

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Zymomonas mobilis* İLE MELASTAN LEVAN
POLİMERİNİN ÜRETİMİ**

Onur KIRTEL

Tez danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bölüm Kodu: 614.02.00

Sunuş Tarihi: 22.07.2015

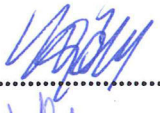
Bornova-İZMİR

2015

Onur KIRTEL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Zymomonas mobilis* ile Melastan Levan Polimerinin Üretimi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22/07/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR	
Raportör Üye	: Doç. Dr. Hatice Kalkan YILDIRIM	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Seval DAĞBAĞLI	

ÖZET

Zymomonas mobilis ile Melastan Levan Polimerinin Üretimi

Kırtel, Onur

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yekta Göksungur

2015, 62 sayfa

Levan, $\beta(2\rightarrow6)$ fruktofuranozidik bağları ile bağlanmış fruktoz birimlerinden oluşan doğal bir homopolisakkarittir ve gıda, biyomedikal, kimya endüstrisi, tıp, kozmetik gibi birçok alanda çok geniş kullanım potansiyeline sahiptir. Bu çalışmada ilk olarak *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile farklı ön işlemlere tabi tutulmuş şeker pancarı melası içeren fermentasyon ortamlarında bakterinin levan üretim performansı incelenmiştir. Melas örnekleri santrifügal klarifikasyon, sülfürik asit, potasyum ferrosiyaniür, trikalsiyum fosfat ve aktif karbon ön işlemleriyle işlenmiş ve levan üretimi için en uygun ön işlemin santrifügal klarifikasyon olduğu bulunmuştur. %25 sakkaroz içeren santrifügal klarifikasyon ile işlenmiş melaslı fermentasyon ortamından 17.13 g/L levan elde edilmiştir. Melaslı besiyerinde üretilen levanın analizi sırasında melastan gelen çamursu bir yapının analizlerde interferansa sebep olduğu keşfedilmiştir. Bu yapının, şeker üretimi sırasında Maillard reaksiyonları sonucu oluşan melanoidinlerden oluştuğu düşünülmektedir.

Bu çalışmaların ardından, sentetik ortamda kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde serbest ve Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle levan üretimi

incelenmiştir. Sürekli sistemde levan üretimi için 740 ml üretim hacmine sahip karıştırılmalı tank tipi bir biyoreaktör imal edilmiş ve kullanılmıştır. Her iki üretimde de sıcaklık 28°C ve başlangıç pH değeri 5'tir. Kesikli sistemde serbest hücrelerle ulaşılan levan konsantrasyonunun (21.16 g/L), immobilize hücrelerle ulaşılan levan konsantrasyonundan (14.05 g/L) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sürekli sistemde ise 0.12 h⁻¹ seyreltme hızında serbest hücrelerle 13.6 g/L; immobilize hücrelerle ise 18.4 g/L levan üretildiği belirlenmiştir. Maksimum verimlilik değerlerine hem serbest hücrelerle (2.058 g/L/h) hem de immobilize hücrelerle (3.465 g/L/h) 0.21 h⁻¹ seyreltme hızında ulaşılmıştır.

Sentetik ortamdan elde edilen levan örneğinin ısı özellikleri Fark Tarama Kalorimetresi ile incelenmiş ve ticari levan ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda ticari levanın erime noktasının 202,25 °C ve erime entalpisinin 199,90 J/g olduğu; sentetik ortamda ürettiğimiz levanın ise erime noktasının 190,80 °C ve erime entalpisinin 81,58 J/g olduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Levan, mikrobiyal polisakkarit, *Zymomonas mobilis*, melas, immobilizasyon, karıştırılmalı tank tipi biyoreaktör.

ABSTRACT**Production of Levan Polymer from Molasses by *Zymomonas mobilis***

Kırtel, Onur

MSc. in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Yekta Göksungur

2015, 62 pages

Levan is a natural homopolysaccharide consisting of fructose units bound by $\beta(2\rightarrow6)$ fructofuranosydic bonds and it has a wide range of applications in various industries such as food, biomedical, chemical, medical and cosmetics. In this work, levan production performance of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 cells cultivated in fermentation medium containing beet molasses pretreated with different methods was assessed at first. Beet molasses was pretreated with methods such as centrifugal clarification, sulphuric acid, potassium ferrocyanide, tricalcium phosphate and activated charcoal. Best pretreatment method was determined as centrifugal clarification, resulting in 17.13 g/L levan with 25% initial sucrose concentration and an initial pH of 5. During the analysis of levan produced in molasses medium, it was noticed that a clay-like material originating from molasses was causing interference. It is speculated that this material could be consisting of melanoidins, formed by Maillard reactions during sugar production.

After that, levan production in synthetic medium by free and immobilized cells trapped in Ca-alginate in batch and continuous fermentation systems was investigated. Fermentation temperature was 28 °C and initial pH was 5 for both

systems. A stirred-tank bioreactor with a production volume of 740 ml was manufactured and used for continuous fermentation. In batch fermentation, free cells showed a better performance in levan production than immobilized cells (21.16 g/L and 14.05 g/L levan, respectively). In stirred-tank bioreactor, however, levan produced by immobilized cells (18.4 g/L) exceeded levan concentration reached by free cells (13.6 g/L) at 0.12 h^{-1} dilution rate. Maximum productivity values were observed at 0.21 h^{-1} dilution rate both for immobilized (3.465 g/L/h) and free cells (2.058 g/L/h).

Thermal properties of levan produced in synthetic medium were investigated by Differential Scanning Calorimetry and compared with commercial levan. Melting point for commercial levan was found to be $202,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and melting enthalpy was $199,90\text{ J/g}$. Levan produced in synthetic medium had a melting point of $190,80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a melting enthalpy of $81,58\text{ J/g}$.

Keywords: Levan, microbial polysaccharide, *Zymomonas mobilis*, molasses, immobilization, stirred-tank bioreactor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR’a sabrı ve özverisi için,

Tez çalışmalarımın her aşamasında karşılaştığım sorunlar konusunda bana yardım etmek için zaman ayıran Sayın Ar. Gör. Dr. Sırma YEĞİN’e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Burcu Kaplan TÜRKÖZ’e ve Sayın Ar. Gör. Mehmet Selim ŞILBİR’a,

HPLC analizleri konusundaki yardımlarından ötürü Ar. Gör. Emine NAKİLCİOĞLU’na,

Fark Tarama Kalorimetresi analizleri konusunda bana yol gösteren Sayın Yrd. Doç. Dr. Seher KUMCUOĞLU’na ve Sayın Neslihan BOZDOĞAN’a,

14-MÜH-051 no’lu Bilimsel Araştırma Projesi’ne olan desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne,

Çocukluğumdan itibaren bana bilim aşkını kazandırmak için ellerinden geleni yaparak bugünlere gelmemi sağlayan annem Nilgün KIRTEL’e, babam Turgay KIRTEL’e, halam Sunay KALELİ’ye ve eniştem Prof. Dr. Çetin KALELİ’ye teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Levanın Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	9
2.3 Şeker Pancarı Melası.....	10
2.4. İmmobilizasyon.....	12
2.5 Levan Üretimi.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1 Materyal.....	21
3.1.1 Mikroorganizma.....	21
3.1.2 Substrat.....	21
3.2 Yöntemler.....	23
3.2.1 <i>Z.mobilis</i> hücrelerinin Ca-aljinatta immobilizasyonu.....	23
3.2.2 Sürekli sistemde levan üretimi.....	23
3.2.3 Kesikli Sistemde Levan Üretimi.....	27
3.2.4 Melasa Uygulanan Ön İşlemler.....	28

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.5 Üretilen levanın izolasyonu.....	29
3.2.6 Levanın kısmi saflaştırılması.....	29
3.3 Analiz Yöntemleri.....	30
3.3.1 İndirgen şeker tayini.....	30
3.3.2 Toplam şeker tayini.....	30
3.3.3 Melasın şeker bileşiminin belirlenmesi.....	31
3.3.4 Melasta toplam azot ve protein tayini.....	32
3.3.5 Melasta brix ve kuru madde oranlarının belirlenmesi.....	32
3.3.6 Melasta kül miktarı tayini.....	32
3.3.7 Levan konsantrasyonu tayini.....	33
3.3.8 Fark tarama kalorimetresi (DSC).....	33
3.3.9 Tartım.....	33
3.3.10 pH.....	33
3.3.11 Santrifügasyon.....	34
3.3.12 Levan üretiminde verim ve verimlilik hesaplamaları.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1 <i>Z.mobilis</i> 'in Çoğalması Üzerine Oksijenin Etkisinin İncelenmesi.....	36
4.2 Melasın Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi.....	37
4.3 Melasa Uygulanan Ön İşlemlerin Levan Üretimine Etkisi.....	38
4.4. Kesikli Sistemde Serbest Hücrelerle Levan Üretimi.....	44
4.5 Kesikli Sistemde İmmobilize Hücrelerle Levan Üretim Kinetiği.....	45
4.6 Sürekli Sistemde Serbest Hücrelerle Levan Üretim Kinetiği.....	46

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.7 Sürekli Sistemde İmmobilize Hücrelerle Levam Üretim Kinetiği.....	48
4.8 Fark Tarama Kalorimetresi.....	49
5. SONUÇ.....	52
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55
7. ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Levanın moleküler yapısı.....4
2.2	<i>G.diazotrophicus</i> SRT4 levansukrazının üç boyutlu dimerik kristal yapısı.....6
2.3	<i>Zymomonas mobilis</i> 'in taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....10
3.1	Üzerinde gösterilmiş boyutlarıyla sürekli sistemde üretim için kullanılan fermentasyon kabı.....25
3.2	Sürekli sistemde levan üretim düzeneği.....26
3.3	Liyofilize edilmiş levan.....29
3.4	İndirgen şeker tayini için kullanılan DNS standart grafiği.....31
3.5	Toplam şeker ve kalan şeker tayini için kullanılan fenol-sülfürik asit standart grafiği.....31
4.1	Dökme plak (a), çift plak (b) ve derin plak (c) yöntemleriyle agarlı besiyerinde 28 °C' de 42 h inkübe edilmiş <i>Z.mobilis</i> kolonileri.....36
4.2	Uygun melas işleme yönteminin belirlenmesi için %15 sakkaroz içeren melaslı besiyerlerinde yapılan levan üretimlerinin sonuçları.....38
4.3	%15, 20 ve 25 oranlarında sakkaroz içeren, santrifügal klarifikasyon yöntemi ile işlenmiş melaslı besiyerlerinde yapılan levan üretimlerinin sonuçları.....40
4.4	Maillard reaksiyonu ile melanoidin oluşumu.....42
4.5	Serbest hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği.....44
4.6	İmmobilize hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği.....45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 Serbest hücrelerle sürekli sistemde levan üretim kinetiği.....	47
4.8 İmmobilize hücrelerle sürekli sistemde levan üretim kinetiği.....	48
4.9 Ticari levan örneğinin DSC termogramı.....	50
4.10 Sentetik ortamda üretilmiş levan örneğinin DSC termogramı.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1	Levan üreten mikroorganizmalar.....5
2.2	50 g/L toplam şeker içerecek şekilde seyreltilmiş pancar melası ve şeker kamışı melasının karşılaştırmalı kimyasal bileşimleri.....13
3.1	Stok besiyerinin bileşimi.....22
3.2	Aşı ve üretim ortamlarının bileşimi (pH=5.0).....22
3.3	Sürekli sistemde üretim için kullanılan fermentasyon kabının boyutları.....24
4.1	Fermentasyonda kullanılan şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi.37
4.2	Serbest hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği.....44
4.3	İmmobilize hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği.....46
4.4	Sürekli sistemde serbest hücrelerle levan üretim kinetiği.....47
4.5	İmmobilize hücrelerle sürekli sistemde levan üretim kinetiği.....48

1. GİRİŞ

Levan, $\beta(2\rightarrow6)$ fruktofuranozidik bağları ile birbirine bağlanmış fruktoz ünitelerinden oluşan doğal bir homopolisakkarittir (Bekers et al., 2005). Bitkisel ya da bakteriyel kökenli olabilen levan, levansukraz enziminin (EC 2.4.1.10) transfruktozilasyon aktivitesi ile sakkarozdan sentezlenir (Crittenden and Doelle, 1994). Levan ve inülin tipi fruktanlar, birçok ot ve tahılda temel depo karbonhidratı olarak bulunurlar (Pollock and Cairns, 1991). Günümüzde, sahip oldukları daha yüksek molekül ağırlıkları ve dallanma dereceleri pek çok farklı fonksiyonel özellik sağladığı için birçok uygulamada mikrobiyal levanlar bitkisel levanlara tercih edilmektedir. Levan ürettiği gözlemlenmiş bazı mikroorganizmalar *Acetobacter xylinum* (Ahmed et al., 2014; Srikanth et al., 2015) *Bacillus subtilis* (natto) (Shih et al., 2005; Wu et al., 2013), *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002 (Zhang et al., 2014), *Lactobacillus reuteri* (Sims et al., 2011), *Halomonas smyrnensis* AAD6 (Kazak Sarılmışer vd., 2015; Poli et al., 2009), *Pseudomonas fluorescens* (Freitas et al., 2009) ve *Zymomonas mobilis* (Bekers et al., 2002; de Oliveira et al., 2007; Şılbr vd., 2014) olarak sıralanabilir.

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023, Gram-negatif ve fakültatif anaerobik bir bakteridir. *Z.mobilis*, levanın yanı sıra fruktooligosakkarit, sorbitol, glukonik asit ve etanol gibi farklı metabolitler de üretmektedir (Bekers et al., 2000; Doelle and Greenfield 1985; Viikari, 1984). Glukoz, fruktoz, sakkaroz ve ksilozu Entner-Doudoroff yol izi ile metabolize edebilen bu bakteri, dışarıdan aldığı karbon kaynaklarının %98'i ile metabolit üretirken sadece %2'sini biyokütle oluşturmak için kullanır (de Graaf, 2000; Pentjuss et al., 2013; Sprenger, 1996).

Farklı fonksiyonel özellikleri sayesinde levan gıda, tıp, biyomedikal, kozmetik, kimya ve nanoteknoloji gibi pek çok farklı endüstride kendine kullanım alanı bulmuş bir biyopolimerdir. Kuru levan tozu kokusuzdur, higroskopik değildir ve suda yavaş çözünür. Toksik ya da mutajenik bir etkisi bulunmamaktadır. Gıdalarda emülgatör ve stabilizatör olarak kullanılabilmesinin

yanı sıra film oluşturma özelliği sayesinde levandan yenebilir gıda kaplamaları da üretilebilmektedir. İki fazlı PEG/levan sıvı sistemleri ile sığır serum albumini, at kalp miyoglobini ve yumurta albumini gibi biyolojik moleküller saflaştırılmaktadır (Chung et al., 1997). Levan bazlı yapıştırıcılar petrokimyasal yapıştırıcılara karşı ciddi bir alternatif oluşturmaktadır. İki farklı levan bazlı yapıştırıcı günümüzde Montana Biotech SE Inc. tarafından üretilmektedir. Levan; antienflamatuar, anti-AIDS, antitümör ve kolesterol düşürücü özelliklere sahip olduğu için biyomedikal uygulamalarda kendine çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Ayrıca anti-pıhtılaşma ve ilaç kaplama ajanı olarak da kullanılmaktadır (Srikanth et al., 2015).

Biyoteknolojik proseslerde besiyeri maliyeti toplam maliyetin %30 ila %50'sini oluşturmaktadır. Bu sebeple biyoteknolojik üretimlerde ucuz karbon kaynaklarının kullanımı endüstriyel anlamda büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple çalışmamızın bir kısmında fermentasyon ortamında sakkaroz kaynağı olarak şeker pancarı melası kullanılmıştır. Melas, şeker üretiminin kristalizasyon aşamasında teknolojik imkanlarla daha fazla şeker kristalinin elde edilemeyeceği noktada çıkan bir yan üründür. Şeker pancarı melası %48-56 sakkaroz içerdiği ve temini kolay bir yan ürün olduğu için biyoteknolojik üretimlerde en çok tercih edilen karbon kaynaklarından biridir. Ancak melasta mikrobiyal gelişimi inhibe edebilecek düzeyde ağır metal ve antimikrobiyal özelliğe sahip renk maddeleri bulunduğundan, fermentasyon öncesi melasın genellikle çeşitli klarifikasyon işlemlerine tabi tutulması gerekir.

İmmobilizasyon, canlı hücrelerin ya da aktif haldeki enzimlerin bir destek maddesi içerisinde ya da üzerinde tutuklanması işlemine verilen addır. İmmobilize hücrelerin biyoteknolojik üretimlerde tekrar tekrar kullanılabilme, sürekli sistemde hücre kaybını önleme ve hücre stabilitesini arttırma gibi avantajları mevcuttur. Çalışmamızın aşamalarından birinde *Z.mobilis* hücreleri Ca-aljinat boncuklarda immobilize edilerek levan üretim performansları değerlendirilmiştir.

