



**KATI HAL BİYOREAKTÖRÜNDE
 α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

Muhammet Ali UYGUT

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI**

AĞUSTOS-2016

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATI HAL BİYOREAKTÖRÜNDE α -AMİLAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammet Ali UYGUT

(131132102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09 Ağustos 2016

Tezin Savunulduğu Tarih : 26 Ağustos 2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Hamdi Soner ALTUNDOĞAN (F.Ü)

Prof. Dr. Hasan TOĞRUL (E.O.Ü)

AĞUSTOS-2016

ÖNSÖZ

Bu tez konusu TÜBİTAK tarafından 2210-C programı ile desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar TÜBİTAK 115 M 502 ve FÜBAP M.F.15.06 nolu projeler ile yürütülmüştür.

Bütün büyüklerime teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun seçiminde ve planlamasında, deneysel çalışmalarım sürecinde deney düzeneğinin tasarımında, temininde ve işler hale getirilmesinde, tezin yazım aşamasında bilimsel katkısını ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI'na en içten hislerimle teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deney düzeneğinin tasarımında değerli fikirleriyle katkıda bulunan sayın hocam Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ahmet YAZICIOĞLU'na ve Arş. Gör. Ahmet DÜZEL'e teşekkür ederim.

Beni çok güzel bir şekilde yetiştirip bugünlere gelmeme vesile olan, her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan anneme, babama ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

**Muhammet Ali UYGUT
ELAZIĞ-2016**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Fermentasyon.....	4
2.1.1. Katı Substrat Fermentasyonu	4
2.1.2. Derin Fermentasyonu	10
2.1.3. Katı Substrat Fermentasyonu ile Derin Fermentasyon Arasındaki Farklar	11
2.1.4. Katı Substrat Fermentasyonu Prosesindeki Genel İşlem Basamakları	12
2.2. Katı Substrat Fermentasyonunda Biyoreaktör Basamağı	15
2.2.1 Katı Substrat Fermentasyonunda Biyoreaktörün Önemi	15
2.2.2. Katı Substrat Biyoreaktörlerinin Fiziksel Yapısı	17
2.3. Katı Substrat Biyoreaktörleri	21
2.3.1. Tepsili Biyoreaktörler	23
2.3.2. Dolgulu Yatak Biyoreaktörler	24
2.3.3. Döner Tambur Biyoreaktörler	25
2.3.4. Gaz-katı Akışkan Yataklı Biyoreaktörler.....	28
2.4. Enzimler.....	30
2.4.1. α -Amilaz Enzimi ve Kullanım Alanları	30
2.4.2. Türkiye’de Enzim Üretimi	32
2.5. Deneysel Tasarım	33
2.5.1. Plackett-Burman Tasarımı.....	34
2.6. Döner Tambur Biyoreaktör ile Yapılan Çalışmalar	35
3. MATERYAL ve METOT	41
3.1. Mikroorganizma.....	41

3.2. Substrat	41
3.3. Aşı Hazırlama	41
3.4. Enzim Üretim Ortamının Hazırlanışı.....	42
3.5. Erlenlerde Enzim Üretiminin İncelenmesi.....	42
3.6. Döner Tambur Biyoreaktörün Tasarımı.....	42
3.7. Döner Tambur Biyoreaktörün Sterilizasyonu	44
3.8. Biyoreaktörde α -Amilaz Üretiminin Deneysel Tasarım ile İncelenmesi	44
3.9. Enzim Ekstraktının Elde Edilmesi	47
3.10. α -Amilaz Aktivitesinin Tayini.....	47
3.11. Spesifik Verimlilik Hesabı.....	47
3.12. On-line Gaz Analizi	48
3.13. pH ve DO Analizi	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1. Erlenlerde Enzim Üretimi Deney Sonuçları	49
4.2. PB Tasarımı Deney Sonuçları.....	50
4.3. PB Tasarımı Deney Şartlarının α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	52
4.4. PB Tasarımı Deney Sonuçlarının İstatiksel Olarak İncelenmesi.....	61
4.5. PB Tasarımı Doğrulama Deneyinin Sonuçları	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR.....	75
EKLER	86
ÖZGEÇMİŞ	87

ÖZET

Bu çalışmada, katı substrat fermentasyonunda kullanılan önemli biyoreaktör tasarımlarından biri olan döner tambur biyoreaktör, yarı katı hal fermentasyonuna uygun bir şekilde tasarlanmış ve reaktör işletme parametrelerinin α -amilaz üretimi üzerine etkileri deneysel tasarım yöntemiyle incelenmiştir. Döner tambur biyoreaktör tasarımında oksijen transfer etkinliğinin artırılması amacıyla seramik mikro hava difüzörü kullanılmıştır. α -Amilaz üretim çalışmalarında daha önce erlenlerde yapılan çalışmalarda belirlenen optimum koşullar (25 g/l mısır kepeği, 10 g/l yeast ekstrakt ve 1 g/l KH_2PO_4) kullanılmıştır. Erlenlerde yapılan çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesi 20,68 U/ml değerine ve spesifik verimlilik 25,36 U/g mısır kepeği.st değerine ulaşılmıştır. Döner tambur biyoreaktörde fermentasyon esnasında pH, çözünmüş oksijen konsantrasyonu, sıcaklık ile çıkış gazındaki oksijen ve karbon dioksit konsantrasyonu online olarak takip edilmiştir. α -Amilaz aktivitesinin tayini için dinitrosalisilik asit metodu (Bernfeld, 1955) kullanılmıştır. Döner tambur biyoreaktör'de α -amilaz üretimi üzerine devir sayısı, havalandırma hızı, doluluk oranı, difüzörün gözenek çapı, tampon boyutu, ortam sıcaklığı ve aşı miktarı olmak üzere 7 reaktör işletme parametresinin etkisi Plackett-Burman tasarımı ile incelenmiştir. Plackett-Burman tasarımından elde edilen ANOVA sonuçlarına göre Model F-değerinden (17,46) ve çok düşük probabilitate değerinden (0,0075) anlaşıldığı üzere, model anlamlıdır. Devir sayısı, havalandırma hızı ve tampon boyutu değişkenlerine ait temel etkiler sahip oldukları düşük p değerleri ($p < 0,05$) ile istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Plackett-Burman tasarımının önerdiği doğrulama deneyinde devir sayısının (18 rpm), havalandırma hızının (2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda enzim aktivitesi 26,64 U/ml değerine ve spesifik verimlilik 50,86 U/g mısır kepeği.st değerine ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Katı substrat fermentasyonu, Döner tambur biyoreaktör, α -Amilaz, Plackett-Burman tasarımı.

SUMMARY

INVESTIGATION of α -AMYLASE PRODUCTION in SOLID STATE BIOREACTOR

In this study, rotating drum bioreactor that important one using in the solid substrate fermentation was designed by adapting for semi solid state fermentation and effects of reactor operating parameters on α -amylase production was investigated by experimental design. Ceramic micro diffuser was used to increase oxygen transfer efficiency in the rotating drum bioreactor design. In the α -amylase production studies was used optimum conditions (25 g/l corn bran, 10 g/l yeast extract ve 1 g/l KH_2PO_4) that determined earlier obtained α -amylase production studies in erlenmayer flasks. The maximum enzyme activity 20,68 U/ml specific productivity 25,36 U/g corn bran.h was obtained in erlenmayer studies. Dissolved oxygen concentration, pH, temperature, oxygen and carbon dioxide at gas outlet was followed online during fermentation in rotating drum bioreactor. Dinitrosalicylic acid method (Bernfeld, 1955) was used for determination of α -amylase activity. Effects of 7 reactor operating parameters, rotation speed, aeration rate, working volume, pore diameter of the diffuser, baffle size, temperature and inoculum size, on the α -amylase production in the rotating drum bioreactor was determined with Plackett-Burman design. According to ANOVA results of Plackett-Burman design, Model is significant as it is seen Model F value (17,46) and very low probality value (0,0075). The effects of rotation speed, aeration rate and baffle size were statistically the significant parameters with low p values ($p < 0,05$). In the validation study that suggested by Plackett-Burman design, enzyme activity 26,64 U/ml and specific productivity 50,86 U/g corn bran.h was obtained in the conditions that rotation speed (18 rpm), aeration rate (2 lpm) and baffle size (4 cm).

Keywords: Solid substrate fermentation, Rotating drum bioreactor, α -Amylase, Plackett-Burman design.

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Katı substrat fermentasyonunun tarihçesi.	6
Tablo 2.2. Katı substrat fermentasyonunun avantajları.	7
Tablo 2.3. Katı substrat Fermentasyonun Dezavantajları.	8
Tablo 2.4. KSF ve SmF arasındaki temel farklar.	13
Tablo 2.5. KSB tiplerinin genel özellikleri.	29
Tablo 2.6. Türkiye'nin enzim ithalat hacminin ülkelere göre dağılımı.	32
Tablo 2.7. Döner tambur biyoreaktör ile yapılan fermentasyon çalışmaları.	40
Tablo 3.1. <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> için kullanılan besiyerleri.	41
Tablo 3.2. PB tasarımında incelen bağımsız değişkenlerin deneysel aralıkları.	44
Tablo 3.3. PB tasarımı tarafından önerilen deneysel tasarım.	45
Tablo 4.1. PB tasarımı tarafından önerilen deneyler ve bağımlı değişkenlerin sonuçları. .	51
Tablo 4.2. α -Amilaz aktivite modeli ANOVA testi sonuçları.	62
Tablo 4.3. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.	63
Tablo 4.4. Maksimum α -amilaz üretiminde kullanılan şartlar ve sonucu.	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. KSF'nun belirgin özellikleri..	4
Şekil 2.2. Kesikli sistemdeki bir KSF prosesindeki genel işlem basamakları.	14
Şekil 2.3 KSB'ünün genel özellikleri.	16
Şekil 2.4. KSB'ündeki parametrelerin kontrol sorunları.	16
Şekil 2.5. KSB'ünün kısımları.	18
Şekil 2.6. Büyük ölçekli KSF proseslerinde sıcaklığın zamanla değişim profilleri.	19
Şekil 2.7. KSB gruplarının tasarım özellikleri.	22
Şekil 2.8. Tepsili biyoreaktörlerin temel tasarım özellikleri ve muhtemel tasarımlar.	23
Şekil 2.9. Dolgulu yatak biyoreaktörlerin tasarım özellikleri ve muhtemel tasarımlar.	25
Şekil 2.10. Döner/karıştırmalı tambur biyoreaktörlerin tasarım ve işletme parametreleri..	27
Şekil 2.11. Akışkan yataklı biyoreaktör tasarımları..	28
Şekil 2.12. α -Amilazın etki mekanizması.	31
Şekil 3.1. Döner tambur biyoreaktör düzeneği.	43
Şekil 3.2. Seramik mikro hava difüzörü.	44
Şekil 3.3. Döner tambur biyoreaktörde enzim üretim düzeneği.	45
Şekil 3.4. Maltoz ve DNS arasındaki oksidasyon-reduksiyon tepkimesi.	47
Şekil 3.5. Gaz analizörü.	48
Şekil 3.6. pH ve DO ölçüm sistemi.	48
Şekil 4.1. Erlende yapılan çalışmada α -amilaz aktivitesinin zamanla değişimi.	49
Şekil 4.2. Farklı miktarlarda eklenen köpük kırıcının α -amilaz aktivitesine etkisi.	50
Şekil 4.3. 1 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.	52
Şekil 4.4. 1 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, %O ₂ ve %CO ₂ 'in zamanla değişimi.	53
Şekil 4.5. 2 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	54
Şekil 4.6. 3 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	54
Şekil 4.7. 4 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	55
Şekil 4.8. 4 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, %O ₂ ve %CO ₂ 'in zamanla değişimi.	55
Şekil 4.9. 5 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.	56
Şekil 4.10. 6 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.	56
Şekil 4.11. 7 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	57
Şekil 4.12. 8 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.	58

Şekil 4.13. 8 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, %O ₂ ve %CO ₂ 'in zamanla değişimi.	58
Şekil 4.14. 9 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	59
Şekil 4.15. 10 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.	59
Şekil 4.16. 11 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	60
Şekil 4.17. 11 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, %O ₂ ve %CO ₂ 'in zamanla değişimi.	61
Şekil 4.18. 12 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.	61
Şekil 4.19. Teorik spesifik verimlilik değerlerine karşı deneysel sonuçların dağılımı.	63
Şekil 4.20. α -Amilaz aktivitesinin havalandırma hızı ile değişimi	64
Şekil 4.21. α -Amilaz aktivitesinin devir sayısı ile değişimi.....	65
Şekil 4.22. α -Amilaz aktivitesinin tampon boyutu ile değişimi	66
Şekil 4.23. α -Amilaz aktivitesinin doluluk oranı ile değişimi.....	67
Şekil 4.24. α -Amilaz aktivitesinin aşı miktarı ile değişimi	68
Şekil 4.25. α -Amilaz aktivitesinin ortam sıcaklığı ile değişimi	69
Şekil 4.26. α -Amilaz aktivitesinin gözenek çapı ile değişimi	70
Şekil 4.27. Doğrulama deneyinde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'ın zamanla değişimi.....	71
Şekil 4.28. Doğrulama deneyinde α -amilaz aktivitesi, %O ₂ , %CO ₂ 'in zamanla değişimi.	72

KISALTMALAR LİSTESİ

ANOVA	Varyans Analizi
DTB	Döner tambur biyoreaktör
DT	Deneysel tasarım
DO	Çözülmüş oksijen konsantrasyonu
KSF	Katı substrat fermentasyonu
KHF	Katı hal fermentasyonu
KSB	Katı substrat biyoreaktörü
PB	Plackett-Burman
SmF	Derin fermentasyon
YKHF	Yarı katı hal fermentasyonu

1. GİRİŞ

Katı substrat fermentasyonu (KSF), düşük nem içeriğine sahip olmasının yanında mikroorganizmaların büyüme ve metabolik aktivitelerini sürdürebilecekleri katı substratların ya da serbest su varlığında katı substratların kullanıldığı fermentasyon teknolojisi olarak tanımlanmaktadır. KSF, enzim üretimi için 1900'lerin daha öncesinde, penisilin üretimi için ise 1940'larda kullanılmaya başlanmıştır. KSF teknolojisine 1970'lerin ortalarında eğilim başlamış ancak katı substrat biyoreaktör (KSB) teknolojisi üzerine kayda değer çalışmalar 1990 yıllarından itibaren yürütülmüştür (Rahardjo ve ark., 2006). KSF, özellikle son yıllarda biyolojik olarak aktif sekonder metabolit, yem, biyoyakıt, gıda, endüstriyel kimyasal ve farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu potansiyel uygulamalar sayesinde KSF, endüstriyel biyoteknolojide önemli bir konuma gelmiş ve uygulanabilirliği artmıştır (Xie ve ark. 2013; Asagbra ve ark., 2005).

Antik çağlardan bu yana uygulanan KSF proseslerinin çoğu, hala herhangi bir modifikasyona uğramadan uygulanmaktadır. Bu teknikler çok basit işletim koşullarında uygulanmaktadır. Genelde basit bir ön işlem gören katı substratın nem içeriği ayarlanmakta ve aşılama yapılmaktadır. Fermentasyon geleneksel uygulamalarda oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir (Abdul Manan, 2014).

KSF teknolojisindeki uygulamalar ve gelişmeler özellikle batı ülkelerinde yeni gıdaların ve çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminde ortaya konulan avantajlar sayesinde son yıllarda büyük bir gelişme göstermiştir (Oostra ve ark., 2000). Fermentasyon sırasında oluşan kimyasal ve mikrobiyolojik değişimlerin tam olarak anlaşılması için laboratuvarlarda çok ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır. Küçük ölçekli geleneksel KSF proseslerinin bir kısmı, büyük ölçekli endüstriyel proseslere uygulanabilmektedir. KSF teknolojisi azalan petrol kaynaklarının yerine biyolojik esaslı hammaddelerin işlenmesi prosesi ile gelecekte çok daha önemli hale gelebilir. Endüstriyel biyokimyasalların üretimi için biyorafinerilerin (biyolojik esaslı hammadde) kullanımına yönelik çalışmalar giderek artan bir ilgi ile devam etmektedir (Mitchell ve ark., 2006).

Son yıllarda özellikle gelişmekte olan ülkelerde katı substratlar kullanılarak enzim üretimi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. KSF üretim teknolojisi, basitliği ve düşük üretim maliyetinden dolayı önemli bir araştırma alanıdır. Bu üretim teknolojisi büyük miktarlarda üretilen ve çevresel sorunlara neden olan tarımsal ve endüstriyel atıkların enzim ve metabolitler gibi değerli ürünlere dönüştürülmesine olanak

sağlamaktadır. Ülkemizin başlıca geçim kaynaklarından olan tarımsal faaliyetler sonucu büyük miktarda oluşan tarımsal atıkların bu teknoloji sayesinde değerli mikrobiyal ürünlere dönüştürülmesi biyoteknoloji endüstrisi için araştırılmaya değer bir alan olarak ortaya çıkmaktadır.

Günümüzde birçok endüstride kullanım alanı bulan enzimlerin önemi hızla artmaktadır. 2013 yılı verilerine göre dünya enzim pazarı 4,5 milyar dolar olmakla birlikte 2018 yılında 7,1 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Dewan, 2012). Polisakkaritlerdeki α -1-4 glikozidik bağlarını kırarak glikoz, maltoz gibi küçük şeker gruplarının açığa çıkmasını sağlayan α -amilaz, en önemli endüstriyel enzimler arasındadır ve biyoteknoloji için büyük öneme sahiptir. α -Amilaz enzimi tekstil, gıda, deterjan ve biyoyakıt endüstrileri başta olmak üzere birçok alanda yaygın bir kullanıma sahiptir.

KSF'nun laboratuvar, pilot ve endüstriyel ölçekli uygulamalarında kullanılan katı substrat biyoreaktörleri (KSB), özellikle son 20 yılda artan bir ilgiyle çalışılmaktadır. Bu konudaki gelişmeler sayesinde KSF teknolojisinin endüstriyel uygulamaları bulunmasına rağmen KSB tasarımlarının çoğu, metabolik ısının birikimi ve oksijen transferi kısıtlamaları nedeniyle endüstriyel uygulamalar için uygun değildir. Döner Tambur Biyoreaktör (DTB), KSF teknolojisinde kullanılan önemli KSB tasarımlarından biridir. Klasik DTB'ler, yüksek katı konsantrasyonlarında gerçekleşen mikrobiyal üretimler için önemli bir sistem olmasına karşın etkili bir hava difüzörünün bulunmamasından dolayı ısı ve kütle transferi açısından tam olarak yeterli değildir ve daha büyük ölçekli DTB'lerde ileri seviyedeki sıcaklık gradientleri sebebiyle biyomas üretim verimi azalmaktadır. Diğer yandan klasik DTB'lerde sıvı film tabakasını daha ince tutarak gaz-sıvı kütle transferinin etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi için biyoreaktörün doluluk oranı %50'nin altında kalmaktadır. DTB'lerde karşılaşılan sorunların minimize edilmesi için klasik döner tambur biyoreaktör tasarımına ek olarak daha önce etkinliği kanıtlanmış olan (Nehring ve ark., 2004; Czermak ve ark., 2005; Jin ve ark., 2010) seramik mikro hava difüzörü yeni DTB tasarımında kullanılmıştır.

Mikro hava difüzörlü yeni DTB tasarımının endüstriyel uygulamalar için uygun olduğu belirtilmiş ancak herhangi bir enzim ve ya mikrobiyal ürünün üretimine ilişkin bir çalışma yapılmamıştır. Bu tasarım sayesinde klasik DTB'lerde karşılaşılan oksijen, ısı ve kütle transferi sınırlamaları gibi sorunlar minimize edilerek daha yüksek reaktör doluluk oranlarında enzim üretimi için önemli bir KSF prosesi oluşturulmuştur. Endüstriyel uygulamalara geçilme noktasında proste etkin olan faktörler üzerine yoğun çalışmalar

yapılarak bu faktörlerin anlaşılması çok önemlidir. Bu amaçla kullanılan klasik yöntemlere nazaran istatistiksel bir tekniğe sahip deneysel tasarım yöntemleri büyük avantaja sahiptir. Fermentasyon prosesinde etkin değişkenlerin taranmasında yaygın bir şekilde kullanılan deneysel tasarım yöntemlerinden biride Plackett-Burman tasarımıdır. Bu çalışmanın amacı, seramik mikro hava difüzörlü yeni DTB tasarımı ile α -amilaz üretiminin laboratuvar ölçekli biyoreaktör sistemine uyarlanması ve reaktör işletme parametrelerinin Plackett-Burman tasarımı ile incelenmesidir.



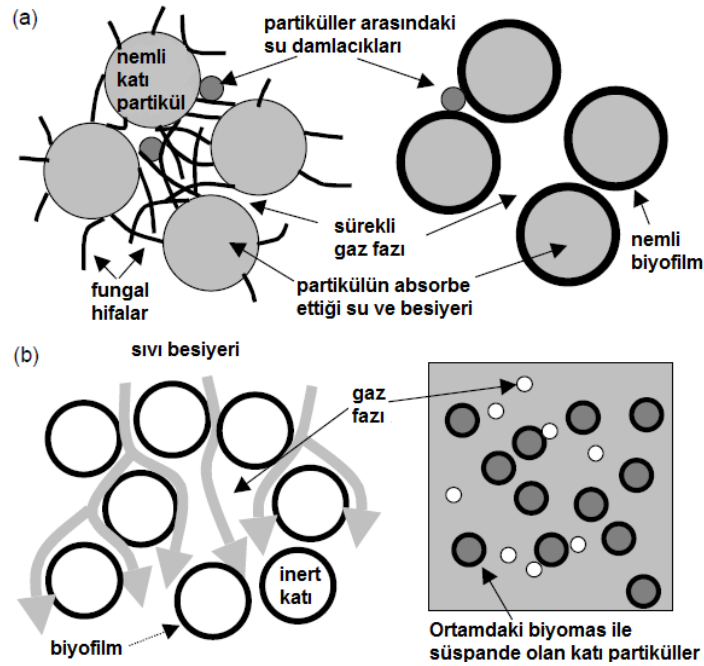
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fermentasyon

Fermentasyon, mikroorganizmaların makromolekülleri metabolize ederek mikromolekülleri ürettiği bir prosestir. Mikrobiyal büyümeyi destekleyen birçok substrat fermentasyonda kullanılabilir. Kullanılan mikroorganizma ve ortam bileşenine bağlı olarak alkoller, enzimler, organik asitler gibi birçok ürün üretilmektedir. Katı substrat fermentasyonu ve derin fermentasyon olmak üzere ticari mikrobiyal ürün üretiminde kullanılan en yaygın iki fermentasyon prosesi vardır.

2.1.1. Katı Substrat Fermentasyonu

Katı substrat fermentasyonu (KSF), mikroorganizmaların katı ya da yarı katı substratların veya destek materyallerinin üzerinde kültürü şeklinde tanımlanabilir (Rosales ve ark., 2007). Bu tanıma göre daha sonra KSF'nun alt sınıfları, Katı Hal Fermentasyonu (KHF), neredeyse hiç serbest su içermeyen katı üzerindeki fermentasyon sistemi olarak, Yarı Katı Hal Fermentasyonu (YKHF) ise sıvı ortamda süspansiyon olmuş katı substratın kullanıldığı fermentasyon sistemleri olarak literatürde adlandırılmıştır (Moo-Young ve ark., 1983). Partiküller arasında sıvı faz sürekli olarak bulunmazken gaz fazı sürekli bulunur. Sistemdeki suyun büyük bölümü katı partiküller tarafından absorblanır (Şekil 2.1(a)). Sıvı ortamda süspansiyon olmuş katı substratın kullanıldığı YKHF sistemlerinde serbest su miktarı KHF'na göre oldukça fazladır (Şekil 2.1(b)).



Şekil 2.1. KSF'nun belirgin özellikleri. (a) KHF: filamentöz fungus (soldaki) ve prokaryot organizmalar (sağdaki). (b) YKHF : damlatmalı filtre (soldaki), bulamaç (sağdaki) (Mitchell ve ark., 2006).

2.1.1.1. Katı Substrat Fermentasyonunun Tarihçesi

KSF, Doğu ve Asya ülkelerinde gıda endüstrisi ve geleneksel fermente yiyeceklerin farklı ölçeklerde üretimi için yüzyıllardır uygulanmaktadır. Tempe, soya sosu, tapai, koji, kırmızı prinç, annatto, miso gibi ürünler KSF ile üretilen fermente yiyecekler arasındadır. Bu ürünlerden bazıları bin yıllık bir geçmişe sahiptir ve üretim metodları deneme ve yanılma yöntemleri ile oluşturulmuştur. Ekmek yapımı, insanlık için bilinen en eski tekniklerden biridir ve arkeolojik kazılar Eski Mısırlıların M.Ö. 2600 yılından daha öncesinde bir fermentasyon prosesini kullanarak ekmek yaptıklarını göstermiştir. KSF'nun kronolojik tarihçesi Tablo 2.1'de verilmiştir.

Fermente gıda ürünleri bu ülkelerdeki ailelerin büyük bölümünün günlük öğünlerinde, protein ve vitamin kaynağı olarak önemli bir yer tutmaktadır. Bununla birlikte, bu ürünlerin üretimi için en alt seviyedeki geleneksel teknolojiler kullanılması sebebiyle, sterilite koşulları olması gerektiği gibi sağlanamamakta ve dolayısıyla istenmeyen mikrobiyal aktiviteler sonucu toksinler ve zehir etkisi oluşturabilecek maddeler yan ürün olarak meydana gelmekte, bunun kontrolü bilimsel ve endüstriyel çalışmalarda problem teşkil etmektedir. KSF tekniğinin daha iyi anlaşılması için derinlemesine çalışmalar yapılmakta ve çeşitli KSF yaklaşımları geliştirilmektedir.

2.1.1.2. Katı Substrat Fermentasyonunun Avantajları

KSF, gıda ve tarımsal sanayi atıklarının geri dönüşümü ve biyokütle tasarrufu gibi çok önemli ekonomik avantajların yanı sıra mikroorganizmaların biyoremediasyon için uygun bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. KSF, derin fermentasyona göre ekonomik avantajlarıyla son yıllarda enzim üretiminde önem kazanmıştır (Elibol ve Moreira, 2005).

KSF teknolojisinin enzim üretimi uygulamalarındaki avantajlarından birçok yayında bahsedilmiştir. Bu avantajlar; daha yüksek enzim konsantrasyonları (Romero-Gomez ve ark., 2000; de Barros Soares ve ark., 2003; Fenice ve ark., 2003; Sandhya ve ark., 2005; Patil ve Dayanand, 2006; Téllez-Jurado ve ark., 2006), enzim üretiminde daha yüksek verimlilik (Solis-Pereira ve ark., 1993; Aguilar ve ark., 2001; Balasubramaniam ve ark., 2001; Nagel ve ark., 2001), üretilen enzimlerin stabilitesi (Diaz-Godinez ve ark., 2001; Diaz ve ark., 2006; Wolski ve ark., 2009) ve çok düşük seviyede katabolik represyon (Solis-Pereira ve ark., 1993; Minjares-Carranco ve ark., 1997; Maldonado ve de Saad, 1998; Diaz-Godinez ve ark., 2001; de Azeredo ve ark., 2007) şeklindedir.

Tablo 2.1. Katı substrat fermentasyonunun tarihçesi (Chen, 2013).

Tarih	Gelişmeler
MÖ 2000	Mısırlıların ekmek yapımı <i>Penicilium roquefortii</i> kullanılarak peynir yapımı
MÖ 1000	koji sosu üretimi
16. yüzyıl	Fermente çay üretimi
18. yüzyıl	Üzüm posasından sirke yapımı, tabaklama ve baskıda gallik asit kullanımı
1860 – 1900	Kanalizasyon Arıtımı
1900 – 1920	Fungal ve mikrobiyal enzimlerin üretimi, kojik asidin üretimi Pnömatik tambur-tip fermenterin geliştirilmesi
1920 – 1940	Glukonik asit ve sitrik asit üretimi Tambur biyoreaktörlerin geliştirilmesi
1940 – 1950	Penisilin üretimi
1950 – 1960	Steroid hormonu üretimi
1960 – 1980	Proteince zengin gıda ve mikotoksin üretimi
1990 – 2000	KSF tekniğinde temel konular hakkında, biyoproses ve ürünler açısından gelişmeler; Biyoproses: Biyoremediasyon, tehlikeli maddelerin biyobuzundurulması, tarımsal ve endüstriyel atıkların biyolojik detoksifikasyonu, tahıl ve tahıl artıklarının besinsel değerinin zenginleştirilmesi için biyodönüşüm, biyolojik yöntemler ile kağıt hamuru üretimi vs. Ürünler: Biyolojik olarak aktif bileşikler: Aflatoksin, okratoksin, bakteriyel endotoksinler, gibberellik asit, zearalenon, ergot alkaloidleri, penisilin, sefalosporin, sefamisin C, tetrasiklin, kloratetrasiklin, oksitetrasiklin, iturin, aktinorodin, metilenomisin, sürfaktin, monorden, siklosporin A, ustiloksinler, antifungal uçucu bileşenler, destruksin A & B, klavulonik asit, mikofenolik asit vs. Enzimler: Çeşitli enzimler (selülaz, β -glukozidaz, CMCaz, lakkaz, ksilanaz, poligalakturonaz, ligninaz, β -ksilozidaz, a-arabinofuronosidaz, Li-peroksidaz, Mn-peroksidaz, aril-alkol oksidaz, katalaz, fenol oksidaz, proteazlar (asidik, nötral ve bazik), lipazlar, α -galaktosidaz, β -galaktosidaz, α -amilaz, β -amilaz, glukoamilaz, glutaminaz vs. Organik asitler: Sitrik asit, fumarik asit, laktik asit, oksalik asit, gallik asit vs. Diğer Ürünler: L-glutamik asit, pigmentler, karotenoid, ksantan sakızı, süksinoglikan, etanol, aroma bileşenleri, vitamin B-12 ve B-6, riboflavin, tiamin, nikotinik asit, nikotinamid, gama-linolenik asit, biyosüpfaktanlar, biyopestisitler/biyoherbisitler vs.
2000 - günümüze	KSF tekniğinin biyorafineri prosesinde hammadde üretimi için kullanılması
Gelecekte	Endüstriyel biyokimyasalların üretimi için biyorafineri prosesinde gelişmelerin olması

Enzim üretiminde KSF, derin fermentasyona göre katobolik represyonun alt seviyede olması ve geniş bir aralıktaki çeşitli substratların kullanımı ile elde edilen yüksek verim sayesinde derin fermentasyona göre daha avantajlıdır ((Ramesh ve ark., 1996; Maldonado ve de Saad, 1998; Aguilar ve ark., 2001; Diaz-Godinez ve ark., 2001). Literatürde KSF'nun çeşitli avantajları dört sınıf halinde Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Katı substrat fermentasyonunun avantajları (Abdul Manan, 2014).

Biyolojik Avantajlar	<u>Enzim Üretimi İçin Biyolojik Avantajlar</u> • Yüksek hacimde ürün üretimi • Üretimde daha yüksek verimlilik • Daha yüksek ürün stabilitesi • Katabolik represyonun daha az olması • Yüksek substrat konsantrasyonlarına tolerans <u>Diğer Biyolojik Avantajlar</u> • Doğal ve kompleks ham maddelerin kullanımı • Fermentasyon sisteminin kontrol ihtiyacının daha az olması • Daha kolay havalandırma • Daha az su kullanımı ile kontaminasyon riskinin daha az olması
Üretim Prosesindeki Avantajlar	<u>Enzim Üretimi Prosesindeki Avantajlar</u> • Genellikle küçük hacimli ve kompakt biyoreaktör kullanımı • Çok yüksek hacimlerde substrat yüklemesi <u>Diğer Üretim Proseslerindeki Avantajlar</u> • Kullanılan substratların basit ve işlenmemiş bir şekilde doğal materyallerden elde edilmesi • Bu materyellere uygulanacak ön işlemler basit olması • Ürün konsantre olduğu için alt akım işlemleri daha basit olması • Ürünün ekstraksiyonunda daha az solvent kullanımı • Köpük kırıcı kullanmaya gerek olmaması
Çevresel Avantajlar	• Üretim sırasında zararlı atık oluşumunun minimize edilmesi • Daha az sıvı atık oluşumu • Biyolojik detoksifikasyon ile atık problemlerinin çözümü
Ekonomik Avantajlar	• Substrat olarak genellikle birincil kullanımı olmayan, oldukça ucuz ve bol bulunan tarımsal sanayi atıklarının kullanımı • Daha basit biyoreaktör işletiminin ucuz ve kolay olması • Alt akım işlemlerinde düşük saflaştırma maliyeti • Ekonomik açıdan uygulanabilirliğinin kanıtlanmış olması

2.1.1.3. Katı Substrat Fermentasyonunun Dezavantajları

KSF, çok önemli avantajlar sunmasına karşın, aynı zamanda bazı aşılması güç dezavantajlara sahiptir. Laboratuvar ölçeğinde yapılan bilimsel araştırmalar, fermentasyon sırasında meydana gelen kimyasal ve mikrobiyolojik değişikliklerin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. KSF, bilindiği üzere geleneksel teknoloji ile fermente gıda üretim prosesinden değerli biyoteknolojik ürünlerin üretimi prosesine birçok endüstriyel uygulama için cazip bir teknolojidir. Ancak bazı durumlarda, KSF'nun SmF'ye karşı avantajları metabolik ısı birikimi ve oksijen transferi kısıtlaması problemleri dolayısıyla ölçek büyütme ile dezavantaja dönüşmektedir. Biyolojik dezavantajların bazıları ve aşılması için öneriler Tablo 2.3'de belirtilmiştir.

