



**MİKROBİYAL YOLLA SİTRİK ASİT, ETİL ALKOL,
POLİMER ve PİGMENT ÜRETİMİNDE BAKLAVA
ATIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2020
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MİKROBİYAL YOLLA SİTRİK ASİT, ETİL ALKOL, POLİMER ve
PİGMENT ÜRETİMİNDE BAKLAVA ATIKLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2020**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ ONAY FORMU



**MİKROBİYAL YOLLA SİTRİK ASİT, ETİL ALKOL, POLİMER ve PİGMENT
ÜRETİMİNDE BAKLAVA ATIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Mehmet Akif ÖMEROĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 02/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.2/.2)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Üye : Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

Üye : Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **09.01./2020** tarih ve **.02..../...40.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYAL YOLLA SİTRİK ASİT, ETİL ALKOL, POLİSAKKARİT ve PİGMENT ÜRETİMİNDE BAKLAVA ATIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Mikroorganizmalar organik asitler, enzimler, biyoyakıtlar, rekombinant proteinler, pigmentler ve polisakkaritler dahil endüstriyel, biyoteknolojik ve tıbbi öneme sahip olan bir çok maddenin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyal ürünlerin üretiminde ise besiyeri bileşimine giren azot ve karbon kaynaklarının yüksek maliyeti büyük problem olarak kabul edilmektedir. Besiyeri maliyetininin azaltılması için, melas, peynir altı suyu, narenciye atıkları, meyve kabukları ve çekirdekleri gibi tarımsal atıklar ya da bunların yan ürünleri besiyerinde substrat olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ülkemizdeki baklava işletmelerinin bir atığı olarak ortaya çıkan şerbetin mikrobiyal fermantasyon çalışmalarında substrat olarak kullanımına yönelik literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden mevcut çalışmada, atık şerbetin sitrik asit, levan, pigment ve etil alkol üretiminde substrat olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır. Atık şerbetin şeker ve protein içerikleri sırasıyla 870 g/L ve 3,4 g/L olarak belirlenmiştir. Sitrik asit üretimi için *Aspergillus niger*, etil alkol üretimi için *Saccharomyces cerevisiae*, levan üretimi için ise *Zymomonas mobilis* ve pigment üretimi için *Monascus purpureus* test mikroorganizmaları olarak seçilmiştir. Sitrik asit ve levan üretimi için en uygun şerbet konsantrasyonu 200 mL/L olarak belirlenmiştir. Etil alkol üretimi için en uygun şerbet konsantrasyonu 250 mL/L, pigment üretimi için ise 30 mL/L olarak tespit edilmiştir. Optimal şerbet konsantrasyonunda sitrik asit, etil alkol ve levan verimleri sırasıyla; 0,22 g/g, 0,47 g/g ve 0,16 g/g olarak hesaplanmıştır. Optimal şerbet konsantrasyonunda üretilen esas *Monascus* pigmentinin, kırmızı olduğu belirlenmiştir.

2020, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sitrik asit, etil alkol, levan, pigment, şerbet

ABSTRACT

Master Thesis

UTILISATION of BAKLAVA WASTES IN THE MICROBIAL PRODUCTION of CITRIC ACID, ETHYL ALCOHOL, POLYSACCHARIDE and PIGMENT

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

Atatürk University
Faculty of Science Graduate School
Department of Molecular Biology and Genetic
Microbiology Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Microorganisms are widely used in the production of many substances which would have industrial, biotechnological and medical importance, including organic acids, enzymes, biofuels, recombinant proteins, pigments and polysaccharides. In the production of microbial substances, the high cost of nitrogen and carbon sources entering the medium composition is considered as a major problem. In order to reduce the cost of the medium, agricultural wastes or by-products such as molasses, whey, citrus wastes, fruit peels and seeds are utilised as fermentation substrate. However, there is no study in the literature on the use as a substrate in microbial fermentation studies of sherbet, which would be regarded as a waste of baklava industry in our country. Therefore, in the present study, the potential usage of waste sherbet as a substrate for the microbial production of citric acid, ethyl alcohol, levan and pigment was investigated. Sugar and protein contents of waste sherbet were determined as 870 g/L and 3.4 g/L, respectively. *Aspergillus niger* for citric acid production, *Saccharomyces cerevisiae* for ethyl alcohol production, *Zymomonas mobilis* for levan production and *Monascus purpureus* for pigment production were selected as test microorganisms. The most favorable sherbet concentration for citric acid and levan production was determined as 200 mL/L while the optimal sherbet concentration for ethyl alcohol and pigment production was 250 ml/L and 30 ml/L, respectively. The yields of citric acid, ethyl alcohol and levan were calculated as 0.22 g/g, 0.47 g/g and 0.16 g/g at the optimum sherbet concentration, respectively. The main *Monascus* pigment, which was produced at optimal sherbet concentration, was determined as red pigment.

2020, 73 pages

Keywords: Citric acid, ethyl alcohol, levan, pigment, sherbet

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu alıŐma, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalışmalarında her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve deneysel çalışmalarında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaŐan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Laboratuvar alıŐmaları sırasında ve tez çalıŐmasının hazırlanması aşamasında desteklerinden ötürü Sayın ArŐ. Gör. Mustafa Özkan BALTACI, Sayın ArŐ. Gör. Elanur TUYSUZ ve Tuğba ORAK'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her konuda bana yardımcı olan, sabır gösteren ve hiçbir zaman destek ve ilgilerini esirgemeyen aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Mehmet Akif ÖMEROğLU

Ocak, 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Laboratuvar gereçleri	30
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	31
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Şerbetin kimyasal içeriğinin belirlenmesi	33
3.2.1.a. Toplam şeker analizi.....	33
3.2.1.b. Toplam protein analizi.....	33
3.2.1.c. Element analizi	34
3.2.2. Sitrik asit sentezi	34
3.2.2.a. Sentez işleminde kullanılacak mikroorganizmanın aktifleştirilmesi.....	34
3.2.2.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması	35
3.2.2.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon	35
3.2.2.d. Sitrik asit tayini ve kuru mikroorganizma ağırlığı.....	36
3.2.3. Biyoetanol fermantasyonu.....	37
3.2.3.a. Fermantasyon işleminde kullanılacak mikroorganizmanın aktifleştirilmesi.....	37
3.2.3.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması	37
3.2.3.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon	38
3.2.3.d. Etanol tayini ve kuru maya ağırlığının belirlenmesi	38

3.2.4. Polisakkarit sentezi.....	39
3.2.4.a. Sentez işleminde kullanılacak mikroorganizmanın aktifleştirilmesi.....	39
3.2.4.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması	40
3.2.4.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon	40
3.2.4.d. Levan tayini ve kuru bakteri ağırlığının belirlenmesi	41
3.2.5. Pigment üretimi	41
3.2.5.a. Pigment üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın aktifleştirilmesi	41
3.2.5.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması	42
3.2.5.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon	42
3.2.5.d. Pigment analizi ve kuru mikroorganizma ağırlığının belirlenmesi	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
4.1. Şerbetin kimyasal içeriği	43
4.2. <i>Aspergillus niger</i> ile Fungal Biyomas ve Sitrik Asit Üretiminde Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı.....	43
4.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ile Fungal Biyomas ve Etil Alkol Üretimi İçin Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı	45
4.4. <i>Zymomonas mobilis</i> ile Hücre Biyoması ve Levan Üretimi İçin Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı.....	48
4.5. <i>Monascus purpureus</i> ile Hücre Biyoması ve Pigment Üretimi İçin Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı.....	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Derece santigrat
dk	Dakika
EA	Etanol
EPS	Ekzopolisakkarit
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
gr	Gram
HB	Hücre Biyoması
ICP-MS	İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma-kütle spektrometresi
kDa	Kilodalton
kob	Koloni oluşturan birim
KP	Kırmızı pigment
L	Litre ve levan
M	Molar
mL	Mililitre
nm	nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PDA	Patates dekstroz agar
ppb	Milyardaki konsantrasyon
Rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SA	Sitrik asit
SP	Sarı pigment
TP	Turuncu pigment
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sitrik asidin moleküler yapısı	2
Şekil 1.2. Sitrik Asit Döngüsü	3
Şekil 1.3. Etanol üretimi sırasında bazı faktörlerin <i>Saccharomyces cerevisiae</i> üzerinde etkisi.....	10
Şekil 1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da etanol fermantasyon reaksiyonu	11
Şekil 3.1. PDA besiyerindeki <i>Aspergillus niger</i> 'in (MT-4) görüntüsü.....	35
Şekil 3.2. PDA besiyerindeki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'ın (ATCC 4126) petri görüntüsü	37
Şekil 3.3. Sükroz kaynaklı besiyerindeki <i>Zymomonas mobilis</i> 'in (DSM 12496) petri görüntüsü	40
Şekil 3.4. PDA besiyerindeki <i>Monascus purpureus</i> 'un (ATCC 16365) petri görüntüsü	41
Şekil 4.1. <i>Aspergillus niger</i> 'de sitrik asit üretimi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi.....	44
Şekil 4.2. <i>Aspergillus niger</i> 'in şerbet içeren kültürdeki beş günlük görüntüsü	45
Şekil 4.3. <i>Aspergillus niger</i> 'in şerbet içeren kültürdeki misel peletlerinin genel görüntüsü	45
Şekil 4.4. <i>Saccharmyces cerevisiae</i> 'da etil alkol üretimi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi.....	47
Şekil 4.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'nın şerbet içeren besiyerindeki 48 saatlik kültürü.....	47
Şekil 4.6. <i>Zymomonas mobilis</i> 'de levan sentezi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi.....	49
Şekil 4.7. <i>Zymomonas mobilis</i> 'in şerbet içeren besiyerindeki 60 saatlik kültürü.....	49
Şekil 4.8. <i>Monascus purpureus</i> 'da pigment sentezi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi.....	51
Şekil 4.9. <i>Monascus purpureus</i> 'un şerbet içeren besiyerindeki 6 günlük kültürü.....	51
Şekil 4.10. <i>Monascus purpureus</i> 'un şerbet içeren besiyerindeki misel peletleri.....	52

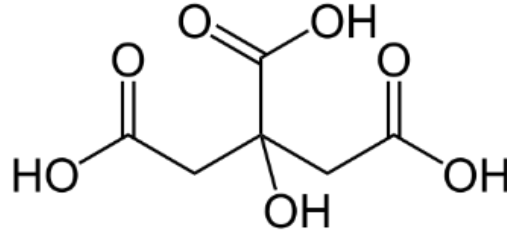
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	30
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	31
Çizelge 4.1. Atık şerbetin kimyasal içeriği	43
Çizelge 4.2. <i>Aspergillus niger</i> 'de sitrik asit üretimi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi.....	44
Çizelge 4.3. <i>Saccharmyces cerevisiae</i> 'da etil alkol üretimi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi.....	46
Çizelge 4.4. <i>Zymomonas mobilis</i> 'de levan sentezi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi	48
Çizelge 4.5. <i>Monascus purpureus</i> 'da pigment sentezi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi.....	50

1. GİRİŞ

İsmi latince bir kelimedden (citrus) alan sitrik asit ($C_6H_8O_7$, 2-hidroksi-propan-1,2,3-trikarboksilik asit) doğada yaygın olarak bulunan ve karbonhidratların karbon dioksit oksitlenmesi sırasında sitrik asit döngüsünde bir ara madde olarak yer alan organik bir bileşiktir. Narenciye, ananas, armut ve incir gibi pek çok meyvede az miktarlarda bulunan saf sitrik asit renksiz olup, suda ve alkoldeki çözünürlük seviyesi de iyidir. Oda sıcaklığında katı halde bulunan sitrik asidin erime sıcaklığı, $153^{\circ}C$ olup, yüksek sıcaklık değerlerinde de farklı ürünlere ayrılmaktadır (Rajoka *et al.* 1998).

Sitrik asit ilk olarak limon suyundan izole edilerek 1784 yılında Carl Scheele (Tsay and To 1987) tarafından kalsiyum sitrat olarak kristalleştirilmiştir. Bununla beraber, 1880 yılında sitrik asit sentezi, Grimoux ve Adams tarafından önce gliserolden ve daha sonra simetrik dikloroasetondan gerçekleştirilmiştir. Sitrik asit eldesi için farklı başlangıç materyalleri kullanılan birçok kimyasal sentetik yöntem tanımlanmıştır (Kristiansen *et al.* 1999). Wehmer, 1893 yılında, *Penicillium glaucum*'un şeker ve inorganik tuzlar içeren bir kültür ortamında sitrik asit biriktirdiğini tespit etmiştir. 1917 yılında James Currie tarafından yapılan deneyde ise, farklı *Aspergillus niger* suşlarının, 2,5-3,5 başlangıç pH aralığında, yüksek konsantrasyonda şeker ve mineral tuzları içeren bir besiyerinde çoğaltıldıklarında, bu suşların büyük miktarda sitrik asit ürettiği gözlemlenmiştir. Araştırma sırasında Currie; pH değerlerini düşük seviyelerde tutarak, *A. niger*'in hem oksalik hem de glukonik asit oluşturma potansiyelini baskılamıştır. Currie'nin bu keşfi, 1923'te Amerika Birleşik Devletleri'nde Pfizer tarafından kurulan fermantasyon yoluyla endüstriyel sitrik asit üretiminin de temelini oluşturmuştur (Dashen *et al.* 2014).



Şekil 1.1. Sitrik asidin moleküler yapısı (Kubicek and Karaffa 2010)

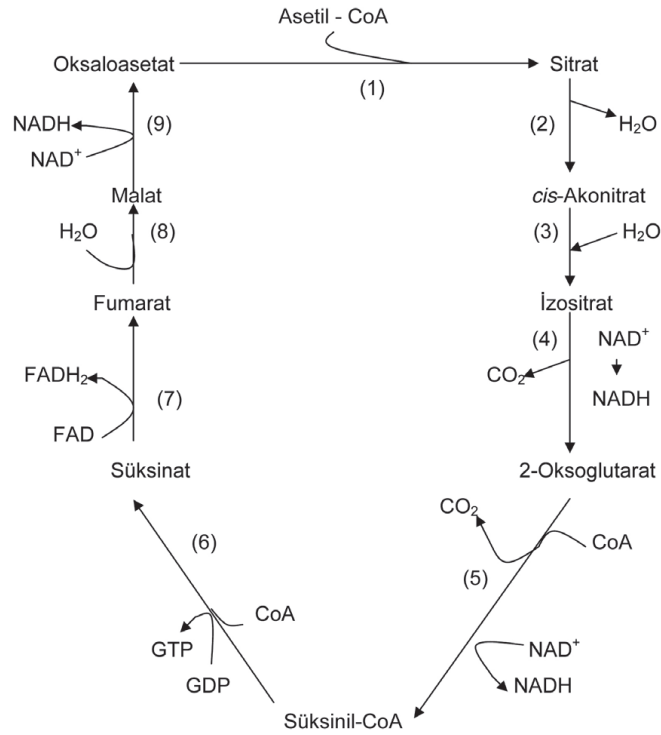
Geçmişte sitrik asit sentezi çalışmaları fungus, bakteri ve mayalar gibi çok çeşitli mikroorganizmalar üzerinde yapılmıştır. Organik maddelerden mikrobiyal sitrik asit sentezi, dikkatli kontrol ve iyi tasarlanmış proses koşulları gerektiren karmaşık bir biyokimyasal reaksiyondur. Fermantasyon prosesini etkileyen faktörler arasında; karbon kaynağının konsantrasyonu ve tipi, fermantasyon ortamının pH'ı, fosfat ve azot sınırlamaları, havalandırma, sitrik asit üreten mikroorganizmaların morfolojisi ve iz elementlerin konsantrasyonları yer almaktadır. Manganez, fosfat ve azot gibi iz elementler yalnızca belirli değerler altında fermantasyon prosesini olumlu yönde etkiler. Bununla birlikte, oksijen ve şeker gibi diğer bileşenlerin ise belirli miktarların üstünde olması gerekmektedir (Soccol *et al.* 2002; Max *et al.* 2010).

Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen sitrik asit biyosentezi, ticari ve akademik yönden oldukça önemli bir araştırma konusu olmuştur (Mattey 1992). *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Corynebacterium* spp, *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium restrictum*, *Candida lipolytica*, *C. intermedia* ve *Sacchromyces cerevisiae* gibi mikroorganizmalar biyoteknolojik sitrik asit üretimi için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Filamentli bir küf olan *A. Niger* kullanım kolaylığı, çeşitli ucuz hammaddeleri fermente etme kabiliyeti ve yüksek ürün verimi yönüyle, sitrik asit üretimi açısından en uygun mikroorganizma olarak belirlenmiştir (Raja Rao and Kruthi Reddy 2013).

Birçok fungusda olduğu gibi *Aspergillus*'un taksonomisi, genellikle bakterileri sınıflandırmak için kullanılan fizyolojik, biyokimyasal ve genetik özelliklerden ziyade morfolojik temellere dayanır. Vejetatif yapısı septat filamentlerinden oluşan *A. niger*'in hücre duvarı temel olarak kitinden oluşur. Bununla beraber bu organizmanın hücre duvarı

amino şekerler, proteinler, mannoz, glukoz ve yüzey enzimleri gibi diğer bileşikler de içerir. *A. niger* grubunun üyeleri oldukça fazla türden oluşan, çok çeşitli substratlar üzerinde gelişebilen, önemli gıda bozucu funguslar olup, dünya üzerinde farklı lokasyonlarda geniş bir dağılım gösterirler (Raper and Fennell 1965; Pitt and Hocking 1997).

A. niger'de sitrik asit üretiminin biyokimyası araştırmalarda oldukça fazla yer bulmuş ve bu organizma sitrik asit üretimi çalışmalarının odak noktası olmuştur (Tsao *et al.* 1999). Çünkü diğer türlerin aksine, *A. niger*'in birçok suşu minimum düzeyde istenmeyen toksik yan ürün oluşumu ile, yüksek seviyede sitrik asit üretme kabiliyetine sahiptir (Schuster *et al.* 2002).



Şekil 1.2. Sitrik Asit Döngüsü (Ratledge 2001)

1937'de Krebs tarafından öne sürülen trikarboksilik asit döngüsü (TCA), orijinal başlık altında "sitrik asit döngüsü" olarak adlandırılabilir (Krebs and Johnson 1937). TCA döngüsü, aerobik organizmaların mitokondrilerinde evrensel oluşum reaksiyonlarının döngüsel bir dizisidir. Bu döngü Asetil Koenzim A'yı yakıt olarak kabul edip, CO₂ ve

hidrojen atomlarını elde eden çok enzimli bir sistem tarafından katalize edilir (Jaklitsch *et al.* 1991). Bir TCA döngüsü içinde her dönüşte, bir asetik asit molekülü (iki karbon atomlu), asetil-Ko enzimi olarak reaksiyona girer ve altı karbonlu bileşik olan sitrik asit oluşturmak için dört karbonlu bileşik olan oksalo-asetik asit molekülü ile yoğunlaşır..Sitrik asit daha sonra iki molekül CO₂ açığa çıkaran ve dört karbon oksalo-asetik asidi yeniden üreten bir reaksiyon dizisi ile degrade edilir. Döngünün diğer bir kısmı oksalo-asetik asidin başka bir asetil-KoA molekülü ile reaksiyona girmesiyle başlayabilir. Böylece, döngünün her bir turunda bir asetik asit molekülü devreye girer, iki ATP ve bir CO₂ molekülü oluşur. Böylece sitrik asit oluşturmak için bir oksalo asetik asit molekülü kullanılmış olur (Papagianni *et al.* 1999; Prescott and Dunn 2001).

Sitrik asit sentezinde, fermantasyon yolu oldukça ekonomik olup, dünya genelinde üretilen sitrik asidin %90'ından fazlası bu yolla elde edilmektedir. Bu yöntemin en önemli avantajları arasında; üretim tesislerinin ve proseslerin genellikle daha az karmaşık olması, tesislerde daha az kompleks kontrol sistemlerine ihtiyaç duyulması, daha az iş gücü ve enerji tüketimi gerektirmesi sayılabilir (Soccol *et al.* 2006).

Fermantasyonla sitrik asit üretimi; hammaddenin hazırlanması ve mikroorganizma inokülasyonu, fermantasyon ve ürünün geri kazanılması aşamalarından oluşurken, endüstriyel sitrik asit fermantasyonu ise; Batık Kültür Fermantasyonu, Yüzey Fermantasyonu ve Katı Hal Fermantasyonu (Koji Prosesi) olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşir (Vandenberghe *et al.* 2004). Bol miktarda serbest su bulunan ortamlarda, mikroorganizmaların gelişimi ve karbonhidratların bunlar tarafından ayrıştırılması (aerobik veya anaerobik olarak) batık kültür fermantasyonu olarak tanımlanabilir (Ray and Ward, 2006). Batık kültür fermantasyonu; fermantasyon modellemesi, biyoreaktör tasarımı ve proses kontrolü gibi çok iyi bilinen özellikleri nedeniyle, sitrik asit üretimi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Dünya genelinde sitrik asit üretiminin büyük bir çoğunluğunun, batık kültür fermantasyonu kullanılarak gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Vandenberghe 2000; Soccol and Vandenberghe 2003). Yüzey fermantasyonu ise; genellikle filamentli funguslar kullanılarak gerçekleştirilen sitrik asit üretim yöntemidir. Yüzey fermantasyonu tekniği kurulum, işletme ve enerji maliyeti

açısından daha az çaba gerektirmesi nedeniyle küçük ve orta ölçekli endüstrilerde daha sık kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem yoğun iş gücü gerektirdiği için, besiyeri kompozisyonundaki değişikliklere karşı oldukça hassastır (Benghazi *et al.* 2014). Koji prosesi olarak da bilinen katı hal fermantasyonu; hem fiziksel destek hem de besin kaynağı olarak görev yapan, çözünmeyen bir materyal üzerinde ve düşük su aktiviteli bir ortamda mikroorganizmaların gelişimi olarak tanımlanabilir (Castilho *et al.* 2009). Bu fermantasyon tekniğinin düşük maliyet, geliştirilmiş ürün özellikleri, yüksek ürün verimi, kolay ürün geri kazanımı ve düşük enerji gereksinimi gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır (Berovic and Legisa 2007). Bunun yanında, yüksek nitrojen ve fosfor gereksinimi olan mikrobiyal suşlar, katı hal prosesinde düşük su aktivitesinde meydana gelen besin ve metabolitlerin düşük difüzyon oranlarından dolayı, katı kültür için ideal mikroorganizmalar değildir.