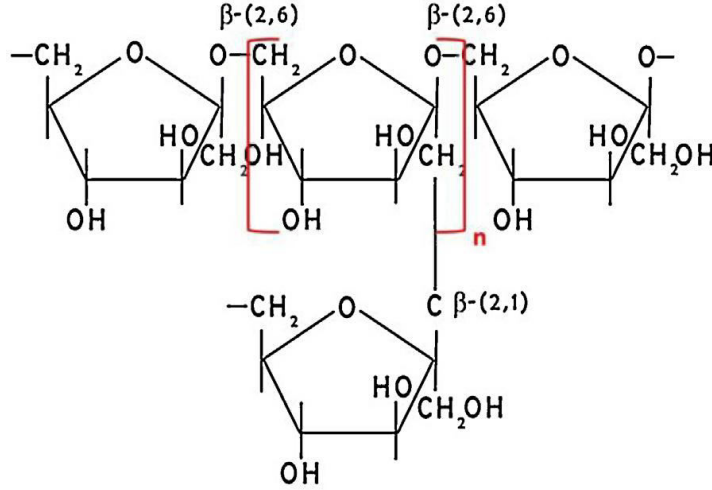
Bu çalışmanın ilk aşamasında şeker pancarı melasına uygulanan farklı klarifikasyon işlemlerinin levan üretimine etkisi incelenmiştir. Ardından sentetik ortamda kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde serbest ve immobilize

hücrelerin levan üretim performansları değerlendirilmiştir. Son olarak, üretilen levan kısmen saflaştırılmış ve Fark Tarama Kalorimetresi aracılığıyla ısı özellikleri ticari levan ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmalarla *Z.mobilis* ile levan üretiminde ucuz bir karbon kaynağının kullanılma olasılıkları araştırılmış, ayrıca laboratuvar ölçeğinde karıştırılmalı tank tipi bir biyoreaktör ile sürekli sistemde yüksek verimlilikte levan üretilebileceği ve bu biyoreaktörün ölçek büyütme çalışmaları için ileriki çalışmalarda kullanılabileceği gösterilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Levanın Yapısı ve Özellikleri

Levan, fruktozun doğal bir homopolimeridir. $\beta(2\rightarrow6)$ bağları ile birbirine bağlanmış fruktoz moleküllerinden oluşan bir zincir şeklindedir. Zincirin dallanma noktalarını ise $\beta(2\rightarrow1)$ bağları oluşturur. Zincirin başında sakkaroz molekülünden gelen bir D-glukoz molekülü bulunmaktadır (Srikanth, et al., 2015). Şekil 2.1’de levanın moleküler yapısı görülebilir.



Şekil 2.1 Levanın moleküler yapısı. $\beta(2\rightarrow6)$ bağlarından oluşan fruktan omurgası ve $\beta(2\rightarrow1)$ noktasında oluşan dallanma görülmektedir (Srikanth et al., 2015).

Levan doğada bitkilerde ya da bakteriler tarafından hücre dışına sentezlenmiş halde bulunabilir. Bitkisel levanın molekül ağırlıkları genellikle 2000 ila 33,000 Da arasında iken bakteriyel levanın molekül ağırlıkları 2 ila 100 milyon Da arasında değişmekte ve polisakkarit zinciri boyunca pek çok noktada dallanma göstermektedirler (Bekers et al., 2002). Levanın molekül ağırlığı ve dallanma derecesi hem levayı üreten mikroorganizmaya hem de fermentasyon şartlarına göre farklılık göstermektedir (Wu et al., 2013). Molekül

ağırlığı ve dallanma derecesindeki bu farklılıklar levanın fonksiyonel özellikleri üzerinde büyük etkiye sahiptir.

Mikrobiyal levan çoğunlukla bakteriler tarafından hücre dışına sentezlenmiş şekilde üretilir. Çizelge 2.1’de levan üreten bazı mikroorganizmalar görülmektedir.

Çizelge 2.1 Levan üreten mikroorganizmalar (Srikanth et al., 2015)

Mikroorganizma	Karbon Kaynağı
<i>Aerobacter</i> sp.	
<i>Acetobacter xylinum</i>	Sakkaroz
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Sakkaroz
<i>Bacillus subtilis</i>	Sakkaroz
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	Sakkaroz
<i>Bacillus licheniformis</i>	Sakkaroz
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Sakkaroz
<i>Erwinia herbicola</i>	Sakkaroz
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Sakkaroz, fruktoz, glukoz, rafinoz, gliserol
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Sakkaroz
<i>Halomonas</i> sp.	Sakkaroz, şeker pancarı melası, nişasta melası
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Sakkaroz
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Hurma şurubu ve sakkaroz
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Sakkaroz
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sakkaroz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sakkaroz
<i>Serratia levanicum</i>	Sakkaroz
<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>Streptococcus mutans</i>	
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Sakkaroz
<i>Zymomonas mobilis</i>	Sakkaroz, şeker pancarı melası, kamış melası

Levan, levansukraz enziminin transfruktozilasyon aktivitesi ile sakkarozdan sentezlenir. Levansukraz başlangıçta periplazmda birikir ve burada son konformasyonunu aldıktan sonra hücre dışına salgılanır. Bakterilerde genel olarak iki farklı levansukraz sentez mekanizması mevcuttur. Bunlardan ilki, *Bacillus* sp. gibi Gram-pozitif bakterilerde görülen iki aşamalı sentezdir; protein katlanmasının ardından sinyal peptidi enzimden kesilir. Dış ortamda bulunan demir, kalsiyum iyonları ya da pH değişimi gibi etkenler levansukrazın hücre dışına salgılanması için gereken sinyali tamamlar (Hernández et al., 1999; Vandamme et al., 2002). *Z.mobilis*, *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas syringae* gibi Gram-negatif bakterilerde ise levansukraz sentezi bir sinyal peptidinden bağımsız bir yol izi ile gerçekleşir (Ben Ammar et al., 2002).

Literatürde levansukraz enziminin karakterizasyonu ile ilgili yapılmış pek çok çalışma mevcut olsa da Worldwide Protein Data Bank (PDB)'te üç boyutlu kristal yapısı çözülmüş yalnızca 16 adet levansukraz girdisi bulunmaktadır. Bunlardan *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4'e ait levansukrazın üç boyutlu yapısı Şekil 2.2'de görülebilir (Martinez-Fleites et al., 2005).



Şekil 2.2 *G.diazotrophicus* SRT4 levansukrazının üç boyutlu dimerik kristal yapısı (PDB id: 1W18). Gösterim için PyMOL yazılımı kullanılmıştır (Martinez-Fleitez et al., 2005).

Levan, $\beta(2\rightarrow6)$ bağları sayesinde hem suda hem yağda çözünebilir. Amfifilik karaktere sahip olması, levanın sulu çözeltilerinde nano boyutta parçacıklar halinde bulunmasını sağlar. Levan; metanol, etanol, izopropanol, aseton, toluen, polietilen glikol, kerosen vb. birçok organik solventte çözünmez durumdadır. Birçok polimerin aksine levan, suda şişmez. Dallanmış yapısı levanın kohezif kuvvetine katkıda bulunurken içerdiği yüksek sayıda hidroksil grubu birçok farklı yüzey ile adhesif bağlar oluşturmasını sağlar (Ullrich, 2009). Levanın biyo-bozunur yapıda olması ve yüksek çekme ve kayma gerilimi sayesinde levan bazlı yapıştırıcılar petrokimyasal yapıştırıcılara karşı ciddi bir alternatif oluşturmuş durumdadır (Barone and Medynets, 2007). Diğer birçok yüksek molekül ağırlıklı molekülün aksine levan düşük bir iç viskoziteye sahiptir. Bu özelliği sayesinde levan, kapsül yapımı ve kaplanması gibi birçok farmasötik uygulamada yer almaktadır.

Levan toksik değildir. Kokusuzdur. Isıya oldukça dayanıklıdır. Oda sıcaklığında sıvı kültür içerisinde 120 saat boyunca bozunmadan kaldığı gözlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda ise bozunma derecesi pH ile ters orantılıdır; yani asit hidrolizi levan için temel bozunma faktörüdür (Bekers et al., 2005). Mayalar tarafından sentezlenen invertazlar ya da amilazlar levani hidrolize edemezler.

Gıda endüstrisinde kullanılan levanlar genellikle *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Lactobacillus reuteri* LB121 gibi laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir (Srikanth et al., 2015). Gıdalarda emülgatör, stabilizatör ve kıvam arttırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra kolesterol düşürücü etki de göstermektedir. Asit hidrolizi sonucu küçük fruktooligosakkaritler açığa çıkardığı ve endojen *Bifidobacteria*'nın çoğalmasını teşvik ederek kolonik mikrobiyotayı düzenlediği için levan prebiyotik etki göstermektedir (Huang et al., 2013). Normalde nötr bir tada sahip olan levanın enzimatik ve kimyasal hidrolitik ürünleri gıda endüstrisinde tatlandırıcı ya da diyet lifi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Fruktofuranozil birimleri arasındaki çapraz bağlar değiştirilerek elde edilen levan türevleri, birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır. Deri dokusuna

uygulanan levanın dokuda interferon üretimini arttırarak anti-enflamatuvar etki gösterdiği gözlenmiştir. İrite olmuş cilde uygulanan levanın ayrıca yumuşatıcı etki gösterdiği de görülmüştür. Hücre yenileme özelliklerinin yanı sıra levanın enfeksiyon ve nekrozu önleme yeteneği de vardır (Rairakhwada et al., 2007). Tümörlü hücrelerin hücre zarı geçirgenliklerini arttırıp sitotoksik ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmelerini sağlayarak tümör inhibisyonu sağlar. *Microbacterium* levanının antikanser özelliğinin dallanma derecesi ile birlikte arttığı görülmüştür. Levanın düzenli tüketimi dışkı pH'sını düşürmekte, beta glukoronidaz aktivitesini yükseltmekte, bağırsaktaki *Bifidobacteria* sayısını arttırıp kısa zincirli yağ asitlerinin oluşumunu desteklemektedir. Dolayısıyla kolonda laktik asit bakterilerinin gelişimini desteklemekte ve kolonu karsinogenlerden korumaktadır (Basit and Ibekwe, 2007). Makrofajlar ile B ve T-hücreleri üzerinde immün-düzenleyici etki gösteren levan, bazı tümör hücrelerini de öldürmektedir (Robertson et al., 1977; Mathé et al., 1969). *Z.mobilis* kaynaklı levan, kozmetik endüstrisinde cilt nemlendirme özelliği sebebiyle kullanılmaktadır.

Farmasötik endüstrisinde levan emülgatör ve enkapsüle edici ajan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç tabletlerinde ve kaplamalarında renk ve tat düzenleyici etkileri sebebiyle tercih edilmektedir. Diyabetli sıçanlarda içme suyuna eklenen levanın plazmada glukoz seviyesini kayda değer derecede düşürdüğü ve glikojen seviyesini yükselttiği görülmüştür (Dahech et al., 2011). Levan uygulamasının aynı zamanda karaciğer, böbrek, pankreas ve kalpte süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini yükselttiğine dair çalışmalar mevcuttur. Levan diyet ile uygulanması sonucunda plazmada antioksidan enzim aktiviteleri yükselmekte ve toplam kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterol seviyeleri düşmektedir (Belghith et al., 2012). Asetillenmiş, fosforlanmış ya da bezillenmiş levan türevleri daha yüksek indirgen aktivite göstermekte ve süper oksit ve hidroksil radikallerini daha etkili tutmaktadır (Liu et al., 2012).

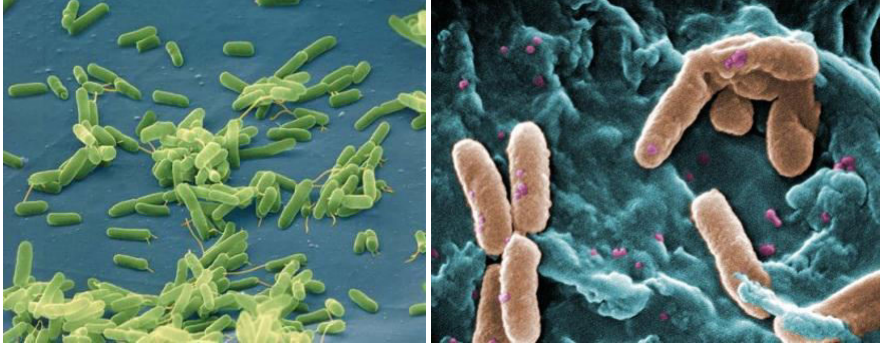
2.2. *Zymomonas mobilis*

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma olan *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023, fakültatif anaerobik, Gram-negatif ve çubuk şeklinde bir bakteridir (Şekil 2.3). Sakkaroz içeren besiyerlerinde öncelikli olarak levan üretse de, bu bakteri Entner-Doudoroff metabolik yol izini kullandığından glukoz veya fruktozdan etanol de üretmektedir. Tükettiği 1 mol glukoz karşılığında sadece 1 mol ATP elde etse de çok yüksek glikoliz hızı sayesinde 0.25 h^{-1} kadar yüksek büyüme hızlarına ulaşabilmektedir. Mikroaerobik koşullarda da büyüebiliyor olması, aerobik *Gluconobacter* ve *Acetobacter* ile olan akrabalığına işaret etmektedir.

Bu bakteri ilk olarak agav gibi şekerce zengin bitki saplarının fermentasyonu sırasında keşfedilmiştir. Glukoz varlığında teorik verim değerinin %97-98'i kadar yüksek verimlerde etanol üretmekte ve çok düşük miktarlarda yan ürün oluşturmaktadır. Mayalara kıyasla etanol verimliliği 3-5 kat daha yüksektir; şeker toleransı 400 g/L'ye, etanol direnci ise %12-13'e kadar çıkmaktadır. Ancak substrat spektrumu glukoz, fruktoz ve sakkaroz ile kısıtlıdır. Günümüzde lignoselülozik materyalden etanol üretimini arttırmak için ksilozu metabolize edebilen *Z.mobilis* suşları geliştirilmiştir. Ksilozdan teorik etanol veriminin %86'sı kadar etanol üretebilen suşlar mevcuttur. Bakterinin glukoz ve fruktozu metabolize etme yolu neredeyse birbirinin aynısı olsa da, fruktoz varlığında bakterinin büyümesi yavaşlamakta, biyokütle miktarı azalmakta ve etanol verimi teorik değerin %90'ına düşmektedir. Bunun sebebinin fruktoz varlığında oluşan gliserol ve dihidroksi aseton gibi yan ürünler olduğu düşünülmektedir.

Z.mobilis, çok yüksek bir glikoliz hızına sahiptir. $900 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g kuru ağırlık})^{-1}$ kadar yüksek glukoz alım hızlarına ulaştığı gözlenmiştir. Ancak glikoliz hızı, glukozun hücre içine alım hızından düşük olduğundan hücre içinde glukoz birikmektedir. Ayrıca sakkaroz hidroliz hızı da glikoliz hızını geçmektedir. Biriken glukoz, levansukraz enzimi üzerinde inhibe edici etki gösterdiğinden nispeten daha düşük sakkaroz hidroliz hızında levan üretimi daha yüksek olmaktadır. Sakkaroz hidroliz hızı fermentasyon sıcaklığına, sakkaroz konsantrasyonuna ve pH'ya bağlıdır. *Z.mobilis*'in %46 (w/v)'ya ulaşan başlangıç

sakkaroz konsantrasyonlarında gelişip aktif şekilde fermentasyona devam edebildiği bilinmektedir. Başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun yükseltilmesi fermentasyon süresini arttırmasına rağmen toplam biyokütle miktarında önemli bir değişim gözlenmez (Bekers et al., 2000; Doelle and Greenfield, 1985).



Şekil 2.3 *Zymomonas mobilis*'in taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (Anonymous,2012a; Anonymous 2012b).

2.3 Şeker Pancarı Melası

Melas, şeker üretiminin kristalizasyon aşamasında açığa çıkan bir yan üründür. Kolay temin edilmesi, ucuz olması ve yüksek konsantrasyonda (%48-56) sakkaroz içermesi sebebiyle biyoteknolojik üretimler için popüler bir ucuz karbon kaynağıdır. Şeker pancarı melasının yüksek sakkaroz konsantrasyonuna karşılık düşük indirgen şeker içeriğine (%1'in altında) sahip olması, *Z.mobilis* ile levan üretimi için uygun bir besiyeri olabileceğine işaret etmektedir. Su ve sakkarozun yanı sıra melasta proteinler, vitaminler, amino asitler, organik asitler ve demir, çinko, bakır, manganaz, magnezyum, kalsiyum gibi metaller de bulunmaktadır (Roukas, 1998). Melasa koyu kırmızımsı kahve rengini veren bileşenler ise polifenoller, melanoidinler, heksozların alkali bozunma ürünleri ve karameller olarak sıralanabilir (Arimi et al., 2014). Hem ağır metaller hem de renk bileşenlerinden bazıları fermentasyon sırasında mikrobiyal gelişimi inhibe etmekte, ortam pH'sını etkilemekte ve bazı enzimleri inaktive etmektedir. Bu sebeplerle melasın biyoteknolojik üretimlerde kullanılmadan önce genellikle bazı

kimyasal ön işlemlerden geçirilerek içerisindeki ağır metallerin ve renk bileşenlerinin uzaklaştırılması amaçlanır. Melasa uygulanan kimyasal ön işlemlerden en çok kullanılanlar sülfürik asit uygulaması, trikalsiyum fosfat uygulaması, potasyum ferrosiyanit uygulaması ve aktif karbon uygulaması olarak sıralanabilir (Küçükaşık vd., 2011; Roukas, 1998).

Paenibacillus polymyxa NRRL-18475 ile melastan levan üretiminin incelendiği bir çalışmada (Han and Watson, 1992) ön işlemden geçirilmemiş pancar melasından fermentasyon sonunda 3.6 g/L levan elde edilmişken jel filtrasyon kolonlarından geçirilen pancar melasından 36.0-38.0 g/L levan üretilmiştir. Ayrıca jel filtrasyon kolonlarından geçirilmiş melastan üretilen levan, işlenmemiş melastan elde edilen levanın aksine tipik beyaz, düzgün, yapışkan yapıyı göstermiştir.

Aureobasidium pullulans P56 ile pancar melasından ve sentetik besiyerinden pullulan üretilen bir çalışmada ise (Göksungur vd., 2004) sentetik besiyerinden 21.6 g/L pullulan elde edilirken sülfürik asit ve aktif karbon ile işlenmiş melastan 35.0 g/L pullulan üretilmiştir.