Tablo 2.3. Katı substrat Fermentasyonun Dezavantajları (Abdul Manan, 2014).

Dezavantajlar	Öneriler
Isı birikmesi, pH kontrolü, oksijen transferi, kütle ve ısı transferi, substrat ve nem gradientlerinden dolayı ortaya çıkan mühendislik problemleri	Sıcaklık artışı, oksijen ve karbon dioksit gradientleri problemlerinin aşılması için bu parametreler on-line ölçülerek sistem değişikliklere göre kontrol edilmeli
Hücre kitlesi, besiyeri bileşenleri, sıcaklık, pH ve nem içeriği parametrelerinin fermentasyon ortamındaki dengesiz dağılımı	
Substrat yatağının tamamına eşit olarak ve kararlı bir şekilde havalandırma zorluğu	Havalandırma hızı kontrol edilmeli. Bu şekilde, aynı zamanda sıcaklık kontrol edilebilir
Metabolizma ve mikroorganizmanın çoğalması sonucu açığa çıkan ısı, katı substratın sıcaklığını yükseltir ve nem kaybetmesine ya da buharlaştıktan sonra yoğunlaşan su sebebiyle substratın bazı bölgelerinde su artışına neden olur	Artan sıcaklık gradiyenti probleminin aşılması için metabolik ısı uzaklaştırılmalı
Mikrobiyal üreme kinetiği için biyomas miktarının belirlenmesi Çoğalma ve kinetik çalışmaları, edinilen yeni bilgiler bulunmasına rağmen, yine de nispeten sınırlı ve hala zor	On-line ölçümler geliştirilmeli ve bu ölçümler sistem kontrolünde kullanılmalı Kuvvetli öngörü ve verilerin optimizasyonu için matematiksel modeller geliştirilmeli

Biyoteknolojik ürünlerin geliştirilmesi alanında KSF'nun uygulanabilirliğinin artırılması üzerine yapılan araştırmalar, KSF'nun endüstriyel uygulamalarında karşılaşılan problemlerin çözülmesi için bu faktörlerin daha iyi anlaşılması üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu faktörler, şimdiye kadar tam olarak anlaşılamamış ve rapor edilmemiştir, bununla birlikte biyomas ve mikrobiyal ürün üretimi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bazı ampirik eşitlikler türetilmiştir. Bu sorunların aşılmasında mikrobiyal çoğalma karakteristiklerinin anlaşılması çok önemlidir. Diğer taraftan, rasyonel tasarım ve proses kontrol konularında tam olarak aydınlatılması gereklidir. Bu konular, KSF prosesinin geliştirilmesinde ve uygun şartların net bir şekilde ortaya konulmasında büyük öneme sahiptir. KSF'nu, Katı Hal Fermentasyonu (KHF) ve Yarı Katı Hal Fermentasyonu (YKHF) olmak üzere 2 sınıfa ayırmak mümkündür.

2.1.1.4. Katı Hal Fermentasyonunu

Katı hal fermentasyonu, bu alanda çalışmalar yapan birçok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. KHF, nemli katı destek materyalleri (inert taşıyıcılar ya da karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilen çözünmez substratlar) üzerinde mikroorganizmaların kültürü olarak tanımlanmıştır (Pandey ve ark., 2000). Diğer bir tanımda KHF, çözünür nutrienlerin varlığında ya da yokluğunda, belirli bir nem içeriğine sahip ya da

absorblama yeteneği olan katı materyellerin çoğunlukla yüzeyinde meydana gelen mikrobiyal bir proses olarak tanımlanırken (Minjares-Carranco ve ark., 1997), bir başka tanım ise, partiküler haldeki katı substratlar kullanılan herhangi bir proses şeklindedir (Mitchell ve ark., 2000). Rahardjo ve ark., (2006), KHF’nu mikrobiyal üreme ve metabolik faaliyetler için yeterli nem içeriğine sahip, serbest su ve havanın sürekli etkileşimde olduğu nemlendirilmiş katı substrat üzerinde mikroorganizmaların çoğalması olarak tanımlamıştır.

Mitchell ve ark. (2011) tarafından yapılan en güncel tanımlamaya göre sürekli gaz fazı ile temas halinde olan substrat yatağındaki katı materyelin nemli partikülleri üzerinde mikroorganizmaların gelişmeleri ile gerçekleşen bir prosestir. Tanımlaması nasıl yapılırsa yapılsın, genel olarak KHF, serbest suyun neredeyse hiç bulunmadığı şartlarda funguslar gibi doğal ortam koşullarına yakın şartlarda gelişme özelliğine sahip, doğal olarak adapte olmuş ve özelleşmiş mikroorganizmaların kullanıldığı mikrobiyal fermentasyonunu ifade etmektedir (Abdul Manan, 2014).

2.1.1.5. Yarı Katı Hal Fermentasyonu

Yarı katı hal Fermentasyonu son yıllarda katı hal fermentasyonunun dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik ortaya çıkan yeni bir fermentasyon prosesidir. Serbest su miktarının artırıldığı KHF teknolojisine ilgi özellikle son yıllarda artmış ve buna bağlı olarak teknolojinin adlandırılmasında farklılıklar olmuştur. “Yarı Katı Hal Fermentasyonu” (Couto ve ark., 2002; Economou ve ark., 2010; Onofre ve ark., 2012) ya da “Bulamaç Hal Fermentasyonu (Slurry-State Fermentation)” (De Gregorio ve ark., 2002; Zhong ve Cen, 2005; Rasheed ve ark., 2015) bu teknoloji için en fazla kullanılan diğer adlandırmalardır. SmF ile karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalar, YKHF ile verimin önemli miktarda (55 kat fazlasına varan oranlarda) artırılabilceğini diğer yandan üretim maliyetinin de kayda değer seviyede (4 kat gibi) daha düşük olabileceğini ifade etmektedir (Osma ve ark, 2011; Machado ve ark., 2013). Yüksek su içeriğine sahip katı substratların kullanıldığı bu fermentasyon yöntemiyle KHF’nun avantajlarından faydalanılarak yüksek verimlerde üretim yapılabilmekteyken diğer yandan kontrol ve taşınım problemleri en aza indirilebilmektedir (Tanyildizi ve Özer, 2011).

2.1.2. Derin Fermentasyonu

Derin fermentasyon (SmF), n utrientlerin tamamen     nd     ya da süspanse oldu   sıvı ortamda (melas, sıvı besiyeri vb.) mikrobiyal üretimlerin gerçekleştiği prosestir. Bu proseste susbtrat oldukça hızlı bir şekilde t k tilir. Proses kontrolü ve ürünün saflaştırılması SmF’de daha kolaydır. Ticari enzimlerin %75’den fazlasının üretiminde derin fermentasyon tercih edilmektedir. Bunun başlıca sebepleri SmF’un büyük ölçekli üretimlere rahatça uygulanabilmesi ve genetiği de i tirilmi  mikroorganizmalar için daha uygun bir proses olmasıdır (Subramaniyam ve Vimala, 2012). Fermentasyon teknolojisinde kullanılan fermentör tipleri genel olarak aşağıdaki gibidir:

1. Karıştırmalı tank ferment rler
2. Hava kaldırmalı ferment rler
3. Borusal akışlı ferment rler
4. Kabarcıklı kolon ferment rler

Ticari enzimlerin üretimi genellikle karıştırmalı tank ferment rlerinde gerçekleştirilir. Bu yöntemde öncelikle bir besiyeri hazırlama tankına hammaddeler beslenir. Burada  retim için uygun pH ayarlanır ve sterilizasyon işlemi sonrası daha önce buharla sterilize edilmiş olan fermentöre beslenir. Bazı durumlarda ihtiyaç duyulan bazı ısı stabil eklemeler, köpük kırıcılar ile viskozite ve homojeniteyi ayarlayan maddeler steril olarak ilave edilebilir (Topal, 1985). Diğer taraftan mikroorganizma fermentöre gelmeden önce üretim hacmine bağlı olarak bir ve ya daha fazla a ı hazırlama safhasından geçer. Fermentasyon ortamında bulunan bileşenlerin korozif etkilerine karşın tanklar uygun bir paslanmaz  elikten (316L, 304L gibi) yapılır.  nemli bir kısmını mikrobiyal enzim üretiminin oluşturduğu biyoteknolo i endüstrisinde kullanılan ferment rler, 1000 m³ gibi yüksek hacimlerde olabilmektedir (Renge ve ark., 2012). Endüstriyel enzimler aerobik mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Bu nedenle fermentasyon ortamına steril hava verilmesi gerekir. Ayrıca oksijenin gaz fazdan sıvı faza transferi için ortamın karıştırılması gerekmektedir. Hava içerisindeki kontaminantların uzaklaştırılmasında endüstride mikron seviyesinde gözenekleri olan hidrofobik silikon esaslı membran filtreler ya da ısıyla  n sterilize edilebilen lifli maddeleri içeren filtreler kullanılır (Rehm, 1987).

Ekzotermik bir proses olması sebebiyle aerobik mikrobiyal büyüme sırasında ısı üretilir. Karıştırma ve havalandırma prosesleriyle ısı tranferine ek olarak fermentasyon sıcaklığını 30-35 C değerlerinde tutmak için ferment rden ısı uzaklaştırılmalıdır.

Bakteriyel fermentasyonda açığa çıkan metabolik ısı daha fazladır ve diğer organizmalara göre bazen iki katı kadar yüksek olabilir. Mikrobiyal büyümenin ve enzim üretiminin kontrol edilerek ortam şartlarının sürekliliğin sağlanması için çeşitli parametreler hem aşı hazırlama, hem de fermentasyonla üretim aşamasında özenle takip edilmelidir. Bu parametreler fermentasyon ortamının sıcaklığı, soğutma suyunun sıcaklığı, çalışma hacmi, karıştırıcının hızı, havalandırma hızı, sıvı besleme hızı ve kültür ortamındaki köpük varlığı gibi fiziksel parametrelerdir. Bu parametreler gelişmiş cihaz teknolojisi ile takip ve kontrol edilebilmektedir. Fermentasyon ortamının analizinde bazı ölçümlerden yararlanılır. Online takip edilen pH, sıcaklık, DO, redoks potansiyeli ve fermentörü terk eden gaz içerisindeki oksijen ve karbon dioksit konsantrasyonu parametreleri bu ölçümlerden en önemlileridir (Tanyıldızı, 2005).

Endüstriyel fermentasyonlar kesikli, yarı kesikli ve sürekli olarak yapılabilmesine karşın genelde kesikli ve yarı kesikli üretim modu tercih edilmektedir. Kesikli üretim prosesinde üretim hacmi başlangıçta belirlenir ve üretim süresince sabit kalır. Aşı kesikli hacmine ilave edilerek bir “fermentasyon süresi” ya da “çevrim süresi” boyunca fermentasyon devam eder. Kesikli fermentasyon süresi genellikle 1-2 gün olmakla birlikte mikrobiyal büyüme ve üretime bağlı olarak 5-6 güne kadar çıkabilir. Yarı kesikli üretim prosesinde fermentasyon hacmi sürekli ya da periyodik zaman aralıkları ile ilave edilen taze besiyeri ile artar. Sürekli üretim prosesinde ise fermentöre sürekli taze besiyeri ilave edilir ve fermente olmuş ortamda aynı hızla fermentörden çekilir. Böylece fermentasyon hacmi sabit kalmakla birlikte ürün ve atıklar bulunan ortam uzaklaştırılmakta ve taze besiyeri sisteme ilave edilmektedir. Sürekli üretim prosesi genelde kesikli üretim gibi başlar ve mikrobiyal üreme belirli bir noktaya gelince taze besiyeri ilave edilmeye başlanır. Bazı sürekli üretim proseslerinde, ürün akımından ayrılan aşı tekrar fermentöre beslenir. Kesikli ve yarı kesikli üretim proseslerinde her çevrim sonrası sterilizasyon yapılırken, sürekli üretim proseslerinde sadece üretimin başında yapılmaktadır bu nedenle mikrobiyal kontaminasyona daha hassastır (Chisti, 1999).

2.1.3. Katı Substrat Fermentasyonu ile Derin Fermentasyon Arasındaki Farklar

KSF ile karşılaştırıldığında SmF, bazı süspende katılarda içeren sıvı ortamda gerçekleştirilir. KHF'nun nem içeriği %12-70 aralığında olabilmekteyken genellikle %60 civarındadır (Chen 2013), YKHF'unda ise ortamda bir miktar serbest su bulunur. SmF, fermentasyon teknolojisinde kullanılan en yaygın teknolojidir (Hata ve ark., 1997). SmF

üzerine, prosesin ürün verimi, verimliliği ve ekonomisini ele alan, bu parametrelerin maksimize edilmesini amaçlayan birçok araştırma yapılmıştır (Castilho ve ark., 2000).

SmF ile endüstriyel enzimlerin üretimi uzun yıllardır uygulanmaktayken, filamentöz fungusların endüstriyel mikrobiyal ürünlerin üretiminde kullanımı son elli yılda büyük bir artış göstermiştir (Papagianni ve ark., 1999). SmF, yüksek maliyetli bir teknoloji olmasına rağmen enzim ihtiyacının çok fazla olması nedeniyle ticari enzimlerin ve diğer birçok mikrobiyal ürünün üretimi için birincil olarak kullanılan teknolojidir (Viniegra-González ve ark., 2003). SmF, KSF ile karşılaştırıldığında ortam parametrelerinin daha iyi kontrolü, nispeten düşük işçilik maliyeti, daha küçük alan gereksinimi ve daha az ölçek büyütme gereksinimleri gibi avantajlara sahiptir (Singhania ve ark., 2009).

Modern SmF birçok avantaj sunmasına rağmen, aynı zamanda bazı önemli dezavantajlara sahiptir. Barros Soares ve ark. (2003), SmF ile transglutaminaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada uzun fermentasyon süreci, aşırı köpük üretimi nedeniyle oksijen transferi etkinliğinin azalması ve pahalı besiyeri gibi bazı sınırlamaları bildirmişlerdir (de Barros Soares ve ark., 2003). KSF ve SmF arasındaki temel farklılıklar Tablo 2.4'te belirtilmiştir.

Filementöz fungusun doğada bir katı ortamda yaşadığı için SmF'un fungus için yapay bir ortam olduğu belirtilmiştir (Singhania ve ark. 2009). Mikroorganizmaların çoğu, özellikle filamentöz funguslar ve aktinomisetlerin çoğu doğada birincil olarak KSF koşullarında yaşar ve çoğalırlar. KSF ile enzim üretimlerinde de bu iki mikroorganizma grubu yoğun olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan, önceleri bakteriyel enzimlerin üretiminde en uygun metodun SmF olduğu kabul edilmekteyken yapılan son çalışmalar KSF'nun bakteriyel enzim üretiminde SmF'dan daha verimli olduğunu göstermiştir (Subramaniyam ve Vimala, 2012). Mikroorganizmaların morfolojiside, prostesteki parametrelerin çoğunu etkileyebileceği için önemli bir faktördür.

2.1.4. Katı Substrat Fermentasyonu Prosesindeki Genel İşlem Basamakları

KSF prosesinde uygulanan işlem basamakları büyük oranda SmF ile aynıdır. Bu basamaklar arasında hammaddenin katı olması sebebiyle substrat hazırlama aşaması ile ortamdaki nemin kontrolü için hava hazırlama aşaması SmF ile farklıdır. Şekil 2.1'de gösterildiği üzere aşamalar şöyledir;

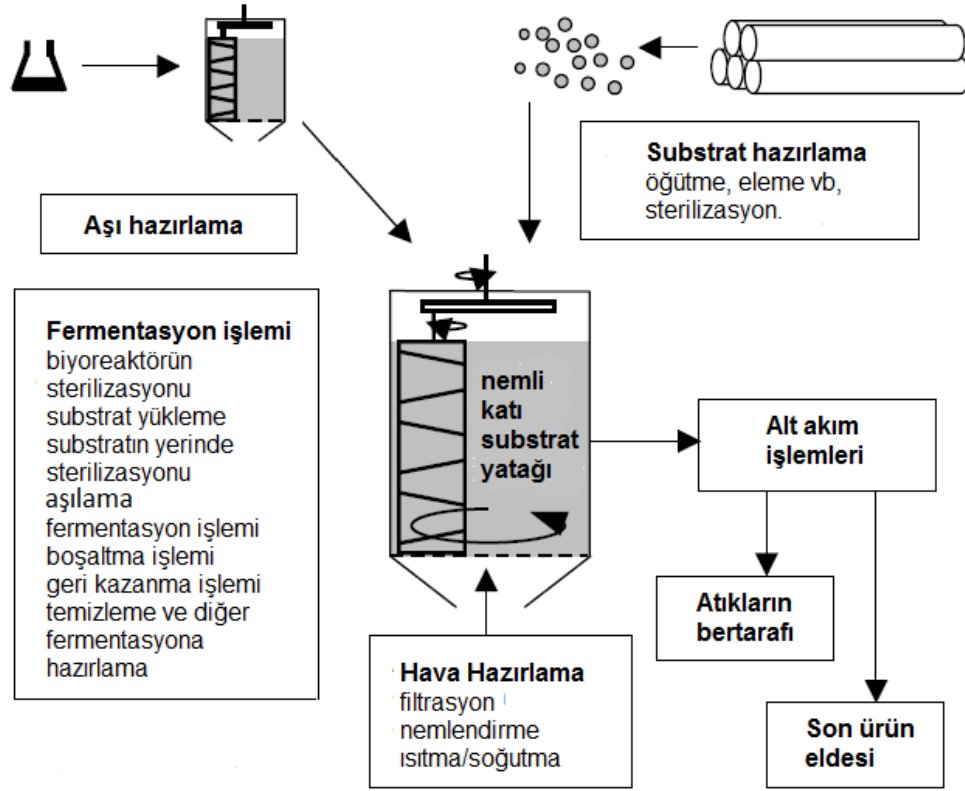
Tablo 2.4. KSF ve SmF arasındaki temel farklar (nee’Nigam ve Pandey, 2009; Chen, 2013).

KSF	SmF
Serbest su olmadığı şartlarda substratın nem içeriği %12-70 aralığında olabilir ya da bir miktar serbest su bulunabilir	Su kültürün temel bileşenidir
Besiyeri konsantrasyon gradiyenti vardır	Besiyeri konsantrasyon gradiyenti yoktur
Kültür sistemi 3 fazdan oluşur (gaz, sıvı ve katı) ve gaz sürekli fazdır	Kültür sistemi sıvı fazdan oluşur ve sıvı sürekli fazdır
Aşı hacmi büyüktür, %10’dan fazladır	Aşı hacmi küçüktür, %10’dan azdır
Oksijen ihtiyacı gaz fazdan karşılanır; proses düşük enerji gereksinimine sahiptir	Oksijen ihtiyacı çözünmüş oksijenden karşılanır.
Mikroorganizmalar katı substrata tutunur ve içine nüfuz eder	Mikroorganizmalar kültürde homojen bir şekilde dağılır
Fermentasyon sonunda, ortam nemli katı substrattan oluşur ve ürün konsantrasyonu yüksektir	Fermentasyon sonunda, ortam sıvıdır ve ürün konsantrasyonu düşüktür
Yüksek üretim verimliliği	Düşük üretim verimliliği
Karıştırma zor ya da imkansızdır, bazı mikroorganizmalar karıştırma ve dönmeye karşı hassastır.	Karıştırma kolaydır, besiyeri difüzyonu nedeniyle mikroorganizmanın çoğalması sınırlanmaz
Metabolik ısının uzaklaştırılması zordur	Sıcaklık kontrolü kolaydır
Heterojenite vardır	Homojenite vardır
Fermentasyon parametrelerinin on-line belirlenmesi ve kontrolü zordur	Fermentasyon parametrelerinin on-line belirlenebilir ve kontrol edilebilir
Ekstraksiyon prosesi basittir ve kontrol edilebilir; çok az atık su	Ekstraksiyon prosesi genelde komplekstir; büyük miktarda atık su
Düşük su aktivitesi	Yüksek su aktivitesi
Basit fermenter	İleri teknoloji ile fermenter tasarımı
Düşük enerji tüketimi ve ekipman yatırımı	Yüksek enerji tüketimi ve ekipman yatırımı
Düşük hammadde maliyeti	Yüksek hammadde maliyeti

Substrat Hazırlama: Substratı uygun boyutlarda elde etmek için kesme, kırma ya da öğütme işlemleri gerekebilir. Substratın fermentasyon için daha kullanılabilir hale getirilmesi için su eklemek, besinsel ekler, ısıl işlem ya da ön işlem gerekebilir. Substratın sterilizasyonu ya da pastörizasyonu biyoreaktör içinde ya da dışında yapılabilir.

Aşı Hazırlama: Aşı hazırlama metodu kullanılacak mikroorganizmaya bağlıdır. Bu basamakta amaç yeterli miktarda ve yüksek canlılıkta aşının geliştirilmesidir. KHF prosesinde aşılama, mikroorganizmanın nemli katı substrat üzerine homojen bir şekilde dağıtılabilmesi için sporların süspende olduğu aşı ile yapılmalıdır.

Biyoreaktörün Hazırlanması: Biyoreaktör, önceki fermentasyon işleminden sonra temizlenmeli ve eğer substrat biyoreaktöre yüklenmeden önce steril edilecekse biyoreaktörde steril edilmeli, daha uygun görülen diğer seçenekte ise biyoreaktör ve substrat yükleme işleminden sonra birlikte sterilize edilmelidir.



Şekil 2.2. Kesikli sistemdeki bir KSF prosesindeki genel işlem basamakları (Mitchell ve ark., 2006).

Aşılama ve Substrat Yükleme: Aşılama adımı substratı yüklemekten önce ya da sonra olabilir. Substrat yatağının karıştırıcı vasıtasıyla ile karıştırılmadığı durumlarda, aşılama biyoreaktörün dışında yapılmalıdır. Eğer karıştırıcı kullanılabiliyorsa, en iyi aşılama metodu karışma dolayısıyla homojene yakın olan substrat yatağına aşının püskürtülmesidir. Eğer substrat sterilize ya da pastörize edilmişse ve biyoreaktör dışında aşılanmışsa, yükleme esnasındaki kontaminasyon riskini en aza indirmek için son derece dikkatli bir şekilde yükleme yapılmalıdır.

Fermentasyon İşlemi: Burada biyoreaktör tasarımı bazı işletme parametreleri üzerinde büyük öneme sahiptir. Beslenen havanın akış hızı ve sıcaklığı, substrat yatağının karışma (karıştırma/dönme) hızı, soğutma suyunun sıcaklığı gibi çeşitli işletme parametreleri ise genel fermentasyon yaklaşımı ile belirlenebilir. Substrat yatağının sıcaklığı ve su aktivitesi gibi fermentasyon için anahtar parametreleri kontrol etmek için ise mikrobiyal aktivite ve ürün üretiminin optimum olduğu değerler belirlenmelidir.

Ayırma: Bazı durumlarda ön ayırma işlemi biyoreaktörde, genellikle ise ürün ayırma ve saflaştırma basamaklarının tümü biyoreaktör dışında yapılır. Her durumda,

biyoreaktördeki katılar fermentasyon sonunda uzaklaştırılmalıdır. Büyük ölçekli proseslerde, ayırma işlemi için cihaz teknolojisinin kullanılması gereklidir.

Alt Akım İşlemleri: Bu işlemler fermente katı substratın tamamının ürün olduğu durum ve spesifik ürünün fermente ortamdan ayırma ve saflaştırma işlemi ile kazanıldığı durumlara göre şekillenir. Bununla birlikte, ekstraksiyon dışında KSF’unda uygulanan diğer alt akım işlemlerindeki genel prensipler SmF ile çok benzerdir.

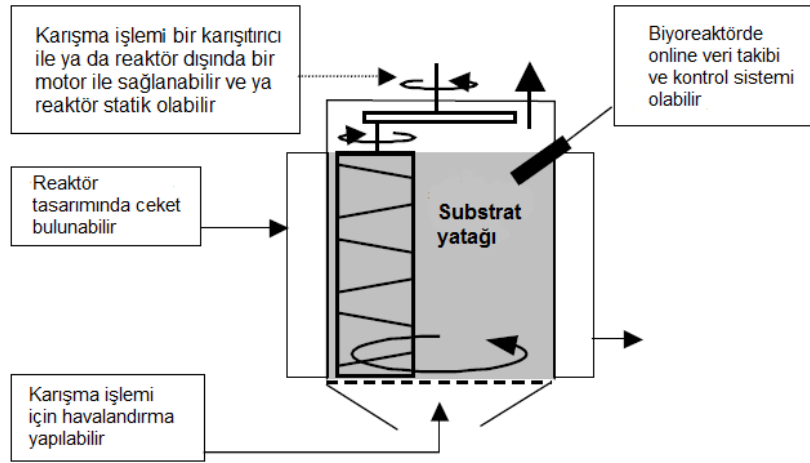
Atıkların Bertarafı: KSF, organik katı atıkların çevreye atılması yerine hammadde olarak kullanımı ile bu atıkların çevreye oluşturacağı negatif etkiyi minimize etmesiyle ön plana çıkmaktadır. Bazı durumlarda fermente katının tümü yiyecek ya da hayvan yemi olarak direk kullanılırken diğer durumlarda ise istenen ürünün saflaştırılması sonucu bir miktar katı atık ortaya çıkmaktadır (Mitchell ve ark., 2006).

2.2. Katı Substrat Fermentasyonunda Biyoreaktör Basamağı

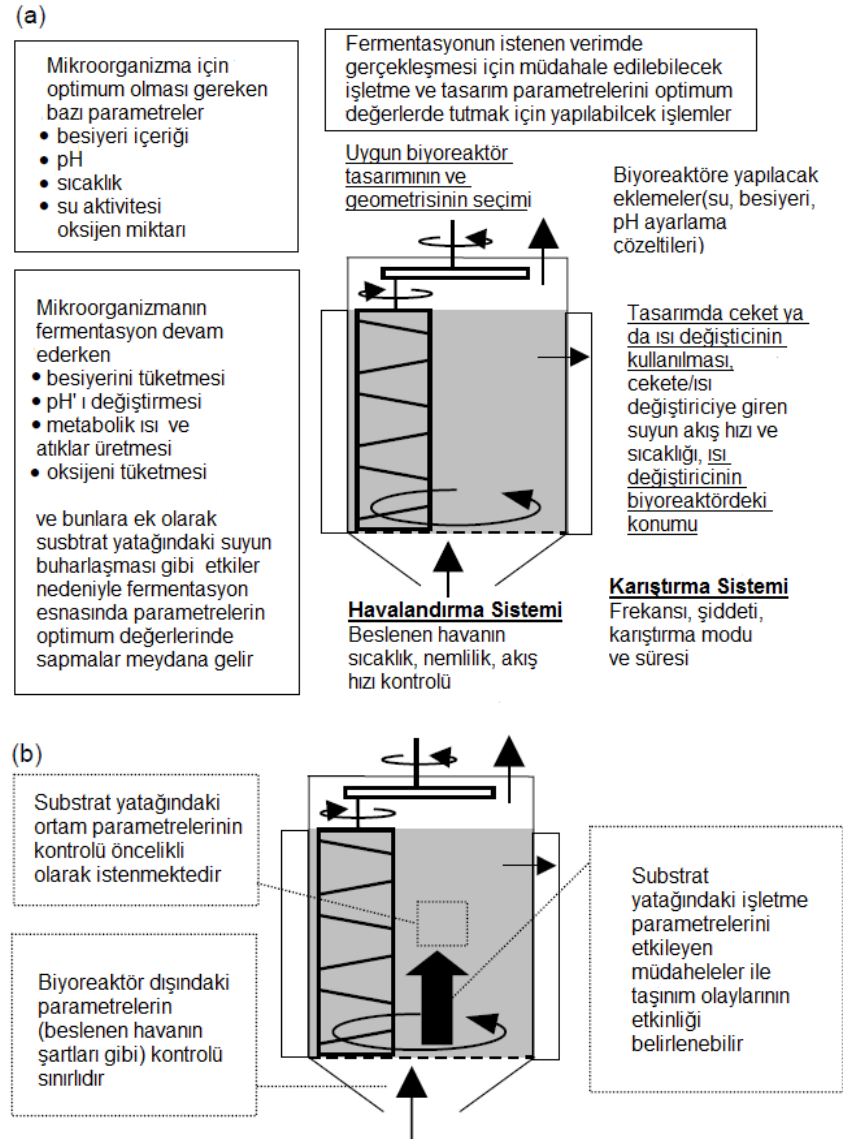
2.2.1 Katı Substrat Fermentasyonunda Biyoreaktörün Önemi

KSF proseslerinde üretimin biyoreaktöre uygulanması çok önemli bir adımdır. Bu adımda gerekli biyokimyasal reaksiyonlar reaktörün içinde gerçekleştirilerek endüstriyel uygulamalar yapılır. Biyoreaktörde genelde karıştırıcı kullanılmamasına rağmen bazı tasarımlarda mevcuttur. Karıştırma işlemi dönme ile aralıklı ve sürekli modda yapılabilir. KHF’unda sıcaklık kontrolü için havanın nemi ve sıcaklığı önemlidir. YKHF’unda ise serbest su ile temas halindeki serpantin ile sıcaklık daha kolay kontrol edilebilir. Nemli katı substratların kullanıldığı KHF’unda online veri takibi ve kontrol sistemi uygulamaları çok gelişmemiş durumda olmasına karşın YKHF’unda bu işlemler yapılabilmektedir. Klasik bir KSB’ünün genel özellikleri Şekil 2.3’de gösterilmektedir.

Substrat yatağında ortam parametrelerini optimum değerlerde tutmak kolay değildir. Mikrobiyal aktiviteler, ortam parametrelerinin optimum değerlerden sapmasıyla önemli ölçüde etkilenir. Böyle durumlarda sistemi tekrar optimum şartlara döndürmek için bazı müdahaleler gereklidir (Şekil 2.4). Bununla birlikte, biyoreaktörde fermentasyon işlemi sırasında müdahale edilebilecek “işletme parametreleri” olarak adlandırılan sınırlı sayıda parametre mevcuttur. Örneğin, karıştırma ve ya döndürme hızı, havanın akış hızı ve nemi, ısı değiştiriciye giren suyun sıcaklığı ve akış hızı değiştirilebilir; pH ayarlaması ve diğer gerekli şartlar için çözeltiler ya da bileşenler eklenebilir.



Şekil 2.3 KSB'nin genel özellikleri (Mitchell ve ark., 2006).



Şekil 2.4. KSB'ndeki parametrelerin kontrol sorunları (Mitchell ve ark., 2006). (a) Biyoreaktör tasarımında ve işletiminde yapılabilir müdahaleler. (b) Substrat yatağına yapılabilir müdahaleler.

2.2.2. Katı Substrat Biyoreaktörlerinin Fiziksel Yapısı

KSB’ünde taşınım olaylarını daha iyi anlamak için, taşınım olaylarının gerçekleştiği fiziksel kısımları ve bu kısımların düzenlenişini iyi bir şekilde anlamak önemlidir. Sistemin fiziksel yapısı hakkında detaylı açıklama yaparken bu kısım “makro boyutta” ve “mikro boyutta” olarak iki başlık halinde incelenebilir.

2.2.2.1. Makro Boyutta KSB’ünün Kısımları

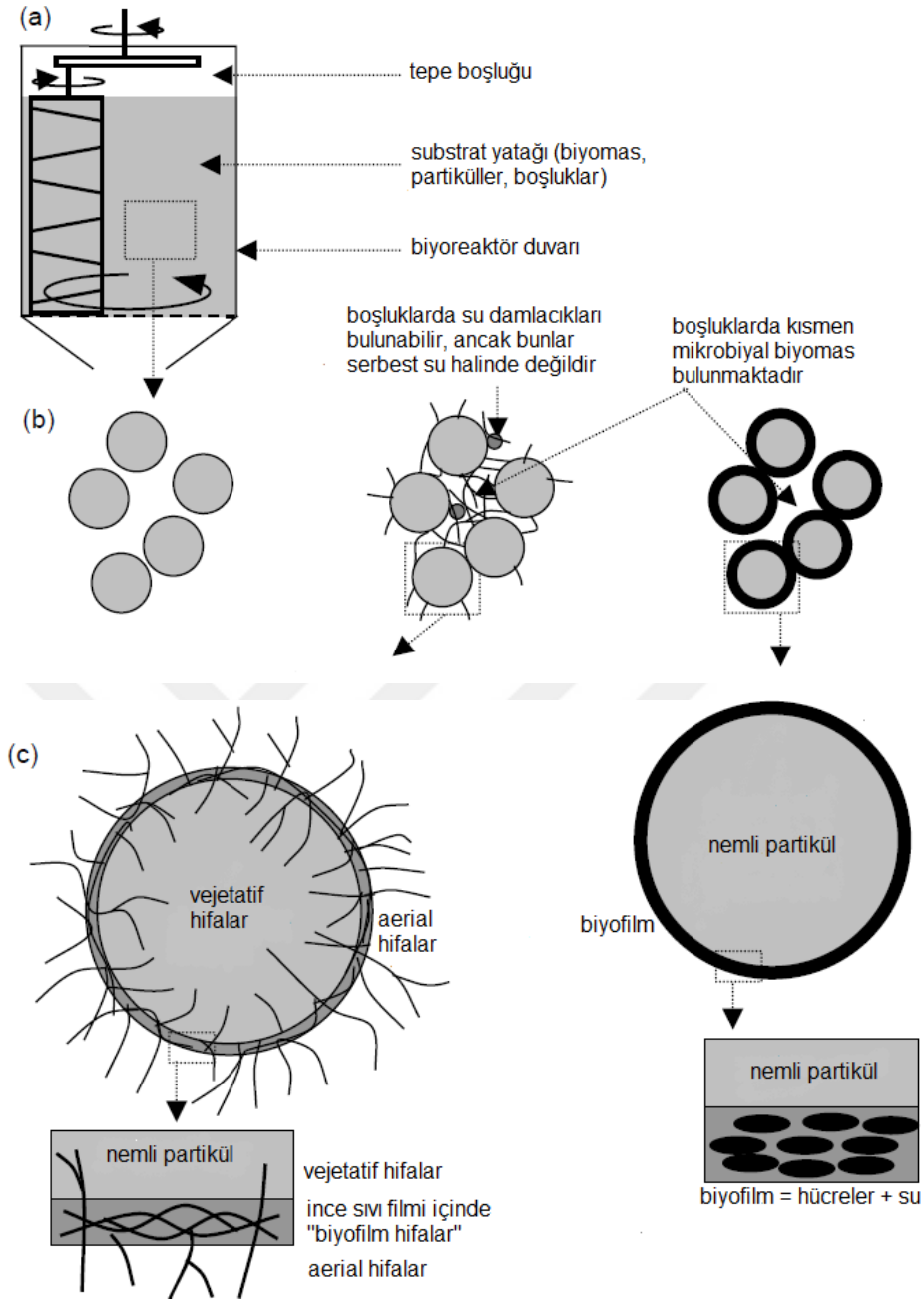
Makro boyutta bir bakış açısı ile KSB’ü Şekil 2.5’te gösterildiği gibi;

- Biyoreaktör cidarı,
- Tepe boşluğu (yanlıca gaz bulunan kısım, hacmi biyoreaktör türüne göre değişir),
- Substrat yatağı (nemli katı partiküller ve partiküller arası sürekli hava) kısımlarından oluşur.

