Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Oluşturulan MKD Dizayn Matrisi ve Elde Edilen Glukonik Asit Konsantrasyonları

DENEY NO	Faktör 1 A: Melas Kons.(g/L)	Faktör 2 B:CaCO ₃ (g/L)	Faktör 3 C:Sıcaklık (°C)	Faktör 4 D: Çalkalama Hızı (d/dk)	Faktör 5 E: Küşpe (g/L)	Maksimum Glukonik Asit Kons. (g/L)
1	186,93	21,59	25,80	120,57	10,80	19,97
2	313,07	21,59	25,80	120,57	10,80	19,65
3	186,93	38,41	25,80	120,57	10,80	25,60
4	313,07	38,41	25,80	120,57	10,80	25,04
5	186,93	21,59	34,20	120,57	10,80	25,00
6	313,07	21,59	34,20	120,57	10,80	26,21
7	186,93	38,41	34,20	120,57	10,80	20,24
8	313,07	38,41	34,20	120,57	10,80	15,23
9	186,93	21,59	25,80	179,43	10,80	20,64
10	313,07	21,59	25,80	179,43	10,80	20,16
11	186,93	38,41	25,80	179,43	10,80	23,31
12	313,07	38,41	25,80	179,43	10,80	21,41
13	186,93	21,59	34,20	179,43	10,80	21,61
14	313,07	21,59	34,20	179,43	10,80	18,36
15	186,93	38,41	34,20	179,43	10,80	19,34
16	313,07	38,41	34,20	179,43	10,80	17,31
17	186,93	21,59	25,80	120,57	19,20	28,31
18	313,07	21,59	25,80	120,57	19,20	17,31
19	186,93	38,41	25,80	120,57	19,20	26,01
20	313,07	38,41	25,80	120,57	19,20	22,67
21	186,93	21,59	34,20	120,57	19,20	33,31
22	313,07	21,59	34,20	120,57	19,20	38,41
23	186,93	38,41	34,20	120,57	19,20	42,23
24	313,07	38,41	34,20	120,57	19,20	22,25
25	186,93	21,59	25,80	179,43	19,20	27,86
26	313,07	21,59	25,80	179,43	19,20	24,98
27	186,93	38,41	25,80	179,43	19,20	25,64
28	313,07	38,41	25,80	179,43	19,20	23,75
29	186,93	21,59	34,20	179,43	19,20	19,05
30	313,07	21,59	34,20	179,43	19,20	22,43
31	186,93	38,41	34,20	179,43	19,20	17,05
32	313,07	38,41	34,20	179,43	19,20	18,58
33	100	30	30	150	15	44,55
34	400	30	30	150	15	50,47
35	250	10	30	150	15	20,01
36	250	50	30	150	15	24,97
37	250	30	20	150	15	20,62
38	250	30	40	150	15	26,57
39	250	30	30	80	15	33,81
40	250	30	30	220	15	21,28
41	250	30	30	150	5	14,02
42	250	30	30	150	25	22,02
43	250	30	30	150	15	68,74
44	250	30	30	150	15	68,51
45	250	30	30	150	15	67,12
46	250	30	30	150	15	69,67
47	250	30	30	150	15	70,03
48	250	30	30	150	15	73,94
49	250	30	30	150	15	75,34
50	250	30	30	150	15	70,03

Adj. R² değeri 0 ile 1 arasında yer alması beklenmektedir. Bu değer 1'e ne kadar yakın olursa modelin o kadar uygun olduğu anlamına gelir. Buna ek olarak R² değerinin 0,92 olması, modelin cevaptaki değişikliğin %92 'sini açıklama yeteneği olduğunu ifade eder. Model için ve modelde yer alan terimler için Prob >F değeri 0,05'den küçük olması genel olarak modelin ve ilgili terimlerin önemini ifade eder. Bu durumda A², B², C², D² ve E² en önemli model terimleridir.

Gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirmeler sonucunda önerilen ikinci derece model denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\begin{aligned} \text{Glukonik Asit Konsantrasyonu (g/L)} = & -1083,98 + 0,632x A + 9,833xB + 35,037xC \\ & + 3,505x D + 18,651xE - 0,001xAxB \\ & + 0,003xAxC + 0,004xAxD - 0,001xAxE \\ & - 0,041x BxC - 0,008xBxE - 0,018xCxD \\ & + 0,051xCxE - 0,009xDxE - 0,001xA^2 \\ & - 0,135xB^2 - 0,530x C^2 - 0,010xD^2 - 0,586xE^2 \end{aligned} \quad (6.4)$$

Tablo 6.6. *A. niger* ile Melastan Yarı Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler

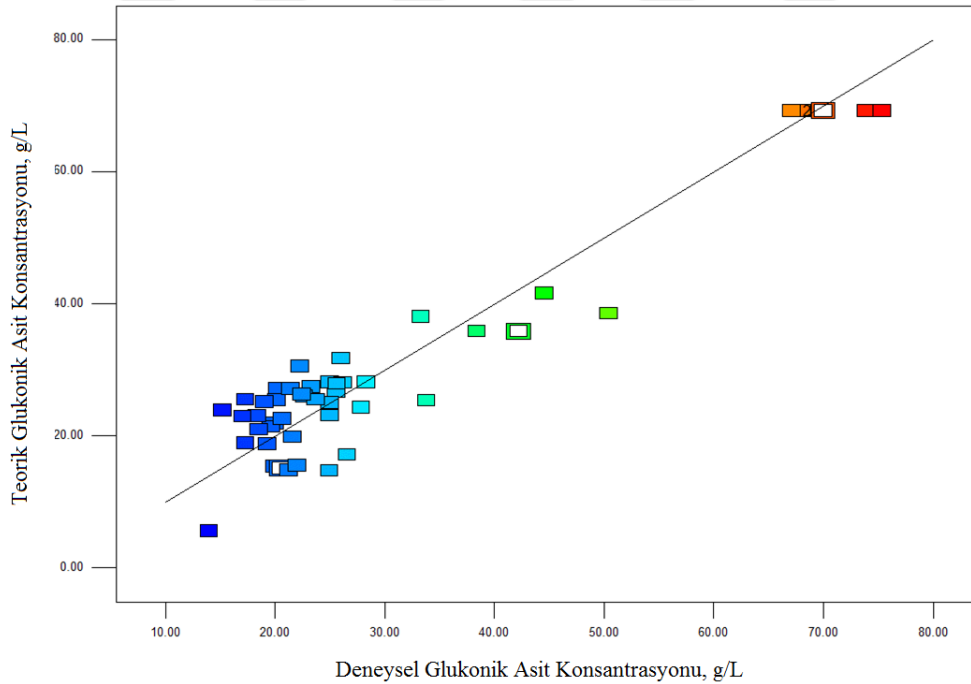
Standart sapma	6,611	R²	0,920
Ortalama	31,813	Adj. R²	0,871
Varyans (C.V.)	20,782	Pred. R²	0,692

Tablo 6.7. *A. niger* ile Melastan Yarı Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları

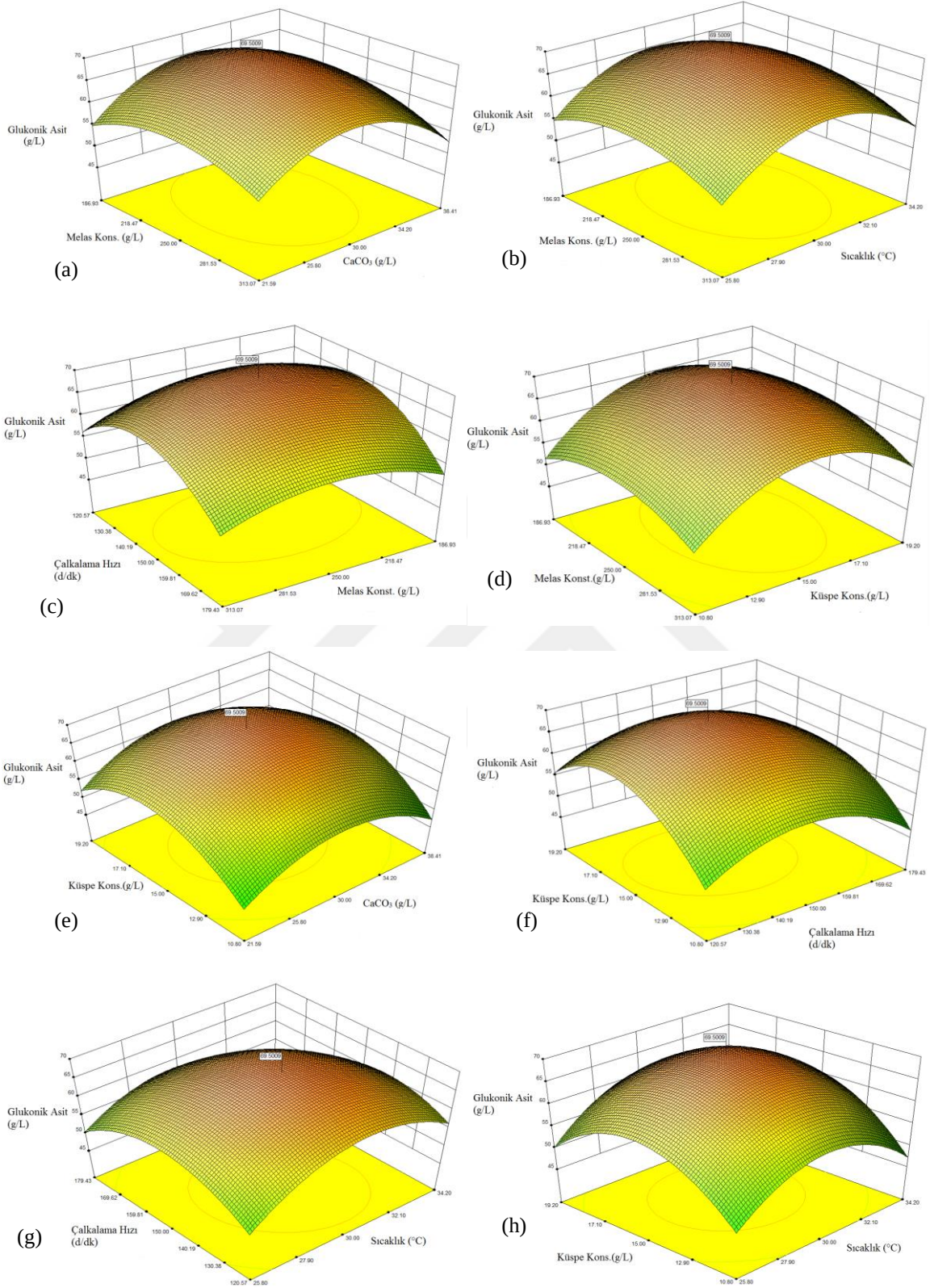
Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	15389	809,96	18,539	<0,0001
A	17,257	17,26	0,395	0,5344
B	0,77	0,77	0,018	0,8952
C	7,86	7,86	0,18	0,6745
D	211,718	211,718	4,85	0,0355
E	186,322	186,322	4,26	0,0476
AB	19,44	19,44	0,44	0,5099
AC	0,34	0,34	0,01	0,9298
AD	21,75	21,75	0,49	0,4859
AE	8,76	8,76	0,20	0,6576
BC	68,15	68,15	1,56	0,2213
BE	2,74	2,74	0,06	0,8040
CD	163,534	163,534	3,74	0,0625
CE	26,75	26,75	0,61	0,4400
DE	41,31	41,31	0,95	0,3386
A²	1474,33	1474,33	33,74	<0,0001
B²	5094,29	5094,29	116,60	<0,0001
C²	4887,62	4887,62	111,87	<0,0001
D²	4186,91	4186,91	95,84	<0,0001
E²	5970,85	5970,85	136,67	<0,0001

Bu eşitlikte yer alan A, B, C, D ve E, fermantasyon değişkenleri olup sırasıyla melas konsantrasyonu (g/L), CaCO_3 miktarı (g/L), sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$), çalkalama hızı (d/dk) ve küspe miktarıdır (g/L). MKD dizayn matrisinde yer alan deneylerden elde edilen sonuçlar ile model eşitliğinden hesaplanan değerler arasındaki uyum Şekil 6.9'da görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi deneysel sonuçlarla model eşitliğinden hesaplanan değerler arasında oldukça iyi bir yaklaşım olduğu söylenebilir.

Yarı katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi üzerine etkili olan parametrelerin etkileşim grafikleri de Şekil 6.10'da görülmektedir. Elde edilen üç boyutlu grafiklerde mevcut olan merkez noktalar civarındaki maksimum bölgelerinin uçlara doğru gidildikçe minimum değerler arz etme durumu, beş parametrenin sonuç cevabı üzerine etkide bulunduğu şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan değişkenlerin birbiriyle oluşturduğu etkileşimler açısından bir değerlendirme yapıldığında, derin fermantasyondan farklı olarak ortamda bulunan küspe miktarının sonuç cevabı üzerine etki yaptığı söylenebilir.



Şekil 6.9. *A. niger* ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum

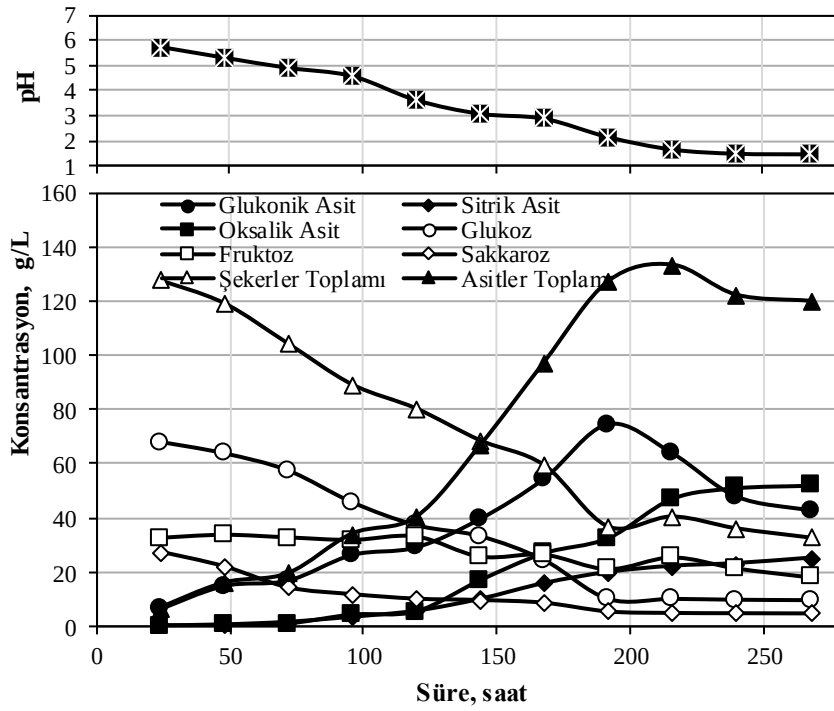


Şekil 6.10. *A. niger* ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Melas kons.- CaCO_3 miktarı, (b) Melas kons.-sıcaklık, (c) Çalkalama hızı-sıcaklık, (d) Melas kons.-küspe miktarı, (e) Küspe miktarı- CaCO_3 miktarı, (f) Küspe miktarı-çalkalama hızı, (g) Çalkalama hızı-sıcaklık, (h) Küspe miktarı-sıcaklık.

Yarı katı hal fermantasyonu çalışmalarında ortamda bulunan küspenin glukonik asit üretimine etkisi kayda değer seviyelerdedir. Oluşturulan deneysel dizayn matrisinde yer alan, merkez nokta deneyleri ile (43-48 nolu deneyler), küspe miktarı açısından uç nokta deneyleri (41 ve 42 nolu deneyler) kıyaslandığında bu etki açık bir biçimde görülebilmektedir. Tüm şartlar aynı olmak kaydıyla, 5 ve 25 g/L küspe miktarına sahip uç noktalarda glukonik asit konsantrasyonları sırasıyla 14 ve 22 g/L civarında olurken, 15 g/L küspe içeren merkez nokta deneylerinde bu değer, 68-75 g/L arasında olmuştur. Dolayısıyla belli bir noktaya kadar küspe miktarındaki artışın glukonik asit üretimini arttırdığı ancak daha ileri seviyelerdeki artışla üretimin azaldığı söylenebilir. Bu durumun muhtemel nedenleri, arasında artan küspe miktarıyla, çalkalamanın güçleşmesi ve dolayısıyla da oksijen transferinin güçleşmesi ve küspe yapısında bulunan inhibe edici bileşenlerin fermantasyon ortamındaki konsantrasyonlarının artışı gibi nedenler sayılabilir.

Yazılım tarafından maksimum glukonik asit konsantrasyonunun elde edildiği şartlar için önerilen çözüm değerleri, 245 g/L melas konsantrasyonu, 30 g/L CaCO₃ miktarı, 30,2 °C sıcaklık, 145,7 d/dk çalkalama hızı ve 15,5 g/L küspe miktarı şartlarında elde edilen glukonik asit konsantrasyonu 69,5 g/L olduğu şeklindedir. Bu şartlarda yapılan bir fermantasyon çalışmasında elde edilen sonuçlar Şekil 6.10'da görülmektedir. Zamana bağlı olarak gerçekleştirilen deneylerde, glukonik asit konsantrasyonun zamanla artarak maksimum değerinin 192 saat sonunda 74,64 g/L olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen meydana gelen inhibisyon etkileri sonucu daha ileri sürelerde konsantrasyon düşmektedir. Buradan önerilen model ifadesinin deneysel sonuçlarla bir uyum içerisinde olduğu söylenebilir. Uyumun derin fermantasyon çalışmasına göre düşük oluşu, Tablo 6.5'de verilen önerilen modele ait istatistiksel parametrelerden biri olan R² değerinin daha düşük olması nedeniyle beklenen bir durumdur.

