

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BAZI MEYVELERDEN *ASPERGILLUS NIGER*'İN İZOLASYONU,  
TANIMLANMASI VE SODYUM GLUKONAT ÜRETİMİNDE  
KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUSENUR ÖZKAN**

**DENİZLİ, OCAK - 2023**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



BAZI MEYVELERDEN *ASPERGİLLUS NİGER*'İN  
İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE SODYUM GLUKONAT  
ÜRETİMİNDE KULLANIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BUSENUR ÖZKAN

DENİZLİ, OCAK - 2023

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon tarafından 2022FEBE002 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**Busenur Özkan**

## ÖZET

**BAZI MEYVELERDEN *ASPERGILLUS NIGER*'İN İZOLASYONU,  
TANIMLANMASI VE SODYUM GLUKONAT ÜRETİMİNDE  
KULLANIMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BUSENUR ÖZKAN  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.SEBAHATTİN NAS)**

**DENİZLİ, OCAK - 2023**

Sodyum glukonat gıda, kimya, inşaat ve çevre sektörlerinde kullanılan bir yardımcı kimyasaldır. *Aspergillus niger* suşları glikozu okside ederek glukonik asit üretebilme yeteneğine sahiptir. Bu tezin amacı ise glukonik asidi biyoteknolojik yolla üretimi için aday *Aspergillus niger* suşlarının çeşitli meyvelerden izolasyonu ve tanımlanması, takiben yüksek glukonik asit üreticilerinin belirlenmesi ve pilot ölçekte kesikli ve yarı kesikli sistemde sodyum glukonatın üretilmesidir. Çalışmada PDA besiyerinden 46 adet tipik *Aspergillus* kolonilerinden toplanmış ve ardından morfolojik özelliklerine göre 25 adedi ribozomal ITS bölgenin dizi analizi sonucuna göre tanımlaması gerçekleştirilmiştir. Buna göre toplanan izolatlardan 21'inin *Aspergillus niger* türüne ait olduğu %97'den yüksek homoloji ile tespit edilmiştir. %1 glikoz varlığında bu suşlar arasından en yüksek sodyum glukonat verimi ( $Y_{s/p} > 0.5$ ) *A. niger* SG-3 ve SG-21 suşlarında belirlenmiştir. Pilot ölçek 40 saat kesikli fermentasyon sonunda 61.14 g/L sodyum glukonat üretilmiştir. Ayrıca yarı kesikli fermentasyonda ise 105,30 g/L sodyum glukonat üretilmiştir. Her iki fermentasyon sonunda üretilen sodyum glukonat kristalizasyon ile geri kazanılarak HPLC sisteminde standart ile karşılaştırılarak karakterize edilmiştir. Bu çalışmanın sonunda endüstriyel kullanıma hazır sodyum glukonat üretimi için yerel kaynaklı *Aspergillus niger* SG-21 suşu belirlenmiştir. Ayrıca söz konusu suş ile pilot ölçekli sistemlerde sodyum glukonat üretilbildiği gösterilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Aspergillus Niger*, Sodyum glukonat, Fermentasyon

## ABSTRACT

### ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *ASPERGILLUS NIGER* FROM SOME FRUITS AND USE FOR SODIUM GLUCONATE PRODUCTION

MSC THESIS

BUSENUR ÖZKAN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR:PROF. DR. SEBAHATTİN NAS)

DENİZLİ, JANUARY 2023

Sodium gluconate is an auxiliary chemical used in the food, chemical, construction and environmental sectors. *Aspergillus niger* strains have the ability to produce gluconic acid by oxidizing glucose. The aim of this thesis is the isolation and identification of candidate *Aspergillus niger* strains from various fruits for the biotechnological production of sodium gluconate, followed by the identification of high sodium gluconate producers and the production of sodium gluconate in batch and semi-batch system at pilot scale. In the study, 46 typical *Aspergillus* colonies were collected from PDA medium, and then 25 ribosomal ITS regions were identified according to their morphological features according to the results of the sequence analysis. Accordingly, it was determined that 21 of the collected isolates belonged to the *Aspergillus niger* species, with homology higher than 97%. In the presence of 1% glucose, the highest sodium gluconate yield ( $Y_{s/p}$ ,  $>0.5$ ) among these strains was determined in *A. niger* SG3 and SG21 strains. 61.14 g/L sodium gluconate could be produced at the end of the pilot scale 40 hours of intermittent fermentation. In addition, 105.30 g/L sodium gluconate could be produced in semi-batch fermentation. The sodium gluconate produced at the end of both fermentations was recovered by crystallization and characterized by comparing it with the standard in the HPLC system. At the end of this study, the locally sourced *Aspergillus niger* SG21 strain was determined for the production of ready-to-use sodium gluconate for industrial use. It has also been shown that sodium gluconate can be produced in pilot scale systems with this strain.

**KEYWORDS:** *Aspergillus Niger*, Sodium Gluconate, Fermentation

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	v
SEMBOL LİSTESİ .....	vi
KISALTMALAR .....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
1.2 Literatür Özeti .....	2
1.2.1 <i>Aspergillus niger</i> .....	2
1.2.2 Glukonik asit.....	5
1.2.2.1 Glukonik asit üretim yöntemleri .....	9
1.2.2.2 Glukonik asit biyosentezi için kullanılan fermentasyon yöntemleri	12
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>14</b>
2.1 Materyal.....	14
2.2 <i>Aspergillus</i> sp. İzolasyonu.....	14
2.3 İzolatların Tanımlanması.....	15
2.3.1 DNA izolasyonu .....	15
2.4 <i>Aspergillus</i> sp. Suşlarında Sodyum Glukonat Üretim Miktarının Belirlenmesi.....	17
2.5 Farklı Glikoz Konsantrasyonlarında Sodyum Glukonat Üretim Miktarının Belirlenmesi .....	18
2.6 <i>Aspergillus niger</i> SG3 ve SG21 Suşlarında Sodyum Glukonat Üretim HPLC ile doğrulanması .....	18
2.7 Yarı- Kesikli Fermentör Sisteminde Sodyum Glukonat Üretimi ve Rezidü Şeker Analizi.....	19
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>21</b>
3.1 <i>Aspergillus niger</i> İzolasyonu.....	21
3.2 <i>Aspergillus</i> sp. İzolatlarının Tanımlanması.....	25
3.3 <i>A. niger</i> İzolatlarının Glukonik Asit Üretim Miktarı.....	27
29	
3.4 <i>A. niger</i> SG-21 Suşu Tarafından Üretilen Glukonik asidin HPLC ile Doğrulanması .....	30
3.5 Pilot Ölçek Sodyum Glukonat Üretim Çalışmaları .....	31
31	
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>36</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>6. EKLER.....</b>	<b>40</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>56</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : <i>Aspergillus Niger</i> Morfoloji .....	3
Şekil.1.2 : <i>Aspergillus Niger</i> Elektron mikroskobu görüntüsü.....	3
Şekil 1.3 : GA'nın kimyasal formülü (A) Glukona Lakton (B).....	6
Şekil 1.4 : Glikoz oksidaz aracılığıyla glikozdan glukonik asit üretimi.....	11
Şekil 1.5 : Glikoz dehidrogenaz enzimi ile glukonik asit üretim basamakları..	12
Şekil 3.1 : Çalışmaya dahil edilen bazı örneklere ait görüntüler.....	21
Şekil 3.2 : Bazı örneklerden yapılan ekimler sonucunda PDA üzerinde gelişen kolonilerin görüntüsü.....	22
Şekil 3.3 : Toplanan kolonilerden potansiyel <i>A.niger</i> olanların hücresel görüntüsü.....	23
Şekil 3.4 : Toplanan izolatların sıvı ortamdaki hücre görüntüleri.....	23
Şekil 3.5 : İzolarların PDA ortamındaki koloni morfolojisi.....	24
Şekil 3.6 : Liyofilize edilen <i>A.niger</i> örnekleri.....	25
Şekil 3.7 : SG-1, SG-3, SG-4, SG-5, SG-6, SG-7, SG-8, SG-9, SG-10, SG-11, SG-12, SG-13, SG-15, SG-16, SG-20, SG-21, SG-25, SG-26, SG-29, SG-31, SG-36 PZR sonrası agaroz jel görüntüleri.....	25
Şekil 3.8 : SG-38, SG-42, SG-45, SG-47 PZR sonrası agaroz jel görüntüleri...26	
Şekil 3.9 : <i>A.niger</i> izolatlarının kontrolsüz koşulda glukonik asit üretim verimi ( $Y_{GA/Glikoz}$ ).....	27
Şekil 3.10 : <i>A.niger</i> izolatlarının %5 ve %10 glikoz içeren nutrient broth ortamında glukonik asit üretim verimi ( $Y_{GA/Glikoz}$ ).....	28
Şekil 3.11 : <i>A.niger</i> SG-3 ve SG-21 izolatlarının %5 glikoz içeren sıvı ortamında pH'sı nötrlenerek yapılan fermentasyondaki glukonik asit verimi.....	29
Şekil 3.12 : <i>A. niger</i> izolatlarının %5 glikoz içeren nutrient sıvı ortamında nötrlenerek yapılan fermentasyondaki glukonik asit verimi.....	29
Şekil 3.13 : Sodyum glukonat kromatogramı.....	30
Şekil 3.14 : Fermantöre aşılacak için geliştirilen <i>A.niger</i> SG-21.....	31
Şekil 3.15 : 200 L hacimli pH kontrollü, hava karıştırılmalı fermantör görüntüsü.....	32
Şekil 3.16 : 2 ton kapasiteli pH kontrollü ve impeller karıştırılmalı fermantörün görüntüsü.....	33
Şekil 3.17 : Tez kapsamında üretilen proje çıktısı kristal sodyum glukonatın görüntüsü.....	34
Şekil 3.18 : Standart ve tez çıktısı sodyum glukonatın HPLC kromatogram görüntüsü.....	35



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1.1 : Glukonik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	5
Tablo 1.2 : Glukonik asit ve türevlerinin kullanım alanları .....	9
Tablo 1.3 : Glukonik asit ve türevlerinin gıda katkı maddesi olarak kullanımı..	8
Tablo 1.4 : Glukonik asit üretimi için kullanılan farklı karbon kaynakları ve fermentasyon yöntemleri.....	9
Tablo 2.1 : PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler.....	16
Tablo 2.2 : DNA izolasyonu için kullanılan PZR bileşimi.....	16
Tablo 2.3 : DNA izolasyonu için kullanılan PZR koşulları .....	16
Tablo 2.4 : Besiyeri ortam bileşenleri.....	19
Tablo 3.1 : İzole edilen <i>Aspergillus niger</i> suşlarının kaynakları.....	21
Tablo 3.2 : Sekansa gönderilen örneklerin tanımlamaları.....	26
Tablo 3.3 : %5 glikoz içeren kesikli fermentasyonda sodyum glukonat üretimi.....	32
Tablo 3.4 : Yarı- kesikli fermentasyonda sodyum glukonat üretimi.....	33

## SEMBOL LİSTESİ

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>dk</b>	: Dakika
<b>sn</b>	: Saniye
<b>L</b>	: Litre
<b>g</b>	: Gram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>M</b>	: Molar
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>rpm</b>	: Dakikadaki dönüş sayısı
<b>ppm</b>	: Milyonda bir
<b>V</b>	: Volt
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>OD</b>	: Optik yoğunluk
<b>Mb</b>	: Megabayt
<b>Tm</b>	: Çözülme sıcaklığı
<b>Au</b>	: Altın
<b>Pt</b>	: Platin
<b>Pd</b>	: Palatyum

## KISALTMALAR

<b>bç</b>	:	Baz çifti
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>FAD</b>	:	Flavin Adenin Dinükleotit
<b>GA</b>	:	Glukonik asit
<b>GRAS</b>	:	Genel Olarak Güvenilir Kabul Edilen
<b>PZR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>HPLC</b>	:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>rDNA</b>	:	Ribozomal Deoksiribonükleik asit
<b>ORF</b>	:	Okuma Çerçevesi
<b>PDA</b>	:	Potato Dextrose Agar
<b>SFS</b>	:	Serum fizyolojik su

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının tamamlanması için bilgi ve birikimiyle desteğini esirgemeyen ve yanımda olan çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Sebahattin Nas'a, bu projenin oluşumunda itibaren birlikte ilerlediğimiz, mentörüm Sayın Prof. Dr. Ömer Şimşek hocama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarımnda her zaman yardımcı olan BİOLAB ekibi Ar. Gör. Duygu Zehir Şentürk ve Yük. Gıda Müh. Ece Çetin'e,

Maddi destekleri için Pamukkale Üniversitesi BAP birimine ve sağladıkları imkanları için ORTEKS Kimya fabrikasına ve emekçilerine teşekkür ederim.

Her zaman tam destekçim olan biricik ailem Yücel ve Ahmet Özkan'a derin sevgimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Proje aşamasından itibaren benim manevi destekçilerim canım arkadaşlarım Metehan'a, Okan'a, Muhammet'e, Zeynep'e ve Funda'ya Lizbon'dan sevgimi ve teşekkürlerimi gönderiyorum.

## 1. Giriş

*Aspergillus niger* suşları şeker içeriği yüksek meyvelerin doğal mikrobiyotasında çokça bulunan ve gerek enzim gerek de organik asit üretimi bakımından yetenekli mikroorganizmalardır. Bu suşlar yüksek oksijen saturasyonunda glikoz oksidaz enzimi ile glukonik asit üretebilmektedir. Glukonik asidin farklı tuzları endüstriyel kullanım açısından birçok öneme sahiptir. Örneğin sodyum glukonat gıda sanayinde ürünlerin muhafazasında, süt taşlarının temizlenmesinde, gıda ürünlerine ferahlatıcı ve ekşi bir tadın kazandırılmasında, dekapaj işleminde, donutlarda yağ emiliminin azaltılmasında kullanılabilir. Bu nedenle endüstriyel bir öneme sahip glukonik asit ve tuzların biyoteknolojik yol ile üretiminde yetenekli *Aspergillus niger* suşların belirlenmesi ve karakterize edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yüksek şeker içeriği, asidik karakteri ve hasat koşullarına bağlı olarak çeşitli funguslar meyvelerin yüzey florasının üyeleridir. Bunlardan birisi olan *Aspergillus*'lar güçlü enzimatik aktiviteleri ve ozmofilik özellikleri nedeniyle üzüm ve incir gibi şekerli meyvelerin temel mikrobiyotasında mutlaka bulunur. Meyvelerdeki *Aspergillus* çeşitliliği ise meyvenin yetiştirildiği ve hasat edildiği bölgeye ve saklama koşullarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Kısaca meyveler *Aspergillus* izolasyonu için önemli bir kaynaktır.

Glukonik asit ve tuzlarının üretiminde şeker içeriği yüksek substrat kullanılarak oksijen bakımından doyurulmuş ortamda kesikli fermentasyon kullanılmaktadır. Ancak tüm mikroorganizmalarda olduğu gibi kesikli sistemlerde üretimde başlangıç yüksek substrat konsantrasyonunu inhibisyona neden olabildiğinden yarı-kesikli fermentasyon sistemi de tercih edilmektedir. Fermentasyon sistemlerinde stabil yeni suşların geliştirilmesi bu açıdan oldukça önemlidir. Çünkü yüksek substrat konsantrasyonlarına dayanıklı yeni suşlar ile daha yüksek konsantrasyonlarda glukonik asit üretilmesi mümkün olacaktır.