Biyoreaktör cidarı, bazı girişler dışında (yükleme, örnekleme, boşaltma gibi) çevre ile substrat yatağını ayıran bir bariyerdir. Bunun yanında, ısı transferi içinde kısmi bir bariyerdir. Isı kondüksiyon ile çevreye transfer olabilir, bu transferin miktarı biyoreaktörün yapıldığı malzemenin termal özelliklerine bağlıdır. Diğer taraftan cidar ısıyı depo edebilir, depo edilen ısı dolayısıyla cidarın sıcaklığında bir artış gerçekleşecektir.

Tepe boşluğunun fonksiyonları ise şöyledir;

- Metabolik aktivite sonucu üretilen ya da sistemde var olan havanın substrat yatağından hava çıkışına ulaşmasını sağlar. SmF biyoreaktörlerinde köpük kontrolü için tepe boşluğu kullanılırken KHF biyoreaktörlerinde köpük oluşumu gibi bir problem söz konusu olmadığından kullanılmaz. Katı partiküllerin havalandırma ile substrat yatağında süspande olduğu (gaz-katı akışkan yatak) bazı KHF biyoreaktörlerinde, tepe boşluğu substrat yatağının hacim artışına ve partiküller ile havanın birbirinden ayrılmasına olanak sağlar,
- Karışmanın olduğu biyoreaktörlerde partiküllerin etkin bir şekilde karışmasını sağlar, Döner tambur ve karıştırılmalı tambur gibi biyoreaktörlerde havanın substrat yatağı ile tepeboşluğu arasında sirkülasyonu dolayısıyla daha etkin bir oksijen transferini sağlar.

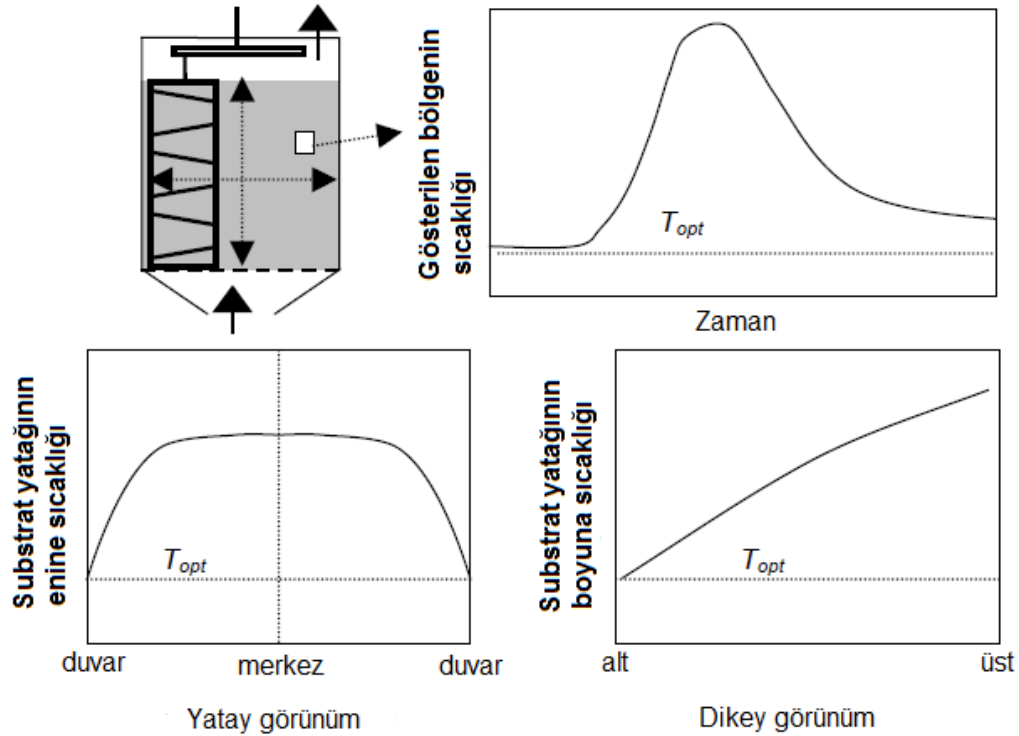


Şekil 2.5. KSB'nin kısımları. (a) Makro boyutta. (b) Mikro boyutta. inokule olmamış partiküller (soldaki), filamentöz fungus ile (ortadaki) ve bakteri ya da maya ile (sağdaki). (c) Mikro boyutta enine kesit.

2.2.2.2. Mikro Boyutta Substrat Yatağı

Substrat yatağının fiziksel görünüşü mikrobiyal aktiviteler ile birlikte değişime uğrar. Şekil 2.6'da fermentasyon sırasında olan değişimler grafikler yardımıyla gösterilmektedir. Substrat yatağı oldukça kompleks bir yapıya sahiptir. Şekil 2.5(b)'de gösterildiği gibi substrat partikülleri, partiküller arası alanlar ve mikrobiyal biyomasın bulunduğu ortamda fermentasyon ile gerçekleşen reaksiyonlar ile kompleks bir yapı oluşmaktadır.

Substrat partiküllerinin boyutu ve şekli (özellikle dolgulu kolonda büyük öneme sahip), partiküller arası boşluk hacmini ve partiküllerin birbiriyle etkileşim derecesini belirler. Substrat partikülleri nemlidir ve ince bir sıvı filme sahiptir. Mikrobiyal biyomas substrat partiküllerinin yüzeyine biyofilm şeklinde dağılır. Bu durum, tek hücreliler için ve hifa oluşturan filamentöz funguslar için Şekil 2.5(b)'de gösterilmiştir. Partiküller arası alanlarda sürekli gaz fazı vardır. Tek hücreli mikroorganizmaların gelişimi için, partiküller arası alan hakkında iyi bir tanımlama yapılması ve biyofilm partikülün bir parçası olarak kabul edilmiştir. Fungus içeren prosesler için, aerial hifalar partiküller arası alana doğru büyür ve partiküller arası sınırı oluşturur. Partikül diğer partikül üzerinde bulunan ince sıvı film ile etkileşir. Partiküller arası alan tamamen hifalar ile dolu olduğunda bile, sürekli gaz fazı bulunur. Diğer taraftan miselyum yapısı hifaların partiküller arası mevcut hacmin %34'den fazlasını kaplamasını önler (Auria ve ark., 1995). KHF sistemlerinde, küçük su damlacıkların fungusların aerial hifaları arasında bulunmasına rağmen, partiküller arasında serbest su hiç yoktur ya da çok az miktarda bulunur. YKHF sistemlerinde ise serbest su vardır ve partiküller arasında daha yüksek miktarda bulunur. Bu durumda havalandırma, reaktöre hava beslenerek ya da havayla temas edecek karıştırma ile sağlanmaktadır.



Şekil 2.6. Büyük ölçekli KSF proseslerinde, belirli bir noktadaki sıcaklığın zamanla değişim ve biyoreaktördeki sıcaklığın yatay ve dikey olarak uzunlukla değişim profilleri (Mitchell ve ark., 2006).

Partikül daha ayrıntılı seviyede incelenecek olursa,

- Substrat partikülü bir ya da daha fazla katı yapıdaki makro moleküllerden oluşmaktadır. mikroorganizmalar polimer ya da polimer yapısındaki substrat partiküllerini fermentasyon sırasında kullanırlar. Böylece fermentasyon sonunda substrat partiküllerinin orijinal yapısı ve özellikleri değişmektedir. Substratın özellikleri, substrat partikülünün kaynağına ve nasıl hazırlandığına bağlıdır. Bu özellikler, proses performansı için önemli faktörler olan mikroorganizmanın tutunmasını ve besiyerinin ulaşılabilirliğini etkiler. Basit bir örnek ile açıklanırsa, direkt kullanılan bitki sapı parçaları mikroskobik seviyede incelendiğinde hücresel yapıya sahiptir yani hücre duvarı vardır. Diğer taraftan, öğütülerek çok küçük boyutlara getirilen partiküllerin daha amorf bir yapıya sahip olması substratın kullanılabilirliğini artırabilir.
- Biyomasın partiküller üzerindeki dağılımı Şekil 2.5(c)'de gösterilmiştir. Bakteriler kullanılan durumda, biyofilm partikülün yüzey alanını kaplayarak çevre ile etkileşimini kısıtlar. Hücreler arası alandaki su ile biyofilm oluşur ve sıkı bir hamur kıvamı alır. Filementöz fungus kullanılan durumda ise partikülü aerial hifalar, “biyofilm” ve vejetatif hifalar olarak 3 kısımda tanımlayabiliriz. Vejetatif (pentetratif) hifalar, nemli katı matriksin içine penetre olmuşlardır. Aerial hifalar partikül dışına doğru büyür ve hava ile direkt temas halindedir. Biyofilm hifalar ise katı yüzeyin üzerine çıkmış ancak ince sıvı filme batık haldedir. Sıvı filmin genişliğine bağlı olarak (hifa ağının varlığında daha stabil olabilir), toplam biyomasın önemli bir miktarı biyofilm hifalarında bulunabilir (Mitchell ve ark., 2000).
- Özellikle mikroorganizmalar partikülü kullandıkça, biyofilm ve mikroorganizmaların bulunduğu partikül yüzeyi ayırt edilemez hale gelebilir. Mikrobiyal gelişme için, partikül yüzeyindeki biyomas miktarı genellikle yüzeyin üstlerinde ve altlarında en yüksek seviyededir. Bu kısımlarda substrattan alınacak besiyeri ve gaz fazından alınacak O_2 eş zamanlı olarak hızlı bir şekilde kullanılabilir.
- Spesifik kimyasal bileşenleri göz önünde bulundurursak, besiyeri, enzimler, polimerler, hidroliz ürünleri, diğer besin maddeleri ve substrat partikülündeki gaz fazı arasında bazı gardiyentler (pH gibi) oluşmaktadır. Mikroorganizmanın hızlı bir şekilde çoğaldığı log fazında O_2 gardiyenti oldukça yüksektir. O_2 konsantrasyonu

yüzey alanı yüksek olan biyofilmlerden düşük olana doğru giderek azalır, genellikle yüzey alanı 100 µm'nin altında olan biyofilmlerde ise sıfırdır (Oostra ve ark., 2001). Substrat konsantrasyon gradiyenti yatak boyunca farklı oranlarda mevcut olmakla birlikte çözünür besin maddeleri açısından bakılacak olursa substrat yüzeylerinde bu gradient oldukça düşüktür (Mitchell ve ark., 2006).

2.3. Katı Substrat Biyoreaktörleri

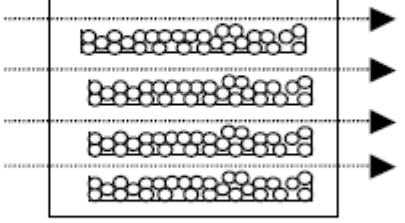
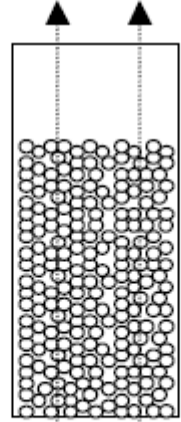
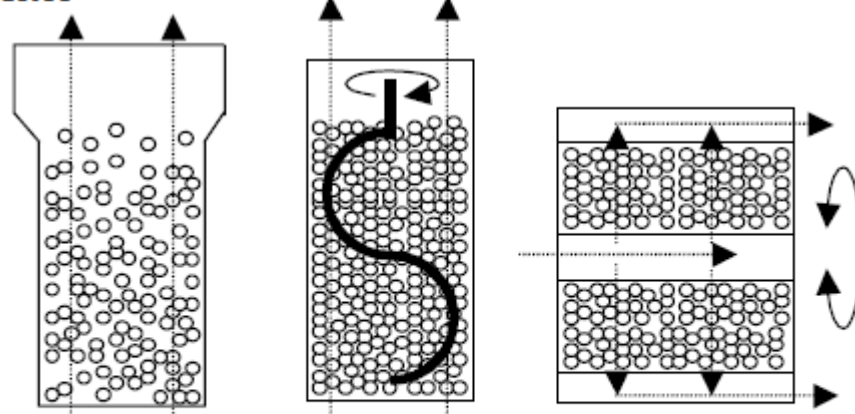
KSF proseslerinde birçok farklı biyoreaktör türü kullanılmış ve bu biyoreaktörlere araştırmacılar tarafından farklı isimler verilmiştir. Bununla birlikte, tasarımdaki ve işletimdeki benzerliklerden faydalanarak KSB'leri karışma ve havalandırmanın şekline göre dört gruba ayrılabilir (Şekil 2.7).

I.Grup Biyoreaktörler: Bu gruptaki biyoreaktörler geniş tepsilerin bulunduğu bir inkübatörden ya da odadan oluşur, tepsiler belirli aralıklar ile üst üste yerleştirilir. Bunlar genelde “tepsili biyoreaktör” olarak adlandırılır. Uygun koşullardaki hava (örneğin nemi ve sıcaklığı ayarlanmış) hazneye beslenir ve tepsilerde sirküle edilir. Karışma işlemi uygulandığı durumlarda çok nadirdir ve genelde elle yapılır. Tepsiler genelde tahta, bambu, metal ya da plastikten yapılır. Tepsilerin üst kısmı tamamen açık iken taban O₂ transfer etkinliğini artırmak için deliklidir (perforedir). Mikro-delikli plastik torbalar bu kategoriye örnek olarak verilebilir.

II.Grup Biyoreaktörler: Substrat yatağı statik ya da çok nadiren (günde bir ya da iki defa) karıştırılan ve havanın bir ekipman vasıtasıyla yüksek akış hızlarında beslendiği biyoreaktörlerdir. Bunlar genelde “dolgu yatak biyoreaktör” olarak adlandırılır. Klasik bir dolgu yatak biyoreaktör silindirik ya da dikdörtgen kesitli bir kolondan oluşur ve dikey olarak işletilir, en altta bulunan delikli plakadan substrat ve hava beslenir.

III.Grup Biyoreaktörler: Bu gruptaki biyoreaktörler, silindirik kesitli tambur şeklindedirler ve yatay olarak işletilirler. Tamburun yarısından azı substrat ile doludur ve tepe boşluğunda hava bulunur. Döner tamburlarda, tüm tambur merkezi eksen etrafında döner. Karıştırmalı tamburlarda, biyoreaktör gövdesi statik kalırken sabit shaft üzerine yerleştirilen kanatlar ya da sıyrıcılar eksen etrafında döndürülerek karışma sağlanır.

IV.Grup Biyoreaktörler: Substrat yatağına karışma işlemi uygulanır ve havanın bir ekipman vasıtasıyla yüksek akış hızlarında beslendiği biyoreaktörlerdir. Bu grup biyoreaktörler iki mekanizma ile işletilebileceği için iki alt gruba ayrılabilir, 1.gruptaki biyoreaktörler sürekli olarak karıştırılırken, 2.gruptaki biyoreaktörlerde belirli zaman aralıklarında karıştırma yapılır (Mitchell ve ark., 2006).

↓ Karışma → Havalandırma	Karışma yok (ya da çok nadir)	Sürekli ya da aralıklı karışma
Hava girişi vardır ancak bir ekipman ile havalandırma yoktur (substrat yatağında hava bulunur)	1. GRUP  Tepsi haznesi	3. GRUP  Döner tambur Karıştırmalı tambur
Hava beslemesi bir ekipman yardımıyla yapılır (hava püskürtülerek substrat yatağına dağıtılır)	2. GRUP  Dolgulu yatak	4. GRUP  Gaz-katı akışkan yatak Karıştırmalı yatak Sallanır tambur

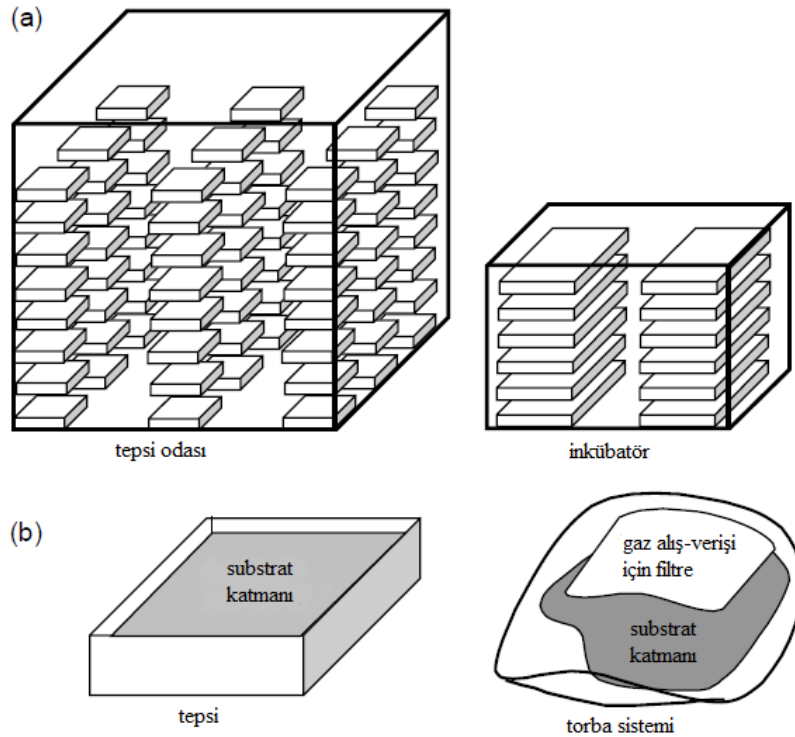
Şekil 2.7. KSB gruplarının tasarım özellikleri (Mitchell ve ark., 2000).

2.3.1. Tepsili Biyoreaktörler

Tepsili biyoreaktörler, KSF proseslerinde kullanılan en basit teknolojidir. Şekil 2.8’de gösterildiği üzere tepsili biyoreaktörün tasarımında çeşitli seçenekler mevcuttur. Tepsi odası bir inkübatör kadar küçük olabileceği gibi araştırmacının girebileceği kadar büyüklükte de olabilir. Tepsi; tahta, bambu, tel ya da plastikten yapılabilir. Tepsi yapımında elastik olmayan rijit bir materyal yerine plastik torbanın kullanımı daha caziptir. En alttaki plaka ve tepsiler delikli olabilir, soğutma için ısı değıştirici kullanılabilir. Tepsili biyoreaktörler genellikle statik olmak ile birlikte, substrat yatağının kısmen karışması için elle sallamak suretiyle günde bir ya da iki defa karıştırılır (Mitchell ve ark., 2006).

Yeni geliştirilen tepsili biyoreaktörlerde, O_2 ve CO_2 alışverişine izin verirken su alışverişine izin vermeyen böylece mikroorganizmanın solunumuna izin verirken kurumayı önleyen özel plastikler kullanılabilir. Bu sistemin geleneksel açık tepsi teknolojisine göre en büyük avantajlarından biri substrat yatağına girecek kontaminantları engellemesidir.

Bu biyoreaktörler, tempe ve koji sosu gibi fermente gıdaların üretiminde asırlardır kullanılmaktadır. Üretilen ürün çok büyük miktarlarda değil ise üretim sonrası fermente ürün ayırma işlemine gerek kalmadan satılabilir bir ürün ise ya da işçilik masrafları daha düşük ise tepsili biyoreaktörler mikrobiyal ürünler için alternatif bir proses olabilir.



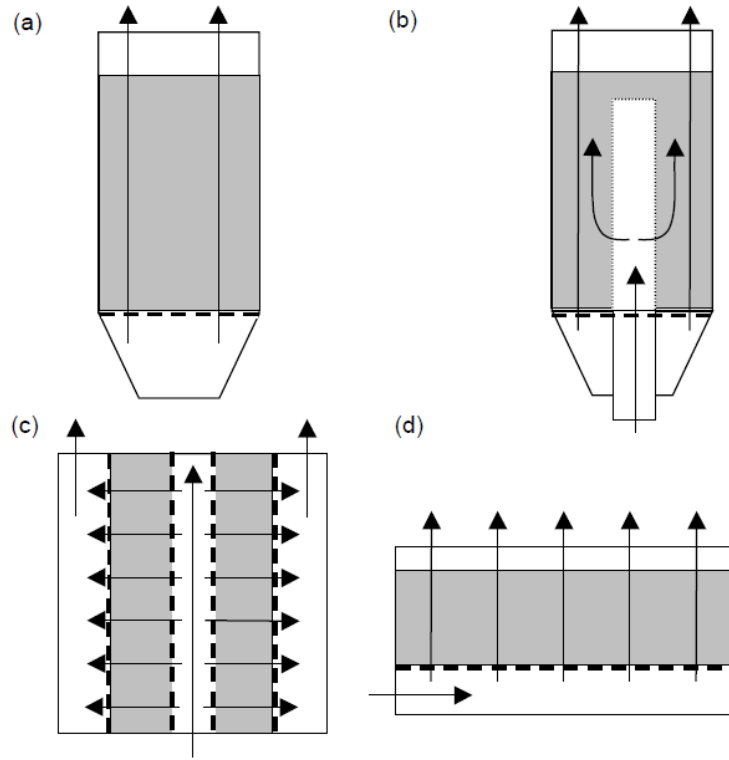
Şekil 2.8. Tepsili biyoreaktörlerin temel tasarım özellikleri ve muhtemel tasarımlar. (a) Tepsi odası ve inkübatör. (b) Farklı tepsi tasarımları (Mitchell ve ark., 2006).

2.3.2. Dolgulu Yatak Biyoreaktörler

Bu işletim modu mikrobiyal gelişmeye ya da son ürünün fiziksel yapısına zarar vermesinden dolayı substrat yatağının karıştırılması istenmeyen birçok KSF prosesi için uygundur. Karakteristik işletme parametreleri statik substrat yatağının havalandırıldığı ve birkaç saatte bir karıştırılan biyoreaktörlere uygulanabilir.

Şekil 2.9'da gösterildiği üzere dolgulu yatak biyoreaktörün tasarımında çeşitli seçenekler mevcuttur. Kolon dairesel kesitli ya da karesel kesitli olabilir. Kolon, dikey olarak ya da düz ya da açılı bir şekilde yatay olarak yerleştirilebilir. Bu seçim açık hava basıncı ve yer çekimi kuvvetlerin yönlerine bağlıdır. Yatay konumda hava herhangi bir uçtan, dikey konumda ise üstten ya da alttan beslenebilir. Üstten havalandırma yüksek hava akış hızlarında parçacıklarının akışkanlanmasını önler, ancak hava akışı yer çekimi ile aynı yönde olduğu için yatağın sıkıştırılmasına katkıda bulunacaktır. Şekil 2.9(b)'de görülen tasarım, kolonun merkezine ekstra havalandırma sağlayacak delikli bir difüzör yerleştirilerek yatak boyunca havalandırma yapılabilir. Bu sistem küçük yarıçaplı yatakta uygun iken, daha geniş çaplılarda uygun olması için daha fazla sayıda difüzör yerleştirilmelidir. Şekil 2.9(c)'de görülen radyal akışlı dolgulu yatak tasarımının diğerlerine göre üstünlüğü hava akışı yatağa daha yakın yapılır ve daha homojen bir hava dağılımı olur.

Yatak yüksekliğinin daha küçük olması ile “klasik” dolgulu yatak biyoreaktörlere benzer. Bu nedenle havalandırma aksiyal yönde yapılır ve radyal yöne difüzör vasıtasıyla aktarılır. Ancak bu difüzör yalnızca küçük çaplı biyoreaktörlerde verimli sonuçlar verir. Kolon tasarımında ceket ya da ısı transfer plakaları yer alabilir. İçerisinde ısı transfer plakaları bulunan dolgulu yatak biyoreaktörler Roussos ve ark. (1993), “Zymotis dolgulu yatak” olarak, ısı transfer plakaları bulunmayan ise “Klasik dolgulu yatak” olarak adlandırılmaktadır. Bu biyoreaktörler, biyodizel ve koji sosu gibi fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır.



Şekil 2.9. Dolgulu yatak biyoreaktörlerin temel tasarım özellikleri ve muhtemel tasarımlar. (a) Basit “klasik” dolgulu yatak tasarımı. (b) Merkezine difüzör yerleştirilmiş bir dolgulu yatak. (c) Radyal akışlı dolgulu yatak. (d) “Kısa Yataklı” bir dolgulu yatak.

2.3.3. Döner Tambur Biyoreaktörler

Yatay konumda silindirik bir şekilde olan, substrat yatağının aralıklı ya da sürekli dönme işlemi ile karıştırıldığı ve havalandırıldığı bir biyoreaktör tipidir. Gövdenin ortasına yerleştirilen bir motor ya da merdaneler vasıtasıyla döndürülen DTB’lerde, çoğu durumda gövde etrafına yerleştirilmiş tamponlar ile etkin bir karıştırma sağlanır (Mitchell ve ark., 2000). Genellikle yarı hacmini dolduracak kadar substrat bulunması ile oksijen ve karbon dioksit transfer etkinliği artırılır (Mitchell ve ark., 2006). DTB, etkin ısı ve kütle transferi, karıştırıcılı biyoreaktörlere göre daha hassas (mikroorganizmalar açısından daha uygun) bir karışma sağlaması ile statik yataklı KSB’lerine karşı üstünlük sağlar. Karıştırıcının olmaması DTB’ün tasarımını, yapımını, işletimini kolaylaştırır, basınç düşüşlerinin az olması işletim maliyetini düşürür (Hardin ve ark., 2002) ve mikroorganizmaların karıştırıcı dolayısıyla uğradıkları stresi ortadan kaldırır (Esquivel ve ark., 1999). Sıcaklık kontrolünün, KSF proseslerinin verimi için anahtar etmenlerden biri olduğu belirtilmiştir (Saucedo-Castaneda ve ark., 1992). Bu bağlamda DTB, ısı uzaklaştırma problemini aşma noktasında önemli bir tasarımıdır (Fung ve Mitchell, 1995; Stuart ve ark., 1999). DTB,

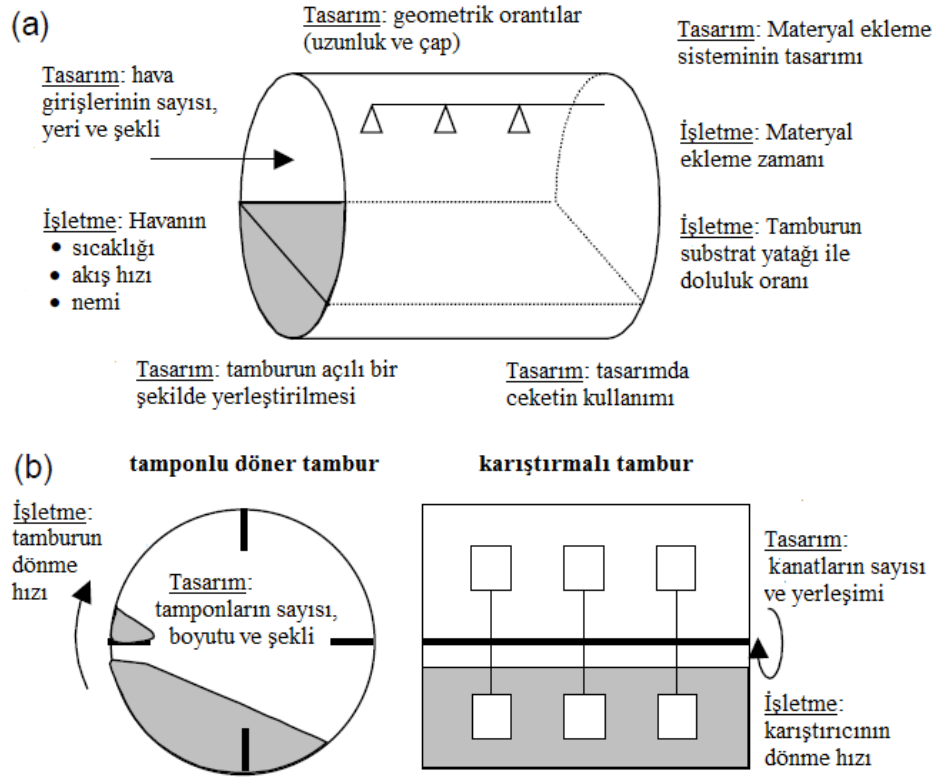
hareketsiz işletildiğinde tepsili biyoreaktör davranışı göstermekle birlikte sürekli ve aralıklı döndürme modunda işletilebilir. DTB, havalandırmanın yanında genellikle 1-2 devir/dk gibi çok düşük ya da 10-15 devir/dk gibi nispeten daha yüksek dönme hızlarında işletilir. Biyoreaktörün çok yüksek devirlerde işletilmesi ise kayma gerilimine sebep olur (Mitchell ve ark., 2000). mikroorganizmaların kayma gerilimine maruz kalmayacakları daha yüksek devir hızlarında çalışmak ve tasarımda tampon kullanmak gaz-sıvı-katı etkileşimini dolayısıyla ısı ve kütle transferini artıracaktır (Hardin ve ark., 2002). Şekil 2.10'da gösterildiği üzere döner tambur biyoreaktörlerin tasarımında çeşitli seçenekler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Biyoreaktörün çapı ve uzunluğu. Geometrik oranlar oldukça geniş bir aralıkta değişebilir,
- Biyoreaktör açılı bir şekilde yerleştirilebilir,
- Karıştırmalı tamburda, karıştırma ekipmanının şekli ve boyutu; döner tamburda tamponların sayısı, boyutu ve şekli değiştirilebilir,
- Havalandırma sisteminin giriş ve çıkış bölgelerinin tasarımı. Bu parametre hava akış modellerini etkiler,
- Isı transferi için ceket ya da serpantin kullanılması. Döner tamburda sızdırmazlığı sağlamak için su giriş ve çıkış hatları sıkıca kapatılmalıdır,
- Isı transferi ve karışmaya katkıda bulunmak için iç kısma tampon ya da sıyrıcı yerleştirilmelidir,
- Fermentasyon sırasında numune alımı ve su, besiyeri gibi bileşenlerin eklenmesi için bir giriş tasarımı,
- Sürekli işletim için substrat giriş ve çıkış girişi tasarımı.

DTB'de işletme parametreleri şu şekilde sıralanabilir:

- Katı substratın miktarı,
- Dönme hızı. Eğer aralıklı olarak yapılıyorsa, frekansı, süresi ve dönme hızı,
- Beslenen havanın akış hızı, fermentörün sıcaklığı ve nemi,
- Isı değiştirici kullanılıyorsa soğutma suyunun sıcaklığı ve akış hızı.

Bu parametrelerin çoğu fermentasyon sırasında değiştirilebilir. Her çevrim başında yapılan substrat yükleme bir işletme parametresidir. Fermentasyon ilerledikçe substratın bir kısmı kullanılacak ve CO₂'e dönüşecektir, bu yüzden yeni substrat yükleme verimli olabilir.



Şekil 2.10. Döner tambur ve kariştırmalı tambur biyoreaktörlerin tasarım ve işletme parametreleri. (a) Her iki biyoreaktör türü için tasarım ve işletme parametreleri. (b) Biyoreaktör türüne spesifik olan tasarım ve işletme parametreleri.

Substrat yükleme, “w” sembolü ile gösterilen “fraksiyonel doluluk” faktörü ile yakından ilişkilidir. Genellikle etkin kariştırmanın sağlanması için bu faktör 0,4’ün altında tutulur. Karişma etkinliğini artırmak için su ilavesi bir sprey yardımıyla püskürtülerek yapılabilir (Mitchell ve ark., 2006).

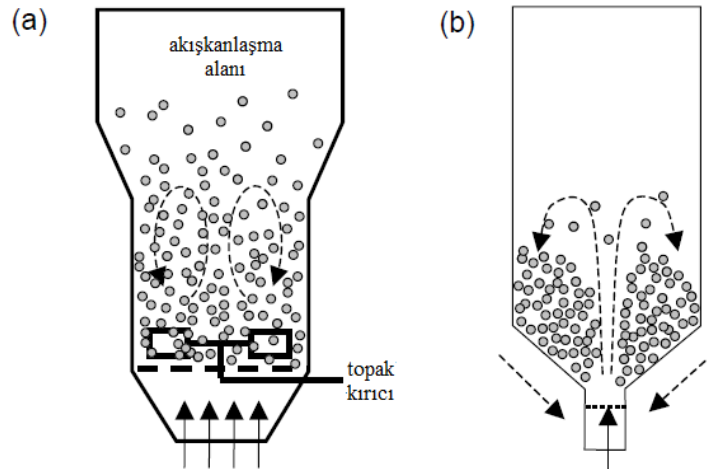
DTB’de beslenen havanın nemi belirlenirken yataktaki ısı üretim hızı, substrat hacmi, havalandırma hızı büyük öneme sahiptir. Ayrıca seçilen dönme/kariştirme hızı yataktaki ve tepe boşluğundaki metabolik ısı transferi ile O₂ transferi arasında bir denge sağlaması açısından çok önemlidir. Partiküllerin mukavemeti, substratın miktarını dolayısıyla optimum substrat yüklemesini etkileyebilir. Yumuşak partiküller üstlerindeki substratın ağırlığında ezilebilir (Mitchell ve ark., 2000).