Sitrik asit üretiminde nişasta veya sükroz bazlı substratların yanı sıra, tarımsal (manyok ve şeker kamışı küspesi gibi), meyve ve sebze atıkları da (elma ve üzüm çekirdeği gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır (Vandenberghe 2000; Soccol *et al.* 2006). Yüksek oranda (%40-55), sükroz, glukoz ve fruktoz şekerlerini içeren melas, düşük maliyetinden dolayı mikrobiyal sitrik asit üretimi için oldukça fazla tercih edilmektedir (Grewal and Kalra 1995). Melas bir şeker rafinasyon yan ürünü olduğu için, kalite açısından da oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu yüzden, melasın bazı tipleri sitrik asit üretimi için uygun değildir. Melas bileşimi, pancar ve kamış çeşitliliği, yetiştirme yöntemleri, saklama ve kullanma koşullarına bağlı olarak (taşıma özellikleri ve sıcaklık değişimleri) değişiklik göstermektedir. Hem pancar hem de kamış melasları sitrik asit üretimi için uygundur. Ancak pancar melasları kamış melaslara göre daha az miktarda iz elementleri içermesi nedeniyle daha çok tercih edilir. Böylece, daha yüksek seviyelerde ürün verimi sağlanabilir (Berovic and Legisa 2007).

Kamış melası, genellikle sitrik asit sentezini inhibe eden bazı elementleri (demir, kalsiyum, magnezyum, mangan ve çinko) içerir ve bu elementlerin indirgenmesi için bir ön işlem gerekmektedir. Pancar melası inkübasyonunun ilk aşamalarında fitat eklenmesi sitrik asit birikiminde yaklaşık 3 kat artışa neden olur (Lu *et al.* 1998).

Ayrıca, manyok k spest, kahve kabuğu, buğday kepeği, elma ve üzüm posası, ananas atığı, kivi kabuğu ve narenciye atıkları gibi çeşitli tarımsal endüstri atıklarının da katı kültür fermantasyonuyla sitrik asit üretimi için substrat olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırılmıştır (Vandenberghe *et al.* 1999; Vandenberghe 2000). Bu substratlar küspe olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar.  nk  küspe ortam nemlendirildikten sonra, aglomerasyon göstermediğinden ve fermantasyon sırasında da daha iyi ısı ve kütle transferi sağladığından, daha yüksek verimli ürün eldesine olanak sağlar (Kumar and Jain 2008).

Pancar veya şeker kamışı şurupları, batık kültür fermantasyonu ile sitrik asit sentezi için temel substrat olarak kullanılmaktadır. Bu substratların en büyük avantajı saflığıdır. Fakat şurupların kalitesi depolama sırasında hızlı bir şekilde bozulabilmektedir. Bununla beraber nişastanın enzimatik hidrolizi ile elde edilen dekstroz şurubu kullanılarak da yüksek verimli sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem endüstriyel proseslerde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Soccol *et al.* 2006).

Fosil yakıtların  evre üzerindeki olumsuz etkileri, küresel ısınma, artan enerji talebi, dünyadaki enerji ihtiyacının önemli  l de azalması ve petrol pazarındaki negatif durumlar (1970 yılındaki petrol krizi) gibi nedenler dünya genelinde alternatif yakıtlara olan ilgiyi artırmaktadır (Himmel *et al.* 2007; Solomon *et al.* 2007). Alternatif yakıtların, sera gazı emisyonlarını önemli  l de azaltması, dünya çapında hammadde ihtiyacını karşılaması ve yenilenebilir hammadde kaynaklarından  retilbilme gibi özellikleri, bu tip yakıtları cazip hale getirmektedir (Hahn-H gerdal *et al.* 2006). Bu alternatif yakıtlardan biri olan biyoyakıtlar; tarımsal atıklar, kereste atıkları, lignoselülozik kentsel ve endüstriyel atıklar gibi çeşitli kaynakların substrat olarak kullanılmasıyla üretilir (Gupta *et al.* 2014; Sims *et al.* 2010). Biyoetanol, biyometanol, biyodizel, biyogaz, biyo-sentetik gaz ve biyohidrojen gibi alternatif yakıt formları biyoyakıtlara örnek olarak verilebilir.

Düzenli bir yakıt formu olan biyoetanol en yaygın olarak kullanılan yakıt çeşididir. Çeşitli hammadde kaynakları kullanılarak üretilen biyoetanol, yakıt karışımlarında veya tek

yakıt olarak kullanılabilir. Ayrıca geleneksel fosil yakıtlara karşı iyi bir alternatiftir. Kimyasal formülü C_2H_5OH olan etil alkol; yanıcı, berrak, renksiz ve hafif toksik olan bir kimyasal bileşiktir. Etil alkol, asit katalizörlü eten hidrasyonu ile petrokimyasal hammaddelerden veya fermantasyon yoluyla çeşitli hammaddelerden üretilir. Küresel olarak sentetik etanol üretimi, toplam üretimin yaklaşık %3-4'ünü oluştururken geri kalanı ise fermantasyon yoluyla gerçekleştirilir (Licht 2006).

Biyometanol üretiminin temeli fermantasyon prosesine dayanır. Fermantasyon bilinen en eski biyokimyasal işlemlerden biridir. Bu işlem, karbonhidratların mikrobiyal enzimlerle alkollere ve kısa zincirli yağ asitlerine dönüşümü olarak tanımlanabilir (Silva *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2008). Bu tip prosesler, bakteri, maya ve filamentli funguslar gibi mikroorganizmaların kullanımı ile gerçekleşir (Huang and Tang 2007; Fortman *et al.* 2008). Biyoteknolojik gazların ve kimyasalların üretiminin konvansiyonel yöntemlere kıyasla fermantasyon yöntemiyle yapılması daha avantajlıdır (Das and Veziroglu 2001). Çünkü fermantasyon prosesi daha az enerji gerektirir ve çevre dostudur (Wu *et al.* 2007). Fermantasyon prosesinin verimi, kullanılan besiyeri ortamı ve proses koşulları gibi fiziksel ve kimyasal faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Huang and Tang 2007).

Fermantasyon prosesleri genellikle aerobik veya anaerobik olarak sınıflandırılmaktadır (Huang and Tang 2007). Aerobik fermantasyon, hammadde olarak bir oksijen kaynağına ihtiyaç duyar (Ward 1992). Oksijenin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan dolayı oksijen konsantrasyonu için bazı sınırlamalar vardır (Huang and Tang 2007). Oksijen, mikrobiyal büyümeyi ve aktiviteyi etkilediği için, proses sırasında oksijen seviyesi mümkün olduğu kadar yüksek tutulmalıdır. Aerobik fermantasyon prosesleri, antibiyotikler ve organik asitler gibi yüksek biyoteknolojik öneme sahip ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Enzinger and Asenjo, 1986). Öte yandan, anaerobik fermantasyon, oksijen yokluğunda ve çok daha uzun sürelerde gerçekleşen bir süreçtir (Huang and Tang 2007). Zorunlu anaerobik mikroorganizmalar oksijene karşı oldukça hassastır. Bu nedenle, bu tip proseslerin gerçekleşeceği ortamları olabildiğince oksijensiz tutmak gereklidir. Biyoreaktörlerde, anaerobik koşulların devamlılığının sağlanabilmesi için genellikle reaktörden azot gazı (N_2) geçirilir.

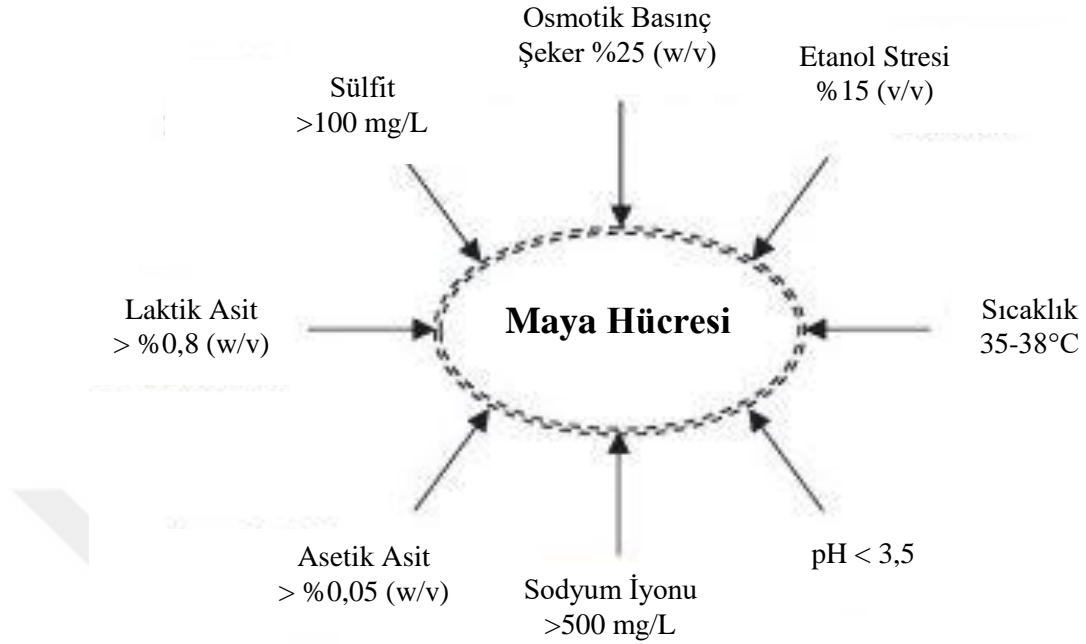
Anaerobik fermantasyon, çoğunlukla glukozun substrat olarak kullanıldığı H₂ üretimi için sıkça tercih edilen bir yöntemdir (Ren *et al.* 2006; Wu *et al.* 2010). Bunlara ilaveten, fermantasyon işlemi kesikli, kesiksiz ve yarı-kesikli olarak gerçekleştirilebilir (Stanbury and Whitaker 1984; Olsson and Hahn-Hägerdal 1996; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000). Uygulanacak fermantasyon tipi, prosesin ekonomisine ve kullanılan mikroorganizmaların özelliklerine bağlı olarak değişir (Olsson and Hahn-Hägerdal, 1996). Fermantasyon konfigürasyonu, ürün verimi ve proses maliyeti gibi parametreler dikkate alınarak, ürün veriminin minimum ekipman maliyeti ile maksimum seviyede olmasını gerektirmektedir (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000).

Fermantasyon proseslerinde kullanılan mikroorganizmalar, çeşitli substratlardan değerli ürünlerin sentezlenmesinde (endüstriyel kimyasallar ve yakıtlar gibi) önemli rol oynar. Mikroorganizmaların fermantasyon başarısı, genetik yapılarıyla ilişkilidir. Bu mikroorganizmalar, substratları metabolize edebilen özel enzimlere sahip olup enzimler vasıtasıyla, ısı ve gazların birlikte üretilmesiyle sonuçlanan çeşitli substratları farklı metabolitlere ayırma işlemini gerçekleştirebilir. Günümüzde bakteriler ve funguslar endüstriyel proseslerde etanol, asetik asit, metan ve H₂ gibi biyoteknolojik öneme sahip kimyasallar ve gazların üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang and Tang 2007).

Hem mayalar hem de bakteriler, fermantasyon prosesleriyle şekerleri verimli bir şekilde etanole dönüştürmektedirler. Etanol endüstrisinin gelişmesi için daha yüksek aktivite gösterebilecek mikroorganizma seçimi ve daha iyi proses tasarımları gerekmektedir. Etanol üretimi birçok bakteri tarafından gerçekleştirilebilir. Gram negatif bir bakteri olan *Zymomonas mobilis*, biyoetanol üretimi açısından kapsamlı olarak araştırılmış bir bakteridir. Bu bakteri yabani tip *Saccharomyces cerevisiae* mayasıyla karşılaştırıldığında, yüksek etanol konsantrasyonlarına daha fazla tolerans göstermektedir. Bundan dolayı, *Z. mobilis* etanol üretimi için uygundur. Ancak bu bakterinin dezavantajı, yalnızca glukoz, fruktoz ve sükrozu substrat olarak kullanarak fermantasyon prosesini gerçekleştirmesidir (Ruanglek *et al.* 2006). *S. cerevisiae* manipüle ve kültüre edilmesi kolay olan bir mikroorganizma olduğu için, çalışmalarda sıklıkla

kullanılan ökaryotik bir model organizmadır. Ayrıca bu maya bira, şarap ve ekmek üretimi gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır.

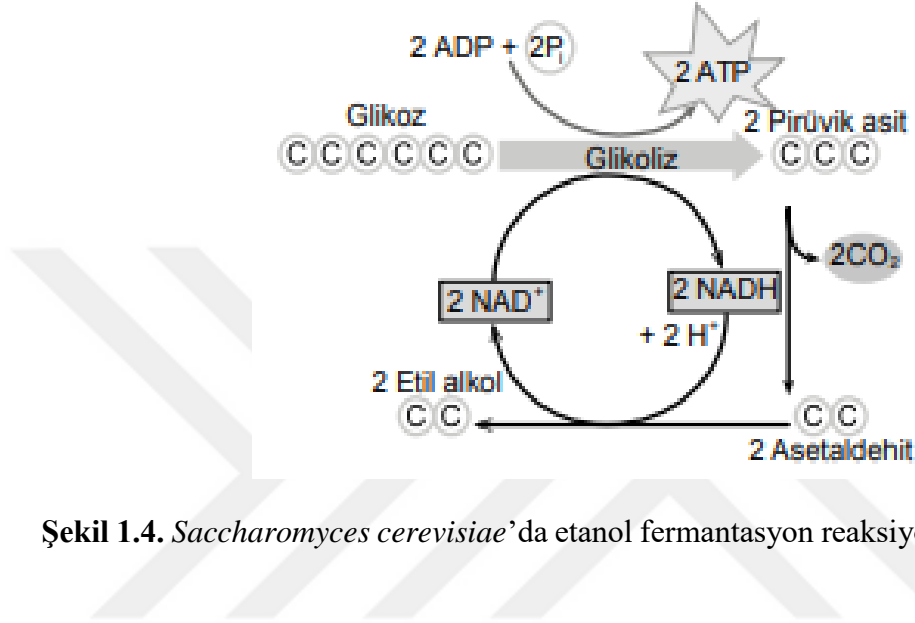
İnkübasyon sıcaklığı, pH, çalkalama hızı ve katkı maddeleri gibi çeşitli fizikokimyasal parametreler etanol üretimini büyük ölçüde etkiler. Sıcaklık hücrelerin büyümesini ve verimliliğini de etkiler. *S. cerevisiae* 30°C olan optimum büyüme sıcaklığına yaklaştığında, büyüme hızı her 10°C’de bir yaklaşık iki katına çıkar. Optimum büyüme sıcaklığından sonra ise, büyüme hızı yavaşlar. Maya hücreleri, pek çok organizmaya nazaran daha asidik ortamlarda aktivite göstermektedir. Bu hücrelerin aktiviteleri sonucu azot kaynakları tüketildiğinden, ortamın pH değerini düşüren hidrojen iyonları ortama salınır. Bu durumlarda tamponlar, ortamı istenen pH aralığında tutmak için sıklıkla kullanılır. Fermantasyon ortamında çözünmüş oksijen miktarının, mayada meydana gelen reaksiyonlar için önemli etkileri vardır. Oksijen mevcut olduğu zaman basit şekerleri, hücre biyoması, karbondioksit ve suya dönüştüren solunum işlemi meydana gelir. Bazı koşullar altında etanol, maya hücreleri tarafından tüketilmektedir. Bununla beraber maya hücreleri, uygun koşullar altında yüksek etanol konsantrasyonlarını da tolere edebilir. Sıcaklık, mayanın etanol konsantrasyonuna duyarlılığını, büyüme hızını ve fermantasyon hızını etkilemektedir. Maya hücrelerinin, şekeri karbondioksit ve alkole dönüştürme kabiliyeti enzimler tarafından kontrol edilir. Prosesin her aşamasında çeşitli enzimler yer alır. Yüksek alkol konsantrasyonları enzimleri inhibe ederek maya hücrelerini öldürebilir. Farklı maya suşlarının, çeşitli konsantrasyonlardaki alkollere karşı toleransı organizmadan organizmaya değişkenlik gösterebilir. Bira mayası, konsantrasyonu %5-6’dan daha fazla olan alkole dayanamazken, şarap mayası ise %10-15 arasında olan alkol oranlarını iyi tolere edebilir. Bununla beraber uygun besiyeri ortamında geliştirilen maya suşları %21 alkol seviyesine kadar dayanıklılık gösterebilir (Karhumma *et al.* 2006; Chu and Le 2007; Ban *et al.* 2008).



Şekil 1.3. Etanol üretimi sırasında bazı faktörlerin *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde etkisi (Bai *et al.* 2008)

Mikroorganizmalarda, yaşamın devamlılığı için enerji gereklidir. Bu nedenle, organik maddelerin parçalanması sırasında elektronlar, Adenozin Trifosfat (ATP) formunda bir dizi elektron taşıyıcısı vasıtasıyla oksijenden ekstrakte edilir ve aktarılır. Bu işlem oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılır (Brock *et al.* 1984). Birçok organizmanın, enerjinin serbest bırakılmasıyla fermantasyon olarak adlandırılan dengelenmiş redoks reaksiyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir. Ancak organik bileşiklerdeki karbon atomları, sadece kısmen oksitlendiği ve diğerleri ise indirgeniği için, bu koşullar altında yalnızca sınırlı miktarda enerji açığa çıkarır. Bu redoks reaksiyonlarının sonucunda CO₂ ve etanol üretimi gerçekleşir. Glukoz, fruktoz ve sükröz gibi etanol şekerleri mikrobiyal fermantasyonla hücresel enerjiye dönüştürülür. Böylece metabolik ürünler olarak, etanol ve karbondioksit üretilir. Endüstriyel ölçekte gerçekleştirilen etanol üretiminde tercih edilen mikroorganizmalar mayalar olup, üretim oksijen yokluğunda gerçekleştiği için, bu prosese anaerobik fermantasyon denir (Madigan and Martinko 2006). Hammaddelerin bileşimine bağlı olarak yöntemde hangi maya türünün kullanılacağı belirlenir. *S. cerevisiae* geleneksel olarak heksoz şekeri fermantasyonunda kullanılırken, *Kluyveromyces fragilis* veya *Candida sp.* ise laktoz veya pentozları fermente etmek için

kullanılır. Etanol üretimi aslında bir anaerobik proses olmasına rağmen, maya tarafından lipit biyosentezi ve hücrel proseslerin devamlılığı için de, eser miktarda oksijene gereksinim duyulmaktadır (Shuler and Kargi 2002).



Şekil 1.4. *Saccharomyces cerevisiae*'da etanol fermantasyon reaksiyonu (Bai *et al.* 2008)

Fermantasyon yoluyla gerçekleştirilen etanol üretiminin ekonomik anlamda önemli bir uygulama olabilmesi için, ucuz substratlar kullanılmalı ve substrat kullanımı maksimize edilmelidir. Etanol üretimi şeker, nişasta ve selülozik malzemelerin hammadde kaynağı olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Şeker kamışı, şeker pancarları, melas ve çeşitli meyveler gibi substratların içerisindeki şekerler, doğrudan etanole dönüştürülebilir. Patateslerden, kök bitkilerinden, buğday ve mısır gibi tahıllardan elde edilen nişastanın, etanole dönüştürülmeden önce, α -amilaz ve glukoamilaz enzimleri tarafından fermente edilebilir şekerlere hidroliz edilmesi gerekir (Lee *et al.* 1995). Şeker ve nişasta, etanol üretimi için ana kaynaklar olarak tercih edilse de, selülozik maddelerin de birtakım işlemlerden geçirildikten sonra etil alkol üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır. Odun atıklarından, kentsel katı atıklardan ve tarımsal ürün atıklarından elde edilen selülozik materyaller doğada en çok bulunan hammadde kaynakları olarak gösterilebilir (Lin and Tanaka 2006).

Biyopolimerler (yenilenebilir polimerler olarak da adlandırılan), biyolojik sistemler tarafından üretilen polimerler veya kimyasal olarak sentezlenmeyen ve amino asitler,

şekerler ve doğal yağlar gibi biyolojik başlangıç materyallerinden türetilen polimerlerdir (Tang *et al.* 2012). Biyopolimerler sentetik veya doğal polimerler olarak sınıflandırılır (Vroman and Tighzert 2009). Biyoyumluluk, biyobozunurluk ve çevre dostu olması gibi özelliklerinden dolayı petrokimyasal türevli polimerlere nazaran daha avantajlıdır.

Günümüzde birçok mikroorganizma, mikrobiyal biyopolimer üretiminde önemli rol oynamaktadır. Bu polimerler, hücre yüzeyine bağlı halde veya fermantasyon ortamından ekstrakte edilmiş olarak bulunmaktadır. Bakteriler, bu mikrobiyal biyopolimerleri, belirli çevresel koşullara karşı depolama malzemesi olarak kullanır (Sanchez-Garcia *et al.* 2010). Biyolojik fonksiyonlarına bağlı olarak, mikrobiyal polisakkaritler; intraselüler depolama polisakkaritleri (glikojen), kapsüller polisakkaritler (K30 O-Antigen) ve ekstraselüler bakteriyel polisakkaritler (levan, ksantan ve selüloz) olmak üzere üçe ayrılır (Schmid and Sieber 2015).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve hücre tarafından salgılanan mikrobiyal polisakkaritler, ekzopolisakkaritler (EPS) olarak tanımlanır. Hücrenin korunmasında, bakteriyel yüzeylerin yapışmasında ve hücre-hücre etkileşimlerinde önemli rol oynarlar (Nicolaus *et al.* 2010). EPS'ler, gıda, ilaç, kimya ve diğer birçok endüstriyel uygulamada kullanılan hidrokolloidler için önemli kaynaklardır (Ahmad *et al.* 2015). Birçok fizikokimyasal ve reolojik özelliğinden dolayı mikrobiyal EPS'ler, yeni biyomateryaller olarak işlev görmekte ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, atık su arıtımı, saflaştırma prosesleri, kozmetik ve farmakoloji gibi birçok endüstri dalında geniş bir uygulama alanı bulmaktadır (Rühmann *et al.* 2015). Özellikle levan, ksantan, dekstran ve pullulan polisakkaritleri, geniş bir uygulama alanına sahip mikrobiyal polisakkaritlerdendir.

Mikrobiyal biyopolimerler, yedek materyal veya koruyucu bir mekanizmanın parçası olarak işlev gördüğü için biyopolimer üreten mikroorganizmalar, farklı çevresel koşullara karşı daha dayanıklıdır (Rehm 2010). İlk teşhis edilen bakteriyel polimer olan “dekstran” Pasteur (1861) tarafından şarap içerisinde bulunan mikrobiyal bir ürün olarak keşfedilmiştir. *Leuconostoc mesenteriodes* mikroorganizması ise, dekstran üreticisi olarak Van Tieghem (1878) tarafından tanımlanmıştır.