## 1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının temel amacı çeşitli yüksek şekerli meyve kaynaklarından *Aspergillus niger* suşlarının izolasyonu ve moleküler tanımlanması, ardından glukonik asit miktarlarının belirlenmesidir. Ayrıca iyi üreticiler belirlenerek kesikli fermentasyon sisteminde glukonik asidin üretilmesidir. Bu temel amacın ekseninde tez çalışmasının başlıca hedefleri aşağıda sıralanmıştır.

- 1) İlk olarak hedefe yönelik çeşitli şekerli gıda kaynaklarından glukonik asit üreticisi suş olarak seçilen *Aspergillus niger* izolasyonu ve moleküler tanımlaması
- 2) *Aspergillus niger* suşlarında glukonik asit üretim miktarlarının belirlenmesi
- 3) Yarı-kesikli fermentasyon sisteminde sodyum glukonat üretimi

## 1.2 Literatür Özeti

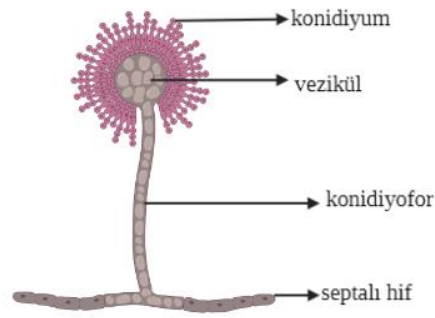
### 1.2.1 *Aspergillus niger*

*A. niger* haploid filamentli bir küf türüdür ve biyoloji alanında çok önemli bir fungusdur. *A. niger*, hücre dışı enzimler ve sitrik asit üretiminin yanı sıra atık yönetimi ve biyotransformasyonlar için kullanılmaktadır (Schuster ve diğ. 2002). *A. niger*, 35.5 ile 38.5 Mb arasında değişen ve genom boyutu yaklaşık 13.000 genden oluşur. Bu genlerden yaklaşık 8000 ile 8500 genin fonksiyonel özelliği bulunur. Ek olarak, genomda bir proteini potansiyel olarak kodlayabilecek yaklaşık 14.000 açık okuma çerçevesi (ORF) tanımlanmıştır. *A. niger*'in DNA dizisi yaklaşık olarak 33,9 milyon baz çiftinden oluşmaktadır. Toplam gen sayısının sadece yaklaşık %45'i olan 6500 genin olası işlevi belirlenebilmiştir (Debets ve diğ. 1990).

*A. niger*, geniş bir sıcaklık aralığında büyüyebilir (6-47 °C) ve optimum sıcaklığı 35-37 °C gibi yüksek bir değerdir ve değişmektedir. Büyüme için önemli parametrelerden olan su aktivitesi diğer *Aspergillus* türleri ile karşılaştırıldığında yüksektir ve bu değer 0,88'dir. Ayrıca *A. niger* 1,4-9,8 gibi geniş bir pH aralığına gelişim göstermektedir. Hava ile dağılan konidiosporların verimli üretimi bu türün

sıcak ve nemli bölgelerde daha sık olmak üzere geniş bir yayılım göstermesini sağlar (Schuster ve diğ. 2002).

*A. niger*, koyu renkli aseksüel olarak üretilmiş mantar sporlarıyla kaplı beyaz koloniler üretmektedir. İpliksi hifler bir septumla bölünür ve şeffaftır. *A. niger*'in konidioforları (eşseysiz olarak üretilen mantar sporları) genellikle 900-1600  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır ve çapı 40-60  $\mu\text{m}$  arasında değişen küresel veziküller içerir. Her bir küresel vezikül, *A. niger*'in konidioforundan çıkıntılar olan iki sıralı fiyalid ile tamamen kaplıdır. Bu fiyalidler, bir hücrenin oluşturulduğu yer olan kahverengi metuladan çıkar. Fiyalidler çapı 3 ile 5  $\mu\text{m}$  arasında değişen küresel mitosporlar oluşturmak için bir blastik bazipetal konidiogenez sürecinden geçer (Debets ve diğ. 1990).



Şekil 1.1 : *Aspergillus niger*'in morfolojik görüntüsü



Şekil 1.2 : *Aspergillus niger*'in elektron mikroskobu görüntüsü

*A. niger* genellikle toprak, bitkiler ve kapalı hava ortamları gibi yaygın mezofilik ortamlarda bulunduğu bilinmektedir. Ek olarak, şekerli meyvelerin yüzeyinde de önemli miktarda bulunmaktadır. Hatta üzüm salkımlarında bu küf türü küllenme hastalığına da neden olur. *A. niger* sadece kserofilik bir mantar değil aynı zamanda ısıya dayanıklı (yüksek sıcaklıklarda gelişebilen) bir organizmadır. İpliksi mantarların donma sıcaklıklarına karşı yüksek bir tolerans sergiledikleri de bilinmektedir (Schuster ve diğ. 2002).

*Aspergillus niger* hasat sonrası meyvelerde çürümeye neden olan en yaygın küflerin başında gelir (Whitfield 2003). Elma, şeftali, limon, üzüm, incir, çilek, mango ve kavunda çürümeye neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca domates, sarımsak ve soğanda da bozulma etkenlerinden biridir. Özellikle en çok kuru yemişlerden izole edilen küfler arasında olup; ceviz, yer fıstığı, fındık, tahıl ve yağlı tohumlarda bulunmaktadır. Et ve zeytinde de varlığı bilinmektedir (Pitt ve Hocking 1997).

*Aspergillus* cinsi küfler birincil ve ikincil metabolik üretimleri nedeniyle ticari alanda kullanılan önemli fungus cinsleridir. *A. niger*'in ürettiği enzimler hem kendisi için hem de diğer organizmalar için kaynak sağlamaktadır.

*A. niger* biyoteknoloji alanında kullanılan yaygın olarak kullanılan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Sitrik asit, amilazlar, lipazlar, selülazlar, ksilanazlar ve proteazlar gibi *A. niger* tarafından üretilen enzimlerin çoğu, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi tarafından GRAS (genel olarak güvenli kabul edilir) olarak kabul edilir (Debets ve diğ. 1990).

*A. niger* sitrik asit üretiminin ana kaynağıdır. Dünyada sitrik asit üretiminin tamamına yakını *A. niger* kaynaklıdır. Yılda 4,5 milyon tondan fazla sitrik asit üretimi yapılmaktadır.

*A. niger*, glikozun glukonik aside dönüştürülmesi için gerekli olan, glikoz oksidaz, katalaz, laktonaz ve mutarotaz gibi tüm enzimleri üretir. Bu nedenle endüstriyel glukonik asit ihtiyacı *A. niger*'in biyoteknolojik kullanımı ile karşılanmaktadır (Ramachandran ve diğ. 2006).



Biyolojik aktiviteleri olan pek çok ikincil metabolitlerin, bir dizi enzimin ve proteinin *Aspergillus* spp., tarafından üretimi bu cinsin endüstriyel anlamda ne kadar önemli olduğunu gösterir (Frisvad ve Larsen 2015).

*A. niger*'in birinci kullanımı fermentasyon ile organik asit ve enzim üretimidir. İnsan sağlığına hiçbir yan etkisi olmadan uzun bir süredir kullanılmaktadır (Abarca ve diğ. 2004).

*A. niger* biyotransformasyon ve atık artımında kullanıldığı bilinmektedir. Bu küfün ürettiği enzim gıda sektöründe kullanılan enzimlerin üretiminde önemli bir transformasyon sağlamıştır (Schuster ve diğ. 2002).

### 1.2.2 Glukonik asit

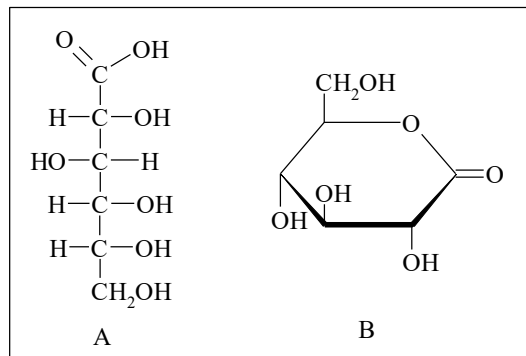
Glukonik asidin (GA) kimyasal formülü  $C_6H_{12}O_7$ 'dir. GA oda sıcaklığında renksiz kristal bir görünüme sahiptir. GA biyolojik olarak kolay parçalanabilen bir organik asit olmasının yanında orta derece kuvvetlidir. Korozif ve toksik özelliği yoktur (Othmer 1953). Hlasiwetz ve Habermann 1870 yılında yaptıkları bir çalışmada glikozun oksidasyonu sonucunda GA keşfetmişlerdir. D-glikoz oligosakkarit ve polisakkaritlerin (selüloz vb.) temel yapısını oluşturmaktadır. GA bu temel yapıyı oluşturan D-glikozun oksitlenmiş halinden meydana gelmektedir. GA yaygın kullanım alanına sahiptir (Roehr ve Kubicek 1996).

Glukonik asit (GA, penta-hidroksikaproik asit) biyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan polihidroksikarboksilik asittir (Hustede ve diğ., 1989). GA'nın alkali koşullarda yüksek şelatlama özelliği bulunmaktadır. GA temizlik sektöründe ve zorlu iklim koşullarında çimento direncini artırmak üzere katkı olarak inşaat sektöründe kullanılmaktadır (Milson ve Meers 1985; Roehr ve diğ. 1996; Ramachandran ve diğ., 2006). Buna göre GA'nın takribi piyasa değeri 300 milyon doların üzerine çıkmıştır. Dünya ölçeğinde talep giderek artmaktadır. Ekonomik değerinin bulunması nedeniyle ve maliyetinin düşürmek için GA üretiminin artırılması veya daha verimli üretim sistemlerin kurgulanması başlıca hedeflerdir. Bu doğrultuda çalışmalar yeni üretici suşların izole edilmesi veya mevcut suşların farklı karbon kaynaklarında üretim miktarlarının artırılması şeklinde iki koldan yürütülmektedir.

**Tablo 1.1 :** Glukonik asidin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Ramachandran ve diğ. 2006)

<b>Formül</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> ( 2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanoik asit)
<b>Doğası</b>	Kokusuz, aşındırıcı olmayan, hafif asidik, daha az tahriş edici, toksik olmayan, kolayca biyobozunur, uçucu olmayan organik asit
<b>Molekül ağırlığı</b>	196,16
<b>Kimyasal formülü</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
<b>Anlam</b>	2,3,4,5,6-pentahidroksiheksanoik asit
<b>pKa</b>	3.7
<b>Erime noktası</b>	120- 131 °C
<b>Kaynama noktası</b>	(%50'lik çözelti) 100 °C den fazla
<b>Özgül ağırlık</b>	1,24- 1,26
<b>Görünüm</b>	Açık kahverengi (%50 çözelti)
<b>Çözünürlük</b>	Suda çözünür
<b>Tat</b>	Ekşi yumuşak tazeleyici tat, hafif ekşi
<b>Ekşi derecesi</b>	(Sitrik asit 100 olarak kabul edildi) 29- 35
<b>Toksosite</b>	Sıçan oral LD50, 90 mL/ kg'dan fazla

*A. niger* gibi mantarlarda, GA glikozun glikoz oksidaz tarafından dehidrasyonu ile katalizlenen basit bir üründür. Bu aldehit grubun oksidasyonu sonunda oluşan glukona delta lakton GA'ya hidroliz edilirken, hidrojen peroksit ise su ve oksijene ayrıştırılır. *A. niger*'in yanı sıra *Penicillium*, *Gliocadium*, *Scopulariopsis* ve *Gonatobotrys* gibi diğer cins türleri de GA ürettiği rapor edilmiştir (Ramachandran ve diğ. 2006). Birkaç *G. oxydans*, *Z. mobilis*, *A. metanolicus*, *P. fluorescens* ve *Morexella* bakteri türleri dahil *Pullularia*, *Enterobacter* ve *Scopulariopsis* glikozu dehidrojenaz ile okside ederek GA üretmektedir (Ramachandran ve diğ. 2006).



**Şekil 1.3 :** GA'nın kimyasal formülü (A) Glukono lakton (B)

Glukonik asit ve türevleri gıda katkı maddesidir. Şarap ve meyve suyu üretiminde tadın iyileştirilmesi için katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Tatlandırmak ve asitliği düzenlemek amacıyla glukona delta lakton eklemek, tofu, mozzarella, deniz ürünleri gibi çeşitli gıda üretimlerinde tercih edilmektedir. Yağ emilimini azaltmak amacıyla çörek ve külah üretiminde kullanılmaktadır (Znad ve diğ. 2004).

Glukonik asit ve türevleri, su bazlı boya formülasyonlarında ve alkali boya çıkarma formülasyonlarında, şişe yıkamada, metal yüzlerin temizlenmesinde pas ve leke çıkarmada sıklıkla kullanılır (Ramachandran ve diğ. 2006).

**Tablo 1.2 :** Glukonik asit ve türevlerinin kullanım alanları (Ramachandran ve diğ. 2006)

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

Endüstriyel ölçekte GA üretiminde en fazla *A. niger* suşları kullanılmaktadır. *A. niger* organik madde üzerinde aerobik olarak büyüyen filamentöz bir mantardır. Doğada, toprakta, kompostta ve çürüyen bitki materyalin üzerinde bulunur. Bu küf türü *Aspergillus* cinsi içerisinde sınıflandırılır, temel özellikleri kahveden siyaha değişen sporları ve misel yapısına sahiptir. Taban hif üzerine yükselen sporogiyumları bulunur ve bunun üzerinde sporogiyoforları mevcuttur. Sporları ise sporogiyofor üzerinde yerleşmiştir. Siyah renkte sporlar oluşturdukları için *A. niger* türü kolaylıkla *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus* ve *A. aculeatus* türleri

ile karışabilmektedir. *A. niger*, 35-37 °C'de nispeten yüksek sıcaklıkta 6-47 ° C geniş sıcaklık aralığında gelişebilir. Çoğalma için su aktivitesi limiti, diğer *Aspergillus* türlerine kıyasla nispeten yüksek olan 0,88'dir. *A. niger*, son derece geniş bir pH aralığında (1,4- 9,8) büyüyebilir. *A. niger*'in bu özellikleri ve hava yoluyla dağıtılan sporların uygun üretimi, sıcak ve nemli yerlerde daha yüksek bir sıklıkta bu türlerin her yerde meydana gelmesini sağlar (Rippel ve Baldes 1955).

