

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

TOPRAK VE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN SİSTEİN, GLUTAMİK
ASİT VE BETA KAROTEN ÜRETİM
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Cihat GÜNER

İstanbul
Ekim-2020

T.C.
İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

TOPRAK VE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN SİSTEİN, GLUTAMİK ASİT VE
BETA KAROTEN ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Cihat GÜNER

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ertan ERMİŞ

İstanbul
Ekim-2020

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Ertan ERMIŞ

Üye Prof.Dr. Hasan YETİM

Üye Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

Üye Doç. Dr. M. Zeki DURAK

Üye Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ali GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

(Doktora Tezi) olarak hazırladığım “**Toprak ve Gıdalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Sistein, Glutamik Asit Ve Beta Karoten Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi**” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

Cihat GÜNER

ÖNSÖZ

Araştırmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren çalışmama destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ertan ERMİŞ'e, tez çalışmamın tamamlanmasına katkı sağlayan İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Akademik ve Teknik Kadrosuna, çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini aktarıp her konuda yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mine ERGÜVEN'e ve Sayın Doç. Dr. Muhammed Zeki DURAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca bana maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarım da dahil olmak üzere her konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübelerin aktaran sevgili eşim Kübra ÖZKAN GÜNER'e teşekkür ederim.

Ve tabiki hayatımı anlamlı kılan kızım Ahsen GÜNER'e; hayatımın her anında bana destek olan ve güvenen, dünyadaki en büyük şansım olan sevgisi sonsuz kıymetli GÜNER ve ÖZKAN ailelerime kucak dolusu sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Cihat GÜNER
İstanbul - 2020

ÖZET

**TOPRAK VE GIDALARDAN İZOLE EDİLEN
MİKROORGANİZMALARIN SİSTEİN, GLUTAMİK ASİT VE
BETA KAROTEN ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Cihat GÜNER

Doktora, Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ertan ERMIŞ

Ekim-2020, 172 + XIX Sayfa

Bu çalışmanın amacı; gıda endüstrisinde gıda katkı maddeleri olarak kullanılan sistein, glutamik asit ve beta karoteni üretme yeteneğine sahip mikroorganizmaları çeşitli gıda ve toprak numunelerinden izole etmek, en iyi üretim yeteneğine sahip türlerin tanımlamasını yaparak çeşitli besiyerlerinde üretim potansiyellerini araştırmaktır. Bu amaçla, Türkiye'nin yedi bölgesinden farklı lokasyonlardan 37 adet toprak ve 9 adet gıda ürünü olmak üzere toplamda 46 örnek alınmış ve bu örneklerden toplamda 262 koloni izole edilmiş ve bu türlerin sistein, glutamik asit ve beta karoten üretim potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Çalışmada elde edilen verilere göre en yüksek metabolit üretme yeteneği gösteren izolatlar tespit edilmiş ve 16S rRNA dizi analizi ile tür identifikasyonları yapılmıştır. Elde edilen DNA dizilimlerinin gen bankası ile karşılaştırılması sonucu en yüksek sistein üretimi gözlemlenen izolatın *Bacillus* sp. strain CG1; en yüksek glutamik asit üretimi gözlemlenen izolatın *Stenotrophomonas* sp. strain CG2; ve en yüksek beta karoten üretimi gözlemlenen izolatın ise *Enterococcus* sp. strain CG3 olduğu anlaşılmıştır.

Araştırmada; *Bacillus* sp. strain CG1'in en yüksek sistein üretimi yaptığı optimum besiyeri içeriği ve diğer proses parametreleri (pH 7,5, 40 °C sıcaklık, 175 rpm çalkalama hızı ve 84 saat fermantasyon süresi) tespit edilmiştir. Yine uygulanan optimum koşullar ve belirtilen sürede *Bacillus* sp. strain CG1'in 4,24±0,47 g/L sistein üretebildiği belirlenmiştir. Üretilen sistein Dowex 50 marka katyonik iyon değiştirici

reçine kullanılarak besiyeri ortamından ayrıştırılmış ve %64,26 oranında geri kazanım verimi sağlanmıştır.

Araştırmada; *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin en yüksek glutamik asit üretimi yaptığı optimum besiyeri içeriği ve diğer proses parametreleri (pH 7, 30°C sıcaklık, 200 rpm çalkalama hızı ve 84 saat fermantasyon süresi) tespit edilmiştir. Yine uygulanan optimum koşullar ve belirtilen sürede *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin $3,76 \pm 0,65$ g/L glutamik asit üretilbildiği belirlenmiştir. Üretilen glutamik asit Amberlite IR 120 marka katyonik iyon değiştirici reçine kullanılarak besiyeri ortamından ayrıştırılmış ve %53,48 oranında geri kazanım verimi sağlanmıştır.

Araştırmada; *Enterococcus* sp. strain CG3 'ün en yüksek beta karoten üretimi yaptığı optimum besiyeri içeriği ve diğer proses parametreleri (pH 7,5, 40°C sıcaklık, 175 rpm çalkalama hızı ve 84 saat inkübasyon) tespit edilmiştir. Yine uygulanan optimum koşullar ve belirtilen sürede *Enterococcus* sp. strain CG3'ün $53,36 \pm 5,34$ mg/L beta karoten üretilbildiği belirlenmiştir. Üretilen beta karotenin bakteri hücrelerinden ayrıştırılmasında ise hekzan ile saflaştırma yöntemi tercih edilmiş ve %80,75 oranında verimde geri kazanım sağlanmıştır.

Sonuç olarak, Türkiye'deki farklı bölgelerden toplanmış çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaları kullanarak ülkemizde üretilmeyen ve yurt dışından tedarik edilen sistein, glutamik asit ve beta karoten gibi endüstriyel öneme sahip gıda katkı maddelerinin aynı konuda yapılan diğer çalışmalara benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda izolatlarda yapılacak genetik modifikasyonlar ve endüstriyel atıklar kullanılarak yapılacak proses optimizasyonları ile bu gıda katkı maddelerinin ekonomik ve sürdürülebilir şekilde ülkemizde de yerli kaynaklar ile üretilbileceği ön görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gıda Katkı Maddesi, Sistein, Glutamik Asit, Beta Karoten, Tür İzolasyonu, Biyoproses, Saflaştırma.

ABSTRACT

DETERMINATION OF CYSTEINE, GLUTAMIC ACID AND BETA CAROTENE PRODUCTION POTENTIAL OF THE MICROORGANISMS ISOLATED FROM DIFFERENT SOIL AND FOOD SAMPLES

Cihat GÜNER

PhD Dissertation, Food Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ertan ERMIŞ

October-2020, 172+ XIX Pages

The aim of this study was to isolate microorganisms from food and soil samples to assess their production ability of cysteine, glutamic acid and beta carotene and to identify the best productive strains. For this purpose; 46 soil and food samples were collected from different locations in Turkey and 262 colonies were isolated and their cysteine, glutamic acid and beta carotene production potentials were investigated

Based on the data obtained in this research, the isolates which produced highest amount of metabolites were identified by using 16S rRNA sequence analysis. As a result of the searching the DNA sequences of the isolates in the GenBank® database, the highest cysteine producing isolate was identified as *Bacillus* sp. strain CG1; the highest glutamic acid producing isolate was identified as *Stenotrophomonas* sp. strain CG2 and the highest beta carotene producing isolate was identified as *Enterococcus* sp. strain CG3.

In this research, the growth media composition which provided highest cysteine production using *Bacillus* sp. strain CG1 was determined in addition to the optimum other process parameters like (pH 7,5, temperature 40°C, mixing speed 175 rpm and fermentation time 84 hours). Under the optimum conditions, *Bacillus* sp. strain CG1 produced $4,24 \pm 0,47$ g/L cysteine during the incubation period. The produced cysteine was separated from the fermentation medium using the Dowex 50 cationic ion exchange resin with 64,26% recovery efficiency.

In this research, the growth media composition which provided highest amount of glutamic acid using *Stenotrophomonas* sp. strain was determined in addition to the optimum other process parameters like (pH 7, temperature 30°C, mixing speed 200

rpm rpm and fermentation time 84 hours). Under the optimum conditions, *Stenotrophomonas* sp. strain CG2 produced $3,76 \pm 0,65$ g/L glutamic acid during the incubation period. The produced cysteine was separated from the fermentation medium using the Amberlite IR 120 cationic ion exchange resin with 53,48% recovery efficiency.

In this research, the growth media composition which provided highest amount of beta carotene using *Enterococcus* sp. strain CG3 was determined in addition to the optimum other process parameters like (pH 8, temperature 40 °C, mixing speed 150 rpm rpm and fermentation time 84 hours). Under the optimum conditions, *Enterococcus* sp. strain CG3 produced $53,36 \pm 5,34$ mg/L glutamic acid during the incubation period. The produced cysteine was separated from growth media using the hexan with 80,75% recovery efficiency.

As a result, the microbial strains isolated from food and soil samples which were collected from different regions of Turkey, shows industrial production ability of cysteine, glutamic acid and beta carotene. Based on the data obtained, it is anticipated that these food additives can be produced economically and sustainably. Applying genetic modifications may result in increased yield of production using optimized fermentation conditions. In addition, the cost of production might be reduced by using industrial food by-product or wastes as growth media.

Keywords: Food Additives, Cysteine, Glutamic Acid, Beta Carotene, Strain Identification, Bioprocess, Purification.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
KISALTMALAR	xviii
EKLER	xix
GİRİŞ	1
BİRİNCİ BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	3
1.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	3
1.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihi ve Kullanım Amaçları	3
1.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kaynakları ve Özellikleri	5
1.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	7
1.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanımını Düzenleyen Kuruluşlar	10
1.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Etiketlenmesi ve E Kodları	11
1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Üretimi	12
1.2.1. Mikroorganizmaların Gıda Endüstrisinde Kullanımı.....	12
1.2.2. Biyoproses ile Gıda Katkı Maddelerinin Üretimi	13
1.2.3. Üretiminde Mikroorganizmaların Kullanıldığı Gıda Katkı Maddeleri	16
1.3. Mikrobiyal Gıda Katkıları.....	16

1.3.1. Sistein	17
1.3.1.1. Sistein Tanımı, Biyokimyasal Yapısı ve Tarihi.....	17
1.3.1.2. Sistein Kullanım Alanları ve Pazarı	19
1.3.1.3. Sistein Üretim Yöntemleri.....	20
1.3.1.4. Literatürde Sistein Üretimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	23
1.3.2. Glutamik Asit	24
1.3.2.1. Glutamik Asitin Tanımı, Biyokimyasal Yapısı ve Tarihi.....	24
1.3.2.2. Glutamik Asitin Kullanım Alanları ve Pazarı	26
1.3.2.3. Glutamik Asit Üretim Yöntemleri.....	27
1.3.2.4. Literatürde Glutamik Asit Üretimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	30
1.3.3. Beta Karoten.....	32
1.3.3.1. Beta Karotenin Tanımı, Biyokimyasal Yapısı ve Tarihi	32
1.3.3.2. Beta Karotenin Kullanım Alanları ve Pazarı	34
1.3.3.3. Beta Karotenin Üretim Yöntemleri	35
1.3.3.4. Biyoproses Yöntemi ile Beta Karoten Üretimine Yönelik Önceki Çalışmalar	37
1.4. Mikrobiyal Gıda Katkılarının Helal Standartları Açısından Değerlendirilmesi .	39
1.5. Biyoproses ile Üretilen Mikrobiyal Gıda Katkı Maddelerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	43
1.5.1. Hücre Parçalama.....	44
1.5.2. Çöktürme	45
1.5.3. Santrifüj	46
1.5.4. Ekstraksiyon	46
1.5.5. Kristalizasyon.....	46
1.5.6. Filtrasyon.....	46
1.5.7. Kromatografi	48
1.6. Üretilen Mikrobiyal Gıda Katkı Maddelerinin Enstrümental Analizleri	50

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT	52
2.1. Materyal	52
2.1.1. Mikroorganizma Kaynaklarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması ...	53
2.1.2 Kullanılan Besiyerleri Ve Cözeltiler	54
2.2. Metot	57
2.2.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu, Saflaştırılması ve Stoklanması.....	58
2.2.2. Mikroorganizmaların İnkübasyonu ve Gıda Katkı Maddelerinin Üretilmesi	58
2.2.3. Mikrobiyal Sistein Üretimi ve Tespiti.....	58
2.2.3.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Sistein Miktarının Spektroskopik Yöntemler İle Tespiti.....	58
2.2.3.2. En İyi Üretim Yapan Mikroorganizmaların Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanımlanması.....	59
2.2.3.3. Proses Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisinin İncelenmesi (Optimizasyonu).....	62
2.2.3.4. Üretilen Sisteinin Besiyeri Ortamından Ayrıştırılarak Geri Kazanımı	64
2.2.3.5. Elde Edilen Sisteinin Enstrümental Analiz Cihazları ile Karakterizasyonu	65
2.2.3.5.1. Elde Edilen Sisteinin FTIR Analizi	65
2.2.3.5.2. Elde Edilen Sisteinin RAMAN Analizi	65
2.2.3.5.3. Elde Edilen Sisteinin LC-MS/MS Analizi.....	65
2.2.4. Mikrobiyal Glutamik Asit Üretimi ve Tespiti.....	67
2.2.4.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Glutamik Asit Miktarının Spektroskopik Yöntemler İle Tespiti.....	67
2.2.4.2. En İyi Üretim Yapan Mikroorganizmaların Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanımlanması.....	68

2.2.4.3. Proses Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisinin İncelenmesi (Optimizasyonu)	68
2.2.4.4. Üretilen Glutamik Asitin Besiyeri Ortamından Ayrıştırılarak Geri Kazanımı.....	69
2.2.4.5. Elde Edilen Glutamik Asitin Enstrümental Analiz Cihazları ile Karakterizasyonu	70
2.2.4.5.1. Elde Edilen Glutamik Asitin FTIR Analizi	70
2.2.4.5.2. Elde Edilen Glutamik Asitin RAMAN Analizi	70
2.2.4.5.3. Elde Edilen Glutamik Asitin LC-MS/MS Analizi.....	70
2.2.5. Mikrobiyal Beta Karoten Üretimi ve Tespiti	71
2.2.5.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Beta Karoten Miktarının Spektroskopik Yöntemler ile Tespiti	71
2.2.5.2. En İyi Üretim Yapan Mikroorganizmaların Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanımlanması.....	72
2.2.5.3. Proses Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisinin İncelenmesi (Optimizasyonu)	72
2.2.5.4. Üretilen Beta Karotenin Besiyeri Ortamından Ayrıştırılarak Geri Kazanımı.....	73
2.2.5.5. Elde Edilen Beta Karotenin Enstrümental Analiz Cihazları ile Karakterizasyonu	74
2.2.5.5.1. Elde Edilen Beta Karotenin HPLC Analizi	74
2.2.5.5.2. Elde Edilen Beta Karotenin FTIR Analizi.....	74
2.2.5.5.3. Elde Edilen Beta Karotenin RAMAN Analizi	74
2.2.6. İstatistik Analizler	74

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA	75
3.1. Mikroorganizma İzolasyon Sonuçları	75
3.2. Mikrobiyal Sistein Üretimi	77
3.2.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Sisteinin Analizi.....	77
3.2.2. En Yüksek Sistein Üretim Yapan izolatın Tanımlanması.....	81
3.2.3. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisi ...	82
3.2.3.1. İnkübasyon Koşullarının Sistein Üretimine Etkisi	82
3.2.3.2. Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisi	85
3.2.5.3. Optimum İnkübasyon Koşullarında Üretilen Sistein Miktarının Tespiti	88
3.2.4. Besiyeri Ortamında Üretilen Sisteinin Geri Kazanımı.....	88
3.2.5. Elde Edilen Sisteinin Karakterizasyonu	90
3.3. Mikrobiyal Glutamik Asit Üretimi	93
3.3.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Glutamik Asitin Analizi.....	93
3.3.2. En Yüksek Glutamik Asit Üretim Yapan izolatın Tanımlanması.....	97
3.3.3. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisi.....	98
3.3.3.1. İnkübasyon Koşullarının Glutamik Asit Üretimine Etkisi.....	98
3.3.3.2. Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisi	101
3.3.3.3. Optimum İnkübasyon Koşullarında Üretilen Glutamik Asit Miktarının Tespiti	102
3.3.4. Besiyeri Ortamında Üretilen Glutamik Asitin Geri Kazanımı.....	104
3.3.5. Elde Edilen Glutamik Asitin Karakterizasyonu	105
3.4. Mikrobiyal Beta Karoten Üretimi	109
3.4.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Beta Karotenin Analizi	109
3.4.2. En Yüksek Beta Karoten Üretim Yapan izolatın Tanımlanması	113

3.4.3. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi.....	114
3.4.3.1. İnkübasyon Koşullarının Beta Karoten Üretimine Etkisi	114
3.4.3.2. Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi.....	116
3.4.3.3. Optimum İnkübasyon Koşullarında Beta Karoten Asit Miktarının Tespiti	118
3.4.4. Besiyeri Ortamında Üretilen Beta Karotenin Geri Kazanımı	120
3.4.5. Elde Edilen Beta Karotenin Karakterizasyonu.....	121

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER	124
KAYNAKÇA	130
EKLER.....	147
ÖZGEÇMİŞ.....	172

TABLolar LİSTESİ

BİRİNCİ BÖLÜM

Tablo 1.1: Gıda Katkı Maddelerinin E Kodları	7
Tablo 1.2: Mikrobiyal Sistein Üretimi Konusunda Yapılmış Bazı Çalışmalar	24
Tablo 1.3: Mikrobiyal Glutamik Asit Üretimi Konusunda Yapılmış Bazı Çalışmalar	31
Tablo 1.4: Mikrobiyal Beta Karoten Üretimi Konusunda Yapılmış Bazı Çalışmalar	38
Tablo 2.1: Gıda Numunelerinden Toplanan Örnekler	53
Tablo 2.2: Çeşitli Bölgelerden Toplanan Toprak Örnekleri	53
Tablo 2.3: İnkübasyon Proses Parametreleri.....	62
Tablo 2.4: Besiyeri İçerikleri	63
Tablo 3.1: Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatlar	75
Tablo 3.2: Toprak Örneklerinden Elde Edilen İzolatlar.....	76
Tablo 3.3: Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Sistein Üretim Değerleri.....	78
Tablo 3.4: Topraktan Elde Edilen İzolatların Bölgelere Göre Sistein Üretim Ortalamaları.....	79
Tablo 3.5: En Yüksek Sistein Üretimi Gözlemlenen 5 İzolatın Üretim Validasyon Verileri	81
Tablo 3.6: TI.5.8.1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Gen Dizilimine NCBI Gen Bankasında Karşılık Gelen Türler	82
Tablo 3.7: Besiyeri ve Proses Optimizasyonunun Sistein Üretimine Etkisi.....	87
Tablo 3.8: Sistein Geri Kazanım Verileri	89
Tablo 3.9: Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Glutamik Asit Üretim Ortalamaları.....	93
Tablo 3.10: Topraktan Elde Edilen İzolatların Bölgelere Göre Glutamik Asit Üretim Ortalamaları.....	94

Tablo 3.11: En Yüksek Glutamik Asit Üretimi Gözlemlenen 5 İzolatın Üretim Validasyon Verileri	96
Tablo 3.12: TK.1.4.1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Gen Dizilimine NCBI Gen Bankasında Karşılık Gelen Türler.....	97
Tablo 3.13: Besiyeri ve Proses Optimizasyonunun Glutamik Asit Üretimine Etkisi	103
Tablo 3.14: Glutamik Asit Geri Kazanım Verileri.....	105
Tablo 3.15: Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Beta Karoten Üretim Ortalamaları.....	109
Tablo 3.16: Toprakтан Elde Edilen İzolatların Bölgelere Göre Beta Karoten Üretim Ortalamaları.....	110
Tablo 3.17: En Yüksek Beta Karoten Üretimi Gözlemlenen 5 İzolatın Üretim Validasyon Verileri	112
Tablo 3.18: G.4.3.1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Gen Dizilimine NCBI Gen Bankasında Karşılık Gelen Türler.....	113
Tablo 3.19: Besiyeri ve Proses Optimizasyonunun Beta Karoten Üretimine Etkisi	119
Tablo 3.20: Beta Karoten Geri Kazanım Verileri	120

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Mikrobiyal Gıda Katkı Maddesi Üretim Prosesi	15
Şekil 1.2: L- Sisteinin Kimyasal Yapısı	17
Şekil 1.3: Sisteinin Enzimatik Dönüşüm Yöntemi ile Üretimi	21
Şekil 1.4: L-Glutamik Asitin Kimyasal Yapısı	25
Şekil 1.5: Glutamik Asitin Kimyasal Sentez Yöntemi ile Üretimi	28
Şekil 1.6: Cis-Beta Karotenin Kimyasal Yapısı.....	33
Şekil 2.1: Sistein Kalibrasyon Eğrisi	59
Şekil 2.2: Glutamik Asit Kalibrasyon Eğrisi	67
Şekil 2.3: Beta Karoten Kalibrasyon Eğrisi	71
Şekil 3.1: Bacillus sp. strain CG1 İçin Proses Parametrelerinin Sistein Üretimine Etkisi	83
Şekil 3.2: Bacillus sp. strain CG1 İçin Proses Parametreleri Etkileşimlerinin Sistein Üretimine Etkilerini Gösteren Yüzey Grafikleri.....	85
Şekil 3.3: Bacillus sp. strain CG1 İçin Tablo 2.4'te Belirtilen Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisi	86
Şekil 3.4: Süreye Bağlı Reçineye Bağlanan Sistein Miktarı.....	89
Şekil 3.5: Mikrobiyal ve Standart Sisteine ait FTIR Spektrumları	90
Şekil 3.6: Mikrobiyal ve Standart Sisteine ait Raman Spektrumları	91
Şekil 3.7: Mikrobiyal ve Standart Sisteine ait LC-MS/MS Spektrumları.....	92
Şekil 3.8: Stenotrophomonas sp. strain CG2 İçin Proses Glutamik Asit Üretimine Etkisi	99
Şekil 3.9: Stenotrophomonas sp. strain CG2 İçin Proses Parametreleri Etkileşimlerinin Glutamik Asit Üretimine Etkilerini Gösteren Yüzey Grafikleri ...	100
Şekil 3.10: Stenotrophomonas sp. strain CG2 İçin Tablo 2.4'te Belirtilen Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisi.....	101
Şekil 3.11: Süreye Bağlı Reçineye Bağlanan Glutamik Asit Miktarı.....	104

Şekil 3.12: Mikrobiyal ve Standart Glutamik Asite ait FTIR Spektrumları	106
Şekil 3.13: Mikrobiyal ve Standart Glutamik Asite ait Raman Spektrumları.....	107
Şekil 3.14: Mikrobiyal ve Standart Glutamik Asite ait LC-MS/MS Spektrumları.	108
Şekil 3.15: Enterococcus sp. strain CG3 İçin Proses Parametrelerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi	115
Şekil 3.16: Enterococcus sp. strain CG3 İçin Proses Parametreleri Etkileşimlerinin Beta Karoten Üretimine Etkilerini Gösteren Yüzey Grafikleri.....	116
Şekil 3.17: Enterococcus sp. strain CG3 için Tablo 2.4'te Belirtilen Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi	117
Şekil 3.18: Mikrobiyal ve Standart Beta Karoten'e ait FTIR Spektrumları	121
Şekil 3.19: Mikrobiyal ve Standart Beta Karoten'e ait Raman Spektrumları.....	122
Şekil 3.20: Mikrobiyal ve Standart Beta Karoten'e ait HPLC Spektrumları.....	123

KISALTMALAR LİSTESİ

°C: Santigratderece

g : Gram

M :Molar

N :Normal

L :Litre

kg :Kilogram

mL : Mililitre

μ L : Mikrolitre

dk : Dakika

mL : Mililitre

pH : Ortamdaki hidroje iyonu konsantrasyonu

ppm : Parts per million- milyonda birbirim

rpm: Revolutions per minute

% : Yüzde

www: World wide web

EKLER LİSTESİ

Ek 1: Mikrobiyal Gıda Katkı Maddesi Üretim Prosesi	147
Ek 2: İzolatların Koloni Morfolojisi Özellikleri	149
Ek 3A İzolatların Ürettiği Sistein Miktarı.....	156
Ek 3B: İzolatların Ürettiği Glutamik Asit Miktarı.....	158
Ek 3C: İzolatların Ürettiği Beta Karoten Miktarı	160
Ek 4A: TI.5.8.1 Kodlu İzolatların 16S rRNA Kromotogramı	162
Ek 4B: TK.1.4.1 Kodlu İzolatların 16S rRNA Kromotogramı	163
Ek 4C: G.4.3.1 Kodlu İzolatların 16S rRNA Kromotogramı	164
Ek 5A: TI.5.8.1'in 16S rRNA Sekansı ile Benzer İzolatların Karşılaştırılması	165
Ek 5B: TK.1.4.1'in 16S rRNA Sekansı ile Benzer İzolatların Karşılaştırılması	167
Ek 5C: G.4.3.1'in 16S rRNA Sekansı ile Benzer İzolatların Karşılaştırılması.....	168
Ek 6A: Kullanılan Cihazlar	169
Ek 6B: Kullanılan Kimyasallar	170

GİRİŞ

Günümüzde endüstrisinin odak noktası, insanların yaşamsal faaliyetlerini ve refahlarını ilgilendiren gıda ve sağlık endüstrileridir. Gıda insanlığın hayatta kalabilmesi için ihtiyaç duyduğu en temel kaynaklardan biridir. Ancak gelişen dünya ve beraberinde getirdiği yeni düzenle beraber insanlığın beslenme alışkanlıkları da değişme uğramıştır. Hızla artan dünya nüfusu ve yeni oluşan kalabalık şehir hayatının doğurduğu zaman darlığı, insanlığın beslenme ihtiyaçlarını doğal gıdalardan ziyade pratik ve çekici görüntüye sahip endüstriyel hazır yiyecekler ile karşılamasına neden olmuştur. Ancak bu endüstriyel gıda ürünlerinin üretim süreçlerinde gerek proses gereksinimi olarak gerekse tüketicinin beğenisini kazanmak amacıyla gıda katkı maddeleri (Yörük ve Danyer, 2016) olarak adlandırılan çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır (Kaya, 2011). Gıda katkı maddeleri; gıdaların üretilmesi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması ve depolanması sırasında gıda maddesinin tad, koku, görünüş, yapı ve diğer hususiyetlerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak amacıyla kullanılan maddeler olarak tanımlanmakta olup günümüz endüstriyel gıda üretiminin ayrılmaz bir parçasıdır (Erdem, 2014).

Öte yandan hızla büyüyen gıda endüstrisine paralel olarak gelişen gıda katkı maddesi endüstrisinin ekonomik büyüklüğünün global düzeyde 40 milyar dolara ulaştığı tahmin edilmektedir. Genel olarak bitkisel veya hayvansal kaynaklardan ekstrasyon yöntemiyle, kimyasal sentez yöntemiyle veya mikroorganizmalar yardımıyla biyolojik prosesler ile üretilen bu gıda katkı maddelerinin gerek insan sağlığı üzerindeki etkileri gerekse Müslüman toplumlar tarafından helallik ve haramlıkları günümüzde hala tartışma ve araştırma konusudur. Gıda katkı maddelerinin üretimi sırasında kullanılan hammaddelerin kaynakları ve üretim proseslerinde kullanılan kimyasalların, islam dini açısından uygunluğu; bu gıda katkı maddelerinin hellalliğini doğrudan etkileyen unsurlardır (Yenen, 2019).

Ülkemizin endüstriyel gıda katkı maddesi ihtiyacı göz önüne alındığında; bu alanda büyük oranda dışa bağımlılığı söz konusudur. Buna karşın ihtiyaç duyulan gıda katkı maddelerini yerli olarak üretmek için yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Gıda endüstrisinde kullanılan gıda katkı maddelerinin pek çoğu mikroorganizma kaynaklı olarak üretilebilmektedir. Ülkemizin farklı iklim koşullarına sahip olması ve ayrıca çeşitli geleneksel fermente gıdaların varlığı bizlere oldukça zengin bir mikroorganizma çeşitliliği sağlamaktadır ve bu mikroorganizmaların gıda katkı maddesi olarak kullanılacak metabolitleri üretme yeteneklerinin araştırılması bu yüzden çok büyük bir önem arz etmektedir.

Gıda endüstrisinde kullanılan gıda katkı maddelerini biyoteknolojik yollardan üreten bazı yabancı firmalar mevcuttur ve bu amaçla kullanılan mikroorganizma suşları patent altına alınmışlardır. Ekonomik açıdan dışa bağımlılığın azaltılması ve yerli gıda katkı maddelerinin biyoteknolojik yöntemlerle elde etme süreçlerinin geliştirilmesi, bu alanda yapılacak araştırma ve geliştirme çalışmalarının başarısına bağlıdır. Bu konu ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmanın temel amacı, gıda endüstrisinde önemli kullanım alanlarına sahip olan gıda katkı maddeleri arasında yer alan sistein, glutamik Asit ve beta-karoteni üretme potansiyeline sahip mikroorganizmaları gıda ve toprak numunelerinden izole etmek, izole edilen bu mikroorganizmalardan helal standartlarına uygun sistein, monosodyum glutamat ve beta-karoten'in üretilebilirliğinin araştırılmasıdır. Yapılan çalışma neticesinde elde edilecek veriler ile ele alınan bu üç gıda katkı maddesinin endüstriyel olarak üretimine yönelik yeni mikroorganizma suşları tespit edip, bu mikroorganizmaların optimum üretim şartlarının tespit edilmesi ile endüstriyel olarak ülkemizde de üretilebilerine katkı sağlayacaktır.

BİRİNCİ BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Gıda Katkı Maddeleri

1.1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihi ve Kullanım Amaçları

Gıda, insanlığın yaşamının sürdürülmesinde en önemli öge olmakla beraber, insanlığın sağlığı ve refahını doğrudan etkilemektedir. Geçmişte olduğu gibi günümüzde de gıda olmaksızın yaşamın sürmesi mümkün değildir. Beslenme ihtiyacı çağlar boyunca değişmeden kalsada, gıda maddelerini tüketme biçimimiz ciddi değişimlere uğramıştır. Günümüzde gıdalar gıda işleyen işletmelerde tüketici beğenileri gözetilerek işlenip üretilmekte ve daha sonrasında dünyanın farklı yerlerinde pazarlara sunulmaktadır (Atkins ve Bowler, 2001). Bu durum, üretilen gıdanın tüketiciye ulaşana kadar tadını ve dokusunu kaybetmeden ulaştırılması gereksinimi doğurur. Rekabetçi küresel pazarda, en düşük maliyetle tüketicinin beğenisini kazanan gıdaların üretilmesinde ve üretilen bu gıdaların güvenle tüketiciye ulaştırılmasında gıda katkı maddeleri büyük önem taşımaktadır (Carocho vd., 2014).

Gıda katkı maddeleri, lezzeti korumak, bozulmayı engellemek veya tat ve görünümdeki çekiciliği arttırmak için gıdaya eklenen maddelerdir. Gıda katkı maddesi, tüketilen gıdanın ana bileşeni olmayan fakat o ürünün üretilmesinde, paketlenmesinde veya stoklanmasında fayda sağlaması amacı ile gıdaya eklenen doğal veya sentetik kimyasal maddeler olarak tanımlanabilir. Ancak Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde gıda katkı maddeleri "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda hammaddesi ya da yardımcı madde olarak kullanılmayan; tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan, işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen; gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya

istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddelerdir” şeklinde açıklanır (Türk Gıda Kodeksi, 2013).

Günümüzde çoğu insan, evde hazırlamak yerine piyasada bulunan hazır gıda ürünlerini kullanmaya meyillidir. Bu tür gıdalarda tüketicinin beğenisini kazanacak şekilde uzun sürede raflarda kalabilmesi için çeşitli katkı maddeleri ve koruyucular kullanılmalıdır. Bu gıda katkı maddeleri gıdaların kalitelerini ve lezzetlerini düzenlediği gibi bakteriler, küfler ve mayalar gibi bozulmalara neden olabilecek mikrobiyal faktörlerden koruyabilmektedir. Tarihte ilk olarak gıdaların korunması amacı ile kullanılmaya başlanan gıda katkı maddeleri, zamanla gıdanın tat, aroma ve tekstürünü düzenlemek için de kullanılmaya başlanmıştır (Pandey, 2012). Gıda katkı maddelerinin geleneksel gıdalarda kullanımı yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. İnsanlık tarihinde kullanılan ilk gıda katkıları tuz ve baharatlar olmuştur. İlk çağlarda etin kürlenerek saklanmasında tuzdan faydalandığı görülmektedir. Ayrıca milattan önceki yıllarda birçok baharat gıdaların lezzetlendirilmesinde kullanılmış, aynı şekilde mısırlılar tarafından gıdaların renklendirilmesinde gıda boyaları kullanılmıştır. Orta çağlara gelindiğinde ise etlerin bozulmasının önlemenin yanı sıra rengini de korumak için tuzla beraber nitratın da kullanıldığı görülmektedir. Sirke kullanılarak salamura yapmak, tuz ile pastırma yapmak veya bazı şaraplara sülfür dioksit ekleyerek bozulmasını engellemek tarihte kullanılan geleneksel gıda katkı maddelerinin kullanımına örnek gösterilebilir. 19. Yüzyıldan itibaren artan insan nüfusu ve gıda tüketimi yeni gıdaürünlerine ihtiyaç doğurmuş, bu durum ise gıda katkı maddelerine olan ihtiyacı ve kullanımı hızla arttırmıştır. Günümüzde kullanılan gıda katkı maddelerinin pek çoğu 19. yüzyılın başlarında ortaya çıkan gıda talebinin karşılanması sürecinde bulunmuştur (Arslan G., 2011). 20. yüzyılın ikinci yarısında işlenmiş gıdaların ortaya çıkması ile gerek doğal gerekse doğayla özdeş ve yapay kaynaklı daha birçok katkı maddesi gıda üretim teknolojisine dahil olmuştur. Bu dönemde artan nüfusla beraber talep edilen sadece gıda miktarında değil aynı zamanda gıda çeşitliliğinde de artış yaşanmaya başlamıştır. Gıda çeşitliliğindeki yenilikler bu dönemde gıda katkı maddesi kullanımına olan ilgiyi de arttırmıştır. Gıda endüstrisinde katkı maddelerinin kullanımının temelini tüketicinin gıdaya olan ilgisini artırılması, gıdaların raf ömrünün uzatılması, duyuşal özelliklerinin geliştirilmesi, kalite karakteristiklerinin korunması, gıda hazırlanmasına yardımcı olarak besleyici değerinin korunması olarak özetlenebilmektedir (Yörük ve Danyer, 2016).

21. yüzyılın değişen yaşam koşulları tüketim davranışlarını etkilerken beslenme alışkanlıklarında ve gıdaya ulaşım koşullarında da değişime neden olmaktadır. Toplumların sosyoekonomik düzeyinin artması, perakende sektöründeki büyük gelişim, ulaşım olanaklarının artması ile pazar sınırlarının uluslararası boyutlara ulaşması, bireylerin beslenme alışkanlıklarının temel nedenleri olarak gösterilmektedir. Beslenme alışkanlıklarındaki bu değişim gıda üretiminde ve teknolojisinde yenilikleri ve hızlı gelişmeleri ortaya çıkarmıştır. Gıda teknolojisinde yenilikler, değişen üretim teknolojileri, uzun raf ömrü gereksinimleri, kalitenin artırılması ve maliyetlerin azaltılmasına yönelik gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu kılmaktadır. Tüm bunların ötesinde gıdalarda bu katkı maddelerinin kullanılmasındaki temel neden bu gıdaların tüketiciye ulaştığında tat, koku ve görünüm gibi duyuşal özelliklerini korumak mümkün olduğunca tazeye yakın ve lezzetli olmasını sağlamaktır (Kaya, 2011). Gıda katkı maddeleri kullanım amaçlarının başında hastalık yapıcı mikroorganizmaların gelişmelerini önleyerek gıdanın dayanıklılığını ve raf ömrünü uzatmaktır. Ayrıca gıdaların lezzetini ve rengini tüketici için çekici hale getirip veya dokusal özelliklerini koruyup geliştirmek gıda katkı maddelerinin kullanımında bir diğer temel amaçtır. Bunların yanı sıra gıdaların besin değerlerindeki ve lezzetlerindeki kayıpları önlemek içinde sıklıkla gıda katkı maddelerine başvurulmaktadır. Özel tüketici guruplarına özgü diyetlere özgü gıdalar üretmek ve gıda çeşitliliğini arttırmak gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları arasındadır. Tüm bunların ötesinde gıda üretim teknolojisinde üretim proseslerindeki problemlerin çözümünde, kayıpların önlenmesinde ve maliyetlerin azaltılmasında gıda katkı maddeleri büyük önem taşımaktadır (Erişik, 2012)

1.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kaynakları ve Özellikleri

Gıda katkı maddeleri hayvansal kaynaklardan, bitkisel kaynaklardan ekstre edilerek üretilebildiği gibi laboratuvar ortamında sentetik olarak veya mikroorganizmalar kullanılarak biyoproses yöntemi ile de üretilebilmektedir. Hayvansal kaynaklı gıda katkı maddelerine guanilik asit, mono ve digliseritler, jelatinkarminler ve koşinal (böcek), vb. maddeler örnek gösterilebilir. Bitkisel kaynaklı gıda katkı maddelerine agar, karragenan, pektin, lesitin, karotenler, klorofil, guar gam v.b. örnek gösterilebilir. BHA gibi antioksidanlar, allura red gibi renklendiriciler, askorbik asit ve malik asit ise sentetik gıda katkı maddelerine örnektir. Mikroorganizmaları kullanarak biyoproses yöntemi ile ise tüm bunların ötesinde

enzimlerden renklendiricilere kadar hemen her türde gıda katkı maddesi sentezlemek mümkündür. Bu gıda katkı maddeleri pancar suyundan elde edilen kırmızı renklendirici gibi doğal, doğada bulunmayıp sadece insanlar tarafından sentezlenen yapay veya vanilin (vanilya) gibi doğadaki örneğine birebir olarak insanlar tarafından sentezlenen doğayla özdeş yapıda olabilirler (Erdem, 2014).

Doğal, yapay veya doğa ile özdeş olmasına bakılmaksızın gıda katkı maddeleri üründe kullanılabilmesine izin verilen en yüksek miktar otoritelerce belirlenen sağlık için risk oluşturmayacak kadar çok düşük oranlarda kullanılabilir. Bu oranlar Avrupa ve Amerika istatistiklerine bakıldığında yıllık ortalama kişi başı 2 kg katkı maddesi düzeyindedir. Ayrıca günümüzde 3 bine yakın gıda katkı maddesi gıda endüstrisinde kullanılmakta olup bu gıda katkı maddelerinin yaklaşık %90'ı doğal, ancak %10 kadarı doğa ile özdeş veya yapay gıda katkı maddeleridir. Bir maddenin hangi amaçla kullanıldığı önemli olmaksızın gıda katkı maddesi olarak kullanılabilmesi için aşağıdaki şu nitelikleri barındırması gerekmektedir (Yılmaz, 2018):

- Gıda katkı maddesinin tüketici sağlığı açısından herhangi bir risk teşkil etmediği yasal otoritelerce belirtilmiş olması gerekir.
- Gıda katkı maddesi kullanıldığı gıda maddesinin besin değerini ve kalitesini düşürmemelidir.
- Gıda katkı maddelerinin yasal otoritelerce belirlenen bütün niteliklere sahip olması gerekmektedir.
- Gıda katkı maddeleri karmaşık yapıda değil, basit yapıda olmalıdır.
- Gıda katkı maddelerinin reaksiyon alanı geniş olmalı ve ilave edildiği gıda maddesinde yapıya homojen olarak dağılmalıdır.
- Bozulmuş gıdayı maskeleyici ve tüketiciyi aldatmak amacıyla kullanılmamalıdır.
- Kullanımında teknolojik zorunluluk bulunmalıdır.

1.1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Gıdaların katkı maddeleri elde ediliş şekillerine bakılarak doğal, yarı sentetik veya sentetik maddeler; kullanım şekillerine bakılarak üretim proseslerinde doğrudan veya dolaylı olarak kullanılan maddeler; kullanım amaçlarına bakılarak ise raf ömrünün uzatılması, duyuşsal özelliklerin geliştirilmesi, gıda kalitesinin korunması, gıda üretimini kolaylaştırılması, gıdanın tat ve besin değerlerinin geliştirilmesinde kullanılan maddeler olarak çeşitli kategorilerde sınıflandırılmıştır.

Doğrudan kullanılan gıda katkı maddeleri, gıda ürünlerine kontrollü seviyelerde belli amaçlar için eklenen maddelerdir. Dolaylı olarak kullanılan gıda katkı maddeleri ise işleme veya paketleme sonucunda genellikle çok düşük seviyelerde yenilebilir bir ürünün parçası haline gelen maddelerdir (Pandey, 2012).

Gıda katkı maddelerini sınıflandırılmasında, tanımlamak ve tüketiciyi bilgilendirmek için kullanılan E-kodları “Avrupa Bilim Komitesi” tarafından belirlenen güvenlik testlerinden geçmiş ve spesifikasyonları belirlenmiş gıda katkılarına verilen E harfi ve 3 rakamı bulunan kodlardır. Teknolojinin ilerlemesi gıda katkı maddelerinin de her geçen gün yeni formülasyonlarda ve üretimlerde yer almasını sağlamakta olup bu durum gıda katkı maddelerinin tanımı ve sınıflandırılmaları zaman içinde değişimlere sebebiyet vermektedir.

FAO/WHO Birleşik Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesinin (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) onayladığı listelerde gıda katkı maddeleri; ait oldukları grubun adı ve The European Food Safety Authority'nin (EFSA) belirlediği E kodlarına göre sınıflandırılır. Bu sınıflandırma Tablo 1.1'deki gibidir (Igoe, 2011).

Tablo 1.1 Gıda Katkı Maddelerinin E Kodları

Katkı Maddesi Grubu	E Kodu	Kullanım Amacı
Antioksidanlar	E300– E399	Gıdaya eklendiğinde, gıdanın oksidatif bozulmasını önleyerek arzu edilmeyen, koku, tat, renk değişimlerini önleyen veya geciktiren; özellikle yağlı besinlerde acılaşmayı önleyerek raf ömrünü uzatan kimyasal maddelerdir
Aroma Vericiler ve Lezzet Arttırıcılar	E 620– 640	Aroma vericiler gıdanın işlenmesi, stoklanması ve tüketilmeye hazır hale gelmesi sırasında ortaya çıkabilecek lezzet değişimlerini engellemek veya gıdanın tat ve kokusunu değiştirmek amacı ile gıdalara katılan; doğal, doğayla özdeş veya yapay kimyasallardır

<i>Asitler</i>	E500–E509	Asitler gıdalardaki tadı ve kokuyu daha belirgin hale getirmek, istenmeyen tatları gizlemek veya baskın tadın dışındaki tatları ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal etkiye sahip olan asitler istenmeyen mikroorganizmaların üremelerinin kontrolü amacı ile de gıdalara eklenebilmektedir.
<i>Asitlik Düzenleyiciler</i>	E260-E300	Bir diğer adı ekşileştiriciler olan asit düzenleyiciler kullanıldıkları gıdanın pH'nı değiştirmeye veya kontrol etmeye yarayan kimyasallardır.
<i>Ayırıcılar</i>	E510–E599	Şelat ajanları olarak da isimlendirilen ayırıcılar; gıdalarda acılaşmaya, renk değişimine ve besin değerinin azalmasına neden olan serbest metal iyonları etkileşime giren kimyasal maddelerdir
<i>Emülgatörler</i>	E440–E449	Gıdalarda normal şartlarda birbiriyle çözünmeyen maddelerin tekstür özelliklerini koruyarak yapıları bozulmadan uzun süreler stabil kalmalarını sağlayan kimyasallardır.
<i>Emülgatör Tuzları</i>	E450–E459	Emülgatör tuzları tek değerlikli katyonlar ve polivalent anyonlardan oluşan iyonik bileşikler olup özellikle süt endüstrisinde proteinleri dispers hale getirerek yağ ve diğer bileşenlerin yapı içerisinde homojen dağılımını sağlayan maddelerdir.
<i>Enzimler</i>	E 1100-1105	Enzimler katalitik aktiviteye sahip protein yapısında bileşikler olup gıda teknolojilerinde, biyosentez, bileşenlerin parçalanması, akışkanlığın ayarlanması ve lezzetlerin düzenlenmesi gibi pek çok işlem için kullanılmaktadır.
<i>Hacim Arttırıcılar</i>	E1200	Dolgunlaştırıcılar veya hacim verici ajanlar olarak da bilinen hacim arttırıcılar; gıdanın kalori değerini etkilemeksizin hacminin artmasını sağlayan kimyasal bileşiklerdir.
<i>İtici Gazlar</i>	E 938-949	Gıdaların bozulmasını önlemek amacı ile kullanılan gaz formundaki kimyasallardır. Gıdalarda mikroorganizmaların gelişimini sağlayan gaz ortamının yerini alarak gıdaların stoklanması ve ambalajlanması sırasında bozulmaların önlenmesi için kullanılmaktadır.
<i>Jelleştirme Ajanları</i>	E400-440	Gıdalarda suya bağlanarak suyu akışkan formdan jölemsi bir jel yapısı oluşturan kimyasallardır.
<i>Kabartıcılar</i>	E920–E929	Bir diğer adı kabartma ajanı olan kabartıcılar, unlu mamullerde karbondioksit gazı oluşturarak hamurun hacminin artmasını ve gözenekli yumuşak bir yapı almasını sağlayan kimyasal maddelerdir.
<i>Kıvam arttırıcılar</i>	E400-440	Gıdanın akışkanlığını düzenleyen, viskozitesini arttırarak kalınlaştıran gıda katkı maddeleridir.

<i>Koruyucular</i>	E200-E299	Bir başka adı antimikrobiyal olan koruyucular, gıdalarda mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek bozulmalara karşı koruyan ve bu sayede raf ömrünü uzatan kimyasal maddelerdir.
<i>Köpüklenmeyi Önleyiciler</i>	E900-E905	Gıda üretim prosesleri sırasında oluşan köpürmeyi kontrol ederek teknolojik avantaj sağlayan, genelde silikon bazlı olan kimyasal maddelerdir.
<i>Modifiye Nişasta</i>	E1404-E1451	Modifiye nişastalar gıdaların kıvamını arttırmak amacıyla nişastayı kimyasal işleme tabi tutularak istenilen nitelikler kazandırılmasıyla oluşan bir katkı maddesidir.
<i>Nem Tutucular</i>	E1517-E1518	Islatma ajanı olarakta adlandırılan nem tutucular kek, reçel ve pasta gibi ürünlerde kurumayı önlemek; nemi ve yumuşaklığı korumak, bayatlamayı geciktirmek amacıyla eklenen su tutucu kimyasallardır.
<i>Parlatıcılar</i>	E910-E919	Gıdanın tüketicinin ilgisini çekebilmek amacı ile dış yüzeyini cilalı parlak hale getirmek veya dış yüzeyde parlak bir tabaka oluşturmak amacı ile kullanılan kimyasallardır.
<i>Renklendiriciler</i>	E100-E199	Gıdaların çekiciliğini arttırmak veya ürünün işlenmesi, depolanması veya tüketime hazır hale getirilmesi aşamalarında oluşacak renk kayıplarının giderilmesi için kullanılan doğal veya sentetik kimyasal pigmentlerdir.
<i>Sertleştiriciler</i>	E 509	Başta konserve endüstrisi olmak üzere pek çok alanda işlenen meyve ve sebzelerin dokularını gevrek hale getiren veya jelleştirici ajanlar ile reaksiyona girerek oluşan jel yapısını güçlendiren kimyasal maddelerdir.
<i>Stabilizatörler</i>	E400-440	Hidrokalloid olarakta adlandırılan stabilizatörler gıdanın kristalleşme, dibe çökme, faz ayrımı gibi tekstürünü bozacak durumların engellenmesi amacı ile gıdalara katılan kompleks yapıdaki hidrokarbonlardır.
<i>Tatlandırıcılar</i>	E950-E969	Gıdaların lezzet ve aromalarının tüketici için daha cazip hale getirmek ve kalorisiz olarak şeker tadını vermek amacıyla gıdalara katılan yapay kimyasallardır.
<i>Topaklanmayı Önleyiciler</i>	E 535-E536, E551-E559	Topaklanmayı önleyiciler tuz, şeker vb. ıslanmamasına rağmen nem tutarak akışkanlığı azaltan topak oluşumlarını önlemek için gıdalara ilave edilen önleyici kimyasal maddelerdir.
<i>Un İşleme Ajanları</i>	E920-E928	Un ile yapılan hamurun kıvamını ve işlenme becerisini olumlu yönde etkileyen, ayrıca hamurun pişme kalitesini arttıran kimyasal maddelerdir.

1.1.4. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanımını Düzenleyen Kuruluşlar

Güvenlik standartları belirlenmiş gıda üretimi ve toplumun güvenli gıda tüketimi tüm dünyayı ilgilendiren global bir konudur. Bu durum, ilgili güvenlik standartlarını oluşturan ve denetleyen uluslararası yapılanmalara gereksinim doğurmuştur. Gıda katkı maddelerinin kullanılabilirliğinin ve güvenliğinin sistematik bir şekilde incelenmesi ilk olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) nun 1956'da 43 dünya ülkesinde yaptığı tarama çalışmaları ile başlamıştır. Daha sonra 1962'de gıda katkı maddesi olarak kullanılan maddelerin toksikolojik olarak incelenmesi için FAO ve WHO' bünyesinde uzmanların oluşturduğu gıda komisyonu (CAC) ve bu kuruluşun alt komitesi olan Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi (JECFA) kurulmuştur. Günümüzde gıda katkı maddelerinin güvenilirliği konusunda çalışmalar yapan ve hangi maddelerin hangi dozlarda insan sağlığı açısından güvenilir olduğunu belirleyen ilgili listeleri hazırlayan birimler aşağıda belirtilmiştir (Arslan G., 2011).

Ülkemizde ise ilk olarak gıda katkı maddeleri ile ilgili olarak Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı tarafından 1983'de bir yönetmelik çıkarılmış, buna ek bir yönetmelik 1984'te yürürlüğe girmiştir. Daha sonra 1990 yılında Sağlık Bakanlığı bu alanla ilgili olarak yeni bir yönetmelik yayımlamıştır. Son olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığınının 16 Kasım 1997 tarihinde yayınladığı Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY) ile gıda katkı maddelerinin kullanımı düzenlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (1997) ülkemizde hangi katkı maddelerinin hangi gıdalara ve ne miktarda katılabilecekleri belirlenmiştir (Yılmaz, 2018).

- *Codex Alimentarius Commission (CAC) - Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu:*

Birleşmiş milletlere bağlı olarak çalışan, dünya çapında gıda uygulamalarının teknoloji ve sağlık açısından standardize eden komisyondur. Bu konuda dünyanın en yetkili insanlarından oluşan bu komisyonun hazırladığı standartlar dünya üzerindeki bütün ülkeler için güvenli gıda üretiminde referans olarak değerlendirilmektedir. (Yılmaz, 2018).

- *Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) – Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi:*

Gıda katkı maddelerinin hangi gıda sınıflarında kullanılabileceğini ve kullanıldığı gıda sınıflarında hangi oranlarda bulunabileceğinin üst limitleri belirleyen komitedir (Arslan G., 2011).

- *The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)-Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi:*

Gıda katkı maddelerinin toksikolojik açıdan güvenirliliğini belirleyen ve bu maddelerle ilgili günlük alım limiti değerlerini belirleyen komitedir (Yılmaz, 2018).

- *The European Food Safety Authority (EFSA)-Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi:*

Bir Avrupa Birliği komisyonu olan EFSA 2002 yılında kurulmuştur. Bu kuruluş avrupada gıda zincirindeki her basamaktaki riskler ile ilgili değerlendirme ve iletişim yapmakla görevlidir (Erdem, 2014).

- *Food and Drug Administration (FDA)-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi:*

Bir Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) kuruluşu olan FDA kararları tüm dünya genelinde referans olarak kabul gören bir yapıdadır. Gıda katkı maddeleri ile ilgili GRAS (Genelde güvenli kabul edilenler) listelerini hazırlayan ve (kabul edilebilir günlük tüketim) ADI değerlerini araştırıp onaylayan kurumdur (Erdem, 2014).

1.1.5. Gıda Katkı Maddelerinin Etiketlenmesi ve E Kodları

Gıda katkı maddelerini sınıflandırılmasında, tanımlamak ve tüketiciyi bilgilendirmek için kullanılan E-kodları; "Avrupa Bilim Komitesi" tarafından belirlenen güvenlik testlerinden geçmiş ve spesifikasyonları belirlenmiş gıda katkılarına verilen E harfi ve 3 rakamı bulunan kodlardır. Avrupa birliği ülkeleri 1979 yılından itibaren her gıda maddesinin "Scientific Committee on Food (SCF)" tarafından E kodları ile tanımlanmasına karar vermiştir. E numaralı maddelerin kullanımı her ülkenin ilgili otoritelerince belirlenir ve ülkeden ülkeye farklılık gösterebilir. Bir diğer deyişle ilgili komisyonca onay alarak E numarası verilen bir gıda katkı maddesi bir Avrupa Birliği ülkesinde kullanılabilirken bir başka Avrupa veya dünya ülkesinde kullanımı yasaklanabilir (Altun, 2014).

1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Üretimi

Günümüzde endüstride 5000'den fazla sayıda gıda katkı maddesi kullanılmakta olup bu gıda katkı maddeleri üretim şekline göre doğal, doğala özdeş veya yapay olmak üzere üç ana katagoriye ayrılmaktadır (Erdem, 2014). Kaynakları bakımından gıda katkı maddelerini incelediğimizde ise hayvansal, bitkisel, mikrobiyal ve mineral kaynaklı gıda katkı maddeleri olmak üzere dört temel katogoriye ayırabiliriz (Türker, 2020). Gıda katkı maddelerinin üretiminde daha önceleri bitkisel ve/veya hayvansal kaynaklardan çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmış olmakla birlikte, son yıllarda çeşitli ekonomik ve sosyal bazlı nedenlerden dolayı mikrobiyal üretim yöntemlerinin endüstrideki payı günden güne artmaktadır (Seviour vd., 2013).

Mikrobiyal üretimlerde gıda proseslerinde ortaya çıkan çeşitli yan/atık ürünlerin hammadde olarak kullanılabilmesi ekonomik avantaj sağlamaktadır. Ayrıca hayvansal kaynaklı gıda katkı maddelerinin üretiminde kullanılan bazı hayvanların veya bunların ve bitkisel kaynaklı gıda katkı maddelerinin üretiminde kullanılan yardımcı kimyasalların tüketilmesinin dini gereksinimler açısından sakıncalı olabilmesi, dini hassasiyetleri olan tüketicilerin de mikrobiyal gıdalara olan talebini arttırmış, bu durumda üreticilerin mikrobiyal üretim proseslerini geçişini teşvik etmiştir (Gündüz, 2009; Ermis, 2017).

1.2.1. Mikroorganizmaların Gıda Endüstrisinde Kullanımı

İnsanlık farkında olmadan binlerce yıldır gıda üretimi için mikroorganizmalardan yararlanmaktadır. Sümerler ve Çinlilerin M.Ö 7000 li yıllarda *Saccharomyces cerevisiae*'ı kullanarak bira ürettiği görülmektedir. Şarap üretiminin M.Ö. 6000'de İran'da, MÖ 3000'de Mısır'da olduğu ve daha sonra da Avrupa'ya yayıldığı bilinmektedir. Ayrıca MÖ 4000 yılında Mısır'da mikroorganizmalar kullanılarak ekmek ve peynir üretimi yaptığı görülmektedir. Çoğunlukla anaerobik olan bu işlemler, meydana gelen kimyasal değişikliklerden hangi faktörlerin sorumlu olduğunu anlaşılmadan, çokta kontrollü olmayan geleneksel koşullar altında küçük ölçeklerde gerçekleştirilmiştir (Bentley ve Bennett, 2008).

Mikroorganizmalar gıda katkı maddesi, enzim ve antibiyotik gibi pek çok biyokimyasalın üretiminde ve gıdaların işlenmesinde kullanılabilir. Ekonomik önemi olan bir ürün veya hizmet elde etmek için mikroorganizmaların kullanılması

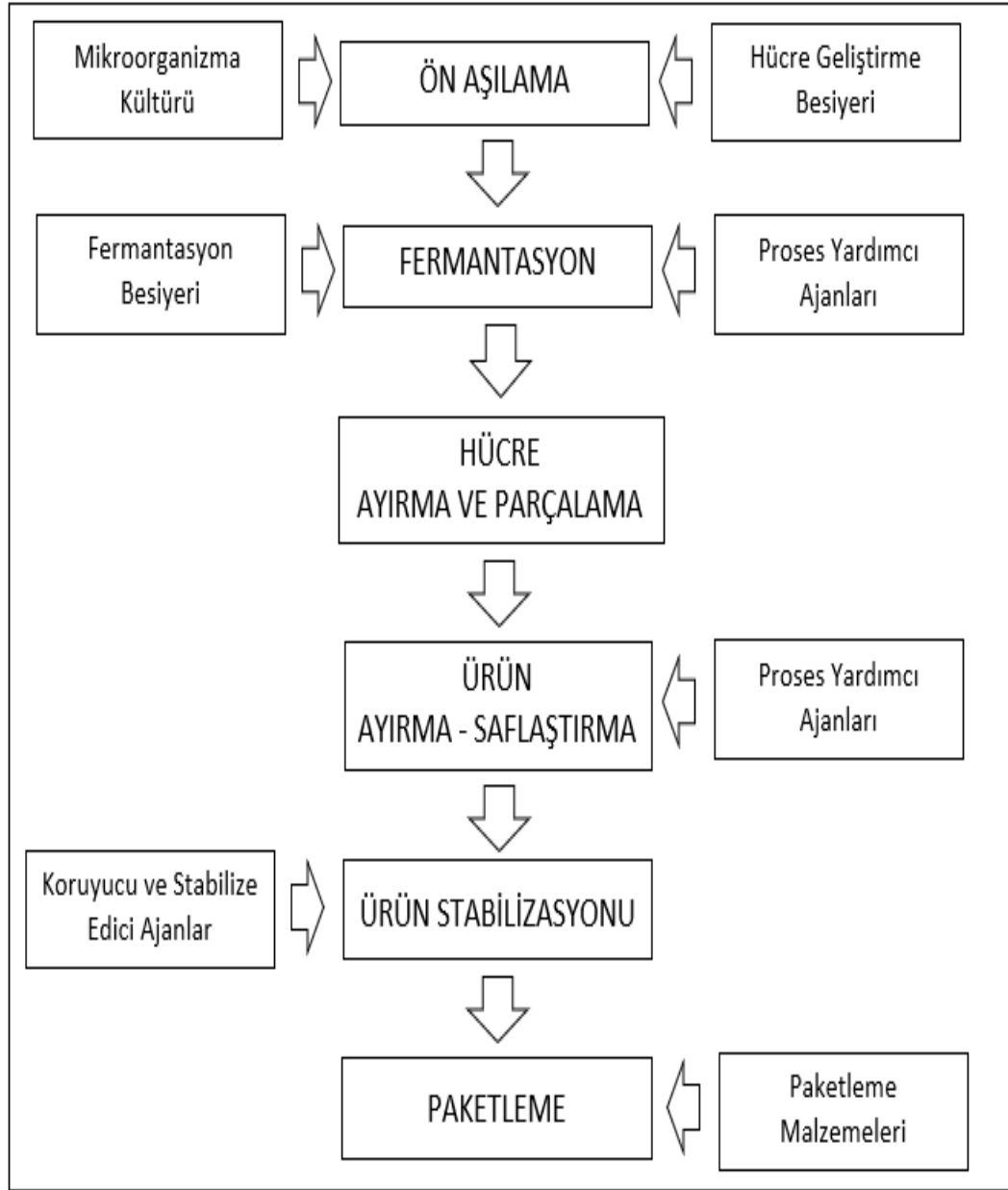
mikrobiyal biyoteknoloji veya biyoproses olarak tanımlanır (Lopes vd., 2017). Endüstride enzimlerin ve mikroorganizmaların kullanımı 1950'lere kadar nispeten yavaş ilerlesede; mikrobiyal çeşitlilik ve fonksiyon araştırmalarında büyük gelişmeler sağlanmıştır. Biyoproses endüstrisi ilk zamanlarda sistemlerin standartlaştırma, izlenme ve kontrol edilmeden uzak olarak, katı hal fermantasyonları veya sıvı besiyeri inkübasyonları ile bazı endüstriyel metabolitlerin üretimleri gerçekleştirilebilmiştir. Gelişen teknoloji ile artık birçok endüstriyel ürünün büyük ölçekli ticari üretimleri için mikroplardan faydalanıyoruz. Günümüzde başta gıda katkı maddeleri olmak üzere birçok endüstriyel ürün katı gıda güvenliği standartlarını karşılar şekilde ve oldukça ekonomik koşullarda; biyoreaktörler içerisinde mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Bentley ve Bennett, 2008). Büyük ölçekli gıda katkı maddelerinin mikroorganizmalar yardımı ile üretimlerinde hammadde olarak endüstriyel artıkların kullanımı üretim maliyetlerini düşürmesi ve elde edilen ürünün katma değeri biyoprosesi sektörün vazgeçilmez bir parçası haline getirmiştir (Seviour vd., 2013).

1.2.2. Biyoproses ile Gıda Katkı Maddelerinin Üretimi

Biyoreaktörlerde mikroorganizmalar yardımı ile gıda ve gıda katkı maddesi üretimi dış koşullardan etkilenmeden her zaman istenilen standartta ve kalitede kesintisiz şekilde üretim yapmayı mümkün kılmaktadır. İstenilen gıda ve gıda katkı maddesi üretim sürecinin geliştirilmesi öncelikle mikrobiyologların ve mühendislerin küçük ölçekli laboratuvar çalışmaları ile başlayıp optimize edilerek endüstriyel ölçekte etkili bir şekilde çalışan bir sisteme dönüştürmesini takip eden disiplinler arası faaliyetleri içerir. Yapılan çalışma sonucunda üretilecek ürüne ait biyoproses süreç verimive üretkenliği optimize etmekte; yüksek verimlilikte ve sabit standartta sürekli ürün elde edilmesini mümkün kılınmaktadır (Mateles, 1979). Kimyasal sentez ile gıda katkıları üretmenin yüksek saflıkta ve istenilen özellikte ürün elde etme avantajlarının yanı sıra, bu yöntemde kullanılan girdilerin her geçen gün artan maliyeti, yüksek yatırım ve enerji girdileri, toksik ara ürünlerin ürünlerin ortaya çıkması ve biyolojik kökenli kimyasalların üretilmesindeki zorluklar gibi gözardı edilemeyen ciddi dezavantajları vardır. Buna karşılık, mikroorganizmaların kullanıldığı biyoproses yöntemiyle gıda katkıları üretiminde hammadde olarak tarımsal ürün veya endüstriyel artıkların kullanılabilmesi, katma değeri yüksek bu bileşenlerin üretimi için giderek daha uygulanabilir bir ekonomik alternatif haline gelmiştir. Bunun yanı sıra biyomühendislik yöntemleri ile mikroorganizmaların metabolit üretim yeteneklerinin

artırılmasına yönelik tekniklerin hızla gelişmesi, gerek biyoproses ile üretilebilen ürün çeşitliliğinin artırılmasında gerekse mevcut ürünlerin daha düşük maliyette ve yüksek standartlarda üretimine olanak sağlamış, bu durum da çeşitli gıda katkı maddelerinin biyoteknolojik yöntemlerde üretilebilmesine büyük katkı sağlamıştır (Lopes vd., 2017).

Gıda endüstrisinde büyük önemi olan proteinlerin, aminoasitlerin, organik asitlerin, enzimlerin ve antibiyotiklerin üretiminde kontrollü ve izlenebilir üretim ortamı sağlayan biyoreaktörler kullanılmaktadır. Biyoreaktörde gerçekleştirilecek biyoproseslerin temel girdileri ilgili üretimi yapacak saf kültür ve saf kültürün üretimde kullanacağı besi ortamıdır. İlgili mikroorganizma reaktör içindeki kontrollü şartlarda besiyerini hammadde olarak kullanarak istenilen biyolojik ürünleri sentezler, daha sonra ise biyoreaktör dışına alınan bu girdilerden üretilen biyolojik ürünler saflaştırma prosesleri ile ayrılarak kullanıma hazır hale getirilirler (Şekil 1.1). Biyoprosesin en önemli girdisi olan biyosentezi gerçekleştirecek saf kültür, başta toprak olmak üzere su, bitki, hayvan ve gıda ürünlerinden izole edilerek elde edilebilmektedir. Bu kültürler doğadaki orijinal hali ile proseslerde kullanılabilirdiği gibi çeşitli genetik modifikasyonlar ile de istenilen özelliklere sahip hale getirilip proseslerde kullanılabilir. Biyoprosesin bir diğer önemli girdisi olan besi ortamı, mikroorganizmanın gelişmesi ve istenen ürünü sentezleyebilmesi için gereken su, karbon kaynağı, azot kaynağı ve bazı vitaminler ile mineralleri içeren steril karışımlardan oluşmaktadır. Gıda endüstrisinde ortaya çıkan pek çok üretim artığının bu bileşenlerin pek çoğunu içermesi, onların farklı biyoloji ürünlerin sentezinde ekonomik hammaddeler besiyeri olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Biyoreaktör içerisinde; saf mikroorganizma kültürlerinin ortama eklenen besiyeri içeriklerini kullanarak sentezlediği biyolojik ürünler bir sonraki aşamada ortamdan ayrıştırılarak geri kazanılması gerekmektedir. Bu işlem içinse hücre parçalama, çöktürme, filtrasyon veya kromatografi gibi bir dizi işlem uygulanarak istenen metabolit(ler) diğer hücre bileşenlerinden ayrılarak gerekli işlemlerden geçirildikten sonra endüstrinin kullanımına hazır hale getirilir (Aran, 2014).