Çözüm noktasında zamana bağlı olarak gerçekleştirilen fermantasyon deneyleri sırasında ortamdaki diğer önemli organik asitler ve şekerler de takip edilmiştir. Şekil 6.11'den görüldüğü gibi ilerleyen fermantasyon süresiyle belli bir süreden itibaren sitrik ve oksalik asit oluşumunun gerçekleştiği gözlenmektedir. Glukonik asit oluşumunun maksimuma ulaşip düşme eğilimine girdiği bölgede sitrik ve oksalik asit oluşumunun artarak devam ettiği görülmektedir. Bu durumun, fermantasyon ortamının pH'sındaki değişimle *A. niger* tarafından üretilen enzimlerin aktivitesine bağlı olduğu düşünülebilir. Düşük pH'larda glukoz oksidaz aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü bilinen bir durumdur.



Şekil 6.11. *A. niger* ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonla glukonik asit üretimi için önerilen modelden maksimum üretim şartlarındaki çözüm noktası için elde edilen süreye bağlı deney sonuçları (Melas kons.:245 g/L; CaCO_3 miktarı: 30 g/L; Sıcaklık: 30,2 °C; Küşpe miktarı: 15,5 g/L; Çalkalama hızı: 145,7 d/dk; Küşpe fraksiyonu: -16+30 mesh).

Fermantasyon ortamında tüketilen substrat ve üretilen asitlerin ve şekerlerin miktarı hakkında, derin fermantasyon çalışmasındaki duruma benzer yorumlar yapılabilir. Ancak yarı katı hal fermantasyonunda ortamda substrat olarak küspenin varlığının da göz önünde bulundurulması gerekir. Zira küspe yapısındaki, lignoselülozik bileşenler ve pektinin de hidrolize olarak şekerlere ve asitlere dönüşümü mümkündür. Stokiyometrik açıdan bir değerlendirme yapıldığında maksimum glukonik asit üretiminin gerçekleştiği sürede ortamdaki asitlerin ve şekerlerin toplamının melastan ve küspeden gelen fermante olabilir şekerlerden daha yüksek olma durumu bu düşüncüyü desteklemektedir.

6.2.3. Katı Hal Fermantasyon Çalışmaları

Organik asitlerin melas gibi zengin içeriğe sahip bir materyalden üretimi için kullanılabilecek başka bir fermantasyon biçimi, katı hal fermantasyonudur. Katı hal fermantasyonunda uygun bir katı destek materyalinin bulunduğu şartlarda fermantasyon olayı statik olarak yürütülür. Kullanılan katı destek materyali tamamen inert bir yapıya sahip olabileceği gibi, substrat özelliği de taşıyabilir. Bu açıdan bakıldığında şeker pancarı küspesinin yapısal özellikleri nedeniyle substrat özelliği gösteren bir katı hal destek

materyali olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle farklı ağırlık kesirlerinde melas, CaCO_3 ve küspe içeren karışımlarla yürütülen katı hal fermantasyon karışımları, inkübasyonu takiben distile su ile ekstraksiyona tabi tutularak elde edilen çözeltilerdeki glukonik asit miktarları, salt katı substrat (melastan gelen katı + küspeden gelen katı) miktarı başına ifade edilmek üzere deneyler yapılmıştır. RSM ve MKD yöntemi kullanılarak oluşturulan deney matrisi ve elde edilen sonuçlar toplu olarak Tablo 6.8’de görülmektedir.

Tabloda yer alan deney sonuçlarına bakıldığında maksimum glukonik asit üretiminin merkez noktalarda gerçekleştiği görülmektedir. Bu deney şartlarında ortamdaki salt katı substratın kütlege dörtte biri kadar glukonik asit üretiminin söz konusu olduğu görülmektedir. Öte yandan uç noktalardaki deney sonuçlarının oldukça dikkat çekici olduğu görülmektedir. Beklendiği üzere uç noktalara gidildikçe glukonik asit üretim miktarının azalması söz konusu olmakla birlikte, ortamda hiç melasın olmadığı ve substrat olarak sadece küспенin bulunduğu şartlarda (Deney no: 19) önemli seviyede (0,176 g GA/g substrat) bir üretimin gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum aslında küспенin yapısında bulunan şekerin yanı sıra, selüloz, pektin ve hemiselüloz yapılarının, *A. niger* tarafından üretilen enzimler ile fermantasyon sırasında bir parçalanmaya uğrayarak oluşan glikozun glukonik aside dönüştüğü şeklinde yorumlanabilir.

Elde edilen katı hal fermantasyonu deney sonuçları, yazılım yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uygulanmış olup, en uygun modelin, derin ve yarı katı hal fermantasyon çalışmalarında olduğu gibi, ikinci derece (*quadratic*) model olduğu belirlenmiştir. Ortaya konulan ikinci derece modele ait uygunluğun testi için kullanılan istatistik verileri ve ANOVA verileri sırasıyla Tablo 6.9 ve 6.10’da görülmektedir. Tablo 6.9’da verilen Adj. R^2 değeri 0 ile 1 arasında yer alması beklenmektedir. Bu değer 1’e ne kadar yakın olursa modelin o kadar uygun olduğu anlamına gelir. Buna ek olarak R^2 değerinin 0,917 olması, modelin cevaptaki değişikliğin % 91,7’sinin açıklama yeteneği olduğunu ifade eder. Tablo 6.10’da verilen ANOVA verilerinden elde edilen Fisher-F test değeri (15,7122) ve Prob>F değerinin 0,05’den küçük oluşu, önerilen modelin önemli olduğunu belirtmektedir. Ayrıca tabloda yer alan Prob>F değeri 0,05’den küçük olan terimler önemli model terimleri olarak değerlendirilmektedir. Model için ve modelde yer alan terimler için Prob >F değeri 0,05’den küçük olması genel olarak modelin ve ilgili terimlerin önemini ifade eder. Bu durumda model için önemli görülen terimler B, C, D, A^2 , B^2 , C^2 ve D^2 terimleridir.

Tablo 6.8. Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Oluşturulan MKD Dizayn Matrisi ve Elde Edilen Glukonik Asit Konsantrasyonları

DENEY NO	Faktör 1 A: CaCO ₃ Kesri (g/g)	Faktör 2 B: Melas Kesri (g/g)	Faktör 3 C: Köspe Kesri (g/g)	Faktör 4 D: Sıcaklık (°C)	İlave Su Kesri* (g/g)	Maksimum GA Üretimi** (g GA/ g sks)
1	0,0125	0,1	0,175	25	0,712	0,060
2	0,0375	0,1	0,175	25	0,687	0,068
3	0,0125	0,3	0,175	25	0,512	0,079
4	0,0375	0,3	0,175	25	0,487	0,066
5	0,0125	0,1	0,325	25	0,562	0,046
6	0,0375	0,1	0,325	25	0,537	0,040
7	0,0125	0,3	0,325	25	0,362	0,022
8	0,0375	0,3	0,325	25	0,337	0,039
9	0,0125	0,1	0,175	35	0,712	0,102
10	0,0375	0,1	0,175	35	0,687	0,156
11	0,0125	0,3	0,175	35	0,512	0,083
12	0,0375	0,3	0,175	35	0,487	0,130
13	0,0125	0,1	0,325	35	0,562	0,098
14	0,0375	0,1	0,325	35	0,537	0,103
15	0,0125	0,3	0,325	35	0,362	0,065
16	0,0375	0,3	0,325	35	0,337	0,082
17	0	0,2	0,250	30	0,550	0,136
18	0,0500	0,2	0,250	30	0,500	0,115
19	0,0250	0	0,250	30	0,725	0,176
20	0,0250	0,4	0,250	30	0,325	0,062
21	0,0250	0,2	0,100	30	0,675	0,205
22	0,0250	0,2	0,400	30	0,375	0,098
23	0,0250	0,2	0,250	20	0,525	0,054
24	0,0250	0,2	0,250	40	0,525	0,038
25	0,0250	0,2	0,250	30	0,525	0,230
26	0,0250	0,2	0,250	30	0,525	0,238
27	0,0250	0,2	0,250	30	0,525	0,235
28	0,0250	0,2	0,250	30	0,525	0,233
29	0,0250	0,2	0,250	30	0,525	0,236
30	0,0250	0,2	0,250	30	0,525	0,237

*İlave su kesri=1-(CaCO₃ Kesri+Melas Kesri+Köspe Kesri)

**Maksimum GA üretimi (g GA/ g sks): Çözeltideki GA miktarının (g) salt katı substat (Köspe ve melasdan gelen katı madde) miktarına (g) oranıdır. Salt katı madde miktarları hesaplanırken melasın % 20,05 olan su içeriği ve köspenin % 6,12 olan nem içeriği göz önünde bulundurulmuştur.

Gerçekleştirilen istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi için önerilen ikinci derece model denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\begin{aligned} \text{Glukonik Asit Üretimi (g GA/g sks)} = & -2,339 + 8,536x_A + 1,784x_B + 2,265x_C \\ & + 0,133x_D - 4,789x_Ax_C + 0,112x_AxD \\ & - 0,472x_BxC - 0,012x_BxD - 207,618x_A^2 \\ & - 3,577x_B^2 - 4,609x_C^2 - 0,002xD^2 \end{aligned} \quad (6.5)$$

Tablo 6.9. *A. niger* İle Melastan Katı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler

Standart sapma	0,027	R²	0,917
Ortalama	0,116	Adj. R²	0,859
Varyans (C.V.)	23,497	Pred. R²	0,599

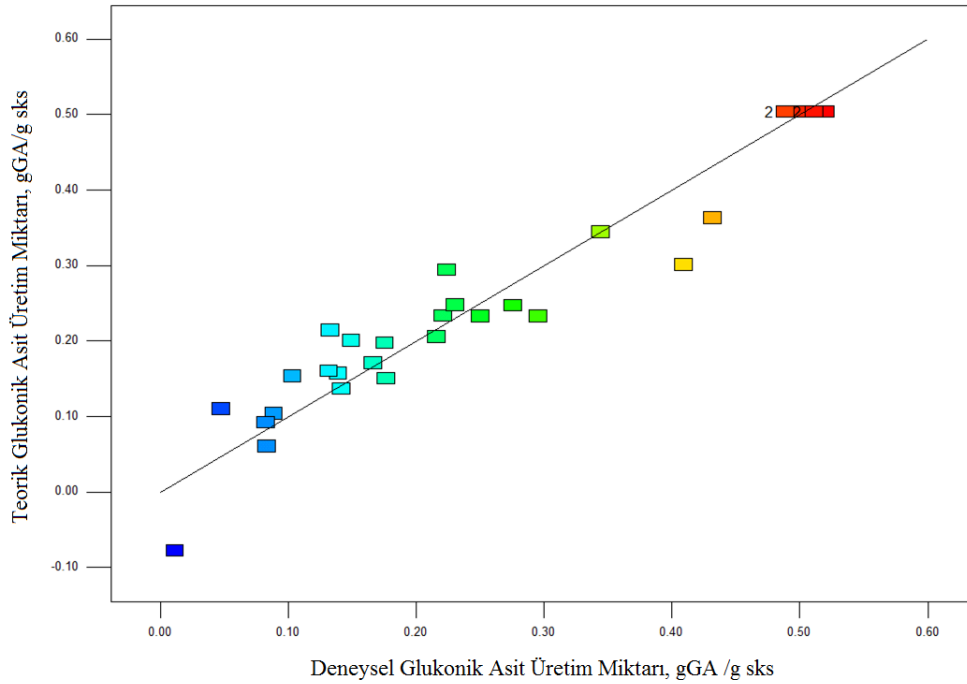
Tablo 6.10. *A. niger* İle Melastan Karı Hal Fermantasyonu ile Glukonik Asit Üretimi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	0,1412	0,0118	15,7122	< 0,0001
A	0,0003	0,0003	0,4622	0,5058
B	0,0038	0,0038	5,0309	0,0385
C	0,0087	0,0087	11,6094	0,0034
D	0,0068	0,0068	9,1106	0,0077
AC	0,0003	0,0003	0,4305	0,5206
AD	0,0008	0,0008	1,0378	0,3226
BC	0,0002	0,0002	0,2679	0,6114
BD	0,0006	0,0006	0,7715	0,3920
A²	0,0289	0,0289	38,5294	< 0,0001
B²	0,0351	0,0351	46,8421	< 0,0001
C²	0,0184	0,0184	24,6123	0,0001
D²	0,0806	0,0806	107,5763	< 0,0001

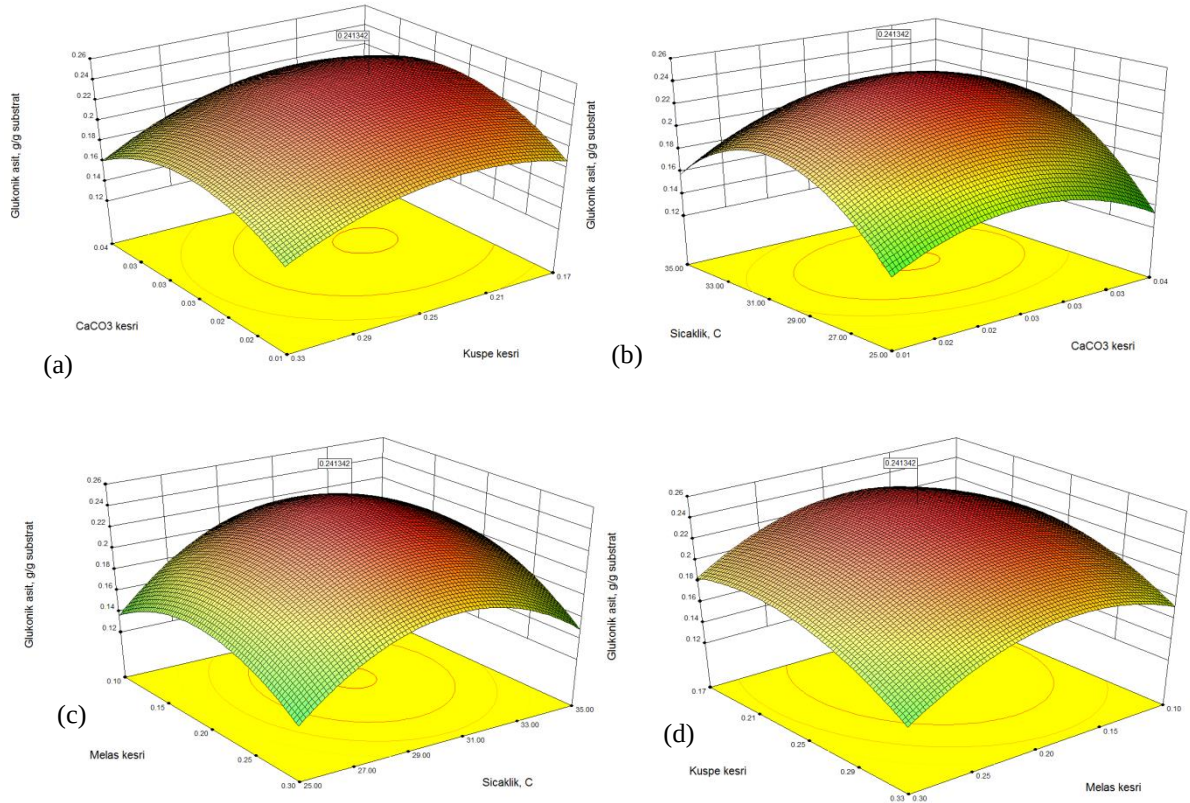
Bu model eşitliği fermantasyon değişkenlerine bağlı olarak verilmiş olup eşitlikte, A, CaCO₃ kesri (g/g); B, melas kesri (g/g); C, küspe kesri (g/g) ve D, sıcaklık (°C) parametreleridir. MKD dizayn matrisinde yer alan deneylerden elde edilen sonuçlar ile model eşitliğinden hesaplanan değerler arasındaki uyum Şekil 6.12’de görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi deneysel sonuçlarla model eşitliğinden hesaplanan değerler arasında oldukça iyi bir yaklaşım olduğu söylenebilir.

Katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi üzerine etkili olan parametrelerin etkileşim grafikleri de Şekil 6.13’de görülmektedir. Elde edilen üç boyutlu grafiklerde mevcut olan merkez noktalar civarındaki maksimum bölgelerinin uçlara doğru gidildikçe minimum değerler arz etme durumu, parametrelerin sonuç cevabı üzerine etkide bulunduğu şeklinde yorumlanabilir. Yarı katı hal fermantasyon çalışmaları için verilen

etkileşim grafikleri ile kıyaslandığında az sayıda grafiğin var olma durumu, derin fermentasyon çalışmalarında olduğu gibi, model ifadesinde yer alan önemsiz terimlerin çıkarılmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir deyişle cevap üzerine etkili olan parametre çiftleri CaCO_3 -küspe kesri, sıcaklık- CaCO_3 kesri, sıcaklık-melas kesri ve melas kesri-küspe kesri çiftleridir. Öte yandan katı hal fermentasyonunda, fermentasyon ortamının su içeriğinin önemli bir parametre olarak değerlendirilmesine karşın bu grafiklerden, su içeriğinin etkisine dair bir sonuç çıkarmak güçtür. Bu nedenle katı hal fermentasyon çalışmaları için oluşturulan MKD deney matrisinde her bir deneydeki ilave edilen su kesri Tablo 6.7’de verilmiştir. Tabloda su içeriği bakımından birebir karşılaştırılabilir diğer bir deyişle su içeriği dışında aynı şartlara sahip deney bulunmadığından net bir sonuç vermek mümkün değildir. Ancak genel olarak su kesri yüksek deneylerde elde edilen üretim miktarlarının daha yüksek olduğu noktasından hareketle, nem içeriğinin fermentasyona olumlu bir katkı yaptığı şeklindeki genel kanının geçerli olduğu söylenebilir.



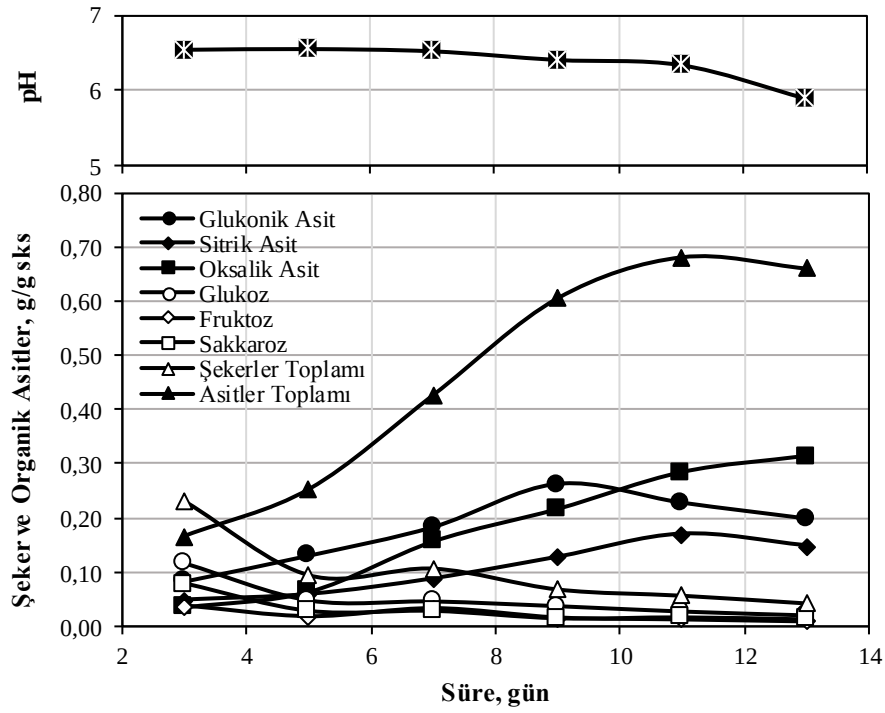
Şekil 6.12. *A. niger* ile şeker pancarı melasından katı hal fermentasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum



Şekil 6.13. *A. niger* ile şeker pancarı melasından katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) CaCO_3 kesri-küspe kesri, (b) Sıcaklık- CaCO_3 kesri, (c) Melas kesri-sıcaklık, (d) Küspe kesri-melas kesri.

DesignExpert yazılımı tarafından maksimum glukonik asit üretiminin elde edildiği şartlar için önerilen çözüm değerleri, 0,18 melas kesri, 0,22 küspe kesri, 30,9 °C sıcaklık, ve 0,03 CaCO_3 kesri şartlarında elde edilen glukonik asit üretiminin 0,24 g GA/g sks olduğu şeklindedir. Bu şartlarda yapılan bir fermantasyon çalışmasında elde edilen sonuçlar Şekil 6.14’de görülmektedir. Zamana bağlı olarak gerçekleştirilen deneylerde, glukonik asit konsantrasyonun zamanla artarak maksimum değerinin 9. günde 0,26 g GA/ sks olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen meydana gelen inhibisyon etkileri sonucu daha ileri sürelerde konsantrasyon düşmektedir. Buradan önerilen model ifadesinin deneysel sonuçlarla bir uyum içerisinde olduğu söylenebilir.

Şekil 6.14’den görüleceği gibi, katı hal fermantasyon şartlarında başlangıçta ortamda bulunan şekerler büyük ölçüde sakkaroz halindeyken, ilerleyen süreyle glukoz ve fruktozunun oluştuğu, öte yandan glukonik asitle birlikte sitrik ve oksalik asit miktarlarının da arttığı söylenebilir. 9. günde glukonik asit üretimi maksimum değerine ulaşmakta olup, sitrik ve oksalik asit üretimi sürekli artış eğilimi göstermektedir. Fermantasyon hızı açısından, bir değerlendirme yapıldığında katı hal fermantasyon hızının derin ve yarı katı hal fermantasyona



Şekil 6.14. *A. niger* ile şeker pancarı melasından katı hal fermentasyonu ile glukonik asit üretimi için önerilen modelden maksimum üretim şartlarındaki çözüm noktası için elde edilen süreye bağlı deney sonuçları (Melas Kesri: 0,18 g/g; CaCO_3 kesri: 0,03 g/g; Küşpe kesri: 0,22 g/g; Sıcaklık: 30,9 °C; Küşpe fraksiyonu: -16+30 mesh).

göre daha yavaş gerçekleştiği söylenebilir. Ortamdaki substratın tüketimi açısından bir değerlendirme yapmak üzere birim salt katı substrat başına şeker toplamı ve organik asitler toplamına bakıldığında 11. gün sonunda, bu değerlerin sırasıyla 0,06 ve 0,68 g/g sks olduğu görülmektedir. Melas ve küspeden gelen başlangıçtaki fermente olabilir şekerler toplamının 0,27 g/g sks civarında olduğu düşünüldüğünde, üretim sırasında sadece şekerlerin değil melas ve küспенin bünyesinde bulunan diğer hidrokarbon yapılarının da substrat olarak tüketildiği açıktır. Dolayısıyla katı hal fermentasyon ortamının, *A. niger* tarafından üretilen enzimlerin rol aldığı hidroliz, glikolizis, oksidasyon vb. olayların eş zamanlı olarak gerçekleştiği kompleks bir durum arz ettiği söylenebilir.

6.3. Küşpe Partikül Boyutunun Etkisi

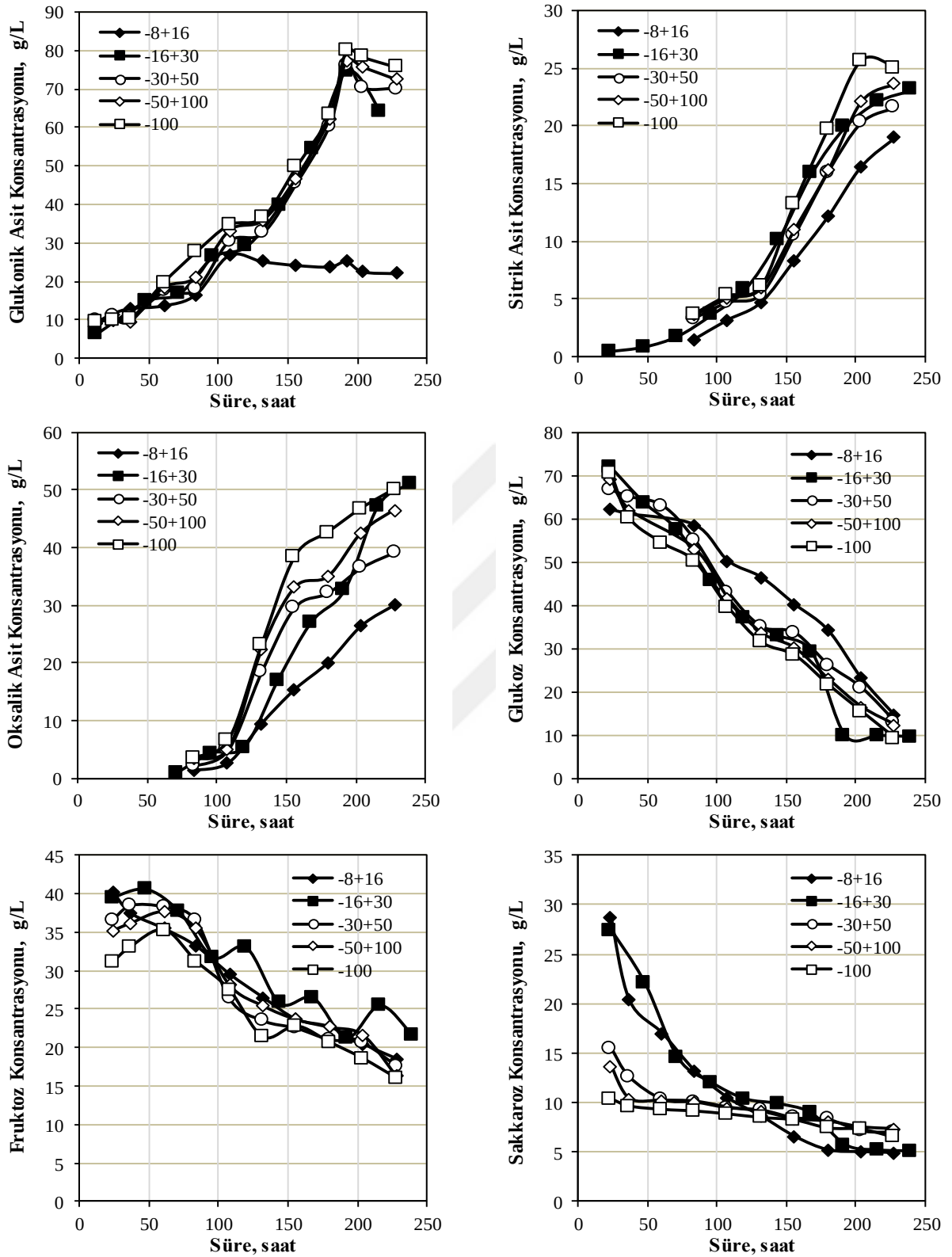
Yarı katı hal ve katı hal fermentasyon çalışmalarında küспенin katı bir substrat ve destek materyali olarak kullanılmasının glukonik asit üretimine olumlu katkılar yaptığı açıktır. Bu nedenle deneysel dizayn yöntemiyle belirlenen çözüm noktalarında glukonik asit üretimi üzerine partikül boyutunun etkisini ortaya koymaya yönelik deneyler de yapılmıştır. Bu bölümde bu deneylere ait sonuçlar verilecektir.

6.3.1. Yarı Katı Hal Fermantasyonuna K     Partikül Boyutunun Etkisi

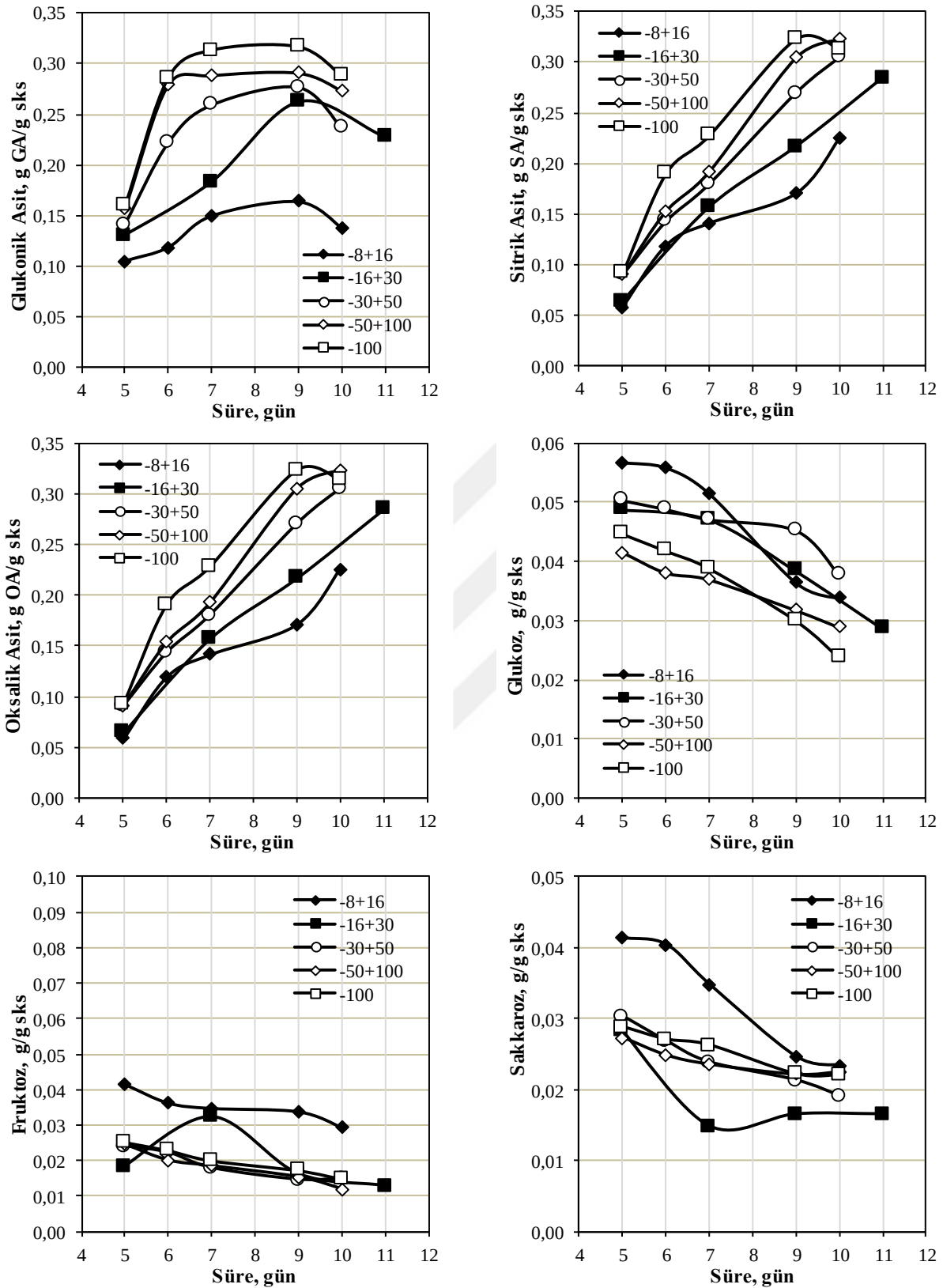
Yarı katı hal fermantasyonu için önerilen maksimum glukonik asit üretim şartlarında -8+16, -16+30, -30+50, -50+100 ve -100 mesh fraksiyonlarında hazırlanmış k     örnekleriyle zamana bağlı fermantasyon deneyleri yapılmıştır. Zamana bağlı olarak elde edilen organik asit ve şeker konsantrasyonları   ekil 6.15’de toplu olarak görülmektedir. Partikül boyutunun başta glukonik asit olmak üzere, üretilen organik asit miktarları üzerine kayda değer bir etkisinin olduğu açıktır. En iri partikül b  y  kl     olan -8+16 mesh fraksiyonu için glukonik asit konsantrasyonu oldukça sınırlı değerlerde (~25 g/L) seyrederken, daha ince partikül büyüklüklerinin t  m   için yaklaşık benzer eğilimle, zamana bağlı olarak belirgin ölçüde artış gözlenmektedir. -8+16 mesh’den daha ince olan fraksiyonlarda elde edilen maksimum glukonik asit konsantrasyonları 75-80 g/L aralığında olmaktadır. Sitrik ve oksalik asit üretimi açısından bakıldığında, partikül b  y  kl    ne bağlı olarak üretim hızının değişme eğiliminin daha yumuşak olduğu görülmektedir. Bu nedenle yarı katı hal fermantasyonuyla glukonik asit üretimi açısından, partikül b  y  kl    n  n kritik bir faktör olduğu söylenebilir.     tme maliyetleri göz önüne alındığında -16+30 mesh fraksiyonunun optimum bir partikül b  y  kl     olarak değerlendirilmesi mümkündür.

6.3.2. Katı Hal Fermantasyonuna K     Partikül Boyutunun Etkisi

Katı hal fermantasyonuyla substrat olarak şeker pancarı melası ve k    sinin kullanıldığı glukonik asit üretimine, k     partikül boyutunun incelendiğı deneyler, MKD ile elde edilen optimum şartlarda y  r  t  lm    tır. Buna göre K     kesrinin 0,18, melas kesrinin 0,22, CaCO₃ kesrinin 0,03 ve dolaylı olarak ilave su kesrinin 0,57 olduğu karışımlar ile 30,8   C sıcaklıkta -8+16, -16+30, -30+50, -50+100 ve -100 mesh fraksiyonlarındaki k     örnekleriyle zamana bağlı olarak yürütülen deneylerin sonuçları   ekil 6.16’da görülmektedir. Şekillerden anlaşılacağı üzere üretilen organik asitlerin ve ortamdaki şekerlerin miktarları yarı katı hal fermantasyonunda olduğundan çok daha fazla partikül b  y  kl    ne bağlıdır. Bu durumun katı hal fermantasyon çalışmalarının statik şartlarda gerçekleştirilmesi nedeniyle, fermantasyon olayının kütlenin oluşturduğu toplam yüzey alanına büyük ölçüde bağlı olmasından kaynaklandığı d    n  lmektedir. Dolayısıyla köşk partikül boyutlarında oluşan yüzey alanının büyük oluşu, atmosferik oksijen ile



Şekil 6.15. *A. niger* ile şeker pancarı melasından yarı katı hal fermantasyonu ile glukonik asit üretimi üzerine küspe partikül büyüklüğünün etkisi (Melas kons.:245 g/L; CaCO_3 miktarı: 30 g/L; Sıcaklık: 30,2 °C; Küspe miktarı: 15,5 g/L; Çalkalama hızı: 145,7 d/dk).