**Tablo 1.3 :** Glukonik asit ve türevlerinin gıda katkıları maddesi olarak kullanımı (Rodriguez ve diğ. 2006c)

Katkı Maddesi	INS Kodu	Son revizyon tarihi	Fonksiyon	Eklendiği gıdalar
Glukonik asit	E- 574	-	Asit düzenleyici Yükseltgen ajan	Meyve ve sebzeler, Süt ürünleri
Glukono- lakton	1,5 E- 575	1998	Asit düzenleyici Ayırma ajanı	Doğal fermente edilmiş sütler, peynir altı suyu protein peyniri Emzikli bebeklerde ve yeni doğanlar için ek gıda
Sodyum glukonat	E-576	1998	Ayırma ajanı Stabilizatör Yoğunlaştırıcı	Kurulmuş makarna ve nodullarda Tuzların yerine Sıcak içeceklerde
Potasyum glukonat	E- 577	1998	Asit düzenleyici Doğal takviye	Mozzeralla peyniri, bisküvi Pandispanya Soğuk et
Kalsiyum glukonat	E- 578	1998	Asit düzenleyici Sertleştirici	Bisküvi ve meyve sularında Diyet takviyelerinde
Demir glukonat	E- 579	1999	Renk koruma Stabilizatör Doğal takviye	Bahçe sebzeleri, deniz yosunu Soya sosu, sirke, salamura
Magnezyum D- glukonat	E-580	1999	Asit düzenleyici Sıkılaştırıcı ajan Doğal takviye	Ekmek ve ekmek ürünlerinde

**Tablo 1.4** : Glukonik asit üretimi için kullanılan karbon kaynakları ve fermentasyon yöntemleri (Pal ve diğ. 2016)

Mikroorganizma	Substrat	Konsantrasyon	Verim	pH	Proses	Kaynak
<i>Aspergillus niger</i>	Muz, Üzüm şırası, Pekmez	61,8 g/ L 54 g/L 69,8 g/ L	-	6	Kesikli	(Ahmet ve diğ. 2015)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 10577	Yarı kuru incir	490 g/ yarı kuru incir	% 93	7	Kesikli	(Pandey ve diğ. 2000)
<i>Aspergillus niger</i> ARNU- 4	Şeker kamışı melası	76.3 g/L	% 87.7	5,5	Kesikli	(Sharma ve diğ. 2008)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 545	Susuz glikoz	0.22g misel/ saat	GA/ -	6	Kesikli Katı yüzey fermentasyonu	(Sankpal ve diğ. 1999)
<i>Aspergillus niger</i> AN151	Saflaştırılmış glikoz	21 g/ L/ saat	1.1 g/ g	7	Kesikli	(Lu ve diğ. 2015)
<i>Aspergillus niger</i> IAM 2094	Kâğıt atığı	1.13 g/ L / gün	%92	5-6	Kesikli	(Ikeda ve diğ. 2006)
<i>Aspergillus niger</i> ORS-4410	Üzüm Muz	73.2 g/ L 0.132 g/ L/ saat	% 80,6 % 72.4	6,5 6,5	Kesikli Derin Fermentasyon	(Singh ve diğ. 2005)
<i>Aspergillus niger</i>	Üzüm	67.43 g/ L	0.96 g/g	-	Kesikli	(Buzzini ve diğ. 1993)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 545	Glikoz	1.58 g/ g/ saat 3. döngü	1.01 g/ g 3. döngü	6	Kesikli	(Sankpal ve Kulkami, 2002)
<i>Aspergillus niger</i>	Glikoz	4.6 g/ L / saat	-	5,5	Kesikli	(Znad ve diğ. 2004)
<i>Aspergillus niger</i> CCM 8004	Glikoz	4 g/ L / saat	% 93	5,5	Kesikli	(Klein ve diğ. 2002)

### 1.2.2.1 Glukonik asit üretim yöntemleri

Glukonik asidin üretmek için kimyasal, biyokimyasal, mikrobiyal fermentasyon ve enzimatik kataliz gibi çeşitli üretim yöntemleri kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemleri kendi arasında kıyasladığımızda diğer yöntemlere göre kolay çalışma koşullarının olması, düşük enerji tüketimi, istenmeyen yan ürünlerin az miktarda oluşması gibi sebeplerden dolayı ticari üretimde fermentasyon ile glukonik asit yöntemi en yaygın üretim yöntemi olarak kullanılmaktadır. Fermentasyon ile üretim yöntemi kullanıldığında en yaygın kullanılan mikroorganizma *A. niger* küfü

olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra bakteriler ile de glukonik asit üretimi gerçekleştirilmektedir (Ergül 2013).

Diğer işlemler üretim ve verim maliyetleri açısından değerlendirildiğinde en ekonomik ve verimli üretimin fermentasyon ile glukonik asit üretimidir. Biyoteknolojik yöntemler endüstriyel ölçekteki üretimde daha çok tercih edilmektedir.

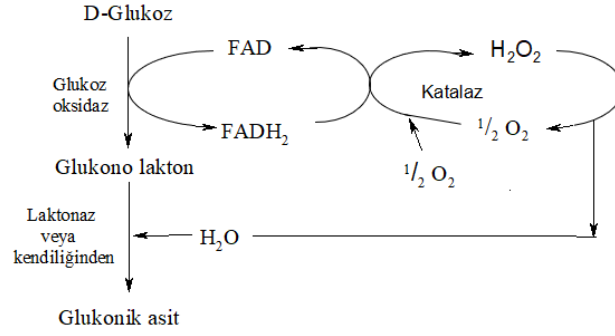
**Kimyasal yolla üretim:** Atmosferik oksijen varlığında Pt, Pd veya Au elementlerinin katalizör olarak kullanılması ile glikoz oksidasyonu sonucunda glukonik asit üretimi mümkündür. Reaksiyon sırasında alkali pH (9-10) seviyeleri tercih edilir. Bunun sebebi katalizörün reaksiyon esnasında inaktif olmasını engellemektir. Bu sayede katalizör reaksiyon hızını arttırıcı özellik gösterir.

Katalizör maliyetlerinin yüksek olması, deaktive olmaları, sızıntı ihtimali ve katalizörün geri kazanımın zor olması kimyasal üretimin dezavantajıdır.

**Mikrobiyolojik yolla üretim:** *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., ve *Mucor* spp., gibi ipliksi mantarlar başta olmak üzere *Gluconobacter* spp., *Pseudomonas* spp., veya *Acetobacter* spp., cinsinden bakteri türleri mikroorganizmaların geniş bir grubu glukonik asit üretebilmektedir (Cochrane 1958).

*A. niger* endüstriyel olarak glukonik asit üretiminde büyük bir önem taşımaktadır. Glikozun glukonik aside dönüştürülmesi için kullanılan enzimleri *A. niger* üretebilmektedir. Gerekli olan bu enzimler glikoz oksidaz, katalaz, laktanoz ve mutarotazdır (Ramachandran ve diğ. 2006).

*A. niger*'ın ürettiği enzimler ortamdaki glikozun hepsini glukonik aside dönüştürebilir. Ortamdaki D-glikoz glikoz oksidaz enziminin FAD'ın FADH'a yükseltgenmesinin ardından glukono-1,5- laktone katalizlenerek yükseltgenir. Oluşan FADH<sub>2</sub> hidrojen ve oksijen transferleri ile tekrar ilk formu olan FAD'a dönüşür (Şekil 1.4).

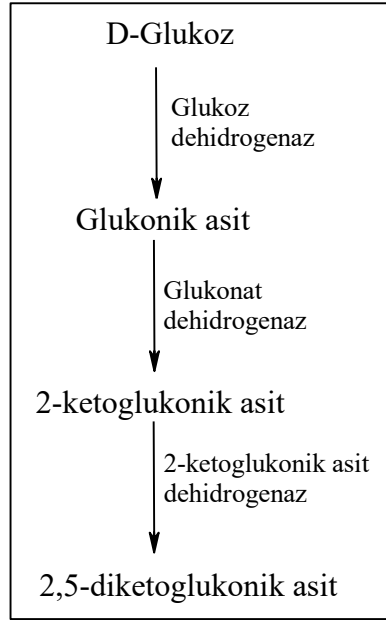


**Şekil 1.4 :** Glikoz oksidaz ile glikozdan glukonik asit üretimi

Funguslar ile glukonik asit üretiminde iki önemli parametre karşımıza çıkmaktadır. Bunlar ortamın pH seviyesi ve kullanılabilir oksijen miktarıdır. Glukonik asit üretimindeki verim glikoz oksidaz enziminin aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Reaksiyon sonucunda asidik ürün miktarında artış gözlemlenir. Bunun engellenebilmek için ortam pH'ı nötralize edilir. Bu amaç doğrultusunda kalsiyum karbonat, sodyum hidroksit gibi ürünler kullanılabilir. Asitliğe karşı önlem alınmaması durumunda üretim veriminde önemli olan glikoz oksidaz enzimi inaktif hale geçer ve döngünün tamamlanmasını engeller. Çözünmüş oksijen miktarı glukonik asit üretiminde fungusların büyüüp gelişebilmesi ve glukonik aside dönüşümünü sağlaması için önemlidir. *A. niger* kullanılan üretimlerde reaksiyon ortamının hava doygunluk seviyesinin % 90'na ulaştığı bilinmektedir (Ikeda ve diğ. 2006)

Bakterilerle glukonik asit üretiminde farklı olarak reaksiyonun glikoz dehidrogenaz enzimi varlığında gerçekleşmektedir. Ürün veriminde pH, glikoz oksidasyonu için önemli bir parametredir. Ancak bu tarz bakteriler ile fermentasyon üretiminde funguslarla gerçekleşen reaksiyon ortamının aksine asitliğin düşük olması beklenmektedir. Endüstriyel üretimlerde % 87 gibi yüksek verimli çalışmalarda pH 3,5-4,0 düzeylerindedir. Üretici olarak *Gluconobacter oxydans*'ın türü bakteri kullanılan optimal endüstriyel koşullarda ortam parametrelerine (pH, glikoz konsantrasyonu, havalandırma miktarı) bağlı bir şekilde üretim verimi %75-80 olmasına karşı, aynı zamanda üretilen oksoglukonik asitlerin ikincil metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşması nedeniyle bakteri suşları kullanılarak yapılan endüstriyel ölçekteki üretim verimi sınırlıdır (Velizarov ve diğ.1998; Olijve ve diğ. 1979; Ramachandran ve diğ. 2017; Ramachandran ve diğ. 2006).

Bakteriler glukonik asit üretmek için GDH enzimini kullanarak glikozu oksitler. Üretimin devamlılığının sağlanması için *Gluconabacter* suşları glukonatları keto-asitlere dönüştürür. Glukonat dehidrogenaz enzimi (GADH) glukonik asidi 2-ketoglukonik aside dönüştürür (Şekil 1.5) (Klasen ve diğ. 1995).



**Şekil 1.5** Glikoz dehidrogenaz enzimi ile glukonik asit üretim basamakları

### 1.2.2.2 Glukonik asit biyosentezi için kullanılan fermentasyon yöntemleri

Fermentasyon sistemleri kesikli, yarı kesikli ve sürekli sistemler olarak üç çeşittir. Hava kaldırmalı ve karıştırmalı reaktörler kullanılır. Endüstriyel boyutta üretim yapılmak istendiğinde hava beslemesi, pH kontrolü ve ısı kontrolü yapılan fermentörler kullanılır. Üretici mikroorganizma olarak *A. niger* ve *Gluconobacterler* kullanılmaktadır (Anastassiadis ve diğ. 1999)

Kesikli fermentasyon sisteminde bütün parametreler (pH, sıcaklık, karıştırma hızı vb.) ayarlanır. Substrat ortamı hazırlanır ve mikroorganizma beslemesi yapılır. Kesikli fermentasyon sistemi kapalı bir sistemdir ve fermentasyon esnasında sistem içerisine giriş-çıkış olmamaktadır (Enfors ve diğ. 2000). Ortamın substratları tükendiğinde fermentasyon işlemi sonlandırılır. Kontaminasyon riski en az olan sistemdir. Ürün verimi bütün substratın kullanılmasından dolayı daha yüksektir. Ancak işçilik maliyeti ve işlem süresi uzundur.



Yarı kesikli sistemlerin temel esası reaksiyon hızını kontrol etmek amacıyla sisteme substrat eklenmesidir. Sistemden fermentasyon boyunca ürün çıkışı olmaz ama substrat girişi olur. Bu sayede reaksiyon hızını ve metabolik reaksiyonların kontrolü sağlanır. Endüstriyel üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Enfors ve diğ. 2000).

Sürekli sistemler açık sistemlerdir. Giriş ve çıkış akışı gözlemlenmektedir. Ama ortam hacmi sabit tutulur (Enfors ve diğ. 2000). Hacmi sabit tutmak amacıyla reaktör ortamına steril substrat ilave edilirken ortamdan aynı miktarda ürün ve mikroorganizma uzaklaştırılmaktadır. Yüksek mikroorganizma miktarı ve karıştırma hızının fazla olmasından dolayı fermentasyon süresi kısadır. İşçilik ve maliyet düşüktür ancak kontaminasyon riskli yüksektir. Endüstriyel üretimlerde sürekli sistemler birçok avantaj gösterdikleri için üretimde alternatif bir yol olarak görülmektedir (Anastassiadis ve diğ. 1999-2001).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

Çalışmada *Aspergillus niger* izolasyonu yapmak için şeker oranı yüksek taze veya kurumuş meyveler ile çeşitli tahıllar kullanılmıştır. Bu ürünler market ve yerel pazarlardan temin edilmiştir. Buna göre çalışma kapsamında kuru meyvelerden üzüm (7), erik (2), incir (2), kayısı (1), cennet hurması (1) olmak üzere 13 adet örnek analize dahil edilmiştir. Bunların yanında birer adet mısır, soğan ve mantar ile üzüm ve mısır toprağı da kullanılmıştır.

### 2.2 *Aspergillus* sp. İzolasyonu

Temin edilen örnekler aseptik koşullarda laboratuvara getirilmiş ve küf izolasyonu için kullanılmıştır. Bunun için örneklerin serum fizyolojik sıvıda (% 0,85 NaCl) içerisinde dilüsyonları hazırlanmış ardından tartarik asit ile asitlendirilmiş Patato Dextrose Agar (Merck, Almanya) besiyeri üzerine sürme ekim gerçekleştirilmiştir. Ardından hazırlanan petripler 25 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda beyaz hif üzerinde siyah sporlanma gösteren küf kolonileri izole edilmiştir. Bunun için %1 glikoz içeren Nutrient Broth (Merck , Almanya) ortamına söz konusu kolonilerden alınmış ve ardından 150 rpm çalkalayarak (Wise Shake SHO-1D, Birleşik Krallık) aynı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Küflerin sıvı ortamda da iyi sporlanması sağlandıktan sonra iki kez PDA ortamına çizilerek saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Benzer şekilde tipik *A. niger* kolonilerinden sporlar toplanarak %30 gliserol çözeltiye inoküle edilerek sonraki çalışmalar için -80°C'de muhafaza edilmiştir.

## 2.3 İzolatların Tanımlanması

Toplanan izolatların tanımlanması öncelikle mikroskop muayenesi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için -80 °C’de muhafaza edilen izolatlardan alınarak PDA üzerine çizilmiş ve 25 °C’de 5 gün inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşan koloniler iyice sporlaşması gerçekleştikten sonra bir damla laktofenol pikrik asit bulunan lam üzerinde küf izolatlarının misel yapısı dağıtılmış ve mikroskobun önce 10’luk ardından da 40’lık objektif kullanılarak morfolojik yapı incelenmiştir. Tipik konidium, konidiofor ve vezikül yapılarını bulduran tipik koloniler potansiyel *A. niger* olarak tanımlanmıştır.