Halomonas smyrnensis AAD6'nın pancar melasından levan üretimini inceleyen bir çalışmada (Küçükaşık vd., 2011) ise bakterinin 30 g/L başlangıç şeker konsantrasyonuna sahip melaslardan sadece santrifügal klarifikasyon ve pH ayarlaması yapılanlarda 3.49 g/L; sırasıyla trikalsiyum fosfat-sülfürik asit-aktif karbon ile ön işleme tabi tutulan melasta ise 7,56 g/L levan ürettiği görülmüştür.

Dünya genelinde biyoteknolojik üretimlerde şeker pancarı melasının yanı sıra şeker kamışı melası da sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi, şeker kamışı melasıninkinden oldukça farklıdır (Çizelge 2.2). Bu farklılıkların en önemlisi, pancar melasının indirgen şeker (fruktoz ve glukoz) içeriği %1'in altında iken şeker kamışı melasında %12-35 oranında indirgen şeker görülmesidir. Pancar melasındaki α -amino asit miktarı, şeker kamışı melasıninkinin yaklaşık sekiz katıdır. Pancar melasındaki amino asitler hem pancar hücrelerinin içeriğinden hem de şekerin saflaştırılması sırasında uygulanan alkali hidroliz aşamasında proteinlerin bozunmasından

gelmektedir. Şeker kamışı melasında sitrik asit ve DL-malik asit miktarları pancar melasının 10 katından fazla iken DL-laktik asit miktarı pancar melasında yaklaşık 4 kat daha fazladır. Pancar melasında aynı zamanda şeker kamışı melasından %40 daha fazla asetik asite rastlanmıştır. Na miktarı pancar melasında yaklaşık 10 kat daha fazla iken Ca, Mg ve P miktarları şeker kamışı melasına göre çok daha düşüktür (Nakata et al., 2014).

Çalışmalarımızda kullanılan şeker pancarı melası, Pakmaya A.Ş. Kemalpaşa fabrikasından temin edilmiştir.

2.4. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, biyoteknolojik bir üretim yapmak amacıyla canlı hücre veya aktif enzimlerin bir destek maddesinin içinde ya da üzerinde tutuklanması işlemidir. İmmobilize edilen hücre ya da enzim, fermentasyon ortamından fiziksel olarak ayrılmakta ancak ortamla aralarında substrat ve ürün alışverişi devam etmektedir.

İmmobilize hücreler tekrar tekrar kullanılabilir, aktiviteleri stabile edilmiş olur, sürekli fermentasyon sistemleri için uygundur, yüksek hacimsel verimlilik sağlarlar ve fermentasyon ortamından kolaylıkla ayrılabilirler.

İmmobilizasyon teknikleri genel olarak adsorpsiyon, kovalent bağlama ve polimerik bir dayanak maddesine hapsetme olarak üçe ayrılabilir.

Adsorpsiyon yönteminde enzimler, katı-sıvı ara yüzeyinde Van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlar ya da hidrofobik etkileşimlerle tutunurlar. Teknik açıdan oldukça basit olsa da bu yöntemde enzim ya da hücrelerin yüzeye zayıf şekilde tutunması ve birim destek maddesi başına az miktarda enzim ya da hücrenin adsorbe edilebilmesi gibi dezavantajları vardır.

Kovalent bağlama yönteminde ise kimyasal bir bağlanma söz konusudur, bunun için destek materyali farklı yöntemlerle aktive edilir. Ancak bu teknikle

enzim immobilizasyonu oldukça zordur ve enzim aktivitesinde ciddi kayıplar görülebilir.

Çizelge 2.2 50 g/L toplam şeker içerecek şekilde seyreltilmiş pancar melası ve şeker kamışı melasının karşılaştırmalı kimyasal bileşimleri (Nakata et al., 2014).

		Pancar melası	Şeker kamışı melası
Şeker (g/L)	Fruktoz	0	12
	Glukoz	0	9
	Sakkaroz	50	29
	Toplam	50	50
Amino asit (mg/L)			
α -Amino asit	Alanin	195	25
	Arjinin	13	0
	Asparajin + aspartik asit	310	122
	Sistein	0	0
	Glutamin + glutamik asit	327	5
	Glisin	68	2
	Histidin	0	0
	İzolösin	209	13
	Lösin	181	6
	Lisin	98	29
	Metiyonin	0	0
	Fenilalanin	47	1
	Prolin	0	0
	Serin	104	7
	Treonin	49	8
	Triptofan	0	0
	Tirozin	176	7
	Valin	140	24
	Toplam	1916	248
Diğer amino asitler	γ -Aminobütirik asit (GABA)	259	7
	Betain	3717	0
	Piroglutamik asit (PCA)	1354	166
	Toplam	5329	173
Organik asit (mg/L)			
	Asetik asit	574	411
	Sitrik asit	49	660
	DL-Laktik asit	2904	729
	DL-Malik asit	144	1781
	Toplam	3944	3832
Mineral (mg/L)			
	Ca	4	458
	K	2303	2033
	Mg	3	159
	Na	811	81
	P	10	57
	Toplam	3131	2788

Polimerik dayanak maddesinde hapsedme yönteminde hücreler jel yapısında bir polimer matriksinin içinde hapsedilir. Bu amaçla en çok kullanılan polimerler kalsiyum aljinat, κ -karragenan ve agardır. Bu polimerler kolay hazırlanabildikleri, toksik olmadıkları ve kolay kullanılabildikleri için tercih edilmektedir. İmmobilizasyon, enzim ya da hücrenin bir monomer çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra kimyasal bir reaksiyon ya da sıcaklık değişimiyle polimerizasyonuna, bir membranın ardında tutuklanmasına ya da daha önce hazırlanmış bir polimerin jelleşmesi ile gerçekleşir. Ca-aljinatta immobilizasyon işlemi, hücre süspansiyonu ile karıştırılmış sodyum aljinatın kalsiyum klorür çözeltisine damla damla eklenmesi ile kısa bir sürede kolayca gerçekleştirilmektedir.

İmmobilize *Z.mobilis* hücrelerinin kesikli sistemde levan ve etanol üretim performanslarının incelendiği bir çalışmada (Bekers et al., 2001), hücreler paslanmaz çelik tellerden oluşan kürelere, Al_2O_3 granüllerine ve Ca-aljinat boncuklara immobilize edilmiştir. *Z.mobilis* hücrelerinin hücre zarlarının negatif yüklü olması sayesinde pozitif yüklü Al_2O_3 granüllerindeki deliklere ve porlara etkili şekilde tutunabildikleri ve birkaç fermentasyon döngüsünden sonra granüllerin levan ile kaplandığı gözlenmiştir. Birkaç fermentasyon döngüsünün ardından Ca-aljinat boncukların dağılmaya başladığı gözlenirse de en yüksek ortalama levan konsantrasyonuna (13.6 g/L) Ca-aljinat boncuklarla yapılan üretimde ulaşılmıştır. Bu çalışmada serbest hücrelerin hem etanol hem de levan üretimi konusunda daha etkili oldukları bildirilmiş olsa da, sürekli sistemde immobilize hücrelerle yapacağımız üretimde serbest hücrelere göre daha yüksek levan konsantrasyonlarına ulaşılabilceği düşünülmektedir.

Dolgu kolon biyoreaktörde Ca-aljinatta immobilize edilmiş *Z.mobilis* hücreleri ile levan üretilen bir çalışmada ise (Şılbr vd., 2014) $0.14\ h^{-1}$ seyreltme hızında 31.8 g/L levan üretilmiştir. Maksimum hacimsel verimlilik değeri olan $6.556\ g/(L\ h)$ 'e ise $0.22\ h^{-1}$ seyreltme hızında ulaşılmıştır. Bu çalışmada da fermentasyonun sonlarına doğru Ca-aljinat boncukların önemli kısmının parçalandığı bildirilmiştir.

Ca-aljinatta immobilize edilmiş *Z.mobilis* hücreleri ile levan üretiminin incelendiği başka bir araştırmada da (Santos et al., 2014) pH 5 değerinde %35

sakkaroz içeren besiyerinde 48 saatte 22.39 g/L levan konsantrasyonuna erişildiği gözlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda fermentasyon süresince Ca-aljinat boncuklardaki hücre miktarının 10^7 kob/ml'den 10^9 kob/ml'ye çıkması, *Z.mobilis*'in Ca-aljinatta etkili bir şekilde tutulup çoğalabildiğine işaret etmektedir.

Aljinat/polivinil alkol (PVA) boncuklarda immobilize edilen *Z.mobilis* hücrelerinden levan üretimi ile alakalı bir makalede (Lorenzetti et al., 2015) %30 başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda ve pH 7.0'de 18.66 g/L levan değerine ulaşıldığı ve verimlilik değerinin 1.55 g/L/h olduğu bildirilmiştir.

2.5 Levan Üretimi

Z.mobilis, ticari boyutlarda levan üretimi için çok önemli bir mikroorganizma olarak görülmektedir. Literatürde bu mikroorganizma ile levan üretimine dair birçok çalışma mevcuttur. *Z.mobilis* levanın yanı sıra etanol, sorbitol, fruktooligosakkarit, glukonik asit gibi başka birçok metabolit de ürettiğinden ortam şartlarının levan üretimi için optimize edilmesi önem taşımaktadır.

Viikari (1984), 150 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonuna sahip sentetik besiyerinde *Z.mobilis* ile 22 saatte 14.4 g/L levan üretildiğini gözlemlemiştir. Ayrıca yapılan HPLC analizi ile bu bakterinin aynı zamanda sorbitol ürettiği de gözlenmiştir. Maksimum sorbitol konsantrasyonuna (17 g/L) en yüksek etanol konsantrasyonunun gözlemlendiği noktada rastlanmıştır. Bu çalışmada, üretilen levanın büyük kısmının çöktürülemez nitelikte olduğu belirtilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalar, bahsi geçen çöktürülemeyen levanın aslında fruktooligosakkaritler olabileceğini göstermektedir.

Crittenden ve Doelle (1994), *Z.mobilis* ATCC 39676 kaynaklı ekstraselüler levansukraz enzimini incelemiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda enzimin sakkaroz hidrolizi, levan oluşumu ve oligosakkarit üretimi olmak üzere üç farklı işlevi olduğu anlaşılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 98 kDa, optimum aktivite

gösterdiği pH ise 5.5 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin glukoz tarafından inhibe edildiği; ancak fruktoz, etanol, sorbitol, NaCl, TRIS ya da EDTA'nın inhibisyon etkisi göstermediği görülmüştür. Levansukraz enziminin levan oluşturma aktivitesini 35°C sıcaklığa ulaşıldığında geri dönüşsüz olarak kaybettiği de gözlenmiştir.

Muro et al. (2000), yüksek levan üretme kapasitesine sahip mutant *Z.mobilis* suşlarını N-metil-N-nitro-nitrozoguanidin ve kafein mutasyonları ile seçmiş ve en çok levan üreten (41 g/L) suşun *Z.mobilis* HL 29 olduğunu bulmuştur. Levan üretimi 200 g/L sakkaroz ve 0.5 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren ortamda 7°C'de 29 gün boyunca depolanan kültürlerde gerçekleşmiştir.

Bekers et al. (2001); paslanmaz çelik tel kürelerde, Al₂O₃ granüllerinde ve Ca-aljinat boncuklarda immobilize edilmiş *Z.mobilis* 113S ile 100 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda fermentasyonunu incelemiştir. Üretim ortamı 48 saatte bir tazelenerek immobilize hücrelerin performansı gözlenmiştir. Bakterinin Al₂O₃ granüllerine etkin bir şekilde tutunduğu ve birkaç fermentasyon döngüsünden sonra granüllerin kısmen levan ile kaplandığı; ancak Ca-aljinat boncukların bir süre sonra dağılmaya başladığı görülmüştür. Tüm immobilizasyon yöntemlerinde birkaç fermentasyon döngüsünden sonra ortamdaki serbest hücre miktarının immobilize hücre miktarının çok üzerine çıktığı görülmüştür. Üç immobilizasyon yönteminde de ikinci ve üçüncü fermentasyon döngülerinden sonra maksimum etanol ve levan konsantrasyonları yakın bulunmuştur (%2.3 - %2.7 etanol ve %1.3 - %1.5 levan). Bu çalışma ile paslanmaz çelik tel kürelerde ve Al₂O₃ granüllerinde immobilize edilmiş *Z.mobilis* bakterilerinin inokulum oluşturma amacıyla başarıyla kullanılabileceği; ancak serbest hücrelerin levan ve etanol üretiminde daha etkin oldukları sonucuna ulaşılmıştır.

Borsari et al. (2006), *Z.mobilis* CP4 ile kesikli ve kesikli-beslemeli levan üretiminde karbon kaynaklarının etkisini Cevap Yüzey Yöntemi ile incelemiştir. Hücreler 25°C sıcaklıkta 20 saat süreyle farklı şeker kamışı suyu ve sakkaroz konsantrasyonlarında geliştirilmiştir. Maksimum levan konsantrasyonuna (40.14 g/L) kesikli sistemde 150 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda ulaşıldığı belirtilmiştir. Ortama şeker kamışı suyunun eklenmesi levan üretimi üzerine

istatistiksel olarak önemli bir katkı sağlamamış; ancak biyokütle, sorbitol ve etanol üretimini yükseltmiştir.

de Oliveira et al. (2007), *Z.mobilis* ATCC 31821 ile ucuz karbon kaynaklarından levan üretim potansiyelini araştırmışlardır. Bunun için mikroorganizmanın ticari sakkaroz, melas ve şeker kamışı şurubunda levan üretim performanslarını incelemişlerdir. Yapılan incelemeler sonucunda hepsi %25 sakkaroz içeren ticari sakkarozlu besiyerinden 21.685 g/L, melastan 2.533 g/L, şeker kamışı şurubundan ise 15.456 g/L levan üretildiği gözlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda ticari sakkaroz içeren besiyerinde maya ekstraktı ve KH_2PO_4 'ın; şeker kamışı şurubunda yapılan üretimde ise maya ekstraktı ve MgSO_4 'ın levan üretiminde önemli derecede etkili olduğu görülmüştür.

Melo et al. (2007), *Z.mobilis* ZAG-12 ile levan üretimini optimize etmek için sıcaklığın, karıştırma hızının, başlangıç sakkaroz ve başlangıç maya ekstraktı konsantrasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda son levan konsantrasyonunun sıcaklık, karıştırma hızı ve sakkaroz konsantrasyonuna bağlı olduğunu; ancak maya ekstraktı konsantrasyonunun son levan konsantrasyonu üzerinde etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak etanol ve biyokütle miktarı göz önüne alındığında maya ekstraktı konsantrasyonunun önemli bir değişken olduğu görülmüştür. Levan üretimi için en iyi koşulların 100 rpm karıştırma hızı, 20°C sıcaklık ve 250 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu olduğu sonucuna varılmıştır. Ulaşılan maksimum levan konsantrasyonu 14.67 g/L'dir.

Ananthalakshmy ve Gunasekaran (2011), *Z.mobilis* B-4286 ile levan üretimini incelemiş ve 250 g/L sakkaroz içeren besiyerinde maksimum levan konsantrasyonuna (15.5 g/L) 20 saat sonunda ulaşmıştır. 150 g/L sakkaroz içeren besiyerinde ulaşılan maksimum levan konsantrasyonu 12.6 g/L olarak bildirilmiş; ancak 150 g/L'nin üzerindeki sakkaroz konsantrasyonlarında biyokütle miktarının daha fazla artmadığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada levan üretimi için optimum pH değerinin 5 olduğu bulunmuştur. pH 4'te levan üretimi gözlenmemiş, pH 7'de ise ulaşılan maksimum levan konsantrasyonu 6.8 g/L'ye düşmüştür. Ayrıca bu araştırmada belirgin bir biyokütle artışının görülmediği koşullarda bile sakkaroz

hidrolizi ve levan oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir. 35°C ve 40 °C arasındaki sıcaklıklarda levan üretiminin görülmediği, ortamda bulunan glukozun levan üretimini ciddi şekilde azalttığı (2.8 g/L levan) anlaşılmıştır.

Jathore et al. (2012), *Pseudomonas fluorescens* ile levan üretimi için fermentasyon ortamı bileşenlerinin optimizasyonunu yapmıştır. Optimize edilmiş ortamın bileşimi 60 g/L sakkaroz, 1.5 g/L amonyum klorür, 2.0 g/L sodyum nitrat ve 15.0 g/L kazein pepton içermektedir. Optimal ortamın kullanımı ile levan üretimi 5.27 g/L'den 15.42 g/L'ye çıkarılmıştır. Ayrıca bakterinin ürettiği polisakkaritin levan olduğu FT-IR ve NMR analizleri ile doğrulanmıştır.

Wu et al. (2013), *Bacillus subtilis* natto ile kesikli ve kesikli-beslemeli sistemlerde levan üretime ve üretilen levanın molekül ağırlığına etki eden faktörler üzerine çalışmışlardır. En etkili ve yüksek verimde levan üretimi (24 saatte 61 g/L levan; 3.4 g/L/h verimlilik) 250 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu, pH 7.0, 37 °C sıcaklık ve 175 rpm karıştırma hızında gerçekleşmiştir. Buna ek olarak sakkarozun ortama vurgulu besleme (pulsed feeding) şeklinde verilmesi, son levan konsantrasyonunu 100 g/L'ye çıkarmıştır. Üretilen levanın molekül ağırlığının üretim koşullarıyla önemli ölçüde bağlantılı olduğu; en çok da başlangıç sakkaroz konsantrasyonundan etkilendiği görülmüştür.

Huang et al. (2013), bir tuzlu su balık havuzundan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 ile levan üretime farklı faktörlerin etkisini incelemiş ve %50 sakkaroz içeren besiyerinde 7.0 başlangıç pH değerinde 145.94 g/L kadar yüksek bir levan konsantrasyonuna ulaşıldığını bildirmiştir. Levan üretim verimliliği 3.92 g/L/h olarak belirtilmiştir. Üretilen levanın molekül ağırlığı artan sıcaklık ve sakkaroz konsantrasyonu ile azalmıştır (13.45 kDa'dan 2.96 kDa'ya). Ayrıca bu levanın prebiyotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Şilbir vd. (2014), *Z.mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile kesikli ve sürekli sistemlerde levan üretimini incelemiştir. Öncelikle maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton, malt çimi ve üre gibi farklı azot kaynaklarının levan üretimine etkisi incelenmiş ve en uygun azot kaynağının maya ekstraktı olduğu

görülmüştür. Ardından kesikli sistemde levan üretimini optimize etmek için Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology) kullanılmış ve maksimum levan konsantrasyonu olan 40.2 g/L levana 299.1 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu, 42.3 saat inkübasyon süresi ve başlangıç pH değeri 6.0 ile ulaşıldığı bildirilmiştir. Son olarak dolgulu kolon tipi biyoreaktörde Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle levan üretimi gerçekleştirilmiş ve 0.14 h^{-1} seyreltme hızında 31.8 g/L maksimum levan konsantrasyonuna; 0.22 h^{-1} seyreltme hızında ise 6.556 g/(L h) maksimum hacimsel verimliliğe ulaşılmıştır.

Kazak Sarılmışer vd. (2015), halofilik ekstremofil bir bakteri olan *Halomonas smyrnensis* AAD6^T ile levan üretiminde farklı stimüle edici faktörlerin etkisini incelemiştir. Başlangıç karbon ve azot konsantrasyonlarının, üretim ortamı pH'sının, NaCl ve azot dalgalanmalarının, azot ve fosfor kısıtlamalarının, bazal üretim ortamının iz element ve tiamin içeriklerinin levan verimini farklı oranlarda etkilediği görülmüştür. Ayrıca ortama eklenen 50 mM konsantrasyondaki borik asitin sakkaroz kullanımını üç katına ve levan üretimini beş katına (1.84 g/L'den 8.84 g/L'ye) çıkardığı belirtilmiştir. Borik asitin, bakterinin yetersayı algısı (quorum sensing) mekanizmasını harekete geçirip levan üretimini tetiklediği anlaşılmıştır.

Lorenzetti et al. (2015), aljinat/polivinil alkol sisteminde immobilize edilmiş *Z.mobilis* CCT 4494 hücrelerinin levan üretim performansını değerlendirdikleri çalışmada 18.66 g/L maksimum levan konsantrasyonuna ve 1.55 g/L/h verimliliğe 30 °C sıcaklık, 24 saat inkübasyon süresi, başlangıç pH değeri 7.0 ve %30 başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda ulaşmıştır.

Srikanth et al. (2015), *Acetobacter xylinum* NCIM 2526 ile levan üretimini incelemiştir. Yapılan optimizasyon sonucu maksimum levan konsantrasyonu 0.54 g/L'den 13.25 g/L'ye çıkarılmıştır. Ayrıca üretilen levanın antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş ve 1 mg/ml levanın, aynı konsantrasyondaki askorbik asit çözeltisinin %81.26'sı kadar antioksidan aktivite gösterdiği anlaşılmıştır. Buna ek olarak levanın anti-enflamatuvar aktivitesi de incelenmiş ve 0.25 mg/ml levanın, aynı konsantrasyondaki diklofenak sodyum çözeltisinin %71.18'i kadar protein

inhibisyonuna sebep olarak kayda değer bir anti-enflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma

Levan üretimi için Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilen *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 kullanılmıştır. Mikroorganizma, stok besiyeri ortamında (Yeast Pepton Broth) +4 °C'de saklanmış ve her hafta taze stok besiyerine ekim yapılarak kültür yenilenmiştir. Taze stok besiyerine ekilen mikroorganizma 28 °C'de 24 saat karıştırma ya da havalandırma yapılmaksızın inkübasyona bırakılmış ve ardından depolanmak üzere +4 °C'deki buzdolabına konmuştur. Stok besiyerinin bileşimi Çizelge 3.1.1'de görülebilir.

Fakültatif anaerobik bir metabolizmaya sahip *Z.mobilis*'in çoğalmasının üzerine oksijenin etkisini incelemek için yapılan denemede yaklaşık 10^1 kob/ml'ye seyreltilmiş *Z.mobilis* kültürleri sırasıyla dökme plak, çift plak ve derin plak yöntemleriyle %15 sakkaroz içeren agarlı üretim ortamına inokule edilmiş ve 28 °C'de 42 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda plaklardaki kolonilerin gelişimi kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

Sürekli sistem hariç tüm inkübasyonlar Nüve EN 400 inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Substrat

Levan üretimi için sentetik besiyeri ve melaslı besiyeri kullanılmıştır. Kullanılan aşı ortamı ve üretim ortamının bileşenleri aynı, ancak bileşenlerinin konsantrasyonları farklıdır. Optimum levan üretimi için kullanılan besiyeri karbon kaynağı olarak yüksek konsantrasyonda (%30) sakkaroz içermektedir (Şılbir vd., 2014). Aşı ortamında ise mikroorganizmanın çoğalmasını desteklemek amacıyla sakkaroz konsantrasyonu daha düşük, organik azot kaynağı olarak kullanılan

maya ekstraktı konsantrasyonu ise daha yüksektir (M. Bekers et al., 2001). Melaslı besiyeri hazırlanırken pancar melası istenen sakkaroz oranına seyreltildikten sonra ortama gerekli besin elementleri eklenmiştir. Her üretimden önce stok besiyerinden aşı ortamına %3 (v/v) oranında inokulasyon yapılmış ve aşı ortamı 28 °C’de 24 saat karıştırma ya da havalandırma yapılmadan inkübe edilerek mikroorganizma çoğaltılmıştır. Sentetik besiyerleri 121 °C’de 15 dakika, melaslı besiyerleri ise Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumunu azaltmak amacıyla 121 °C’de 5 dakika sterilize edilmiştir. Aşı ortamı ve üretim ortamının bileşenleri Çizelge 3.1.2’de görülebilir. Aşı ortamı ve üretim ortamının pH’sı 1 N HCl ile 5,0’a ayarlanmış, stok besiyeri için ise pH ayarlaması yapılmamıştır. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Bazı analizlerde referans amaçlı kullanılan *Z.mobilis* kaynaklı ticari levan, Hayashibara Co., Ltd.’den temin edilmiştir.

Çizelge 3.1 Stok besiyerinin bileşimi.

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	20
Bacto Peptone	10
Maya ekstraktı	10

Çizelge 3.2 Aşı ve üretim ortamlarının bileşimi (pH=5,0).

Bileşen	Aşı ortamı (g/L)	Üretim ortamı (g/L)
Sakkaroz	50,0	300,0
Maya ekstraktı	7,0	2,5
KH ₂ PO ₄	2,5	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,6	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0	0,5

3.2 Yöntemler

Bu tez çalışmasında bahsi geçen üretimler ve analizler, 2 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 *Z.mobilis* hücrelerinin Ca-aljinatta immobilizasyonu

Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle levan üretimi için öncelikle 28 °C’de 24 saat inkübe edilmiş hücreleri içeren 25 ml aşı ortamı, steril %4 (w/v) Na-aljinat çözeltisi ile tamamen karıştırılmış, ardından bu karışım peristaltik pompa yardımıyla aseptik koşullarda steril CaCl₂ çözeltisine 1 ml’lik steril mikropipet ucundan yavaş yavaş damlatılmıştır. Bu sırada CaCl₂ çözeltisi sürekli karıştırılmıştır. Damlama anında oluşan Ca-aljinat boncuklar, işlemin sonunda CaCl₂ çözeltisinde 30 dakika daha sertleşmeye bırakılmış, ardından fazla Ca²⁺ iyonlarını ve serbest hücreleri uzaklaştırmak için steril %0,85 (w/v) NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Hapsedilmiş hücreleri içeren Ca-aljinat boncuklar 28 °C’de 1 gece inkübe edilerek hücre sayıları artırılmıştır.

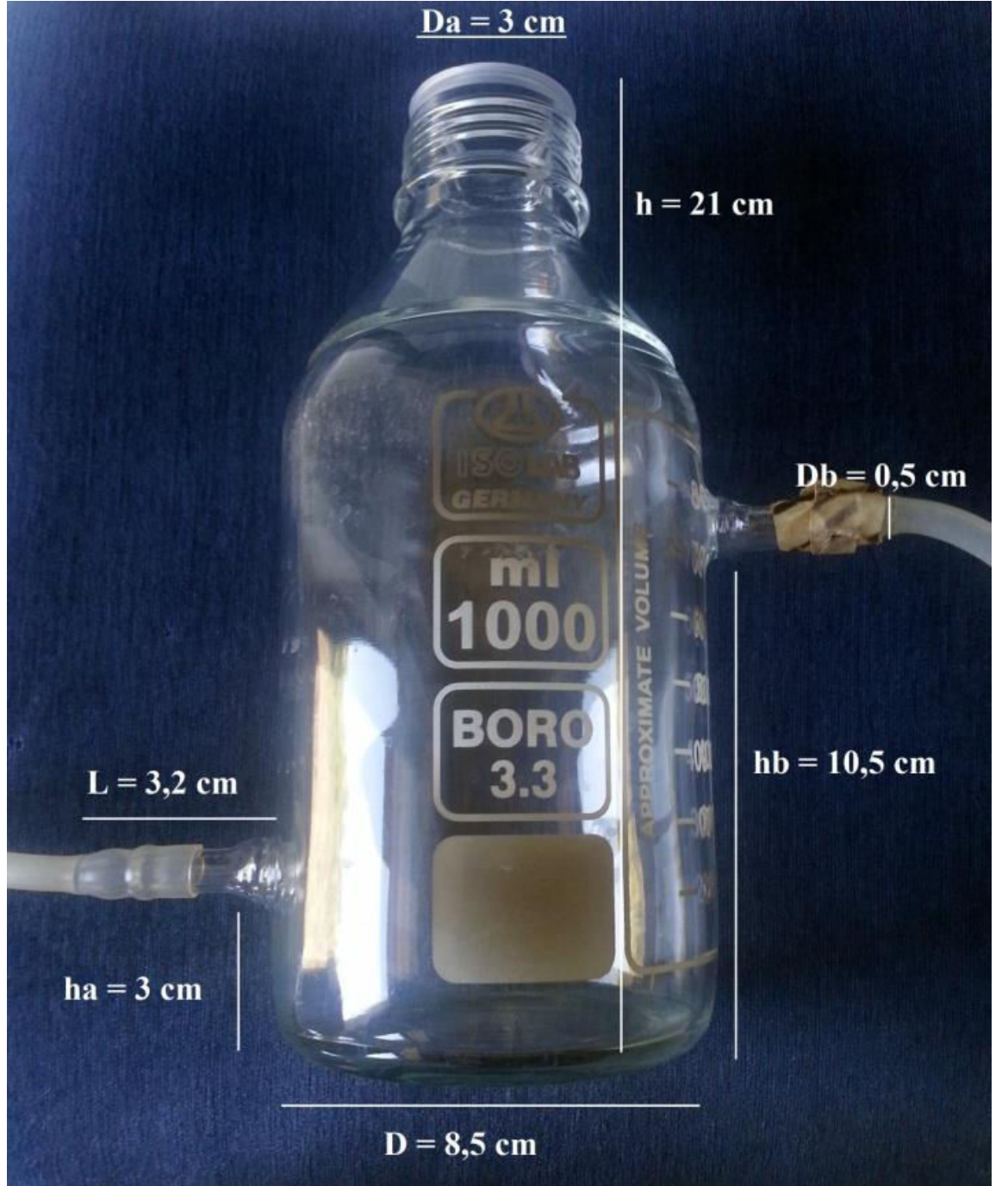
3.2.2 Sürekli sistemde levan üretimi

Sürekli sistemde levan üretimi için kullanılan fermentasyona uygun 1 L hacme sahip aspiratör şişe, ideEGE-TGB Cam Atölyesi’nde imal edilmiştir. Şişenin boyutları Çizelge 3.2.2’de verilmiştir. Şişenin çalışma hacmi 740 ml olup bir giriş ve bir çıkış borusuna sahiptir (Şekil 3.2.2a). Sürekli sistemde şişenin alt kısmında bulunan giriş borusundan Chemap AG peristaltik pompa yardımıyla ortama sürekli taze besiyeri verilmiş ve şişenin üstünde bulunan çıkış borusundan kullanılmış besiyeri toplanmıştır. Sürekli sistemde sırasıyla 0,12; 0,21; 0,31 ve 0,41 h⁻¹ seyreltme oranlarında çalışılmış ve 3 kalış süresi sonunda sistemin dengeye geldiği varsayıp ortamdan analiz edilmek üzere örnek alınmıştır. Sistemin kurulmuş hali Şekil 3.2.2b’de gösterilmiştir.

Sürekli sistemde hem serbest hücrelerle hem de Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle levan üretimi gerçekleştirilmiştir. Sürekli sistemde yapılan üretimler boyunca oda sıcaklığı devamlı olarak 28 °C’de sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.3 Sürekli sistemde üretim için kullanılan fermentasyon kabının boyutları.

Yükseklik (h)	21 cm
Giriş borusunun yüksekliği (ha)	3 cm
Çıkış borusunun yüksekliği (hb)	10,5 cm
Dip çapı (D)	8 cm
Ağız çapı (Da)	3 cm
Giriş ve çıkış borularının çapı (Db)	3,2 cm
Giriş ve çıkış borularının uzunluğu (L)	0,5 cm



Şekil 3.1 Üzerinde gösterilmiş boyutlarıyla sürekli sistemde üretim için kullanılan fermentasyon kabı.



Şekil 3.2 Sürekli sistemde levan üretim düzeniği. Soldan sağa taze substrat, peristaltik pompa, altında karıştırıcı ile aspiratör şişe ve atık şişesi görülmektedir.

3.2.2.1 Sürekli sistemde serbest hücrelerle levan üretimi

Serbest hücrelerle levan üretimi için 28 °C’de 24 saat inkübe edilmiş hücreleri içeren 22 ml taze aşı ortamı, 718 ml üretim ortamı içeren şişenin içine aseptik koşullarda aktarılmış ve hücreler ilk 12 saat sürekli sistem başlatılmadan ve karıştırma uygulanmadan inkübe edilmiştir. Bu aşamada şişenin giriş ve çıkış boruları metal kısıkaçlarla sıkıca kapalı tutulmuştur. Şişenin ağız kısmı, hücrelerin ürettiği yüksek miktarda CO₂’in sistemden çıkışını sağlamak için pamukla kapatılmıştır. 12 saatin sonunda 0,12 h⁻¹ seyreltme hızında sürekli sistemde çalışılmaya başlanmış ve her 3 kalış süresinin ardından ortamdan analiz için örnek alınıp bir sonraki seyreltme hızına geçilerek üretim gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2 Sürekli sistemde immobilize hücrelerle levan üretimi

Ardından 22,2 g Ca-aljinat boncuk aşı ortamından aseptik koşullarda ayrılıp 740 ml üretim ortamına inokule edilmiş (%3 (w/v)) ve sürekli sistem başlatılmadan önce 28 °C’de 24 saat yavaşça karıştırılarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda 0,12 h⁻¹ seyreltme hızında sürekli sistemde çalışılmaya başlanmış ve her 3 kalış süresinin ardından ortamdan analiz için örnek alınıp bir sonraki seyreltme hızına geçilerek üretim gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Kesikli Sistemde Levan Üretimi

Kesikli sistemde levan üretimi, 250 ml’lik erlenlerde 100 ml üretim ortamı ile gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık 28 °C, pH 5,0 ve fermentasyon süresi 42 saattir. Serbest hücrelerle üretim için üretim ortamına %3 (v/v); immobilize hücrelerle üretim için canlı hücre içeren 3 g/100 ml Ca-aljinat boncuk inokule edilmiştir.

3.2.4 Melasa Uygulanan Ön İşlemler

3.2.4.1 Santrifügasyon ile klarifikasyon

İstenen oranda seyreltilen melas örneğinin pH'sı 5,0'a ayarlandıktan sonra 5000 x g'de 15 dakika santrifügasyon uygulanmış ve üst faz ile besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.4.2 Potasyum ferrosiyanit ($K_4[Fe(CN)_6]$) ön işlemi

İstenen oranda seyreltilen melas örneği, pH'sı 5,0'a ayarlandıktan sonra 5 dakika kaynatılmış, ardından melasa sıcakken 100 ppm $K_4[Fe(CN)_6]$ eklenmiştir. Oda sıcaklığında 24 saat bekletilen melas örneği 5000 x g'de 15 dakika santrifügasyona tabi tutulduktan sonra üst faz ile besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.4.3 Sülfürik asit (H_2SO_4) ön işlemi

Seyreltilen melas örneği, pH'sı 2 N H_2SO_4 ile 4,0'a getirildikten sonra 5 dakika kaynatılmış ve 4000 x g'de 10 dakika santrifügasyondan sonra üst faz kaba filtre kağıdından süzölmüştür.

3.2.4.4 Aktif karbon ön işlemi

H_2SO_4 ile işlenen melas örneği, %3 (w/v) aktif karbon ile mayşeleme cihazında 60 °C'de 1 saat boyunca 100 rpm'de karıştırılmış ve ardından 5000 x g'de 15 dakika santrifügasyon uygulanmıştır. Aktif karbonla yukarıda belirtildiği şekilde tekrar işlenen melas örneği, ardından aynı şekilde yeniden santrifüj edilmiş ve üst faz, kaba filtre kağıdından geçirilmiştir.

3.2.4.5 Trikalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) ön işlemi

Seyreltilen melas örneğinin pH'sı 5,0'a ayarlanmış ve 5000 x g'de 15 dakika santrifügasyon uygulanmıştır. Üst faza %2 (w/v) $Ca_3(PO_4)_2$ eklendikten

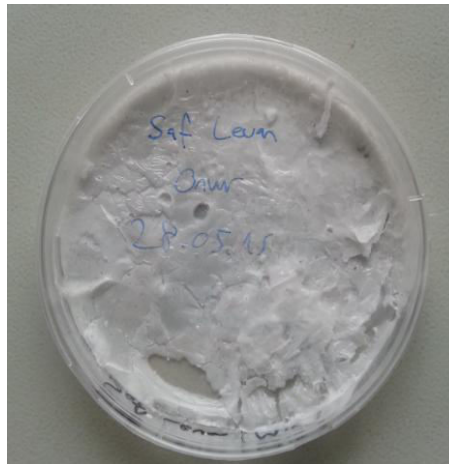
sonra otoklavda 105 °C’de 5 dakika ısıtım işlemi uygulanmış ve tekrar 5000 x g’de 15 dakika santrifügasyonun ardından üst faz ile besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.5 Üretilen levanın izolasyonu

Fermentasyon ortamından alınan örnekler 6,000 x g’de 10 dakika santrifüj edilerek biyokütle ortamdan ayrılmıştır. Üst fazda çözünmüş halde bulunan levanın presipitasyonunu sağlamak için üst faza hacimce 3 katı %96’lık etanol eklenmiş ve pH, 5 N KOH ile 10,0’a ayarlanmıştır. +4 °C’de 2 saat bekletilen örnekler 6,000 x g’de 15 dakika santrifüj uygulanarak levanın tamamen presipite olması sağlanmıştır. Santrifüjün ardından üst faz, kalan şeker analizi için ayrılırken alt faz (levan çökeltisi) tekrar orijinal hacminde ultra saf suda çözülmüştür (Viikari, 1984).

3.2.6 Levanın kısmi saflaştırılması

İzole edilen levan çözeltisi, yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar etanol ile presipite edilip orijinal hacminde saf suda çözüldükten sonra ultra saf suya karşı 48 saat boyunca 13 kDa por çapına sahip diyaliz tüpünde diyaliz edilmiştir. Diyaliz edilmiş levan çözeltisi dondurulmuş ve ardından liyofilizasyon uygulanmıştır. Şekil 3.3’te liyofilize edilmiş levan örneği görülebilir.



Şekil 3.3 Liyofilize edilmiş levan.

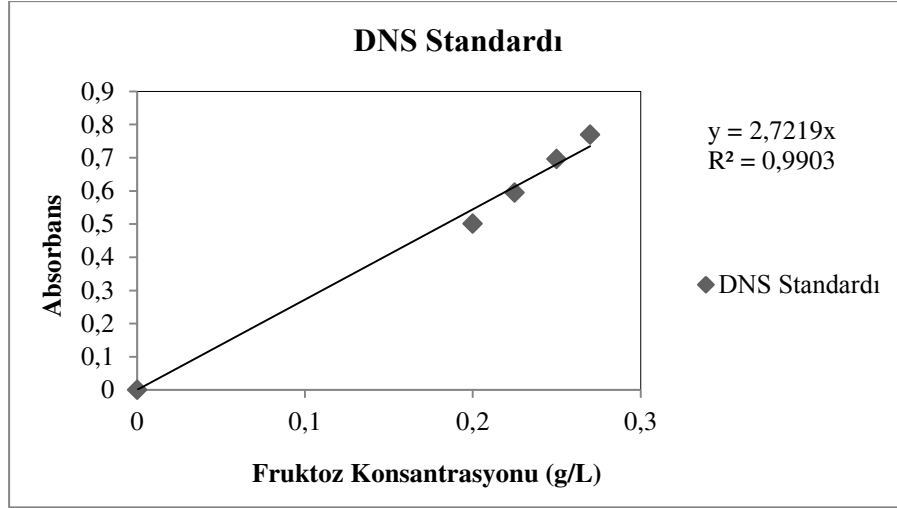
3.3 Analiz Yöntemleri

3.3.1 İndirgen şeker tayini

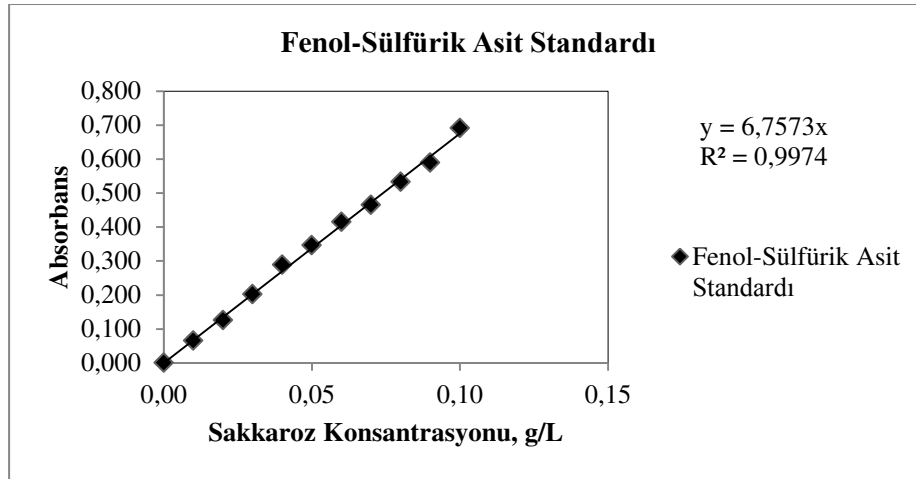
Hidroliz edilen levan çözeltilerindeki ve melastaki indirgen şeker oranları, DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Ghose, 1987). Standart denklem için artan konsantrasyonlarda saf fruktoz içeren standart çözeltilerin absorbands değerleri Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunmuş ve elde edilen değerlere lineer regresyon uygulanarak birinci dereceden doğrusal bir denklem elde edilmiştir (Şekil 3.4). Standart grafiğin fruktoz ile çizilmesi durumunda glukoza kıyasla daha dar bir aralıkta doğrusallık görülmüştür, bu sebeple sonuçların doğru yorumlanması için analiz edilecek örnekler 0,5 – 0,7 arasında absorbands verecek şekilde seyreltilerek DNS yöntemine göre standart denklem üzerinden fruktoz konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.3.2 Toplam şeker tayini

Fermentasyonda kullanılacak şeker pancarı melası ve levanın fermentasyon ortamından izolasyonu sonrasında kalan üst faz, toplam şeker miktarının belirlenmesi için analiz edilmiştir. Bunun için fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır (DuBois et al., 1956). Standart denklemin eldesi için artan konsantrasyonlarda saf sakkaroz çözeltileri kullanılmıştır (Şekil 3.5). Okumalar Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda yapılmıştır.



Şekil 3.4 İndirgen şeker tayini için kullanılan DNS standart grafiği. Absorbans için standart sapma değerleri 0 ila 0,01 arasında değişmektedir.



Şekil 3.5 Toplam şeker ve kalan şeker tayini için kullanılan fenol-sülfürik asit standart grafiği. Standart sapma değerleri 0,001 ve 0,033 arasında değişmektedir.

3.3.3 Melasın şeker bileşiminin belirlenmesi

Pancar melasının temel şeker kompozisyonunu oluşturan sakkaroz, glukoz ve fruktoz miktarlarının belirlenmesi için DNS yöntemi ile indirgen şeker tayini

ve fenol-sülfürik asit metodu ile toplam şeker tayininin yanı sıra melas örnekleri HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz için referans alınan çalışmaya (Xu, Liang, & Zhu, 2014) göre; mobil faz olarak %75'lik (v/v) asetronitril çözeltisi izokratik modda kullanılmıştır. Bu çözelti kullanılmadan önce mavi bant filtre kağıdından geçirilmiş ve ultrasonik su banyosunda degaz edilmiştir. 2,970 g sakkaroz, 1,648 g fruktoz, 0,902 g glikoz içeren 100 ml'lik karışık standart çözelti ve yine aynı miktarlarda tek tek sakkaroz, fruktoz ve glikoz içeren standart çözeltiler ayrı ayrı hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanılmış ve çözeltiler kolona zarar verebilecek maddelerin uzaklaştırılması için 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Analiz edilecek melas örnekleri 20 kat seyreltilip 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Dedektör olarak Refraktif İndeks Dedektörü (RID) kullanılmıştır. Dedektör sıcaklığı 35 °C'de sabitlenmiştir. Kolon olarak yukarıdaki çalışmadan farklı olarak Thermoscientific Hypersil GOLD™ Amino Column kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'de sabitlenmiştir. Tüm analizlerde mobil faz debisi 1,0 ml/min'de tutulmuş ve analizden önce kolon 45 dakika kadar mobil faz ile yıkanmıştır. Standart eğrinin oluşturulması için standart çözeltiler 5, 10 ve 15 µl hacimlerde sisteme enjekte edilerek analiz edilmiştir.

3.3.4 Melasta toplam azot ve protein tayini

Melastaki toplam azot miktarı, Leco FP-528 azot/protein tayin cihazı ile analiz edilmiştir. Bulunan azot miktarı 6.25 faktörü ile çarpılarak toplam protein oranı belirlenmiştir.

3.3.5 Melasta brix ve kuru madde oranının belirlenmesi

Melasta kuru madde tayini 70 °C'de vakumlu etüvde yapılmıştır. Brix ise uygun oranda seyreltilmiş melas örneklerinde SOIF DBR95 dijital refraktometre ile ölçülmüştür.

3.3.6 Melasta kül miktarı tayini

Melasta kül tayini 750 °C'de kül fırınında yapılmıştır.

3.3.7 Levan konsantrasyonu tayini

Fermentasyon ortamından izole edilen levan çözeltisi 1:1 oranında 0,1 N HCl ile kapaklı cam tüplerde karıştırılmıştır. Tüpler 100 °C'deki su banyosunda 1 saat bekletilerek levanın tamamen fruktoza hidrolize olması sağlanmıştır (Viikari, 1984). Hidroliz işleminin etkinliği, %1 (w/v) saf levan çözeltisinin aynı koşullarda hidroliz edilerek açığa çıkan fruktoz miktarının analiz edilmesi ile doğrulanmıştır. Hidroliz edilen örneklerdeki fruktoz konsantrasyonu, levan konsantrasyonuna eşitir ve dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.8 Fark tarama kalorimetresi (DSC)

Levanın ısı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DSC cihazı (TA Instruments DSC Q2000) kullanılmıştır. 4-5 mg arasında değişen ticari levan ve sentetik ortamda üretilmiş levan örnekleri alüminyum panlara konmuş ve panlar mühürlenmiştir. 20 °C'den 300 °C'ye kadar 10 °C/min ısıtma hızında 50 ml/min N₂ akışı altında boş bir alüminyum pan referans alınarak analiz gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 Tartım

Tüm tartım işlemleri Shimadzu marka elektronik tartı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.10 pH

pH ayarlamaları ve okumaları, WTW Series pH 720 marka pH-metre ile yapılmıştır. Cihazın kalibrasyonu düzenli aralıklarla pH tampon çözeltileri ile yapılmıştır.

3.3.11 Santrifügasyon

Tüm santrifügasyon işlemleri Hettich Universal 320 R santrifügasyon cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.3.12 Levan üretiminde verim ve verimlilik hesaplamaları

Dönüşüm verimi, elde edilen levanın fermentasyon sırasında harcanan sakkaroz miktarına yüzdesel oranı şeklinde tanımlanmıştır. Fermentasyonda kullanılan sakkarozun ne kadarının levan üretimi için kullanıldığının bir ölçüsüdür. Sakkaroz ve onun inversiyonu sonucu açığa çıkan glukoz ve fruktoz, levanın yanı sıra başka birçok metabolitin üretimi ve biyokütle artışı için de kullanılmaktadır.

$$\text{Dönüşüm verimi (\%)} = \frac{P}{S_0 - S} * 100$$

P = Fermentasyon sonunda elde edilen levana konsantrasyonu (g/l)

S₀ = Başlangıçta ortamda bulunan sakkaroz konsantrasyonu (g/l)

S = Fermentasyonun sonunda kullanılmadan kalan sakkaroz (g/l)

$$\text{Efektif verim (\%)} = (P / S_0) * 100$$

P = Fermentasyon sonunda elde edilen levana konsantrasyonu (g/l)

S₀ = Başlangıçta ortamda bulunan sakkaroz konsantrasyonu (g/l)

$$\text{Sürekli sistemde hacimsel verimlilik (g l}^{-1}\text{ h}^{-1}\text{)} = D * P$$

D = Sürekli sistemde seyreltme hızı (h⁻¹)

P = Sürekli sistemde belirli bir seyreltme hızında kararlı halde elde edilen levan konsantrasyonu (g/l)

Kesikli sistemde hacimsel verimlilik ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$) = P_t / t

P_t: belirli bir t saatinde ortamda bulunan levam konsantrasyonu (g/L)

t: süre (h)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *Z.mobilis*'in Çoğalması Üzerine Oksijenin Etkisinin İncelenmesi

Fakültatif anaerobik bir bakteri olan *Z.mobilis*'in çoğalması üzerine oksijenin etkisini incelemek amacıyla yapılan denemede bakterinin oksijensiz ortamda daha iyi çoğaldığı görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Dökme plak (a), çift plak (b) ve derin plak (c) yöntemleriyle agarlı besiyerinde 28 °C'de 42 h inkübe edilmiş *Z.mobilis* kolonileri.

Aerobik koşullarda çoğaltılan *Z.mobilis* hücrelerinde katalaz seviyelerinin neredeyse hiç değişmediği; ancak süperoksit dismutaz aktivitesinin 5 katına çıktığı ve hücrelerin normal fermentasyon ürünlerinin yanı sıra kayda değer miktarda asetik asit ve asetaldehit ürettikleri gözlenmiştir (Bringer et al., 1984).

Şılbr vd. (2014), *Z.mobilis* ile levan üretimine karıştırmanın etkisini incelemiştir. 28 °C sıcaklık ve %15 başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda 48 saat boyunca karıştırma uygulanmayan kültürlerde 15.52 g/L levan, 48 saat boyunca 150 rpm’de karıştırılan kültürlerde 9.9 g/L ve sadece ilk 8 saat 150 rpm’de karıştırma uygulanan kültürlerde ise 9.1 g/L levan üretildiği gözlenmiştir. Karıştırma işlemi fermentasyon sıvısına havadan oksijen geçişini kayda değer seviyede arttırdığından fazla oksijenin hem *Z.mobilis*’in gelişimine hem de levan üretimine olumsuz etkide bulunduğu sonucuna varılmıştır.

4.2 Melasın Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi

Fermentasyon için kullanılan şeker pancarı melasının bileşimi Çizelge 4.2’de verilmiştir. Melasın şeker bileşimin belirlenmesi için hem DNS ve fenol-sülfürik asit metodları, hem de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. HPLC’den elde edilen fruktoz, glukoz ve sakkaroz standardı verileri lineerize edilmiş ve hepsinde R² değeri 0,998’in üzerinde bulunmuştur.

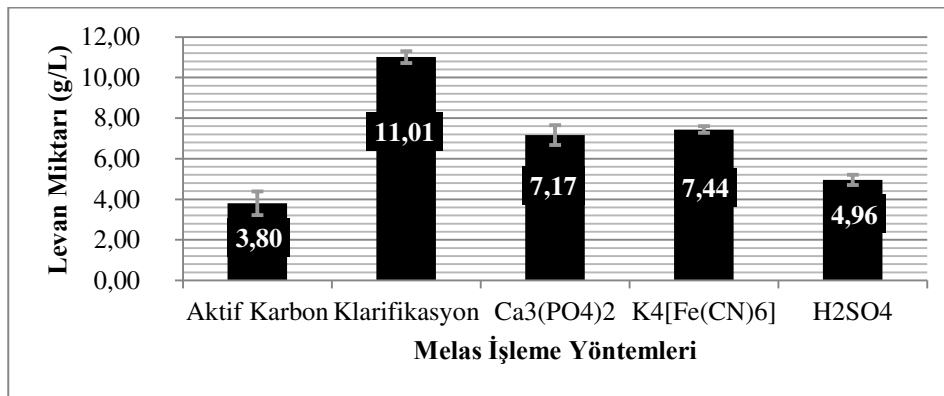
Çizelge 4.1 Fermentasyonda kullanılan şeker pancarı melasının kimyasal bileşimi

	Klasik yöntemler (DNS ve fenol-sülfürik asit)	HPLC
Toplam şeker (%)	56,21	53,36
İndirgen şeker (%)	0,22	1,36
Kuru madde (%)	80,51	
Kül (%)	9,03	
Brix (%)	79,0	
Toplam azot (%)	1,81	
Protein (%)	11,34	

HPLC analizinin klasik indirgen ya da toplam şeker analizlerine göre genelde farklı miktarlarda sonuçlar vermesi beklenen bir durumdur (Rajakyla ve Paloposki 1983). Damon ve Pettitt'in 1980'de yaptığı bir çalışmada HPLC ile alınan indirgen şeker ve sakkaroz miktarı sonuçları ile klasik yöntemler ile buldukları sonuçlar arasında sırasıyla %3.9 ve %1.2'lik bir fark olduğu görülmüştür. Bunun sebebi klasik yöntemlerde şekerlerin yarattığı interferansa bağlanmaktadır. Dolayısıyla HPLC ile elde edilen sonuçların daha doğru olduğu düşünülmektedir. Art arda cihaza verilen standart çözeltilerle elde edilen veriler arasında indirgen şekerler için %2.0'lik, sakkaroz için %2.2'lik bir varyasyon gözlemlendiğinden de aynı çalışmada bahsedilmiştir.

4.3 Melasa Uygulanan Ön İşlemlerin Levan Üretimine Etkisi

Melaslı besiyerlerinde serbest hücrelerle kesikli sistemde fermentasyona başlanmadan önce melas örnekleri istenen sakkaroz oranına seyretilmiş ve santrifügal klarifikasyon, sülfürik asit, aktif karbon, trikalsiyum fosfat ya da potasyum ferrosiyanit ön işlemlerinden geçirilerek ağır metal ve antimikrobiyal renk maddeleri içeriklerinin kısmen azaltılması hedeflenmiştir. En uygun melas işleme yönteminin belirlenmesi için %15 sakkaroz içeren melaslı besiyerlerinde levan üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).



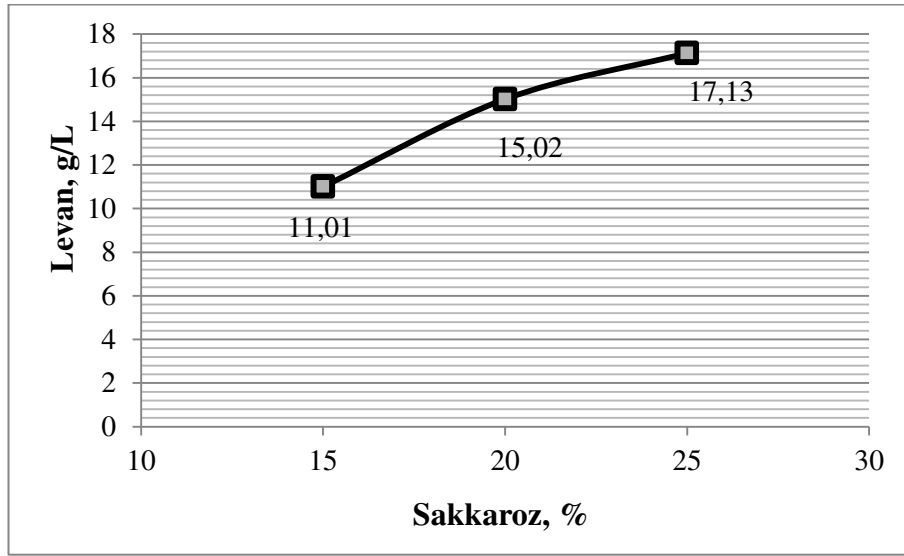
Şekil 4.2 Uygun melas işleme yönteminin belirlenmesi için %15 sakkaroz içeren melaslı besiyerlerinde yapılan levan üretimlerinin sonuçları. Standart sapma değerleri 0,16 ile 0,59 arasında değişmektedir.

Şekil 4.3'te görülebileceği üzere en yüksek levan konsantrasyonu (11,01 g/L) santrifügal klarifikasyon; en düşük levan konsantrasyonu (3,80 g/L) ise aktif karbon ön işlemleri sonucunda elde edilmiştir. Santrifügal klarifikasyon ön işlemiyle diğerlerine göre daha yüksek levan konsantrasyonuna ulaşılmasının muhtemel sebebinin bu ön işlem metodunun diğerlerinin aksine herhangi bir ısı işlem içermemesi olabileceği düşünülmüştür. Göksungur (1998), kuru madde bazında %0.47 indirgen şeker içeren şeker pancarı melasının sülfürik asit ile işlendikten sonra inversiyon sonucunda indirgen şeker oranının kuru madde bazında %12.33'e kadar çıktığını bildirmiştir. Ortamda bulunan indirgen şekerlerin levansukraz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği ve mikroorganizmayı etanol üretimine yönlendirdiği bilinmektedir (de Graaf, 2000). Blackbeard ve Doelle (1983) ile Lyness and Doelle (1983), 30 mM glukozun saflaştırılmış levansukraz enzimini tamamen inhibe ettiğini göstermiştir. Dolayısıyla melasa uyguladığımız ön işlemlerdeki ısı uygulama aşamalarında sakkarozun önemli kısmının inversiyona uğrayarak glukoz ve fruktoz açığa çıkardığı; azalan sakkaroz konsantrasyonu ve yükselen indirgen şeker konsantrasyonu sonucunda levan üretiminin azaldığı düşünülmektedir.

Aktif karbon ön işleminde önceden sülfürik asit ile işlenmiş melas kullanılmıştır. Dolayısıyla bu işlemin başlangıcında melastaki sakkarozun bir kısmı hali hazırda inversiyona uğramış haldedir. Ayrıca Küçükaşık vd. (2011), aktif karbon ön işleminin melastaki demir oranını %522 oranında arttırdığını gözlemlemiştir. Bunun sebebinin, önceden sülfürik asitle muamele edilen melastaki Fe^{3+} iyonlarının aktif karbon ön işlemi sonucunda çözünür Fe^{2+} formuna indirgenmesi olabileceği öne sürülmüştür.

Denemelerimizde aktif karbon ön işleminin melastaki renk maddelerini etkili bir şekilde uzaklaştırabildiği, ancak buna rağmen muhtemelen artan demir iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak levan üretiminin düşük olduğu görülmüştür. Dolayısıyla *Z.mobilis*'in levan üretim mekanizmasının antimikrobiyal renk maddelerinden ziyade yüksek demir konsantrasyonundan daha çok etkilendiği söylenebilir.

%15 sakkaroz içeren melaslı besiyerleri ile yapılan ön denemeler sonucu santrifügal klarifikasyon levan üretimi için en uygun ön işleme yöntemi olarak seçilmiştir. Şekil 4.3'te artan konsantrasyonlarda sakkaroz içeren, santrifügal klarifikasyon ön işleminden geçirilmiş melaslı besiyerlerinde levan üretim grafiği görülebilir.



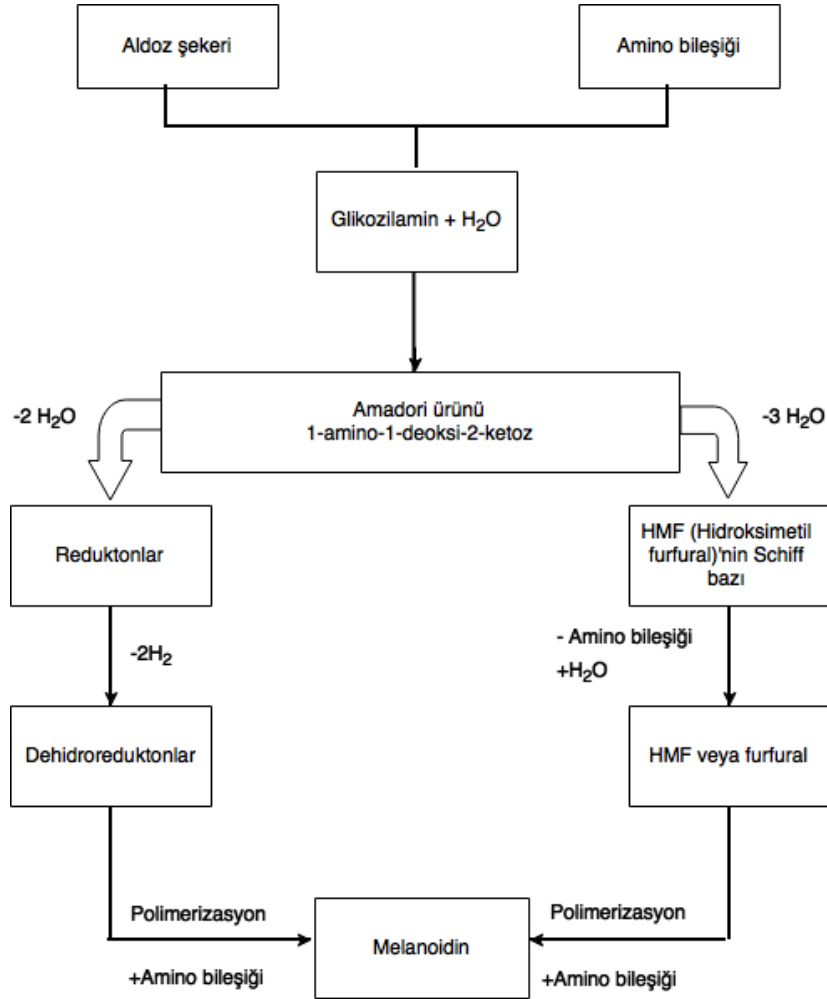
Şekil 4.3 %15, 20 ve 25 oranlarında sakkaroz içeren, santrifügal klarifikasyon yöntemi ile işlenmiş melaslı besiyerlerinde yapılan levan üretimlerinin sonuçları. Standart sapmadegerleri 0,18 ile 0,42 arasında değişmektedir.

Şekil 4.3'te görülebileceği gibi levan üretimi sakkaroz oranındaki artışa bağlı olarak yükselmiştir; ancak %30 sakkarozun üzerindeki konsantrasyonlarda levan miktarında beklenen düşüşün yerine gözlenen ani artış (veriler gösterilmemiştir), levan analizi sırasında melastan gelen bir faktörün indirgen şeker tayininde interferansa yol açtığını düşündürmüştür.

Levanın fermentasyon ortamından ayrılması için uygulanan etanol presipitasyonu sırasında levan ile birlikte melasta bulunan koyu renkli, akışkan, çamurumsu bir maddenin de çöktüğü gözlenmiştir. Han ve Watson (1992) da ön işleme tabi tutulmayan melastan *Paenibacillus polymyxa* ile

levan üretimi sonucunda elde ettikleri levanın kahverengi ve çamursu bir yapıya sahip olup tipik beyaz, yumuşak ve yapışkan tekstürü göstermediğini belirtmiştir. Denemelerimizde fermentasyon ortamında kullanılan melasın konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak çöken çamurumsu maddenin miktarının da arttığı görülmüştür. Melasa uygulanan ön işlemlerin hiçbiri bu maddenin ortamdaki tamamen uzaklaştırılmasını sağlayamamıştır. Ayrıca levanın fermentasyon ortamından izolasyonu sırasında art arda uygulanan etanol presipitasyonu da çamursu materyali uzaklaştırmak için yeterli olmamıştır. Bu madde aynı zamanda levan analizinin bir parçası olan asit hidrolizi sırasında indirgen şeker açığa çıkartarak DNS yöntemi ile indirgen şeker analizinde interferansa sebep olmaktadır. Melasın kimyasal yapısına yönelik olarak yapılan literatür araştırması, bu maddelerin melanoidinler olabileceğine işaret etmektedir.

Melanoidinler Maillard reaksiyonlarının ürünleridir ve melasın rengine önemli ölçüde katkıda bulunurlar (Onyango et al., 2011). Kahve rengine, kompleks polimerik yapılardır. Maillard reaksiyonunun son aşamasında, aminler ile şekerlerin sıcaklık etkisiyle enzimatik olmayan şekilde reaksiyona girmesiyle oluşurlar (Şekil 4.4) (Wang et al., 2011). Şeker üretiminde özellikle sıcaklığın 100 °C'nin üzerine çıkarıldığı evaporasyon aşaması, melanoidinlerin oluşması için idealdir. Şeker üretimi sırasında melanoidin oluşumu ortamdaki azot miktarına –özellikle de amino asit bileşimine- bağlıdır. Şeker pancarı, kamış melasına göre daha yüksek azot miktarına sahip olduğundan şeker pancarından şeker üretiminde daha çok melanoidin açığa çıkmaktadır (Coca et al., 2004).



Şekil 4.4 Maillard reaksiyonu ile melanoidin oluşumu (Arimi et al., 2014). Akım şeması, <http://www.draw.io> web adresinde çizilmiştir.

Melanoidinlerin belirli bir yapısı yoktur, boyutları küçük moleküllerden çok büyük polimerlere kadar değişiklik göstermektedir. Dolayısıyla karakterizasyonları oldukça zordur (Cämmerer ve Kroh 1995; Wang et al. 2011). Maillard reaksiyonu ürünlerinin yapısı pH, sıcaklık, solvent, reaksiyon süresi, reaktan tipi ve konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlıdır (Yaylayan and Kaminsky, 1998). Melanoidinler, anyonik hidrofobik polimerler olduklarından metallerle kompleks oluşturabilirler.

Aynı zamanda proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal etki gösterebilirler (Kim and Lee, 2009).

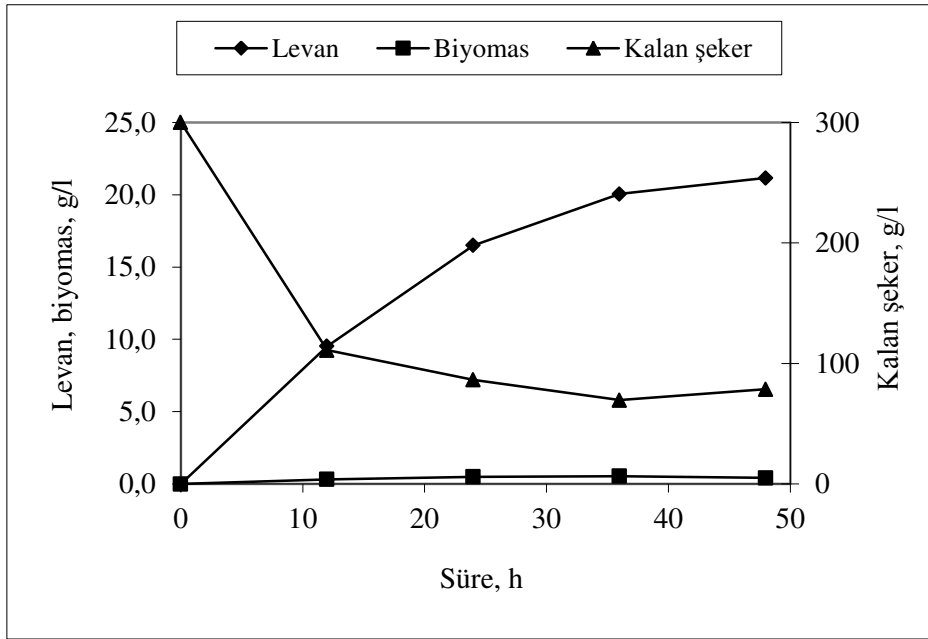
Cammerer et al. (2002), melanoidinlerin asidik koşullarda yüksek sıcaklıkla parçalanarak indirgen şeker açığa çıkardıklarını göstermiştir. Yapılan çalışmada melanoidinlerin Maillard reaksiyonu ile oluşumu sırasında di- ve oligosakkaritlerin amino bileşikleriyle reaksiyona girmesinin, asit hidrolizi sonucunda kayda değer miktarda daha fazla indirgen şeker açığa çıkmasına sebep olduğunu göstermiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçların, melaslı ortamda üretilmiş levanın analizi sırasında melanoidinlerin sebep olduğu interferans için bir açıklama olma özelliği taşıyabileceği düşünülmektedir.

Etanol presipitasyonu sırasında çökmeleri, kullandığımız melastaki melanoidinlerin polimerik yapıda olabileceklerine işaret etmektedir. Ancak melanoidin yapısının genel olarak yüksek değişkenlik göstermesi, denemelerimizde gözlenen durumun literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca melasın kompleks yapısı, çöken maddenin melanoidinlerden oluştuğu konusunda kesin bir yorum yapılmasına engel teşkil etmektedir. Bu konuda daha ileri düzeyde bir yorumlama yapılabilmesi için gelecek çalışmalarda çökeltilerin karakterizasyonu yapılmalıdır.

Bilindiği kadarıyla literatürde melastan mikrobiyal polisakkarit üretiminde melanoidinlerin yol açtığı interferansa değinen bir çalışma bulunmamaktadır; ancak bunun sebebi, kullanılan melas örneklerindeki melanoidinlerin polimerik yapıda olmayıp etanol presipitasyonu sırasında üst fazda kalıp başarıyla uzaklaştırılmaları olabilir. Han ve Watson (1992), melasın fermentasyon öncesi jel filtrasyon kolonlarından geçirilmesi ile tipik beyaz, yumuşak ve yapışkan levan üretiminin sağlandığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla jel filtrasyon kolonundan geçirilen melastan melanoidinlerin fermentasyon öncesi uzaklaştırılmış olabileceği düşünülmektedir.

4.4. Kesikli Sistemde Serbest Hücrelerle Levan Üretimi

Sentetik besiyerinde kesikli sistemde serbest hücrelerle levan üretim kinetiği Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2’de görülebilir. Şılbır vd. (2014) tarafından *Z.mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile levan üretiminde optimum sakkaroz konsantrasyonu olarak belirtilen %30 konsantrasyonda üretim gerçekleştirilmiştir (pH = 5,0).



Şekil 4.5 Serbest hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği.

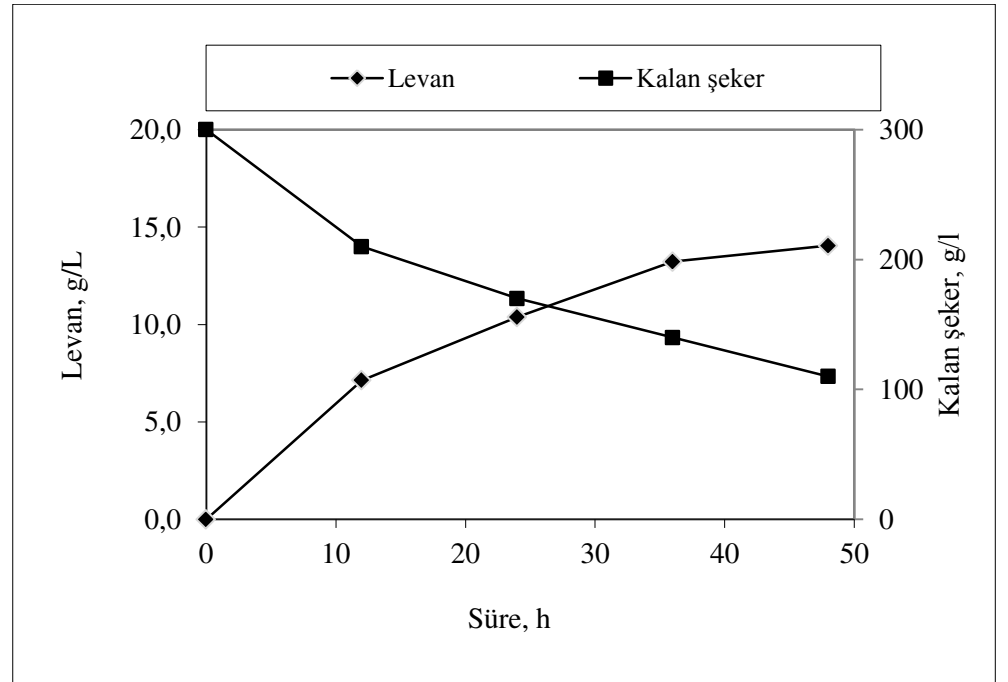
Çizelge 4.2 Serbest hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği. Standart sapma değerleri levan konsantrasyonu için 0,04 ila 0,49 arasında, biyokütle konsantrasyonu için 0,01 ila 0,04 arasında, kalan şeker konsantrasyonu için 2.1 ila 3.9 arasında değişmektedir.

Süre (h)	Levan (g/L)	Biyokütle (g/L)	Kalan şeker (g/L)	Hacimsel verimlilik (g/L/h)	Dönüşüm verimi (%)	Efektif verim (%)
0	0	0	300	0	0	0
12	9.53	0.32	111	0.79	5.04	3.17
24	16.5	0.50	86.5	0.69	7.73	5.50
36	20.06	0.54	69.6	0.56	8.71	6.68
48	21.16	0.42	78.6	0.44	9.56	7.05

Şılbrı vd. (2014), kesikli sistemde serbest *Z.mobilis* hücreleri ile levan üretiminde maksimum levan konsantrasyonuna 42.3 saatlik fermentasyon sonucunda ulaşıldığını bildirmiştir. Yaptığımız denemelerde 42. saatte de ortamdan örnek alınmış ve levan konsantrasyonu 22.70 g/L olarak belirlenmiştir. 42. saatten sonra ortamdaki levan konsantrasyonu düşmeye başlamıştır.

4.5 Kesikli Sistemde İmmobilize Hücrelerle Levan Üretim Kinetiği

Sentetik besiyerinde Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.6 İmmobilize hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği.

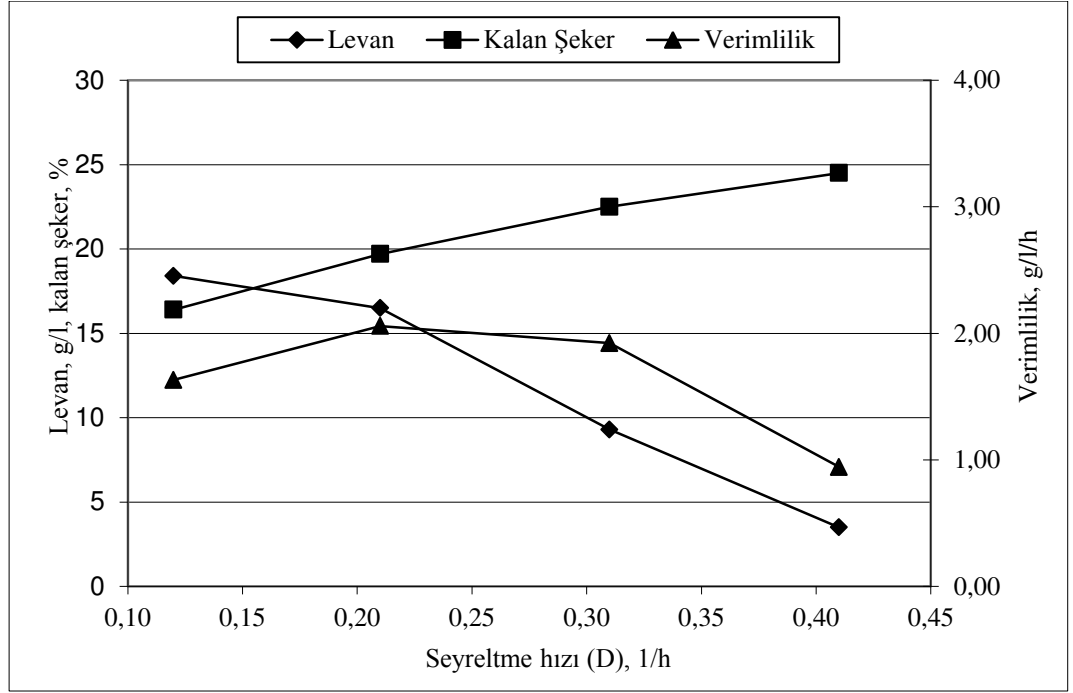
Çizelge 4.3 İmmobilize hücrelerle kesikli sistemde levan üretim kinetiği. Standart sapma değerleri levan konsantrasyonu için 0.03 ila 0.5 arasında, kalan şeker konsantrasyonu için 0.76 ila 2.4 arasında değişmektedir.

Süre (h)	Levan (g/L)	Kalan şeker (g/L)	Hacimsel verimlilik (g/L/h)	Dönüşüm verimi (%)	Efektif verim (%)
0	0	300	0	0	0
12	7.14	210	0.60	7.93	2.38
24	10.38	170	0.43	7.98	3.46
36	13.23	140	0.37	8.26	4.41
48	14.05	110	0.29	7.39	4.68

Kesikli sistemde immobilize hücrelerle ulaşılan maksimum levan konsantrasyonu, serbest hücrelerle ulaşılan levan konsantrasyonuna kıyasla düşüktür. Bunun, kalan şeker konsantrasyonları da göz önüne alındığında, hücreleri hapseden Ca-aljinat boncukların substrat difüzyonunu kısıtlamasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Fermentasyon sonucunda Ca-aljinat boncukların önemli bir kısmının çatlayıp dağıldığı gözlenmiştir. Buna, üretilen levanın ve hücrelerin açığa çıkardığı yüksek miktardaki CO₂'in neden olduğu düşünülmektedir. Bekers et al. (2001) da, *Z.mobilis* ile hem levan hem de etanol üretiminde serbest hücrelerle immobilize hücrelere kıyasla daha yüksek levan ve etanol konsantrasyonlarına ulaşılabilirdiğini belirtmiştir.

4.6 Sürekli Sistemde Serbest Hücrelerle Levan Üretim Kinetiği

Sürekli sistemde dört farklı seyreltme hızında (0.12, 0.21, 0.31 ve 0.41 h⁻¹) levan üretim kinetiği Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. Sürekli sistem başlatılmadan önce hücreler üretim ortamında 12 saat inkübe edilmiş ve sürekli sistem başlatıldıktan sonra her 3 kalış süresinin ardından sistemin dengeye geldiği varsayılarak diğer seyreltme hızına geçilmiştir.



Şekil 4.7 Serbest hücrelerle sürekli sistemde levan üretim kinetiği.

Çizelge 4.4 Sürekli sistemde serbest hücrelerle levan üretim kinetiği. Standart sapma değerleri levan konsantrasyonu için 0.02 ila 0.3 arasında, kalan şeker konsantrasyonu için 0.02 ila 0.24 arasında değişmektedir.

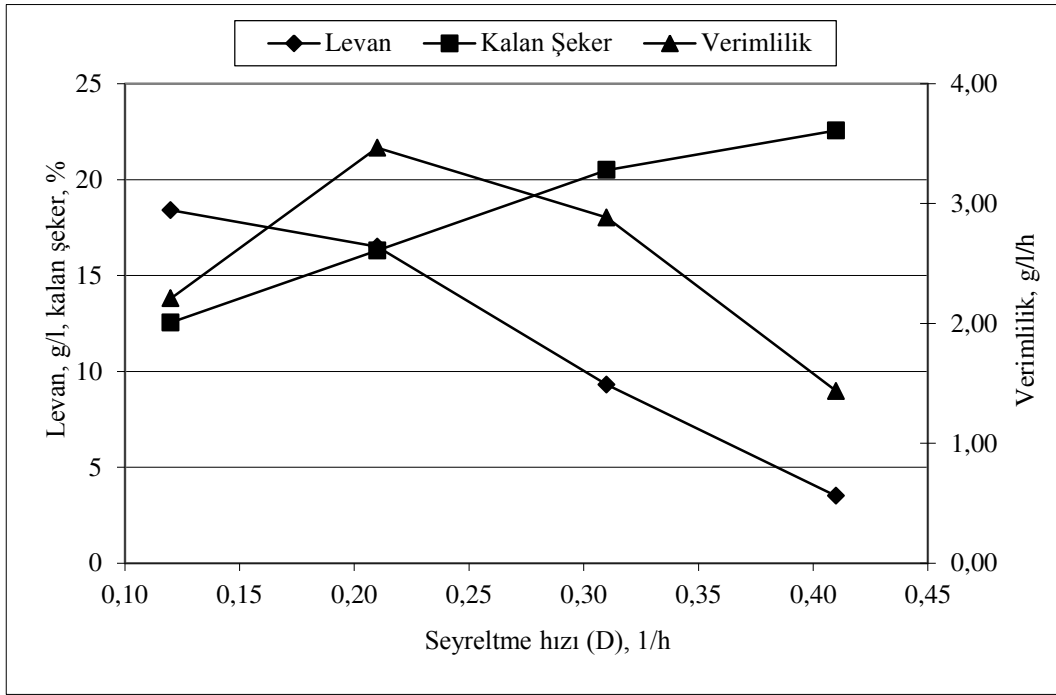
Seyreltme hızı (h ⁻¹)	Levan (g/L)	Kalan şeker (g/L)	Verimlilik (g/L/h)	Dönüşüm verimi (%)	Efektif verim (%)
0.12	13.6	16.4	1.632	4.79	4.53
0.21	9.8	19.7	2.058	3.49	3.27
0.31	6.2	22.5	1.922	2.23	2.07
0.41	2.3	24.5	0.943	0.83	0.77

Sürekli sistemde serbest hücrelerle yapılan üretimde en yüksek levan konsantrasyonuna (13.6 g/L) 0.12 h⁻¹ seyreltme hızında ulaşılırken maksimum hacimsel verimlilik değerine ise (2.058 g/L/h) 0.21 h⁻¹ seyreltme hızında ulaşılmıştır; ancak bu seyreltme hızında kullanılmadan atılan şeker miktarının daha yüksek olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca sürekli sistemde serbest hücrelerle yapılan üretimlerde yıkanma etkisine bağlı olarak hücre kaybı

gerçekleşmiş ve ortamdaki biyokütle konsantrasyonunda dalgalanmalar gözlenmiştir (veriler gösterilmemiştir).

4.7 Sürekli Sistemde İmmobilize Hücrelerle Levan Üretim Kinetiği

Sürekli sistemde Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerle yapılan levan üretiminin kinetiği Şekil 4.8 ve Çizelge 4.5'te görülebilir.



Şekil 4.8 İmmobilize hücrelerle sürekli sistemde levan üretim kinetiği.

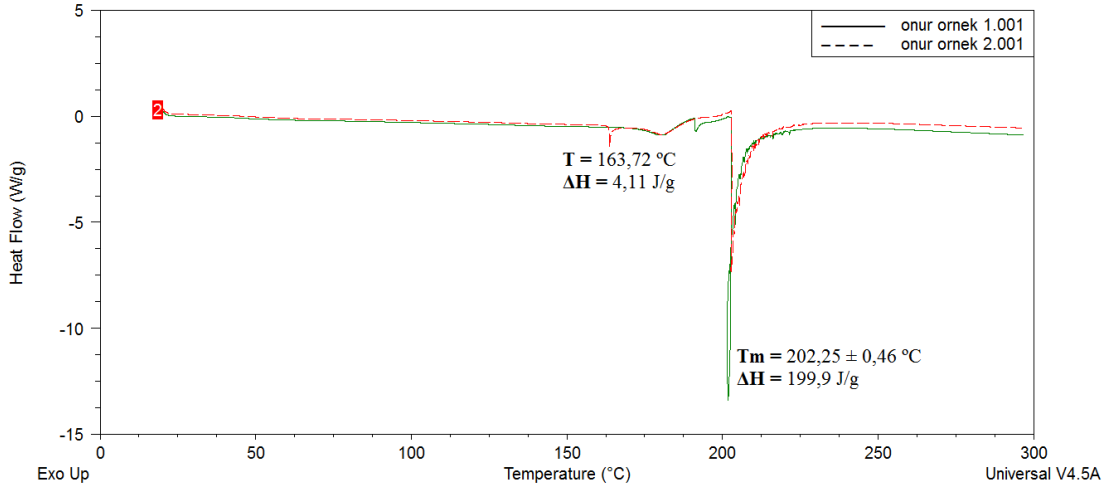
Çizelge 4.5 İmmobilize hücrelerle sürekli sistemde levan üretim kinetiği. Standart sapma değerleri levan konsantrasyonu için 0.01 ila 0.2 arasında, kalan şeker konsantrasyonu için 0.03 ila 0.41 arasında değişmektedir.

Seyreltme hızı (h^{-1})	Levan (g/L)	Kalan şeker (g/L)	Verimlilik (g/L/h)	Dönüşüm verimi (%)	Efektif verim (%)
0.12	18.4	12.54	2.208	6.40	6.13
0.21	16.5	16.30	3.465	5.82	5.50
0.31	9.3	20.50	2.883	3.33	3.10
0.41	3.5	24.56	1.435	1.27	1.17

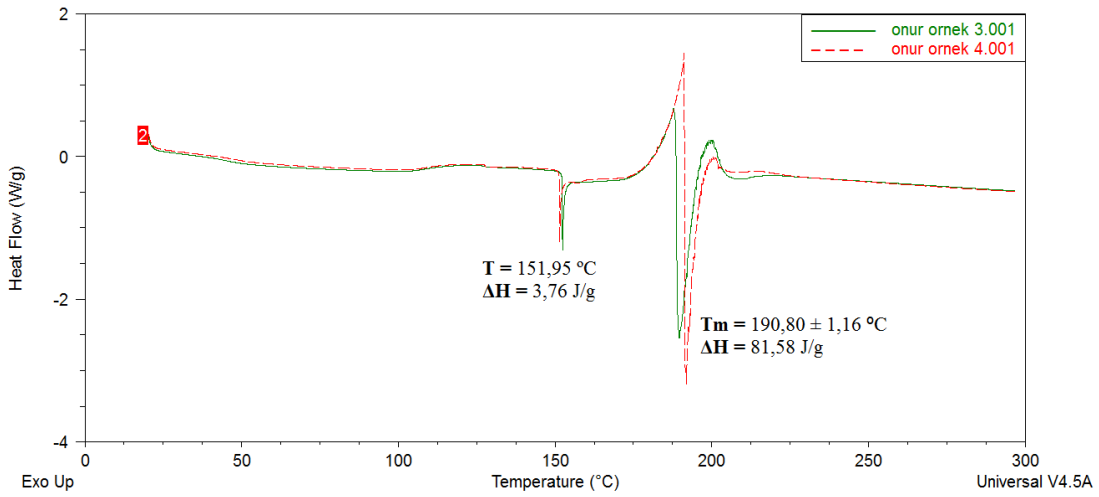
Sürekli sistemde immobilize hücrelerle yapılan levan üretiminde, serbest hücrelerle yapılan üretime kıyasla daha yüksek levan konsantrasyonuna (0.12 h^{-1} seyreltme hızında 18.4 g/L) ve hacimsel verimlilik değerine (0.21 h^{-1} seyreltme hızında 3.465 g/L/h) ulaşıldığı gözlenmiştir. Ca-aljinat boncukların hem fakültatif anaerobik bir bakteri olan *Z.mobilis*'i oksijenin olumsuz etkisinden koruduğu hem de yıkanma etkisi sonucu meydana gelen hücre kaybını önlediği düşünülmektedir. Yine de fermentasyonun sonunda Ca-aljinat boncukların önemli bir kısmının çatlayıp dağılmış olduğu görülmüştür. Aljinat jellerin, ortamda bulunabilecek fosfat ve laktat gibi katyon şelatlama ajanlarına karşı duyarlılıkları sebebiyle stabilitelerini kaybedebilecekleri bilinmektedir. Fermentasyon sırasında jel yapısının dağılmasını önlemek amacıyla boncukların polietilenimin, glutaraldehit, hekzametilendiamin ile muamele edilmesi ya da poli-L-lisin veya kitozan ile kaplanması önerilebilir (Göksungur vd., 2005).

4.8 Fark Tarama Kalorimetresi

Mikrobiyal polisakkaritlerin ısı özelliklerinin belirlenmesi, bu polisakkaritler ile film oluşturulması ve yeni kompozit materyaller geliştirilmesi gibi uygulama alanları açısından büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple denemelerimizde ticari levan ve sentetik ortamda üretilmiş levanın erime sıcaklıklarının ve entalpilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amacıyla Fark Tarama Kalorimetresi (DSC) kullanılmıştır. Alınan sonuçlarda her iki levan örneğinde de birbirine yakın iki farklı noktada erime pikleri gözlenmiştir. Bunun, levanda bağlı kalmış suyun yarattığı interferanstan kaynaklanabileceği (Chen et al., 2014) ya da levan örneklerinde farklı molekül ağırlıklarında iki fraksiyonun varlığına işaret ettiği düşünülmektedir. Ticari levan örneklerinin erime noktası $202,25 \pm 0,46 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve erime entalpisi (ΔH) $199,9 \text{ J/g}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Denemelerimizde sentetik ortamda üretilip saflaştırılmış levan örnekleri için ise erime sıcaklığının $190,80 \pm 1,16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve erime entalpisinin $81,58 \text{ J/g}$ olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). İki örnek arasındaki erime noktası ve erime entalpisi farkları, ürettiğimiz levanın ticari levan örneğine kıyasla daha düşük bir molekül ağırlığına sahip olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.9 Ticari levan örneğinin DSC termogramı.



Şekil 4.10 Sentetik ortamda üretilmiş levan örneğinin DSC termogramı.

Barone and Medynets (2007), *Bacillus* sp. kaynaklı levanın camsı geçiş sıcaklığının yaklaşık 139 °C olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada levanın geleneksel yoğurma ve ekstrüzyon teknikleri ile başarılı bir şekilde ısı işleme tabi tutulabileceği gösterilmiştir. Ortama eklenen gliserol, levanın camsı geçiş sıcaklığını düşürerek daha düşük sıcaklıklarda istenen ısı ve reolojik niteliklere ulaşılmasını sağlamıştır.

Wang et al. (2008), *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 ile üretilen ekzopolisakkaritin ısı özelliklerini ksantan ve guar gam ile karşılaştırmıştır. Yapılan DSC analizi sonucunda ZW3 ekzopolisakkaritin erime noktası 97,38 °C ve erime entalpisi 249,7 J/g olarak belirlenirken ksantan gam için bu değerlerin 153,4 °C ve 93,2 J/g; guar gam için ise 490,1 °C ve 192,9 J/g olduğu görülmüştür. Bu veriler, farklı mikrobiyal polisakkaritlerin birbirlerinden çok farklı ısı özelliklere sahip olabileceklerini göstermektedir.

Chen et al. (2014), *Bacillus* sp. kaynaklı ticari levanı DSC ile incelemiş ve levanın erime noktasını 197,0 °C olarak belirlemiştir. Levana %5 (w/w) montmorillonite eklenerek oluşturulan nanokompozitin erime noktasının ise 208,4 °C olduğu görülmüştür. Bu çalışma, levanın ısı stabilitesinin ortama eklenecek bazı materyaller ile artırılabilmesine işaret etmektedir.

Wang et al. (2015), *Lactobacillus plantarum* YW11 ile üretilen ekzopolisakkaritin ısı özelliklerini DSC ile analiz etmiş ve erime noktasının 143,6 °C, erime entalpisinin ise 217,8 J/g olduğunu göstermiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, melaslı fermentasyon ortamında ve sentetik besiyerinde serbest ve Ca-aljinatta immobilize edilmiş *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 hücreleriyle kesikli ve sürekli sistemlerde levan üretimi incelenmiş ve üretilen levanın ısı özellikleri Fark Tarama Kalorimetresi ile değerlendirilmiştir.

İlk aşamada, şeker pancarı melasından serbest hücrelerle kesikli sistemde levan üretimi için farklı melas işleme tekniklerinin levan üretimine etkisi incelenmiş ve en yüksek levan konsantrasyonuna santrifügal klarifikasyon ile işlenmiş melaslı fermentasyon ortamında ulaşılmıştır (17.13 g/L, %25 başlangıç sakkaroz konsantrasyonu). Santrifügal klarifikasyon, diğer melas işleme tekniklerinin aksine ısı bir işlem içermemektedir. Dolayısıyla sıcaklık etkisiyle sakkaroz inversiyonu sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarı minimum düzeyde kalmaktadır. Ortamda bulunan glikozun levansukraz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği ve bakteriyi etanol üretimine yönlendirdiği bilinmektedir. Bu sonuç; ucuz ve temini kolay bir yan ürün olan melasın, sadece santrifügasyon ve pH ayarı aşamalarını içeren basit bir ön işlemle etkili bir şekilde levan üretimi için kullanılabileceğini göstermiştir.

Melastan üretilen levanın fermentasyon ortamından ayrılması sırasında çamursu bir yapının da levan ile birlikte çöktüğü ve levan konsantrasyonunun belirlenmesinden önce yapılan asit hidrolizi sırasında indirgen şeker açığa çıkartarak indirgen şeker analizinde interferansa sebep olduğu fark edilmiştir. Çöken çamursu madde miktarının kullanılan melas miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı ve %30 sakkaroz içeren melas konsantrasyonunun üzerinde, indirgen şeker konsantrasyonunda ani bir yükselmeye sebep olduğu gözlenmiştir. Çökeltinin, şeker üretiminde Maillard reaksiyoları sonucunda açığa çıkan melanoidinlerden oluştuğu düşünülmektedir; ancak melasın kompleks yapısı göz önüne alındığında bu konuda kesin bir yorum yapılabilmesi için ileriki çalışmalarda çökeltinin kimyasal olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Etanol presipitasyonu sırasında çökmeleri ve diyaliz ile ortamdan uzaklaştırılma denemelerinin başarısız olması, kullandığımız melastaki melanoidinlerin

polimerik yapıda olduklarına işaret etmektedir. Bu çalışma, bilindiği kadarıyla biyoteknolojik yöntemlerle melastan mikrobiyal polisakkarit üretiminde melanoidinlerin yol açtığı sorunlara değinen ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Melanoidinlerin ortamdan uzaklaştırılması için jel filtrasyon kolonlarının kullanılması önerilebilir.

Çalışmanın ikinci aşamasında sentetik ortamda kesikli ve sürekli fermentasyon sistemlerinde serbest ve Ca-aljinatta immobilize edilmiş hücrelerin levan üretim performansları değerlendirilmiştir. Kesikli fermentasyonda serbest hücrelerle immobilize hücrelere kıyasla daha yüksek konsantrasyonda (21.16 g/L levana karşılık 14.05 g/L levana) levana elde edilebildiği görülmüştür. Bunun muhtemel sebebinin, Ca-aljinat boncukların substrat difüzyonunu sınırlayarak hücreye birim zamanda ulaşan substrat miktarını düşürmeleri olduğu düşünülmüştür. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde 740 ml fermentasyon ortamıyla sürekli sistemde yapılan üretimde ise tersi bir durum gözlenmiştir; 0.12 h⁻¹ seyreltme hızında serbest hücrelerle ulaşılan maksimum levana konsantrasyonu 13.06 g/L iken immobilize hücrelerde 18.40 g/L levana konsantrasyonuna erişilmiştir. *Z.mobilis* fakültatif anaerobik bir mikroorganizma olduğundan, Ca-aljinat boncukların sürekli sistemde karıştırma sırasında hücreleri artan çözünmüş oksijen konsantrasyonunun inhibitör etkisinden koruduğu düşünülmektedir. Sürekli sistemde hem serbest hücrelerle hem de immobilize hücrelerle maksimum verimlilik değerlerine 0.21 h⁻¹ seyreltme hızında ulaşılmıştır. Serbest hücrelerle yapılan üretimde maksimum verimlilik 2.058 g/L/h, immobilize hücrelerle yapılan üretimde ise 3.465 g/L/h olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, immobilize *Z.mobilis* hücreleri ile karıştırmalı tank tipi bir biyoreaktörde etkin bir şekilde levana üretilebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca sürekli sistem için imal edilip kullanılan laboratuvar ölçeğindeki fermentasyon kabının ölçek büyütme çalışmaları için iyi bir referans oluşturacağı düşünülmektedir.

Sentetik ortamda üretilen levana ile ticari levananın ısı özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla Fark Tarama Kalorimetresi kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda ticari levananın erime noktasının 202,25 °C ve erime entalpisinin 199,90 J/g olduğu bulunmuştur. Sentetik ortamda ürettiğimiz levananın ise erime noktasının 190,80 °C ve erime entalpisinin 81,58 J/g olduğu

gözlenmiştir. Bu sonuçların, ürettiğimiz levanın ticari levana kıyasla daha düşük bir molekül ağırlığına sahip olduğunu gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca her iki levan örneğinde de tespit edilen erime noktasından daha düşük sıcaklıkta ve daha düşük erime entalpisine sahip birer pik gözlenmiştir. Bunun, *Z.mobilis*'in iki farklı molekül ağırlığına sahip iki levan fraksiyonu ürettiğine işaret ettiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anonymous, 2012a**, <http://bio-x.ru/articles/poluchenie-etilalkola-kak-topлива> (Erişim tarihi: 2 Temmuz 2015).
- Anonymous, 2012b**, <http://www.indiatalkies.com/2010/12/bioengineers-develop-bacterial-strain-hike-ethanol-biofuel-production.html> (Erişim tarihi: 2 Temmuz 2015).
- Ahmed, K. B. A., Kalla, D., Uppuluri, K. B., & Anbazhagan, V.** 2014. Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. *Carbohydrate Polymers*, 112, 539–545.
- Ananthalakshmy, V. K., & Gunasekaran, P.** 2011. Optimization of Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Microbial Technology*.
- 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.
- Barone, J.R., Medynets, M.**, 2007. Thermally processed Levan polymers. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 554–561.
- Basit, A., Ibekwe, V.**, 2007. Colonic drug delivery formulation. Google Patents.
- Bekers, M., Laukevics, J., Karsakevich, a., Ventina, E., Kaminska, E., Upite, D., ... Scherbaka, R.** 2001. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, 36(10), 979–986.
- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, a., Viesturs, U., ... Danilevics, a.** 2002. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38(5), 701–706.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, a., & Linde, R.** 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1535–1539.
- Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoport, A., & Zikmanis, P.** 2000. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 147–150.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Belghith, K. S., Dahech, I., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H., & Belghith, H.**, 2012. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial Levan in cholesterol-fed rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(4), 1070–1074.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura, N.** 2002. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 99(2), 111–119.
- Blackbeard, J. R., & Doelle, H. W.** 1983. The effect of glucose on the sucrose hydrolysing activity of *Zymomonas mobilis*. *European Journal Of Applied Microbiology*, 17, 261–263.
- Borsari, R. R. J., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., & Silva, R. S. D. S. F. Da.** 2006. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 604–609.
- Bringer, S., Finn, R. K., & Sahm, H.** 1984. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. *Archives of Microbiology*, 139, 376–381.
- Cammerer, B., Jalyschkov, V., & Kroh, L. W.** 2002. Carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *International Congress Series*, 1245, 269–273.
- Cämmerer, B., & Kroh, L. W.** 1995. Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chemistry*, 53(1), 55–59.
- Chen, X., Gao, H., Ploehn, H.J.** 2014. Montmorillonite–levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 101, 565–573.
- Chung, B. H., Kim, W. K., Song, K., & Kim, C.** 1997. Novel polyethylene glycol / levan aqueous two-phase system for protein partitioning. *Biotechnology*, 11(5), 327–329.
- Coca, M., García, M. T., González, G., Peña, M., & García, J. a.** 2004. Study of coloured components formed in sugar beet processing. *Food Chemistry*, 86(3), 421–433.
- Crittenden, R. G., & Doelle, H. W.** 1994. Identification and Characterization of the Extracellular Sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM-2716 (ATCC-39676). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3), 302–308.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H., & Mejdoub, H.** 2011. Antidiabetic activity of Levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4), 742–746.
- Damon, C.E, Pettitt, B.C. Jr.,** 1980. High performance liquid chromatographic determination of fructose, glucose, and sucrose in molasses. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 63(3):476-480.
- De Graaf, A. A.** 2000. Metabolic Analysis of *Zymomonas mobilis*. In K. Schügerl (Ed.), *Bioreaction Engineering* (pp. 478–505). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- De Oliveira, M. R., da Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B., & Celligoi, M. A. P. C.** 2007. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2), 177–183.
- Doelle, H., & Greenfield, P.** 1985. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 411–415.
- DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., ... Reis, M. a M.** 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*, 100(2), 859–865.
- Göksungur, Y.,** 1998. Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 155 s.
- Göksungur vd.** 2004. Production of Pullulan From Beet Molasses and Synthetic Medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology*, 28, 23–30.
- Göksungur, Y., Gündüz, M., Harsa, Ş.** 2005. Optimization of lactic acid production from whey by *L. casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 1282–1290.
- Ghose, T. K.** 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, 59(5), 695–702.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Han, Y. W., & Watson, M. a.** 1992. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3-4), 257–260.
- Hernández, L., Arrieta, J., Betancourt, L., Falcón, V., Madrazo, J., Coego, A., & Menéndez, C.** 1999. Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current Microbiology*, 39(3), 146–152.
- Huang, M. Y., Lee, C. F., Ho, S. T., Lin, K. J., & Pan, C. L.** 2013. High-yield levan produced by *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 in high-sucrose medium and its prebiotic effect. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(3), 1585–1599.
- Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V., & Annapure, U. S.** 2012. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1045–1053.
- Kazak Sarılmışer, H., Ateş, O., Özdemir, G., Arga, K. Y., & Toksoy Öner, E.** 2015. Effective stimulating factors for microbial levan production by *Halomonas smyrnensis* AAD6^T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(4), 455–463.
- Kim, J.-S., & Lee, Y.-S.** 2009. Antioxidant Activity of Melanoidins from Different Sugar/Amino Acid Model Systems: Influence of the Enantiomer Type. *Food Science and Technology International*, 15(3), 291–297.
- 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(6), 1729–1740.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., & Zeng, X.** 2012. Preparation, antioxidant and antitumor activities *in vitro* of different derivatives of Levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3), 767–772.
- Lorenzetti, M. F. S., Moro, M. R., & García-Cruz, C. H.** 2015. Alginate/PVA Beads for Levan Production by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Food Process Engineering*, 38(1), 31–36.
- Lyness, E. W., & Doelle, H. W.** 1983. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 5(5), 345–350.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E.J., Arrieta, J.G., Hernández, L., Davies, G.J., 2005.** Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *The Biochemical Journal*, 390: 19-27.
- Mathé, G., Amiel, J., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Cattan, A., Schlumberger, J.R., et al., 1969.** Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 293(7597), 697–699.
- Melo, I. R., Pimentel, M. F., Lopes, C. E., & Calazans, G. M. T. 2007.** Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 45–51.
- Muro, A. C., Rodr, E., Abate, C. M., & Siñeriz, F. 2000.** Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. *Biotechnology Letters*, (22), 1639–1642.
- Nakata, H., Tamura, M., Shintani, T., & Gomi, K. 2014.** Evaluation of baker's yeast strains exhibiting significant growth on Japanese beet molasses and compound analysis of the molasses types. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 715–719.
- Onyango, M., Kittinya, J., Hadebe, N., Ojijo, V., & Ochieng, A. 2011.** Sorption of melanoidin onto surfactant modified zeolite. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 17(4), 385–395.
- Pentjuss, A., Odzina, I., Kostromins, A., Fell, D. A., Stalidzans, E., & Kalnenieks, U. 2013.** Biotechnological potential of respiring *Zymomonas mobilis*: A stoichiometric analysis of its central metabolism. *Journal of Biotechnology*, 165(1), 1–10.
- Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., & Nicolaus, B. 2009.** High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 651–657.
- Pollock, C. J., & Cairns, A. J. 1991.** Fructan metabolism in grasses and cereals, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42,77–101.
- Rairakhwada, D., Pal, A., Bhathena, Z., Sahu, N., Jha, A., Mukherjee, S. 2007.** Dietary microbial Levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(5),477–486.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajakyla, E., & Paloposki, M.** 1983. Determination of sugars (and betaine) in molasses by high-performance liquid chromatography: Comparison of the results with those obtained by the classical Lane-Eynon method. *Journal of Chromatography*, 282, 595–602.
- Robertson, T., Papadimitriou, J., Walters, M., Wolman, M.** 1977. Effects of exposure of murine peritoneal exudate and resident macrophages to high molecular Levan: A morphological study. *The Journal of Pathology*, 123(3), 157–164.
- Roukas, T.** 1998. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochemistry*, 33(8), 805–810.
- Santos, V. A. Q., Bianchi, V. L. Del, & Garcia-Cruz, C. H.** 2014. Effect of initial pH in levan production by *Zymomonas mobilis* immobilized in sodium alginate *Acta Scientiarum. Technology*, 36(2), 349.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., & Hsieh, C. Y.** 2005. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8211–8215.
- Şılbr, S.**, 2013. *Zymomonas mobilis* ile levan üretimi ve üretim parametrelerinin optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 64 s.
- Şılbr, S., Dağbağlı, S., Yeğin, S., Baysal, T., & Göksungur, Y.** 2014. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate Polymers*, 99, 454–461.
- Sims, I. M., Frese, S. a, Walter, J., Loach, D., Wilson, M., Appleyard, K., ... Tannock, G. W.** 2011. Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23. *The ISME Journal*, 5(7), 1115–1124.
- Sprenger, G. A.** 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes, 145, 301–307.
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B.** 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102–114.
- Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C. H. S. S., Harish B.S., Janaki Ramaiah, M., & Uppuluri, K. B.** 2015. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate Polymers*, 123, 8–16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ullrich, M.** 2009. Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press.
- Vandamme, E., De Baets, S., Steinbüchel, A.** (eds), 2002. Biopolymers Vol. 5: Polysaccharides I, Vol. 5 Wiley & Sons, p. 532.
- Viikari, L.** 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 252–255.
- Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R.** 2011. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573–584.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., & Yang, Z.** 2015. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16–25.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., Song, S.** 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 283–288.
- Wu, F. C., Chou, S. Z., & Shih, I. L.** 2013. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 846–853.
- Xu, W., Liang, L., & Zhu, M.** 2014. Determination of Sugars in Molasses by HPLC Following Solid-Phase Extraction. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 547–557.
- Yaylayan, V. a., & Kaminsky, E.** 1998. Isolation and structural analysis of Maillard polymers: Caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system. *Food Chemistry*, 63(1), 25–31.
- Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M., & Jiang, B.** 2014. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 975–981.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler:

Adı soyadı: Onur Kırtel
Doğum yeri: Edirne
Doğum tarihi: 15.03.1990
Unvan: Yüksek lisans öğrencisi
Adres: Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği
Bölümü

Eğitim bilgileri:

Yüksek lisans (2013-halen): Ege Üniversitesi, Gıda Müh. A.B.D (İzmir)
Lisans (2008-2013): Ege Üniversitesi, Gıda Müh. Bölümü
Lise: (2004-2008): Lüleburgaz Anadolu Lisesi (Kırklareli)

Yabancı diller:

İngilizce (Çok iyi) (2013 Bahar YDS Puanı: 90.00)
Japonca (Başlangıç)

E-mail:

kirtel.onur@gmail.com