Şekil 1.1. Mikrobiyal Gıda Katkı Maddesi Üretim Prosesi

1.2.3. Üretiminde Mikroorganizmaların Kullanıldığı Gıda Katkı Maddeleri

Biyoproses endüstrisindeki gelişmeler ve yenilikler pek çok gıda ve gıda katkı maddesinin mikrobiyal prosesler ile basit ve ekonomik olarak üretilmesini sağlamıştır. Gerek mikroorganizmaların enzimleri yardımı ile belirli substratları istenilen bir biyolojik ürüne çevrilmesi, gerekse mikroorganizmaların besiyeri ortamındaki karbonhidrat ve azot kaynaklarını kullanarak istenilen biyolojik ürünleri sentezlemesi, gıda endüstrisinin gıda katkı maddesi üretiminde her geçen gün biyoproses tekniklerini daha çok kullanmasını sağlamıştır. Günümüzde mikroorganizmalar yardımı ile en fazla üretilen gıda katkı maddeleri ise şunlardır (Lopes vd., 2017):

- Aminoasit ve türevleri (Sistein, Lizin)
- Antioksidanlar (Glukoz Oksidaz, Askorbik Asit)
- Aroma Vericiler (Vanilin, Benzaldehit)
- Bakteriosinler (Laktosin, Nisin)
- Enzimler (Alfa Amilaz, Lipaz)
- Kıvam Arttırıcılar ve Gamlar (Ksantan Gam, Gellan Gam)
- Organik Asitler (Sitrik Asit, Laktik Asit)
- Polisakkaritler ve Oligosakkaritler (Dekstran, Alginat)
- Renklendiriciler (Riboflovin, Beta Karoten)
- Yağ Asitleri (Araşidonik Asit, Dokosaheksaenoik Asit)

1.3. Mikrobiyal Gıda Katkıları

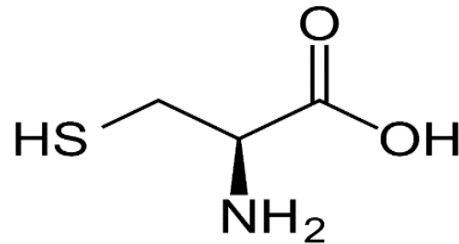
Mikrobiyal gıda katkı maddeleri üretim avantajları ve tüketici talepleri doğrultusunda gün geçtikçe hayvansal ve bitkisel kaynaklı gıda katkı maddelerinin yerini almaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi günümüz teknolojisi ile daha önce hayvansal veya bitkisel kaynaklardan elde edilen pek çok gıda katkı maddesi artık mikrobiyal prosesler ile de üretilmektedir. Mikrobiyal prosesler ile üretilen sistein, glutamik asit ve beta karoten gibi gıda katkı maddelerinin maliyet avantajı üreticiler için bir avantaj sağladığı gibi; bu gıda katkı maddelerinin geleneksel üretiminde insan ve hayvanlardan elde edilen kılların kullanılması da vejetaryan, koşer ve helal hassasiyeti olan tüketicilerinde mikrobiyal yöntemler ile üretilen gıda katkı maddelerini tercih etmesine sebep olabilmektedir.

1.3.1. Sistein

1.3.1.1. Sistein Tanımı, Biyokimyasal Yapısı ve Tarihi

İnsan hayatı için hayati öneme sahip olan proteinlerin, vitaminlerin ve bazı biyomoleküllerin ana bileşenlerinden olan kükürt; başta insanlar olmak üzere bitkisel ve hayvansal organizmalarda bulunan ve bu organizmaların metabolizmalarında kritik öneme sahip olan önemli bir elementtir (Yılmaz, 2019). İnsanlar genel olarak kükürt gereksinimini, inorganik kükürtü vücutlarında depolayan bitkilerden veya bu bitkileri yiyerek kükürtleri bünyelerine transfer eden hayvanların ürünlerini tüketerek sağlamaktadır. Kükürt içeren başlıca amino asitler metiyonin, homosistein ve en önemlisi sisteindir (Bin, Huang ve Zhou , 2017). Beslenme yoluyla insan vücuduna giren kükürt, kükürt içeren amino asitlerin sentezi amacıyla organizmada kullanılmaktadır. Kükürt içeren amino asitler sülfidril (tiyol) grubu içeren proteinlerin yapısında, metabolizma reaksiyonlarında ve bağışıklık sisteminde çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Bu amino asitler arasında metiyonin, sistein, homosistein ve taurin bulunur.

Sistein $C_3H_7NO_2$ kimyasal formüle sahip, $121.16 \text{ g.mol}^{-1}$ moleküler ağırlığında olup doğada genel olarak L ve D izomeri yapısında bulunan, insan vücudu tarafından sentezlenebilir olmasından dolayı yarı esansiyel olarak gruplandırılan, 20 amino asitten biridir (Şekil 1.2). Sistein, asetik asit ve amonyak gibi çözücülerde çözünebilirken eter, aseton, benzen gibi çözücülerde çözünemeyen bir aminoasittir. Sistein genel olarak renksiz ve kristal bir yapıya sahiptir. Sistein sülfidril fonksiyonel bileşiklerinden olan tiol grupları içeren bir aminoasit olup polar ve yüksüz bir yapıya sahiptir. Disülfid bağlarının oluşması, çoğu proteinin üç boyutlu yapılarının oluşmasında kritik öneme sahip olup; bu bağlar iki sistein arasındaki tiol gruplarının okside olmasıyla mümkün olabilmektedir (İsmail vd., 2014).



Şekil 1.2. L-Sisteinin Kimyasal Yapısı

İlk sistein izolasyonu 1810 yılında böbrekten gerçekleştirilmiştir. 1899 yılına gelindiğinde ise sistein hayvan boynuzundan elde edilerek bir proteinin yapıtaşlarından biri olduğu ortaya çıkartılmıştır (Ruzanna, 2007). Daha sonraki yıllarda da boynuz, tüy, kıl, pençe gibi hayvan organlarının yüksek oranda sistein aminoasidi içerdiği tespit edilmiştir. Sadece hayvansal kaynaklarda değil sebze ve meyvelerin de yapısında doğal olarak sistein bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak hayvansal kaynaklarda, bitkisel kaynaklı proteinlere kıyasla daha yüksek oranlarda sistein yer almaktadır. Sistein içeriği bakımından buğday, sert kabuklu yemişler, brokoli, sarımsak, soğan ve keçiyoynuzu oldukça zengin bitkisel kaynaklardır. İnsan metabolizmasında anahtar roller üstlenen sisteinin vücudumuza temini diyet yoluyla; yemişlerden, et ürünlerinden, tahıllardan, bazı meyve ve sebzelerden veya takviye edici gıdalardan gerçekleşmektedir (Şimşek, 2019).

Sistein biyolojik ve ticari olarak önemli bir amino asittir. Biyolojik olarak insan, hayvan ve bitkilerin metabolizmasında kritik görevlere sahiptir. Sistein sülfür içeren antioksidanlar, vitaminler gibi bileşiklerin biyosentezi, ağır metallerin detoksifikasyon redoks döngüsü, protein katlanarak üç boyutlu yapısını oluşturması ve stabilitesi, ikincil metabolitlerin oluşumu gibi reaksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır (İsmail, 2014). Ayrıca sistein metiyonin, tiyamin, biotin, koenzim ve kofaktörler gibi sülfür içeren bileşiklerin biyosentezinde ve Demir/Kükürt arasındaki dengenin sağlanmasında görev almaktadır (Arslan, 2016).

Sistein aminoasitinin en büyük özelliklerinden biri yapısında bulunan tiyol grupları redoks reaksiyonlarına sebep olmaktadır. Tiyol grupları arasındaki redoks reaksiyonları sonucunda iki sistein aminoasidi birbirlerine disülfid bağı bağlanarak sistinin ortaya çıkmasını sağlarlar. Sisteinin yapısında bulunan bu disülfid bağları çeşitli proteinler meydana oluşmasında, proteinlerin üç boyutlu yapılarının oluşmasında, başka aminoasit ve proteinlerle etkileşiminde ve kararlı bir yapı sağlamasında da önemli bir role sahiptir (Wirtz ve Droux, 2005). Metabolizmadaki çoklu rolleri ve çeşitli endüstriyel alanlardaki sayısız uygulamadan dolayı sistein endüstrinin yüksek talep gösterdiği bir aminoasittir.

1.3.1.2. Sistein Kullanım Alanları ve Pazarı

Sistein başta gıda ve ilaç endüstrisinde olmak üzere tarım, hayvancılık ve kozmetik gibi endüstrilerde kullanılan ticari açıdan oldukça önemli bir aminoasittir (Wada ve Takagi, 2006). Sistein insan metabolizmasındaki etkileri nedeni ile ilaç endüstrisinde çok farklı uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Emilim sendromu bozukluğu olan ve glutahiane eksikliği bulunan bireylerde, genetik ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda sistein, bu metabolik hastalıkların giderilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Şimşek, 2019). Ayrıca sistein ağız içi iltihapları, bazı kanser türleri ve HIV gibi viral hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır (İsmail vd., 2014). Premature bebekler, çocuklar ve yaşlılar gibi bünyelerinde sistein sentezi yetersizliği görülen kişilerde takviye edici olarak kullanılmaktadır. Tüm bunların yanı sıra parasetamol ve asetaminofen zehirlenmesine karşı panzehir olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (Nur, Yumi ve Jamal, 2014).

Sistein gıda endüstrisinde de oldukça yaygın kullanılan bir gıda katkı maddesi olup; L-sistein (E910), L-sistein hidroklorür (E920) ve L-sistein hidroklorür monohidrat (E921) formlarında gıdalarda kullanılmaktadır. Sisteinin gıdalarda sektöründe en yaygın kullanıldığı ürünler unlu mamüller ve bitkisel proteinlerden elde edilen et benzeri ürünleridir. Sistein riboz şekeri ile reaksiyona girerek oluşturduğu bileşiklerle et aroması oluşturduğu ve mevcut et aromasını güçlendirdiği belirtilmektedir (Renneberg vd., 2016). Sisteinin unlu mamüllerde kullanımının temel amacı ise hamurun işlenmesini kolaylaştırmak, elastikiyetini arttırmak ve hamurun kabarmasını geliştirmektir. Hamur üretimi sırasında harca katılan sistein, hamur oluşumu sırasında oksijen ile etkileşime geçip molekül içi ve moleküller arası disülfid bağ oluşumu tetikleyerek gluten ağının oluşumuna ve stabilitesine yardımcı olur (Ertugay, 1982). Bu durum hamurun reolojik özelliklerini etkilemekte, üretilen unlu mamülün kalitesini arttırmaktadır. Hamuru yumuşatmak ve böylece daha esnek ve genişletilebilir hamur geliştirmeye, işleme süresini azaltmaya yardımcı olması sisteinin pizza, baklava ve yufka gibi dirençli hamurlara ihtiyaç duyulan alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. (Majzoobi vd., 2011). Tüm bunların yanı sıra sistein enzimatik esmerleşmeleri önlemek amacı ile tüketime hazır olarak doğranmış ve yıkanmış olarak satılan meyve ve sebzelerde proses yardımcı malzemesi olarak kullanılmaktadır (Şimşek, 2019).

Sisteinin kullanıldığı bir diğer önemli endüstriyel alan ise kozmetik sektördür. Sistein antioksidan özelliği ile yaşlanmayı geciktirme ve cildi güneşin ultraviyole ışınların

etkilerine koruma amacı kozmetik ürünlerinde sıklıkla tercih edilmektedir (Nur, Yumi ve Jamal, 2014). Ayrıca sistein kalıcı perma uygulamalarında saçın içeriğinde bulunan keratindeki disülfid bağlarını kırmak için thioglycolic asit substratı olarak kuaför ürünlerinde kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra sistein, saç, tırnak ve cilt bakım ürünlerinde destekleyici olarak ve cilt beyazlatıcı ajan olarakta kullanılmaktadır (Renneberg vd., 2016).

Sistein hayvanların ihtiyaç duyduğu kükürt ihtiyacını karşılamak amacı ile hayvan yemi endüstrisinde de yoğun olarak kullanılmaktadır. Hayvanların gelişim metabolizmasında birçok kritik role sahip olan sistein, sülfür içeren aminoasitler, antioksidanlar, vitaminler gibi bileşiklerin biyosentezi ve ikincil metabolitlerin oluşumu gibi reaksiyonların tetiklemek; bu sayede büyümelerini hızlandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle tüy, yün ve deri gibi ticari değere sahip hayvansal ürünlerin yapısında yüksek oranda sistein bulunması sisteinin hayvan yemleri aracılığıyla hayvan metabolizmasına dahil edilip ilgili hayvansal ürünlerin verimini ve kalitesini arttırmak için kullanımını tetiklemektedir (Yin vd., 2015). Ayrıca sistein ruminant hayvanlarda nitrat zehirlenmesini önleyici olarak da hayvan yemlerinde kullanılabilir (İsmail vd., 2014).

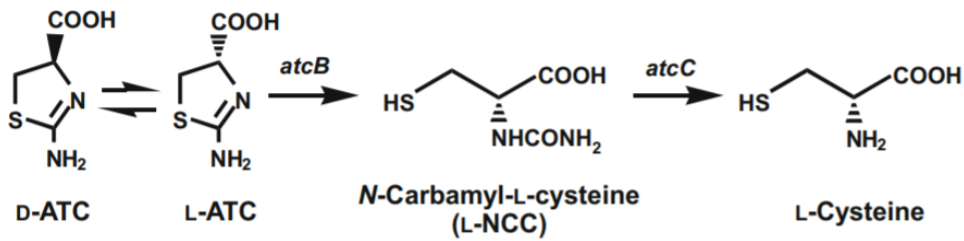
Küresel sistein üretimi 2014 yılında 8.3 bin ton civarındayken 2019 yılına gelindiğinde bu rakam 12 bin tona ulaşmıştır. Bu üretimin %12'si biyolojik prosesler ile üretilirken, %1 kadarı kimyasal sentezle ve %87 kadarı ise protein hidrolizi yöntemleri ile gerçekleştirildiği görülmektedir. Sisteinin pazar büyüklüğü ise 2018 yılı itibari ile 410 milyon ABD doları olup 2025 yılına gelindiğinde yıllık ortalama %8.3 büyüme ile 410 milyon ABD dolarına ulaşması ön görülmektedir. Küresel pazarda Almanya, Çin ve Japonya'nın üretimi üstlendiği gözlemlenilen pazardaki en etkili şirketler Wacker (Almanya), Nippon Rika (Japonya), Ajinomoto (Japonya), Shine Star (Hubei) Biological Engineering (Hindistan) ve Donboo Amino Acid (Çin)'dir (Marketwatch, 2020).

1.3.1.3. Sistein Üretim Yöntemleri

Dünyada artan sistein talebi sisteinin endüstriyel ölçekte yenilikçi, verimli ve ekonomik üretim yöntemleri ile üretimi ihtiyacını doğurmuştur. Sistein endüstriyel olarak ilk zamanlarda keratince zengin kaynaklardan hidrolize edilip ekstrasyon ile elde edilmekteydi. Günümüzde ise endüstriyel düzeyde sistein üretimi keratin hidrolizi

ve ekstrasyonu, enzimatik biyodönüşüm ve mikrobiyal biyoproses olmak üzere üç temel yöntem ile gerçekleştirilmektedir (İsmail vd., 2014).

Keratin hidrolizi yönteminde; hayvan ve insandan alınan tüy, saç, kıl ve toynaklar gibi keratine zengin kaynaklardan hidroklorik asit yardımıyla geleneksel protein hidrolizatı elde edip, daha sonra bu hidrolizattan ekstrasyon yöntemiyle sistein izole edilmektedir. Tüy, saç, kıl ve toynaklar gibi malzemelerin kolay ve ekonomik olarak temin edilebilmesinden dolayı Çin ve çevresindeki asya ülkelerinde sistein üretimi için en çok tercih edilen yöntem keratin hidrolizidir (Renneberg vd., 2016). Keratin hidrolizi sistein üretiminin en kolay yolu olmasına rağmen, düşük verim, hoş olmayan bir koku ve atık arıtma problemi gibi birçok dezavantaja sahiptir (Takagi ve Ohtsu, 2017). Bu ekstrasyon yöntemi için yüksek miktarlarda aktif kömür ve konsantre hidroklorik asit ihtiyaç duyulmaktadır. Hidrolizi yöntemi ile 10 kg saçtan ancak 1 kg keratin elde edilebilmekte olup bu proses için ise 27 kg yüksek konsantrasyonda hidroklorik asite ihtiyaç duyulmaktadır. Buna rağmen keratin içerisinde yer alan sisteinin ancak %60'ı geri kazanılabilmektedir (Haas vd., 2009). Son yıllarda deli dana hastalığı (BSE), şiddetli akut solunum yolu sendromu (SARS) ve kuş gribi gibi hayvan kaynaklı virüslerin artışı; insan ve hayvan kökenli kaynaklardan elde edilen sisteinin vejeteryanlar, helal gıda ve koşer ürünleri tercih eden tüketicilerin bu yöntemle elde edilen sisteinli gıdalardan uzak durması; sistein üretiminde farklı üretim yollarına yönelimi arttırmıştır (Şimşek, 2019)



Şekil 1.3. Enzimatik Dönüşüm Yöntemi ile Sistein Sentezi (Takagi ve Ohtsu, 2017)

Ajinomoto Co. firması tarafından geliştirilmiş olan enzimatik dönüşüm yöntemi sistein üretimi Japonya'da uzun yıllardır tercih edilmektedir (Wada ve Takagi, 2006). Enzimatik biyolojik dönüşüm yönteminde sistein, hammadde olarak kullanılan sentetik DL-2-amino-Δ2-thiazoline-4-carboxylic (DL-ATC) asidin *Pseudomonas thiazolinophilum* suşunun bulunduğu biyoproses ortamında enzimatik olarak hidrolizi

sonucu elde edilmektedir (Şekil 1.3). Bu enzimatik dönüşümde L-NCC amidohidrolase, L- ATC hidrolase and S-carbamoyl-L-cysteine hidrolase enzimleri olmak üzere üç enzim yer almaktadır (Ohmachi vd., 2002). Üç aşamada gerçekleşen biyodönüşüm işleminin ilk aşamasında D-ATC'nin L-ATC'ye dönüştürülmektedir. İkinci aşamada L-ATC halka açılma reaksiyonu ile L-ATC'nin N-karbamil-L-sisteine (L-NCC)'ye dönüştürülmekte; son aşamada ise bu L-NCC'nin L-sisteine dönüştürülmesi ile proses son bulmaktadır (Takagi ve Ohtsu, 2017). Enzimatik biyodönüşüm yöntemi ile kolaylıkla ayrılıp saflaştırılabilen yüksek saflıkta sistein üretilebilmektedir. Bu proses çevre dostu, düşük enerji gereksinimi duyan ve yüksek verimlerde çalışabilir olmasına rağmen hammadde maliyetinin çok yüksek olması bu yöntemin endüstriyel üretimde daha az tercih edilmesine neden olmaktadır (Ivanov vd., 2013).

Bilim dünyasındaki gelişmeler ile; sisteinin mikrobiyal proses yöntemi kullanılarak endüstriyel olarak üretimi tercih edilir bir teknoloji konumuna gelmiştir. Mikrobiyal üretim yönteminde, mikroorganizmaların uygun besiyerinde ve proses şartlarında inkübasyonu neticesinde sistein üretimi gerçekleştirilmektedir (Leuchtenberger vd., 2005). Mikrobiyal proses yöntemi ile sabit koşullarda hedeflenen saflıkta ve kalitede; çevre dostu yöntemler ile sistein üretimi mümkündür. Günümüzde sistein pazarının en büyük aktörlerinden birisi olan Wacker Fine Chemicals isimli Alman kimya firması geliştirdikleri rekombinant mikroorganizmalar ile mikrobiyal biyoproses yöntemi ile sistein üretimi gerçekleştirmektedir (Haas vd., 2009).

Endüstriyel boyutta mikrobiyal biyoproses yöntemi ile sistein üretimi, ticari boyutta fermantasyon tankları içerisinde, optimize edilmiş proses koşullarında mikroorganizmaların çoğalması ile gerçekleşmektedir. Sistein üretme yeteneğine sahip mikroorganizmalara *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus sphaericus* ve *Streptomyces* sp. verilebilir (Hashim, 2014). Ancak; ilgili suşlar metabolizmaları gereği ortamdaki sistein konsantrasyonu artınca üretimlerini durduracakları için daha yüksek verimler elde edilebilmesi adına bu organizmaların genetik olarak modifiye edilerek inhibasyon metabolizmalarının düzenlenmesine gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların gerek gelişebilmeleri gerekse sistein sentezleyebilmeleri için karbonhidrat, azot, su, vitamin ve mineral gibi bileşenleri içeren besi ortamına ihtiyaç vardır. Yüksek verimde sistein üretiminin sağlanacağı besiyeri içeriği ticari

kimyasallarla laboratuvar ölçeğinde belirlendikten sonra, bu içeriğe benzer şartları sağlayacak düşük maliyetli gıda endüstrisi atıkları endüstriyel ölçekli üretimlerde hammadde olarak kullanılabilir (Takagi ve Ohtsu., 2017).

Biyoreaktörler içerisinde belirlenen mikroorganizma ve besiyeri ortamında, optimum proses şartları ile fermentasyonu sonrasında elde edilen sisteinin ayırma saflaştırma yöntemleri ile izolasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Mikrobiyal proses yöntemi ile sistein üretim maliyetinin büyük bir kısmını oluşturan ayırma ve saflaştırma sürecinde sırası ile hücre parçalama, santrifüj, filtrasyon, iyon değiştirici reçine ile absorpsiyon, kristalizasyon ve çöktürme aşamaları uygulanmaktadır (Boehm, 2008). Her ne kadar üretici mikroorganizmanın genetik olarak düzenlenmesinde, ideal proses koşullarının ve besiyer içeriğinin belirlenmesinde detatlı moleküler araştırmalara ihtiyaç duyulsada; biyolojik proses yöntemi ile %90'lara varan verimlilikte sistein üretilebilmesi, hammadde maliyetlerinin düşük olması, son ürünlerdeki istenmeyen kontaminasyonların engellenebilmesi ve %98.5 varan saflıklarda sistein üretiminin sağlanabilmesi bu yöntemi diğer iki yöntemle oranla daha avantajlı hale getirmektedir (Renneberg vd., 2016).

1.3.1.4. Literatürde Sistein Üretimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Literatüre bakıldığı zaman mikrobiyal prosesler ile sistein üretimine yönelik sınırlı sayıda çalışma karşımıza çıkmaktadır. İlk olarak Dhillon vd. (1986), topraktan izole ettikleri *Bacillus sphaericus* ile fermentasyon ortamında 3-Chloro-L-alaninin sisteine enzimatik dönüşümü ile 7 g/L sistein elde etmişlerdir. Takagi vd., (1999), *Arabidopsis thaliana*'dan izole ettikleri Serine Acetyltransferase üretiminden sorumlu geni klonlama yöntemi ile *E. Coli*'ye aktararak 1.7 g/L sistein sentezi sağlamışlardır. Daha sonra ise Wada vd., (2002), *Corynebacterium glutamicum*'un cysteine desulfhydrase'den sorumlu geninde mutasyon sağlayarak; *Corynebacterium glutamicum*'un sistein üretimini ikiye katlayarak 290 mg/L sistein elde etmişlerdir.

Ali vd., (2011), sistein üretimini geliştirmek üzerine yaptıkları çalışmada toprak, su, bal, süt ve atık su örneklerinden izole ettikleri izolatların inkübasyonu sonucu *Streptomyces sp.* türü mikroorganizmanın 8.76 g/L sistein üretimi sağladığını bildirmişlerdir. Shakoori vd., (2012), atık su, taze süt, bal, yoğurt and toprak örneklerinden elde ettikleri 65 izolatın farklı koşullarında inkübasyonu sonucunda farklı *Bacillus* ve *E. coli* türlerinde 9.7-13.2 g/L aralığında sistein üretimi sağladığını bildirmişlerdir. Takumi vd., (2017), *Pantoea ananatis* kullanarak glikoz ve tiyosülfat

içeren besi ortamında yaptığı inkübasyon sonunda 2.2g/L sistein elde etmişlerdir. Şimşek (2019) ise Hatay ve Antakya illerinden elde ettiği peynir, atık su, ağaç kabuğu, yaprak, pul kırmızı biber, zeytinyağı, toprak, salça, zeytin, çiğ süt, bal ve yoğurt olmak üzere 28 farklı kaynaktan izole ettiği 224 adet bakteri suşunun sistein üretme potansiyelini incelemiş olup; *Bacillus pumilus*'un 0,096 g/L ile en yüksek sistein üreten mikroorganizma olduğunu bildirmiştir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Mikrobiyal Sistein Üretimi Konusunda Yapılmış Bazı Çalışmalar

No	Mikroorganizma	Üretim Yaptığı Sistein Miktarı (g/L)	Kaynak
1	<i>Bacillus sphaericus</i>	7	(Dhillon vd.,1986)
2	<i>Escherichia coli</i> JM109	1.7	(Takagi vd., 1999)
3	<i>Corynebacterium Glutamicum</i>	0,29	(Wada vd., 2002)
4	<i>Streptomyces</i> sp.	8.76	(Ali vd., 2011)
5	<i>Bacillus</i> sp.	10,07	(Shakoori vd., 2012)
6	<i>Bacillus anthracis</i>	13.28	(Shakoori vd., 2012)
7	<i>Bacillus cereus</i>	11.4	(Shakoori vd., 2012)
8	<i>Escherichia coli</i> H	10,4	(Shakoori vd., 2012)
9	<i>Escherichia coli</i> M2	9.7	(Shakoori vd., 2012)
10	<i>Pantoea ananatis</i>	2.2	(Takumi vd., 2017)
11	<i>Bacillus pumilus</i>	0,096	(Şimşek, 2019)

1.3.2. Glutamik Asit

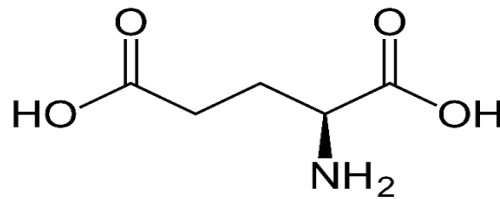
1.3.2.1. Glutamik Asitin Tanımı, Biyokimyasal Yapısı ve Tarihi

Glutamik asit, insanlar, hayvanlar ve bitkiler gibi kompleks organizmalarda bolca bulunan ancak insanlar için esansiyel olmayan asidik bir aminoasittir. Doğada en çok bulunan amino asit olan glutamik asit özellikle et ve süt ürünleri, mantar ve tahıl gibi proteince zengin gıdalarda doğal olarak bulunan bir aminoasittir (Dinç, 2012). Aynı zamanda bazı bitkilerde bulunan glutamik asit, vücudumuzda da glutamik asitin sodyum tuzu olan glutamat (L- Glutamat, L-glutamik asit veya monosodyum

glutamat olarakta adlandırılmakta) formunda bulunup, insan metabolizmasında birçok hayati görev üstlenmektedir (Barut, 2015).

Vücudumuzun doku ve organlarında bolca stoklanan glutamat; aynı zamanda protein sentezi metabolizmasında da kritik görevler üstlenmektedir (Young ve Ajami, 2000). Metabolizmada pürinlerin, nikotinamid adenin dinükleotidin, flavin adenin dinükleotidin, glutatyon ve çeşitli temel bileşiklerin sentezine görev almakla beraber, enerji ve nitrojen metabolizmasının düzenlenmesinde hayati öneme sahiptir. Ayrıca metabolizmadaki başlıca enerji kaynaklarından biri olan glutamat ancak tiamin, riboflavin, niasin, vitamin B6, pantotenat, lipoat, ubikinon, demir ve magnezyumun varlığında tamamen okside olabilmektedir (Kohlmeier, 2003). Tüm bunların yanı sıra beyin fonksiyonları için elzem olan glutamik asit kuvvetli bir nörotransmitter madde olma özelliği taşımakta ve sinapslar arası iletişimin hızlandırılmasında anahtar görev üstlenmektedir (Duran, 2017).

Esansiyel olmayan bir aminoasit olan glutamik asit (Glu), diğer aminoasitlerin sentezi için amino grubu sağlayıcısıdır. Moleküler formülü $C_5H_8NNaO_4$ Glutamik asitin molekül ağırlığı 169,112 g/mol olup, %9,5 oranında nitrojen içermektedir (Freeman, 2006). Kokusuz beyaz veya beyazımsı kristal toz formda bulunan glutamik asidin çözünürlük katsayısı (pKa) 9,67 ve izoelektirik noktası (pI) 3,22'dir (Fleck ve Petrosyan, 2014). Vücutta 5,5-8 pH aralığında, L-formunda aktivite gösteren glutamik asit (Şekil 1.4) D-formunun ise herhangi bir aktivite göstermemektedir. Bunun yanı sıra ısıya karşı oldukça hassas bir yapıya sahiptir ve ısıya maruz kaldığında hemen bir mol su kaybederek laktan formunu dönüşmektedir (Rogers ve Blundell, 1990).



Şekil 1.4. L-Glutamik Asitin Kimyasal Yapısı

Glutamik asitin sodyum tuzu formunda olan monosodyum glutamat (MSG) (E621) gıda endüstrisinde lezzet arttırıcı olarak kullanılan katkı maddelerinin başında gelmektedir. Tarihte ilk olarak yüksek glutamik asit içerikli yosunların geleneksel çin mutfağında kullanımı ile karşımıza çıkan monosodyum glutamat; 1866 yılına

gelindiğinde Alman kimyacı Ritthausen tarafından laboratuvarında saf bir kimyasal olarak elde edilmiştir (Niiijima, 1980). 1907-1908 yıllarında ise Japon Kikunae Ikeda, kombu yosundaki (*Laminariaceae*) farklı lezzet algısından yola çıkarak, yosuna bu lezzet algısını veren glutamik asit içeriğini saflaştırmayı başarmıştır (Duran, 2017). Sonrasında Ikeda, saflaştırdığı bu tuzun umami tadını ortaya çıkardığını kanıtlayabilmek amacıyla kalsiyum, potasyum, amonyum ve magnezyum glutamat gibi çok sayıda glutamat tuzunun tat özelliklerini kıyaslamış ve minerallerden farklı olarak umami tadı ortaya çıkardığını kanıtlamıştır. Yapmış olduğu bu keşifin ismini monosodyum glutamat koyan Ikeda; aynı zamanda kendi bulduğu monosodyum glutamat ekstrasyon yönteminin de patentini almıştır (Soysever, 2018).

1960 yıllarda yoğun olarak endüstride kullanılmaya başlanan glutamik asit, ilk zamanlarda Ikeda tarafından ortaya konan bitkisel ekstrasyon yöntemi ile üretilirken, günümüzde kimyasal sentezle ve mikrobiyal proseslerle üretilmektedir. Ancak gıda ve diğer endüstrilerden artan talebinin karşılanabilmesi için ekonomik, işlevsel ve standart ürün üretimine imkân tanıyan mikrobiyal proses yöntemi endüstride en çok tercih edilen üretim yöntemi konumuna gelmiştir (Ault, 2004).

1.3.2.2. Glutamik Asitin Kullanım Alanları ve Pazarı

Glutamik asit başta gıda sektörü olmak üzere kozmetik sanayinde, medikal endüstrisinde, su arıtma işlemlerinde ve tarımsal ürünlerde yoğun olarak kullanılmaktadır. Glutamik asit tıp ve sağlık sektöründe çeşitli fonksiyonlarından faydalanılan bir aminoasittir. Kalsiyum ile proteinlerin etkileşim metabolizmasında rol alan glutamik asit; osteoporos hastalarında kalsiyum emiliminin artırması için kullanılmaktadır (Rizzoli, Bonjour ve Ferrari, 2001). Ayrıca biyoyumlu taşıyıcılık özelliğiyle kanser ilaçların hedef organlara taşınmasında da glutamik asit etkin rol oynamaktadır (Tozkoparan ve Aytaç, 2007). Kozmetik alanında ise özellikle krem ve şampuanlarda; cilt kırısklıklarının önlenmesi ve giderilmesi, saçlara dolgunluk ve form verilmesi, kişisel bakım ve cilt bakım ürünlerinin etkinliğinin artırılması için kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik endüstrisinde doğal bir nemlendirici olarak yoğun olarak kullanılan Pirolidon karboksilik asit (PCA) glutamik asitten sentezlenmektedir (Specialchem, 2020). Su arıtma ve ıslahında ise radyonüklid grupların ve ağır metallerin izole edilmesinde kullanılmaktadır. Tüm bunların ötesinde glutamik asit bitki gübrelerinde verimi artırıcı inhibitör olarak; hayvansal yemlerde ise emilim metabolizmasını düzenleyerek kemik gelişimini ve yumurta kabuğu sertliğini

arttırmak, vücuttaki enerjiyi de proteine çevirerek yağ depolanımını azaltmada kullanılmaktadır (Chemicalceo, 2015).

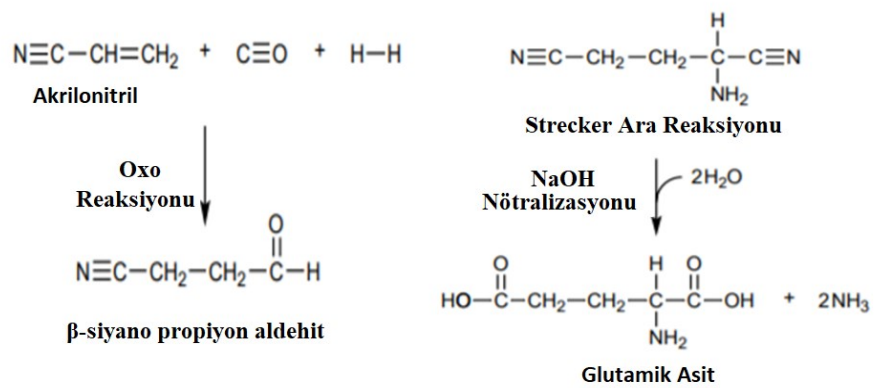
Gıda sanayinde glutamik asit her ne kadar gıdaların duyusal karakteristiklerini arttırmak amacıyla kullanıldığı bilinse de; aynı zamanda sıvı gıdalarda ve unlu mamüllerde kıvam arttırıcı olarak da yoğun olarak kullanılmaktadır. Dünyada en çok bilinen ve kullanılan lezzet arttırıcı olan glutamik asit, dil üzerindeki tat almadan sorumlu sinirleri uyararak gıdanın lezzetini güçlendirerek daha çok ve sık yeme isteği doğurmaktadır. EFSA tarafından E621 olarak kodlanmış olan glutamik asit; sos, çorba, cips, atıştırmalıklar, dondurulmuş gıdalar, işlenmiş et ürünleri, marine edilmiş et, vejeteryan burger gibi gıdalarda umami tadı ortaya çıkarmak için lezzet arttırıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Bojanić vd., 2009).

Küresel glutamik asit üretiminin 2014 yılında 2,9 milyon ton dolaylarındayken 2020 yılına gelindiğinde bu rakamın 4 milyon tonun üzerine çıktığı görülmektedir. Glutamik asit pazar büyüklüğü ise 2020 yılı itibari ile 15,5 milyar ABD dolarının yakalamış olup yıllık olarak yaklaşık 7,5 büyüme göstermektedir (Glutamic Acid Market Research Report, 2020). Glutamik asit üretimi ucuz ve kolay hammadde temini, ucuz işçilik maliyetiyle gibi avantajlardan dolayı asya ülkelerinde yoğunlaşmış olup; toplam glutamik asit üretiminin %96'sı Çin, Vietnam, Endonezya, Tayvan, Tayland vb asya ülkelerinde gerçekleştirilmektedir. Küresel glutamik asit pazarı temelde belirli büyük şirketlerin etkisinde olup bu şirketler Ajinomoto Co (Japonya-Çin), Kyowa Hakko Bio Co (Japonya-Çin), Evonik Co (Almanya), Hebei Huayang Biological Technology Co (Çin), Global Bio-chem Technology Group Company (Honkong-Çin), Acerblend Ingredients Co. (Çin), Emeishan City Dragon Biological Technology Co. (Çin) ve Suzhou Organic Bio-Tech Co. (Çin)'dur (Gminsights, 2020).

1.3.2.3. Glutamik Asit Üretim Yöntemleri

Saf glutamik asitin endüstride kullanılabilmesi için bazı ön işlemlere tabi tutulması gerekmektedir. Kristal yapıdaki saf glutamik asiti endüstride kullanılan monosodyum glutamat tuzuna çevirmek için öncelikle içerisine %10-20 oranında sodyum tuzu tuz eklenip su içinde çözündürülür ve sodyum hidroksit ilave edilir, ardından da aktif karbondan geçirilip renksizleştirilerek vakum altında konsantre edilir ve satışa hazır hale getirilir. Endüstriyel olarak kristal saf glutamik asit üretimi ise protein hidrolizatlarının ekstrasyonu yöntemi, kimyasal sentez yöntemi ve mikrobiyal proses yöntemi olmak üzere 3 temel metot ile yapılmaktadır (Soysever, 2018).

Glutamik asit 1900'lü yılların başından 1965'li yılların sonuna kadar protein hidrolizatlarının ekstrasyonu ile üretilmekte olup 1965'li yıllardan sonra mikrobiyal proses yöntemine geçilmiştir. Bu yöntem glutamik asitçe zengin glutenli gıdaların asitle parçalanıp daha sonra serbest kalan glutamik asitlerin ekstraksiyonu prensibine dayanmaktadır. İşlemin ilk aşamasında gluten içerikli hammadde sulu hidroklorik asit çözeltisi ile parçalanarak protein yapısının hidrolize uğraması sağlanır. Daha sonra bu hidrolizatlar düşük basınç altında yoğunlaştırılarak üzerine tekrar hidroklorik asit eklenip soğutulmaya bırakılır. Bu işlem kristalize (S)-glutamik asit hidroklorürün oluşarak çökmesini sağlar. Kristal haldeki (S)-glutamik asit hidroklorürün filtrelenerek solüsyondan uzaklaştırılıp ardından sıcak su içerisinde çözündürülerek üzerinde kalan safsızlıklardan arınması sağlanır. Elde edilen son çözeltinin pH'ı glutamik asidin izoelektrik noktası olan 3,2'ye ayarlanarak, 25 C° saf kristalize glutamik asit elde edilmektedir (Barut, 2015). Glutamik üretiminin bir diğer yöntemi ise kimyasal sentezdir (Şekil 1.5). İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra kimya bilimindeki gelişmeler ve keşfedilen yeni reaksiyonlar ile glutamik asit kimyasal olarak sentezlenebilmiştir. Kimyasal sentezle glutamik asit üretimi okso reaksiyonun keşfi ve bu yolla β-siyano propiyon aldehit sentezi olağan hale gelmiştir. Prosesin ilk aşamasında amonyaklı ortamda oksidasyon yoluyla, akrilonitrile ile asetilen ve propilen reaksiyona sokularak kilit ara ürünü olan β-siyano propiyon aldehit elde edilir. Daha sonra Strecker ara reaksiyonu ile β-siyano propiyon aldehit su ile reaksiyona girerek glutamik asidi oluşturmaktadır. Kimyasal sentez ile yüksek saflıkta, istenilen kalitede ürün elde edilebilmesine rağmen; reaksiyon hammaddelerinin yüksek maliyetli olması bu yöntemin endüstriyel üretimden ziyade, güvenilir referans standartların üretiminde tercih edilmesine neden olmaktadır (Ault, 2004).



Şekil 1.5. Glutamik Asitin Kimyasal Sentez Yöntemi İle Üretimi (Ault, 2004).

Günümüzde endüstriyel glutamik asit üretiminin büyük bir bölümü mikrobiyal proses yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. 1950’li yılların sonunda mikrobiyoloji ve biyoproses alanındaki gelişmeler glutamik asidin fermentasyon yöntemi ile çok daha ekonomik şartlarda üretilebileceğini ortaya koymuştur. Özellikle *Corynebacterium glutamicum* suşunun karbonhidrat kaynaklarını kullanarak yüksek verimlilikle glutamik asit sentezleyebilmesinin keşfi, biyoproses ile glutamik asit üretimi için bir dönüm noktası olmuştur. Günümüzde glutamik asidin fermentasyonunda genel olarak *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* ve *Brevibacterium flavum* suşları tercih edilmektedir (Sadamlı, 2014).

Biyoproses ile glutamik asit sentezi endüstriyel fermentasyon tankları içerisinde karbonhidrat, azot, su, vitamin ve mineral kombinasyonundan oluşan kültür ortamlarında gerçekleşmektedir. Ancak kültür ortamından glutamik asitin izolasyonu yalnızca sentezlenen glutamik asit miktarına değil, aynı zamanda hücre tarafından sentezlenen glutamik asidin kültür ortamına salınımına da bağlıdır. Mikroorganizmanın büyüme metabolizmasını kontrol eden biyotin, hücre içinde çoğalma için yeterli metabolit konsantrasyonu sağlandığında hücre duvarının geçirgenliğini azaltıp aminoasit sentezini durdurmaktadır. Ancak fermentasyonda karbonhidrat kaynağı olarak şeker kamışı suyu ve pancar melası kullanımı, biyotini inhibe ederek glutamik asit sentezinin devamını sağlamaktadır. Biyoproses metodunun en büyük avantajı endüstriyel atık olan şeker kamışı suyu ve pancar melası bu özellikleri ile glutamik asitte temel besiyeri girdisi olarak kullanarak diğer yöntemlere göre büyük maliyet avantajı sağlamasıdır. Ancak bu yöntemin kesikli prosesler ile üretilebilmesi ve karmaşık bir biyoseperasyon aşamasına ihtiyaç duyması ise dezavantajları arasındadır (Ault, 2004.) Glutamik asidin saflaştırılmasında da aynı sisteminde olduğu gibi sırası ile hücre parçalama, santrifüj, filtrasyon, iyon değiştirici reçine ile absorsiyon, kristalizasyon ve çöktürme aşamaları uygulanmaktadır. Gerek yatırım maliyeti olarak gerekse işletim maliyeti olarak ayırma saflaştırma adımları toplam üretim maliyetinin yarısını oluşturabilmektedir. (Kumar, Vikramachakravarthi ve Pal, 2014)

1.3.2.4. *Literatürde glutamik asit üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar*

Günümüzde endüstriyel glutamik asit üretiminin büyük bir bölümü mikrobiyal proses yöntemi ile gerçekleştirilmekte olup, farklı mikroorganizmalar ile glutamik asit üretimine yönelik literatürdeki çalışmalar aşağıdaki gibidir.

Chattopadhyay and Baknerjee (1978), Hindistanda topraktan izole ettikleri mikroorganizmaları farklı proses koşullarında ve besiyeri içeriklerinde inkübasyona bırakıp, *Bacillus cereus* türü mikroorganizmadan 5,2 g/L glutamik asit elde ettiklerini bildirmişlerdir. Shakoori vd., (2012), atık su, taze süt, bal, yoğurt ve toprak örneklerinden elde ettikleri 65 izolatın üre ve glikoz bazlı besiyeri içeriklerinde ve farklı proses koşullarında inkübasyonu sonuncunda çeşitli *Bacillus* ve *E. coli* türlerinde 9.6-11.1 g/L glutamik asit üretimi sağladığını bildirmişlerdir. Zareian vd., (2012), Malezyadan çeşitli fermente gıdadan izole ettiği çeşitli laktik asit bakteri suşlarının glutamik asit üretim potansiyelini incelemiş olup; *Lactobacillus plantarum*'un 1.032 mmol/L (0,174 g/L) ile en yüksek en yüksek glutamik asit üretimi gösteren mikroorganizma olduğunu bildirmiştir. Adeogun vd., (2017), toprak ve endüstriyel atık su numunlerinden izole ettikleri mikroorganizmalar ile Luria Bertani Broth içerisinde yaptıkları fermentasyon sonucunda *Bacillus firmus*'tan 0,27 g/L, *Enterobacter cloacae*'den 0,52 g/L, *Bacillus validus*'tan 0,63 g/L ve *Paenibacillus alvei*'den 2,09 g/L glutamik asit elde ettiklerini bildirmişleridir. Gul vd., (2012) pakistandan elde ettikleri toprak numunelerinden izole ettikleri 230 mikroorganizmayı glikoz bazlı besi ortamında 4 gün süre ile inkübe etmiş ve inkübasyon sonunda türleri belirlenmiş bu mikroorganizmalardan 14 tanesinde 18 g/L ile 30 g/L arasında yüksek glutamik asit üretimi gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Kebede ve Abate (2016) ise, Etopyadan elde ettikleri toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmaları farklı glikoz ve nitrojen kaynakları içeren besiyeri ortamında 2 gün süre ile inkübe etmiş ve inkübasyon sonunda türleri belirlenmemiş DSSI2, DSSI5 ve DSSI7 kodlu izolatlardan sırası ile 52.18 g/L, 92.53 g/L ve 49.97 g/L glutamik asit elde ettiklerini bildirmişlerdir (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Mikrobiyal Glutamik Asit Üretimi Konusunda Yapılmış Bazı Çalışmalar

No	Mikroorganizma	Glutamik Asit Miktarı (g/L)	Kaynak
1	<i>Bacillus cereus</i>	5.2	(Chattopadhyay vd.,1978)
2	<i>Brevibacterium divaricatum</i>	3,97	(Jyothi vd., 2005)
3	<i>Brevibacterium linens</i>	5.6	(Moosavi vd., 2010)
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,174	(Zareian vd., 2012)
5	<i>Bacillus</i> sp.	6.1	(Shakoori vd., 2012)
6	<i>Bacillus anthracis</i>	9,6	(Shakoori vd., 2012)
7	<i>Bacillus cereus</i>	11,06	(Shakoori vd., 2012)
8	<i>Escherichia coli</i> H	10,02	(Shakoori vd., 2012)
9	<i>Escherichia coli</i> M2	12,05	(Shakoori vd., 2012)
10	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	24	(Ahmed vd., 2013)
11	<i>Bacillus firmus</i>	0,27	(Adeogun vd., 2017)
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,52	(Adeogun vd., 2017)
13	<i>Bacillus validus</i>	0,63	(Adeogun vd., 2017)
14	<i>Paenibacillus alvei</i>	2,09	(Adeogun vd., 2017)
15	<i>Pseudomonas reptilivora</i>	3	(Shyamkumar vd., 2014)

Jyothi vd., (2005), *Brevibacterium divaricatum* ile işlenmiş manyok bitkisi atığını besiyeri olarak kullanarak yaptığı 30 °C ve pH 7.0 de 48 saatlik inkübasyon neticesinde 3,97 g/L glutamik asit üretimi gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Moosavi vd., (2010), *Brevibacterium linens* ile glikoz ve mineral kaynakları ile zenginleştirilmiş endüstriyel patates atığı hidrolizatını besiyeri olarak kullanarak yaptığı 4 günlük inkübasyon sonunda 5.6 g/L glutamik asit üretimi sağladıklarını bildirmişlerdir. Ahmed vd., (2013) ise, *Corynebacterium glutamicum* ile hurma şurubunu glikoz kaynağı olarak kullanarak proses koşullarını optimize ettikleri inkübasyon koşulları neticesinde 24 g/L glutamik asit üretim kristalize ettiklerini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra Shyamkumar vd., (2014), *Corynebacterium glutamicum* yalnız ve

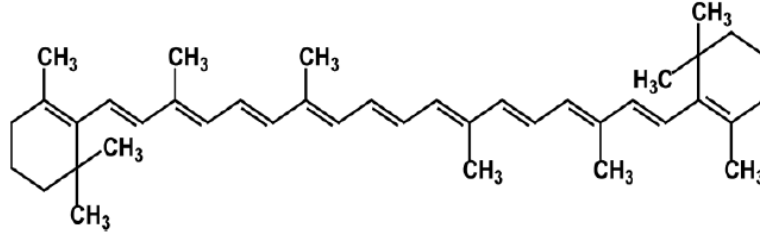
Pseudomonas reptilivora ile birlikte kullanarak aynı besiyeri içeriklerinde ve proses şartlarında gerçekleştirdiği glutamik asit inkübasyonunda, *Corynebacterium glutamicum* yalnız yapılan inkübasyon sonrasında 13 g/L glutamik asit üretimi gözlemlenirken, *Corynebacterium glutamicum* ve *Pseudomonas reptilivora*'nın ortak kullanılması neticesinde 16 g/L glutamik asit üretimi gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

1.3.3. Beta Karoten

1.3.3.1. Beta Karotenin Tanımı, Biyokimyasal Yapısı ve Tarihi

Karotenoidler doğal veya sentetik olarak oluşturulan oldukça fazla çeşide sahip olan pigment grubu içerisinde yer alan moleküllerdir. Genel olarak yağda çözünebilen bu pigment gurubu organizma fonksiyonlarında kilit rol oynamasının yanı sıra endüstride de renk ve tad verici olarak yoğun olarak kullanılan maddelerdir. Doğal olarak insan ve hayvanlarda sentezlenmeyip diyet yoluyla alınan bu karotenoidler; bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedir (Sui, 2013). Doğada en çok bulunan, bazı sentetik ve doğal yollarla sentezlenen karotenoidlerin başında β -karoten, α -karoten, likopen, lütein, kriptoksantin, zeaksantin, nero sporen, astaksantin gelmektedir ancak endüstriyel olarak en çok kullanılan karotenoid beta karotendir (Yılmaz, 2010).

Beta Karoten (β -karoten), $C_{40}H_{56}$ formülünde konjuge çift bağ zincirinin sonunda iki halkaya sahip, 40 karbonlu, sekiz isopren biriminden oluşan $536,89 \text{ g.mol}^{-1}$ moleküler ağırlığa sahip, heksanda 0,1 g/L çözünürlüğe sahip karotenoid çeşididir (Şekil 1.6). Beta Karoten turuncu renkli bir renk pigmenti olup, suda ve etanolde çözünmeyip endüstriyel kullanımlarında daha ziyade yağda çözdürülerek kullanılmaktadır. Beta karoten birçok sebze ve meyvede bulunan, en önemli karotenoidlerden biridir. Kimyasal sentez ile, mikrobiyal prosesler ile ve bitkilerden ekstraksiyon ile elde edilebilen beta karoten endüstride çoğunlukla bitkilerden ekstakte edilerek üretilmektedir. Havuç, yağ palmyesi, portakal, kayısı, mango, şeftali ve biber gibi gıdalar iyi bir Beta karoten kaynağı olmakla beraber üretiminde en çok kullanılan bitki su yosunlarıdır (Barth vd.,1995). Beta karoten doğada cis ve trans geometrik izomer yapısında bulunabilmektedir. Beta karoten doğada cis ve trans olmak üzere iki farklı izomer yapısında doğada farklı kaynaklarda bulunabilmektedir. Çoğu bitkisel kaynaktan tamamen trans formunda bulunan β -karotenin yeşil alg türü olan *Dunaliella salina*'da kristal yapıda olan ve çözünürlüğü trans formuna göre daha cis izomer formu da mevcuttur (Britton, Liaaen-Jensen, ve Pfander, 1995).



Şekil 1.6. Cis-Beta Karotenin Kimyasal Yapısı

Beta karoten ilk olarak 1820 yılında Wachenroder tarafından havuçtan ekstrasyon yolu ile elde edilmiş ve tanımlanmıştır; ardından yıllar 1827 yılını gösterdiğinde ise Guibourt yeşil yapraklarda karoten pigmentlerinin var olduğunu ortaya çıkarmış; 1906 yılında ise Willstaetler tarafından beta karotenin moleküler formülü bulunmuş olup moleküler yapısının çözülmesi ancak 1931 yılında Karrer tarafından gerçekleştirilmiştir. Fakat 1911 yılından itibaren karotenoid türleri kromatografi yardımıyla ayrıştırılmaya başlanmıştır ve 1943'e gelindiğinde diğer karotenoidlerinde kimyasal yapısı spektroskopik davranışları ortaya çıkartılmıştır (Hart ve Scott, 1995)

Karotenoid alanındaki bu gelişmelerin ardından Karrer ve ark., (1953) ilk kimyasal beta karoten sentezini gerçekleştirmiş ve sonrasında Inhoffen bu sentezi endüstriyel üretime uyarlayarak 1954 yılından itibaren ticari üretime başlamıştır (Strain, 1976). Ancak biyoteknolojideki gelişmeler yavaş yavaş beta karoten üretim endüstrisini mikrobiyolojik proseslere yöneltmiştir. Kimyasal yöntemlere oranla daha ekonomik ve kolay olması, bitkisel ekstrasyonla kıyasla da yüksek verimlilikte kolay ve hızlı kültive edilebilmesinden dolayı mikroalgler endüstriyel beta karoten üretiminde daha fazla talep görmeye başlamıştır (Clinton ve Giovannucci, 1998)

İlaç ve gıda sektöründe yoğun olarak kullanılan beta karotenin başlıca kullanım alanları; tereyağı, margarin, peynirler, aromalandırılmamış eritme peynirleri, sirke, salamura sebzeler, kahvaltılık tahıllar, reçeller, jöleler, marmelatlar, işlenmiş et ürünleri, şekerlemeler, içecekler, alkollü içecekler soslar, tursu çeşitleri, çerezler ve unlu mamullerdir (Atlı, 2019).

1.3.3.2. *Beta Karotenin Kullanım Alanları ve Pazarı*

Endüstride en çok kullanılan karotenoid olan beta karoten; renk verme özelliği, besin değeri ve canlı metabolizmalara olan etkileriyle başta gıda sektörü olmak üzere ilaç sanayinde, kozmetik sanayinde ve hayvan yemi endüstrisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Kozmetik sanayinde, *Dunaliella* gibi alg türü kaynaklardan veya palm gibi bitkisel kaynaklardan elde edilen β -karoten; UV ışıklarının ve oksidasyonun cilde verdiği hasarları engelleme özelliği ile anti-aging kremlerde, cilt bakım ürünlerinde, fondötenlerde ve güneş kremlerinde kullanılmaktadır. Beta karoten gerek büyük ve küçük baş hayvancılık gerek kümes hayvancılığı gerekse kültür balıkçılığında vitamin desteği ve pigmentasyon sağlamak amacıyla yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Büyük ve küçük baş hayvancılıkta vitamin katkısı ve stresi azaltarak gastrik ülserlerinin önlemek amacıyla yemlere β -karoten ilavesi yapılmaktadır. Ayrıca kümes hayvanlarının et ve yumurta renginin düzenlenmesi amacıyla da beta karoten yem katkısı olarak tercih edilmektedir (Lee vd., 2010). Buna ek olarak balık yemi sanayinde de saf beta karoten veya beta karoten içerikli katkılar kültür balıkçılığında renklendirme amacıyla kullanılmaktadır (Harpaz vd. 1998).

β -karoten sağlık sektöründe timus, lenf bezleri ve dalak gibi lenfoid organlarda bulunan hücrelerin korunmasında kullanılmaktadır. Kuvvetli bir antioksidan olan beta karotenin özellikle anti kanserojen özelliğinden faydalanılmaktadır. Beta karotenin akciğer kanseri, karaciğer kanseri, mide kanseri, meme kanseri, prostat kanseri ve cilt kanserine karşı önleyici ve tedavi edici etkileriyle ilaç sektöründe kullanılmaktadır. Beslenme diyetlerinde β -karoten ve diğer karotenoidleri yeterli düzeylerde alan bireylerin kansere yakalanma olasılıklarının daha düşük olduğu ve β -karotenin başlangıç aşamasındaki kanser hastalarında tedavi edici bir etkisi bulunduğu bildirilmiştir (Temple ve Basu, 1988). Oksidatif stresi azaltan beta karoten kardiyovasküler, romatizmal, oto-immün ve nörolojik birçok hastalığın tedavisinde etkili olmaktadır (Maccarrone ve Ulrich, 2004). Göz sağlığında da oldukça etkili olan beta karoten yaşlılıkta körlüğe neden olan yaşa bağlı makular dejenerasyonun (AMD) önlenmesinde ve porfirisi hastalarında UV'ye karşı toleransı arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Erzi, 2019). β -karoten, antioksidan özellikleri ve provitamin-A aktiviteleri sebebiyle; gıda takviyesi ve renklendiricileri olarak da kullanılmaktadırlar (Bloukas vd., 1999). Beslenme diyetlerine ve bebek mamalarında A vitamini kaynağı olarak ilave edilmektedir. Ayrıca vitamin desteği içeceklerde de hem boyar madde

olarak hemde vitamin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Gıda alanında gıdaların renklendirilmesi için bir çok alanda kullanılan beta karotenin en çok kullanıldığı gıda maddeleri ise; tereyağı (yağı azaltılmış ve konsantre tereyağları dahil), margarin, minarin ve diğer yağ emülsiyonları, turuncu, sarı ve krem renkli olgunlaştırılmış peynirler, aromalandırılmamış eritme peynirleri, sirke, tuzlu su (salamura) ve yağda sebzeler, kahvaltılık tahıllar, reçeller, jöleler, marmelatlar, meyve preparatları, sosis, salam ve pateler, sekerlemeler, içecekler, distile alkollü içkiler, meyve sarapları, aromalandırılmış saraplar, soslar, salata sosları, tursu çeşitleri, çerezler ve unlu mamullerdir (Hammaddeleransiklopedisi, 2013).

Toplam karotenoid pazarının üçte birini oluşturan küresel beta karoten pazarı 2013 yılında 280 milyon ABD doları dolaylarındayken 2020 yılına gelindiğinde bu rakamın 314 milyon ABD üzerine çıktığı görülmektedir. Pazar büyüklüğü ise 2020 yılı 2025 yılı arasında %3,9 büyüme göstererek 2025 yılında 380 milyon ABD dolarına ulaşması beklenmektedir. Küresel beta karoten pazarının en etkili şirketleri ise ; BASF SE (Almanya), Kemin Industries Inc (ABD), Algatechnologies Ltd (Yeni Zellanda), Chr. Hansen (Danimarka), Royal DSM (Hollanda), LycoRed Ltd (ABD), Overseal Natural Ingredients Ltd (İngiltere) ve Sensient Technologies Corporation (ABD)'dir. Beta karoten pazarının en büyük bölümünü beslenme ve yiyecek içecek sektörü oluştursa da pazarın yaklaşık %40'ı kozmetik ve hayvan yemi sektöre aittir (Marketdataforecast, 2020).

1.3.3.3. Beta Karotenin Üretim Yöntemleri

Güçlü bir antioksidan olarak tanımlanan renk pigmenti, beta-karoten günümüzde çoğunlukla sentetik olarak üretilmektedir. Sentetik beta karotenin trans formunu içerdiğinden, yağda düşük çözünürlüğü ve düşük antioksidan aktivite özelliğinden dolayı daha çok doğal formu tercih edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda sentetik formun kansorejen etki gösterebileceğinin ortaya çıkartılması doğal beta karotene olan ilgiliyi de günden güne arttırmaktadır. Doğal beta karoten bitkilerden solvent ekstrasyonu yöntemiyle veya mikroorganizmalardan biyoteknolojik yöntemler ile elde edilebilmektedir (Kahyaoğlu ve Kıvanç 2007).

Beta karoten molekül yapılarından dolayı ışık, sıcaklık, pH değişimi ve oksijene karşı hassas bir karotenoid olup kolayca oksidasyona uğrayabilmektedir. Bu nedenle, üretim aşamasında ve ticari olarak üretilmiş fomlarında stabilitesinin korunması gerekmektedir. Bitkisel kaynaklardan beta karoten ekstraksiyonu genel

olarak klasik solventlerler olan hekzan, etanol, aseton ve eter gibi kimyasallar ile yapılabilmektedir. Endüstriyel üretimde ise toksik etkisi az olan ve düşük sıcaklıklarda buharlaşabilen hekzan ve etanol gibi çözücüler ile basınç altında solvent ekstraksiyonu tercih edilmektedir (Rebecca, 2014). Isı, ışık, nem ve oksijene karşı yüksek hassasiyetleri, beta karotenlerin stabilitesini bozarak raf ömrünü kısaltmaktadır. Endüstriyel üretimlerde ürünün stabilitesini artırmak için gıda koruyucu takviyeleri eklenerek dondurarak kurutma (freze drying) ve püskürterek kurutma (spray drying) yöntemleri ile stabilizasyonlarının korunması sağlanmaktadır (Martelli vd., 2014). Bitkisel kaynaklardan beta karoten izolasyonun yüksek maliyet düşük verim ve gıda ürünün zahiyatı gibi dezavantajları endüstrinin farklı yöntemler ile beta karoten üretim arayışına girmesine neden olmuştur (Szterk, 2008).

Kimyasal sentez, 1950 yılında Karrer, Eugster, Inhoffen ve Milas tarafından geliştirildiğinden 4 yıl sonra, sentetik beta karoten endüstriyel ölçekte üretilip, yem ve gıda boyası olarak kullanılmaya başlanmıştır. Doğal olarak oluşan yaklaşık 700 karotenoidden, β -karoteninde içinde olduğu sadece birkaç karotenoid endüstriyel ölçekte sentezlenmektedir. Beta karoten üretiminde Wittig reaksiyonları veya Grignard bileşikleri kullanılmaktadır (Alvarez, 2014). Wittig reaksiyonları, aldehitler veya ketonlardan aldehitler üretir. Trifenilfosfinin spesifik türevleri bu reaksiyonda önemli rol oynar. Wittig reaksiyonunda karotenoidler elde etmek için kullanılan ilk strateji, 15 karbon atomu içeren iki fosfonyum tuz molekülünü ve 10 karbon içeren bir dialdehit molekülünü birleştirip elde edilen reaksiyon ürünlerini izomerizasyona tabi tutmaktır. İzomerizasyon sonunda simetrik bileşikler 40 karbon atomulu beta karoteni oluşturur. Beta karotenin kimyasal sentezindeki bir diğer yaklaşım ise organometalik Grignard bileşiklerinin kullanımınıdır. Grignard bileşiklerini kullanımında, bir diketon molekülü ve iki metanol molekülü reaksiyona girerek 40 karbon atomu içeren beta karoten elde edilmektedir (Britton, Liaaen-Jensen, ve Pfander, 1996). Kimyasal yöntem ile beta karoten üretimi her ne kadar ekonomik bir yöntem olsada; sentetik beta karotenin kanser gibi sağlığa olumsuz etkilerinin ortaya çıkması, endüstriyi ekonomik prosesler ile doğal beta karoten üretimi arayışına yönlendirmiştir (Black, 2004).

Doğal β -karoten elde etmek için bilinen tüm yöntemler arasında, mikrobiyal prosesler özellikle ilgi çekicidir. β -karoten gibi bir çok doğal pigment ihtiyacı; bakteri, maya, küf ve alglerin kullanıldığı biyoproses ortamında endüstriyel ölçekte üretilmesi

mümkündür. *Dunaliella spp.* türü alg kullanılarak endüstriyel ölçeklerde β -karoten üretilmektedir (Rathinam, Shanmugam ve Rengasamy, 2007). *Rhodococcus maris* ve *Rhodobacter sphaeroides* gibi bazı bakterilerde de beta karoten sentezi tespit edilmiştir (Ichiyama, Shimokata ve Tsukamura, 1989). Ayrıca pek çok maya türünde hızlı büyüme özellikleri beta karoten üretimi araştırmalarına konu olmuştur. Mikrobiyal biyosentez sonrası saflaştırma adımları beta karoten üretiminde önemli bir adımdır. Beta karotenin stabilitesinin bozulmasında hücre zarlarının parçalanması ile hücre bileşenlerin içinden beta karotenin uygun yöntemle çıkartılması, üretim prosesinin geliştirilmesinde çok kritik bir adımdır. Biyoproses yöntemi ile doğal beta karoten üretimi; yüksek biyoteknolojik bilgi gerektirse de, ekonomik oluşu, sürdürülebilir oluşu ve aynı proseste gliserol gibi ekonomik değeri olan yan ürünlerin elde edilmesine imkân vermesinden dolayı endüstrinin ilgisini çeken bir yöntem olmuştur (Radomska, 2018).

1.3.3.4. *Biyoproses Yöntemi ile Beta Karoten Üretimine Yönelik Önceki Çalışmalar*

Literatüre bakıldığında mikroorganizmalar ile beta karoten üretimine yönelik birçok çalışma olup, bu çalışmalar endüstriyel üretim kapasitesi daha yüksek olmasından dolayı algler, mayalar ve genetik olarak düzenlenmiş bakteriler üzerine yoğunlaşmıştır.