DTB kullanıldığı durumda dönme hızı çok önemlidir. Eğer tasarımda tampon kullanılmayacaksa dönme hızı kritik hızın %10’undan fazla olursa, bu etkin bir karişma sağlar. Bununla birlikte bu durum gerekli enerji miktarını dolayısıyla maliyeti artırır. Etkin karişma için diğer seçenek ise tasarımda tampon kullanılan biyoreaktörün düşük dönme hızlarında işletilmesidir. Aralıklı dönme işlemi büyük ölçekli biyoreaktörlerde istenen faydayı sağlamayacaktır. Bu mod ile dönme başlarken ve sona ererken yatağın durağan

halde kalması engellenmiş olur. Fraksiyonel doluluk 0,4'ten büyük olmamalıdır hatta bazı durumlarda daha da küçük olması gerekebilir. Aslında fraksiyonel doluluk her çalışmada kullanılan substrat kombinasyonu ve mikroorganizmaya bağlı olarak farklı olacaktır. Her bir üretim prosesi için optimum işletme ve tasarım parametreleri deneysel olarak belirlenmelidir.

2.3.4. Gaz-katı Akışkan Yataklı Biyoreaktörler

Gaz-katı akışkan yataklar, tabanındaki delikli plakadan substrat partiküllerinin havalandırılması için yeterli bir akış hızında havanın (ya da diğer bazı gazların) beslendiği dikey bir hazneden oluşur (Şekil 2.11). Biyoreaktör tasarımında substrat yatağının akışkanlaşması için yeterli yükseklik sağlanmalıdır. Ayrıca katıların çökmesini kolaylaştırmak için genellikle yukarı doğru genişleyen bir tasarım kullanılır. Bu genişleyen alandaki akış dolayısıyla, havanın süperkritik hızı akışkanlık için gerekli minimum hızında altına düşer ve bu bölgedeki partiküller akışkanlaşamaz. Bu bölgedeki topaklanan substratın akışkanlaşması için tasarımda mekanik bir karıştırıcı kullanılabilir. Bu gruptaki biyoreaktörlerde fermentasyon sırasında gerekli eklemelerin yapılması nispeten daha kolaydır. Su, besiyeri ve pH ayarlama çözeltileri gibi bileşenler reaktörün üst kısmından spreyle substrat yatağına eklenebilir. Sistemdeki havanın sirkülasyonu, ısıtma ve nemlendirme gibi hava hazırlama maliyetlerini düşürürken, aerobik prosesler için önemli olan O_2/CO_2 oranının ayarlamasının yapılamamasına sebep olur. Bu yüzden bu sınıftaki biyoreaktörler genellikle N_2 gazının akışkanlaştırma için kullanıldığı anaerobik prosesler için daha uygundur.



Şekil 2.11. Akışkan yataklı biyoreaktör tasarımları. (a) Bütün yatağın akışkanlaştırıldığı gaz-katı akışkan yataklı biyoreaktörler. (b) Sadece yatağın merkezindeki partiküllerin püskürtme ile akışkanlaştırıldığı biyoreaktörler (Silva ve Yang, 1998).

Kullanılan substratın özellikleri, bu gruptaki biyoreaktörlerin verimi açısından çok önemlidir. Burada iki muhtemel problem mevcuttur. Birincisi, büyük ve akışkanlaşmayacak kadar katı substrat topaklanmalarının oluşmasıdır. İkincisi ise, substrat farklı partikül boyutlarında ise bazı partiküller akışkanlaşırken diğerlerinin topaklanmasıdır. Kullanılan substratın partikül boyutları homojen ve katı topaklanmalar oluşturmayacak özelliklere sahip olsa bile, fermentasyon sırasında gerçekleşen mikrobiyal aktiviteler sonucu substrat özellikleri belirgin şekilde değişebilir. Tablo 2.5'te KSB tiplerinin özellikleri görülmektedir.

Tablo 2.5. KSB tiplerinin genel özellikleri (Abdul Manan 2014).

Biyoreaktör Tipi	Özellikler/Problemler
Tepsili Biyoreaktör	• Basit tasarım ve kolay işletim • Isı birikimi • Sıcaklık ve nem gradientleri • Yatakta topaklanmalar • Büyük alan gereksinimi • İş yükünün çok olması
Dolgulu Yatak Biyoreaktör	• Sıcaklık ve gaz konsantrasyonu gradiyenti • Son ürünün saflaştırılmasındaki zorluklar • Büyüme hızının uniform olmaması • Ölçek büyütmede zorluklar • Yatakta topaklanmalar • İş yükünün çok olması
Zymotis Biyoreaktör	• Isı uzaklaştırma noktasında verimlidir • Ölçek büyütme işlemleri kolaydır, büyük ölçekte yüksek verimlilik sağlar • Isı transfer plakaları arasındaki alan çok önemlidir • Soğutma suyunun sıcaklığı yatağın durumuna göre değiştirilmelidir
Döner Tambur Biyoreaktör	• Sürekli, ya da aralıklı mod ile işletilebilir ve havalandırma yapılabilir • Isı ve kütle transferi yüksek seviyededir • Daha verimli ve uniform üretimler yapılır • Kayma gerilimi mikroorganizma üzerinde olumsuz etki yapabilir • Reaktör tasarımı ve yapımı karmaşıktır • Büyük ölçekte işletimi zordur
Akışkan Yataklı Biyoreaktör	• Etkin bir karıştırma ile nem ve sıcaklık kontrolü iyi seviyededir • Yüksek kütle ve ısı transfer hızı • Metabolik ısının etkin bir şekilde uzaklaştırılması • Mikroorganizmalara karşı yüksek kayma gerilimi • Büyük, iri taneli ve yapışkan partiküllerin akışkanlaştırılmasının zorluğu • Yüksek maliyet
Püskürtmeli Yatak Biyoreaktör	• Etkin bir karıştırma ile nem ve sıcaklık kontrolü iyi seviyededir • Yüksek kütle ve ısı transfer hızı • Akışkan yataklıya göre daha az enerji gereksinimi • Büyük, iri taneli, farklı partikül boyutlarındaki ve yapışkan partiküllerin etkin bir şekilde akışkanlaştırılması

2.4. Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerde üretilip kimyasal reaksiyonların hızını artıran ve reaksiyondan değişmeden çıkan biyokatalizörlerdir. RNA'nın hidrolizini katalizleyen RNA yapısındaki ribozimler dışında bütün enzimler protein yapısındadır ve oldukça spesifik bir karakterde olup substrat ya da substratlara özgüdürler (Palmer ve Bonner, 2007). Bugün, canlı sistemlerdeki bütün kimyasal reaksiyonların hızlı ve seçici bir şekilde katalizlenmesi için enzimlerin gerekli olduğu bilinmektedir (Buchholz ve ark., 2012).

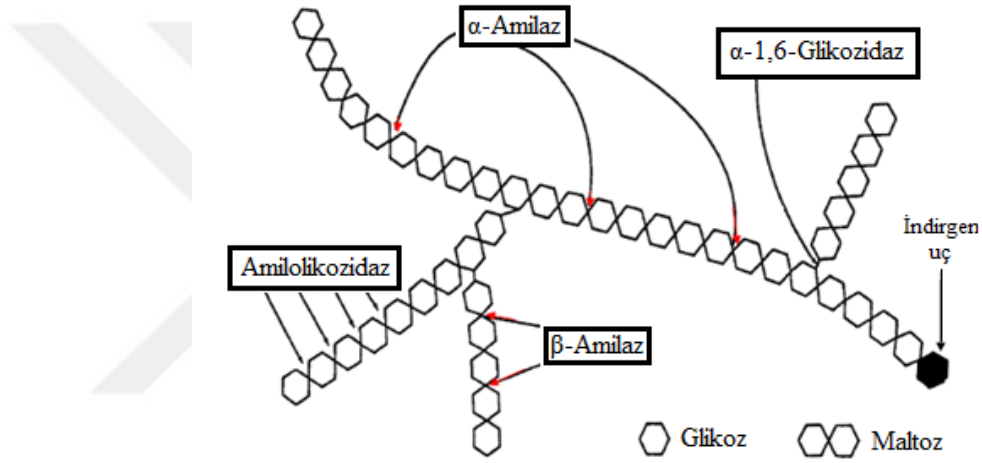
19. yüzyıla kadar, sütün mayalanması ve şekerin alkole fermentasyonu gibi proseslerin canlı bir organizma ile gerçekleştiği kabul edilmekteydi. Şekeri hidroliz eden aktif ajan 1833'de kısmi olarak izole edilmiş ve diastaz (şimdi amilaz olarak bilinen) ismi verilmiştir. Kısa bir süre sonra proteinleri sindiren madde mide sıvısından ekstrakte edilmiş ve pepsin adı verilmiştir. Bu aktif preparatlar genel olarak "fermentler" diye adlandırılmıştır. Louis Pasteur ve diğerlerinin fermentler canlı organizmalar içermeli görüşüne karşın Justus von Liebig bu fermentlerin canlı hücrelerden elde edilen cansız mataryeller olabileceğini belirtmiştir. Bu tartışma devam ederken, ferment ifadesi yavaş yavaş ilk kez Wilhelm Kühne tarafından önerilen ve Yunanca'dan gelen enzim ifadesine yerini bırakmıştır. James Sumner, 1926'da fasulye ekstraktından üreaz enzimini kristalize etmiştir. Bu gelişme sonrasında birçok enzim saflaştırılmış ve kristalize edilmiştir. Bu şekilde enzimlerin yapısı ve özellikleri ayrıntılı bir şekilde belirlenebilmiştir. Enzimler günümüzde hala birçok akademik araştırmaya konu olmaktadır. Spesifik bölgeleri sayesinde hastanelerde tedaviye yardımcı olarak kullanılmakta ve bu yönde araştırmalar devam etmektedir. Diğer yandan endüstride geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimlerin kullanıldığı alanlar genişlemekte ve pazar payı hızla büyümektedir.

Endüstriyel enzimlerin kullanıldığı başlıca endüstriler; deterjan (%37), tekstil (%12), nişasta (%11), fırıncılık (%8) ve hayvan yemi (%6) şeklindedir. Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Proteaz grubundaki enzimler kullanımda ilk sırayı alırken, karbonhidrazlar ikinci sırada yer almaktadır. Tüm dünyada enzim pazarının yaklaşık % 25'ini oluşturan amilazlar günümüzde büyük öneme sahip enzimler arasındadır (Burçak, 2015; Deb, 2013).

2.4.1. α -Amilaz Enzimi ve Kullanım Alanları

α -Amilaz (E.C.3.2.1.1) polisakkaritlerdeki α -1-4 glikozidik bağlarını kırarak glikoz, maltoz gibi daha küçük şeker gruplarının açığa çıkmasını sağlar (Gupta ve ark., 2003;

Kandra, 2003; Rajagopalan ve Krishnan, 2008). Bir endo amilaz olan α -amilaz etki mekanizması Şekil 2.12’de gösterildiği gibi polisakkaritlerdeki α -1-4 bağıını gelişi güzel kırar (Selen, 2006). Amilopektin ve glikojenin dallanma noktalarındaki α -1-6 bağlarına etki etmezler (Windish ve Mhatre, 1965). Birçok mikroorganizma tarafından sentezlenen α -amilazın etki mekanizması ve özellikleri enzimin kaynağına göre farklıdır. α -Amilaz tarafından amilozun hidroliziyle maltotrioz ve maltoz oluşur. Bunu takip eden ikinci reaksiyon, küçük bir molekül olan maltotriozun hidrolizidir. Amilopektinin hidrolizi ise bir dizi dallı α -limit dekstrinlere ilave olarak glikoz ve maltoz gibi ürünler verir (Fogarty, 1983).



Şekil 2.12. α -Amilazın etki mekanizması.

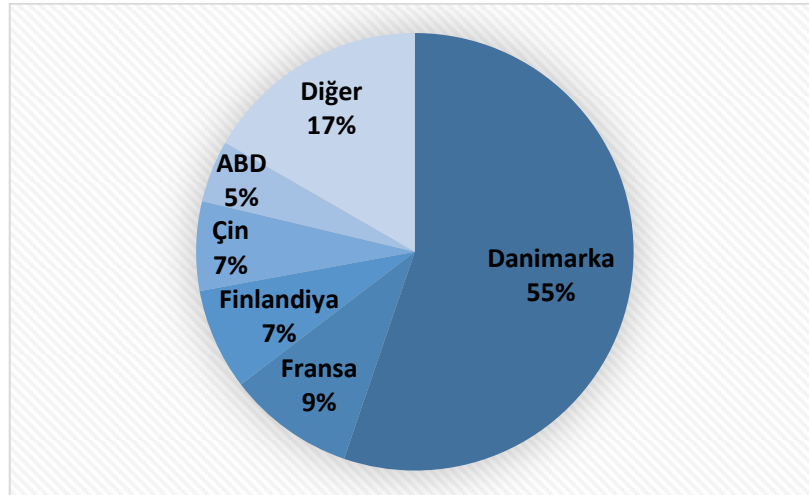
Amilazlar en önemli endüstriyel enzimler arasındadır ve biyoteknoloji için büyük öneme sahiptir. α -Amilazların dünya çapında en yaygın kullanımı nişasta sıvılaştırma endüstrisinde glikoz ve fruktoz şurubu üretiminde kullanımıdır (Nielsen ve Borchert, 2000). Amilazlar deterjan endüstrisinde en çok kullanılan ikinci enzimdir ve üretilen sıvı deterjanların %90’ında bulunmaktadır (Gupta ve ark., 2003; Mitidieri ve ark., 2006; Hmidet ve ark., 2009). Biyoetanol üretiminde ucuzluğu ve bolluğu sayesinde en çok kullanılan substrat nişastadır ve üretim öncesi nişastanın monosakkaritlere dönüştürülmesinde α -amilazlar kullanılmaktadır (de Moraes ve ark., 1999; Toksoy Öner, 2006). Amilazlar, gıda endüstrisinde fırıncılık, sindirime yardımcı gıda imalatı, kek üretimi ve meyve suyunun berraklaştırılması alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Couto ve Sanromán, 2006). Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde amilazları, kuşe kâğıt nişastanın modifikasyonunda yani düşük viskozite ve yüksek molekül ağırlıklı nişastanın

üretimi için kullanılmaktadır (Van Der Maarel ve ark., 2002; Gupta ve ark., 2003). Bunun yanı sıra elektrolit, izolator ve yarı-iletken kapasitörlü biyosensörlerde de amilaz enzimi kullanılmaktadır (Menzel ve ark., 1998).

2.4.2. Türkiye’de Enzim Üretimi

TÜİK verilerine göre ülkemizde “Başka yerde sınıflandırılmamış enzimler ve diğer organik bileşikler” ürün grubunda 2014 yılında 4.877.805 kg üretim yapılmıştır. Bu üretimlerden enzim üretiminin büyük kısmını 2.304.256 kg ile rennin enzimi ve konsantreleri oluşturmaktadır (TÜİK, 2014). Bunun dışında diğer enzimleri üreten kuruluşlar bulunmakla birlikte ORBA A.Ş. bu alanda en kapsamlı ve tecrübeli işletme konumundadır. 1977 yılında Türkiye’de ilk defa ekmek üretimine yönelik α -amilaz enzimi üreterek iş hayatına başlayan kuruluş gıda, yem ve alkol sanayisine yönelik enzim formülasyonları üretmektedir (Kiper, 2013). Bunun dışında yem katkı maddesi için enzim karışımları üreten kuruluşlar mevcuttur. Diğer yandan Türkiye’nin enzim ithalat hacmi 2013 yılında 106,7 milyon \$’dır. Bu ithalatta en büyük pay sahibi olan ülkeler; Danimarka (59 milyon \$), Fransa (10 milyon \$), Finlandiya (8 milyon \$), Çin (7 milyon \$) ve ABD (4,9 milyon \$)’dir (Özbağ, 2014). Türkiye’de henüz tam olarak yaygınlaşmamış olan enzim sektörü yatırımcıların bu alana yönelmesiyle gelişmektedir. Yatırımcıların bu alana yönelmesi için Türkiye Cumhuriyeti tarafından teşvikler mevcuttur. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı (BSTB)’nin hazırladığı Ulusal Biyoteknoloji Ar-Ge ve Yenilik Strateji Belgesi ve Eylem Planı’nda, “sanayide yoğun olarak kullanılan ve yurtdışından ithal edilen enzimler yerine yerli enzimlerin” üretimini desteklemek için Ekonomi Bakanlığı tarafından öncelik ve teşvik verileceği belirtilmektedir (BSTB, 2014).

Tablo 2.6. Türkiye’nin enzim ithalat hacminin ülkelere göre dağılımı (Özbağ, 2014).



2.5. Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım (DT), deney koşullarını etkileyecek değişkenlerin seviyelerinin sistematik olarak değiştirilmesiyle ölçülen yanıtta değişimin gözlenerek yorum yapılması amacıyla kullanılan istatistiksel yöntemdir. Klasik metod ile değişkenlerin optimum değerleri, bir değişkenin değerini değiştirirken diğerlerini sabit tutarak bulunmaktadır. Değişken sayısının fazla olduğu durumlarda çok fazla deney gerekmekte bu yüzden zaman ve sarf kaybına neden olmaktadır. Diğer yandan deneysel tasarımda istatistiksel teknikler kullanılarak öncelikle az sayıda seviye ile tüm değişkenler sistematik bir şekilde aynı anda değiştirilir ve etkili değişkenler bulunur. Daha sonra etkili olmayan değişkenler elimine edilerek sadece etkili değişkenler, farklı seviyelerde ve tekniklerle yine aynı anda değiştirilerek incelenir ve optimizasyon işlemi yapılmış olur. Bu yüzden klasik metoda göre deney sayısı daha aza indirilerek daha kısa zamanda sonuca ulaşılmakta ve maliyet de azalmaktadır. Bu avantajlara ek olarak deneysel tasarımın en önemli avantajlarından biri de klasik metodlarda sadece değişkenlerin bireysel etkileri incelenirken deneysel tasarımda ise hem bireysel etkileri hem de değişkenlerin birbirleri ile etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca etkisi incelenmektedir. Deneysel tasarım genel olarak tarama, optimizasyon ve modelleme olarak 3 aşamadan oluşur (Koç, 2014).

1. Tarama: Deneysel çalışmalarda sonuç üzerinde önemli olan değişkenleri belirlemek amacıyla kullanılır. Bu tasarımlar ile aşı miktarı, substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, fermentasyon süresi, karıştırma/havalandırma hızı gibi değişkenlerin etkilediği bir fermentasyonun prosesinde değişkenlerden hangilerinin üretim verimi için önemli olduğu, hangilerinin elenmesi ve hangilerinin daha ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerektiği belirlenir.

2. Optimizasyon: Tarama tasarımları kullanılarak belirlenen önemli değişkenlerin optimum değerlerini bulmak için kullanılır.

3. Modelleme: Tarama ve optimizasyon tasarımları ile değişkenlerin sonuç üzerine etkisi matematiksel bir model ile ifade edilir. Bu sayede deneysel olarak bulunan sonuçlar ile birlikte model denklemi kullanılarak tahmini sonuçlar da bulunmuş olur. Doğrulama deneyleri ile önerilen sonucun gerçekte hangi oranda gerçekleştiği kontrol edilir.

Endüstriyel fermentasyon proseslerinde, fermentasyon koşullarının fermentasyon süreci, üretim verimi ve proses ekonomisi üzerine etkisi önemli bir rol oynamaktadır. Bu

nedenle üretim ortamını ve şartlarını optimize etmek fermentasyon prosesinde maksimum verimin ve minimum maliyetin sağlanması açısından büyük önem taşımaktadır (Schmidt, 2005). Mikrobiyal üretim proseslerinin optimizasyonunda, son ürünün ve biyokütle üretiminin istenen şekilde gerçekleştiği şartları belirlemek için, ortam bileşenlerinin yanında reaktör işletme parametrelerinin araştırılması gerekmektedir (Stanbury ve ark., 2007; İşler, 2012).

Proses optimizasyonu için kapalı uçlu bir tasarım olan faktöriyel tasarımda birbirinden bağımsız olarak değişkenlerin düzeyi değiştirilip, değişkenlerin sonuç üzerine etkileri ve onların etkileşimleri etkin bir şekilde değerlendirilmektedir. Faktöriyel tasarım kullanılarak yapılmış birçok deneysel tasarım yöntemi bulunmakla birlikte (Rajendhran ve ark., 2002), Plackett-Burman tasarımı fermentasyon prosesinde etkin değişkenlerin taranmasında yaygın bir şekilde kullanılan metodlardan biridir (Tripathi ve ark., 2008).

2.5.1. Plackett-Burman Tasarımı

R.L. Plackett ve J.P. Burman tarafından 1946 yılında yayınlanan bir makalede tanımlanan Plackett-Burman (PB) tasarımı çok sayıda parametrenin az sayıda deney ile taranmasına olanak vermesi açısından zaman ve maliyet bakımından çok ekonomik bir tasarımdır. Bu tasarım faktörlerin ikili etkileşimleri hakkında bilgi vermemesine karşın faktörlerin birbirleri ile etkileşimlerini ihmal ederek her birinin sonuç değişkeni üzerine etkisini koymasından dolayı faktörlerin taranmasında kullanışlı bir metottur. Fiziksel ya da endüstriyel bir araştırma içinde meydana gelebilecek sorunlara karşı sürecin etkinliğini belirlemek amacıyla tasarlanan yöntem, birinci derecede modele dayanmaktadır. Var olan nicel değişkenlerin yapılan deneylerle sonuca katkıları ölçülerek süreç etkinliklerinin artırılması hedeflenmektedir. Taranan faktör sayısına göre (n) faktör, (n+1) deney ile taranabilmektedir. Bu tasarımların en küçüğünde 11 faktör ve her bir faktörün bir alt bir de üst limiti olmak üzere iki düzeyinin kullanıldığı tasarımda 12 deney ile denenilen düzeylerden elde edilen veriler ışığında her bir faktör için deney tasarımında denenmeyen farklı düzeylerde önerilebilmekte ayrıca sonuca katkısı olan kritik faktör ve düzeylerde belirlenebilmektedir. PB tasarımının en büyük avantajı, deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir. Yapılan doğrulama deneyleri kabul edilebilir güven aralıkları ile sistemin kendi içindeki tutarlılığını ve güvenilirliğini de test etmektedir (Plackett ve Burman, 1946).

2.6. Döner Tambur Biyoreaktör ile Yapılan Çalışmalar

Günümüzde endüstriyel kullanımı yaygın olan enzimler için en önemli konu üretim maliyetinin ve buna bağlı olarak da prosese girdi maliyetinin düşürülmesidir. α -Amilazın da aralarında bulunduğu proteaz, lipaz, ksilanaz, selüloz, pektinaz gibi endüstriyel enzimlerin üretimi üzerine sürdürülen araştırmalar, uygun bir mikroorganizmanın bulunması ve aynı zamanda ucuz ve bol bulunabilen substratlardan oluşan bir üretim ortamının oluşturulması yönünde devam etmektedir.

Endüstriyel biyoteknolojik ürünlerin üretiminde şeker kamışı kütlesi, soya fasulyesi kütlesi, buğday kepeği, mısır kepeği, mısır proteini, üzüm posası, muz kabuğu, limon kabuğu gibi tarımsal ve endüstriyel artıkların KSF teknolojisinde ucuz substratlar olarak kullanımının araştırılmasına yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur (Abate ve ark., 1999; Baysal ve ark., 2003; Huerta-Ochoa ve ark., 2003; Osma ve ark., 2007; Oberoi ve ark., 2012; Ruiz ve ark., 2012).

KSF, derin fermentasyona göre ekonomik yönden birçok avantaja sahip olması sebebiyle özellikle son yıllarda mikrobiyal ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu üretimlerin endüstriyel ölçeklere uygulanması için KSB teknolojisi üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. KSB tasarımlarından ısı birikimi ve oksijen transferi kısıtlaması problemlerini aşma noktasında DTB tasarımı büyük öneme sahiptir. DTB ile daha verimli üretimlerin gerçekleştirilmesi için farklı ölçeklerde yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

Jin ve ark. (2010), arsenopiritin *Acidithiobacillus ferrooxidans* ile biyoliçi üzerine yapılan çalışmada, seramik mikro hava difüzör kullanılan yeni 18 litre hacmindeki DTB tasarımı ile gaz-sıvı kütle transferi hızının arttığı, diğer yandan endüstride en yaygın kullanılan biyoreaktör tiplerinden biri olan karıştırmalı biyoreaktör ile güç tüketimi açısından kıyaslandığında 0.0407 Watt/litre ile daha ekonomik olduğu ve $0.0927 \text{ s}^{-1} k_{La}$ değeri ile yüksek oksijen transfer etkinliğine sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmada biyoreaktörün yatırım ve işletme maliyetleri açısından önemli bir parametre olan doluluk oranı %75 olmasına rağmen etkin oksijen transferi ve verimli bir üretim için uygun koşullar sağlanmıştır. Aynı çalışma grubu daha sonra 96 litre ve 703 litre hacimlerindeki DTB'ler ile ölçek büyütme yapmışlardır. Karıştırmalı biyoreaktöre göre 1/3 oranında daha az güç tüketimi ve yüksek oksijen transfer etkinliği ile varolan avantajlarının büyük ölçeklerde de sürdürülebildiğini ifade etmişlerdir (Liu ve ark., 2013).

Yeni DTB'ün oksijen transfer hızı klasik DTB'ün hızına göre çok yüksek olmakla birlikte karıştırmalı biyoreaktörün oksijen transfer hızına çok yakın ve güç tüketimi açısından çok daha ekonomiktir (Bouquet ve Morin, 2006; Jin ve ark., 2010). Klasik DTB'ler laboratuvar ve pilot ölçekli çalışmalar için uygun görülüp endüstriyel ölçekte kütle ve ısı transferi kısıtlamalarından dolayı kullanılamazken, işletme ve reaktör tasarım parametreleri açısından yeni DTB tipi, ölçek büyütme çalışmaları ve endüstriyel uygulamalar için uygun görülmektedir (Zhang ve ark., 2012).

Biyoreaktörlerde hava kabarcık boyutlarının hayvan hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar, büyük çaplardaki hava kabarcıklarının hücrenin kayma gerilimi etkisinde kalarak zarar göreceğini ve bu nedenle mikron boyuttaki kabarcıkların hücrelere daha az zarar vereceğini göstermiştir (Kunas ve Papoutsakis, 1990; Wu, 1995; Meier ve ark., 1999).

Contreas ve ark. (1999), 60, 120 500 ve 1000 μm por çaplarındaki mikro hava difüzörlerinin etkinliği incelenmiş, por çapı küçüldükçe k_La değerinin artması oksijen transferi etkinliğinin arttığını ve düşük kayma gerilimlerinin sağlandığını belirtmiştir. Michaels ve ark. (1996), kabarcıkların kümeleşmesi ve dağılma problemlerinin düşük devirli dönme hızlarında sisteme verilen mikro kabarcıklar sayesinde minimize edilebileceğini göstermişlerdir.

Nehring ve ark. (2004), hücre kültürü biyoreaktöründe, 100-500 μm çapında kabarcıklar üreten seramik mikro hava difüzörü ile 800-3000 μm çapında kabarcıklar üreten paslanmaz çelik hava difüzörünü karşılaştırmıştır. Hücre yoğunluğu, kültivasyon süresi ve k_La 'nın takip edildiği çalışmalarda seramik mikro hava difüzörünün 3 kat daha yüksek oksijen transferi yaptığı, por çapının küçülmesi ile hücrelerin daha az zarar görmesi ile daha uzun kultivasyon sürelerinde kültür yapılabildiği ifade edilmiştir.

Czermark ve ark. (2005), 2 ve 5 litre hacmindeki 2 biyoreaktörde hayvan hücrelerinin kültürü üzerine seramik, paslanmaz çelik ve silikon mikro hava difüzörlerinin etkisini incelediği çalışmada, seramik mikro hava difüzörünün 50 st^{-1} k_La değeri ile paslanmaz çelik difüzörün 10 st^{-1} k_La değerine göre oksijen transferi etkinliğini önemli derecede artırdığı, diğer yandan tasarım kolaylığı ve büyük ölçeklerde kullanım parametreleri açısından diğer hava difüzörlerine göre belirgin bir üstünlüğe sahip olduğu belirtilmiştir.

Marsh ve ark. (1998), buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı 200 litrelik döner tambur biyoreaktör tasarımı tapmon kullanımının *Rhizopus oligosporus*'un gelişimi üzerine etkisini incelemişlerdir. 0,5 rpm dönme hızında gerçekleştirilen fermentasyonda tamponsuz biyoreaktörde 5,1 mmol/dk.kg substrat oksijen alım hızına ulaşılırken 4 adet tampon bulunan tambur biyoreaktörde 6.9 mmol/dk.kg substrat değerine ulaşarak oksijen alım hızı artırılmıştır. Diğer yandan fermentasyonun tamponsuz biyoreaktörde susbtrat yatağı 46,8°C'ye kadar çıkarken 4 adet tampon bulunan tambur biyoreaktörde 44,1°C'ye kadar ulaşarak yatak ile çevre arasında daha etkin bir ısı transferinin olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada 17 cm genişliğindeki 4 adet tampon ile 5 cm genişliğindeki 12 adet tamponun etkinliğini karşılaştırılmıştır. Oksijen alım hızı bakımından çok az bir fark görülürken 4 adet tampon kullanımı ısı uzaklaştırımı açısından daha iyi sonuçlar vermiştir.

Stuart (1996), 200 litrelik tamponsuz bir döner tambur biyoreaktörde buğday kepeği üzerinde *Aspergillus oryzae* kültürü yapmış ve biyomas üretimini incelemişlerdir. Dönme hızı 9 rpm olan şartlardaki O₂ tüketim performansının 2 rpm olan şartlara göre önemli derecede yüksek olduğunu göstermiştir.

Schutyser ve ark. (2003), buğday kepeğinin katı substrat olarak kullanıldığı 28 litrelik döner tambur biyoreaktör tasarımı *Aspergillus oryzae* gelişimi üzerine tamponların etkisini daha iyi anlamak için yaptığı çalışmada tamponsuz tambur ile genişliği tamburun yarıçapının %66'sı olan 4 adet tampon kullanılan tamburu karşılaştırmıştır. Tamponlu tambur tasarımının diğerine göre etkin bir karıştırma sağladığını göstermiştir.

Grajales ve ark. (2012), 30 cm çapındaki tambur biyoreaktörde *Metarhizium anisopliae*'un kültüre edilerek biyomas üretiminin incelendiği çalışmada, 5 cm genişliğindeki 4 adet tampon varlığında biyomas üretimi verimli bir şekilde gerçekleştirmiştir. Görüldüğü üzere biyoreaktörün çapı küçüldükçe tasarımda boyutlarına da bağlı olarak 4 adet tamponun kullanılması olumlu sonuçlar vermiştir.

Han ve ark.(1999), tempe üretimi için tepsili biyoreaktör ve DTB'ü kullanarak karşılaştırma yaptıkları çalışmada DTB'ünün etkin bir havalandırma, sıcaklık kontrolü ve mikroorganizmalar için daha hassas karışma özellikleriyle son ürünlerdeki pH artışı 1,5 birim düşürülmüştür. Diğer yandan statik şartlarda ± 10 °C olan sıcaklık kontrolü DTB ile ± 1 °C

hassasiyette gerçekleştirilmiş ve bu sayede fermente bir gıda olan tempenin yüksek verimlilikle üretiminde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Dhillon ve ark. (2013), 12 litrelik döner tambur biyoreaktörde *A. niger* ile elma posasından sitrik asit üretimi üzerine yaptıkları çalışmada 1 vvm havalandırma hızı ve 12 saat aralıkla 1 saat boyunca 2 rpm dönme hızında 120 saat süren inkübasyon sonucunda 220.6 ± 13.9 g/kg substrat ile yüksek verimlilikle üretim yapmışlardır.

Rocha ve ark. (2013), 0,5 litrelik döner tambur biyoreaktörde eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon çalışmaları yapmışlar %86 pirinç artığı, %12 peyniraltı suyu ve %2 CaCl_2 kullanılan üretim ortamında *A. niger* ile 40 U/g substrat aktivite ile selüloz enzimi üretilmiştir. Daha sonra *Saccharomyces cerevisiae* ile 4.5 pH ve 35 °C şartlarında 12 saat süren inkübasyon sonunda 11.7 g/L verimle etanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Dominguez ve ark. (2001), döner tambur biyoreaktörde havalandırma hızının lignolitik enzim üretimine etkisini inceledikleri çalışmada havalandırma hızı 0,5 vvm ve 1 vvm olan iki fermentasyon çalışması sonucunda, havalandırma hızındaki artış ile mangan peroksidaz aktivitesinin 570 U/l'den 1350 U/l'ye diğer yandan lignin peroksidazın aktivitesinin 144 U/l'den 364 U/l'ye çıkmasıyla enzim üretiminin yaklaşık 3 kat artırıldığını ifade etmiştir.