Şekil 6.16. *A. niger* ile şeker pancarı melasından katı hal fermentasyonu ile glukonik asit üretimi üzerine küspe partikül büyüklüğünün etkisi (Melas Kesri: 0,18 g/g; CaCO_3 kesri: 0,03 g/g; Küspe kesri: 0,22 g/g; Sıcaklık: 30,9 °C).

reaksiyona girme eğilimini arttıran bir faktör olarak düşünülebilir. Örneğin glukonik asit için üretimin maksimum olduğu 9. günde, elde edilen üretim miktarları -8+16, -16+30, -30+50, -50+100 ve -100 mesh fraksiyonları için sırasıyla 0,16; 0,26; 0,28; 0,29 ve 0,32 g GA/g sks'dir. Benzer eğilimin sitrik ve oksalik asit için de var olduğu söylenebilir. Öte yandan zamana bağlı olarak gözlenen şeker miktarlarında belli bir sistematiğe bahsetmenin pek mümkün olmadığı söylenebilir. Genel bir eğilim olarak büyük partikül boyutları için şeker miktarlarının daha yüksek olduğu izlenimi oluşmuştur. Bu durum da partikül boyutu büyüdükçe asit dönüşümünün düşük olması nedeniyle beklenen bir durum olarak değerlendirilebilir.



7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Şeker pancarı melasından *A.niger* kullanılarak kesikli şartlarda fermantasyonla glukonik asit üretiminin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Çalışmalara konu edilen *A.niger* NRRL 3 suşu, gerek farklı bileşimlerde hazırlanan ve karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı sentetik besi yerlerinden, gerekse melas içeren sentetik besi yerlerinden glukonik asit üretimini gerçekleştirebilme kabiliyetine sahiptir. Öte yandan şeker pancarı melasının, yüksek şeker içeriğinin yanı sıra, protein yapılı organik maddeleri, vitaminleri ve inorganik besin maddelerini de içeriyor olması nedeniyle olduğu haliyle dışarıdan herhangi bir besin ilavesi yapılmaksızın fermente olabileceği ortaya konulmuştur.
2. Şeker pancarı melasından kesikli olarak *A.niger* kullanılarak glukonik asit üretimi için derin, yarı katı hal ve katı hal yöntemleriyle fermantasyon şartlarının optimize edilmesine yönelik olarak cevap yüzey yöntemi ve merkezi kompozit dizayn tekniği kullanılarak deneysel tasarımlar yapılmıştır. Bu deneysel tasarımlarda incelenecek parametreler ve aralıkları literatür bilgilerinden ve yürütülen ön denemelerin sonuçlarından elde edilmiştir. Oluşturulan deneysel dizayn matrislerinde yer alan tüm deneyler zamana bağlı olarak gerçekleştirilmiş olup, maksimum glukonik asit üretiminin gerçekleştiği şartlardaki sonuçlar cevap değeri olarak alınmıştır. Yürütülen çalışmalarda elde edilen sonuçlar aşağıya çıkarılmıştır:
 - a) Derin fermantasyon için yapılan dizayn deneyleri sonunda en yüksek glukonik asit konsantrasyonu, 257,8 g/L melas konsantrasyonu, 30 g/L CaCO_3 miktarı, 31,8 °C sıcaklık ve 135,2 d/dk çalkalama hızında elde edilmiş olup, bu şartlarda 192 saatte ulaşılan glukonik asit konsantrasyonu 58,76 g/L' dir. Aynı şartlarda ortamdaki sitrik ve oksalik asit konsantrasyonlarının 17,25 ve 30,35 g/L olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ortamdaki glukoz, fruktoz ve sakkaroz konsantrasyonlarının da sırasıyla 10,38; 22,89 ve 5,02 g/L olduğu tespit edilmiştir.
 - b) Yarı katı hal fermantasyonu için yapılan dizayn deneyleri sonunda en yüksek glukonik asit konsantrasyonu, 245 g/L melas konsantrasyonu, 15,5 g/L küspe miktarı, 30 g/L CaCO_3 miktarı, 30,2 °C sıcaklık ve 145,7 d/dk çalkalama

hızında elde edilmiş olup, bu şartlarda 192 saat sonunda ulaşılan glukonik asit konsantrasyonu 74,64 g/L' dir. Aynı şartlarda ortamdaki sitrik ve oksalik asit konsantrasyonlarının 19,92 ve 32,65 g/L olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ortamdaki glukoz, fruktoz ve sakkaroz konsantrasyonlarının da sırasıyla 9,97; 21,29 ve 5,72 g/L olduğu tespit edilmiştir.

- c) Katı hal fermantasyonu için yapılan dizayn deneyleri sonunda en yüksek glukonik asit konsantrasyonu, 0,18 melas kesri, 0,22 küspe kesri, 0,03 CaCO₃ kesri ve 30,9 °C sıcaklıkta statik şartlarda elde edilmiş olup, bu şartlarda 9 gün sonunda ulaşılan glukonik asit miktarı 0,26 g/g salt katı substrat' dır. Aynı şartlarda ortamdaki sitrik ve oksalik asit miktarlarının 0,13 ve 0,21 g/g sks olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ortamdaki glukoz, fruktoz ve sakkaroz miktarlarının da sırasıyla 0,038, 0,016 ve 0,014 g/g sks olduğu tespit edilmiştir.
3. Üç farklı fermantasyon biçimini birbirleriyle üretim verimi açısından karşılaştırmak için, bir yöntem olarak katı hal fermantasyonunda olduğu gibi, ortamdaki salt katı substrat miktarı başına üretilen glukonik asit miktarları karşılaştırılabilir. Buna göre, derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon biçimleri için bu değerler sırasıyla, 0,285; 0,354 ve 0,262 g/g sks şeklindedir. Fermantasyon süreleri de göz önünde bulundurularak, elde edilen bu değerlerin süreye de oranlanmasıyla verimlilik açısından da bir karşılaştırma yapılabilir. Buna göre, derin, yarı katı hal ve katı hal fermantasyon biçimleri için verimlilik değerlerinin sırasıyla 0,036; 0,044 ve 0,029 g GA/g sks.gün olduğu görülmektedir. Bu yönüyle yarı katı hal fermantasyonu en verimli fermantasyon biçimi olarak ortaya çıkmaktadır.
4. Yarı katı hal ve katı hal fermantasyonları için kullanılan küspenin partikül büyüklüğünün etkisini ortaya koymak üzere, elde edilen optimum şartlarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerin sonunda yarı katı hal fermantasyonu için en uygun küspe boyut fraksiyonunun, öğütme maliyetleri de göz önüne alındığında, -16+30 mesh fraksiyonu olduğu, katı hal fermantasyonunda ise azalan tanecik boyutuyla üretim miktarının kayda değer seviyede arttığı tespit edilmiştir. Katı hal fermantasyonunda -16+30 mesh faraksiyonu için 0,26 g/g sks olan üretim miktarı, -100 mesh fraksiyonu için 0,32 g/g sks değerine kadar çıkmıştır.

5. Her üç fermantasyon biçimi için, maksimum üretimin gerçekleştiği şartlarda ortamda yan ürünler olarak önemli miktarlarda sitrik ve oksalik asit de bulunduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle nihai hedef glukonik asit üretimi olmakla birlikte, ticari değeri olan sitrik ve oksalik asit üretiminin de gerçekleşmesi nedeniyle, prosesin bu yönüyle de değerlendirilmesi gerektiği açıktır. Bu konuda, özellikle ayırma saflaştırma maliyetleri prosesin fizibilitesini belirleyici en önemli unsur olarak düşünülebilir.

Nihai bir sonuç olarak, şeker pancarı melasından *A. niger* kullanılarak glukonik asit üretiminin mümkün olduğu, bunun için de en uygun fermantasyon yöntemi olarak yarı katı hal fermantasyonu yönteminin öne çıktığı söylenebilir. Özellikle şeker sanayinin bir yan ürünü olan şeker pancarının katı destek materyali ve substrat olarak kullanılmaya elverişli oluşu prosesin fizibilitesini arttıran bir unsurdur. Şeker sanayinin Türkiye’de yaygın ve gelişmiş oluşu, aslında pancara dayalı ürünlerin üretimini de beraberinde getirmesi beklenen bir durum iken, melasın ve küspenin sadece alkol sanayinde ve yem sanayinde kullanılıyor olması bir eksiklik olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmanın sonuçlarından da görüldüğü gibi organik asitlerin melasdan ve küspeden çıkılarak fermantasyon teknikleriyle üretimi mümkündür. Bu ürünlerin ekseriyetle ithalat yoluyla karşılanması yerine, şeker fabrikalarının içinde kendi ürettiği melas, küspe ve karbonatlama keki gibi yan ürünleri ve artıkları kullanarak organik asitlerin üretimi sağlanabilir. Bu nedenle bu çalışmanın sonuçlarından hareketle, şeker sanayinde organik asitlerin üretimine yönelik proseslerin oluşturulması için gerek laboratuvar ve gerekse pilot ölçek çalışmaların yapılması, bu proseslerin teknolojik, egzerjik ve ekonomik açılarından değerlendirilmesine yönelik çalışmaların yapılması önerilebilir. Böylece ülke ekonomisine önemli katkılar sağlanabileceği düşünülmektedir.

8. KAYNAKLAR

- Ahmed K., Valeem E., Haq Q. 2015. Optimal conditions for the production of industrial enzymes by *Aspergillus niger* using agricultural wastes as source of carbon, *Fuuast Journal of Biology*, 4, 205-211.
- Amaniampong P.N., Li K., Jia X., Wang B., Borgna A., Yang Y.. 2014. Titania-supported gold nanoparticles as efficient catalysts for the oxidation of cellobiose to organic acids in aqueous medium, *Chemcatchem*, 6, 2105–2114.
- Amaniampong P.N., Jia X., Wang B., Mushrif S.H., Borgna A., Yang Y. 2015. High-temperature reduction improves the activity of rutile TiO₂ nanowires-supported gold-copper bimetallic nanoparticles for cellobiose to gluconic acid conversion, *Applied Catalysis A: General*, 50, 16–27.
- Ameyama, M., Nonobe, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Takimoto, K. 1986. purification and characterization of the quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*, *Agricultural Biology and Chemical*, 50, 49-57.
- Amotz, S., Rugh, S., Markussen, E.K., Thomsen, K. 1986. US 4,572,897, Carrier for immobilizing enzymes, 25.12.1986.
- An D., Ye A., Deng W., Zhang Q., Wang Y. 2012. Selective conversion of cellobiose and cellulose into gluconic acid in water in the presence of oxygen, catalyzed by polyoxometalate-supported gold nanoparticles, *Chemistry Journal*, 18, 2938–2947.
- Anastassiadis, A., Aviasidis, A., Wandrey C. 1999. US 5962286, Process for the production of gluconic acid with a strain of *Aureobasidium pullulans*, 5.10.1999.
- Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C. 2001. US 6303351. Process for the continuous production of citric acid by fermentation, 16.10.2001.
- 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*, 91,494-501.
- Anastassiadis S., Rehm H.J. 2006. Continuous gluconic acid production by *Aureobasidium pullulans* with and without biomass retention, *Electron Journal of Biotechnology*. 9, 494–504.
- Anastassiadis S. and Morgunov I.G. 2007. Gluconic acid production, *Recent Patents On Biotechnology*
- Ano Y., Shinagawa E., Adachi O., Toyama H., Yakushi T., Matsushita K., 2011. Selective, high conversion of d-glucose to 5-keto-d-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*, *Bioscience Biotechnology and Biochemical*, 75, 586–589.
- Anonim 1, 2002. Glucono Delta-Lactone <http://www.jungbunzlauer.com/en/products/gluconates/glucono-delta-lactone.html> Jungbunzlauer, 2002.
- Anonim 2. 2016. <http://Haryanabiotech.Com/>
- Anonim 3. The observatory of economic complexity <http://atlas.media.mit.edu/en/profile/hs92/291816/> 2014
- Anonim 4. 2013. http://www.sekerkurumu.gov.tr/upload/special/SEKER_KURUMU_2013_F.PDF . Şeker Kurumu Faaliyet Raporu 2013.
- Anonim 5. 2016. <http://www.turkseker.gov.tr/>
- Anonim 6. 2016. <http://www.johnkingchains.com/industries/sugar-industry-chains-cane-and-beet/typical-layout-in-sugar-beet-diffuser-process/> .

- Arimi M.M., Zhang Y., Götz G., Kiriamiti K., Geißen S.U.** 2014. Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal Technologies, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 87, 34-43.
- Attwood M.M., Dijken J.P., Pronk J.T.** 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72, 101-105
- Babu K.R. and Satyanarayana T.** 1996. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55, 464-467.
- Balakrishnan, K., Pandey, A.** 1996. production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55, 365-372.
- Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L.,** 2009. Glucose oxidase an overview, *Biotechnology*, 27, 489-501.
- Bao J., Furumoto K., Fukunaga K., Nakao K.** 2001. A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate, *Biochemical Engineering*, 8, 91-102.
- Bertin C., Rouau X., Thibault J.** 1988. Structure and properties of sugar beet pulp, *Journal of Science Food Agriculture*, 44, 15-29.
- Besson M., F. Lahmer, G. Fleche, J.** 1995. catalytic oxidation of glucose on bismuth-promoted palladium catalysts, *Catalyst*, 152, 116-121.
- Biella S., L. Prati, M. Rossi, J.** 2002. Selectivity control in the oxidation of phenylethane-1, 2-diol with gold catalyst, *Inorganica Chimica Acta*, 349, 253-257.
- Bin D., Wang H., Li J., Wang H. Yin Z.,** 2014. Controllable oxidation of glucose to gluconic acid and glucaric acid using an electrocatalytic reactor, *Electrochemical*, 130, 170-178.
- Blom R.H., Pfeifer V.F., Moyer A.J., Traufler D.H., Conway H.F., Crocker C.K., Farison R.E., Hannibal D.V.** 1952. Sodium gluconate production, fermentation with *Aspergillus niger*, *Industrial Engineering Chemical*, 44, 435-440.
- Bright H. and Appleby M.** 1969. The ph dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction, *Journal Of Biological Chemistry*, 244, 3625-3634.
- Brookes G.C. and Neville K.B.** 2005. an analysis of labeling requirements, market dynamics and cost implications, *The Global GM Market- Implications For The European Food Chain*, U.K..
- Bull D.N. and Kempe L.L.** 1970. Kinetics of the conversion of glucose to gluconic acid by *Pseudomonas ovalis*, *Biotechnology Bioengineering*, 12, 273-290.
- Buzzini P., Gabbetti 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, *Biotechnology Letter*, 15, 151-156.
- Cameselle C., Bohlmann J.T., Núñez M.J., Lema J.M.** 1998. Oxalic acid production by *Aspergillus niger* Part I: Influence of sucrose and milk whey as carbon source, *Bioprocess Engineering*, 19, 4, 247-252.
- Cochrane V. W.** 1958. *Physiology Of Fungi*, John Wiley And Sons, London.
- Chun U.H. and Rogers P.L.** 1988. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 19-24.
- Curie J., Kane J., Finlay A.** 1931. US 1,893,819. Process for producing gluconic acid by fungi.
- Currie J. N. and Carter R. H.** 1933. U.S. Patent 1896811. Gluconic acid, *Chemical Abstract*, 27, 2757.