EPS üreten bakterilerin çoğu homopolisakkarit veya heteropolisakkarit üretirken (Kumar *et al.* 2007), bir kısmı (*Serratia marcescens* ve *Aeromonas salmonicida*) ise her ikisini de aynı anda üretebilmektedir (Kwon *et al.* 1994). Homopolisakkaritler tek tip monosakkarit ünitelerinin polimerleşmesi ile oluşan polisakkaritlerdir. Bazı homopolisakkaritler, monosakkaritlerin depo şekli olarak görev yaparlar. Nişasta, selüloz, kitin ve glikojen bu tip homopolisakkaritlere örnek olarak verilebilir (Nelson *et al.* 2005). Heteropolisakkaritler ise iki ya da daha fazla çeşitteki monosakkarit ünitelerinin polimerleşmesi ile meydana gelen polisakkarit çeşitleridir. Heteropolisakkaritler, hayvansal dokularda hücre dışı destek sağlar ve hücreleri bir arada tutarak, koruma ve şekil verme konusunda yardımcı olur. Heteropolisakkaritlere örnek olarak, bakteriyel hücre duvarında bulunan ve N-asetil muramik asit ile N-asetil glukozamin'den oluşan peptidoglikan yapıları verilebilir. Homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler sentez bakımından farklıdır. Homopolisakkaritlerin biyosentezi sükroz gibi spesifik substratların varlığını gerektirir, buna karşın heteropolisakkarit kalıntıları intraselüler olarak üretilir (Nwodo *et al.* 2012).

EPS'ler biyotik stres, abiyotik stres, sıcaklık, ışık yoğunluğu ve pH gibi farklı stres koşulları altında hücreleri antibiyotiklerin, antimikrobiyal maddelerin, antikorların ve bakteriyofajların etkisinden korur (Kumar *et al.* 2007). Mikroorganizmalar sıklıkla hücresel yoğunluğu yüksek olan bir biyofilm tabakası ile bağlanır ve mikroorganizmaların stabilitesi polisakkarit zincirleri arasındaki etkileşimler yoluyla EPS'ler tarafından kontrol edilir. Ayrıca mikrobiyal çeşitlilik, EPS tarafından biyolojik olarak desteklenir. Biyofilm oluşumu, hem adhezyon hem de bakterilerin çevresel fizikokimyasal koşullara adaptasyonunda önemli bir rol oynar (Donot *et al.* 2012).

Çevresel faktörler, pH, sıcaklık, karbon-azot oranı, oksijenlenme miktarı ve karbon kaynakları gibi spesifik kültür koşulları, EPS üretimini etkileyebilir. EPS kompozisyonu koşullara göre değişiklik gösterebilir. Örneğin, karbon kaynağından dolayı, *Lactobacillus casei* tarafından üretilen EPS'nin kimyasal kompozisyonunun değiştiği gözlemlenmiştir (Staudt *et al.* 2012). Ayrıca biyoreaktörlerde gerçekleştirilen mikrobiyal EPS üretim

proseslerinde, genetik mühendisliği çalışmaları ile mikrobiyal büyüme ve ürün verimleri optimize edilebilir (Delbarre-Ladrat *et al.* 2014).

Bakteriyel EPS'ler, genellikle intraselüler olarak sentezlenir ve substratı polimere dönüştüren enzimlerin salgılanmasıyla, dekstran, levan ve mutan gibi homopolisakaritler ekstraselüler olarak ortama verilir (Kumar *et al.* 2007).

Önemli bir ekzopolisakarit çeşidi olan levan, fruktoz ünitelerinin β -2-6 ve β -2-1 bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan doğal bir polimerdir. Levan sentezi sükrözü doğrudan polimere dönüştüren levansükraz enziminin aktivitesi ile gerçekleşir (Han and Clarke, 1990). Yağda ve suda yüksek çözünürlük, güçlü yapışkanlık, iyi biyoyumluluk ve biyofilm oluşturma kabiliyeti gibi birçok ayırt edici özelliğe sahip bir homopolisakarit olan levanın; gıda, kozmetik, farmasötik ve kimya endüstrisinde önemli bir uygulama alanı bulunmaktadır. Mikrobiyal levan üretimi sakkaroz içeren üretim ortamlarında, *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *Aerobacter levanicum*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium laevaniformans* ve *Zymomonas mobilis* gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (Bergey *et al.* 1989). Biyoteknolojik sentez işlemlerinde, substrat maliyeti, uygun fermantasyon yöntemi ve mikroorganizma seçimi, proseslerin ekonomik olarak gerçekleşmesi açısından önemli parametrelerdir (Borsari *et al.* 2006). *Z. mobilis* levan üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan önemli bir mikroorganizmadır (Oliveira *et al.* 2007). Bu mikroorganizma, fakültatif anaerob ve Gram negatif bir bakteridir. Sakkaroz içeren üretim ortamlarında levan ve fruktooligosakarit üretimini gerçekleştirmektedir.

Latince kökenli olan pigment kelimesi ilk olarak renk anlamında kullanılmıştır. Fakat sonraki zamanlarda tanımı renklendirilmiş nesne olarak değiştirilen bu terim, Orta Çağ zamanlarında özellikle besin renklendirme amacıyla kullanılan farklı bitki ve sebze ekstraktlarını tanımlamak için tercih edilmiştir. Biyolojik terminolojide pigment terimi, hayvanlarda ya da bitkilerde bulunan, vücut sıvısında kimi zaman süspanse halde olan kimi zaman da dokuda birikintiler olarak bulunan, hücre içindeki granüllerde veya hücre membranında yer alan renkli maddeler olarak tanımlanır. (Buxbaum 1998). Kimyasal

anlamda pigmentler ise; görünür bölgenin belirli dalga boyu aralığında, ışığı absorbe eden bileşikler olarak tanımlanmaktadır.

Yaşamın her basamağında yaygın olarak yer alan pigmentler insanlarda deride ve gözde, ağaç yapraklarında, meyvelerde, sebzelerde ve bunlara ilaveten mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Frick and Meggos 1988). Pigmentler gıda endüstrisinde katkı maddesi, antioksidan ve renk yoğunlaştırıcı olarak sıkça tercih edilmektedir (Tibor 2007). Ayrıca besin maddelerini, tekstil ve farmosötik ürünleri ticari açıdan daha cazip hale getirmek amacıyla da kullanılmaktadır.

Pigmentler temel olarak doğal ve sentetik olarak üretilen pigmentler olmak üzere iki grupta incelenir. Sentetik pigmentler de, organik ve inorganik olarak iki sınıfa ayrılır. İnorganik pigmentler; krom ve kadmiyum gibi metal elementlerden oluşurken, organik pigmentler; benzen, anilin ve naftalin gibi organik bileşikleri içeren geniş ve karmaşık kimyasal yapılardan köken alır. Daha parlak, berrak ve zengin renkten oluşan organik pigmentlerin sıcaklığa, güneş ışığına ve kimyasal bozulmaya karşı hassasiyeti fazladır. Ayrıca organik pigmentler inorganik olanlara nazaran oldukça maliyetlidir (Fabre *et al.* 1993).

Mikroorganizmalar ve bitkiler doğal pigmentlerin önemli kaynağıdır. Bitkilerden elde edilen doğal pigmentlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar; sıcaklık, ışık, dar pH aralıklarında kararlı olma ve sudaki düşük çözünürlüktür. Bu nedenlerden dolayı, mikrobiyal pigmentler daha fazla tercih edilmektedir (Raisainen *et al.* 2002). Bununla beraber, mikrobiyal pigment üretimi kimyasal pigment üretimi ile kıyaslandığında, maliyet açısından daha verimli ve çevre dostu bir prosestir. Çünkü mikroorganizmalar maliyeti düşük olan kültür ortamlarında kolayca üretilebilmektedir (Dufosse 2009).

Bakterilerin ve fungusların çoğu, antikanser özelliklere sahip gıda renklendirici pigmentlere sahip olduklarından dolayı, ilgiyi sürekli üzerlerinde toplamışlardır. Bu metabolitler, pro-A vitamini içermekte olup, ışığa, sıcaklığa ve pH'a karşı stabilite gibi önemli özelliklere sahiptir (Joshi *et al.* 2003). Özellikle, gıda endüstrisinde bunların

yaygın kullanılmasıyla beraber, sentetik renklendiricilerin kullanımının önüne geçilmiş ve bu da insan sağlığına olan olumsuz etkilerin engellenmesini ortaya çıkarmış, aynı zamanda dolaylı olarak biyolojik çeşitliliğin korunmasına da katkı sağlamıştır. Bu doğal renklendiriciler bebek mamasında, kahvaltılık gevreklerde, makarnalarda, soslarda, işlenmiş peynirlerde, meyve içeceklerinde, vitamin bakımından zenginleştirilmiş süt ürünlerinde ve bazı enerji içeceklerinde kullanılmaktadır. Bu nedenle, çevre dostu olmasının yanı sıra doğal pigmentler; hem gıda ürünlerinde görsel olarak cezbedici renkler oluşturmakta hem de probiyotik özelliklerinden dolayı sağlık açısından oldukça yararlı etki göstermektedirler (Nagpal *et al.* 2011).

Melanin, riboflavin ve karoteonid gibi pigmentler mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve yaygın olarak bilinen pigmentlerdir (Dufosse 2009). Antioksidan özelliği olan melanin pigmenti, *Cryptococcus neoformans* mayası tarafından üretilirken (Wang and Casadevall 1994), *Rhodotorula glutinis* karotenoid pigmenti (Simova *et al.* 2004), *Candida guilliermundii* ve *Debaryomyces subglobosus* mikroorganizmaları ise yüksek oranlarda sarı renkli riboflavin pigmenti üretmektedir (Santos *et al.* 2005).

Dünya genelinde yüksek ekonomik değeri olan *Monascus* tarafından fermente edilen doğal pigmentler, renklendirme ajanı olarak oldukça cezbedici olup, yaygın olarak tercih edilmektedir. 1884 yılında Fransız bilim adamı Van Tieghem tarafından sınıflandırılan ve isimlendirilen *Monascus* cinsi; Eumycota şubesi, Ascomycotina alt şubesi, Plectomycetes sınıfı, Monascaceae ailesi olup, *Monascus floridanus*, *M. pallens*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. sanguineus*, *M. eremophilus*, *M. lunisporas* ve *M. argentinensis* mikroorganizmalarından oluşan dokuz tür içermektedir (Shao *et al.* 2011).

Monascus tarafından fermente edilen pirinçler Çin, Japonya ve Tayland gibi uzak doğu Asya ülkelerinde renklendirici besin maddesi olarak kullanılmaktadır (Lin *et al.* 2008). *Monascus* pigmentleri tıp, ilaç sanayi, kozmetik, gıda ve tekstil endüstrisinde geniş kullanım alanı bulmakta olup (Pattanagul 2002), gıda endüstrisinde tat ve aroma artırıcı, tekstil endüstrisinde renklendirme ajanı olarak yaygın kullanım alanına sahiptir (Juzlova

et al. 1996). Ayrıca tıp ve farmakoloji alanlarında da çeşitli hastalıklara karşı önlem ve tedavi amacıyla tercih edilmektedir.

Azaphilone iskeleti ihtiva eden *Monascus* pigmentlerinin üretimi ucuz substratlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Campoy *et al.* 2006). Spesifik koşullar altında üretildiğinde oldukça güvenilir olan pigmentlerin, suda ve etanolde çözünürlükleri oldukça iyidir (Lin and Iizuka, 1982). *Monascus* türlerinin her biri poliketid kökenli bileşene sahip olan kırmızı, sarı ve turuncu pigment karışımının dışında çeşitli renksiz metabolitler de üretmektedir (Sweeny *et al.* 1981).

Monascus purpureus ve *M. ruber* tarafından üretilen ve renk yoğunluğu spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda tespit edilen turuncu pigmentler, oxo-lakton halkasına sahip Monascorubrin ve Rubropunctatin'i içermektedir (Zhou *et al.* 2009). Suda çözünmeyen ve aminofil yapısı içeren turuncu pigmentler, poliketidsentaz I'in çoklu enzim kompleksi tarafından sitozolde asetil KoA'dan sentezlenmektedir. Sıcaklık hassasiyeti yüksek olan bu pigmentler, pH 2-10 değerleri arasında stabil olmayıp, ışığa maruz kalma süreleri arttıkça renklerinde de deformasyonlar oluşur. Ayrıca ortamda amino grubu içeren protein, amino asit ve nükleik asitlerle reaksiyona girdikleri zaman da kırmızı pigmente dönüşürler. Bu şekilde de suda çözünür hale gelirler (Wong and Koehler 1983).

Monascorubramine and Rubropunctamine adı verilen kırmızı pigmentler, turuncu pigmentlerin oksidasyonu sonucunda oluşur. Ekstrasellüler olarak sentezlenen bu pigmentler, toksik değildir ve geniş pH aralıklarında stabilitesini korurlar (Pattanagul 2007). Suda ve alkolde çözünürlüğü iyi olan bu pigmentler, 15 dk boyunca 100°C sıcaklığa maruz bırakıldığı zaman, siyah renge dönüşürler (Pastrana *et al.* 1994; Blanc *et al.* 1994). Turuncu pigmentlere nazaran çok daha az miktarda antimikrobiyal etkisi olan kırmızı pigmentler, N-bütanol gibi organik çözücülerle muamele edildiği zaman, güneş ışığında birkaç ay boyunca stabil kalabilirler (Kim *et al.* 2006).

Sarı pigmentler; Ankaflavin, Monascidin A (citrinin), Rubropunctatin, Monascin C ve Monascorubrin içeren azofilon heksaketid pigmentlerinin indirgenmiş formlarıdır (Cheng *et al.* 2010). Sarı pigment olan ankaflavin, apoptoz ile ilişkili bir mekanizma ile kanser hücre hatlarına selektif sitotoksosite göstermekte olup, normal fibroblastlar için nispeten düşük toksisite sergilerler. Bu pigmentin yapısal analogu olan monascin, hiçbir hücre hattında sitotoksosite göstermez (Su *et al.* 2005).

Biyoteknolojik proseslerde mikroorganizmalar kullanılarak, atıkların ürünlere dönüşümüne yönelik çalışmalar son yıllarda ciddi artış göstermiştir. Bununla birlikte, tatlı ve baklava endüstrisinin atığı olarak kabul edilen şerbetin mikrobiyal çalışmalarda substrat olarak kullanımına yönelik literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Özellikle ülkemizde, baklava, tel kadayıf, ekmek kadayıfı, künefe, tulumba ve lokma gibi tatlılar yaygın olarak üretilmekte olup, bunların hazırlanması esnasında şerbet adı verilen ve şeker bakımından son derece zengin olan bir sıvı katılmaktadır. Tüketimden sonra, şerbet herhangi bir amaçla kullanılmamakta ve atık olarak (Örneğin 5 kg baklava için yaklaşık 250 mL) kabul edilmektedir. Herhangi bir kullanım alanı bulunmayan bu atık şerbetin organik asit, mikrobiyal lipit, *Monascus* pigmentleri, tek hücre proteini ve polisakkarit gibi değerli maddelerin üretiminde substrat olarak kullanılabilirdiği muhtemeldir. Bu yüzden mevcut çalışmada baklava tüketiminden sonra açığa çıkan atık şerbetin; sitrik asit, etanol, levan ve pigment üretiminde substrat olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mikroorganizmalar tarafından farklı substratların kullanımı ve bunların ürüne dönüşümüne yönelik çok sayıda çalışma bulunmakta olup, bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Demirel *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada, kalsiyum alginat ile tutuklanmış *Aspergillus niger* sporları ile sitrik asit üretimi araştırılmıştır. Başlangıç sükröz konsantrasyonu (100–180 g/L), azot konsantrasyonu (0–0,3 g/L), metanol konsantrasyonu (0–6 mL) ve etanol konsantrasyonu (0–5 mL) değerleri arasında olan 100 mL besiyeri ortamında sitrik asit üretiminin optimum koşulları tespit edilmiştir. Başlangıç sükröz konsantrasyonu (140 g/L) ve azot konsantrasyonu (0,05 g/L) optimize edilmiş, ortama 4,0 mL metanol veya 3,0 mL etanol eklendiği durumlarda ise maksimum sitrik asit sentezinin gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Imandi *et al.* (2008) tarafından yapılan çalışmada, *Yarrowia lipolytica* mikroorganizması ile ananas atıklarının substrat olarak kullanılmasıyla katı kültür fermantasyonunda gerçekleştirilen sitrik asit üretimi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Plackett-Burman tasarımı kullanılarak maya özütü, substratın nem içeriği, KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 'ın sitrik asit üretimini önemli ölçüde etkileyen değişkenler olduğu tespit edilmiş ve sonrasında bu değişkenler, merkezi bir tasarım kullanılarak optimize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen proseste 202,35 g/kg (üretilen sitrik asit/substrat olarak kullanılan ananas) üretim gerçekleştirilmiştir.

Barrington *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada, *A. niger* NRRL 567 mikroorganizması ve turba yosunlarını substrat olarak kullanarak sitrik asit sentezinin optimizasyonu amaçlanmıştır. Yapılan deney düzeneğinde havalandırma hızı, yatak derinliği ve sıcaklık parametreleri araştırılmıştır. Optimum değerler havalandırma hızı için 0,84 vvm, yatak derinliği için 22 cm ve sıcaklık için 32°C olarak belirlenmiş, bu optimum

değerlerle gerçekleştirilen sentez işlemi sonrasında tahmini sitrik asit üretimi 120 g/L olarak bildirilmiştir.

Yalcin *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Y. lipolytica* 57 suşu ile peyniraltı suyu ve üzüm şırası substrat olarak kullanılarak sitrik asit sentezi gerçekleştirilmiştir. *Y. lipolytica* 57 ile gerçekleştirilen sentez işleminde peyniraltı suyuna fruktoz ilavesi sonucunda 49,23 g/L ve üzüm şırası eklenmesinde ise 32,09 g/L sitrik asit elde edilmiştir.

Nadeem *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, *A. niger* M-101 suşu ile şeker pancarı melası (şeker konsantrasyonu 150 g/L, 30°C, pH 4 ve 200 rpm) kullanılarak gerçekleştirilen sentez işleminde 27,25 g/L sitrik asit birikimi, % 1,5 metanol ve % 1 etanol ilavesi sonucunda sırasıyla 49,33 g/L ve 40,85 g/L sitrik asit eldesi gözlemlenmiştir.

Majumder *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, *A. niger*'in 14/20 ve 79/20 mutantları ile şeker bakımından zengin iki farklı substrat olan balkabağı ve şeker kamışı melasının hidroliz edilmesiyle sitrik asit sentezi gerçekleştirilmiştir. *A. niger* 14/20 ile gerçekleştirilen sentezde 14,86 mg/ml ve *A. niger* 79/20 ile gerçekleştirilen sentez işleminde ise 14,44 mg/mL sitrik asit eldesi gözlemlenmiştir.

Javed *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, UV ve kimyasal mutajenler kullanılarak yüksek sitrik asit üretme kabiliyetine sahip mutantlar elde edilmiştir. Mutantlar ile katı hal fermantasyonunda substrat olarak şeker kamışı melası (%10 şeker), mısır koçanı, muz sapları, buğday samanı ve buğday kepeği kullanılmıştır. Maksimum sitrik asit üretimi, muz saplarının substrat olarak kullanıldığı *A. niger* EB-3 mutanı ile 5 mL inokulum, 35°C'de, pH 6'da ve 72 saat sonunda 67,72 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Acourene *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışmada, *A. niger* ATCC 16404 suşu ile hurma şurubu kullanılarak sitrik asit sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, vejetatif inokulum kullanılmış, metanol, NH₄NO₃ ve optimum pH değerleri sırası ile %3, 2,5 g/L ve 3,5 olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullar altında 96 g/L sitrik asit sentezinin gerçekleştiği belirtilmiştir.

Kareem and Rahman (2011) tarafından yapılan çalışmada, muz kabukları kullanılarak, %1 metanol ve 10 ppm Cu ilavesi ile 30°C'de 96 saat sonunda *A. niger* UABN 210 suşunda 82,0 g/kg (kuru ağırlık) sitrik asit birikimi gözlemlenmiştir.

Acourene and Ammouche (2012) tarafından yapılan çalışmada, *A. niger* ATCC 16404 suşu ile hurma atıkları kullanılarak gerçekleştirilen maksimum sitrik asit üretimi, 30°C, 150 g/L şeker konsantrasyonunda, pH 3,5 ve 144 saat sonunda %3 metanol ilavesi ile 126,4 g/L olarak elde edilmiştir.

Dhillon *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada, elma posası ile zenginleştirilmiş sanayi atık suları kullanılarak gerçekleştirilen sitrik asit sentezinde 30°C, pH 3,5 ve %3 metanol içeren ortamda 120 saat sonunda 11.34 g/L verim elde edilmiştir.

Gopinadh *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, mutant *A. niger* MTCC 282 mikroorganizması ile gerçekleştirilen sitrik asit sentez işleminin optimizasyon çalışması amaçlanmıştır. Sitrik asit üretimi için kimyasal parametrelerin optimizasyonu Box-Behnken metodu ile gerçekleştirilmiştir. Optimum amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), magnezyum (Mg²⁺), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve potasyum fosfat (KH₂PO₄) miktarları maksimum sitrik asit üretimi için araştırılmıştır. Bu değerler sırasıyla 0,2138 g/L, 0,1896 g/L, 0,3968 g/L ve 3 g/L olarak tespit edilmiştir. pH 4 ve bu optimum parametre değerlerinde gerçekleştirilen proses sonucunda 75 g/L sitrik asit elde edilmiştir.

Khatab *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, hem taze portakallardan hem de topraktan *A. niger* fungusları izole edilmiş olup, bunların farklı koşullarda sitrik asit üretme kabiliyetleri araştırılmıştır. İki farklı kaynaktan izole edilem fungusların, pH 5 ve 6 değerlerinde, 30°C'de, %1 inokülüm miktarında ve 168 saat inkübasyon sonucunda maksimum sitrik asit ürettiği belirlenmiştir.

Sun *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, kitin sentaz geninin *A. niger* ile sitrik asit üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kitin sentaz geni susturulmuş fungusun

viskozitesinde azalma, oksijen ve kütle transfer verimlerinde ise artış gözlemlenmiştir. Mutant mikroorganizma %42,6 daha fazla sitrik asit sentezlemiştir. Bununla beraber, glukoz dönüştürme oranı yabani suşa kıyasla mutant mikroorganizmada %3,6 oranında artmıştır.