Kalogeris ve ark. (1999), 10 litrelik döner tambur biyoreaktörde *Thermoascus aurantiacus* ile endoglukanaz, β -glukozidaz ve ksilanaz üretimi çalışmaları yapılmış, sıcaklık ve nem içeriği kontrolünün daha etkin yapılması ile diğer KSB'lerine göre daha yüksek verimlerde enzim üretimi gerçekleştirildiği belirtilmiştir.

Kalogeris ve ark. (2003), 10 litrelik döner tambur biyoreaktörde *Thermoascus aurantiacus* ile aralıklı karıştırma modunda endoglukanaz, sellobiyohidrolaz, β -glukozidaz, selüloz, ksilanaz ve β -ksilozidaz üretimi için nem içeriği, sıcaklık ve havalandırma hızının optimizasyonu incelenmiştir. Aralıklı karıştırma modu ile nem içeriği %80, havalandırma hızı 15 l/dk.kg substrat ve 49 °C şartlarında g substrat başına 1709 U endoglukanaz, 4 U/g sellobiyohidrolaz, 79 U β -glukozidaz, 5.5 U FPA, 4490 U ksilanaz ve 45 U β -ksilozidaz aktiviteleri ile yüksek verimlerde enzim üretiminin gerçekleştirildiğini belirtmiştir.

Rodríguez-Jasso ve ark. (2013), 50 ve 500 mililitrelik döner tambur biyoreaktörlerde *Aspergillus niger* PSH ve *Mucor* sp. 3P suşları ile 3 farklı algal substrat

(işlem görmemiş, hidroliz edilmiş ve mikrodalga ile muamele edilmiş) kullanarak fungal fukoidenaz üretimi üzerine dönme hızı ve nem içeriği parametrelerini incelemişlerdir. İlk aşamada daha küçük ölçekte 500 ml'lik reaktörlerde statik ve 10 rpm dönme hızı şartları incelenmiş ve dönme işlemi ile enzim aktivitesinin (3.82 U/l) artırıldığı gözlenmiştir. İkinci aşamada 10 katlık bir ölçek büyütme ile 500 ml'lik reaktörlerde nem içeriği ve dönme hızı şartları incelenmiş ve hidroliz edilmiş algal substrat kullanılarak *Mucor sp. 3P* suşu ile 10 rpm dönme hızı ve %80 nem içeriği şartlarında en yüksek aktivite (9.62 U/l) elde edilerek enzim üretimi yaklaşık 3 kat artırılmıştır.

Sukumprasertsri ve ark. (2013), 200 litrelik döner tambur biyoreaktörde *A. oryzae* ile soya fasulyesi kullanarak amilaz ve proteaz üretimi üzerine bulanık mantık ve geleneksel kontrol sistemini incelemişlerdir. Üretim için en önemli parametreler olan sıcaklık ve nem içeriğini kontrolü için havalandırma hızı, dönme hızı ve su ilavesi kontrol edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda bulanık mantık kontrol sistemi ile geleneksel kontrol sistemi karşılaştırıldığında amilaz aktivitesi 80.000 U/g'dan 110.000 U/g'a, proteaz aktivitesi ise 4000 U/g'dan 9000 U/g'a ulaştığı belirtilmiştir.

Ortiz ve ark. (2015), 15 litrelik döner tambur biyoreaktörde *Trichoderma reesei* strain 938 ile selüloz üretimini optimize etmişlerdir. İlk aşamada ortam bileşenleri ve çevresel koşullardan enzim üretimi üzerine etkin olanlar PB tasarımı ile belirlenmiş ve belirlenen parametreler optimize edilmiştir. Önemli olan parametrelerin optimizasyonu ile pH 6,4-6,6 ve nem içeriği %74-94 şartlarında endoglukanaz aktivitesinin 1,28'den 6,7 U/g.gün aktivitesine, toplam selüloz aktivitesinde (FPA) 0,2'den 3,8 U/g.gün aktivitesine ulaşarak enzim üretiminin yaklaşık 5 kat artırıldığı ifade edilmiştir.

Literatürde KSF teknolojisiyle döner tambur biyoreaktör kullanılarak enzim ve diğer mikrobiyal ürünlerin üretimi üzerine yapılmış fermentasyon çalışmalarından bazıları Tablo 2.6'da verilmiştir.

Bu çalışmada mikro hava difüzörü bulunan yeni DTB tasarımı ile tarımsal bir atık olan mısır kepeği kullanılarak düşük maliyetli α -amilaz üretimi ve üretim üzerine reaktör işletme parametrelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Tablo 2.7. Döner tambur biyoreaktör ile yapılan fermentasyon çalışmaları.

Mikroorganizma	Substrat	Ürünler	Referans
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 567	Elma posası	Sitrik Asit	Dhillon ve ark., 2013
<i>Aspergillus oryzae</i>	Buğday	Biyomas	Schutyser ve ark., 2004
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Buğday kepeği	Endoglukanaz, β -glukozidaz ve ksilanaz	Kalogeris ve ark., 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Prinç kabuğu ve kepeği karışımı	Selülaz	Rocha ve ark., 2013
<i>Aspergillus oryzae</i>	Soya fasulyesi	Amilaz ve Proteaz	Monton ve ark., 2013
<i>Mucor sp. 3P</i>	Algal biyomas	Fungal fukoidenaz	Rodríguez-Jasso ve ark., 2013
<i>Trichoderma reesei</i> strain 938	Buğday kepeği	Selülaz	Ortiz ve ark., 2015

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Mikroorganizma

Deneylerde NRRL kültür koleksiyonundan temin edilmiş termostabil α -amilaz üreticisi olarak *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 kullanılmıştır. Tablo 3.1’de verilen kültür saklama ortamında +4°C’ de depolanmaktadır.

3.2. Substrat

Çalışmanın bütün aşamalarında substrat olarak daha önce erlenlerde yapılan çalışmalarda yüksek α -amilaz üretimi gerçekleştirilen mısır kepeği içeren enzim üretim ortamı kullanılmıştır (Tanyıldızı, 2005). Elazığ Yem A.Ş.’den satın alınan mısır kepeği Biyomühendislik Bölümü stoklarında kuru ve serin ortamda depolanmıştır. Mısır kepeğinin, metabolik enerji (kül, protein, asit hidrolizli yağ, selüloz analizleri) ve amino asit içeriği analizleri TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır. Analiz sonuçları Ek 1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Bacillus Amyloliquefaciens* için kullanılan besiyerleri.

	Kültür Saklama Besiyeri (g/l) (Yıldız,1993)	Hücre Geliştirme Besiyeri (g/l) (Shu,1997)
Glikoz	4.0	10.0
Bakto pepton		1
Yeast Ekstrakt	0.5	1
MgSO ₄ .7H ₂ O		0.5
NaCl	2.0	2.0
CaCl ₂ .2H ₂ O		0.1
KH ₂ PO ₄		1
Et peptonu	8.0	
Kazein	2.0	
Agar-agar	18.0	
MnSO ₄ .7H ₂ O		0.01
FeSO ₄ . 7H ₂ O		0.01
(NH ₄) ₂ .SO ₄		5.0
Başlangıç	7.0	7.0

3.3. Aşı Hazırlama

Standart aşı ortamı olarak Tablo 3.1’de verilen geliştirme besiyeri kullanılmıştır. Kültür saklama ortamından steril bir öze yardımıyla alınan bakteri kültürü, içerisinde 50 ml bakteri geliştirme besiyeri bulunan 250 ml’lik erlenlere aşılanmış, 37°C’de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip çalkalamalı su banyosunda 18 saat süre ile inkübe edilmiş ve daha sonra steril koşullarda biyoreaktöre PB tasarımında belirlenen miktarlarda aşılanmıştır.

3.4. Enzim Üretim Ortamının Hazırlanışı

Mısır kepeği, laboratuvar ölçekli öğütücüde (Waring, IC-10B-25000 rpm) öğütülmüş, 30 meshlik elekten geçirilmiş ve nem içeriği %7,64 olarak belirlendikten sonra kapalı kaplarda muhafaza edilmiştir. Biyoreaktörde üretim çalışmalarında daha önce erlenlerde yapılan çalışmalarda belirlenen maksimum enzim üretimi sağlayan besiyeri (25 g/l mısır kepeği, 10 g/l yeast ekstrakt ve 1 g/l KH_2PO_4) kullanılmıştır.

3.5. Erlenlerde Enzim Üretiminin İncelenmesi

Biyoreaktörde üretim çalışmalarına geçmeden önce erlenlerde yapılan deneyler ile enzim aktivitesinin zamanla değişimini ve farklı konsantrasyonlarda köpük kırıcının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla daha önce tanımlanan besiyeri içeriği (25 g/l mısır kepeği, 10 g/l yeast ekstrakt ve 1 g/l KH_2PO_4) kullanılarak 33°C ve 150 rpm şartlarında enzim üretim çalışması yapılmıştır. Köpük kırıcının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek üzere %10'luk (v/v) köpük kırıcıdan üretim ortamında %2, %6 ve %10 oranlarında olacak şekilde ekleme yapılmıştır.

3.6. Döner Tambur Biyoreaktörün Tasarımı

α -Amilaz enziminin üretimi için kullanılan katı hal biyoreaktörünün tasarımı tarafımızdan yapılmış ve Pikolab Mühendislik Ltd. Şti.'ne yaptırılmıştır. Tasarımda "Jin ve ark., 2010" tarafından tanımlanan parametreler esas alınıp ve gerekli düzenlemeler ile Şekil 3.1(a)'da görülen DTB ve biyoreaktörden çıkan buharın yoğunlaştırılarak sıvı kaybının önlenmesi için bir yoğunlaştırucu tasarlanmıştır. Biyoreaktör, merkezinde bulunan bir şaft yardımıyla döndürülmektedir. Dönme hızı bir elektronik kontrol devresi ile ayarlanmakta ve elektrik motoruna bağlı şaft yardımıyla sağlanmaktadır. Biyoreaktör içerisindeki ekipmanların montajının yapılması aşamasında Şekil 3.1(b)'de görülen reaktör kapağı tamamen açılacak şekilde yapılmıştır. Şekil 3.1(c)'de görüldüğü üzere reaktör kapağında sabit bulunan yüzeye mikro hava difüzörü, ısı değiştiricisi, termoçift bağlantısı ile çözünmüş oksijen probu ve pH metre probu bağlantıları yapılmaktadır. Biyoreaktör kendi eksenini etrafında dönerken otoklav şartlarına dayanıklı sızdırmaz rulmanlar sayesinde sabit merkez hareketsiz kalmaktadır. Karıştırma etkinliğini artırmak üzere tambur iç cidarına bağlı 4 adet tampon (kaldırıcı) yerleştirilmiştir. Reaktör yapım malzemesi olarak 316L paslanmaz çelik kullanılmıştır. Şekil 3.2'de görülen 200 mm uzunluğundaki seramik mikro

hava difüzörü (Refractron, 6-15-25 μm gözenekli) kapağın tabanına 5 cm yukarı noktadan yerleştirilmiştir. DTB’de enzim üretim düzeneği Şekil 3.3’te görülmektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.1. Döner tambur biyoreaktör düzeneği. (a), döner tambur biyoreaktör; (b), biyoreaktörün kapağı; (c) probalar ve difüzör monte edilmiş reaktör kapağının iç kısmı.



Şekil 3.2. Seramik mikro hava difüzörü.

3.7. Döner Tambur Biyoreaktörün Sterilizasyonu

Enzim üretim ortamı içerisinde olan DTB'e seramik mikro hava difüzörü, pH ve DO probu ve gaz çıkış hattı monte edildikten sonra otoklavda (Lab Companion, ST-65G) 121°C'de 30 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

3.8. Biyoreaktörde α -Amilaz Üretiminin Deneysel Tasarım ile İncelenmesi

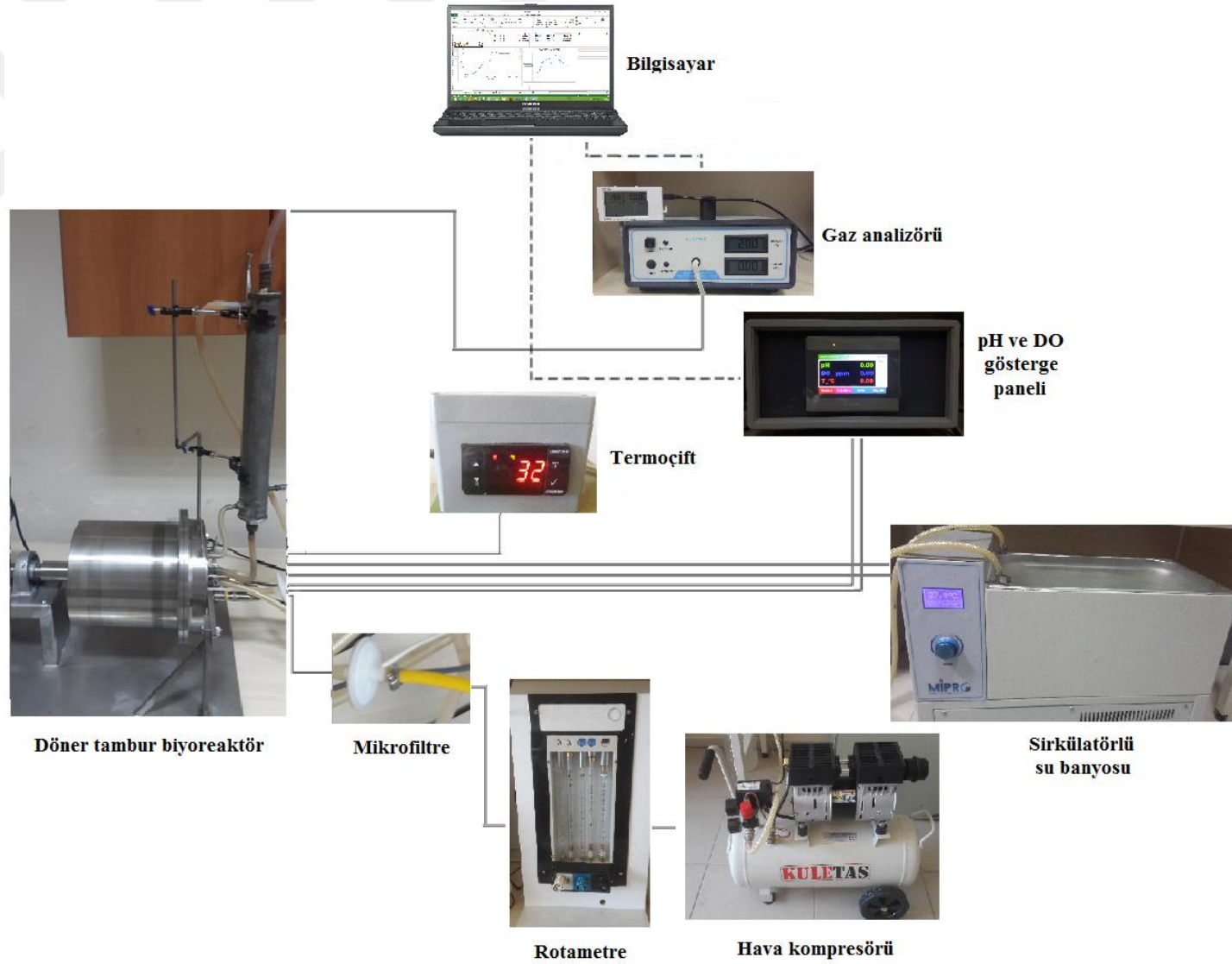
DTB'de enzim üretimi üzerine etkisinin olduğu düşünülen değişkenler ve incelenen aralıklar Tablo 3.2'de verilmiştir. Placket-Burman deneysel tasarım yöntemine göre planlanmıştır. Bağımsız değişkenlerin tasarlanan biyoreaktörlerde α -amilaz üretimi üzerine etkin olan değişkenlerin belirlenmesi amacıyla Placket-Burman Deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla tasarımda incelenecek bağımsız değişken aralıkları belirlenirken erlenmayerlerde yapılan ön deneyler ve literatürdeki DTB çalışmaları dikkate alınmıştır. PB tasarımına göre hazırlanan deneysel tasarım Tablo 3.3'te verilmiştir. Deneysel tasarımın ve sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla Desing Expert (Stat-Ease Inc. Versiyon 8.0) yazılımından faydalanılmıştır. Program yardımıyla elde edilen sonuçlar %95 güven aralığında etkin olan değişkenler belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin sonuç değişkeni olarak seçilen enzim verimliliği arasında lineer model ifade program yardımıyla elde edilmiştir. Fermentasyon sırasında köpük oluşumu gözlemlendiğinde Simetikon esaslı bir köpük kırıcı kullanılmıştır. İnkubasyon süresi enzim aktivitesinin maksimum olduğu zaman belirleninceye kadar sürdürülmüştür.

Tablo 3.2. PB tasarımında incelen bağımsız değişkenlerin deneysel aralıkları.

Seviyeler	Devir Sayısı (rpm)	Havalandırma Hızı (l/dk)	Doluluk Oranı (%)	Difüzörün Gözenek Çapı(μ m)	Tampon Boyutu (cm)	Aşı Miktarı (%)	Reaktör Sıcaklığı (°C)
-1	3	0,2	40	6	1	2	30
1	18	2	80	25	4	4	37

Tablo 3.3. PB tasarımı tarafından önerilen deneysel tasarım.

Deneysel No	Devir Sayısı (rpm)	Havalandırma Hızı (l/dk)	Dummy	Doluluk Oranı (%)	Difüzörün Gözenek Çapı (µm)	Dummy	Tampon Boyutu (cm)	Aşı Miktarı (%)	Dummy	Ortam Sıcaklığı (°C)	Dummy
1	18	2	-1	80	25	1	1	2	-1	37	-1
2	3	2	1	40	25	1	4	2	-1	30	1
3	18	0.2	1	80	6	1	4	4	-1	30	-1
4	3	2	-1	80	25	-1	4	4	1	30	-1
5	3	0.2	1	40	25	1	1	4	1	37	-1
6	3	0.2	-1	80	6	1	4	2	1	37	1
7	18	0.2	-1	40	25	-1	4	4	-1	37	1
8	18	2	-1	40	6	1	1	4	1	30	1
9	18	2	1	40	6	-1	4	2	1	37	-1
10	3	2	1	80	6	-1	1	4	-1	37	1
11	18	0.2	1	80	25	-1	1	2	1	30	1
12	3	0.2	-1	40	6	-1	1	2	-1	30	-1



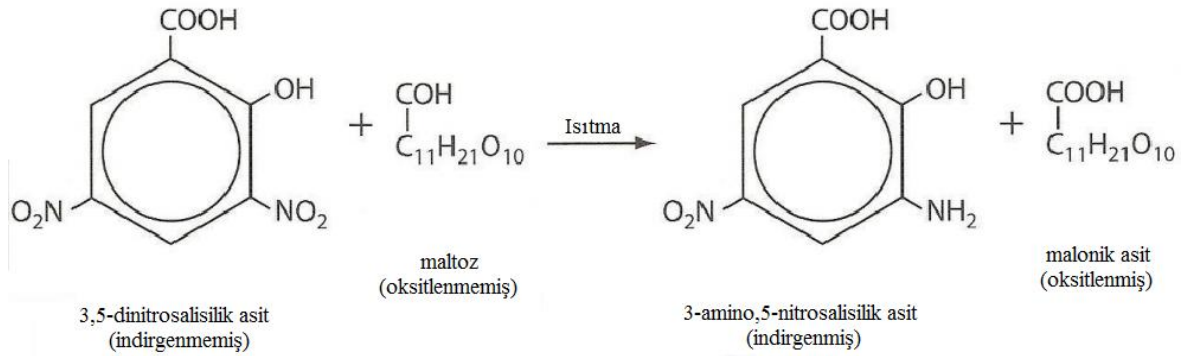
Şekil 3.3. Döner tambur biyoreaktörde enzim üretim düzeneği.

3.9. Enzim Ekstraktının Elde Edilmesi

Alınan numuneler soğutmalı santrifüjde (Nüve) +4°C’de 4100 devir/dk dönme hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. İşlem sonrasında elde edilen supernatant ham enzim ekstraktı olarak aktivite tayininde kullanılmıştır.

3.10. α-Amilaz Aktivitesinin Tayini

α-Amilaz aktivitesinin tayini için DNS metodu olarak bilinen indirgen şeker tayini yapan metot (Bernfeld, 1955) kullanılmıştır. Bu yöntemde, α-amilazın nişastayı hidroliz etmesi sonuca açığa çıkan maltoz ile 3,5-dinitrosalisilik asit ısıtma işlemi sonucunda oksidasyon-reduksiyon tepkimesine girerler. Bu tepkime sonucu 3,5-dinitrosalisilik asit indirgenerek 3-amino,5-nitrosalisilik aside dönüşürken, maltozda oksitlenerek malonik aside dönüşür (Şekil 3.4). Bunun sonucunda sarı renkli DNS çözeltisi maltoz konsantrasyonuna bağlı olarak turuncu ya da kırmızıya döner. Aktivite örneklerin OD540 nm deki absorbanslarına ve maltoz standart eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesi, deney koşullarında 1 µmol nişastayı 3 dakikada maltoza parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.4. Maltoz ve DNS arasındaki oksidasyon-reduksiyon tepkimesi

3.11. Spesifik Verimlilik Hesabı

Belirli zaman aralıklarında alınan numunelerdeki α-amilaz aktivitesi (U) ölçülmüş birim zaman (st) ve birim katı substrat (g) miktarına oranlanarak verimlilik hesabı yapılmıştır.

$$Q(U/g \text{ mısır kepeği. st}) = \frac{\text{Aktivite (U)}}{\text{Katı substrat (g).Zaman (st)}}$$

3.12. On-line Gaz Analizi

Fermantasyon sırasında oluşan gazların on-line analizi gaz analizörü (Quantek, Model 902P) yardımıyla yapılmıştır. Biyoreaktörden çıkan gaz bir rotametre vasıtasıyla debisi ayarlandıktan sonra nem tutucu bir aparattan geçirilerek O₂ ve CO₂ oranları, veriler on-line olarak cihaz ekranından ve HOBOWare® yazılımı ile bilgisayardan takip edilmiş ve kaydedilmiştir.



Şekil 3.5. Gaz analizörü.

3.13. pH ve DO Analizi

Fermantasyon ortamının pH ölçümlerinin yapılması amacıyla pH probu (Hamilton, Easyferm Plus Arc 120) kullanılmıştır. Kültür ortamının içerisindeki çözülmüş oksijen miktarının tayini için çözülmüş oksijen probu (Hamilton, Visiform Arc 120) kullanılmıştır. Problar biyoreaktöre yerleştirilerek, veriler on-line olarak gösterge pano ekranından ve HDM® yazılımı ile bilgisayardan takip edilmiş ve kaydedilmiştir.



(a)



(b)



(c)

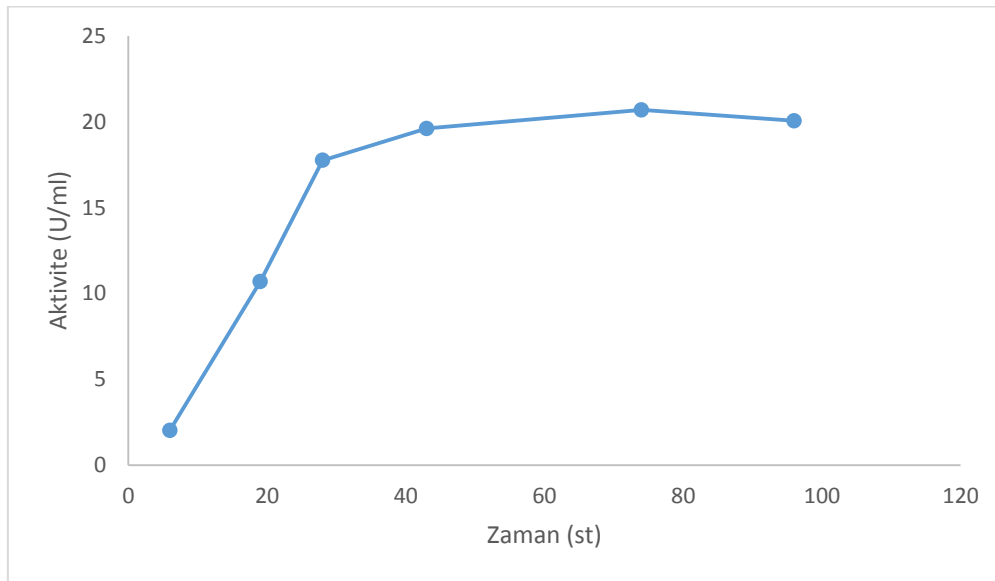
Şekil 3.6. pH ve DO ölçüm sistemi. (a), pH ve DO gösterge paneli; (b), pH probu; (c), DO probu.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

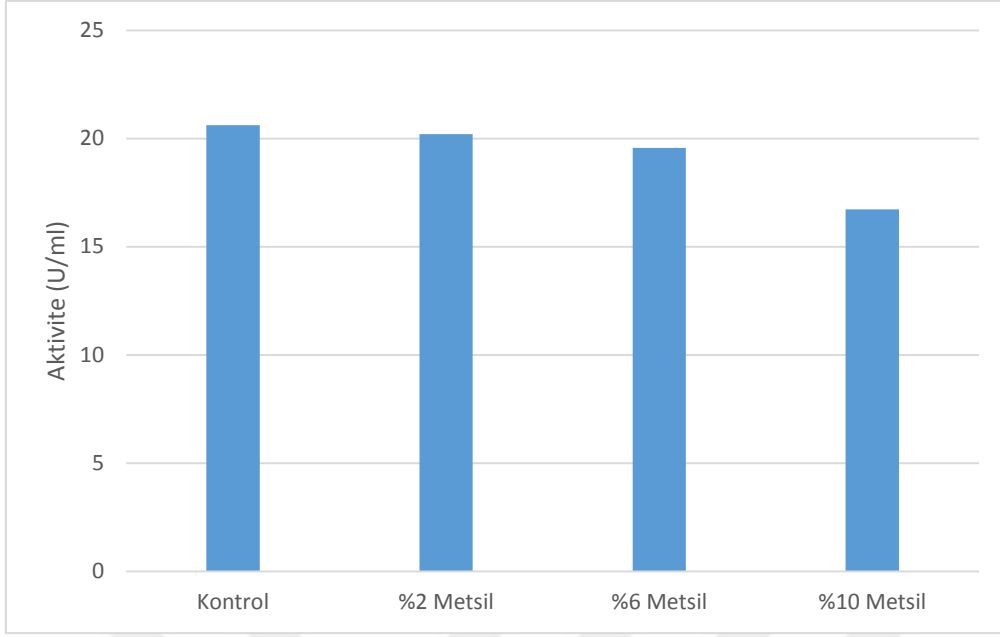
Son yıllarda özellikle gelişmekte olan ülkelerde katı substratlar kullanılarak enzim üretimi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizin başlıca geçim kaynaklarından olan tarımsal faaliyetler sonucu büyük miktarda oluşan tarımsal atıkların bu teknoloji sayesinde değerli mikrobiyal ürünlere dönüştürülmesi biyoteknoloji endüstrisi için araştırılmaya değer bir alan olarak ortaya çıkmaktadır. Mısır işleme endüstrisinin yan ürünü olan mısır kepeğinde hem bol miktarda açığa çıkması hemde %18'e varan oranlarda yüksek nişasta içeriği sebebiyle α -amilaz üretimi için değerlendirilebilecek önemli bir tarımsal atıktır. Ucuz ve bol bulunan bu tarımsal atığın kullanılmasıyla katma değeri yüksek olan ve büyük kısmı ithal edilen α -amilaz enziminin üretimi laboratuvar ölçekli biyoreaktörde incelenmiştir. DTB'de yapılan çalışmalarda yüksek karıştırma ve oksijen transfer etkinliği sağlanan şartlarda yüksek aktivite ve spesifik verimlilik değerlerine ulaşıldığı görülmüştür. Aktivite ve verimlilik değerlerindeki değişimlerin karıştırma ve oksijen transfer etkinliği ile ilişkili olduğu görülmüştür.

4.1. Erlenlerde Enzim Üretimi Deney Sonuçları

Erlenlerde yapılan enzim üretimi çalışması sonucunda Şekil 4.1'de görüldüğü gibi enzim üretimi 40.saate kadar artmış ve sonrasında önemli bir artış göstermemiştir. En yüksek enzim aktivitesi 20,68 U/ml değerine 74.saatte ulaşılmıştır. Metsil ticari isimli köpük kırıcının farklı dozlarda enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek üzere yapılan deneyin sonuçları Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Erlenlerde yapılan çalışmada α -amilaz aktivitesinin zamanla değişimi (33°C, 150 rpm).



Şekil 4.2. Farklı miktarlarda eklenen köpek kırıcının α -amilaz aktivitesine etkisi.

Döner tambur biyoreaktörde yapılan çalışmalarda mikrobiyal aktivitenin yoğun olduğu zaman dilimlerinde köpük oluşumu gözlenmiştir. Bu oluşumun önüne geçmek için kullanılan. Şekil 4.2’de görüldüğü üzere %2 ve %6 köpük kırıcı kullanılan şartlarda aktivite neredeyse hiç değişmezken %10’luk köpük kırıcı ilavesi aktivite bir miktar düşmüştür.

4.2. PB Tasarımı Deney Sonuçları

Döner tambur biyoreaktörde katı substrat olarak mısır kepeğinin kullanıldığı ortamda α -amilaz verimi üzerine etkin değişkenler PB tasarımı kullanılarak incelenmiştir. Tablo 4.1’de önerilen 12 deney noktasında yapılan deneyler sonucunda elde edilen maksimum spesifik verimlilik ve enzim aktivite değerleri görülmektedir. PB tasarımının en küçük modelinde 11 değişken 12 deney ile iki noktalı belirlenmiş aralıkta incelenebilmektedir. Bu amaçla incelenen 7 biyoreaktör işletme değişkeni (devir sayısı, havalandırma hızı, doluluk oranı, gözenek çapı, tampon boyutu, aşı miktarı ve ortam sıcaklığı) yanında 4 adet boş (dummy) değişken tanımlanmıştır. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi havalandırma hızının ve devir sayısının düşük miktarlarında yapılan deneylerde enzim aktivitesi belirlenememiştir. En yüksek aktivite değerleri bu iki değişkenin üst noktaları yanında tampon boyutunun üst noktasında yapılan deneyde elde edilmiştir. Yapılan deneyler, PB tasarımı sonucunda etkin olan değişkenler (havalandırma hızı, devir sayısı ve tampon boyutu) dikkate alınarak yorumlanmıştır.

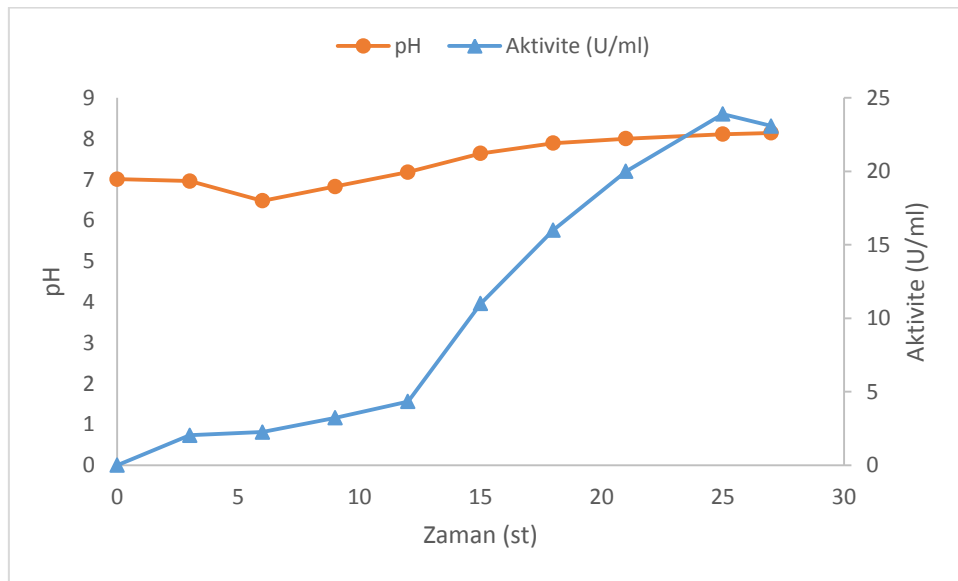
Tablo 4.1. PB tasarımı tarafından önerilen deneyler ve bağımlı değişkenlerin sonuçları.