- Currie J. N. and Finlay A.** 1933. U.S. Patent, 1908225, Fermentation such as the production of D-gluconic acid.
- Deller K., Krause H., Peldszus E., Despeyroux B.** 1992. US5,132,452, Method for preparation of gluconic acid by catalytic oxidation of glucose, 21.09.1992.
- Dinis M.J., Bezerra R.M.F, Nunes F., Dias A.A., Guedes C.V., Ferreira L.M.M.,** 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi, *Bioresource Technology*, 100,4829–35.
- Dronowat S., Svihla C., Hanley T.** 1995. The effects of agitation and aeration on the production of gluconic acid by *Aspergillus niger*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51,52, 347-354.
- Eblagon K.M., Pereira, M.F.R., Figueiredo J.L.** 2016. One-pot oxidation of cellobiose to gluconic acid. Unprecedented high selectivity on bifunctional gold catalysts over mesoporous carbon by integrated texture and surface chemistry optimization, *Applied Catalysis B: Environmental*, 184, 381-396.
- Economou C.N., Makri A., Aggelis G., Pavlou S., Vayenas D.V.,** 2010. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the Biotechnologyological production of single cell oil, *Bioresource Technology*, 101, 1385–1388.
- El-Bendary M.A., Monoram D., Foda M.S.** 2008. Efficient mosquitocidal toxin production by bacillus sphaericus using cheese whey permeate under both submerged and solid state fermentations, *Journal of Invertebrate Pathology*, 98,46–53.
- El-Enshasy H. A.** 2003. Production of gluconic acid by free and immobilized cells of recombinant *Aspergillus niger* in batch cultures, *Journal Biotechnology*, 13,187-201.
- Elfari M., Ha S.W., Bremus C., Merfort M., Khodaverdi V., Herrmann U., Sahm H., Görisch H.,** 2005. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 668-674.
- Elnagy M.A. and Megalla S.E.** 1975. Gluconic Acid Production by *Penicillium puberulum*, *Folia Microbiology*, 20, 504-508.
- Enfors S., Haggström L.** 2000. Bioprocess technology fundamentals and applications, Royal Institute of Technology, Stockholm, 356.
- Fischer K. and Bipp H.P.** 2005. Generation of organic acids and monosaccharides by hydrolytic and oxidative transformation of food processing residues, *Bioresource Technology*, 96, 831–842.
- Franke W.** 1963. Zur physiologie und enzymatik der gluconsaure-graung durch *Aspergillus niger*, *Zentralbl Bakteriol Parisitenkd Infektionskr*, 1, 194–200.
- Gibson Q.H. and Massey B.E.P.** 1964. Swoboda, kinetics and mechanism of action of glucose oxidase, *Journal of Biological Chemistry*, 239, 3927–3934.
- Gregersen L. and Jorgensen S. B.,** 1999. Supervision of fed-batch fermentation, *Chemical Engineering Journal*, 75, 69-76.
- Gromada A. and Fiedurek J.** 1997. Selective isolation of *Aspergillus niger* mutants with enhanced glucose oxidase production, *Journal of Applied Microbiology*, 82, 5,648-652.
- Guru M., Bilgesu A.Y., Pamuk V.** 2001. Production of oxalic acid from sugar beet molasses by formed nitrogen oxides, *Bioresource Technology*, 77, 81–86.
- Hamad O., Alma M.H., Ismael H.M., Gocerı A.** 2014. The Effect of some sugars on the growth of *Aspergillus niger*, *Natural Science*, 17, 4.
- Hartmeier W. and Döppner T.** 1983. Preparation and properties of mycelium bound glucose oxidase co-immobilized with excess catalase, *Biotechnology Letter*, 5,743–748.

- Hartmeier W.** 1984. US4,460,686, Glucose oxidation with immobilized glucose oxidase-catalase.
- Hatzinikolaou D., Macris B.** 1995. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*, Enzyme and Microbial Technology, 17, 530-534.
- Haug I. and Heinzler K.** 1990. Simultaneous synthesis of sorbitol and gluconic acid by glucosefructose oxidoreductase, Biotechnology Congress, 289- 292.
- Hayashi S. and Nakamura S.**1981. Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions, Biochemical and Biophysical Acta (BBA) – Enzymology, 657, 1, 40-51.
- Heinrich M. and Rehm H.J.** 1982. formation of gluconic acid at low pH values by free and immobilized *Aspergillus niger* cells during citric acid fermentation, Applied Microbiology Biotechnology, 15,88–92.
- Henk G., and Wilt J.** 1972. Part I: The oxidation of glucose to gluconic acid, Industrial Engineering and Chemical Research Development, 11,4, 370-380.
- Holstein A.G. and Holsing G. C.** 1962. US 3,050,444, Method for the production of levulose, 03.04.1962.
- Hommes R.W.J., Postma P.W., Neijssel O.M., Tempest D.W., Dokter P., Duine J.A.** 1984. evidence of a quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme in several strains of *E. Coli*, Fems Microbiology Letter, 24, 329-333.
- Hölker U., Lenz J.** 2005. Solid-state fermentation: Are there any Biotechnologyological advantages?, Curr Opin Microbiology, 8.
- Huang C., Zong M.H., Wu H., Liu Q.P.** 2009. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by trichosporon fermentans, Bioresource Technology, 100, 4535, 8
- Hustede H., Haberstroth H.J., Schinzig E.** 1989. Gluconic acid, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 449–56.
- Ikeda Y., 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.
- Initial Assessment Report For SIAM 18.** 2004. Gluconic acid and derivatives, Paris, France, 20-23 April 2004.
- Ishida T., Kinoshita N., Okatsu H., Akita T., Takei T., Haruta M., Angew.** 2008. Deposition of gold clusters on porous coordination polymers by solid grinding and their catalytic activity in aerobic oxidation of alcohols, Chemical International Edition, 47. 9265–9268.
- Iwase K.** 1991. Gluconic acid synthesis by the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma robustum*, Canadian Journal Of Botany, 70, 84-88.
- James J. and Simpson B.K.** 1996. Application of enzymes in food processing, CRC Critical Reviews in Food Science And Nutrition, 36, 437–463.
- Kagliwal L.D., Survase S.A., Singhal R.S.** 2009. A novel medium for the production of cephamycin c by nocardia lactamdurans using solid-state fermentation, Bioresource Technology, 100.
- Kalogiannis S., Iakovidou G., Kyriakides M.L., Kyriakidis D.A., Skaracis G.N.** 2003. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses, Process Biochemistry, 39, 249-256.
- Kapat A, Jung J, Park Y.** 2001. Enhancement of glucose oxidase production in batch cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*; optimization of oxygen transfer condition, Journal of Applied Microbiology, 90, 216-222.

- Kara A. and Bozdemir T.O.** 1998. Optimization of the growth parameters of *Aspergillus foetidus*, *Acta Biotechnologica*, 18, 327-338.
- Kay K., Debarah R., George C.** 1990. Production, purification and properties of glucose oxidase from biocontrol fungus *Talaromyces flavus*, *Canadian Journal Of Microbiology*, 36, 199-205.
- Kazemi B. H., Papari S.** 2013. Modeling and control of dissolved oxygen concentration in the fermentation of glucose to gluconic acid, *Chemical Engineering*, 57, 63-7.
- Kelly R.I., Adinarayana N.** 1986. Purification and characterization of god from lignolytic culture of phanerochaete chrysosporium, *Journal of Bacteriology*, 166, 269-274.
- Khardenavis A.A., Vaidya A.N., Kumar M.S., Chakrabarti T.** 2009. Utilization of molasses spentwash for production of bioplastics by waste activated sludge, *Waste Manage*, 29, 2558-2565.
- Kim D., Kim H.** 1992. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and inulinase, *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 336-342.
- Klasen R., Bringermeier S., Sahm H.** 1995. Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate: NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*, *Journal of Bacteriology*, 177, 2637-2643.
- Klein J., Rosenberg M., Markos J., Dolgos O., Krosiak M., Kristofikova L., Engg J.** 2002. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger*-study of mass transfer in an airlift bioreactor, *Journal of Biochemical Engineering Biochemistry*, 10, 197-205.
- Kubicek C.P., Peter P., Jaap V.** 2010. The Mycota a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research, Edited By K. Esser, 10, 215-234.
- Kulshrestha S.** 2013. Invertase and its applications a brief review, *Journal of Pharmacy Research*, 7, 792-797.
- Kundu P., Das A.** 1984. utilization of cheap carbohydrate sources for production of calcium gluconate by *Penicillium funiculosum* mutant MN 238, *Indian Journal of Experimental Biology*, 22, 279-281.
- Kusai K., Sekuzu I., Hagihara B., Okunuki K., Yama- Uchi S., Nakai M.** 1960. Crystallisation of glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*, *Biochemical and Biophysical Acta (BBA)*, 40, 555- 557.
- Küçükaşık F., Kazak H., Güney D., Finore I., Poli A., Yenigün O., Öner E. T.** 2011. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas sp.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1729- 1740.
- Lazaridou A, Roukas T, Biliaderis C.G, Vaikousi H.** 2002. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 122-132.
- Lennox B., Hiden H. G., Montague G. A., Kornfeld G., Goulding P. R.** 2000. Applications Of multivariate statistical process control to batch operations, *Computers and Chemical Engineering*, 24, 291-296.
- Lennox B., Montague G. A., Hiden H. G., Kornfeld G., Goulding P. R.** 2001. process monitoring of an industrial fed-batch fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 2, 125-135.
- Li S., Xu S., Liu S., Yang C., Lu Q.** 2004. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas, *Fuel Processing Technology*, 85, 1201 – 1211.
- Linko P.** 1980. Immobilized live cells, In Moo-Young M. (edditor) *Advances in Biotechnology*, 6th International Fermentation Symposium London, 711-715

- Linko P., Linko Y.Y.** 1983. Application of immobilized microbial cells, In: Lemuel B.W., Ichiro C. (editors) Applied Biochemistry and Bioengineering, Academic press, New York, 4, 97.
- Lockwood L. B.** 1975. Organic acid production in the filamentous fungi, 1. Industrial Mycology, (Editors Smith, H. E. and Berry, D. E.) Edward Arnold (Pub.) 140.
- Loffhagen N., Babel W.** 1993. The influence of energy deficiency-imposing conditions on the capacities of *Acetobacter methanolicus* to oxidize glucose and to produce gluconic acid, Acta Biotechnologica, 13, 251-256.
- Machado C.M., Oishi B.O., Pandey A., Soccol C.R.** 2004. Kinetics Of *Gibberella Fujikori* growth and gibberellic acid production by solid state fermentation in a packed-bed column bioreactor, Biotechnology Progress, 20, 1449-1453.
- Machado I., Teixeira J. A., Rodriguez-Couto S.** 2013. Semi-solid-state fermentation: a promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*, Journal of Biotechnology, 165, 3, 195-200.
- Malley J., Weaver J.** 1972. Subunit structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, Biochemistry, 11, 3527-3532.
- Markussen E.K., Wintherhalter S.A.** 1978. US 4,106,991, Enzyme granulate composition and process for forming enzyme granulates, 15.09.1978.
- Matsui T., Tooyama K., Sato S.** 2013. Simultaneous saccharification of corn starch in gluconic acid production by *Aspergillus niger* immobilized on nonwoven fabric in a pressurized reactor, Journal of Microbiology and Biochemical Technology, 5, 88-91.
- Mattey M.** 1992. The production of organic acids, Critical Reviews in Biotechnology, 12, 87-132.
- May O.E., Herrick H.T., Moyer A.J., Wells P.A.** 1934. Gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure, Industrial Engineering and Chemistry Research, 26, 575-578.
- McCready R.M.**, 1966. Polysaccharides of sugar beet pulp : A review of their chemistry, Journal American Sugar Beet Technology, 14, 261-270.
- Michel F., Thibault J.F., Barry J.L., Baynast R.** 1988. Preparation and characterisation of dietary fibre from sugar beet pulp, Journal of the Science of Food and Agriculture, 42, 77-85.
- Mitchell D.A., Berovic, M., Krieger, N.**, 2002. Overview of solid state bioprocessing, Biotechnology Annual Review, 8, 183-225.
- Moksia J., Larroche, C., Gros, J.B.**, 1996. Gluconate production by spores of *Aspergillus niger*, Biotechnology Letters, 18, 1025-1030.
- Moresi M., Parente E., Mazzatura A.** 1991. Effect of dissolved oxygen concentration on repeated production of gluconic acid by immobilized mycelia of *Aspergillus niger*, Applied Microbiology Biotechnology, 36, 320-323.
- Moyer A.J.** 1940. US 2351500, Process for gluconic acid production, Chemical Abstract, 38, 53-60.
- Mukhopadhyay R., S. Chatterjee, B.P. Chatterjee, P.C. Banerjee, A.K. Guha**, 2005. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*, International Dairy Journal, 15 299-303.
- Müller D.**, 1928. Oxidation von glukose mit extrakten aus *Aspergillus niger* (oxidation of glucose with the extracts from *Aspergillus niger*), BioChemical, 199, 36.
- Myers R.H., Montgomery D.C.** 1995. Response surface methodology, process and product optimization using designed experiments, 2nd edition John Wiley and Sons, New York.

- Nakao K., Kiefner, A., Furumoto, K.** 1997. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors, *Chemical Engineering Science*, 52, 21-22, 4127-4133.
- Neijssel O.M., Tempest D.W., Postma P.W., Duine J.A., Frank J.** 1983. Glucose metabolism by k+-limited *Klebsiella aerogenes*: evidence for the involvement of a quinoprotein glucose dehydrogenase, *Fems Microbiolgy Letter*, 20, 35-39.
- Nigam P., Vogel M.** 1991. Bioconversion of sugar industry by-products-molasses and sugar beet pulp for single cell protein production by yeasts, *Biomass and Bioenergy*, 1, 6, 339-345.
- Nigam P.S., Pandey.** 2009. A. solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues, (Nigam P.S., Pandey A., Editors), *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization*, 197-221.
- Nigam P.S.** 2009. Production of bioactive secondary metabolites, (Nigam P.S., Pandey A, Editors) *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization*, 129-45.
- Nurhayati J., Mayzuhroh, A., Arindhani, S., Caroenchai, C.** 2016. Studies on bioethanol production of commercial. baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 493-499.
- Olbrich H.** 1963. The molasses, *Fermentation Technologist*, Institut für Zuckerindustrie, Berlin, Germany.
- Olijve W., Kok J.J.** 1979. Analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures, *Archives Microbiology*, 121, 291-297.
- Olmos J., Zuniga-Hansen M.E.** 2012. Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates, *Chemical Engineering Journal*, 192, 29-36.
- Onda A., Ochi T., Yanagisawa K.** 2011. New direct production of gluconic acid from polysaccharides using a bifunctional catalyst in hot water, *Catalysis Communications*, 12, 421-425.
- Orbis Research.** 2016. Hector Costello ile Kişisel görüşme, 3 Haziran 2016.
- Orozco A.L., Pérez M.I., Guevara O., Rodríguez J., Hernández M., González-Vila F.J.** 2008. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces. sp* GS/MS analysis, *Journal of Analytical Applied Pyrolysis*, 81, 247-52.
- Orzua M.C., Mussatto S.I., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez R., De La Garza H, Teixeira J.A.,** 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation, *Industrial Crops and Production*, 30, 24-7.
- Osmaa Johann F., Toca-Herrera José L., Susana Rodríguez-Couto José L.** 2011. Cost analysis in laccase production, *Journal Of Environmental Management*, 92, 2907-2912.
- Pandey A.,** 1992. Recent developments in solid-state fermentation, *Process Biochemical*, 27, 109-116.
- Pandey A., Vandenberghe, L.P.S., Soccol C.R., Lebeault J.M.** 2000. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*, *Bioresource Technology*, 74, 175-178.
- Pandey A.** 2003. Solid-State Fermentation, *Biochemical Engineering of Journal*, 13, 81-84.
- Pazur J., Kleppe K.** 1964. The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Biochemistry*, 3,578-583.
- Peberdy J.F.** 1993 Protein secretion in *Aspergillus*: Invertase as a model system, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56, 216-217.
- Pérez-Guerra N., Torrado-Agrasar A., López-Marias C., Pastrana L.** 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation, *Electronic Journal Environmental Agricultural Food Chemistry*, 2, 343-50.