Kahyaoğlu ve Kıvanç (2007), Türkiyedeki gıda işletmelerinden topladıkları melas, şilempe ve peynir altı suyu gibi proses atıklarını besi ortamı olarak kullandıkları fermentasyon neticesinde *Blakesleea trispora* ile 43,3 mg/L, *Phycomyces blakesleeanus* ile 27.9 mg/L beta karoten üretimi sağladıklarını bildirmişlerdir. Iriani vd., (2008) ise Brezilya'daki toprak numunelerinden izole ettiği *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* ve *Sporobolomyces sp.* türü mikroorganizmalardan beta karoten elde etmek için yeast malt broth içerisinde, 25 °C'de 5 gün süre ile inkübe etmiştir. İnkübasyon süresi sonunda *Rhodotorula mucilaginosa*'nın 139 mg/L, *Rhodotorula graminis*'in 303 mg/L, *Rhodotorula glutinis*'nin 382 mg/L, *Rhodotorula minuta*'nın 23 mg/L ve *Sporobolomyces sp.*'nin ise 118 mg/L beta karoten ürettimi gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Bhosale ve. Gadre (2002) *Rhodotorula glutinis*'in yaklaşık olarak 250 mg/L beta karoten sentezlediğini bildirmiştir. Wang vd., (2012), çürümüş odundan izole ettikleri *Serratia marcescens* türü mikroorganizma ile beta karoten üretimi

yapabilmek amacıyla besiyeri içeriklerinde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 2.0% laktoz, 2.0% pepton, 0,3% et ekstratı, 1.0% sodyum klorür ve 0,05% demir içeren besiyeri ortamında *Serratia marcescens*'nin 2,45 g/L beta karoten üretimi sağladığı rapor edilmiştir. Valduga vd., (2013), ise orman endüstrisi atıklarından izole ettikleri *Sporidiobolus pararoseus* türü mikroorganizma ile Ph'ı 4.0 olan 40 g/L gliserol, 40 g/L mısır abartılı likör ve 20 g/L kaynatılmış mısır suyundan oluşan besiyeri ortamında 25 °C'de 96 saat süre yaptıkları inkübasyon sonunda 396 mg/L beta karoten elde ettiklerini bildirmişlerdir. Zhao vd., (2013), *Escherichia coli*'nin 2-C-Methyl- d-erythritol 4-phosphate (MEP) yolağında yaptıkları genetik modifikasyon ile 2.1 g/L beta karoten üretimi sağladıklarını bildirmişlerdir. Yang ve Guo (2014) ise, *E.coli*'nin MEP yolağının yanı sıra Mevalonate metabolik yolağında da modifikasyon yaparak ilgili rekombinant mikroorganizmadan 56 saatlik inkübasyon sonunda 3.2 g/L beta karoten üretimi sağladıklarını bildirmişlerdir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4. Mikrobiyal Beta Karoten Üretimi Konusunda Yapılmış Bazı Çalışmalar

No	Mikroorganizma	Beta Karoten Miktarı (mg/L)	Kaynak
1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	250	(Bhosale ve. Gadre 2002)
2	<i>Blakesleea trispora</i>	43.3	(Kahyaoğlu ve Kıvanç 2007)
3	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	27.9	(Kahyaoğlu ve Kıvanç 2007)
4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	139	(Iriani vd., 2008)
5	<i>Rhodotorula graminis</i>	303	(Iriani vd., 2008)
6	<i>Rhodotorula glutinis</i>	382	(Iriani vd., 2008)
7	<i>Sporobolomyces sp</i>	118	(Iriani vd., 2008)
8	<i>Serratia marcescens</i>	245	(Wang vd., 2012)
9	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	396	(Valduga vd., 2013)
10	<i>Escherichia coli</i> (Mutant)	2100	(Zhao vd.,2013)
11	<i>Escherichia coli</i> (Mutant)	3200	(Yang ve Guo 2014)

1.4. Mikrobiyal Gıda Katkılarının Helal Standartları Açısından Değerlendirilmesi

İnsan yaşamını düzen içerisinde sürdürebilmesi için toplumsal alanlarda kurallara gereksinim vardır. İnsanlığın yaşamını sürdürdüğü toplumsal alanlarda kuralsızlık birçok sorunun ortaya çıkmasına neden olur. Toplum ve birey yaşantısının vazgeçilmez parçası olan kurallar inanışlara ve toplumlara göre değişkenlikler gösterebilmektedir. İslam dininde ise yapılması serbest olanları ifade eden helaller ve yapılması yasak olan haramlar ile bireylerin belirli sınırlar içerisinde düzenli bir yaşam sürdürmeleri gerektiği ifade edilmektedir. (Yenen, 2019). Dünya üzerindeki hemen hemen bütün inanışlarda insanların beslenme şekillerine yönelik bazı düzenlemeler mevcuttur. İslam dini de dünya üzerindeki tüm nimetleri insanlığın hizmetine sunarken, insanların yaşamlarını sürdürebilmeleri için ihtiyaç duydukları yeme, içme, giyinme gibi konularda uyulması gereken bazı prensipler getirmiştir.

İslam dini helal ve tayyib şeylerin yenmesine izin verirken, haram ve habis şeylerin yenmesini yasaklayarak, Müslümanların besleneceği kaynaklara bazı sınırlar getirmiştir (Yetim, 2019). Kur'ân-ı Kerim'de helal kavramı; Allah (CC) 'ın insanlara ayet ve hadislerle kısıtlama getirmeyip izin verdiği fiilleri, yenilip-içilmesi ve kullanılması dinen yasak olmayan gıdaları ifade eder. Haram kavramı ise; Allah (CC) 'ın insanlara ayet ve hadislerle kesin ve bağlayıcı tarzda yasakladığı fiilleri, yenilip-içilmesi ve kullanılması dinen yasak olan gıdaları ifade eder. Birçok ayette helallik kavramı ile beraber kullanılan tayyib kavramı insanın beğendiği, hoşlandığı, temiz, güzel, iyi ve yararlı bulduğu ürünler için kullanılırken Buna karşın habîs kavramı ise, pis, kötü, sağlıksız, zararlı ve tat ve koku olarak bozuk olan şeyler tarif edilirken kullanılmaktadır (Saygılı, 2019). Bu kapsamda helal ve haram kıldığı gıdalar Kur'an-ı Kerimde kesin olarak belirtilmekte olup hadisler ile de bu ayetler desteklenerek, daha detaylı durumlara açıklık getirilmiştir. Temelde İslam dini, zararlı ve temiz olmayan gıdaları yasaklayarak haram kılmış, temiz ve faydalı gıdaları helal kılmıştır. Ayet ve hadisler ile helalliği ve haramlığı kesin olarak belirtilen gıdalarda herhangi bir kafa karışıklığı bulunmamakta ancak endüstriyel gıdalarda kullanılan bazı ürünleri helalliği veya haramlığı hakkında kesin kaidelerin bulunmaması; bu şüpheli ürünlerin gıdalarda kullanılmasında ihtilaflar ortaya çıkarmıştır (Yenen, 2019).

Günümüzde Müslümanların en büyük problemlerinden biri, tükettikleri endüstriyel gıdaların helallik durumudur (Çayiroğlu, 2013). Özellikle halihazırda tüketilen endüstriyel gıdaların üretim proseslerinde birçok bileşen kullanılması ve bu bileşenlerinin helal olmayan kaynaklardan da üretilebiliyor olması; özellikle uluslararası ticaretin gelişmesi sonucu Müslüman olmayan ülkelerden çeşitli gıda katkı maddelerinin ithal edilmesi; Müslümanların bu endüstriyel gıdaları tüketirken helal gıda bilincinin ve arayışının zaruretini ortaya çıkarmıştır (Özkan, 2011). Gelişen gıda teknolojisiyle birlikte ise endüstriyel gıdaların üretim aşamasından gıdanın normalde içeriğinde olmayan ancak gıdaya teknolojik avantajlar sağlamak amacıyla bitkisel, mikrobiyal veya hayvansal kaynaklardan elde edilmiş sekiz binden fazla katkı maddesinin gıda üretiminde kullanılması, bunun yanı sıra bitkilerin ve hayvanların genetikleri değiştirilerek farklı bazı nitelikler kazandırılması gibi endüstriyel gıda üretimindeki gelişmeler, pazardaki gıda ürünleri ile ilgili hem “helâllik ve haramlık“ durumunu hem de “sağlık ve beslenme“ üzerine potansiyel olumsuz etkilerini gündeme getirmiştir (Çayiroğlu , 2013).

Gıda katkı maddelerinin hellalliğini etkileyen iki unsur; bu gıda katkı maddelerinin elde edildiği kaynaklar ve insan sağlığına olan etkileridir. Gıda katkı maddeleri sentetik, maden kaynaklı, mikroorganizma kaynaklı, hayvansal kökenli veya bitkisel kökenli olabilmektedir. Özellikle hayvan kökenli gıda katkı maddelerinin islam dininin tüketilmesini yasakladığı hayvanlardan elde edilmiş olması, İslami usullere göre kesilmeyen veya ölü hayvanlardan elde edilmiş olması helalliğini etkileyen temel unsurlardır. Sentetik, maden kaynaklı ve bitkisel kökenli gıda katkı maddeleri ise üretilirken alkol benzeri kullanımına izin verilmeyen ürünler ile temas etmediği, sarhoşluk verici veya insan sağlığına zarar olmadığı sürece temiz ve helal kabul edilmektedir (Yüksel, 2003). Ancak mikrobiyal gıda katkı maddelerinin helalliğinin incelenmesi çok daha karmaşık bir konudur. Mikrobiyal bir gıda katkı maddesinin helalliğini etkileyen; kullanılan mikroorganizmanın transgenik olup olmaması, mikroorganizmanın çoğaltıldığı besiyeri içerikleri, prosesin gerçekleştirildiği besiyeri ortamı, ayırma ve saflaştırma adımlarında kullanılan çözücüler ve mikrobiyal ürünün paketlenerek saklanması aşamasında stabilitesinin korunması için eklenen maddeler gibi pek çok etken bulunmaktadır (Ermis, 2017). Özellikle mikrobiyal bir gıda katkı maddesinin helalliğinin sertifikalandırılması sırasında; mikroorganizmadan başlayarak üretim prosesinin her bir aşaması tek tek ele

alınarak, her bir aşamada proses girdilerinin helal olmayan kaynaklardan elde edilmiş olup olmadığı veya helal olmayan bileşenler içerip içermediği incelenerek karar verilmelidir (Küçüköner, 2011; Ermiş, 2017).

İslamiyetin ilk dönemlerinde mikroorganizma kaynaklı gıdaların yaygın olmayışı, ayet ve hadislerde doğrudan mikrobiyal gıdaların helalliğine yönelik hükümlerin olmayışı ve günümüzde kullanılan mikrobiyal gıda üretim proseslerin oldukça karmaşık olması, mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik prosesler ile üretilen gıda katkı maddelerinin helalliği hakkında hüküm verilmesini hayli zorlaştırmaktadır. Mikrobiyal gıda katkı maddeleri helalliği hakkında hüküm verilirken veya helal sertifikası verilirken üretim süreci bir bütün olarak ele alınarak prosesin her bir adımındaki helalliği etkileyecek riskler ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Bu kapsamda mikrobiyal bir gıda katkı maddesinin helalliği değerlendirilirken sırasıyla prosesde kullanılan mikroorganizma, bu mikroorganizmanın çoğaltıldığı besiyeri ortamı, prosesin gerçekleştirildiği besiyeri ortamı, ayırma-saflaştırma adımları ve mikrobiyal ürünün paketlenip saklanma süreci helalliği etkileyecek riskleri içeren birer helal kritik noktadır (Karahalil, 2020).

Biyoproses ile üretilen gıda katkı maddelerinin helalliği hakkında hüküm verilirken ilk helal kritik nokta proseste kullanılan mikroorganizmadır. Sağlık açısından bir risk oluşturmayan veya sarhoşluk verici etkisi bulunmadığı sürece mikroorganizmaların gıda olarak tüketilmesinin veya gıda ile ilişkili ürünlerin üretiminde kullanılmasının ilgili ürünün helalliğine şüphe düşürmeyeceği hükmü genel kabuldür (Türker, 2020). Ancak genetik olarak modifikasyona uğramış mikroorganizmalar ayrıca değerlendirmeye alınmalıdır. Günümüz gıda endüstrisinde verimliliğin artırılması amacıyla, gıda ürünlerinin ve gıda katkı maddelerinin üretiminde genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların helalliği değerlendirilirken yapılan genetik modifikasyonun insan sağlığına olan etkisi, helal olmayan hayvanların genetik materyalinin kullanılıp kullanılmadığı ve yaratılışı bozma niteliği taşıyıp taşımadığı temel kriterlerdir. Günümüzde genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların sağlığa veya doğaya herhangi bir zararı olduğuna dair herhangi somut bir delil bulunmaması sebebi ile bu mikroorganizmaların helal olmasına herhangi bir engel olmadığı düşünülmektedir (Yenen, 2019). Ancak mikroorganizmanın genetiğinin değiştirilmesinde kullanılan genetik materyal; ayet ve hadislece tüketilmesi yasaklanmış hayvanlardan elde

edilmesi durumunda ilgili mikroorganizmaların tüketilmesi veya bu mikroorganizmalar kullanılarak üretilen gıda bileşenlerinin tüketilmesinin mekruh veya haram hükmünde olacağı görüşü savunulmaktadır (Türker, 2020).

Mikrobiyal gıda katkı maddelerin helallığı incelenirken diğer bir helal kritik nokta ise mikroorganizmaların büyütüldüğü ve prosesin gerçekleştiği besiyeri bileşenleridir. Bu besiyeri bileşenleri mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu azot kaynağı, karbonhidrat kaynağı, vitamin ve minerallerin yanı sıra proseste ortaya çıkacak problemlerin giderilmesi için kullanılan proses yardımcı maddelerinden oluşmaktadır. Burada önemli olan bu besiyeri içeriklerinin elde edildiği kaynakların helal olup olmadığıdır. Besiyeri içeriklerinde sıklıkla et ekstresi, et peptonu, kan, jelatin, kolajen, gliserol, yağ, hidrolize protein, enzimler, yağ türevleri, kan serumu ve köpük önleyici maddeler gibi helallik riski olan bileşenler kullanılmaktadır. Bu kapsamda mikrobiyal bir gıda katkı maddesinin helallığı incelenirken, kullanılan besiyeri ortamında kan, domuz veya ayet ve hadisler ile haram olduğu belirtilen bileşenler içermemesi; hayvan kaynaklı içerikler kullanılıyor ise bu içeriklerin İslam dininde tüketimine izin verilen hayvanlardan elde edilmesi ve bu hayvanlarında İslami usullere uygun kesilmiş olması temel kayidelerdir (Ermiş, 2017).

Besiyeri ortamında üretilen gıda ürünlerinin saflaştırılması ve stabilitesini koruyacak şekilde paketlenmesi de bir diğer önemli helal kritik noktadır. Üretilen gıda maddesinin besiyeri ortamından ayrılmasında çeşitli absorbe edici ve çözücü maddeler kullanılmaktadır. Absorbe edici maddelerin içeriklerinde hayvansal ürünler kullanılıyorsa gene yukarıda bahsettiğimiz helal ve İslami usullere göre kesilen hayvanların kullanılıp kullanılmadığı helallığı doğrudan etkileyebilecek kriterler arasındadır. Ayrıca ayırma saflaştırma aşamalarında etil alkolün çözücü olarak kullanılması sıklıkla karşılaşılan bir durum olup her ne kadar son üründe alkol kalmıyor olsada genede gıdayı necaset yönünden etkileyip etkilemediği fıkıhçılar tarafından tartışılan bir konudur. Son olarak ise saflaştırılan gıda katkı maddesinin stabilitesini koruyacak şekilde stoklanabilmesi için kullanılan koruyucu ve standarde edici maddelerin ve ambalaj malzemelerin helal standartlarını taşıması gerekmektedir (Mohamed ve Mohd, 2012).

1.5. Biyoproses ile Üretilen Mikrobiyal Gıda Katkı Maddelerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Biyoproses ile istenilen bir ürünün besiyeri ortamında sentezi, ilgili ürünün fermantasyon sıvısı içerisinde diğer hücre bileşenlerinden, istenmeyen veya kirletici yan ürünlerinden ayrılmasını gerektirir. Biyoseparasyon olarak adlandırılan bu süreç, yüksek katma değerli biyomoleküllerin üretiminin en önemli ve maliyetli aşamalarından biridir (Carvalho, 2017). Bir biyoproses ürününün üretim maliyeti göz önüne alındığında, ayırma saflaştırma maliyeti toplam maliyetin yarısından fazlasını kapsamaktadır. Fakat üretilen ürünün saflık oranı direk olarak katma değerini ve satış fiyatını etkilemektedir. Dolayısı ile saflaştırma prosesleri beklenen son ürün niteliğine göre maliyet kalite dengesine dikkate alınarak tasarlanmaktadır (Hubbuch ve Kula, 2007).

Bir biyoproses süreci sonunda fermantasyon sıvısı içerisinde katı, sıvı ve gaz fazlarında, mikroorganizma hücreleri ve hücre parçaları, hücre metabolitleri, ortam bileşenleri ve proses katkılarının yanında, bu diğer bileşenlere göre daha düşük konsantrasyonlarda sentezlenen ürün (metabolit) bulunmaktadır. Biyoproses ile üretilen bu ürünün ticari bir değere sahip olması için fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre tasarlanmış bir dizi biyoseparasyon aşamasından geçirek diğer bileşenlerden ayrılarak mümkün olduğunca saf hale getirilmesi gerekmektedir (Aran, 2009).

Saflaştırma aşamaları tasarlanırken bazı faktörleri göz önünde bulundurulmalıdır. Bunların en başında ürünün fiyatı ve proses maliyeti gelmektedir. Ürünün saflık oranına göre olan fiyatlandırılması ile maliyet biyoseparasyon tasarımında ana kriter durumundadır. Ürünün kullanım alanı ve gerektirdiği satılabilirlik standartlarında gene saflaştırma prosesinin tasarımında en önemli etkenlerden biridir (Hacking, 1987). Saflaştırma aşamasında ise ürünün sentezlendikten sonra hücre içinde mi tutulduğu, yoksa hücre dışında fermantasyon sıvısına mı salındığı hücre parçalama prosesinin gerekliliğini ortaya koyan bir parametredir. Tüm bu parametreler dikkate alındıktan sonra istenilen ürünün konsantrasyonu, fiziksel ve kimyasal özellikleri dikkate alınarak saflaştırma metotları seçilir ve ürün diğer biyoproses bileşenlerinden ayrılır (Stanbury, Whitaker ve Hall, 1995).

Biyoseperasyonun temelinde, hedeflenen biyolojik maddenin sahip olduğu çözünürlüğü, uçuculuğu, elektrik yükü veya boyutu gibi niteliklerinin belirlenip bu nitelikler değerlendirilerek diğer biyoproses bileşenlerinden ayırma yatar (Carvalho, 2017). Biyoproses işlemi sonrası saflaştırma sürecine başlarken ilk bakılması gereken kriter, istenilen biyolojik ürünün hücre içindemi depolandığı yoksa sentez sonrası fermentasyon ortamınamı salındığıdır. Eğer elde edilmek istenen hücre içinde sentezleniyorsa saflaştırma basamaklarından önce hücre duvarının bütünlüğü mekanik veya mekanik olmayan yöntemler ile bozularak elde edilmek istenen biyoürünün ortaya çıkartılması gerekmektedir (Middelberg, 1998). Bir sonraki adım ise fermentasyon sıvısı içerisinde yer alan parçaları boyutlarına göre ayrılmasıdır. Hedeflenen ürüne göre oldukça kaba olan biyoproses bileşenlerinin boyut ve ağırlık özelliğinin kullanılarak ayrılmasında sıklıkla kullanılan yöntemler ise santrifüj, filtrasyon ve çöktürmedir. Kaba proses artıklarından ayrılan fermentasyon bileşenleri bu aşamada kimyasal özelliklerine bağı olarak ayrıştırma işlemine tabi tutulur. Bu ayrıştırma işleminde ise ultra filtrasyon, sıvı sıvı ekstraksiyon, temel kromatografi ayırma yöntemleri veya çöktürme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu aşamalar ile genel olarak proses bileşenlerinden ayrılan hedef ürün; biyoseperasyonun son basamağında ise karakteristik kendine özgü fiziko kimyasal özellikleri kullanılarak hassas kromatografi ve kristalizasyon yöntemleri ile de tamamen saflaştırılıp konsantre hale getirilir (Aran, 2009).

1.5.1. Hücre Parçalama

Biyoproses sonrası sentezlenen ürünün hücre içinde depolanması durumunda saflaştırılması için hücrenin parçalanarak ürün dışarı çıkartılması gerekmektedir. Hücrenin parçalanmasından kastedilen durum ise hücrenin bileşenlerini dış ortamdan ayıran hücre duvarının bütünlüğünün bozulmasıdır. Hücre duvarının parçalanmasında hedeflenen ürünün zarar görmeyecek şekilde mekanik veya mekanik olmayan yöntemlerden en uygun olanın belirlenmesi oldukça önemlidir. Mekanik olmayan yöntemlerin başında enzimler ve solventler ile hücre duvarındaki bileşenlerin çözümlenmesi yer almaktadır. Bu yöntemler diğer yöntemlere oranla daha etkili ve endüstriyel olarak uygulanabilir olmakla beraber proses maliyeti yüksek olan yöntemlerdir. Ayrıca ozmotik şok ve dondurup eritmek gibi mekanik olmayan fiziksel yöntemler hücre duvarının bütünlüğünün bozulmasında oldukça etkili yöntemlerdir. Endüstriyel olarak ise daha çok mekanik yöntemlerden olan sonikatörler, blendırlı

homojenizatörler ve presler hücre duvarı bütünlüğünün bozulması için biyoseperasyon proseslerinde tercih edilmektedir. Ancak seçilecek yöntemlerden her biri farklı yapı ve boyutlarda hücre fraksiyonları ortaya çıkarmakta ve farklı biyoseperasyon yöntemleri gerektirmekte, dolayısı ile hücre parçalama yöntemi seçiminde kullanılacak biyoseperasyon prosesinin tümünün dikkate alınması oldukça önemlidir (Chisti ve Moo-Young, 1986).

1.5.2. Çöktürme

Çöktürme işlemi bir sıvı içerisinde çözünmüş halde bulunan maddenin içinde bulunduğu çözücü ortamının şartlarının değiştirilmesi ile veya solvent, iyon ve tuz gibi maddelerle etkileşime girerek çözünürlüğünün kaybolması prensibine dayanır. Genellikle ortam pH'nı değiştirerek ve hızlı soğutma ile çökeltme sağlanabilsede, bazı biyomaddelerin çöktürülmesinde etanol, kalsiyum ve amonyumsülfat gibi özel çöktürücüler de kullanılabilir (Kumar, Galaev ve Mattiasson, 2003).

Uygulanmadaki kolaylık, laboratuvar ortamında geliştirilen metodun doğrudan endüstriyel ölçekte uygulanabilmesi, protein gibi karmaşık ve hassas yapıdaki biyolojik ürünler için bile basit ve güvenilir bir yöntem olması, bazı durumlarda doğrudan son ürünün elde edilebilmesi çöktürme yöntemini endüstride ürün saflaştırmanın birçok aşamasında kullanılabilir hale getirmiştir. Ancak çöktürmede kullanılan ajan doğrudan son ürünü ve proses maliyetini etkileyebildiği için hedef üründen kolay ayrılan, ucuz ve mümkünse tekrar kullanılabilir olması oldukça önemlidir (Hilbrig ve Freitag, 2003).

1.5.3. Santrifüj

Gerek fermantasyon sıvısındaki katı partiküllerin boyutlarına göre ayrılmasında, gerek katı sıvı ayırımında gerekse farklı sıvıların ayırımında santrifüj hem laboratuvar ölçeğinde hemde endüstride sıklıkla kullanılan bir ayırma metodudur. Küçük ölçekli sistemlerde genelde kesikli proseslerde kullanılan santrifüj yöntemi endüstride ise ya sürekli ya da yarı sürekli proseslerde tercih edilmektedir. Santrifüj yöntemi merkezkaç kuvvetine maruz kalan partiküllerin sedimentasyon hızındaki farklılıklara göre ayrılması prensibine dayanır. Burada sedimentasyonun hızını etkileyen parametreler ise katı parçacıkların boyutu ve ağırlığı ile sıvıların yoğunluğu ve viskozitesidir. Santrifüj işleminde fermantasyon sıvısındaki ağır veya yoğun maddeler merkezkaç kuvvetinin etkisiyle alt kısma çökerek peleti oluştururken, daha hafif ve az yoğunluklu

maddeler veya sıvılar üst tarafta kalır. Süspansiyon ve emülsiyon halindeki karışımların birbirinden ayrılmasında oldukça etkili bir yöntemdir (Voisard, 2003).

1.5.4. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon kimya endüstrisinin yanında gıda ve ilaç endüstrisinde de sıklıkla kullanılan bir yöntem olup sıvı veya katı karışımlarından hedef maddelerin organik çözücüler içerisinde çözündürülerek ayırma prensibine dayanır. Biyoteknoloji endüstrisinde ekstraksiyon, penisilin gibi antibiyotiklerin fermantasyon sıvısından izolasyonunda sıklıkla kullanılan bir metottur. Ekstraksiyonda, fermantasyon sıvısı içindeki hedef maddeleri çözen fakat diğer istenmeyen maddeleri çözmeyen ve aynı zamanda fermantasyon sıvısına karışmayan bir çözen yardımıyla saflaştırma sağlanmaktadır. Proteinler organik çözücüde çözünmediği için saflaştırılmalarında ekstraksiyon yöntemine pek başvurulmaz ancak gıda ve kimya endüstrisinde renk bileşenlerinin ayrıştırılmasında sıklıkla başvuru olan oldukça etkili bir metottur (Ruffer, 2004)

1.5.5. Kristalizasyon

Kristalizasyon, çözücü içinde çözünmüş katı bir maddenin kristal hale getirilmesi ile katı ve sıvı fazlarının birbirinden ayrılması prosesidir. Bu teknik, sıcaklık, pH ve çözücü bileşimi ile doyumluğa ulaştırılan bir çözelti içerisindeki hedef ürüne gerekli şartları sağlayarak kristal yapı oluşturup dibe çökmesi prensibine dayanmaktadır (Zhou, 2006). Kristalleşme tekniği, biyoteknoloji endüstrisinde steroidler, antibiyotikler ve amino asitlerin saflaştırılmasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak makromoleküllerin kristalleştirilmesi oldukça zor olduğu için bu yöntem daha küçük moleküller için tercih dilmektedir. Çöktürme yönteminin aksine kristalizasyon yöntemi genel olarak fermantasyon sıvısındaki diğer bileşenler elimine edildikten sonra uygulanmalıdır çünkü bu safsızlıklar kristallenmeyi yavaşlatabilmekte hatta durdurabilmektedir. Hedeflenen ürün kristalleştirilip çöktürüldükten sonra süzülerek veya solvent uçurularak ayrıştırılmaktadır (Lee ve Kim, 2003).

1.5.6. Filtrasyon

Filtrasyon yöntemi fermentasyon sıvısı içerisindeki parçacıklarının gözenekli bariyerler yardımıyla boyutlarına göre ayrılması prensibine dayanır. Endüstrinin pek çok alanında farklı ölçeklerde kullanımı mümkün olan bu teknik pek çok farklı

yöntemi olan etkin ve yaygın bir metottur. Filtrasyon yönteminin belirlenmesinde filtre edilecek ürünün özelliği, ayrılmak istenen bileşenlerin boyutu, sıvının yoğunluğu gibi birçok parametre göz önüne alınmalıdır. Endüstriyel ölçekte ise vakumlu ve basınçlı filtrasyon teknikleri kullanılabilir. Bu seçim yapılırken proses süreliyse vakum filtrasyonu yöntemi kullanılırken kesikli proseslerde basınçlı filtrasyon yöntemi tercih edilmelidir (Shao ve Zydney, 2004). Filtre malzemesi olarak ince, poroz, selüloz asetat veya selüloz nitrattan oluşan membranların kullanımı gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan bir filtrasyon yöntemidir. Membran filtre gözenek boyutları 10 nm'den 10 µm'ye varan boyutlarda olması, çok küçük boyutlara sahip biyolojik ürünlerin membran filtrasyonla ayrıştırılması kromatografik saflaştırma ve kristalizasyon aşamalarından önce ön saflaştırma sağlayarak proses verimini arttırmaktadır. Gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan başlıca membran teknolojileri şunlardır (Baruah, Venkiteshwaran, ve Belfort , 2005);

- Mikrofiltrasyon: Bu filtrasyon fermentasyon sıvısından 0,05 ile 2 µm aralığındaki küçük partikülleri ayırmak için kullanılır. Tipik olarak nişasta, yağ ve mikroorganizma benzeri maddeler fermentasyon atıkları bu mikrofiltrasyon yöntemi ile giderilir (Aslan, 2016).
- Ultrafiltrasyon: Ultrafiltrasyonda membran gözenek boyutları 0,05-1 nm arasında değişebilmekte olup; büyük boyutlu makro moleküllerin, polisakkaritlerin ve proteinlerin ayrıştırılmasında kullanılabilir (Aslan, 2016).
- Nanofiltrasyon: Nanofiltrasyonda membran gözenek boyutları 0,001-0,005 nm arasında değişmekle beraber 200-300 dalton ağırlık aralığındaki oligosakkaritlerin, antibiyotiklerin ve renk pigmentleri gibi organik bileşenlerin ayrıştırılmasında kullanılabilir (Aslan, 2016).
- Ters ozmos filtrasyon: Ters ozmos membran prosesi 0,1 nm ila 1.5 nm gözenek çapı ile aminoasitler, monosakkaritler gibi düşük molekül ağırlıklı çözülmüş maddelerin, çözeltiliden ayrıştırılmasında kullanılmaktadır (Aslan, 2016).

1.5.7. Kromatografi

Kromatografi; ilaç sanayiinden biyoteknoloji, gıda ve tıp ve kimya gibi birçok alanda protein ve aminoasit gibi biyolojik ürünlerin yüksek saflıkta elde edilmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Kromatografik ayırma; özellikle biyoproses sonrasında ön saflaştırma ile kaba hücre bileşenlerinden arındırılan fermentasyon sıvısındaki düşük konsantrasyondaki protein ve aminoasitlerin biyoseperasyonundaki en kritik adımdır. Bu yöntem bir karışım içerisindeki çeşitli maddelerin birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için çeşitli bileşenler içeren çözücülerden oluşan hareketli bir fazın, bileşenleri çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayıran, gözenekli bir yatak, tabaka veya film şeklinde ve genellikle hareketsiz olan sabit bir faz üzerinden geçirilirken ayrılması esasına dayanır. Proseste, sabit fazdan geçilirken hedeflenen ürünün çözünürlük, yük, boyut ve spesifik bağlanma gibi kendine has nitelikleri onun fermentasyon sıvısı içerisinde yer alan diğer bileşenlerden ayrılmasına olanak verir. Saflaştırılmak istenen ürünün niteliklerine göre kullanılacak kromatografi yöntemi tespit edilir (Muller, 2005).

- *Absorbsiyon Kromatografisi*

İlk kullanılan kromatografik teknik olan adsorpsiyon kromatografisi, fermentasyon sıvısında bulunan sıvı veya gaz halindeki maddelerin, inorganik veya organik gözenekli reçineler üzerine tutunmasıdır. Gıda üretiminde pek çok alanda kullanılan bu yöntem ürüne özgü saflaştırmadan ziyade sıvı faz içerisindeki safsızlıklarının farklı basamaklarda ayrılmasını hedefler (Hubbuch, Thommes ve Kula, 2005).

- *İyon Değişirme Kromatografisi*

İyon değişim kromatografisi, yükü bilinen hedef ürün ile bu ürüne zıt yüke sahip iyon değiştirici reçine arasındaki tersinir adsorpsiyon prensibine dayanır. Bu proseste öncelikle hedef ürününün niteliklerine göre iyon değiştirici reçineler tampon çözeltiler yardımı ile pH ve iyonik güç açısından düzenlenmektedir. Daha sonra içerisinde hedef ürünün de olduğu çözelti kolondan geçirilerek ürünlerin reçinelere bağlanması sağlanır. Bu aşamadan sonra kolon yıkanarak reçineye bağlanan ürün dışındaki safsızlıkların giderilmesi sağlanır. Son aşamada ise tampon çözeltiler ile pH ve iyonik güç dengesini bozarak ürünün reçineden ayrılarak saf halde elde edilmesi sağlanır (Konak, Turhan ve Certel, 2014).

- *Jel Filtrasyon Kromatografisi*

Jel filtrasyon kromatografisi, çözelti içerisindeki bileşenlerin boyutlarındaki farklılıklara göre ayrıldığı bir tekniktir. Bu teknikte; hedef ürünün diğer bileşenlerden izole edilmesi sağlanırken aynı zamanda moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde olanak vermektedir. Jel filtrasyon kromatografisinde doğal veya sentetik moleküller kullanarak oluşturulan farklı boyutlardaki üç boyutlu ağ matriks yapısındaki gözeneklerden; boyutları gözenek büyüklüğünden daha küçük olan bileşenleri rahatlıkla geçebilmekte, büyük boyutlu bileşenlerin ise gözeneklerden geçişi daha yavaş olmakta; bu sayede zamanla bileşenler boyutlarına bağlı olarak birbirinden uzaklaşarak ayrılabilir (Konak, Turhan ve Certel, 2014).

- *Affinite Kromatografisi*

Affinite kromatografisi, biyolojik ürünün saflaştırılması moleküler özellikleri bakılarak tasarlanan spesifik ligandlar (antijeni ve antikor, enzim süpsrat örneği gibi) yardımı ile fermantasyon sıvısı içerisinde ayırılıp saflaştırılmasında kullanılan yöntemdir. Affinite Kromatografiler kolon içerisine bağlanan saflaştırılması hedeflenen ürüne özgü tasarlanan ligantların bu ürünü spesifik ve geri dönüşümlü olarak absorbe etmesini temel alan, oldukça seçici ancak bir okadar da maliyetli bir yöntemdir. Ligand ile hedef ürün arasındaki bağlanma hidrofobik, elektrostatik etkileşimler veya van der Waals ve hidrojen bağları ile gerçekleşmektedir. Bu yöntem ile hedef ürün tek bir adımda fermantasyon sıvısında ayrılmasını sağlayabilmekte ancak endüstriyel olarak kullanımı her zaman mümkün olmayabilmektedir (Kobayashi, 2013).

- *Gaz ve Sıvı Kromatografiler*

Sağlık, gıda, ilaç ve kimya sanayi gibi alanlarda daha çok ölçüm amacı ile kullanılan bu yüksek çözünürlüklü kromatografik tekniklerin, en yaygın olanı ise sıvı kromatografi temelli HPLC ve gaz kromatografi temelli GC cihazlarıdır. Bu cihazlardan hazırlanan çözelti içerisindeki maddeleri farklı özelliklere sahip olan kolonlarından çıkış zamanlarına göre analiz etmektedir. Ayrıca bu cihazlara kütle kromatografileri de entegre edilerek çözelti içerisindeki maddelerin hem kütle oranlarına göre hem de kolondan çıkış zamanlarına göre analiz edilmeleri mümkün olabilmektedir (Güler, 2020).

1.6. Üretilen Mikrobiyal Gıda Katkı Maddelerinin Enstrümental Analizleri

Biyoproses ile gıda katkı maddesi üretimi araştırmalarında fermentasyon sıvısı içerisinde ilgilenilen ürün veya ürünlerin nitel ve nicel analizler ile derişimlerinin tespiti oldukça önemlidir. Bununla beraber proses sonunda elde edilen son ürün veya ürünlerin istenilen standartları karşılayıp karşılamadığı yine nicel, nitel ve moleküler karakterizasyonun ile mümkün olmaktadır. Bu süreçte ihtiyaç duyulan nicel, nitel ve moleküler analizlerin gerçekleştirilmesinde çeşitli spektroskopik ve kromatografik enstrümental analiz yöntemleri kullanılmaktadır.

Gıda katkı maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde UV-Vis spektrofotometre en yaygın kullanılan enstrümental analiz cihazıdır. Bir gıda katkı maddesinin spektrofotometre yardımıyla ışığı soğurtma miktarına bakarak, absorpsiyon ile çözelti içindeki konsantrasyon etkileşiminin tespit edilebilmektedir. UV Spektrofotometre de bu soğurma değerini ve miktarını analiz ederek çözelti içerisindeki madde ile ilgili nicel ve nitel bilgiler vermektedir (Şener, 2006).

Gıda katkı maddeleri gibi organik bileşliklerin moleküler karakterizasyonunda çoğunlukla RAMAN ve Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu şekilde analiz edilen gıda bileşeninde bulunan moleküllerde bulunan bağlar hakkında karakterize edici bilgiler edinilebilmektedir. FTIR spektroskopisi, organik veya inorganik bileşenlerin kesin bir hassasiyetle moleküler karakterizasyonunda kullanılan faydalı bir enstrüman olarak ortaya çıkmıştır (Jacksen, 1995). Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisi olup bu ışınlarının hedef ürün moleküllerinin titreşim hareketleri tarafından absorplanması ilkesine dayanmaktadır (Büyüksırt ve Kuleasan, 2014). Raman Spektroskopisi ise moleküldeki bağların ışığı saçması prensibiyle çalışır. Raman saçılımı ancak titreşim sırasında değişen bağ kutuplaşmasıyla gerçekleşir ve kızılötesi aktifliği olmayan moleküller eğer kutuplaşma değişimi gerçekleştirebiliyorlarsa Raman-aktif özellik gösterirler. Raman Spektroskopisinde incelenecek maddelerin atom, molekül veya iyonların farklı enerji düzeylerine geçişleri sırasında yayılan elektromanyetik ışımının analizi ile kimyasal yapıları ve fiziksel formlarının karakterize edilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Açıkğöz, 2017).

Gıda analizinde kullanılan enstrümental analizlerin başında gelen “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi” kısaca HPLC (High Performance Liquid Chromatography) olarak adlandırılmış olup sıvı çözeltilerin hareketli faz olarak kullanıldığı ve bu çözeltilerin içindeki bileşenlerin incelenebildiği bir kromatografik yöntemdir. (Güler, 2020). LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş kütle spektroskopisi) sistemi ise molekül tanımlamada kullanılan, HPLC ve MS sistemlerinin birbiriyle entegre olarak çalıştığı bilinen en hassas ve seçici kromatografik yöntemlerden birtanesidir (Arslan, 2016). Özellikle sıvı kromatografi ve kütle kromatografi özelliklerini beraber taşıması bir karışımdaki aminoasit ve proteinleri ileri düzeyde ayırıp, yüksek seçicilikle tanımlayabilme özelliği LC-MS/MS kullanımını avantajlı ve kolay bir yöntem haline getirmiştir. (Bilgin vd, 2018).

Bu çalışmada, Türkiye'nin yedi farklı bölgesinden toplanan çeşitli gıda ve toprak numunelerinden elde edilen mikroorganizmaların endüstriyel öneme sahip gıda katkı maddeleri olarak sistein, glutamik asit ve beta karoten üretim potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ülkemiz gıda katkı maddesi tedariki noktasında büyük oranda yurt dışına bağımlı durumda olup, sistein, glutamik asit ve beta karoten gibi mikrobiyal yöntemler ile üretilebilen gıda katkı maddelerinin ülkemizde üretilmesinin ekonomik anlamda katma değer oluşturabileceği düşünülmektedir. Ülkemiz, yedi farklı bölgesinde barındırdığı birbirinden farklı iklim koşulları nedeni ile geniş bir mikroorganizma çeşitliliği barındırmaktadır. Bu geniş mikroorganizma çeşitliliğinin başta bahsi geçen gıda katkı maddeleri olmak üzere yurt dışından temin edilen çoğu gıda katkı maddesinin yerli imkanlar ile üretimi için potansiyel taşınmasına rağmen ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalar sınırlı ve yetersizdir. Türkiye'nin 7 farklı bölgesinden toplanan 46 farklı gıda ve toprak numunesinden izole edilen 262 koloni oluşturan mikroorganizmanın sistein, glutamik asit ve beta karoten üretim potansiyellerini analiz edip ilgili gıda katkı maddelerini en fazla üreten izolatların tespit edilerek optimum proses ve besiyeri içeriklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Optimize edilmiş fermentasyon prosesleri sonucunda üretilen sistein, glutamik asit ve beta karoten, iyon değiştirici reçine ve çözümler yardımı ile besiyeri ortamından ayrıştırılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Yapılan çalışma neticesinde elde edilen gıda katkı maddesi üretim potansiyeli olduğu belirlenen mikroorganizma türlerinin, elde edilen proses optimizasyonu ve elde edilen saflaştırma verilerinin gelecekte yapılacak endüstriyel çalışmalara bilimsel alt yapı oluşturacağı düşünülmektedir.

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Mikroorganizma Kaynaklarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması

Endüstriyel öneme sahip gıda katkı maddesi üretebilen potansiyel mikroorganizmaların izolasyonu için Mutlu (2015) tarafından rapor edilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Mikroorganizma izolasyonu amacıyla farklı bölgelerden rastgele örnekleme ile toplamda 46 adet gıda (Tablo 2.1) ve toprak örnekleri (Tablo 2.2) toplanmıştır. Numune alınacak alanların seçiminde farklı iklim ve coğrafi koşulları tercih edilerek aynı tür mikroorganizmaların izole edilme olasılığı azaltılmıştır.

Tablo 2.1. Gıda Numunelerinden Toplanan Örnekler

Örnek No	Örnek İsmi	Numunenin Bölgesi	Toplama Tarihi
G.1	Elâziğ Tulum Peyniri	Doğu Anadolu Bölgesi	20.04.2018
G.2	Tereyağı	Karadeniz Bölgesi	20.04.2018
G.3	Antep Peyniri	Güneydoğu Anadolu Bölgesi	20.04.2018
G.4	Yörük Peyniri	Akdeniz Bölgesi	20.04.2018
G.5	Örgü Peyniri	Marmara Bölgesi	20.04.2018
G.6	Otlu Peynir	Doğu Anadolu Bölgesi	20.04.2018
G.7	İzmir Tulum Peyniri	Ege Bölgesi	20.04.2018
G.8	Eski Kaşar	Doğu Anadolu Bölgesi	20.04.2018
G.9	Mihalic Peyniri	Marmara Bölgesi	20.04.2018

G: Gıda Numunesi

Tablo 2.2. Çeşitli Bölgelerden Toplanan Toprak Örnekleri

Örnek No	Örnek İsmi	Alındığı Coğrafi Bölge	Toplanma Tarihi
TA.1	Sera Toprağı	Akdeniz	23.06.2018
TA.2	Kayacı Vadi Toprağı	Akdeniz	23.06.2018
TA.3	Sahil Kumu	Akdeniz	23.06.2018
TD.1	Bahçe Toprağı	Doğu Anadolu	15.07.2018
TD.2	Yayla Toprağı	Doğu Anadolu	15.07.2018
TD.3	Çimlik Alan Toprağı	Doğu Anadolu	15.07.2018
TD.4	Dağ Eteği Toprağı	Doğu Anadolu	15.07.2018
TD.5	Mera Toprağı	Doğu Anadolu	15.07.2018
TD.6	Dağlık Arazı Toprağı	Doğu Anadolu	15.07.2018
TE.1	Yol Kenarı Otlak Toprağı	Ege	4.06.2018
TE.2	Çamlık Arazı Toprağı	Ege	4.06.2018
TE.3	Tarım Arazisi Toprağı	Ege	5.05.2018
TE.4	Bahçe Toprağı	Ege	5.05.2018
TE.5	Çimlik Alan Toprağı	Ege	2.05.2018
TE.6	Yol Kenarı Otlak Toprağı	Ege	2.05.2018
TE.7	Çiçeklik Alan Toprağı	Ege	2.05.2018
TG.1	Üzüm Bağı Toprağı	Güneydoğu	17.08.2018
TG.2	Fıstık Bahçesi Toprağı	Güneydoğu	17.08.2018
TG.3	Ev Bahçesi Toprağı	Güneydoğu	17.08.2018
TI.1	Bahçe Toprağı	İç Anadolu	4.08.2018
TI.2	Mera Toprağı	İç Anadolu	4.08.2018
TI.3	Dağ Eteği Toprağı	İç Anadolu	4.08.2018
TI.4	Ağaçlık Alan Toprağı	İç Anadolu	4.08.2018
TI.5	Tarım Arazisi Toprağı	İç Anadolu	4.08.2018
TK.1	Çay Bahçesi Toprağı	Karadeniz	1.09.2018
TK.2	Fındık Bahçesi Toprağı	Karadeniz	1.09.2018
TK.3	Mera Toprağı	Karadeniz	1.09.2018
TK.4	Yol Kenarı Otlak Toprağı	Karadeniz	1.09.2018
TK.5	Fındık Bahçesi Toprağı	Karadeniz	1.09.2018
TM.1	Sahil Kumu	Marmara	3.06.2018
TM.2	Tarım Arazisi Toprağı	Marmara	3.06.2018
TM.3	Şile Bahçe Toprağı	Marmara	21.06.2018
TM.4	Şile Sahil Kumu	Marmara	21.06.2018
TM.5	Çamlık Arazı Toprağı	Marmara	15.05.2018
TM.6	Çimlik Alan Toprağı	Marmara	15.05.2018
TM.7	Çiçeklik Alan Toprağı	Marmara	15.05.2018
TM.8	Gölcük Orman Toprağı	Marmara	21.06.2018

TA: Akdeniz bölgesinden toplanan, TD: Doğu Anadolu bölgesinden toplanan, TE: Ege bölgesinden toplanan, TG: Güneydoğu Anadolu Bölgesinden toplanan, TI: İç Anadolu Bölgesinden toplanan, TK: Karadeniz Bölgesinden toplanan, TM: Marmara bölgesinden toplanan toprak numunesi

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

- *Tryptic Soy Broth Sıvı Besiyerinin Hazırlanması (TSB)*

Tryptic Soy Sıvı Besiyerinin hazırlanmasında 17 g/L kazein peptonu, 3 g/L soya peptonu, 2.5 g/L glikoz, 5 g/L sodyum klorür ve 2.5 g/L di potasyum hidrojen fosfat içeriğine sahip Tryptic Soy Broth kullanılmıştır. Bu kapsamda 30g TSB hassas terazide tartılıp 1000 ml'lik otoklavlanabilir cam şişeye konarak üzerine 300 mL saf su eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile çözdürülerek hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Sonrasında şişenin kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk süre ile 121 °C'de otoklavlanarak hazır hale getirilmiştir.

- *Tryptic Soy Agar Besiyerinin Hazırlanması (TSA)*

Tryptic Soy Katı Besiyerinin hazırlanmasında Tryptic Soy Broth ve Agar Agar kullanılmıştır. Bu kapsamda 30 g TSB ve 15 g Agar hassas terazide tartılıp 1000 ml'lik otoklavlanabilir cam şişeye konarak üzerine 300 mL saf su eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile çözdürülerek hacmi 1000 mL tamamlanmıştır. Sonrasında şişenin kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk süre ile 121 C'de otoklavlanıp, plastik petri kaplarına her biri 20 mL hacimde olacak şekilde dökülerek hazır hale getirilmiştir.

- *Nutrient Katı Besiyerinin Hazırlanması (NA)*

Nutrient Katı Besiyerinin hazırlanmasında 20 g/L et peptonu, 10 g/L et ekstraktı içeriğe sahip Nutrient Broth ve Merck Agar kullanılmıştır. Bu kapsamda 8 gram Nutrient Broth ve 15 gram Agar hassas terazide tartılıp 1000 ml'lik otoklavlanabilir cam şişeye konarak üzerine 300 mL saf su eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile çözdürülerek hacmi 1000 mL tamamlanmıştır. Sonrasında şişenin kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk süre ile 121 °C'de otoklavlanıp, plastik petri kaplarına her biri 20 mL hacimde olacak şekilde dökülerek hazır hale getirilmiştir.

- *Peptonca Zenginleştirilmiş Nutrient Katı Besiyerinin Hazırlanması (PNA)*

Peptonca zenginleştirilmiş nutrient katı besiyerinin hazırlanmasında nutrient broth, pepton ve agar kullanılmıştır kullanılmıştır. Bu kapsamda 8 g Nutrient Broth, 5 gram pepton ve 15 gram agar hassas terazide tartılıp 1000 mL'lik otoklavlanabilir cam şişeye konarak üzerine 300 mL saf su eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile

çözdürülerek hacmi 1000 mL tamamlanmıştır. Sonrasında şişenin kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk süre ile 121 °C’de otoklavlanıp, plastik petri kaplarına her biri 20ml hacimde olacak şekilde dökülerek hazır hale getirilmiştir.

- *Plate Count Katı Besiyerinin Hazırlanması (PCA)*

Plate count katı besiyerinin hazırlanmasında 5 g/L kazein peptonu, 2.5 g/L maya ekstratı, 1 g/L glikoz ve 14 g/L agar agar içeriğine sahip plate count agar kullanılmıştır. Bu kapsamda 22 gram PCA hassas terazide tartılıp 1000 mL’lik otoklavlanabilir cam şişeye konarak üzerine 300 mL saf su eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile çözdürülerek hacmi 1000 mL tamamlanmıştır. Sonrasında şişenin kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk süre ile 121 °C’de otoklavlanıp, plastik petri kaplarına her biri 20 mL hacimde olacak şekilde dökülerek hazır hale getirilmiştir.

- *Violet red bile glucose katı besiyerinin hazırlanması (VRBGA)*

Violet red bile glucose katı besiyerinin hazırlanmasında 7 g/L pepton, 3 g/L maya ekstratı, 10 g/L glikoz, 5g/L sodyum klorür, 1.5 g/L ox bile, 0,002 g/L kristal viyole ve 13 g/L agar agar içeriğine sahip violet red bile glucose agar kullanılmıştır. Bu kapsamda 38 gram VRBGA hassas terazide tartılıp 1000 ml’lik otoklavlanabilir cam şişeye konarak üzerine 300 mL saf su eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile çözdürülerek hacmi 1000 mL tamamlanmıştır. Sonrasında şişenin kapağı alüminyum folyoyla kapatılarak 15 dk süre ile 121 °C’de otoklavlanıp, plastik petri kaplarına her biri 20 mL hacimde olacak şekilde dökülerek hazır hale getirilmiştir.

- *%0,2’lik Pyrogallol Çözeltisinin Hazırlanması*

%0,2’lik pyrogallol çözeltisi hazırlamak için 50 mL’lik balon jöjeye 10 mg pyrogallol konulup, üzerine 50 mL %95’lik metanol eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile homojenize edilmiştir.

- *%60’lik Potasyum Hidroksit (KOH) Çözeltisinin Hazırlanması*

%60’lik potasyum hidroksit çözeltisi hazırlamak için 50 ml’lik balon jöjeye 30 mg KOH konulup, üzerine 50 mL distile su eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile homojenize edilmiştir.

- *%15'lik İzotonik Çözeltinin Hazırlanması*

%15'lik izotonik çözeltisi hazırlamak için 100 mL'lik balon jöjeye 15 mg Sodyum Klorürü konulup, üzerine 100 mL distile su eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile homojenize edilmiştir.

- *Ninhidrin Çözeltinin Hazırlanması*

Ninhidridin çözeltisini hazırlamak için 100 mL'lik balon jöje içerisine 1 g ninhidrin, 16 mL 0,6 molar fosforik asit ve 64 mL asetik asit eklenmiş ve ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile homojenize edilmiştir.

- *Beta Karoten Ekstrasyon Çözeltisinin Hazırlanması*

Beta Karoten Ekstrasyon çözeltisini hazırlamak için 500 mL'lik balon jöje içerisine 250 mL metanol ve 250 mL tetrahidrofuran eklenip ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile homojenize edilmiştir.

- *0,02 M Amonyum Asetat Çözeltisinin Hazırlanması*

Amonyum asetat çözeltisini hazırlamak için 200 ml'lik balon jöje içerisine 310 mg amonyum asetat eklenip hacim 200 ml'ye tamalanmış ve ultrasonik su banyosunda 15 dk süre ile homojenize edilmiştir.

- *Beta karoten HPLC Mobil Fazının Hazırlanması*

Beta karoten ekstrasyon çözeltisini hazırlamak için 1000 mL'lik cam şişe içerisine 490 mL metanol ve 50 mL tetrahidrofuran eklenip ultrasonik su banyosunda 30 dk süre ile homojenize edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu, Aktifleştirilmesi ve Stoklanması

Mikroorganizma izolasyonu için Demirdöğen, (2015) tarafından kullanılan yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. İzolasyon için laboratuvara gelen numune örneklerinden 2 gram alınarak cam tüplere konulup, üzerine 5 mL daha önce 120 °C de 15 dk sterilizasyon işlemine tabi tutularak hazırlanan %15 lik izotonik çözelti eklenerek 30 sn süreyle vortekslenmiş ve ardından 5 dakika süre ile 37 °C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Sonrasında bu örnekler, barındırdıkları mikroorganizmaların izolasyonu için tek kullanımlık steril öze kullanılarak daha önceden hazırlanan nutrient agar, tryptic soy agar, 5 g/L hayvansal peptonla zenginleştirilmiş nutrient agar, plate count agar ve violet red bile glucose agar olmak üzere 5 farklı agar besiyerine tarama yöntemi ile ekimi yapılmış ve 48 saat süresince 37 °C etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri içeren petrilerde gelişen mikroorganizmaların saflaştırılmasında Güven (2014)'in kullandığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda petrilerde üreyen izolatlar, saf tek tür mikroorganizma elde edilmesi için bir kez daha üreme gösterdiği katı besiyerine (Ek-1) seyreltme yöntemi ile ekilmiş ve 24 saat sonunda aynı işlem saf koloni elde etmek amacı ile 2 kez tekrar uygulanmıştır. Toplam 72 saatlik 3 farklı inkübasyon sonucunda tek düşürülen koloniler koloni morfolojisini incelemek amacıyla tekrar ürettiği tür agar besiyerine nokta ekim yöntemi ile ekilmiştir. Nokta ekim sonrası üreyen saf kolonilerin koloni morfolojileri analiz edilmiştir (Ek-2). Aynı zamanda mikroorganizmaların gıda katkı maddesi üretim potansiyellerinin belirlenmesi ve -86 derecede canlılığını yitirmeden dondurulabilmesi amacı ile iki ayrı steril cam tüpde 120 °C 'de 15 dk sterilize edilmiş 10 mL TSB içerisinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların -86 °C stoklanması sürecinde "Sağlık Bakanlığı Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Gliserol Buyyon İçerisinde Dondurarak Suş Saklama Prosedürü "uygulanmıştır (Güven, 2014). Daha önce 24 saat süre ile TSB içerisinde inkübe edilen mikroorganizmalardan laminar flow içerisinde pipet yardımı ile 1 mL alınarak steril ependorf tüp içerisine konulmuştur. Sonrasında üzerine toplam hacmin %16'sı olacak şekilde 0,19 mL, daha önce 120 °C 'de 15 dakika sterilize edilmiş gliserol eklenmiştir. Mikrosantrifuj tüpünün kapağı kapatılıp kontaminasyonu ve açılmayı engellemek amacıyla parafilmle sarılarak -86 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Mikroorganizmaların İnkübasyonu ve Gıda Katkı Maddelerinin Üretilmesi

Mikroorganizmaların, gıda katkı maddesi üretim potansiyellerinin belirlenmesinde Shakoori vd. (2012) tarafından rapor edilen yöntem revize edilerek kullanılmıştır. İlgili analiz için referans inkübasyon besiyeri olarak seçilen 100 mL TSB'nin pH'ı 7,5'e ayarlanarak, daha önce saf su ile yıkanan 250 mL cam şişeler içerisine konulmuştur. Ardından otoklav kullanılarak ile 120 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra ise mikroorganizmaların gıda katkı maddesi üretmesi için; bölüm 2.2.1'de belirtildiği gibi hazırlanan, 24 saat süre ile TSB içerisinde inkübe edilen izolatlardan 1 mL alınıp cam şişelerde sterilize edilen inkübasyon besiyerine eklenmiştir. Son olarak hazırlanan inkübasyon besiyerleri çalkalamalı inkübatör içerisinde 37,5 °C derecede ve 125 rpm de 48 saat süre ile inkübe edilerek ilgili metabolitlerin oluşması sağlanmıştır.

2.2.3. Mikrobiyal Sistein Üretimi ve Tespiti

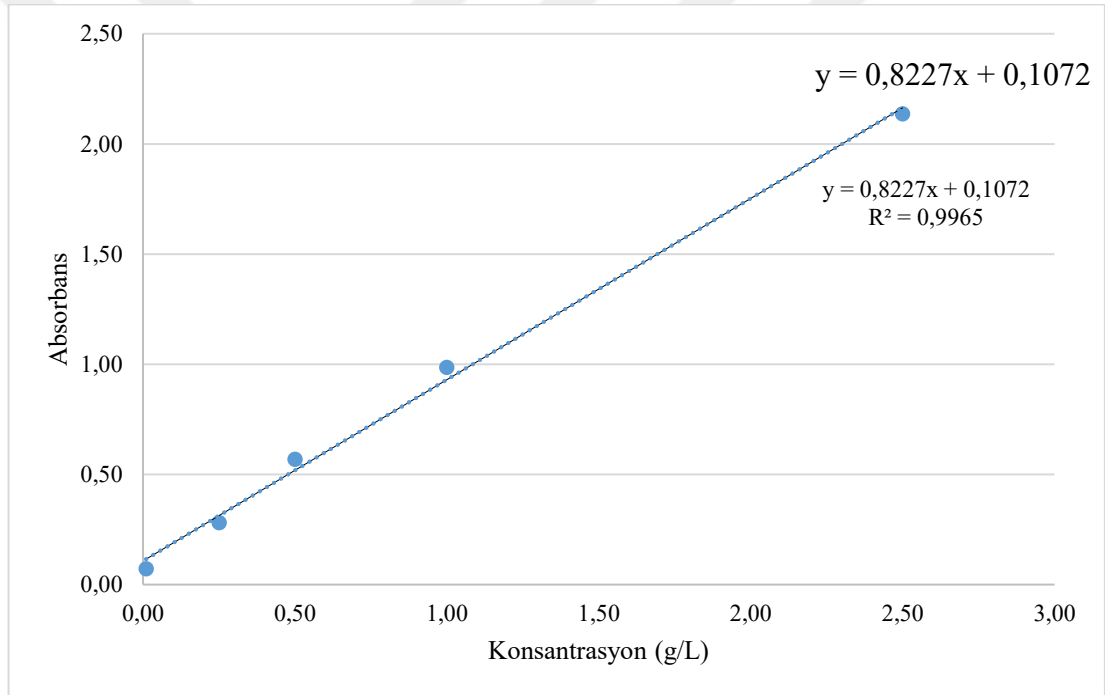
2.2.3.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Sistein Miktarının Spektroskopik Yöntemler ile Tespiti

İzolatların sistein üretim potansiyellerinin belirlenmesinde Ali ve ark. (2011) tarafından uygulanan asidik ninhidrin yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. İlk aşamada daha önce izole edilen izolatların inkübe edildiği besiyerleri homojenizatör yardımı ile 5000 rpm'de 30 sn süre ile homojenize edilip, içerisinden 10 mL örnek alınarak 4100 rpm karıştırma hızında 7 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant kısmı membran filtreden (0,45 µm) geçirilmiştir. Sistein miktarının saptanmasında asidik ninhidrin metodu kullanılmıştır. Bu amaçla steril mikrosantrifüj tüpü içerisine hazırlanan süpernetantlardan 50 µL numune konulmuştur. Daha sonra mikrosantrifüj tüpü 550 µL ninhidrin çözeltisi eklenip 80 °C de su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Su banyosundan alınan numuneler oda sıcaklığına geldikten sonra 1600 µL glacial asetik asit ilave edilmiştir. Asidik ninhidrin yöntemiyle ön hazırlıkları tamamlanan numunelerin spektrofotometre ile 365 nm dalga boyunda UV absorbans ölçümü yapılmıştır. Üretilen sistein miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak g/L cinsinden hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için ticari olarak satılan standart sistein saf su içerisinde 2.5, 1.0, 0,5, 0,25, 0,01 g/L derişimlerinde çözdürülmüş, daha sonra ise

asidik ninhidrin yöntemi ile ön hazırlığı yapılarak spektrofotometrede 365 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Derişimi bilinen standart sistein çözeltilerinin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulup (Şekil 2.1), elde edilen denklem kullanılarak en iyi üretim yapan 5 numunenin sistein derişimleri tespit edilmiştir.

Son aşamada ise en iyi sistein üretimi gözlemlenen 5 izolatin üretim verilerini doğrulamak amacıyla validasyon çalışması yapılmıştır. Bu işlem için; izolatlar 5 tekrar halinde daha önce olduğu gibi 100 mL Tryptic Soy Broth içerisinde pH'sı 7,5'ye ayarlandıktan sonra 37,5 °C, 125 rpm de 48 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Ardında da tüm örnekler tekrar asidik ninhidrin yöntemi ile spektrofotometrede analiz edilmiştir.



Şekil 2.1. Sistein Kalibrasyon Eğrisi

2.2.3.2. En İyi Üretim Yapan Mikroorganizmaların Fenotipik ve Genotipik Olarak Tanımlanması

En yüksek sistein üretimi yapan, İç Anadolu bölgesinden alınmış tarım arazisi toprağından izole edilen TL5.8.1 kodlu (Tablo 4.2) mikroorganizmanın tanımlanmasında koloni morfolojisi, gram boyama gibi konvansiyonel yöntemler ve moleküler 16S rRNA dizi analizi yöntemi uygulanmıştır.

Fenotipik karakterizasyon için; petri kabında üretilen TI.5.8.1 kodlu izolat öncelikle kolonisinin görünüm, büyüklük, kenar yapısı ve yüksekli gibi morfolojik özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Daha sonra ise izolat gram boyama ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir (Güven, 2014). Gram boyama için ilk aşamada lam üzerine distile su damlatıldı ve petri kabında üretilen izolattan öze yardımı ile bir miktar alınarak distile su içerisine dağıtılarak lam yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Sonrasında lam ateşten geçirilerek mikroorganizma lama sabitlenmesi sağlanıp, ardından da kristal viyole ile boyanarak 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra lam üzerindeki boya, distile su yardımıyla temizlenip, ardından tekrardan lam üzerine lugol çözeltisi damlatılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Lugol lam üzerinden öncelikle etil alkol ile ardından da distile su ile yıkanmıştır. Son aşamada ise lam, sulu karbol füksin ile 30 saniye süreyle boyanmış, distile su ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparat ışık mikroskobu altında hücre şekilleri ve oluşan renge göre değerlendirilmiştir (Bilginer, 2018).

TI.5.8.1 kodlu izolatin genotipik tanımlanması için, karşılaştırılmalı 16S rRNA dizi analizi yöntemi Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri Limited Şirketi'nden hizmet alınarak yapılmıştır. 16S rRNA dizi analizi için ise sırası ile bakteriyel DNA izolasyonu, gerçek zamanlı PCR, PCR ürünün saflaştırması, DNA dizi analizi ve analiz edilen dizinin gen bankası ile kıyaslanması protokolleri uygulanmıştır (Carozzi vd., 1991). DNA İzolasyonu için Biospeedy® Bakteriyel DNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır. Öncelikle petri kabında inkübe edilen izolat besiyeri yüzeyinden kazınarak (200 mg), içerisinde 500 µL %0,1 Tris buffer bulunan 1.5 mL'lik mikro santrifüj tüplerine alınıp 10 sn süre ile vortekslenmiştir. Sonrasında 14000 g'de 1 dk santrifüj edilip üst faz atılmış, 150 µL bağlama tamponu, (6.75 M guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-Cl pH 8.0) eklenip vorteks ile karıştırılmış ve ardından 5. 95 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrar 14000 g'de 1 dakika santrifüj edilip, üstteki sıvı faz yeni bir tüpe transfer edilmiş, 150 µL 2-propanol eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra toplama tüpüne DNA kolonu yerleştirilmiş ve karışımın tümü DNA kolonuna transfer eklenmiş; 14000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alttaki sıvı (filtrat) atılmıştır. Sonrasında DNA kolonuna 500 µL yıkama tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v ethanol) eklenip ve 14000 g'de 30 saniye santrifüj edilerek ve alttaki sıvı (filtrat) atılmıştır. Son aşamada DNA kolonuna 100 µL 60 °C'ye ısıtılan çözücü Tampon (MGW) ilave

edilerek, 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında 14000 g'de 1 dakika santrifüj edilip ve kolon atılmıştır. İzole edilen DNA tüpte kalan sıvıdadır. DNA -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Güven, 2014). Bakterilerin identifikasyonu için gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) ile bakteri genomik DNA'sında 16s rRNA'nın 1400-1550 baz çiftlik bölgesi ileri primer (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ve geri primer (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) çifti kullanılarak çoğaltılmıştır (Edwards vd., 1989). Reaksiyonlar için Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) Real Time PCR cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 1x reaksiyon tamponu, 0,1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 4 ng/μL kalıp cDNA ve her bir primerden 0,5 μM içeren karışımla gerçekleştirilmiştir. Cihazda, Dorak (2007) tarafından belirtilen bu primerlere özgü optimim PCR koşullarının ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sonuçları, Biorad CFX Connect Software 3.0'da analiz edilmiştir. PCR Ürünü Saflaştırması için elde edilen qPCR ampliconları, DNA dizi analizi öncesi primerler ve diğer qPCR bileşenlerinden Biospeedy® PCR ürün saflaştırma Kiti kullanılarak temizlenmiştir. Bu amaçla öncelikle PCR ürünleri bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Ardından üzerine birinci aşamadaki toplam hacmin 3 katı kadar bağlama tamponu (6.75 M guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-HCl (pH 8.0) eklenerek 10 saniye boyunca vorteks yapılmıştır. Bu aşamadan sonra DNA Kolonunu Toplama Tüpü'ne yerleştirilip karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, ardından da 14.000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında ise toplama tüpündeki sıvıyı atılarak, DNA kolonuna 500 μl yıkama solüsyonu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v etanol) eklenmiş akabinde de 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edilip, toplama tüpündeki sıvı atılmıştır. Hemen sonrasında DNA kolonunu 14.000 g'de 1 dakika boş olarak santrifüj edilerek DNA kolonunu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne takılıp üzerine 50 μl elüsyon çözeltisi (MGW) eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında (+15°C ile +25°C arası) inkübe edildikten sonra 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen bakteriyel ampliconların dizileri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ile ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, USA) belirlenmiştir. Son aşamada izolattan elde edilen diziler, uluslararası olarak kabul gören gen bankası olan NCBI DNA databankasında 16s rRNA bölgesi belirlenmiş bilinen bakteriyel türler ile karşılaştırılmış ve en çok benzeyen türler, benzerlik oranları belirlenmiştir (Sun, 2011).