Deney No	Devir Sayısı (rpm)	Havalandırma Hızı (l/dk)	Dummy	Doluluk Oranı (%)	Difüzörün Gözenek Çapı (µm)	Dummy	Tampon Boyutu (cm)	Aşı Miktarı (%)	Dummy	Ortam Sıcaklığı (°C)	Dummy	α-Amilaz aktivitesi (U/ml)	Spesifik Verimlilik (U/g misir kepeği.st)
1	18	2	-1	80	25	1	1	2	-1	37	-1	23,90	35.92
2	3	2	1	40	25	1	4	2	-1	30	1	21,53	33.09
3	18	0.2	1	80	6	1	4	4	-1	30	-1	20,38	30.64
4	3	2	-1	80	25	-1	4	4	1	30	-1	19,59	30,00
5	3	0.2	1	40	25	1	1	4	1	37	-1	0	0
6	3	0.2	-1	80	6	1	4	2	1	37	1	0	0
7	18	0.2	-1	40	25	-1	4	4	-1	37	1	17,60	24.53
8	18	2	-1	40	6	1	1	4	1	30	1	23,32	36.97
9	18	2	1	40	6	-1	4	2	1	37	-1	14,51	49.17
10	3	2	1	80	6	-1	1	4	-1	37	1	16,81	20.59
11	18	0.2	1	80	25	-1	1	2	1	30	1	13,80	7.77
12	3	0.2	-1	40	6	-1	1	2	-1	30	-1	0	0

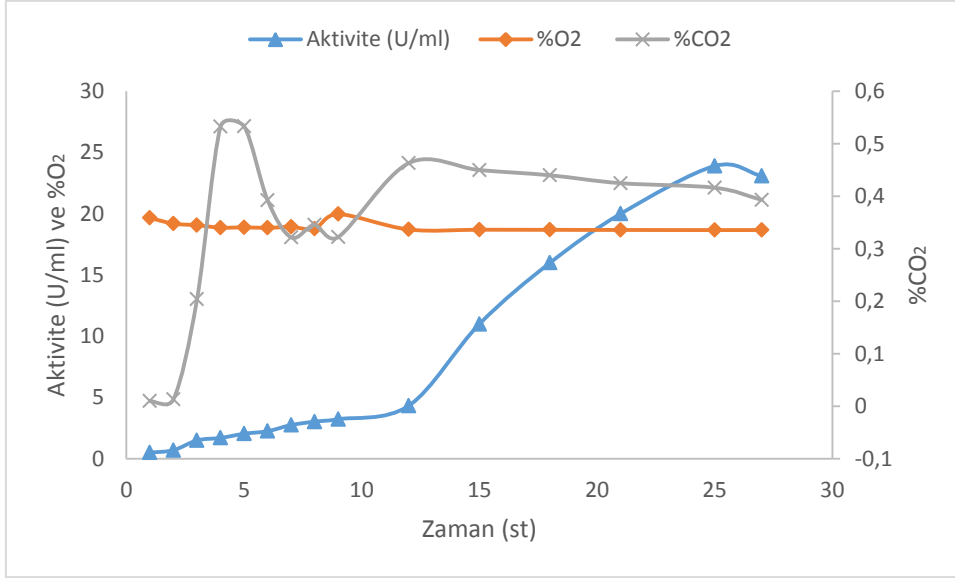
4.3. PB Tasarımı Deney Şartlarının α -Amilaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

İncelenen 12 deney süresince α -amilaz aktivitesinin, biyoreaktörde DO ve pH değerlerinin zamanla değişimi takip edilmiştir. O₂ ve CO₂ değerleri gaz analizörünün projeden temin edilme sürecinden sonra takip edilmiştir (Şekil 4.3-18). Deneylerde başlangıç pH'sı 7 olarak ayarlanmış ve aktivite belirlenemeyen 5,6 ve 12 no'lu noktalar dışındaki deneylerde ortam pH'sının önce 6,4-6,5 değerlerine geldiği daha sonra enzim üretiminin maksimum değerlerinde ortam pH'sında 8-8,5 civarında sabitlendiği görülmüştür. Bu değişim başlangıçtan itibaren doğal substratın bünyesinde bulunan proteinlerin kullanılarak ortamdaki amonyak miktarının artmasıyla ve daha sonra mikroorganizmanın protein üretimi ile açıklanabilir (Tanyıldızı, 2005).

PB tasarımının önerdiği 1 no'lu deneyde devir sayısı (18 rpm) ve havalandırma hızının (2 l/dk) en yüksek olduğu ve tampon boyutunun (1 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.3'te görüldüğü üzere enzim aktivitesi 23,9 U/ml değerine 24. saatte ulaşılmıştır. Köpük oluşumu nedeniyle 25 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. Havalandırma hızı ve devir sayısı değişkenlerinin üst noktada olduğu bu deney şartlarında enzim aktivitesi erlenlerde ulaşılan değerden daha yüksek bulunmuştur. Kullanılan tampon boyutunun minimum olduğu bu noktada en yüksek aktivite değerine ulaşılmış olmasına rağmen spesifik verimlilik değeri maksimum değildir.



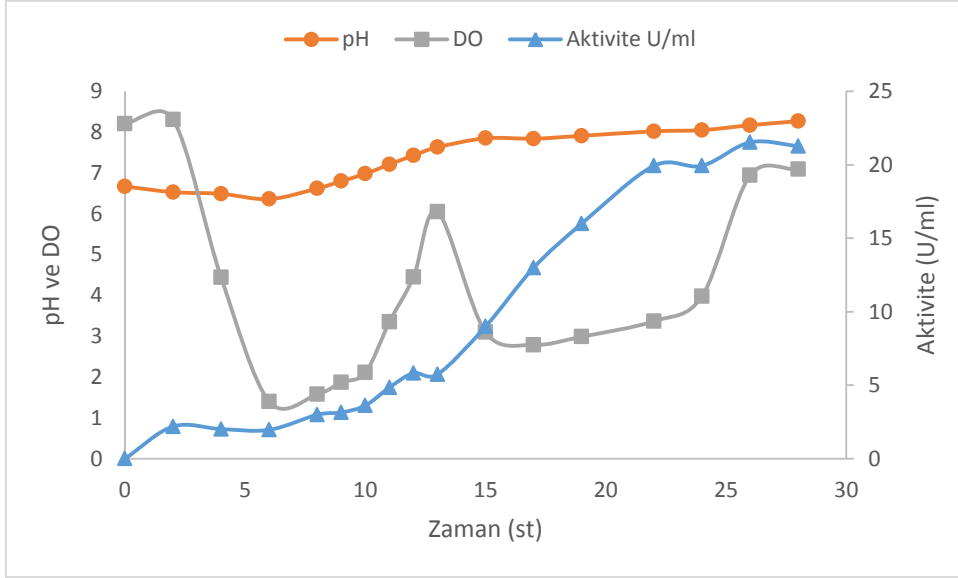
Şekil 4.3. 1 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.



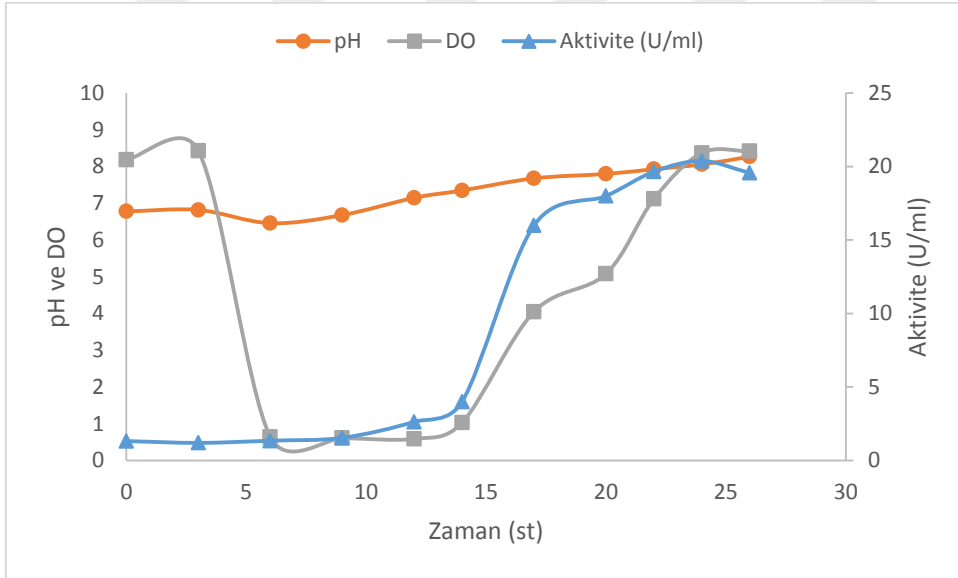
Şekil 4.4. 1 no'lu deneyde α-amilaz aktivitesi, %O₂ ve %CO₂'in zamanla değişimi.

PB tasarımının önerdiği 2 no'lu deneyde devir sayısı (3 rpm), havalandırma hızının (2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.5'te görüldüğü üzere enzim aktivitesi 21,6 U/ml değerine 26. saatte ulaşmıştır. Köpük oluşumu nedeniyle 10 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. 1 no'lu deney ile karşılaştırdığımızda aktivitede yaklaşık %10'luk bir düşüş gözlenmiştir. Deney süresince online olarak takip edilen DO kritik değer altına düşmemiştir. Yüksek havalandırma hızı ve büyük tampon boyutu ile fermentasyon ortamındaki düşük sıcaklığın oksijen davranışında etkin olabileceği düşünülmektedir.

PB tasarımının önerdiği 3 no'lu deneyde devir sayısı (18 rpm), havalandırma hızının (0,2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.6'da görüldüğü üzere enzim aktivitesi 20,38 U/ml değerine ulaşmıştır. Deney süresince köpük oluşumu gözlenmemiştir. 1 no'lu deney ile karşılaştırdığımızda havalandırma hızı çok düşük olmasına rağmen difüzörün gözenek çapının 6 µm'ye düşürülmesi ve tampon boyutu 4 cm'ye çıkarılması ile 20,38 U/ml α-amilaz aktivitesi gözlenmiştir. Reaktör doluluk oranının %80 ve fermentasyon ortam sıcaklığının düşük olduğu (30°C) deneyde oksijen limitasyonunun gerçekleştiği görülmüştür. 2 no'lu deneye göre devir sayısının ve reaktör doluluk oranının yüksek havalandırma hızının düşük olduğu 3. deneyde 2 no'lu deney ile karşılaştırdığımızda aktivitede yaklaşık %5'lik bir düşüş bulunmuştur.

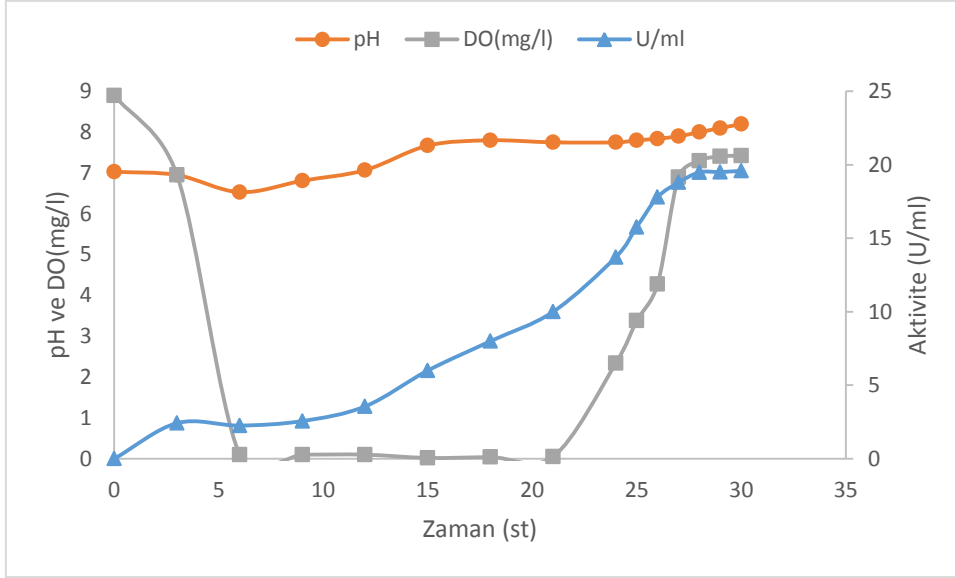


Şekil 4.5. 2 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'nın zamanla değişimi.

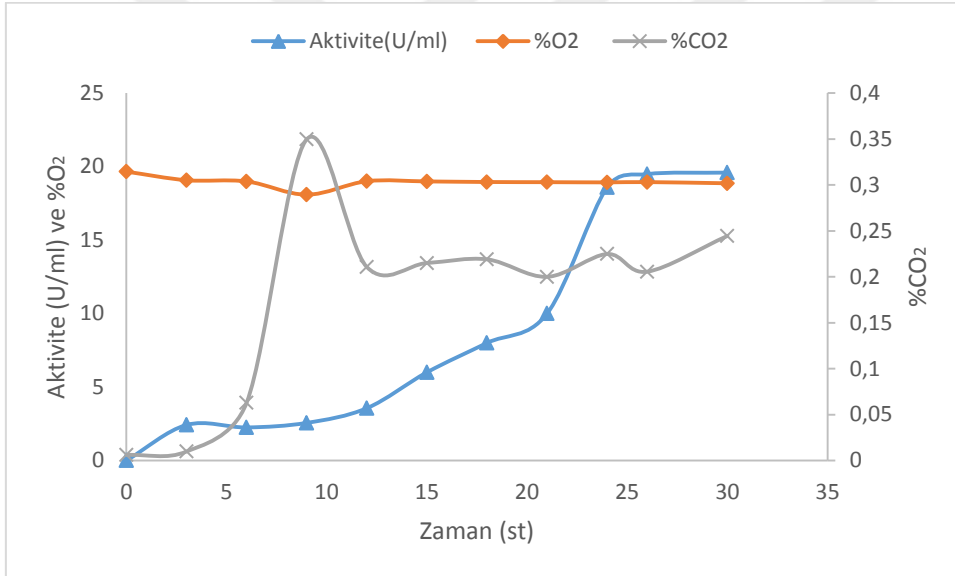


Şekil 4.6. 3 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'nın zamanla değişimi.

PB tasarımının önerdiği 4 no'lu deneyde devir sayısı (3 rpm), havalandırma hızının (2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.7'de görüldüğü üzere enzim aktivitesi 19,59 U/ml değerine 26.saatte ulaşılmıştır. Deney süresince köpük oluşumu gözlenmemiştir. 2 no'lu deneye göre reaktör doluluk oranının artmasıyla 4.deneyde aktivitede yaklaşık %9'luk bir düşüş bulunmuştur.



Şekil 4.7. 4 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'nin zamanla değişimi.

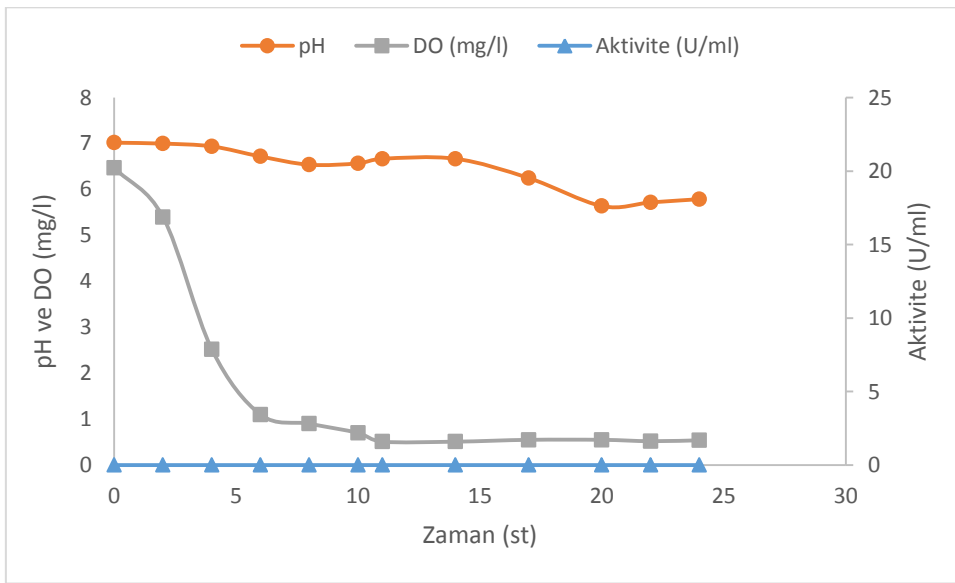


Şekil 4.8. 4 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, %O₂ ve %CO₂'in zamanla değişimi.

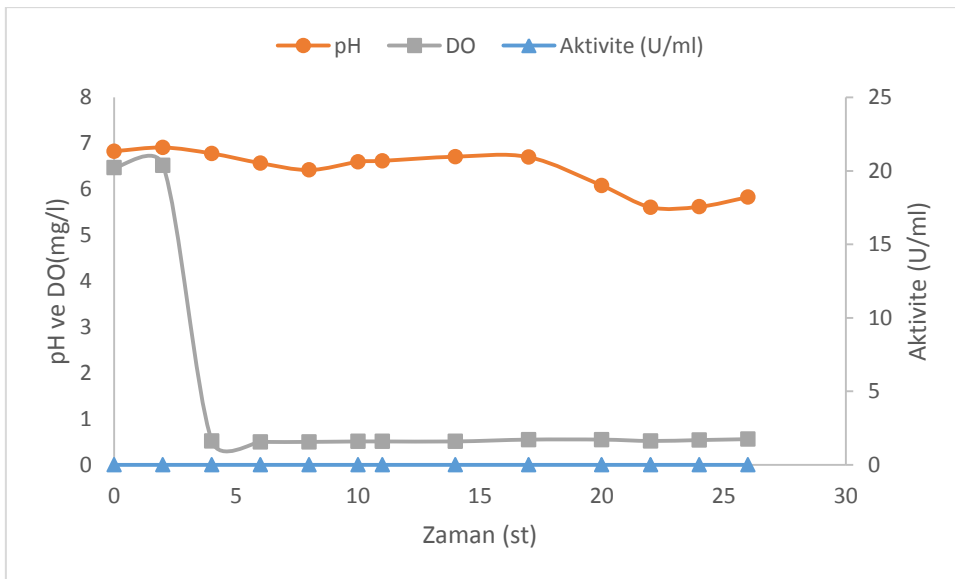
PB tasarımının önerdiği 5 no'lu deneyde devir sayısı (3 rpm), havalandırma hızının (0,2 l/dk) ve tampon boyutunun (1 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.9'da görüldüğü üzere enzim üretimi gerçekleşmemiştir. Deney süresince köpük oluşumu gözlenmemiştir. pH değerinin 5,5 değerine kadar düştüğü bu şartlarda α -amilaz üretimi gözlenmemiştir. Bu davranış, George ve ark., (1994) proteaz üretimini incelediği çalışmada ifade ettiği şekilde pH değeri düşmektedir. Kullanılan katı substratın yüksek protein içeriği (%19,25) incelenen şartlarda proteolitik enzim üretimini desteklemiş olabilir. Buradaki davranış muhtemelen George ve ark., (1994) tanımladığı gibi

mikroorganizmanın proteaz enzimini üretmeye yönelmesiyle başlangıçta ortamdaki substratın kullanılması ile ortama amonyak salınması sonucu pH'ın artması ve daha sonra ortamda tüketilmemiş proteinlerin proteazlar ile sindirilmesi sonucu ortaya çıkan serbest peptid ve amino asitler nedeniyle pH'ın düşmesi şeklinde olabilir.

PB tasarımının önerdiği 6 no'lu deneyde devir sayısı (3 rpm), havalandırma hızının (0,2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.10'da görüldüğü üzere enzim üretimi gerçekleşmemiştir. Köpük oluşumu nedeniyle 10 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. 5 no'lu deneyle benzer sonuçlar gözlenmiştir.

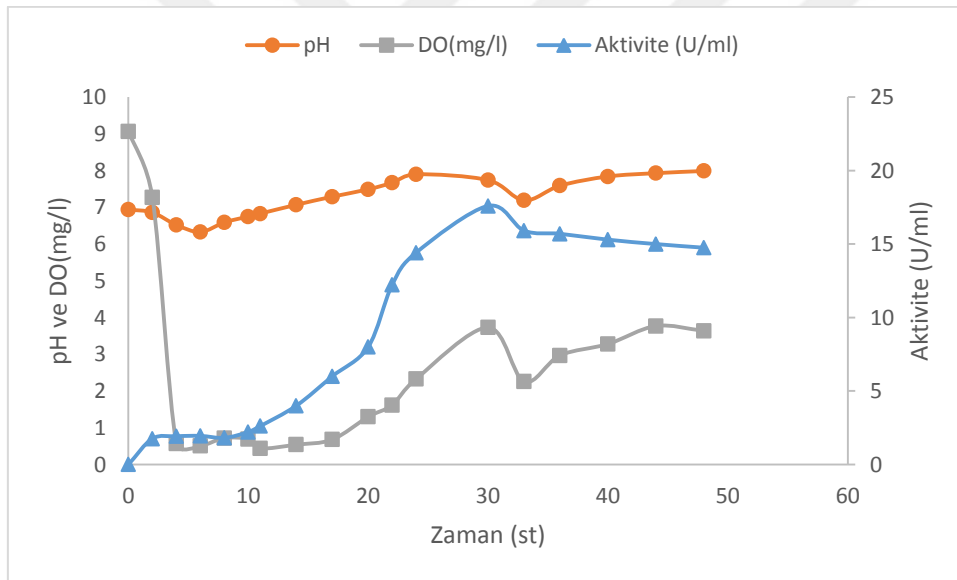


Şekil 4.9. 5 no'lu deneyde α-amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.



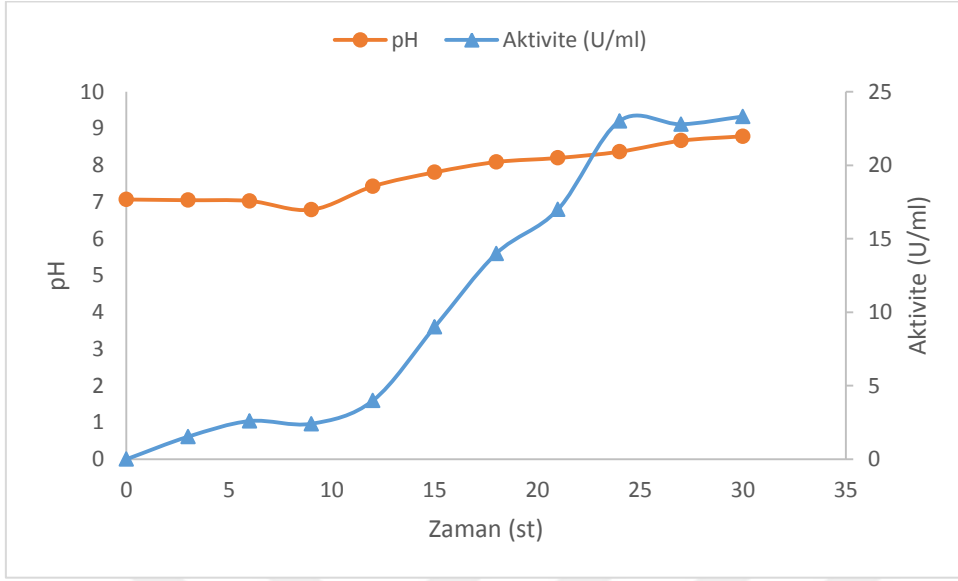
Şekil 4.10. 6 no'lu deneyde α-amilaz aktivitesi ve pH'ın zamanla değişimi.

PB tasarımının önerdiği 7 no'lu deneyde devir sayısı (18 rpm), havalandırma hızının (0,2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.11'de görüldüğü üzere enzim aktivitesi 17,6 U/ml değerine 30. saatte ulaşılmıştır. Deney süresince köpük oluşumu gözlenmemiştir. 3 no'lu deney ile karşılaştırdığımızda difüzörün gözenek çapının 25 μm 'ye çıkarılması ve sıcaklığın 37°C'ye çıkarılması ile aktivitede az bir düşüş gözlenmiştir. 6 no'lu deney ile karşılaştırdığımızda devir sayısındaki artış ile enzim üretimi sağlanmıştır. Devir sayısının enzim üretiminde önemli olduğu görülmektedir. Rodríguez-Jasso ve ark., (2013), döner tambur biyoreaktörde fungal fukoidenaz enzimi üretimi üzerine yaptıkları çalışmada devir sayısının enzim üretimini artırıcı bir etkisinin olduğunu ifade etmişlerdir. Havalandırma hızının (0,2 l/dk) düşük olmasına rağmen yüksek devir sayısı ve tampon boyutunda elde edilen enzim aktivitesi bu sonucu doğrulamaktadır.

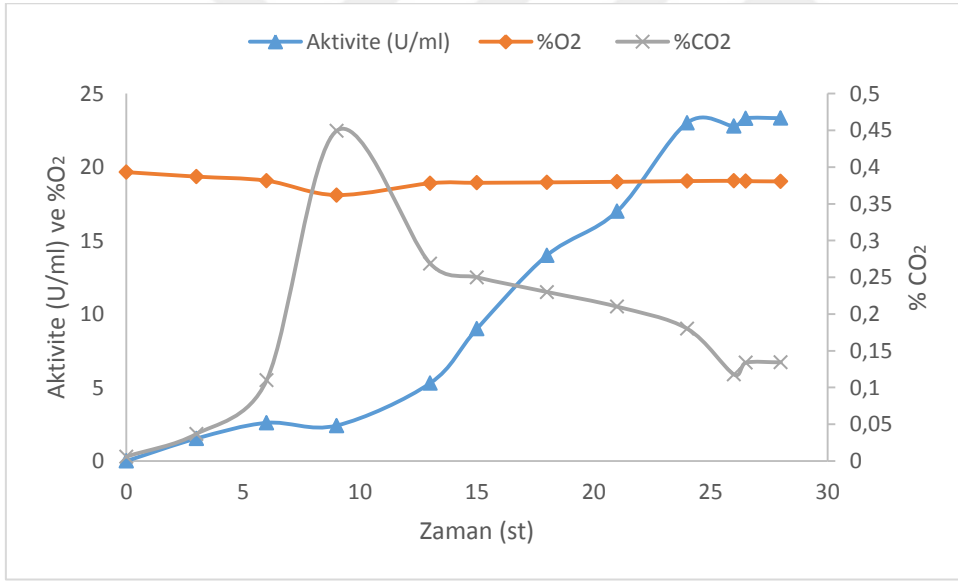


Şekil 4.11. 7 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'nin zamanla değişimi.

PB tasarımının önerdiği 8 no'lu deneyde devir sayısı (18 rpm), havalandırma hızının (2 l/dk) ve tampon boyutunun (1 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.12'de görüldüğü üzere enzim aktivitesi 23,02 U/ml değerine 24.saatte ulaşılmıştır. Deney süresince köpük oluşumu gözlenmemiştir. Yüksek havalandırma hızı ve devir sayılarında yapılan 1 no'lu deneyde elde edilen aktivite değerine yaklaşık bir değer 8 no'lu deneyde elde edilmiştir. Bu iki değişken dışındaki değişkenlerin enzim üretimine etkisinin daha sınırlı olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.12. 8 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'nın zamanla değişimi.

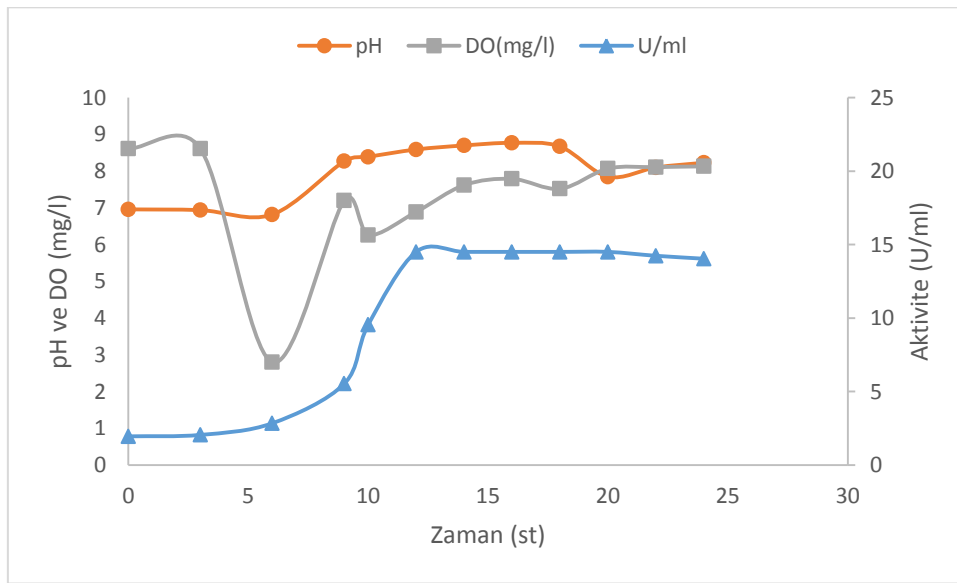


Şekil 4.13. 8 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, %O₂ ve %CO₂'in zamanla değişimi.

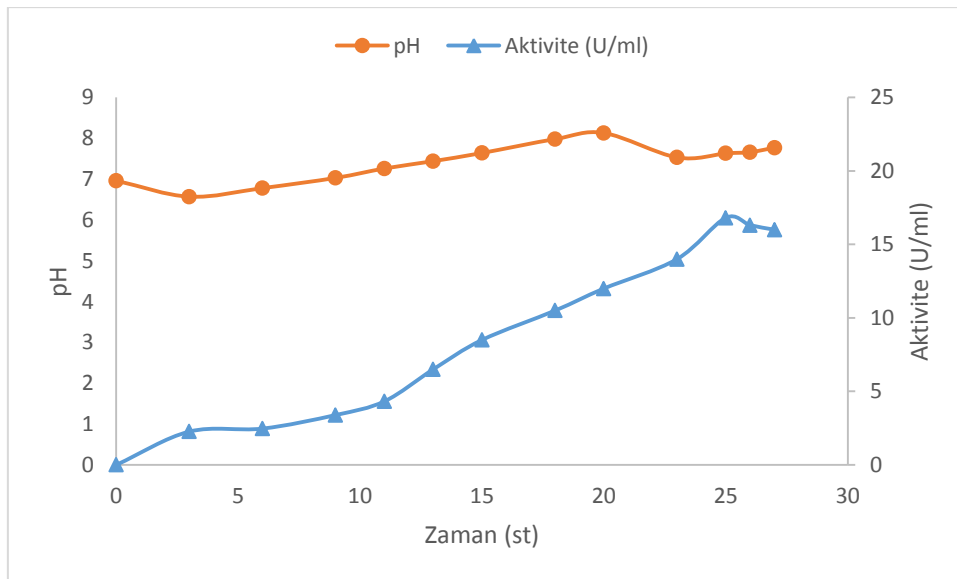
PB tasarımının önerdiği 9 no'lu deneyde devir sayısı (18 rpm), havalandırma hızının (2 l/dk) ve tampon boyutunun (4 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.14'te görüldüğü üzere enzim aktivitesi 14,5 U/ml değerine 12. saatte ulaşılmıştır. Köpük oluşumu nedeniyle 130 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. İncelenen deneyler arasında elde edilen aktivite değeri maksimum olmamasına rağmen 12. saatte elde edilen aktivite ile spesifik verimlilik bu noktada maksimum olarak bulunmuştur. Devir sayısı,

havalandırma hızı ve tampon boyutunun yüksek olduğu şartlarda yapılan bu deneyde DO diğer deneylere göre daha yüksek değerlerde kalmıştır.

PB tasarımının önerdiği 10 no'lu deneyde devir sayısı (3 rpm), havalandırma hızının (2 l/dk) ve tampon boyutunun (1 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.15'te görüldüğü üzere enzim aktivitesi 16,8 U/ml değerine 24.saatte ulaşılmıştır. Köpük oluşumu nedeniyle 80 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. Tampon boyutunun ve dönme hızının düşük olduğu bu deneyde ortam sıcaklığı 37°C'dir ve 3 no'lu deneyden çok daha düşük aktiviteye ulaşılmıştır.



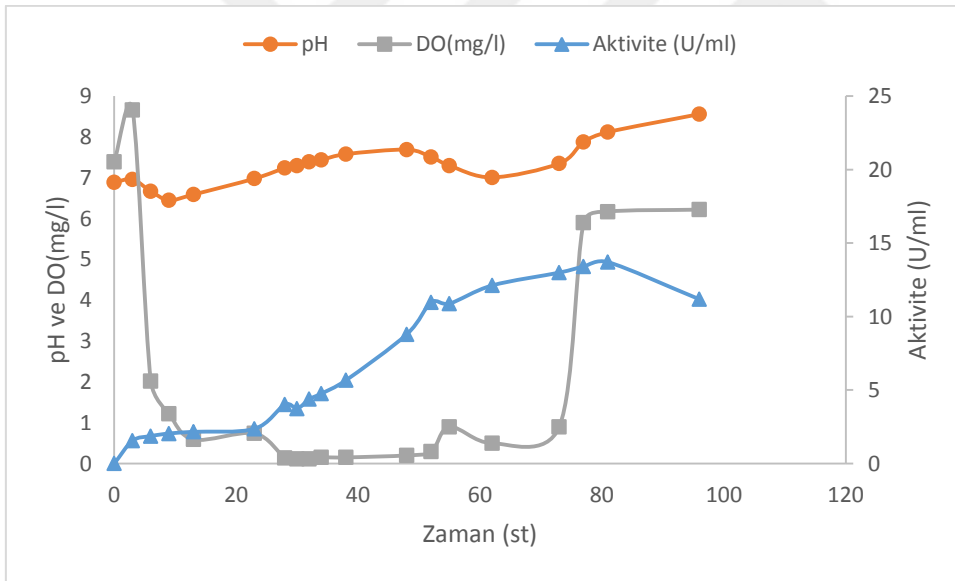
Şekil 4.14. 9 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'nın zamanla değişimi.



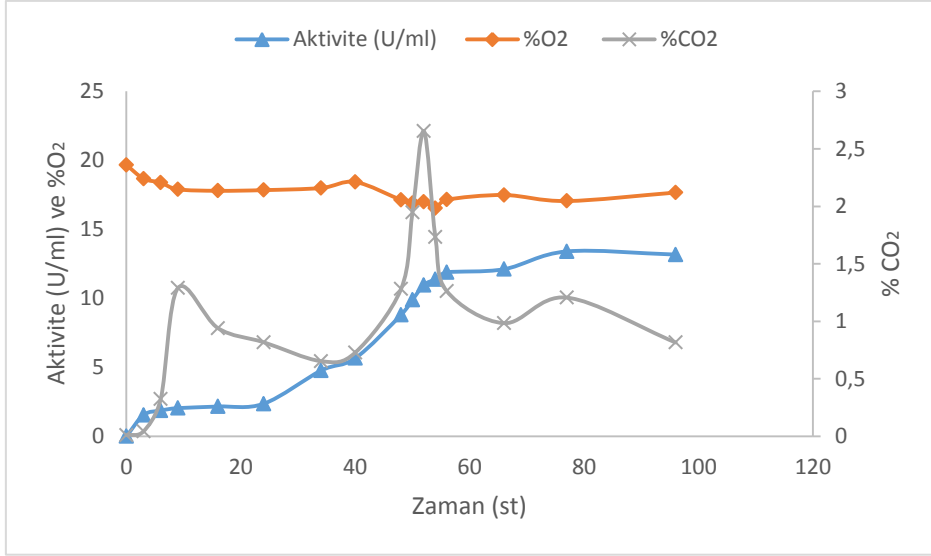
Şekil 4.15. 10 no'lu deneyde α -amilaz aktivitesi ve pH'nın zamanla değişimi.

PB tasarımının önerdiği 11 no'lu deneyde devir sayısı (18 rpm), havalandırma hızının (0,2 l/dk) ve tampon boyutunun (1 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.16'da görüldüğü üzere enzim aktivitesi 13,7 U/ml değerine 81. saatte ulaşmıştır. Köpük oluşumu nedeniyle 30 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. 7 no'lu deney ile karşılaştırdığımızda enzim üretimi üzerine en fazla katkı yapan 3. değişken olan tampon boyutunun 1 cm'e düşürülmesiyle aktivitenin düştüğü görülmektedir.

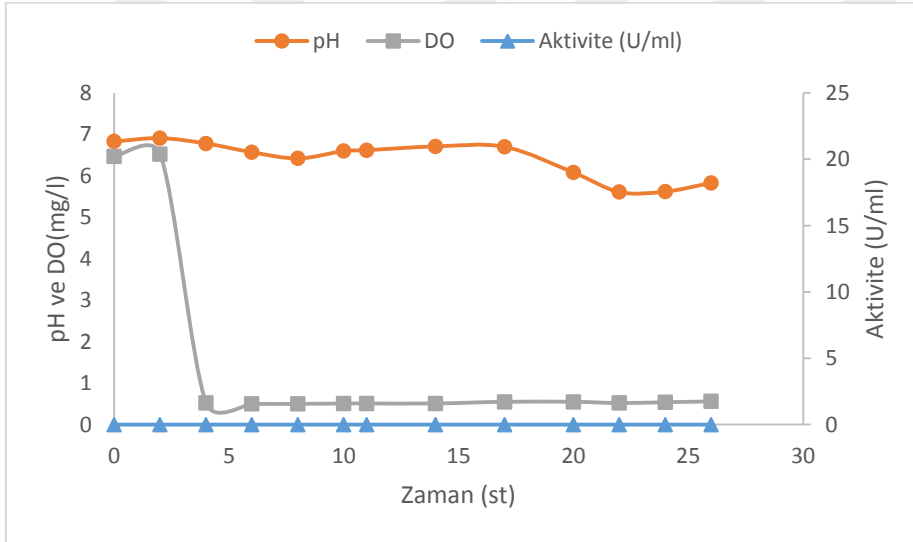
PB tasarımının önerdiği 12 no'lu deneyde devir sayısı (3 rpm), havalandırma hızının (0,2 l/dk) ve tampon boyutunun (1 cm) olduğu şartlarda yapılan deneyde Şekil 4.18'de görüldüğü üzere enzim üretimi gerçekleşmemiştir. 5 no'lu deneyle benzer sonuçlar gözlenmiştir.



Şekil 4.16. 11 no'lu deneyde α-amilaz aktivitesi, DO ve pH'nın zamanla değişimi.



Şekil 4.17. 11 no'lu deneyde α-amilaz aktivitesi, %O₂ ve %CO₂'in zamanla değişimi.



Şekil 4.18. 12 no'lu deneyde α-amilaz aktivitesi, DO ve pH'nın zamanla değişimi.

4.4. PB Tasarımı Deney Sonuçlarının İstatiksel Olarak İncelenmesi

Tablo 4.1'de PB tasarımına göre yapılan deneylerden elde edilen spesifik verimlilik ifadesi Design-Expert yazılımıyla analiz edilmiştir. PB tasarımından elde edilen ANOVA sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Tabloda verimlilik üzerine etkin olan değişkenler ve bunların katkıları görülmektedir. Sonuçların anlamlı olabilmesi için modelde "Prob>F" diye ifade edilen olasılık değerinin 0,05'ten küçük olması gerekir. Olasılık değerinin 0,10'dan büyük olduğu durumlarda tasarım cevap değişkenleri için önemsiz olur.

Tablo 4.2. α -Amilaz aktivite modeli ANOVA testi sonuçları.

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	%Katkı
Model	2983.38	426.20	17.46	0.0075	
Devir sayısı	854.49	854.49	35.00	0.0041	27.73
Havalandırma hızı	1701.16	1701.16	69.68	0.0011	55.21
Doluluk oranı	29.76	29.76	1.22	0.3315	0.97
Difüzörün gözenek çapı	3.13	3.13	0.13	0.7386	0.10
Tampon boyutu	365.61	365.61	14.98	0.0180	11.87
Aşı miktarı	23.65	23.65	0.97	0.3807	0.77
Reaktör sıcaklığı	5.59	5.59	0.23	0.6573	0.18
Kalan/Hata	97.66	24.41			
Düzeltilmiş ortalamaların toplamı	3081.04				

Model F-değerinden ve çok düşük probabilitate değerinden anlaşıldığı üzere, model anlamlıdır. Model içerisinde yer alan devir sayısı, havalandırma hızı ve tampon boyutu bağımsız değişkenlerine ait temel etkiler sahip oldukları düşük p değerleri ($p < 0,05$) ile istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Modelin uyum derecesi belirtme katsayısı R ve çoklu korelasyon katsayısı, R^2 nin değerine bakılarak kararlaştırılır. R^2 nin değeri 1'e ne kadar yakınsa, deneysel ve model değerler arasındaki korelasyon o ölçüde iyidir. Spesifik verimlilik için öngörülen modelin 0,9683'lük R^2 değeri deneysel verilerle model tarafından öngörülen değerlerin uyumuna işaret eder. Yüzde olarak ifade edildiğinde, R^2 α -amilaz üretim verimliliği için %96,83 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %3,27'sinin modelle ifade edilemediğini göstermektedir.

Bir regresyon modeline eklenen her bağımsız değişken, bağımlı değişkeni açıklama yeteneği olmasa bile R^2 değerinin büyümesine neden olmaktadır. Bu durum ise modelin açıklayıcılığının iyileştiği gibi yanlış bir sonuç doğurmaktadır. Bu nedenle modele katkısı olmayan değişkenleri dikkate alarak daha gerçekçi bir R^2 değeri hesaplanmakta ve bu değer ayarlanmış/düzeltilmiş R^2 (adjusted R^2) olarak ifade edilmektedir. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi modelin R^2 değeri %96,83 iken, düzeltilmiş R^2 değeri %91,28'e düşmüştür. Bu değer modelin belirleyiciliğinin yorumlanmasında ilk başvurulacak büyüklüktür. Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir. Sinyal gürültü oranının ise 4' ün üstünde olması beklenir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı 12,48 yeterli sinyale işaret etmektedir.

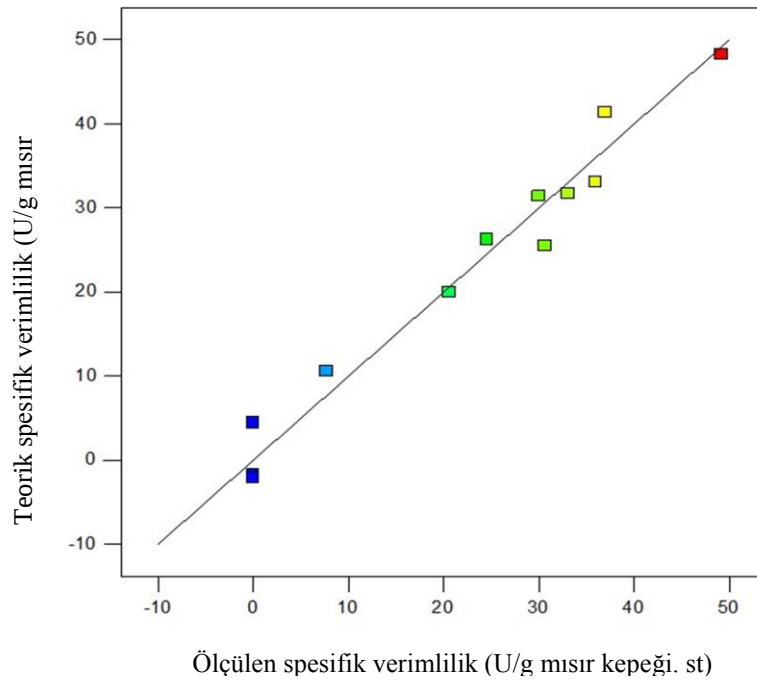
Tablo 4.3. Modellerin uygunluğunun test edilmesi için kullanılan istatistikler.

Standart Sapma	4.94	R²	0.9683
Ortalama	22.38	Adj R²	0.9128
Varyans Katsayı (C.V)	22.07	Pred R²	0.7147
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	878.91	Adeq Precision	12.4838

Design Expert programı tarafından önerilen faktöriyel modele ait değişkenleri gerçek değerlerinde tanımlayan lineer model eşitliği aşağıda verilmiştir.

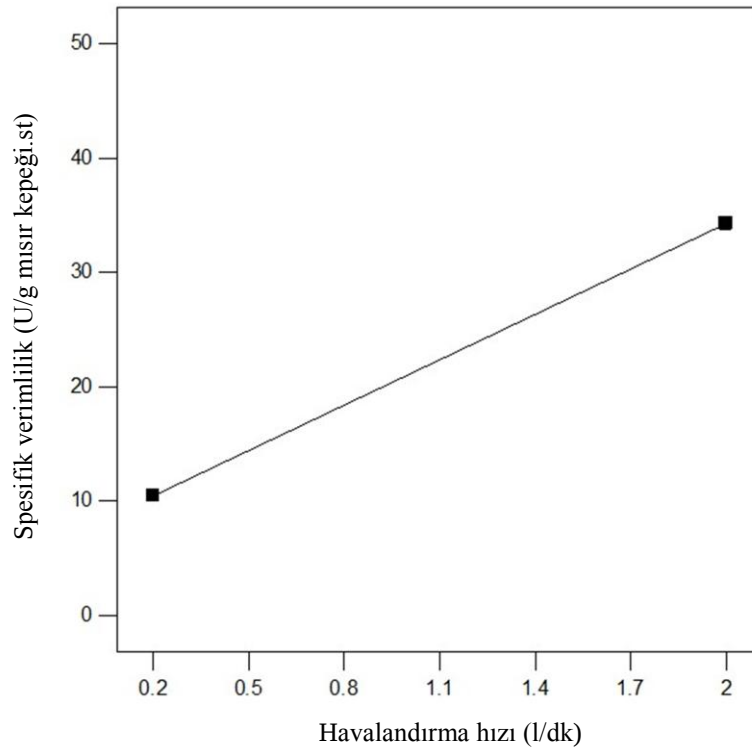
$$\alpha\text{-Amilaz aktivitesi} = -5.30327 + 1.12512 * \text{Devir sayısı} + 13.22939 * \text{Havalandırma hızı} - 0.078738 * \text{Doluluk oranı} - 0.053726 * \text{Gözenek çapı} + 3.67981 * \text{tampon boyutu} + 1.40392 * \text{Aşı miktarı} - 0.19499 * \text{Ortam sıcaklığı}$$

Eşitlikte önerilen model eşitliği kullanılarak hesaplanan teorik sonuçlara karşı gözlenen (deneysel) sonuçların dağılımı Şekil 4.19’da verilmiştir. α -Amilaz aktivitesine ait teorik ve gözlenen değerler Şekil 4.19’da görüleceği üzere lineer doğrunun etrafında dağılım göstermektedir. Bu dağılım, deneysel veriler ile modelden elde edilen verilerin uyumlu olduğunu göstermektedir.



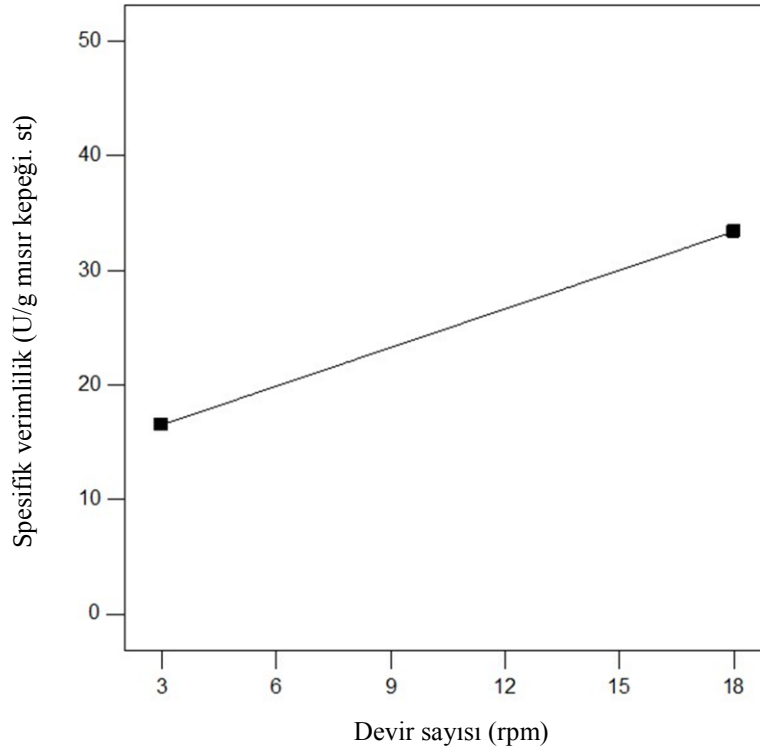
Şekil 4.19. Spesifik verimlilik değerlerine ait teorik olarak hesaplanan sonuçlara karşı deneysel sonuçların dağılımı.

İncelenen değişkenler arasında enzim üretimi üzerine yaklaşık %55 oranında bir etki ile en önemli değişken havalandırma hızıdır. Oksijenli solunum ile mikrobiyal üretim yapılan fermentasyonlarda DO kritik öneme sahiptir. Şekil 4.20’de görüldüğü üzere havalandırma hızının 0,2 l/dk’dan 2 l/dk’ya çıkarılması ile aktivitede yaklaşık 2,5 kat artış gözlenmiştir. Brinques ve ark. (2010), biyoreaktörde laktik asit ve probiyotik üretimi üzerine etkin olan değişkenlerin optimize edildiği çalışmada PB tasarımı ile 0 ile 2 vvm aralığında incelenen havalandırma hızının mikrobiyal üretim için önemli olduğunu göstermişlerdir. Dominguez ve ark. (2001), döner tambur biyoreaktörde havalandırmanın enzim üretimine etkisini inceledikleri çalışmada akış hızı 0,5 vvm ve 1 vvm olan iki fermentasyon deneyi sonucunda, havalandırma hızındaki artış ile enzim üretiminin 3 kat artırıldığını belirtmişlerdir (Domínguez ve ark., 2001).



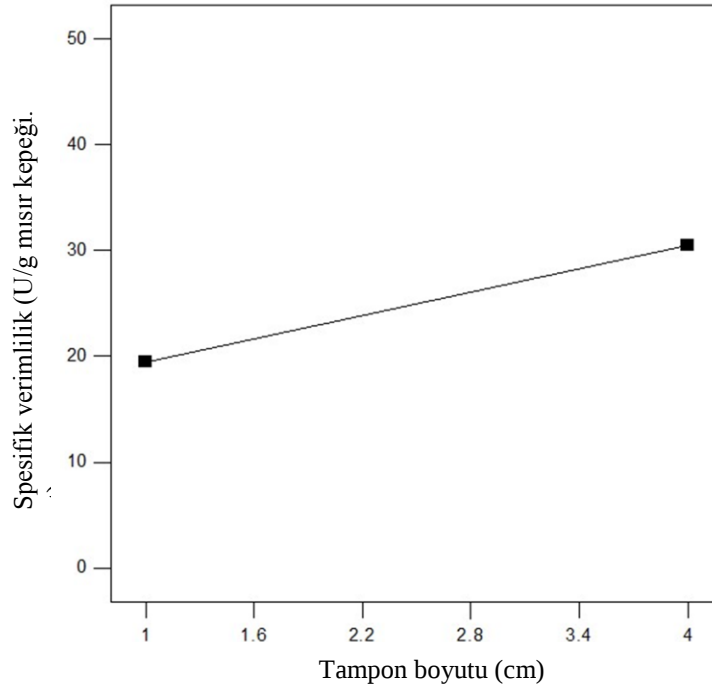
Şekil 4.5. α -Amilaz aktivitesinin havalandırma hızı ile değişimi

İncelenen değişkenler arasında enzim üretimi üzerine yaklaşık %28 oranında bir etki ile en önemli 2. değişken devir sayısıdır. Sentetik ortama göre daha viskoz olan katı substratın kullanıldığı doğal ortamlarda oksijen transferi sınırlanmaktadır. Bu bakımdan oksijen transferi ile güçlü bir ilişkisi olan devir sayısı kritik bir öneme sahip olmaktadır. Şekil 4.21’de görüldüğü üzere devir sayısının 3 rpm’den 18 rpm’e çıkarılması ile aktivitede yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. Devir sayısının artmasıyla oksijen transferi artmakta ve fermentasyon daha hızlı gerçekleşmektedir. Bu şekilde düşük devirli çalışmalara göre pH değişimi daha hızlı olmuş ve en yüksek aktiviteye daha kısa sürede ulaşılmıştır. Bu durum Stuart (1996) tarafından yapılan döner tambur biyoreaktörde *Aspergillus oryzae* kültürü yapılan çalışmada dönme hızının 2 rpm’den 9 rpm’e çıkarılmasıyla O₂ tüketim performansının önemli derecede arttığı belirtilen çalışma ile desteklenmektedir (Stuart, 1996).



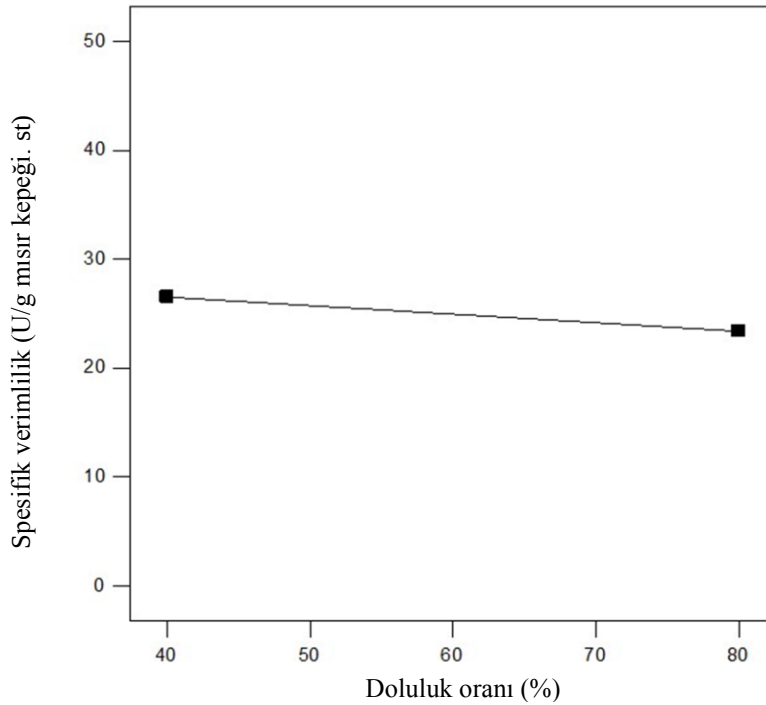
Şekil 4.21. α -Amilaz aktivitesinin devir sayısı ile değişimi

İncelenen değişkenler arasında enzim üretimi üzerine yaklaşık %12 oranında bir etki ile en önemli 3. değişken tampon boyutudur. KSF proseslerinde genellikle düşük devir hızlarında işletilen DTB'lerde karışma etkinliğinin artırılması için tampon kullanılmasının önemi büyüktür. Schutyser ve ark. (2003), tamponların karıştırma üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için yaptığı çalışmada tamponsuz tambur ile 4 adet tampon kullanılan tamponlu tamburu karşılaştırmıştır. Tamponlu tambur tasarımının diğerine göre etkin bir karışma sağladığını göstermiştir (Schutyser ve ark. 2003). Şekil 4.22'de görüldüğü üzere tampon boyutunun 1 cm'den 4 cm'ye çıkarılması ile aktivitede yaklaşık 1,5 kat artış gözlenmiştir. Bu etki, karışma etkinliğinin artırılması sonucu kütle ve ısı transferi hızının artması ile mikrobiyal ürün üretiminin artması olarak yorumlanabilir. Marsh ve ark. (1998), 57 cm çapındaki tambur biyoreaktörde *Rhizopus oligosporus*' un kültüre edildiği çalışmada, 17 cm genişliğindeki 4 adet tampon ile 5 cm genişliğindeki 12 adet tamponun etkinliğini karşılaştırmış ve genişliği artırılan 4 adet tampon kullanımı ile oksijen transfer hızı artırılmıştır (Marsh ve ark., 1998). Grajales ve ark. (2012), 30 cm çapındaki tambur biyoreaktörde *Metarhizium anisopliae*' un kültüre edildiği çalışmada, 5 cm genişliğindeki 4 adet tampon varlığında verimli mikrobiyal üretimler gerçekleştirmiştir (Grajales ve ark., 2012).



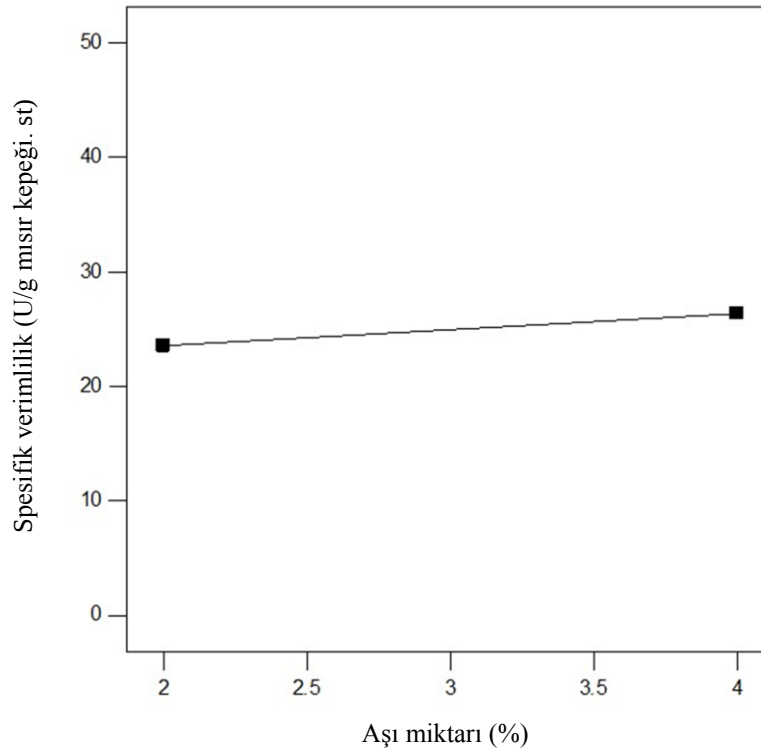
Şekil 4.22. α -Amilaz aktivitesinin tampon boyutu ile değişimi

ANOVA sonuçlarına göre sonuç değişkeni üzerine önemli olan 3 değişkenden sonra en fazla etkiye sahip olan değişken doluluk oranıdır. Endüstriyel üretimlerin gerçekleştirildiği biyoreaktörlerde yatırım ve işletme maliyetleri açısından önemli bir değişken olan doluluk oranı klasik DTB’lerde sıvı film tabakasını daha ince tutarak gaz-sıvı kütle transferinin etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi için genellikle %50’nin altında kalmaktadır. Şekil 4.23’te görüldüğü üzere doluluk oranının %40’dan %80’e çıkarılması ile aktivitede önemli seviyede olmayan bir azalma gözlenmiştir. Reaktörün alt kısmından yerleştirilen seramik mikro hava difüzörü sayesinde klasik DTB’lerde karşılaşılan oksijen transferi ve gaz-sıvı-katı fazları arasındaki ısı ve kütle transferi sınırlamaları gibi sorunların minimize edilmesi ile reaktör doluluk oranı artırılmasına rağmen üretim verimi yüksek değerlere ulaşmıştır. Jin ve ark. (2010), biyoliç üzerine yapılan çalışmada, seramik mikro hava difüzörü kullanılan yeni DTB tasarımı ile gaz-sıvı kütle transferi hızının arttığı, diğer yandan endüstride en yaygın kullanılan biyoreaktör tiplerinden biri olan karıştırılmalı biyoreaktör ile güç tüketimi açısından kıyaslandığında daha ekonomik olduğu ve gaz-sıvı-katı-mikroorganizma reaksiyon sistemleri için uygun olduğunu belirtilmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada biyoreaktörün doluluk oranı %75 olmasına rağmen etkin oksijen transferi ve verimli bir üretim için uygun koşullar sağlanmıştır. Yüksek doluluk oranlarında yapılan üretimler işletim maliyetinin düşürülmesi açısından önemlidir.



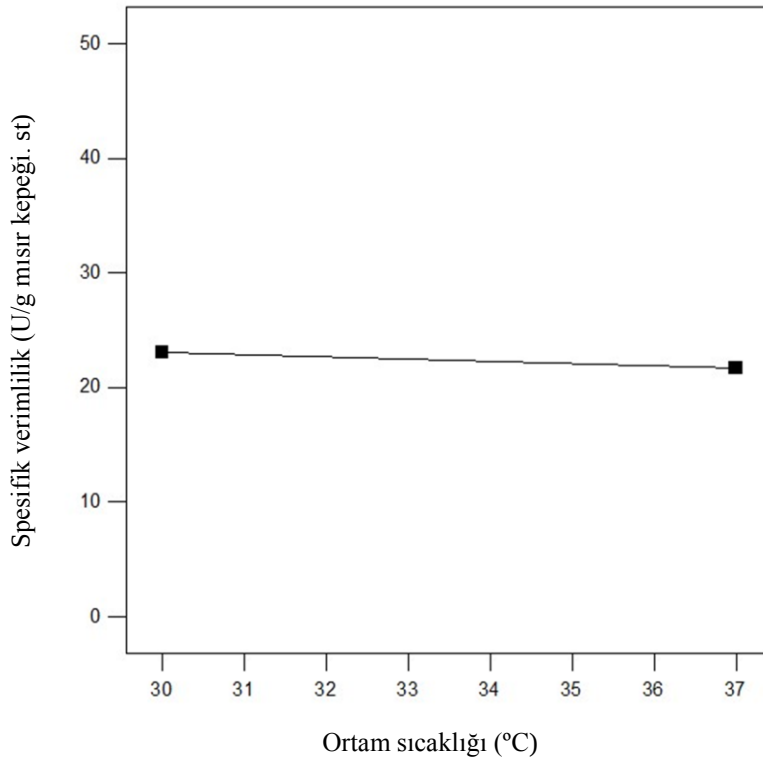
Şekil 4.23. α -Amilaz aktivitesinin doluluk oranı ile değişimi

Fermentasyon proseslerinde aşı miktarı başlangıç lag fazının kontrolünde etkilidir. Düşük ekim konsantrasyonlarında lag fazın uzun olduğu, yüksek ekim konsantrasyonlarında ise nem içeriğinin artmasıyla yine lag fazın önemli miktarda uzayacağı belirtilmektedir (Krishna ve ark., 1996). Şekil 4.24’de görüldüğü üzere aşı miktarının %2’den %4’e çıkarılması ile aktivitede az bir artış gözlenmiştir. Xiao ve ark. (2015), KSF ile alkalın proteaz üretimi üzerine etkin olan değişkenlerin optimize edildiği çalışmada PB tasarımı ile incelenen aşı miktarının mikrobiyal üretim için önemli bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Yine Singhania ve ark. (2007), KSF ile selülaz üretimi üzerine etkin olan değişkenlerin optimize edildiği çalışmada PB tasarımı ile incelenen aşı miktarının mikrobiyal üretim için önemli bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. KSF ile α -amilaz üretimi üzerine yapılan diğer bir çalışmada aşı miktarı %0,2 ile %4 aralığında incelenmiş ve herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Tanyıldızı, 2005).



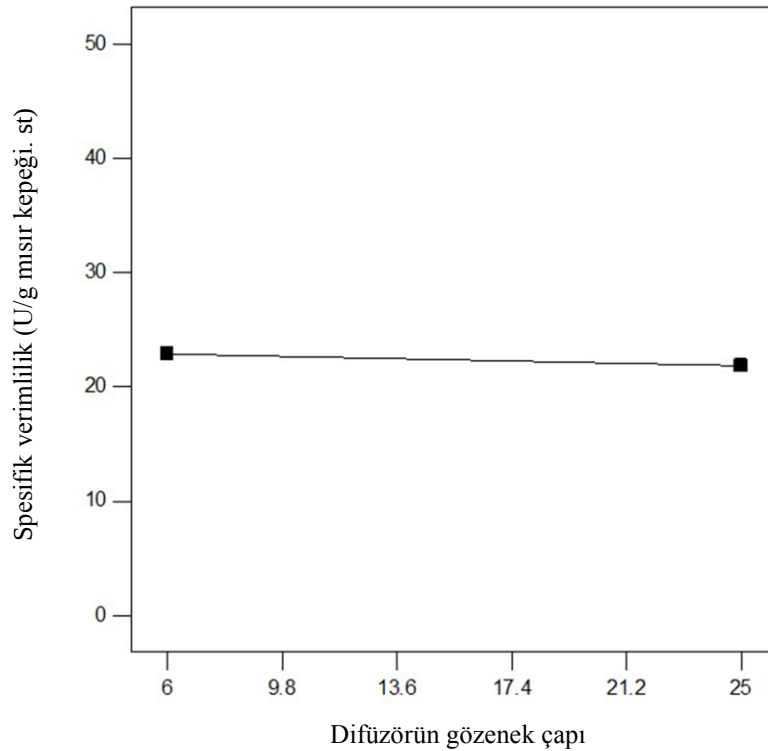
Şekil 4.24. α -Amilaz aktivitesinin aşı miktarı ile değişimi

Mikrobiyal üretimlerde sıcaklığın kritik bir faktör olması sebebiyle KSF’unda sıcaklık kontrolü büyük öneme sahiptir. KHF’de biyoreaktöre beslenen havanın sıcaklığı ya da belirli aralıklarla su püskürtülmesi ile sıcaklık kontrol edilmektedir. YKHF’ de ise serbest su miktarının artması ile ısı değıştiricilerin kullanımı dolayısıyla sıcaklık kontrolü daha kolaydır. Şekil 4.25’te görüldüğü üzere ortam sıcaklığının 30 °C’den 37 °C’ye çıkarılması ile aktivitede bir azalma gözlenmiştir. Tanyıldızı (2005), YKHF ile *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B–645 kullanarak α -amilaz üretimi yaptığı çalışmada 25, 30 ve 33, 37, 40°C’de yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivitelerinin oldukça yakın olduğunu ve ortam sıcaklığının 37°C’den 30°C’ ye düşürülmesiyle enzim üretiminde bir artış olduğunu ve maksimum enzim aktivitesine 33°C’de ulaşıldığını göstermiştir (Tanyıldızı, 2005). Yine YKHF ile *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B–645 kullanarak α -amilaz üretimi yapılan diğer bir çalışmada Selen (2006), 30, 33 ve 37°C’de yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivitelerinin oldukça yakın olduğunu göstermiştir (Selen, 2006). Fermantasyon sıcaklığındaki bu azalma ısıtma işleminin daha az enerji ile sağlanması açısından bir avantaj oluşturur. Fermentasyon sıcaklığının etkisi ortamda bulunan serbest su miktarı ve reaktörün karıştırma etkinliğine bağlı olarak değişmektedir.



Şekil 4.25. α -Amilaz aktivitesinin ortam sıcaklığı ile değişimi

Şekil 4.26’da görüldüğü üzere difüzörün gözenek çapının 6 μm ’den 25 μm ’ye çıkarılması ile aktivitede bir azalma gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar hava kabarcıklarının boyutunun hücreler üzerinde etkili olduğunu, büyük çaplardaki hava kabarcıklarının hücrenin kayma gerilimi etkisinde kalarak zarar göreceğini ve bu nedenle mikron boyuttaki kabarcıkların hücrelere daha az zarar vereceğini ifade etmiştir (Kunas ve Papoutsakis, 1990; Wu, 1995; Meier ve ark., 1999). Contreas ve ark. (1999), 60, 120, 500 ve 1000 μm por çaplarındaki mikro hava difüzörlerinin etkinliği incelenmiş, por çapı küçüldükçe oksijen transferi etkinliğinin arttığını göstermiştir. Michaels ve ark. (1996), kabarcıkların kümeleşmesi ve dağılma problemlerinin düşük devirli dönme hızlarında sisteme verilen mikro kabarcıklar sayesinde minimize edilebileceğini göstermişlerdir (Michaels ve ark., 1996). Wood ve ark. (2008) mikro hava difüzörünün por çapı ve yüzey alanın oksijen transfer etkinliği üzerine etkisini inceledikleri çalışmada 2 ile 40 μm gözenek çapındaki difüzörler arasında oksijen transfer etkinliği açısından önemli bir fark olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada ise incelenen difüzör gözenek çaplarının çok yakın olmasından dolayı PB tasarımında etkin bir değişken olarak belirlenemediği düşünülmektedir (Wood ve ark., 2008).



Şekil 4.26. α -Amilaz aktivitesinin gözenek çapı ile değişimi

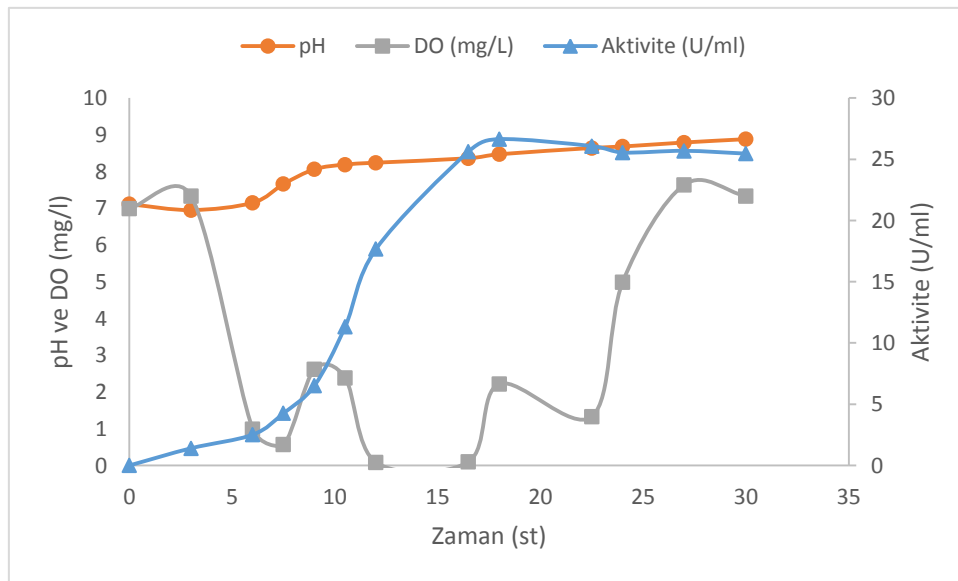
4.5. PB Tasarımı Doğrulama Deneyinin Sonuçları

PB tasarımından elde edilen model denkleminde Design-Expert yazılımı ile maksimum α -amilaz üretimini sağlayan noktalarda doğrulama deneyi yapılmıştır. Elde edilen lineer model denklem etkileşimleri içermediğinden gerçek optimum değerleri vermemekle birlikte istatistiksel analiz sonucunda %97 oranında açıklanabildiği belirlenmiştir. Tablo 4.4'te maksimum α -amilaz üretimini sağlayan şartlar görülmektedir. Bu noktalarda modelin önerdiği değere %94 oranında uyum içerisinde. Buradan model ile deneysel sonuçların uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

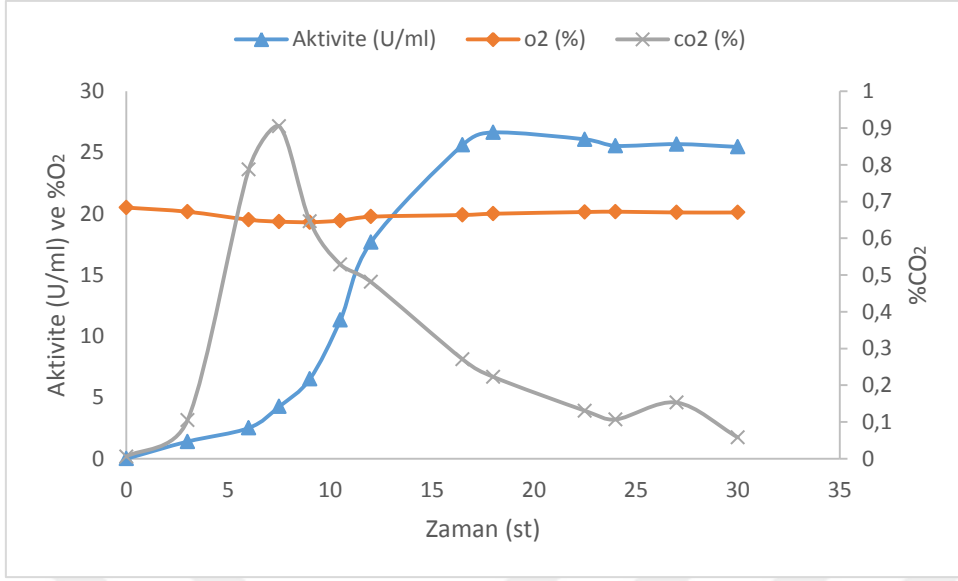
Yapılan doğrulama deneyinde incelenen değişkenlerin zamanla değişimi Şekil 4.27 ve 4.28'de görülmektedir. Maksimum enzim aktivitesine (26,84 U/ml) 18.saatte ulaşılmıştır. Köpük oluşumu nedeniyle 210 ml %10'luk köpük kırıcı ilave edilmiştir. Çalışmada katı substrattan dolayı hücre konsantrasyonu takip edilememiştir. Ancak çıkış akımındaki CO₂ değeri ve DO'ndan logaritmik evrenin sonuna doğru maksimum aktivite değerine ulaşıldığı söylenebilir. Çalışmanın devamında belirlenen etkin değişkenlerin etkileşimini içeren modeller yardımıyla incelenecek gerçek bir inceleme yapılmalıdır.

Tablo 4.4. Maksimum α -amilaz üretiminde kullanılan şartlar ve sonucu.

Devir Sayısı (rpm)	Hava Besleme Hızı (l/dk)	Doluluk Oranı (%)	Difüzörün Gözenek Çapı (μ m)	Tampon Boyutu (cm)	Aşı Miktarı (%)	Ortam Sıcaklığı (°C)	Önerilen Spesifik Verimlilik (U/g.st)	Ölçülen Spesifik Verimlilik (U/g.st)
18	2	75,5	6	4	4	30	54,1	50,86



Şekil 4.27. Doğrulama deneyinde α -amilaz aktivitesi, DO ve pH'nın zamanla değişimi.



Şekil 4.28. Doğrulama deneyinde α -amilaz aktivitesi, %O₂ ve %CO₂'in zamanla değişimi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Erlenlerde yapılan enzim üretim çalışmaları laboratuvar ölçekli DTB'e uygulanarak ölçek büyütme işlemi yapılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında DTB'de enzim üretiminin daha yüksek aktivitelerle ve daha kısa sürede gerçekleştirilerek yaklaşık 2 kat daha yüksek spesifik verimlilik ile gerçekleştirildiği belirlenmiştir.
2. Döner tambur biyoreaktörde α -amilaz üretimi için en etkin değişken havalandırma hızı olarak belirlenmiştir. Havalandırma hızının yetersiz olduğu durumlarda farklı metabolitlerin üretimi söz konusu olabilir. Burada olması en muhtemel üretim proteolitik enzimler olduğundan bu enzimin değişimi çalışmada takip edilmelidir.
3. DTB'de α -amilaz üretimi için en etkin 2. değişken devir sayısı olarak belirlenmiştir. Devir sayısı DO'nuda değiştiren kütle transfer sınırlamasının azalmasına neden olmaktadır. Ortamda serbest suyun fazla olması sebebiyle yeterli havalandırma ve ısı değiştirici ile DTB'de taşınım sınırlamalarının önüne geçilebilir.
4. Tampon boyutu karıştırma etkinliği için önemli bir değişkendir. Yapılan çalışmada tampon boyutu en önemli 3. değişken olarak belirlenmiştir. Tampon boyutunun etkisinin devir sayısı ile ilişkili olması beklenir. Bunun belirlenebilmesi için etkileşimlerde ortaya koyan bir model kullanılarak α -amilaz üretimi incelenmelidir. Karıştırma etkinliğinin artması hücre sayısı veya hücre morfolojisini etkileyecek bir değişkendir. Kullanılan mikroorganizmanın yüksek karıştırma hızlarına dayanıklı olması (bakteri hücresi) sebebiyle daha yüksek devir sayıları ve farklı geometrilerde açılı yerleştirilecek tamponlar ile üretimin incelenmesi α -amilaz üretimini artırabilir.
5. Biyoreaktörlerde üretimi etkilemesi muhtemel diğer değişkenler tasarlanan ve çalışma aralıkları literatürden belirlenen şartlarda etkin olarak görülmemiştir. Bunlardan difüzörün gözenek çapı daha geniş aralıklarda incelenerek ortaya konulabilir. Yüksek doluluk oranının önemli bir etki yapmaması tasarlanan DTB'de büyük hacimlerde üretim için önemli bir avantajdır. Ortam sıcaklığının etkisi sadece optimum sıcaklık olarak değil DO'ndaki değişim ve köpük oluşumuyla birlikte düşünülmelidir. Erlenlerde sentetik ortamda optimum 37°C olarak belirlenen sıcaklık reaktörde katı substrat ile 30°C olarak bulunmuştur. Yüksek hücre büyüme hızlarında aşırı köpük oluşumu gözlemlenmiş ve köpük kırıcı

sisteme ilave edilmiştir. Köpük kırıcının oksijen transferine olumsuz etkisi α -amilaz üretimini etkilemiş olabilir. Bu sonucun doğrulanması için deneyler yapılmalıdır.

6. Elde edilen lineer model denkleminin %94 oranında deneysel sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür.
7. Reaktörde hücre konsantrasyonunun takibinin yapılması gereklidir. Hücre konsantrasyonu ile çıkış gazındaki CO₂ konsantrasyonu arasında bir ilişki geliştirilebilir. Gaz analizörünün teminindeki sorunlar dolayısıyla bazı çalışmalarda analiz yapılamamıştır.
8. Proses kontrol sistemlerinin gelişmesi ile biyoreaktörlerde pH, DO gibi kritik değişkenler kontrol edilebilmektedir. mikroorganizmaların optimum çalışma şartları arasında önemli bir yere sahip olan pH ve DO değişkenlerinin kontrolü gereklidir. DTB'e pH ve DO kontrol sisteminin eklenmesi ile optimum pH değerinin bulunması ile α -amilaz üretimi artırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abate, C. M., G. R. Castro, F. Siñeriz ve D. A. Callieri** (1999). "Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*." *Biotechnology letters*, 21(3), 249-252.
- Abdul Manan, M.** (2014). "Design Aspects of Solid State Fermentation." Doktora Tezi, University of Manchester, İngiltere.
- Aguilar, C. N., G. Gutiérrez-Sánchez, R. Rodríguez-Herrera, J. L. Martínez-Hernandez ve J. C. Contreras-Esquivel** (2008). "Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes." *American journal of biochemistry and biotechnology*, 4(4), 354.
- Akcan, N.** (2009). "Bazı *Bacillus* Türlerinin Ekstraselüler Enzimlerinin Araştırılması." Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Asagbra, A. E., A. I. Sanni ve O.B. Oyewole** (2005). "Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate." *World journal of microbiology and biotechnology* 21(2): 107-114.
- Auria, R., P. Christen, E. Favela, M. Gutierrez, J.-P. Guyot, O. Monroy, S. Revah, S. Roussos, G. Saucedo-Castaneda ve G. Viniegra-Gonzalez** (1995). Biotreatment of liquid, solid or gas residues: an integrated approach. *Environmental Biotechnology*, Springer: 221-236.
- Balasubramaniam, A. K., K. V. Nagarajan ve G. Paramasamy** (2001). "Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation." *Process Biochemistry*, 36(12), 1241-1247.
- Baysal, Z., F. Uyar ve Ç. Aytekin** (2003). "Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water." *Process Biochemistry*, 38(12), 1665-1668.
- Bernfeld, P.** (1955). "Amylases, α and β ." *Methods in enzymology*, 1, 149-158.
- Bouquet, F. ve D. Morin** (2006). "BROGIM®: A new three-phase mixing system testwork and scale-up." *Hydrometallurgy*, 83(1), 97-105.
- Brinques, G. B., M. do Carmo Peralba ve M. A. Z. Ayub** (2010). "Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems." *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 37(2): 205-212

- Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı (BSTB)** (2014). Ulusal Biyoteknoloji Ar-Ge ve Yenilik Strateji Belgesi ve Eylem Planı (2015-2019), Ankara.
- Buchholz, K., V. Kasche ve U. T. Bornscheuer** (2012). Biocatalysts and enzyme technology, John Wiley & Sons.
- Burçak, T.** (2012). "Bazı Endüstriyel Hidrolitik Enzimlerin Şapkalı Mantarlardaki Aktivitelerinin Araştırılması " Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Castilho, L. R., R. A. Medronho ve T. L. Alves** (2000). "Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*." Bioresource Technology 71(1): 45-50.
- Chen, H.** (2013). ModernSolidState Fermentation, Springer.
- Chisti, Y.** (1999). "Fermentation (industrial): basic considerations." Encyclopedia of Food Microbiology: 663-674.
- Contreras, A., F. García, E. Molinaa ve J. C. Merchuk** (1999). "Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor." Enzyme and Microbial Technology 25(10): 820-830.
- Couto, S. R. ve M. A. Sanromán** (2006). "Application of solid-state fermentation to food industry—a review." Journal of Food Engineering, 76(3), 291-302.
- Czermak, P., C. Weber, D. Nehring ve D. Hall** (2005). "A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors." Publication Series of IBPT University of Applied Sciences Giessen-Friedberg, 1-6.
- de Azeredo, L. A., P. M. Gomes, G. L. Sant’Anna Jr, L. R. Castilho ve D. M. Freire** (2007). "Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations." Current Microbiology, 54(5), 361-365.
- de Barros Soares, L. H., F. Assmann ve M. A. Z. Ayub** (2003). "Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid-state and submerged cultivations." Biotechnology letters 25(23): 2029-2033.
- De Gregorio, A., G. Mandalari, N. Arena, F. Nucita, M. Tripodo ve R. L. Curto** (2002). "SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps." Bioresource technology 83(2): 89-94.
- de Moraes, L. M., S. Astolfi Filho ve C. J. Ulhoa** (1999). "Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*." World journal of microbiology and biotechnology, 15(5), 561-564.

- Deb, P., S. A. Talukdar, K. Mohsina, P. K. Sarker ve S. A. Sayem** (2013). "Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001." SpringerPlus 2(1): 1.
- Dewan, S.** (2012). "Global markets for enzymes in industrial applications." BCC Research, BIO030G.
- Dhillon, G. S., S. K. Brar, S. Kaur ve M. Verma** (2013). "Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor." Industrial Crops and Products, 41, 78-84.
- Diaz-Godinez, G., J. Soriano-Santos, C. Augur ve G. Viniegra-González** (2001). "Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 26(5), 271-275.
- Diaz, J. M., J. Rodríguez, S. Roussos, J. Cordova, A. Abousalham, F. Carriere ve J. Baratti** (2006). "Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures." Enzyme and microbial technology, 39(5), 1042-1050.
- Domínguez, A., I. Rivela, S. R. g. Couto ve M. Á. Sanromán** (2001). "Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support." Process Biochemistry, 37(5), 549-554.
- Economou, C. N., A. Makri, G. Aggelis, S. Pavlou ve D. Vayenas** (2010). "Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil." Bioresource Technology, 101(4), 1385-1388.
- Elibol, M. ve A. R. Moreira** (2005). "Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation." Process Biochemistry, 40(5), 1951-1956.
- Esquivel, J. C. C., R. A. Hours, C. E. Voget ve C. F. Mignone** (1999). "*Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity." Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(1), 48-52.
- Fenice, M., G. G. Sermanni, F. Federici ve A. D'Annibale** (2003). "Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media." Journal of Biotechnology, 100(1), 77-85.

- Fung, C. J. ve D. A. Mitchell** (1995). "Baffles increase performance of solid-state fermentation in rotating drum bioreactors." *Biotechnology Techniques* 9(4): 295-298.
- Grajales, L. M., N. M. Xavier, J. P. Henrique ve J. C. Thomeo** (2012). "Mixing and motion of rice particles in a rotating drum." *Powder Technology*, 222, 167-175.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami ve B. Chauhan** (2003). "Microbial α -amylases: a biotechnological perspective." *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Han, B., J. L. Kiers ve R. M. Nout** (1999). "Solid-substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus spp.*: Comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 205-209.
- Hardin, M. T., T. Howes ve D. A. Mitchell** (2002). "Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors." *Journal of Biotechnology*, 97(1), 89-101.
- Hata, Y., H. Ishida, Y. Kojima, E. Ichikawa, A. Kawato, K. Suginami ve Mayasu S. I.** (1997). "Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture." *Journal of fermentation and bioengineering* 84(6): 532-537.
- Hmidet, N., N. E. H. Ali, A. Haddar, S. Kanoun, S.-K. Alya ve Nasri M.** (2009). "Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive." *Biochemical Engineering Journal*, 47(1), 71-79.
- Huerta-Ochoa, S., M. S. de Nicolás-Santiago, W. D. Acosta-Hernández, L. A. Prado-Barragán, G. Fidel, B. E. Gutiérrez-López ve Regalado-González C.** (2003). "Production and Partial Purification of Glycosidases Obtained by Solid-State Fermentation of Grape Pomace Using *Aspergillus niger* 10." *Food science and food biotechnology*, 119.
- İşler, C.** (2012). "Katı Kültür Fermentasyonu ile Aktinomiset M135-3'den Aktinomisin D Üretimi" Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Jin, J., G.-L. Liu, S.-Y. Shi ve Cong W.** (2010). "Studies on the performance of a rotating drum bioreactor for bioleaching processes. Oxygen transfer, solids distribution and power consumption." *Hydrometallurgy*, 103(1), 30-34.

- Kalogeris, E., F. Iniotaki, E. Topakas, P. Christakopoulos, D. Kekos ve B. Macris** (2003). "Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw." *Bioresource Technology*, 86(3), 207-213.
- Kandra, L.** (2003). " α -Amylases of medical and industrial importance." *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666, 487-498.
- Kelecom, A.** (2002). "Secondary metabolites from marine microorganisms." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74(1): 151-170.
- Kiper, M.** (2013). *Biyoteknoloji Sektörel İnovasyon Sistemi: Kavramlar, Dünyadan Örnekler, Türkiye'de Durum ve Çıkarımlar, Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV).*
- Koç, M.** (2014). "Çok Bilşenli Karışımların HPLC ile Analizi İçin Deneysel Tasarım ve Validasyon" Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Krishna, C.** 2005. "Solid-state fermentation systems-an overview." *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
- Kunas, K. T. ve E. T. Papoutsakis** (1990). "Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment." *Biotechnology and bioengineering*, 36(5), 476-483.
- Liu, G., J. Jin, S. Wen, Z. Wang, Q. Zhang ve W. Cong** (2013). "Research on the characteristic of power consumption in a novel rotating drum bioleaching reactor of different sizes." *Minerals Engineering* 53: 16-23.
- Machado, I., J. A. Teixeira and S. Rodríguez-Couto** (2013). "Semi-solid-state fermentation: a promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*." *Journal of biotechnology* 165(3): 195-200.
- Maldonado, M. ve A. S. de Saad** (1998). "Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 34-38.
- Marsh, A. J., D. A. Mitchell, D. M. Stuart ve T. Howes** (1998). "O₂ uptake during solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor." *Biotechnology letters*, 20(6), 607-611.
- Menzel, C., T. Lerch, K. Schneider, R. Weidemann, C. Tollnick, G. Kretzmer, T. Scheper ve K. Schüger** (1998). "Application of biosensors with an electrolyte

- isolator semiconductor capacitor (EIS-CAP) transducer for process monitoring." *Process Biochemistry*, 33(2), 175-180.
- Meier, S. J., T. A. Hatton ve D. I. Wang** (1999). "Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors." *Biotechnology and bioengineering*, 62(4), 468-478.
- Michaels, J. D., A. K. Mallik ve E. T. Papoutsakis** 1996. "Sparging and agitation-induced injury of cultured animals cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells?", *Biotechnology and bioengineering*, 51(4), 399-409.
- Minjares-Carranco, A., B. A. Trejo-Aguilar, G. Aguilar ve G. Viniegra-González** (1997). "Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation." *Enzyme and Microbial Technology* 21(1): 25-31.
- Mitchell, D. A., M. Berovic ve N. Krieger** (2000). *Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. New Products and New Areas of Bioprocess Engineering*, Springer: 61-138.
- Mitchell, D. A., M. Berovič ve N. Krieger** (2006). *Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and overview*, Springer.
- Mitidieri, S., A. H. S. Martinelli, A. Schrank ve M. H. Vainstein** (2006). "Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations." *Bioresource Technology*, 97(10), 1217-1224.
- Nagel, F. J. J., J. Tramper, M. S. Bakker ve A. Rinzema** (2001). "Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation." *Biotechnology and Bioengineering* 72(2): 219-230.
- nee'Nigam, P. S.ve A. Pandey** (2009). *Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues*, Springer.
- Nielsen, J. E. ve T. V. Borchert** (2000). "Protein engineering of bacterial α -amylases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 253-274.
- Oberoi, H. S., N. Babbar, S. K. Sandhu, S. S. Dhaliwal, U. Kaur, B. Chadha ve V. K. Bhargav** (2012). "Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant

- Pichia kudriavzevii* HOP-1." Journal of industrial microbiology & biotechnology, 39(4), 557-566.
- Onofre, S. B., S. Groff, A. Sartori, J. Bertolini, F. Kagimura, D. Rotta, L. Mazzali ve P. Steilmann** (2012). "Production of α -Amylase and Amyloglucosidase by the Fungus *Cylindrocladium* sp. in semi-solid state fermentation." Journal of Microbiology Research, 2(5), 123-126.
- Ortiz, G. E., M. E. Guitart, S. F. Cavalitto, E. O. Albertó, M. Fernández-Lahore ve M. Blasco** (2015). "Characterization, optimization, and scale-up of cellulases production by *Trichoderma reesei* cbs 836.91 in solid-state fermentation using agro-industrial products." Bioprocess and biosystems engineering 38(11): 2117-2128.
- Oostra, J., J. Tramper ve A. Rinzema** (2000). "Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats." Enzyme and Microbial Technology 27(9): 652-663.
- Osma, J. F., J. L. T. Herrera ve S. R. Couto** (2007). "Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration." Dyes and Pigments, 75(1), 32-37.
- Özbağ, N.** (2014). "Turkey Requires GE-Free Attestation for Enzymes and Microorganisms." USDA Foreign Agricultural Service, Global Agricultural Information Network, Rapor No: TR4039.
- Palmer, T. ve P. L. Bonner** (2007). Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry, Elsevier.
- Pandey, A., C. R. Soccol ve D. Mitchell** (2000). "New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products." Process Biochemistry 35(10): 1153-1169
- Papagianni, M., S. E. Nokes ve K. Filer** (1999). "Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation." Process Biochemistry 35(3): 397-402.
- Patil, S. R. ve A. Dayanand** (2006). "Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions." Bioresource Technology, 97(16), 2054-2058.
- Plackett, R.L. ve Burman, J.P.** (1946). The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, 33, 305–325.

- Rahardjo, Y. S., J. Tramper ve A. Rinzema** (2006). "Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives." *Biotechnology advances* 24(2): 161-179.
- Rajagopalan, G. ve C. Krishnan** (2008). " α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate." *Bioresource Technology*, 99(8), 3044-3050.
- Rasheed, T., A. Mathew, M. Mathew, R. K. Sukumaran ve Elyas K.K.** (2015). "Optimization of process parameters for β -glucosidase production by *Byssoschlamys fulva* in slurry state fermentation." *Biotech. Res.*, 1(1), 101-107.
- Rejendhran, J., Krishnakumar, V. and Gunasekaran, P.** (2002). Optimization of a fermentation medium for the production of Penicilin G acylase from *Bacillus* sp., *Lett Applied Microbia.*, 35: 523-527.
- Ramesh, M., N. Charyulu, N. Chand ve B. Lonsane** (1996). "Non-growth associated production of enzymes in solid state fermentation system: Its mathematical description for two enzymes produced by *Bacillus licheniformis* M27." *Bioprocess engineering*, 15(6), 289-294.
- Renge, C., S. Khedkar ve N. Nandurkar** (2012). "Enzyme synthesis by fermentation method: a review." *Sci Rev Chem Comm* 2(4): 58.
- Rocha, N. R. d. A. F., M. A. Barros, J. Fischer, U. Coutinho Filho ve V. L. Cardoso** (2013). "Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*." *Renewable Energy*, 57, 432-435.
- Rodríguez-Jasso, R. M., S. I. Mussatto, L. Sepúlveda, A. T. Agrasar, L. Pastrana, C. N. Aguilar ve J. A. Teixeira** (2013). "Fungal fucoidanase production by solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor using algal biomass as substrate." *Food and Bioproducts Processing* 91(4): 587-594.
- Romero-Gomez, S., C. Augur ve G. Viniegra-González** (2000). "Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation." *Biotechnology letters*, 22(15), 1255-1258
- Rosales, E., S. R. Couto ve M. A. Sanromán** (2007). "Increased laccase production by *Trametes hirsuta* grown on ground orange peelings." *Enzyme and Microbial Technology* 40(5): 1286-1290.

- Roussos, S., M. Raimbault, J.-P. Prebois ve B. Lonsane** (1993). "Zymotis, a large scale solid state fermenter design and evaluation." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 42(1): 37-52.
- Ruiz, H. A., D. P. Silva, D. S. Ruzene, L. F. Lima, A. A. Vicente ve J. A. Teixeira** (2012). "Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain–Effect of process conditions." *Fuel*, 95, 528-536.
- Sandhya, C., A. Sumantha, G. Szakacs ve A. Pandey** (2005). "Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation." *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
- Saucedo-Castaneda, G., B. Lonsane, M. Krishnaiah, J. Navarro, S. Roussos ve M. Raimbault** (1992). "Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system." *Process Biochemistry*, 27(2), 97-107.
- Schmidt, F.R.** (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes, *Appl Microbial Biotechnol*, 68: 425-435.
- Schutyser, M., P. De Pagter, F. Weber, W. Briels, R. Boom ve A. Rinzema** (2003). "Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: experiments and modeling." *Biotechnology and bioengineering* 83(5): 503-513
- Selen, V.** (2006). *Bacillus Amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretiminin katı substrat fermentasyonu ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Silva, E. M. ve S. T. Yang** (1998). "Production of Amylases from Rice by Solid-State Fermentation in a Gas–Solid Spouted-Bed Bioreactor." *Biotechnology progress* 14(4): 580-587.
- Singhania, R. R., A. K. Patel, C. R. Soccol ve A. Pandey** (2009). "Recent advances in solid-state fermentation." *Biochemical Engineering Journal* 44(1): 13-18.
- Singhania, R. R., R. K. Sukumaran ve A. Pandey** (2007). "Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 142(1): 60-70.
- Solis-Pereira, S., E. Favela-Torres, G. Viniegra-González ve M. Gutiérrez-Rojas** (1993). "Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by

- Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations." Applied Microbiology and Biotechnology, 39(1), 36-41.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J.** (1997). Principles of Fermentation Technology, Aditya Books, New Delhi.
- Stuart, D. M.** (1996). "Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors."
- Subramaniam, R.ve R. Vimala** (2012). "Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study." Int J Sci Nat 3: 480-486.
- Sukumprasertsri, M., P. Unrean, J. Pimsamarn, P. Kitsubun ve A. Tongta** (2013). "Fuzzy logic control of rotating drum bioreactor for improved production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation." Journal of microbiology and biotechnology 23(3): 335-342.
- Tanyildizi, M. ve D. Özer** (2011). "An Investigation of α -amylase production in semi solid substrate fermentation by using corn bran with *Bacillus amyloliquefaciens*." Turkish Journal of Science & Technology, 6(1), 47-52.
- Tanyıldızı, M. Ş.** (2005). Çeşitli bakteri türleriyle farklı ortam ve çalışma şartlarında α -amilaz üretiminin incelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Téllez-Jurado, A., A. Arana-Cuenca, A. G. Becerra, G. Viniegra-González ve O. Loera** (2006). "Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations." Enzyme and microbial technology, 38(5), 665-669.
- Toksoy Öner, E.** (2006). "Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain." Yeast, 23(12), 849-856.
- Tripathi, C.K.M., Praveen, V., Tripathi, D. and Bihari, V.** (2008). Nutritional regulation of Actinomycin-D production by a new isolate of *Streptomyces sindenensis* using statistical methods, Indian J Exp Biol, 46: 138-144.
- TÜİK** (2014). Sanayi Ürünleri Yıllık Üretim ve Satış İstatistikleri, 2005 - 2014.
- Van Der Maarel, M. J., B. Van Der Veen, J. C. Uitdehaag, H. Leemhuis ve L. Dijkhuizen** (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family." Journal of Biotechnology, 94(2), 137-155.
- Viniegra-González, G., E. Favela-Torres, C. N. Aguilar, S. de Jesus Romero-Gomez, G. Diaz-Godínez ve C. Augur** (2003). "Advantages of fungal enzyme production

in solid state over liquid fermentation systems." *Biochemical Engineering Journal* 13(2): 157-167.

- Wolski, E., E. Menusi, D. Remonatto, R. Vardanega, F. Arbter, E. Rigo, J. Ninow, M. A. Mazutti, M. Di Luccio ve D. de Oliveira** (2009). "Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid state and submerged fermentation: A comparative study." *LWT-Food Science and Technology*, 42(9), 1557-1560.
- Wood, C., T. Kumiawati ve S. Öztürk** (2008). BIOT 358-Effects of microsparger surface area and pore size on mass transfer in a development bioreactor. ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA.
- Wu, J.** (1995). "Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives." *Journal of Biotechnology*, 43(2), 81-94.
- Xiao, Y.-Z., D.-K. Wu, S.-Y. Zhao, W.-M. Lin ve X.-Y. Gao** (2015). "Statistical optimization of alkaline protease production from *Penicillium citrinum* YL-1 under solid-state fermentation." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 45(5): 447-462.
- Xie, L., H. M. Chen ve J. B. Yang** (2013). Conidia production by *Beauveria bassiana* on rice in solid-state fermentation using tray bioreactor. *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publ.
- Zhang, Q., Z. Wang, S. Wen, G. Liu, X. Wu ve W. Cong** (2012). "Gas-Liquid Mass Transfer Characteristics in a Rotating-Drum Bioreactor." *Chemical Engineering & Technology*, 35(10), 1842-1848.

EKLER

Ek 1.

Tablo E 1.1 Mısır kepeğinin bileşimi.

Analiz	Sonuç	Yöntem
Metabolik Enerji	3067 kcal/kg	TS 9610
Kül	6,66 g/100 g	AOAC Ofical Method 923.03 2005
Protein	19,25 g/100 g	AOAC Ofical Method 960.52
Nişasta	18g/100 g	(Tanyıldızı, 2005)
Asit hidrolizli yağ	2,91 g/100 g	Tecator Soxhlet System HT Application
Selüloz	%8,80	Fibertech cihaz el kitabı
Nem	7,64 g/100 g	AOAC Ofical Method 925.10 2005
L-Alanin (Ala)	1371 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
Glisin (Gly)	797 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Valin (Val)	1130 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Lösin (Leu)	1989 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-İsolösin (İle)	878 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Treonin (Thr)	477 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Serin (Ser)	581 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Prolin (Pro)	1910 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Arjinin (Arg)	101 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Aspartik asit (Asp)	1697 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Metionin (Met)	291 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Glutamik asit (Glu)	3520 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Fenilalanin (Phe)	811 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Lizin (Lys)	656 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Histidin (His)	349 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)
L-Tirozin (Tyr)	416 mg/100 g	D.05.G106 (İşletme İçerik Metodu UFLC - UV)

ÖZGEÇMİŞ

Muhammet Ali UYGUT
muygut@firat.edu.tr

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri: Kayseri
Doğum Tarihi: 14.09.1991
Yabancı Dil: İngilizce

EĞİTİM BİLGİLERİ

2009-2013: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
2005-2009: Kayseri Anadolu Lisesi, Sayısal Bilimler

İŞ TECRÜBESİ

Araştırma Görevlisi, F.Ü. Müh. Fak., Biyomühendislik Bölümü (Aralık 2013-devam ediyor)
Araştırmacı, SUNY-ESF, Bioprocess Engineering, (Temmuz 2014-Ekim 2014)
Staj, Konya Şeker A.Ş.-Biyoeanol Fabrikası, (Temmuz 2012- Ağustos 2012)

YAYINLAR

Uygut M.A ve Tanyildizi, M. (2016). " Optimization of Alpha-Amylase Production by *Bacillus amyloliquefaciens* Grown on Orange Peels" Iran. J. Sci. Technol. Trans. Sci., 1(2), 1-7.

Uygut M.A., Tanyıldızı M.S., Elcicek S., Kalender, M., Utilization of Orange Peels for the Production of α -Amylase under Semi Solid State Fermentation by *Bacillus Amyloliquefaciens*, 7ND INTERNATIONAL BIOENGINEERING CONGRESS (BEC 2015), Ege University, 18-21 NOV 2015, Abstract Book, 32, İzmir.

Uygut, M., Corbett, D., Wood, C., Zelig, M. ve Bujanovic, B. Potential for enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar maple (*Acer saccharum*). 249th ACS National Meeting and Exposition on the Chemistry of Natural Resources, (2015, Mart), Denver, ABD.

Uygut M.A., Tanyıldızı M.S., Topdemir A., Kalender, M., Production of α -Amylase by *Bacillus Amyloliquefaciens* under Solid State Fermentation, 7ND INTERNATIONAL BIOENGINEERING CONGRESS (BEC 2015), Ege University, 18-21 NOV 2015, Abstract Book, 112, İzmir.

Özlü M., Ay S., Uygut M.A., CuO Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi, Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi, IV. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, 7-8 Nisan 2016, Bildiriler Kitabı, 21, Elazığ.

Yıldız Ş., Yeşiltaş G., Uygut M.A., Alfa-Amilaz Üreticisi Yeni Fungal Suşların İzolasyonu, IV. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, 7-8 Nisan 2016, Bildiriler Kitabı, 33, Elazığ.

PROJELER

Döner Tambur Biyoreaktör Tasarımı ve α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi, TÜBİTAK 115 M 502, Bursiyer 2015-2016.

Katı Hal Biyoreaktöründe α -Amilaz Üretiminin İncelenmesi, FÜBAP MF.15.06, Araştırmacı, 2015-2016.