- Petruccioli M., Federici F.** 1993. Glucose Oxydase production by *Pennicilium variable*, Journal of Applied Bacteriology, 75, 369-372.
- Petruccioli M., Piccioni P., Fenice M., Federici F.** 1994. Glucose oxidase, catalase and gluconic acid production by immobilized mycelium of *Penicillium variabile* P16, Biotechnology Letters, 16, 939–942.
- Pronk J.T., Levering P.R. Ohjve W., Van Dijken J.P.** 1989. Role of nadp-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by gluconobacter oxydans, Enzyme and Microbial Technology, 11, 3, 160-164.
- Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C.** 2006. Gluconic acid: properties, applications and microbial production, Food Technology and Biotechnology, 44,185-195.
- Ramachandran S., Nair S., Larroche C., Pandey A.** 2017. Gluconic acid, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 577-599.
- 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 Biosystem Engineering, 11, 209–212.
- Rao D., Babu P., Satyanarayana M.** 1995. Technology of gluconic acid production, Indian Chemical Engineering, 35, 58–81.
- Rehm H.J.** 1980. Industrielle Mikrobiology, 2. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- 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 and Engineering, 1, 79–91.
- Richter G.** 1983. Glucose oxidase in industrial enzymology, in the application of enzymes in industry, New York: Nature Press, 428-436.
- Robinson T., Singh D., Nigam P.** 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production, Applied Microbiology And Biotechnology, 55, 284-289.
- Rodriguez H., Gonzalez T., Goire I., Bashan Y.** 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.*, Naturwissenschaften, 91.552-555.
- Rodriguez-Couto S.** 2012. A promising inert support for laccase production and decolouration of textile wastewater by the white-rot fungus *Trametes pubescens*, Journal of Hazardous Materials, 233–234, 158– 162.
- Rodríguez A.M., Cañete- I.M., Santos-Dueñas M.J., Torija-Martínez A., Mas J.E., Jiménez-Hornero I., García-García.** 2015. Preparation of a pure inoculum of aceticacid bacteria for the selective conversion of glucose in strawberry purée into gluconic acid, Food Bioproduction and Process, 96, 35–42.
- Rodríguez A.M., Cañete I.M., Santos-Dueñas J.E., Jiménez-Hornero M.J., Torija-Martínez A., Mas I., García-García.** 2016a. Revalorization of strawberry surpluses by biotransforming its glucose content into gluconic acid, Food Bioproduction and Process, 99, 188–196.
- Rodríguez A.M., Cañete I.M., Santos-Dueñas J.E., Jiménez-Hornero M.J., Torija-Martínez A., Mas I., García-García.** 2016b. An approach for estimating the maximum specific growth rate of *gluconobacter japonicus* in strawberry purée without cell concentration data, Biochemical Engineering Journal, 105, 314–320.
- Rodríguez A.M., Cañete I.M., Santos-Dueñas J.E., Jiménez-Hornero M.J., Torija-Martínez A., Mas I., García-García.** 2016c. Gluconic Acid: properties, production methods and applications

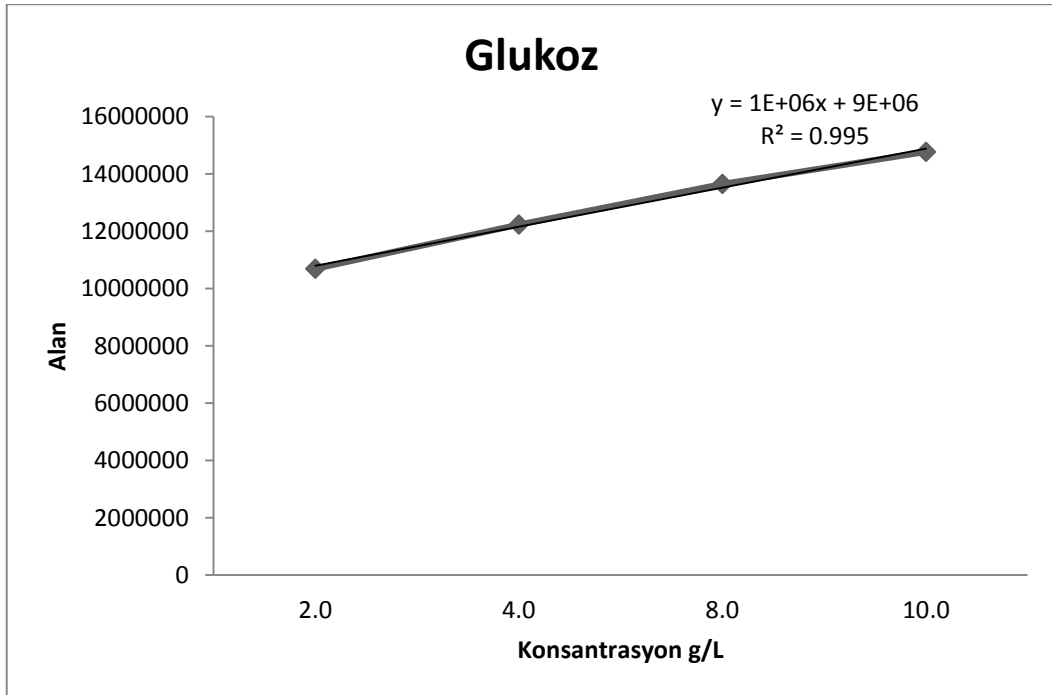
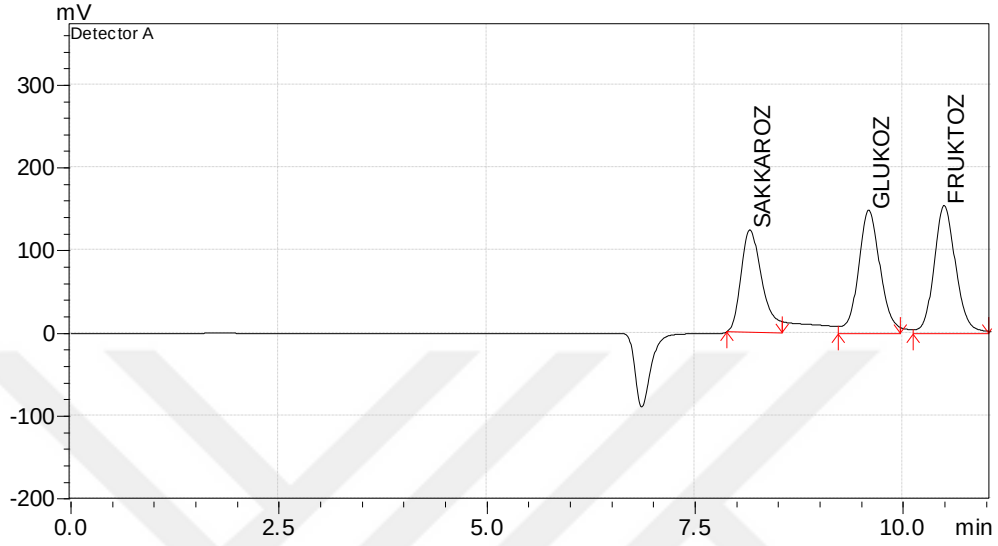
- anexcellent opportunity for agro-industrial by-products and wastebio-valorization, *Process Biochemistry*, 51, 12, 1891-1903.
- Roehr M., Kubicek C., Kominek J.** 1996. Gluconic Acid, In: Rehm, Reed G (Edditor), *Biotechnology, Product Of Primary Metabolism*, 6, Verlag Chemical, Weinheim, 347–362.
- Rogalski J., Fiedurek J., Szczordrak J., Kapusta K., Leonowicz A.** 1988. Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant, *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 508–511.
- Roukas T., Harvey L.** 1988. The effect of ph on production of citric acid and gluconic acid from beet molasses using continuous culture, *Biotechnology Letter*, 10, 295–300.
- Roukas T.** 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production, *Process Biochemistry*, 33, 8, 805–810.
- Roukas T.**, 2000. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 298–304.
- Roukas T., Liakopoulou-Kyriakides M.** 2002. Optimization study for the production of citric and gluconic acid from fig water extract by *Aspergillus niger* in surface fermentation, *Food Biotechnology*, 16, 17–28.
- Röhr M., Kubicek C.P., Kominek J.** 1983. Gluconic Acid, In: *Biotechnology*, 3, 455–465.
- Rymowic W., Lenart D.** .2003. Oxalic acid production from lipids by a mutant of *Aspergillus niger* at different pH, *Biotechnology Letters*, 25, 955–958.
- Sahasrabudhe N., Sankpal N.**, 2001. Production of organic acids and metabolites on fungi and applications in food industry, *Agriculture and Food Production*, 1, 387–425.
- Saito H., Ohnaka S., Fukuda S.** 1989. US 4843173, Process for producing gluconic acid, 27.06.1989.
- 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, *Journal Of Fermentation and Bioengineering*, 67, 6, 404-408.
- Sankpal N.V., Joshi A.P., Sutar I.I., Kulkarni B.D.** 1999. Continuous production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on a cellulosic support: study of low pH fermentative behaviour of *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, 35, 3-4. 317–325.
- Sankpal N.V., Kulkarni B.D.** 2002. Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils, *Process Biochemistry*, 37, 1343–1350.
- Scopes R.K., Rogers P.L., Leigh D.A.** 1988. US 4755467, Method for the production of sorbitol and gluconate, 05.07.1988.
- Sharma V., Vivekanand R.P., Singh,** 2008. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support, *Bioresearch Technology*, 99, 3444–3450.
- Shindia A., El-Sherbeny G.** 2006. Production of gluconic acid by some local fungi, *Mycobiology*, 34, 1, 22-29.
- Initial Assessment Report For SIAM** 18 Paris, 2004.
- Sievers M., Swings J.** 2005. Family, *Acetobacteraceae*, (D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, Edditors), *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, 2, 41–95.
- Singh N.B.** 1976. Effect of gluconates on the hydration of cement, *Cement And Concrete Research*, 6, 4, 455-460.

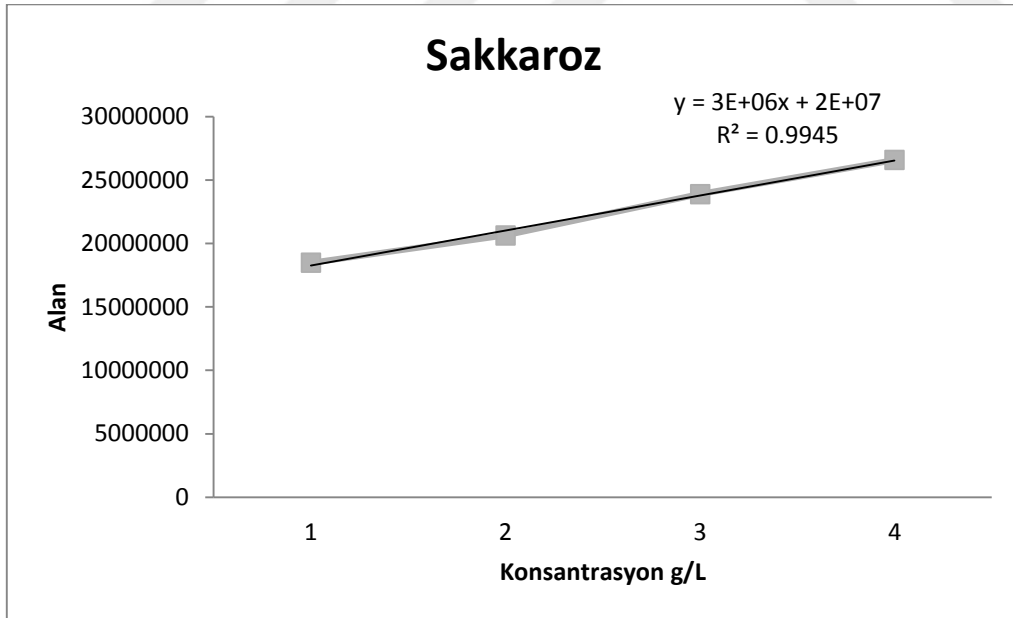
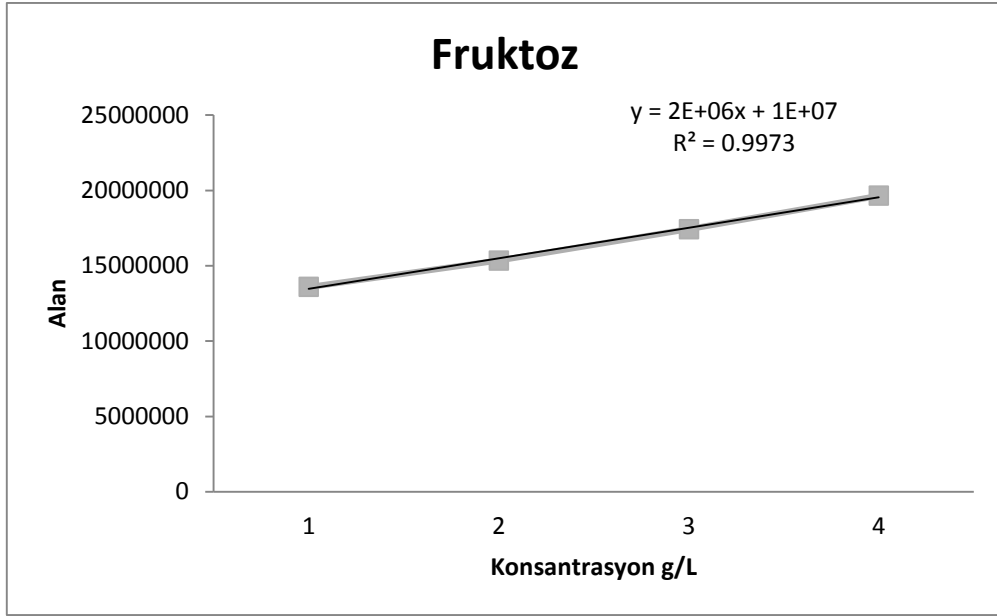
- Singh O.V., Pereira B.M.J., Singh R.P.** 1999. Isolation and characterization of a potent fungal strain *Aspergillus niger* ORS-4 for gluconic acid production, *Journal of Science Industrial Research*, 58, 594–600.
- Singh O.V., Singh R.P.** 2002. Utilization Of agro-food by-products for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4 under surface culture cultivation, *Journal of Science Industrial Research*, 61, 356–360.
- Singh O.V., Jain R.K., Singh R.P.** 2003. Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*, *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 78, 208–212.
- Singh O.V., N. Kapur, R.P. Singh**, 2005. Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus Niger* ORS-4.410, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 519–524.
- Singh O.V., Singh R.P.** 2006. Bioconversion of grape must into modulated gluconic acid production by *Aspergillus Niger* ORS- 4.410, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1114–1122.
- Singh O.V., Kumar R.** 2007. Biotechnologyological production of gluconic acid: future implications, *Applied Microbiology Biotechnology*, 75, 713–722.
- Singh O.V.**, 2008. Modulated gluconic acid production from immobilized cells of *Aspergillus niger* ORS-4.410 utilizing grape must, *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 83, 780–787.
- Stubbs J.J., Lockwood L.B., Roe E.T., Tabenkin B., Ward G.E.** 1940. Ketogluconic acids from glucose, *Industrial Engineering and Chemical*, 32, 1626–1630.
- Subramaniyam R. and Vimala R.** 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study, *International Journal of Science and Nature*, 3,3, 480-486.
- Sun R., Hughes S.** 1998. Extraction and physicochemical characterization of pectins from sugar beet pulp, *Polymer Journal*, 30,8, 671-677.
- Sun W.J., YunaQ.Q., Zhou Y.Z., Cui F.J., Yu S.L.**, 2013. Continuous 2-keto-gluconic acid (2KGA) production from corn starchhydrolysate by *Pseudomonas fluorescens* AR4, *Biochemical Engineering Journal*, 77, 97–102.
- Swoboda B., Massey V.** 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Analytical Biochemistry*, 240, 2209-2215.
- Tan X., Deng W., Liu M., Zhang Q., Wang Y.** 2009. Carbon nanotube-supported gold nanoparticles as efficient catalysts for selective oxidation of cellobiose into gluconic acid in aqueous medium, *Chemical Communication*, 46, 7179–7181.
- Taskin M., Ucar M.H., Unver Y., Ortucu S.** 2016. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* H125, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8,
- Tosun F.** 2015. Gıda, tarım ve hayvancılık bakanlığı tarımsal ekonomi ve politika geliştirme enstitüsü (TEPGE), Şeker pancarı ve Şeker, Ürün raporu.
- Tsao G.T., Kempe L.L.** 1960. Oxygen transfer in fermentation systems I, use of gluconic acid fermentation for determination of instantaneous oxygen transfer rates, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 2, 129-142.
- Tsuge H., Natsuaki O., Ohashi K.** 1975. Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Journal Of Biochemistry*, 78, 835-843.
- Vainstein M.H., and Peberdy J.F.** 1991. Regulation of invertase in *Aspergillus Nidulans*: effect of different carbon sources, *Journal Of General Microbiology*, 137, 315–321.