### 2.3.1 DNA izolasyonu

Potansiyel *A. niger* suşlarının DNA izolasyonu için GeneMATRIX Plant & Fungi DNA saflaştırma Kiti ( EURX, Poland) kullanılmıştır. Örnekler kit kullanımına hazırlanmak için %2 glikoz içeren 111 ml’lik nutrient broth ortamında aşılandı. 220 rpm hızda çalkalayıcı içerisinde 30 °C’ de 3 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında gelişen hücreler saf su ile yıkanıp -80 °C’de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda örnekler 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

Kit kullanımından önce kolonlara 30 µl tampon P kolon aktivasyonu için konulmuştur. Daha sonra liyofilize edilmiş 10 mg örnek 2 ml mikro tüplere alınmıştır. Üzerlerine 400 µl Lyse F fungi tampon eklenmiştir. 3 µl RNase A ve 10 µl Proteinase K ilave edildikten sonra 65°C’de 30 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreç tamamlandıktan sonra 130 µl AC tampon eklenip 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. 10 dakika 14 000 xg santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 400 µl süpernatant yeni bir mikro tüpe alınmıştır. Üzerine 350 µl Sol P tampon ve 250 µl %96’lık etanol eklenmiştir. 1 dakika boyunca 12 000 xg’de santrifüj yapılmıştır. Bu aşamadan sonra 600 µl lizat kolon tüplere alınmıştır ve 11 000 xg’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem lizat bitene kadar tekrar edilmiştir. Ardından yıkama tampon 500 µl eklenmiş ve 11 000 xg’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Kolonlar yeni tüplere alınıp üzerine 100 µl elüsyon tamponu ilave edilmiştir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu sürecin sonunda kolonlar

11 000 xg'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolatlar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Küf izolatlarının kesin tanısının yapılabilmesi için 5,8S rDNA alt ünitesinin iki yanında bulunan ITS1 ve ITS4 bölgelerini de kapsayan DNA dizisinin analizi ile tanımlanmıştır. DNA izolasyonu için sıcaklık döngüsü uygulayan cihazda (Kyratec. Australia) polimeraz zincir reaksiyonları yapılmıştır. Söz konusu bölgenin çoğaltılması için kullanılan primerler Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1** PZR reaksiyonlarında kullanılan primerler

<b>Primer</b>	<b>Sekans 5'- 3'</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>ITS 1</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55,41
<b>ITS 4</b>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49,73

**Tablo 2.2** DNA izolasyonu için kullanılan PZR bileşimi

<b>PZR bileşeni</b>	<b>Miktar (µl)</b>
<b>Master Karışım</b>	4
<b>İleri Primer (ITS 1) (25 µl)</b>	0,3
<b>Geri Primer (ITS 4) (25 µl)</b>	0,3
<b>Deiyonize Su</b>	14,4
<b>DNA</b>	1
<b>Toplam hacim</b>	20

**Tablo 2.3** DNA izolasyonu için kullanılan PZR koşulları

<b>Aşama</b>	<b>Sıcaklık °C</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü sayısı</b>
<b>Denatürasyon</b>	95	12 dk	x 1
<b>Denatürasyon</b>	95	10 sn	
<b>Bağlanma</b>	Tm - 5	30 sn	x 25-30
<b>Uzama</b>	72	1 dk	
<b>Son uzama</b>	72	10 dk	x 1

Toplamda 20 µl olacak şekilde PZR için oluşturulan karışım; 4 µl master karışım, 0,3 µl ITS1 primeri, 0,3 µl ITS4 primeri ve 1 µl DNA eklenerek toplam hacim deiyonize su ile tamamlanmıştır. Küf suşlarından hedef bölgenin çoğaltılması amacıyla, 95 °C 12 dk ön denatürasyonu, 30 çevrim 95 °C 10 sn, 48°C 30 sn, 72 °C 1 dk'lık program ve son aşamada 72 °C'de 10 dk olan PZR koşulları uygulanmıştır.

PZR sonucunda elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde 100 V'da 45 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) ile görüntülenmiştir.

Doğru boyuttaki PZR fragmentleri jel saflaştırma kiti (Thermo, ABD) ile saflaştırıldıktan sonra çift yönlü dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analizi için hizmet alımı yapılmış ve elde edilen veriler BLAST algoritması (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak GenBank'ta kayıtlı diğer türlerle karşılaştırılması yapılmıştır.

#### **2.4 *Aspergillus* sp. Suşlarında Sodyum Glukonat Üretim Miktarının Belirlenmesi**

*Aspergillus* sp. suşlarında sodyum glukonat üretim tespiti yapılmadan önce aynı oranda inokülasyon için spor sayımı yapılmıştır. Bunun için izolatlar PDA üzerine çizilmiş ve 25 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Küf misellerinin tamamen sporlanması tamamlandıktan sonra, petri üzerine 1 ml SFS konulmuş ardından steril bir öze ile sporlar kazınarak SFS'ye geçmesi sağlanmıştır. Son aşamada petri içerisindeki sporlu sıvı faz yeni bir tüpe alınarak stok spor solüsyonu hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra spektrofotometrede 0.1 OD<sub>600</sub> yoğunluğa ayarlanan spor solüsyonu dilüe edilerek Thoma lamında sayım gerçekleştirilmiş ve spor sayısı belirlenmiştir.

İzolatların sodyum glukonat üretim miktarını belirlemek için 0,1 OD<sub>600</sub>'de belirlenen spor sayısı miktarına göre 10<sup>7</sup> spor/adet olacak şekilde %1 glikoz içeren 5 ml nutrient broth ortamına aşılama yapılmıştır. Hazırlanan tüpler 200 rpm çalkalanarak 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sonra sıvı içerisinde oluşan küf miselleri 20 dk

4000 rpm'de santrifüjle çöktürülmüş ve berrak sıvı membran filtreden (0,45 µm) geçirilerek Shi ve diğ. (2015) tarafından CuSO<sub>4</sub> temelli spektrofotometrik yöntemle göre sodyum glukonat miktarı ölçülmüştür. Buna göre 400 µl 0,1 M CuSO<sub>4</sub> son hacmi 1 ml olacak şekilde örnek ile karıştırılmıştır. Ardından karışım kaynar su içerisinde 5 dk tutulmuş ve oda sıcaklığına soğuması sağlanmıştır. Son aşamada örneklerin OD'si 810 nm'de ölçülmüştür. Kontrol olarak taze besiyeri kullanılmıştır. Örneklerdeki sodyum glukonat miktarının hesaplanması için 5-100 mM konsantrasyon aralığındaki standart sodyum glukonat çözeltilerinden elde edilen standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

## **2.5 Farklı Glikoz Konsantrasyonlarında Sodyum Glukonat Üretim Miktarının Belirlenmesi**

Çalışma kapsamında en iyi üretici *A. niger* suşunun tespiti için ortamda bulunan şeker konsantrasyonu artırılarak denemeler yapılmıştır. Bu doğrultuda %1 şeker ilavesinin yanında %5 ve %10 glikoz ilavesi yapılarak da denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde aynı koşullarda gerçekleştirilmiş ve spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır.

## **2.6 *Aspergillus niger* SG3 ve SG21 Suşlarında Sodyum Glukonat Üretiminin HPLC ile doğrulanması**

Çalışma kapsamında sodyum glukonat üretimi bakımından seçilen iki suş; *A. niger* SG-3 ve SG-21 tarafından üretilen sodyum glukonat HPLC (Thermo-Fisher Scientific, ABD) sisteminde teşhis edilmiştir. Buna göre kültür üst sıvısı 0,2 µm filtreden geçirildikten sonra doğrudan üzerinde C18 kolon (ODS-2, 4.6x150 mm, Thermo-Fisher Scientific, ABD) takılı HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Örnekler izokratik koşulda 0,8 ml/dk akış hızında yürütülmüş ve 210 nm dalga boyunda tespiti yapılmıştır. Sodyum glukonat pikinin tespiti için 1000 ppm sodyum glukonat aynı şartlarda yürütülerek karakterize edilmiştir.

## 2.7 Yarı- Kesikli Fermentör Sisteminde Sodyum Glukonat Üretimi ve Rezidü Şeker Analizi

Yukarıda verilen deneme desenine uygun olarak seçilen yetenekli glukonik asit üreticisi *A. niger* SG-3'ün glukonik asit üretimi pilot ölçek fermentör sisteminde gerçekleştirilmiştir. Bunun 200 L ön fermentör ve 2 ton hacmine sahip sıcaklık, pH ve hava kontrollerinin yapılabildiği ana fermentör kullanılmıştır. Fermentasyon işlemine başlamadan önce gerekli spor ( $10^7$  spor/ml) nemlendirilmiş kırık mısır taneleri üzerinde *A. niger* suşlarının geliştirilmesi ile elde edilmiştir.

Fermentörde %5 dekstroz ve  $MgSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , Üre ve  $(NH_4)_2HPO_4$  bileşikleri içeren ortam kullanılmıştır. Öncelikle *A. niger* sporları 200 L ön fermentasyonun 150 L'sinde çoğaltılmış, ardından misel yapılar 2 ton fermentörün 750 L hacmine alınarak fermentasyonuna devam edilmiştir. Kesikli olarak başlatılan fermentasyon daha sonra yarı-kesikli devam edilmiştir. Bunun 750 L %5 dekstroz içeren besiyeri ortamı ilave edilerek fermentasyon sonlandırılmıştır. Fermentasyonun farklı zaman dilimlerinde sodyum glukonat analizi ve rezidü dekstroz analizi yapılarak fermentasyon izlenmiştir.

**Tablo 2.4 :** Besiyeri ortam bileşenleri

Bileşen	Miktar ( %)
D- glikoz	11,303
Su	88
$MgSO_4$	0,0183
$KH_2 PO_4$	0,00220
Üre	0,0117
$(NH_4)_2HPO_4$	0,0467
$H_2SO_4$	0,598

Fermentasyon sürecinde kalan glikoz miktarını öğrenmek için rezidü şeker analizi yapılmıştır. Bunun için örnek 500 kat seyreltilir. Deney tüpünün içerisine 1 ml seyreltilmiş örnek alınır. Üzerine sırasıyla %5'lik fenol çözeltisinden 1 ml ve 5 ml  $H_2SO_4^{-2}$  eklenir ve vortekslenir. 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Bu sürecin ardından 10 dakika soğuk suda inkübasyona bırakılır. Kör çözelti hazırlamak için 1 ml saf suyun üzerine 1 ml %5 fenol çözeltisi ve 5 ml  $H_2SO_4$  ilave edilir ve önce 20 dakika oda sıcaklığında daha sonra 10 dakika soğuk suda inkübasyona bırakılır. 470 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma gerçekleştirilir. Absorbans

1.00'dan küçük olmalıdır. Büyük çıkarsa tekrar seyreltme işlemi yapılır. Ölçülen absorbans değeri formülde (Denklem 2.1) yerine konularak hesaplama yapılır ve rezidü şeker miktarı bulunur.

$$\text{Rezidü Şeker} = \frac{ABS+0,0146}{0,0097} \times \frac{SF}{1000}$$

**Denklem 2.1:** Rezidü şeker hesaplanması (ABS: Absorbans, SF: Seyreltme faktörü)



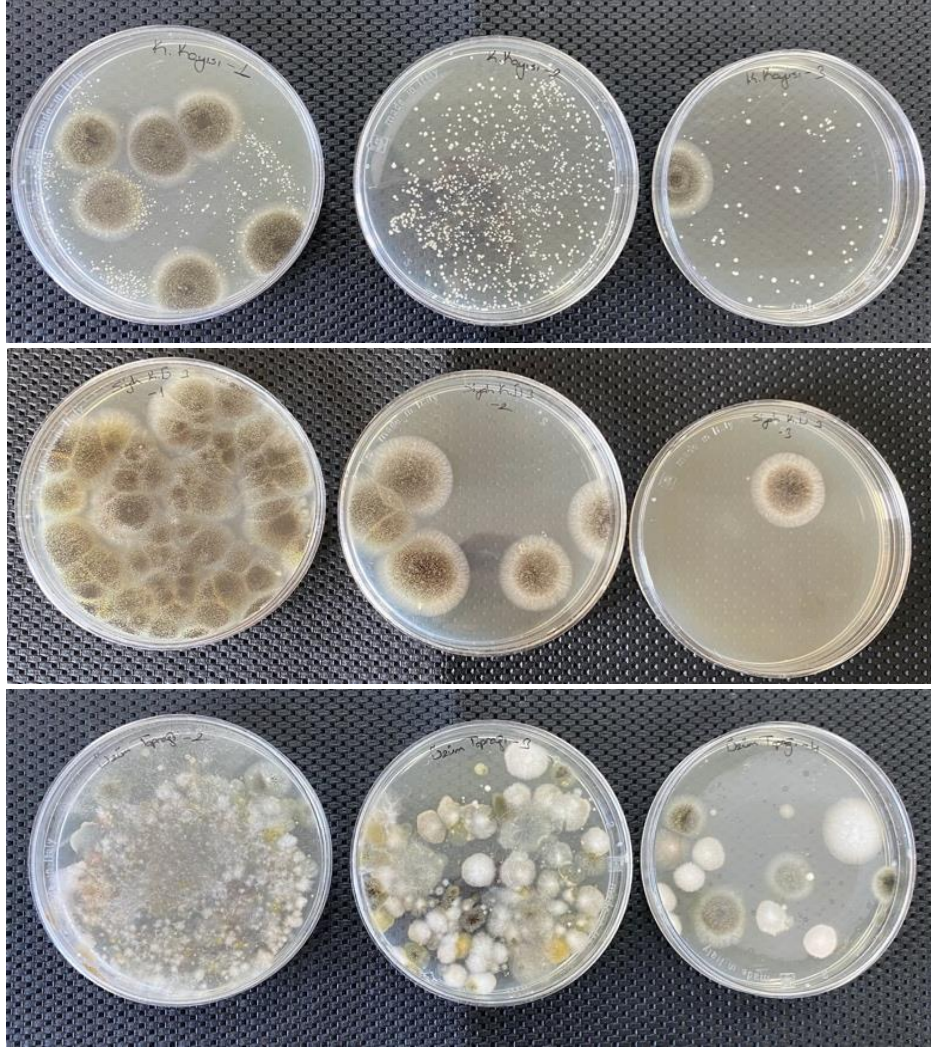
### 3. BULGULAR

#### 3.1 *Aspergillus niger* İzolasyonu

Çalışmada 18 adet örnek farklı oranlarda dilüe edilerek PDA üzerine sürme ekimleri yapılmıştır (Şekil 3.1). 25 °C’de 5 gün inkübasyon sonunda PDA’da beyaz miseller üzerinde siyah sporları bulunan koloniler seçilmiştir (Şekil 3.2). Toplam 46 adet koloni belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre en fazla tipik koloni kuru üzüm örneklerinde tespit edilmiştir. Bu sonuç kuru üzümün mikrobiotasında yaygın *A. niger* türlerin varlığına işaret etmiştir. Bunu ise mısır takip etmiştir. İzole edilen *A. niger* olduğu düşünülen küf izolatlarının kaynakları Tablo 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmaya dahil edilen bazı örneklere ait görüntüler



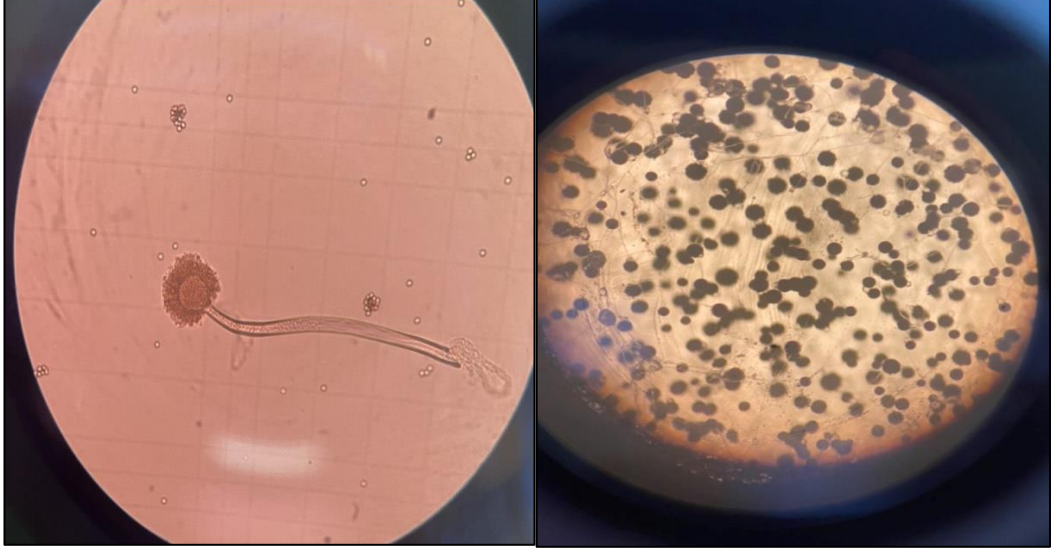
**Şekil 2.2** Bazı örneklerden yapılan ekimler sonucunda PDA üzerinde gelişen kolonilerin görüntüsü