2.2.3.3. Proses Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisinin İncelenmesi (Optimizasyonu)

En iyi sistein üretimi yapan *Bacillus* sp. strain CG1 farklı besiyeri içeriklerinde ve proses koşullarında sistein üretimi incelenerek proses koşulları optimize edilmiştir. *Bacillus* sp. strain CG1'in hangi proses şartlarında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek için 4 temel çevresel proses parametresi olan pH, sıcaklık, zaman ve çalkalama süresinin farklı varyasyonlarında, TSB içerisinde inkübe edilerek sistein üretimi incelenmiştir. Bu amaç ile 100 mL TSB içerisine 1 mL mikroorganizma aşılansarak Plackett–Burman dizaynı ile oluşturulan Tablo 2.3'te belirtilen proses koşullarında inkübe edilmiş, ardından da asidik ninhidrin yöntemi ile spektrofotometre yardımı ile üretilen sistein miktarı tespit edilmiştir.

Tablo 2.3. İnkübasyon Proses Parametreleri

Örnek	Ph	Süre (Saat)	Çalkalama Hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Örnek	Ph	Süre (Saat)	Çalkalama Hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)
1	7,5	48	75	37,5	17	7,5	24	125	37,5
2	7,5	48	100	37,5	18	7,5	36	125	37,5
3	7,5	48	125	37,5	19	7,5	48	125	37,5
4	7,5	48	150	37,5	20	7,5	60	125	37,5
5	7,5	48	175	37,5	21	7,5	72	125	37,5
6	7,5	48	200	37,5	22	7,5	84	125	37,5
7	7,5	48	225	37,5	23	7,5	96	125	37,5
8	7,5	48	250	37,5	24	7,5	108	125	37,5
9	7,5	48	125	10	25	5,5	48	125	37,5
10	7,5	48	125	15	26	6	48	125	37,5
11	7,5	48	125	20	27	6,5	48	125	37,5
12	7,5	48	125	25	28	7	48	125	37,5
13	7,5	48	125	30	29	7,5	48	125	37,5
14	7,5	48	125	35	30	8	48	125	37,5
15	7,5	48	125	40	31	8,5	48	125	37,5
16	7,5	48	125	45					

İlgili mikroorganizmanın inkübasyonunda, farklı besiyeri içeriklerinin sistein üretimine etkisini saptayabilmek adına Tablo 2.4'te belirtilen reçetelerdeki farklı karbonhidrat, protein, aminoasit ve minerallerin üretime etkileri incelenmiştir. Bu amaçla belirlenen reçete içerikleri ile hazırlanan 250 mL sıvı besiyerine 1 mL mikroorganizma aşılı olarak pH 7,5'te, 37,5 °C'de, 150 rpm'de 48 saat süre inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda besiyeri içeriklerinin sistein üretimine etkisi spektrofotometre ile tespit edilmiştir.

Optimum proses şartları ve besiyeri içerikleri belirlenen ilgili izolat; öncelikle TSB içerisinde optimum proses şartlarında ardından belirlenen besiyeri içeriği içerisinde optimum proses şartlarda inkübe edilerek maksimum sistein üretim kapasitesi tespit ve valide edilmiştir.

Tablo 2.4. Besiyeri Reçeteleri

	R	A1	A2	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	E4
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Glucose (D+)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptone	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Casein Peptone	17	17	17	17	17	20	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Soya Peptone	3	3	3	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Beef Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Malt Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Yeast Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
NaCl	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
K ₂ HPO ₄	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5
FeSO ₄ 7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-
Methionine	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serine	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.2.3.4. Üretilen Sisteinin Besiyeri Ortamından Ayrıştırılarak Geri Kazanımı

İnkübasyon sonrası üretilen mikrobiyal sisteinin besiyeri ortamından uzaklaştırarak geri kazanabilmek için Pu Wang vd., (2015)'in uyguladığı yöntem yöntem modifiye edilerek 3'er paralel çalışılmıştır. Bu kapsamda öncelikle, inkübasyon sonrası elde edilen sıvı besiyerinden istenmeyen hücre bileşenlerinden ayırıştırılması için 4200 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilip 45 µm filtreden geçirilerek iyon değiştirici reçineye yüklemeye hazır hale getirilmiştir. İyon değiştirici reçine ile sisteinin geri kazanımı sürecinde ise sırası ile iyon değiştirici reçineyi şartlama, dilüsyon ve kristalizasyon işlemleri uygulanmıştır.

Sisteinin besiyeri ortamında geri kazanımı için Dowex 50W x 8 isimli reçine kullanılmıştır. Reçinenin şartlandırılması aşamasında, öncelikle 10 g reçine alınarak 1 litrelik erlene konulmuş ve 100 mL saf su ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra ise reçine sırası ile 100 mL 2 N HCl ve 100 mL 2 N NaOH ile yıkanmış; bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra elde edilen reçine alkali olana kadar saf su ile yıkanmış, süzölmüş ve dilüsyon işlemine hazır hale getirilmiştir.

İnkübasyon sonrası santrifüj edilip, 45 µm filtreden geçirilerek büyük hücre bileşenlerinden ayrılan ve sistein konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçülen 500 mL sıvı besiyerinin pH'sı 8.0'e ayarlanarak içinde reçine bulunduğu erlene ilave edilmiştir. Daha sonra ise süreye bağlı dilüsyon miktarının tespiti için reçine-besiyeri karışımı 42 °C ve 200 rpm de çalkalamalı inkübatöre bırakılarak 30 dakikalık aralıklar ile numune alınarak UV spektrofotometrede 365 nm dalga boyunda absorbas ölçümü yapılmıştır. Maksimum absorbasın tespit edildiği 150, dakikanın sonunda erlenin içinden, sisteini absorbe etmiş olan reçine süzülerek üzerine 500 mL 1N HCl eklenmiş ve 30 °C, 200 rpm'de çalkalamalı inkübatör içerisinde reçinelerden sisteinin ayrılması sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda elde edilen elüsyon sıvısı behere alınarak, içerisinde yer alan sisteinin kristalize olması için pH'sı sisteinin izoelektirik noktası olan 5.0'e ayarlanmıştır (Arslan, 2016). Sonrasında ise elüsyon sıvısı 60 °C'lik su banyosuna konularak solventi uçurulmuş, beherin alt kısmında kristal formda oluşan sistein kazınarak ayrılmıştır.

2.2.3.5. Elde Edilen Sisteinin Enstrümental Analiz Cihazları ile Karakterizasyonu

2.2.3.5.1. Elde Edilen Sisteinin FTIR Analizi

Üretilen sisteinin moleküler analizinde, karakterizasyonunda ve standart sistein ile kıyaslanmasında, ilk olarak ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. FTIR analizi Erzurum Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinden hizmet alınarak Bruker Verter 70 marka spektroskopisi ile Andrzej vd., (2005)'in uyguladığı metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrumların eldesi için kullanılan, Bruker Verter 70 spektroskopi, DLaTGS detektörü ve Elmas ATR hücresi ile teçhizatlandırılmıştır. Örneklerin ATR-FTIR spektrası herbir spektrada 50 tarama biriktiren 4 cm^{-1} 'lik çözünürlük ile 4000'den 400 cm^{-1} dalgasayısı aralığında kaydedilmiştir. Ölçümler öncesinde ölçüm haznesinde örnek olmadan arka plan ölçümü yapılarak sıfırlama yapılmıştır. Elde edilen veriler OPUS (version 5.5) kullanılarak analiz edilmiş ve literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır.

2.2.3.5.2. Elde Edilen Sisteinin RAMAN Analizi

Üretilen sisteinin moleküler analizinde, karakterizasyonunda ve standart sistein ile kıyaslanmasında kullanılan bir diğer yöntem ise RAMAN spektroskopisi olmuştur. RAMAN analizi Erzurum Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinden hizmet alınarak Witecalpha 300 R marka raman spektroskopisi ile Andrzej vd., (2005)'in uyguladığı metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrumların eldesi için kullanılan, Bruker Verter 70 spektroskopi; Back-illuminated CCD dedektör ve 532 nm dalga boyuna sahip lazer kaynağı ile teçhizatlandırılmıştır. Raman ölçümleri 100 mW ise lazer gücü ile, 25 sn integrasyon süresinde 4 lazer ölçümüyle alınmıştır. Elde edilen veriler OriginLab (2020b) kullanılarak analiz edilmiş ve literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır.

2.2.3.5.3. Elde Edilen Sisteinin LC-MS/MS Analizi

Üretilen sisteinin LC-MS/MS analizi, JASEM Laboratuvar Sistem ve Çözümleri San. Tic. A.Ş.'den hizmet alımı yöntemi ile Agilent Infinity 1260 HPLC sistemine entegre Agilent 6460 Triple Quad LC/MS kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin LC-MS/MS analizi ön hazırlığı; Bilgin vd., (2018)'de belirtilen metot ile JASEM LC-MS / MS amino asit kiti (Sem Laboratuvar Cihazları

Pazarlama San. Ve Tic. A.Ş. İstanbul/Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlgili kiti kullanarak kalibrasyon standartları ve numunelerin ön hazırlığının yapılması için öncelikle 50 µL standart ve 50 µL numune bir numune şişesine aktarılmıştır. Daha sonra, dahili standart olarak 50 µL etiketli kararlı izotop karışımı ilave edildi ve 700 µL reaktif-1, 5 saniye süreyle döndürülmeden önce numune şişesine ilave edildi. Ön hazırlık işlemi tamamlanan numuneler, ultrasonik su banyosunda 1 dk bekletildikten sonra, 0,45 µl filtreden geçirilerek LC-MS/MS viallerine aktarılmış ve ardından cihaza yüklenmiştir. HPLC sistemi, 30°C'de tutulan amino asit analizi için (analiz kitine bağlı olarak) belirtilen Jasem analitik kolonuna 3 µL hazırlanmış numuneyi enjekte etmek için çalıştırıldı. Kromatografik ayırma, 0.7 mL/dakikalık bir akış hızında gradyan elüsyonu ile Jasem mobil faz A ve B kullanılarak gerçekleştirildi.

HPLC elüsyonu için %22 mobil faz A 'nın ilk LC gradyanı 1 dakika süreyle tutuldu. Daha sonra gradyan 3 dakikada %78 mobil faz A 'ya yükseltildi ve 0,5 dakika tutuldu. Son olarak, sütun 3 dakika %22 mobil faz A 'da dengelendi. Toplam çalışma süresi 7,5'teki olarak ayarlandı.

Kütle spektrometrik algılama, pozitif iyon modunda bir ESI kaynağı ile donatılmış Agilent 6460 üçlü dört kutuplu MS üzerinde gerçekleştirildi. MS dedektör ayarları; Kurutma gazı sıcaklığı 150°C, kurutma gazı akışı 10L/dak, nebulizör basıncı 40psi (Gösterge-Nebulizasyon, atmosfer basıncının altında vakumda olmayan bir odada gerçekleşir) ve kapiler voltaj 2000 V (+) olarak düzenlendi. Pozitif ESI modu, protonlanmış form olarak sistein ve IS'nin saptanması için çalıştırıldı ($m/z = [M+1]^+$). Bu öncü iyonun çarpışmayla indüklenen ayrışması (CID), sistein ve IS için bir ana ürün iyonu üretti. Sistein ve karşılık gelen IS'nin (öncü iyondan ürün iyonuna) MRM geçişleri, optimum parçalanma voltajlarında (FV) ve optimum çarpışma enerjilerinde (CE) izlendi.

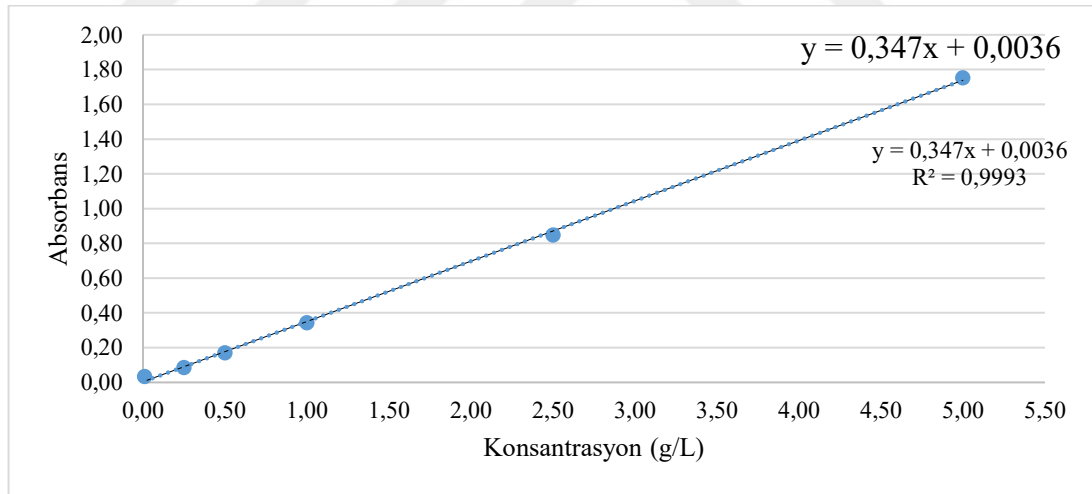
2.2.4. Mikrobiyal Glutamik Asit Üretimi ve Tespiti

2.2.4.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Glutamik Asit Miktarının Spektroskopik Yöntemler ile Tespiti

İzolatların glutamik asit üretim potansiyellerinin belirlenmesinde Gul vd., (2012) tarafından uygulanan asidik ninhidrin yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. İlk aşamada Bölüm 2.2.3.1'de belirtildiği gibi homojenizatör yardımı ile 5000 rpm de 30

sn süre ile homejenize edilen numunelerden 10 mL örnek alınarak 4100 rpm'de 7 dakika boyunca santrifüj edilmiş, ardından süpernatant kısım membran filtreden (0,45µm) geçirilerek ninhidrin yöntemine hazır hale getirilmiştir. Ninhidrin reaksiyonu için öncelikle steril mikrosantrifüj tüpleri içerisine 200 µl numune konulmuştur. Numunelerin üzerine de 550 µl ninhidrin çözeltisi eklenip oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 1600 µL glisial asetik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan numuneler spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda UV absorbans ölçümü yapılmıştır. Gözlemlenen glutamik asit miktarları kalibrasyon eğrisi kullanılarak g/L cinsinden hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için; ticari olarak satılan standart glutamik asit saf su içerisinde 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.01 g/L derişimlerinde çözdürülmüş, daha sonra ise asidik ninhidrin yöntemi ile ise spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Şekil 2.2). Derişimi bilinen standart glutamik asit çözeltilerinin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrişi oluşturulup, elde edilen denklem kullanılarak en iyi üretim yapan 5 numunenin glutamik asit derişimleri tespit edilmiştir.



Şekil 2.2. Glutamik Asit Kalibrasyon Eğrisi

Son aşamada ise en iyi glutamik asit üretimi gözlemlenen 5 izolatın üretim verilerini doğrulamak amacı ile validasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla izolatlar 5 tekrar halinde 100 mL TSB içerisinde 37,5 °C, 125 rpm de 48 saat süre ile inkübe edilmiş, ardında da asidik ninhidrin yöntemi ile spektrofotometrede analiz edilmiştir.

2.2.4.2.En iyi Üretim Yapan Mikroorganizmanın Genotipik Olarak

Tanımlanması

En iyi glutamik asit üretimi yapan, Karadeniz bölgesindeki çay bahçesinden alınan toprak numunesinden izole edilen TK.1.4.1 kodlu mikroorganizmanın (Tablo 4.2) fenotipik tanımlanmasında koloni morfolojisi, gram boyama gibi konvansiyonel yöntemler, genotipik tanımlanmasında ise moleküler tanı yöntemleri arasında olan 16S rRNA dizi analizi yöntemi uygulanmıştır. İlgili izolatın fenotipik ve genotipik analizinde bölüm 2.2.3.2 de belirtilen protokoller kullanılmıştır.

2.2.4.3. Proses Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine

Etkisinin İncelenmesi (Optimizasyonu)

En iyi glutamik asit üretimi yapan *Stenotrophomonas* sp. strain CG2; farklı besiyeri içeriklerinde ve proses koşullarında inkübasyonu neticesinde üretilen glutamik asit miktarı incelenerek proses koşulları optimize edilmiştir. İlgili izolatın hangi proses şartlarında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek için Tablo 2.3'te belirtilen 4 temel çevresel proses parametresi olan pH, sıcaklık, zaman ve çalkalama süresinin farklı varyasyonları ile TSB içerisinde glutamik asit inkübasyonuna bırakılmıştır. İlgili mikroorganizmanın hangi besiyeri ortamında daha iyi glutamik asit üretimi yaptığını yine 2.2.3.3'te uygulanan yöntem kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaç ile Tablo 2.4'te belirtilen reçete içerikleri ile hazırlanan 100 mL sıvı besiyerine 1 mL mikroorganizma aşılansak pH 7,5'te, 37,5 °Cde, 150 rpm de 48 saat süre inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonucunda proses koşullarının glutamik asit üretimine etkisi 2.4.1'de belirtilen yöntem kullanılarak tespit edilmiştir.

Optimum proses şartları ve besiyeri içerikleri belirlenen izolat; öncelikle TSB içerisinde optimum proses şartlarında, ardından belirlenen besiyeri reçetesi içerisinde optimum şartlarda inkübe edilerek maksimum glutamik asit üretim kapasitesi tespit edilerek validasyon ölçümleri yapılmıştır.

2.2.4.4. Üretilen Glutamik Asitin Besiyeri Ortamından Ayrıştırılarak Geri Kazanımı

İnkübasyon süresi sonunda üretilen glutamik asitin besiyeri ortamında ayrıştırılmasında Nampoothiri vd., (1999) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek 3'er paralel halinde çalışılmıştır. İnkübasyon sonrası elde edilen sıvı besiyeri, istenmeyen hücre bileşenlerinden ayırmak amacıyla 4200 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilip 45 µm filtreden geçirilerek iyon değiştirici reçineye yüklemeye hazır hale getirilmiştir. İyon değiştirici reçine ile ayrıştırma sürecinde ise yine sırası ile iyon değiştirici reçineyi şartlama, dilüsyon ve kristalizasyon işlemleri uygulanmıştır.

Glutamik Asitin geri kazanımında Amberlite IR 120 (Hi-media) türü reçine kullanılmıştır. Reçinenin şartlandırılması aşamasında; öncelikle 50 g reçine alınarak 1 litrelik erlene konulmuş, sonrasında ise safsızlıklarından arındırmak için iki kez 200 mL saf su ile yıkanıp ve süzülmüştür. Şartlandırma için ise saf su ile yıkanan reçine, 200 mL 4 N HCl ile yıkanmış ve ardından iki kez saf su ile yıkanıp süzülmüştür. Ardından süzüntü reçine alkali olana kadar 2 N NaOH ile yıkanmıştır. Alkali hale getirilen reçine 200 mL 1 N HCl içerisinde 2 saat süreyle 50 °C ve 200 rpm'de yıkanmaya bırakılmıştır. 2 saat sonrasında reçine süzümüş ve bir kez daha aynı işleme bir kez daha maruz bırakılmıştır. İkinci kez 2 saat süresince 50 °C'de 200 rpm'de yıkanan reçine tekrar süzümüş ve alkali olana kadar saf su ile yıkanarak çalışılmaya hazır hale getirilmiştir.

İnkübasyon sonrası santrifüj edilip 45 µm filtreden geçirilerek büyük hücre bileşenlerinden ayrılan ve glutamik asit konsantrasyonu ölçülen 500 mL inkübasyon besiyerinin pH'sı kademeli olarak önce 4.0'e sonrasında ise 2.0'ye ayarlanarak şartlandırılan reçinenin bulunduğu erlene eklenmiştir. Öncelikle süreye bağlı reçine sistein absorpsiyon değerini belirleyebilmek adına reçine-besiyeri karışımı 30 °C ve 150 rpm'de çalkalamalı inkübatöre bırakılmış ve 1 saat arayla ortamdaki serbest glutamik asit ölçülmüştür. Maksimum absorbasın ölçüldüğü 5. saatin sonunda glutamik asitleri absorbe etmiş olan reçine süzümüş ve absorbe edilen glutamik asidin ayrıştırılması için üzerine 500 mL pH'ı 3.9'a ayarlanmış saf su eklenerek 30 °C ve 150 rpm'de 2 saat çalkalamalı inkübatör bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda elüsyon sıvısı süzülerek reçineden ayrılmış ve içindeki glutamik asidin kristalize olması için beher içerisine alınarak pH'sı glutamik asitin izoelektirik noktası olan 3.2'ye ayarlanarak beherin alt kısmında kristal formda biriken glutamik asit ayrılmıştır.

2.2.4.5. Elde Edilen Glutamik Asitin Enstrümental Analiz Cihazları ile Karakterizasyonu

2.2.4.5.1. Elde Edilen Glutamik Asidin FTIR Analizi

Üretilen glutamik asidin moleküler analizinde, karakterizasyonunda ve standart glutamik asit ile kıyaslanmasında, bölüm 2.2.3.5.1’de belirtildiği gibi öncelikli olarak ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Üretilen glutamik asidin FTIR analizi; Bruker Verter 70 marka spektroskopisi ile Andrzej vd., (2005)’in uyguladığı metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler OPUS (version 5.5) kullanılarak analiz edilmiş ve literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır.

2.2.4.5.2. Saflaştırılan Glutamik Asidin RAMAN Analizi

Üretilen glutamik asidin moleküler analizinde, karakterizasyonunda ve standartları ile kıyaslanmasında da ikincil olarak RAMAN spektroskopisi kullanılmıştır. RAMAN analizi; bölüm 2.2.3.5.2’de belirtildiği gibi Witecalpha 300 R marka spektroskopisi ile Andrzej vd., (2005)’in uyguladığı metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler OriginLab (2020b) kullanılarak analiz edilmiş ve literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır.

2.2.4.5.3. Elde Edilen Glutamik Asidin LC-MS/MS Analizi

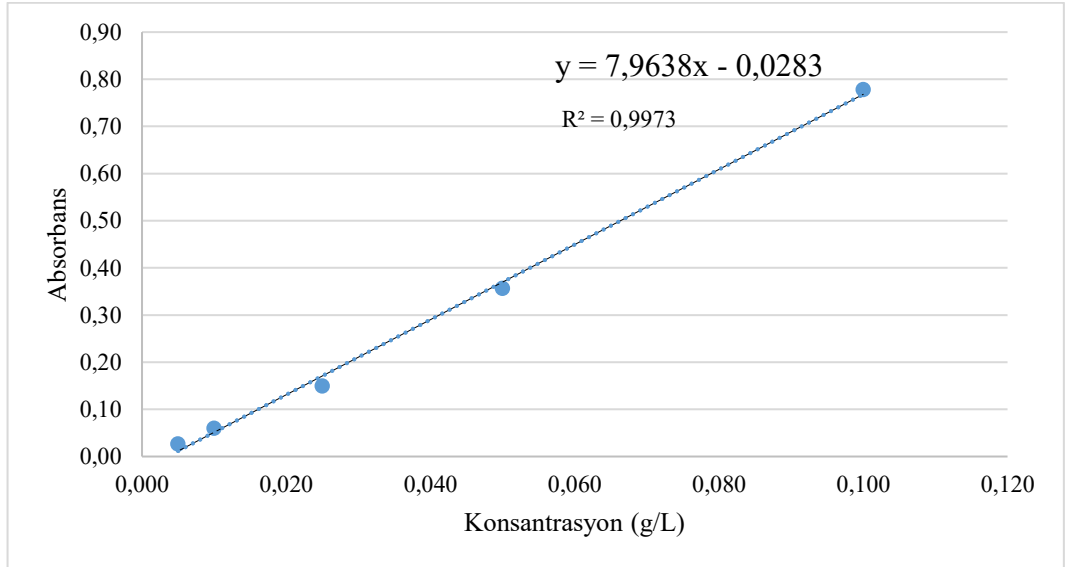
Üretilen glutamik asitin LC-MS/MS analizi, yine JASEM Laboratuvar Sistem ve Çözümleri San. Tic. A.Ş.'den hizmet alımı yöntemi ile Agilent Infinity 1260 HPLC sistemine entegre Agilent 6460 Triple Quad LC/MS kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin LC-MS/MS analizi ön hazırlığı; bölüm 2.2.3.5.3’te belirtildiği gibi Bilgin vd., (2018)’de belirtilen metot ile JASEM LC-MS / MS amino asit kiti (Sem Laboratuvar Cihazları Pazarlama San. Ve Tic. Inc. İstanbul / TÜRKİYE) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ön hazırlık işlemi tamamlanan numuneler, ultrasonik su banyosunda 1 dk bekletildikten sonra, 0,45 µL filtreden geçirilerek LC-MS/MS viallerine aktarılmış ve ardından cihaza yüklenmiştir. LC-MS/MS analizinde gene JASEM LC-MS / MS amino asit kitinde yer alan mobil fazlar kullanılarak, Bilgin vd., (2018)’de belirtilen metot ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Mikrobiyal Beta Karoten Üretimi ve Tespiti

2.2.5.1 Mikroorganizmaların Ürettiği Beta Karoten Miktarının Spektroskopik Yöntemler ile Tespiti

İzolatlarının beta karoten üretim potansiyelerinin belirlenmesinde ise Kodal (2016)'in kullanılan yöntem uygulanmıştır. Öncelikle homojenize edilmiş numunelerden 10 mL örnek alınarak 4100 rpm de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Bu analizde sistein ve glutamik asitin aksine süpernetant değil dipte kalan mikroorganizma kütlesi kullanılmıştır. Daha sonra dipte kalan mikroorganizma kütlesine 1 damla %37'lik HCl asit ilave edilerek 30 saniye vortekslenmiştir. Oluşan bu karışıma 5 mL %80 lik aseton ilave edilerek 24 saat boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Bu süre sonunda tekrardan santrifüj edilerek sıvı faza (aseton faz) geçen beta karoten 455 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Üretilen glutamik asit miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg/L cinsinden hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için ticari olarak satılan standart beta karoten aseton içerisinde 0,1, 0,05, 0,025, 0,010, 0,005 g/L derişimlerinde çözdürülmüş daha sonra ise spektrofotometrede 455 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır (Şekil 2.3). Derişimi bilinen standart glutamik asir çözeltilerinin absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrişi oluşturulup, elde edilen denklem kullanılarak en iyi üretim yapan 5 numunenin beta karoten derişimleri tespit edilmiştir.



Şekil 2.3. Beta Karoten Kalibrasyon Eğrisi

Son aşamada en iyi beta karoten üretimi gözlemlenen 5 izolatın üretim verilerini doğrulamak amacı ile validasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla izolatlar 5 tekrar halinde 100 mL TSB içerisinde 37,5°C derecede, 125 rpm’de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve ardından Kodal (2016) belirtilen %80 lik asetonla çözeltme yöntemi ile UV spektrofotometrede analiz edilmiştir.

2.2.5.2 En iyi Üretim Yapan Mikroorganizmanın Genotipik Olarak Tanımlanması

En iyi beta karoten üretimi yapan G.4.3.1 kodlu izolatın koloni morfolojisinin incelenmesi, gram boyama ile boyanması ve 16S rRNA dizi analizleri bölüm 2.2.3.2 de belirtilen protokoller kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.3 Proses Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisinin İncelenmesi (Optimizasyonu)

En iyi beta karoten üretimi yapan, Antalya yöresine ait Yörük peyniri numunesinden izole edilen *Enterococcus* sp. strain CG3’nin (Tablo 3.2) farklı besiyeri içeriklerinde ve proses koşullarında glutamik asit üretiminin incelenmesinde de gene bölüm 2.2.3.3’te belirtilen Tablo 2.3’teki proses parametreleri ve Tablo 2.4’te belirtilen besiyeri içerikleri kullanılmıştır. Belirtilen proses koşulları ve besiyeri içerikleri ile inkübasyona bırakılan izolat, inkübasyon süresi sonunda Bölüm 2.2.5.1 de belirtilen metod ile analiz edilerek ürettiği beta karoten miktarı tespit edilmiştir.

Optimum proses şartları ve besiyeri içerikleri belirlenen ilgili izolat; öncelikle TSB içerisinde optimum proses şartlarında ardından da belirlenen besiyeri reçetesi içerisinde optimum şartlarda inkübe edilerek maksimum beta karoten üretim kapasitesi tespit ve valide edilmiştir.

2.2.5.4 Üretilen Beta Karotenin Besiyeri Ortamından Ayırıştırılarak Geri Kazanımı

İnkübasyon süresi sonunda üretilen Beta Karoten'nin besiyeri ortamından ayırıştırılarak geri kazanılmasında Aslan (2018) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası üreyen mikroorganizma hücrelerini ayırmak için sıvı besiyeri 4000 rpm de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatantlar dökülmüş, pelette toplanan hücreler ise -80 °C ayırıştırma işlemine kadar mühafaza edilmiştir.

Beta Karotenin hücre içinden ekstrasyonu işlemi, hekzan (C_6H_{14}) çözgeni kullanılarak yapılmıştır. Beta karoten ekstraksiyonu başlamadan önce deneyde kullanılacak olan tüm cam malzemeler su ve deterjan artığından arındırmak için hekzanla yıkanmıştır. Sonrasında ise -80 °Cde muhafaza edilen donmuş hücreler kapalı cam tüplere konulup, üzerine 2 mL distile su eklenerek 2 dk süre ile vortekslenmiş; sonrasında da üzerine 1 gram, 1mm'lik cam boncuk eklenmiştir. Daha sonra tüpler 2'ser dakikadan 6 tur olacak şekilde toplamda 12 dakika vortekslenmiştir. Bu aşamadan sonra her bir tüpe daha önceden hazırlanan %0,2'lik pyrogallol çözeltisinden 5 mL ve %60'luk KOH çözeltisinden ise 2,5 mL ilave edilerek 10 sn süre ile vortekslenmiş ve ardından cam tüpler 75 °C'de ısıtıcı su banyosu içerisinde sabunlaşma tepkimesine girmesi için 1 saat süre ile beklemeye bırakılmıştır.

Sabunlaşma tepkimesi sonrasında cam tüpler alınıp üzerine 2 mL %95'lik hekzan eklenerek 1 dakika süre ile vortekslenmiş, sonrasında da 2800 rpm'de 2 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda tüpte; dıp kısımda cam boncuklar, orta kısımda mikroorganizmanın parçalanması sonucu oluşan protein, karbonhidrat gibi hücresel atıklar ve en üst kısımda da hücrenin içindeki beta karoteni tutan ve bu yüzden sarı renk almış hekzandan oluşan 3 faz oluşmuştur. Beta karotenin bulunduğu üst faz pastor pipet yardımı ile ayrı bir cam tüpe toplanmış ve en son aşamada ise ayrılan çözelti son bir kez daha 2800 rpm'de 2 dakika daha santrifüj edilerek bulaşan kalıntılardan ayırıştırılmıştır.

2.2.5.5 Elde Edilen Beta Karotenin Enstrümental Analiz Cihazları ile Karakterizasyonu

2.2.5.5.1 Elde Edilen Beta Karotenin HPLC Analizi

Elde edilen karoteni HPLC analizine hazırlamak için, öncelikle mikroorganizmalar yardımı ile ürettiğimiz karoten numunesinden ve standart beta karoten ile hazırlanmış 10 mg/L, 50 mg/L ve 100 mg/L derişime sahip numunelerden 5ml alınarak 250 mL şişelere konulup üzerine 45 mL beta karoten ekstrasyon çözeltisi eklenmiştir. Çözelti vorteks yardımıyla 5 dakika süreyle karıştırılıp 0,45 µl filtreden geçirilip, HPLC ye analiz için yüklenmiştir. HPLC analizinde ise Mobil faz olarak Metanol:Tetrahidrofuran(95:5) çözeltisi kullanılmış olup; 450 nm dalga boyunda Ultra Viyole (UV) dedektörde, 0,8 ml/dakika akış hızında ve Merck C18 (250x4.6 mm, 5 µm) kolonkullanılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.5.2 Elde Edilen Beta Karotenin FTIR Analizi

Üretilen Bete karotenin moleküler analizinde, karakterizasyonunda ve standartları ile kıyaslanmasında ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. FTIR analizi; bölüm 2.2.3.5.1’de belirtildiği gibi Bruker Verter 70 marka spektroskopisi ile Andrzej vd., (2005)’in uyguladığı metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler OPUS (version 5.5) kullanılarak analiz edilmiş ve literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır

2.2.5.5.3 Elde Edilen Beta Karotenin RAMAN Analizi

Üretilen beta karotenin moleküler analizinde, karakterizasyonunda ve standart beta karoten ile kıyaslanmasında da RAMAN spektroskopisi kullanılmıştır. Analiz; bölüm 2.2.3.5.2’de de belirtildiği gibi Witecalpha 300 R marka spektroskopisi ile Andrzej vd., (2005)’in uyguladığı metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler OriginLab kullanılarak analiz edilmiş ve literatürdeki veriler ile kıyaslanmıştır.

2.2.6 İstatistik Analizler

Çalışmalar kapsamında yapılan ölçümler en az üç tekrarlı olarak yapılarak ortalama değerleri hesaplanmıştır. Ortalama değer arasındaki farkların önem derecelerinin belirlenmesi için ANOVA tek yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testleri ($p < 0,05$) uygulanmıştır. Bu çalışmalar Minitab 17(Minirab Ltd, Coventry, UK) paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3 ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Mikroorganizma İzolasyon Sonuçları

Endüstriyel öneme sahip gıda katkı maddesi üretebilen potansiyel mikroorganizmaların izolasyonu için Türkiye'nin 7 bölgesinin farklı koşullarından, 37 adet toprak ve 9 adet gıda olmak üzere toplam 46 numune toplanmıştır (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2). İlgili toprak ve gıda numunelerinden 262 mikroorganizma izole edilmiş olup, bu 262 mikroorganizmanın ancak 212'sinde inkübasyon gerçekleşmiş, 50 sinde herhangi bir üreme gözlemlenmemiştir. Toplanan 9 gıda numunesinden 23 mikroorganizma izole edilirken; 37 toprak numunesinden ise 239 mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Marmara bölgesinden toplanan numunelerden 52 mikroorganizma, Ege bölgesinden toplanan numunelerden 44 mikroorganizma, Karadeniz bölgesinden toplanan numunelerden 41 mikroorganizma, Akdeniz bölgesinden toplanan numunelerden 22 mikroorganizma, İç Anadolu bölgesinden toplanan numunelerden 34 mikroorganizma, Doğu Anadolu bölgesinden numunelerden 27 mikroorganizma ve Güney Doğu Anadolu bölgesinden toplanan numunelerden 19 mikroorganizma izole edilmiştir.

Tablo 3.1. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatlar

Örnek No	Örnek Türü	İzolat Sayısı	Mikroorganizma İzolat Numarası
G.1	Elâzığ Tulumu	2	G.1,1.1, G.1,2.1
G.2	Tereyağı	4	G.2.1.1, G.2.2.1, G.2.3.1, G.2.4.1
G.3	Antep Peyniri	3	G.3.1.1, G.3.2.1, G.3.3.1
G.4	Yörük Peyniri	3	G.4.1.1, G.4.2.1, G.4.3.1
G.5	Örgü Peyniri	2	G.5.1.1, G.5.3.1
G.6	Otlu Peynir	2	G.6.1.1, G.6.2.1
G.7	İzmir Tulumu	2	G.7.1.1, G.7.2.1
G.8	Eski Kaşar	3	G.8.1.1, G.8.2.1, G.8.3.1
G.9	Mihalıc Peyniri	2	G.9.1.1, G.9.2.1

G: Gıda Numunesi

Tablo 3.2. Toprak Örneklerinden Elde Edilen İzolatlar

Örnek No	İzolat Sayısı	İzolat Kodu
TA.1	8	TA.1.1.1, TA.1.2.1, TA.1.3.1, TA.1.4.1, TA.1.5.1, TA.1.6.1, TA.1.7.1, TA.1.8.1
TA.2	8	TA.2.1.1, TA.2.2.1, TA.2.3.1, TA.2.4.1, TA.2.5.1, TA.2.6.1, TA.2.7.1, TA.2.8.1
TA.3	5	TA.3.1.1, TA.3.2.1, TA.3.3.1, TA.3.4.1, TA.3.5.1
TD.1	6	TD.1.1.1, TD.1.2.1, TD.1.3.1, TD.1.4.1, TD.1.5.1, TD.1.6.1,
TD.2	3	TD.2.1.1, TD.2.3.1, TD.2.5.1,
TD.3	5	TD.3.2.1, TD.3.3.1, TD.3.4.1, TD.3.5.1, TD.3.7.1
TD.4	3	TD.4.1.1, TD.4.2.1, TD.4.7.1
TD.5	4	TD.5.4.1, TD.5.5.1, TD.5.6.1, TD.5.8.1
TD.6	6	TD.6.1.1, TD.6.2.1, TD.6.3.1, TD.6.5.1, TD.6.7.1, TD.6.8.1
TE.1	8	TE.1.1.1, TE.1.2.1, TE.1.3.1, TE.1.4.1, TE.1.5.1, TE.1.6.1, TE.1.7.1, TE.1.8.1
TE.2	5	TE.2.1.1, TE.2.2.1, TE.2.5.1, TE.2.6.1, TE.2.7.1,
TE.3	7	TE.3.1.1, TE.3.3.1, TE.3.3.2, TE.3.4.1, TE.3.5.1, TE.3.6.1, TE.3.7.1
TE.4	5	TE.4.1.1, TE.4.2.1, TE.4.3.1, TE.4.5.1, TE.4.6.1
TE.5	6	TE.5.1.1, TE.5.2.1, TE.5.3.1, TE.5.4.1, TE.5.5.1, TE.5.6.1
TE.6	6	TE.6.1.1, TE.6.2.1, TE.6.3.1, TE.6.4.1, TE.6.5.1, TE.6.6.1
TE.7	7	TE.7.1.1, TE.7.2.1, TE.7.3.1, TE.7.4.1, TE.7.5.1, TE.7.6.1, TE.7.7.1
TG.1	7	TG.1.1.1, TG.1.2.1, TG.1.3.1, TG.1.4.1, TG.1.5.1, TG.1.6.1, TG.1.7.1
TG.2	7	TG.2.1.1, TG.2.2.1, TG.2.3.1, TG.2.4.1, TG.2.5.1, TG.2.6.1, TG.2.7.1,
TG.3	5	TG.3.1.1, TG.3.2.1, TG.3.3.1, TG.3.4.1, TG.3.5.1
TI.1	6	TI.1.1.1, TI.1.2.1, TI.1.3.1, TI.1.4.1, TI.1.5.1, TI.1.6.1
TI.2	9	TI.2.1.1, TI.2.2.1, TI.2.3.1, TI.2.4.1, TI.2.5.1, TI.2.6.1, TI.2.7.1, TI.2.8.1, TI.2.9.1
TI.3	5	TI.3.1.1, TI.3.2.1, TI.3.3.1, TI.3.4.1, TI.3.5.1
TI.4	6	TI.4.1.1, TI.4.2.1, TI.4.3.1, TI.4.4.1, TI.4.5.1, TI.4.6.1
TI.5	8	TI.5.1.1, TI.5.2.1, TI.5.3.1, TI.5.4.1, TI.5.5.1, TI.5.6.1, TI.5.7.1, TI.5.8.1
TK.1	9	TK.1.1.1, TK.1.2.1, TK.1.3.1, TK.1.4.1, TK.1.5.1, TK.1.6.1, TK.1.7.1, TK.1.8.1, TK.1.9.1
TK.2	5	TK.2.1.1, TK.2.2.1, TK.2.3.1, TK.2.4.1, TK.2.5.1
TK.3	11	TK.3.1.1, TK.3.2.1, TK.3.4.1, TK.3.5.1, TK.3.6.1, TK.3.6.2, TK.3.7.1, TK.3.8.1, TK.3.9.1, TK.3.10.1, TK.3.11.1
TK.4	9	TK.4.1.1, TK.4.2.1, TK.4.3.1, TK.4.4.1, TK.4.5.1, TK.4.6.1, TK.4.7.1, TK.4.8.1, TK.4.9.1
TK.5	7	TK.5.1.1, TK.5.2.1, TK.5.3.1, TK.5.4.1, TK.5.4.2, TK.5.5.1, TK.5.6.1
TM.1	8	TM.1.1.1, TM.1.2.1, TM.1.3.1, TM.1.4.1, TM.1.5.1, TM.1.6.1, TM.1.7.1, TM.1.8.1
TM.2	5	TM.2.1.1, TM.2.2.1, TM.2.3.1, TM.2.4.1, TM.2.5.1
TM.3	7	TM.3.1.1, TM.3.2.1, TM.3.3.1, TM.3.4.1, TM.3.5.1, TM.3.6.1, TM.3.7.1
TM.4	6	TM.4.1.1, TM.4.2.1, TM.4.3.1, TM.4.4.1, TM.4.5.1, TM.4.6.1
TM.5	9	TM.5.1.1, TM.5.2.1, TM.5.3.1, TM.5.4.1, TM.5.5.1, TM.5.6.1, TM.5.7.1, TM.5.8.1, TM.5.9.1
TM.6	8	TM.6.1.1, TM.6.2.1, TM.6.3.1, TM.6.4.1, TM.6.5.1, TM.6.6.1, TM.6.7.1, TM.6.8.1
TM.7	7	TM.7.1.1, TM.7.2.1, TM.7.3.1, TM.7.4.1, TM.7.5.1, TM.7.6.1, TM.7.7.1
TM.8	3	TM.8.1.1, TM.8.2.1, TM.8.3.1

TA: Akdeniz bölgesinden toplanan, TD: Doğu Anadolu bölgesinden toplanan, TE: Ege bölgesinden toplanan, TG: Güneydoğu Anadolu Bölgesinden toplanan, TI: İç Anadolu Bölgesinden Toplanan, TK: Karadeniz Bölgesinden toplanan, TM: Marmara bölgesinden toplanan toprak numunesi

İzole edilen mikroorganizmaların inkübasyonundan ve -86 °C'de dondurulmasından önce koloni morfolojisi analiz edilmiştir. Mikroorganizmaların koloni morfolojisi incelenirken S (Düzgün - Smooth), R (Pürüzlü - Rough), M (Pelte - Mukoid), L (L Formda) tipi koloni olmak üzere dört temel sınıfta değerlendirme yapılmıştır. İzole edilen mikroorganizmalar sınıflandırıldığında 25 tanesi L tipi koloni oluştururken, 11 tanesi M tipi, 10 tanesi R tipi ve kalan 216 tanesi S tipi koloni oluşturduğu görülmektedir. Kolonilerin şekilleri incelediğinde ise 83 tanesinin dairesel, 27 tanesinin filamentli, 95 tanesinin gayri muntazam, 51 tanesinin noktasal ve 6 tanesinin ise rizoid yapıda olduğu tespit edilmiştir. Tüm mikroorganizmalar morfoloji analizinin ardından inkübasyona tabi tutulmuş, aynı zamanda ihtiyaç duyulduğunda veya farklı çalışmalarda tekrar kullanabilmek amacıyla mikrosantrifüj tüplerinde -86 derecede stoklanmıştır.

3.2 Mikrobiyal Sistein Üretimi

3.2.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Sisteinin Analizi

Türkiye'nin 7 farklı bölgesinden elde edilen 9 gıda ve 37 toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların TSB besiyerinde inkübasyonu neticesinde elde edilen sistein miktarları Ek-3A'da belirtildiği gibidir. Toprak numunelerinden elde edilen izolatların sistein üretim miktarı ortalaması $0,784 \pm 0,259$ g/L iken, gıda numunelerinden elde edilen izolatların sistein üretim miktarı ortalaması $0,617 \pm 0,217$ g/L belirlenmiştir. En yüksek sistein üretimi $2,124 \pm 0,004$ g/L ile İç Anadolu bölgesindeki bir meralık alandan alınan toprak numunesinden izole edilen EM 5.8.1 kodlu izolat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca $1,637 \pm 0,014$ g/L ile Karadeniz bölgesindeki tarım alanından alınan toprak numunesinden izole edilen TK.3.1.1 kodlu izolat ile Marmara bölgesindeki sahilden alınan toprak numunesinden izole edilen TM.4.6.1, TM.4.5.1 ve TM.3.7.1 kodlu izolatlardan sırayla $1,524 \pm 0,005$ g/L, $1,499 \pm 0,004$ ve $1,449 \pm 0,007$ g/L sırası üretim gözlemlenmiştir. Gıda numunelerinde ise 1 g/L üzerinde sistein üretimi gösteren herhangi bir izolat gözlemlenmemiştir.

Tablo 3.3. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Sistein Üretim Değerleri

Numune Kodu	Örnek Türü	İzolat Sayısı	İzolatların Sistein Üretim miktarları (g/L) (ortalama±standart sapma)
G.1	Elazığ Tulumu	2	0,74±0,16 ^b
G.2	Tereyağı	4	0,41± 0,02 ^c
G.3	Antep Peyniri	2	0,74±0,30 ^b
G.4	Yörük Peyniri	2	0,55±0,29 ^d
G.5	Örgü Peyniri	2	0,60±0,26 ^{c,d}
G.6	Otlu Peynir	2	0,40±0,03 ^c
G.7	İzmir Tulumu	2	0,59±0,10 ^a
G.8	Eski Kaşar	2	0,65±0,14 ^c
G.9	Mihalic Peyniri	2	0,83±0,22 ^a

Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir (p<0,05)

Tablo 3.3’de 9 farklı gıda örneğinden elde edilen izolatların sistein üretim miktarları görülmektedir. Gıda örneklerinden elde edilen bu mikroorganizmaların sistein üretim ortalamaları 0,617±0,217 g/L belirlenmiştir. Gıda numuneleri arasında en yüksek sistein üretimi ortalaması 0,827±0,216 g/L ile Balıkesir bölgesinde üretilen Mihaliç peynirden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir. 0,742±0,163 g/L ortalaması ile Elâzığ Tulum peynirinden elde edin izolatlarda ve 0,738±0,297 g/L ortalaması ile Antep Peynirinden elde edilen izolatlarda, Mihaliç peynirden elde edilen izolatlara yakın bir sistein üretim ortalaması göstermiştir. 0,645±0,137 g/L ortalaması ile Kars Eski Kaşarından elde edilen izolatlar, 0,604±0,256 ortalaması ile Adapazarı örgü peynirinden elde edilen izolatlar, 0,589±0,105 g/L ortalaması ile İzmir tulum peynirinden elde edilen izolatlar ve 0,549±0,294 g/L ortalaması ile Antalya Yörük peynirinden elde edilen izolatlar; genel gıda örnekleri ortalamasına yakın sonuçlar göstermektedir. Ancak 0,407±0,023 g/L ortalaması ile Trabzon Tereyağından elde edilen izolatlar ile 0,396±0,032 g/L ortalaması ile Van otlu peynirinden elde edilen izoatlarda diğer gıda numunelerinden elde edilen izolatlarla oranla daha düşük sistein üretim ortalamaları elde edilmiştir.

Tablo 3.4’te ise Türkiye’nin 7 farklı coğrafi bölgesinden toplanan toprak örneklerinden elde edilen izolatların glutamik asit üretim ortalamaları görülmektedir. Toprak örneklerinden elde edilen bu mikroorganizmaların sistein üretim ortalamaları 0,784 + 0,259 g/L belirlenmiştir.

Tablo 3.4. Toprakta Edilen İzolatların Bölgelere Göre Sistein Üretim Miktarları

Örnek Alınan Bölge	Numune Kodu	Örnek Türü	İzolat Sayısı	Örnekten Elde Edilen İzolatların Sistein Üretim Ortalaması (g/L)	Bölgeden Elde Edilen İzolatların Sistein Üretim Ortalaması(g/L)
Doğu Anadolu Bölgesi	TD.1	Bahçe Toprağı	6	0,76±0,14 ^{ac}	0,79±0,13 ^{ab}
	TD.2	Yayla Toprağı	3	0,88±0,11 ^{ac}	
	TD.3	Çimlik Alan Toprağı	3	0,72±0,07 ^{ac}	
	TD.4	Dağ Eteği Toprağı	3	0,82±0,05 ^{ac}	
	TD.5	Mera Toprağı	4	0,87±0,13 ^{ac}	
	TD.6	Dağlık Arazi Toprağı	6	0,73±0,14 ^{ac}	
İç Anadolu Bölgesi	TI.1	Bahçe Toprağı	5	0,75±0,29 ^{ac}	0,94±0,39 ^a
	TI.2	Mera Toprağı	7	0,94±0,32 ^{ac}	
	TI.3	Dağ Eteği Toprağı	4	0,98±0,33 ^{ac}	
	TI.4	Ağaçlık Alan Toprağı	6	0,89±0,36 ^{ac}	
	TI.5	Tarım Arazisi Toprağı	6	1,13±0,60 ^{ab}	
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	TG.1	Üzüm Bağı Toprağı	6	0,64±0,09 ^{bc}	0,66±0,10 ^b
	TG.2	Fıstık Bahçesi Toprağı	5	0,67±0,10 ^{bc}	
	TG.3	Bahçe Toprağı	4	0,70±0,14 ^{ac}	
Karadeniz Bölgesi	TK.1	Çay Bahçesi Toprağı	8	0,70±0,11 ^{bc}	0,80±0,21 ^{ab}
	TK.2	Fındık Bahçesi Toprağı	5	0,77±0,17 ^{ac}	
	TK.3	Mera Toprağı	9	0,84±0,32 ^{ac}	
	TK.4	Yol Kenarı Otlak Toprağı	7	0,90±0,12 ^{ac}	
	TK.5	Fındık Bahçesi Toprağı	5	0,74±0,16 ^{ac}	
Akdeniz Bölgesi	TA.1	Sera Toprağı	7	0,65±0,06 ^{bc}	0,72±0,20 ^b
	TA.2	Kayacı Vadi Toprağı	6	0,70±0,15 ^{bc}	
	TA.3	Sahil Kumu	5	0,83±0,32 ^{ac}	
Marmara Bölgesi	TM.3	Şile Bahçe Toprağı	7	0,93±0,29 ^{ac}	0,82±0,29 ^{a,b}
	TM.4	Şile Sahil Kumu	6	1,25±0,23 ^a	
	TM.5	Çamlık Arazi Toprağı	5	0,56±0,16 ^c	
	TM.6	Çimlik Alan Toprağı	7	0,66±0,15 ^{bc}	
	TM.7	Çiçeklik Alan Toprağı	4	0,73±0,07 ^{ac}	
	TM.8	Göl Kenarı Toprağı	2	0,69±0,71 ^{ac}	
	TM.1.	Sahil Kumu	7	0,75±0,28 ^{ac}	
	TM.2	Tarım Arazisi Toprağı	3	0,83±0,23 ^{ac}	
Ege Bölgesi	TE.1	Yol Kenarı Otlak Toprağı	7	0,72±0,28 ^{bc}	0,67±0,20 ^b
	TE.2	Çamlık Arazi Toprağı	2	0,75±0,01 ^{ac}	
	TE.3	Tarım Arazisi Toprağı	5	0,69±0,10 ^{ac}	
	TE.4	Bahçe Toprağı	5	0,74±0,30 ^{ac}	
	TE.5	Çimlik Alan Toprağı	4	0,67±0,08 ^{ac}	
	TE.6	Yol Kenarı Otlak Toprağı	2	0,61±0,16 ^{ac}	
	TE.7	Çiçeklik Alan Toprağı	6	0,56±0,20 ^c	

Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir (p<0,05)

Toprak numuneleri arasında en yüksek sistein üretimi ortalaması $0,941\pm 0,391$ g/L ile İç Anadolu bölgesinden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir. $0,818\pm 0,293$ g/L ortalaması ile Marmara bölgesinden elde edilen izolatlar, İç Anadolu bölgesinden sonra sistein üretim ortalaması en yüksek bölgedir. İç Anadolu ve Marmara bölgesini ise $0,798\pm 0,206$ g/L sistein üretim ortalaması ile Karadeniz bölgesi takip etmektedir. Tüm izolatlar arasında en yüksek sistein üretimini yapan 5 izolat bu 3 bölgeden elde edilmiştir.

Bu bölgeler dışında $0,788\pm 0,126$ g/L sistein üretim ortalaması ile Doğu Anadolu bölgesinden elde edilen izolatlar Türkiye genelinde elde edilen izolatların sistein üretim ortalamalarına yakın bir ortalama göstermiştir. Yine $0,718\pm 0,197$ g/L sistein üretim ortalaması ile Akdeniz bölgesinden elde edilen izolatlarda; Türkiye ortalamalarına yakın bir ortalama göstermiştir. Ancak bu iki bölgeden elde edilen hiçbir izolatta yüksek miktarda sistein üretimi gözlemlenmemiştir. Ege bölgesinden toplanan numunelerden elde edilen izolatlar ise $0,675\pm 0,205$ g/L ile Türkiye genelinde elde edilen izolatların sistein üretim ortalamasının altında bir üretim ortalaması göstermiştir. Güneydoğu Anadolu bölgesinden toplanan numunelerden elde edilen izolatların sistein üretim ortalaması ise $0,665\pm 0,103$ g/L ile 7 coğrafi bölge arasındaki en düşük sistein üretimi ortalaması olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan spektrofotometrik analiz neticesinde toprak numunelerinden elde edilen izolatların sistein üretim ortalamalarının, gıda numunelerinden elde edilen izolatların sistein üretim ortalamalarının üzerinde olduğu; gıda örneklerinden elde edilen izolatların yüksek sistein üretimi göstermediği gibi, sadece İç Anadolu, Karadeniz ve Marmara bölgelerine ait toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmalarda yüksek sistein üretim potansiyeli tespit edilmiştir.

Yapılan spektrofotometrik analiz sonucunda iyi sistein üretimi yapan EM 5.8.1, TK.3.1.1, TM.4.6.1, TM.4.5.1 ve TM.3.7.1 kodlu 5 izolatın üretim verilerini doğrulamak amacı ile validasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla tekrar izolatlar 5 tekrar halinde Shakoori vd. (2012) tarafından rapor edilen yöntem kullanılmıştır. Buna göre, 100 mL Tryptic Soy Broth içerisinde pH'sı 7,5'e ayarlanmış $37,5$ °C, 125 rpm'de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve spektrofotometre ile 365 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Validasyon (doğru bir şekilde tekrarlanabilirliğini tespit etmek için) için aynı şartlarda 5 tekrarlı olarak yapılan analizlerin sonucu Tablo 3.5'te belirtildiği gibidir.

Tablo 3.5. En Yüksek Sistein Üretimi Gözlemlenen 5 İzolatın Üretim Validasyon Verileri

İzolat Kodu	ST1 (g/L)	ST2 (g/L)	ST3 (g/L)	ST4 (g/L)	ST5 (g/L)	Ortalama
TI.5.8.1	1,38	1,68	2,05	2,35	1,90	1,87±0,37
TK.3.1.1	1,68	1,74	1,15	1,36	1,23	1,43±0,13
TM.4.6.1	1,21	1,61	1,50	1,04	1,41	1,36±0,09
TM.4.5.1	1,34	1,35	1,22	1,52	1,09	1,31±0,03
TM.3.7.1	1,23	1,70	1,47	1,60	1,56	1,51±0,18

Validasyon çalışması sonrasında en yüksek sistein üretimi $1,871\pm0,368$ g/L ile İç Anadolu bölgesinden izole edilen EM 5.8.1 kodlu izolat olduğu doğrulanmıştır. İlk yapılan analizde $1,449\pm0,007$ g/L ile 5. en iyi üretim yapan TM.3.7.1 numaralı izolatın ise yapılan 5 tekrar sonucunda $1,512\pm0,180$ g/L ile 2 en yüksek üretim yapan izolat olduğu anlaşılmıştır. TK.3.1.1 izolat numaralı $1.432\pm0,264$ g/L ile 3 en yüksek sistein üretimi yapan, TM.4.6.1 numaralı izolat $1,364\pm0,217$ g/L ile 4 en yüksek sistein üretimi yapan ve TM.4.5.1 numaralı izolat $1.306\pm0,159$ g/L ile 5 en yüksek üretim yapan mikroorganizma olduğu tespit edilmiştir. Yapılan validasyon çalışmaları sonucunda elde edilen değerlerin ilk analiz ile büyük oranda örtüştüğü, ilk ölçüm ile sonrasında yapılan 5 tekrarlı validasyon ölçümleri arasındaki farkların kabul edilebilir düzeyde olduğu ve literatürde aynı konuda daha önceden yapılan çalışmalara benzer oranlarda olduğu tespit edilmiştir.

3.2.2. En Yüksek Sistein Üretim Yapan izolatın Tanımlanması

En yüksek sistein üretim potansiyeli gözlemlenen EM 5.8.1 kodlu izolatın öncelikli olarak konvansiyonel yöntemler ile koloni morfolojisi incelenip ışık mikroskopu altında gram boyaması yapılarak hücre yapısı analiz edilmiştir. İlgili izolatın koloni yapısına bakıldığında; filamentli yapıda, R (Rough) tipi vizkos şekilli koloniler oluşturduğu gözlemlenmektedir. İzolatın ışık mikroskopu altında gram boyaması ile hücre yapısı incelendiğinde ise gram pozitif, çubuk şeklinde ve endosporlu hücrelerden oluştuğu gözlemlenmektedir. İlgili izolatın moleküler olarak tanımlanmasında karşılaştırmalı DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Karşılaştırmalı DNA dizi analizi için Bölüm 2.2.3.2 de anlatıldığı üzere izole edilen ve saflaştırılan 16S rRNA gen bölgesi sekanslanmıştır. Sekanslama sonunda elde edilen 730 bazlık bölgenin kromotogramı (Ek-4A) BLAST kullanılarak NCBI gen

bankasındaki verilerle kıyaslanmıştır (Tablo 3.6). Elde ettiğimiz gen bölgesinin gen bankasındaki veriler ile kıyasladığımızda (Ek-5A) elimizdeki mikroorganizmanın *Bacillus* sp. olduğu ve genbankasında bu mikroorganizmaya en yakın suşun 724/270 eşleşen nükleotid benzerliği ve %99.18 benzerlik yüzdesiyle *Bacillus toyonensis* (KP326368.1) olduğu tespit edilmiştir. %100 benzerlik bulunamaması nedeniyle tanımlanan bu tür, *Bacillus* sp. strain CG1 olarak adlandırılmıştır.

Tablo 3.6. TI.5.8.1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Gen Dizilimine NCBI Gen Bankasında Karşılık Gelen Türler

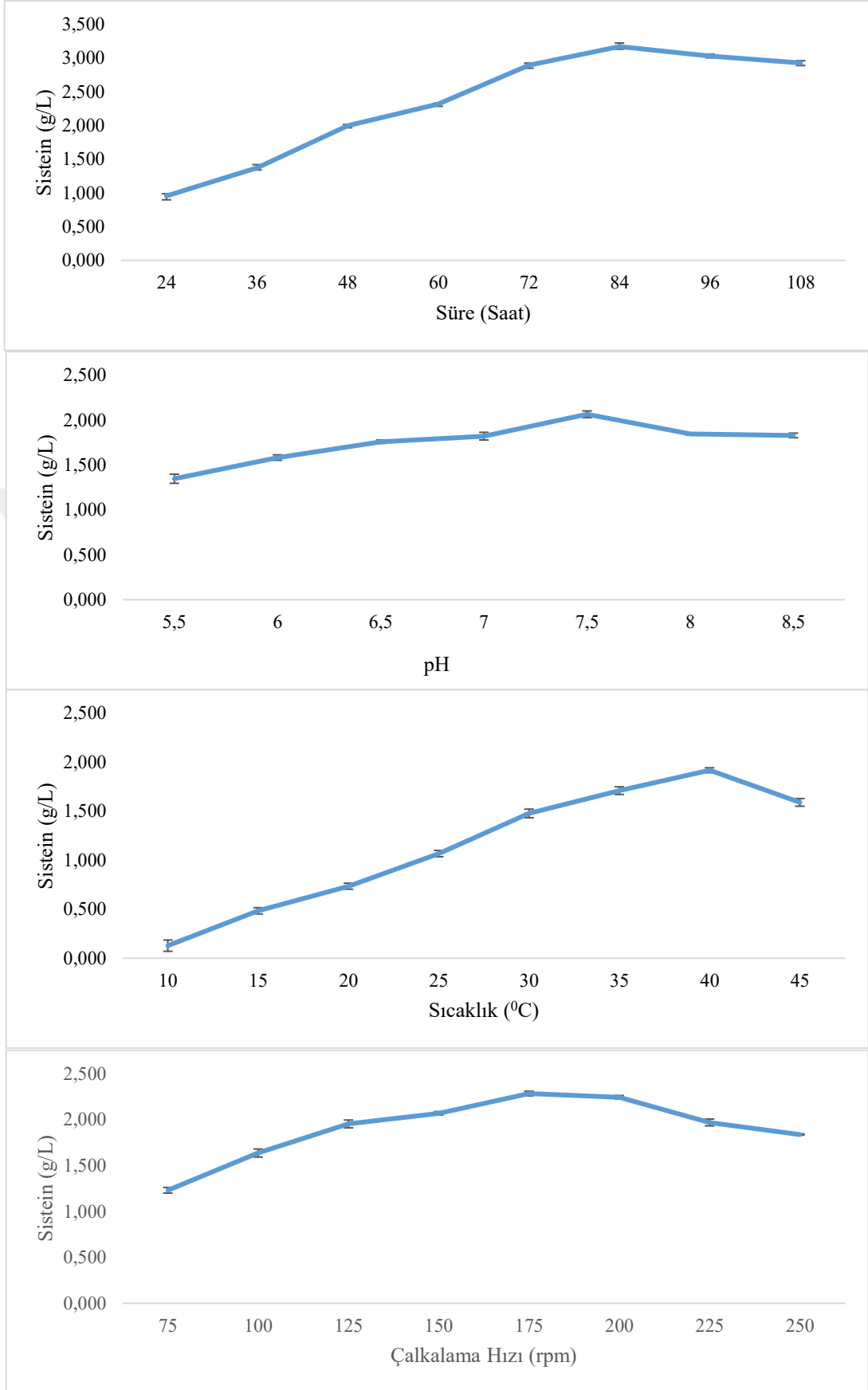
Benzerlik Gösteren Tür ve Cins İsmi	Benzer Mikroorganizma Kodu	Benzerlik Yüzdesi	Eşleşen Nükleotid Sayısı	NCBI BLAST Benzerlik Skoru
<i>Bacillus toyonensis</i>	KP326368.1	99%	724/730	1312 bits (710)
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	MT573519.1	99%	723/730	1306 bits (707)
<i>Bacillus mycooides</i>	MT478147.1	99%	723/730	1306 bits (707)
<i>Bacillus anthracis</i>	MN329991.1	99%	723/730	1306 bits (707)
<i>Bacillus cereus</i>	MK285635.1	99%	723/730	1306 bits (707)
<i>Bacillus subtilis</i>	MH422001.1	99%	723/730	1306 bits (707)
<i>Bacillus samanii</i>	KJ590517.1	99%	723/730	1306 bits (707)

Literatürde ise bizim sonuçlarımıza benzer olarak Dhillon vd., (1986), topraktan izole ettiği *Bacillus sphaericus*'den; Shakoori vd., (2012), Atık su, gıda and toprak örneklerinden izole ettiği *Bacillus* türlerinden ve Şimşek (2019) çeşitli gıda, toprak ve ağaç numunelerinden izole ettiği *Bacillus pumilus*'dan yüksek oranda sistein üretimi gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

3.2.3. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisi

3.2.3.1. İnkübasyon Koşullarının Sistein Üretimine Etkisi

Bacillus sp. strain CG1'in hangi çevre şartlarında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek adına 4 temel çevresel proses şartı olan pH, sıcaklık, zaman ve çalkalama süresinin farklı varyasyonları ile TSB ortamında yapılan inkübasyon sonundan üretilen sistein miktarları Şekil 3.1'deki gibidir. Proses parametreleri etkileşimlerinin sistein üretimine etkilerini gösteren yüzey grafikleri ise Şekil 3.2'deki gibidir.