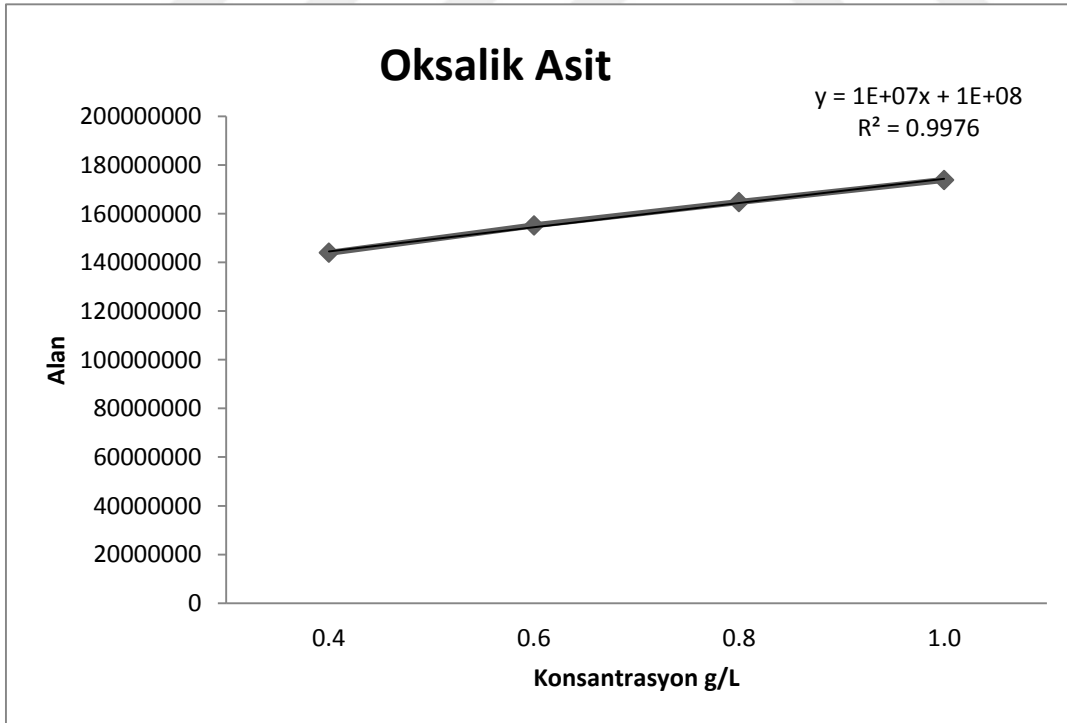
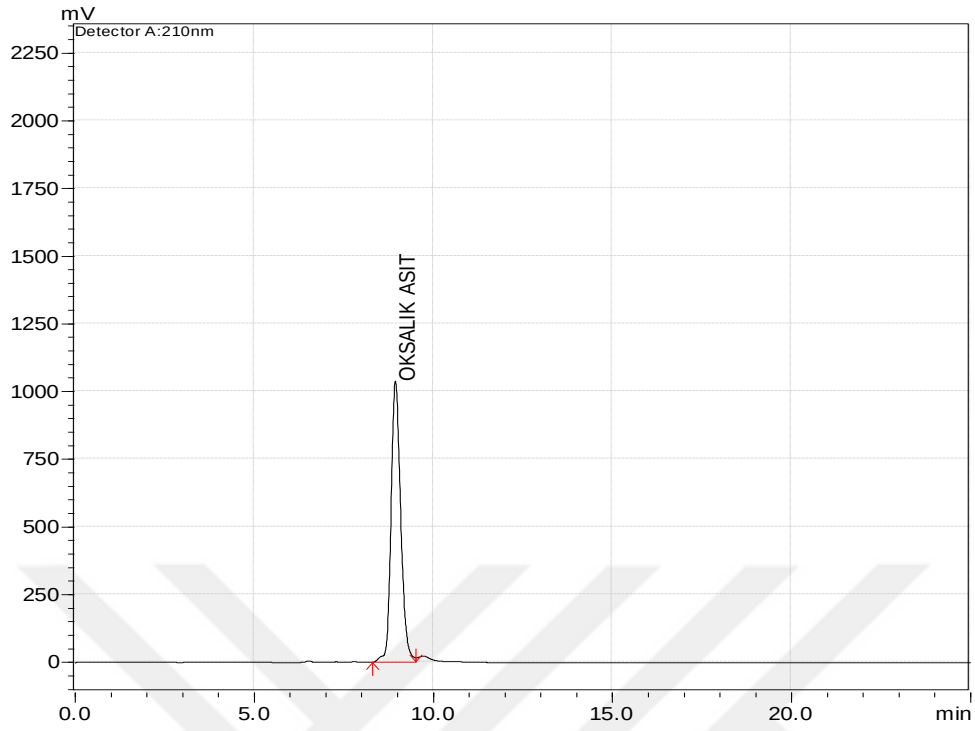
- Van Schie B.J., Mooya O.H., Linton, J.D.** 1987. PQQ-dependent production of gluconic acid by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Rhizohiitni* species, *Journal of General Microbiology*, 133, 867-875.
- Vargas L.H.M., Sdomingos. R.N., Carmona E.C.** 2004. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 137–142, 200.
- Vassilev N., Vassileva M.** 1992. Production of organic acids by immobilized filamentous fungi, *Mycological Research*, 96, 563–570.
- Vassilev N., Vassileva M.C., Spassova D.I.** 1993. production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam, *Applied Microbiolgy Biotechnology*, 39, 285–288.
- Velizarov S., Beschkov V.** 1998. Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations, *Process Biochemistry*, 33, 527-534.
- Verhave T. H.** 1930. Germant Patent 563758, A method for bacterial oxidation of organic compounds for the manufacture of oxidation products, such as dioxyacetone, 09.11.1932.
- 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, *Industrial Engineering and Chemical*, 29, 635–656.
- Witteveen C. F. B., Veenhuis M., Visser J.** 1992. Location of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*, *Applied Environmental Microbiology*, 58, 1190-1194.
- Yaşar M.** 2003. Şeker Teknolojisi, QKZ.
- Yu M., Zeng G., Chen Y., Yu H., Huang D., Tang L.** 2009. Influence of phanerochaete chrysosporium on microbial communities and lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw, *Process Biochemical*, 44, 17–22.
- Zetelaki K.Z., Vas K.** 1968. The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture, *Biotechnology Bioengineering*, 10, 45- 59.
- Zhang H., Zhang J., Bao J.** 2016. High titer gluconic acid fermentation by aspergillus niger from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification, *Bioresourch Technology*, 203, 211–219.
- Zhao F., Li H., Jiang Y., Wang X., Mu Z.** 2014. Co-immobilization of multi-enzymeon control-reduced graphene oxide by non-covalent bonds: an artificial biocatalytic system for the one-pot production of gluconic acid from starch, *Green Chemical*, 16, 2558–2565.
- Znad A., Markos J., Bales V.** 2004. Production of gluconic acid by *Aspergillus niger* growth and non-growth conditions, department of chemical and biochemical engineering, Faculty Chemical Food Technology, 34, 1078-1080.

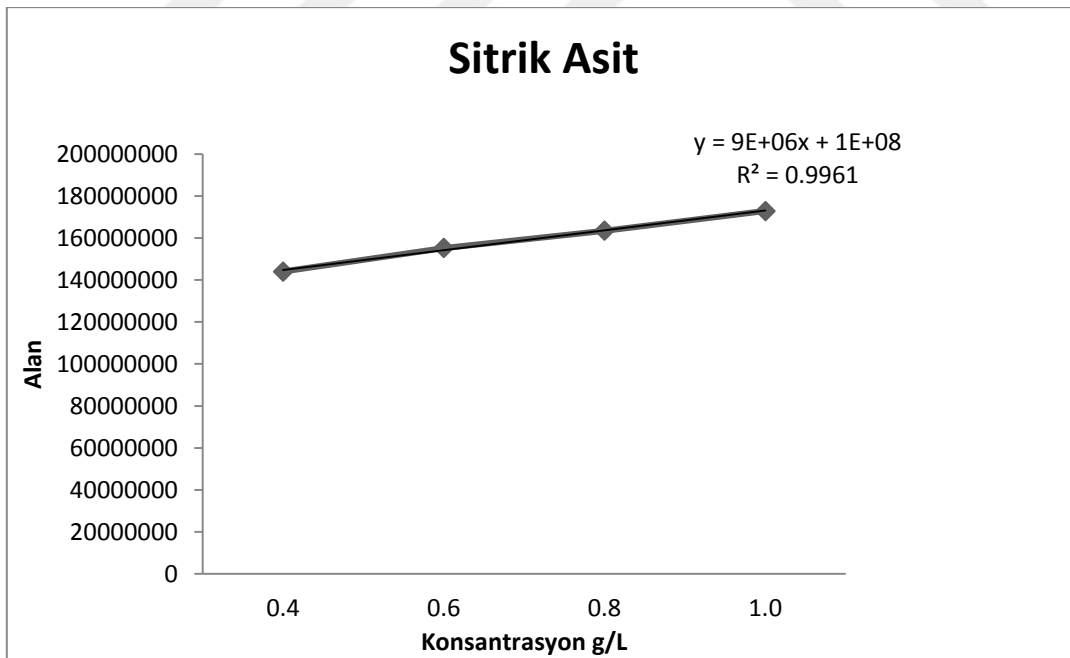
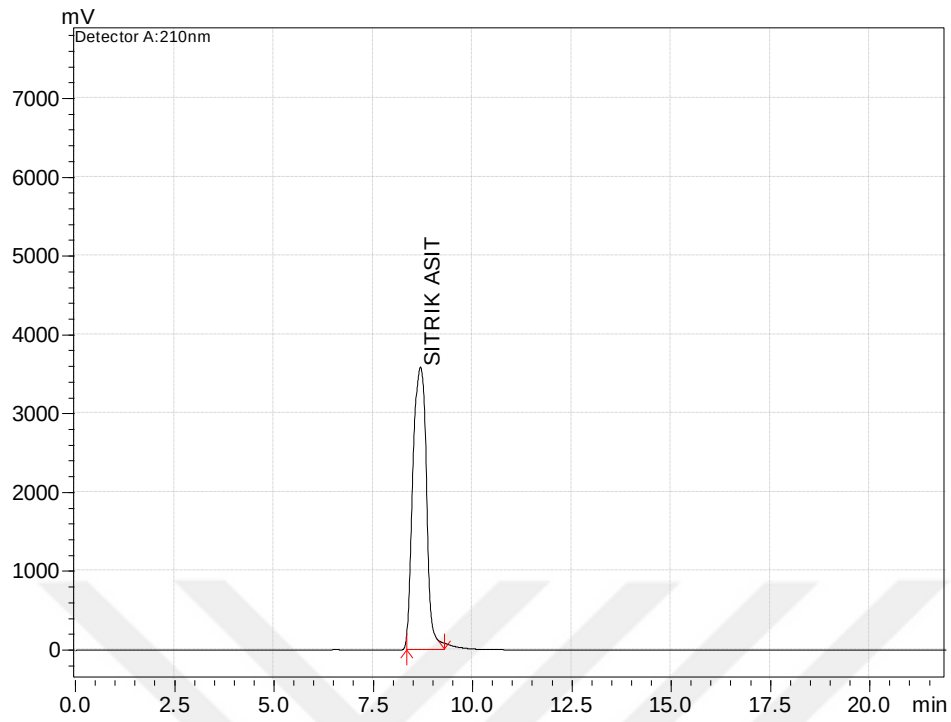
EKLER

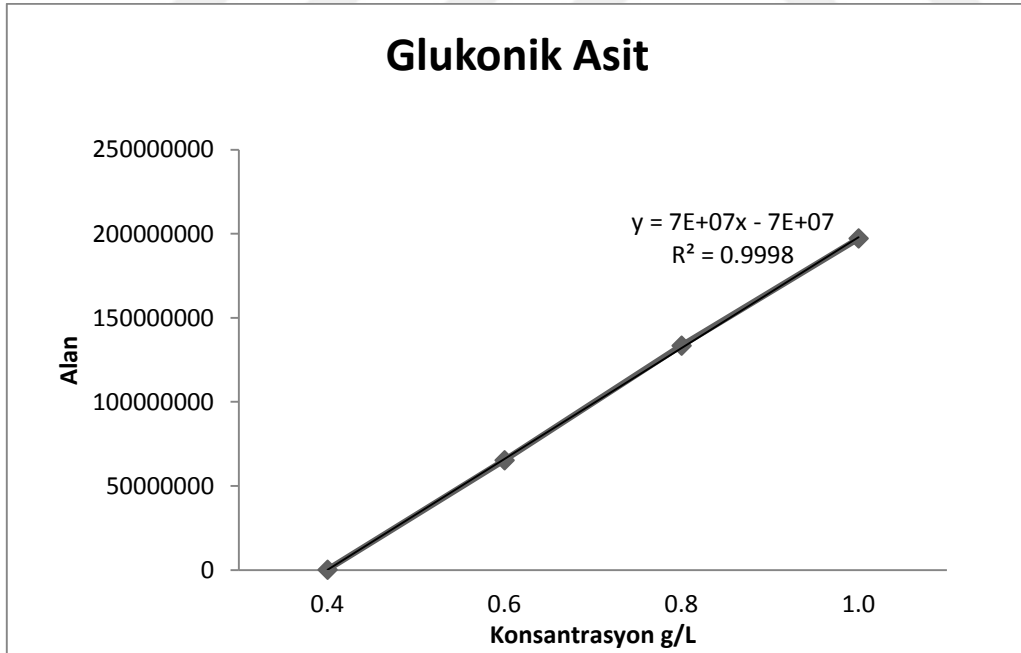
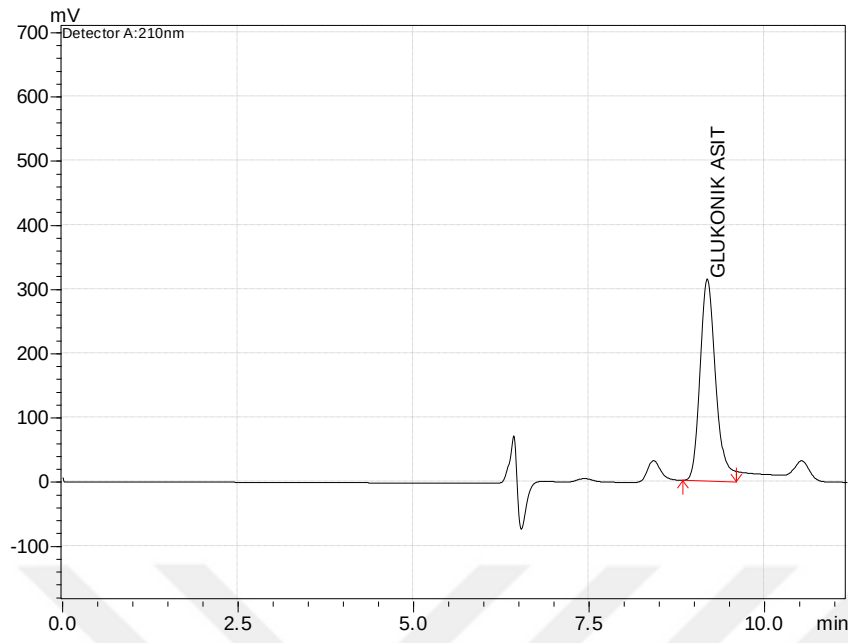
EK.1. HPLC Analizleri için Kromotogram Görüntüleri ve Kalibrasyon Grafikleri











EK.2. Deneysel Verilere Ait Sayısal Değerler

Tablo E2.1. Şekil 6.1'e Ait Deney Sonuçları

Besiyeri 1'e Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat											
	16	24	40	48	64	72	89	97	137	168	174	187
G.A.	1,68	2,35	3,16	4,95	5,96	6,17	6,46	8,80	6,51	6,12	6,55	6,15
Glukoz	110,26	106,24	101,03	98,17	95,17	92,06	90,16	87,17	84,34	80,16	80,03	78,49
pH	6,21	5,83	4,93	4,85	4,61	4,39	4,21	4,19	4,14	4,07	4,03	4,01

Besiyeri 2'ye Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat											
	16	24	40	48	64	72	89	97	137	168	174	187
G.A.	1,85	5,46	13,57	20,06	29,90	38,82	48,96	58,84	62,37	66,34	64,31	62,59
Glukoz	115,29	110,26	107,46	100,47	97,46	93,17	90,07	98,59	96,57	92,15	90,36	87,49
Fruktoz	20,16	23,19	25,17	26,59	27,84	29,79	31,26	35,18	36,59	39,74	38,76	38,01
pH	6,15	6,02	5,96	5,94	5,86	5,83	5,76	5,61	5,53	5,49	5,37	5,29

Besiyeri 3'e Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat											
	16	24	40	48	64	72	89	97	137	168	174	187
G.A.	1,82	4,67	12,74	17,65	25,33	29,07	31,42	33,39	34,06	35,94	33,21	30,16
Glukoz	62,14	60,16	56,47	53,24	50,79	48,58	45,56	41,01	40,25	36,58	11,45	30,27
Fruktoz	10,26	11,26	13,24	12,24	11,69	10,64	8,59	6,54	5,03	5,01	4,28	3,21
pH	6,19	6,13	6,01	5,93	5,89	5,84	5,82	5,71	5,63	5,55	5,49	5,42

Tablo E2.2. Şekil 6.2'ye Ait Deney Sonuçları

240 g/L Melaslı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat											
	16	24	40	48	64	72	89.	97	137	168	174	187
G.A.	3,24	13,82	15,67	19,37	20,34	28,34	38,61	56,37	68,06	72,34	66,25	65,36
Glukoz	70,59	64,29	60,39	58,49	54,28	50,19	40,29	37,59	31,26	30,24	25,19	23,15
Fruktoz	40,16	35,29	31,25	23,17	24,17	26,47	27,15	21,26	20,15	16,57	13,24	10,24
Sakkaroz	30,27	23,19	20,17	15,34	10,23	5,18	5,01	2,56	2,17	1,03		
pH	6,42	5,57	5,34	5,06	4,95	4,65	4,02	3,34	3,21	3,01	2,94	

Besiyeri 2'ye Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat											
	16	24	40	48	64	72	89	97	137	168	174	187
G.A.	1,85	5,46	13,57	20,06	29,90	38,82	48,96	58,84	62,37	66,34	64,31	62,59
Glukoz	115,29	110,26	107,46	100,47	97,46	93,17	90,07	98,59	96,57	92,15	90,36	87,49
Frutoz	20,16	23,19	25,17	26,59	27,84	29,79	31,26	35,18	36,59	39,74	38,76	38,01
pH	6,15	6,02	5,96	5,94	5,86	5,83	5,76	5,61	5,53	5,49	5,37	5,29

Tablo E2.3. Şekil 6.3'e ait Deney Sonuçları

120g/L Melaslı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	2,41	7,64	14,34	20,16	21,06	22,15	27,37	36,09	39,04	42,02	38,15
Glukoz	33,69	30,58	28,45	21,12	18,46	13,65	10,41	9,57	8,36	5,46	3,24
Frutoz	21,47	20,14	18,46	15,49	13,24	10,54	9,57	10,65	12,49	13,54	12,48
Sakkaroz	10,36	9,51	8,59	8,01	7,54	6,47	5,13	3,04	2,51	2,16	
pH	6,10	5,46	5,39	5,00	4,81	4,33	3,67	3,17	3,02	2,86	2,81

240 g/L Melaslı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	24	40	48	64	72	89.	97	137	168	174
G.A.	3,24	13,82	15,67	19,37	20,34	28,34	38,61	56,37	68,06	72,34	66,25
Glukoz	70,59	64,29	60,39	58,49	54,28	50,19	40,29	37,59	31,26	30,24	25,19
Fruktoz	40,16	35,29	31,25	23,17	24,17	26,47	27,15	21,26	20,15	16,57	13,24
Sakkaroz	30,27	23,19	20,17	15,34	10,23	5,18	5,01	2,56	2,17	1,03	
pH	6,42	5,57	5,34	5,06	4,95	4,65	4,02	3,34	3,21	3,01	2,94

360g/L Melaslı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	4,88	14,37	16,37	19,13	22,09	29,16	32,04	41,09	48,34	56,37	52,21
Glukoz	86,54	76,59	74,31	70,24	65,29	64,01	63,28	60,15	52,17	50,16	48,79
Frutoz	66,84	66,57	60,12	60,03	54,59	56,87	55,28	52,11	50,16	42,51	41,05
Sakkaroz	42,69	33,26	30,15	28,49	25,41	20,17	15,49	18,42	12,04	10,64	10,03
pH	6,51	6,34	6,04	5,91	5,34	4,76	3,95	3,22	3,12	2,94	2,83

Tablo E.2.4. Şekil 6.4'e ait deney sonuçları

Başlangıç pH Değeri 1'e Ayarlanmış 240 g/L'lik Melashı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	1,41	4,41	8,51	12,04	15,67	19,64	24,06	31,27	38,06	53,46	52,16
Glukoz	55,28	52,16	50,36	42,17	45,18	35,27	36,87	35,18	30,24	30,01	26,57
Fruktoz	33,16	38,42	40,57	34,16	35,41	33,17	30,28	28,49	30,51	31,64	33,59
Sakkaroz	10,36	3,27	3,06	2,94	2,41	2,29	2,13	1,69	1,02		
pH	6,04	5,27	5,01	4,71	4,68	4,34	3,87	3,12	3,02	2,84	2,79

Başlangıç pH Değeri 2'ye Ayarlanmış 240 g/L'lik Melashı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	1,63	4,62	9,27	12,28	16,05	19,08	26,37	32,08	38,64	55,07	54,24
Glukoz	60,57	63,16	60,47	52,17	46,51	44,47	30,28	31,49	30,27	30,03	25,48
Fruktoz	39,47	31,42	40,27	45,27	41,09	36,57	30,29	30,01	31,26	33,57	34,61
Sakkaroz	10,07	9,54	8,29	8,01	7,61	3,17	2,07	1,67	1,06	0,90	
pH	6,12	5,33	5,13	4,82	4,71	4,49	4,06	3,31	3,13	2,93	2,81

Başlangıç pH Değeri 3'e Ayarlanmış 240 g/L'lik Melashı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	1,84	7,61	12,34	14,16	17,34	22,34	28,61	34,16	41,07	57,34	56,86
Glukoz	68,26	64,26	61,27	55,97	53,61	48,24	44,06	34,49	33,05	31,26	26,74
Fruktoz	39,14	44,26	46,97	40,16	38,59	36,52	34,16	36,29	36,59		
Sakkaroz	14,59	10,06	9,24	9,01	8,46	5,07	4,06	2,52	2,04	1,06	
pH	6,19	5,54	5,32	4,93	4,76	4,41	4,17	3,29	3,16	2,87	2,82

Başlangıç pH Değeri 4'e Ayarlanmış 240 g/L'lik Melashı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	2,25	9,69	13,29	16,38	18,29	24,83	35,72	49,09	58,06	62,19	61,25
Glukoz	35,17	48,27	53,67	50,19	46,57	42,28	36,54	30,16	30,04	26,58	24,54
Fruktoz	20,63	23,92	24,51	25,74	26,47	30,63	31,27	32,06	31,47	30,25	30,04
Sakkaroz	76,24	55,17	50,16	45,27	30,17	25,19	20,47	18,59	10,96	9,57	5,04
pH	6,43	5,57	5,32	5,01	4,95	4,63	4,26	3,21	3,18	2,96	2,89

Başlangıç pH Değeri 5,5'e Ayarlanmış 240 g/L'lik Melashı Ortama Ait Sayısal Veriler

Kons., g/L	Süre, saat										
	16	40	48	64	72	97	137	168	174	187	200
G.A.	3,24	13,82	15,67	19,37	20,34	28,34	38,61	56,37	68,06	72,34	66,25
Glukoz	70,59	60,39	58,49	54,28	50,19	40,29	37,59	31,26	30,24	25,19	23,15
Fruktoz	40,16	36,26	23,17	24,17	26,47	27,15	21,26	20,15	16,57	13,24	10,24
Sakkaroz	30,27	20,17	15,34	10,22	5,18	5,01	2,56	2,17	1,03		
pH	6,42	5,57	5,34	5,06	4,95	4,65	4,02	3,34	3,21	3,01	2,94

Tablo E2.5. Şekil 6.7'ye ait sayısal veriler

Derin Fermantasyon İle Glukonik Asit Üretimi İçin Önerilen Çözüm Noktası İçin Elde Edilen Deney Sonuçları

Kons., g/L	Süre, saat										
	12	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
G.A	4,32	8,61	16,11	16,92	19,02	28,78	35,91	42,48	58,76	53,23	45,1
S.A	0,44	0,69	0,98	1,12	1,83	5,01	9,37	12,71	17,25	21,51	23,53
O.A	0,23	0,57	0,79	0,95	1,64	4,49	12,84	22,84	30,35	38,73	50,51
Glukoz	69,62	70,57	68,83	59,64	46,57	39,79	35,11	25,52	10,38	10,02	9,69
Fruktoz	33,15	36,92	31,51	29,89	28,85	23,18	21,72	21,47	22,89	22,34	22,04
Sakkaroz	25,62	22,78	18,82	10,55	10,44	8,21	6,17	5,41	5,02	4,56	3,82
pH	6,59	6,565	6,31	6,135	5,89	5,58	5,03	4,06	3,12	2,13	1,37

Tablo E2.6. Şekil 6.10'a ait sayısal veriler

Yarı Katı Hal Fermantasyon İle Glukonik Asit Üretimi İçin Önerilen Çözüm Noktası İçin Elde Edilen Deney Sonuçları

Kons., g/L	Süre, saat										
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	268
G.A	6,23	14,87	16,86	26,32	29,12	39,63	54,50	74,64	63,94	47,95	42,70
S.A	0,44	0,82	1,74	3,60	5,79	10,12	15,88	19,92	22,16	23,14	25,12
O.A	0,25	0,43	0,99	4,265	5,44	17,02	27,05	32,64	47,21	51,15	52,12
Glukoz	67,93	63,73	57,39	45,68	37,21	33,14	24,31	9,97	10,02	9,69	9,54
Fruktoz	32,47	33,56	32,63	31,73	32,98	25,78	26,45	21,29	25,47	21,55	18,33
Sakkaroz	27,43	22,13	14,49	12,02	10,37	9,88	8,89	5,72	5,19	5,09	5,01
pH	5,73	5,31	4,90	4,58	3,63	3,09	2,90	2,17	1,68	1,52	1,49

Tablo E2.7. Şekil 6.13 'e ait sayısal veriler

Katı Hal Fermantasyon İle Glukonik Asit Üretimi İçin Önerilen Çözüm Noktası İçin Elde Edilen Deney Sonuçları

Kons., ksg/g	Süre, gün					
	3	5	7	9	11	13
G.A	0,083	0,131	0,183	0,262	0,228	0,199
S.A	0,048	0,059	0,088	0,128	0,170	0,149
O.A	0,036	0,064	0,157	0,217	0,284	0,314
Glukoz	0,116	0,049	0,047	0,038	0,029	0,022
Fruktoz	0,037	0,019	0,033	0,016	0,013	0,009
Sakkaroz	0,078	0,028	0,028	0,015	0,017	0,013
pH	6,552	6,561	6,532	6,415	6,345	5,931

Tablo E2.8. Şekil 6.14 'e ait sayısal veriler

-8+16 Mesh Partikül Boyutlu Küşpe ile Gerçekleştirilen Yarı Katı Hal Fermantasyon Sonuçları

Kons., g/L	Süre, saat									
	24	37	61	84	108	132	156	180	204	228
G.A	11,53	12,89	13,61	16,49	26,79	25,14	24,17	23,76	22,48	22,01
O.A				1,39	2,69	9,54	15,49	20,16	26,54	30,15
S.A				1,46	3,15	4,67	8,34	12,12	16,49	18,97
Glukoz	62,16	61,17		58,64	50,31	46,51	40,27	34,25	23,17	14,58
Fruktoz	40,31	37,48	35,47	33,21	29,57	26,54	23,68	22,69	20,48	18,57
Sakkaroz	28,64	20,36	16,98	13,25	10,48	8,63	6,59	5,23	5,04	4,96
pH	6,24	5,97	5,06	4,69	3,36	3,21	2,15	2,07	1,97	

-16+30 Mesh Partikül Boyutlu Küşpe ile Gerçekleştirilen Yarı Katı Hal Fermantasyon Sonuçları

Kons., g/L	Süre, saat										
	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	268
G.A		14,87	16,86	26,32	29,12	39,63	54,50	74,64	63,94	47,95	42,70
O.A			0,99	4,27	5,44	17,02	27,05	32,64	47,21	51,15	
S.A	0,44	0,82	1,77	3,60	5,79	10,12	15,88	19,92	22,16	23,14	25,12
Glukoz	71,93	63,73	57,39	45,68	37,21	33,14	29,31	9,97	10,02	9,69	9,54
Fruktoz	39,47	40,57	37,63	31,73	32,98	25,78	26,45	21,29	25,47	21,55	18,33
Sakkaroz	27,43	22,13	14,49	12,02	10,37	9,88	8,89	5,72	5,19	5,09	5,01
pH	5,73	5,31	4,90	4,58	3,63	3,09	2,90	2,17	1,68	1,52	1,49

-30+50 Mesh Partikül Boyutlu Küşpe ile Gerçekleştirilen Yarı Katı Hal Fermantasyon Sonuçları

Kons., g/L	Süre, saat									
	24	37	61	84	108	132	156	180	204	228
G.A	10,92	10,35	17,34	17,85	30,46	32,47	42,25	60,24	70,17	70,03
O.A				2,19	4,98	18,47	29,67	32,19	36,54	39,21
S.A				3,27	4,67	5,37	10,49	15,98	20,31	21,58
Glukoz	66,64	65,16	63,04	55,17	43,05	35,04	33,62	26,24	20,89	13,04
Fruktoz	36,54	38,49	38,31	36,52	26,37	23,51	22,54	21,05	20,57	17,63
Sakkaroz	15,47	12,57	10,32	10,06	9,48	9,26	8,47	8,31	7,16	7,04
pH	5,84	5,69	5,12	5,12	4,84	4,62	4,04	3,16	2,27	

-50+100 Mesh Partikül Boyutlu KÜSPE İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN YARI KATI HAL FERMANTASYON SONUÇLARI

Kons., g/L	Süre, saat									
	24	37	61	84	108	132	156	180	204	228
G.A	9,89	9,54	18,34	21,01	33,14	35,76	46,76	62,13	75,61	72,42
O.A				3,47	5,23	22,41	33,16	35,04	42,61	46,57
S.A				3,64	5,12	5,96	11,04	16,13	22,14	23,64
Glukoz	69,27	62,04		53,06	41,61	33,61	30,15	23,05	16,57	12,48
Fruktoz	35,23	36,21	37,69	35,49	28,16	25,47	23,69	22,69	21,69	16,32
Sakkaroz	13,64	10,36	10,22	10,09	9,49	9,05	8,31	8,07	7,49	7,31
pH	5,76	5,72	5,67	4,49	4,36	4,18	3,57	3,16		

-100 Mesh Partikül Boyutlu KÜSPE İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN YARI KATI HAL FERMANTASYON SONUÇLARI

Kons., g/L	Süre, saat									
	24	37	61	84	108	132	156	180	204	228
G.A	9,72	10,01	19,61	27,44	34,58	36,48	49,57	63,27	78,24	75,69
O.A				3,61	6,58	23,16	38,46	42,65	46,79	50,13
S.A				3,69	5,27	6,04	13,26	19,68	25,64	25,01
Glukoz	70,45	60,16	54,39	50,17	39,57	31,49	28,46	21,68	15,49	9,34
Fruktoz	31,06	33,08	35,26	31,18	27,46	21,36	22,78	20,68	18,56	16,03
Sakkaroz	10,36	9,64	9,31	9,15	8,86	8,51	8,27	7,48	7,36	6,54
pH	5,49	5,46	5,39	4,23	4,17	4,04	4,21	3,49	3,42	

Tablo E2.9 Şekil 6.15 'e ait sayısal veriler

-8+16 Mesh Partikül Boyutlu KÜSPE İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN KATI HAL FERMANTASYON SONUÇLARI

Kons., g/g sks	Süre, gün				
	5	6	7	9	10
G.A	0,105	0,119	0,150	0,164	0,138
O.A	0,058	0,119	0,141	0,170	0,225
S.A	0,037	0,058	0,074	0,111	0,141
Glukoz	0,057	0,056	0,051	0,036	0,033
Fruktoz	0,041	0,036	0,035	0,034	0,029
Sakkaroz	0,041	0,040	0,035	0,025	0,023
pH	6,51	6,55	6,48	6,41	6,38

-16+30 Mesh Partikül Boyutlu KÜSPE İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN KATI HAL FERMANTASYON SONUÇLARI

Kons., g/g sks	Süre, gün			
	5	7	9	11
G.A	0,131	0,183	0,262	0,228
O.A	0,064	0,157	0,217	0,284
S.A	0,059	0,088	0,128	0,170
Glukoz	0,049	0,047	0,038	0,029
Fruktoz	0,019	0,033	0,016	0,013
Sakkaroz	0,028	0,015	0,017	0,017
pH	6,56	6,53	6,42	6,35

-30+50 Mesh Partikül Boyutlu KÜspe ile Gerçekleştirilen Katı Hal Fermantasyon Sonuçları

Kons., g/g sks	Süre, gün				
	5	6	7	9	10
G.A	0,141	0,222	0,260	0,277	0,237
O.A	0,091	0,143	0,180	0,270	0,305
S.A	0,076	0,103	0,119	0,130	0,186
Glukoz	0,050	0,049	0,047	0,045	0,038
Fruktoz	0,024	0,022	0,018	0,015	0,015
Sakkaroz	0,030	0,027	0,024	0,021	0,019
pH	6,58	6,5	6,43	6,34	6,32

-50+100 Mesh Partikül Boyutlu KÜspe ile Gerçekleştirilen Katı Hal Fermantasyon Sonuçları

Kons., g/g sks	Süre, gün				
	5	6	7	9	10
G.A	0,157	0,279	0,288	0,291	0,273
O.A	0,091	0,153	0,192	0,304	0,323
S.A	0,082	0,105	0,138	0,157	0,187
Glukoz	0,041	0,038	0,037	0,032	0,029
Fruktoz	0,025	0,020	0,019	0,015	0,012
Sakkaroz	0,027	0,025	0,024	0,022	0,023
pH	6,44	6,48	6,46	6,3	6,26

-100 Mesh Partikül Boyutlu KÜspe ile Gerçekleştirilen Katı Hal Fermantasyon Sonuçları

Kons. g/g sks	Süre, gün				
	5	6	7	9	10
G.A	0,160	0,286	0,313	0,317	0,288
O.A	0,092	0,190	0,228	0,323	0,313
S.A	0,087	0,107	0,157	0,177	0,212
Glukoz	0,045	0,042	0,039	0,030	0,024
Fruktoz	0,025	0,023	0,020	0,017	0,015
Sakkaroz	0,029	0,027	0,026	0,022	0,022
pH	6,32	6,3	6,26	6,23	6,21

ÖZGEÇMİŞ

Kübra GÖLEBATMAZ

E-posta: kubra211@gmail.com

Telefon: 0506 7338723

Akademik Aktivite:

- **2014-2017 :** Fırat Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Biyomühendislik Anabilim Dalı /Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı.

❖ **Tez Konusu:** *Şeker Pancarı Melasdan A. niger Kullanılarak Glukonik Asit Üretimi.*

❖ **Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Soner ALTUNDOĞAN

- **2009-2013:** Fırat Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Biyomühendislik Bölümü
- **2004-2008:** Sivas Halil Rıfat Paşa (Yabancı Dil Ağırlıklı) Lisesi (Merkez/Sivas)

Görev aldığı /Yürüttüğü Projeler:

2015-2016: *Yapay Sinir Ağı Modeli ile Endüstriyel Glukonik Asit Üretimi.* (TÜBİTAK_1512 Programı- 2. Aşama) –beklemede (**Yürütücü olarak**).

2014-2017: *Şeker Pancarı Melasından A. niger Kullanılarak Glukonik Asit Üretimi.* (TÜBİTAK_2210-C Programı) –devam ediyor (**Araştırmacı olarak**)

2016-2017: *Şeker Pancarı Melasından A. niger Kullanılarak Glukonik Asit Üretimi.* (FUBAP- M.F.16.17)

2012-2013: *Rekombinant Mikroorganizmalar Kullanılarak Dopamin'in Biyosentezi.* (**Araştırmacı olarak**).

2012-2013: *Rekombinant E. Coli ile Buğday Kepeğinden Katı Hal Fermantasyon ile Alfa Amilaz Üretimi.* Bitirme Projesi (**Araştırmacı olarak**)

2011-2012: *Tedavi Amacıyla Kullanılan Bitkiler ve Bitkisel Ürünlerin Yan Etkileri.* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, (**Araştırmacı olarak**)

2010-2011: *Hatay İlinde Risk Gruplarında Q Ateşi, Bruselloz ve Toksoplazmoz Seroprevalansının Araştırılması.* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, (**Araştırmacı olarak**)

2010-2011: *Akrep Antivenom Üretimi.* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, stajyer (**Araştırmacı olarak**)