**Tablo 2.1 :** İzole edilen *A. niger* suşlarının kaynakları

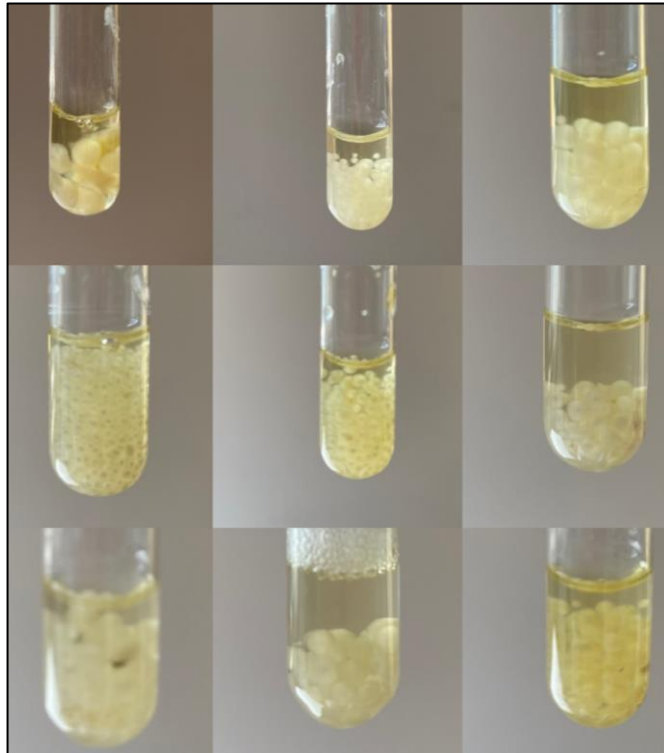
Verilen kod numarası	Kaynak
SG 1,2,3,4,5,6,7,8,15,16	Üzüm
SG 9,10,11	Mısır
SG 17	Soğan
SG 18	Erik
SG 19,20,21,22,23,24,25	Kuru Kayısı
SG 26,27,28,30,31,32	Üzüm toprağı
SG 29	Mısır toprağı
SG 33,34,35,36,38,39,40,41,45,46,47	Siyah Kuru Üzüm
SG 37,38,42,43,44,	Sarı Kuru Üzüm

Belirlenen kolonilerin potansiyel *A. niger* türü olup olmadıkları mikroskop altında morfolojik tanımlaması yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir

koloniden bir öze alınarak lam üzerinde laktofenol pikrik asit ile boyanmış ve üzeri lamel ile kapatılarak 40 kat büyütme gücü olan mikroskopta incelenmiştir. Şekil 3.3'ten görüldüğü gibi toplanan kolonilerin 46 adedi *Aspergillus* özelliği olan konidium ve konidiofor yapılarına sahip oldukları ve konidium üzerinde vezikül yapılarını bulduklarını görmüştür.

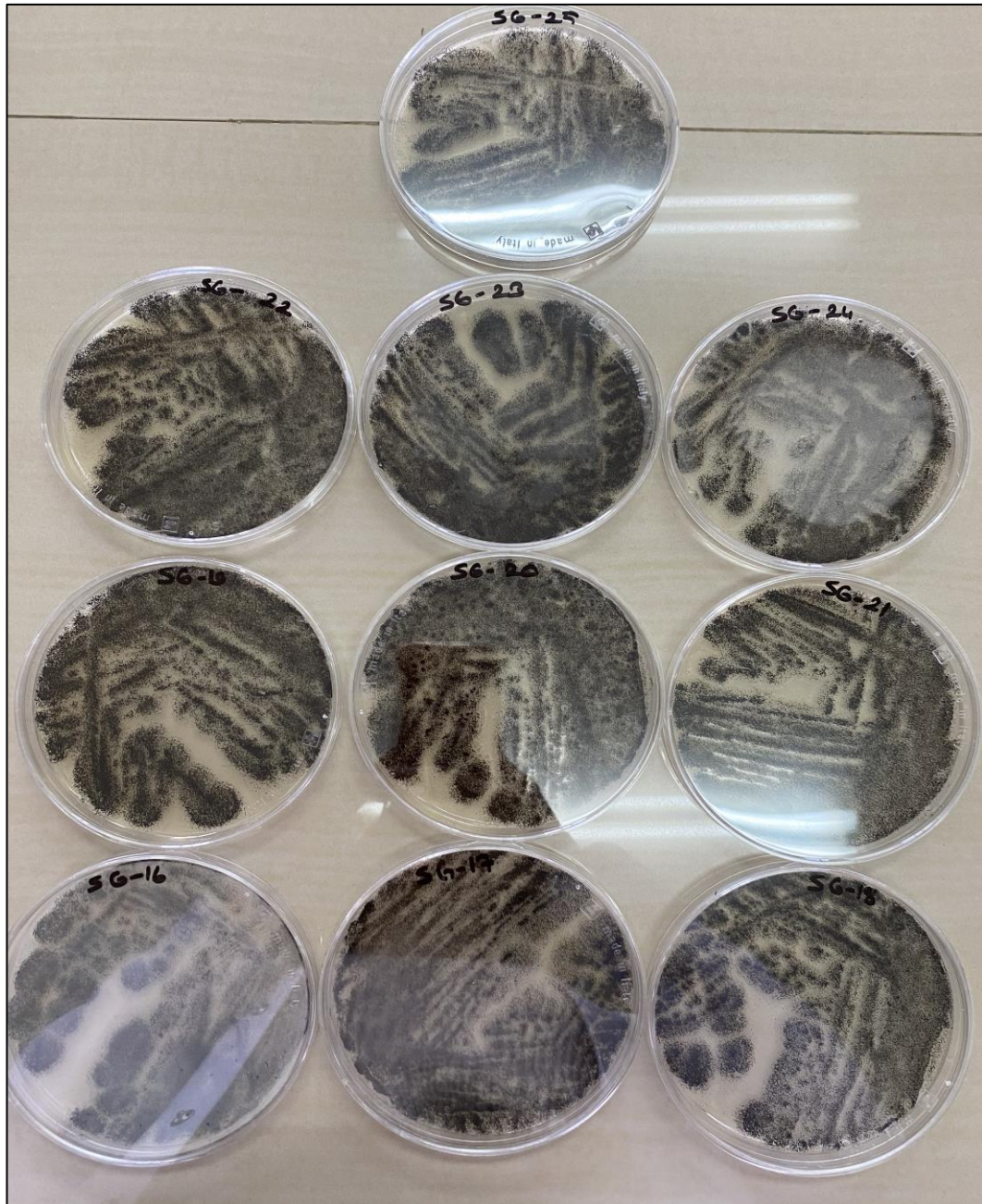


Şekil 3.3: Toplanan kolonilerden potansiyel *A. niger* olanların hücresel görüntüsü.



Şekil 3.4: Toplanan izolatların sıvı ortamdaki hücre görüntüleri

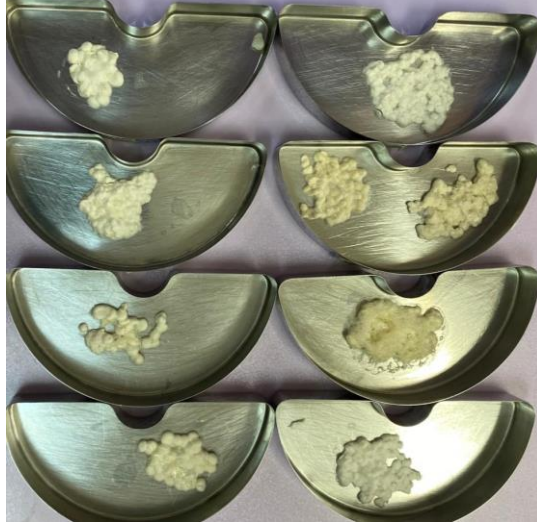
*Tipik Aspergillus* hücre morfolojisine sahip koloniler yeniden nutrient sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir. Kültürlerin sıvı ortamlardaki gelişim özellikleri Şekil 3.4’de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi bazılarının oluşturduğu biyokütlelerinin farklı olduğu görülmüş bunların farklı suşlara ait olduklarına işaret etmektedir. Bu hücreler sporlaşmaya başladıktan sonra PDA üzerine yeniden çizilerek ileri düzeyde saflaştırma yapılmıştır. İzolatların çizim sonrası görüntüleri Şekil 3.5’de izlenebilmektedir.



Şekil 3.5: İzolatların PDA ortamı üzerindeki koloni morfolojisi.

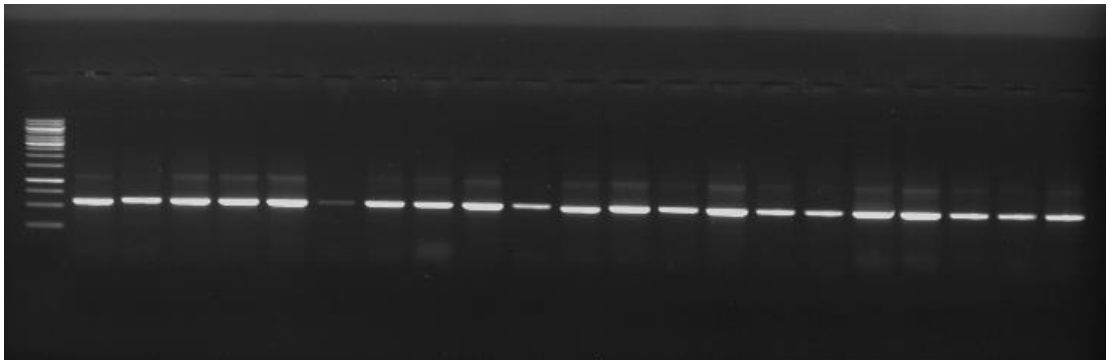
### 3.2 *Aspergillus* sp. İzolatlarının Tanımlanması

DNA izolasyonu için örnekler liyofilize edilerek kit kullanımına hazırlanmıştır. Liyofilize edilen örnekler Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

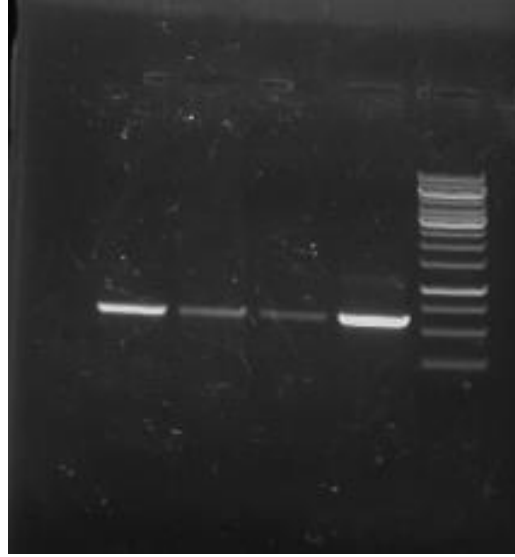


**Şekil 3.6:** Liyofilize edilen *A. niger* örnekleri

*Aspergillus* sp. izolatlarının nihai tanısı için 18S ve 28S rDNA dizileri arasında kalan bölge ITS1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Buna göre PZR sonucunda üretilen fragmentler Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Şekillerden de anlaşılacağı üzere tüm izolatların DNA'sından tek bir parlak DNA bandının (600 bp) elde edilmiştir.



**Şekil 3.7:** SG1, SG3, SG4, SG5, SG6, SG7, SG8, SG9, SG10, SG11, SG12, SG13, SG15, SG16, SG20, SG21, SG25, SG26, SG29, SG31, SG36 PZR sonrası agaroz jel görüntüleri.



**Şekil 3.8:** SG38, SG41, SG45, SG47 PZR sonrası agaroz jel görüntüleri.

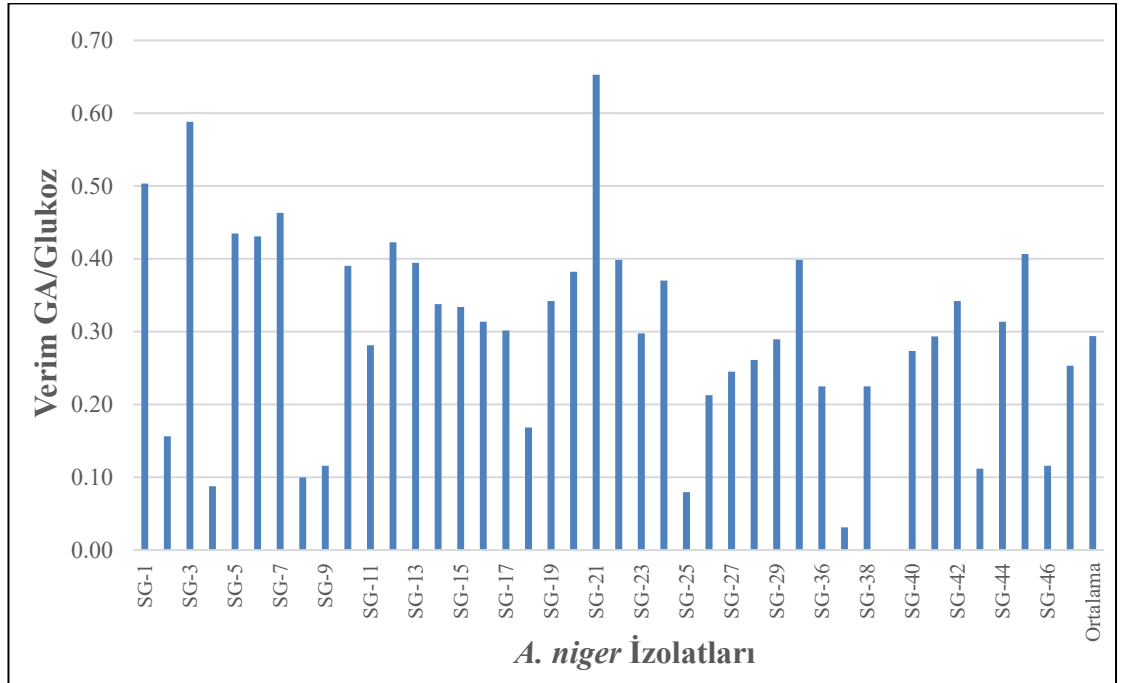
DNA dizi analizi sonucuna göre DNA tanımlamaları Tablo 3.2’de gösterilmiştir. *Aspergillus* sp. izolatları yüksek DNA homolojisi ile (>%97) tanımlanmıştır. İzolatlardan SG-1 ve SG-13 *Aspergillus japonicus* ile SG-36 ve SG-42 *Aspergillus tubigensis* olarak diğer 21 suş ise *Aspergillus niger* olarak tanımlanmıştır.