Şekil 3.1. *Bacillus sp. strain CG1* İçin Proses Parametrelerinin Sistain Üretimine Etkisi

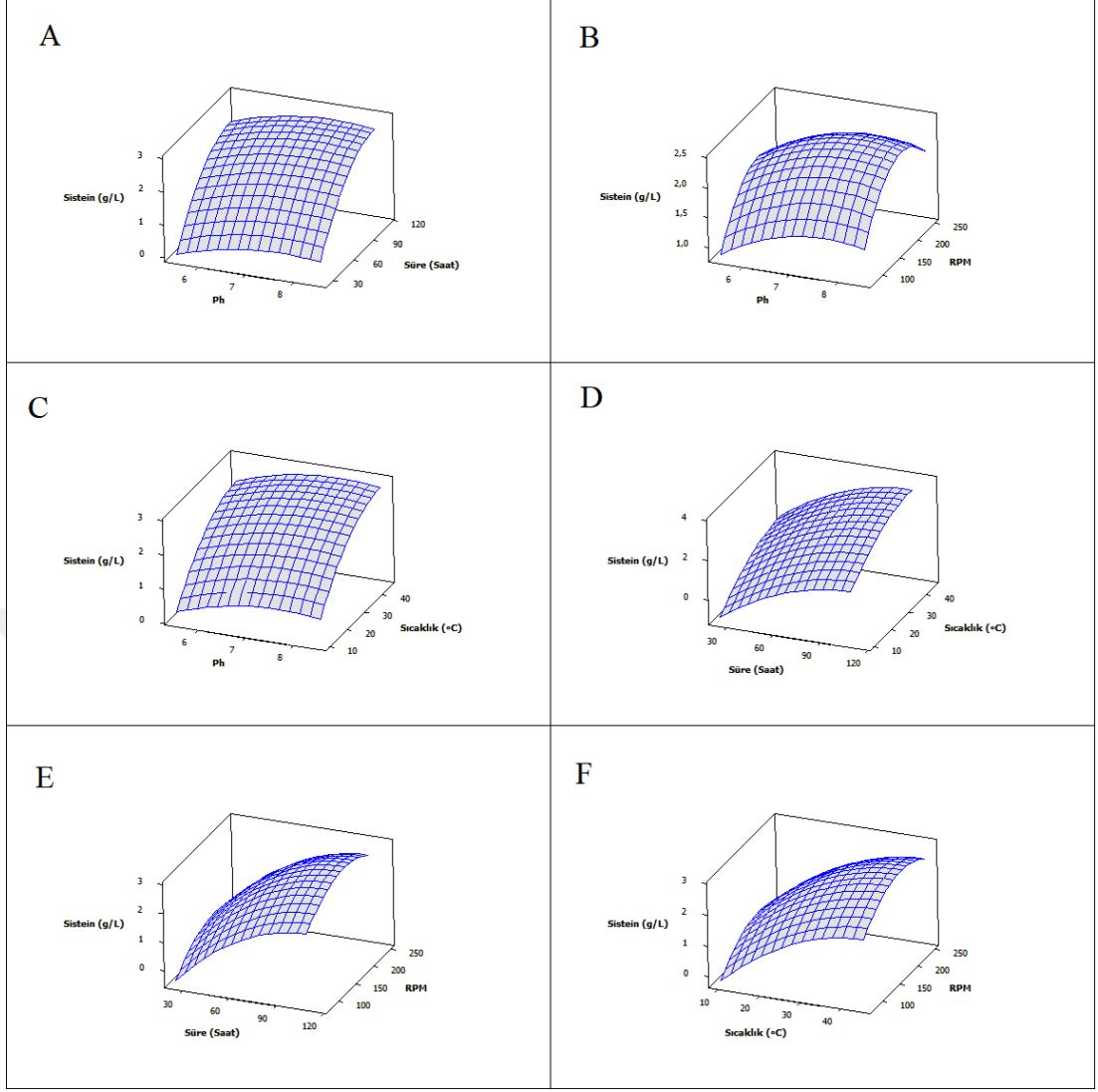
(Sabit Parametreler: pH 7.5, Sıcaklık 37.5, Çalkalama Hızı: 125 rpm, Süre 48 saat)

İnkübasyon süresi mikroorganizmaların gıda katkı maddesi sentezini en çok etkileyen parametre olarak gözce çarpılmaktadır. *Bacillus* sp. strain CG1'in sabit koşullarda (pH:7,5, sıcaklık: 37,5 °C, çalkalama hızı: 125 rpm ve TSB referans besiyeri içerisinde) farklı inkübasyon sürelerinde sistein üretimi sırası ile 24 saatte 0,955±0,003 g/L, 36 saatte 1,372±0,005 g/L, 48 saatte 1,996±0,002 g/L, 60 saatte 2,316±0,001 g/L, 72 saatte 2,891±0,003 g/L, 84 saatte 3,047±0,005 g/L, 96 saatte 3,027±0,003 g/L ve son olarak 108 saatte 2,927±0,003 g/L olarak tespit edilmiştir. Verilere bakıldığında 84. saatin sonunda 3,047±0,005 g/L ile maksimum sistein üretimi izlenmişken daha sonra üretimin düştüğü gözlemlenmiştir.

Mikroorganizmaların gıda sistein sentezinde besin ortamının pH'ı ve inkübasyon ortamının sıcaklığı oldukça önemli diğer parametrelerdir. Her mikroorganizma belirli bir pH aralığında optimum gelişme ve ürün sentezi göstermektedir. *Bacillus* sp. strain CG1'in sistein üretimine, sabit koşullarda (Sıcaklık: 37,5 °C, Çalkalama Hızı: 125 rpm, İnkübasyon süresi: 48 Saat ve TSB referans besiyeri içerisinde) pH'ın etkisi 5,5-8,5 aralığında incelenmiştir. Verilere bakıldığında izolatın, pH 6.5 altında düşük sistein üretimi gösterdiği, pH 6.5-8.5 aralığında ise yüksek sistein üretimi gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolat için en yüksek sistein üretimi pH 7,5'te 2,063±0,004 g/L olarak tespit edilmiştir.

Bacillus sp. strain CG1'in sistein üretimine, sabit koşullarda (Çalkalama Hızı: 125 rpm, pH: 7,5, İnkübasyon süresi: 48 Saat ve TSB referans besiyeri içerisinde), sıcaklığın etkisi ise 10-45 °C aralığında incelenmiş ve 25 °C altında ortalamasının altında sistein üretimi gösterdiği, pH 25-45 °C aralığında ise daha yüksek sistein üretimi gösterdiği belirlenmiştir. İlgili izolatın için en yüksek sistein üretimi 40 °C'de 1,917±0,003 g/L olarak tespit edilmiştir.

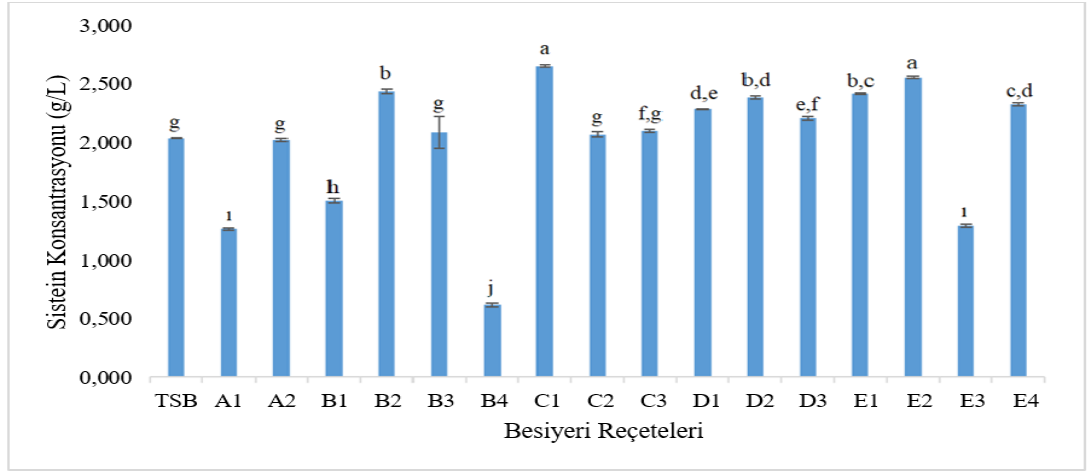
İnkübasyon koşullarında bir başka incelediğimiz parametre ise inkübasyon sırasında kullanılan çalkalama hızıdır. *Bacillus* sp. strain CG1'in sistein üretimine, sabit koşullarda (pH: 7,5, sıcaklık: 125 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat ve TSB referans besiyeri içerisinde) inkübasyon çalkalama hızının etkisi ise 75-250 rpm aralığında incelenmiş ve 100 rpm'in altında düşük seviyelerde sistein üretimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu izolat için en yüksek sistein üretimi 175 rpm'de gözlenmiş olup bu değerde üretim miktarı ise 2,282±0,003 g/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Bacillus sp. strain CG1 İçin Proses Parametreleri Etkileşimlerinin Sistein Üretimine Etkilerini Gösteren Yüzey Grafikleri; A: pH-Süre, B: pH-rpm, C: pH-Sıcaklık, D: Sıcaklık-, E: rpm-Süre ve F:Sıcaklık-Rpm etkileşimi (Sabit Parametreler: pH 7.5, Sıcaklık 37.5, Çalkalama Hızı:125 rpm, Süre 48 saat)

3.2.3.2. Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisi

Bacillus sp. strain CG1'in hangi besiyeri ortamında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek adına farklı karbonhidrat, azot, aminoasit ve minerallerin üretime etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Tryptic Soy Broth referans alınarak belirlenen reçete içerikleri ile hazırlanan 100 mL sıvı besiyerine 1 mL mikroorganizma aşılarak pH 7,5 de, 37,5 °C de, 125 rpm'de 48 saat süre inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında üretilen sistein miktarı spektrofotometre ile tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Bacillus sp. strain CG1 İçin Tablo 2.4'te Belirtilen Besiyeri İçeriklerinin Sistein Üretimine Etkisi [Farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir ($p < 0,05$)]

Yapılan çalışmada karbonhidratların sistein üretimine etkisini incelemek için standart TSB içerisine sırası ile 2,5 g/L glikoz, früktoz ve laktoz eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 3 farklı karbonhidratın da sistein üretimini arttırdığı izlenirken %30 luk artış ile en yüksek artışı glikoz yaparken, %3 lük artışla früktoz glikoz takip etmiştir. Bir disakkarit olan laktoz ise sistein üretimine % 1 lik artış sağlamıştır. Ayrıca methionin ve serin gibi amino asit kaynaklarından da besi ortamına 2 g/L ekleyerek sistein üretimine etkisi incelenmiş, methionin'in sistein üretimini baskılayarak üretimi %38 oranda düşürdüğü, serinin ise sistein üretime çok fazla etki etmeyip üretimde sadece %8 oranda küçük bir düşüşe sebep olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada azot kaynağı olarak besiyerine; üre, hayvansal pepton, kazein peptonu ve soya peptonu, yeast extract, beef extract ve malt extract eklenerek sistein üretimine olan etkileri incelenmiştir. Besiyeri ortamına 8 g/L Üre eklendiğinde sistein üretiminin ciddi oranda baskılandığı, üretimin %70 oranda düştüğü gözlemlenmiştir. Besiyeri ortamına 3 g/L hayvansal pepton eklendiğinde %20'lük artış izlenirken, 3 g/L kazein peptonu eklendiğinde sadece %2 gibi kayda değer olmayan bir artış, 3 g/L soya peptonu eklendiğinde ise üretimin baskılandığı ve % 26 lik oranda sistein üretiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca besiyeri ortamına 1 g/L beef, malt ve yeast extract eklenerek sistein üretimine etkisini incelenmiş ve bu üç tür besi içeriğinin de sistein üretimini artırdığını; bitki kaynaklı malt ekstratı sistein

üretimini %17 arttırırken, hayvansal kaynaklı et ekstratı %12, mikroorganizma kaynaklı maya ekstratı da sistein üretimini % 8 oranında arttırdığı gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmada minerallerin sistein üretimine etkisini incelemek için ise besiyeri ortamına monopotasyum fosfat, dipotasyum fosfat, demir sülfat ve magnezyum sülfat eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda yapılan analizde besiyeri ortamına 0,25 g/L Demir Sülfat eklemenin sistein üretimini %25 oranında arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 0,5 g/L monopotasyum fosfat ilavesinin sistein üretimini %18 oranda; 2,5 g/L dipotasyum fosfat ilavesinin ise üretimi %14 oranda arttırdığı tespit edilmiştir. Fakat besiyeri ortamına eklenen 0,25 g/L magnezyum sülfatın sistein üretimini baskıladığı ve üretimi %36 oranda düşürdüğü tespit edilmiştir.

3.2.3.3. *Optimum İnkübasyon Koşullarında Üretilen Sistein Miktarının Tespiti*

Bacillus sp. strain CG'in proses optimizasyonu verilere bakıldığında; pH 7,5 de, 40 °C sıcaklıkta, 175 rpm'de, 84 saat süre ile inkübe edildiğinde maksimum sistein üretimi yaptığı saptanmıştır. Bu veriler kullanılarak 100 mL TSB içerisinde 5 tekrarlı olarak yaptığımız validasyon çalışması sonucunda izolatın ortalama 3,10±0,21 g/L sistein üretebildiği tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. strain CG1'in besiyeri içeriklerine göre sistein üretim verilerine bakıldığında ise; 5g/L glikoz, 3 g/L hayvansal pepton, 17 g/L kazein peptonu, 1 g/L malt ekstratı, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L dipotasyum fosfat, 0,5 g/L monopotasyum fosfat ve 0,25 g/L demir sülfat optimum besiyeri içeri olarak tespit edilmiştir. Bu optimum besiyer içeriği ile ve optimum proses koşulları olan pH 7,5 de, 40 °C sıcaklıkta, 175 rpm'de, 84 saat süre parametreleri ile 5 tekrarlı olarak yaptığımız validasyon çalışmasında izolatın ortalama 4,24±0,47 g/L sistein üretebildiği tespit edilmiştir (Tablo 3.7).

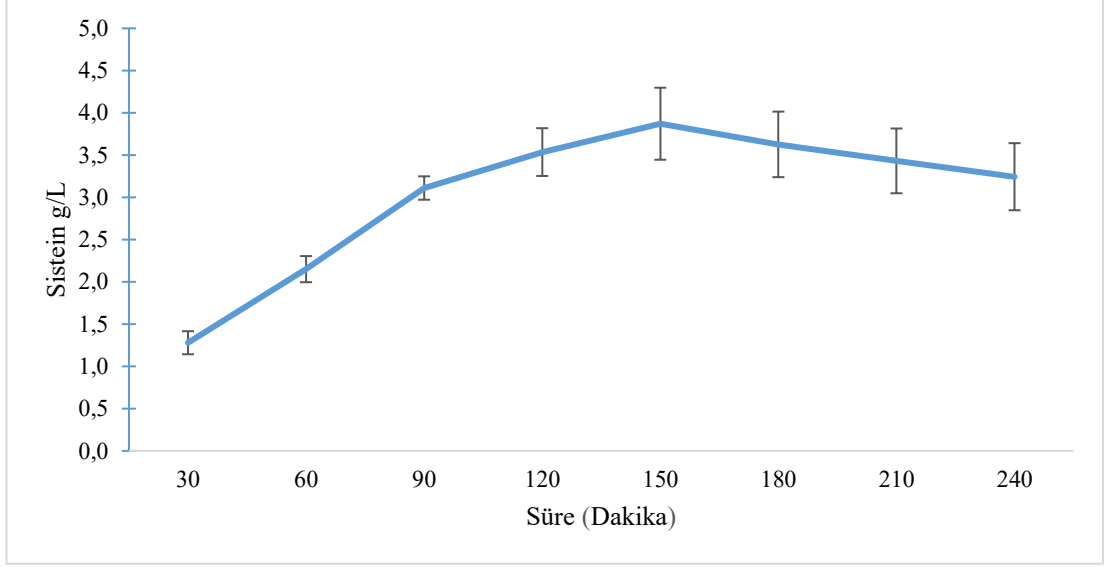
Tablo 3.7. Besiyeri ve Proses Optimizasyonunun Sistein Üretimine Etkisi

Besiyeri İçeriği	Proses Koşulları	Üretilen Sistein Miktarı (g/L)
Tryptic Soy Broth	Standart Proses Koşulları	1,87±0,37
Tryptic Soy Broth	Optimize Edilmiş Proses Koşulları	3,10±0,21
Optimize Edilmiş Besiyeri İçeriği	Optimize Edilmiş Proses Koşulları	4,24±0,47

Literatürde bakıldığında bizim çalışmamıza benzer olarak Ali vd. (2011), toprak, su, bal, süt ve atık gibi kaynaklardan su izole ettikleri mikroorganizmalardan besiyeri ve proses optimizasyonu neticesinde 8,76 g/L sistein üretimi sağlamışlardır. Shakoori vd., (2012) ise, atık su, gıda ve toprak örneklerinden elde ettikleri mikroorganizmaların besiyeri ve proses optimizasyonu sonunda maksimum 13,2 g/L sistein üretimi sağlamışlardır. Bunların dışında Takumi vd., (2017), *Pantoea ananatis* kullanarak optimize edilmiş glikoz ve tiyosülfat bazlı besi ortamında yaptığı inkübasyon sonunda 2,2 g/L sistein elde etmişlerdir. Bu kapsamda yaptığımız çalışmada, besiyeri ve proses optimizasyonu sonucunda elde edilen 4,24 g/L sistein üretim değerinin literatürde rapor edilen değerler ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır.

3.2.4. Besiyeri Ortamında Üretilen Sisteinin Geri Kazanımı

Mikrobiyal yöntemler ile besiyeri ortamında üretilen sisteinin ayrıştırılarak geri kazanımında iyon değiştirici reçine ile ayırma metodu kullanılmıştır. Bu amaçla sisteinin ayrıştırılmasında Dowex 50W x 8 reçine kullanılmıştır. Reçinenin şartlandırılması aşamasında, farklı miktarlarda reçine alınarak dilüsyon işlemine hazır hale gelmiştir. Devamında, inkübasyon sonrası santrifüj edilip, 45 µm filtreden geçirilerek büyük hücre bileşenlerinden ayrılan ve içinde 4,24±0,47 g/L sistein bulunduğu spektrofotometrik yöntemler ile tespit edilen 500 mL sıvı besiyerinin pH'sı 8.0'e ayarlanarak reçinenin bulunduğu erlene konmuştur. Süreye bağlı olarak reçineye bağlanan sistein miktarını tespit edebilmek için için reçine-besiyeri karışımı 42 °C ve 200 rpm'de çalkalamalı inkübatöre bırakılmış ve 30 dakikalık aralıklar ile numune alınarak UV spektrofotometrede 365 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Süreye bağlı reçineye bağlanan sistein miktarı Şekil 3.4'teki gibidir.



Şekil 3.4. Süreye Bağlı Reçineye Bağlanan Sistein Miktarı

Maksimum absorbansın tespit edildiği 150. dakikanın sonunda ise erlenin içinden sisteini absorbe etmiş olan reçine süzülüp, üzerine 500 mL 1N HCl eklenerek 30 °C ve 200 rpm’de çalkalamalı inkübatör içerisinde sisteinlerin reçinelerden ayrılması sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda elüsyon sıvısı süzülerek reçineden ayrılmış ve pH’sı sisteinin izoelektrik noktası olan 5,0’ye ayarlanarak kristalize olması için su banyosuna konulmuştur. Sonrasında 60 °C’lik su banyosunda solvent uçurulmuş ve beherin alt kısmında kristal formda bulunan sistein kazınarak ayrılmıştır. Sisteinin besiyeri ortamında ayrıştırılarak geri kazanım verileri Tablo 3.8’de belirtilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda % 64,26 geri kazanım verimi elde edilmiştir. Literatüre bakıldığında Wang vd., (2015) bu çalışmaya benzer olarak 6 farklı reçine çeşidi ile sistein ayrıştırması yapmış ve bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak %42 ile %73 aralığında geri kazanım verimliliği elde etmiştir.

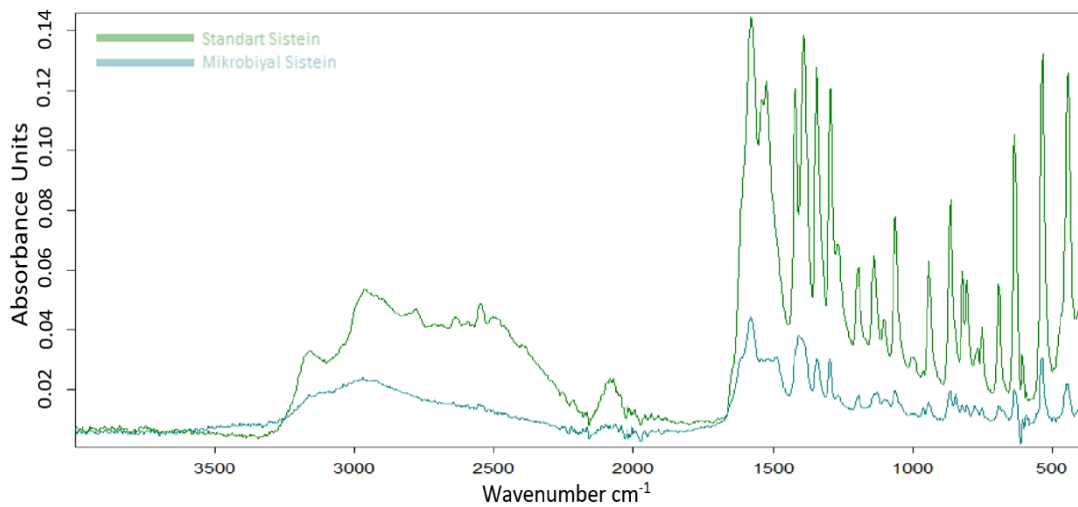
Tablo 3.8. Sistein Geri Kazanım Verileri

Fermentasyon sıvısı içerisinde ölçülen sistein miktarı:	4,24±0,47 g/L
Reçineye bağlanan sistein miktarı:	3,87±0,43 g/L
Elüsyon sıvısında ölçülen sistein miktarı:	3,39±0,36 g/L
Kristal yapıda elde edilen sistein miktarı:	2,72±0,28 g/L
Geri kazanım verimi:	%64,26±4,08

3.2.5. Elde Edilen Sisteyin Karakterizasyonu

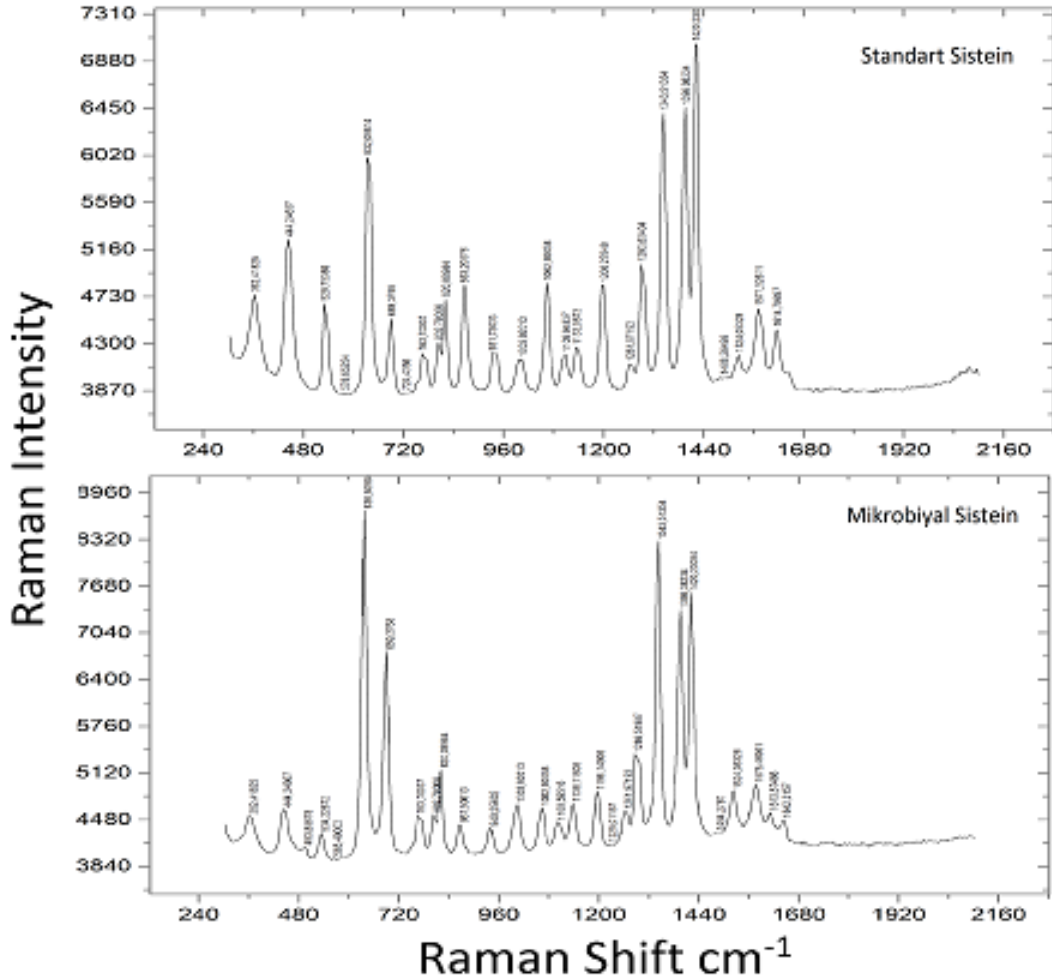
Yapılan çalışmada mikroorganizmalar tarafından üretilip besiyeri ortamından geri kazanım yolu ile elde edilen sisteyin kimyasal yapısını inceliyip standart saf sisteyin ile kıyaslayarak nicel tayin yapmak amacıyla birbirini tamamlayan iki FTIR ve Raman spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiş; aynı zamanda bu iki yöntem hassas bir kromatografi yöntemi olan LC-MSMS ile nicel olarak da doğrulanmıştır.

Saf standart sisteyin ile mikrobiyal sisteyine ait kızılötesi spektrumları Şekil 3.5'te gösterilmektedir. Saf standarta ait spektrumlar 2968, 2552, 2068, 1581, 1488, 1405, 1344, 1296, 1195, 1128, 1062, 1004, 964, 941, 867, 846, 823, 808, 777, 752, 692, 636, 594, 555, 538, 495 ve 445 cm^{-1} olarak tespit edilmiş olup bu veriler literatürdeki verilerle de örtüşmektedir (Seong, Jongsung ve Ankireddy., 2015). Sisteyine ait kızılötesi spektrumlarında tespit edilen ve 2800-2400 cm^{-1} bant aralığı sisteyin molekülünün parmak izi (iskelet titreşimi) bölgesini ifade eder. Bu bölgede tespit edilen 636 cm^{-1} 'deki pik değeri bu bölgede S-H bağının bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca 1968 cm^{-1} 'deki yüksek pik değeri ise yine sisteyin yapısında bulunan amin gurubundaki N-H bağını, ve 1128 cm^{-1} 'deki pik değeri de N-C bağını ifade etmektedir. Yine karboksil gurubunda bulunan C = O çift-bağ gerilme bölgesi, 1581 cm^{-1} bandında görülmektedir (Thangakani vd., 2015). Mikrobiyal sisteyine ait kızılötesi spektrumları incelediğimizde standart sisteyinden farklı olarak geri kazanımı sırasında besiyerinden gelen safsızların neden olduğu 3160 cm^{-1} 'de ve 2800-2400 cm^{-1} bant aralığında yer alan hidrojen bağı bölgesinde spektrumlar da tespit edilmiştir.



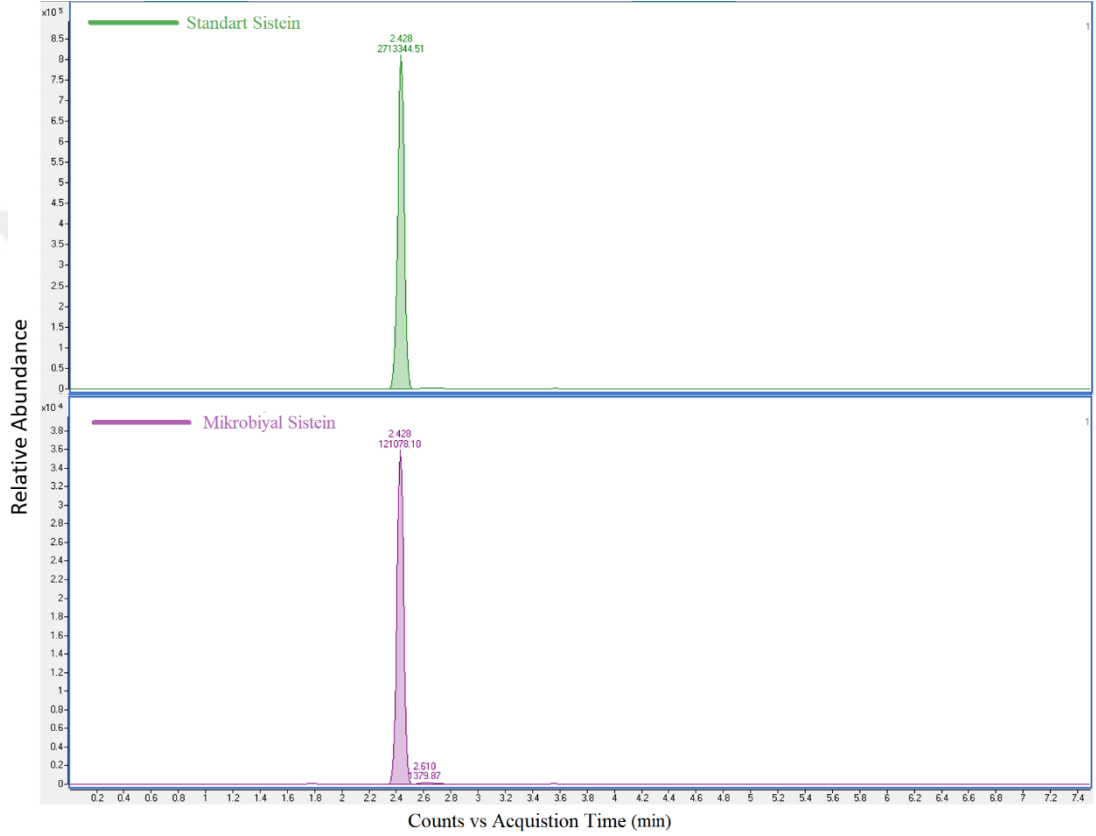
Şekil 3.5. Mikrobiyal ve Standart Sisteyine ait FTIR Spektrumları

Mikrobiyal sistein ile standart sisteine ait Raman spektrumları Şekil 3.6’de gösterildiği gibidir. Standart sistenin Raman analizinde elde edilen 445, 529, 632, 689, 763, 820, 863, 931, 1003, 1062, 1200, 1290, 1343, 1396, 1420 cm^{-1} bantları sistein yapısındaki mevcut kimyasal gruplara ait karakteristik raman kaymalarını göstermekte olup bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile de örtüşmektedir (Parker, 2013). Bu pikler arasında 940 cm^{-1} ’de elde edilen pik diğer pek çok aminoasitten farklı olarak moleküler yapısında kükürt bulunan sisteine S-H bant titreşimine aittir. Bunun yanı sıra 1003 cm^{-1} elde edilen pik ise bu S-H ile NH_3 bağları arasındaki etkileşime ait piki ifade etmekte olup; bu pikler mikrobiyal üretim sisteinde de mevcuttur (Pawlukojć vd., 2005). Fakat mikrobiyal sisteinde bulunup standart sisteinde yer almayan 493, 1225 ve 1642 cm^{-1} gibi safsızlıkların neden olduğuk küçük küçük şiddetli bantların da varlığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.6. Mikrobiyal ve Standart Sisteine ait Raman Spektrumları

Elde edilen FTIR ve Raman analiz sonuçlarını kromatografik bir yöntemle nicel olarak doğrulamak amacı ile LC-MS/MS kullanılmıştır. Besiyeri ortamından geri kazanım yolu ile elde edilen sisteine ait kromotogram Şekil 3.7'deki gibidir. Mikroorganizmalardan elde edilen sisteim numunesine ait LC-MS/MS kromotogramı incelendiğinde sisteine ait pik baskın ve net bir şekilde görülmekte beraber bu pikin yanı sıra sisteinin besiyeri ortamından ayrıştırılması sürecinde gelen safsızlığın neden olduğu bir başka küçük şiddetli pikin varlığında gözlemlenmiştir.



Şekil 3.7. Mikrobiyal ve Standart Sisteine ait LC-MS/MS Spektrumları

FTIR, Raman ve LC-MS/MS analizlerinden elde edilen veriler incelendiğinde bu çalışmada elde edilen mikrobiyal sistein numunesi ile sisteinin standardının analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde elde edilen verilerin literatürdeki rapor edilen veriler ile örtüştüğü gözlemlenmiştir (Çelik, 2009; Parker, 2013; Seong, Jongsung ve Ankireddy., 2015; Karakaplan 2019).

3.3 Mikrobiyal Glutamik Asit Üretimi

3.3.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Glutamik Asitin Analizi

Türkiyenin 7 farklı bölgesinden elde edilen 9 gıda ve 37 toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların TSB besiyerinde inkübasyonu neticesinde elde edilen glutamik asit miktarları Ek-3B’de belirtildiği gibidir. Toprak numunelerinden elde edilen izolatların glutamik asit üretim miktarı ortalaması $0,848\pm 0,167$ g/L iken, gıda numunelerinden elde edilen izolatların glutamik asit üretim miktarı ortalaması $0,921\pm 0,165$ g/L olarak izlenmiştir. Ancak en yüksek glutamik asit üretimi yapan 5 izolatta toprak numunelerinden elde edilmiş olup bunlar arasında ilk sırada $1,426\pm 0,020$ g/L ile Karadeniz bölgesinde, çay bahçesinden alınan toprak numunesinden izole edilen TK.1.4.1 kodlu izolat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca $1,286\pm 0,006$ g/L glutamik asit üretim ortalaması ile Karadeniz bölgesinde tarım alanından alınan toprak numunesinden izole edilen TK.3.1.1 kodlu izolatta, $1,196\pm 0,021$ g/L ile yine aynı bölgede fındık bahçesinden izole edilen TK.2.5.1 kodlu izolatta ve $1,150\pm 0,022$ g/L ile aynı bölgede yol kenarı otlak alandan alınan topraktan izole edilen TK.4.2.1 kodlu izolatta da yüksek oranda glutamik asit üretimi gözlemlenmiştir. Karadeniz bölgesi dışında, $1,189\pm 0,045$ g/L ile İç Anadolu bölgesinde, dağ eteğinden alınan toprak numunesinden izole edilen TI.3.2.1 kodlu izolat en yüksek glutamik asit üretimi izlenen 5 izolattan biri olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 3.9. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Glutamik Asit Üretim Ortalamaları

Numune Kodu	Örnek Türü	İzolat Sayısı	İzolatların Glutamik Asit Üretim Ortalaması (g/L)
G.2	Tereyağı	4	$0,74\pm 0,17^d$
G.3	Antep Peyniri	2	$0,98\pm 0,07^b$
G.4	Yörük Peyniri	2	$0,83\pm 0,03^c$
G.5	Örgü Peyniri	2	$1,0240,02^b$
G.6	Otlu Peynir	2	$0,74\pm 0,18^d$
G.7	İzmir Tulumu	2	$0,99\pm 0,07^b$
G.8	Eski Kaşar	2	$1,01\pm 0,17^b$
G.9	Mihalic Peyniri	2	$1,03\pm 0,03^b$
G.1	Elâzığ Tulumu	2	$1,11\pm 0,04^a$

Aynı sütündeki farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir ($p<0,05$)

Tablo 3.10. Topraktan Elde Edilen İzolatların Bölgelere Göre Glutamik Asit Üretim Ortalamaları

Örnek Alınan Bölge	Numune Kodu	Örnek Türü	İzolat Sayısı	Örnekten Elde Edilen İzolatların Glutamik Asit Üretim Ortalaması (g/L)	Bölgeden Elde Edilen İzolatların Glutamik Asit Üretim Ortalaması (g/L)
Doğu Anadolu Bölgesi	TD.1	Bahçe Toprağı	6	0,91±0,16 ^{ad}	0,79±0,15 ^{ab}
	TD.2	Yayla Toprağı	3	0,71±0,08 ^{ad}	
	TD.3	Çimlik Alan Toprağı	3	0,77±0,09 ^{ad}	
	TD.4	Dağ Eteği Toprağı	3	0,91±0,42 ^{ad}	
	TD.5	Mera Toprağı	4	0,74±0,16 ^{ad}	
	TD.6	Dağlık Arazi Toprağı	6	0,69±0,12 ^{bd}	
İç Anadolu Bölgesi	TI.1	Bahçe Toprağı	5	0,89±0,05 ^{ad}	0,92±0,11 ^a
	TI.2	Mera Toprağı	7	0,90±0,10 ^{ad}	
	TI.3	Dağ Eteği Toprağı	4	0,99±0,16 ^{ac}	
	TI.4	Ağaçlık Alan Toprağı	6	0,94±0,14 ^{ac}	
	TI.5	Tarım Arazisi Toprağı	6	0,90±0,12 ^{ad}	
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	TG.1	Üzüm Bağı Toprağı	6	0,79±0,167 ^{ad}	0,83±0,13 ^{ab}
	TG.2	Fıstık Bahçesi Toprağı	5	0,85±0,07 ^{ad}	
	TG.3	Bahçe Toprağı	4	0,89±0,14 ^{ad}	
Karadeniz Bölgesi	TK.1	Çay Bahçesi Toprağı	8	0,95±0,24 ^{ac}	0,96±0,17 ^a
	TK.2	Fındık Bahçesi Toprağı	5	1,03±0,10 ^{ab}	
	TK.3	Mera Toprağı	9	0,98±0,13 ^{ac}	
	TK.4	Yol Kenarı Otlak Toprağı	7	0,94±0,19 ^{ac}	
	TK.5	Fındık Bahçesi Toprağı	5	0,85±0,15 ^{ad}	
Akdeniz Bölgesi	TA.1	Sera Toprağı	7	0,70±0,18 ^{cd}	0,77±0,18 ^b
	TA.2	Kayacı Vadi Toprağı	6	0,83±0,18 ^{ad}	
	TA.3	Sahil Kumu	5	0,82±0,16 ^{ad}	
Marmara Bölgesi	TM.3	Şile Bahçe Toprağı	7	0,85±0,12 ^{ad}	0,85±0,16 ^{ab}
	TM.4	Şile Sahil Kumu	6	1,04±0,08 ^a	
	TM.5	Çamlık Arazi Toprağı	5	0,85±0,04 ^{ad}	
	TM.6	Çimlik Alan Toprağı	7	0,83±0,15 ^{ad}	
	TM.7	Çiçeklik Alan Toprağı	4	0,79±0,41 ^{ad}	
	TM.8	Göl Kenarı Toprağı	2	0,60±0,20 ^{ad}	
	TM.1	Sahil Kumu	7	0,79±0,12 ^{ad}	
	TM.2	Tarım Arazisi Toprağı	3	0,86±0,15 ^{ad}	
Ege Bölgesi	TE.1	Yol Kenarı Otlak Toprağı	7	0,83±0,14 ^{ad}	0,76±0,14 ^b
	TE.2	Çamlık Arazi Toprağı	2	0,90±0,04 ^{ad}	
	TE.3	Tarım Arazisi Toprağı	5	0,78±0,14 ^{ad}	
	TE.4	Bahçe Toprağı	5	0,68±0,07 ^{ad}	
	TE.5	Çimlik Alan Toprağı	4	0,81±0,08 ^{ad}	
	TE.6	Yol Kenarı Otlak Toprağı	2	0,84±0,03 ^{ad}	
	TE.7	Çiçeklik Alan Toprağı	6	0,60±0,15 ^d	

Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir (p<0,05)

Tablo 3.9'ta 9 farklı gıda örneğinden elde edilen edilen izolatların glutamik asit üretim miktarları görülmektedir. Gıda örneklerinden elde edilen bu mikroorganizmaların glutamik asit üretim ortalamaları $0,921 + 0,165$ g/L belirlenmiştir. Gıda numuneleri arasında en yüksek glutamik asit üretim ortalaması $1,106 \pm 0,043$ g/L ile Elâzığ yöresinde üretilen Tulum peynirden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir. $1,029 \pm 0,029$ g/L ortalaması ile Mihaliç peynirinden elde edin izolatlarda, $1,024 + 0,016$ g/L ortalaması ile Adapazarı Örgü Peynirinden elde edilen izolatlarda ve $1,012 + 0,171$ g/L ortalaması ile Kars Eski Kaşarından elde edilen izolatlarda 1g/L üzerinde glutamik asit üretim ortalaması gözlemlenmiştir. $0,995 + 0,073$ g/L ortalaması ile İzmir Tulum Peynirinden elde edilen izolatlar, $0,981 + 0,066$ ortalaması ile Antep Peynirinden elde edilen izolatlar ve $0,830 + 0,027$ g/L ortalaması ile Antalya Yörük peynirinden elde edilen izolatlar; genel gıda örnekleri ortalamasına yakın glutamik asit üretimi göstermiştir. Ancak $0,743 + 0,174$ g/L ortalaması ile Trabzon Tereyağından elde edilen izolatlar ile $0,747 + 0,180$ g/L ortalaması ile Van otlu peynirinden elde edilen izolatlarda diğer gıda numunelerine ait izolatlara oranla daha düşük glutamik asit üretimi izlenmiştir.

Tablo 3.10'da ise Türkiye'nin 7 farklı coğrafi bölgesinden toplanan toprak örneklerinden elde edilen izolatların glutamik asit üretim ortalamaları görülmektedir. Toprak örneklerinden elde edilen bu mikroorganizmaların glutamik asit üretim ortalamaları $0,848 \pm 0,167$ g/L belirlenmiştir. Toprak numuneleri arasında en yüksek glutamik asit üretimi ortalaması $0,957 \pm 0,171$ g/L ile Karadeniz bölgesinden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir. $0,920 \pm 0,114$ g/L ortalaması ile İç Anadolu bölgesinden elde edin izolatlar, Karadeniz bölgesinden sonra en yüksek glutamik asit ortalaması izlenen bölgedir. Bu bölgeleri $0,848 \pm 0,157$ g/L glutamik asit üretim ortalaması ile Marmara bölgesi ve $0,826 \pm 0,128$ g/L glutamik asit üretim ortalaması ile Güneydoğu Anadolu bölgesi takip etmektedir. $0,789 \pm 0,153$ g/L glutamik asit üretim ortalaması ile Doğu Anadolu bölgesinden elde edilen izolatlar, $0,774 \pm 0,178$ g/L glutamik asit üretim ortalaması ile akdeniz bölgesinden elde edilen izolatlar ve $0,757 \pm 0,145$ g/L glutamik asit üretim ortalaması ile Ege bölgesinden elde edilen izolatlar, Türkiye genelinde elde edilen izolatların glutamik asit üretim ortalamalarının altında bir ortalama göstermiştir.

Yapılan Spektrofotometrik analiz sonucunda iyi glutamik asit üretimi yapan TK.1.4.1, TK.3.1.1, TK.2.5.1, TL3.2.1 ve TK.4.2.1 kodlu 5 izolatın üretim verilerini doğrulamak amacı ile validasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla tekrar izolatlar 5 tekrar halinde Shakoori vd. (2012) yılında uyguladığı yöntem ile 100 mL Tryptic Soy Broth içerisinde Ph'ı 7,5'te, 37,5 °C, 125 rpm de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve spektrofotometre ile tekrar naliz edilmiştir. Validasyon için 5 tekrarlı olarak yapılan analizlerin sonucu Tablo 3.11'deki gibidir.

Tablo 3.11. En Yüksek Glutamik Asit Üretimi Gözlemlenen 5 İzolatın Üretim Validasyon Verileri

İzolat Kodu	GT1 (g/L)	GT2 (g/L)	GT3 (g/L)	GT4 (g/L)	GT5 (g/L)	Ortalama
TK.1.4.1	1,36	1,40	1,27	1,34	1,45	1,36±0,07
TK.3.1.1	1,30	1,25	1,30	1,06	1,21	1,22±0,10
TK.2.5.1	1,10	1,14	0,99	1,16	0,90	1,06±0,11
TL3.2.1	0,99	1,25	1,01	0,89	1,32	1,09±0,18
TK.4.2.1	1,28	1,09	0,89	1,25	1,15	1,13±0,16

Tablo 3.11'de görüldüğü üzere validasyon çalışması sonrasında en yüksek sistein üretimi 1,365±0,068 g/L ile Karadeniz bölgesinden izole edilen TK.1.4.1 kodlu izolat olduğu doğrulanmıştır. Yine 1,225±0,098 g/L ile Karadeniz bölgesinden izole edilen TK.3.1.1 kodlu izolatın 2. yüksek glutamik üretimi yapan izolat olduğu doğrulanmıştır. İlk yapılan analizde 1,449±0,007 g/L ile 5. iyi üretim yapan TM.3.7.1 numaralı izolatın ise validasyon amacı ile yapılan yapılan 5 tekrar sonucunda 1,512±0,180 g/L ile 2 en yüksek üretim yapan izolat olduğu anlaşılmıştır. İlk yapılan analizde 1,150±0,022 g/L ile 5. iyi üretim yapan TK.4.2.1 numaralı izolatın ise validasyon amacı ile yapılan 5 tekrar sonucunda 1,132±0,157 g/L ile 3. yüksek üretim yapan izolat olduğu anlaşılmıştır. Aynı şekilde ilk yapılan analizde 1,196±0,021 g/L ile 3. iyi üretim yapan TK.2.5.1 numaralı izolatın ise validasyon amacı ile yapılan 5 tekrar sonucunda 1,057±0,108 g/L ile 5. yüksek üretim yapan izolat olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların literatürde rapor edilen sonuçlar ile benzer olduğu tespit edilmiş olup, bölüm 3.3.3.3'te detaylı bir şekilde mukayese edilmiştir.

3.3.2. En Yüksek Glutamik Asit Üretim Yapan Suşların Tanımlanması

En yüksek glutamik asit üretim potansiyeli gözlenmelenen TK.1.4.1 kodlu izolatın öncelikli olarak konvansiyonel yöntemler ile koloni morfolojisi ve ışık mikroskobu altında gram boyama ile hücre yapısı analiz edilmiştir. İlgili izolatın koloni yapısına bakıldığında düz-dairesel yapıda, S (smooth) tipi koloniler oluşturduğu gözlemlenmektedir. İzolatın gram boyama yöntemi ile hücre yapısı incelendiğinde ise; gram negatif, çomak şeklinde ve sporsuz hücrelerden oluştuğu gözlemlenmiştir. Sekanslama sonunda elde edilen 639 bazlık bölgenin kromotogramı (Ek-4B) BLAST kullanılarak NCBI'gen bankasındaki verilerle kıyaslanmıştır (Tablo 3.12). Elde ettiğimiz gen bölgesini gen bankasındaki veriler ile kıyasladığımızda (Ek-5B) ise elimizdeki mikroorganizmanın *Stenotrophomonas sp.* olduğu ve genbankasında bu mikroorganizmaya en yakın suşların 622/639 eşleşen nükleotid benzerliği ve %97 benzerlik yüzdesiyle *Stenotrophomonas sp.* (MK424600,1) ve olduğu 622/639 eşleşen nükleotid benzerliği ve %97 benzerlik yüzdesiyle *Pseudomonas geniculata* (KP890071.1) olduğu tespit edilmiştir. %100 benzerlik bulunamaması nedeniyle tanımlanan bu tür, *Stenotrophomonas sp.* strain CG2 olarak adlandırılmıştır.

Tablo 3.12. TK.1.4.1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Gen Dizilimine NCBI Gen Bankasında Karşılık Gelen Türler

Benzerlik Gösteren Tür ve Cins İsmi	Benzer Mikroorganizma Kodu	Benzerlik Yüzdesi	Eşleşen Nükleotid Sayısı	NCBI BLAST Benzerlik Skoru
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	MK424600.1	97%	622/639	1079 bits(584)
<i>Pseudomonas geniculata</i>	KP890071.1	97%	622/639	1079 bits(584)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EU934076.1	97%	621/638	1079 bits(583)
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	MT435033.1	97%	621/638	1077 bits(583)

Literatüre baktığımızda, *Stenotrophomonas* suşları ile glutamik üretime yönelik doğrudan yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak TK.1.4.1 ile genetik olarak benzerlik gösteren *Pseudomonas reptilivoranın*, *Corynebacterium glutamicum* ile birlikte kullanılarak gerçekleştirilen glutamik asit inkübasyonu neticesinde, *Corynebacterium glutamicum* tek başına üretebildiği glutamik asite oranla %13 fazla glutamik asit üretimi sağlandığı bildirilmiştir (Shyamkumar vd, 2014).

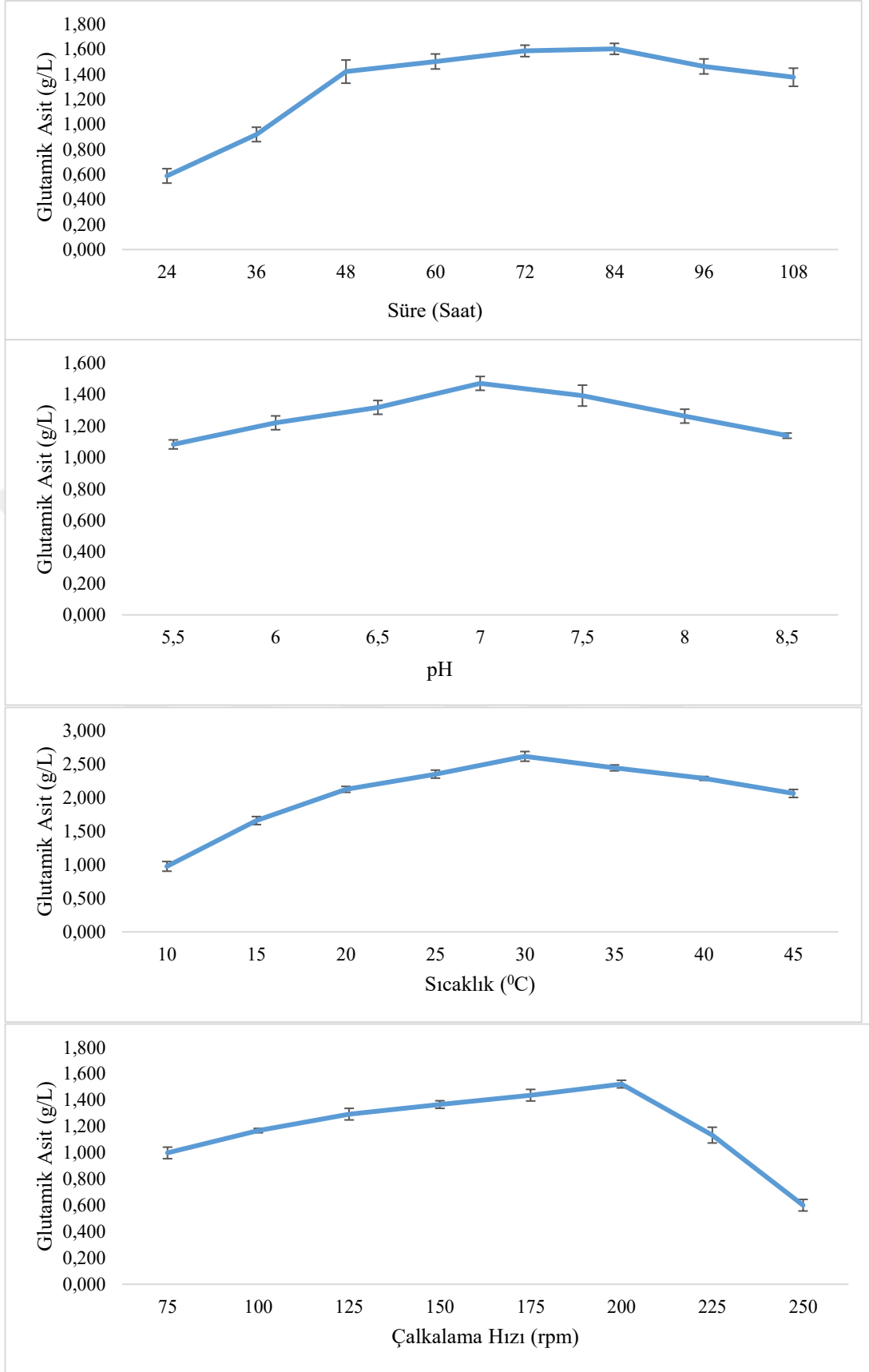
3.3.3. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisi

3.3.3.1. İnkübasyon Koşullarının Glutamik Asit Üretimine Etkisi

Stenotrophomonas sp. strain CG2'nin hangi çevre şartlarında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek adına 4 temel çevresel proses şartı olan pH, sıcaklık, zaman ve çalkalama süresinin farklı varyasyonları ile TSB ortamında yapılan inkübasyon sonundan üretilen glutamik asit miktarları Şekil 3.8'deki gibidir. Proses parametreleri etkileşimlerinin glutamik asit üretimine etkilerini gösteren yüzey grafikleri ise Şekil 3.9'daki gibidir.

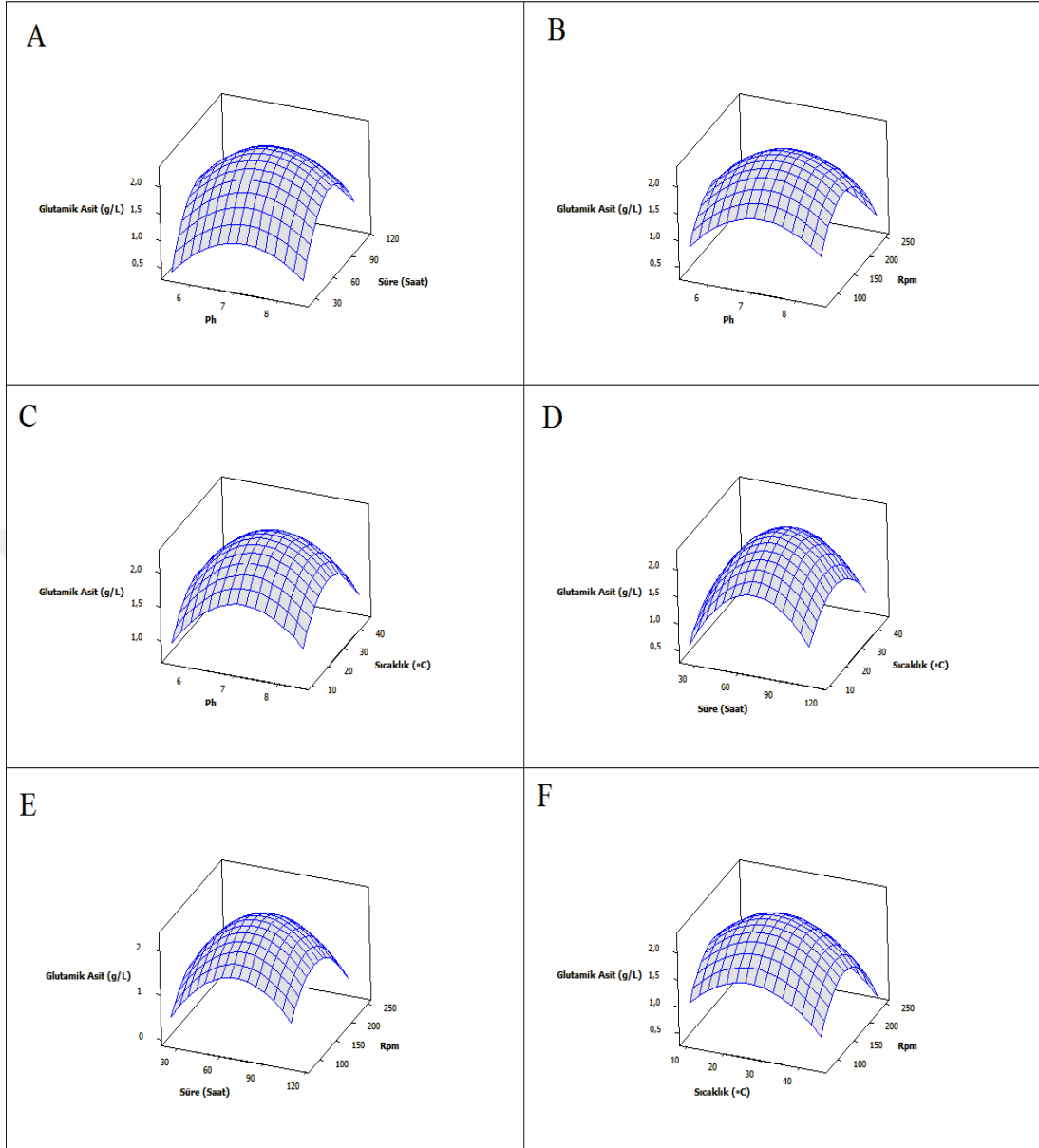
İnkübasyon süresi, *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin glutamik asit sentezini en çok etkileyen parametre olarak gözce çarpmaktadır. İlgili mikroorganizmanın sabit koşullarda (pH:7,5, sıcaklık: 37,5 °C, çalkalama hızı: 125 rpm ve TSB referans besiyeri içerisinde) farklı inkübasyon sürelerinde glutamik asit üretimi sırası ile 24 saatte 0,588±0,006 g/L, 36 saatte 0,920±0,006 g/L, 48 saatte 1,422±0,009 g/L, 60 saatte 1,502±0,006 g/L, 72 saatte 1,603±0,005 g/L, 84 saatte 1,463±0,004 g/L, 96 saatte 1,377±0,006 g/L ve son olarak 108 saatte 1,107±0,007 g/L olarak tespit edilmiştir. *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin glutamik asit üretimine, sabit koşullarda (Sıcaklık: 37,5 °C, çalkalama hızı: 125 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat ve TSB referans besiyeri içerisinde) pH'ın etkisi 5.5-8.5 aralığında incelenmiş ve en yüksek glutamik asit üretimi pH 7'de 1,472±0,004 g/L olarak tespit edilmiştir. Sıcaklığın glutamik asit üretime etkisi ise 10-45°C aralığında incelenmiş ve 20°C altında ortalamanın altında glutamik asit üretimi gösterdiği, pH 25-45 °C aralığında ise daha yüksek oranlarda sistein üretimi gösterdiği belirlenmiştir. İlgili izolat için en yüksek glutamik asit üretimi 30°C'de 2,620±0,007 g/L olarak tespit edilmiştir.

Sıcaklığın glutamik asit üretime etkisi ise 10-45 °C aralığında incelenmiş ve 20 °C altında ortalamanın altında glutamik asit üretimi gösterdiği, pH 25-45 °C aralığında ise daha yüksek oranlarda sistein üretimi gösterdiği belirlenmiştir. *Stenotrophomonas* sp. strain CG2 için en yüksek glutamik asit üretimi 30 °C'de 2,620±0,007 g/L olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon çalkalama hızının ilgili izolat için, sabit koşullarda glutamik asit üretimi üzerine etkisi ise 75-250 rpm aralığında incelenmiştir. Elde edilen veriler 100-225 rpm'in aralığında yüksek glutamik asit üretimi olduğunu göstermiştir. Bu bakteri için en yüksek glutamik asit üretimi 200 rpm'de gözlenmiş olup bu değerde üretim miktarı ise 1,522 ±0,003 g/L olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.8. Stenotrophomonas sp. strain CG2 İçin Proses Glutamik Asit Üretimine Etkisi

(Sabit Parametreler: pH 7.5, Sıcaklık 37.5 °C'de, Çalkalama Hızı:125 rpm, Süre 48 saat)

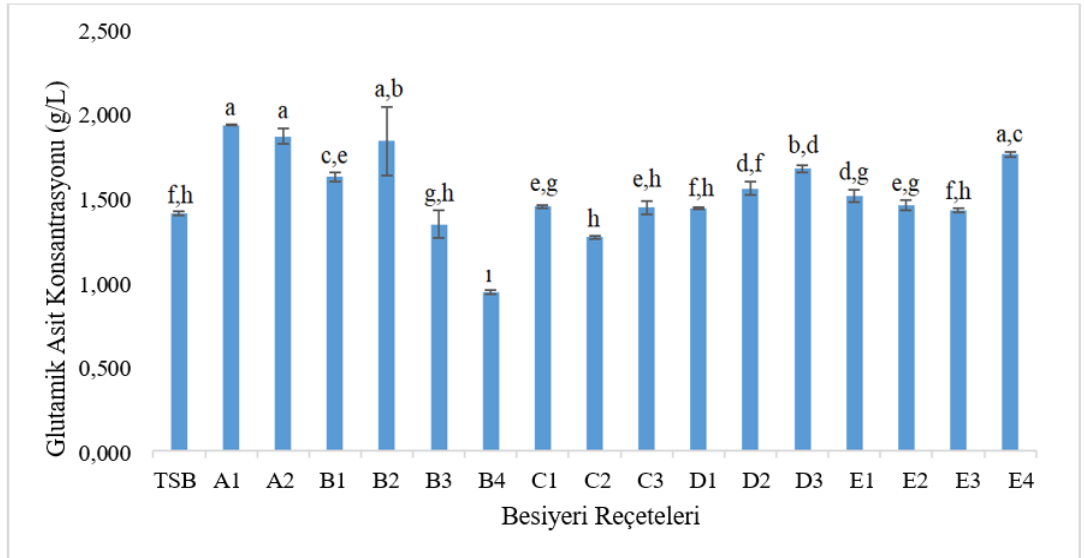


Şekil 3.9. Stenotrophomonas sp. strain CG2 İçin Proses Parametreleri Etkileşimlerinin Glutamik Asit Üretimine Etkilerini Gösteren Yüzey Grafikleri; A: pH-Süre, B: pH-rpm, C: pH-Sıcaklık, D: Sıcaklık-, E:rpm-Süre ve F: Sıcaklık-rpm etkileşimi (Sabit Parametreler: pH 7.5, Sıcaklık 37.5, Çalkalama Hızı:125 rpm, Süre 48 saat)

3.3.3.2. Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisi

En fazla glutamik asit üreten *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin hangi besiyeri ortamında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek adına farklı karbonhidrat, azot, aminoasit ve minerallerin üretime etkileri incelenmiştir. Bu amaçla TSB referans alınarak, belirlenen reçete içerikleri ile hazırlanan 100 mL sıvı besiyerine 1 mL mikroorganizma aşılı olarak pH 7,5 de, 37,5 °C'de, 125 rpm'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında üretilen glutamik asit spektrofotometre yardımıyla tespit edilmiştir (Şekil 3.10).

Yapılan çalışmada karbonhidratların glutamik asit üretimine etkisini incelemek için standart TSB içerisinde sırası ile 2,5 g/L glikoz, früktoz ve laktoz eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 3 farklı karbonhidratın da glutamik üretimini önemli oranda etkilemediği gözlemlenmiştir. Glikoz ve früktoz, glutamik asit sentezinde %2.5'lik gibi ufak bir artış sağlarken laktoz ise glutamik asit üretiminde % 10'luk azalma sağlamıştır. Ayrıca methionin ve serin besi ortamına 2 g/L eklenerek glutamik asit üretimine etkisi incelendiğinde iki aminoasidinde glutamik asit üretimini benzer oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir. Besi ortamına eklenen Metiyonin'in glutamik asit üretimini %37 oranında, Serin'in ise %32 oranda artış sağladığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.10. *Stenotrophomonas* sp. strain CG2 için Tablo 2.4'te Belirtilen Besiyeri İçeriklerinin Glutamik Asit Üretimine Etkisi [Farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistik olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir ($p < 0,05$)]

Yapılan çalışmada azot kaynağı olarak besiyerine üre, hayvansal pepton, kazein peptonu ve soya peptonu, yeast extract, beef extract ve malt extract eklenerek glutamik asit üretimine olan etkileri incelenmiştir. Besiyeri ortamına 8 g/L üre eklenmesinin glutamik asit üretiminin ciddi oranda baskılandığı, üretimin % 33 oranında düşürdüğü gözlemlenmiştir. Besiyeri ortamına 3 g/L hayvansal pepton eklendiğinde % 30'luk belirgin bir artış izlenirken, 3 g/L soya peptonu eklendiğinde de %15'lik bir artış gözlenmiş, 3 g/L kazein peptonu eklendiğinde ise üretimin baskılandığı ve %5'lik oranda glutamik asit üretiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca besiyeri ortamına 1 g/L beef, malt ve yeast extract eklenerek glutamik asit üretimine etkisini incelediğimizde bu üç tür besi içeriğinin de üretimi artırdığını; hayvan kaynaklı beef extractın glutamik asit üretimini sadece %2 gibi önemsiz bir oranda arttırdığını, bitki kaynaklı malt extractın %10 mikroorganizma kaynaklı yeast extractın da glutamik asit üretimini % 18 gibi önemli oranlarda artış sağladığı gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmada minerallerin glutamik asit üretimine etkisini incelemek için ise besiyeri ortamına monopotasyum fosfat, dipotasyum fosfat, demir sülfat ve magnezyum sülfat eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda yapılan analizde besiyeri ortamına 0,25 g/L demir sülfat eklemenin glutamik asit üretimini sadece % 3 gibi ufak bir oranında arttırdığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde besiyeri ortamına eklenen 0,2 g/L magnezyum sülfat glutamik asit üretiminde %1 gibi dikkate alınmayacak kadar küçük bir oranda artışa yaptığı tespit edilmiştir. Ancak 0,5 g/L monopotasyum fosfat ilavesinin glutamik asit üretimini %7, 2,5 g/L dipotasyum fosfat ilavesinin ise üretimi %25 gibi ciddi oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir.

3.3.3.3. Optimum İnkübasyon Koşullarında Üretilen Glutamik Asit Miktarının Tespiti

Stenotrophomonas sp. strain CG2'nin proses optimizasyonu verilerine bakıldığında; pH 7'de, 30 °C sıcaklıkta, 200 rpm'de, 84 saat süre ile inkübe edildiğinde maksimum glutamik asit üretimi yaptığı saptanmıştır. Bu veriler kullanılarak 100 mL TSB içerisinde 5 tekrarlı olarak yaptığımız validasyon çalışmasında izolataın ortalama $2,72 \pm 0,17$ g/L glutamik asit üretebildiği tespit edilmiştir. *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin besiyeri içeriklerine göre glutamik üretim verilerine bakıldığında ise; 2,5 g/L glikoz, 2,5 g/L fruktoz, 3 g/L hayvansal pepton, 6 g/L soya peptonu, 1 g/L maya ekstratı, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L dipotasyum fosfat, 0,5 g/L monopotasyum fosfat, 0,25 g/L demir sülfat, 2 g/L metiyonin ve 2 g/L serin optimum besiyeri içeri olarak

tespit edilmiştir. Bu optimum besiyer içeriği ile optimum proses koşulları olan pH 7’de, 30 °C sıcaklıkta, 200 rpm’de, 84 saat süre parametreleri ile 5 tekrarlı olarak yaptığımız validasyon çalışmasında izolatın ortalama $3,76\pm0,65$ g/L glutamik asit üretilebildiği tespit edilmiştir (Tablo 3.13).

Tablo 3.13. Besiyeri ve Proses Optimizasyonunun Glutamik Asit Üretimine Etkisi

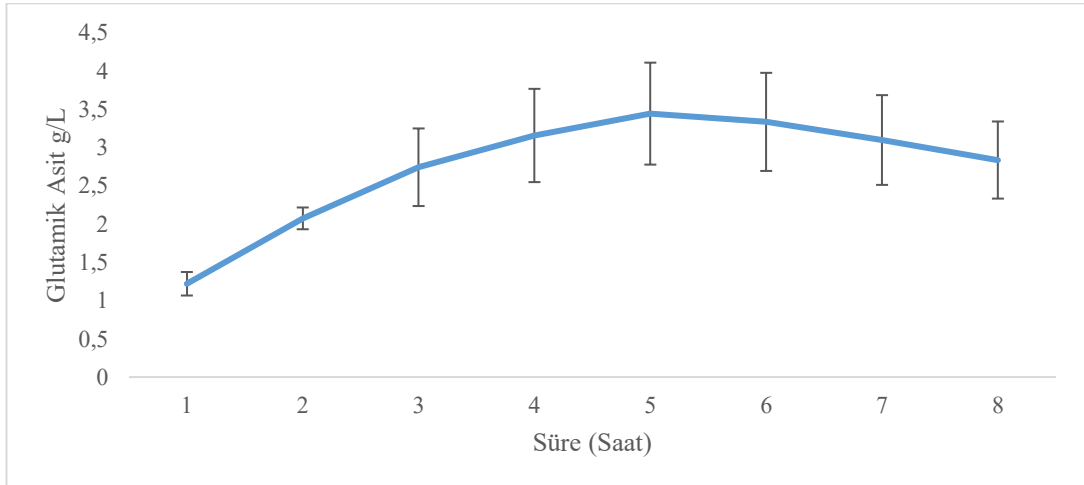
Besiyeri İçeriği	Proses Koşulları	Üretilen Glutamik Asit Miktarı
Trytic Soy Broth	Standart Proses Koşulları	1,36±0,07 g/L
Trytic Soy Broth	Optimize Proses Koşulları	2,72±0,17 g/L
Optimize Edilmiş Besiyeri İçeriği	Optimize Proses Koşulları	3,76±0,65 g/L

Literatürde bakıldığında bizim çalışmamıza benzer olarak; Chattopadhyay and Baknerjee (1978), Hindistan’da topraktan izole edilen *Bacillus cereus* isimli mikroorganizmadan 5,2 g/L glutamik asit elde ettiklerini bildirmişlerdir. Shakoori vd., (2012) ise, Atık su, gıda ve toprak örneklerinden elde ettikleri mikroorganizmaların besiyeri ve proses optimizasyonu sonunda maksimum 11.1 g/L glutamik asit üretimi sağladığını bildirmişlerdir. Yine Zareian vd., (2012), Malezyadan çeşitli fermente gıdadadan izole ettiği *Lactobacillus plantarum*’un maksimum 1.032 mmol/L (0,174 g/L) glutamik asit üretimi sağladığını bildirmişlerdir. Adeogun vd., (2017) ise, toprak ve endüstriyel atık su numunlerinden izole ettikleri *Bacillus firmus*’tan 0,27 g/L, *Enterobacter cloacae*’den 0,52 g/L, *Bacillus validus*’tan 0,63 g/L ve *Paenibacillus alvei*’den 2,09 g/L glutamik asit elde ettiklerini bildirmişleridir. Bunların yanı sıra Gul vd., (2012), Pakistan’dan elde ettikleri toprak numunelerinden izole ettikleri 230 mikroorganizmanın inkübasyon sonunda türleri belirlenmiş bu mikroorganizmalardan maksimum 30 g/L glutamik asit üretimi gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Kebede ve Abate, (2016) ise, benzer olarak Etiyopyadan elde ettikleri toprak numunelerinden izole edilen türleri belirlenmemiş mikroorganizmalardan maksimum 92.53 g/L glutamik asit elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu kapsamda yaptığımız çalışmada besiyeri ve proses optimizasyonu sonucunda sağlanan $3,76\pm0,65$ g/L’lik glutamik asit üretimi, literatürdeki diğer çalışmalara benzer değerde olduğu gözlemlenmiştir.

3.3.4. Besiyeri Ortamında Üretilen Glutamik Asidin Geri Kazanımı

İnkübasyon süresi sonunda üretilen Glutamik Asidin besiyeri ortamından ayrıştırılarak geri kazanılmasında Nampoothiri vd., (1999) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek 3 tekrarlı çalışılmıştır. İnkübasyon sonrası elde edilen sıvı besiyeri istenmeyen hücre bileşenlerinden ayrıştırılması için öncelikle 4200 rpm de 15 dk süre ile santrifüj edilmiş ardından da 45 µm filtreden geçirilerek iyon değiştirici reçineye yüklenmeye hazır hale getirilmiştir. İyon değiştirici reçine ile ayrıştırma sürecinde ise yine sırası ile iyon değiştirici reçineyi şartlama, dilüsyon ve kristalizasyon işlemleri uygulanmıştır.

Mikrobiyal yöntemler ile besiyeri ortamında üretilen glutamik asidin ayrıştırılmasında da iyon değiştirici reçine ile ayırma metodu kullanılmıştır. bu amaçla amberlite ır 120 (hi-media) isimli katyonik reçine kullanılmıştır. inkübasyon sonrası büyük hücre bileşenlerinden ayrılan ve spektrofotometre yardımı ile içerisinde $3,76 \pm 0,65$ g/L glutamik asit bulunduğu tespit edilen 500 mL sıvı besiyerinin pH'ı 2.0 ayarlanarak içerisinde 50 g şartlandırılmış reçinenin bulunduğu erlene ilave edilmiştir. Öncelikle süreye bağlı dilüsyon miktarının tespiti için reçine-besiyeri karışımı 30 °C ve 150 rpm'de çalkalamalı inkübatöre bırakılarak 30 dakikalık aralıklarla numune alınmış ve ninhidrin yöntemi ile UV spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Süreye bağlı reçineye bağlanan sistein miktarı Şekil 3.11'deki gibidir.



Şekil 3.11. Süreye Bağlı Reçineye Bağlanan Glutamik Asit Miktarı

Maksimum absorbasın tespit edildiği 5. saatin sonunda ise erlenin içinden glutamik asiti absorbe etmiş olan reçineler süzölmüş ve ardından glutamik asidi reçineden ayırmak için 500 mL pH'ı 3.9'a ayarlanmış saf su eklenip 30 °C ve 150 rpm de 2 saat süre ile çalkalamalı inkübatöre bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda elüsyon sıvısı reçineden ayrılmış ve kristalize olması için beher içerisinde pH'ı glutamik asidin izoelektirik noktası olan 3.9'a çekilmiştir. Sonrasında su ise banyosunda 60 °C'de solvent uçurulmuş beherin alt kısmında kristal formda bulunan glutamik asit kazınarak ayrılmıştır. Elde edilen geri kazanım verileri Tablo 3.14'te verilmiştir.

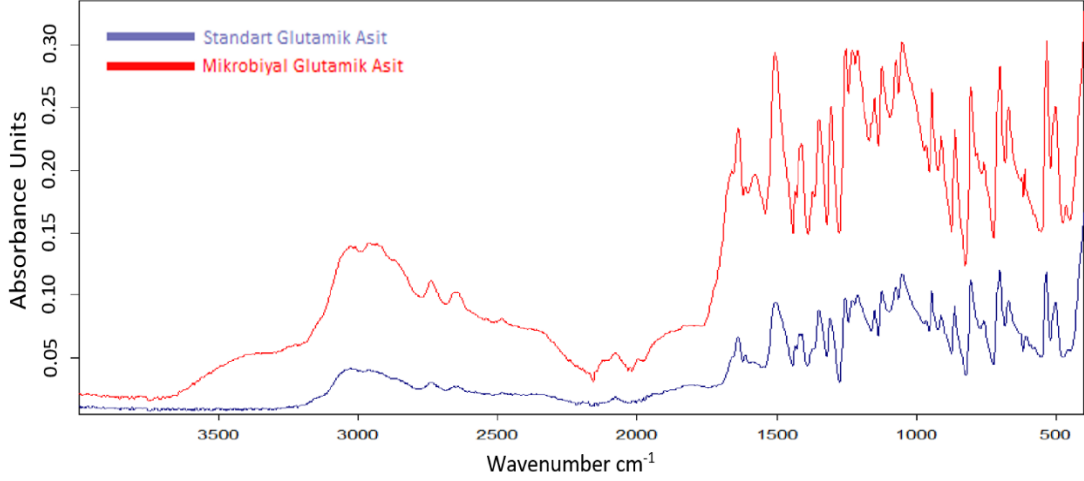
Yapılan çalışma sonucunda %53.48 geri kazanım verimi elde edilmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalara baktığımızda, Nampoothiri vd., (1999) yaptıkları çalışmada %45 oranında geri kazanım verimi elde ederken Nampoothiri vd., (1995) yaptıkları çalışmada %67,15 oranında geri kazanım verimi elde etmiştir. Benzer çalışmalar ile kıyaslandığında elde edilen geri kazanım verimi literatürde kabul görür limitlerde olduğu saptanmıştır.

Tablo 3.14. Glutamik Asit Geri Kazanım Verileri

Fermentasyon sıvısı içerisinde ölçölen glutamik asit miktarı:	3,76±0,65 g/L
Reçine bağlanan glutamik asit miktarı:	3,44±0,66 g/L
Elüsyon sıvısında ölçölen glutamik asit miktarı:	2,94±0,49 g/L
Kristal yapıda elde edilen glutamik asit miktarı:	2,01±0,39 g/L
Geri kazanım verimi:	%53,48±3,28

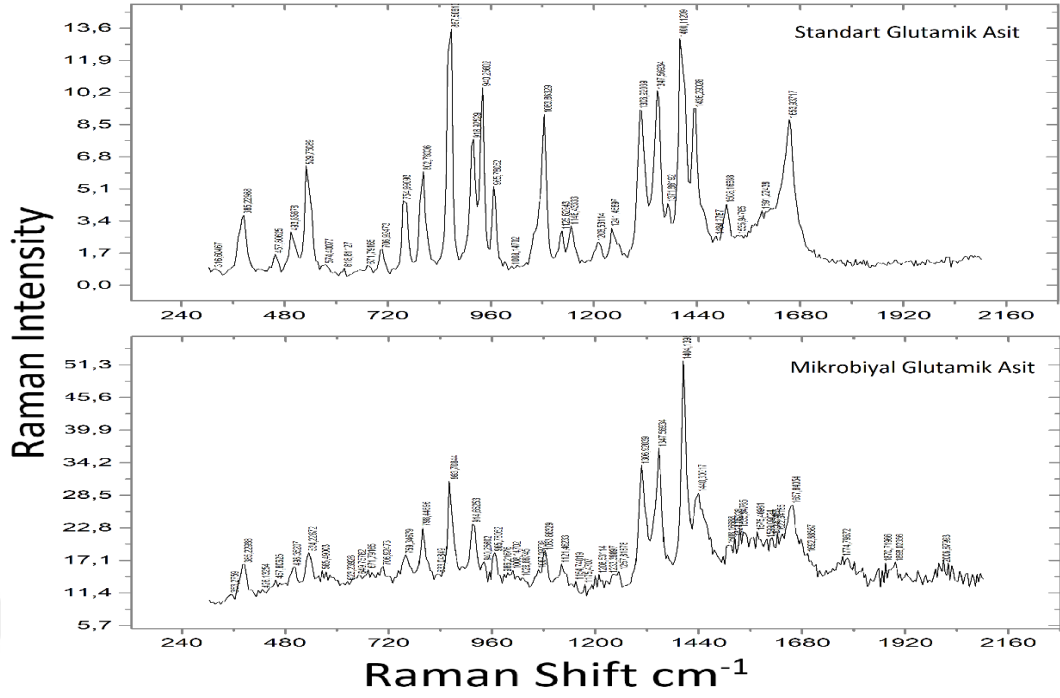
3.3.5. Elde Edilen Glutamik Asidin Karakterizasyonu

Yapılan çalışmada mikroorganizmalar tarafından üretilip besiyeri ortamından geri kazanım yolu ile elde edilen glutamik asitin kimyasal yapısını inceliyip standart glutamik asit ile kıyaslayarak nicel tayin yapmak amacıyla birbirini tamamlayan iki FTIR ve Raman spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiş; aynı zamanda bu iki yöntem yine hassas bir kromatografi yöntemi olan LC-MSMS ile nicel olarak da doğrulanmıştır.



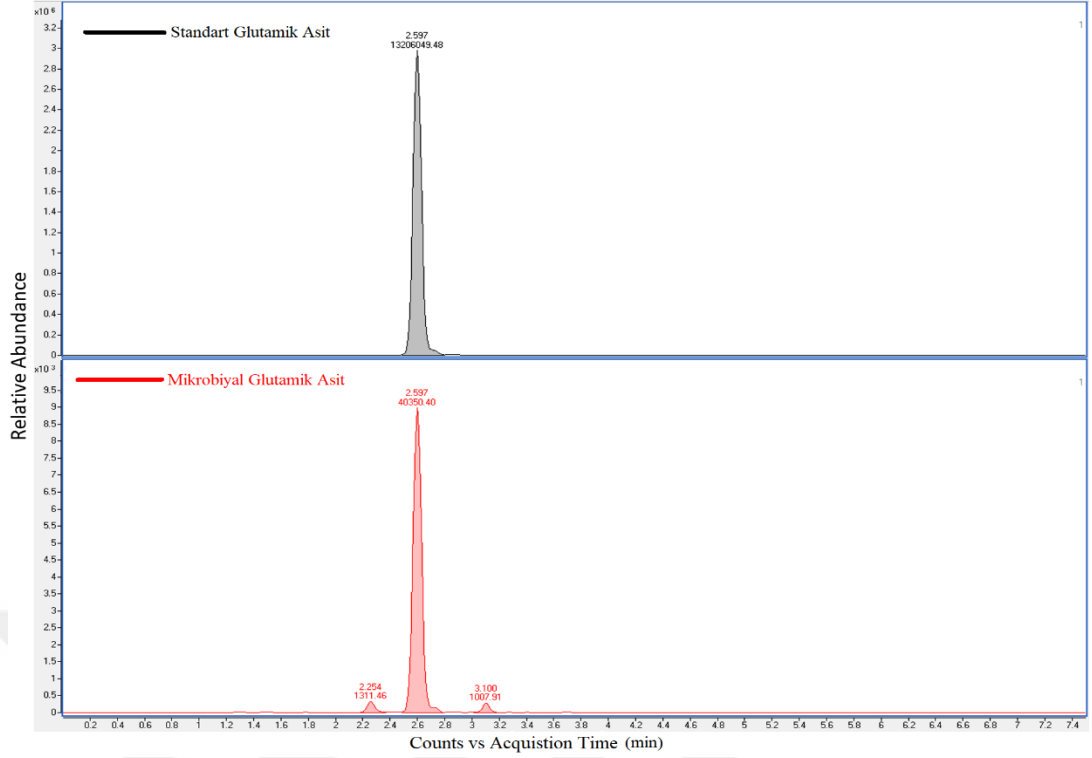
Şekil 3.12. Mikrobiyal ve Standart Glutamik Asit Standardına ait FTIR Spektrumları

FTIR analizi neticesinde elde edilen saf standart glutamik asit ile mikrobiyal glutamik asite ait kızılötesi spektrumları Şekil 3.12’de gösterilmektedir. Saf standarta ait spektrumlar 3027, 2962, 2737, 2652, 1660, 1637, 1614, 1585, 1504, 1434, 1414, 1373, 1350, 1309, 1255, 1230, 1211, 1149, 1124, 1074, 1053, 966, 945, 912, 864, 804, 757, 702, 669, 536, 503 ve 457 cm^{-1} olarak tespit edilmiş olup bu veriler literatürdeki verilerle örtüşmektedir (Kimmel ve Saifer, 1969). Mikrobiyal glutamik asit numunelerinde ise bu spektrumlara ek olarak glutamik asidin geri kazanımı sırasında besiyerinden gelen safsızların neden olduğu 783 cm^{-1} , 1991 cm^{-1} ve 2869 cm^{-1} gibi küçük şiddetli spektrumlar da tespit edilmiştir. Glutamik aside ait kızılötesi spektrumlarında tespit edilen ve 600 - 1200 cm^{-1} bant aralığı glutamik asit molekülünün parmak izi (iskelet titreşimi) bölgesini ifade etmektedir. Ayrıca karakteristik olarak 1504 cm^{-1} ’deki pik değeri glutamik yapısında bulunan karboksil gurubundaki COOH’ı, 1637 cm^{-1} ’deki pik değeri amin gurubundaki NH₂ yi ve 1350 cm^{-1} ’deki pik değeri ise CH₂ ifade etmektedir. Buna ek olarak karboksil gurubunun içinde yer alan O-H etkileşimi 1230 cm^{-1} ’deki pikte görülmektedir (Lanzilotta ve McQuillan, 2000). Yapılan FTIR analizi sonucunda mikrobiyal yöntemler ile üretilip geri kazanım yapılan glutamik asit numunesine ait kızılötesi spektrumları ile aynı şartlarda analizi yapılan standart glutamik asite ait spektrumlar ile ve literatürdeki çalışmalarda glutamik asit için belirtilen spektrumlar ile spektrumlar ile örtüştüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 3.13. Mikrobiyal ve Standart Glutamik Asite ait Raman Spektrumları

Mikrobiyal glutamik asit ile standart glutamik asitin raman spektrumu alınmış bölgeleri Şekil 3.13’da gösterildiği gibidir. Standart glutamik asitin raman analizinde elde edilen 385, 457, 493, 529, 574, 618, 671, 706, 754, 802, 867, 918, 940, 956, 1083, 1125, 1146, 1208, 1241, 1306, 1347, 1400, 1436, 1508, 1653 cm^{-1} bantları glutamik asit yapısındaki mevcut kimyasal gruplara ait karakteristik raman kaymalarını göstermekte olup bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile de örtüşmektedir (Cebi vd., 2020). Bu pikler arasında 1124 cm^{-1} ’de elde edilen pik NH_3 ’e aitken, 1083 cm^{-1} elde edilen pik ise bu karbon iskeletiyle NH_3 arasındaki etkileşime ait piki ifade etmektedir (Dhamelincourt ve Ramírez, 1991). 1400 cm^{-1} ’de elde edilen kuvvetli pik ise iskelettteki karbon atomu ile çift bağ ile bağlandığı O atomları arasındaki titreşime ait piklerdir (Navarrete vd., 1994). Bunun yanı sıra 867 cm^{-1} ve 965 cm^{-1} elde edilen karakteristik pikler ise OH ile O atomu arasındaki etkileşimi ifade etmektedir (Kabischt ve Klose, 1978). 1125 cm^{-1} ile 1347 cm^{-1} arasındaki bölgede elde edilen pikler de CH_2 ’deki titreşimleri göstermektedir (Peica vd., 2007). Genel olarak raman spektrumundaki mikrobiyal glutamik asite ait titreşimsel bantlar, standart glutamik asitin pikleri ile büyük oranda örtüştüğü gözlemlenmiştir ancak; mikrobiyal glutamik asitde bulunup standart glutamik asitde yer almayan $353, 426, 1075, 1257, 1774, 1898$ ve 2006 cm^{-1} gibi safsızlıkların neden olduğu küçük şiddetli bantların da varlığı da gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14. Mikrobiyal ve Standart Glutamik Asite ait LC-MS/MS Kromotogramları

Elde edilen FTIR ve Raman analiz sonuçlarını kromatografik bir yöntemle nicel olarak doğrulamak amacı ile LC-MSMS kullanılmıştır. Besiyeri ortamından geri kazanım yolu ile elde edilen glutamik asite ait kromotogram Şekil 3.14'teki gibidir. Mikroorganizmalardan elde edilen sisteim numunesine ait LC-MSMS kromotogramı incelendiğinde sisteine ait pik baskın ve net bir şekilde görülmekte ancak, bu pikin yanı sıra sisteyinin besiyeri ortamından ayrıştırılması sürecinde gelen safsızlığın neden olduğu küçük şiddetli piklerin varlığında gözlemlenmiştir. FTIR, Raman ve LC-MS/MS analizlerinden elde edilen veriler incelendiğinde; mikrobiyal yöntemler ile üretilip geri kazanım yapılan glutamik asit numunesi ile standart glutamik asitin birbirleriyle verilerinin uyumlu olduğu ve ayrıca literatürdeki veriler ile de örtüştüğü gözlemlenmiştir (Lanzilotta ve McQuillan, 2000; Karakaplan 2019; Cebi vd., 2020).

3.4 Mikrobiyal Beta Karoten Üretimi

3.4.1. Mikroorganizmaların Ürettiği Beta Karoten Analizi

Türkiyenin 7 farklı bölgesinden elde edilen 9 gıda ve 37 toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizmaların TSB besiyerinde inkübasyonu neticesinde elde edilen beta karoten miktarları Ek-3C’de belirtildiği gibidir. Toprak numunelerinden elde edilen izolatların beta karoten üretim miktarı ortalaması $9,184 \pm 2,603$ mg/L iken, gıda numunelerinden elde edilen izolatların beta karoten üretim miktarı ortalaması $10,953 \pm 4,152$ mg/L belirlenmiştir. En yüksek beta karoten üretimi $23,895 \pm 0,251$ mg/L ile Antalya yöresine ait Yörük peyniri numunesinden izole edilen G 4.3.1 kodlu izolat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca $19,751 \pm 0,126$ mg/L ile Ege bölgesinde, çiçeklik alandan alınan toprak numunesinden izole edilen TE.7.1.1 kodlu izolat; $19,165 \pm 0,145$ g/L ile Karadeniz bölgesinde, fındık bahçesinden alınan toprak numunesinden izole TK.2.3.1 kodlu izolat ve $19,082 \pm 0,192$ mg/L ile Ege bölgesinde, tarım arazisinden alınan toprak numunesinden izole edilen TE.3.5.1 kodlu izolat diğer yüksek üretim gösteren toprak kaynaklı izolatlardır. Son olarak 5. en yüksek üretim gösteren izolat ise $17,031 \pm 0,261$ mg/L ile Balıkesir yöresine ait Mihaliç peyniri numunesinden izole edilen G 9.1.1 kodlu gıda kaynaklı izolat olduğu belirlenmiştir. Diğer izolatlarla oranla daha yüksek beta karoten üretimi gözlenen bu 5 izolatın verilerine doğrulamak amacı ile daha sonra validasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Tablo 3.15. Gıda Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Beta Karoten Üretim Ortalamaları

Numune Kodu	Örnek Türü	İzolat Sayısı	İzolatların Beta Karoten Üretim Ortalaması (mg/L)
G.1	Elazığ Tulumu	2	$9,88 \pm 2,34$ ^c
G.2	Tereyağı	4	$11,52 \pm 1,92$ ^b
G.3	Antep Peyniri	2	$7,80 \pm 0,03$ ^d
G.4	Yörük Peyniri	2	$16,03 \pm 11,13$ ^a
G.5	Örgü Peyniri	2	$9,18 \pm 3,11$ ^{cd}
G.6	Otlı Peynir	2	$10,46 \pm 3,08$ ^{bc}
G.7	İzmir Tulumu	2	$12,24 \pm 3,28$ ^b
G.8	Eski Kaşar	2	$9,04 \pm 3,31$ ^{cd}
G.9	Mihaliç Peyniri	2	$11,94 \pm 7,19$ ^b

Aynı sütündeki farklı harfler ortalama değerler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir ($p < 0,05$)

Tablo 3.16. Toprakta Edilen İzolatların Bölgelere Göre Beta Karoten Üretim Ortalamaları

Örnek Alınan Bölge	Numune Kodu	Örnek Türü	İzolat Sayısı	Örnekten Elde Edilen İzolatların Beta Karoten Üretim Ortalaması (mg/L)	Bölgeden Elde Edilen İzolatların Beta Karoten Üretim Ortalaması (mg/L)
Doğu Anadolu Bölgesi	TD.1	Bahçe Toprağı	6	7,19±1,28 ^b	7,81±1,86 ^b
	TD.2	Yayla Toprağı	3	6,51±1,48 ^{ab}	
	TD.3	Çimlik Alan Toprağı	3	8,30±0,54 ^{ab}	
	TD.4	Dağ Eteği Toprağı	3	7,59±3,14 ^{ab}	
	TD.5	Mera Toprağı	4	8,39±3,62 ^{ab}	
	TD.6	Dağlık Arazı Toprağı	6	8,55±1,81 ^{ab}	
İç Anadolu Bölgesi	TI.1	Bahçe Toprağı	5	9,57±1,07 ^{ab}	9,27±1,75 ^{ab}
	TI.2	Mera Toprağı	7	9,35±1,82 ^{ab}	
	TI.3	Dağ Eteği Toprağı	4	8,74±1,93 ^{ab}	
	TI.4	Ağaçlık Alan Toprağı	6	9,88±2,49 ^{ab}	
	TI.5	Tarım Arazisi Toprağı	6	8,74±1,47 ^{ab}	
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	TG.1	Üzüm Bağı Toprağı	6	7,13±1,56 ^b	8,02±1,58 ^{ab}
	TG.2	Fıstık Bahçesi Toprağı	5	8,78±1,54 ^{ab}	
	TG.3	Bahçe Toprağı	4	8,38±1,27 ^{ab}	
Karadeniz Bölgesi	TK.1	Çay Bahçesi Toprağı	8	9,25±0,03 ^{ab}	9,31±2,67 ^{ab}
	TK.2	Fındık Bahçesi Toprağı	5	10,84±4,89 ^{ab}	
	TK.3	Mera Toprağı	9	9,03±2,77 ^{ab}	
	TK.4	Yol Kenarı Otlak Toprağı	7	8,54±1,74 ^{ab}	
	TK.5	Fındık Bahçesi Toprağı	5	9,88±1,90 ^{ab}	
Akdeniz Bölgesi	TA.1	Sera Toprağı	7	9,64±2,45 ^{ab}	9,43±2,35 ^{ab}
	TA.2	Kayacı Vadi Toprağı	6	8,25±1,49 ^{ab}	
	TA.3	Sahil Kumu	5	10,52±2,83 ^{ab}	
Marmara Bölgesi	TM.3	Şile Bahçe Toprağı	7	8,01±2,20 ^{ab}	9,56±2,51 ^{ab}
	TM.4	Şile Sahil Kumu	6	8,67±1,19 ^{ab}	
	TM.5	Çamlık Arazı Toprağı	5	9,19±1,52 ^{ab}	
	TM.6	Çimlik Alan Toprağı	7	11,14±3,34 ^{ab}	
	TM.7	Çiçeklik Alan Toprağı	4	10,30±4,14 ^{ab}	
	TM.8	Göl Kenarı Toprağı	2	8,47±0,80 ^{ab}	
	TM.1.	Sahil Kumu	7	9,59±3,38 ^{ab}	
	TM.2	Tarım Arazisi Toprağı	3	11,24±2,60 ^{ab}	
Ege Bölgesi	TE.1	Yol Kenarı Otlak Toprağı	7	7,32±2,14 ^b	9,96±3,74 ^a
	TE.2	Çamlık Arazı Toprağı	2	8,74±0,79 ^{ab}	
	TE.3	Tarım Arazisi Toprağı	5	9,25±5,07 ^{ab}	
	TE.4	Bahçe Toprağı	5	8,94±1,19 ^{ab}	
	TE.5	Çimlik Alan Toprağı	4	12,18±3,66 ^{ab}	
	TE.6	Yol Kenarı Otlak Toprağı	2	11,09±1,36 ^{ab}	
	TE.7	Çiçeklik Alan Toprağı	6	12,99±4,07 ^{ab}	

Aynı sütündeki farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir ($p<0,05$)

Tablo 3.15'te 9 farklı gıda örneğinden elde edilen izolatların beta karoten üretim miktarları görülmektedir. Gıda örneklerinden elde edilen bu mikroorganizmaların beta karoten üretim ortalamaları $10,953\pm 4,152$ mg/L g/L belirlenmiştir. Gıda numuneleri arasında en yüksek beta karoten üretimi ortalaması $16,026\pm 11,128$ mg/L ile Antalya bölgesinde üretilen Yörük peynirden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir. $12,238\pm 3,285$ mg/L ortalaması ile İzmir Tulum peynirinden elde edilen izolatlarda, $11,945\pm 7,192$ mg/L ortalaması ile Balıkesir bölgesine ait Mihaliç peynirden elde edilen izolatlarda ve $11,516 + 1,918$ mg/L ortalaması ile Trabzon tereyağından elde edilen gıda ürünlerine oranla daha yüksek beta karoten üretim ortalaması izlenmiştir. Van otlu peynirinden elde edilen izolatlarda ise $10,460 + 3,078$ mg/L beta karoten üretim ortalaması ile gıda ürünlerinden izole edilen izolatların ortalamasına yakın bir ortalama tespit edilmiştir. $9,811\pm 2,338$ mg/L ortalaması ile Elâzığ tulum peynirinden elde edilen izolatlar, $9,183\pm 3,108$ mg/L ortalaması ile Adapazarı örgü peynirinden elde edilen izolatlar ve $9,036\pm 3,315$ mg/L ortalaması ile Kars eski kaşarından elde edilen izolatlar diğer gıda numunelerinden elde edilen izolatların ortalamasından daha düşük beta karoten üretim ortalamaları göstermişlerdir. Gıda numuneleri arasında en düşük beta karoten üretimi ortalaması ise $7,802\pm 0,030$ mg/L ile Güneydoğu Anadolu bölgesinde tüketilen ve yerel bir peynir olan antep peynirinden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir.

Tablo 3.16'da ise Türkiye'nin 7 farklı coğrafi bölgesinden toplanan toprak örneklerinden elde edilen izolatların beta karoten üretim ortalamaları görülmektedir. Toprak örneklerinden elde edilen bu mikroorganizmaların beta karoten üretim ortalamaları $9,184\pm 2,603$ mg/L belirlenmiştir. Toprak numuneleri arasında en yüksek beta karoten üretimi ortalaması $9,963\pm 3,740$ mg/L ile Ege bölgesinden elde edilen izolatlarda gözlemlenmiştir. Daha sonra ise $9,566\pm 2,508$ mg/L ortalaması ile Marmara bölgesinden elde edilen izolatlar gelmektedir. Bu bölgeleri $9,435\pm 2,352$ mg/L beta karoten üretim ortalaması ile Akdeniz bölgesi, $9,315\pm 2,674$ mg/L beta karoten üretim ortalaması ile Karadeniz bölgesi ve $9,271\pm 1,746$ mg/L beta karoten üretim ortalaması ile İç Anadolu bölgesi takip etmektedir. Güneydoğu Anadolu bölgesinden toplanan numunelerden elde edilen izolatlar ise $8,015\pm 1,576$ mg/L, Doğu Anadolu bölgesinden toplanan numunelerden elde edilen izolatların beta karoten üretim

ortalaması ise $7,808 \pm 1,864$ mg/L ile 7 coğrafi bölge arasındaki en düşük beta karoten üretim ortalamalarına sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan Spektrofotometrik analiz sonucunda iyi beta karoten üretimi yapan G.4.3.1, TE.7.1.1, TK.2.3.1, TE.3.5.1 ve G.9.1.1 kodlu 5 izolatın üretim verilerini doğrulamak amacı ile validasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla tekrar izolatlar 5 tekrar halinde Shakoori vd., (2012) yılında uyguladığı yöntem ile 100 mL Tryptic Soy Broth içerisinde pH'ı 7,5'te, 37,5 °C, 125 rpm de 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve spektrofotometrede asetonla çözündürme ile tekrar analiz edilmiştir. Validasyon için 5 tekrarlı olarak yapılan analizlerin sonucu Tablo 3.17 deki gibidir.

Tablo 3.17. En Yüksek Beta Karoten Üretimi Gözlemlenen 5 İzolatın Üretim Validasyon Verileri

İzolat Kodu	BT1 (mg/L)	BT2 (mg/L)	BT3 (mg/L)	BT4 (mg/L)	BT5 (mg/L)	Ortalama
G.4.3.1	26,03	21,26	24,65	17,62	25,28	22,97 \pm 3,50
TE.7.1.1	12,28	15,74	17,49	20,01	16,49	16,39 \pm 2,83
TK.2.3.1	19,25	17,00	20,63	20,88	16,86	19,32 \pm 1,60
TE.3.5.1	16,61	19,76	14,61	18,50	22,26	18,34 \pm 2,93
G.9.1.1	18,12	10,84	20,38	17,74	14,98	16,41 \pm 3,66

Tablo 3.17'de görüldüğü üzere validasyon çalışması sonrasında en yüksek beta karoten üretimi $22,966 \pm 3,503$ mg/L ile Antalya yöresine ait yörük peynirinden izole edilen G.4.3.1 kodlu izolat olduğu doğrulanmıştır. İlk yapılan analizde $19,751 \pm 0,126$ mg/L ile 2. en iyi üretim yapan TE.7.1.1 numaralı izolatın ise validasyon amacı ile yapılan yapılan 5 tekrar sonucunda $16,386 \pm 2,833$ mg/L ortalaması ile bu beş izolat arasında en düşük üretim yapan mikroorganizma olduğu anlaşılmıştır. Bu durumda TK.2.3.1 numaralı izolat $19,324 \pm 1,605$ mg/L ile 2. en yüksek üretim yapan izolat, TE.3.5.1 numaralı izolat $18,345 \pm 2,391$ mg/L ile 3. en yüksek üretim yapan izolat ve G.9.1.1 numaralı izolat $16,411 \pm 3,659$ mg/L ile 4. en yüksek üretim yapan izolat olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak yapılan validasyon çalışmaları sonucunda elde edilen değerler ilk analiz ile büyük oranda örtüştüğü, ilk ölçüm ile sonrasında yapılan 5 tekrarlı validasyon ölçümleri arasındaki fark kabul edilebilir düzeyde olduğu ve literatürdeki rapor edilen veriler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

3.4.2. En Yüksek Beta Karoten Üretim Yapan Suşların Tanımlanması

En yüksek glutamik asit üretim potansiyeli gözlenmelenen G.4.3.1 öncelikli olarak konvansiyonel yöntemler ile koloni morfolojisi ve ışık mikroskopu altında gram boyama ile hücre yapısı analiz edilmiştir. İlgili izolatın koloni yapısına bakıldığında küçük dairesel yapıda, S (smooth) tipi koloniler oluşturduğu gözlemlenmektedir. İzolatın ışık mikroskopu altında gram boyama yöntemi ile boyanarak hücre yapısı incelendiğinde ise gram pozitif, kok şeklinde ve sporsuz hücrelerden oluştuğu gözlemlenmektedir. G.4.3.1 kodlu izolatın genotipik olarak tanımlanmasında karşılaştırmalı DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Karşılaştırmalı DNA dizi analizi için Bölüm 2.2.3.2 de anlatıldığı üzere izole edilen ve saflaştırılan 16S rRNA gen bölgesi sekanslanmıştır. Sekanslama sonunda elde edilen 881 bazlık bölgenin kromotogramı (Ek-4C) BLAST kullanılarak NCBI'gen bankasındaki verilerle kıyaslanmış (Ek-5C) ve elimizdeki mikroorganizmanın *Enterococcus sp.* olduğu; genbankasında bu mikroorganizmaya en yakın suşların %98 benzerlik yüzdesiyle *Enterococcus faecium* (MF108117.1) ve *Enterococcus faecalis* (KF183511.1) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.18). %100 benzerlik bulunamaması nedeniyle tanımlanan bu tür, *Enterococcus sp.* strain CG3 olarak adlandırılmıştır.

Tablo 3.18. G.4.3.1 Kodlu İzolatın 16S rRNA Gen Dizilimine NCBI Gen Bankasında Karşılık Gelen Türler

Benzerlik Gösteren Tür ve Cins İsmi	Benzer Mikroorganizma Kodu	Benzerlik Yüzdesi	Eşleşen Nükleotid Sayısı	NCBI BLAST Benzerlik Skoru
<i>Enterococcus faecium</i>	MF108117.1	98%	861/881	1509 bits(817)
<i>Enterococcus faecalis</i>	KF183511.1	98%	859/881	1506 bits(815)

Literatüre baktığımızda *Enterococcus* kullanarak doğrudan beta karoten sentezine yönelik doğrudan yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır; ancak Kim vd., (2009), *Enterococcus faecium*'den elde ettikleri mvaE and mvaS genelerini E. coli DH5'e klonlayarak elde ettikleri rekombinant mikroorganizma ile 663 mg/L beta karoten sentezi sağladıklarını bildirmişlerdir. Duong vd., (2017) ise, *Enterococcus faecium*'den elde ettikleri mvaK1, mvaK2 ve mvaD genelerini E. Coli BL21'e klonlayarak elde ettikleri rekombinant mikroorganizmadan 3 kat daha fazla beta karoten sentezi sağladıklarını bildirmişlerdir.

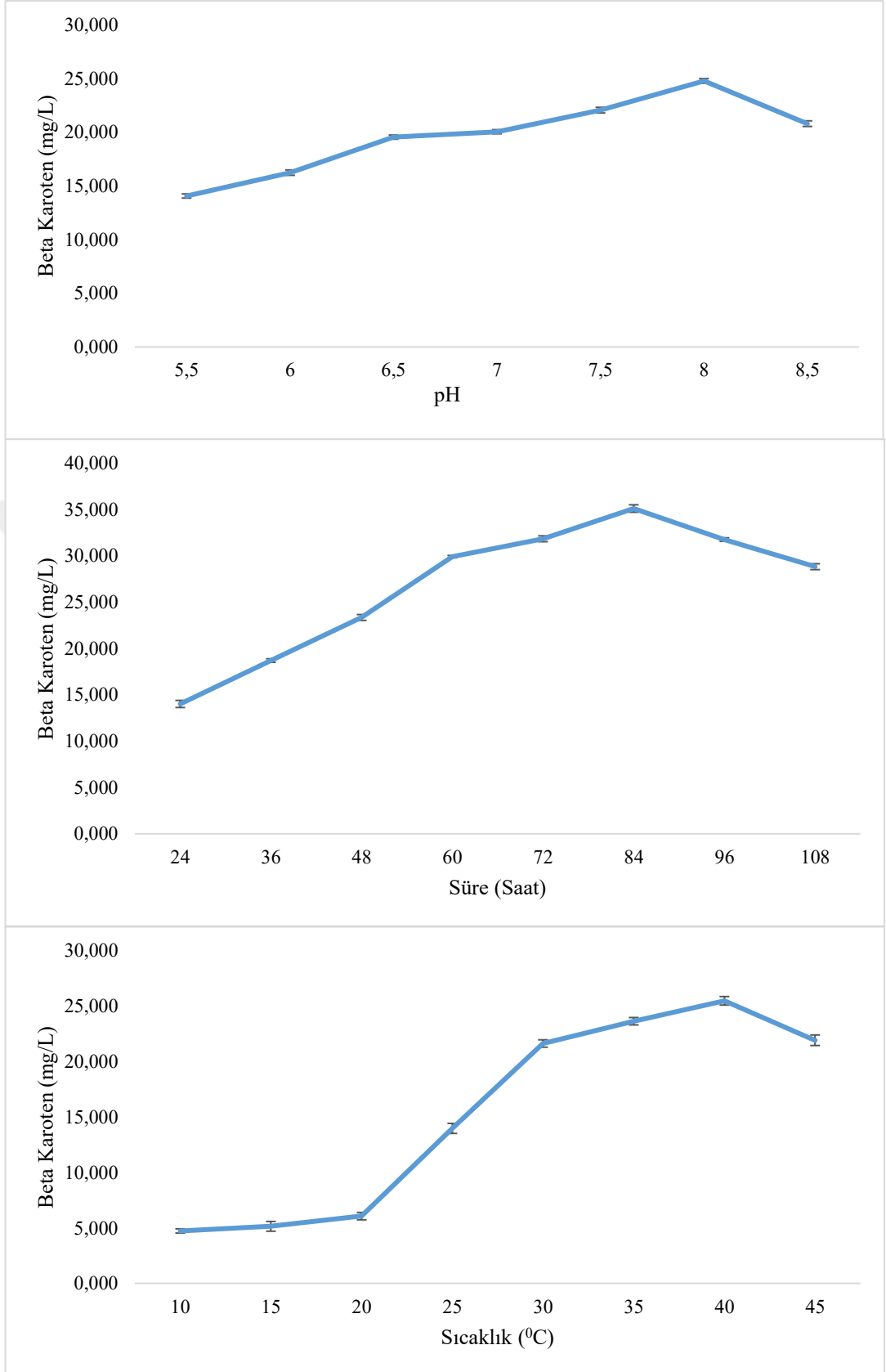
3.4.3. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi

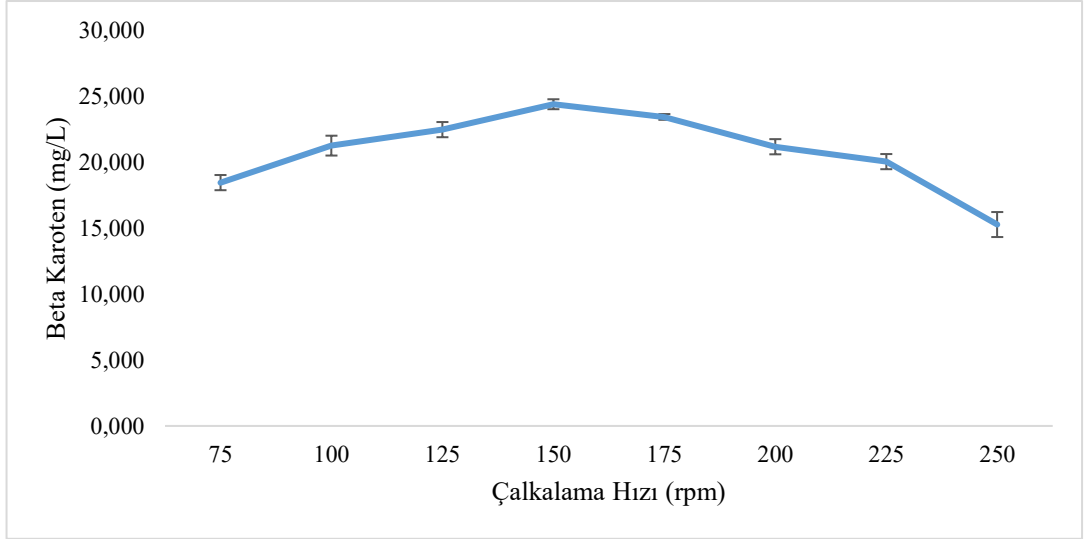
3.4.3.1.İnkübasyon Koşullarının Beta Karoten Üretimine Etkisi

En iyi beta karoten üretimi *Enterococcus* sp. strain CG3'nin hangi çevre şartlarında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek adına 4 temel çevresel proses şartı olan pH, sıcaklık, zaman ve çalkalama süresinin farklı varyasyonları ile TSB ortamında yapılan inkübasyon sonundan üretilen beta karoten miktarları Şekil 3.15'teki gibidir. Proses parametreleri etkileşimlerinin beta karoten üretimine etkilerini gösteren yüzey grafikleri ise Şekil 3.16'daki gibidir.

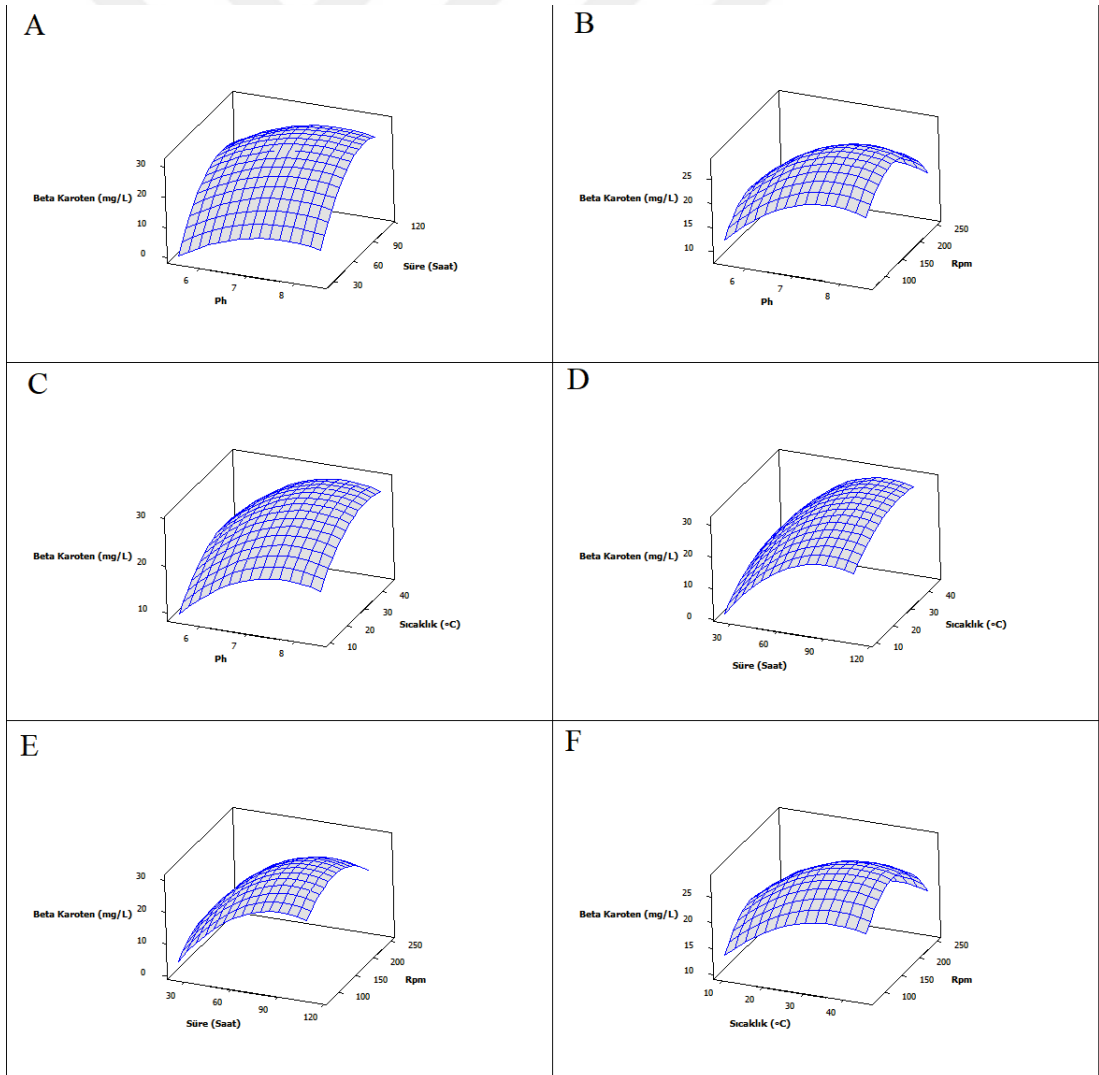
Enterococcus sp. strain CG3'nin sabit koşullarda (pH:7,5, sıcaklık: 37,5 °C, çalkalama hızı: 125 rpm ve TSB referans besiyeri içerisinde) farklı inkübasyon sürelerinde beta karoten üretimi sırası ile 24 saatte 14,017±0,384 mg/L, 36 saatte 18,705±0,192 mg/L, 48 saatte 23,351±0,316 mg/L, 60 saatte 29,992±0,126 mg/L, 72 saatte 31,847±0,316 mg/L, 84 saatte 35,112±0,404 mg/L, 96 saatte 31,764±0,192 mg/L ve son olarak 108 saatte 28,834±0,316 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bakterinin 72 ile 96 saatleri arasında yüksek miktarda beta karoten sentezlediği 84. saatin sonunda ise 35,112±0,404 mg/L ile maksimum beta karoten üretimi izlenmiştir. Bu bakterinin sabit koşullarda (sıcaklık: 37,5 °C, çalkalama Hızı: 125 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat ve TSB referans besiyeri içerisinde) beta karoten üretimine pH'ın etkisi 5.5-8.5 aralığında incelenmiştir ve pH 6 altında düşük beta karoten üretimi gösterdiği, pH 6.5-8.5 aralığında ise yüksek beta karoten üretimi gösterdiği belirlenmiştir. *bakterinin* en yüksek beta karoten üretimi pH 8'da 24,774±0,217 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Sıcaklığın sabit koşullarda (çalkalama Hızı: 125 rpm, pH: 7,5, inkübasyon süresi: 48 Saat ve TSB referans besiyeri içerisinde) beta karoten üretimi etkisi ise 10-45 °C aralığında incelenmiştir. Sıcaklığın 30 °C altında olduğunda ortalamanın altında beta karoten üretimi gözlemlenmiş olup, sıcaklığın 30-45 °C aralığında daha yüksek beta karoten üretimi gözlemlenmiştir. Bu izolat için en yüksek beta karoten üretimi ise 40 °C'de 25,486±0,384 mg/L olarak tespit edilmiştir. Bir başka proses koşulu olan çalkalama hızının sabit koşullarda (pH: 7,5, sıcaklık: 125 rpm, inkübasyon süresi: 48 saat ve TSB referans besiyeri içerisinde) beta karoten üretimi üzerine etkisi ise 75-250 rpm aralığında incelenmiştir. İlgili izolat için en yüksek beta karoten üretimi 150 rpm'de 24,397±0,126 mg/L olarak tespit edilmiş olup bu değer üzerindeki çalkalama hızlarında beta karoten üretimi kademeli olarak düştüğü izlenmiştir.





Şekil 3.15. Enterococcus sp. strain CG3 İçin Proses Parametrelerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi (Sabit Parametreler: pH 7.5, Sıcaklık 37.5, alkalama Hızı:125 rpm, Süre 48 saat)

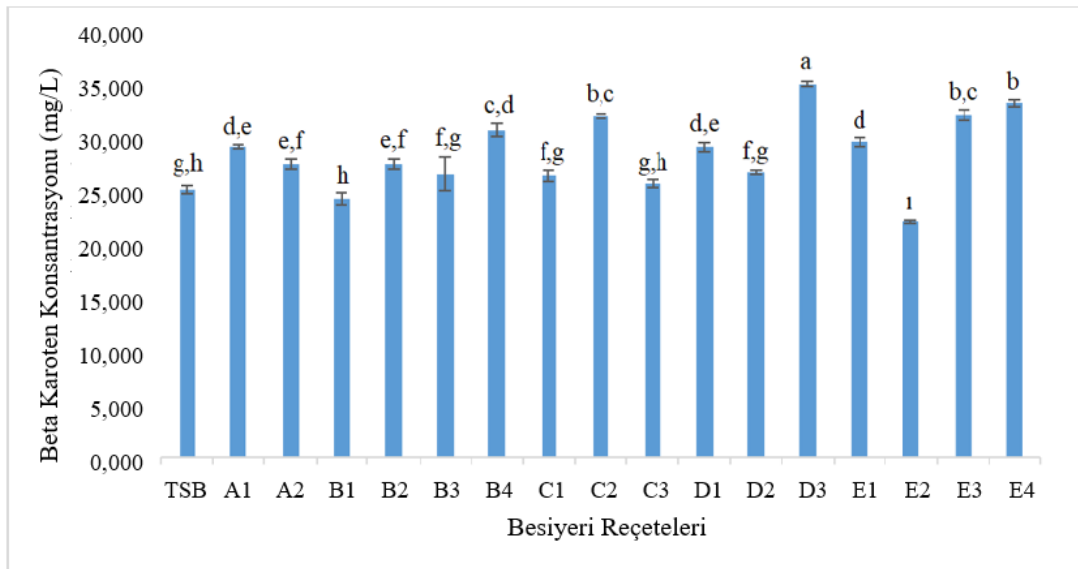


Şekil 3.16. Enterococcus sp. strain CG3 İçin Proses Parametreleri Etkileşimlerinin Beta Karoten Üretimine Etkilerini Gösteren YüzeY Grafikleri; A: pH-Süre, B: pH-rpm, C: pH-Sıcaklık, D: Sıcaklık-süre, E: rpm-Süre ve F: Sıcaklık-rpm etkileşimi (Sabit Parametreler: pH 7.5, Sıcaklık 37.5, Çalkalama Hızı:125 rpm, Süre 48 saat)

3.4.3.2. Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi

En fazla beta karoten üretimi izlenen *Enterococcus* sp. strain CG3'ün hangi besiyeri ortamında daha iyi üretim yaptığını saptayabilmek adına farklı karbonhidrat, azot, aminoasit ve minerallerin üretime etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Tryptic Soy Broth referans alınarak belirlenen reçete içerikleri ile hazırlanan 100 mL sıvı besiyerine 1 mL mikroorganizma aşılansarak pH 7,5 de, 37,5 °C de, 125 rpm de 48 saat süre inkübasyona bırakılmıştır.

Yapılan çalışmada karbonhidratların üretime etkisini incelemek için standart TSB içerisine sırası ile 2,5 g/L glikoz, früktoz ve laktoz eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda glikoz ve früktozun beta karoten sentezinde %5'lik ve %2.5'lik gibi ufak oranlarda artış sağladığı gözlenmiştir. Ancak bir disakkarit olan ve genelde süt ürünlerinde bulunan laktozun ise beta karoten üretimini % 28 gibi yüksek bir oranda arttırdığı saptanmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Enterococcus sp. strain CG3 için Tablo 2.4'te Belirtilen Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi [Farklı harfler ortalama değerler arasındaki farkların istatistik olarak anlamlı olduğunu belirtmektedir (p<0,05)]

Yapılan çalışmada azot kaynağı olarak besiyerine üre, hayvansal pepton, kazein peptonu ve soya peptonu, yeast extract, beef extract ve malt extract eklenerek beta karoten üretimine olan etkileri incelenmiştir. Besiyeri ortamına 8 g/L üre eklendiğinde sistein ve glutamik asitden aksine beta karoten üretiminin %22 gibi önemli bir oranda arttırdığı gözlemlenmiştir. Besiyeri ortamına 3 g/L hayvansal pepton eklendiğinde % 10'luk bir artış izlenirken, 3 g/L soya peptonu eklendiğinde de %3 gibi belirgin olmayan bir düşüş izlenmiş, 3 g/L kazein peptonu eklendiğinde ise üretimin baskılandığı ve % 6'lık oranda beta karoten üretiminin azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca besiyeri ortamına 1 g/L et, malt ve maya ekstresi eklenerek beta karoten üretimine etkisini incelediğimizde bu üç tür besi içeriğinin de üretimi arttırdığını; bitki kaynaklı malt ekstratı beta karoten üretimini sadece %6 oranında arttırırken, hayvan kaynaklı et ekstratı %16, mikroorganizma kaynaklı maya ekstratı da beta karoten üretimini %39 gibi önemli oranlarda arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca metiyonin ve serinin besiyeri ortamına 2 g/L eklenerek beta karoten üretimine etkisi incelendiğinde iki aminoasitinde glutamik asitde olduğu gibi beta karoten üretimini de arttırdığı tespit edilmiştir. Besiyeri ortamına eklenen metiyonin'in beta karoten üretimini %16 oranında, serinin ise %10 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada minerallerin beta karoten üretimine etkisini incelemek için ise besiyeri ortamına monopotasyum fosfat, dipotasyum fosfat, demir sülfat ve magnezyum sülfat eklenerek inkübasyon bırakılmıştır. Sistein ve glutamik asidin aksine bu mineraller, mikroorganizmanın beta karoten üretimine radikal etkiler yaptığı gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda yapılan analizde besiyeri ortamına 0,25 g/L demir sülfat eklenmesi beta karoten üretimini baskılamış ve üretim oranında % 12'lik düşüşe neden olmuştur. Fakat besiyeri ortamına eklenen 0,25 g/L magnezyum sülfat eklentisinin beta karoten üretiminde %28 gibi ciddi bir artış yaptığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde 0,5 g/L monopotasyum fosfat ilavesinin beta karoten üretimini %18, 2,5 g/L dipotasyum fosfat ilavesinin ise üretimi %32 oranlarında arttırdığı tespit edilmiştir.

3.4.3.3. Optimum İnkübasyon Koşullarında Üretilen Beta Karoten

Enterococcus sp. strain CG3'nin proses optimizasyonu verilere bakıldığında; pH 8 de, 40 °C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 84 süre ile inkübe edildiğinde maksimum beta karoten üretimi yapacağı saptanmıştır. Bu veriler kullanılarak 100 mL Tryptic Soy

Broth içerisinde 5 tekrarlı olarak yaptığımız validasyon çalışmasında izolatın ortalama $36,15 \pm 5,12$ mg/L beta karoten üretebildiği tespit edilmiştir.

Enterococcus sp. strain CG3'nin besiyeri içeriklerine göre beta karoten verilerine bakıldığında ise; 2,5g/L glikoz, 2,5g/L laktoz, 8 g/L üre 3 g/L hayvansal pepton, 17 g/L kazein peptonu, 1 g/L maya ekstratı, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L dipotasyum fosfat, 0,5 g/L monopotasyum fosfat, 0,25 g/L magnezyum sülfat ve 2 g/L metiyonin optimum besiyeri içeriği olarak tespit edilmiştir. Bu optimum besiyer içeriği ile optimum proses koşulları olan pH 8 de, 40 °C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 84 süre parametreleri ile 5 tekrarlı olarak yaptığımız validasyon çalışmasında izolatın ortalama $53,36 \pm 5,34$ mg/L beta karoten üretebildiği tespit edilmiştir (Tablo 3.19).

Tablo 3.19. İnkübasyon Koşulları ve Besiyeri İçeriklerinin Beta Karoten Üretimine Etkisi

Besiyeri İçeriği	Proses Koşulları	Üretilen Beta Karoten Miktarı (mg/L)
Trytic Soy Broth	Standart Proses Koşulları	22,96±3,50
Trytic Soy Broth	Optimize Edilmiş Proses Koşulları	36,15±5,12
Optimize Edilmiş Besiyeri İçeriği	Optimize Edilmiş Proses Koşulları	53,36±5,34

Literatürde bakıldığında bizim çalışmamıza benzer olarak Kahyaoğlu ve Kıvanç, (2007), Türkiyedeki gıda işletmelerinin proses atıklarını besi ortamı olarak kullandıkları fermentasyon neticesinde topraktan izole edilen *Blakesleea trispora* ile 43,3 mg/L, beta karoten üretimi sağladıklarını bildirmişlerdir. Bhosale ve Gadre, (2002) *Rhodotorula glutinis*'in 250 ± 7 mg/L beta karoten sentezlediğini bildirmiştir. Aksan, (2005) ise Türkiye'de çeşitli kaynaklardan izole ettiği 100 adet mikroorganizma ile 5ml'lik besiyeri ortamında yaptığı inkübasyon neticesinde *Rhodotorula mucilaginosa* ile maksimum 3,94 mg/L beta karoten üretimi sağladıklarını, literatürdeki diğer çalışmalara oranla daha düşük seviyelerde beta karoten üretimi elde etmelerinin sebebini ise mikroorganizmaların düşük hacimdeki (5ml) besiyerinde geliştirilmesi ve gelişim sürecinde pH, oksijen, karbon ve azot

kaynağı miktarı gibi çeşitli parametrelerde herhangi bir optimizasyon çalışması yapılmamasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Iriani vd., (2008) ise, Brezilya'daki toprak numunelerinden izole ettiği mikroorganizmalar ile yaptığı 5 günlük inkübasyon süresi sonunda *Rhodotorula glutinis*'nin 382 mg/L ile maksimum beta karoten üretimi gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Wang vd., (2012), çürümüş odundan izole ettikleri *Serratia marcescens* türü mikroorganizma ile maksimum 2,45 g/L beta karoten üretimi sağladığı rapor edilmiştir. Valduga vd., (2013) ise, yine orman endüstrisi atıklarında izole ettikleri *Sporidiobolus pararoseus* türü mikroorganizma ile inkübasyon sonunda maksimum 396 mg/L beta karoten elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu kapsamda yaptığımız çalışmada besiyeri ve proses optimizasyonu sonucunda sağlanan 53.36 mg/L beta karoten üretimi, literatürdeki diğer çalışmalara göre biraz daha düşük olsada kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu gözlemlenmiştir.

3.4.4. Besiyeri Ortamında Üretilen Beta Karotenin Geri Kazanımı

İnkübasyon süresi sonunda üretilen Beta Karoten'nin ayrıştırılarak geri kazanımında Aslan, (2018) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası üreyen mikroorganizma hücreleri santrifüj yardımı ile pelette toplanmış ve hücre duvarının parçalanmasını kolaylaştırmak için -80 °C derecede ayrıştırma işlemine kadar mühafaza edilmiştir. Beta Karotenin hücrelerden ekstrasyonunda hekzan (C₆H₁₄) çözücüsü ile ayrıştırma yapılmıştır. Bu aşamada %0,2'lik pyrogallol çözeltisinden ve %60'luk KOH çözeltisinden kullanılarak beta karoten dışındaki hekzanda çözünen bileşenlerin sabunlaşarak çökmesi sağlanmıştır. Beta karoten ekstrasyonu için öncelikle cam boncuklar yardımı ile mikroorganizmaların hücre duvarları parçalanmış, ardından da %0,2'lik pyrogallol ve %60'luk KOH çözeltileri yardımıyla hekzan içinde çözünebilen diğer bileşenlerin sabunlaşarak çöktürülmesi sağlanmıştır.

Son aşamada ise üzerine %95'lik hekzan eklenerek önce homojenize edilmiş, sonrasında da santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda tüpte; dipte cam boncukların olduğu, ortada hücre parçalanması sonucu oluşan protein, karbonhidrat ve sabunlaşan hücre atıklarının ve en üst kısımda ise beta karoteni tutan hekzanın yer aldığı 3 faz oluşmuştur. Beta karotenin bulunduğu üst faz pastor pipet yardımı ile ayrı bir cam tüpe alınmış ve spektrofotometre yardımı ile 455nm dalga boyunda ölçülmüştür. Maksimum beta karoten miktarının geri kazanımı için 2 mL %95'lik hekzan eklenmesi ve ayrıştırma prosedürü 5 kez tekrarlanmıştır. 4 fraksiyonun

sonunda maksimum beta karoten ayrıştırılması 29 ± 3 mg/L sağlanmış olup pastör pipetle ayrılan çözelti son bir kez daha 2800 rpm’de 2 dakika daha santrifüj edilerek bulaşan kalıntılardan ayrılmıştır. Elde edilen geri kazanım verileri Tablo 3.20’deki gibidir.

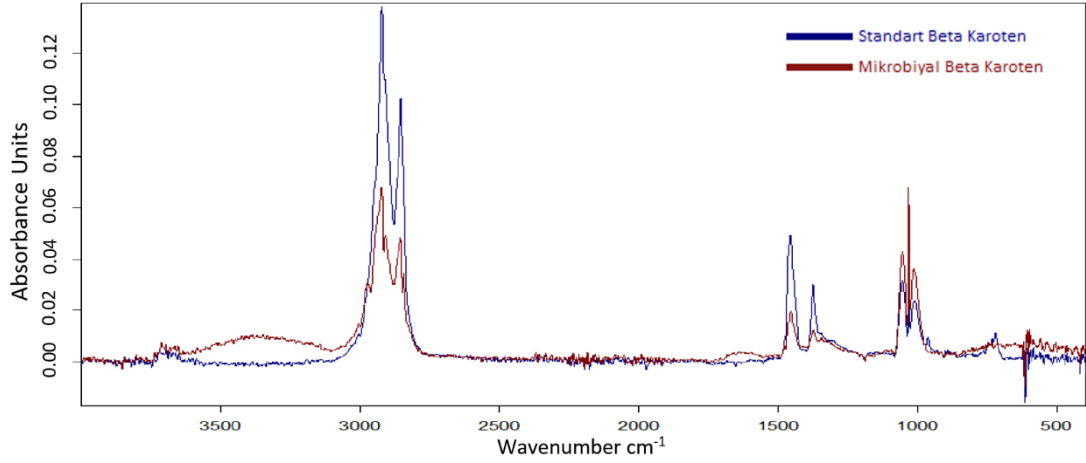
Tablo 3.20. Beta Karoten Geri Kazanım Verileri

Başlangıç Beta Karoten konsantrasyonu	53,36 \pm 5,34 mg/L
Ayrıştırma sonucunda elde edilen beta Karoten konsantrasyonu	43,09 \pm 4,75 mg/L
Ayrıştırma verimi:	%80,75

3.4.5. Elde Edilen Beta Karotenin Karakterizasyonu

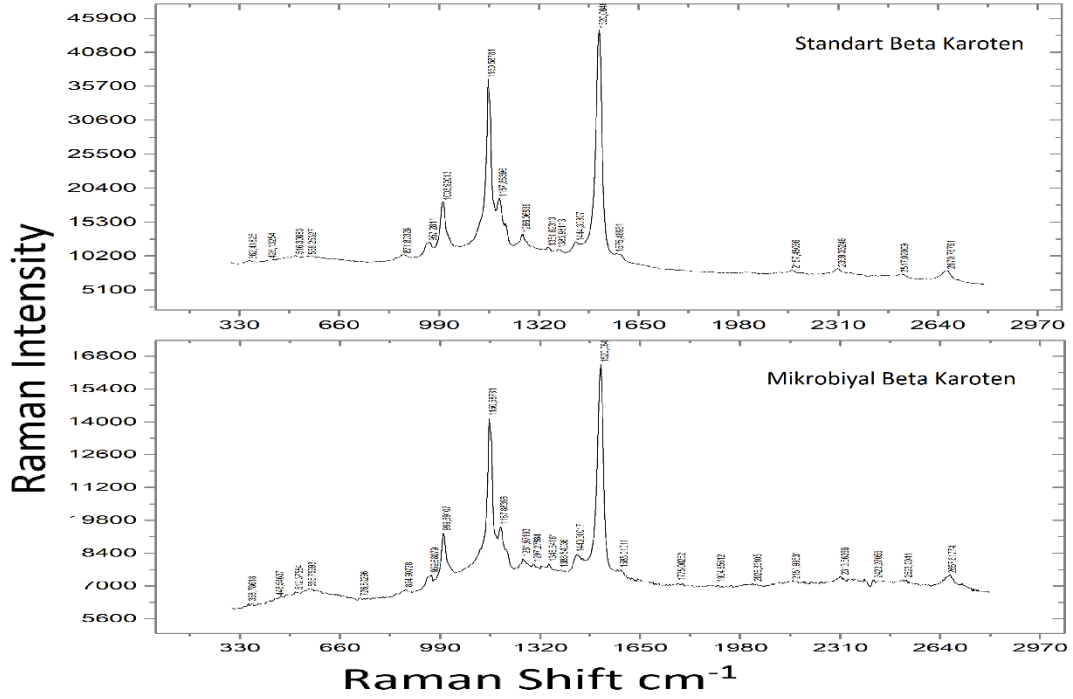
Yapılan çalışmada mikroorganizmalar tarafından üretilip besiyeri ortamından geri kazanım yolu ile elde edilen beta karotenin kimyasal yapısını inceliyip standart beta karoten ile kıyaslayarak nicel tayin yapmak amacıyla birbirini tamamlayan iki FTIR ve Raman spektroskopisi analizleri gerçekleştirilmiş; aynı zamanda bu iki yöntem bir başka kromatografik yöntem olan HPLC ile doğrulanmıştır.

FTIR analizi için hekzan içerisinde çözdürülen saf standart beta karoten ile yine hekzan yardımıyla hücrelerden elde edilen mikrobiyal beta karotene ait kızılötesi spektrumları Şekil 3.18’te gösterilmektedir. Numunelere ait spektrumlar 2968, 2552, 2068, 1581, 1488, 1405, 1344, 1296, 1195, 1128, 1062, 1004, 964, 941,867,846, 823, 808, 777, 752, 692, 636, 594, 555, 538, 495 ve 445 cm^{-1} olarak tespit edilmiş olup bu veriler literatürdeki verilerle örtüşmektedir. Ancak numunelere ait bu kızılötesi spektrumları incelediğimizde beta karotenin çözücüsü olarak kullanılan hekzana ait piklerin baskın olduğu, ancak beta karoteni temsil eden daha küçük şiddetteki karakteristik spektrumların varlığı gözlemlenmiştir. Numunelere ait kızılötesi spektrumlarında tespit edilen 720, 1012, 1032, 1053, 1376, 1458, 2853, 2912 ve 2912 cm^{-1} ’deki yüksek şiddetli pikler çözücü olarak kullanılan hekzanın sebep olduğu piklerdir (Walton ve Reyes, 1983). Bununla beraber analizde görülen 965 cm^{-1} ’deki pik değeri ise beta karotene ait karakteristik C-H etkileşimlerini göstermektedir (Quijano vd., 2020). Buna ek olarak 1595 cm^{-1} ’deki pik değeri de yine beta karotenin yapısındaki karakteristik C = C Çift-Bağ gerilme bölgesi ifade etmektedir. Ayrıca beta karotenin yapısında yer alan karakteristik CH_3 gurupları ise 1346 cm^{-1} bandında görülmektedir (Berezin vd., 2005).



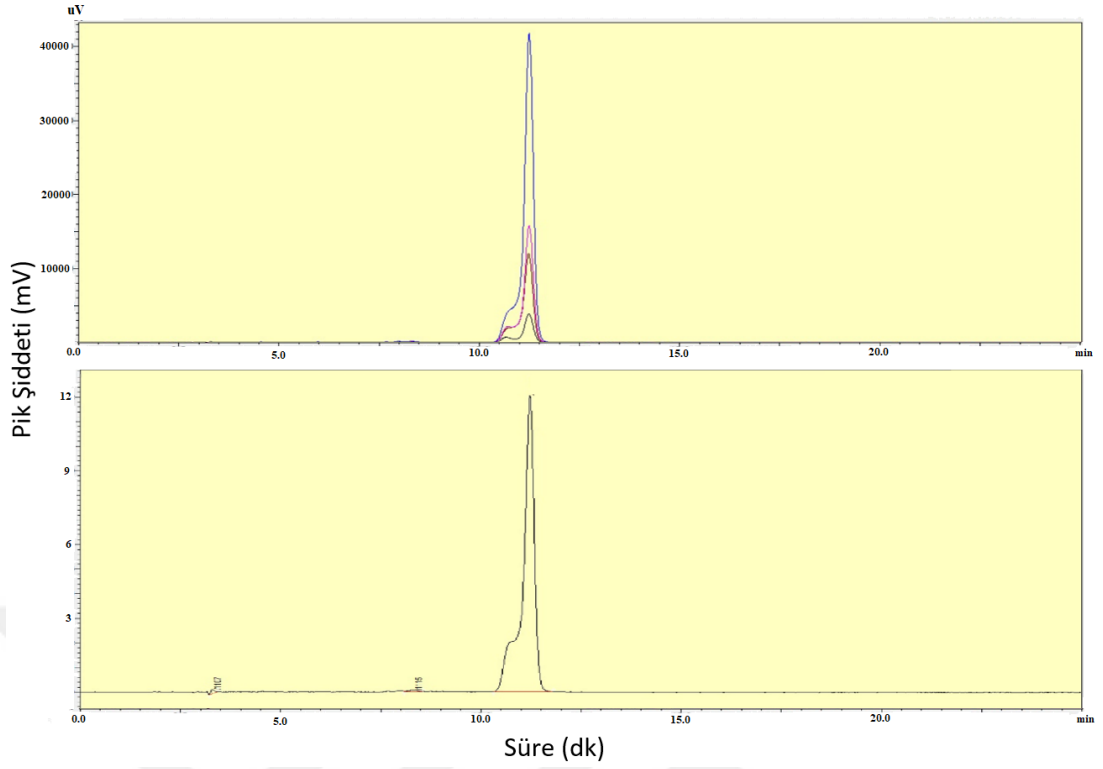
Şekil 3.18. Mikrobiyal ve Standart Beta Karoten'e ait FTIR Spektrumları

Raman analizi için mikrobiyal beta karoten ile standart beta karotenin 400-2100 cm^{-1} aralığından Parmak izi bölgesini de içine alacak şekilde raman spektrumları alınmış bölgeleri Şekil 3.19'de gösterildiği gibidir. Standart beta karotenin raman analizinde elde edilen 871, 957, 1003, 1150, 1187, 1266, 1351, 1383, 1444, 1520, 1575, 2157, 2309, 2517 ve 2670 cm^{-1} bantları beta karoten yapısındaki mevcut kimyasal gruplara ait karakteristik raman kaymalarını göstermekte olup bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile de örtüşmektedir (Tschirner vd., 2008). Bu pikler arasında 1150 cm^{-1} 'de elde edilen pik beta karotenin karakteristik C-C, 1520 cm^{-1} 'de elde edilen pik beta karotenin karakteristik C=C bant titreşimine aittir. Bunun yanı sıra 1003 cm^{-1} elde edilen pik ise bu NH₃ bağları arasındaki etkileşime ait piki ifade etmekte olup; tüm bu görülen pikler mikrobiyal üretim beta karotende de mevcuttur (Luyao vd., 2017). Ayrıca 2157, 2309 ve 2670 cm^{-1} bantları da beta karoten çözücüsü olarak kullanılan hekzana ait karakteristik raman kaymalarını göstermektedir (Wang vd., 2006). Genel olarak analizler sonucunda elde edilen raman spektrumlarındaki mikrobiyal beta karotene ait titreşimsel bantlar, standart beta karotene ait bantlar ile örtüşmekte; ancak mikrobiyal beta karotende bulunup standart beta karotende yer almayan 493, 1225 ve 1642 cm^{-1} gibi safsızlıkların neden olduğu küçük küçük şiddetli bantların da varlığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.19. Mikrobiyal ve Standart Beta Karoten'e ait Raman Spektrumları

Elde edilen FTIR ve Raman analiz sonuçlarını kromatografik bir yöntemle doğrulamak amacı ile HPLC kullanılmıştır. Mikroorganizmalardan hekzan yardımı ile geri kazanılan beta karoten ile 100, 50 ve 10 mg/L derişimdeki hekzan içerisinde çözüldürülmüş beta karotenin HPLC sonuçları Şekil 3.20 deki gibidir. Mikroorganizmalardan elde edilen beta karoten numunesinin HPLC analizinin farklı derişimlerdeki standart beta karoten örnekleri ile uyumlu olduğu gözlemlenmektedir. Ancak standart beta karotenden numunelerinden farklı olarak; mikroorganizmalardan elde edilen beta karoten numunesinin HPLC analizinde 3. ve 8. dakikalarda safsızlıklardan kaynaklanan küçük şiddetli farklı piklerin varlığında gözlemlenmiştir.



Şekil 3.20. Üretilen ve Standart Beta Karotene ait HPLC Kromotogramları

FTIR, Raman ve LC-MS/MS analizlerinden elde edilen veriler incelendiğinde; mikrobiyal yöntemler ile üretilip geri kazanım yapılan beta karoten numunesi ile standart beta karotenin birbirleriyle uyumlu sonuçlar verdikleri ve literatürdeki veriler ile örtüştüğü gözlemlenmiştir (Berezin vd., 2005; Tschirner vd., 2008; Karakaplan 2019).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Artan dünya nüfus ile beraberinde gelen gıda ihtiyacı; buna ek olarak değişen alışkanlıklarıyla pratik ve tüketime hazır gıdalara yönelim, gıda katkı maddelerinin dünya ekonomilerindeki yerini güçlendirmektedir. Ülkemizde ise gıda endüstrisinde yaşanan gelişmelere rağmen, gıda katkı maddelerinin tedariği noktasında hala büyük oranda dışa bağımlığımız söz konusu olduğu gibi yurt dışından temin edilen bu katkıların üretim proseslerinin de helalliği de tartışma konusudur. Endüstride kullanılan katkı maddelerinin pek çoğunun mikroorganizmalar aracılığı ile üretilmesi ve ülkemizin zengin endemik mikroorganizma popülasyonuna sahip olması; katkı maddelerinin ülkemizde de üretilmesinde için büyük bir potansiyel ortaya koymaktadır. Bu çalışmada da gıda endüstrisinde önemli kullanım alanlarına sahip olan sistein, glutamik asit ve beta karotenin ülkemizdeki farklı kaynaklardan izole edilen mikroorganizmalar ile üretebilirliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla, türkiyenin yedi farklı bölgesinden toplanan çeşitli gıda ve toprak numunelerinden izole edilen mikroorganizma türlerinin endüstriyel öneme sahip birer gıda katkı maddesi olan sistein, glutamik asit ve beta karoteni üretme potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İlk aşamada gıda ve toprak örneklerinden mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardından da elde edilen izolatlar belirlenen proses koşullarında inkübe edilmiş ve spektrofotometre yardımıyla sistein, glutamik asit ve beta karoten üretim kapasiteleri belirlenmiştir. Bu izolatlar arasında en yüksek üretimi gösteren izolatlar 16s rRNA analiz yöntemi ile tanımlanmıştır. Daha sonra bu izolatların en fazla üretim yaptıkları inkübasyon koşulları ve besiyeri içerikleri belirlenmiştir. Son aşamada ise elde optimize edilmiş parametreler ve besiyeri içerikleri kullanılarak bu izolatlardan sistein, beta karoten ve glutamik asit sentezlenmesi sağlanmış, üretilen gıda katkı maddeleri iyon değiştirici reçineler ve çözücüler yardımıyla besiyeri ortamından ayrıştırılarak geri kazanılmış, son aşamada

ise bu üretilen gıda katkı maddeleri FTIR, Raman, HPLC ve LC-MS/MS gibi enstrümental analiz cihazları ile analiz edilerek literatürdeki bulgular ile ve bu metabolitlerin saf ticari standartlardan elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Türkiye'nin 7 farklı bölgesinden, farklı koşullardan 37 adet toprak ve 9 adet gıda ürünü olmak üzere 46 örnek toplanmış ve bu örneklerden 262 adet mikroorganizma izole edilmiştir. Toplanan 9 gıda numunesinden 23 mikroorganizma izole edilirken; 37 toprak numunesinden ise 239 izolat elde edilmiştir.
2. Elde edilen 162 izolat pH'ı 7.5 e ayarlanmış tryptic soy broh içerisinde 48 saat süre ile 37,5 °C ve 150 rpm'de inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında her izolat ürettiği gıda katkı maddesi spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan analiz sonrasında en yüksek sistein üretimi TI.5.8.1 kodlu izolatta, en yüksek glutamik asit üretimi TK.1.4.1 kodlu izolatta ve en yüksek beta karoten üretimi G.4.3.1 kodlu izolatta olduğu gözlemlenmiştir.
3. Yapılan spektrofotometrik analiz sonucunda en yüksek gıda katkı maddesi üretimi yaptığı belirlenen izolatların 16S rRNA gen bölgesi dizilenip elde edilen kromotogram verileri NCBI gen bankasındaki veriler ile kıyaslanarak identifikasyon yapılmıştır. Yapılan analiz neticesinde en yüksek sistein üretimi izlenen TI.5.8.1 kodlu izolataın *Bacillus* sp. strain CG1, en yüksek glutamik asit üretimi izlenen TK.1.4.1 kodlu izolataın *Stenotrophomonas* sp. strain CG2 ve en yüksek beta karoten üretimi izlenen G.4.3.1 kodlu izolataın ise *Enterococcus* sp. strain CG3 olduğu tespit edilmiştir.
4. En yüksek sistein üretimi izlenen *Bacillus* sp. strain CG1'nin besiyeri içeriklerine göre sistein üretim verilerine bakıldığında ise; 5g/L glikoz, 3 g/L hayvansal pepton, 17 g/L kazein peptonu, 1 g/L malt ekstratı, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L dipotasyum fosfat, 0,5 g/L monopotasyum fosfat ve 0,25 g/L demir sülfat optimum besiyeri içeri olarak tespit edilmiştir. Bu optimum besiyer içeriği ile ve optimum proses koşulları olan pH 7,5'da, 40 °C sıcaklıkta, 175 rpm'de, 84 saat süre parametreleri ile yapılan inkübasyon neticesinden *Bacillus* sp. strain CG1'nin 4,24±0,47 g/L sistein üretebildiği tespit edilmiştir.

5. En yüksek glutamik asit üretimi izlenen *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin besiyeri içeriklerine göre glutamik üretim verilerine bakıldığında ise; 2,5 g/L glikoz, 2,5 g/L fruktoz, 3 g/L hayvansal pepton, 6 g/L soya peptonu, 1 g/L maya ekstratı, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L dipotasyum fosfat, 0,5 g/L monopotasyum fosfat, 0,25 g/L demir sülfat, 2 g/L metiyonin ve 2 g/L serin optimum besiyeri içeri olarak tespit edilmiştir. Bu optimum besiyer içeriği ile optimum proses koşulları olan pH 7'de, 30 °C sıcaklıkta, 200 rpm'de, 84 saat süre parametreleri ile yapılan inkübasyon neticesinde *Stenotrophomonas* sp. strain CG2'nin 3,76±0,65 g/L glutamik asit üretilbildiği tespit edilmiştir.
6. En yüksek beta karoten üretimi izlenen *Enterococcus* sp. strain CG3'nin besiyeri içeriklerine göre beta karoten verilerine bakıldığında ise; 2,5g/L glikoz, 2,5g/L laktöz, 8 g/L üre 3 g/L hayvansal pepton, 17 g/L kazein peptonu, 1 g/L maya ekstratı, 5 g/L sodyum klorür, 5 g/L dipotasyum fosfat, 0,5 g/L monopotasyum fosfat, 0,25 g/L magnezyum sülfat ve 2 g/L metiyonin optimum besiyeri içeri olarak tespit edilmiştir. Bu optimum besiyer içeriği ile optimum proses koşulları olan pH 8'de, 40 °C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 84 süre parametreleri ile yapılan inkübasyon neticesinde *Enterococcus* sp. strain CG3'nin 53,36±5,34 mg/L beta karoten üretilbildiği tespit edilmiştir.
7. Üretilen sistein glutamik asit ve beta karoten iyon değıştirci reçineler ve farklı çözücüler yardımı ile besiyeri yeri ortamında ayrıştırılarak kazanılmıştır. Sisteinin iyon değıştirici reçine ile saflaştırma sürecinde Dowex 50 marka katyonik iyon değıştirici reçine kullanılmış olup %64,26 verimde ayrıştırma ve geri kazanım sağlanmıştır. Glutamik asitin iyon değıştirici reçine ile saflaştırma sürecinde ise Amberlite IR 120 marka katyonik iyon değıştirici reçine kullanılmış olup %53,48 verimde ayrıştırma ve geri kazanım sağlanmıştır. Beta karotenin ayrıştırılıp geri kazanımında ise hekzanla ayrıştırma yöntemi tercih edilmiş olup %80,75 verimde ayrıştırma ve geri kazanım sağlanmıştır.
8. Mikrobiyal yöntemler ile üretilip saflaştırılan sistein glutamik asit ve beta karoten son aşamada FTIR, Raman, HPLC ve LC-MS/MS gibi enstrümental analiz cihazları ile analiz edilerek saf ticari standartları ile kıyaslanmıştır. Üretilen gıda katkı maddelerinin analiz sonuçları büyük oranda saf ticari

örnekleri ile ve literatürdeki veriler ile örtüşmektedir. Bununla birlikte, analizlerden elde edilen sonuçlarda üretilen metabolitlerin besiyeri ortamından ayrıştırılması ve geri kazanım sürecinde ekstrakte edilen metabolit ile beraber gelen bazı safsızlıklar da gözlemlenmiştir.

9. Üretim sırasında helallik anlamında riskli noktalarında biri gıda katkı maddelerinin sentezlendiği besiyeri ortamının içerikleridir. Yapılan çalışmada kullanılan besiyerleri içeriklerinde hayvansal pepton dışında tamamen bitkisel, mikrobiyal veya mineral bileşenlerden oluşturulmuştur. Hayvansal pepton olarak sığır peptonu tercih edilmiştir. Ürünün besiyeri ortamından ayrıştırılması aşamasında ise helallik açısından sorun doğurabilecek herhangi hayvansal bir bileşen veya etil alkol kullanılmamıştır. Bu kapsamda laboratuvar ölçeğinde üretilen bu metabolitlerin üretim prosesleri endüstriyel boyuta adapte edilerek helallik şartlarını sağlayacak şekilde endüstriyel olarak üretilebileceği düşünülmektedir..

Sonuç olarak bu araştırmada, Türkiye'deki çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaları kullanarak yurt dışından temin edilen sistein, glutamik asit ve beta karoten gibi endüstriyel öneme sahip gıda katkı maddelerinin aynı konuda yapılan diğer çalışmalara benzer oranda olduğu ve endüstriyel üretim için potansiyel taşıdığı gözlemlenmiş ve elde edilen önemli sonuçlar yukarıda kısaca özetlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen verilerden yola çıkarak bazı öneriler aşağıda verilmiştir:

1. Yapılan çalışmada gıda katkı maddesi niteliğindeki metabolitleri üreten mikroorganizma suşları izole edilmiştir. Ancak, bu suşlar kullanılarak doğrudan ticari üretim yapılabilmesi için ileri düzeyde bazı araştırma ve geliştirme çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç vardır. Öncelikli olarak, ticari mikrobiyal gıda katkı maddesi üreten suşlar incelendiğinde genel olarak genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalar karşımıza çıkmaktadır. Doğal ortamlarından izole edilen suşlar herhangi bir maddeyi fazla üretmeye başladığında, kendini korumak adına üretimi inhibe eden metabolik fonksiyonlarını devreye almaktadır. Yapılacak genetik modifikasyonlar ile ilgili inhibe edici metabolik fonksiyonlar ortadan kaldırılarak mikroorganizmanın yüksek miktarlarda gıda katkı maddesi üretmesi sağlanabilmektedir. Bu kapsamda gelecek çalışmalarda; gıda katkı maddesi

Üretim potansiyeli belirlenen bu üç mikroorganizmanın genetik modifikasyon çalışmaları yapılarak ticari olarak kullanılabilir nitelikler kazandırılabilir.

2. Bu tezde elde edilen sonuçlara değerlendirildiğinde izole edilen suşların endüstriyel oranda sistein, glutamik asit ve beta karoten üretimi için kullanılma potansiyeli olduğu söylenbilir. Ancak gelecek çalışmalarda numune sayısı ve çeşitliliği arttırarak daha geniş kapsamlı bir tarama yapılarak ilgili gıda katkı maddelerini daha yüksek verimde ve daha düşük maliyetli proses koşullarında üreten mikroorganizmalar tespit edilebilir.
3. Yapılan çalışmada sabit miktarlar farklı karbon, azot ve mineral kaynakları kullanılarak ilgili gıda katkı maddelerinin üretim değerleri optimize edilmiştir. Gelecek çalışmalarda ilgili gıda katkı maddelerinin moleküler özelliklerine göre bu karbon, azot ve mineral kaynakları çeşitlendirilerek üretim verimi arttırılabilir. Aynı şekilde gelecek çalışmalarda kullanılan veya yeni belirlenecek karbon, azot ve mineral kaynaklarının besiyeri içerisindeki oranları optimize edilerek ilgili gıda katkı maddesi üretim verimi arttırılabilir.
4. Yapılan besiyeri optimizasyonu neticesinde elde edilen veriler baz alınarak gelecek çalışmalarda; çeşitli gıda proses atıkları veya yan ürünleri sistein, glutamik asit ve beta-karoten üretiminde kullanılabilir. Bu durum gıda atıkları için çevreci ve katma değer üreten bir çözüm olurken, ilgili gıda katkı maddelerinin üretimi için ekonomik ve sürdürülebilir bir hammadde kaynağı sağlayabilir.
5. Yapılan çalışmada üretilen gıda katkı maddelerinin besiyeri ortamından ayrıştırılarak geri kazanılmasında iyon değiştirici reçineler ve çeşitli çözücüler kullanılarak literatürde rapor edilen verilerle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ilgili gıda katkı maddelerinin endüstriyel boyutta piyasa ile rekabet edebilecek ekonomik koşullarda üretim yapılabilmesi için ayırma ve saflaştırma adımları optimize edilerek saflık ve geri kazanım oranlarının arttırılmasına ihtiyaç vardır. Bu kapsamda gelecek çalışmalarda ilgili gıda katkı maddelerinin ayırma saflaştırma süreçleri ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak saflık değerlerinin ve geri kazanım oranlarının arttırılması endüstriyel üretim için oldukça değerli olacaktır.

6. Gelecek çalışmalarda mikrobiyal yöntemler ile üretilen bu gıda katkı maddelerinin in vitro ve in vivo testlerinin yapılarak toksisitesi olmadığından ve insan sağlığı için zararlı bileşenler içerip içerilmediği araştırılarak güvenilirliğini kanıtlayacak çalışmaların yapılması önerilmektedir.
7. Çalışma kapsamında elde edilen veriler kullanılarak gelecek çalışmalarda ilgili gıda katkı maddelerinin mikroorganizmalar kullanılarak yerli imkanlar ile üretimine yönelik fayda, toplam maliyet ve kazanç değerleri hesaplamalarına yönelik çalışmalar yapılması önerilmektedir.
8. Çalışma kapsamında ayrıca çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmalar ile küçük çapta bir mikroorganizma koleksiyonu oluşturulmuş olup; bu koleksiyon, gelecekte farklı kaynaklardan izole edilecek mikroorganizmalar ile zenginleştirilerek farklı endüstriyel ürünlerin ülkemizde mikrobiyal prosesler ile üretimine yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere alt yapı sağlanabilir. Başta gıda katkı maddeleri olmak üzere çeşitli endüstriyel metabolitlerin, dünyadaki pazar payı ve ülkemizin bu alandaki dışa bağımlılığı göz önünde bulundurulduğunda; ileriki çalışmalarda daha farklı çevre koşullarından ve daha fazla doğal kaynaktan mikroorganizma izolasyonu sağlanıp bu izolatlarında farklı endüstriyel metabolitleri üretme potansiyelleri incelenerek, ülkemizin bu alanda kendi kaynakları ile üretim yapmasına olanak sağlanabilir. En iyi üretme yeteneğine sahip suşların rekombinant DNA teknolojisi gibi moleküler teknikler kullanılarak üretim yeteneklerinin artırılması çalışmaları yapılabilir. Aynı şekilde, üretimden sorumlu genlerin ticari konakçı hücrelere klonlama çalışmaları ile bu gıda katkı maddelerini yüksek verimde üretimi ve ülkemize özgü patentlenmesi de mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Açıköz, G. (2017). *Raman Spektroskopisi ve Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Sers) Tekniklerinin Adli Tıp Uygulamalarındaki Üstünlüklerinin İncelenmesi* (Doktora Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Adeogun, M., Omotayo A., Oderinde O. and Amund O. (2017). A Study of Naturally-occurring L-glutamic Acid Producing Bacteria From Tropical Soil and Aquatic Environments. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, Microbiology*, 9:57-63.
- Ahmed, Y.M., Khan, J.A., Abulnaja K.A and Al-Malki A.L. (2013). Production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* using dates syrup as carbon source. *African Journal of Microbiology Research*, 7: 2071-2077.
- Aksan, E. (2005). *Çeşitli Mayalardan Karetonoid Elde Edilmesi ve Sucukta Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Arastırılması* (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Ali, N., Shakoori, F.R. and Shakoori, A.R (2011). Improvement in Cysteine Production by Local Bacterial Isolates. *Pakistan Journal Of Zoology*. 43: 805-808.
- Altun, H., (2014). *Gıda Materyallerinde Spektrofotometrik Yöntemlerle Çok Bileşenli Yapay Tatlandırıcıların Birarada Tayinleri* (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Alvarez, R., Vaz, B., Gronemeyer H. and Lera A.R. (2014). Functions, Therapeutic Applications, And Synthesis Of Retinoids And Carotenoids. *Chemical Reviews*, 114: 1–125.
- Barnas, E., Skret-Magierlo, J., Skret, A., Kaznowska, E., Depciuch, J., Szmuc, K., Łach, K., Krawczyk-Marć, I. and Cebulski, J. (2020). Simultaneous FTIR and Raman Spectroscopy in Endometrial Atypical Hyperplasia and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 21:4828.

- Arslan, A. (2016). *Un ve Unlu Mamullerde L-Sistein Tespitine Yönelik Kromatografik Ve Spektroskopik Metotların Geliştirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- Arslan, G. (2011). *Gıda Katkı Maddeleri ve Yeni Yapılan Dioksimlerin Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılabilirliğinin İncelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya.
- Aran, N. (2009). *Gıda Biyoteknolojisi* (5. Baskı), Nobel, Ankara, 2014.
- Aslan, K. (2018). *UV Mutajenez Yöntemini Kullanarak S.Cerevisiae Mayasında Beta Karoten Ve Likopen Miktarının Artırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara.
- Aslan M. (2016). *Gıda Biyoteknolojisi*, Nobel, 1. Baskı, Çevre ve Şehircilik Bakanlığı.
- Atkins, P., & Bowler, I. (2001). *Food in Society* (1st ed.). New York. USA: Oxford University Press.
- Atlı, B. (2019). *Gıda Boyaları* (Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Ault, A. (2004). The Monosodium Glutamate Story: The Commercial Production of MSG and Other Amino Acids. *Journal of Chemical Education*, 81(3): 347.
- Baruah, G.L., Venkiteshwaran, A. and Belfort, G. (2005). Global model for optimizing crossflow microfiltration and ultrafiltration processes: A new predictive and design tool. *Biotechnol Progress*, 21: 1013–1025.
- Barut, İ. (2015). *Ankara’da Tüketime Sunulan Hazır Çorbalarda Hplc Yöntemi ile Monosodyum Glutamat Miktarlarının Araştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Analizleri ve Beslenme Anabilim Dalı, Ankara.
- Barth, M.M., Zhou, C., Kute, K.M. and Rosenthal, G.A. (1995) Determination Of Optimum Conditions For Supercritical Fluid Extraction Of Carotenoids From Carrot (*Daucus carota* L.) Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43:2876-2878.

- Berezin, K.V. & Nechaev, V.V. (2005). Calculation of the IR Spectrum and the Molecular Structure of Beta-Carotene. *Journal of Applied Spectroscopy*, 72: 164–171.
- Bentley, R. & Bennett, J.W. (2008). A Ferment Of Fermentations: Refl Ections On The Production of Commodity Chemical Using Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 63: 1–32.
- Bhosale, P. & Gadre, R. (2002). Production of B-Carotene by A Mutant Of *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiol Biotechnoly*, 55: 423–427.
- Bilgin, O., Carlı, U., Erdoğan, S., Maviş, M., Gürsu G. ve Yılmaz M. (2018). Karadeniz’de (Sinop Yarımadası Civarı) Avlanan İzmarit Balığı, *Spicara smarıs* (Linnaeus, 1758), Etinin LC-MS/MS Kullanarak Amino Asit İçeriğinin Tespiti ve Ağırlık-Boy İlişkisi, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 6(2): 130–136.
- Bin, P., Huang, R. ve Zhou, X., (2017) Oxidation Resistance of the Sulfur Amino Acids: Methionine and Cysteine, *BioMed Research International*.
- Bojanić, V., Bojanić, Z., Najman, S., Savić, T., Jakovljević, V., and Jancić, S. (2009). Diltiazem Prevention of Toxic Effects of Monosodium Glutamate on Ovaries in Rats. *General Physiology and Biophysics*, 28: 149–154.
- Black, H. (2004). Pro-Carcinogenic Activity Of -Carotene, A Putative Systemic Photoprotectant. *Photochemical Photobiology Science*, 3: 753–758.
- Bloukas, J.G., Arvanitoyannis, I.S. and Siopi, A.A. (1999), Effect Of Natural Colourants And Nitrites On Colour Attributes Of Frankfurters. *Meat Science*, 52(3), 257-265.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (1996). Carotenoids. *Springer Science & Business Media, Birkhauser*, 2: 1–26.
- Büyüksırt, T. & Kuleasan, H. (2014). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisinin Gıda Analizlerine Uygulanması. *Gıda* 21, 39 (4): 235-241.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P. and Ferreira I. (2014). Adding Molecules To Food, Pros And Cons: A Review of Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 377-399.

- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. and Koziel, M.G. (1991) Prediction of Insecticidal Activity of Bacillus Thuringiensis Strains By Polymerase Chain Reaction Product Profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3057-306.
- Carvalho, D.J., Medeiros, A.B., Vandenberghe, L.P. and A.I. Magalhães A.I. (2017). Approaches for the Isolation and Purification of Fermentation Products. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 34: 783-805.
- Çebi, N. (2018). *Helal Gıda Kapsamında Yumuşak Şekerlemelerde Jelatin Kökeninin Tespitinde Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Metot Validasyonu* (Doktora Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.
- Cebi, N., Dogan, C.E., Olgun, E. O. and Sagdic, O. (2018). A Survey of Free Glutamic Acid in Foods Using a Robust LC–MS/MS Method. *Food Chemistry*, 248:8–13.
- Çebi, N., Öztürk, T., Doğan, C.E. and Sağdıç, O. (2020). Evaluation Of Raman Microscopy For The Detection Of Additional Monosodium Glutamate İn Dry Soup Mix. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 12: 1-10.
- Chattopadhyay, S.P. & Banerjee, A.K. (1978). Production of L-glutamic Acid by *Bacillus* sp. *Folia Microbiol* 23: 469–480.
- Chemicalceo, (2015). Glutamik Asit Kullanım Alanları, <https://chemicalceo.com/tag/glutamik-asit-kullanim-alanlari>, [09.09.2020].
- Chisti, Y. & Moo-Young, M. (1986). Disruption of Microbial Cells for Intracellular Products. *Enzyme and Microbial Technology*, 8: 194–204.
- Clinton, S. K, & Giovannucci, E. (1998). Diet, Nutrition and Prostate Cancer. *Annual Review of Nutrition*, 18(1), 412-440.
- Çayıroğlu, Y. (2013). *İslâm Hukuku'na Göre Helâl Gıda Sorunu* (Doktora Tezi). Marmara Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Temel İslam Bilimleri Anabilim Dalı, İslam Hukuku Bilim Dalı, İstanbul.
- Çelik, M., (2009). *Plazma/Serumda Toplam Homosistein Miktarının ESI-LC-MS/MS Yöntemiyle Ölçülmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Gebze.

- Demirdöğen, E. (2011). *Tekstil Fabrikası Atık Sularından Mikroorganizma İzolasyonu Ve Biosümfektan Üretimi* (Yüksek Lisans Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Dhamelincourt, P. & Ramirez, F.J. (1991). Polarized micro-Raman and Fourier Transform Infrared Spectra of L-glutamic Acid. *Journal of Raman Spectroscopy* 22: 577-582.
- Dhillon, G.S., Takagi, H. and Ohtsu, I. (1986) Microbial Process for Lcysteine Production. *Enzyme and Microbial Technology* 9: 277-280.
- Dinç, B, (2012). *Lezzet Arttırıcı Maddeler* (Yüksek Lisans Tezi). Tekirdağ Namik Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Duong, V.C., Nam V.H. and Huyen T.H. (2017). Enhanced β -Carotene Biosynthesis in Recombinant Escherichia Coli Harboring the Bottom Portion of Mevalonate Pathway of *Enterococcus Faecium* VTCC-B-935 Isolated in Vietnam. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*. 3:10.
- Duran, N. (2017). *Gıdalarda Lezzet Arttırıcı Olarak Kullanılan Monosodyum Glutamat (MSG) ve Ribonükleotidlerin (GMP/IMP) Allium Cepa L. Türü Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale.
- Erdem, N. (2014). *Tüketicilerin Hazır ve Yarı Hazır Gıdalarda Kullanılan Gıda Katkı Maddelerine Yönelik Görüşlerinin İncelenmesi (Konya İli Örneği)* (Yüksek Lisans Tezi). Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Çocuk Gelişimi ve Ev Yönetimi Eğitimi Anabilim Dalı, Konya.
- Erişik, E. (2012). *1-12 Yaş Arası Çocuğu Olan Annelerin Çocuk Beslenmesi Ve Gıda Katkıları Konusunda Bilgi ve Davranışa Yönelik Tutumlarının Belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- Ermis, E. (2017). Halal Status of Enzymes Used in Food Industry. *Trends in Food Science & Technology* 64: 69-73.
- Ertugay, Z. (1982). *Buğday, Un ve Ekmek Arasındaki Kalite İlişkileri*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt ve Gıda Teknolojisi Bölümü.

- Erzi, N, (2019). *Karotenoid Üreten Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu* (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Fleck, M. & Petrosyan, A. M. (2014). *Salts of amino Acids: Crystallization, Structure and Properties*. Springer, 16.
- Freeman, M. (2006). Reconsidering the Effects Of Monosodium Glutamate: A Literature Review. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 18(10), 482-486.
- Gminsights, (2020). Glutamic Acid and Monosodium Glutamate (MSG) Market Size, Potential, Industry Outlook, Regional Analysis, Application Development, Competitive Landscape & Forecast, 2020 – 2026. [www.gminsights.com/industry-analysis/ glutamic-acid-and monosodium-glutamate-msg-market](http://www.gminsights.com/industry-analysis/glutamic-acid-and-monosodium-glutamate-msg-market), [13.07.2020].
- Gul, H., Abdul, A.H and Younis, N. (2012). Fermentative Production of Glutamate by Newly İsolated Soil Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(6):1368-1376.
- Güler, N. (2020). *Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (Pah) Ekstraksiyonu Ve Hplc İle Tayinleri* (Yüksek Lisans Tezi). Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Bilim Dalı, Manisa.
- Gündüz, H. (2009). *Gıda Katkı Maddeleri ve Riskleri*, VI. İslâm Hukuku Anabilim Dalı Koordinasyon Toplantısı ve İslam Fıkhı Açısından Helâl Gıda Sempozyumu, Bursa: Emin Yayınları.
- Gündüz, T. (2002). *İnstrümental Analiz* (6. Baskı), Gazi Kitabevi, Ankara, s. 1357.
- Güven, Ü. (2014). *İzole edilen toprak bakterileri tarafından üretilen ksilanaz, proteaz, lipaz, lakkaz ve alfa amilaz enzimlerinin kısmi saflaştırılmaları ve karakterizasyonları* (Yüksek Lisans Tezi). Fatih Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı, İstanbul.
- Haas, T. (2009). White Biotechnology. (R. Höfer, Editör). In: Sustainable Solutions for Modern Economies. *The Royal Society of Chemistry*, 4: 436-479.
- Hacking, J. (1987). *Economic Aspect of Biotechnology*, Cambridge University Press

- Hammaddeleransiklopedisi, (2013). Beta Karoten Nerelerde Kullanılır. <http://www.hammaddeleransiklopedisi.com/makale-detay.php?seo=beta-karoten-nerelerde-kullanilir>, [29.07.2020].
- Harpaz, S., Moshe R., Shoshana, A. and Natan, G. (1998). The Effect Of Three Carotenoid Sources on Growth And Pigmentation of Juvenile Freshwater Crayfish *Cherax Quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*, 4(3): 201-208.
- Hart, D.J. & Scott, K.J. (1995). Development and Evaluation of An HPLC Method For the Analysis of Carotenoids in Foods, and The Measurement Of The Carotenoid Content of Vegetables and Fruits Commonly Consumed In The UK. *Food Chemistry*, 54:101–111.
- Hashim, Y., Izzah, I., Parveen, J., Rashidi, O. and Hamzah, S. (2014). Production of Cysteine: Approaches, Challenges and Potential Solution. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3: 95-101.
- Hilbrig, F. & Freitag, R. (2003). Protein purification by affinity precipitation. *Journal of Chromatography B*, 790: 79–90,
- Hubbich, J., Thommes, J. and Kula, M. (2005). Expanded Bed Adsorption – Biochemical Engineering Aspects. *Advances in Biochemical Engineering*, 92: 101–123.
- Hubbich, J. & Kula, M. (2007). Isolation and Purification of Biotechnological Products. *Journal of Non-equilibrium Thermodynamics*, 32: 99-127.
- Ichiyama, S., Shimokata, K. and Tsukamura M. (1989). Carotenoid pigments of genus *hodococcus*. *Microbiol Immunology*, 33(6): 503-508.
- Igoe, R. (2011). *Dictionary of Food Ingredients* (4. Baskı). Springer, Boston, MA.
- Iriani, M., Rodriguez-Amaya D.B. and Scamparini A. (2008). Carotenoids of Yeasts Isolated from Brazilian Ecosystem. *Food Chemistry*, 150.
- Ivanov, K., Assena, S., Danka, O. and Luciano, S.(2013). Biotechnology in the Production Of Pharmaceutical Industry Ingredients: Amino Acids. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27 (2): 3620-3626.
- Jyothi, A., Sasikiran, K., Nambisan, B. and Balagopalan, C. (2005). Optimisation of Glutamic Acid Production from Cassava Starch Factory Residues Using *Brevibacterium divaricatum*. *Process Biochemistry*, 40: 3576-3579.

- Kabischt, G. & Klose, M. (1978). A Raman Spectroscopic Study of Aqueous and Methanolic Tetramethylammonium Chloride Solutions. *Journal of Raman Spectroscopy* 7: 311–315.
- Kahyaoglu, M & Kıvanç, M. (2007). Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 17 (2): 61-66.
- Karahalil, E. (2020). Principles Of Halal-Compliant Fermentations: Microbial Alternatives for the Halal Food Industry. *Trends in Food Science & Technology*, 98: 1-9.
- Karakaplan, M. (2019). *Nar, ayva ve elma sularında fenolik bileşiklerin HPLC ve LC MS/ MS ile incelenmesi* (Doktora Tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Kaya, İ. (2011). *İstanbul’ Da Bir İlçede Gıda Katkı Maddesi İçeren Bazı Besinlerin Tüketiminin ve Sağlığa Etkilerinin Araştırılması: Gıdaların Risk Analizi* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul.
- Kebede, B. & Abate, D. (2016). Roduction o f L- Glutamic Acid From Wild Bacterial Isolates From Soil Using Batch Fermentation. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (11): 1103-1114.
- Kim, J.H., Kim, S.W., Nguyen, D., Yang, J.K. and Chung, I.Y. (2009). Production of B-Carotene by Recombinant *Escherichia Coli* with Engineered Whole Mevalonate Pathway in Batch and Fed-Batch Cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 559.
- Kimmel, H.S. & Saifer, A. (1969). Infrared spectra of related dipeptides, *Analytical Biochemistry*, 32 (1): 1-9.
- Kobayashi, S. & Ueda, Y. (2013). Comparing Protein A Resins For Monoclonal Antibody Purification. *BioPharm International* 12:28-31.
- Kodal, S.P. (2020). *Narenciye Atıklarından Gıda Katkı Maddesi Üretimimin Mikrobiyal Üretim ile Karşılaştırılması Olarak Değerlendirilmesi* (DoktoraTezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

- Kohlmeier, M. (2003). Nutrient Metabolism: Structures, Functions, and Genetics. Academic Press, 272-277.
- Konak, Ü.İ., Turhan, İ. and Certel, M. (2014). Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflastırılması. *Akademik Gıda*, 12 (2): 79-87.
- Kuandykova, G. (2020). *Bazı Aminoasitlerin Schiff Bazı ile Türevlendirilerek Hplc ile Tayin* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Kumar, A., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B. (2003) Precipitation of Proteins: Nonspecific and Specific, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 27: 225–275.
- Kumar, R., Vikramachakravarthi, D. and Pal, P. (2014). Production and Purification of Glutamic Acid: A Critical Review Towards Process Intensification. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 81(10):1016.
- Küçüköner, E, (2011). “*Helal Gıda Sertifikasyonunda Gıda Katkı Maddelerinin Yeri*”. I. Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi (Ankara, 19-20 Kasım 2011). Ed. Fatih Gültekin. 34-44. Ankara: Pozitif Tanıtım.
- Lanzilotta, A.D. & Mcquillan, A. (2000). An in situ Infrared Spectroscopic Study of Glutamic Acid and of Aspartic Acid Adsorbed on TiO₂: Implications for the Biocompatibility of Titanium. *Journal of Colloid and Interface Science*: 227. 48-54.
- Lee, D.S., Pitari, G., Volker, G., Gierens, K. and Penner, j. (2010). Transport impacts on atmosphere ve climate: aviation. *Atmospheric Environment*. 44:4678–734.
- Lee, E.K. & Kim, W.S., (2003). Protein Crystallization for Large-Scale Bioseparation, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 27: 277–320.
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. and Drauz, K. (2005). Biotechnological Production of Amino Acids and Derivatives: Current Status and Prospects. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 69 (1): p.1-8.
- Lopes, D., Junior, J., Reis, L. and Macedo, G. (2017). Microbial Production of Added-Value Ingredients. *State of the Art*, 10:1016.
- Luyao, L., Shi, L., Secor, J., and Alfano, R. (2017). Resonance Raman Scattering of B-Carotene Solution Excited by Visible Laser Beams into Second Singlet State. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 8: 179.

- Maccarrone, M. & Ullrich, V. (2004). Redox Regulation in Disease and Ageing. *Cell Death and Differentiation* 11: 949–951.
- Majzoobi, M., Farahnaky A., Jamalian, J. and Radi, M. (2011). Effects Of L-Cysteine on Some Characteristics Of Wheat Starch. *Food Chemistry*, 124 (3): 795-800.
- Marketdataforecast, (2020). Global Beta Carotene Market- Segmented By Application. www.marketdataforecast.com/market-reports/beta-carotene-market, [30.07.2020].
- Marketwatch, (2020). Global Cysteine Market 2020 Top countries data Industry Size, Share, Business Growth, Revenue, Trends, Market Demand Penetration and Forecast to By 360 Market Updates, <https://www.marketwatch.com/press-release/global-cysteine-market-2020-top-countries-data-industry-size-share-business-growth-revenue-trends-market-demand-penetration-and-forecast-to-by-360-market-updates-2020-09-22?tesla=y>, [02.10.2020].
- Mateles, R. (1979). ‘*The Physiology of Single-Cell protein (SCP) production*’. In Microbial Technology: Current State, Future Prospects, A.T. Bull, D.C. Ellwood & C. Ratledge (eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 29–52.
- Middelberg, A.P.J. (1998). *The Release of Intra-Cellular Bioproducts. Bioseparation and Bioprocessing* (2. Edition), Wiley VCH, Weinheim.
- Mohamed, T., & Mohd, J. (2012). Issues in Halal Packaging: A Conceptual Paper. *International Business and Management*, 5 (2): 94-98.
- Moosavi, N.M., Izadi, M. and Hosseinpour, S. (2010). Glutamic Acid Production from Potato by *Brevibacterium linens*. World Academy of Science, Engineering and Technology, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 4: 610-612.
- Muller, E., (2005). Properties and Characterization of High Capacity Resins for Biochromatography. *Chemical Engineering & Technology*., 28: 1295–1305.
- Mutlu, N. (2015). *Çevresel Örneklerden Listeria Monocytogenes’e Özgü Faj İzolasyonu ve Genotipik Karakterizasyonu* (Doktora Tezi). Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kars.
- Nampoothiri, K. & Pandey A. (1999). Fermentation And Recovery of L-Glutamic Acid from Cassava Starch Hydrolysate by Ion-Exchange Resin Column. *Revista de Microbiologia*, 30(3), 258-264.

- Niessena, W.M.A. & Tinkeb, A. (1995). Fluid Chromatography-Mass Spectrometry General Principles and Instrumentation. *Journal of Chromatography*, 703: 37-57.
- Nur, I., Yumi, Z.H. and Jamal, P., (2014). “Production of Cysteine: Approaches, Challenges and Potential Solution”, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3: 95-101.
- Ohmachi, T., Nishino, M., Kawata, M., Edo, N., Funaki, H., Narita, M., Mori, K., Tamura, Y. and Asada, Y. (2002). Identification, Cloning, and Sequencing of the Genes Involved in the Conversion of D,L-2-amino- Δ^2 -thiazoline-4-carboxylic Acid to L-Cysteine in *Pseudomonas* sp. strain ON-4a. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66 (5): 1097-1104.
- Özkan, H. (2011). *Hanefî Mezhebinde Helal Gıda Kriterleri* (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Temel İslam Bilimleri Anabilim Dalı, Çanakkale.
- Pandey R.M. & Upadhyay S.K. (2012). *Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy* (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6,
- Parker S.F., (2013). Assignment of the Vibrational Spectrum of L-Cysteine, *Chemical Physics*, 424:75-79.
- Pawlukojć, A., Leciejewicz, J., Ramirez-Cuesta, A. J. and Nowicka-Scheibe, J. (2005). L-Cysteine: Neutron spectroscopy, Raman, IR and AB Initio Study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(11–12), 2474-2481.
- Peica, N., Lehene, C., Leopold, N., Schlücker, S. and Kiefer, W. (2007). Monosodium Glutamate in its Anhydrous and Monohydrate form: Differentiation by Raman Spectroscopies and Density Functional Calculations. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 66: 604–615.
- Quijano O.N., Fuenmayor, C., Zuluaga-Domínguez, C., Díaz-Moreno, A., Ortiz, S., García M., Maribel and Grassi, S. (2020). FTIR-ATR Spectroscopy Combined with Multivariate Regression Modeling as a Preliminary Approach for Carotenoids Determination in *Cucurbita* Sp. *Applied Sciences*. 10:3722.
- Radomska, L. & Harasym, J. (2018). β -Carotene—Properties and Production Methods. *Food Quality and Safety*, 2(10):1093.

- Rathinam R., Shanmugam H. and Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 517-23.
- Rebecca, J. Sharmila, D., Das, M.P. and Seshiah, C. (2014). Extraction and Purification of Carotenoids from Vegetables. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6: 594-598.
- Renneberg, R., (2016). *High Grade Cysteine no Longer has to be Extraxted from Hair*. Biotechnology for Beginners, Academic Press.
- Rizzoli R., Bonjour J.P. and Ferrari S.L. (2001). Osteoporosis, Genetics and Hormones. *Journal of Molecular Endocrinology*, 26: 79–94.
- Rogers P.J. & Blundell J.E. (1990) Umami And Appetite: Effects of Monosodium Glutamate on Hunger and Food İntake in Human Subjects. *Physiology & Behavior*; 48:801-804.
- Ruffer, N., Heidersdorf, U., Kretzers, I., Sprenger, G. A., Raeven, L. and Takors, R. (2004). Fully Integrated L-Phenylalanine Separation and Concentration Using Reactive-Extraction with Liquid–Liquid Centrifuges in A Fed-Batch Process With *E. Coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26: 239–248.
- Ruzanna, M., (2007). L-cysteine Another Pandora’s Box. *The Halal Journal*, 40-43.
- Stahl, W. & Sies, H. (1996). Lycopene: A Biologically Important Carotenoid For Humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 1-9.
- Sadamlı, I. & Temiz, A. (2014). *Amino Asitler, Peptitler, Proteinler*. *Gıda Kimyası* (4 Baskı). Ankara. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, s. 247.
- Saygılı, M. (2019). *Helal Ürün Farkındalığı ve Satın Alma Niyeti İlişkisi Üzerine Bir Araştırma* (Doktora Tezi). Sakarya Üniversitesi, İşletme Enstitüsü, İşletme Anabilim Dalı, Sakarya.
- Seong, A., Jongsung, K. and Ankireddy, R. (2015). Selective Detection of Dopamine in the Presence Of Ascorbic Acid via Fluorescence Quenching of Inp/Zns Quantum Dots. *International Journal of Nanomedicine*. 10: 113.
- Seviour, R., Harvey, L.M., Fazenda, M. and Mcneil, B. (2013). Production of Foods and Food Components by Microbial Fermentation: An Introduction. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* 97-124.

- Shakoori, R., Butt, A., Ali, N., Zahid, M.T., Rehman, A. and Shakoori, A. (2012). Optimization of Fermentation Media for Enhanced Amino Acids Production by Bacteria Isolated from Natural Sources. *Pakistan Journal Of Zoology*, 44: 1145-1157.
- Shao, J.H. & Zydney, A.L. (2004). Retention of Small Charged Impurities During Ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 87: 7–13.
- Shyamkumar, R., Moorthy, I. M., Ponmurugan, K. and Baskar, R. (2014). Production of L-glutamic Acid with *Corynebacterium glutamicum* (NCIM 2168) and *Pseudomonas reptilivora* (NCIM 2598): A Study on Immobilization and Reusability. *Avicenna Journal Of Medical Biotechnology*. 6: 163-168.
- Specialchem, (2020). Cosmetics Ingredients Containing Glutamic Acid. <https://cosmetics.specialchem.com/inci/glutamic-acid>, [02.10.2020].
- Soyseven, M. (2018). *Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Monosodyum Glutamatın Çeşitli Gıda Maddelerinin İçindeki Miktarının Tayini* (Doktora Tezi). Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Çanakkale.
- Stanbury, P.F, Whitaker A. and Hall, S. J. (1995). *Principle of Fermentation Technology*, 2. Baskı, Pergamon Press, Oxford.
- Sui, X., Kiser, P.D., Lintig, J. and Palczewski, K. (2013, November). Structural Basis of Carotenoid Cleavage: From Bacteria to Mammals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 203–213.
- Sun, Y., Cai, Y., Huse, S. M., Knight, R., Farmerie, W. G., Wang, X. and Mai, V. (2011). A Large-Scale Benchmark Study of Existing Algorithms for Taxonomy-Independent Microbial Community Analysis. *Brief Bioinform* 13:107- 121.
- Szterk, A., Sosińska E., Obiedziński M. and Lewicki P. (2008). Metoda Otrzymywania Preparatu Naturalnego &- Î ß-Karotenu Z Marchwi. *Food Science Technology Quality*. 4: 269–274.
- Şener, M. (2006). *İçme sularında kalsiyum ve magnezyumun spektrofotometrik metotla simultane tayini ve yapay sınır ağları ile kemometrik analizi* (Yüksek Lisans Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Isparta.

- Şimşek, N. (2019). *Çeşitli Ortamlardan L-Sistein Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Tanımlanması ve L-Sistein Üretim Miktarlarının Saptanması* (Yüksek Lisans Tezi). Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Hatay.
- Takagi, H. & Ohtsu, I., (2017). L-Cysteine Metabolism and Fermentation in Microorganism. *Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology*, 79: 130-147.
- Takagi, H., Awano, N., Kobayashi, S., Noji, M., Saito, K., and Nakamori, S. (1999). Overproduction of L-Cysteine and L-Cystine by Expression of Genes for Feedback Inhibition-Insensitive Serine Acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 179 (2):453-9.
- Takumi, K., Ziyatdinov, M. K., Samsonov, V. and Nonaka, G. (2017). Fermentative Production of Cysteine by *Pantoea ananatis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5): 2502-16.
- Temple, N.J. & Basu, T.K. (1988). Does B-Carotene Prevent Cancer? A Critical Appraisal. *Nutrition Research*, 6: 685- 701.
- Thangakani, J., Rajendran, S., Sathiabama, J., Rathish, J. and Prabha, S. (2015). Inhibition of Corrosion of Carbon Steel in Well Water by L-Serine-Zn²⁺ system. *Portugaliae Electrochimica Acta*. 7: 35-46.
- Tozkoparan B. & Aytaç S. (2007), Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutasyon S-Transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27(2) :139-164.
- Tschirner, N., Schenderlein, M., Brose, K., Schlodder, E., Mroginski, A., Hildebrandt, P. and Thomsen, C. (2008). Raman Excitation Profiles of B-Carotene – Novel Insights into the Nature of the N1-Band. *Physical Status Solidi*, 245 (10): 2225–2228.
- Türker, S. (2020). Helal ve Güvenilir Gıda. *Journal of Halal and Ethical Research*, 2 (1): 85-97.
- Valduga, E., Arthur R., Cence, K., Colet, R., Tiggemann, L., Zeni, J. and Toniazzo, G. (2013). Carotenoids Production from A Newly Isolated *Sporidiobolus pararoseus* Strain Using Agroindustrial Substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(10):10-16,

- Voisard, D., Meuwly, F., Ruffieux, P. A., Baer, G. and Kadouri, A. (2003). Potential of Cell Retention Techniques for Large-Scale High-Density Perfusion Culture of Suspended Mammalian Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, 82: 751–765.
- Wada, M., Awano, N., Haisa, K., Takagi, H. and Nakamori, S. (2002). Purification, Characterization and Identification Of Cysteine Desulphydrase Of *Corynebacterium glutamicum*, and Its Relationship to Cysteine Production. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 103-107.
- Wada, M., & Takagi, H., (2006). Metabolic Pathways and Biotechnological Production of L-cysteine. *Applied Microbiology Biotechnology*, 73 (1): 48–54.
- Walton, H.F. & Reyes, J. (1983). *Análisis Químico e Instrumental Moderno*, (1st edition). Reverté: Barcelona, Spain, 229.
- Wang, B., Lin, L., Lu, L. and Chen, W. (2012). Optimization of B-Carotene Production by a Newly Isolated *Serratia marcescens* Strain. *Electronic Journal of Biotechnology*. 15(6) :3-3.
- Wang, H., Hai-Fei, Z. and Qiang, S. (2006). Raman Spectroscopic Studies of the Phase Transitions in Hexane at High Pressure. *Applied Spectroscopy*, 59: 1498-5000.
- Wang, P., He, J.Y. and Yin, J.F. (2015). Enhanced Biocatalytic Production of L-Cysteine by *Pseudomonas* Sp. B-3 with in Situ Product Removal Using Ion-Exchange Resin. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38: 421–428.
- Wirtz, M., & Droux, M., (2005). Synthesis of the Sulfur Amino Acids: Cysteine and Methionine. *Photosynthesis Research*, 86 (3): 345-362.
- Yaman, A. (2018). *Helal Gıda Kapsamında Yumuşak Şekerlemelerde Jelatin Kökeninin Tespitinde Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerin Geliştirilmesi ve Metot Validasyonu* (Tıpta Uzmanlık Tezi). Marmara Üniversitesi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Yang, J. & Guo, L. (2014). Biosynthesis of Beta Carotene in Engineered *E. coli* Using the MEP and MVA Pathways. *Microbial Cell Factories*. 13. 160,

- Yenen, F. (2019). *İslam Hukuku Açısından Gıda Katkı Maddeleri ve Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar* (Yüksek Lisans Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Temel İslam Bilimleri Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Yetim, Ö. (2019). *Katkı Maddesi İhtiva Eden Gıdalarda Helalliğin ve Haramlığın Belirlenmesinde Bir Yöntem Olarak İstihâle Ve İstihlâk* (Yüksek Lisans Tezi). Harran Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Temel İslam Bilimleri Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
- Yılmaz, E. (2018). *Gıda Katkı Maddeleri Olarak Kullanılan Monopotasyum Glutamat, Magnezyum Dıglutamat ve Xylitol'ün Genotoksik Etkilerinin Araştırılması* (Doktora Tezi). Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Yılmaz, İ. (2010). Karotenoidler. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17 (3), 223-231.
- Yılmaz, S. (2019). *Sistein Bileşiklerinin Antioksidan Aktiviteleri* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, İstanbul.
- Yin, J., Ren, W., Yang, G., Duan, J., Huang, X., Fang, R., Yin, Y., Hou, Y., Kim, S.W. and Wu, G. (2015). L-Cysteine Metabolism and its Nutritional Implications. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60 (1): 134-146.
- Young, V.R. & Ajami, A.M., (1998) *Glutamate: an amino acid of particular distinction. In: International Symposium on Glutamate*, Proceedings of the symposium held October, 1998 in Bergami, Italy. J. Nutr. 130 (Suppl.): 892S – 900.
- Yörük, N. & Danyer, E. (2016). Gıda Katkı Maddeleri Genel Bilgiler ve Tanımlar. *Türkiye Klinikleri Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Özel Dergisi*. 2: 1-10.
- Yüksel, F. (2003). *İslam Hukuku ve Yahudi Hukukunda Helal-Haram Kavramı Açısından Gıdalar* (Yüksek Lisans Tezi). Marmara Üniversitesi, Sosyal Bilimleri Enstitüsü, İlahiyat Anabilim Dalı, İstanbul.

Zareian, M., Ebrahimpour, A., Bakar, F.A., Mohamed, A.K., Forghani, B., Ab-Kadir, M.S. and Saari, N. (2012). A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods. *International Journal Of Molecular Sciences*, 13: 5482-5497.

Zhou G., Fujiwara, M., Woo, X., Rusli, E. and Tung, H. (2006). Direct Design of Pharmaceutical Antisolvent Crystallization Through Concentration Control. *Crystal Growth and Design*, 6(4):892-898.

Zhao, J., Li, Q., Sun, T., Zhu, X., Xu, H., Tang, J., Zhang, X. and Ma, Y. (2013). Engineering Central Metabolic Modules of *Escherichia Coli* for Improving B-Carotene Production. *Metabolic Engineering*, 17: 42-50.



EKLER

EK 1 Mikroorganizmaların İzole Edildiği Katı Besiyerleri

No:	Numune	Besiyeri	No:	Numune	Besiyeri	No:	Numune	Besiyeri
1	TM.1.1.1	NPA	44	TD.1.5.1	VRBGA	87	TI.3.5.1	NPA
2	TM.1.2.1	VRBGA	45	TD.1.6.1	NPA	88	TI.4.1.1	NA
3	TM.1.3.1	PCA	46	TD.2.1.1	PCA	89	TI.4.2.1	NPA
4	TM.1.4.1	NA	47	TD.2.3.1	NPA	90	TI.4.3.1	TSA
5	TM.1.5.1	PCA	48	TD.2.5.1	TSA	91	TI.4.4.1	NPA
6	TM.1.6.1	PCA	49	TD.3.2.1	NA	92	TI.4.5.1	NA
7	TM.1.7.1	TSA	50	TD.3.3.1	NPA	93	TI.4.6.1	PCA
8	TM.1.8.1	NPA	51	TD.3.4.1	NA	94	TI.5.1.1	VRBGA
9	TM.2.1.1	NA	52	TD.3.5.1	NPA	95	TI.5.2.1	PCA
10	TM.2.3.1	VRBGA	53	TD.3.7.1	TSA	96	TI.5.3.1	NA
11	TM.2.4.1	TSA	54	TD.4.1.1	TSA	97	TI.5.4.1	TSA
12	TM.2.5.1	NPA	55	TD.4.2.1	TSA	98	TI.5.7.1	NA
13	TE.1.2.1	PCA	56	TD.4.7.1	VRBGA	99	TI.5.8.1	PCA
14	TE.1.3.1	NA	57	TD.5.4.1	NA	100	G.3.3.1	TSA
15	TE.1.4.1	NA	58	TD.5.5.1	NA	101	G.4.1.1	NPA
16	TE.1.5.1	PCA	59	TD.5.6.1	NPA	102	G.8.3.1	PCA
17	TE.1.6.1	PCA	60	TD.5.8.1	TSA	103	G.1.1.1	TSA
18	TE.1.7.1	NPA	61	TD.6.2.1	NA	104	G.1.2.1	NPA
19	TE.1.8.1	TSA	62	TD.6.3.1	PCA	105	G.2.1.1	NA
20	TE.2.6.1	TSA	63	TD.6.5.1	TSA	106	G.2.2.1	NPA
21	TE.3.3.1	PCA	64	TD.6.7.1	VRBGA	107	G.2.3.1	NA
22	TE.3.3.2	NA	65	TD.6.8.1	NPA	108	G.2.4.1	TSA
23	TE.3.4.1	NA	66	EM 1.3.1	TSA	109	G.3.1.1	NPA
24	TE.3.5.1	NPA	67	EM 2.2.1	PCA	110	G.3.2.1	TSA
25	TE.3.6.1	NPA	68	EM 2.5.1	TSA	111	G.4.2.1.	PCA
26	TE.3.7.1	NPA	69	EM 2.7.1	NPA	112	G.4.3.1	VRBGA
27	TE.4.1.1	PCA	70	EM 3.4.1	NA	113	G.5.1.1	TSA
28	TE.4.2.1	NA	71	EM 5.5.1	TSA	114	G.5.3.1	NPA
29	TE.4.3.1	PCA	72	EM 5.6.1	TSA	115	G.6.1.1	NA
30	TE.4.5.1	TSA	73	TI.1.1.1	TSA	116	G.6.2.1	PCA
31	TE.4.6.1	NA	74	TI.1.2.1	NA	117	G.7.1.1	NPA
32	TE.1.1.1	NA	75	TI.1.4.1	NA	118	G.7.2.1	PCA
33	TE.2.2.1	PCA	76	TI.1.5.1	PCA	119	G.8.1.1	NA
34	TE.3.1.1	PCA	77	TI.1.6.1	PCA	120	G.8.2.1	TSA
35	TE.4.1.1	NPA	78	TI.2.1.1	NA	121	G.9.1.1	NA
36	TE.4.7.1	TSA	79	TI.2.3.1	PCA	122	G.9.2.1	TSA
37	TE.5.1.1	NA	80	TI.2.4.1	TSA	123	TG.2.5.1	NPA
38	TE.4.2.1	NA	81	TI.2.6.1	NA	124	TG.3.5.1	TSA
39	TD 6.1.1	NA	82	TI.2.8.1	VRBGA	125	TG.1.1.1	PCA
40	TD.1.1.1	NPA	83	TI.2.9.1	TSA	126	TG.1.2.1	NA
41	TD.1.2.1	NA	84	TI.3.1.1	TSA	127	TG.1.3.1	NPA
42	TD.1.3.1	NA	85	TI.3.2.1	NA	128	TG.1.4.1	TSA
43	TD.1.4.1	PCA	86	TI.3.3.1	NA	129	TG.1.5.1	TSA

No:	Numune	Besiyeri	No:	Numune	Besiyeri	No:	Numune	Besiyeri
130	TG.1.6.1	VRBGA	175	TK.4.8.1	NPA	220	TM.2.4.1	NPA
131	TG.1.7.1	TSA	176	TK.4.9.1	NPA	221	TM.3.3.1	PCA
132	TG.2.1.1	NPA	177	TK.5.1.1	NA	222	TM.5.3.1	TSA
133	TG.2.2.1	TSA	178	TK.5.3.1	NPA	223	TM.6.5.1	VRBGA
134	TG.2.3.1	NA	179	TK.5.4.1	TSA	224	TM.7.2.1	TSA
135	TG.2.4.1	VRBGA	180	TK.5.4.2	TSA	225	TM.5.1.1	NA
136	TG.2.6.1	NPA	181	TK.5.5.1	PCA	226	TM.5.5.1	PCA
137	TG.2.7.1	NA	182	TK.5.6.1	NPA	227	TM.5.6.1	TSA
138	TG.3.1.1.	PCA	183	TA.1.2.1	NPA	228	TM.5.7.1	NA
139	TG.3.2.1	TSA	184	TA.1.1.1	NPA	229	TM.5.8.1	TSA
140	TG.3.3.1	NA	185	TA.1.3.1	NPA	230	TM.5.9.1	NPA
141	TG.3.4.1	NPA	186	TA.1.4.1	PCA	231	TM.6.1.1	PCA
142	TK 3.4.1	PCA	187	TA.1.5.1	NPA	232	TM.6.2.1	PCA
143	TK 5.2.1.	PCA	188	TA.1.6.1	PCA	233	TM.6.3.1	PCA
144	TK.1.1.1	NPA	189	TA.1.7.1	PCA	234	TM.6.5.1	TSA
145	TK.1.2.1	PCA	190	TA.1.8.1	PCA	235	TM.6.6.1	TSA
146	TK.1.3.1	NA	191	TA.2.1.1	TSA	236	TM.6.7.1	VRBGA
147	TK.1.4.1	VRBGA	192	TA.2.2.1	TSA	237	TM.6.8.1	TSA
148	TK.1.5.1	PCA	193	TA.2.3.1	NA	238	TM.7.1.1	NA
149	TK.1.6.1	NA	194	TA.2.4.1	TSA	239	TM.7.2.1	NA
150	TK.1.7.1	PCA	195	TA.2.5.1	NPA	240	TM.7.4.1	TSA
151	TK.1.8.1	TSA	196	TA.2.6.1	NPA	241	TM.7.6.1	NPA
152	TK.1.9.1	TSA	197	TA.2.7.1	PCA	242	TM.7.7.1	PCA
153	TK.2.1.1	NPA	198	TA.2.8.1	NA	243	TM.8.1.1	NPA
154	TK.2.2.1	PCA	199	TA.3.1.1	NA	244	TM.8.2.1	PCA
155	TK.2.3.1	NA	200	TA.3.2.1	VRBGA	245	TM.8.3.1	NPA
156	TK.2.4.1	PCA	201	TA.3.3.1	PCA	246	TE.5.1.1	TSA
157	TK.2.5.1	TSA	202	TA.3.3.2	TSA	247	TE.5.2.1	TSA
158	TK.3.1.1	TSA	203	TA.3.4.1	NPA	248	TE.5.4.1	NPA
159	TK.3.10.1	NPA	204	TA.3.5.1	NA	249	TE.5.5.1	PCA
160	TK.3.11.1	NA	205	TM.1.4.1	NPA	250	TE.5.6.1	NA
161	TK.3.2.1	PCA	206	TM.1.5.1	PCA	251	TE.6.1.1	TSA
162	TK.3.5.1	NA	207	TM.3.1.1	NA	252	TE.6.2.1	VRBGA
163	TK.3.6.1	NA	208	TM.3.2.1	NPA	253	TE.6.3.1	NA
164	TK.3.6.2.	NA	209	TM.3.3.1	TSA	254	TE.6.4.1	NPA
165	TK.3.7.1	TSA	210	TM.3.6.1	VRBGA	255	TE.6.6.1	NA
166	TK.3.8.1	TSA	211	TM.3.7.1	PCA	256	TE.7.1.1	NPA
167	TK.3.9.1	TSA	212	TM.4.1.1	PCA	257	TE.7.3.1	NA
168	TK.4.1.1	VRBGA	213	TM.4.2.1	TSA	258	TE.7.4.1	NPA
169	TK.4.2.1	TSA	214	TM.4.3.1	NA	259	TE.7.5.1	NPA
170	TK.4.3.1	PCA	215	TM.4.4.1	NA	260	TE.7.6.1	PCA
171	TK.4.4.1	TSA	216	TM.4.5.1	NPA	261	TE.7.7.1	VRBGA
172	TK.4.5.1	NA	217	TM.4.6.1	NPA	262	TM.5.4.1	PCA
173	TK.4.6.1	PCA	218	TM.1.2.1	PCA			
174	TK.4.7.1	NPA	219	TM.1.3.1	NA			

EK 2 İzolatların Koloni Morfolojisi Özellikleri

No	İzolat İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
1	TM.1.1.1	L	G.Muntzam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
2	TM.1.2.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
3	TM.1.3.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
4	TM.1.4.1	S	Nokta	Ondüleli	Küçük	Düz	Beyaz
5	TM.1.5.1	M	Flamentli	Flamentli	Normal	Düz	Beyaz
6	TM.1.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
7	TM.1.7.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Düğümlü	Sarı
8	TM.1.8.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
9	TM.2.1.1	S	Rizoid	Ondüleli	Normal	Düz	Beyaz
10	TM.2.3.1	M	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
11	TM.2.4.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
12	TM.2.5.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
13	TE.1.2.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
14	TE.1.3.1	L	Dairesel	Düz	Normal	Düğümlü	Beyaz
15	TE.1.4.1	R	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
16	TE.1.5.1	M	Flamentli	Flamentli	Normal	Düz	Beyaz
17	TE.1.6.1	R	Dairesel	Dalgalı	Normal	Yükselmiş	Beyaz
18	TE.1.7.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
19	TE.1.8.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Düğümlü	Beyaz
20	TE.2.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Sarı
21	TE.3.3.1	S	Nokta	Ondüleli	Küçük	Yükselmiş	Beyaz
22	TE.3.3.2	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
23	TE.3.4.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
24	TE.3.5.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Sarı
25	TE.3.6.1	M	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
26	TE.3.7.1	L	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
27	TE.4.1.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
28	TE.4.2.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
29	TE.4.3.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
30	TE.4.5.1	S	G. Muntazam	Ondüleli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
31	TE.4.6.1	M	Flamentli	Flamentli	Normal	Düz	Beyaz
32	TE.1.1.1	R	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
33	TE.2.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
34	TE.3.1.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
35	TE.4.1.1	L	Dairesel	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
36	TE.4.7.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
37	TE.5.1.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
38	TE.4.2.1	S	Rizoid	Ondüleli	Geniş	Düz	Beyaz
39	TD 6.1.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
40	TD.1.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz

No	İzolât İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
41	TD.1.2.1	L	Dairesel	Flamentli	Geniş	Düğmeli	Beyaz
42	TD.1.3.1	S	G.Muntazam	Ondüleli	Geniş	Düğmeli	Sarı
43	TD.1.4.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
44	TD.1.5.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
45	TD.1.6.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
47	TD.2.3.1	R	Rizoid	Ondüleli	Normal	Düz	Beyaz
48	TD.2.5.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Sarı
49	TD.3.2.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
50	TD.3.3.1	R	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
51	TD.3.4.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Düğmeli	Sarı
52	TD.3.5.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
53	TD.3.7.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
54	TD.4.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
55	TD.4.2.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
56	TD.4.7.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
57	TD.5.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
58	TD.5.5.1	S	Nokta	Dalgalı	Normal	Yükselmiş	Beyaz
59	TD.5.6.1	M	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
60	TD.5.8.1	R	G.Muntazam	Ondüleli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
61	TD.6.2.1	L	Dairesel	Düz	Normal	Düğmeli	Beyaz
62	TD.6.3.1	M	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
63	TD.6.5.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
64	TD.6.7.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
65	TD.6.8.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Yükselmiş	Beyaz
66	TA.1.3.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
67	TA.2.2.1	S	G. Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
68	TA.2.5.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
69	TA.2.7.1	M	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
70	TA.3.4.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
71	TA.5.5.1	S	Dairesel	DÜZ	Geniş	DÜZ	Beyaz
72	TA.5.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
73	TI.1.1.1	s	Flamentli	Flamentli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
74	TI.1.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
75	TI.1.4.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
76	TI.1.5.1	S	Nokta	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
77	TI.1.6.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
78	TI.2.1.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
79	TI.2.3.1	S	G.Muntazam	DÜZ	Geniş	Düz	Beyaz
80	TI.2.4.1	S	G.Muntazam	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz

No	İzolât İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
81	TI.2.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
82	TI.2.8.1	S	G.Muntazam	Ondüleli	Geniş	Düz	Turuncu
83	TI.2.9.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
84	TI.3.1.1	S	Flamentli	Flamentli	Normal	Düz	Beyaz
85	TI.3.2.1	S	Rizoid	Loblu	Geniş	Düz	Beyaz
86	TI.3.3.1	S	G.Muntazam	Fdüz	Normal	Düz	Beyaz
87	TI.3.5.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
88	TI.4.1.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
89	TI.4.2.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
90	TI.4.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
91	TI.4.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
92	TI.4.5.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
93	TI.4.6.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Yükselmiş	Sarı
94	TI.5.1.1	R	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
95	TI.5.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
96	TI.5.3.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
97	TI.5.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Yükselmiş	Sarı
98	TI.5.7.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
99	TI.5.8.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
100	G 3.3.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
101	G 4.1.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Dügmeli	Beyaz
102	G 8.3.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
103	G.1.1.1	S	Nokta	Düz	Normal	Yükselmiş	Beyaz
104	G.1.2.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
105	G.2.1.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
106	G.2.2.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
107	G.2.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
108	G.2.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
109	G.3.1.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
110	G.3.2.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
111	G.4.2.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
112	G.4.3.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Sarı
113	G.5.1.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
114	G.5.3.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
115	G.6.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
116	G.6.2.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Dügmeli	Beyaz
117	G.7.1.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
118	G.7.2.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
119	G.8.1.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
120	G.8.2.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz

No	İzolât İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
120	G.8.2.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
121	G.9.1.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Turuncu
122	G.9.2.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
123	TG.2.5.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
124	TG.3.5.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
125	TG.1.1.1	L	Dairesel	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
126	TG.1.2.1	S	Rizoid	Ondüleli	Geniş	Düz	Beyaz
127	TG.1.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
128	TG.1.4.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
129	TG.1.5.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
130	TG.1.6.1	S	Dairesel	DÜZ	Geniş	DÜZ	Beyaz
131	TG.1.7.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
132	TG.2.1.1	M	G.Muntazam	Ondüleli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
133	TG.2.2.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
134	TG.2.3.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
135	TG.2.4.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Dügmeli	Beyaz
136	TG.2.6.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
137	TG.2.7.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
138	TG.3.1.1.	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
139	TG.3.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
140	TG.3.3.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
141	TG.3.4.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
142	TK.3.4.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Dügmeli	Beyaz
143	TK.5.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
144	TK.1.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
145	TK.1.2.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
146	TK.1.3.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Sarı
147	TK.1.4.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
148	TK.1.5.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
149	TK.1.6.1	L	Dairesel	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
150	TK.1.7.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
151	TK.1.8.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Yükselmiş	Beyaz
152	TK.1.9.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
153	TK.2.1.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
154	TK.2.2.1	L	Dairesel	Ondüleli	Geniş	Düz	Beyaz
155	TK.2.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Sarı
156	TK.2.4.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
157	TK.2.5.1	S	Nokta	Düz	Geniş	Yükselmiş	Sarı
158	TK.3.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
159	TK.3.10.1	S	Nokta	DÜZ	Geniş	Düz	Beyaz
160	TK.3.11.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz

No	İzolât İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
161	TK.3.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
162	TK.3.5.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
163	TK.3.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
164	TK.3.6.2.	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
165	TK.3.7.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
166	TK.3.8.1	S	Nokta	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Sarı
167	TK.3.9.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
168	TK.4.1.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
169	TK.4.2.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
170	TK.4.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
171	TK.4.4.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
172	TK.4.5.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Yükselmiş	Sarı
173	TK.4.6.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
174	TK.4.7.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
175	TK.4.8.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
176	TK.4.9.1	S	Nokta	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
177	TK.5.1.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
178	TK.5.3.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
179	TK.5.4.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
180	TK.5.4.2	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
181	TK.5.5.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
182	TK.5.6.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
183	TA.1.2.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
184	TA.1.1.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
185	TA.1.3.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
186	TA.1.4.1	R	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
187	TA.1.5.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
188	TA.1.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
189	TA.1.7.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
190	TA.1.8.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
191	TA.2.1.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
192	TA.2.2.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
193	TA.2.3.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
194	TA.2.4.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
195	TA.2.5.1	S	G.Muntazam	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
196	TA.2.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
197	TA.2.7.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
198	TA.2.8.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
199	TA.3.1.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
200	TA.3.2.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz

No	İzolat İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
201	TA.3.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
202	TA.3.3.2	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
203	TA.3.4.1	L	G.Muntazam	Ondüleli	Geniş	Düz	Beyaz
204	TA.3.5.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Sarı
205	TM.1.4.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
206	TM.1.5.1	S	Dairesel	DÜZ	Geniş	DÜZ	Beyaz
207	TM.3.1.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
208	TM.3.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
209	TM.3.3.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
210	TM.3.6.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
211	TM.3.7.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
212	TM.4.1.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
213	TM.4.2.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Sarı
214	TM.4.3.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
215	TM.4.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Normal	DÜZ	Beyaz
216	TM.4.5.1	R	G.Muntazam	Düz	Normal	Düz	Beyaz
217	TM.4.6.1	S	G.Muntazam	Dalgalı	Normal	Düz	Beyaz
218	TM.1.2.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Düğümlü	Beyaz
219	TM.1.3.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
220	TM.2.4.1	M	G.Muntazam	Ondüleli	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
221	TM.3.3.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
222	TM.5.3.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
223	TM.6.5.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
224	TM.7.2.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
225	TM.5.1.1	S	Nokta	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
226	TM.5.5.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
227	TM.5.6.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
228	TM.5.7.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
229	TM.5.8.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
230	TM.5.9.1	L	Dairesel	Düz	Normal	Düğümlü	Beyaz
231	TM.6.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
232	TM.6.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
233	TM.6.3.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
234	TM.6.5.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
235	TM.6.6.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Düğümlü	Beyaz
236	TM.6.7.1	S	Nokta	Düz	Küçük	Düz	Beyaz
237	TM.6.8.1	s	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
238	TM.7.1.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
239	TM.7.2.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
240	TM.7.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz

No	İzolat İsmi	Koloni Yapısı	Koloni Şekli	Koloni Kenar Şekli	Koloni Büyüklüğü	Koloni Yüksekliği	Koloni Rengi
241	TM.7.6.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
242	TM.7.7.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
243	TM.8.1.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
244	TM.8.2.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
245	TM.8.3.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Dügmeli	Beyaz
246	TE.5.1.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
247	TE.5.2.1	M	Dairesel	Düz	Geniş	Yükselmiş	Beyaz
248	TE.5.4.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
249	TE.5.5.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Sarı
250	TE.5.6.1	L	Dairesel	Düz	Geniş	Dügmeli	Beyaz
251	TE.6.1.1.	S	Dairesel	Düz	Geniş	DÜZ	Beyaz
252	TE.6.2.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
253	TE.6.3.1	S	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
254	TE.6.4.1	S	Dairesel	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
255	TE.6.6.1	S	Dairesel	Dalgalı	Geniş	Düz	Beyaz
256	TE.7.1.1	L	G.Muntzam	Dalgalı	Geniş	Düz	Sarı
257	TE.7.3.1	S	Nokta	Düz	Normal	Düz	Beyaz
258	TE.7.4.1	L	Dairesel	Düz	Normal	Düz	Beyaz
259	TE.7.5.1	R	Rizoid	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
260	TE.7.6.1	S	Flamentli	Flamentli	Geniş	Düz	Beyaz
261	TE.7.7.1	S	Nokta	Düz	Geniş	Düz	Beyaz
262	TM.5.4.1	S	G.Muntazam	Düz	Geniş	Düz	Beyaz

EK 3.A İzolatların Ürettiği Sistein Miktarı

No	İzolat İsmi	Sistein Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Sistein Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Sistein Üretimi (g/L)
1	TI.5.8.1	2,124±0,004	41	TD.1.6.1	0,939±0,008	81	TM.5.1.1	0,784±0,004
2	TK.3.1.1	1,637±0,014	42	G.7.1.1	0,933±0,221	82	G.7.2.1	0,784±0,006
3	TM.4.6.1	1,524±0,005	43	TM.6.4.1	0,925±0,047	83	TK.4.4.1	0,783±0,016
4	TM.4.5.1	1,499±0,004	44	TI.4.6.1	0,921±0,001	84	TA.3.4.1	0,781±0,010
5	TM.4.4.1	1,488±0,698	45	TI.2.8.1	0,905±0,003	85	TI.3.1.1	0,779±0,004
6	TM.3.7.1	1,449±0,007	46	TK.4.7.1	0,898±0,087	86	TD.1.4.1	0,775±0,001
7	TI.5.1.1	1,430±0,005	47	TD.1.2.1	0,897±0,006	87	TK.5.2.1	0,772±0,014
8	TA.3.5.1	1,399±0,012	48	TM.2.4.1	0,886±0,003	88	TE.3.5.1	0,767±0,037
9	TI.2.2.1	1,385±0,007	49	TD.6.2.1	0,881±0,005	89	TM.6.1.1	0,764±0,008
10	TM.4.1.1	1,326±0,008	50	TD.6.1.1	0,880±0,007	90	TD.5.5.1	0,763±0,004
11	TI.4.5.1	1,319±0,010	51	TK.2.3.1	0,877±0,032	91	TM.1.2.1	0,758±0,009
12	TI.4.2.1	1,276±0,021	52	TD.4.7.1	0,876±0,005	92	G.4.2.1	0,757±0,209
13	TI.3.2.1	1,261±0,006	53	TK.3.5.1	0,863±0,014	93	TG.2.4.1	0,753±0,015
14	TI.3.3.1	1,259±0,005	54	TK.5.1.1	0,862±0,011	94	TK.5.5.1	0,752±0,005
15	TI.2.3.1	1,246±0,003	55	TD.2.1.1	0,861±0,013	95	TE.2.6.1	0,749±0,003
16	TI.1.6.1	1,234±0,008	56	TA.2.6.1	0,858±0,014	96	TA.1.2.1	0,749±0,004
17	TI.5.4.1	1,201±0,004	57	G.1.1.1	0,857±0,073	97	TE.2.1.1	0,744±0,104
18	TM.3.1.1	1,163±0,005	58	TA.2.2.1	0,853±0,009	98	TM.1.8.1	0,743±0,004
19	TM.1.5.1	1,120±0,004	59	TM.3.3.1	0,853±0,008	99	TM.3.5.1	0,743±0,010
20	TE.1.4.1	1,114±0,015	60	TG.3.4.1	0,848±0,007	100	TD.3.4.1	0,743±0,009
21	TM.1.7.1	1,108±0,022	61	TI.2.4.1	0,847±0,004	101	G.8.2.1	0,742±0,029
22	TM.4.3.1	1,107±0,007	62	TK.5.4.2	0,841±0,068	102	TM.8.3.1	0,738±0,021
23	TK.4.6.1	1,086±0,049	63	TD.5.8.1	0,824±0,005	103	TG.3.1.1	0,738±0,006
24	TI.2.6.1	1,080±0,004	64	TD.5.4.1	0,822±0,006	104	TK.3.10.1	0,732±0,008
25	TE.4.6.1	1,059±0,001	65	TE.1.5.1	0,819±0,012	105	TM.7.7.1	0,730±0,042
26	TD.5.6.1	1,058±0,007	66	TI.4.3.1	0,809±0,005	106	TA.3.3.1	0,726±0,008
27	TE.4.5.1	1,049±0,002	67	TE.7.4.1	0,808±0,160	107	TE.6.3.1	0,725±0,016
28	TK.4.3.1	1,037±0,002	68	TK.4.2.1	0,808±0,023	108	TK.1.2.1	0,723±0,009
29	TK.2.4.1	1,023±0,047	69	TE.3.3.1	0,805±0,026	109	TG.3.5.1	0,720±0,005
30	TE.1.8.1	1,022±0,003	70	TD.6.8.1	0,803±0,004	110	TE.5.5.1	0,719±0,021
31	TM.2.3.1	1,020±0,042	71	TD.4.2.1	0,795±0,011	111	TE.7.6.1	0,717±0,046
32	TK.3.6.1	1,018±0,007	72	TA.2.5.1	0,792±0,005	112	TG.1.1.1	0,713±0,007
33	TD.2.3.1	1,005±0,004	73	TM.7.4.1	0,790±0,043	113	TD.1.3.1	0,712±0,006
34	TM.3.2.1	0,991±0,013	74	TM.7.2.1	0,789±0,033	114	TK.3.11.1	0,711±0,013
35	G.9.2.1	0,979±0,002	75	TD.3.5.1	0,787±0,069	115	TE.5.2.1	0,709±0,025
36	TM.4.2.1	0,975±0,003	76	TG.2.7.1	0,787±0,009	116	TE.5.6.1	0,708±0,041
37	TK.1.4.1	0,954±0,020	77	TD.2.5.1	0,786±0,007	117	TG.1.7.1	0,704±0,009
38	G.3.2.1	0,948±0,012	78	TD.4.1.1	0,785±0,003	118	TM.6.7.1	0,703±0,003
39	TI.5.7.1	0,946±0,011	79	G.5.3.1	0,785±0,021	119	TI.1.4.1	0,701±0,023
40	TK.4.9.1	0,944±0,006	80	TK.4.5.1	0,785±0,006	120	TA.1.6.1	0,701±0,006

No	İzolât İsmi	Sistein Üretimi (g/L)	No	İzolât İsmi	Sistein Üretimi (g/L)	No	İzolât İsmi	Sistein Üretimi (g/L)
121	TK.1.9.1	0,700±0,004	152	TK.2.2.1	0,637±0,007	183	TG.2.2.1	0,542±0,004
122	TA.1.8.1	0,699±0,012	153	TM.7.1.1	0,633±0,014	184	TE.3.4.1	0,536±0,016
123	TG.1.5.1	0,697±0,009	154	TE.1.2.1	0,630±0,002	185	TA.2.4.1	0,535±0,005
124	TI.1.1.1	0,693±0,020	155	G.1.2.1	0,627±0,041	186	G.3.1.1	0,528±0,041
125	TD.1.5.1	0,691±0,060	156	TM.3.4.1	0,623±0,009	187	TE.4.1.1	0,523±0,061
126	TK.3.8.1	0,687±0,021	157	TA.1.7.1	0,622±0,009	188	TE.1.3.1	0,517±0,016
127	TM.6.3.1	0,687±0,023	158	TI.3.5.1	0,618±0,015	189	TM.6.6.1	0,511±0,012
128	TA.3.3.2	0,684±0,004	159	TA.1.1.1	0,616±0,004	190	TG.3.2.1	0,507±0,017
129	TE.4.2.1	0,682±0,014	160	TG.2.3.1	0,615±0,013	191	TE.7.1.1	0,501±0,018
130	TK.2.5.1	0,680±0,003	161	TM.1.3.1	0,608±0,026	192	TM.6.8.1	0,496±0,069
131	TM.3.6.1	0,680±0,006	162	TM.5.5.1	0,599±0,011	193	TE.6.4.1	0,494±0,017
132	TE.7.7.1	0,676±0,002	163	TA.1.3.1	0,597±0,002	194	TG.1.6.1	0,493±0,013
133	G.9.1.1	0,674±0,036	164	TA.3.1.1	0,585±0,010	195	TM.5.8.1	0,481±0,033
134	TK.3.7.1	0,667±0,013	165	TA.2.3.1	0,582±0,005	196	TK.5.6.1	0,469±0,108
135	TK.1.6.1	0,665±0,007	166	TG.1.3.1	0,579±0,009	197	TI.1.2.1	0,469±0,013
136	TE.3.7.1	0,665±0,008	167	TM.2.5.1	0,578±0,020	198	TI.4.4.1	0,448±0,005
137	TE.3.6.1	0,657±0,007	168	TM.5.6.1	0,578±0,008	199	G.2.3.1	0,430±0,008
138	TK.1.1.1	0,650±0,004	169	TA.1.4.1	0,577±0,074	200	G.5.1.1	0,422±0,010
139	TK.3.2.1	0,648±0,007	170	TM.6.2.1	0,568±0,034	201	G.2.1.1	0,419±0,035
140	TK.3.9.1	0,646±0,031	171	TM.1.6.1	0,567±0,027	202	G.6.2.1	0,419±0,017
141	TI.1.5.1	0,646±0,009	172	TI.2.1.1	0,567±0,004	203	G.2.4.1	0,405±0,024
142	TK.1.8.1	0,645±0,011	173	TE.1.6.1	0,566±0,013	204	TE.4.3.1	0,402±0,076
143	TK.2.1.1	0,642±0,012	174	TA.2.8.1	0,565±0,004	205	G.2.2.1	0,376±0,058
144	TK.1.5.1	0,642±0,005	175	TI.4.1.1	0,554±0,002	206	G.6.1.1	0,373±0,035
145	TD.6.7.1	0,641±0,005	176	TI.5.2.1	0,552±0,010	207	TM.5.9.1	0,360±0,027
146	TD.6.3.1	0,641±0,005	177	TD.6.5.1	0,550±0,018	208	TM.1.4.1	0,356±0,010
147	TD.3.7.1	0,640±0,004	178	G.8.1.1	0,548±0,052	209	TE.1.7.1	0,350±0,011
148	TG.1.2.1	0,640±0,005	179	TD.1.1.1	0,546±0,006	210	TE.7.5.1	0,343±0,023
149	TG.2.6.1	0,640±0,009	180	TI.5.3.1	0,546±0,005	211	G.4.3.1	0,341±0,044
150	TM.8.2.1	0,638±0,009	181	TE.5.4.1	0,544±0,013	212	TE.7.3.1	0,313±0,048
151	TK.1.3.1	0,638±0,004	182	TI.2.9.1	0,543±0,003			

EK 3.B İzolatların Ürettiği Glutamik Asit Miktarı

No	İzolat İsmi	Glutamik Asit Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Glutamik Asit Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Glutamik Asit Üretimi (g/L)
1	TK.1.4.1	1,425±0,021	41	TK.2.4.1	1,005±0,034	81	TK.4.3.1	0,897±0,027
2	TK.3.1.1	1,286±0,005	42	TI.3.1.1	0,994±0,043	82	TM.5.9.1	0,897±0,008
3	TK.2.5.1	1,196±0,020	43	G.2.1.1	0,993±0,025	83	TE.5.2.1	0,897±0,059
4	TI.3.2.1	1,189±0,044	44	TI.4.5.1	0,991±0,020	84	TK.5.1.1	0,896±0,016
5	TK.4.2.1	1,15±0,022	45	TM.6.3.1	0,989±0,023	85	TM.4.1.1	0,896±0,036
6	G.1.2.1	1,136±0,023	46	TK.4.9.1	0,988±0,035	86	TE.1.3.1	0,893±0,017
7	G.8.1.1	1,132±0,011	47	TG.1.2.1	0,983±0,009	87	TI.1.4.1	0,893±0,023
8	TM.4.6.1	1,126±0,011	48	TM.1.5.1	0,976±0,033	88	TK.1.8.1	0,893±0,028
9	TM.3.7.1	1,114±0,046	49	TM.2.5.1	0,974±0,026	89	G.8.2.1	0,89±0,012
10	TD.1.6.1	1,107±0,025	50	TA.2.5.1	0,973±0,010	90	TM.1.3.1	0,884±0,024
11	TD.1.2.1	1,105±0,031	51	TA.2.2.1	0,97±0,015	91	TG.2.4.1	0,884±0,016
12	TI.4.6.1	1,103±0,340	52	TI.3.3.1	0,97±0,034	92	TM.3.6.1	0,883±0,025
13	TK.3.11.1	1,1±0,031	53	TI.5.4.1	0,962±0,036	93	TK.3.9.1	0,879±0,007
14	TM.4.5.1	1,098±0,054	54	TI.5.2.1	0,958±0,006	94	TD.1.1.1	0,877±0,026
15	TK.1.6.1	1,096±0,042	55	TK.1.2.1	0,957±0,030	95	TK.3.2.1	0,876±0,035
16	TM.4.2.1	1,095±0,015	56	TK.2.3.1	0,957±0,043	96	TD.6.2.1	0,875±0,048
17	TI.4.2.1	1,088±0,065	57	TG.2.7.1	0,955±0,009	97	G.6.2.1	0,874±0,012
18	G.1.1.1	1,075±0,041	58	TK.2.2.1	0,955±0,050	98	TG.1.1.1	0,873±0,015
19	TI.5.1.1	1,07±0,012	59	TI.2.8.1	0,9532±0,078	99	TE.2.6.1	0,869±0,016
20	TK.2.1.1	1,055±0,007	60	TK.3.8.1	0,953±0,027	100	TK.3.10.1	0,868±0,016
21	TK.4.4.1	1,055±0,03	61	TI.1.5.1	0,946±0,016	101	TM.5.8.1	0,865±0,007
22	TM.6.4.1	1,054±0,053	62	TK.3.6.1	0,945±0,011	102	TM.7.4.1	0,862±0,007
23	TI.2.6.1	1,049±0,148	63	G.7.2.1	0,943±0,029	103	TE.6.3.1	0,862±0,008
24	G.9.2.1	1,049±0,008	64	TI.2.3.1	0,94±0,06	104	TD.3.5.1	0,859±0,025
25	G.7.1.1	1,046±0,02	65	TI.2.4.1	0,938±0,059	105	TI.2.2.1	0,858±0,055
26	TK.5.2.1.	1,041±0,011	66	TE.3.7.1	0,934±0,015	106	TM.3.3.1	0,858±0,009
27	TG.3.4.1	1,039±0,014	67	G.3.1.1	0,934±0,035	107	TE.3.3.1	0,856±0,003
28	TM.7.1.1	1,036±0,016	68	TI.1.6.1	0,93±0,11	108	TM.5.5.1	0,856±0,026
29	G.5.3.1	1,035±0,041	69	TK.5.5.1	0,926±0,027	109	TM.6.2.1	0,856±0,026
30	TD.4.1.1	1,032±0,02	70	TK.3.5.1	0,925±0,008	110	TE.1.2.1	0,854±0,161
31	TE.1.7.1	1,028±0,021	71	TM.2.4.1	0,924±0,025	111	TI.1.2.1	0,8524±0,009
32	TK.1.3.1	1,027±0,004	72	TE.2.1.1	0,922±0,007	112	G.4.3.1	0,849±0,017
33	G.3.2.1	1,027±0,037	73	TG.1.5.1	0,922±0,007	113	TE.5.4.1	0,848±0,036
34	TA.3.5.1	1,023±0,061	74	TK.3.7.1	0,92±0,025	114	TD.5.6.1	0,844±0,023
35	TA.2.3.1	1,019±0,014	75	TA.3.1.1	0,919±0,012	115	TE.7.5.1	0,839±0,006
36	G.5.1.1	1,012±0,013	76	TD.5.8.1	0,916±0,007	116	TA.1.7.1	0,839±0,018
37	TM.4.4.1	1,012±0,007	77	TK.4.7.1	0,914±0,024	117	TG.2.6.1	0,838±0,004
38	TK.4.6.1	1,009±0,009	78	TI.5.8.1	0,911±0,058	118	TG.3.5.1	0,838±0,007
39	G.9.1.1	1,007±0,006	79	TE.1.6.1	0,908±0,016	119	TI.4.4.1	0,831±0,029
40	TM.4.3.1	1,007±0,062	80	TD.4.7.1	0,901±0,007	120	TI.4.1.1	0,831±0,017

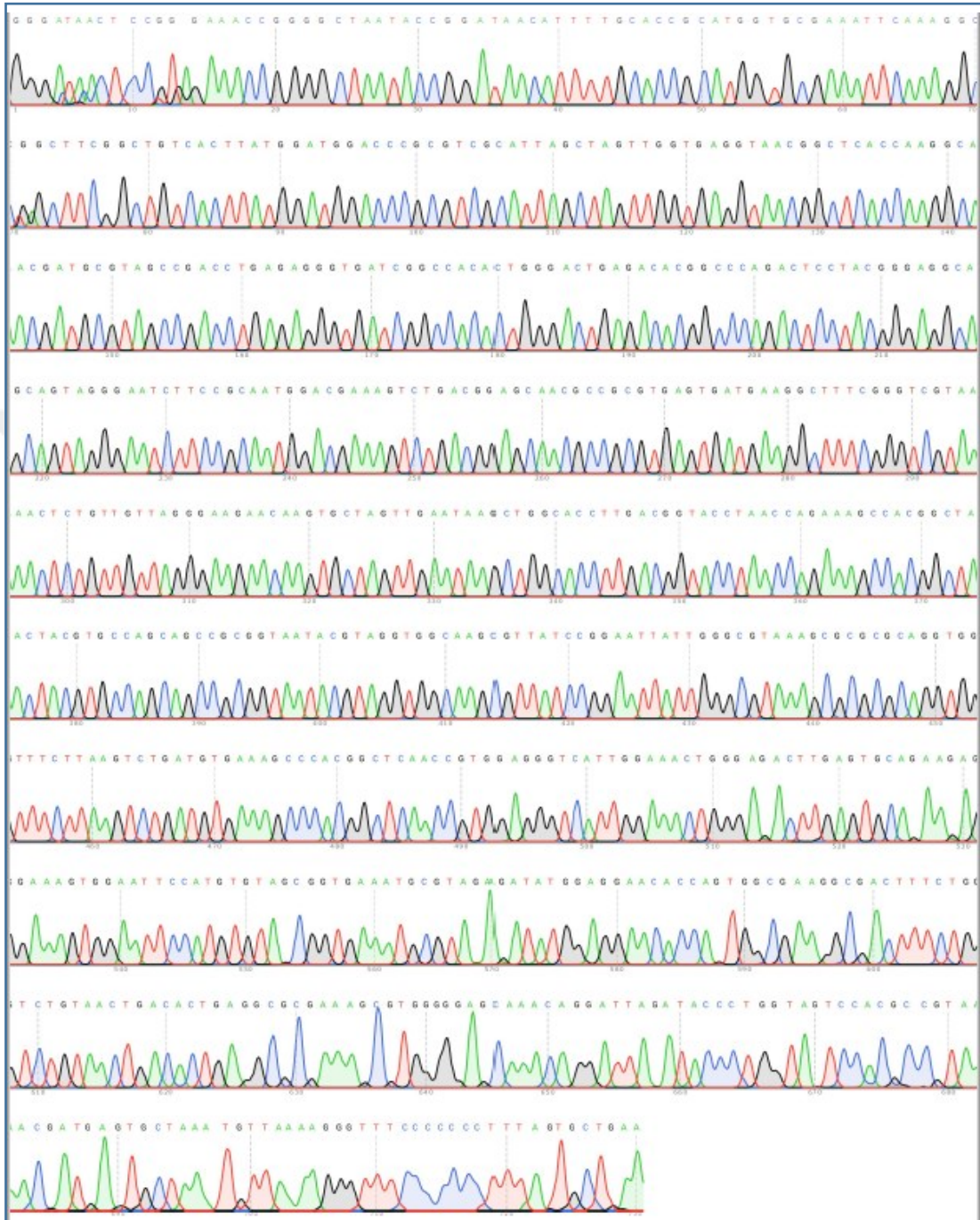
No	İzolat İsmi	Glutamik Asit Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Glutamik Asit Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Glutamik Asit Üretimi (g/L)
121	TA.1.8.1	0,821±0,022	152	TK.1.9.1	0,782±0,042	183	TD.3.7.1	0,671±0,024
122	TA.3.4.1	0,819±0,024	153	TM.3.1.1	0,772±0,039	184	G.2.4.1	0,657±0,007
123	TE.6.4.1	0,817±0,007	154	TE.4.2.1	0,769±0,035	185	TE.1.8.1	0,646±0,002
124	TD.6.8.1	0,816±0,006	155	TM.1.7.1	0,763±0,013	186	TE.1.4.1	0,639±0,006
125	TI.1.1.1	0,815±0,161	156	TM.6.7.1	0,763±0,059	187	TE.4.3.1	0,638±0,043
126	TD.1.3.1	0,815±0,049	157	TM.1.6.1	0,762±0,017	188	TA.2.8.1	0,629±0,014
127	TM.5.6.1	0,815±0,006	158	TD.1.4.1	0,761±0,023	189	TE.4.5.1	0,622±0,003
128	TM.3.4.1	0,814±0,015	159	TG.2.2.1	0,76±0,007	190	G.6.1.1	0,62±0,005
129	TI.2.9.1	0,812±0,028	160	TM.6.6.1	0,751±0,004	191	TD.2.1.1	0,619±0,018
130	TE.1.5.1	0,811±0,044	161	TM.8.3.1	0,751±0,058	192	TK.1.1.1	0,617±0,466
131	TE.4.1.1	0,811±0,047	162	TA.1.2.1	0,748±0,014	193	TM.6.1.1	0,617±0,035
132	G.4.2.1	0,811±0,007	163	TE.5.6.1	0,748±0,016	194	TM.1.8.1	0,614±0,006
133	TI.4.3.1	0,81±0,027	164	TA.3.3.1	0,746±0,025	195	TD.5.5.1	0,611±0,015
134	TM.5.1.1	0,81±0,006	165	TM.3.5.1	0,743±0,007	196	TA.3.3.2	0,604±0,028
135	TE.3.4.1	0,807±0,008	166	TA.1.6.1	0,734±0,022	197	TG.1.7.1	0,603±0,009
136	TG.2.3.1	0,807±0,011	167	TI.2.1.1	0,734±0,009	198	G.2.2.1	0,601±0,031
137	TI.3.5.1	0,806±0,012	168	TE.5.5.1	0,732±0,023	199	TD.6.5.1	0,595±0,017
138	TK.1.5.1	0,806±0,014	169	TI.5.3.1	0,729±0,003	200	TA.2.6.1	0,595±0,027
139	TA.2.4.1	0,804±0,023	170	TM.1.2.1	0,724±0,012	201	TD.6.7.1	0,592±0,022
140	TM.7.2.1	0,804±0,009	171	TG.3.2.1	0,72±0,014	202	TD.6.3.1	0,589±0,014
141	TA.1.3.1	0,802±0,017	172	TE.7.4.1	0,72±0,022	203	TD.5.4.1	0,588±0,003
142	TG.1.3.1	0,801±0,015	173	G.2.3.1	0,719±0,042	204	TG.1.6.1	0,581±0,017
143	TI.5.7.1	0,794±0,013	174	TD.2.5.1	0,711±0,075	205	TK.4.5.1	0,561±0,004
144	TM.1.4.1	0,793±0,017	175	TK.5.4.2	0,708±0,006	206	TE.7.6.1	0,541±0,034
145	TD.2.3.1	0,789±0,016	176	TE.3.5.1	0,707±0,009	207	TE.3.6.1	0,538±0,007
146	TD.4.2.1	0,789±0,011	177	TE.4.6.1	0,705±0,004	208	TE.7.1.1	0,533±0,018
147	TM.6.8.1	0,788±0,014	178	TM.2.3.1	0,691±0,084	209	TE.7.3.1	0,506±0,009
148	TD.1.5.1	0,786±0,032	179	TA.1.4.1	0,689±0,016	210	TM.7.7.1	0,461±0,033
149	TD.3.4.1	0,785±0,011	180	TD.6.1.1	0,688±0,008	211	TM.8.2.1	0,459±0,015
150	TG.3.1.1	0,784±0,013	181	TA.1.1.1	0,687±0,017	212	TE.7.7.1	0,452±0,032
151	TM.3.2.1	0,784±0,065	182	TK.5.6.1	0,684±0,024			

EK 3.C İzolatların Ürettiği Beta Karoten Miktarı

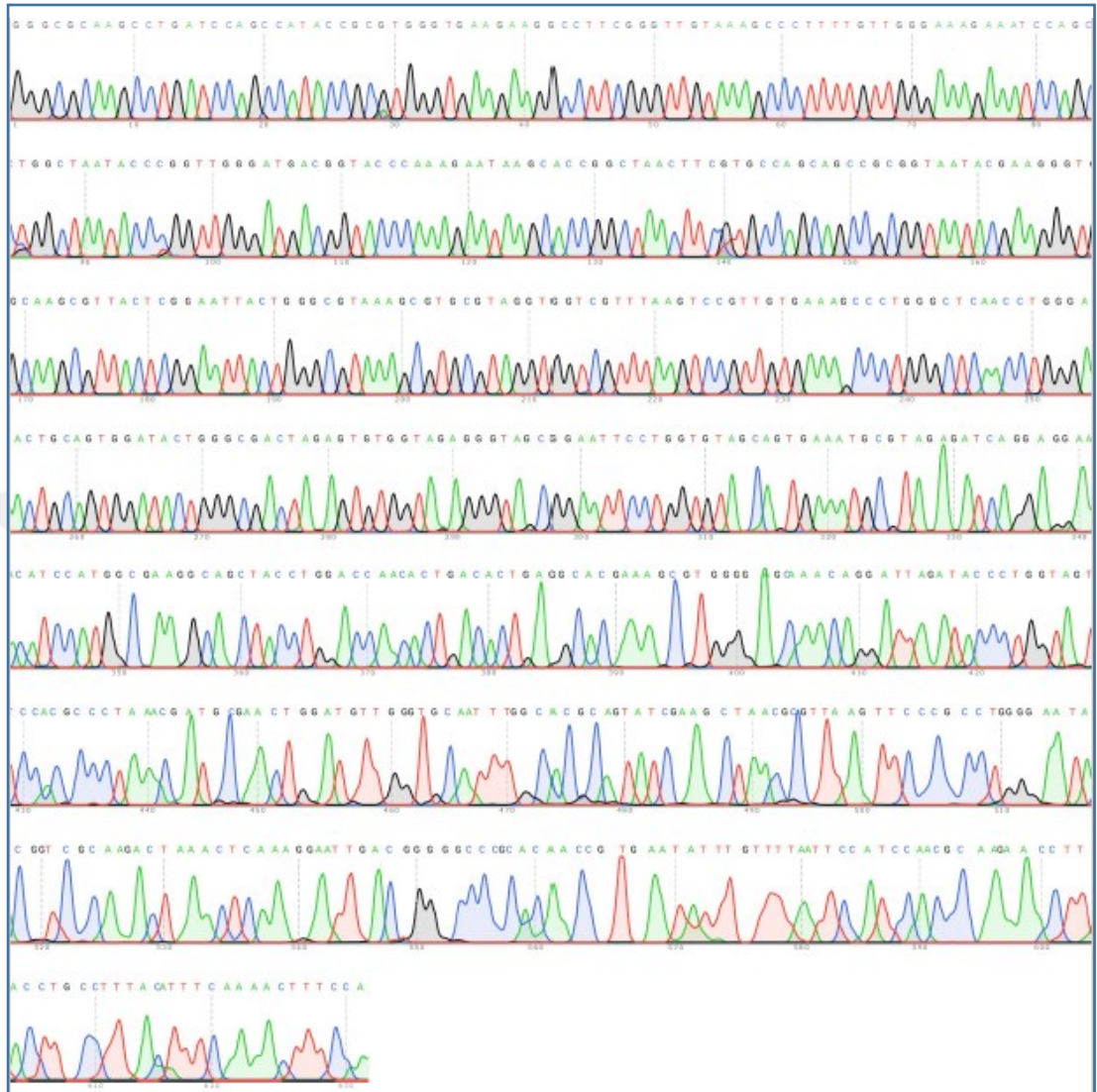
No	İzolat İsmi	Beta Karoten Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Beta Karoten Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Beta Karoten Üretimi (g/L)
1	G.4.3.1	23,895±0,251	41	TI.4.5.1	11,38±0,403	81	TA.1.2.1	9,374±0,261
2	TE.7.1.1	19,751±0,125	42	TG.2.2.1	11,336±0,332	82	TI.1.4.1	9,372±0,192
3	TK.2.3.1	19,165±0,145	43	TM.7.4.1	11,213±0,251	83	TM.1.8.1	9,371±0,261
4	TE.3.5.1	19,082±0,191	44	TE.7.7.1	11,129±0,072	84	TM.4.3.1	9,371±0,176
5	G.9.1.1	17,03±0,261	45	TM.7.7.1	11,004±0,261	85	TM.5.5.1	9,329±0,217
6	TM.1.5.1	16,487±0,125	46	TM.1.4.1	10,878±0,191	86	TE.2.6.1	9,287±0,403
7	TE.5.5.1	16,068±0,191	47	TK.4.9.1	10,836±0,125	87	TD.5.4.1	9,245±0,289
8	TK.3.6.1	15,942±0,144	48	TM.2.5.1	10,836±0,251	88	TA.2.6.1	9,163±0,194
9	TE.7.6.1	15,566±0,44	49	TM.6.7.1	10,836±0,126	89	TK.3.1.1	9,162±0,691
10	TM.6.4.1	15,273±0,191	50	TE.4.6.1	10,585±0,114	90	TE.7.5.1	9,121±0,189
11	G.7.2.1	14,561±1,141	51	TK.2.4.1	10,501±0,145	91	TI.2.2.1	9,12±0,441
12	TE.5.4.1	14,268±0,566	52	TI.1.1.1	10,459±0,377	92	TD.1.1.1	9,079±0,332
13	G.2.2.1	14,059±0,475	53	TM.4.2.1	10,459±0,126	93	TG.1.5.1	9,078±0,332
14	TM.2.3.1	14,017±0,644	54	TE.5.2.1	10,334±0,125	94	TI.5.1.1	9,078±0,502
15	TM.6.1.1	13,849±2,178	55	TI.1.5.1	10,334±0,332	95	TD.6.1.1	9,037±0,475
16	TM.6.8.1	13,682±0,191	56	TM.6.3.1	10,334±0,126	96	TE.4.3.1	9,036±0,197
17	TA.1.7.1	13,598±0,125	57	TA.2.8.1	10,292±0,072	97	TM.8.2.1	9,036±0,191
18	TI.4.1.1	13,473±0,332	58	TM.7.1.1	10,251±0,192	98	TG.3.4.1	8,995±0,261
19	TI.2.4.1	13,18±0,192	59	TI.5.4.1	10,208±0,332	99	TI.2.9.1	8,994±0,145
20	TD.5.6.1	13,138±0,261	60	TK.5.4.2	10,208±0,352	100	TM.4.1.1	8,911±0,261
21	TK.5.1.1	12,845±0,251	61	G.2.1.1	10,208±0,278	101	TI.2.3.1	8,869±0,072
22	TA.3.5.1	12,719±0,332	62	TI.4.4.1	10,166±0,192	102	TK.1.9.1	8,869±0,179
23	G.6.2.1	12,636±0,191	63	TE.6.3.1	10,125±0,316	103	TM.2.4.1	8,869±0,383
24	TE.7.4.1	12,468±0,125	64	TI.5.2.1	10,124±0,192	104	TM.5.9.1	8,869±0,289
25	TM.3.6.1	12,301±0,261	65	TK.4.6.1	10,082±0,126	105	TD.3.5.1	8,827±0,122
26	TA.3.3.2	12,217±0,332	66	TK.2.5.1	9,999±0,192	106	TA.2.4.1	8,787±0,261
27	TA.1.6.1	12,092±0,125	67	TA.3.1.1	9,957±0,146	107	TG.2.7.1	8,785±0,137
28	TE.6.4.1	12,05±0,191	68	TE.7.3.1	9,957±0,217	108	TI.5.3.1	8,783±0,261
29	TK.1.3.1	12,008±0,261	69	G.7.1.1	9,915±0,072	109	TG.1.2.1	8,744±0,769
30	G.2.4.1	11,924±0,145	70	G.2.3.1	9,874±0,182	110	TM.7.2.1	8,743±0,145
31	TA.3.4.1	11,882±0,192	71	TK.1.5.1	9,873±0,191	111	TM.5.1.1	8,702±0,127
32	TD.6.3.1	11,84±0,251	72	TK.3.5.1	9,873±0,315	112	TG.2.4.1	8,66±0,316
33	TK.1.6.1	11,757±0,384	73	TI.1.2.1	9,873±0,261	113	TM.1.6.1	8,659±0,174
34	TI.3.1.1	11,632±0,261	74	TE.4.1.1	9,831±0,332	114	TE.1.6.1	8,618±0,079
35	TM.5.6.1	11,589±0,251	75	TK.1.4.1	9,789±0,192	115	TK.4.3.1	8,617±0,317
36	TE.1.5.1	11,547±0,316	76	TG.3.2.1	9,748±0,261	116	TM.3.2.1	8,617±0,386
37	G.1.1.1	11,464±0,332	77	TI.2.8.1	9,622±0,072	117	TK.3.2.1	8,576±0,332
38	TA.1.4.1	11,464±0,377	78	TK.4.4.1	9,58±0,332	118	TK.5.5.1	8,45±0,111
39	G.8.1.1	11,38±0,404	79	TI.4.6.1	9,538±0,191	119	TM.4.5.1	8,367±0,426
40	G.5.1.1	11,38±0,192	80	TK.5.6.1	9,497±0,073	120	TK.3.7.1	8,325±0,375

No	İzolat İsmi	Beta Karoten Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Beta Karoten Üretimi (g/L)	No	İzolat İsmi	Beta Karoten Üretimi (g/L)
121	TD.3.7.1	8,324±0,139	152	TM.6.2.1	7,822±0,129	183	TA.1.1.1	6,777±0,154
122	G.6.1.1	8,283±0,197	153	G.3.2.1	7,781±0,421	184	TE.1.7.1	6,776±0,403
123	TD.6.7.1	8,242±0,145	154	TI.2.6.1	7,78±0,261	185	TE.1.2.1	6,735±0,441
124	TK.1.8.1	8,241±0,198	155	TK.3.8.1	7,78±0,326	186	TG.1.7.1	6,734±0,303
125	TD.4.2.1	8,2±0,174	156	TI.3.2.1	7,739±0,211	187	G.8.2.1	6,693±0,126
126	TE.2.1.1	8,199±0,215	157	TD.3.4.1	7,738±0,315	188	TM.3.7.1	6,692±0,332
127	TA.2.3.1	8,198±0,252	158	TI.4.2.1	7,738±0,902	189	TK.3.10.1	6,651±0,441
128	G.4.2.1	8,158±0,278	159	TM.1.2.1	7,738±0,191	190	TA.2.5.1	6,609±0,261
129	G.1.2.1	8,157±0,624	160	TI.3.3.1	7,655±0,381	191	TE.1.8.1	6,567±0,251
130	TE.4.2.1	8,116±0,101	161	TG.2.6.1	7,655±0,269	192	TI.4.3.1	6,567±0,217
131	TM.3.3.1	8,115±0,191	162	TK.3.11.1	7,613±0,608	193	TD.4.7.1	6,526±0,191
132	TD.1.4.1	8,074±0,218	163	TD.6.2.1	7,571±0,199	194	TD.6.8.1	6,525±0,261
133	TD.6.5.1	8,073±0,185	164	TK.2.2.1	7,571±0,267	195	TA.2.2.1	6,483±0,191
134	TM.3.1.1	8,074±1,121	165	TK.4.2.1	7,571±0,187	196	TK.1.1.1	6,441±0,126
135	TD.4.1.1	8,032±0,316	166	TD.2.5.1	7,529±0,193	197	TI.5.7.1	6,274±0,261
136	TE.4.5.1	8,031±0,404	167	TE.3.7.1	7,488±0,129	198	TM.6.6.1	6,19±0,125
137	TE.5.6.1	8,03±0,169	168	TG.2.3.1	7,487±0,261	199	TM.1.3.1	6,148±0,145
138	TK.5.2.1	8,03±0,442	169	TM.5.8.1	7,446±0,251	200	TK.4.7.1	6,064±0,127
139	TA.1.5.1	7,992±0,261	170	TD.1.3.1	7,363±0,421	201	TD.5.8.1	5,898±0,072
140	TA.1.8.1	7,991±0,258	171	TK.3.9.1	7,362±0,177	202	TE.3.3.1	5,897±0,072
141	TI.5.8.1	7,99±0,261	172	TG.1.3.1	7,32±0,332	203	TD.1.5.1	5,855±0,153
142	TG.3.5.1	7,948±0,452	173	TD.2.3.1	7,194±0,127	204	TA.3.3.1	5,813±0,128
143	TI.3.5.1	7,948±0,456	174	TM.4.6.1	7,069±0,147	205	TD.1.6.1	5,771±0,194
144	TM.8.3.1	7,906±0,401	175	TD.1.2.1	7,028±0,196	206	TE.1.3.1	5,646±0,149
145	TA.1.3.1	7,865±0,579	176	TK.4.5.1	7,027±0,189	207	TG.1.1.1	5,604±0,267
146	TI.2.1.1	7,864±0,891	177	G.5.3.1	6,986±0,265	208	TE.1.4.1	5,354±0,155
147	TM.4.4.1	7,864±0,523	178	TK.1.2.1	6,985±0,387	209	TE.3.6.1	5,353±0,396
148	G.3.1.1	7,823±0,332	179	TK.2.1.1	6,984±0,554	210	TG.1.6.1	5,311±0,452
149	TE.3.4.1	7,822±0,502	180	TM.3.5.1	6,983±0,713	211	TD.5.5.1	5,27±0,507
150	TI.1.6.1	7,822±0,148	181	G.9.2.1	6,861±0,941	212	TM.3.4.1	5,269±0,315
151	TM.1.7.1	7,822±0,131	182	TG.3.1.1	6,818±0,333			

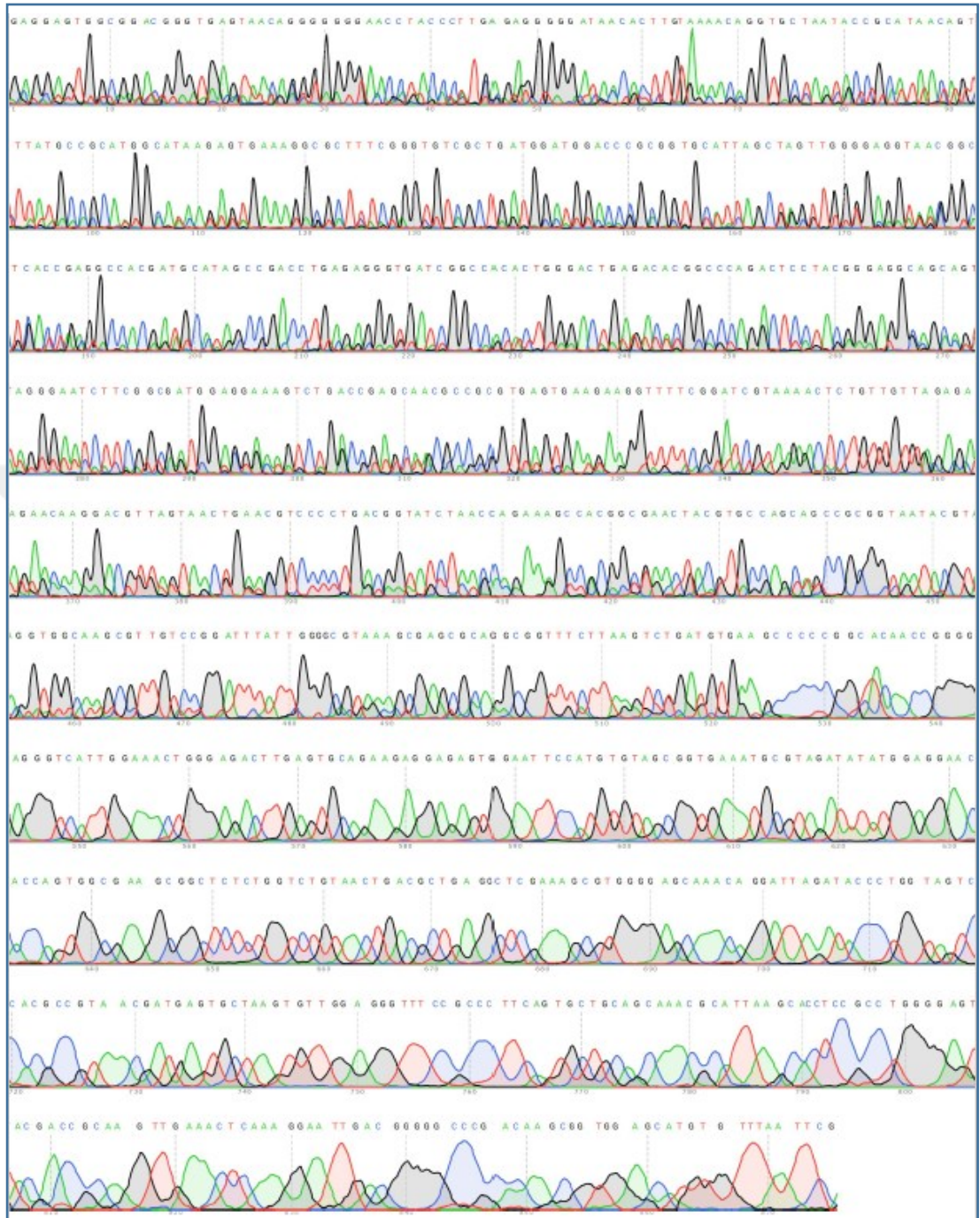
EK 4.A TI.5.8.1 Kodlu İzolatların 16S rRNA Kromotogramı



EK 4.B TK.1.4.1 Kodlu İzolatların 16S rRNA Kromotogramı



EK 4.C G.4.3.1 Kodlu İzolatların 16S rRNA Kromotogramı



EK 5.A TI.5.8.1'in 16S rRNA Sekansı ile Benzer İzolatların Karşılaştırılması

TI.5.8.1	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_toyonensis_KP326368	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_mycooides_MT478147	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_anthraxis_MN329991	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_cereus_MK285635	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_subtilis_MH422001	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60
Bacillus_samanii_KJ590517	GGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAACATTTTGCACCGCATGGTGCGAA	60

TI.5.8.1	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_toyonensis_KP326368	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_mycooides_MT478147	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_anthraxis_MN329991	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_cereus_MK285635	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_subtilis_MH422001	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120
Bacillus_samanii_KJ590517	ATTCAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT	120

TI.5.8.1	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_toyonensis_KP326368	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_mycooides_MT478147	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_anthraxis_MN329991	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_cereus_MK285635	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_subtilis_MH422001	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180
Bacillus_samanii_KJ590517	GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC	180

TI.5.8.1	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_toyonensis_KP326368	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_mycooides_MT478147	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_anthraxis_MN329991	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_cereus_MK285635	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_subtilis_MH422001	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240
Bacillus_samanii_KJ590517	TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG	240

TI.5.8.1	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_toyonensis_KP326368	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_mycooides_MT478147	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_anthraxis_MN329991	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_cereus_MK285635	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_subtilis_MH422001	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300
Bacillus_samanii_KJ590517	GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTC	300

TI.5.8.1	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_toyonensis_KP326368	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_mycooides_MT478147	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_anthraxis_MN329991	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_cereus_MK285635	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_subtilis_MH422001	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360
Bacillus_samanii_KJ590517	TGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCA	360

TI.5.8.1	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_toyonensis_KP326368	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_mycooides_MT478147	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_anthraxis_MN329991	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_cereus_MK285635	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_subtilis_MH422001	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420
Bacillus_samanii_KJ590517	GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC	420

TI.5.8.1	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_toyonensis_KP326368	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_mycooides_MT478147	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_anthraxis_MN329991	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_cereus_MK285635	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_subtilis_MH422001	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480
Bacillus_samanii_KJ590517	CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC	480

TI.5.8.1	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_toyonensis_KP326368	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_mycooides_MT478147	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_anthraxis_MN329991	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_cereus_MK285635	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_subtilis_MH422001	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540
Bacillus_samanii_KJ590517	GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGG	540

TI.5.8.1	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAAGATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	600
Bacillus_toyonensis_KP326368	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599
Bacillus_mycooides_MT478147	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599
Bacillus_anthraxis_MN329991	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599
Bacillus_cereus_MK285635	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599
Bacillus_subtilis_MH422001	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599
Bacillus_samanii_KJ590517	ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA - GATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGA	599

TI.5.8.1	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT	660
Bacillus_toyonensis_KP326368	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT	659
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG - GAGCAAACAGGATTAGAT	658
Bacillus_mycooides_MT478147	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG - GAGCAAACAGGATTAGAT	658
Bacillus_anthraxis_MN329991	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG - GAGCAAACAGGATTAGAT	658
Bacillus_cereus_MK285635	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG - GAGCAAACAGGATTAGAT	658
Bacillus_subtilis_MH422001	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG - GAGCAAACAGGATTAGAT	658
Bacillus_samanii_KJ590517	CTTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG - GAGCAAACAGGATTAGAT	658

TI.5.8.1	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	720
Bacillus_toyonensis_KP326368	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	719
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	718
Bacillus_mycooides_MT478147	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	718
Bacillus_anthraxis_MN329991	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	718
Bacillus_cereus_MK285635	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	718
Bacillus_subtilis_MH422001	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	718
Bacillus_samanii_KJ590517	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGC TAAATGTTAAAAGGGTTTCCGCCCTTT	718

TI.5.8.1	TAGTGCTGAA	730
Bacillus_toyonensis_KP326368	--GTGCTGAA	727
Bacillus_pseudomycooides_MT573519	--GTGCTGAA	726
Bacillus_mycooides_MT478147	--GTGCTGAA	726
Bacillus_anthraxis_MN329991	--GTGCTGAA	726
Bacillus_cereus_MK285635	--GTGCTGAA	726
Bacillus_subtilis_MH422001	--GTGCTGAA	726
Bacillus_samanii_KJ590517	--GTGCTGAA	726

EK 5.B TK.1.4.1'in 16S rRNA Sekansı ile Benzer İzolatların Karşılaştırılması

TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGGCC 60 GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGGCC 60 GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGGCC 60 GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGGCC 60 GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGGCC 60 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	CTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGA 120 CTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGA 120 CTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGA 120 CTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGA 120 CTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGA 120 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACT 180 ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACT 180 ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACT 180 ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACT 180 ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACT 180 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTG 240 CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTG 240 CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTG 240 CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTG 240 CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTTGTGAAAGCCCTG 240 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	GGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGA 300 GGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGA 300 GGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGA 300 GGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGA 300 GGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGA 300 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	ATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGC 360 ATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGC 360 ATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGC 360 ATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGC 360 ATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGC 360 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	TACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAC 420 TACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAC 420 TACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAC 420 TACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAC 420 TACCTGGACCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAC 420 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCGAGT 480 CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCGAGT 480 CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCGAGT 480 CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCGAGT 480 CCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCGAGT 480 *****
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	ATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCGCTGG-GGAATACGGTCGCAAGACTAA-ACTCAA 538 ATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA 540 ATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA 540 ATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA 540 ATCGAAGCTAACCGCTTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA 540 ***** * * * * *
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	AGGAATTGACGGGGCCCGCACAACTGTAATTTG---TTTTAATTCATCCAACG-C 594 AGGAATTGACGGGGCCCGCACAACTGTAATTTG---TTTTAATTCATCCAACGCG 600 AGGAATTGACGGGGCCCGCACAACTGTAATTTG---TTTTAATTCATCCAACGCG 599 AGGAATTGACGGGGCCCGCACAACTGTAATTTG---TTTTAATTCATNCAACGCG 599 AGGAATTGACGGGGCCCGCACAACTGTAATTTG---TTTTAATTCATGCAACGCG 599 ***** ** * * * * *
TK.1.4.1 Pseudomonas_geniculata_KP890071 Stenotrophomonas_sp_MK424600 Stenotrophomonas_maltophilia_EU934076 Stenotrophomonas_pavanii_	AAGAACCCTTACCTGCCTTA-CATTTCAAACCTTTCCA-- 631 AAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACCTTTCCA- 639 AAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACCTTTCCA 639 AAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACCTTTCCA- 638 AAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGAACCTTTCCA- 638 ***** * * * * *

EK 6.A Kullanılan Cihazlar

- Biyolojik Emniyet Kabini (MN120, NÜVE, TÜRKİYE)
- Etüv (EN500, NÜVE, TÜRKİYE)
- Fırın (FN400, NÜVE, TÜRKİYE)
- -86 Derin Dondurucu (DF290, NÜVE, TÜRKİYE)
- Otoklav (NC40M, NÜVE, TÜRKİYE)
- Su Banyosu (NB9, NÜVE, TÜRKİYE)
- Santrifüj (NF400, NÜVE, TÜRKİYE)
- Mikrosantrifüj (NF24, NÜVE, TÜRKİYE)
- Ph Metre (HI2002-02 edge, HANNA, ABD)
- Çalkalamalı İnkübatör (IS20R, DAIHAN, G.KORE)
- Çalkalamalı Su Banyosu (MaXturdy, DAIHAN, G.KORE)
- Hassas Terazî (AS220R2, RADWAG, POLONYA)
- Spektrofotometre (UV-5100, METAS, ÇİN)
- Ultrasonik Su Banyosu (USC 900 TH, VWR, ALMANYA)
- Homojenizatör (T25, IKA, ALMANYA)
- Saf Su Cihazı (Direct-Q3, MILLIPORE, ABD)
- HPLC (Infinity 1260, AGILENT, ABD)
- FTIR (Verter 70, BRUKER, İNGİLTERE)
- Raman Spektroskopisi (Alpha 300 R, WİTEC, ALMANYA)
- LC/MS (6460 Triple Quad, AGILENT, ABD)

EK 6.B Kullanılan Kimyasallar

- Nutrient Broth (Merck, 1054430500)
- Tryptic Soy Broth (Merck 1054590500)
- Plate Count Agar (Merck,1054630500)
- Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid, CM0485)
- Agar Agar (Merck, 1054590500)
- Peptone from soymeal (Merck, 1072120500)
- Casein peptone (Merck, 1072131000)
- Peptone (Oxoid, LP0037)
- Sodyum Klorür (Merck,1064045000)
- Glucose (Sigma, 16301-1KG)
- Lactose (Fluka, 17814-1KG)
- Fructose (F0127, 16301-1KG)
- Urea (Merck, 1084871000)
- Beef Extract (Sigma, B4888-500G)
- Malt Extract (Sigma, 70167-500G)
- Yeast Extract (Sigma, 70161 -500G)
- Serine (Merck, 107760100)
- Methionine (Merck, 1057070100)
- Potassium phosphate monobasic (Sigma, 04243-1KG)
- Potassium phosphate dibasic (Sigma, 60356-1KG)
- Iron sulfate heptahydrate (Sigma, 12354-1KG)
- Magnesium sulfate heptahydrate (Sigma, 63140-1KG)
- %37'lik hidroklorik asit (Merck,1003172011)
- Sodyum Hidroksit (Sigma, 221465-500G)
- Asetonitril (Merck,1000302500)
- Metanol (Merck,1060092511)
- Etanol (Merck,1009832511)
- Tetrahidrofurana (Sigma, 34865-2.5L)
- Ninhydrin (Sigma, 168149-25G)
- Pyrogallol (Sigma, P0381-250G)
- Potasyum Hidroksit (Merck, 1050121000)

- Fosforik asit (Merck, 1005732500)
- Asetik asit (Merck, 1018302500)
- Hekzan (Merck, 270504-2.5L)
- Biospeedy DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen Ltd. Şti. İstanbul/Türkiye)
- Jsem LC-MS / MS amino asit kiti (Sem Laboratuvar A.Ş. İstanbul/Türkiye)
- DOWEX 50W X8-400 (217514-100G)
- AMBERLİTE IR-120 (06428-100G)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Cihat GÜNER

Eğitim:

Lise: Ahmet Rasim Y.D.A.L (2003 – 2007)

Lisans: Fatih Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü (2007-2012)

Y. Lisans: Fatih Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik A.B.D. (2012-2016)