Papadaki and Mantzouridou (2019) tarafından yapılan çalışmada, şeker bakımından zenginleştirilmiş olan atık suların substrat olarak kullanılmasıyla *A. niger* tarafından sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Sıvı kültür ortamında 100 g/L sükröz ve 1,1 g/L NH_4NO_3 ilave edilmesi sonucunda 0,56 g/g verimle 85 g/L sitrik asit birikimi gözlemlenmiştir. Ayrıca, sonuçlar yüksek ölçeklerde yapılan deneylerle doğrulanmış olup, kimyasal oksijen gereksinimi ve fenolik içeriğin sırasıyla %78 ve %64 oranında azalma gösterdiği saptanmıştır.

Ozdal and Kurbanoglu (2019) tarafından yapılan çalışmada, şeker pancarı melası ve tavuk tüyü peptonu sırasıyla karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılarak sitrik asit sentezi incelenmiştir. Sitrik asit verimini artırmak amacıyla *A. niger* MO-25 mikroorganizması etidyum bromid ile muamele edilmiştir. Mutant fungus ile gerçekleştirilen sentez işlemi sonrasında maksimum sitrik asit eldesi 4 g/L tavuk tüyü peptonu ile 168 saat sonunda tespit edilmiştir. Bununla beraber, 0,15 g/L KH_2PO_4 eklenmesi ile 68,8 g/L sitrik asit üretimi gerçekleşmiştir.

Ma *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada, steril olmayan fermantasyon ortamında mutfak atıklarının substrat olarak kullanılması ile etanol fermantasyonun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yüzden, mikroorganizma olarak aside toleranslı *Zymomonas mobilis* seçilmiştir. Gerçekleştirilen fermantasyon prosesi ile aside toleranslı mikroorganizma kullanımının etanol verimini artırabileceği, mutfak atıklarının substrat olarak kullanımının ise etanol üretim maliyetini azaltabileceği sonucuna varılmıştır.

Breisha (2010) tarafından yapılan çalışmada, %30 sükröz içeren besiyeri ortamında *S. cerevisiae* mikroorganizması ile gerçekleştirilen etanol üretimi üzerine tiaminin etkisi araştırılmıştır. Fermantasyon ortamına 0,2 g/L tiamin ilave edilmesi ile 48 saat sonunda

%74 teorik verim elde edilmiş (%14 etanol konsantrasyonu) ve fermantasyon verimliliği artırılmıştır. Daha yüksek konsantrasyonda tiamin ilavesi (0,3 g/L) mikroorganizma büyümesini ve şeker tüketimini olumlu yönde etkilemesine rağmen etanol üretimini negatif olarak etkilemiştir.

Arapoglou *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, patates kabuğu substrat olarak kullanılarak etanol üretimi amaçlanmıştır. İlk olarak patates kabuğu 121°C derecede 15 dakika boyunca HCl ile hidroliz edilmiştir. Hidroliz işleminden sonra fermente edilebilir şeker miktarı 18,5 g/L olarak ölçülmüş ve fermantasyon işlemi sonrasında ise 4,06 g/L olarak tespit edilmiştir. *S. cerevisiae* mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilen 48 saatlik fermantasyon işlemi sonrasında maksimum etanol konsantrasyonu 6,97 g/L olarak bildirilmiştir.

Hashem and Darwish (2010) tarafından yapılan çalışmada, patates fabrikasından elde edilen nişasta atıkları kullanılarak etanol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için ticari suş ve y-1646 kodlu iki farklı *S. cerevisiae* mayası kullanılmıştır. En yüksek etanol konsantrasyonu y-1646 kodlu mikroorganizma kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon işlemi sonucunda ve 35°C sıcaklıkta 5,52 g/L olarak elde edilmiştir.

Rodríguez *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, üzüm ve şeker pancarı posasından *S. cerevisiae* mikroorganizması kullanılarak katı hal fermantasyonunda biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamının pH değeri 4,5 olarak ayarlanmış ve ortamın şeker içeriği ise %16,5 olarak belirlenmiştir. En yüksek etanol veriminin 48 saat sonunda %82 den fazla olduğu tespit edilmiştir.

Lin *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada, *S. cerevisiae* BY 4742 mayası kullanılarak gerçekleştirilen etanol fermantasyonuna sıcaklık ve pH değerinin etkisi araştırılmıştır. Maksimum etanol üretimi farklı şeker konsantrasyonu içeren ortamlarda 30°C ile 45 °C sıcaklık değerleri arasında ve pH 5 değerinde gerçekleşmiştir.

Togarepi *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada, *Ziziphus mauritiana* meyvesinin posası substrat olarak kullanılarak etanol fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu sentez işlemi için *S. cerevisiae* NA 33 mayası kullanılmıştır. Maya inokülasyon oranı, pH ve sıcaklık değerlerinin üretilen etanol konsantrasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada pH 6 ve 30°C sıcaklık değerlerinde 20 g meyve posası başına 8 gram maya inoküle edildiğinde 63 g/L ile en yüksek etanol konsantrasyonu elde edilmiştir.

Corbin *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, substrat olarak üzüm posası kullanılmış ve üzüm posasının %31-54'ünün karbonhidrattan oluştuğu ve bu karbonhidratın %47-80'inin sulu ortamda çözünebildiği gözlemlenmiştir. 0,5 M sülfürik asit ile gerçekleştirilen ön işlem sonucunda glukoz miktarında %10 artış tespit edilmiştir. Üzüm posasının substrat olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen fermantasyon prosesi ile üretilen etanol miktarı teorik olarak 400 L/t olarak elde edilmiştir.

Bahry *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, katı halde bulunan keçi boynuzu atıkları substrat olarak kullanılmış, batık kültür ve katı hal fermantasyonlarının avantajlı ve dezavantajlı yönleri etanol verimi bakımından karşılaştırılmıştır. Keçi boynuzu atıklarının substrat olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen fermantasyon proseslerinin sonucunda, katı hal fermantasyonunun daha verimli ve maliyet açısından daha uygun olduğu tespit edilmiştir.

Okamoto *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, laktozu fermente edebilen *Neolentinus lepideus* mikroorganizmasının etanol üretme potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada, karbon kaynağı olarak laktoz içeren peynir altı suyu ve son kullanma tarihi geçmiş inek sütü kullanılmıştır. Fermantasyon işlemi sonucunda *N. lepideus* fungusunun peynir altı suyundan 0,35 g etanol/g laktoz veriminde etanol ürettiği bildirilmiştir.

Liu *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, *S. cerevisiae* mayası ile gerçekleştirilen etanol fermantasyonunda daha yüksek verimlerde ürün elde etmek için CRISPR/Cas9 sistemine bağlı olarak gen susturma işlemi gerçekleştirilmiştir. Alkol dehidrojenaz, gliserol-3-fosfat dehidrojenaz ve aldehit dehidrojenaz genleri ayrı ayrı ve kombinasyonel

olarak susturulmuştur. Bu işlemler sonrasında yabancı suşa kıyasla 1,41 kat daha fazla etanol üretimi gerçekleştirebilen suşların elde edildiği bildirilmiştir.

Hashem *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, *S. cerevisiae* KKUY-0301 mikroorganizması ile nişasta bakımından zengin olan atıklardan biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Teorik olarak şekerlerin etanole dönüşüm hızınının %82 olduğu çalışmada, 27 g şekerden 11,5 g/L etanol üretilmiştir. Maksimum etanol üretimini teşvik eden parametreler 4 gün inkübasyon süresi, pH 5, 35 °C ve %5 maya inokülümü olarak belirlenmiştir.

Oliveira *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmada, farklı karbon kaynaklarının (ticari sakkaroz, melas ve şeker pancarı şurubu) ve fermantasyon ortamındaki diğer bileşenlerin *Z. mobilis* ile gerçekleştirilen levan üretimi üzerindeki etkisini tespit etmek için faktöryel deney tasarımı kullanılmıştır. Ticari sakkaroz ve şeker pancarı şurubu kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyona kıyasla melas kullanılarak gerçekleştirilen proseste daha düşük levan konsantrasyonu elde edilmiştir. Sakkaroz içeren ortamda, maya ekstraktı ve KH_2PO_4 'ın, şeker pancarı şurubu içeren ortamda ise maya ekstraktı ve MgSO_4 'ın önemli değişkenler olduğu sonucuna varılmıştır.

Chiang *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada, sürekli sistemde gerçekleştirilen levan sentezi için *Z. mobilis* mikroorganizmasından elde edilen levansükraz enzimi immobilize edilmiştir. Levansükraz enzimini kitinin bağlayıcı kısmıyla birleştirmek için *Escherichia coli* bakterisinden çözünebilir formda hibrit protein üretimi gerçekleştirilmiş ve bu sayede hibrit proteinlerin kitin boncuklarına direk adsorpsiyonu sağlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda enzim ile kitin boncukları arasındaki bağın kararlı olduğu tespit edilmiştir. %20 sükröz içeren besiyeri ortamında gerçekleşen sentez işlemi sonucunda immobilize olmayan enzimlerle karşılaştırıldığında çok daha yüksek bir değer olan 83 g/L levan konsantrasyonu elde edilmiştir. Sonuç olarak, immobilize enzimler 7 kez art arda kullanılarak toplamda 480 g/L levan üretimi olduğu bildirilmiştir.

Jathore *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada, *Pseudomonas fluorescens* ile gerçekleştirilen levan üretimi için optimizasyon yapılmıştır. Optimize edilmiş besiyeri ortamının kompozisyonu 60 g/L sakkaroz, 1,5 g/L amonyum klorür, 2,0 g/L sodyum nitrat ve 15,0 g/L kazein pepton olarak bildirilmiştir. Optimize edilmiş ortam ile gerçekleştirilen proses sonucunda levan üretiminin 5,27 g/L'den 15,42 g/L'ye çıktığı tespit edilmiştir.

Huang *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada, tuzlu sudan izole edilen *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 mikroorganizması ile gerçekleştirilen levan üretimine farklı faktörlerin etkisi araştırılmıştır. %50 sakkaroz içeren besiyeri ortamında ve pH 7,0 başlangıç değerinde yüksek bir levan konsantrasyonu (145.94 g/L) elde edilmiştir. Levan üretim verimliliğinin 3,92 g/L/h olduğu belirlenmiş ve üretilen levanın molekül ağırlığının artan sıcaklık ve sakkaroz konsantrasyonu ile azaldığı (13,45 kDa'dan 2,96 kDa'ya) tespit edilmiştir.

Santos *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada, sodyum-aljinata immobilize edilmiş *Z. mobilis* mikroorganizmasının levan üretme kabiliyeti incelenmiştir. %35 sükroz içeren fermantasyon ortamının pH değeri 5 olarak ayarlanmış ve 48 saat sonunda 22,39 g/L levan konsantrasyonu elde edilmiştir. Bununla beraber, fermantasyon süresi boyunca sodyum-aljinat boncukları içindeki hücre miktarının 10^7 kob/ml değerinden 10^9 değerine çıkması bu mikroorganizmaların sodyum-aljinat'a iyi bir şekilde tutunup gelişebildiğinin göstergesi olduğu bildirilmiştir.

Lorenzetti *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, aljinat/PVA ile immobilize edilmiş *Z. mobilis* CCT 4494 mikroorganizmasının levan üretme potansiyeli araştırılmıştır. 30°C sıcaklık, pH 7,0 başlangıç değeri, %30 başlangıç sakkaroz konsantrasyonu ve 24 saat inkübasyon süresi ile gerçekleştirilen sentez işlemi sonucunda 18,66 g/L maksimum levan konsantrasyonu ve 1,55 g/L/h verimlilik elde edilmiştir.

Srikanth *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, *Acetobacter xylinum* NCIM 2526 mikroorganizması kullanılarak gerçekleştirilen levan üretimi araştırılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları sonucu maksimum levan konsantrasyonunun 0,54 g/L'den 13,25 g/L'ye çıktığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber, üretilen levanın antioksidan aktivitesi incelenmiş ve 1 mg/mL levanın aynı konsantrasyondaki askorbik asit çözeltisinin %81,26'sı kadar antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Han *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, Tibet kefirinden izole edilen BD 1707 kodlu suş *Leuconostoc citreum* olarak tanımlanmış ve bu mikroorganizmanın %15 oranında sükröz ilave edilmiş olan domates suyundaki levana üretme potansiyeli araştırılmıştır. 30°C sıcaklıkta ve 96 saat boyunca gerçekleşen fermantasyon işlemi sonrasında *Leuconostoc citreum* BD 1707 mikroorganizmasının 28 g/L'den fazla levana ürettiği bildirilmiştir. NMR ve FTIR gibi analizler sonucunda üretilen levanın moleküler kütlesi yaklaşık olarak 4,3 x 10⁶ Da olarak tespit edilmiştir.

Hamid *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* B 58 kullanılarak gerçekleştirilen levana üretim prosesinin optimizasyonu amaçlanmıştır. İlk olarak levana üretimini etkileyen temel bileşenlerin (sükröz, maya ekstraktı, K₂HPO₄ ve MgSO₄·7H₂O) optimizasyonu kesirli çok etkenli deney tasarımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında Box-Behnken metodu ile gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda levana üretiminin %61,4 oranında artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Son optimizasyon çalışması kontrol edilen ve kontrol edilmeyen pH koşullarında yapılmış, nihai olarak levana üretiminin %97,4 oranında olduğu tespit edilmiştir.

Gojgic-Cvijovic *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, şeker pancarı melası substrat olarak kullanılarak *B. licheniformis* NS 032 mikroorganizması ile levana üretimi gerçekleştirilmiştir. Yüksek polisakkarit verimi, seyreltilmiş melasa ticari sükröz ve K₂HPO₄ ilavesi ile elde edilmiştir. Yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilen parametreler sonucunda (%62,6 şeker, 4,66 g/L fosfat ve pH 7,2) 532 g/L konsantrasyonda levana eldesi sağlanmıştır. Bununla beraber, optimize edilmiş ortamda gerçekleşen fermantasyonda daha hızlı bakteri gelişimi gözlemlenmiş ve polisakkarit üretimi daha kısa zaman aralığında gerçekleşmiştir.

Silveira *et al.* (2008) tarafından yapılan çalışmada, üzüm atığı substrat olarak kullanılmış ve *Monascus purpureus* tarafından pigment üretimi gerçekleştirilmiştir. Proses parametreleri faktöriyel tasarım ve yanıt yüzey yöntemleri kullanılarak optimize edilmiştir. Gerçekleştirilen optimizasyon işlemleri sonucunda, pepton konsantrasyonunun pigment üretimindeki en önemli parametre olduğu sonucunda varılmıştır. Pigment üretiminde optimum pepton konsantrasyonu 20-22,5 g/L olarak tespit edilmiştir.

Dikshit and Tallapragada (2013) tarafından yapılan çalışmada, izole edilen *Monascus* suşu moleküler olarak *Monascus sanguineus* olarak tanılanmıştır. İzole edilen ve tanılanan suş stres koşulları altında kırmızı pigment üretimi için bir referans suş olan *M. purpureus* MTCC 410 ile karşılaştırılmıştır. Her iki suş farklı sıcaklık, pepton, gliserol ve tuz konsantrasyonları gibi stres koşullarına maruz bırakılmıştır. 0,5 M gliserol konsantrasyonunda her iki suş için de maksimum pigment verimliliğinin elde edildiği (*M. sanguineus* için 33,4 CVU/mL, *M. purpureus* için 36,7 CVU/mL) rapor edilmiştir. Tuz konsantrasyonu için ise her iki suş %3 tuz konsantrasyonunda maksimum pigment üretimi gerçekleştirmiştir. %12 tuz konsantrasyonunda, her iki suşun gelişimi çok yavaş ve pigment üretimi neredeyse hiç görülmemiştir. Sporlar farklı sıcaklıklarla muamele edildiğinde *M. sanguineus*'un 90°C'de muamele edilen sporlarla maksimum pigment üretimi gerçekleştirmiş fakat *M. purpureus*'un canlılığını kaybettiği sonucuna varılmıştır.

Zhao *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, *Monascus* pigmentlerinden biri olan turuncu pigmentin *Escherichia coli* bakterisine karşı antagonistik etkisi araştırılmıştır. Turuncu pigment *E.coli*'ye karşı güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. Pigmentin bakteriye karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu 2,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucunda turuncu pigmentin bakteri hücrelerinin ölümüne neden olduğu anlaşılmıştır.

Haque *et al.* (2016) tarafında yapılan çalışmada, fırın depolarından toplanan çeşitli atıklar *M. purpureus* ile gerçekleştirilen katı hal ve batık kültür fermantasyonunda gıda ve tekstil endüstrilerinde kullanılabilecek pigment üretimi için substrat olarak kullanılmıştır.

Fermentatif pigment üretimi için *Aspergillus awamori* ve *Aspergillus oryzae* mikroorganizmalarının hidrolitik reaksiyonlarından elde edilen fırın atığı hidrolizatının fizibilitesi araştırılmıştır. Başlangıç konsantrasyonu olarak 5 g/L glukoz içeren fırın atığı hidrolizati ile en yüksek pigment veriminin (yaklaşık 24 U/g glukoz) elde edildiği tespit edilmiştir. 30°C inkübasyon sıcaklığı ve sırasıyla %55 ve %65 başlangıç nem konsantrasyonlarında gerçekleşen katı hal fermantasyonlarının sonucunda elde edilen glikoamilaz ve proteazın en yüksek aktivitesinin sırasıyla 8 U/g ve 117 U/g olduğu rapor edilmiştir.

Srianta *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, substrat olarak pirinç, mısır, bütün ve kabuğu alınmış sorgum tahıl kullanılarak *M. purpureus* mikroorganizması ile katı hal fermantasyonunda pigment üretimi gerçekleştirilmiş ve fermente ürünlerin pigment bileşimi araştırılmıştır. Pigment içeriği spektrometre ve ince tabaka kromatografisi kullanılarak belirlenmiş, pigment bileşimi ise tandem kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş sıvı kromatografi kullanılarak analiz edilmiştir. Mikroorganizmanın pirinç üzerinde daha iyi gelişim gösterdiği tespit edilmiş ve en iyi pigment üretimi pirinçte gözlemlenmiştir. Bununla beraber, kabuğu alınmış sorgum tahılın diğer fermantasyon ürünlerine nazaran daha fazla miktarda rubropunktatin içerdiği sonucuna varılmıştır.

Koli *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, antifungal madde olan flukonazolün *M. purpureus* ile üretilen kırmızı pigment üzerine etkisi araştırılmıştır. Optimize edilen flukonazol konsantrasyonunda, 96 saat sonunda pigment üretiminin %88 oranında arttığı ve 168 saate kadar sabit kaldığı tespit edilmiştir. Üretilen kırmızı pigmentin analizi ince tabaka kromatografisi, UV spektroskopisi ve kütle spektrometrik analizi yöntemleri ile yapılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Laboratuvar gereçleri

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Cihazlar	Marka
Otoklav	HMC Hirayama
Çalkalamalı inkübatör	ZHWY 2102C
Saf su cihazı	Barnstead EASYpure UV/UF
Spektrofotometre	Beckman Coulter
pH metre	Schott ph-meter CG840
Hassas terazi	Ohaus Pioneer
Steril kabin	Telstar Bio-II-A
Magnetik karıştırıcı	Heidolph
Etüv	BINDER
Vorteks	Wisemix VM-10
Santrifüj	Hettich
Su banyosu	CB2 5Q2
Buzdolabı	Beko
ICP-MS	Agilent 7800 ICP-MS
Otomatik Pipet	Eppendorf

3.1.2. Kimyasal maddeler

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal	Üretici Firma
Patates dekstroz agar	Fluka
Patates dekstroz broth	Fluka
Bakteriyolojik agar	Oxoid
Bakteriyolojik pepton	Oxoid
Maya ekstrakt	Oxoid
Etanol	Sigma
Asetik anhidrit	Sigma
Piridin	Sigma
Potasyum dikromat	Sigma
Fenol (%80)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
H ₃ PO ₄	Sigma
H ₂ SO ₄	Sigma
NaOH	Sigma
HCl	Sigma
KOH	Sigma
D-(+)- Glukoz monohidrat	Sigma
Sükroz	Sigma

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

%96'lık EtOH solüsyonu: 96 mL saf EtOH'un, 4 mL saf su ile karıştırılması ile elde edildi.

%85'lik EtOH solüsyonu: 85 mL saf EtOH'un, 15 mL saf su ile karıştırılması ile elde edildi.

%85'lik H₃PO₄ solüsyonu: 85 mL saf H₃PO₄'in, 15 mL saf su ile karıştırılması ile elde edildi.

1 M HCl solüsyonu: 7,67-8 mL %36,5- 38'lik HCl'in, 100 mL saf su ile karıştırılması ile elde edildi.

1 M NaOH solüsyonu: 4 gr NaOH'in, 100 mL saf suda çözülmesi ile elde edildi.

2.5N KOH solüsyonu: 250 mL saf su içerisinde 40,78 g %86'lık KOH'un, çözülmesi ile elde edildi.

Kromik Asit solüsyonu: Kromik asit solüsyonu hazırlanırken, ilk olarak 34 gram potasyum dikromat 500 mL distile su içinde çözüldü. Daha sonra 325 mL H₂SO₄, solüsyona eklendi ve son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Şerbetin kimyasal içeriğinin belirlenmesi

3.2.1.a. Toplam şeker analizi

Şerbetin şeker analizi fenol-sülfürik asit yöntemine göre yapıldı. 0,1 mL şerbet 1,9 mL saf su ile karıştırıldı. Üzerine 50 µl %80 (w/v) fenol eklendi ve iyice karışması için vorteks işlemi uygulandı. Ardından, karışıma 2,0 mL saf sülfürik asit eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. İnkübasyon sonrasında, 490 nm dalga boyunda absorbans değeri, spektrofotometrede tespit edildi.

Şeker analizi için standart oluşturmak amacıyla, farklı konsantrasyonlarda glukoz solüsyonları hazırlandı. Her bir solüsyondan 0,1 mL alınarak, aynı işlemler uygulandı ve standart grafik elde edildi.

Şerbet içerisindeki toplam şeker miktarı, standart grafik kullanılarak belirlendi (BeMiller, 2010).

3.2.1.b. Toplam protein analizi

Şerbetin protein analizi Bradford Assay yöntemine göre belirlendi. İlk olarak Bradford reaktifi hazırlandı. Bunun için; 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %85'lik etanol ile karıştırıldı. 100 mL %85'lik H₃PO₄, elde edilen karışıma ilave edildi ve son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Standart hazırlamak için 1 mg sığır serum albümin (BSA), 1 mL saf su içerisinde çözüldü ve çözeltinin farklı konsantrasyonları hazırlandı. Her bir karışımdan 10 µl alınarak, 90 µl saf su ile karıştırıldı. Sonrasında karışımlara 4900 µl Bradford reaktifi eklendi ve 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, spektrofotometrede (595

nm) farklı konsantrasyonlardaki karışımların absorbands değerleri tespit edilerek, standart grafik oluşturuldu.

10 µl şerbet, 90 µl saf su ile karıştırıldı ve aynı işlemler tekrarlandı. Absorbans değeri tespit edildikten sonra, standart grafik kullanılarak şerbet içerisindeki toplam protein miktarı belirlendi (Bradford, 1976).

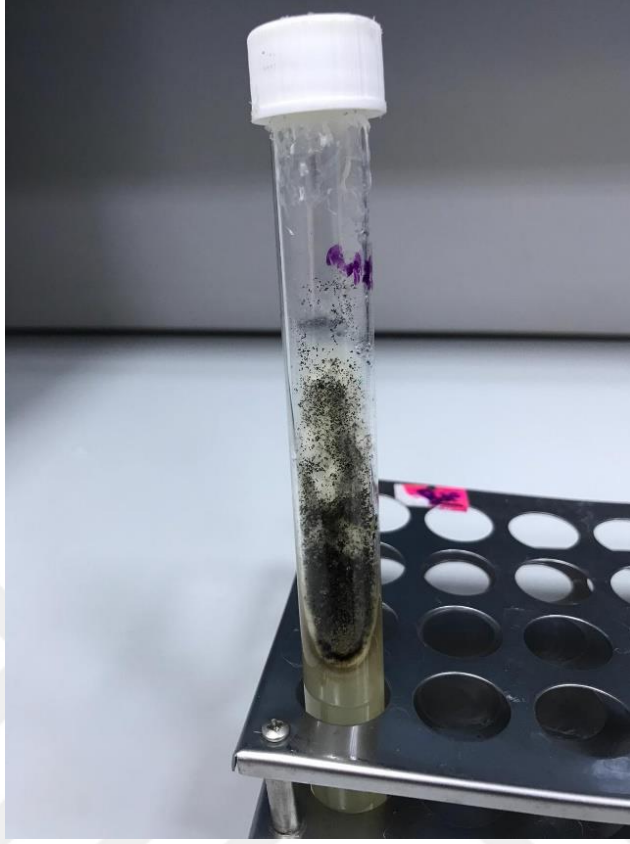
3.2.1.c. Element analizi

şerbetin element analizi İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) yöntemi ile geręekleřtirildi (Sneddon and Vincent, 2008).

3.2.2. Sitrik asit sentezi

3.2.2.a. Sentez işleminde kullanılacak mikroorganizmanın aktiveştirilmesi

Sitrik asit sentezinde standart suş olarak *Aspergillus niger* MT-4 (Taskin *et al.* 2013) küfö kullanıldı. Yatık agar kültüründe saklanmakta olan *A. niger* mikroorganizmasından aktarma iğnesi vasıtasıyla bir miktar alınarak, Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerine inoküle edildi. Ekim yapılan besiyeri 30°C'ye ayarlanmış olan inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilerek, küfün aktiveşmesi sağlandı.



Şekil 3.1. PDA besiyerindeki *Aspergillus niger*'in (MT-4) görüntüsü

3.2.2.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması

Farklı şerbet konsantrasyonlarına sahip [%5 (5 mL şerbet+95 mL saf su), 10, 15, 20, 25 ve 30 olmak üzere] besiyerleri erlenler içinde hazırlandı. 0,4 gr pepton tartılarak besiyerlerine ilave edildi. pH metre kullanılarak, her bir besiyerinin pH değeri 6'ya ayarlandı. Daha sonra erlenmayerler 121°C'de 15 dk boyunca otoklavlandı.

3.2.2.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon

Yatık agar içerisinde aktif hale getirilmiş olan *A. niger* küfüne, 10 mL steril fizyolojik su (%0.9 NaCl) ilave edildi ve homojen karışım sağlamak için 5 dk boyunca vorteks işlemi uygulandı. Bu homojen karışımdan steril koşullar altında 1 mL alınarak, bir önceki basamakta hazırlanan her bir besiyerine inoküle edildi. Ardından, erlenmayerler sitrik asit

sentezi için sıcaklık değeri 30°C olan çalkalamalı inkübatöre konuldu ve beş gün boyunca fermantasyon prosesine maruz bırakıldı.

3.2.2.d. Sitrik asit tayini ve kuru mikroorganizma ağırlığı

Aerobik koşullarda beş gün süren üretim prosesi sonrasında, sitrik asit tayini asetik anhidrit-piridin yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak, standart hazırlamak için 5 gr toz halinde bulunan sitrik asit, 100 mL saf su içerisinde çözöldü. Daha sonra, bu karışımın farklı konsantrasyonları (%10, 30, 50, 80 ve 100) tüpler içerisinde hazırlandı. Her bir tüpe 1,3 mL piridin ilave edildi ve vorteks işlemleri uygulanarak, iyi bir şekilde karışması sağlandı. Sonrasında, 5,7 mL asetik anhidrit her bir karışımına ilave edildi ve 25°C’de 30 dk boyunca su banyosunda bekletildi. Bu işlemten sonra, hazırlanan karışımların absorbans değeri 410 nm’de spektrofotometre kullanılarak belirlendi. Böylece, sitrik asit tayini için standart oluşturuldu.

Daha sonra, farklı şerbet konsantrasyonlarında gelişen *A. niger*’in ne kadar sitrik asit biriktirdiğini tespit etmek için her bir erlenenden 0,1 mL örnek alınarak, etiketlenmiş boş falkon tüpler içerisinde 0,9 mL saf su ile karıştırıldı. Sırasıyla, 1,3 mL piridin ve 5,7 mL asetik anhidrit her bir tüpe ilave edildi ve vorteks işlemleri uygulandı. Tüpler 30 dk boyunca su banyosunda 25°C’de inkübe edildi ve 410 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometre kullanılarak, her bir örnek için absorbans değeri belirlendi (Marier and Boulet, 1958).

Daha sonra, erlenmayerlerde bulunan örnekler süzgeçten geçirilip, üstte kalan baloncuk şeklinde olan *A. niger* küfleri kuruma işlemleri için 60°C’ye ayarlı inkübatörde bir gün süre ile bekletildi. Kuruma işleminden sonra, farklı şerbet konsantrasyonlarında gelişen *A. niger* mikroorganizmalarının kuru ağırlığı tespit edildi.

3.2.3. Biyoetanol fermantasyonu

3.2.3.a. Fermantasyon işleminde kullanılacak mikroorganizmanın aktive edilmesi

Etanol fermantasyonunda *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 mikroorganizması standart suş olarak kullanıldı. Yatık agar kültüründe saklanmakta olan *S. cerevisiae* mayasından 1 öze dolusu alınarak Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri petrilere inoküle edildi ve 30°C'de 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.2. PDA besiyerindeki *Saccharomyces cerevisiae*'ın (ATCC 4126) petri görüntüsü

3.2.3.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması

Şerbet konsantrasyonu farklı olan (%5, 10, 15, 20, 25 ve 30 olmak üzere) 100 mL üretim ortamı, 250 mL'lik erlenmayerler içerisinde hazırlandı ve her bir besiyerine protein kaynağı olarak 0,4 gr pepton ilave edildi. pH değeri 6 olarak ayarlanan besiyerleri sterilizasyon işlemi için otoklav cihazına konuldu ve sterilizasyon sonrasında oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

3.2.3.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon

PDA besiyerinde aktifleştirilmiş *S. cerevisiae* mayası, ön kültür için steril kabin içerisinde 50 mL Patates Dekstroz Broth (PDB) besiyerine transfer edildi. 1 gece boyunca sıvı besiyerinde gelişen mayadan 1 mL alınarak şerbet konsantrasyonu farklı olan üretim ortamlarına inokülasyon gerçekleştirildi.

S. cerevisiae mayasının inoküle edildiği besiyerleri, fermantasyon prosesi için 30°C'ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de 48 saat süre ile fermantasyon prosesine bırakıldı.

3.2.3.d. Etanol tayini ve kuru maya ağırlığının belirlenmesi

Bu anaerobik proses sonrasında, üretilen etanol miktarını tespit etmek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. İlk olarak, 34 gr potasyum dikromatın 500 mL saf su içerisinde çözülmesi ile hazırlanan çözeltiye, 325 mL H₂SO₄ eklendi ve total hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı (Kromik asit çözeltisi). Etil alkol için standart oluşturmak amacıyla, ticari olarak satın alınan saf etanol kullanılarak farklı konsantrasyonlarda etil alkol solüsyonları (%10, 30, 50 ve 70) hazırlandı. Test tüplerine 0,1 mL farklı konsantrasyonlarda etanol eklendi ve her tüpteki hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı. Ardından, her bir tüpe 5 mL kromik asit çözeltisi eklendi ve test tüpleri 20 dk boyunca 60°C'ye ayarlı su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra, her bir örnek için absorbans değeri 584 nm'de ölçülerek etanol tayini için standart oluşturuldu.

Ardından, şerbet konsantrasyonları farklı olan üretim ortamlarında gerçekleşen fermantasyon işlemi sonrasında üretilen etil alkol miktarını tespit etmek için kültür sıvıları, etiketlenmiş ve boş ağırlığı ölçülmüş falkon tüplerine aktarıldı. 6500 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Sonrasında, her bir örnek için süpernatant kısımdan 0,1 mL alınarak, test tüplerine transfer edildi ve son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı. Her tüpe 5 mL kromik asit çözeltisi eklenerek 20 dk boyunca 60°C'ye ayarlı

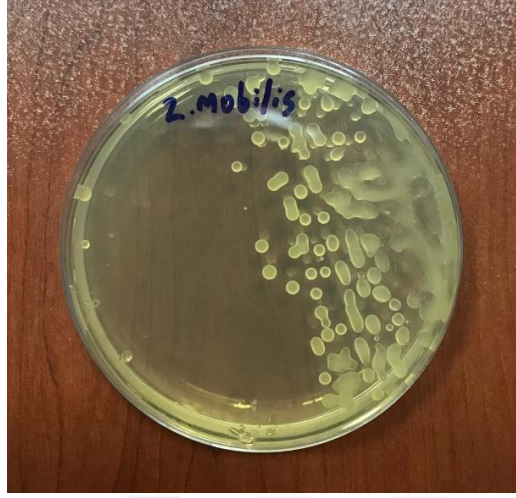
su banyosunda inkübe edildi. Ardından, örneklerin absorbands değeri 584 nm'de tespit edildi (Caputi *et al.* 1968).

Etil alkol miktarının belirlenmesinden sonra, kuru maya ağırlığını tespit etmek amacıyla falkon tüplerdeki süpernatant kısımlar uzaklaştırıldı. Tüpler kuruma işlemi için sıcaklık değeri 60°C olan etüve konuldu. Kuruma işlemi sonrasında her bir şerbet konsantrasyonunda gelişen kuru maya ağırlığı belirlendi.

3.2.4. Polisakkarit sentezi

3.2.4.a. Sentez işleminde kullanılacak mikroorganizmanın aktifleştirilmesi

Zymomonas mobilis DSM 12496 bakterisi DSMZ (Almanya) firmasından ticari olarak satın alındı. Ardından, içerisinde karbon kaynağı olarak sükroz içeren sıvı besiyerinde (Sükroz, 50 g/L; maya ekstrakt, 7,0 g/L; K₂HPO₄, 2,5 g/L; (NH₄)₂SO₄, 1,6 g/L; MgSO₄·7H₂O, 1 g/L) aktifleştirilerek, sükroz kaynaklı agar besiyerine inoküle edildi ve 30°C'ye ayarlı inkübatörde anaerobik koşullar sağlanarak 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, saf olan kolonilerden 1 öze dolusu alınarak, fermantasyon prosesinde ön kültür hazırlamak amacıyla tekrar sükroz kaynaklı sıvı besiyerine inoküle edildi. Daha sonra 30°C ve 150 rpm'e ayarlı çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, aktif hücreler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoğa alınarak -86°C'de depolandı.



Şekil 3.3. Sükroz kaynaklı besiyerindeki *Zymomonas mobilis*'in (DSM 12496) petri görüntüsü

3.2.4.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması

Farklı konsantrasyon değerlerine (%5, 10, 15, 20 ve 25 olmak üzere) sahip şerbet içeren 100 mL besiyeri ortamları 250 mL'lik erlenler içerisinde hazırlandı ve 0,4 gr pepton ile 0,4 gr maya ekstraktı ilave edildi. pH değeri 6 olarak ayarlanan besiyerlerini steril hale getirmek için erlenmayerler otoklav cihazına konularak, 121°C'de 15 dk süreyle steril edildi.

3.2.4.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon

Sükroz içeren sıvı besiyerinde 24 saat boyunca 30°C ve 150 rpm'de inkübe edilen bakteri ön kültüründen 1 mL alınarak steril hale getirilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuş besiyerlerine transfer edildi. Daha sonra, inokülasyon yapılmış besiyerleri 30°C ve 150 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 60 saat boyunca fermantasyon prosesine maruz bırakıldı.

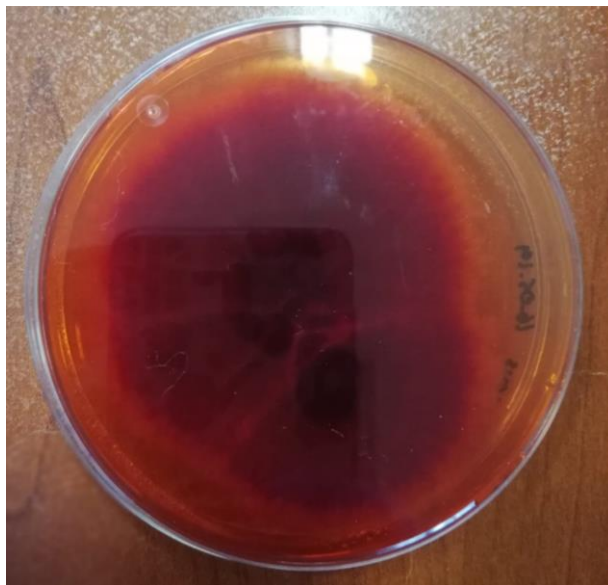
3.2.4.d. Levan tayini ve kuru bakteri ağırlığının belirlenmesi

Anaerobik koşullarda gerçekleşen proses sonrasında, üretim ortamları 6500 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Pellet kısımlar, kuru bakteri ağırlığının tespiti için 60°C’de kurutuldu. Levan ekstraksiyonu için ise, süpernatant kısımlar hacimce 3 kat olan saf etanol ile muamele edildi (100 mL süpernatant için 300 mL etanol). Oluşan karışımlar bir gece boyunca 4°C’de bekletilerek, 6500 rpm’de 15 dk süre ile santrifüjlendi. Süpernatant kısımlar uzaklaştırılıp, pellet kısımlar kuru levan ağırlığını belirlemek için 60°C’de kurumaya bırakıldı (Viikari, 1984).

3.2.5. Pigment üretimi

3.2.5.a. Pigment üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın aktive edilmesi

Pigment üretiminde *Monascus purpureus* ATCC 16365 küfün standart suş olarak kullanıldı. Yatık agar kültüründe saklanmakta olan mikroorganizmadan aktarma iğnesi vasıtasıyla bir miktar alınarak PDA besiyeri içeren petrilere inoküle edildi. Ekim yapılan petri 30°C’de 10 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.4. PDA besiyerindeki *Monascus purpureus*'un (ATCC 16365) petri görüntüsü

3.2.5.b. Fermantasyon ortamının hazırlanması

250 mL'lik erlenmayerler içerisinde hazırlanan ve farklı şerbet konsantrasyonlarına (%1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olmak üzere) sahip 100 mL besiyeri ortamlarına protein kaynağı olarak 0,4 gr pepton ilave edilerek, pH değeri 5,5'e ayarlandı ve 121°C'de 15 dk boyunca steril edildi.

3.2.5.c. Mikroorganizma inokülasyonu ve fermantasyon

PDA besiyerinde aktifleştirilen küf miselyumu içeren katı besiyeri steril lanset kullanılarak eşit parçalara ayrıldı ve üretim ortamlarına inoküle edildi. Daha sonra, erlenler 30°C ve 150 rpm'e ayarlı çalkalamalı inkübatörde 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.2.5.d. Pigment analizi ve kuru mikroorganizma ağırlığının belirlenmesi

Fermantasyon sonrasında, her bir üretim ortamından 10 mL kültür sıvısı alınıp, üzerine 20 mL etanol (%96) eklendi. Karışımlar, 180 rpm'de 30 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra, 5000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj işlemine maruz bırakıldı. Pigment analizi için süpernatant kısımlar, Whatman kağıdı ile süzüldü. Kırmızı pigment için 500 nm, turuncu pigment için 470 nm ve sarı pigment için 400 nm dalga boyunda absorbans değerleri spektrofotometre kullanılarak tespit edildi (De Santis *et al.* 2005).

Kuru mikroorganizma ağırlığını belirlemek için sıvı kültür ortamları süzgeçten geçirildi, üstte kalan miseller 60°C'ye ayarlı inkübatörde kurutuldu ve kuru ağırlık değerleri tespit edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Şerbetin kimyasal içeriği

Şerbetin hazırlanması sırasında 1 L suya 1,5 kg sükrözün eklenmesiyle toplam hacim yaklaşık olarak 2 L olmaktadır. Dolayısıyla 2 L hacimdeki toplam şeker içeriği 1,5 kg, litredeki ise 750 gr civarında olduğu düşünülmektedir. Mevcut çalışmada atık baklava şerbetindeki toplam şeker içeriğinin 870 g/L olduğu, düşük miktarda protein (3,4 g/L) ihtiva ettiği ve “K” gibi mineralleri içerdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Atık şerbetin kimyasal içeriği

İçerik	Miktar
Protein	3,4 g/L
Şeker	870 g/L
Ca	19256 ppb
Mg	3874 ppb
Na	23924 ppb
K	36877 ppb
Fe	211 ppb
Cu	50 ppb
Mn	56 ppb
Co	52 ppb

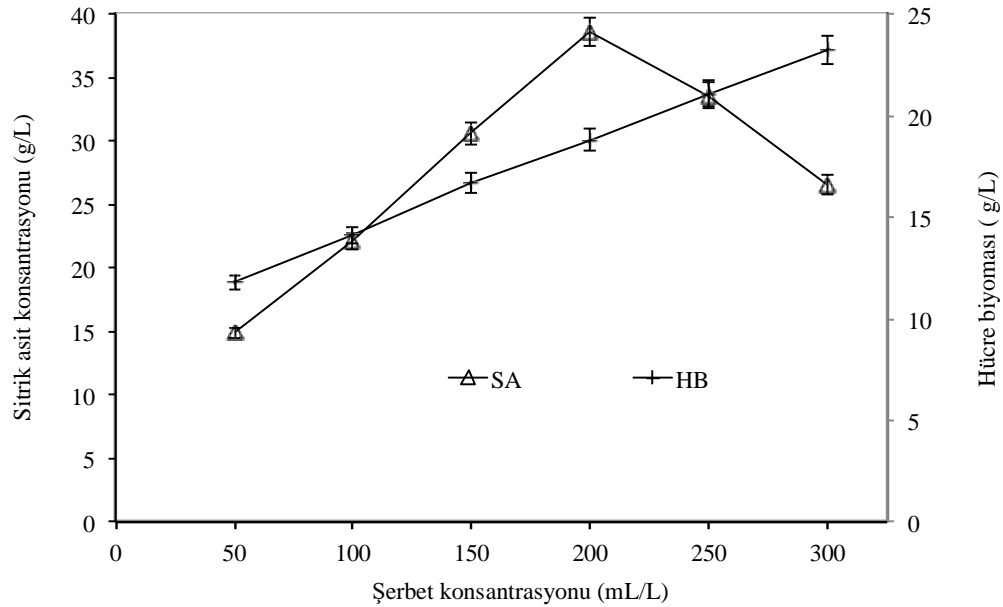
4.2. *Aspergillus niger* ile Fungal Biyomas ve Sitrik Asit Üretiminde Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı

Diğer kültür parametreleri sabit tutulup, besiyerine farklı konsantrasyonlarda (50-300 ml/L) şerbet eklendiğinde; 5 günlük inkübasyon periyodunun sonunda maksimum sitrik asit üretimine (38,6 g/L) 200 mL/L şerbet konsantrasyonunda ulaşıldığı görülmüştür. Daha yüksek şerbet konsantrasyonlarının (250 ve 300 mL/L) ise, sitrik asit üretimini azalttığı tespit edilmiştir. Sitrik asit üretiminin aksine 250 ve 300 mL/L'lik şerbet konsantrasyonlarında hücre büyümesinde artışlar gözlemlenmiştir. Diğer bir ifadeyle,

şerbetin bütün konsantrasyonlarının hücre büyümesinde sürekli artışa neden olduğu belirlenmiştir. Besiyerinde kullanılan optimal şerbet konsantrasyonunun (200 mL) 174 gram şeker içerdiği hesaplanmıştır (1 litre atık şerbet, 870 gram şeker içermektedir). Dolayısıyla, 174 gram şekerden, 38,6 gram sitrik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Sitrik asit verimi ise 0,22 g/g şeker (38,6 g:174 g) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. *Aspergillus niger*'de sitrik asit üretimi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi

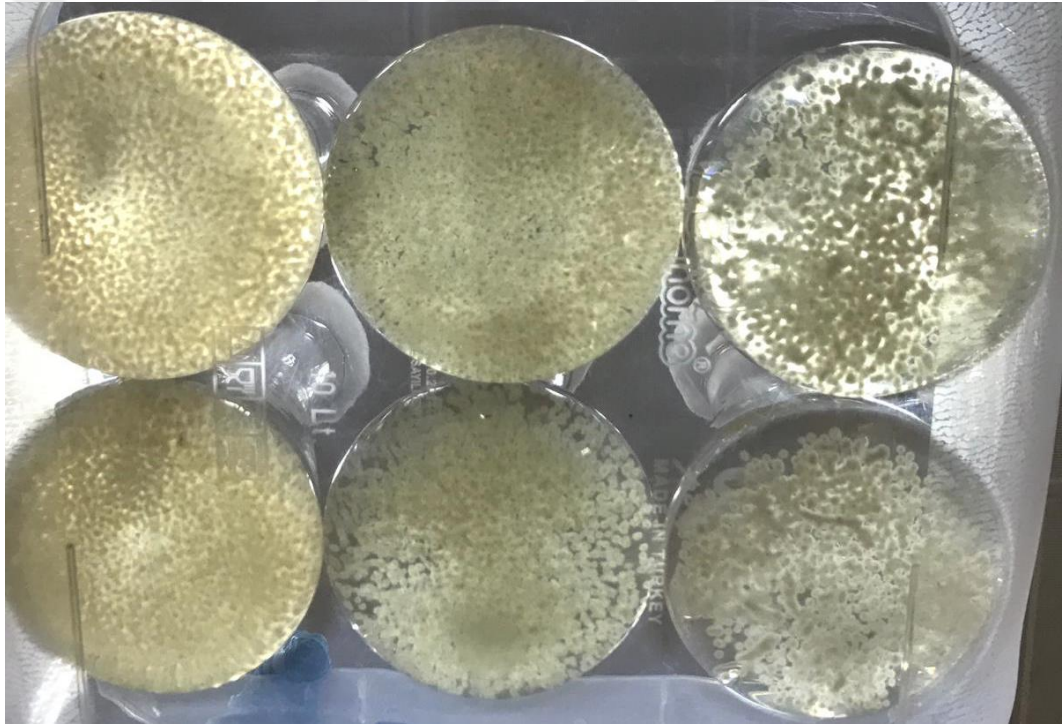
Şerbet Konsantrasyonu (mL/L)	HB (g/L)	SA (g/L)
50	11,8	14,9
100	14,1	22,1
150	16,7	30,6
200	18,8	38,6
250	21,1	33,6
300	23,2	26,6



Şekil 4.1. *Aspergillus niger*'de sitrik asit üretimi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi



Şekil 4.2. *Aspergillus niger*'in şerbet içeren kültürdeki beş günlük görüntüsü



Şekil 4.3. *Aspergillus niger*'in şerbet içeren kültürdeki misel peletlerinin genel görüntüsü

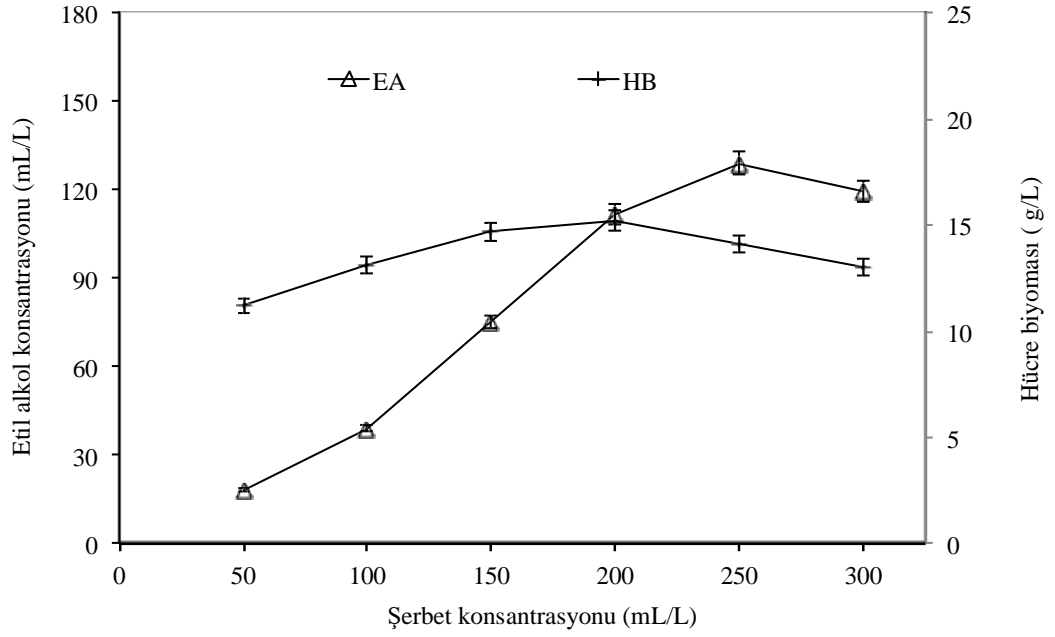
4.3. *Saccharomyces cerevisiae* ile Fungal Biyomas ve Etil Alkol Üretimi İçin Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı

Artan şerbet konsantrasyonları (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2) hücre biyomasını artırmış ve maksimum hücre biyomasına (15,2 g/L) 200 mL/L şerbet konsantrasyonu değerinde

ulaşmıştır. Daha yüksek şerbet konsantrasyonlarının ise, hücre biyomasını azalttığı belirlenmiştir. Etil alkol üretimi de yine artan şerbet konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiş, ancak hücre biyomasının aksine maksimum etil alkol konsantrasyonuna (129 mL/L) 250 mL/L şerbet konsantrasyonunda ulaşılmıştır. 129 mL/L olarak bulunan etil alkol konsantrasyonu, gram cinsinden ($d_{\text{etilalkol}} = m/V$ formülünde $d=0,789$) 101,8 gr/L olarak hesaplanmıştır. Diğer bir ifade ile 217,5 gr şerbet şekerinden (250 mL/L şerbet içeren besiyeri yaklaşık 217,5 gr şeker içermektedir), 129 mL/L (101,8 g/L) etil alkol üretilmiştir. Optimal şerbet konsantrasyonunda üretilen etil alkolün verimi ise; 0,47 g/g şeker (101,7:217,5) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. *Saccharmyces cerevisiae*'da etil alkol üretimi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi

Şerbet Konsantrasyonu (mL/L)	HB (g/L)	EA (mL/L)
50	11,2	18,3
100	13,1	39,2
150	14,7	75,4
200	15,2	111,6
250	14,1	129,0
300	13,0	119,4



Şekil 4.4. *Saccharomyces cerevisiae*'da etil alkol üretimi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi



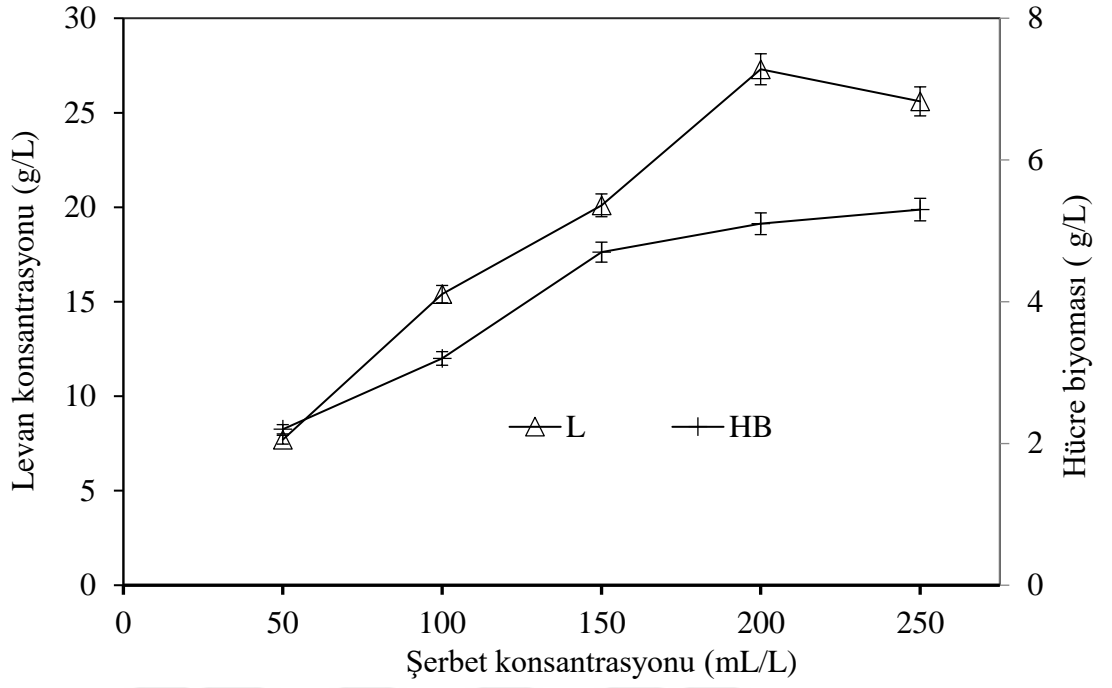
Şekil 4.5. *Saccharomyces cerevisiae*'nın şerbet içeren besiyerindeki 48 saatlik kültürü

4.4. *Zymomonas mobilis* ile Hücre Biyoması ve Levan Üretimi İçin Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı

Şerbet konsantrasyonundaki artış (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3), *Zymomonas mobilis* bakterisinin hücre biyomasında kademeli bir artışa neden olmuş ve maksimum hücre biyomasına, 250 mL/L şerbet konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Bu bakteri ile maksimum levan üretimi (27,3 g/L) ise, 200 mL/L şerbet konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Hücre biyoması 250 mL/L'nin, levan üretimi ise 200 mL/L'nin üzerindeki şerbet konsantrasyon değerlerinde azalma göstermiştir. Bu sonuçlar, 200 mL şerbet içeren besiyerinde (174 gr şeker) 27,3 g/L levan üretilebileceğini göstermiştir. Dolayısıyla, üretilen levanın verimi; 0,16 g/g şeker (27,3:174) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. *Zymomonas mobilis*'de levan sentezi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi

Şerbet (mL/L)	Konsantrasyonu	HB (g/L)	L (g/L)
50		2,2	7,7
100		3,2	15,4
150		4,7	20,1
200		5,1	27,3
250		5,3	25,6



Şekil 4.6. *Zymomonas mobilis*'de levans sentezi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi



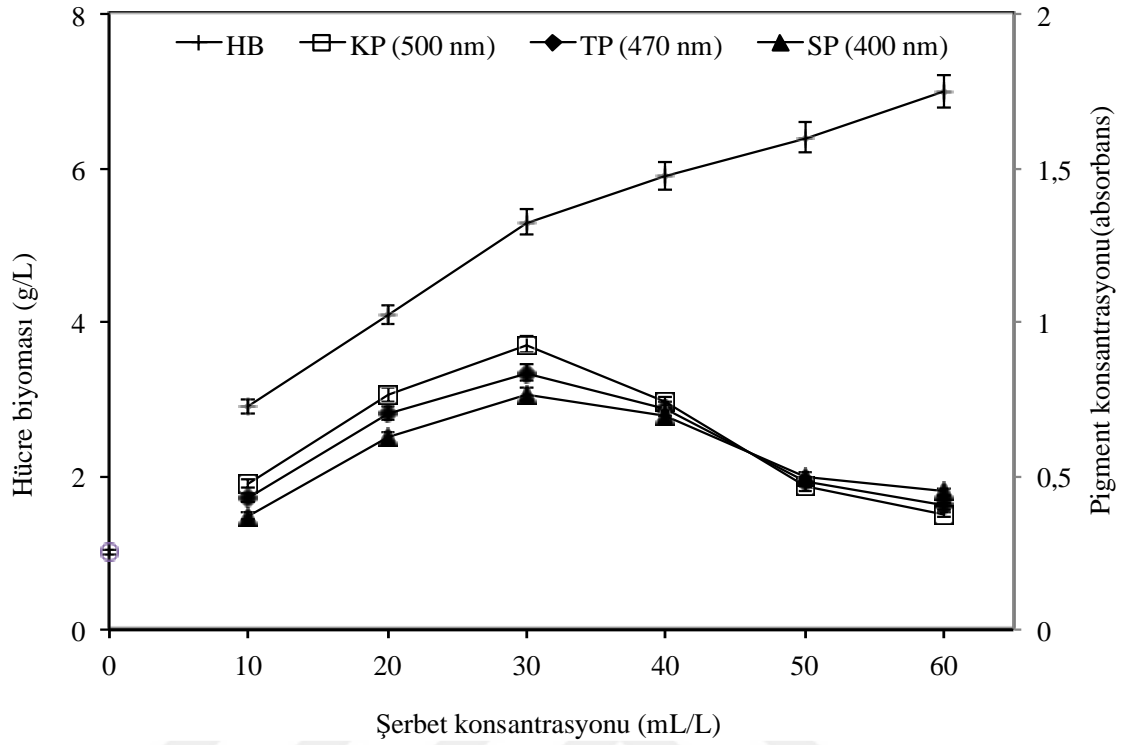
Şekil 4.7. *Zymomonas mobilis*'in şerbet içeren besiyerindeki 60 saatlik kültürü

4.5. *Monascus purpureus* ile Hücre Biyomasi ve Pigment Üretimi İçin Şerbetin Substrat Olarak Kullanımı

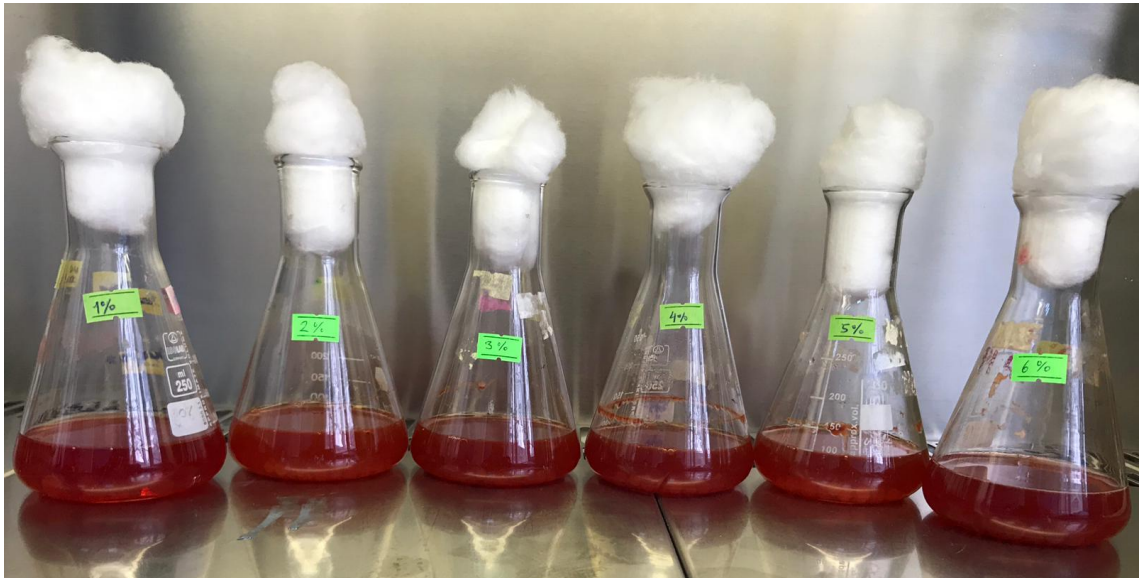
Artan şerbet konsantrasyonuna (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.4) bağlı olarak *M. purpureus*'un hücre büyümesinde sürekli bir artış gözlemlenmiştir. Pigment üretimi ise (sarı, kırmızı ve turuncu pigmentlerin hepsi); 30 mL/L şerbet konsantrasyonuna kadar artış göstermiş, daha yüksek konsantrasyonlarda ise azalmıştır. Örneğin, 60 mL/L şerbet konsantrasyonunda elde edilen pigment absorbansları, 10 mL/L şerbet konsantrasyonunda elde edilen değerlere oldukça yakın bulunmuştur. 30 mL/L şerbet konsantrasyonunda (26,1 g/L şeker) sarı, turuncu ve kırmızı pigment için elde edilen absorbanslar sırasıyla 0,768, 0,835 ve 0,928 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, 40 mL/L şerbet konsantrasyonunda da, en fazla üretilen pigment; kırmızı ardından da turuncu olmuştur. Daha yüksek şerbet konsantrasyonlarında ise; sarı pigmente göre kırmızı ve turuncu pigment konsantrasyonlarında daha fazla düşüşler tespit edilmiştir. Örneğin, 60 mL/L şerbet konsantrasyonunda sarı pigment absorbansı 0,438, kırmızı ve turuncu pigment absorbansları ise sırasıyla 0,375 ve 0,402 olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.5. *Monascus purpureus* 'da pigment sentezi ve hücre büyümesi üzerine şerbet konsantrasyonunun etkisi

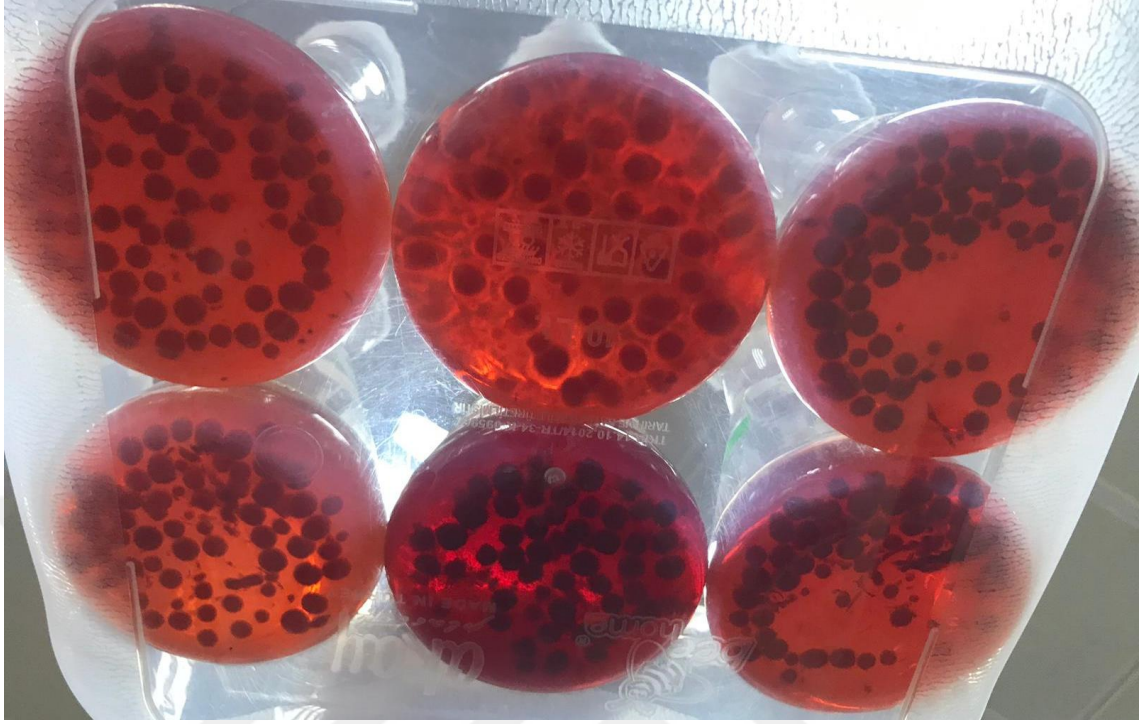
Şerbet Konsantrasyonu (mL/L)	HB (g/L)	SP (400 nm)	TP (470 nm)	KP (500 nm)
10	2,9	0,369	0,429	0,477
20	4,1	0,625	0,704	0,764
30	5,3	0,768	0,835	0,928
40	5,9	0,694	0,717	0,738
50	6,4	0,499	0,479	0,463
60	7,0	0,448	0,402	0,375



Şekil 4.8. *Monascus purpureus*'da pigment sentezi ve hücre büyümesi üzerine farklı şerbet konsantrasyon değerlerinin etkisi



Şekil 4.9. *Monascus purpureus*'un şerbet içeren besiyerindeki 6 günlük kültürü



Şekil 4.10. *Monascus purpureus*'un şerbet içeren besiyerindeki misel peletleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde mikroorganizmalar çevre biyoteknolojisi, gıda mikrobiyolojisi, farmasötik biyoteknoloji, endüstriyel mikrobiyoloji, rekombinant DNA teknolojisi ve tarımsal biyoteknoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda, mikroorganizmaların; endüstriyel, biyoteknolojik veya tıbbi öneme sahip olan çeşitli rekombinant proteinleri, enzimleri, polisakkaritleri, etil alkol, biyodizel, propandiol ve pigmentleri ürettiği (Adrio and Demain 2003; Pérez-García *et al.* 2011; Satyanarayana *et al.* 2013), organik asit olarak ise mikroorganizmaların sitrik asit, glukonik asit, süksinik asit, laktik asit, asetik asetik, itakonik asit, propiyonik asit ve fumarik asit üretebileceği belirtilmektedir (Magnuson and Lasure 2004; Sauer *et al.* 2008; Naraian and Kumari 2017; Kareem and Banjo 2018).

Sitrik asit ve onun tuzları gıda endüstrisi başta olmak üzere; ilaç, kimya, kozmetik ve temizlik alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. (Lotfy *et al.* 2007; Dhillon *et al.* 2011a). Mikrobiyal sitrik asit üretimi esas olarak Amerika, İsrail ve Çin tarafından gerçekleştirilmekte olup (Papagianni 2007), farklı bakteri türleri (*Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis* ve *Corynebacterium* sp.), mayalar (*Candida guilliermondii*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *Pichia anomala*, *Hansenula anamola*, *Rhodotorula* sp. ve *Yarrowia lipolytica*) ve küfler (*Aspergillus niger*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. awamori* ve *Penicillium janthinellum*) tarafından yüksek miktarda sitrik asit üretimi belirtilse de, bu organik asidin üretimi esas olarak *A. niger* küfü tarafından gerçekleştirilmektedir (Soccol *et al.* 2006; Karasu-Yalcin *et al.* 2010).

Literatürde; *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium thermocellum*, *C. thermohydrosulfuricum* ve *Zymomonas mobilis* gibi bakterilerin yanısıra *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Neurospora* ve *Paecilomyces* gibi çok sayıda fungus tarafından etil alkol üretilebileceği ortaya konulsa da, endüstriyel ölçekte etil alkol üretiminin esas olarak *S. cerevisiae* ile gerçekleştiği belirtilmektedir (Ng *et al.* 1981; Singh *et al.* 1992; Dien *et al.* 2003; Watanabe *et al.* 2007; Ma *et al.* 2009; Buaban *et al.* 2010). Levan, *Bacillus subtilis*, *B. polymxa*, *Aerobacter lavanicum*, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp. ve *Zymomonas*

mobilis tarafından üretilen bir polisakkarittir. Gıda, kozmetik ve medikal endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan bu polisakkaritin üretimi esas olarak; *Z. mobilis* bakterisi tarafından gerçekleştirilmektedir (Han 1989; Han and Clarke 1990; Shih *et al.* 2005; Kim *et al.* 2005; de Oliveira *et al.* 2007; Poli *et al.* 2009; Kucukasik *et al.* 2011). *Monascus purpureus* küfü etil alkol, laktik asit, monokolin, antibiyotik, organik asit ve γ -aminobütirik asidin yanısıra sarı, turuncu ve kırmızı renklerde pigment üretmekte olup (Hajjaj *et al.* 2000; Pengnoi *et al.* 2017), *Monascus* pigmentlerinden özellikle sarı ve kırmızı renkli olanlar, gıda sanayinde doğal renklendirici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Renklendirme özelliklerinin yanısıra bu pigmentlerin antikanser, antimikrobiyal, antidiyabetik, antihipertansiyon ve antiobezite özellik taşıdığı da belirtilmektedir (Mukherjee and Singh 2011; Lee and Pan 2012; Feng *et al.* 2012; Vendruscolo *et al.* 2014).

Sitrik asit, etil alkol, levan ve pigment gibi mikrobiyal ürünlerin üretiminde besiyeri bileşenleri özellikle de karbon (sükroz, glukoz vb) ve azot kaynakları (maya ekstraktı, pepton vb) yüksek maliyet oluşturmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar, besiyeri maliyetini düşürmek için besiyerinde melas, peynir altı suyu, patates ve muz kabukları, narenciye atıkları, meyve (kivi, elma, kayısı vb) posası, meyve çekirdekleri, bira atıkları, gliserol ve parafin gibi ucuz organik atıkları ya da tarımsal yan ürünleri substrat olarak kullanma yoluna gitmektedir (Soccol *et al.* 2006; Patle and Lal 2007; Karthikeyan and Sivakumar 2010; Sarkar *et al.* 2012; Angumeenal and Venkappayya 2013). Bu atık ya da yan ürünlerin katı özellikte olanları kimyasal (asit yada baz hidrolizi) ve/veya enzimatik hidrolize tabi tutularak, hidrolizat formuna dönüştürülmekte ve elde edilen bu hidrolizatlar, besiyerinde substrat olarak kullanılmaktadır (Tewari *et al.* 1986; Olsson and Hahn-Hägerdal 1996; Carta *et al.* 1999; Mourya and Jauhri 2000; Rivas *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2008; Khawla *et al.* 2014). Ancak hidroliz işlemlerinde uzun sürelere, pahalı kimyasallara, enzimlere ve ilave enerji tüketimine ihtiyaç duyulması gibi sebepler, sitrik asit üretimi için hidrolizat hazırlamayı sınırlandırmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar, melas, peynir altı suyu ve gliserol gibi sıvı formundaki materyalleri hiç bir hidroliz işlemine tabi tutmadan doğrudan substrat olarak kullanma yoluna gitmektedir (Ali *et al.* 2002; de Oliveira *et al.* 2007; Rywińska and Rymowicz 2010; Kucukasik *et al.* 2011;

Arslan *et al.* 2016). Bu şekilde de hidrolizat hazırlanması sırasında yukarıda bahsedilen eksikliklerin önüne geçilebileceği belirtilmektedir.

Şerbet baklava endüstrisinin bir atığı olarak kabul edilmekte olup, tüketilen baklava miktarına bağlı olarak tepşilerde farklı miktarlarda (5 kg baklava için yaklaşık olarak 250 mL) şerbet birikmektedir (250 mL atık şerbette ise; yaklaşık olarak 217 gr şeker bulunmaktadır). Baklavalara için hazırlanan şerbette (1 litre su içerisinde 1,5 kg şeker çözünerek hazırlanmaktadır) yaklaşık olarak 750 g/L şeker bulunmasına karşın, mevcut çalışmada atık şerbetin şeker içeriğinin başlangıç şerbetinkinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, baklavanın şerbetten su çekmesine ve dolayısıyla şerbetteki şeker oranının artmasına bağlanmıştır. Türkiye’de her yıl büyük miktarlarda baklava üretilmekte ve dolayısıyla büyük miktarda da şerbet açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan bu şerbet ise, ülkemizde herhangi bir kullanım alanı bulmamakta ve atık olarak kabul edilmektedir. Şerbet içerisinde yine düşük miktarda da olsa proteine ve minerallere rastlanmış olup, bu durum şerbetin baklava ile temas ettiği sürece baklava içerisindeki proteinli bileşiklerin veya minerallerin şerbet içerisine geçmesine bağlanmıştır.

Mikrobiyal fermantasyon işleminde organik atıkların kullanımının besiyeri maliyetini azaltması açısından çok önemli bir yaklaşım olarak kabul edildiğinden, atık şerbet gibi atıkların bu prosesinde kullanım potansiyelini artırmaktadır. Bu da şerbetin; sitrik asit, levan ve etil alkol üretimi için iyi bir substrat olabileceği düşünülmektedir. Çünkü literatürde sitrik asit, levan ve etil alkol üretimi için yüksek miktarlarda karbon kaynağına ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Xu *et al.* 1989; Borsari *et al.* 2006; Shafaghat *et al.* 2011; Show *et al.* 2015; Azhar *et al.* 2017). Bu maddeler kadar olmasa da, *Monascus* pigmentlerinin üretimi içinde; 20-30 g/L seviyesinde karbon kaynağına ihtiyaç duyulduğu açıklanmaktadır (Lee *et al.* 2001). Yine, atık şerbetin hiç bir hidroliz işlemine tabi tutulmadan substrat olarak kullanılabilirliği ve içerisindeki sükröz şekerinin suda kolaylıkla çözünebilir olması da, şerbeti sitrik asit, etil alkol, pigment ve levan üretimi için ideal bir substrat haline getirmektedir. Dahası, atıklardan ya da tarımsal yan ürünlerden hazırlanan hidrolizatların, mikrobiyal büyümeyi ve fermantasyon verimini olumsuz etkileyen fenolik özelliğe sahip maddeler içerdiği de belirtilmektedir (Sun and

Cheng 2002; Panagiotou and Olsson 2007; Jönsson and Martín 2016). Şerbet ise; hiç bir hidroliz işlemine tabi tutulmadığı için, bu tarz inhibitör bileşikler içerme olasılığının oldukça düşük olduğu düşünülmektedir. Bu durum da, şerbeti ideal bir fermantasyon substratı yapmaktadır. Şerbetin açık renkli olması, fermantasyonun ve büyümenin daha kolay takip edilebilmesinin önünü açmaktadır. Örneğin, koyu renkli melasın aksine açık ve şeffaf renkli olan şerbet ortamında *Monascus* pigmentlerinin oluşumu, hem daha kolay takip edilebilecek hem de pigmentlerin spesifik izolasyonu daha kolay olacaktır. Bu sebeplerden dolayı, mevcut çalışmada alternatif bir substrat arayışına gidilmiş ve bu doğrultuda da *Monascus* pigmentlerinin, etil alkolün, levanın ve sitrik asidin üretimi için kirlilik içermeyen, açık renkli olan, ucuz atık özelliğinde kabul edilen şerbet, fermantasyon substratı olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde, *A. niger*'in hücre büyümesini ve sitrik asit üretme performansını; pH, sıcaklık ve inkübasyon gibi kültür parametrelerinin yanı sıra, besiyerinde kullanılan azot, karbon ve mineral konsantrasyonunun da etkilediği belirtilmektedir (Xu *et al.* 1989; Vandenberghe *et al.* 1999; Soccol *et al.* 2006). Bu yüzden, mevcut deneylerde temel karbon kaynağı olarak şerbetin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Araştırma bulgularında belirtildiği gibi şerbetin bütün konsantrasyonları *A. niger*'de hem hücre büyümesini, hem de sitrik asit sentezini desteklemiştir. Test edilen bütün konsantrasyonlarda hücre büyümesinde sürekli bir artış tespit edilmiştir. Hücre büyümesini destekleyerek çok yüksek miktarlarda hücre biyoması elde edilmesi, atık şerbetin *A. niger* ile tek hücre proteini üretiminde substrat olarak kullanılabilmesini göstermektedir. Tek hücre proteinlerinin özellikle hayvan yemlerine katkı maddesi olarak katıldığı bilgisi (Ravindra 2001) göz önüne alındığında, şerbetin önemi daha da artmaktadır. Literatürde, *A. niger*'in ayrıca oksalik asit ve glukonik asit ürettiği de belirtilmektedir (Schrickx *et al.* 1995). Bu yüzden, şerbetin bu iki organik asidin üretiminde de substrat olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir. Çalışmada, şerbetin bütün konsantrasyonlarının sitrik asit üretimini teşvik ettiği sonucuna ulaşılsa da, 200 ml/L şerbet konsantrasyonunun sitrik asit üretimi için daha elverişli olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarının ise sitrik asit üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu durum önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi (Dixon-Hardy *et al.* 1998; Anastassiadis *et al.* 2005)

besiyerinin C/N oranına bağlanabilir. Bu şerbet konsantrasyonunda şerbetin içerisindeki şeker miktarı 174 g/L olarak belirlendiğinden dolayı, sitrik asit verimi 0,22 g/g şeker olarak hesaplanmıştır. Sitrik asit için elde edilen bu verim miktarı önceki çalışmalarda (Nadeem *et al.* 2010; Guc and Erkmen 2017) belirtilen verimlere yakın bulunmuştur. Dahası, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi parametrelerin optimize edilmesi sayesinde bu verimin daha da artırılabilceği düşünülmektedir.

S. cerevisiae'nin hücre büyümesi ve etil alkol üretme potansiyeli üzerine atık şerbetin konsantrasyonu test edildiğinde ise, 250 mL/L şerbet konsantrasyonunda etil alkol, 200 mL/L şerbet konsantrasyonunda ise, hücre büyümesinin maksimum değere ulaştığı görülmüştür. Daha düşük veya daha yüksek şerbet konsantrasyon değerlerinin ise hem hücre hem de etil alkol konsantrasyonunda düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Şerbet konsantrasyonunun hücre büyümesi ve/veya etil alkol sentezi üzerindeki etkisi de yine daha önceki çalışmalarda (Manikandan and Viruthagiri 2010; El-Metwally *et al.* 2017) belirtildiği gibi kültür ortamının karbon/azot oranına bağlanmıştır. Literatürde, *S. cerevisiae* biyomasının hamur mayası, gıda katkı maddesi (tek hücre proteini) ve glutasyon kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Taskin 2013; Lasztity 2017). Bu yüzden, *S. cerevisiae* biyomasının üretimi için şerbet atığının kullanımı yine gıda endüstrisi ve biyoteknolojik uygulamalar açısından önem arz edecektir.

Mevcut deneyler sonucunda, *Z. mobilis* bakterisinde levan üretiminin ve hücre büyümesinin besiyerine katılan şerbetin konsantrasyonundan etkilendiği ortaya çıkarılmıştır. Özellikle yüksek şerbet konsantrasyonlarının, hücre büyümesi ve levan üretimi için çok daha iyi sonuçlar sağladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlarda yine, önceki çalışmalarda belirtilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Çünkü literatürde karbon kaynağının yüksek konsantrasyonlarının *Z. mobilis* bakterisinde hem hücre büyümesini, hem de levan üretimini artırdığı belirtilse de, çok yüksek konsantrasyonlarının inhibisyon etkisi yaptığı açıklanmaktadır (Borsari *et al.* 2006; Silbir *et al.* 2014). Mevcut çalışmada, elde edilen 0,16 g/g levan verimi, önceki çalışmalarda belirtilen maksimum levan verimlerine yakın bulunmuştur (Beker *et al.* 1990; He *et al.* 2014; Santos and Cruz 2016). Bu bulgu, sükröz bakımından zengin olan şerbetin, levan üretimi için iyi bir substrat

olduğunu işaret etmektedir. Literatürde, *Z. mobilis*'in etil alkol üretme kapasitesine sahip olduğu ve etil alkol üretimi için de sükrözün iyi bir karbon kaynağı olduğu belirtilmektedir (Doelle and Greenfield 1985). Dolayısıyla sükröz bakımından zengin olan atık baklava şerbetinin, bu bakteri ile etil alkol üretiminde substrat olarak kullanılabilmesi muhtemeldir. Bununla birlikte, bu varsayımı desteklemek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut deneyler sonucunda, *M. purpureus* ile pigment üretiminde şerbetin substrat olarak kullanılabilmesi de gösterilmiş ve pigment üretiminin ve hücre büyümesinin şerbet konsantrasyonundan etkilendiği belirlenmiştir. Her üç pigment için optimal şerbet konsantrasyonu 30 mL/L (26,1 g şeker) olarak belirlenmişken, hücre büyümesinin artan şerbet konsantrasyonuna bağlı olarak sürekli artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Diğer bir ifade ile düşük şeker konsantrasyonlarının pigment üretimi için, yüksek şerbet konsantrasyonlarının ise hücre büyümesi için daha elverişli olduğu tespit edilmiştir. Bu da *M. purpureus* suşları ile pigment üretiminde karbon kaynaklarının düşük konsantrasyonlarının, diğer bir ifade ile düşük karbon, fakat yüksek azot konsantrasyonlarının daha elverişli olduğunu gösteren önceki çalışmalardaki sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir (Said *et al.* 2014; Hajjaj *et al.* 2015; Hamdiyati *et al.* 2016). Literatürde, *M. purpureus*'un doğal pigmentlerin yanı sıra, etil alkol ve laktik asit ürettiği de belirtilmektedir (Hajjaj *et al.* 2000; Pengnoi *et al.* 2017). Bu yüzden, gelecek çalışmalarda şerbetin *M. purpureus* ile etil alkol ve laktik asit üretiminde de substrat olarak kullanılabilirliği olası görünmektedir.

Sonuç olarak;

- ✓ Bu tez çalışmasında, baklava endüstrisinin atığı olarak kabul edilen şerbetin; yüksek miktarda şekerin yanı sıra, düşük miktarda protein ve kül (mineral maddeler) içerdiği tespit edilmiştir.
- ✓ *A. niger* ile sitrik asit, *S.cerevisiae* ile etil alkol, *Z. mobilis* ile levan ve *M. purpureus* ile pigment ve hücre biyoması üretimi için, şerbetin substrat olarak (esas olarak karbon kaynağı) kullanılabilmesi ortaya konulmuştur.

- ✓ Bu maddelerin üretimini ve hücre büyümesini, şerbet konsantrasyonunun etkilediği belirlenmiştir.
- ✓ Gelecek çalışmalarda, atık şerbet; lipit, laktik asit, asetik asit, propandiol, kitin ve kitosan, glutasyon ve dekstran gibi biyoteknolojik veya endüstriyel öneme sahip diğer maddelerin üretiminde mikroorganizmaların kültür ortamına substrat olarak katılabileceği görülmüştür.
- ✓ Şerbetin bu maddelerin üretimi için substrat olarak kullanılması sayesinde de; hem besiyeri maliyeti azaltılabilir, hem de çevre kirliliği probleminin önüne geçilebilir.



KAYNAKLAR

- Acourene, S. and Ammouche, A., 2012. Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, 759–766.
- Acourene, S., Djafri, K., Ammouche, A., Amourache, L., Djidda, A., Tama, M. and Taleb, B., 2011. Utilisation of the date wastes as substrate for the production of Baker's yeast and citric acid. *Biotechnology*, 10(6), 488–497.
- Adrio, J. L. and Demain, A. L., 2003. Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6(3), 191–199.
- Ahmad, N. H., Mustafa, S. and Che Man, Y. B., 2015. Microbial polysaccharides and their modification approaches: a review. *International Journal of Food Properties*, 18, 332–347.
- Ali, S., Haq, I. U., Qadeer, M. A. and Iqbal, J., 2002. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(3), 19–20.
- Anastassiadis, S., Wandrey, C. and Rehm, H. J., 2005. Continuous citric acid fermentation by *Candida oleophila* under nitrogen limitation at constant C/N ratio. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 695–705.
- Angumeenal, A. R. and Venkappayya, D., 2013. An overview of citric acid production. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 367–370.
- Arapoglou, D., Varzakas, T., Vlyssides, A. and Israilides, C., 2010. Ethanol production from potato peel waste. *Waste Management*, 30, 1898–1902.
- Arslan, N. P., Aydogan, M. N. and Taskin, M., 2016. Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose—positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. *Journal of biotechnology*, 231, 32–39.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M. and Rodrigues, K. F., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61.
- Bahry, H., Pons, A., Abdallah, R., Pierre, G., Delattre, C., Fayad, N., Taha, S. and Vial, C., 2017. Valorization of carob waste: Definition of a second-generation bioethanol production process. *Bioresource Technology*, 235, 25–34.
- Bai, F. W., Anderson, W. A. and Moo-Young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 89–105.
- Ban, J., Yu, J., Zhang, X. and Tan, T., 2008. Ethanol production from sweet sorghum residual. *Frontiers in Chemical Engineering China*, 2(4), 452–55.
- Barrington, S., Kim, J. S., Wang, L. and Kim, J. W., 2009. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(2), 422–427.
- Beker, M. J., Shvinka, J. E., Pankova, L. M., Laivenieks, M. G. and Mezharde, I. N., 1990. A simultaneous sucrose bioconversion into ethanol and levan by *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24(1), 265–274.

- BeMiller, J. N., 2010. Carbohydrate analysis. Ch. 10. In: Nielsen SS (ed) Food Analysis, 4th edn, Springer, New York.
- Benghazi, L., Record, E., Suárez, A., Gomez-Vidal, J. A., Martínez, J. and de la Rubia, T., 2014. Production of the *Phanerochaete flavido-alba* laccase in *Aspergillus niger* for synthetic dyes decolorization and biotransformation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30, 201–211.
- Bergey, D. H., Holt, J. G. and Krieg, N. R., 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1:576–580.
- Berovic, M. and Legisa, M., 2007. Citric acid production. Biotechnology Annual Review, 13, 303–343.
- Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A. L., Pareilleux, A. D. and Prome, J. C., 1994. Pigments of *Monascus*. J. Food Sci., 59, 862–865.
- Borsari, R. R. J., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B. and Silva, R. S. D. S. F., 2006. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. Food Science and Technology, 26(3), 604–609.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254.
- Breisha, G. Z., 2010. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. Biomass and Bioenergy, 34(8), 1243–1249.
- Brock, T. D., Smith, A.W. and Madigan, M., 1984. Biology of Microorganisms. 4th edition. NJ: Prentice Hall International.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V. and Eurwilaichitr, L., 2010. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. Journal of bioscience and bioengineering, 110(1), 18–25.
- Buxbaum, G., 1998. Industrial Inorganic Pigments. WILEY –VCH,1,Germany.
- Campoy, S., Rumbero, A. and Martin, J. F., 2006. Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. Appl. Microbiol. Biotechnol., 70, 488–96.
- Caputi, A., Ueda, M. T. and Brown, T., 1968. Spectrophotometric determination of ethanol in wine. American Journal of Enology and Viticulture, 19, 60–165.
- Carta, F. S., Soccol, C. R., Ramos, L. P. and Fontana, J. D., 1999. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. Bioresource Technology, 68(1), 23–28.
- Castilho, L. R., Mitchell, D. A. and Freire, D. M. G., 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. Bioresource Technology, 100, 5996–6009.
- Cheng, K. K., Cai, B. Y., Zhang, J. A., Ling, H. Z., Zhou, Y. J., Ge, J. P. and Xu, J. M., 2008. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. Biochemical Engineering Journal, 38(1), 105–109.
- Cheng, M. J., Wu, M. D., Chen, J. J., Yang, P. S. and Yuan, G. F., 2010. Secondary metabolites isolated from the fungus *Monascus pilosus*. ChemInform, 55, 335–341.

- Chiang, C. J., Wang, J. Y., Chen, P. T. and Chao, Y. P., 2009. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 445–451.
- Chu, B. C. and Lee, H., 2007. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances*, 25, 425–41.
- Corbin, K. R., Hsieh, Y. S., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G. B. and Burton, R. A., 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology*, 193, 76–83.
- Das, D. and Veziroglu, T. N., 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13–28.
- Dashen, M., Ado, S. A., Ameh, J., Amapu, T. and Zakari, H., 2014. Screening and improvement of local isolates of *Aspergillus niger* for citric acid production. *Bayero Journal of Pure and Applied Science*, 6(1), 105–111.
- de Oliveira, M. R., da Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B. and 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.
- De Santis, D., Moresi, M., Gallo, M. A. and Petruccioli, M., 2005. Assessment of the dyeing properties of pigments from *Monascus purpureus*. *Chemical Technology and Biotechnology*, 80(9), 1072–1079.
- Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Lebellenger, L., Zykwiniska, A. and Collic-Jouault, S., 2014. Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in Chemistry*, 2, 85.
- Demirel, G., Yaykasli, K. O. and Yasar, A., 2005. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. *Food Chemistry*, 89(3), 393–396.
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M. and Tyagi, R. D., 2011a. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 505–529.
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S. and Verma, M., 2013. Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1560–1567.
- Dien, B. S., Cotta, M. A. and Jeffries, T. W., 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 258–266.
- Dikshit, R. and Tallapragada, P. 2013. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. *International Food Research Journal*, 20(3), 1235–1238.
- Dixon-Hardy, J. E., Karamushka, V. I., Gruzina, T. G., Nikovska, G. N., Sayer, J. A. and Gadd, G. M., 1998. Influence of the carbon, nitrogen and phosphorus source on the solubilization of insoluble metal compounds by *Aspergillus niger*. *Mycological Research*, 102(9), 1050–1054.
- Doelle, H. W. and Greenfield, P. F., 1985. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 22(6), 405–410.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. and Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951–962.

- Dufosse, L., 2009. Pigments, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology*, 4, 457–471.
- El-Metwally, M. M., El-Hersh, M. S. and Saber, W. I. A., 2017. A Dual Microbial Culture for Improving C/N Ratio and Multi-response Optimization of Rice Straw Fermentation for Bioethanol Production. *Research Journal of Microbiology*, 12, 210–217.
- Enzminger, J. D. and Asenjo, J. A., 1986. Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. *Biotechnology Letters*, 8, 7–12.
- Fabre, C. E., Goma, G. and Blanc, P. J., 1993. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. *Journal of Food Science*, 58, 1099–1110.
- Feng, Y., Shao, Y. and Chen, F., 2012. *Monascus* pigments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 1421–1440.
- Fortman, J. L., Chhabra, S., Mukhopadhyay, A., Chou, H., Lee, T. S., Steen, E. and Keasling, J. D., 2008. Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. *Trends in Biotechnology*, 26, 375–381.
- Frick, D. and Meggos, H., 1988. FD&C colors, *Food Technol.*, 7, 49–56.
- Gojgic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Loncarevic, B. D., Todorovic, N. M., Pergal, M. V., Ciric, J., Loos, K., Beskoski, V. P. and Vrvic, M. M., 2019. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 142–151.
- Gopinadh, R., Ayyanna, C., Ramakrishna, C. H., Narayana Saibaba, K. V., Ravi vittal, K. and Jagadhi, R., 2015. Optimization of Chemical Parameters for the Production of Citric acid using Box-Behnken Design. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5, 244.
- Grewal, H. S. and Kalra, K. L., 1995. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, 13(2), 209–234.
- Guc, S. and Erkmen, O., 2017. Citric Acid Production from Nontreated Beet Molasses by a Novel *Aspergillus niger* Strain: Effects of pH, Sugar and Ingredients. *J. Food Microbiol. Saf. Hyg.*, 2, 122.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G. and Zacchi, G., 2006. Bioethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24, 549–556.
- Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J., Goma, G. and Loubiere, P., 2000. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 619–625.
- Hajjaj, H., Goma, G. and François, J. M., 2015. Effect of the cultivation mode on red pigments production from *Monascus ruber*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 50, 1731–1736.
- Hamdiyati, Y., Kusnadi, M. and Yuliani, L. A., 2016. Effect of *Monascus purpureus* inoculum concentration on pigment production in jackfruit seed flour substrate. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1708, No. 1, p. 030002). AIP Publishing.
- Hamid, K. R. A., Elsayed, E. A., El Enshasy, H. A., Esawy, M. and Abd Malek, R., 2018. Bioprocess Optimization for Levan Production by *Bacillus subtilis* B58. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 77(7), 386–393.
- Han, J., Xu, X., Gao, C., Liu, Z. and Wu, Z., 2016. Levan-producing *Leuconostoc citreum* strain BD1707 and its growth in tomato juice supplemented with sucrose. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1383–1390.

- Han, Y. W. and Clarke, M. A., 1990. Production and characterization of microbial levan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 393–396.
- Han, Y. W., 1989. Levan production by *Bacillus polymyxa*. *Journal of industrial microbiology*, 4(6), 447–451.
- Haque, M. A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A. and Lin, C. S., 2016. Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. *J. Biotechnol.*, 231, 55–64.
- Hashem, M. and Darwish, S. M. I., 2010. Production of bioethanol and associated byproducts from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 34, 953–959.
- Hashem, M., Asseri, T. Y. A., Alamri, S. A. and Alrumman, S. A., 2019. Feasibility and Sustainability of Bioethanol Production from Starchy restaurants' Bio-wastes by New Yeast Strains. *Waste and Biomass Valorization*, 10(6), 1617–1626.
- He, M. X., Wu, B., Qin, H., Ruan, Z. Y., Tan, F. R., Wang, J. L. And Tang, X. Y., 2014. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 101.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W. and Foust, T. D., 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315, 804–807.
- Huang, M. Y., Lee, C. F., Ho, S. T., Lin, K. J. and 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.
- Huang, W. C. and Tang, I. C., 2007. Chapter 8. Bacterial and Yeast Cultures-Process Characteristics, Products and Applications. In: Shang-Tian Yang (Editor). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Bioprocessing Innovative Company, USA, pp. 185–223.
- Imandi, S. B., Bandaru, V.V., Somalanka, S. R., Bandaru, S.R. and Garapati, H.R., 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. *Bioresource Technology*, 99(10), 4445–50.
- Jaklitsch, W. M., Kubicek, C. P. and Scrutton, M. C., 1991. Intracellular organization of citrate production in *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 37, 823–827.
- Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V. and Annapure, U. S., 2012. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1045–1053.
- Javed, S., Asgher, M., Sheikh, M. A. and Nawaz, H., 2010. Strain improvement through UV and chemical mutagenesis for enhanced citric acid production in molasses-based solid state fermentation. *Food Biotechnology*, 24, 165–179.
- Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A. and Bhushan, S., 2003. Microbial Pigments. *Indian J. Biotech.*, 2, 362–369.
- Jönsson, L. J. and Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology*, 199, 103–112.

- Karasu-Yalcin, S., Bozdemir, M. T. and Ozbas, Z. Y., 2010a. Citric acid production by yeasts: fermentation conditions, process optimization and strain improvement,” in Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, A. Mendez-Vilas, Ed., pp. 1374–1382, Formatex, Badajoz, Spain.
- Kareem, S. O. and Banjo, T., 2018. Microbial production of organic acids. In Microbial Biotechnology (pp. 184–201). CRC Press.
- Kareem, S.O. and Rahman, R. A., 2011. Utilization of banana peels for citric acid production by *Aspergillus niger*. Agriculture and Biology Journal of North America, 4, 384-387.
- Karhumma, K., Wiedemann, B., Hahn-Hagerdal, B., Boles. E. and Gorwa-Grauslund M. F., 2006. Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial 134 *Saccharomyces cerevisiae* strains. Microbial Cell Factories, 5, 18.
- Karthikeyan, A. and Sivakumar, N., 2010. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. Bioresource Technology, 101(14), 5552–5556.
- Khatab, A. A., Salem, A. A. and Soheam, A. E., 2017. Optimization of Citric Acid Production by *Aspergillus niger* isolated from different Habitats. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 8(6), 614–623.
- Khawla, B. J., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Raoudha, E. G. and Oumèma, N. E., 2014. Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. Industrial Crops and Products, 52, 144–149.
- Kim, C., Jung, H., Kim, J. H. and Shin, C. S., 2006. Effect of *Monascus* pigment derivatives on the electrophoretic mobility of bacteria, and the cell adsorption and antibacterial activities of pigments. Colloids and Surfaces, B, Biointerfaces, 47, 153–159.
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S. and Kim, C. H., 2005. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. Journal of cosmetic science, 56(6), 395–406.
- Koli, S. H., Suryawanshi, R. K., Patil, C. D. and Patil, S. V., 2017. Fluconazole treatment enhances extracellular release of red pigments in the fungus *Monascus purpureus*. FEMS Microbiology Letters, 364 (8), fnx058.
- Krebs, H. A. and Johnson, W. A., 1937. Citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. Enzymologia, 4, 148–156.
- Kristiansen, B., Matty, M. and Linden, J., 1999. Citric acid biotechnology. Taylor and Francis Inc. Philadelphia. Pp. 55–62.
- Kubicek, C. P. and Karaffa, L., 2010. Citric Acid Processes. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. John Wiley and Sons, pp. 1–7.
- Kucukasik, F., Kazak, H., Guney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigun, O. and Oner, E. T., 2011. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. Applied microbiology and biotechnology, 89(6), 1729–1740.
- Kumar, A. and Jain, V. K., 2008. Solid state fermentation studies of citric acid production. African Journal of Biotechnology, 7, 644–650.
- Kumar, A. S., Mody, K. and Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides-a perception. Journal of Basic Microbiology, 47(2), 103–117.

- Kwon, K. J., Park, K. J., Kim, J. D., Kong, J. Y. and Kong, I. S., 1994. Isolation of two different polysaccharides from halophilic *Zoogloea* sp. *Biotechnology Letters*, 16, 783–788.
- Lasztity, R. (2017). *Use of yeast biomass in food production*. Routledge.
- Lee, B. H. and Pan, T. M., 2012. Benefit of *Monascus*-fermented products for hypertension prevention: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 94, 1151–1161.
- Lee, B. K., Park, N. H., Piao, H. Y. and Chung, W. J., 2001. Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(5), 341–346.
- Lee, Y., Lee, W. G., Chang, Y. K. and Chang, H. N., 1995. Modelling of Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* from a Glucose and Maltose Mixture. *Biotechnology Letters*. 17, 791–796.
- Licht, F. O., 2006. *World Ethanol Market: The Outlook to 2015*, Tunbridge Wells, Agra Europe Special Report, UK.
- Lin, C. F. and Iizuka, H., 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov.. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 671–676.
- Lin, Y. and Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 627–642.
- Lin, Y. L., Wang, T. H., Lee, M. H. and Su, N. W., 2008. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 965–73.
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S. and Kong, H., 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395–401.
- Liu, K., Yuan, X., Liang, L., Fang, J., Chen, Y., He, W. and Xue, T., 2019. Using CRISPR/Cas9 for multiplex genome engineering to optimize the ethanol metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 120–126.
- Lorenzetti, M. F. S., Moro, M. R. and García-Cruz, C. H., 2015. Alginate/PVA Beads for Levam Production by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Food Process Engineering*, 38(1), 31–36.
- Lotfy, W. A., Ghanem, K. M. and El-Helow, E. R., 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate:II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 98, 3470–3477.
- Lu, M. Y., Maddox, I. S. and Brooks, J. D., 1998. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 33, 117–123.
- Ma, H., Wang, Q., Qian, D., Gong, L. and Zhang, W., 2009. The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage. *Renewable Energy*, 34, 1466–1470.
- Madigan, M. and Martinko, J., 2006. *Brock's Biology of Microorganisms* 11th edition. NJ: Prentice Hall International.
- Magnuson, J. K. and Lasure, L. L., 2004. Organic acid production by filamentous fungi. In *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine* (pp. 307–340). Springer, Boston, MA.

- Majumder, L., Khalil, I., Munshi, M. K., Alam, K., Rashid, H., Begum, R. and Alam, N., 2010. Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. *European Journal of Biological Sciences*, 2(1), 01–08.
- Manikandan, K. and Viruthagiri, T., 2010. Optimization of C/N ratio of the medium and fermentation conditions of ethanol production from tapioca starch using co-culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 2(2), 947–955.
- Marier, J. R. and Boulet, M., 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. *Journal of Dairy Science*, 41(12), 1683–1692.
- Mattey, M., 1992. The production of organic acids. *Critical Reviews Biotechnology*, 12, 87–132.
- Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A. and Domínguez, J. M., 2010. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 862–875.
- Mourya, S. and Jauhri, K. S., 2000. Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Microbiological research*, 155(1), 37–44.
- Mukherjee, G. and Singh, S. K., 2011. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochem.*, 46, 188–192.
- Nadeem, A., Syed, Q., Baig, S., Irfan, H. and Nadeem, M., 2010. Enhanced production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower alcohols. *Turkish Journal of Biochemistry*, 35(1), 7–13.
- Nagpal, N., Munjal, N. and Chatterjee, S., 2011. Microbial Pigments with Health Benefits-A Mini Review. *Trends Biosci.*, 4, 157–160.
- Naraian, R. and Kumari, S., 2017. Microbial production of organic acids. *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*, 93.
- Narayanamurthy, G., Ramachandra, Y. L., Rai, S. P., Manohara, Y. N. and Kavitha, B. T., 2008. Areca husk: An inexpensive substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(1), 99-102.
- Ng, T. K., Ben-Bassat, A. and Zeikus, J. G., 1981. Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41(6), 1337–1343.
- Nwodo, U. U., Green, E. and Okoh, A. I., 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14002–14015.
- Okamoto, K., Nakagawa, S., Kanawaku, R. and Kawamura, S., 2019. Ethanol Production from Cheese Whey and Expired Milk by the Brown Rot Fungus *Neolentinus lepideus*. *Fermentation-Basel*, 5(2), 49.
- Oliveira, M. R., Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B. and Celligoi, M. A. P. C., 2007. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate source. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 177–183.
- Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312–331.

- Ozdal, M. and Kurbanoglu, E. B., 2019. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone, Waste and Biomass Valorization, 10(3), 631–640.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B., 2001. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74, 117–124.
- Panagiotou, G. and Olsson, L., 2007. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(2), 250–258.
- Papadaki, E. and Mantzouridou, F. T., 2019. Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 280, 59–69.
- Papagianni, M., 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25(3), 244–263.
- Papagianni, M., Matthey, M. and Kristiansen, B., 1999. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 710–717.
- Pastrana, L., Blanc, P. J., Santerre, A. L., Loret, M. O. and Goma, G., 1994. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochem.*, 30, 333–341.
- Patle, S. and Lal, B., 2007. Ethanol production from hydrolysed agricultural wastes using mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Candida tropicalis*. *Biotechnology letters*, 29(12), 1839–1843.
- Pattanagul, P., 2002. Using of vegetable oil, angkak, SVJ protein isolate and tapioca starch to improve the quality of sausages, Master's Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pattanagul, P., 2007. Effect of *Monascus* strains and their nutrients on the production of alday anak, PhD. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pengnoi, P., Mahawan, R., Khanongnuch, C. and Lumyong, S., 2017. Antioxidant properties and production of monacolin k, citrinin, and red pigments during solid state fermentation of purple rice (*Oryzae sativa*) varieties by *Monascus purpureus*. *Czech J. Food Sci.*, 35, 32–39.
- Pérez-García, A., Romero, D. and De Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187–193.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D., 1997. *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T. and Nicolaus, B., 2009. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 651–657.
- Prescott, S. C. and Dunn, C. G., 2001. *Industrial Microbiology*, McGraw-Hill, New York, pp.883.
- Raisainen, R., Nousiainen, P., Hynninen, P. H., 2002. Dermorubin and 5-chlorodermorubin natural anthraquinone carboxylic acids as dyes for wool. *Textile Res. J.*, 72, 973–976.

- Raja Rao, P. and Kruthi Reddy, M., 2013. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using oat Bran as substrate. *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 3(3), 181–190.
- Rajoka, M. I., Ahmed, M. N., Shahid, R. I., Latif, F. and Parvez. S., 1998. Citric acid production from sugar cane molasses by cultures of *A. niger*. *Biologia*, 44(1), 241–253.
- Raper, K. B. and Fennell, D. I., 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Company, Baltimore, MD.
- Ratledge, C., 2001. Biochemistry and physiology of growth and metabolism. In: *Basic Biotechnology*. Ratledge, C. and Kristiansen, B., (eds), Cambridge University Press, UK, pp. 17-44.
- Ravindra, P., 2001. Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran. *Brazilian Archives of Biology and technology*, 44(1), 79–88.
- Ray, R. C. and Ward, O. P. (editors) (2006). *Microbial Biotechnology in Horticulture*, Volume 1, Science Publishers, New Hampshire, pp.596.
- Rehm, B. H., 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews, Microbiology*. 8, 578–592.
- Ren, N. Q., Li, J. Z., Li, B. K., Wang, Y. and Liu, S. R., 2006. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2147–2157.
- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A. and Domínguez, J. M., 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2380–2387.
- Rodríguez, L. A., Toro, M. E., Vazquez, F., Correa-Daneri, M. L., Gouiric, S. C. and Vallejo, M. D., 2010. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation, *International journal of hydrogen energy*, 35, 5914–5917.
- Ruanglek, V., Maneewatthana, D. and Tripetchkul, S., 2006. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bioethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 41, 1432–1437.
- Rühmann, B., Schmid, J. and Sieber, V., 2015. High throughput exopolysaccharide screening platform: from strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydrate Polymers*, 122, 212–220.
- Rywińska, A. and Rymowicz, W., 2010. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(5), 431–435.
- Said, F. M., Brooks, J. and Chisti, Y., 2014. Optimal C: N ratio for the production of red pigments by *Monascus ruber*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 2471–2479.
- Sanchez-Garcia, M. D., Lagaron, J. M. and Hoa, S. V. 2010. Effect of addition of carbon nanofibers and carbon nanotubes on properties of thermoplastic biopolymers. *Composite Science and Technology*, 70, 1095–1105.
- Santos, M. A., Mateos, L., Stahmann, K. P. and Revuelta, J. L., 2005. Insertional Mutagenesis in the Vitamin B2 Producer Fungus *Ashbya gossypii*. In: *Methods in Biotechnology: Microbial Processes and Products*, Vol. 18, J.L. Barredo (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, pp. 283–300.

- Santos, V. A. Q. and Cruz, C. H. G., 2016. Ethanol and Levan production by sequential bath using *Zymomonas mobilis* immobilized on alginate and chitosan beads. *Acta Scientiarum Technology*, 38(3), 263–271.
- Santos, V. A. Q., Bianchi, V. L. D. and Garcia-Cruz, C., 2014. Effect of initial pH in levan production by *Zymomonas mobilis* immobilized in sodium alginate. *Acta Scientiarum, Technology*, 36(2), 349.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. and Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable energy*, 37(1), 19–27.
- Satyanarayana, T., Johri, B. N. and Prakash, A. (Eds.), 2012. *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. and Branduardi, P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*, 26(2), 100–108.
- Schmid, J. and Sieber, V., 2015. Enzymatic transformations involved in the biosynthesis of microbial exopolysaccharides based on the assembly of repeat units. *Chembiochem.*, 16, 1141–1147.
- Schrickx, J. M., Raedts, M. J., Stouthamer, A. H. and Vanverseveld, H. W., 1995. Organic acid production by *Aspergillus niger* in recycling culture analyzed by capillary electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 231(1), 175–181.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. and Van Dijek, P. W., 2002. On the safety of *A. niger*—A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 426–435.
- Shafaghat, H., Najafpour, G. D., Rezaei, P. S. and Sharifzadeh-Baei, M., 2011. Ethanol production with natural carbon sources in batch and continuous fermentation using free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 70, 162–169.
- Shao, Y., Xu, L. and Chen, F., 2011. Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. *Mycoscience*, 52, 224–233.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J. and 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.
- Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Aziz Zakry, F. A., Lan, J. C. W. and Ling, T. C., 2015. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 271–283.
- Shuler, M. L. and Kargi, F., 2002. 'Traditional Industrial Anaerobic Bioprocesses: Ethanol Production', in *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. 2nd edition. New Jersey: Prentice Hall PTR, pp. 515–533.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T. and Goksungur, Y., 2014. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate polymers*, 99, 454–461.
- Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S. and Schwan, R. F., 2008. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology*, 25, 951–7.
- Silveira, S. T., Daroit, D. J. and Brandelli, A., 2008. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 170–174.
- Simova, E. D., Frengova, G. I. and Beshkova, D. M., 2004. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 115–121.

- Singh, A., Kumar, P. K. R. and Schügerl, K., 1992. Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. In *Enzymes and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells* (pp. 29–55). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sneddon, J. and Vincent, M. D., 2008. ICP-OES and ICP-MS for the Determination of Metals: Application to Oysters. *Analytical Letters*, 41(8), 1291–1303.
- Soccol, C. R. and Vandenberghe, L. P. S., 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 205–218.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C. and Pandey A., 2006. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, 44, 141–149.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C. and Pandey, A., 2006. Citric acid production. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 141–149.
- Solomon, B. D., Barnes, J. R. and Halvorsen, K. E., 2007. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass & Bioenergy*, 31, 416–425.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M. and Harijono., 2016. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 181–186.
- Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C. H. S. S., Harish, B.S., Janaki Ramaiah, M. and Uppuluri, K. B., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate Polymers*, 123, 8–16.
- Stanbury, P. F. and Whitaker, A., 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Press, p 11–25.
- Staudt, A. K., Wolfe, L. G. and ShROUT, J. D., 2012. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology*, 194, 197–206.
- Su, N. W., Lin, Y. L., Lee, M. H. and Ho, C. Y., 2005. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1949–1954.
- Sun, X. W., Wu, H. F., Zhao, G. H., Li, Z. M., Wu, X. H., Liu, H. and Zheng, Z. M., 2018. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(7), 1029–1038.
- Sun, Y. and Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1–11.
- Sweeny, J. G., Estrada-Valdas, M. C., Iacobucci, G. A., Sato, H. and Sakamura, H. S., 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqueous media by 1,4,6 trihydroxynaphthalene. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1189–1193.
- Tang, X. Z., Kumar, P., Alavi, S. and Sandeep, K. P., 2012. Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 426–442.
- Taskin, M., 2013. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine-and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 535–541.

- Taskin, M., Tasar, G. E. and Incekara, U., 2013. Citric acid production from *Aspergillus niger* MT-4 using hydrolysate extract of the insect *Locusta migratoria*. *Toxicology and Industrial Health*, 29(5), 426–434.
- Tewari, H. K., Marwaha, S. S. and Rupal, K., 1986. Ethanol from banana peels. *Agricultural wastes*, 16(2), 135–146.
- Tibor, C., 2007. Liquid Chromatography of Natural pigments and synthetic dyes. *J. Chromatography Library*, 71, 11–19.
- Togarepi, E., Mapiye, C., Muchanyereyi, N. and Dzomba, P., 2012. Optimization of Fermentation Parameters for Ethanol Production from *Ziziphus mauritiana* Fruit Pulp Using *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 2(2), 60–69.
- Tsao, G. T., Cao, N. J. and Gong, C. S., 1999. Production of multifunctional organic acids from renewable resources. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 243–278.
- Tsay, S. S. and To, K. Y., 1987. Citric acid production using immobilized conidia of *A. niger* TMB 2022. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 297–304.
- Vandenberghe, L. P. S., 2000. Development of process for citric acid production by solid-state fermentation using cassava agro-industrial residues, PhD Thesis, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, pp. 205.
- Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C. R., Prado, F. C. and Pandey, A., 2004. Comparison of citric acid production by solid-state fermentation in flask, column, tray and drum bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 1–10.
- Vandenberghe, L. P., Soccol, C. R., Pandey, A. and Lebeault, J. M., 1999. Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(3), 263–276.
- Vendruscolo, F., Tosin, I., Giachini, A. J., Schmidell, W. and Ninow, J. L., 2014. Antimicrobial activity of *monascus* pigments produced in submerged fermentation. *J. Food Process Pres.*, 38, 1860–1865.
- Viikari, L., 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 252–255.
- Vroman, I. and Tighzert, L. 2009. Biodegradable polymers. *Materials*, 2, 307–344.
- Wang, Y. and Casadevall, A., 1994. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen and oxygen derived oxidants. *Infection and Immunity*, 62, 3004–3007.
- Ward, O. P., 1992. *Fermentation biotechnology*. Chichester: J. Wiley, pp. 38.
- Watanabe, S., Saleh, A. A., Pack, S. P., Annaluru, N., Kodaki, T. and Makino, K., 2007. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Microbiology*, 153(9), 3044–3054.
- Wong, H. and Koehler, P. E., 1983. Production of red water-soluble *Monascus* pigments. *J. Food Sci.*, 48, 1200–1203.
- Wu, K. J., Chang, C. F. and Chang, J. S., 2007. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*, 42, 1165–1171.
- Wu, X., Wang, X., Yang, H. and Guo, L. A., 2010. Comparison of hydrogen production among three photosynthetic bacterial strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 7194–7199.

- Xu, D. B., Madrid, C. P., Röhr, M. and Kubicek C. P., 1989. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 553–558
- Yalcin, S. K., Bozdemir, M. T. and Ozbas, Z. Y., 2009. Utilization of whey and grape must for citric acid production by two *Yarrowia lipolytica* strains. *Food Biotechnology*, 23(3), 266–283.
- Yuan, J. S., Tiller, K. L., Al-Ahmad, H., Stewart, N. R. and Stewart, Jr. C. N., 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends Plant Sci.*, 13, 421–429.
- Zhao, G. P., Li, Y. Q., Yang, J. and Cui, K. Y., 2016. Antibacterial Characteristics of Orange Pigment Extracted from *Monascus* Pigments against *Escherichia coli*. *Czech J. Food Sci.*, 34, 197–203.
- Zhou, B., Wang, J., Pu, Y., Zhu, M., Liu, S. and Liang, S., 2009. Optimization of culture medium for yellow pigments production with *Monascus anka* mutant using response surface methodology. *Eur. Food Res. Technol.*, 228, 895–901.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2011 yılında başladığı Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik bölümünden 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