**Tablo 3.2:** Sekansa gönderilen örneklerin tanımlamaları

Örnek	Tanımlama	Oranı (%)	Örnek	Tanımlama	Oran (%)
SG 1	<i>A. japonicus</i>	100	SG 16	<i>A. niger</i>	100
SG 3	<i>A. niger</i>	100	SG 20	<i>A. niger</i>	100
SG 4	<i>A. niger</i>	100	SG 21	<i>A. niger</i>	100
SG 5	<i>A. niger</i>	100	SG 25	<i>A. niger</i>	100
SG 6	<i>A. niger</i>	100	SG 26	<i>A. niger</i>	100
SG 7	<i>A. niger</i>	100	SG 29	<i>A. niger</i>	100
SG 8	<i>A. niger</i>	100	SG 31	<i>A. niger</i>	100
SG 9	<i>A. niger</i>	100	SG 36	<i>A. tubigensis</i>	100
SG 10	<i>A. niger</i>	100	SG 38	<i>A. niger</i>	100
SG 11	<i>A. niger</i>	100	SG 41	<i>A. niger</i>	100
SG 12	<i>A. niger</i>	100	SG 42	<i>A. tubigensis</i>	100
SG 13	<i>A. japonicus</i>	100	SG 45	<i>A. niger</i>	100
SG 15	<i>A. niger</i>	100			

### 3.3 *A. niger* İzolatlarının Glukonik Asit Üretim Miktarı

Morfolojik özelliklerine göre seçilen 46 adet izolatın %1 glikoz içeren nutrient ortamında 48 saat sonunda birim glikoza karşılık glukonik asit üretim verimi Şekil 3.9'de gösterilmiştir. İzolatların glukonik asit üretim verimi ( $Y_{GA/Glikoz}$ ) ortalama 0,29 olarak hesaplanmıştır. İzolatlar arasında en yüksek verim (0,65) SG-21 izolatında elde edilmiştir. Bunu ise SG-3 (0,59) ve SG-1 (0,50) takip etmiştir. En düşük ise SG-39 izolatında izlenmiştir. Bunların dışındaki izolatların 6 adedi 0,40, 9 adedi 0,30 verim civarında glukonik asit üretim verimliliği göstermiştir. Diğerleri ise ortalama verimin (0,30) altında kalmıştır.

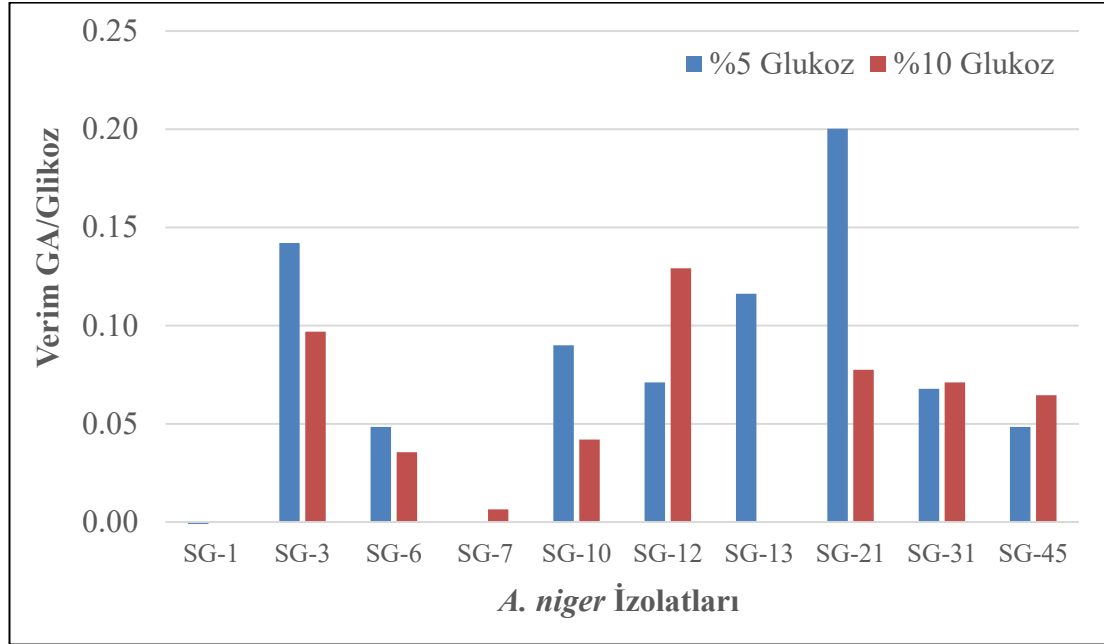


Şekil 3.9: *A. niger* izolatlarının kontrolsüz koşulda glukonik asit üretim verimi ( $Y_{GA/glikoz}$ )

Bu sonuçların ardından çalışmanın en yüksek glukonik asit üretim verimine sahip SG-1, SG-3, SG-6, SG-7, SG-10, SG-12, SG-13, SG-21, SG-31, SG-45 izolatları seçilmiştir. Bu suşların yüksek şeker konsantrasyonlarında glukonik asit üretim verimleri de belirlenmiştir.

Seçilen suşların %5 ve 10 glikoz içeren nutrient broth ortamında glukonik asit üretim verimleri Şekil 3.10'de gösterilmiştir. İlginç bir şekilde yüksek

konsantrasyonda glukonik asit üretim verimi azalmıştır. Bu durumda en yüksek üretim verimi SG-3 ve SG-21 izolatlarında izlenmiş, lakin %1 glikoza göre oldukça düşük bulunmuştur. Bu durumun ortam pH'sının düşmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Nitekim yapılan pH ölçümleri SG-1 ve SG-3'ün dışındaki izolatların gelişmesiyle birlikte pH'nın 4'ün altına düştüğü görülmüştür.



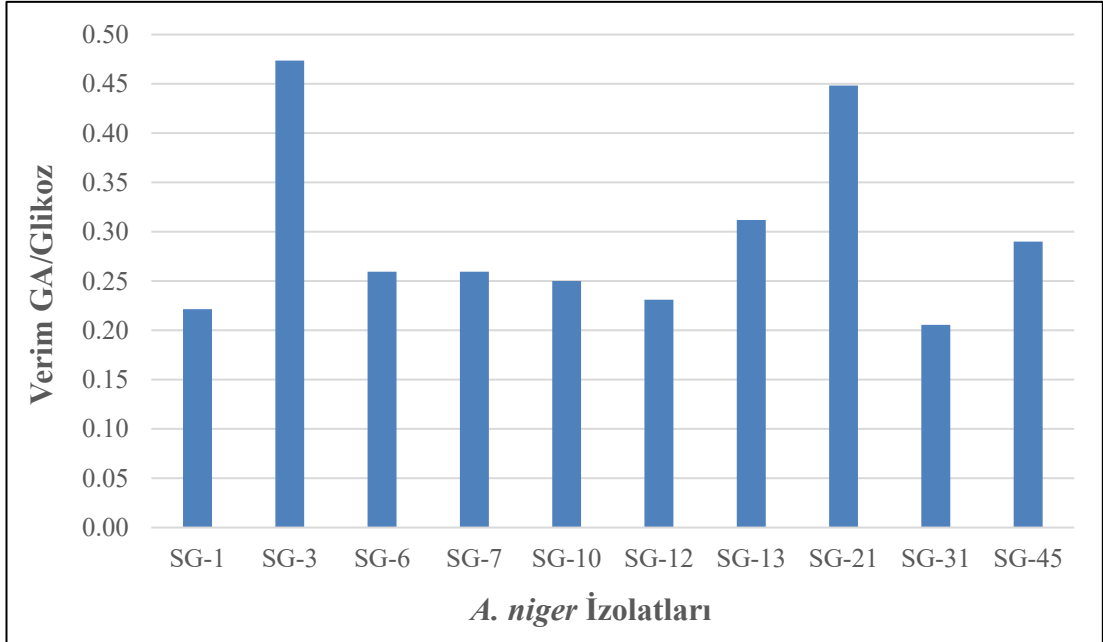
**Şekil 3.10:** *A. niger* izolatlarının %5 ve %10 glikoz içeren nutrient broth ortamında glukonik asit üretim verimi ( $Y_{GA/glikoz}$ ).

pH'ın glukonik asit üzerine olumsuz etkisini gidermek için kesikli sistemle %5 şeker içeren ortamda 12 saat aralıklarla pH nötrlenmiş ve fermentasyona devam edilmiştir (Şekil 3.11). 48 saatin sonunda glukonik asit belirlenmiştir. Şekil 3.12'da görüldüğü üzere tüm izolatlarda glukonik asit üretim verimliliği artmıştır. Buna göre en yüksek üretim belirgin bir şekilde SG-3 ve SG-21 izolatlarında tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar söz konusu iki suşun pilot ölçek üretimler için uygun olduğunu göstermiştir.





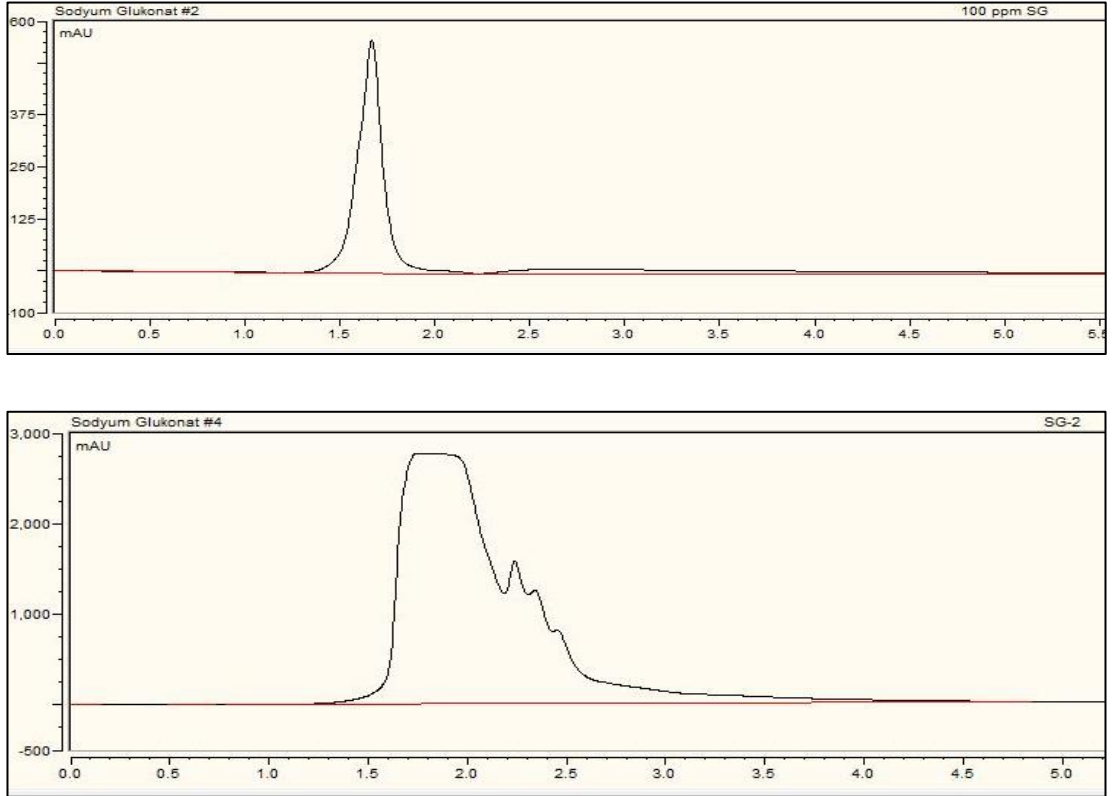
**Şekil 3.11:** *A. niger* SG-3 ve SG-21 suşlarının %5 glikoz içeren nutrient sıvı ortamında pH'sı nötrlenerek yapılan üretim.



**Şekil 3.12:** *A. niger* izolatlarının %5 glikoz içeren nutrient sıvı ortamında nötrlenerek yapılan fermentasyondaki glukonik asit üretim verimi.

### 3.4 *A. niger* SG-21 Suşu Tarafından Üretilen Glukonik asidin HPLC ile Doğrulanması

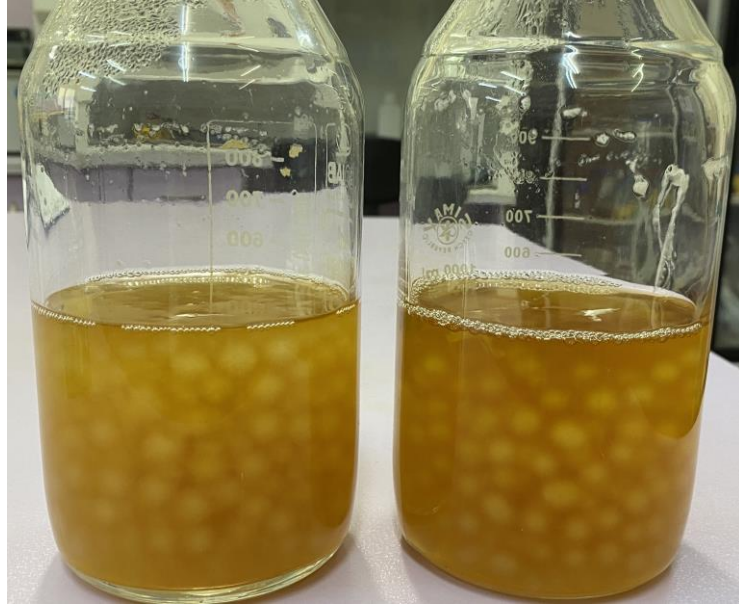
Çalışmalar sonucunda glukonik asit üretim verimi yüksek olarak tespit edilen *A. niger* SG-21 suşu %10 glikoz içeren ve pH'nın tamponlandığı nutrient sıvı ortamında 250 rpm çalkalanarak geliştirilmiş ve ardından üretilen glukonik asit HPLC sistemine doğrudan yüklenerek gözlem yapılmıştır. Validasyon testleri yapılamadığı için miktar hesaplaması yapılmamıştır. Sadece kromatogram üzerinde glukonik asidi temsil eden pikin varlığı teşhis edilmiştir. Bununla birlikte fermentasyon sonrası saflık kontrolü de beraberinde yapılmıştır. Şekil 3.13'da standart glukonik asit pikini göstermektedir. Çalışma koşullarında glukonik asidin 1,7 dk oldukça net bir pik verdiği izlenmektedir. Aynı şekilde *A. niger* SG-21 fermentasyonundan sonra da benzer dakikada oldukça yüksek yoğunlukta pikin geldiği görülmektedir (Şekil 3.13). Bu sonuçlar seçilen suşun fermentasyon koşullarında glukonik asit ürettiğine işaret etmiştir.



Şekil 3.13: Sodyum glukonat kromatogramı

### 3.5 Pilot Ölçek Sodyum Glukonat Üretim Çalışmaları

Pilot ölçek üretimi önce 200 L hacimli havalandırılmalı fermentörün 150 L'lik hacminde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14). Öncelikle fermentöre %5 şeker ile birlikte *A. niger*'in gelişim için ihtiyaç duyduğu  $MgSO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , Üre ve  $(NH_4)_2HPO_4$  bileşikleri içeren 150 L fermentasyon ortamı hazırlanarak alınmış ve kızgın buhar ile sistemin sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermentör aşılama sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra,  $10^8$  spor/ml olacak şekilde spor aşılması yapılmış ve 30 °C'de 0.5 bar basınçta havalandırılarak kesikli sistemle çalıştırılmıştır. Fermentörde rezidü şeker ve sodyum glukonat üretim miktarı ölçülmüştür. Kesikli fermentasyonda rezidü şeker ve sodyum glukonat üretimi Tablo 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.14: Fermentöre aşılama için geliştirilen *A. niger* SG-21



**Şekil 3.15:** 200 L hacimli pH kontrollü, hava karıştırırmalı fermentörün görüntüsü.

**Tablo 3.3:** %5 Glikoz içeren kesikli fermentasyonda sodyum glukonat üretimi.

<b>Saatler</b>	<b>Rezidü Glikoz (g/L)</b>	<b>Sodyum Glukonat (g/L)</b>
16.	31,71	12,79
24.	13,56	43,18
40.	0,21	61,14

Tablo 3.3’den de görüldüğü üzere 40. saatin sonunda fermentasyon başında bulunan %5 şekerin tamamı tüketilmiştir. Şeker tüketimine paralel bir şekilde *Aspergillus niger* SG-21 tarafından sodyum glukonat üretilmiştir. Fermentasyon başında %5 glikoz bulunduğu dikkate alındığında kesikli fermentasyonla %100’ün üzerinde verimle sodyum glukonat üretiminin gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

150 L hacimde kesikli fermentasyonla büyütülen *A. niger* SG-21 hücreleri daha sonra 2 ton kapasiteli fermentöre alınarak üretime devam edilmiştir (Şekil 3.16). Büyük kapasiteli fermentörde hücreler yarı-kesikli fermentasyon ile büyütülerek sodyum glukonat üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda 150 L hacimde kesikli fermentasyonla büyütülen biyokütle 750 L %5 glikoz içeren ortama alınmış ve kesikli sistemde olduğu gibi 30°C’de pH 6’da kontrollü ve 0,8-1 bar aralığında önce kesikli fermentasyonla glikoz tamamen tüketilinceye kadar çalıştırılmış, ardından 750 L %10

glikoz içeren ikinci bir fermentasyon ortamı ilave edilerek üretime devam edilmiştir. Tablo 3.4’de büyük ölçek üretime ilişkin zamana bağlı rezidü şeker ve sodyum glukonat üretimi görülmektedir.



**Şekil 3.16:** 2 ton kapasiteli pH kontrollü ve impeller karıştırımlı fermentörün görüntüsü

**Tablo 3.4:** Yarı-kesikli fermentasyonla sodyum glukonat üretimi

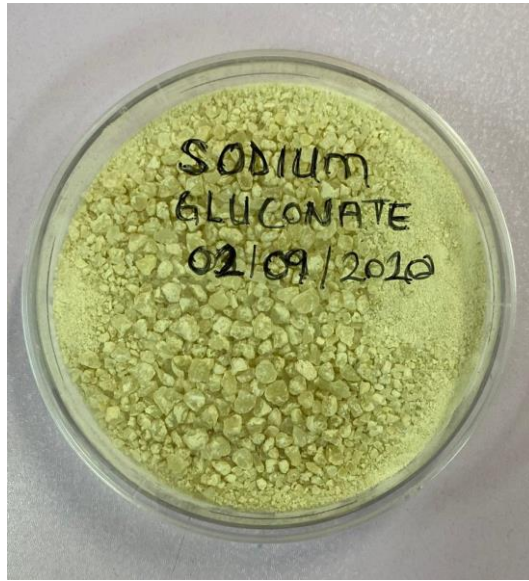
Saatler	Rezidü Glikoz (g/L)	Sodyum Glukonat (g/L)
12.	13,08	43,63
20.*	0,21	69,19
36.	0,02	105,30

\*: besleme yapılmıştır.

2 ton fermentör sisteminde yarı kesikli fermentasyon ile yapılan üretimde kesikli sistemle aktif halde bulunan biyokütle ile üretim devam edilebilmiştir. Tablo 3.4’de görüldüğü üzere 12. saat sonunda başlangıç glikoz miktarının %73’ü kullanılmış, 20. saat sonunda tamamı tüketilmiştir. Bu aşamadan sonra yapılan %10 şeker ilave edilmiş ve bu şeker de 16 saat içinde tamamen hücre tarafından kullanılmıştır. Fermentasyon sonunda fermentasyon hacmi dikkate alındığında 157,5 kg sodyum glukonat üretilmiştir. Bu oran daha önce üretilen miktarların üzerindedir (Pal ve diğ. 2016). Bugüne kadar en yüksek üretim Sharma ve diğ. (2008) tarafından

yapılan kesikli üretimle rapor edilmiştir. Lakin bu çalışmada yapılan yarı-kesikli üretim ile sodyum glukonat üretiminin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Bunun temel nedeni başlangıç substrat konsantrasyonunun inhibisyonun engellenmesi ve ayrıca üreticinin aktif fazında beslenmesi ile üretimin daha fazla artabildiğine işaret etmiştir.

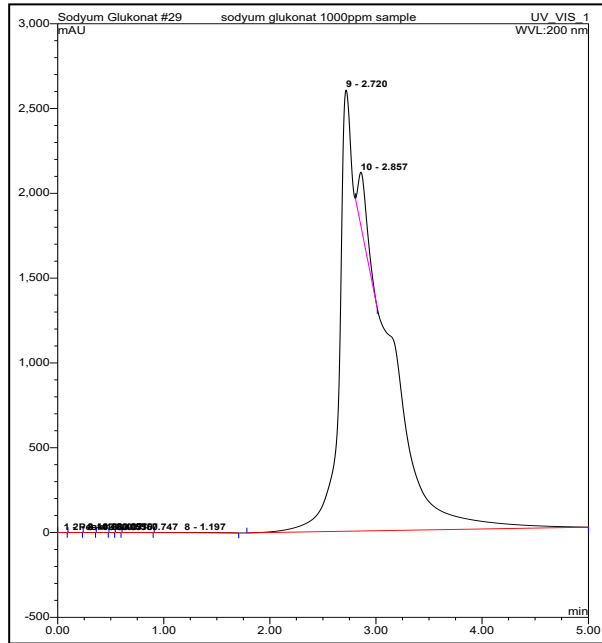
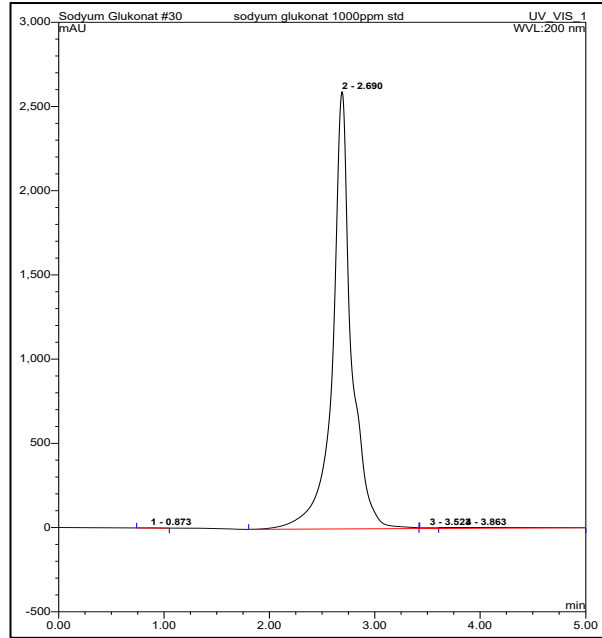
Fermentasyon sonrasında sodyum glukonatın ayrılması amacıyla biyokütle filtre presten geçirilerek ayrılmış ve berrak fermentat elde edilmiştir. Daha sonra fermentat 60°C’de ısıtılarak ¼ oranında konsantre edilmiştir. Konsantre edilen fermentat oda sıcaklığının altına kadar soğutulmuş ve sodyum glukonatın kristalize olmasıyla çökmesi sağlanmıştır. Son aşamada kristal yapılarak sıvı fazdan ayrılarak tamamen kurutularak kristal sodyum glukonat son nihai ürün elde edilmiştir (Şekil 3.17).



**Şekil 3.17:** Tez kapsamında üretilen kristal sodyum glukonatın görüntüsü.

Fermentasyon sonunda üretilen sodyum glukonatın teyit edilmesi ve saflığının belirlenmesi amacıyla Şekil 3.17’de gösterilen nihai ürün HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Şekil 3.18’de standart sodyum glukonat ile ürettiğimiz sodyum glukonatın kromatogramları görülmektedir. Analiz için her iki örneğin 1000 ppm sodyum glukonat içeren çözeltisi hazırlanmış ve HPLC sisteminde C18 kolonda (ODS-2, 4.6x150 mm, Thermo-Fisher Scientific, ABD) izokratik koşulda 0,8 ml/dk akış hızında yürütülmüş ve 210 nm dalga boyunda tespit yapılmıştır. Şekil 3.18’de izlendiği

üzere standart sodyum glukonata benzer şekilde üründe de pikin bulunmaktadır. Lakin tez kapsamında üretilen sodyum glukonat pikinin devamında bazı safsızlıkların bulunduğu dikkati çekmektedir. Kristalizasyon için daha hassas optimizasyona ihtiyaç olduğu çalışma sonucundan anlaşılmıştır.



#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şekerli meyvelerin yüzey mikrobiyotası *A. niger* açısından oldukça zengindir. Çalışmada toplanan izolatların arasından morfolojik olarak seçilen ve tanımlananların %84'ü *A. niger* olarak tespit edilmiştir. Özellikle hem yaş hem de kuru üzümün söz konusu türe ulaşılması için iyi kaynak oldukları anlaşılmıştır. Muhtemelen üzüm bağlarının florası ve yüksek şeker içeriği bu türün daha fazla yer alma potansiyelini ön plana çıkarmaktadır.

*A. niger* suşlarının yüksek glikoz oksidaz aktivitesi bu suşların glikozu, glukonik aside çevirme özelliklerini de beraberinde sağlamaktadır. Ancak suşların sodyum glukonatı farklı oranlarda üretebildiği çalışma sonuçlarından görülmektedir. Suşlar arasındaki temel farkın glikoz oksidaz enziminin ifade düzeyi ile farklılık göstermesinden kaynaklanabilir. Bu nedenle suşlar arasında seçim yapılması önem taşımaktadır. Bu çalışmada *A. niger* SG3 ve SG21 suşları sodyum glukonat üretimi bakımından yetenekli suşlar oldukları anlaşılmıştır. Bu suşlar glikoz birim miktarına karşılık ürettikleri glukonik asit miktarına göre endüstriyel boyutta kullanılabilir endüstriyel mikroorganizmalardır. Özellikle yeşil dönüşüm kapsamında bu organizma atıkların değerlendirilmesi ve katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi açısından da oldukça değerlidir.

Üretici mikroorganizmaların bu çalışma ile ortaya çıkarılması ülkemizde sanayinin ihtiyacı olan sodyum glukonatın üretimi için temel altyapısının oluşturulmasını sağlamıştır. Ayrıca çalışmada söz konusu *Aspergillus* suşlarının pilot ölçek kesikli ve yarı-kesikli sistemde sodyum glukonat üretimini başarıyla gerçekleştirebilmiştir. Lakin fermentasyon altı ayırma işlemleri için halen yeni bilgi ve teknolojilere ihtiyaç bulunmaktadır. Bunların da tamamlanması ile endüstriyel boyutta üretim için sodyum glukonat üretimine ilişkin tüm alt yapı tamamlanmış olacaktır.



## 5. KAYNAKLAR

Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J. and Cabanes, F., “Taxonomy and Significance of Black *Aspergilli*”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86 (1), 33-49, (2004).

Anastassiadis, A., Aviasidis, A., Wandrey C., US 5962286, Process for the production of gluconic acid with a strain of *Aureobasidium pullulans*, (1999).

Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C., US 6303351. Process for the continuous production of citric acid by fermentation, (2001).

Cochrane, V.W., *Physiology of fungi*. London: John Wiley and Sons, (1958).

Debets, A., Holub, E., Swart, K., van den Broek, H., Bos, C. “An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*”. *Molecular and General Genetics*, Volume 224. p. 1432-1874. (1990).

Enfors S., Haggström L., *Bioprocess technology fundamentals and applications*, Stockholm: Royal Institute of Technology, 139-189, (2000).

Frisvad, J.C., Larsen, T.O., “ Chemodiversity in the genus *Aspergillus*” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19):7859-7877, (2015).

Hustede H., Haberstroth H.J., Schinzig E., *Gluconic acid*, Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, 449–56, (1989).

Ikeda Y., Park Enock Y., Okuda N., “Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*” , *Bioresource Technology*, 97, 1030–1035, (2006).

Klasen R., Bringermeier S., Sahn H., “Biochemical characterization and sequence analysis of the gluconate: NADP 5-oxidoreductase gene from *Gluconobacter oxydans*”, *Journal of Bacteriology*, 177(10), 2637–2643, (1995).

May, G., Adams, T., “The Importance of Fungi to Man”. *Genome Research*, Volume 7. p. 1041-1044, (1997).

Milson PE, Meers JL., *Gluconic acid, itaconic acid*, (eds: Blanch HW, Drew S, Wang DIC) *Comprehensive biotechnology*, vol. 3. Pergamon, Oxford, 681–700, (1985).

Olijve W., Kok J.J., “Analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures”, *Archives Microbiology*, 121, 291–297, (1979).

Othmer, K., *Encyclopedia Of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc. 11: 173-177, (2000).

Pal, P., Kumar, R., Banerjee, S., “*Manufacture of gluconic acid: a review towards process intensification for green production*”, *Chem. Eng. Process.*, 104, 160–171, (2016).

Pitt, J.I. and Hocking, A.D., *Fungi and Food Spoilage*, Second Edition, Blackie Academic & Professional, pp:3-12, 385-388, 495, 496, (1997).

Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, Larroche C., “Gluconic acid: properties, applications and microbial production” *Food Technology and Biotechnology*, 44,185-195, (2006).

Ramachandran S., Nair S., Larroche C., Pandey A., S. Ramachandran, S. Nair, C. Larroche, A. Pandey, “Gluconic Acid”, (eds: A. Pandey ve S. C.Negi) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 577-599, (2017).

Rippel-Baldes A., “*Grundzüge der Mikrobiologie*”, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, (1955).

Roehr M., Kubicek C., Kominek J., “Gluconic Acid In Biotechnology” (eds: Rehm, H.J., Reed, G.), *Biotechnology, Product Of Primary Metabolism*, 6, Verlag Chemical, Weinheim, 347–362, (1996).

Rodríguez A.M., Cañete I.M., Santos-Dueñas J.E., Jiménez-Hornero M.J., Torija-Martínez A., Mas I., García-García., “*Gluconic Acid: properties, production methods and applications an excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization*”, *Process Biochemistry*, 51, 12,(2016c).

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. and Van Dijck P.W. M., “On the safety of *Aspergillus niger*” a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 426-435, (2022).

Shi F, Tan J, Chu J, Wang Y, Zhuang Y, Zhang S., “A qualitative and quantitative high-throughput assay for screening of gluconate high-yield strains by *Aspergillus niger*”, *Journal of Microbiological Methods*” 109; 134-139, (2015).

Whitfield, F.B., *Taints and Off-flavours in Foods*, Microbiologically Derived Off-Flavours, Chapter 5, CRC Press LLC, 1-28, (2003).

Velizarov S., Beschkov V., “Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations”, *Process Biochemistry*, 527-534, (1998).

Znad, H., Markos, J., Bales, V., “Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: Growth and non growth conditions”, *Process Biochemistry*, 39, 1341–1345, (2004).

# **EKLER**

## 6. EKLER

**Tablo A :** İzole edilen suşların 18S DNA dizi analizi sonucu DNA bantlarının dizisi

İzolat Kodu	Primer	DNA Dizisi
SG 1	İleri	CCCGTGCTTACCGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCG CCTTCGGGCGGCCCGGGGCCTGCCCCCGGGACCGCG CCCGCCGGAGACCCCAATGGAACACTGTCTGAAAGC GTGCAGTCTGAGTTGATTGATACCAATCAGTTAAAAC TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA GAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG CGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGC GTCATTTCTCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCC GCGCCCCCGGGGGCGGGCCTCGAGAGAAACGGCG GCACCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTAC CCGCTCTATGGGCCCGGCCGGGGCTTGCTCGACCCC CAATCTTCTCAGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCCGCTGAACT
	Geri	CGGCCGGGCCCATAGAGCGGGTGACAGAGCCCCATA CGCTCGAGGACCGGACGGTGCCGCCGTTTCTCTCGAG GCCCCCCCCGGGGGGCGCGGCCCAACAACCAGCG GGGCTGGAGGGGAGAAATGACGCTCGGACAGGCATG CCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAA AGACTCGATGATTCAGTGAATTCTGCAATTCACATTA GTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGA ACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGG TATCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGT TCCATTGGGGTCTCCGGCGGGCGCGGTCCCGGGGGC AGGCCCCGGGCCGCCCGAAGGCGGGCCCCGCCGAAGC AACAGGGTACGGTAAGCACGGGTGGGAGGTTGGGCC CCGAAGGACCCAGCACTCGGTAATGATCCTTC
SG 3	İleri	GGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCCGCCGG AGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGT CTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTTCAAC AATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCC

		TGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG CTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCCGCCGTC CCCCCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGC GGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGT CACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGT TTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGG TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
	<b>Geri</b>	CAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCC GCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGG GACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCA GCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATAC CAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATT CACTGAATTCTGCAATTCACATTATTTATCGCATTTCG CTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCAT TGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCA GACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCT CCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAGACGCGCCCC CCGGCGGACGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAAC AGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCCC AGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCA CCTACGG
<b>SG 4</b>	<b>İleri</b>	CCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCG CGCTTGTCGGCCCGCCGGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCG GGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTG TCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATC AGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGGCATGCC TGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT GTGTTGGGTCCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA GCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGC CGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGG TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA AGCATATCA
	<b>Geri</b>	GTTGGAAAACGTCCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACA GAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGG ACGCGGTGCCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCC GGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGG CTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC CCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA

		CTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTT ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACC AAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATT CAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCG TGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCA AAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCC GCCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAG GTTGGGCCCAAAGACCCGCACTCGGTAATGATCCTT CC
<b>SG 5</b>	<b>İleri</b>	TTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCTTGTCG GCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTG CCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAG CGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAA CTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG TCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAG GCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATG GGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCC TGCCGACGTTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTC GGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAA
	<b>Geri</b>	GGTTGGAAAACGTTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTAC AGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCG GACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCC CGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGG GCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC CCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG ACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGT TATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAAC CAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCAT TCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTC GTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGC AGAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCC CGCCGAAGCAACAGGGTACAATAGACACGGATGGGA GGTTGGGCCCAAAGACCCGCACTCGGTAATGATCC TTCCGC
<b>SG 6</b>	<b>İleri</b>	CAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAG CCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGC TGCTTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGG CGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAAT

		GACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGG GGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGA ATTCTGCAATTACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGT TCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGA AAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGC ACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCG GGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGGCG GCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTA TAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACC CGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCA
	<b>Geri</b>	GGAAAACGTTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAG CATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACG CGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGA GAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTG AGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCG GAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCG ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCG CATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGA GATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAAT CAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTT GGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGG CGCCCCCGGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCG AAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTG GGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCG
<b>SG 7</b>	<b>İleri</b>	CTATTATAACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTG TCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTTTCGCCCCCGGGCCC GTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGA AAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTA AACTTTCACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAAT TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC ATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCC GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTT GGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGA AAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGT ATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGC GCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGA CCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTGAAC
<b>SG 8</b>	<b>İleri</b>	GCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCC AACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTT GATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTTCACAATGGAT CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA

		TGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATT CCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCT CAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCT CCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACC GCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATG CTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCA ACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA TACCCGCTGAACTTAAG
	<b>Geri</b>	GCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCG CTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACG GCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAA TGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGG GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTG AATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGC GTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTT GAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAACTCAGACT GCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGG CGGGCACGGGCCCGGGGGCAGAGGCGCCCCCCCCGG CGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAGGG TACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGA CCCCCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTA CGGAAGGGTCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCC AACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGG CGGGCCCCGCCGTTGTGCGGCCGCCGGGGGGGCGCCT CTGCCCCCGGGCCC
<b>SG 9</b>	<b>İleri</b>	CCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGC CGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCG GGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTG TCTGAAAGCGTGCACTGAGTTGATTGAATGCAATC AGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCC TGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT GTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA GCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGC CGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTCTTTCCAGG TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTG
	<b>Geri</b>	GACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTG CCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGG GGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGC



		<p>AGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA  CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGAT  TCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTT  GCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCA  TTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTC  AGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCTGTGTTGGGGTC  TCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAGAGGGCGCCCC  CCCGGGCGGCCGACAAGCGGGCGGGCCCGCCGAAGCAA  CAGGGTACAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCA  AAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCA</p>
<b>SG 10</b>	<b>İleri</b>	<p>GCTTCGGCGGGCCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGG  GGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGAC  CCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGA  GTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATG  GATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG  TATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG  CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCC  CTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGC  ACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAC  ATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTT  CCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG  GGATACCCGCTGAACTTAAGCA</p>
	<b>Geri</b>	<p>GCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCC  CATACTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGC  CTTTCGGGCCCCTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGA  CCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGAC  GCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGC  GCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATT  CTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCTGCTGCGTTCT  TCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAA  GTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCAC  GCTTTCAGACAGTGTTCTGTGTTGGGGTCTCCGGCGGG  CACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCCCGGCGGC  CGACAAGCGGGCGGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATA  ATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCG  CACTCGGTAATGATCCTTC</p>
<b>SG 11</b>	<b>İleri</b>	<p>TCCGTGTCTATTATAACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCG  CCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCC  GGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACT  GTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAAT</p>

		<p>CAGTTAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGG  CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAAT  GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA  ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGC  CTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTG  TGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGG  CCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCG  AGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGG  CCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTCCAG  GTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTT  AA</p>
	<b>Geri</b>	<p>AAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCA  TGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCG  GTGCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCCTCCCCCGGAGA  GGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAG  GGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGA  ATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGAT  GATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCA  TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGA  TCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCA  ACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGG  GGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCCGGGGGGCAAAGGCG  CCCCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAA  GCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGG  CCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGA</p>
<b>SG 12</b>	<b>İleri</b>	<p>CCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGC  CGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTTGCCCCCG  GGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTG  TCTGAAAGCGTGCACTGAGTTGATTGAATGCAATC  AGTTAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC  ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATG  TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA  CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCC  TGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT  GTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGC  CCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA  GCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGC  CGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTCCAGG  TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA</p>
	<b>Geri</b>	<p>CCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGC  TCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGTGCCTTTCCGG  CCCCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAACAC</p>

		ACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGAC AGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTG CGTTCAAAGACTCGATGATTCCTGCAATT CACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT GCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACT GATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGA CAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCC GGGGGGCAGAGGCGCCCCCGGCGGGCCGACAAGCG GCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTACAATAGACACG GATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTA ATGATCCTTCC
<b>SG 13</b>	<b>İleri</b>	TGCTTACCGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTT CGGGCGGCCCGGGGCTGCCCCGGGACCGCGCCCG CCGGAGACCCCAATGGAACACTGTCTGAAAGCGTGC AGTCTGAGTTGATTGATACCAATCAGTTAAAACCTTC ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAAT TCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC CCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA TTTCTCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCCGCGC CCCCCGGGGGCGGGCCTCGAGAGAAACGGCGGCAC CGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACCCGC TCTATGGGCCCGGCCGGGGCTTGCCCTGACCCCCAAT CTTCTCAGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG CTGAACTT
	<b>Geri</b>	GGGTCGAGGCAAGCCCCGGCCGGGCCCATAGAGCGG GTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGGTG CCGCCGTTTCTCTCGAGGCCCGCCCCGGGGGGGCGC GGCCCAACAACCAGCGGGGCTGGAGGGGAGAAATG ACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGG GCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCCTGAA TTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTT CTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAA AGTTTTAACTGATTGGTATCAATCAACTCAGACTGCA CGCTTTCAGACAGTGTTCCATTGGGGTCTCCGGCGGG CGCGGTCCCGGGGGCAGGCCCGGGCCGCCCGAAGG CGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTACGGTAAGCACGG GTGGGAGGTTGGGC
<b>SG 15</b>	<b>İleri</b>	TATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGT CGGCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCG TGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAA AGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAA

		<p>AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT  GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATT  GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA  TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCG  AGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTG  GGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAA  AGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTA  TGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCG  CCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACC  TCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTG</p>
	<b>Geri</b>	<p>CGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCC  ATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCC  TTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGAC  CCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACG  CTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATAACAGGGGGCG  CAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCATGAATTC  TGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTT  CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAG  TTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACG  CTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGC  ACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCGGCC  GACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAA  TAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGC  ACTCGGTAAT</p>
<b>SG 16</b>	<b>İleri</b>	<p>ACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGT  GACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTG  CCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGG  GGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGC  AGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA  CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGAT  TCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTT  GCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCA  TTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTC  AGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTC  TCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCC  CCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAGCAA  CAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCA  AAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCC</p>
<b>SG 20</b>	<b>İleri</b>	<p>TTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCTTGTCG  GCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCGGGGCCCGTG  CCCGCCGGAGACCCAACACGAACACTGTCTGAAAG  CGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAA  CTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA</p>

		<p>AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC  AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT  GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAG  CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG  TCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAG  GCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATG  GGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCC  TGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTC  GGATCAGGTAGGGATACCCG</p>
	<b>Geri</b>	<p>ACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGT  GACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTG  CCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCTCCCCCGGAGAGGG  GGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGC  AGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATA  CCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGAT  TCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTT  GCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCA  TTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTC  AGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCTGTGTTGGGGTC  TCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCC  CCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGGCCCGCCGAAGCAA  CAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCA  AAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTC</p>
<b>SG 21</b>	<b>İleri</b>	<p>CGGGTCTTTGGGGCCACCTCCCATCCGTGTCTATTATA  CCCTGTTGCTTCGGCGGGCCC GCCGCTTGTCCGGCCGC  CGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCC GTGCCCGCC  GGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCA  GTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTAAA ACTTTCA  ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG  CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT  CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC  CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT  TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCG  TCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCG  GCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT  GTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGAC  GTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCA  GGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT</p>

	<b>Geri</b>	<p>GAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACA  GAGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGG  ACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCC GTCCCCC  GGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGG  CTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC  CCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA  CTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTT  ATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACC  AAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATT  CAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCG  TGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCC GGGGGGCA  AAGGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGGCC  GCCGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAG  GTTGGGCCCAAAGGACCCGCAC</p>
<b>SG 25</b>	<b>İleri</b>	<p>GCTTCGGCGGGCCCCGCGCTTGTCGGCCGCCGGGGG  GGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGAC  CCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGACAGTCTGA  GTTGATTGAATGCAATCAGTTAAA ACTTTCAACAATG  GATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  AAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG  TATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG  CCCTCAAGCCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCCCGTCCCC  CTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGC  ACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAC  ATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTT  CCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG  GGATAACCGCTGAACTTA</p>
	<b>Geri</b>	<p>CGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCC  ATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCC  TTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGAC  CCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACG  CTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCG  CAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTC  TGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCT  CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAG  TTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACG  CTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGC  ACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCCCCGGCGGCC</p>

		GACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAA TAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGC ACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGG
<b>SG 26</b>	<b>İleri</b>	ACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCTTGTCGGCCG CCGGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGC CGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGC AGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTTC ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAAT TCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC CCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA TTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCCGC GTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGC GGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTT TGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGA CGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCA GGTAGGGATACCCGCTGAACTTA
	<b>Geri</b>	AAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCAT GTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGG TGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAG GGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGG GCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAA TACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATG ATCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCAT TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGAT CCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAA CTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCTGTGTTGGG GTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGC CCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCGAAG CAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGC CCAAAGGACCCGCACTCG
<b>SG 29</b>	<b>İleri</b>	CCGTGTCTATTATAACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGC CGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCG GGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTG TCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATC AGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA

		CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCC TGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT GTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA GCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGC CGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTCCAGG TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT
	<b>Geri</b>	TCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGAC AAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCG CCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGG ACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAG CAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACC AGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTC ACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCG CTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCAT TGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCA GACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCT CCGGCGGGCACGGGCCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCC CCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCGAAGCAAC AGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAA AGGACCCGCACTCGGTAATGATCCT
<b>SG 31</b>	<b>İleri</b>	GTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCT TGTCGGCCGCCGGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCGGGCC CGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTG AAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTT AAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTC CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT TGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCG AAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCG TATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGG CGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTCCAGGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
	<b>Geri</b>	CAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAG CCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGC TGCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGG CGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAAT GACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGG GGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGA ATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGT



		TCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGA AAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGC ACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCG GGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGCG GCCGACAAGCGGCGGGCCCGCCAAGCAACAGGGTA TAATAGACACGGATGGGAGGTGGGCCCCAAAGGACC CGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCA
SG 36	İleri	TATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGT CGGCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCG TGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAA AGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAA AACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATT GCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACA TTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCG AGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTG GGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAA AGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTA TGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCG CCTGCCGACGTTTTCCAACCATGTTTTCCAGGTTGAC CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTT
	Geri	TTGGAAAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAG AGCATGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGA CGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCG GAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCT TGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCC CGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACT CGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTAT CGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAA GAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCA ATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTGCTG TTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAA GGCGCCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCGC CGAAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGT TGGGCCCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTC
SG 38	İleri	CCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGC CGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCG GGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTG TCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATC AGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAA

		CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCC TGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGT GTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGC CCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA GCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGC CGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGG TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT
<b>SG 41</b>	<b>Geri</b>	CGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATA CGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTC GGGCCCCGTCCCCCGGAGAGGGGGACGGCGACCCAA CACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCG GACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAAT GTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCA ATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATC GATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTA ACTGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTC AGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGG GCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCGGGCGGCCGACA AGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAGGGTATAATAGA CACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCACTC GGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCCTACGGAAGGGT CATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCA TCCGTGTCTATTATAACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCG CCGCTTGTCCGCCGCCGGGGG
<b>SG 42</b>	<b>Geri</b>	GTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGG TGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCCGGAGAG GGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGG GCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAA TACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATG ATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCAT TTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGAT CCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAA CTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGG GTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGCAAAGGCGC CCCCCGGCGGCCGACAAGCGGCGGGGCCCGCCGAAG CAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGC CCAAAGGACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCG
<b>SG 45</b>	<b>İleri</b>	GTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCA ACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATT CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT

		TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCG TCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCG GCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT GTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGAC GTTTTCCAACCATGNTTCCAGGTTGACCTCGGATCA GGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA G
	<b>Geri</b>	GGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCA ATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAG GGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCCT GAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTG CGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGT TGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAATCAACTCAGAC TGCACGCTTTCAGACAGTGTTTCGTGTTGGGGTCTCCG GCGGGCACGGGCCCCGGGGGGCAAAGGCGCCCCCCCG GCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCGAAGCAACAGG GTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGG ACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCT ACGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGC CCAACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTC GGCGGGCCCCGCCGCTTGTTCGGCCGCCGGGGGGGCGC CTTTGCCCCGCGGGCCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAA CACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGAT TGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTC TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA