

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) MİKROORGANİZMASI KULLANILARAK
FARKLI FERMANTATİF ŞARTLARDA L-DOPA VE DOPAMİN ÜRETİMİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem ÇAKMAK

(132118101)

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Dursun ÖZER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 26 Aralık 2016

ARALIK-2016

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) MİKROORGANİZMASI KULLANILARAK
FARKLI FERMANTATİF ŞARTLARDA L-DOPA VE DOPAMİN ÜRETİMİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem ÇAKMAK

(132118101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 Aralık 2016
Tezin Savunulduğu Tarih : 10 Ocak 2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dursun ÖZER (Fırat Üni.)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülbeyi DURSUN (Fırat Üni.)

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL (İnönü Üni.)

ARALIK-2016

ÖNSÖZ

Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, hiçbir konuda anlayışını ve desteğini esirgemeyen değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Dursun ÖZER’e sonsuz teşekkürlerimi ve saygımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince karşılaştığım sorunların çözümünde büyük bir özveriyle yardımlarını sunan ve değerli tecrübeleriyle çalışmalarımın yürütülmesine önemli katkılar sağlayan Arş. Gör. Dr. Veyis SELEN’e büyük bir içtenlikte teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından ‘2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı’ kapsamında desteklenmiştir. Verdikleri destekten dolayı TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her konuda en büyük desteği gördüğüm ve her zaman bana güvenip yanımda olan sevgili babam, annem ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meltem ÇAKMAK

ELAĞIĞ-2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	II
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	X
SİMGELER LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. FERMANTASYON	3
2.1. Fermantasyon Sürecindeki İşlem Basamakları	4
2.1.1. Fermantasyon ortamının hazırlanması	4
2.1.2. Fermantasyon Ortamının Sterilizasyonu	4
2.1.3. Mikroorganizmanın Ortama Aşılması	5
2.1.4. Fermantasyon Süreci	5
2.1.5. Ayırma İşlemleri	5
2.1.6. Ürünlerin Kazanılması ve Saflaştırma	6
2.2. Fermantasyon Proseslerinde Üretimi Etkileyen Faktörler	6
2.2.1. Mikroorganizmanın Seçimi	7
2.2.2. Ortam Bileşimi	7
2.2.3. Biyoreaktör İşletim Türü	10
2.2.4. Biyoreaktör İşletim Parametreleri	15
2.2.4.1. Sıcaklık	15
2.2.4.2. pH	17
2.2.4.3. Oksijen Transferi	18
3. MİKROBİYAL BÜYÜME VE ÜRÜN OLUŞUM KİNETİĞİ	24
3.1. Kesikli Sistemde Mikroorganizma Üremesi	24
3.2. Kesikli Sistemde Mikroorganizma Üreme Evreleri	24
3.3. Substrat Tüketimi	29
3.4. Ürün Oluşumu	30
3.5. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması	32
3.5.1. Monod Eşitliği ile μ_{max} ve K_s 'in Hesaplanması	32
3.5.2. $Y_{X/S}$ ve m 'in Hesaplanması	33
4. L-DOPA ve DOPAMİN	36
4.1. L-DOPA (Levodopa)	36

4.2. Dopamin	37
4.3. Parkinson Hastalığı.....	38
4.4. L-DOPA ve Dopamin'in Bakteriyel Sentezi	40
4.4.1. L-DOPA Sentezi.....	40
4.4.2. Dopamin Sentezi	43
4.4.3. L-DOPA ve Dopamin Sentezinde Rol Alan Temel Maddeler	43
5. MATERYAL VE METOT	47
5.1. Mikroorganizmalar	47
5.2. Mikroorganizma Büyüme Şartları ve Ortamı	47
5.3. Fermantasyon Ortamı	49
5.4. Biyoreaktör İşletim Şartları	50
5.5. Analitik Yöntemler	51
5.5.1. Biyokütle Derişimi	51
5.5.2. L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi.....	51
5.5.3. Sıvı Faz Hacimsel Kütle Aktarım Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızı	52
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	53
6.1. <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile L-DOPA ve Dopamin Üretimi.....	53
6.1.1. Karbon Kaynağının Etkisi	54
6.1.2. Organik Azot Kaynaklarının Etkisi	56
6.1.3. İnorganik Azot Kaynaklarının Etkisi.....	67
6.1.4. Diğer Bileşenlerin Etkisi	69
6.1.5. Başlangıç Ortam pH'sının Etkisi.....	72
6.1.6. Başlangıç Mikroorganizma Konsantrasyonunun Etkisi	74
6.1.7. Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi.....	76
6.1.8. Çalkalama Hızının Etkisi.....	78
6.2. Kesikli Olarak İşletilen Biyoreaktörde L-DOPA ve Dopamin Üretimi	81
6.2.1. Hava Giriş Hızının Etkisi	81
6.2.2. Oksijen Aktarımı Etkisi	83
7. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	85
8. KAYNAKLAR.....	87
9. EKLER	94
ÖZGEÇMİŞ	99

ÖZET

Yapılan bu çalışmada Parkinson hastalığının tedavisi için oldukça önemli olan nörotransmitter özelliği taşıyan L-DOPA ve Dopamin kimyasallarının *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) mikroorganizması kullanılarak fermentasyonla üretimi gerçekleştirilmiştir. Bahsedilen bu maddelerin üretimini maksimum düzeye çıkaracak doğal bileşenlerin çoğunlukta olduğu fermentasyon ortamının optimum özellikleri belirlenmiştir. Deneyler 250 ml'lik erlenlerde ve 1 L hacmindeki biyoreaktörde kesikli olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, karbon kaynağı (sakkaroz), organik (pepton, yeast ekstrakt, üre, kazein, tirozin, soya proteini, peynir altı suyu) ve inorganik (amonyum sülfat, sodyum nitrat) azot kaynakları ile bunların konsantrasyonlarının yanı sıra pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve oksijen transfer hızının etkileri de incelenmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda, L-DOPA ve Dopamin'in maksimum üretimine sırasıyla 458 mg L⁻¹ ve 592 mg L⁻¹ değerlerinde, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, % 2.5 mikroorganizma kültürü v v⁻¹ içeren fermentasyon ortamında ve 33 °C ortam sıcaklığında, 6.5 başlangıç pH değeri ile 200 rpm çalkalama hızına ayarlanmış fermentasyon şartlarında ulaşılmıştır. Kesikli olarak işletilen biyoreaktörde yapılan deneylerle de hava giriş hızının artışına paralel olarak hacimsel kütle aktarım katsayısı (k_{La}) ve oksijen tüketim hızı (r_o) değerlerinin arttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: L-DOPA, Dopamin, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643), Parkinson Hastalığı, Fermentasyon, Kesikli fermentasyon, Biyoreaktör işletim parametreleri, Biyoteknoloji.

SUMMARY

Investigation of L-DOPA and Dopamine Production in Different Fermentative Conditions by Using *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) Microorganism

In this study, production of L-DOPA and Dopamine chemicals which are very important for treatment of Parkinson's disease and showing neurotransmitter feature were carried out by fermentation using of *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) microorganism. To maximize the production of these substances, the optimum properties of the fermentation medium which are mostly consist of natural components were determined. The experiments were performed using 250 ml shake-flasks and 1.0 L batch operated bioreactor.

As a result of experiments which are performed, the maximum production amount of L-DOPA and Dopamine of 458 mg L^{-1} and 592 mg L^{-1} respectively, in the optimum fermentation medium which are containing 10 g L^{-1} yeast extract, 12.5 g L^{-1} peptone, 2.5 g L^{-1} sucrose, 1 g L^{-1} NaCl, 0.1 g L^{-1} casein, 0.75 g L^{-1} soy protein, 1 g L^{-1} ammonium sulfate, 1 g L^{-1} calcium chloride, % 5 v v⁻¹ whey, % 2.5 v v⁻¹ microorganism culture and fermentation conditions which is operated at 33 °C temperature, initial pH of 6.5 and adjusted to shaking speed of 200 rpm, were reached. In experiments which are performed in batch operated bioreactor, it was observed that the volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) and oxygen consumption rate (r_o) increased in parallel with increase of air inlet velocity.

Key Words: L-DOPA, Dopamine, *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643), Parkinson Disease, Fermentation, Batch Fermentation, Bioreactor parameters, Biotechnology.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Mikroorganizmaların sıcaklığa olan ilgilerine göre dağılımı	16
Şekil 2.2. pH'ın mikroorganizmaların spesifik büyüme hızına etkisi	18
Şekil.2.3. Oksijenin besin ortamındaki mikroorganizmaya transferi	19
Şekil 2.4. Çözünmüş oksijen derişiminin hava beslemesiyle değişimi	21
Şekil 2.5. Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının belirlenmesi	23
Şekil 3.1. Substratın kullanımıyla oluşan ürünler	24
Şekil 3.2. Mikroorganizma büyüme evreleri	25
Şekil 3.3. Spesifik büyüme hızının bulunması	27
Şekil 3.4. Biyokütlenin zamana bağlı değişimi	28
Şekil 3.5. Ürün üretim şekilleri	31
Şekil 3.6. μ_{max} ve K_S 'in hesaplanması	32
Şekil 3.7. Ürün oluşum parametrelerinin bulunması	34
Şekil 4.1. L-DOPA'nın molekül ve 3 boyutlu yapısı	36
Şekil 4.2. Dopamin'in molekül ve 3 boyutlu yapısı	37
Şekil 4.3. Tirozinin moleküler yapısı	45
Şekil 5.1. Biyoreaktör Düzenegi	50
Şekil 6.1. Farklı sakkaroz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	55
Şekil 6.2. Farklı sakkaroz derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	55
Şekil 6.3. Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	58
Şekil 6.4. Farklı pepton derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	58
Şekil 6.5. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	60
Şekil 6.6. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	60
Şekil 6.7. Farklı kazein derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	62
Şekil 6.8. Farklı kazein derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	62
Şekil 6.9. Farklı soya derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	64

Şekil 6.10. Farklı soya derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	64
Şekil 6.11. Farklı peynir altı suyu derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	66
Şekil 6.12. Farklı peynir altı suyu derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	66
Şekil 6.13. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	68
Şekil 6.14. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	68
Şekil 6.15. Farklı CaCl ₂ derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile	71
Şekil 6.16. Farklı CaCl ₂ derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	71
Şekil 6.17. Farklı pH değerlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	73
Şekil 6.18. Farklı pH değerlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	73
Şekil 6.19. Farklı ekim derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	75
Şekil 6.20. Farklı ekim derişimlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	75
Şekil 6.21. Farklı sıcaklık değerlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	77
Şekil 6.22. Farklı sıcaklık değerlerinde <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	77
Şekil 6.23. Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	79
Şekil 6.24. Farklı çalkalama hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi	79
Şekil 6.25. Farklı havalandırma hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	82

Şekil 6.26. Farklı havalandırma hızlarında <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) ile yapılan deneyde biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	82
Şekil E1.1. 600 nm’de <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2633) Konsantrasyonu İçin Çalışma Doğrusu	94
Şekil E4.1. Havanın kesilmesiyle çözünmüş oksijen derişimin zamanla değişimi	97
Şekil E4.2. Mikroorganizmanın oksijen tüketim hızının belirlenmesi.	98



TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Parkinson tedavisinde kullanılan temel ilaçlar	39
Tablo 5.1. Luria-Bertani (LB) besi ortamı	47
Tablo 5.2. HPLC çalışma şartları	51
Tablo 6.1. L-DOPA ve Dopamin üretimi için tasarlanan optimum ortam bileşenleri	80
Tablo 6.2. <i>Citrobacter freundii</i> (NRRL B-2643) mikroorganizması ile yapılan deneylerde farklı hava giriş hızlarında r_o ve k_{La} değerlerinin zamanla değişimi	84

SİMGELER LİSTESİ

x_0	:	Başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu (mg L^{-1})
x	:	Mikroorganizma konsantrasyonu (mg L^{-1})
μ	:	Spesifik büyüme hızı (zaman^{-1})
k_d	:	Ölüm hızı sabiti (zaman^{-1})
t	:	Zaman
N_{O_2}	:	Oksijen transfer hızı ($\text{mg L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
k_{La}	:	Hacimsel sıvı faz kütle aktarım katsayısı (s^{-1})
C_L	:	Sıvı ortamdaki çözünmüş oksijen derişimi (mg L^{-1})
C^*	:	Sıvı ortamdaki çözünmüş oksijenin doygunluk derişimi (mg L^{-1})
r_o	:	Oksijen tüketim hızı ($\text{mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$)
N_o	:	Başlangıçtaki mikroorganizma sayısı
N	:	t anındaki mikroorganizma sayısı
t_{lag}	:	Lag fazı süresi
r_X	:	Mikroorganizma büyüme hızı
r_S	:	Substrat tüketim hızı
r_P	:	Ürün oluşum hızı
$Y_{X/S}$	:	Hücre için verim faktörü ($\text{g hücre g substrat}^{-1}$)
$Y_{P/S}$	:	Ürün için verim faktörü ($\text{g ürün g substrat}^{-1}$)
M	:	Hücre için yaşam katsayısı ($\text{g substrat g hücre}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
α	:	Üremeye bağlı ürün oluşum sabiti
β	:	Üremeye bağlı olmayan ürün oluşum sabiti
μ_{max}	:	Maksimum büyüme hızı
K_s	:	Monod doygunluk sabiti (g L^{-1})

1. GİRİŞ

Geçtiğimiz yıllardan günümüze kadar canlı organizmalardan ve bu organizmaların içinde bulunduğu biyolojik süreçlerden faydalanarak ihtiyaç duyulan gıda, tekstil ve sağlık sektörüne yönelik çeşitli ürünlerin üretimi sağlanmıştır [1]. Örneğin; maya, ekmek, yoğurt, peynir, şarap ve sirke gibi ürünler kültür mikroorganizmalarının yardımıyla geçmişten beri üretilse de son yıllarda biyoteknolojik proseslerin kullanımında kaydedilen ilerlemeler sayesinde geniş bir yelpazeye sahip ürün ağı oluşturulmuştur [2].

Özellikle bazı ürünlerin üretiminde biyoteknolojik proseslerin kimyasal proseslere göre daha avantajlı olması hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerin ekonomik büyümeye yönelik önceliklerinden birisi haline gelmiştir. Bahsedilen bu avantajlar üretim için kullanılan mikroorganizmaların ucuz ve kolay ulaşılabilir besin maddelerini kullanarak çeşitli ürünlerin üretimini gerçekleştirebilmesine ek olarak temel ekipman maliyetlerinin de kimyasal proseslere oranla daha düşük olmasıdır. Bu avantajlardan dolayı son zamanlarda oldukça fazla tercih edilmektedir [3]. Mikrobiyal proseslerde, örneğin ilaç olarak kullanılması planlanan bir madde fermantasyon yöntemi ile bakteri hücrelerinde yüksek miktarda üretilmekte ve daha sonra bu maddeler üretim ortamından saflaştırılmaktadır.

Dünya genelinde ortalama yaşam süresinin geçtiğimiz yıllara oranla arttığı istatistiksel veriler ışığında belirlenmiştir. Ülkemizde ve dünyada geçtiğimiz yüzyıldan bu yana insanların yaşam sürelerinde ve buna paralel olarak 65 yaş ve üzerindeki nüfusta da belirli bir artış olmuştur [4]. Bu artışın temel nedeni bilim ve teknoloji alanında yaşanan gelişmelerle insanların yaşam koşullarının iyileştirilmesi, karşılaşılan hastalıklar üzerine yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmiş olmasıdır. Yaşanan bu gelişmeler sonucunda yaşlı nüfusun artışına paralel olarak, ileri yaş hastalıklarından olan Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif (sinir hücrelerinde meydana gelen hasar) hastalıklar, toplumlarda daha çok görülür hale gelmiştir [5]. Tüm bu nedenler göz önüne alındığında nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson hastalığına karşı biyoteknolojik yöntemlerle ilaç üretilmesi bu hastalığın tedavisine önemli bir katkı sağlayacaktır.

Yapılan bu çalışmada *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) mikroorganizması kullanılarak Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan L-DOPA ve Dopamin gibi iki önemli kimyasalın üretiminin maksimum düzeyde gerçekleştirilebilmesi için fermantasyon ortam bileşenleri ve koşullarının optimize edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmalar erlenlerde ve kesikli olarak işletilen biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Farklı fermantasyon ortamlarında yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine karbon, organik ve inorganik azot kaynakları ile bunların konsantrasyonlarının yanı sıra, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve oksijen transfer hızı gibi fiziksel parametrelerin etkileri de incelenmiştir. Özellikle doğal maddelerin kullanımının tercih edildiği deneyler sonucunda maksimum miktarda L-DOPA ve Dopamin üretiminin gerçekleştirildiği optimum ortam koşulları belirlenmiştir.

2. FERMANTASYON

Fermantasyon, canlı hücresel materyaller, kimyasal bileşikler, enzimler, amino asitler ve diğer biyolojik esaslı ürünlerin üretilmesi amacıyla mikroorganizmaların yüksek molekül ağırlığına sahip olan organik maddeleri aerobik ya da anaerobik şartlar altında kullanmasıyla daha düşük molekül ağırlığındaki maddelere dönüştürme sürecidir [6]. Ayrıca mikroorganizmaların organik bileşenleri parçalamasıyla enerji üretimi de sağlanır. Fermantasyon süreci genel olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir;

Substrat + Hücre $\longrightarrow$ Hücre dışı ürünler + Daha fazla hücre

Yukarıda yazılan hücre dışı ürünler fermantasyon ürünleri olarak da adlandırılabilir. Bu ürünler öncelikli olarak üretilmek istenen primer ve sekonder metabolitler ile diğer yan ürünlerdir.

Fermantasyon olayının gerçekleşebilmesi için öncelikle mikroorganizmaların uygun bir şekilde çoğaltılması gerekmektedir. Bu çoğaltma olayı mikroorganizmaların uygun şekilde üreyebilmesi için ihtiyaç duydukları bazı maddeleri içeren ortamlarda gerçekleştirilir ve bu ortamlara da **besiyeri** adı verilir [7].

Besiyeri bileşiminde yer alan maddeler şu şekildedir;

- Su
- Karbon ve enerji kaynağı olan maddeler: glikoz, sakkaroz, melas, buğday kepeği vb.
- Azot kaynağı olan maddeler: protein, pepton, maya ekstraktı, amino asitler vb.
- İnorganik maddeler: sodyum klorür, sodyum nitrat vb.
- Üreme faktörleri: vitaminler, aminoasitler, pürinler, pirimidinler vb.

2.1. Fermantasyon Sürecindeki İşlem Basamakları

Fermantasyon prosesindeki işlem basamakları sırasıyla aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir.

1. Fermantasyon ortamının hazırlanması,
2. Hazırlanan ortam ve proseste kullanılacak diğer malzemelerin sterilizasyon işlemine tabi tutulması,
3. Mikroorganizmaların steril ortama aşılması,
4. Fermantasyon sürecinin başlaması,
5. Fermantasyon süreci sonunda ortamdaki katı ve sıvı maddelerin ayrılması,
6. Sıvı kısımdaki ürünün saflaştırılarak elde edilmesi.

İstenilen nitelikte bir fermantasyon prosesi gerçekleştirebilmek için yukarıda verilen işlem basamaklarından her birinin dikkatli bir şekilde uygulanması çok önemlidir.

2.1.1. Fermantasyon ortamının hazırlanması

Fermantasyon ortamlarında mikrobiyal büyümenin gerçekleşebilmesi için suyun varlığı çok önemli bir etkidir. Çünkü ortamdaki besin maddeleri suda çözünür ve ancak bu yolla hücreye transfer olur ve fermantasyon ürünleri de su aracılığıyla ortama salınır. Ayrıca mikroorganizmalar çoğalıp gelişebilmek için su faktörünün yanında temel olarak organik karbon ve organik-inorganik azot kaynakları ile oksijen, fosfat, kükürt, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir gibi bazı elementlere de ihtiyaç duyarlar. Ortam hazırlanırken ihtiyaç duyulan bu maddelerin mikroorganizmalar tarafından kolay kullanılabilir nitelikte olmasına özen gösterilmelidir [8].

2.1.2. Fermantasyon Ortamının Sterilizasyonu

Besiyerinin sterilizasyonu, istenilen üretimi gerçekleştirebilmek ve ortamda yabancı mikroorganizmaların üremesini engellemek açısından oldukça önemlidir. Fermantasyon sürecinde besiyerinin sterilizasyonu yanında bu süreçte kullanılacak diğer tüm malzemelerin de steril hale getirilmesi gerekmektedir. Sterilizasyonda sıcaklık temel bir kavram olduğu için besiyeri içeriğindeki tüm maddelerin termal bozunma aktivasyon enerjilerinin önceden bilinerek işlem esnasında dikkate alınması ve sterilizasyonun ortamdaki mikroorganizmaları öldürecek fakat besiyeri bileşimine zarar vermeyecek koşullarda gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Sterilizasyon işlemlerinde “yüksek sıcaklık - kısa süre” uygulaması genel bir kural olarak kabul edilmekte ve uygulanmaktadır.

2.1.3. Mikroorganizmanın Ortama Aşılması

Mikroorganizma kültürleri genellikle buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmektedir. Ayrıca mikroorganizmaların derin dondurucuda -26 °C’de, sıvı azot içerisinde -196 °C’de, donmuş halde veya liyofilize stok kültürleri hazırlanarak kuru formda canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklanması mümkündür [9].

Bahsedilen yollardan biriyle uygun bir şekilde muhafaza edilen mikroorganizmalar erlenlerde çoğaltılarak esas üretimin gerçekleştirileceği fermentör ya da erlene aşılanırlar. Mikroorganizmaları çoğaltmak için kullanılan besin ortamı fermentasyon prosesinin gerçekleştirileceği üretim ortamına içerik olarak benzer özellikte seçilmelidir. Bu durum mikroorganizmanın üretim ortamına kolay alışması ve lag fazının kısılması açısından bir avantajdır.

2.1.4. Fermentasyon Süreci

Ön ekim ile çoğaltıldıktan sonra fermentasyon ortamına aşılanan mikroorganizmalar ortama uyum sağladıktan sonra besiyerindeki bileşenleri kullanarak bir yandan biyosentez yoluyla ürünlerini üretirken diğer yandan belli bir noktaya kadar çoğalmaya devam eder. Bahsedilen bu fermentasyon süreci genellikle sabit sıcaklık ve çalkalama hızına ayarlanan çalkalayıcılarda gerçekleştirilir.

2.1.5. Ayırma İşlemleri

Fermentasyon süreci sonundaki sıvı ortamda ana ürünler, yan ürünler, besiyerinde mikroorganizmalar tarafından kullanılmadan kalan besin maddeleri ve mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu ortamdan ürünlerin rahat bir şekilde ayrılabilmesi için öncelikle büyük çoğunluğunu mikroorganizmaların oluşturduğu katı partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Fermentasyon sıvısından katı maddelerin ayrılması işlemi farklı şekillerde gerçekleştirilebilir. Bu yöntemler aşağıda yazıldığı gibidir [6].

Gravitasyonel olarak;

- ❖ Klasifikasyon
- ❖ Flokülasyon
- ❖ Santrifüjleme

Mekanik olarak;

- ❖ Filtrasyon
- ❖ Diyaliz

Yüzeysel olarak;

- ❖ Adsorpsiyon
- ❖ Flotasyon
- ❖ İyon değıştirme

Elektriksel olarak; Elektroforetik ayırma

Fermantasyon ortamındaki katı ve sıvı maddelerin ayrımı yukarıdaki şekillerden biriyle gerçekleştirilebilir. Fermantasyon prosesinde ürün her zaman hücre dışında olmayıp bazen hücre içinde de olabilir. Eğer istenilen ürünün hücre içi derişimi ihmal edilemeyecek düzeyde ise ayırma işlemi bu amaca uygun olarak mikroorganizma hücrelerini parçalamaya yönelik olmalıdır. Eğer ulaşılmak istenen ürün fermantasyon sıvısında bulunuyorsa bu sıvı üzerine uygulanan saflaştırma işlemleriyle ürün ortamdan ayrılabilir.

2.1.6. Ürünlerin Kazanılması ve Saflaştırma

Fermantasyon ortamında hücre içi (RNA, DNA, protein vb.) ve hücre dışı (organik asit, enzim vb.) olarak bulunan ürünler ulaşılmak istenen saflık derecelerine göre vakum kurutucu, diyaliz hücresi gibi çeşitli saflaştırma yöntemleri kullanılarak saflaştırılabilirler.

2.2. Fermantasyon Proseslerinde Üretimi Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmaların karbon, azot, fosfor, inorganik tuzlar ve vitaminler gibi bileşenleri kullanarak sentezlediği ürünlere mikrobiyal ürünler, bu ürünlerin elde edildiği ve ayırma-saflaştırma işlemlerini de içeren proseslere mikrobiyal üretim prosesi denir. Fermantasyon proseslerinde üretimi etkileyen faktörler aşağıdaki gibidir: [10]

- Mikroorganizma türü
- Ortam bileşimi
- Biyoreaktör işletim türü
- Biyoreaktör işletim parametreleri
 - pH
 - Sıcaklık
 - Oksijen transferi
 - ❖ Havalandırma hızı
 - ❖ Karıştırma hızı

2.2.1.Mikroorganizmanın Seçimi

Fermantasyon proseslerinde mikroorganizmanın seçimi istenilen nitelikteki ürünleri üretebilmenin ön koşuludur. Mikroorganizmalar birbirinden farklı ürünler üretse de aynı ürünü üretebilen mikroorganizmalar da mevcuttur. Birçok mikroorganizma için türlerin ürettikleri spesifik ürünler belirlenmişse de istenilen özellikte bir üretim sağlamak için mikroorganizma türleri detaylı bir şekilde araştırılmalıdır [10]. Türlerin belirlenmesi ortamda oluşan ürünlerin takibi ve mikroorganizmanın ürün üretme kapasitesinin net olarak tespiti gibi bazı faktörler açısından bir avantaj oluşturmaktadır. Bahsedilen bu avantajların aksine bir durumla karşılaşmamak için mikroorganizma fermantasyon ortamına mümkün olduğunca yabancı mikroorganizmalardan izole edilerek saf bir şekilde aşılmalıdır. İzolasyon işlemi selektif besiyerlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir.

Selektif besiyeri; yabancı mikroorganizmanın yararlanamayacağı kompleks besin maddelerini ve yabancı mikroorganizmaları baskılayacak fakat istenen hedef mikroorganizmaya zarar vermeyecek bazı özel kimyasallar ile gelişme faktörlerini içermelidir [11].

2.2.2. Ortam Bileşimi

Hedef ürünün üretimini gerçekleştirecek mikroorganizma türü belirlendikten sonra fermantasyon prosesi için gerekli ortam bileşenlerinin optimizasyonu sağlanmalı ve ürün miktarını maksimum düzeye çıkaracak şekilde planlanmalıdır. Bu ortam, mikroorganizma gelişmesine, çoğalmasına ve ürün sentezine olanak sağlamalıdır. Bir mikroorganizmanın maksimum gelişme gösterdiği ortam ile maksimum ürün üretimi gerçekleştirdiği ortamın özellikleri birbirinden farklı olabilir bundan dolayı ortam tasarımı yapılırken bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Mikroorganizmaların çoğalması için gerekli ortam bileşenleri aşağıdaki temel gruplara ayrılır:

1. Karbon, hidrojen, oksijen ve azot gibi mikroorganizma yapısının temelini oluşturan elementleri sağlayan bileşikler,
2. Yukarıda sayılan temel elementlere kıyasla ikinci derecede önemli olan fosfor, potasyum, kükürt ve magnezyum gibi elementleri sağlayan bileşikler,
3. Eser elementler,
4. Vitamin gibi metabolizmada çeşitli görevleri olan özel maddeleri sağlayan bileşiklerdir.

Mikroorganizma türü değıştikçe ihtiyaç duyulan bileşenler de değışebilir. Bu yüzden ortam kompozisyonu belirlenirken mikroorganizmanın özelliklerinin iyice araştırılması ve özel olarak hangi maddelere ihtiyaç duyulduğu net olarak belirlenmelidir. Mikroorganizma büyüme ve gelişmesinde temel olarak kullanılan besin kaynakları aşağıda açıklanmıştır.

2.2.2.1. Karbon Kaynakları

Besin ortamında karbon kaynağı olarak en çok tercih edilen bileşenler glikoz, sakkaroz, laktoz, selüloz ve nişasta gibi karbonhidratlardır. Mikroorganizmaların çoğu nişasta ve selüloz gibi kompleks karbonhidratları basit şekerlere indirgeyerek besin ve enerji kaynağı olarak kullanmakta zorlanır bunun nedeni ise büyük moleküllü olan bu maddeleri basit şekerlere indireyecek enzim sistemlerinin olmamasıdır [7]. Fermantasyon ortamına katılan bu karbon kaynakları mikroorganizmalar tarafından besin olarak kullanılmasının yanında hidrojenlerini tek tek kaybederek ortama enerji sağlaması açısından enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Bahsedilen bu maddelerin dışında hidrokarbonlar, alkoller, yağlar ve yağ asitleri de karbon kaynağı olarak kullanılabilir fakat mikroorganizmalar ortamda bulunan farklı karbon kaynakları arasında ilk olarak en kolay metabolize edebileceği maddeyi kullanmayı tercih eder. Çünkü metabolize edilmesi kolay olan kaynağı daha az enerji harcayarak parçalayabileceği için bu kaynağı öncelik verir ardından diğer kaynakları da harcayan enerji miktarına göre sırasıyla kullanır [12].

Fermente olabilen karbonhidratlar mikroorganizmalar için enerji ve karbon kaynağı oldukları gibi parçalanmaları sonucu meydana gelen organik asitler besin yerinin pH'ını düşürdüklerinden negatif bir etkiye sahiptir. Bundan dolayı besin ortamına mikroorganizmanın kullanabileceği kadar madde eklenmelidir. Karbon kaynağı çoğu proseste ürün oluşumunu hızlandırırsa da belli bir noktadan sonra ürün oluşumu üzerine inhibisyon etkisi yapabilir. Bu tür proseslerde karbon kaynağının inhibisyon etkisi yapacak kadar fazla kullanılmaması, bundan kaynaklanan karbon eksikliğinin ise ürün oluşumunu inhibe etmeyen ya da bu olayı hızlandıran başka karbon kaynaklarının ilave edilmesiyle giderilmesi gerekmektedir [6]. Yani mikroorganizmaların besin ortamlarında karbonhidrat rezervi fazla olduğu zaman mikroorganizma hücresinde protein sentezi yavaş olmakta, bu rezervler mobilize olduğunda ise protein sentezi hızlanmaktadır [13].

2.2.2.2. Azot Kaynakları

Azot kaynakları mikroorganizmalar için hücre yapısını oluşturan temel maddelerden biridir. Mikroorganizmalarda azotun önemli bir kısmı nükleik asitte bulunmaktadır [13]. Fermantasyon proseslerinde gerekli azot organik ve inorganik kökenli azot kaynaklarından sağlanır. Bu kaynaklardan amonyak, nitrat, amonyum tuzları gibi maddeler inorganik kaynakları oluştururken pepton, maya ekstraktı, üre, kazein ve soya gibi maddeler de organik azot kaynaklarını oluşturur. Mikroorganizmaların çoğu inorganik azot kaynakları içeren ortamlarda büyüyebilmekle birlikte ortam organik azot kaynaklarıyla desteklendiği zaman üreme daha hızlı olmaktadır. Bu organik azot kaynaklarını saf olarak sağlamak ekonomik açıdan avantajlı olmadığından genellikle daha ucuz olan soya, kazein, maya unu ve peynir altı suyu gibi kompleks azot kaynaklarının kullanımı tercih edilir. Diğer besin maddelerinde olduğu gibi azot kaynaklarının da aşırı kullanımı üretimi olumsuz yönde etkileyebilir [10].

Genel olarak, amino asitler gibi basit bileşikler hemen hemen tüm mikroorganizmalar tarafından yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlerden önce kullanılırlar. Ortamda basit yapıli bileşikler tükendikten sonra proteinler gibi yüksek moleküllü bileşikler parçalanmaya başlanır [7].

2.2.2.3. İz Elementler

Mikroorganizmalar besin ortamında temel olan karbon ve azot kaynaklarının dışında, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, P, S vb. elementlere de ihtiyaç duyarlar. Fosfor, kükürt ve esansiyel katyonlar genellikle inorganik tuzlardan sağlanır. Bahsedilen bu elementler çoğunlukla su ve ortamdaki diğer bileşenlerin taşıdığı safsızlıklar vasıtasıyla ortamda bulunsa da bazen ortama özellikle eklenir. Bu elementlerin fazlası mikroorganizmanın gelişimine karşı negatif etki gösterebilir ve bazıları ortamda bulunan aminoasit, protein vb. maddelerle yada oluşan ürünlerle kompleks oluşturarak alt akım işlemlerine olumsuz etki yapabilir. Oluşabilecek bu olumsuz durumları engelleyebilmek için ortam tasarımı yapılırken inhibitör etkisi gösterebilen bu elementlerin uygun miktarda eklenip fazlasının çıkarılması gerekmektedir [6].

2.2.2.4. Diğer Bileşenler

Mikroorganizmalar bazı durumlarda büyüebilmek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyabilirler [6,14]. Pek çok mikroorganizma bu bileşikleri sentezleyebilse de belirli bazı organizmalar bunlardan bir ya da birkaçını çevreden almak zorundadırlar. Vitaminler en yaygın büyüme faktörleridir ve çoğu vitamin koenzimlerinin bir parçası olarak işlev görür. Mikroorganizmalar genellikle koenzimlerini sentezleyebilirler fakat bazıları bunu yapamazlar. Tiamin, biyotin, pantotenik asit, folik asit, riboflavin gibi maddeler büyüme faktörü olarak kullanılan maddelerdendir [15].

2.2.3. Biyoreaktör İşletim Türü

Biyoreaktörler veya fermentörler; mikrobiyal ürünlerin üretildiği herhangi bir biyoteknoloji bazlı üretim prosesinin başlangıç materyalleri ile son ürünü arasındaki bağlantıyı sağlayan temel araçlardır. Bir biyoreaktörün, belli bir prosesin gereklerini ve spesifik ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde tasarımı yapılmalıdır. Reaktörün tasarımı, son ürün veya hizmetin hem maliyetini hem de kalitesini belirlediğinden bir biyoreaktörün veya bir biyoteknolojik prosesin herhangi bir bileşeninin tasarımında en önemli unsur yüksek kaliteli bir ürün elde etmek ve hizmetin üretim maliyetini minimize etmektir. Mikrobiyal ürünlerin üretilmesinde kullanılan iki temel proses vardır. Bunlar; daldırmalı (derin) kültür tekniği ve yüzey kültür tekniği (katı hal fermantasyonu) 'dir.

2.2.3.1. Daldırmalı Kültür Tekniği

Sıvı ortamda çözünmüş ya da bu ortamda süspansiyon halinde bulunan besin maddelerini kullanan süspanse mikroorganizmaların besin ortamında geliştirilmesi tekniğidir. Daldırmalı kültür tekniği olarak en yaygın kullanılan metod, mikroorganizmanın aşılınmış olduğu sıvı kültürün çalkalanmasıdır. Bu sayede mikroorganizmalar substrat yüzeyinde bulunan havayı maksimum düzeyde kullanabilir. Çalkalama işlemi için dairesel veya yatay hareketler yapan çalkalayıcılara yerleştirilen erlenler, belirlenen hız ve sıcaklıkta, istenilen süreyle çalkalanırlar. Fakat daha büyük hacimdeki çalışmalar için bu tarz bir çalkalayıcı sistem kullanmak uygun olmadığından karıştırılmalı biyoreaktörler kullanılmaktadır. Daldırmalı kültür tekniğinde kullanılabilecek farklı reaktör sistemleri mevcuttur. Bu sistemler şunlardır:

1. Mekanik iç karıştırıcılarla karıştırılan sistemler
2. Dış pompalar tarafından karıştırılan sistemler
3. Kabarcık kolonlar
4. Hava kaldırmalı reaktörler

Çeşitli sistemler bulunmasına rağmen çoğunlukla mekanik iç karıştırıcılarla karıştırılan sistemler kullanılır. Bu yöntemde, gerekli pH'a ayarlanan steril besleme sterilize edilmiş fermentörlere sürekli olarak pompalanır. Mikroorganizmanın ortama dikkatli bir şekilde aşılması sağlanır. Karıştırmanın ve bazı maddelerin etkisiyle oluşabilecek köpük için gerekirse köpük kırıcı maddeler, ortam viskozitesinin artmasıyla ortaya çıkabilecek oksijen transferi kısıtlamalarını azaltabilecek viskozite ayarlayan maddeler ve ihtiyaç duyulursa çözünürlüğünü ayarlayan maddeler de steril ortama ayrıca ilave edilir [16]. Kullanılan tanklar fermantasyon ortamının korozif özelliklerine uygun bir paslanmaz çelikten ve geniş bir basınç aralığında çalışacak şekilde dizayn edilir. Aerobik mikroorganizmaların kullanıldığı proseslerde fermantasyon ortamına steril hava verilmesi ve ayrıca oksijenin gaz fazdan sıvı faza transferi için ortamın karıştırılması gerekmektedir. Ortama verilen havanın sterilizasyonu için kullanılan iki temel proses vardır. Bunlardan birincisi, hidrofobik silikon esaslı membran filtrelerin kullanımı, diğeri ise ısıyla ön sterilize edilebilen lifli maddeleri içeren derin filtrelerin kullanımıdır [14].

Fermantasyon ortamının kontrolü oldukça önemlidir. Ortam sıcaklığı, soğutma suyunun sıcaklığı, sıvı hacmi, karıştırıcı hızı, karıştırıcı gücü, hava ve sıvı besleme hızı kültür ortamındaki köpük varlığı gibi fiziksel parametreler çeşitli cihazlar kullanılarak sürekli olarak izlenmelidir. Mekanik iç karıştırıcılarla karıştırılan sistemlerdeki fermantasyon prosesleri; kesikli, sürekli ve yarı-kesikli olarak gerçekleştirilebilir.

Kesikli Kültür Fermantasyonu: Başlangıçta gerekli olan besin maddeleri ve mikroorganizmalar fermentöre eklenir. Fermantasyon ortamında büyüme ilerledikçe besin maddeleri (nütrientler) harcanır ve mikrobiyal kütle artar. Kesikli fermantasyon için gerekli zaman, sağlanacak çalışma koşullarına göre birkaç saatten birkaç haftaya kadar değişebilir. Bahsedilen bu süre sonunda fermentör ortamına, ürünü kazanmak amacıyla çeşitli alt akım işlemleri uygulanır.

Yarı Kesikli Kültür Fermantasyonu: Substratın fazlasının fermantasyon ortamında inhibisyon etkisi yaptığı durumlarda, sınırlı karbon koşullarında çalışabilmek için yarı kesikli prosesler tercih edilir. Ayrıca oluşan ürünün yapısı kararsız olduğu zaman da yarı kesikli sistemler tercih edilir. Yüksek substratlı kesikli fermantasyonla karşılaştırıldığında yarı kesikli sistemlerde biyokütle üretimi düşmektedir. Bu durum üretim açısından bir dezavantaj olsa da fermantasyon ortamındaki kütle ve oksijen transferi olayları açısından avantajdır çünkü bahsedilen bu transfer olayları kolaylaşır. Ayrıca bu işletim şeklinde ortama substrat ilavesi yapıldığından reaktör hacminde zamanla bir artış olur. Bu reaktörler çok yaygın olmamakla birlikte penisilin gibi ikincil metabolitler ile bitki ve hayvan hücrelerinin üretiminde kullanılır.

Sürekli Kültür Fermantasyonu: Kesikli bir kültürde, kültür çevresi sürekli olarak değişir. Büyüme, ürün oluşumu ve substrat kullanımı belirli bir zaman aralığından sonra sona erer oysa sürekli kültürlerde, taze besi ortamı sürekli olarak iyi karıştırılan bir kültüre ilave edilirken ürünlerle hücreler aynı anda ve aynı oranda ortamdan çekilirler. Büyüme ve ürün oluşumu sürekli kültürde çok uzun sürelerle devam ettirilebilir. Belirli bir periyot sonunda sistem genellikle substrat, ürün ve hücre konsantrasyonunun sabit kaldığı sürekli hallere ulaşır. Sürekli kültürler, büyüme ve ürün oluşumu için sabit çevre koşulları sağladığından aynı kalitede ürün elde etme olanağı da sunar. Aynı zamanda sürekli kültürler, mikroorganizmaların çevrelerine verdikleri cevabı tayin etmede önemli bir araçtır [17].

Sürekli kültür teknikleri genel olarak kemostat ve türbidostat şeklinde gerçekleştirilir.

Türbidostat, kültürün bulanıklığının arzu edilen düzeyde tutulmasını sağlayacak şekilde besleme hızının kontrol edildiği kùltivasyon yöntemidir. Hücre konsantrasyonu belirlenen düzeyin altına düştüğünde hücre büyümesi yeterli bulanıklığı oluşturana dek türbidostatın kontrol sistemi besin bileşenlerinin ilavesini yavaşlatırken bu değeri ayar noktasını aştığında hücre konsantrasyonunu seyreltmek için besleme hızı artar.

Kemostat, Sürekli kültürlerde, substrat çözeltisi sabit bir debi ile reaktöre verilirken, reaktördeki sıvı hacminin değişmemesi için reaktör sıvısı aynı debi ile dışarı alınır. Böyle bir sistemde dengeye ulaşıldığında kemostat koşullarına ulaşılmış olur.

Sürekli kültür, klasik kesikli fermantasyon kültüründen daha yüksek verimlilik sağlaması ve spesifik substratın sınırlandırılmasıyla represyon mekanizmalarının etkilerini hafifletmesine rağmen, endüstriyel proseslerde daha sınırlı olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebini aşağıdaki maddelerle açıklayabiliriz.

- a)** Bu tarz proseslerin işletim sürelerinin uzun olmasından dolayı ortamda yabancı mikroorganizmaların oluşmasıyla fermantasyon ortamının kontaminasyonu kaçınılmaz hale gelmektedir. Sürekli fermentörlerde karşılaşılan en büyük problem bahsedilen bu kontaminasyon olayıdır ve bu risk oldukça yüksektir. Kontaminasyon kaynakları mutlaka kontrol altına alınmalıdır.
- b)** Endüstriyel açıdan önem taşıyan ve büyük çoğunluğunu sekonder metabolitlerin oluşturduğu ürünler mikroorganizma üremesi tamamlandıktan sonra başlayan durağan (sabit) evrede üretilirler yani ürün oluşumu büyümeden bağımsızdır. Bundan dolayı sürekli reaktörler sekonder metabolitlerin oluşumu için elverişli değildir. Bu tarz maddeler kesikli olarak işletilen reaktörlerde üretilirler ve ürün üretim hızları sürekli sistemlere kıyasla oldukça yüksektir.
- c)** Genetik stabilitenin sağlanması sürekli reaktörler için zor bir durumdur. Uzun işletme sürelerinden dolayı özellikle 25. jenerasyondan sonra mikroorganizmaların yapısal kararlılıkları bozulmaktadır.
- d)** Sürekli reaktörler genellikle kullanım esnekliği sağlamazlar yani bir amaca yönelik olarak tasarlanıp sadece o ürünün üretimi için kullanılabilirken kesikli bir reaktör çeşitli ürünlerin üretimini gerçekleştirmek için kullanılabilir.
- e)** Bazı metabolitlerin üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan kompleks besin ortamlarında büyümeyi sınırlayan besin maddelerinin miktarının kesin olarak belirlenememesi de sürekli proseslerin kullanımını zorlaştıran unsurlardan biridir.

2.2.3.2. Yüzey Kültür Tekniği (Katı Hal Fermantasyonu)

Bu yöntemde; sıvı, yarı katı veya katı substrat yüzeyinde gelişen mikroorganizmalar ve bunların metabolitleri besiyeri üzerinde bir zar tabakası oluştururlar. Mikroorganizmalar besiyerinin üzerindeki bu zar üzerinde gelişirler ve ürün üretirler. Oluşan bu metabolizma ürünleri ya hücre içinde kalır ya ortama salgılanır ya da her iki halde de bulunur. Bu yöntemde yüzey büyüdükçe yüzeydeki zar tabakasının (misel örtüsünün) havalandırılması da o ölçüde kolay olacağından geniş ve yayvan biçime sahip olan kaplar tercih edilir. Daldırmalı kültür fermantasyonunda besin ortamı %95'den fazla su içerirken katı hal fermantasyonunda bu oran %40 ile %80 arasında değişmektedir [8, 18, 19].

Katı hal fermantasyonu endüstride genellikle aerobik ortamda gerçekleştirildiğinden fermantasyon şartları oksijen transferine iyi bir şekilde olanak sağlayacak ve CO₂ ' yi ortamdan rahat bir şekilde uzaklaştıracak şekilde tasarlanmalıdır. Burada substrat olarak kullanılan partiküllerin büyüklüğü de oldukça önemlidir. Çünkü gaz ve ısı transferinin etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için partiküller arasındaki boşluğun optimize edilmesi gerekir. Ayrıca aerobik prosesler ekzotermik olduğu için açığa çıkan ısı sistemin hava akış hızının artırılmasıyla biraz daha kolaylaştırılabilir. Diğer sistemlerde olduğu gibi bu sistemin de kendine göre bazı avantaj ve dezavantajları vardır.

Katı hal fermantasyonunun avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- a) Kullanılan substratlar genellikle kolay elde edilebilir olduğu için daha düşük maliyet gerektirir ve bu yüzden ekonomiktir. Buğday kepeği, tahıl tanesi, baklagiller vb. en çok tercih edilen maddelerdir.
- b) Teknik olarak basit bir mekanizmaya sahip olduklarından daha az enerjiye ihtiyaç duyarlar ve bundan dolayı da kullanılan ekipmanlar düşük miktarda güç harcarlar.
- c) Nem içeriği düşük ortamlarda çalışıldığı için kontaminasyona sebep olacak bakteri türlerinin üremesi inhibe edilmiş olur.
- d) Ayrıca sistemi terkeden atık suyun daha az olması ve çalkalama olayı olmadığından köpük oluşumunun olmaması sistemin en büyük avantajlarından biridir.

Bu sistemin dezavantajları da aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

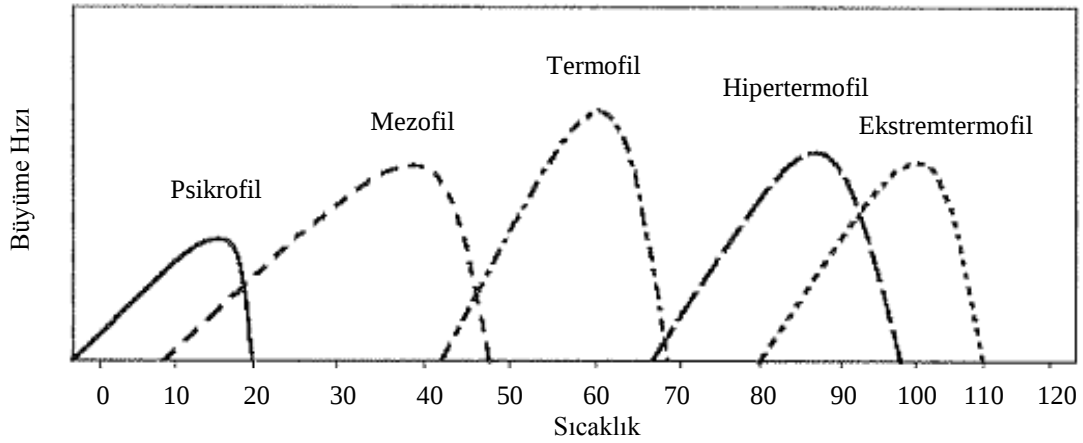
- a) Sistemin kullanımını düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen mikroorganizmalar sınırlar.
- b) Kültür homojen olmadığından proses parametrelerinin ölçümü ve sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi parametrelerin kontrolü zordur.
- c) Sistemde oluşan biyokütle miktarının ölçümü kolay değildir.
- d) Substrat için nem oranının tam olarak kontrolü güçtür.

2.2.4. Biyoreaktör İşletim Parametreleri

Fermantasyonu etkileyen sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen konsantrasyonu, karıştırma hızı, havalandırma hızı gibi faktörler biyoreaktörlerde kontrol edilmesi gereken temel parametrelerdir. Bahsedilen bu parametreler aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

2.2.4.1. Sıcaklık

Sıcaklık mikroorganizmaların canlılığını ve büyümesini etkileyen en önemli çevre faktörlerinden birisidir. Sıcaklık yükseldiğinde, hücredeki kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar daha hızlı yürür ve büyüme hızlanır. Bununla beraber, belirli bir sıcaklığın üzerinde proteinler, nükleik asitler ve diğer hücre bileşenleri geri dönüşümsüz olarak hasar görebilirler. Böylece, verilen bir aralıkta sıcaklık arttırıldığında büyüme ve metabolik fonksiyon, inaktivasyon reaksiyonlarının başladığı bir noktaya kadar artar, bu noktanın üzerinde hücre fonksiyonları hızla sıfıra düşer. Buradan her organizma için o değerin altında büyümenin olmadığı bir **minimum sıcaklık**, büyümenin en hızlı olduğu bir **optimum sıcaklık**, bir de üzerinde büyümenin mümkün olmadığı bir **maksimum sıcaklık** değeri olacağı söylenebilir. Mikroorganizmalar sıcaklığa olan duyarlılıklarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:



Şekil 2.1. Mikroorganizmaların sıcaklığa olan ilgilerine göre dağılımı [25].

Şekil 2.1. ile verilen grafikte mikroorganizma gruplarının sıcaklığa göre spesifik büyüme hızlarının değişimi verilmiştir. Mikroorganizmalar kendileri için optimum olan sıcaklık değerleri dışındaki ortamlarda gelişme gösteremez ve zamanla ölürler. Bu durumda üreme hızı ifadesi ölüm hızı da göz önünde bulundurularak yeniden düzenlenir. Mikroorganizmaların spesifik büyüme hızı ve ölüm hız sabiti göz önüne alınarak düzenlenmiş hali aşağıda gösterildiği gibidir.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (2.1)$$

Yukarıdaki (2.1) eşitliğinin düzenlenmesiyle;

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad \text{eşitliği elde edilir.} \quad (2.2)$$

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = (\mu - k_d) \quad (2.3)$$

μ : spesifik büyüme hızı (zaman^{-1}), k_d : ölüm hızı sabiti (zaman^{-1}), x : mikroorganizma konsantrasyonu (mg L^{-1}), x_0 : başlangıç mikroorganizma konsantrasyonu (mg L^{-1}), t : zaman (saat)

μ ve k_d 'nin her ikisi de sıcaklıkla arhenius eşitliğine göre değişir.

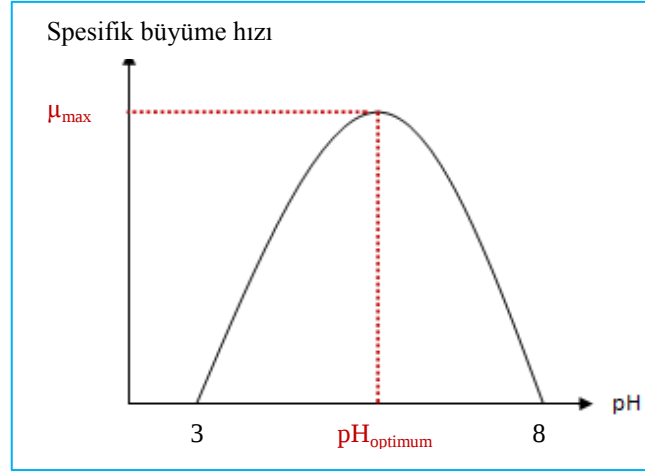
$$\mu = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} , \quad k_d = Ae^{-\frac{E_d}{RT}} \quad (2.4)$$

Eşitlik (2.4.)'te yer alan E_a ve E_d değerleri büyüme ve termal ölüm için aktivasyon enerjileridir. Büyüme için aktivasyon enerjisi tipik olarak 10-20 kcal mol⁻¹, termal ölüm için 60-80 kcal mol⁻¹ dür. Bu da termal ölümün sıcaklık değişimlerine mikrobiyal büyümeden daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

2.2.4.2. pH

Her mikroorganizmanın yaşamı süresince sabit tutmaya çalıştığı özgün bir iç pH değeri vardır. Hücrelerin metabolik faaliyetlerinin sonucu olarak ortamdaki hidrojen iyon derişimi değişir ve dışındaki bu değişimlere rağmen hücre kendi iç pH değerini sabit tutmaya çalışır. Böylece daha fazla enerji harcar ve substratın çoğunu kendi enerji gereksinimi için kullanacağından üreme ve ürün üretme verimi düşer. Bundan dolayı verim açısından dış ortamın pH'ını belli bir değerde ya da aralıkta tutmak gerekebilir. pH, enzimlerin aktivitesini dolayısıyla mikrobiyal büyüme hızını etkiler. Ayrıca mikroorganizmaların maksimum büyüme gösterdiği optimum pH ile maksimum üretim gerçekleştirdiği optimum pH değerleri birbirinden farklı olabileceğinden pH kontrolü yapılırken buna da dikkat edilmelidir.

Fermantasyon süresince pH, kullanılan karbon kaynaklarının farklı ürünlere dönüşmesiyle değişim gösterir. Karbon kaynağı olarak karbonhidratlar kullanıldığında, hücre içi tepkimelerle oluşan organik asitler ve aminoasitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte ortam pH'ında önce düşme, daha sonra da ortama salgılanan metabolitlerin tekrar hücreye transferi ve kullanımı sonucunda artış gözlenir [6]



Şekil 2.2. pH'ın mikroorganizmaların spesifik büyüme hızına etkisi.

Şekil 2.2. ile gösterilen yukarıdaki grafikte pH ile spesifik büyüme hızı arasındaki ilişki verilmiştir. Grafikten de anlaşılabacağı üzere pH'ın artmasıyla birlikte mikroorganizmaların spesifik büyüme hızının da belli bir noktaya kadar arttığı ve daha sonraki artışlardan olumsuz etkilendiği görülmektedir.

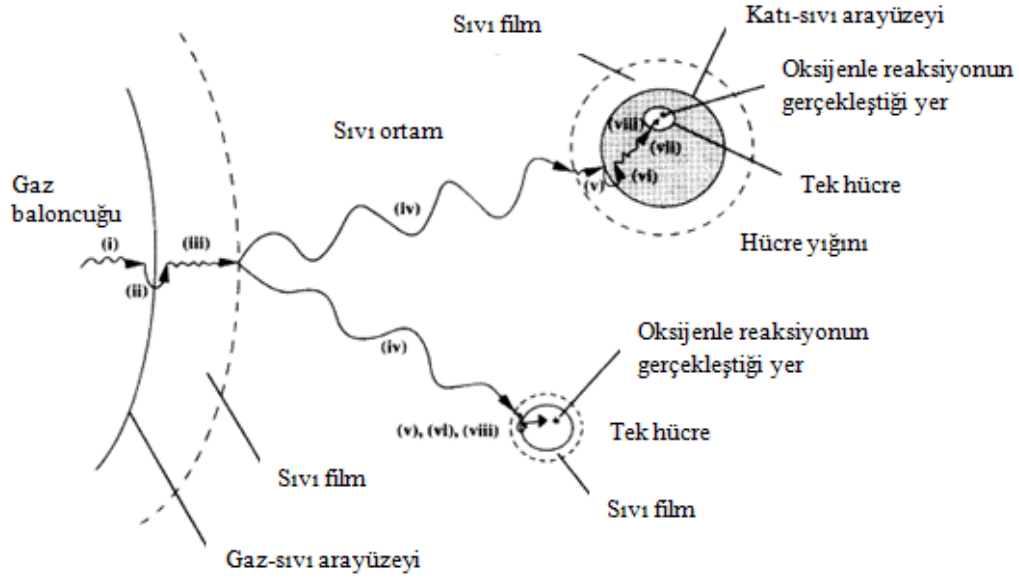
2.2.4.3. Oksijen Transferi

Endüstriyel biyoproseslerin çoğu aerobiktir bundan dolayı havalı fermantasyonlarda mikroorganizmaların besinleri kullanabilmeleri ve metabolik faaliyetlerini devam ettirilebilmeleri için gerekli olan temel substratlardan biri de oksijendir [20, 21]. Mikrobiyal hücreler oksijeni çoğalma, solunum, ürün üretme gibi faaliyetler için temel bir substrat olarak kullanırlar. Ayrıca oksijen aerobik biyoproseslerde, sulu ortamdaki düşük çözünürlüğünden dolayı sürekli sağlanması gereken anahtar bir substrattır [21-24].

Aerobik mikroorganizmaların bulunduğu süspanse ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ve biyoproseslerdeki oksijen gereksinimi, kültürün fizikokimyasal özelliklerine, gaz fazdan sıvı faza olan oksijen transferine ve mikroorganizmalar tarafından büyüme, yaşama ve ürün üretme için kullanılan oksijenin tüketim hızına bağlı olmasının yanında biyoreaktör konfigürasyonuna ve işletme koşullarına da bağlıdır [21].

Yüksek hücre konsantrasyonlarında, oksijen tüketim hızı oksijen besleme hızını geçebilir ve böylece oksijen sınırlamaları meydana gelebilir [20]. Oksijen hız sınırlayıcı faktör olduğunda, spesifik büyüme hızı doygunluk kinetiğine göre çözünmüş oksijen konsantrasyonu ile değişir; kritik konsantrasyonun altında büyüme veya solunum çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak birinci mertebeden hız ifadesine yaklaşır. Eğer ortamda oksijen fazla ise mevcut konsantrasyonunun değişmediği kabul edilir ve reaksiyon hızı oksijene göre sıfırıncı merteben olur [25]. Fermantasyon ortamları için kritik oksijen derişiminin değeri mikroorganizmaya göre değişmekle birlikte genellikle doygunluk derişiminin %5'i ile 10'u arasındadır. [21].

Oksijen genellikle fermantasyon ortamının içine doğru havanın püskürtülmesi ile verilir. Fakat burada gaz kabarcığı ile sıvı ortam ara yüzeyinin her iki tarafında oksijen aktarımına karşı direnç gösteren gaz ve sıvı film tabakaları bulunmaktadır [20]. Oksijenin mikroorganizmaya ulaşması için öncelikle bu engelleri aşması gerekmektedir. Genel olarak oksijenin sıvı ortamdaki mikroorganizmaya transferi 7 basamakta gerçekleşir. Bu transfer basamakları şematik olarak aşağıdaki gibidir.



Şekil.2.3. Oksijenin besin ortamındaki mikroorganizmaya tranferi [9].

Şekil 2.3.'te gösterilen, oksijenin besin ortamındaki mikroorganizmaya transfer basamakları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- i. Oksijen molekülü gaz-sıvı ara yüzeyine gelir,
- ii. Ara yüzeyi geçen molekül sıvı filme ulaşır,
- iii. Sıvı filmi geçtikten sonra ortama ulaşır,
- iv. Sıvı ortamda ilerleyen oksijen molekülü hücre etrafındaki film tabakasına gelir,
- v. Sıvı-hücre ara yüzeyi boyunca taşınır,
- vi. Yüzey duvarını geçer,
- vii. Hücreye ulaşır.

Ortamda etkin bir karıştırmanın sağlanmasıyla sıvı fazdaki taşınımın ve mikroorganizma çevresindeki filmden geçişin kütle aktarımına karşı direnci ortadan kaldırılabılır. Gaz ve sıvı filmlerinden geçişin, kütle aktarımına etkisi ise; havalandırma, karıştırma ve oksijenin sıvı ortamdaki çözünürlük derecesi ile ilgilidir [20]. Oksijenin sudaki çözünürlüğünün az olması nedeniyle gaz filmin direnci, sıvı filmin direncine oranla çok daha az olacağından bu değer ihmal edilebilmektedir. Bu durumda toplam fiziksel kütle aktarım hızı sıvı film direnci tarafından kontrol edilmektedir [26].

Gazdan sıvı faza oksijen transferi:

$$N_{O_2} = k_L a (c^* - c_L) \quad (2.5)$$

(2.5) eşitliğindeki N_{O_2} ; oksijen transfer hızı ($\text{mg L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), k_L ; oksijen transfer katsayısı (cm h^{-1}), a ; birim hacim başına gaz-sıvı ara yüzey alanı ($\text{cm}^2 \text{ cm}^{-3}$), c^* ; doyumluk konsantrasyonu (mg L^{-1}), c_L ; ortamdaki gerçek çözünmüş oksijen konsantrasyonudur.

Oksijen tüketim hızı:

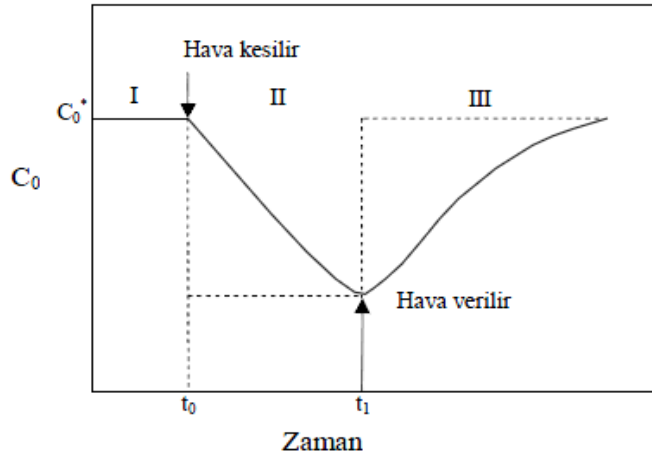
$$q_{O_2} = \mu x / Y_{X/O_2} \quad (2.6)$$

Transfer edilen oksijen miktarı=Alınan oksijen miktarı

$$k_L a(c^* - c_L) = \frac{\mu x}{Y_{X/O_2}} \quad (2.7)$$

Fermantasyon ortamlarında çözülmüş oksijenin metabolizmaya aktarılma derecesini tespit etmek ancak hacimsel oksijen aktarım katsayısı olan $k_L a$ değerinin belirlenmesi ile mümkündür. Bu değer mikroorganizma türüne, fermantasyon ortamının özelliklerine (viskozite, sıcaklık vb.), biyoreaktörün ve karıştırıcının boyutlarına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır [21, 27]. Bu değeri belirlemek için çeşitli yöntemler mevcut olsa da en çok kullanılanı dinamik yöntemdir [21, 28-31]. Bu yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın, mikroorganizmaların yaşamını tehdit etmeyecek bir noktaya kadar kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu ile çözülmüş oksijen derişimindeki azalmanın, ardından havanın tekrar sisteme verilmesi ile de artışının incelenmesi prensibine dayanır [20, 28].

Şekil 2.4.'teki grafikte gösterildiği gibi ortama verilen hava t_0 anında kesilir ve t_1 anında yeniden verilir.



Şekil 2.4. Çözülmüş oksijen derişiminin hava beslemesiyle değişimi.

Yatışkın olmayan koşulda kütle korunum denklemi çözülmüş oksijen derişimi cinsinden yazılacak olursa denklem (2.8) elde edilir.

$$k_L a(C_0^* - C_0) + r_o^I C_x = \frac{dC_0}{dt} \quad (2.8)$$

Burada r_o^I ; birim hücre başına oksijen tüketim hızı ($\text{mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$) olarak verilmiştir.

Şekil 2.4.'te verilen grafikte görüldüğü gibi t_0 anından t_1 anına kadar geçen sürede çözünmüş oksijen konsantrasyonunda bir azalma meydana gelir ve bu sırada transfer gerçekleşmediğinden oksijen aktarım hızı '0' olur. Dolayısıyla zamanla oksijen konsantrasyonundaki değişim yalnızca mikroorganizmanın oksijeni tüketmesinden kaynaklanır. Yukarıdaki denklem bu durum göz önünde bulundurularak yeniden düzenlenir.

$$N_{O_2} = k_L a(C_0^* - C_0) = 0 \quad (2.9)$$

$$\frac{dC_0}{dt} = r_o^I C_x = r_o \quad (2.10)$$

Oksijen tüketim hızı, r_o , denklem (2.10) 'dan kolayca bulunabilir. Sisteme t_1 anında tekrar hava verilmeye başlandığında (2.8) denklemi önem kazanır ve bu denklemden yararlanarak $k_L a$ değeri hesaplanabilir.

$$k_L a(C_0^* - C_0) + r_o = \frac{dC_0}{dt} \quad (2.11)$$

$$\frac{dC_0}{dt} - r_o = k_L a(C_0^* - C_0) \quad (2.12)$$

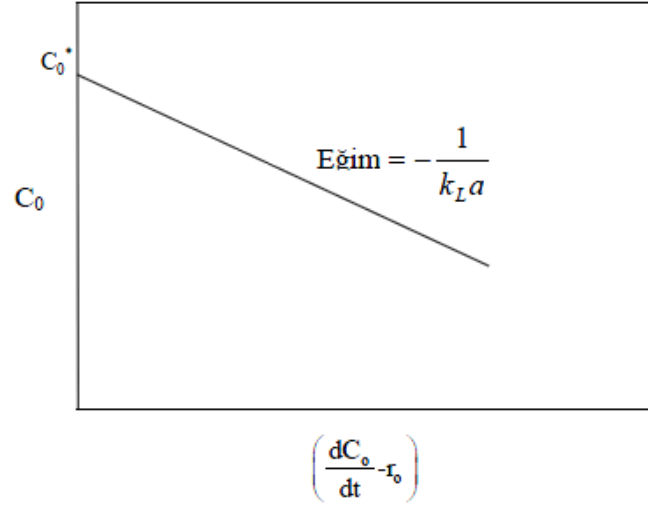
(2.12) eşitliğiyle verilen denklem $k_L a$ ile bölünürse aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\frac{1}{k_L a} \left(\frac{dC_0}{dt} - r_o \right) = C_0^* - C_0 \quad (2.13)$$

(2.13) eşitliğinin düzenlenmesiyle aşağıdaki (2.14) eşitliği elde edilir.

$$C_0 = C_0^* - \frac{1}{k_L a} \left(\frac{dC_0}{dt} - r_o \right) \quad (2.14)$$

Eşitlik (2.14.) ile verilen denklemden yola çıkılarak $[(dC_o/dt)-r_o]$ a karşı C_o değeri grafiğe geçirilir ve eğimden yararlanarak $k_L a$ değeri bulunur.

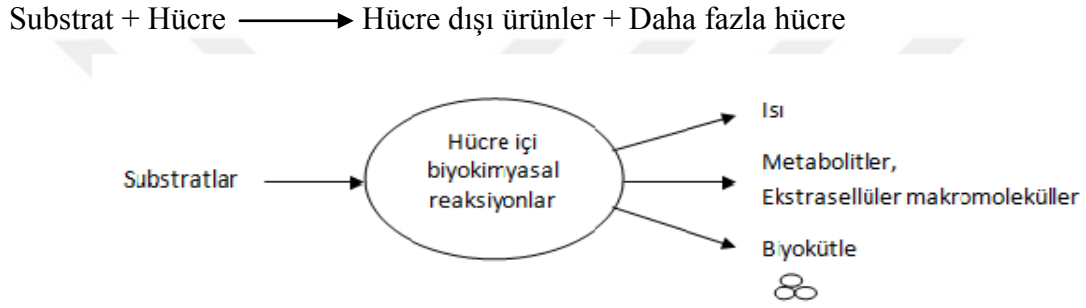


Şekil 2.5. Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının belirlenmesi.

3. MİKROBİYAL BÜYÜME VE ÜRÜN OLUŞUM KİNETİĞİ

3.1. Kesikli Sistemde Mikroorganizma Üremesi

Mikroorganizmalar uygun bir besin ortamında mevcut substratları kullanarak büyüme ve ürün üretimi gerçekleştirirler. Bir ortamdaki mikroorganizma sayısı mikroskop altında boyama ve kuru ağırlık yöntemleriyle hesaplanabilir. Mikroorganizmaların genel olarak substrat kullanımı aşağıdaki şekilde gösterildiği gibidir.



Şekil 3.1. Substratın kullanımıyla oluşan ürünler

Şekil (3.1.)’de görüldüğü gibi mikroorganizmalar substratı hücre içi biyokimyasal reaksiyonlarda kullanarak ısı, metabolit, makromolekül ve biyokütle oluştururlar.

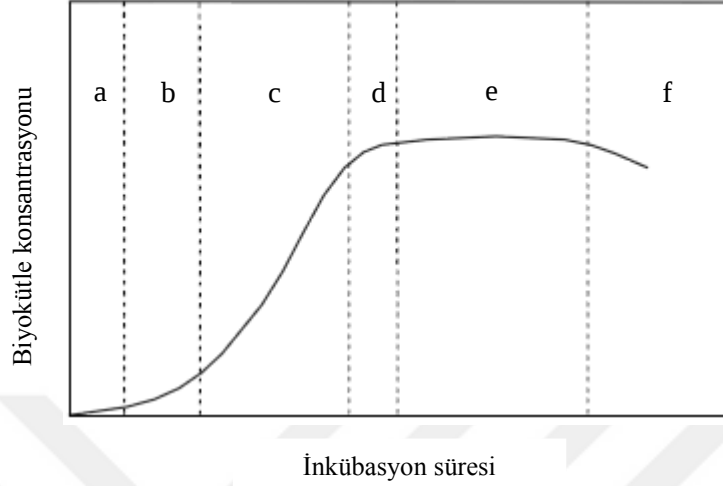
3.2. Kesikli Sistemde Mikroorganizma Üreme Evreleri

Belirli bir mikroorganizma kendi gelişimine uygun bir besiyerine aşılandığı zaman buradaki hücreler ortamdan sırasıyla ihtiyacı olan bileşenleri alır ve onları hücre içi biyokimyasal reaksiyonlarla biyokütle, metabolit ve bazı makromoleküllere dönüştürür.

Kesikli (batch) kültürde üreme aşağıdaki aşamalardan geçer:

- Lag fazı evresi
- Hızlanma evresi
- Logaritmik evre
- Yavaşlama evresi
- Sabit evre
- Ölüm evresi

Mikroorganizmaların bahsedilen üreme evreleri grafiksel olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Şekil 3.2. Mikroorganizma büyüme evreleri.

Şekil (3.2.) ile gösterilen evrelerde gerçekleşen olaylar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

a) Hazırlık Evresi (Lag Fazı): Hücre bölünmesinin görülmediği bu evre ilk hücre bölünmesi gerçekleşinceye kadar devam eder. Aşılana hücre sayısında hiçbir değişiklik olmaz. Besin ortamından alınan su ve substratlar RNA, ribozom ve protein biyosentezinde (özellikle enzim sentezinde) kullanılır. Bu nedenle, hücre çoğalması olmadığı halde biyokütle artar.

b) Hızlanma Evresi: Bu evrede hücre çoğalması başlar ama yavaş yürür, artış üstel (logaritmik) değildir. DNA miktarı artar, enzim sentezi devam eder ve hücrelerdeki RNA miktarında önemli bir artış gözlenir. Bazı yönlerden benzerlik gösterdiklerinden çoğu kez A ve B evreleri birlikte değerlendirilir ve lag fazı adını alır.

c) Logaritmik Evre: Hücreler ortama iyice adapte olduktan sonra logaritmik üreme safhasında hızla çoğalırlar, hücre sayısı ve kütlesi zamanla üstel olarak artar. Bu evrede hücre bileşenleri de aynı oranda artar ve üreme dengelidir. Yani hücrenin ortalama bileşimi sabit kalır. Besiyerindeki bileşenlerin derişimleri yüksek olduğundan üreme hızı substrat

derişiminden bağımsızdır ve hücre derişimine göre birinci derecedendir. Üreme hızı ‘özgül üreme hızı’ ile karakterize edilir ve ‘ μ ’ ile gösterilir. Bu evrede büyüme hızı pratik olarak sabittir ve maksimuma ulaşmıştır. RNA’ya oranla DNA sentezi daha fazladır. Hücreler diğer evrelere göre daha küçük olup hücrelerin kuru kütlelerinin, hücre sayısına oranı diğer evrelerden daha düşüktür. Bu evredeki hücre çoğalması kolayca hesaplanabilir.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (3.1)$$

d) Yavaşlama Evresi: Bu evre logaritmik üreme fazını izleyen evredir. Yavaşlama evresinde hücre çoğalma hızı bazı bileşenlerin azalması veya toksik ürünlerin ortamda birikmesi sonucu yavaşlar. Ortam koşullarının hızla değişmesi üremenin dengesiz olmasına sebep olur ancak hücre sayısı ve biyokütle artışı devam eder. Logaritmik üreme fazında metabolizma üremeyi maksimum sağlayacak şekilde düzenlenmiştir. Yavaşlama fazında besiyerindeki bileşenlerin azalması veya toksik ürünlerin çoğalmasıyla birlikte organizma üzerine uygulanan stres hücrenin kendisine zararlı bir ortamda yaşama şansını arttırmak için hücre içi yapısını yeniden düzenlemesine sebep olur.

e) Durağan Evre: Yavaşlama evresinden sonra başlayan bu evrede yeni oluşan hücre sayısı ile ölen hücre sayısı dengelenmiştir yani net üreme hızı sıfırdır. Buna rağmen metabolizma ürünlerinin hücre içinde veya ortamda birikmesi devam edebilir fakat toplam hücre sayısı sabit kalır. Zamanla ortamdaki canlı hücre sayısı azalabilir veya hücreler otoliz olur böylece ikinci bir üreme evresi gözlenebilir. Hücreler logaritmik fazda üretmedikleri ikincil (sekonder) metabolitleri bu ikinci üreme evresinde üretebilirler.

f) Ölüm Evresi: Durağan evreyi izleyen fazdır fakat ölüm bir önceki evrede de başlayabilir. Bu iki evreyi net olarak birbirinden ayırmak bazen zordur. Genellikle ölü hücreler otoliz olur ve bunun sonucu olarak ortama bırakılan bileşikler canlı organizmalar tarafından kullanılır. Otoliz sebebiyle ortamın yoğunluğu ve viskozitesi azalır. Ölüm hızı matematiksel olarak 1. mertebededir [32].

Mikroorganizmaların ortamdaki büyüme hızı aşağıdaki eşitlikle belirlenebilir.

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad (3.2)$$

(3.2) eşitliği mikroorganizmanın konsantrasyonu (x : mg L^{-1}) cinsinden (3.1) 'deki gibi de yazılabilir.

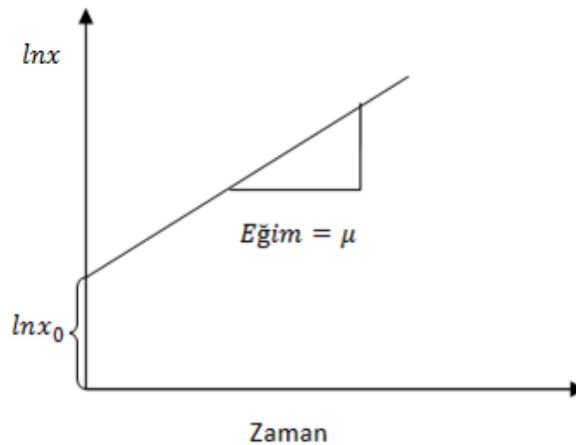
(3.2) eşitliği integre edilerek düzenlenirse aşağıdaki (3.3) eşitliği elde edilir:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu(t - t_{lag}) \quad (3.3)$$

Burada; μ : Spesifik büyüme hızı (zaman^{-1}), N_0 : Başlangıçtaki mikroorganizma sayısı, N : t anındaki mikroorganizma sayısıdır.

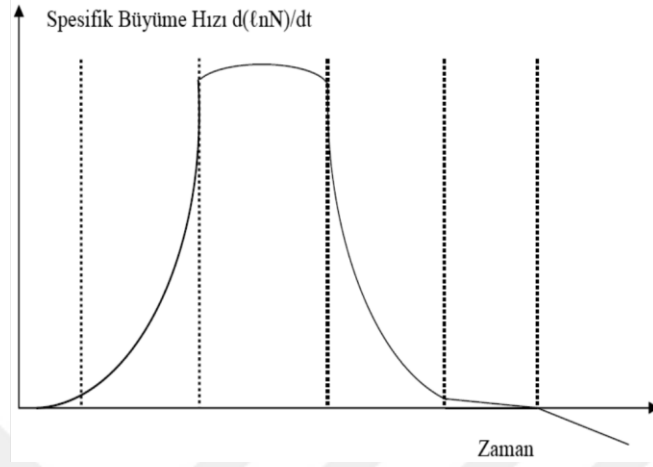
(3.1) eşitliği integre edildikten sonra (3.4) eşitliğindeki gibi doğrusallaştırılarak zamana karşı $\ln x$ değerleri grafiğe geçirilirse eğimden mikroorganizmanın spesifik büyüme hızı aşağıdaki gibi bulunabilir:

$$x = x_0 e^{\mu t}, \quad \ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (3.4)$$



Şekil 3.3. Spesifik büyüme hızının bulunması.

Biyokütlenin zamana bağlı büyüme hızındaki değişim ise Şekil 3.4.'teki grafikte gösterilebilir.



Şekil 3.4. Biyokütlenin zamana bağlı değişimi.

Grafikten yola çıkılarak logaritmik, durgun ve ölüm evresindeki zamana bağlı mikroorganizma değişimi aşağıdaki gibi yazılır.

Logaritmik evrede:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (3.5)$$

Durgun evrede:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (3.6)$$

Ölüm evresinde:

$$\frac{dx}{dt} = -k_d x \quad (3.7)$$

3.3. Substrat Tüketimi

Mikroorganizmaların geliştiği besin ortamları genellikle tuzlar ve organik substratlar içerdiğinden dolayı viskozdur ve non-newtonian bir özellik gösterir [21]. Substrat olarak ortama katılan maddeler mikroorganizmalar tarafından sadece ürün üretmek için değil aynı zamanda yeni hücreler oluşturmak ve enerji sentezlemek için de kullanılır [33]. Enerji, üreme sırasında oluşur ve hücresel faaliyetlerin devamlılığının sağlanması için tekrar kullanılır. Yani bahsedilen bu enerji yaşamsal fonksiyonların yerine getirilmesi, hücre sentezi ve ürün üretimi amacıyla kullanılır. Bunlara bağlı olarak substratın tüketim amaçları matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$r_s = r_{sx} + r_{sp} + r_{sm} \quad (3.8)$$

Burada r_{sx} ; hücre sentezi için substrat tüketim hızı ($g L^{-1}.h^{-1}$), r_{sp} ; ürün sentezi için substrat tüketim hızı ($g L^{-1}.h^{-1}$), r_{sm} ; hücrenin yaşamsal faaliyetleri için substrat tüketim hızı ($g L^{-1}.h^{-1}$) olarak verilmiştir.

Eşitlik (3.8.)’den de anlaşılacağı üzere hücrenin herhangi bir üretim gerçekleştirmese bile canlı olarak kalabilmesi için kullandığı bir enerji vardır. Gerekli olan bu minimum enerji yaşamsal faaliyet enerjisidir. Yukarıda denklem (3.8.) ile verilen hız eşitliği verim cinsinden aşağıdaki denklem (3.9.) şeklinde yazılabilir.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + \frac{r_p}{Y_{p/s}} + m_x \quad (3.9)$$

Burada; $Y_{x/s}$; hücre için verim faktörü ($g \text{ hücre } g \text{ substrat}^{-1}$), $Y_{p/s}$; ürün için verim faktörü ($g \text{ ürün } g \text{ substrat}^{-1}$), m ; hücre için yaşam katsayısı ($g \text{ substrat } g \text{ hücre}^{-1}.h^{-1}$)’dır.

Birim mikroorganizma başına tüketilen substrat miktarı üreme verimi olarak tanımlanır ve ‘ $Y_{x/s}$ ’ ile gösterilir.

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.10)$$

Yeni hücrelerin oluşumu için gerekli substrat miktarı ise ' $r_x/Y_{x/s}$ ' ile hesaplanabilir.

$$\frac{r_x}{Y_{x/s}} = -\frac{\Delta x}{\Delta t} \frac{\Delta S}{\Delta x} = -\frac{\Delta S}{\Delta t} \quad (3.11)$$

Düşük substrat derişimlerinde üreme hızı substrat derişimiyle artar ve maksimum bir değere ulaşır. Subtrat derişimin daha da artmasıyla üreme hızı azalmaya başlar. Bu olay substrat inhibisyonu olarak bilinir. Hücrelerin değışen substrat derişimine karşı olan bu davranışı normaldir.

3.4. Ürün Oluşumu

Mikroorganizmalarda ürün oluşum mekanizması oldukça karmaşık bir durumdur. Mikroorganizmalar zamanlama açısından 3 farklı şekilde ürün üretebilir. Bu üretim şekilleri aşağıda açıklandığı gibidir.

- **Üremeye bağlı ürün üretimi:** Burada ürün üretimi üremeye eş zamanlı olmaktadır (enzim üretimi).

Mikroorganizmaların ürün üretim hızı ' q_p ' ile gösterilir. (q_p : Spesifik ürün üretim hızı)

$$q_p = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \quad (3.12)$$

Burada P, ürün konsantrasyonudur.

- **Üremeden bağımsız ürün üretimi:** Ürün üretimi üreme olayından bağımsızdır yani mikroorganizma üremesi durmuştur sadece ürün üretilmektedir (sekonder metabolitler, antibiyotik üretimi).

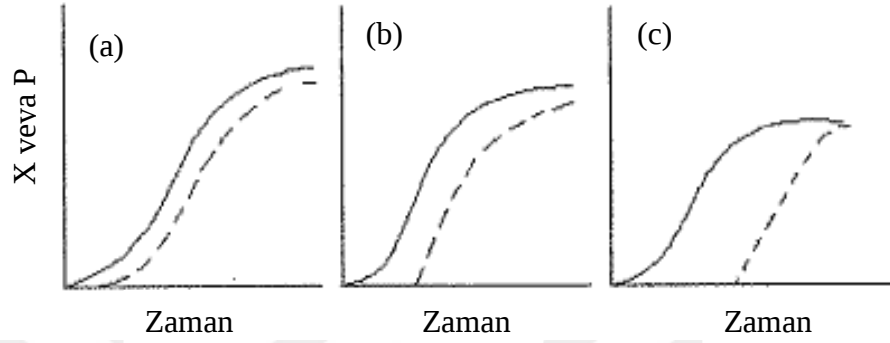
$$q_p = \beta = \text{sabit} \quad (3.13)$$

- **Karışık tip ürün üretimi:** Kompleks besin ortamlarında bu tip üretim şekli gözlenir (laktik asit fermantasyonu).

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (3.14)$$

Yukarıda verilen (3.14.) eşitliği **Luedeking-Piret** eşitliği olarak bilinir ve $\alpha = 0$ ise ürün üremeden bağımsız, $\beta = 0$ ise ürün üremeye eş zamanlıdır.

Bahsedilen üretim şekillerine ait grafikler Şekil 3.5.'te verilmiştir [9].



Şekil 3.5. Ürün üretim şekilleri (— X, ---- P)

Şekil 3.5.'teki a,b ve c grafiklerinden bahsedilen üretim şekilleri görülmektedir. Bu tarz üretimlerden elde edilen ürünler farklı şekillerde sınıflandırılabilir de en çok kabul göreni Gaden'in yapmış olduğu sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre oluşan ürünler 3'e ayrılır [34].

Tip 1 ürünler: Enerji metabolizmasının sonucu olarak ortaya çıkan ürünlerdir. Burada büyüme ve ürün oluşumu paraleldir.

Tip 2 ürünler: Enerji metabolizmasında dolaylı olarak oluşan ara ürünlerdir.

Tip 3 ürünler: Enerji metabolizmasından bağımsız olan kompleks ürünlerdir.

3.5. Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

3.5.1. Monod Eşitliği ile μ_{max} ve K_s 'in Hesaplanması

Mikroorganizma büyümesi ortamdaki substrat miktarıyla doğrudan ilişkili olduğu için spesifik büyüme hızı 'Monod Eşitliği' ile formülize edilir.

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3.15)$$

Bu eşitlik doğrultusunda spesifik büyüme hızı μ , şu üç parametrenin bir fonksiyonu olarak bulunabilir:

S: Sınırlayıcı substrat konsantrasyonu

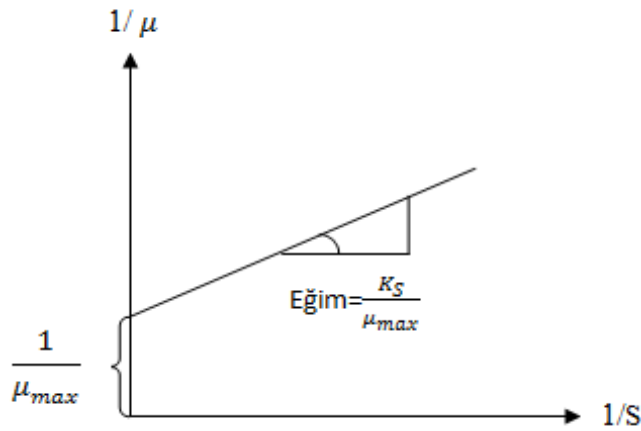
μ_{max} : Maksimum büyüme hızı

K_s : Substrat spesifik doygunluk sabiti

Monod eşitliğinin doğrusallaştırılmış hali:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (3.16)$$

(3.16.) eşitliğine göre $1/\mu$ değerleri $1/S$ değerlerine karşı grafiğe geçirilirse eğim ve kaymadan yararlanarak μ_{max} ve K_s değerleri hesaplanabilir (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. μ_{max} ve K_s 'in hesaplanması.

Monod eşitliğinde ortamda yeterince substrat varsa K_s değeri ihmal edilir ve $\mu = \mu_{max}$ olur. Monod eşitliği yavaş büyüme hızı ve hücre konsantrasyonunun düşük olduğu şartlarda kullanılmakla birlikte eşitliğin geçerli olmadığı durumlar da vardır. Mikroorganizmalar kompleks besin ortamlarında çoğaltılırsa genellikle birden fazla logaritmik faz görülür ve toksik madde çıkışı hızlanır. Bu durumda ortamdaki net büyüme hızları farklı eşitliklerle hesaplanır. Bu eşitliklerden en çok kullanılanları aşağıda verildiği gibidir: [35]

Blackman Eşitliği: $\mu_g = \mu_m, S \geq 2K_s$ (3.17)

$$\mu_g = \frac{\mu_m S}{2K_s}, S < 2K_s \quad (3.18)$$

Tessier Eşitliği: $\mu_g = \mu_m(1 - e^{-KS})$ (3.19)

Moser Eşitliği: $\mu_g = \frac{\mu_m S^n}{K_s + S^n} = \mu_m(1 + K_s S^{-n})^{-1}$ (3.20)

Contois Eşitliği: $\mu_g = \frac{\mu_m S}{K_{sx}X + S}$ (3.21)

Yukarıdaki eşitlikler Monod eşitliği temel alınarak türetilmiş eşitliklerdir. Tessier denkleminde iki sabit vardır ve difüzyon kontrollü substrat beslenmesi sırasındaki üremeyi modellemek için önerilmiştir. Mosser denklemi daha genel bir denklemdir ve 3 tane sabiti vardır, $n=1$ olduğu zaman Monod denklemine indirgenir. Contois denkleminde doyma sabiti hücre derişiminin bir fonksiyonudur ve yüksek hücre derişimlerinde üreme hızını modellemek için kullanılır. DeneySEL verilere Monod Denkleminde daha iyi uymasını rağmen Blackman denklemindeki süreksizlik istenmeyen bir durumdur.

3.5.2. $Y_{X/S}$ ve m 'in Hesaplanması

Mikroorganizmaların substratı hücre sentezlemek, ürün üretmek ve yaşamak için kullandıklarından bahsedilmiştir. Yaşam katsayısı ve verim faktörünü hesaplayabilmek için Luedeking-Piret tarafından geliştirilen substrat tüketim hız denklemi (3.22) eşitliğiyle gösterilmektedir.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{X/S}} + \frac{r_p}{Y_{P/S}} + mx \quad (3.22)$$

Yukarıdaki substrat tüketim denkleminde ürün üretimi için harcanan substrat ihmal edilirse (3.23) eşitliği elde edilir.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + mx \quad (3.23)$$

Bu denklem x ile bölünerek düzenlenirse aşağıdaki eşitliğe ulaşılır.

$$\frac{r_s}{x} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{r_x}{x} + m \quad (3.24)$$

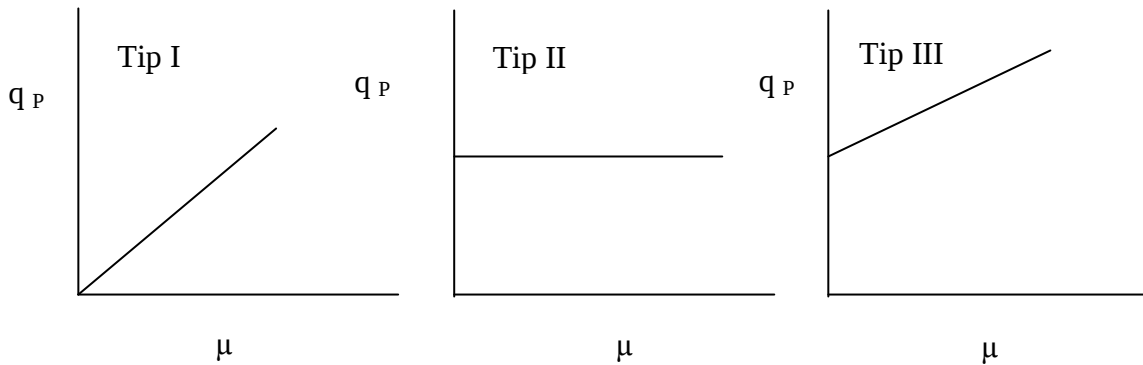
Yukarıdaki eşitliğe göre r_x/x 'e karşı r_s/x grafiğe geçirilirse grafiğin eğiminden yararlanılarak $Y_{x/s}$, kaymasından yararlanılarak da m değeri bulunabilir.

3.5.3. Ürün Oluşum Parametreleri α ve β 'nin Hesaplanması

Ürün oluşum parametrelerinin hesaplanması için aşağıdaki denklem kullanılır.

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (3.25)$$

Bu denklemde μ 'ye karşı q_p değerleri grafiğe geçirilirse α ve β değerleri bulunabilir. Grafik Şekil 3.7.'de gösterilen şekillerden biri gibi çıkabilir.



Şekil 3.7. Ürün oluşum parametrelerinin bulunması.

Şekil 3.7. ile verilen grafikler sırasıyla üremeye bağlı, üremeden bağımsız ve karışık tip ürün üretiminin olduğu durumları göstermektedir. Bunlar incelendiğinde;

$\alpha > 0$, $\beta = 0$ ise Tip I

$\alpha = 0$, $\beta > 0$ ise Tip II

$\alpha > 0$, $\beta > 0$ ise Tip III

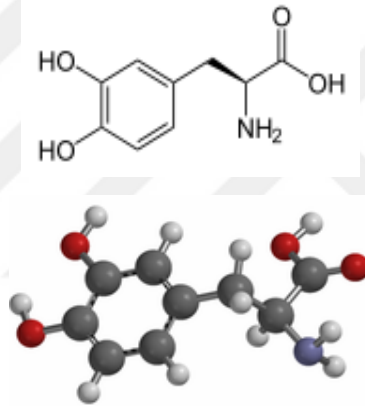
ürün üretim şekli görülmektedir.



4. L-DOPA ve DOPAMİN

4.1. L-DOPA (Levodopa)

L-DOPA (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin ya da 2-amino-3-(3,4 dihidroksifenil)-propanoik asit) insan vücudunda L-tirozinden doğal olarak sentezlenen bir aminoasittir. L-DOPA, tirozin hidroksilazın (TOH) tirozini hidroksillemesi sonucu oluşmakta ve önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olan dopamin, norepinefrin ve epinefrin gibi katekolaminlerin biyosentezine öncülük etmektedir [36, 37]. L-DOPA'nın molekül ve 3 boyutlu yapısı aşağıda görüldüğü gibidir.



Şekil 4.1. L-DOPA'nın molekül ve 3 boyutlu yapısı.

İlk olarak 1913 yılında bakla (*Vicia faba*) tohumlarından izole edilen L-DOPA'nın biyolojik olarak inaktif bir karaktere sahip olduğu ileri sürülmüştür fakat 1927 ve 1930 yıllarında yapılan çalışmalar ile L-DOPA'nın glikoz metabolizması ve atardamar kan basıncı üzerine önemli etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca birçok araştırmacı tarafından bu maddenin *Mucana pruriens* (kadife fasülye) tohumlarında doğal olarak sentezlendiği de belirlenmiştir [38-41].

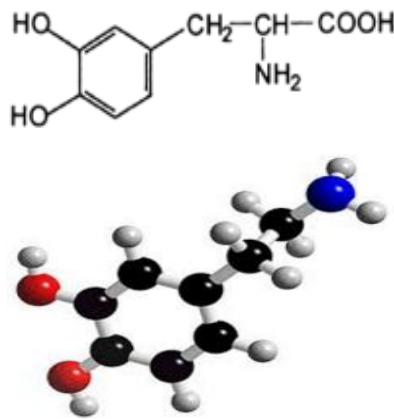
L-DOPA 1960'lardan beri, genellikle beyindeki nörotransmitter Dopamin eksikliğinin sebep olduğu ve merkezi sinir sistemindeki dejeneratif bir bozukluk olan Parkinson hastalığı için bir ilaç olarak kullanılmaktadır.

Çünkü L-DOPA, Dopaminin öncü maddesidir ve Dopamin kan-beyin bariyerini geçemezken L- DOPA bu bariyeri aşarak Parkinson hastalığının tedavisi için gerekli olan Dopamin seviyesini artırır [36, 42].

Son zamanlarda ileri yaşta bulunan çok sayıda insan Parkinson hastalığının hareket kısıtlaması, akinezi, tümör gibi bazı semptomlarından kaynaklı sorunlar yaşamaktadır. Bundan dolayı L-DOPA'nın önemli ölçüde bir pazar büyüklüğü vardır; L-DOPA'nın dünya pazarındaki büyüklüğü 250 ton/yıl ve toplam pazar hacmi yaklaşık 101 milyar/yıl'dır [43]. Bundan dolayı Monsanto L-DOPA sentezi için ilk kez asimetrik hidrojenasyon ile üretimi sağlayan ticari bir proses geliştirdi. L-DOPA ihtiyacının çoğu kimyasal sentezlerle, temel olarak da asimetrik hidrojenasyonla karşılanmaktadır [44]. Bununla beraber kimyasal sentezler, zayıf dönüşüm hızı ve düşük enantiyoseçicilik gibi kritik sınırlandırmalara sahiptir.

4.2. Dopamin

L-DOPA maddesinden *dopa dekarboksilaz* enzimi aracılığıyla sentezlenen Dopamin (3,4 dihidroksifeniletılamin), önemli katekolaminlerin (norepinefrin ve epinefrin gibi) oluşumunda başlangıç maddesi olma özelliği taşıyan ve ayrıca beyinde Dopamin reseptörlerini aktive eden nörotransmitter özellikte basit yapılı bir maddedir [45, 46]. Dopamin'in kimyasal yapısı ve üç boyutlu görüntüsü Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Dopamin'in molekül ve 3 boyutlu yapısı.

Nörotransmitterler, beyinde iki nöron arasında veya nöron ile hücre arasında elektriksel sinyallerin iletimini sağlayan kimyasallardır. Hücrelerarası boşluklarda, komşu hücre tarafından uyarılan bir hücreden salgılanan nörotransmitter aracılığıyla bilgi transferi sağlanır [47].

Dopamin, nöronla komşu hücrenin oluşturduğu sinaps bölgesinde presinaptik nöron içerisinde sentezlendikten sonra veziküllerde birikmektedir. Bu veziküller sinaptik boşluğa doğru ilerlemekte ve vezikül ile postsinaptik membran birleşince dopamin vezikül içinden sinaptik boşluğa salınmaktadır. Daha sonra sinaptik boşluktaki Dopamin, postsinaptik membranda (hedef hücre membranında) bulunan Dopamin reseptörlerine bağlanarak bu hücreye spesifik sinyali iletmektedir [37]. Sinyal iletiminde görev yapan önemli bir nörotransmitter olan Dopamin, beyinde nöron hücreleri tarafından L-DOPA maddesinden sentezlenmektedir [48]. Temelde L-tirozin amino asidinden sentezlenen L-DOPA ve Dopaminin insandaki esas üretim yeri nöron (sinir) hücreleri olup, hücreler arası sinyal iletiminde görev alırlar [49]. Dopamin insan vücudunda doğal olarak sentezlenen nöro-aktif bir kimyasaldır. L-DOPA, Parkinson hastalığı'nda temel ilaç olarak kullanılırken, Dopamin kan basıncı ve kardiyak verimini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Dopaminin ayrıca hareket, algı ve motivasyon üzerine de önemli etkileri vardır [50-51].

4.3. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı dopaminerjik nöronlarda dejenerasyonla başlayan ilerleyici bir nörolojik hastalıktır [52]. Bu hastalık temel olarak beynin substantiya nigra bölgesindeki Dopamin üreten hücrelerin kaybının bir sonucudur [53]. Bu hücrelerin yaklaşık olarak %80'i hasar görürse bu hastalığın semptomlarının ortaya çıktığı belirlenmiştir [54]. Görülme sıklığı açısından erkek/ kadın oranı yaklaşık 3/2'dir. Yani bu rahatsızlığın erkeklerde görülme oranı kadınlarınkinden biraz daha yüksektir. Erken aşamalarında tespit edildiğinde ilaç tedavisine iyi derecede yanıt veren nörodejeneratif Parkinson hastalığı orta ve ileri yaşlarda görülmekle beraber ortalama 50-60 yaşlarında ortaya çıkmaktadır [55].

Yürüme zorluğu Parkinson hastalığının en ağır semptomlarından biridir. Hastalığın erken safhalarında bradikinezi (yürüme yavaşlığı) kendisini yavaş dönüşler ve adım uzunluğunda azalma şeklinde gösterir [56-58]. Hastalık ilerledikçe yürüme zorluğu katlanılmaz hale gelir, kol sallama hareketlerinde yavaşlama gözlenir, krizler oluşur ve

düşmeler görülür. Bu durum hareketi ve yaşam kalitesini oldukça fazla etkiler [59-60]. Hastalığın tedavisi için Dopamin yüklemesi yapan ajanlar yürüme yavaşlığı, kaslardaki sertlik ve titremenin önlenmesine yardımcı olur ve bunlar diğer ilaçlarla birlikte yürüme zorluğu ve denge bozukluğuna etki ederler [61].

Parkinson hastalığının tedavisi için gerekli olan Dopamin maddesinin eksikliğini gidermek için alternatif ilaçlar geliştirilmiştir. Fakat L-DOPA aracılığıyla Dopamin eksikliğini gidermek en çok tercih edilen uygulamadır. Çünkü Dopamin kan-beyin bariyerini geçemediğinden bunun Parkinson hastalığı tedavisinde direkt olarak kullanılması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, Dopamin öncülü olan L-DOPA'nın kullanılmasıyla bu bariyerin aşılması hedeflenir ve nöronlara ulaşan L-DOPA burada *dopa dekarboksilaz* (DDC) enziminin katalizlediği bir reaksiyonla Parkinson hastalığının esas tedavi edici maddesi olan Dopamin'e dönüştürülür [63]. Bu uygulamada önemli ve gerekli olan nokta L-DOPA'nın kan-beyin bariyerine ulaşmadan, bu maddenin kanda ve diğer dokularda Dopamin'e dönüşümünü minimuma indirmektir çünkü ara yollarda gerçekleşecek olan bu dönüşüm L-DOPA'nın hedeflenen etkisini oldukça azaltmaktadır. Bundan dolayı L-DOPA'nın, *cardidopa* ve *benserazide* gibi *dopa dekarboksilaz* (DDC) inhibitörleri ile taşınması gerekmektedir. Ülkemizde Parkinson hastalığının farmakolojik tedavisinde kullanılan temel ilaçlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.1. Parkinson tedavisinde kullanılan temel ilaçlar [63].

ETKEN MADDE	TİCARİ İSİM	FARMASOTİK ŞEKİL
Levodopa içeren ve ilişkili ilaçlar:		
Levodopa+Benserazid	Madopar [•]	100+25 mg 200+50 mg tablet
Levodopa+Benserazid (yavaş salınım)	Madopar [•] HBS	100+25 mg kapsül
Levodopa+Carbidopa	Sinemet [•]	250+25 mg tablet
L-dopa+Carbidopa+Entacapone	Stalevo [•]	50+12.5+200 mg 100+25+200 mg 150+37.5+200 mg tablet
Entacapone	Comtan [•]	200 mg tablet

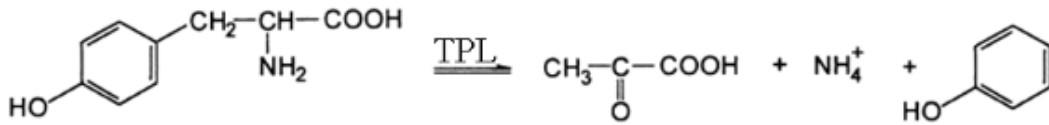
4.4. L-DOPA ve Dopamin'in Bakteriyel Sentezi

Parkinson hastalığının tedavisinde etkin bir madde olarak kullanılan Dopamin bakteriyel sentez yoluyla iki aşamada üretilmektedir. İlk olarak katekol ve tirozin gibi substratlardan L-DOPA sentezlenirken ikinci aşamada L-DOPA kullanılarak Dopamin sentezlenmektedir.

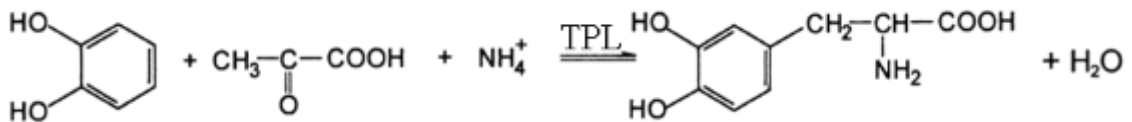
Kimyasal sentezler genellikle karmaşık bir reaksiyon prosedürüne uyar ve düşük substrat spesifitesi ile ağır işletme koşulları altında aktivite gösteren pahalı metal katalizörler (Rb-kompleks gibi) gerektirir [64-65]. Bundan dolayı mikroorganizmaları ve enzimleri kullanan biyoteknolojik yaklaşımlar sadece dönüşüm hızı ve enantiyoseçiciliği geliştirmek için değil aynı zamanda prosesleri ekonomik hale getirmek için de cazip bir alternatif yöntem olarak araştırılmıştır.

4.4.1. L-DOPA Sentezi

L-DOPA sentezinde öncelikle L-tirozin maddesi bakteriyel bir enzim olan *tirozin fenol liyaz* (TPL) tarafından fenol, amonyak ve pürüvata dönüştürülür. Bu ortama katekol ilave edilerek fenol ile katekolün yer değiştirmesi sağlanır böylece yeni reaksiyon yine *tirozin fenol liyaz* enzimin etkisiyle katekol, amonyak, pürüvat arasında gerçekleşir ve L-DOPA sentezlenmiş olur. Bahsedilen bu ardışık reaksiyonlar aşağıda verildiği gibidir [66].



Yukarıdaki reaksiyonda L-tirozinden pürüvat, amonyak ve fenol oluşumu görülmektedir.



Katekol ilavesi ile L-DOPA oluşumu yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibidir.

Mikrobiyal fermentasyon L-DOPA sentezi için alternatiflerden biri olarak düşünülmüş bu kapsamda tirozinaz ve tirozin fenol liyaz (TPL) aktivitesine sahip olan mikroorganizmalar araştırılmıştır. Kimyasal sentezlerle karşılaştırıldığında mikrobiyal fermentasyon enantiyoseçicilik bakımından üstün fakat üretim periyodu bakımından uzundur ayrıca L-DOPA'yı ortamdan saflaştırmak da oldukça zordur. L-DOPA temel olarak tirozinaz ve tirozin fenol liyaz aktivitesine dayalıdır.

Ikram-ul ve Ali, ultraviyole ışına yoluyla mutasyona uğrattıkları *Aspergillus oryzae* mikroorganizmasını kullanarak L-DOPA üretimi gerçekleştirmişler ve bu mutant suşun orijinal suştan 3.72 kat daha fazla üretim gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir [67].

Ateş ve arkadaşları, bakır-aljinat jel içerisine tutuklanmış tirozinaz ile hem kesikli hem de dolgu yataklı reaktörde L-DOPA üretimi gerçekleştirmişlerdir. Kesikli reaktörde yaptıkları deneyde 4.5 mg L^{-1} L-DOPA üretimine ulaşan Ateş ve arkadaşları bunlara ek olarak dolgu yataklı reaktörde L-DOPA üretimi üzerine havanın etkisini araştırmışlar ve havanın beslenmesiyle L-DOPA konsantrasyonunun 1.2 mg L^{-1} 'den 7.7 mg L^{-1} 'ye yükseldiğini görmüşlerdir. Ayrıca dolgu yataklı reaktörde prodüktivite $110 \text{ mg L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a çıkmıştır [68].

Kumagai grubu yüksek derecede TPL (tirozin fenol liyaz) aktivitesine sahip olan *E. Herbicola* mikroorganizmasını kullanarak L-DOPA'nın mikrobiyal üretimi üzerinde çalışmışlardır. TPL sentezinin yüksek seviyede olabilmesi için, *E. Herbicola*'nın TyrR genini klonlayarak onu mutajenize etmişler ve mutant TyrR proteinin kültür ortamına L-tirozin ilavesi olmaksızın TPL'yi aktive etme yeteneğini arttırdığını göstermişlerdir [43, 69].

Kumagai grubuna ek olarak başka bir araştırmacı grup mikrobiyal fermentasyon yoluyla TPL aktivitesine dayalı L-DOPA üretimi gerçekleştirme girişiminde bulunmuşlardır. Bunun için TPL kodlayan geni *E. Herbicola*'dan klonlayarak *E.coli*'ye aktaran araştırmacılar yaklaşık 6 saatlik lag fazı sonunda kültür ortamındaki L-DOPA seviyesinin rekombinant *E.coli* tarafından hızlı bir şekilde arttırıldığını görmüşlerdir. Bunun üzerine yaptıkları çalışmalarla kesikli fermentöre substrat olarak pürivat, katekol ve amonyum asetat ilave ederek rekombinant *E.coli* mikroorganizmasının 105 mM L-DOPA üretimi gerçekleştirdiğini göstermişlerdir [70].

Bielecki ve Bolek TPL kodlayan geni *Citrobacter freundii*'den *E.coli*'ye aktardıktan sonra bu rekombinant hücreleri kalsiyum aljinat ve polivinil alkolde immobilize ederek L-DOPA üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmacılar immobilize haldeki *E.coli* hücrelerinin 8.5 pH değerinde ve 37 °C'de % 60.4 dönüşüm oranıyla 4.53 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda maksimum L-DOPA üretimi gerçekleştirdiğini görmüşlerdir [71].

Lee ve arkadaşları L- DOPA üretimi gerçekleştirmek amacıyla termofilik *Symbiobacterium* türünden termostabil TPL genini klonlayarak *E.coli*'ye aktarmışlardır. Substrat olarak prokatekol, sodyum pürivat ve amonyum klorid kullanan *E.coli* için ortamın optimum pH'ını 8.3 ve sıcaklığını 37 °C olarak belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada TPL aktivitesinin amonyum klorid konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve TPL aktivitesinde etanolün aktivatör olarak rol oynadığını ayrıca bunlara ek olarak, prokatekol konsantrasyonu 0.1 M'den yüksek olduğu zaman TPL'nin inaktive olduğunu görmüşlerdir. Kesikli fermantasyon sisteminde çalışan bu araştırmacılar çalışmalarının sonunda 29.8 g L⁻¹ konsantrasyonunda L-DOPA üretimi gerçekleştirmişlerdir [72].

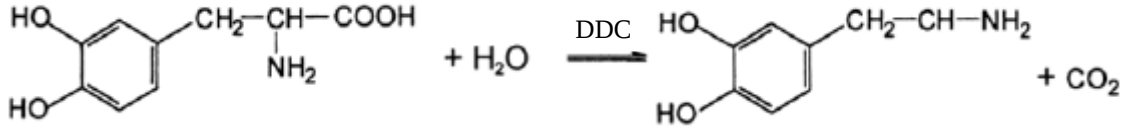
Krishnaveni ve arkadaşları çeşitli yerlerden izole ettikleri, mantar alemine ait, 7 farklı mikroorganizma izolatu içerisinde *Acremonium rutilum*'un en yüksek tirozinaz aktivitesine sahip olduğunu ve dolaylı olarak en yüksek L-DOPA üreticisi olduğunu tespit etmişlerdir [73].

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında TPL aktivitesine dayalı olan mikrobiyal fermantasyonların tirozinaz aktivitesine dayalı olan fermantasyonlardan genellikle daha yüksek bir verimlilik gösterdiği görülmektedir. Çünkü TPL için temel substrat olan katekolün sıvı faz içerisindeki çözünürlüğü tirozinazın substratı olan L-tirozinin çözünürlüğünden çok daha yüksektir. Bununla birlikte TPL aktivitesine dayalı olan fermantasyonlar ek substrat olarak pürivat ve amonyok gerektirdiğinden çeşitli substratlar içeren kültür ortamından L-DOPA'yı ayırmak ve saflaştırmak kolay değildir [74].

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında çeşitli şekillerde L-DOPA üretiminin gerçekleştirildiği görülmüştür. Dopamin L-DOPA'dan sonraki basamakta *dopa dekarboksilaz* enzimin aktivitesiyle oluştuğundan daha çok L-DOPA ile ilgili çalışmalar üzerinde durulmuştur. Çalışmaların büyük çoğunluğu kimyasal proseslerden avantajlı olduğundan fermantasyon ile gerçekleştirilmiştir.

4.4.2. Dopamin Sentezi

Dopamin üretiminin ilk basamağında sentezlenen L-DOPA maddesi *dopa dekarboksilaz* enziminin katalitik etkisiyle substrat olarak kullanılıp Dopamin'e dönüştürülmektedir. Bahsedilen bu dönüşüm aşağıdaki reaksiyonla gösterilmiştir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi reaksiyon sonucunda ortamda karbondioksit çıkışı olmaktadır. Bu durum ortam pH'ını düşürücü etki yapmaktadır. Dopamin maddesinin üretimi hafif bazik ortamda daha iyi olduğundan ortam pH'ındaki bu değişimin ürün üretim verimini etkilememesi için bu proses sırasında iyi bir pH kontrolü yapılmalıdır [75].

4.4.3. L-DOPA ve Dopamin Sentezinde Rol Alan Temel Maddeler

L-DOPA ve Dopamin' in bakteriyel sentezinde rol alan bazı önemli maddeler vardır. Bunlar;

- ❖ *tirozin fenol liyaz* enzimi
- ❖ *tirozinaz* enzimi
- ❖ *dopa dekarboksilaz* enzimi
- ❖ tirozin ve
- ❖ katekollerdir.

4.4.3.1. Tirozin Fenol Liyaz Enzimi (TPL)

Parkinson hastalığı tedavisinde temel çıkış noktası olan L-DOPA maddesinin büyük bir kısmının β -*tirozinaz* olarak bilinen ve tirozin ile indüklenen *tirozin fenol liyaz* (TPL, EC 4.1.99.2) enziminin katalitik etkisiyle üretildiği rapor edilmektedir [76]. Bu enzim tersinir multi fonksiyonel reaksiyonları katalizleyen bir enzimdir [77-78].

TPL enzimi aromatik bir aminoasit olan tirozini pirüvat, amonyak ve fenol oluşturmak için katalizlemektedir. Bu reaksiyon tersinirdir ve katekol fenol ile yer değiştirdiği zaman L-DOPA üretilmektedir [43, 78-80]. TPL enzimi ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar vardır L-DOPA üretimine yönelik olduğundan L-DOPA sentezi başlığı altında verilmiştir.

4.4.3.2. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz (monofenol monooksijenaz, EC 1.14.18.1) bakır içeren oksiredüktazların bir çeşididir ve iki önemli katalitik aktiviteye sahiptir. İlki kresolaz tarafından monofenolün difenole orto hidroksilasyonunu katalizlemesi, ikincisi ise katekolaz aktivitesi ile difenolu kinona ardışık olarak yükseltgemesidir [81]. Tirozinaz Tirozin gibi monofenollerin oksidasyonunu moleküler oksijen kullanarak katalizler [82]. Bunun sonucu olarak L-DOPA, tirozinazdaki kresolaz aktivitesi tarafından L-tirozinin orto hidroksilasyonu ile üretilir [42, 68, 83-85].

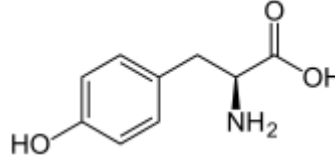
Tirozinaz bakır içeren bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir enzimdir ayrıca bazı meyve ve sebzelerde istenmeyen kararma reaksiyonlarına neden olan bir enzim olduğu tespit edilmiştir [86-87]. Tirozinaz memelilerde renk pigmentlerini üreten melanositlerin oluşumunda oldukça önemlidir. Eksikliğinde ultraviyole ışınların neden olduğu olumsuz etkilere karşı koruyucu görevi yapan melanin pigmentinin oluşumu engellenir [88-89]. Bu çalışmada tirozinazın tirozinden L-DOPA oluşturma özelliği üzerinde durulmuş ve literatürde tirozinaz ilgili olan bazı çalışmalar L-DOPA üretimine yönelik olduğundan L-DOPA sentezi başlığı altında verilmiştir.

4.4.3.3. DOPA Dekarboksilaz Enzimi

DOPA dekarboksilaz (DDC, EC 4.1.1.28) nöral dokularda L-DOPA'nın Dopamine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir [90]. Bu enzim karaciğer ve böbrekler gibi periferik organlarda bulunmaktadır. Memelilerdeki çoğu DDC enzimi L-DOPA, tirozin, fenilalanin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlere karşı geniş bir substrat özgüllüğü göstermektedir [91-92].

4.4.3.4. Tirozin

Aromatik bir molekül olan tirozin, Parkinson hastalığının tedavisinde etkili bir ilaç olarak kullanılan L-DOPA ve ayrıca önemli başka maddelerin de sentezini başlatan öncül bir amino asit olarak tanımlanmaktadır. Şekil 4.6.'da moleküler yapısı gösterilen tirozinin dönüşümü genellikle *tirozinfenoliyaz* (TPL) enzimi ile katalizlenmektedir [78,93].



Şekil 4.3. Tirozinin moleküler yapısı

İnsan vücudu tirozini doğal olarak sentezleyebilir ancak bunun için vücudun doğal olarak üretemediği, esansiyel bir aminoasit olan fenilalaninin dışarıdan vücuda alınması gerekmektedir. Bundan dolayı tirozinin esansiyel bir aminoasit olmadığı savunulmaktadır. Fenilalanin, *fenilalanin hidroksilaz* enziminin etkisiyle tirozine, tirozin de çeşitli enzimlerin etkisiyle başka maddelere (dopamin, adrenalin, noradrenalin vb.) dönüşmektedir. Bahsedilen bu enzimin yapısının bozulması ya da başka nedenlerle inhibe olması durumunda süreçte aksamalar yaşanır ve fenilalanin metabolize edilemez hale gelir. Böylece vücutta fenilalanin birikimi gerçekleşir ve bu durum önemli bir otozomal resesif metabolik hastalık olan fenilketonüri'ye sebep olur. Sonuç olarak tirozinin rol oynadığı tüm maddelerin üretimi dolaylı olarak fenilalanin metabolizmasına bağlı olduğundan bu durum da oldukça önemlidir [94].

4.4.3.5. Katekoller

Katekoller (1,2-dihidroksibenzen) aromatik maddelerin ve ligninin mikroorganizmalar tarafından parçalanması sonucu oluşan ara ürünlerdir [95]. Bunlar *katekol-o-metil transferaz* enzimiyle metabolize edilirler ve ortaya çıkan son metabolitler de idrarla dışarı atılır. Bu enzim katekolamin ve katekolamin içerikli ilaçların metabolizmasında rol oynayan önemli bir enzimdir [96]. Katekoller daha çok hormon (steroid) metabolizmasının metabolitleri olmakla birlikte Adrenalin, Nöradrenalin, Dopamin ve L-DOPA gibi endojen bileşiklerin metabolitleri olarak da ortaya çıkabilirler.

Katekolaminler mikroorganizmaların besin ortamına eklendikleri zaman norepinefrin, epinefrin ve dopamin gibi maddelerin miktarını arttırmış ayrıca bakteri büyüme ve çoğalmasında önemli bir artışa neden olmuştur [97-98].

L-DOPA maddesinin ticari üretiminde son zamanlarda özellikle *Citrobacter freundii* ve *Erwinia herbicola* mikroorganizmaları kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmalar L-DOPA sentezi için tirozin fenol liyaz (TPL) enzimini kullanırlar. Bu olayda katekol, TPL katalizinde başlama materyali olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hücrelerde katekol sentezinin derecesi önemlidir çünkü sentezin durması hücrelerde antioksidan bir etki göstermekle birlikte katekol derişimin yüksek olması toksik bir etki göstermektedir. Yani katekol üretimi sona erdiğinde mikroorganizmalardaki toksisite azalmakta ve antioksidan bir etki oluşmaktadır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada mikroorganizma olarak gram-negatif bakterilerden *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) kullanılmıştır. Bu mikroorganizmanın L-DOPA ve Dopamin üretimi gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [71]. *Citrobacter freundii* mikroorganizması herhangi bir gen transferi işlemi olmaksızın deneylerde saf suş halinde kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan bu mikroorganizma, deneylerin gerçekleştirildiği Fırat Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvar'ında bulunmaktadır.

5.2. Mikroorganizma Büyüme Şartları ve Ortamı

Deneysel çalışmalarda kullanılan *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) mikroorganizmasının saklanması ve geliştirilmesinde Tablo 5.1.'de verilen zengin bir besi ortamı olan Luria-Bertani (LB) besi ortamı kullanılmıştır.

Tablo 5.1. Luria-Bertani (LB) besi ortamı [99].

Bileşen	Bakteri Saklama Besi Ortamı	Bakteri Gelişim Besi Ortamı
Pepton	10 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹
Yeast Ekstrakt	5 g L ⁻¹	5 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹
Agar	15 g L ⁻¹	-

Çalışmalar için hazırlanan stok kültürler yukarıdaki tabloda verilen bakteri saklama besi ortamına ekilerek 37 °C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen kültür, kısa süre içerisinde kullanıldığı için +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca çalışmaların sonraki safhalarında kullanılmak üzere uzun süreli muhafaza kültürleri de oluşturulmuştur.

Bu işlem için logaritmik fazdaki kültürlerden 1 ml alınarak steril haldeki santrifüj tüplerine konulmuştur. Bu tüpler, 5000 devir dk^{-1} hızda 3 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı dökülerek bunun yerine % 20 gliserol içeren besin ortamı toplam 1 ml (0.8 ml sıvı LB + 0.2 ml gliserol) olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan santrifüj tüpleri anlık homojenizasyon sağlamak için vortekslenerek sıvı azot içerisine atılmış ve faz ayrımı oluşmasına fırsat verilmeden hücre süspansiyonu dondurulmuştur. Son basamak olarak da hazırlanan bu stoklar -26 °C’ de muhafazaya alınmıştır. Stok kültürleri bu şekilde hazırlanan hücrelerin yaklaşık 2 yıl kadar canlılıklarını korudukları bilinmektedir. Böylece uzun süreli çalışmaları mikroorganizma sıkıntısı yaşamadan sürdürmek mümkündür. Ancak deneysel çalışmalarımızda yukarıda bahsedilen ve belirli periyotlarla yenilenen +4 °C’deki stok kültürler kullanılmıştır. Bu kültürler L-DOPA ve Dopamin üretimi için hazırlanan fermantasyon ortamına aşılardan önce kültür saklama ortamından bakteri geliştirme ortamına aktarılarak çoğaltılırlar ardından esas fermantasyon ortamına ekilirler. Böylece fermantasyon ortamı taze kültür ile aşılarmış olur. Bahsedilen bu ortamların dikkatli bir şekilde hazırlanması oldukça önemlidir.

Mikroorganizma gelişim ortamında yetiştirilip üretim ortamına aktarılırken;

Öncelikle; deneyler için hazırlanan besin ortamlarından 50 ml alınarak 250 ml’lik erlenlere konulmuştur ardından erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa ile kapatılmış, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Besiyeri içeren bu erlenler sterilizasyon amacıyla 121 °C’de ve 1.2 bar basınçtaki otoklavda 20 dakika bekletilerek (Prior Clave 129) steril hale getirilmiştir. Bu şekilde steril edilen besi yerleri laminar flow kabinde ve UV ışık altında ortam sıcaklığına ulaşana kadar bekletilmiştir. Daha sonra petri kabındaki agar yüzeyinde bulunan bakteri kültürleri steril bir öze (loop) yardımıyla alınarak hazırlanan bu bakteri gelişme ortamı içerisine aşılarmıştır. Kültürlerin aşılandığı bu erlenler 150 devir/dk çalkalama hızına ve 37 °C’ye ayarlanmış orbital inkübatörlü çalkalayıcıya (Selecta Rotabit) alınarak 18 saatlik süre boyunca bakteri gelişiminin sağlanması amacıyla inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda gelişimleri tamamlanan mikroorganizmalar L-DOPA ve Dopamin üretimi için farklı bileşimlerde tasarlanan fermantasyon ortamlarına % 1 (v v⁻¹) oranında aktarılmış ve bu ortamların her biri farklı sürelerde fermantasyona tabii tutulmuştur.

5.3. Fermantasyon Ortamı

Gelişim ortamında üremeleri sağlanan mikroorganizmalar esas üretimimiz için, her biri farklı bileşimde hazırlanmış fermantasyon ortamlarına aktarılarak gelişimleri takip edilmiştir. L-DOPA ve Dopamin üretimi amacıyla çeşitli ortam koşullarında gerçekleştirilen bu deneylerde L-DOPA ve Dopamin sentezi üzerine karbon, organik ve inorganik azot kaynakları ile bunların konsantrasyonlarının yanı sıra, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve oksijen transfer hızı gibi fiziksel parametrelerin etkileri de incelenmiştir. Deneyler genel olarak çalkalamalı ortamda erlenlerde ve oksijen transfer hızının belirlenebilmesi için ise kesikli olarak işletilen biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir.

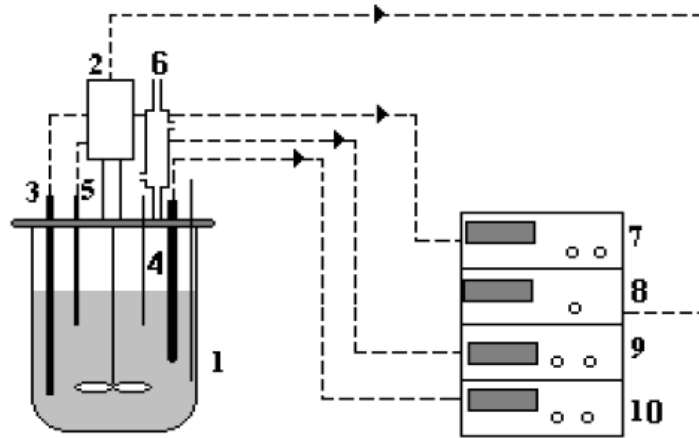
Deneysel çalışmalarda incelenen parametreler:

- a. Sakkaroz konsantrasyonunun etkisi
- b. Organik azot kaynaklarının etkisi (pepton, yeast ekstrakt, üre, tirozin, kazein, soya proteini, peynir altı suyu)
- c. İnorganik azot kaynaklarının etkisi (amonyum sülfat, sodyum nitrat)
- d. Diğer bileşenlerin etkisi (sodyum klorür, kalsiyum klorür, katekol)
- e. Mikroorganizma ekim derişiminin etkisi
- f. Başlangıç ortam pH'nın etkisi
- g. Fermantasyon sıcaklığının etkisi
- h. Karıştırma hızının etkisi

Yukarıda sayılan parametrelerin etkileri incelenerek L-DOPA ve Dopamin üretimi için optimum ortam bileşimleri belirlenmiştir.

5.4. Biyoreaktör İşletim Şartları

L-DOPA ve Dopamin üretimi kesikli olarak işletilen, 800 ml'si çalışma hacmi olmak üzere toplam 1 L hacmindeki karıştırmalı bir biyoreaktörde, erlenlerde yapılan deneylerle belirlenmiş optimum bileşime sahip ortam kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör olarak kullanılan fermentör ısıya dayanıklı pyreks cam hazneye ve paslanmaz çelik malzemeden yapılmış reaktör kapağına sahiptir. Bu kapak üzerinde pH elektrodu, oksijen probu, sıcaklık sensörü, aşı ekleme girişi, ürün çıkışı, hava giriş ve çıkış birimi, karıştırıcı, asit veya baz ilavesi için uygun bağlantılar bulunmaktadır. Sistem pH metre ve buna bağlı pH kontrol ünitesi, asit ve baz pompaları, numune alma kabı ve numune alma pompası, karıştırıcı motor, hava pompası, rotametre ve sıcaklık ölçerden oluşmaktadır (Şekil 5.1). Biyoproses süresince elektrotlar ve kontrol sistemi yardımıyla karıştırma hızı, çözünmüş oksijen derişimi, sıcaklık ve pH değerleri izlenmiştir. Hava akış hızı rotametreden kontrol edilerek, hava 0.2 mikron gözenek çapına sahip filtrelerden geçirildikten sonra karıştırıcının alt kısmındaki hava dağıtıcısından biyoreaktöre gönderilmiştir. Çalışmalar steril koşullarda yapıldığından reaktörün tüm bağlantıları yapıldıktan sonra steril edilmiştir. Bundan sonraki tüm işlemler de sterilliği bozmayacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1. Biyoreaktör Düzenegi, 1: Reaktör, 2: Karıştırıcı motor, 3: Oksijen probu, 4: pH probu, 5: Sıcaklık sensörü, 6: Kondensör, 7: Oksijen metre, 8: Karıştırma hızı kontrol ünitesi, 9: Sıcaklık kontrol ünitesi 10: pHmetre.

5.5. Analitik Yöntemler

Fermantasyon prosesi süresince farklı zamanlarda alınan örneklerde, biyokütle (mikroorganizma) derişimi, hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişimi ile pH değerleri ölçülmüştür.

5.5.1. Biyokütle Derişimi

Fermantasyon ortamında bulunan mikroorganizmaların (biyokütle) derişimi UV-vis spektrofotometrede absorbens ölçümü ile belirlenmiştir. Bunun için öncelikle bir çalışma doğrusu hazırlanmıştır. Bahsedilen bu çalışma doğrusu absorbens ile kuru ağırlık arasında oluşturulmuş ve Ek 1’de verilmiştir (Şekil E1.1). 200 nm ile 800 nm arasında yapılan dalga boyu taraması sonucu en uygun dalga boyu 600 nm olarak belirlenmiş ve okumalar bu noktada yapılmıştır. Okuma yapılırken hazırladığımız çalışma doğrusuna göre absorbens değeri 1.2’ den büyük olduğu zaman uygun oranda seyreltme işlemi uygulanmış ve absorbens değeri çalışma doğrusu üzerine çekilmiştir.

5.5.2. L-DOPA ve Dopaminin HPLC ile Analizi

Fermantasyon ortamında bulunan hücre dışı L-DOPA ve Dopamin ürünlerinin miktarları Shimadzu LC20 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı ile belirlenmiştir. Analizlerin gerçekleştirildiği HPLC şartları Tablo 5.2.’de verilmiştir. Analizlerin gerçekleştirilmesi aşamasında L-DOPA ve Dopamin’in 1000 mg L⁻¹’lik stok çözeltileri hazırlanmış ve bu stok çözeltiler kullanılarak 100 mg L⁻¹ ile 500 mg L⁻¹ arasında farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanmış ve bunlara ait HPLC spektrumları Ek-2’de verilmiştir. Hazırlanan standart çözeltiler ile çalışma doğrusu oluşturulmuş (Ek-3) ve bu grafiğe ait korelasyon katsayısı 0.999 dolaylarında bulunmuştur. Oluşturulan kalibrasyon doğruları analize özgü olarak her defasında yenilenmiştir. Her bir numune 25 dakika analiz edilerek sonuçlar hesaplanmıştır.

Tablo 5.2. HPLC çalışma şartları

Parametre	Özellik
Kolon	250 mm/4.6 mm/100 Å-Inertsil ODS-4 (C18)
Dedektör	UV Dedektör
Taşıyıcı faz	25 mM pH:3.0 Fosfat Tamponu/Metanol (97/3)
Taşıyıcı faz akış hızı	1.0 ml dk-1
Kolon sıcaklığı	25 °C
Tayin yapılan dalga boyu	290 nm
Hesaplama kriteri	Pik Alanı

5.5.3. Sıvı Faz Hacimsel Kütle Aktarım Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızı

L-DOPA ve Dopamin üretiminin gerçekleştirildiği fermantasyon prosesine ait sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı ve oksijen transfer hızı ‘Dinamik Yöntem’ ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde reaktöre gönderilen hava kısa bir süreliğine kesilir ve ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunda meydana gelen azalma ile sisteme tekrardan hava verilmesiyle meydana gelen artış bir oksijen elektroduyla belirli zamanlarda ölçülür [100]. Bu yöntem uygulanırken sisteme beslenen havanın kesilmesi mikroorganizmanın zarar görmeyeceği şekilde çok kısa süreli olarak yapılmıştır. Ayrıca doğru bir hesap yapılabilmesi için yüzey havalandırma etkisinin minimuma indirilmesi amacıyla karıştırma hızı 20-50 devir dk^{-1} arasında tutulmuştur.

Havanın kesilmesiyle fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen derişiminin doğrusal olarak azalmasından faydalanılarak oksijen tüketim hızı denklem (2.10)’daki gibi hesaplanmıştır. Sisteme ait sıvı faz kütle aktarım katsayısının bulunması için ise tekrar hava beslemesi yapılarak ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki doğrusal olmayan artış belirlenmiştir. Deney verilerinden faydalanarak Şekil 2.5’te gösterildiği gibi grafiğin eğiminden yararlanarak $k_L a$ değeri hesaplanmıştır. Örnek grafikler ve hesaplama Ek-4’te verilmiştir.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

L-DOPA ve Dopamin üretimi amacıyla gerçekleştirilen fermantasyon prosesinde bu maddeleri üretme kapasitesinin yüksek olduğu bilinen *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) gram negatif bakterisi kullanılmıştır. Fermantasyon ortamında ilerleyen zamanlarda tüketime bağlı olarak karbon ve azot kaynakları gibi temel besin maddelerinin azalmasıyla bakterilerde stres oluşmaya başlar. Bu sebeple L-DOPA ve Dopamin üretimi tetiklenmiş olur. Bu maddeler hücre içerisinde üretildikten sonra büyük çoğunlukta hücre dışına salgılanırlar. Yapılan bu çalışmada *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşunun ürettiği bu maddelerin hücre dışı miktarlarının tespiti üzerinde durulmuştur. L-DOPA ve Dopamin üretiminin gerçekleştirildiği deneysel çalışmalarda ön gelişim ortamı olarak LB kullanılmıştır. Üretim ortamında ise LB içerisindeki bileşenlere ek olarak karbon kaynağı, organik azot kaynakları, inorganik azot kaynakları ve diğer ortam bileşenlerinin ilavesi ile optimize edilmiş ve maksimum üretim sağlayan ortam belirlenmiştir. L-DOPA ve Dopamin üretimi, hem 50 ml çalışma hacmindeki 250 ml'lik erlenlerde hem de sıcaklığın, pH'ın, karıştırma ve havalandırma hızının doğrudan kontrol edildiği 0.8 L çalışma hacmine sahip 1.0 L'lik kesikli olarak işletilen biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca deneyler herhangi bir başlangıç pH ayarlaması yapılmadan, 6.5 civarındaki doğal ortam pH değerinde gerçekleştirilmiştir.

6.1. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile L-DOPA ve Dopamin Üretimi

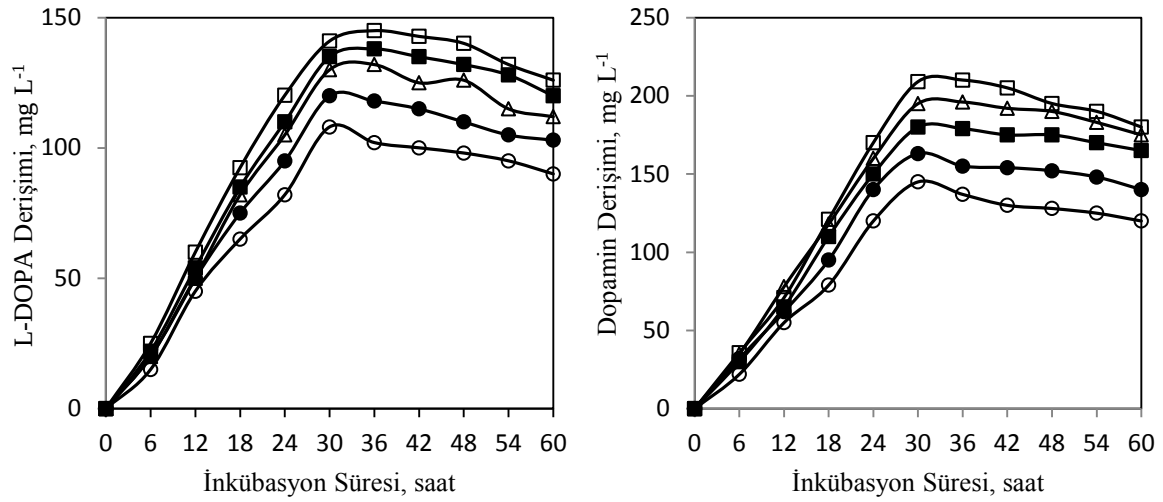
Temel olarak karbon ve azot kaynaklarının kullanıldığı fermantasyon ortamlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile gerçekleştirilen L-DOPA ve Dopamin üretimleri incelenmiştir. İlk olarak erlenlerde yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine karbon kaynağı (sakkaroz) derişimi, organik (pepton, yeast ekstrakt, üre, kazein, tirozin, peynir altı suyu, soya proteini) ve inorganik ((NH₄)₂SO₄, NaNO₃) azot kaynakları ve derişimleri ile diğer ortam bileşenleri (NaCl ve CaCl₂)'nin yanı sıra, pH, sıcaklık, çalkalama hızı ve ortama aşıl原因 mikroorganizma derişiminin etkileri de incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda maksimum oranda L-DOPA ve Dopamin üretiminin gerçekleştirildiği optimum ortam koşulları belirlenmiştir. Deneysel çalışmanın ikinci kısmını ise 0.8 L'lik çalışma hacmine sahip 1.0 L'lik biyoreaktörde yapılan deneyler oluşturmaktadır.

Biyoreaktör kesikli olarak işletilmiş ve hava besleme hızının mikroorganizma gelişimi, oksijen transfer hızı ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine olan etkileri incelenmiştir.

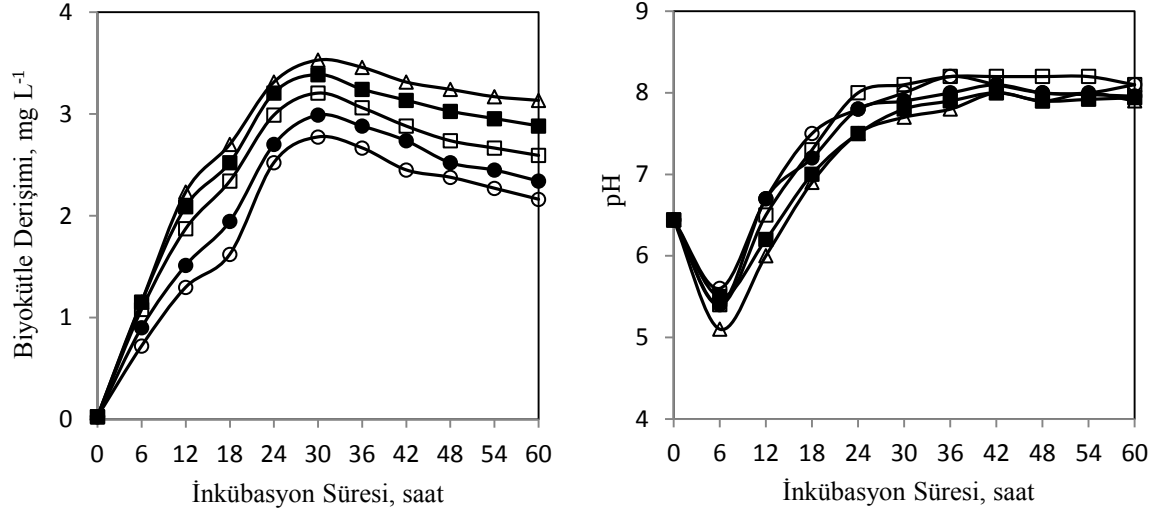
6.1.1. Karbon Kaynağının Etkisi

Ortam bileşimi mikroorganizma gelişimini ve çeşitli metabolitlerin üretimini etkileyen en önemli parametredir. Mevcut ortam bileşenleri içerisinde karbon kaynağı ise polisakkarit, lipid ve protein gibi mikroorganizma hücrelerinin yapıtaşlarını oluşturan temel maddelerin sentezine katıldığından oldukça önemlidir. Ayrıca mikroorganizmalar yaşamları boyunca ihtiyaç duydukları enerjiyi ortama karbon kaynağı olarak eklenen glikoz, sakkaroz, laktoz gibi organik ya da inorganik maddelerin hidrojenlerinin koparılması sonucu açığa çıkan enerjiden sağlarlar. Karbon kaynağı ortam maliyetinin yaklaşık % 60-80'ini oluşturmaktadır [14].

Bu çalışmada L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine karbon kaynağının etkisini araştırmak amacıyla farklı derişimlerde sakkaroz kullanılmıştır. 5 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 10 g L⁻¹ pepton ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilen deneylerde *Citrobacter freundii* (NRRL B 2643) yabanıl suşu ile 1, 2.5, 5 ve 10 g L⁻¹ olmak üzere dört farklı başlangıç sakkaroz derişiminin üretim üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu deneyden elde edilen sonuçlar Şekil 6.1. ve Şekil 6.2'de verilmiştir. Şekil 6.1. başlangıç sakkaroz derişiminin L-DOPA ve Dopamin üretimine etkisini, Şekil 6.2. ise başlangıç sakkaroz derişiminin biyokütle oluşumu üzerine etkisini ve zamanla ortam pH'ındaki değişimi göstermektedir.



Şekil 6.1. Farklı sakkaroz derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 10.0 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E, 10 g L⁻¹ NaCl, pH₀: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.2. Farklı sakkaroz derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 10.0 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E, 10 g L⁻¹ NaCl, pH₀: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Yukarıda verilen Şekil 6.1.'deki grafikler incelendiğinde 141 mg L⁻¹ L-DOPA ve 209 mg L⁻¹ Dopamin değerleriyle en yüksek üretim miktarlarına 2.5 g L⁻¹ sakkaroz derişiminde ulaşıldığı görülmektedir. Yüksek sakkaroz derişiminin L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerinde olumsuz etki yaparak bu metabolitlerin üretim düzeyini düşürdüğü görülmektedir. Bunun nedeni ise bazı karbon kaynaklarının besin ortamında yüksek konsantrasyonlarda bulunmasının mikroorganizmaların salgıladıkları metabolitler üzerinde represyon etkisi yaparak üretilen maddelerin miktarını azaltmasıdır [101-103].

Grafikler incelendiğinde logaritmik evre sonlarına doğru üretim miktarının neredeyse sabitlendiği görülmektedir ve bu da üretimin büyüme eşlikli olduğunu göstermektedir. Yani mikroorganizma bir yandan çoğalıp gelişirken bir yandan da ürün üretmektedir. Ayrıca ürün miktarlarında inkübasyon süresinin sonlarına doğru azalmalar olduğu görülmekte ve bu durum da ürünlerin ortam şartlarından etkilenerek bozulmaya başladığını göstermektedir. Grafikler birlikte incelendiğinde üretilen L-DOPA ve Dopamin derişimlerinin zamanla derişiminin paralel olduğu görülmektedir çünkü üretilen Dopamin miktarı var olan L-DOPA miktarıyla, Dopaminin öncü maddesi olduğu için, yakından ilişkilidir bundan dolayı bu maddelerin zamanla derişiminin paralellik göstermesi beklenen bir durumdur.

Zamanla biyokütle ve pH derişiminin verildiği Şekil 6.2.'deki grafiklere bakıldığında fermentasyon ortamındaki mevcut substratların kullanılmasıyla ortamda artan organik asit gibi bazı maddelerden kaynaklı olarak pH'ın düştüğü ardından üretilen bu metabolitlerin mikroorganizmalar tarafından tekrar kullanılmasıyla yükseldiği ve ayrıca sakkaroz miktarının artmasıyla birlikte biyokütle konsantrasyonunun arttığı fakat yüksek sakkaroz konsantrasyonunun ürün üretimi üzerinde represyon etkisi yapmasından dolayı biyokütle derişimiyle ürün oluşumunun paralellik göstermediği görülmektedir.

6.1.2. Organik Azot Kaynaklarının Etkisi

Bazı değerli metabolitlerin mikrobiyal olarak maksimum düzeyde elde edilebilmesi fermentasyon ortamındaki karbon/azot (C/N) oranının optimum değere ayarlanabilmesiyle sağlanmaktadır [104-105]. Çünkü organik azot kaynaklarının yapısında bulunan bazı aminoasit ve vitaminler mikroorganizmalar için büyüme ve gelişme faktörü olarak görev yapar [12].

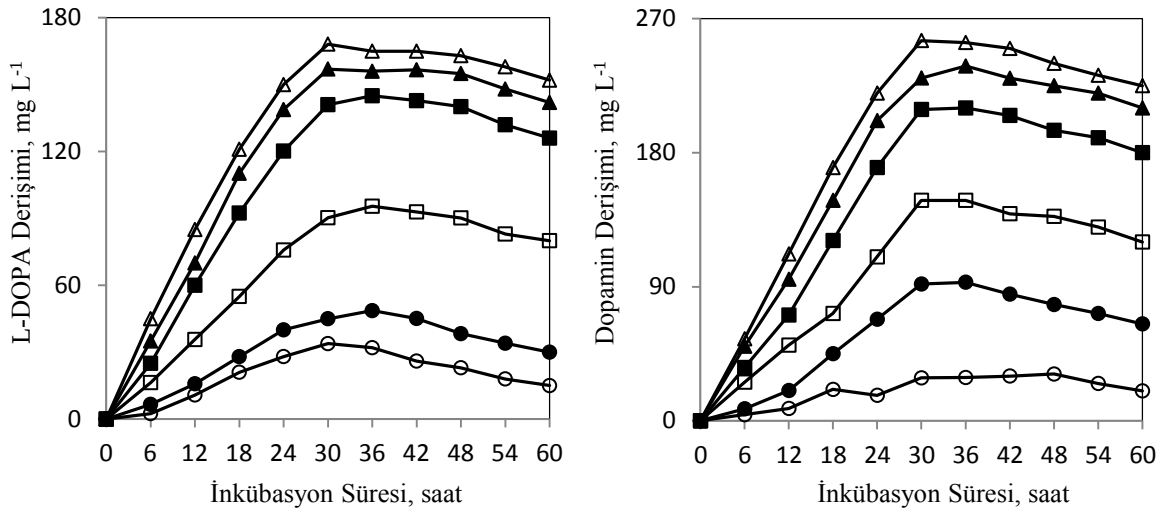
Ayrıca hücresel yapı oluşumuna katılan aminoasit, polipeptit veya protein yapıları maddelerin sentezlenebilmeleri için karbon kaynağının yanında azot kaynağına da önemli ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı fermantasyon ortamında organik ve inorganik azot kaynaklarının bulunması büyük önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmada farklı derişimlerdeki pepton, yeast ekstrakt, üre, tirozin, kazein, peynir altı suyu ve soya proteini gibi organik azot kaynaklarının L-DOPA ve Dopamin sentezine, biyokütle miktarına ve ortam pH'ına olan etkisi araştırılarak ulaşılan sonuçlar aşağıda sunulmuştur. Organik azot kaynaklarından üre, tirozin ve katekolün ürün oluşumu üzerinde pozitif bir etkisi olmadığı için deney sonuçlarına yer verilmemiştir.

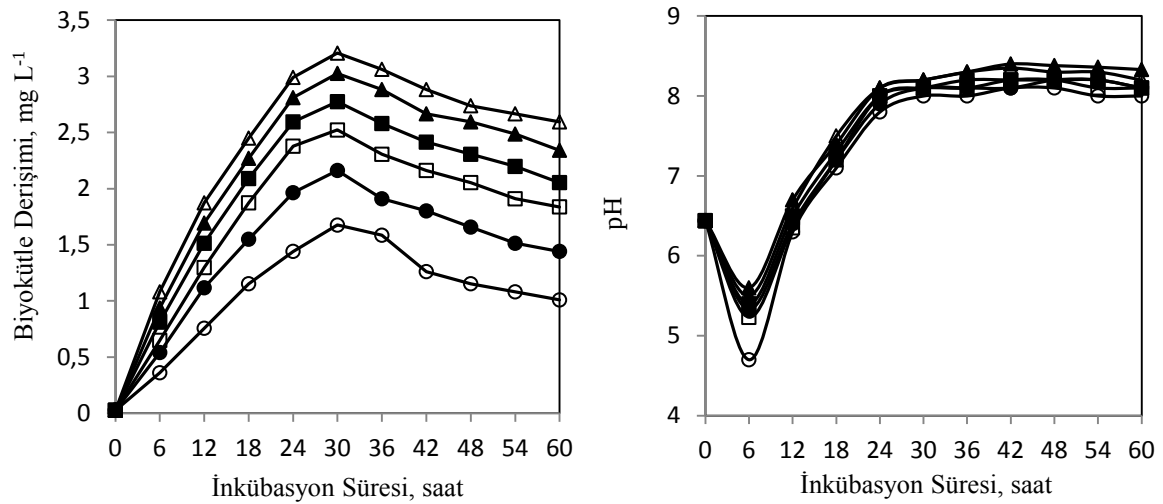
6.1.2.1. Pepton Konsantrasyonunun Etkisi

Pepton temel olarak proteinlerin hidrolizi sonucu oluşan ürünlerdir. Mikroorganizmaların kısmen parçalanmış protein içeren besin ortamlarında iyi derecede gelişme gösterdikleri rapor edilmiştir. Çünkü mikroorganizmaların büyük bir bölümü proteini azot kaynağı olarak kullanamazlar bundan dolayı azotu çok daha rahat kullanabileceği protein hidrolizatlarından sağlarlar. Peptonlar genellikle hayvansal dokular, süt ve soya gibi maddelerin kuvvetli asitler kullanılarak peptit bağlarının mikroorganizmalar için yeterli azot kaynağı sağlayacak düzeyde parçalanmasıyla elde edilir. Mevcut tüm bağların kuvvetli asitle yüksek sıcaklık ve basınç altında kırılması mümkün değildir çünkü bu durum aminoasitlerin yapısının bozulmasına neden olur [12].

Pepton konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi amacıyla, 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile gerçekleştirilen deneyde, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 5 g L⁻¹ yeast ekstrakt ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermantasyon ortamlarına 5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 g L⁻¹ olmak üzere beş farklı derişimde pepton ilave edilerek üretim üzerindeki etkisi gözlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.3. ile Şekil 6.4.'te verilmiştir. Şekil 6.3 'te başlangıç pepton derişiminin L-DOPA ve Dopamin miktarına etkisinin inkübasyon süresiyle değişimi, Şekil 6.4.'te ise pH ve biyokütle derişiminin inkübasyon süresiyle değişimi görülmektedir.



Şekil 6.3. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.4. Farklı pepton derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'nın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ pepton, 5 g L⁻¹ Y.E, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) yabancı suşu ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine başlangıç pepton derişiminin etkisini gösteren Şekil 6.3. incelendiğinde en yüksek L-DOPA ve Dopamin miktarlarına 12.5 g L⁻¹ pepton derişiminde sırasıyla 168 mg L⁻¹ ve 255 mg L⁻¹ değerleriyle ulaşıldığı görülmektedir. L-DOPA ve Dopaminin en yüksek

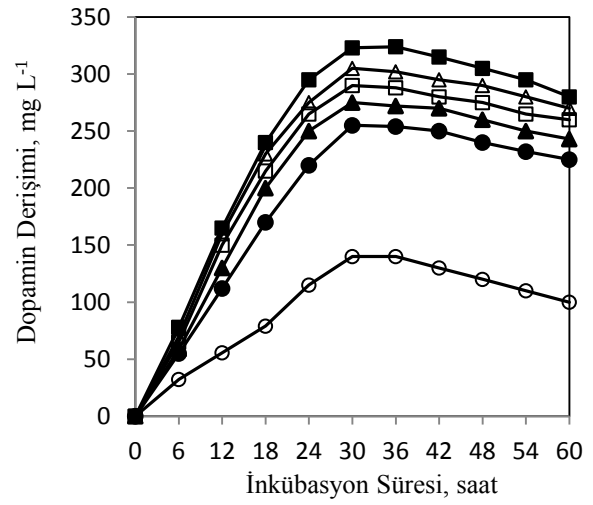
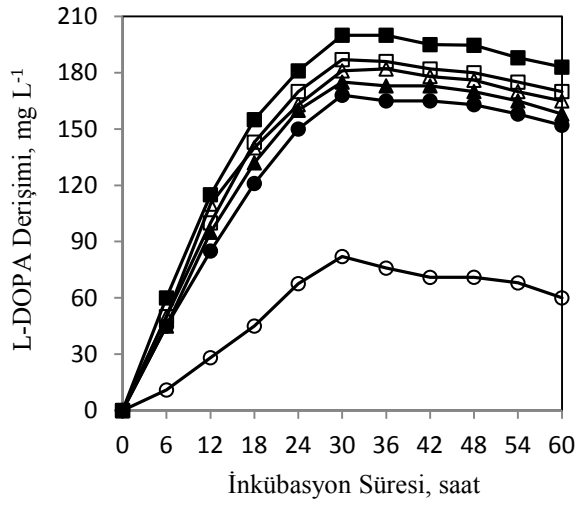
üretim düzeyine logaritmik evre sonlarında ulaşılmış olup, inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir. Bu durum, oluşan ürünlerin yapısının zamanla ve ortam koşullarıyla az da olsa bozulabildiğini göstermektedir. Ayrıca pepton derişiminin en yüksek değerinde bulunduğu 15 g L^{-1} derişiminde ulaşılan ürün miktarlarının 12.5 g L^{-1} derişimine göre biraz daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, yüksek azot konsantrasyonunun ortamda inhibisyon etkisi yapması ve böylece optimum C/N oranının bozulmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Yani substrat artışıyla ürün üretimindeki değişim bir noktaya kadar paralel olsa da bu genel bir durum değildir [106].

Şekil 6.4. incelendiğinde mikroorganizma gelişiminin ürün oluşumuna paralel bir değişim gösterdiği ve pH'ın da tüm ortamlarda önce düşüp sonra tekrar artarak hemen hemen aynı seviyeye geldiği görülmektedir. Bunun nedeni aminoasit yapıları maddelerin miktarının başlangıçta fazla olması ve zamanla mikroorganizmaların hücresel yapı oluşumunu tamamlamasıyla bunların başka maddelere dönüşerek ortam pH'ını yükseltmesidir. Çünkü lag fazında özellikle hücresel faaliyetler ön planda olduğundan pH'ın önce düşüp sonra artması beklenen bir durumdur. Ayrıca ürün oluşumunun hücre büyümesine paralel olması üretimin büyüme eşlikli olduğunu göstermektedir.

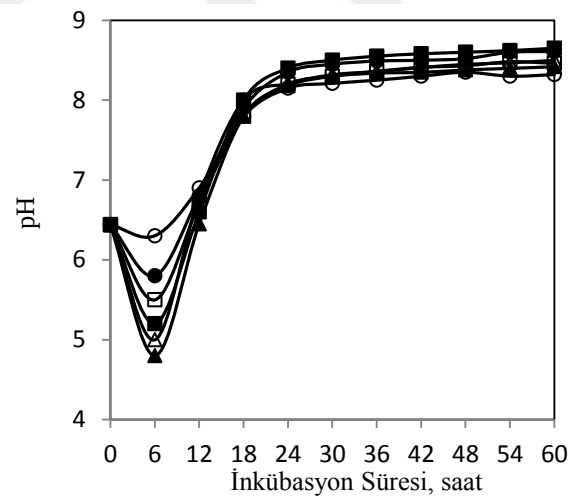
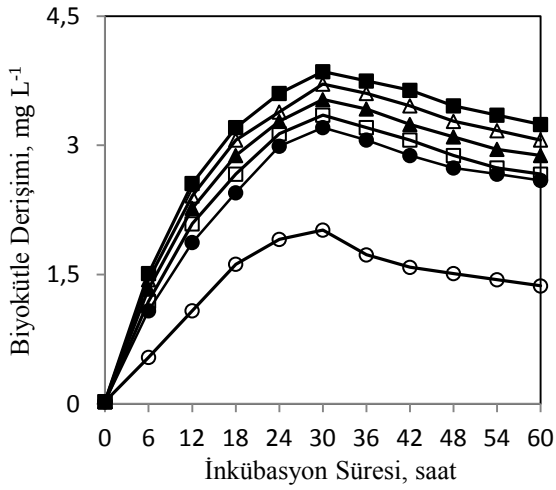
6.1.2.2. Yeast Extract Konsantrasyonunun Etkisi

Yeast extract (maya özütü, maya ekstraktı), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek konsantrasyonda B vitamini içermesinden dolayı mikroorganizmaların gelişimine iyi yönde bir katkı sağlar. Ayrıca içeriğinde aminoasitler, peptitler, karbohidratlar ve mineraller bulundurmasından dolayı önemli bir besiyeri katkı maddesidir [12].

Yeast ekstrakt (Y.E.) derişiminin etkisini araştırmak amacıyla 2.5 g L^{-1} sakkaroz, 12.5 g L^{-1} pepton ve 10 g L^{-1} NaCl içeren fermentasyon ortamlarına 5, 7.5, 10, 12.5 ve 15 g L^{-1} olmak üzere beş farklı derişimde yeast ekstrakt ilave edilerek, 250 ml' lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.5. ve Şekil 6.6.'da sunulmuştur. Şekil 6.5. başlangıç yeast ekstrakt derişimi ile değişen L-DOPA ve Dopamin derişiminin zamanla değişimini, Şekil 6.6. ise yeast ekstrakt derişimiyle biyokütle derişimi ve ortam pH'ının zamanla değişimini göstermektedir.



Şekil 6.5. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b, Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.6. Farklı yeast ekstrakt derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 5.0, □: 7.5, ■: 10.0, △: 12.5, ▲: 15.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b, Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

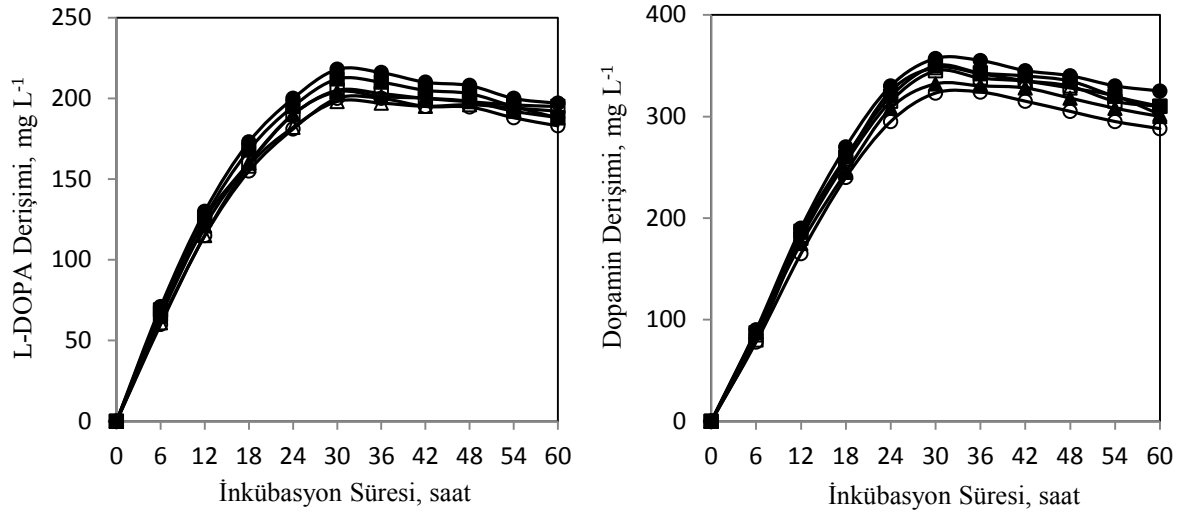
Yeast ekstrakt derişiminin, L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine olan etkisini gösteren Şekil 6.5. incelendiğinde, sırasıyla 200 mg L⁻¹ ve 323 mg L⁻¹ değerleriyle en yüksek L-DOPA ve Dopamin miktarlarına 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt derişiminde ulaşıldığı görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlara oranla 10 g L⁻¹ değerinde daha fazla ürün elde edilmiştir. Bunun nedeni de yine yüksek azot konsantrasyonunun sebep olduğu inhibisyonudur. Diğerlerinde olduğu gibi burada da L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyinin maksimum miktarına logaritmik evre sonlarına doğru ulaşılmış olup inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ürünün zamana ve ortam şartlarına karşı olan davranışdır. Ayrıca yeast ekstrakt konsantrasyonundaki artış L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerinde benzer etki göstermektedir. L-DOPA, Dopaminin öncü maddesidir ve Dopamin miktarının değişimi mevcut L-DOPA miktarının bir ölçüsü olarak kabul edilebilir.

Şekil 6.6'daki grafiklere bakıldığında ise hücre büyümesinin ürün oluşumuyla orantılı olduğu ve pH'ın da artan madde konsantrasyonu ile azalma gösterdiği daha sonra mikroorganizmaların lag fazını geçmesiyle tüm ortamlardaki pH değerlerinin yükselerek yaklaşık aynı seviyeye geldiği görülmektedir.

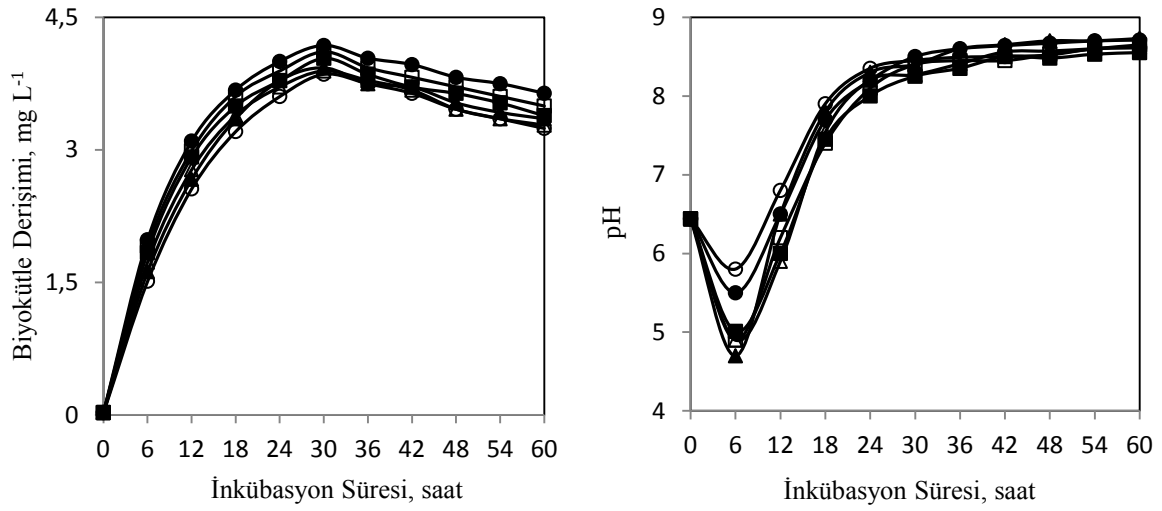
6.1.2.3. Kazein Konsantrasyonunun Etkisi

Temelde bir süt proteini olan kazein mikroorganizmalar tarafından aminoasit ve peptitlerine ayrılarak kullanılır. Bileşiminde aminoasitlerin yanında üreme faktörleri de bulunur. Bundan dolayı yapılan çalışmada kazeinin üreme ve ürün üretim verimini arttıracağı düşünülmüştür.

Kazein konsantrasyonunun etkisini araştırmak amacıyla 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, ve 10 g L⁻¹ NaCl içeren fermantasyon ortamlarına 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 g L⁻¹ olmak üzere beş farklı konsantrasyonda kazein ilave edilerek, 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.7. ve Şekil 6.8.'de sunulmuştur. Şekil 6.7. başlangıç kazein derişimi ile değişen hücre dışı L-DOPA ve Dopamin derişiminin zamanla değişimini, Şekil 6.8. ise kazein derişimiyle biyokütle derişimi ve ortam pH'ının zamanla değişimini göstermektedir.



Şekil 6.7. Farklı kazein derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 0.1, □: 0.25, ■: 0.5, △: 0.75, ▲: 1.0 g L⁻¹ kazein, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.8. Farklı kazein derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 0, ●: 0.1, □: 0.25, ■: 0.5, △: 0.75, ▲: 1.0 g L⁻¹ kazein, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Kazein derişiminin, L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine olan etkisini gösteren Şekil 6.7. incelendiğinde, sırasıyla 216 mg L⁻¹ ve 355 mg L⁻¹ derişim değerleriyle en yüksek hücre dışı L-DOPA ve Dopamin miktarlarına 0.1 g L⁻¹ kazein derişiminde ulaşıldığı, yani kazeinin L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine az da olsa pozitif bir etki yaptığı görülmektedir. Ayrıca deneysel sonuçlara bakıldığında, diğerlerinde olduğu gibi burada da büyüme eşlikli bir üretim olduğundan L-DOPA ve Dopamin üretim düzeyinin maksimum miktarına logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıldığı ve inkübasyon süresi sonuna doğru bu üretim düzeylerinde azda olsa bir azalmanın olduğu görülmektedir. Artan kazein konsantrasyonlarının ürün miktarı üzerinde paralel bir artış yaratmadığı ve değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu grafiklerden anlaşılmaktadır. Bunun nedeni ise kullanılan mikroorganizmaların kazeini etkin bir şekilde parçalaması için gereken proteolitik sistemin bu madde için çok yeterli olmaması şeklinde açıklanabilir. Bu kompleks proteolitik sistemler özellikle bazı mikroorganizmalarda (örneğin *L.lactis*) iyi bir seviyededir [107].

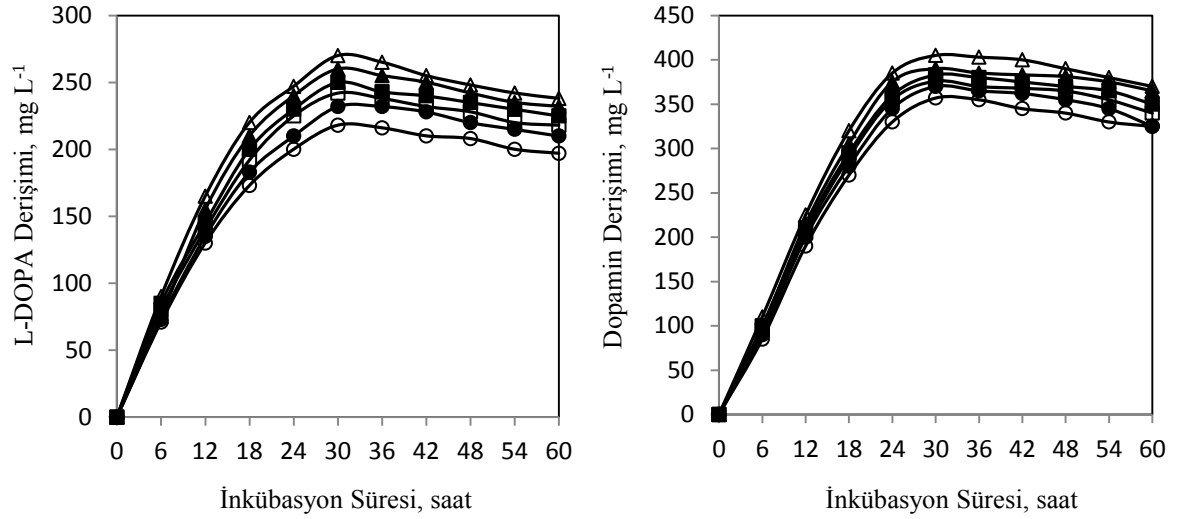
Şekil 6.8.'e bakıldığında biyokütle miktarının 0.1 g L⁻¹ kazein konsantrasyonunda bir miktar artış, yüksek konsantrasyonlarda ise azalma gösterdiği görülmektedir. Bu azalış, besin ortamında artan azot miktarının mikroorganizma gelişimini olumsuz etkilemesinden kaynaklanmış olabilir. Ortamların pH değerlerinin inkübasyon süresiyle değişimini gösteren grafik incelendiğinde mevcut diğer maddelerin de etkisiyle önce azalış sonra tekrar artış olduğu görülmektedir.

6.1.2.4. Soya Proteini Konsantrasyonunun Etkisi

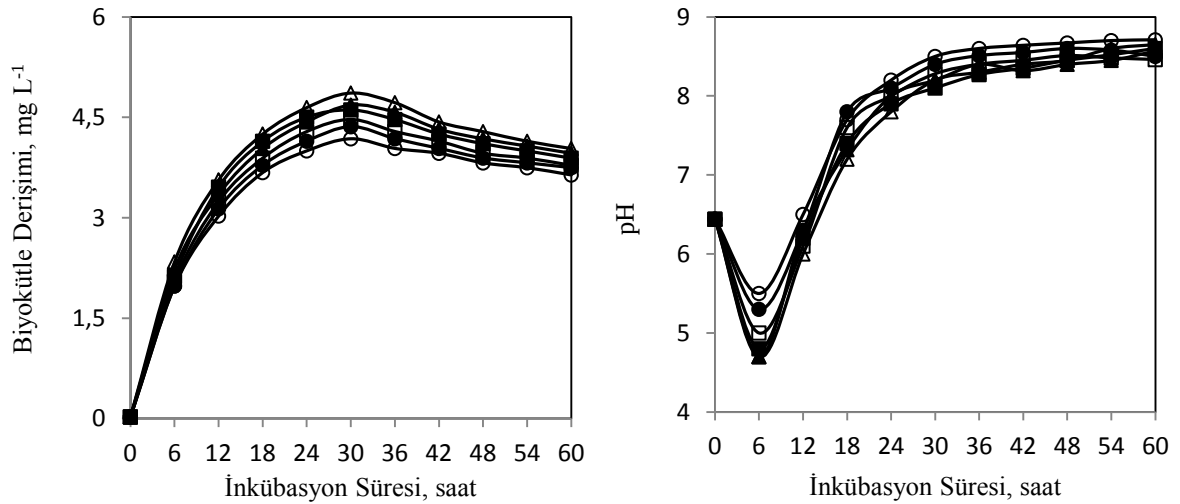
Soya yüksek protein içeriğinden dolayı son yıllarda fermentasyon proseslerinde substrat olarak kullanılan bir maddedir [108]. Ayrıca protein içeriğinin yanında karbonhidrat ve mineral madde içeriğine de sahiptir [109]. Bundan dolayı yapılan çalışmada olumlu bir etki oluşturacağı düşünülerek etkisi araştırılmıştır.

Soya proteini konsantrasyonunun etkisini araştırmak amacıyla 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 10 g L⁻¹ NaCl ve 0.1 g L⁻¹ kazein içeren fermentasyon ortamlarına 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0 g L⁻¹ olmak üzere beş farklı konsantrasyonda soya ilave edilerek, 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.9. ve Şekil 6.10.'da sunulmuştur.

Şekil 6.9. başlangıç soya proteini derişimi ile değişen L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresiyle değişimini, Şekil 6.10. ise soya proteini derişimine karşı biyokütle derişimi ve ortam pH'nın zamanla değişimini göstermektedir.



Şekil 6.9. Farklı soya proteini derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 0.1, □: 0.25, ■: 0.5, △: 0.75, ▲: 1.0 g L⁻¹ soya, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.10. Farklı soya derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'nın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 0.1, □: 0.25, ■: 0.5, △: 0.75, ▲: 1.0 g L⁻¹ soya, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

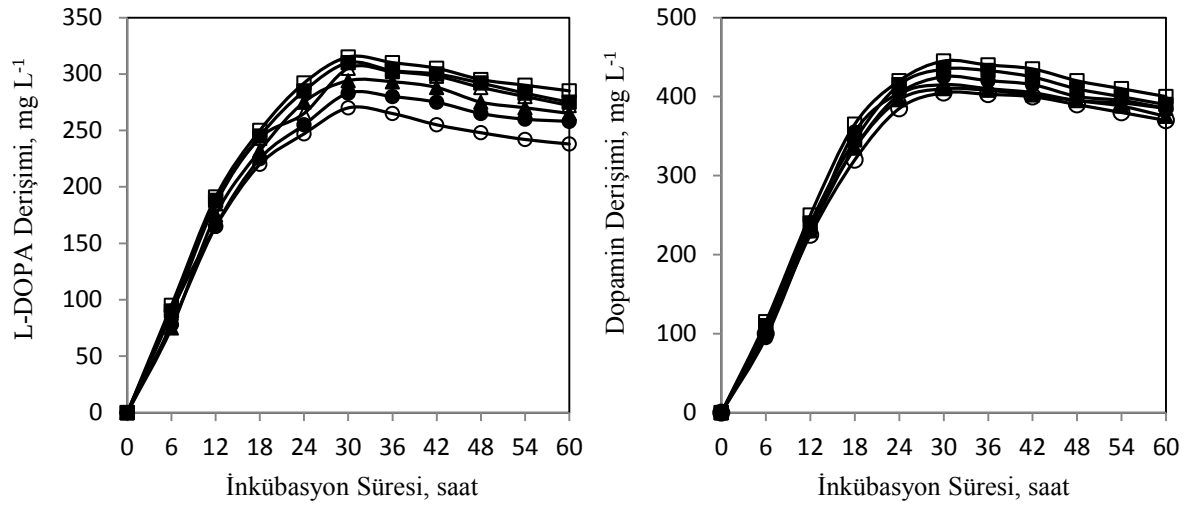
Şekil 6.9. incelendiğinde soya derişiminin artmasıyla L-DOPA ve Dopamin oluşumu üzerinde pozitif bir etkinin oluştuğu görülmektedir. 1.0 g L⁻¹ ile 0.75 g L⁻¹ arasında ürün oluşumu açısından fazla bir fark olmamakla birlikte sırasıyla 270 mg L⁻¹ ve 405 mg L⁻¹ değerleriyle en yüksek L-DOPA ve Dopamin miktarlarına 0.75 g L⁻¹ soya konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Bu durum mikroorganizmaların soyayı tüketebilme kapasitesiyle açıklanabilir. Her substrat için belli bir değerdan sonrasının inhibisyon etkisi yaptığının bilinmesinin yanında mikroorganizmaların bu substratları ne ölçüde tükettiği de önemlidir. Ayrıca önceki kısımlarda açıklandığı gibi L-DOPA miktarıyla Dopamin miktarının orantılı artışının, L-DOPA'nın öncü madde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Biyokütle ve pH değışimlerinin verildiğı Şekil 6.10.'daki grafiklere bakıldığında biyokütlenin ürün oluşumuyla paralel bir artış gösterdiği, pH'ın da yüksek substrat konsantrasyonunda daha fazla düştüğü ve sonra yükselerek tüm ortamlarda yaklaşık aynı değerlere ulaştığı görülmektedir. Yüksek substrat konsantrasyonunda pH'ın daha fazla düşmesi ortamda bulunan aminoasit miktarıyla ilişkilendirilebilir.

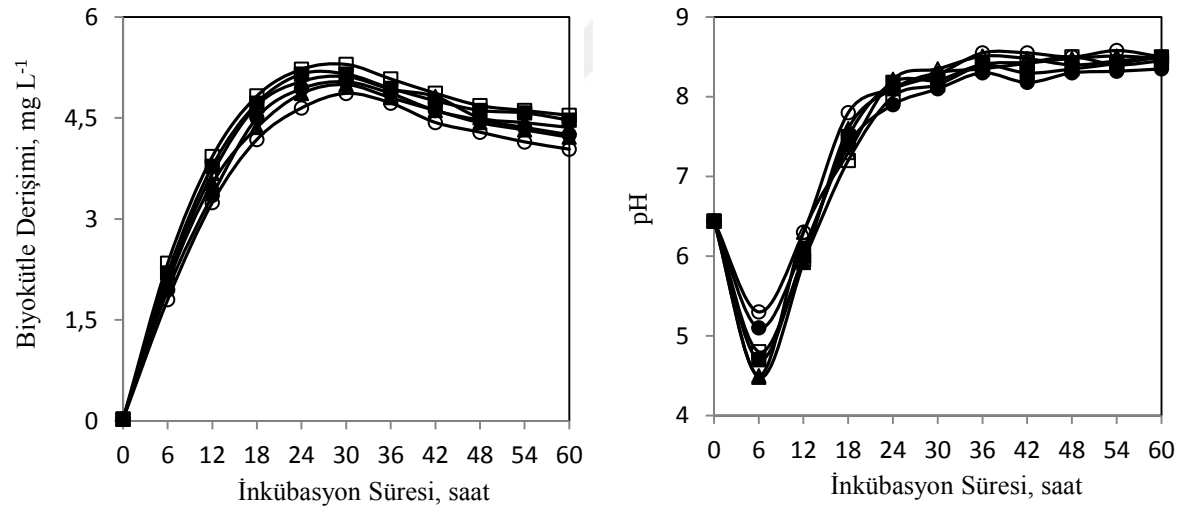
6.1.2.5. Peyniraltı Suyunun Etkisi

Peynir üretimi sırasında peynir mayası yardımıyla sütteki kazeinin çöktürülmesinden sonra kalan sıvı olan peynir altı suyu (PAS) önemli bir yan üründür [110-112]. Bu madde çoğunlukla akarsu ve kanallara verilerek dış ortama salınmaktadır. Fakat peynir altı suyu protein ve laktoz içeriğinden dolayı son yıllarda fermantasyon proseslerinde önemli bir hammadde olarak kullanılmaktadır [112]. Bundan dolayı bu çalışmada olumlu bir etki oluşturacağı düşünülen peynir altı suyunun etkisi araştırılmıştır.

Peynir altı suyunun etkisini araştırmak amacıyla 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein ve 0.75 g L⁻¹ soya proteini içeren fermantasyon ortamlarına % 2.5, % 5, %7.5, % 10 ve % 15 v v⁻¹ olmak üzere beş farklı oranda peynir altı suyu ilave edilerek, 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanil suşu ile gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 6.11. ve Şekil 6.12.'da sunulmuştur. Şekil 6.11. başlangıç peynir altı suyu derişimi ile değışen L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresiyle değışimini, Şekil 6.12. ise peynir altı suyu derişimine karşı biyokütle derişimi ve ortam pH'ının inkübasyon süresiyle değışimini göstermektedir.



Şekil 6.11. Farklı peynir altı suyu derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: % 2.5, □: % 5, ■: % 7.5, △: 0% 10, ▲: % 15 v v⁻¹ peynir altı suyu, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.12. Farklı peynir altı suyu derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi (○: 0, ●: % 2.5, □: % 5, ■: % 7.5, △: 0% 10, ▲: % 15 v v⁻¹ peynir altı suyu, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Şekil 6.11. ile verilen grafikler incelendiğinde en yüksek L-DOPA ve Dopamin miktarlarına, hacimce % 7.5'lik ortamla aralarında çok küçük bir fark olmasıyla birlikte hacimce % 5 oranında peynir altı suyu içeren ortamda ulaşıldığı görülmektedir. Ulaşılan L-DOPA ve Dopamin miktarları sırasıyla 315 mg L⁻¹ ve 445 mg L⁻¹ değerlerindedir.

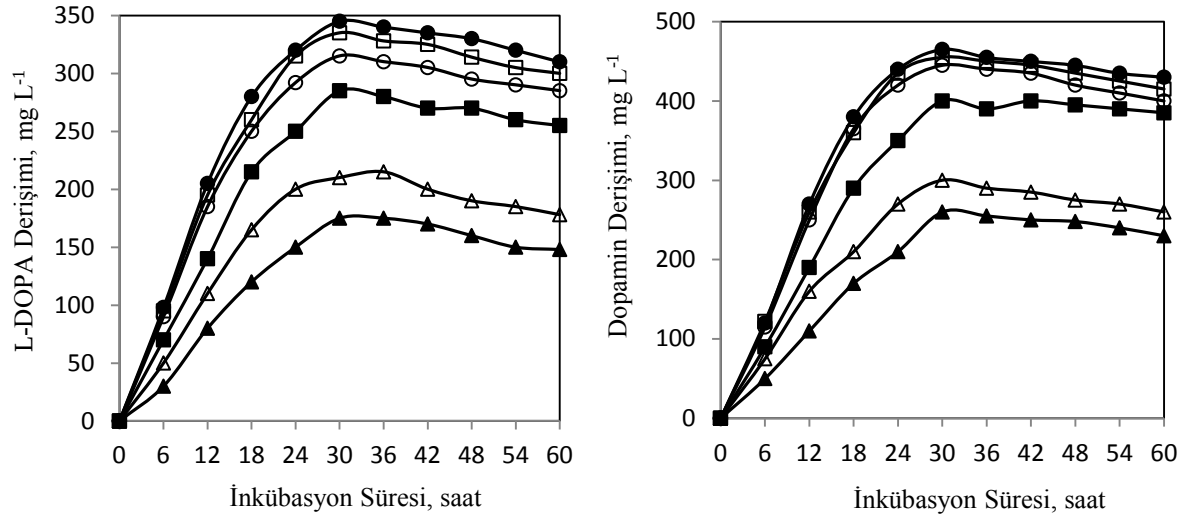
Peynir altı suyu filtre kağıdından süzildikten sonra ortama katılmasına rağmen yine de içinde bulunan küçük partiküllerden dolayı ortam viskozitesini değiştirebilen bir bileşendir. Bundan dolayı yüksek konsantrasyonlarının hücre ve ürün oluşumunu olumsuz etkilediği düşünülmüştür. Ayrıca peynir altı suyunda bulunan proteinler yüksek sıcaklıkta bozulduğundan sterilizasyon sırasında bir miktarının zarar görmüş olabileceği de ihtimaller arasındadır. İnkübasyon süresiyle biyokütle derişimi ve pH değişiminin verildiği Şekil 6.12.'deki grafiklere bakıldığında hücre oluşumunun ürün oluşumundaki gibi değiştiği yani yüksek konsantrasyonlarda gelişimin olumsuz etkilendiği görülmektedir. Bunun nedeni peynir altı suyunun ürün oluşumu üzerinde oluşturduğu etkiyle aynıdır. Hücre gelişimiyle ürün oluşumu paralel sayılabilir.

6.1.3. İnorganik Azot Kaynaklarının Etkisi

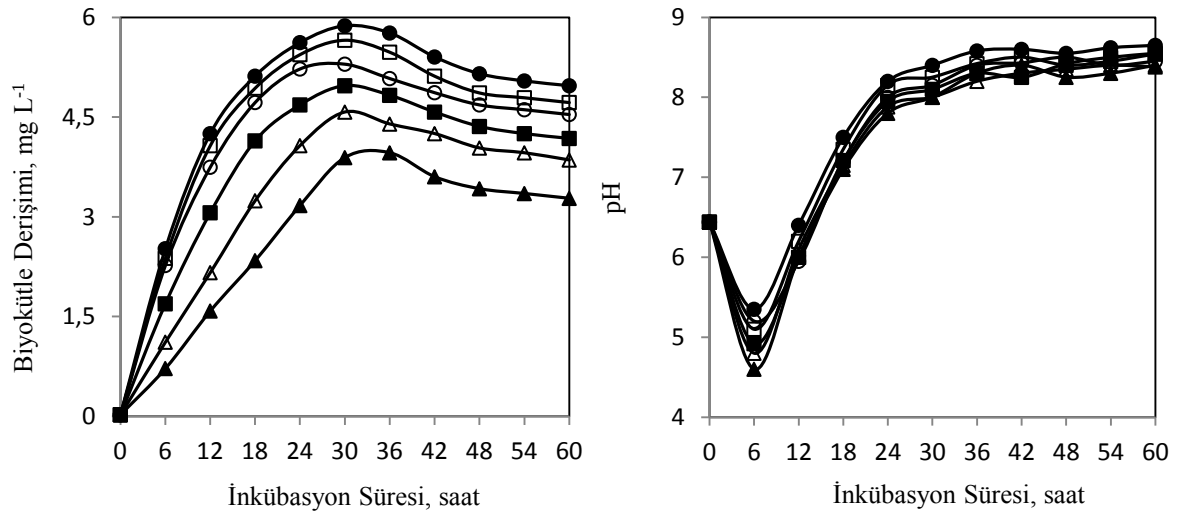
L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine inorganik azot kaynaklarının etkisini araştırmak amacıyla fermantasyon ortamlarına farklı derişimlerde amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ve sodyum nitrat (NaNO₃) ilave edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon ortamına ilave edilen sodyum nitratın ürün verimini negatif yönde etkileyerek azalttığı gözlenmiştir. Çünkü nitrat organik azotun biyokimyasal oksidasyonunun son ürünüdür [113]. Bu nitrat iyonları doğrudan toksik bir etki göstermezken 'bakteriyel nitrat redüktaz' aktivitesi aracılığıyla, zararlı olan nitrit iyonlarına dönüşmektedir [114]. Nitrit hem indirgen hem de yükseltgen özellik gösterip, organik maddelere karşı son derecede reaktiftir ve sodyum nitritin 200 mg kg⁻¹ gibi çok düşük bir konsantrasyonu bile bakterilerin gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir [115]. Yapılan çalışmada da sodyum nitratın üretim üzerine negatif etki göstermesinin nedeninin aynı sebeplerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle sodyum nitrat sonraki çalışmalarda kullanılmamış ve sonuçlarına yer verilmemiştir. Hücre ve ürün oluşumuna olumlu etki yapan amonyum sülfata ait sonuçlar ise aşağıda verilmiştir.

Fermantasyon çalışmalarında, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya, % 5 peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamına 1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L⁻¹ olmak üzere beş farklı derişimde amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) ilave edilerek 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile deneyler gerçekleştirilmiş ve kullanılan inorganik azot kaynaklarından amonyum sülfatın ((NH₄)₂SO₄) mikrobiyal ürün oluşumunu arttırdığı görülmüştür. Bu deneyden elde edilen sonuçlar Şekil 6.13. ve Şekil 6.14.'de verilmiştir.

Şekil 6.13. amonyum sülfat derişiminin zamanla L-DOPA ve Dopamin üretimi ve Şekil 6.14. ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'sındaki değişim üzerine olan etkisini göstermektedir.



Şekil 6.13. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ amonyum sülfat, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.14. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, □: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L⁻¹ amonyum sülfat, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 10 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Şekil 6.13.'te verilen deney sonuçlarına bakıldığında en yüksek L-DOPA ve Dopamin üretimine 1 g L^{-1} amonyum sülfat derişiminde sırasıyla 342 mg L^{-1} ve 467 mg L^{-1} değerleriyle 30. saatlerde ulaşıldığı ayrıca mikroorganizmanın büyüme eğrisi ve ürün oluşum grafikleri karşılaştırıldığında üretimin büyüme eşlikli olduğu görülmektedir. Grafiklerden amonyum sülfatın düşük derişimlerinde üretimin arttığı, yüksek derişimlerinde ise üretimin azaldığı görülmektedir. Üretilen L-DOPA ve Dopamin miktarı 1 g L^{-1} ile 2.5 g L^{-1} derişim değerinde yaklaşık aynı olduğundan bundan sonraki deneysel çalışmalarda amonyum sülfat 1 g L^{-1} olacak şekilde kullanılmıştır.

Şekil 6.14.'te verilen grafiklere bakıldığında amonyum sülfatın yüksek konsantrasyonlarının mikroorganizma üzerinde negatif bir etki yaptığı görülmektedir. Bu ürünün metabolize edilmesiyle ortaya çıkan sülfürlü maddelerin mikroorganizmayı olumsuz etkileyecek bir seviyeye ulaşmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca ortam pH'nın zamanla değişimine bakıldığında ise diğer fermantasyon ortamlarında gerçekleşen olaylarla aynı nedenlerden kaynaklı olarak önce azalıp sonra yükseldiği görülmektedir.

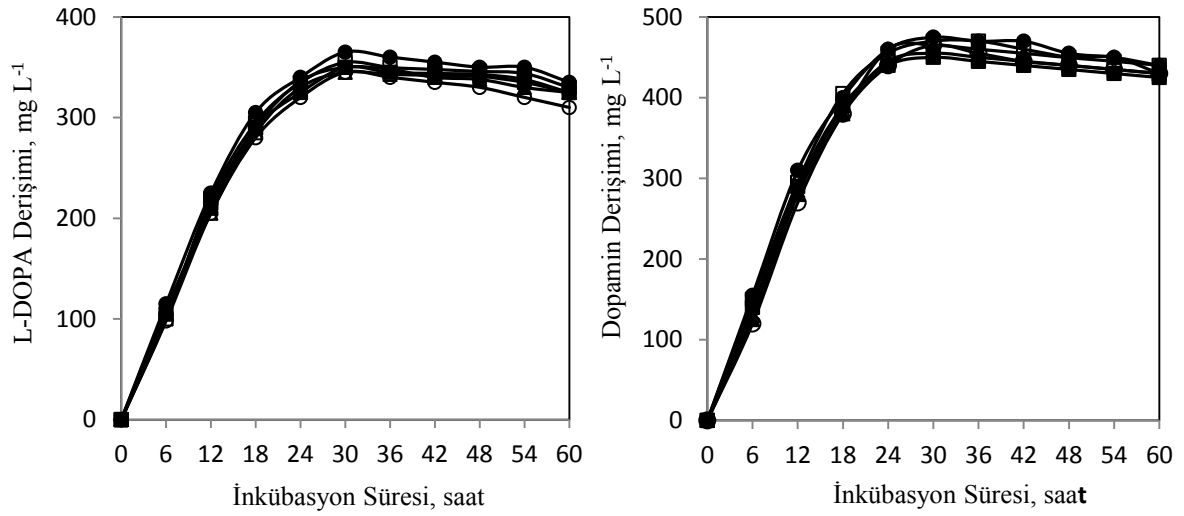
Organik ve inorganik azot kaynaklarının etkisinin araştırıldığı deneysel sonuçlara bakıldığında çalışmalarda kullanılan mikroorganizmanın inorganik azot kaynaklarına kıyasla organik azot kaynaklarından daha yüksek bir fayda sağladığı görülmektedir.

6.1.4. Diğer Bileşenlerin Etkisi

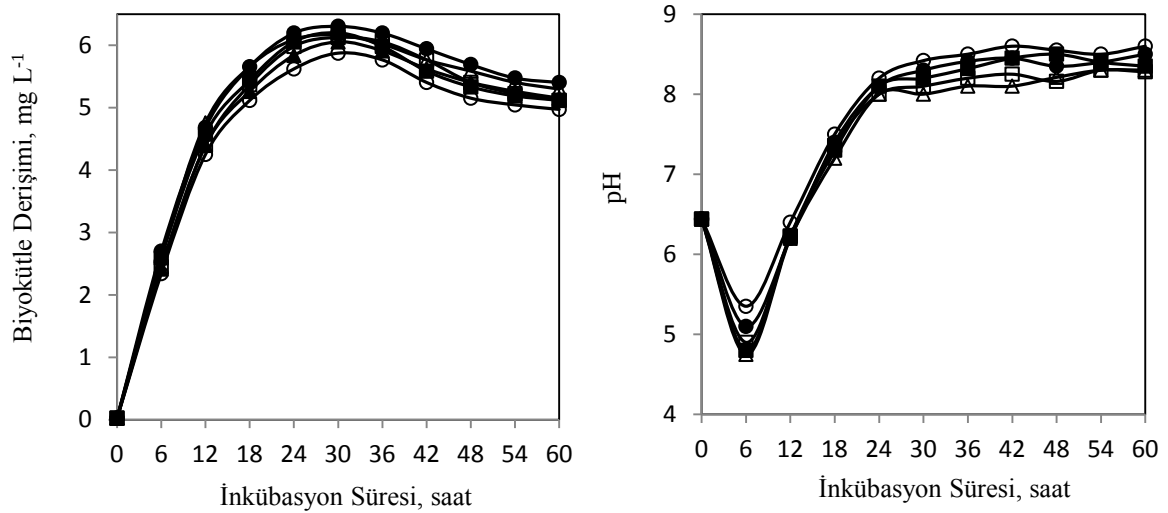
Mikroorganizmalar gelişmek ve ürün üretmek için karbon ve azot kaynaklarının dışında Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi elementlere de ihtiyaç duyarlar. İz elementler bazen özellikle ortama eklenir fakat çoğunlukla su ve diğer ortam bileşenlerindeki safsızlıklar vasıtasıyla ortama katılır, esansiyel katyonlar ise genellikle inorganik tuzlardan sağlanır. [10]. Bu tuzların besin maddesi rollerinden başka, gelişme üzerine teşvik edici rolleri de vardır. Bunun nedeni ise bu elementlerin enzimleri aktifleştirmesi ve bazı enzimlerin komponenti olmasıdır [116]. Ayrıca bahsedilen bu metal iyonları mikrobiyal ürün oluşum reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin kararlılıklarının sağlanması ve oluşan ürünlerin proteolitik etkilere karşı korunması açısından da çok önemlidir ve ortamda mutlaka bulunması gerekmektedir [117].

Bu maddelerin etkisini araştırmak amacıyla temel besiyeri bileşenlerinden olan sodyum klorür (NaCl) yanında kalsiyum klorür de (CaCl_2) fermantasyon ortamına farklı derişimlerde eklenerek denenmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde NaCl'nin farklı konsantrasyonlarının ürün miktarı üzerinde bir etkisi olmadığı fakat farklı CaCl_2 konsantrasyonlarının az da olsa pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ürün üretimi üzerine pozitif bir etkiye sahip olmadığı için NaCl'nin etkisinin incelendiği deney sonuçlarına yer verilmemiştir. NaCl'nin fermantasyon ortamlarında izotonik bir denge oluşturduğu bilinmektedir [12]. Bundan dolayı NaCl'nin düşük ve yüksek derişimleri arasında ürün miktarı açısından bir fark olmadığından, bundan sonraki deneylerde yalnızca ortamdaki izotonik dengeyi sağlaması yani diğer bir deyişle osmotik basıncı ayarlaması amacıyla 1 g L^{-1} konsantrasyonunda kullanılmıştır. Kalsiyum klorür etkisinin araştırıldığı deneye ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Kalsiyum klorür etkisini araştırmak amacıyla yapılan deneylerde, 2.5 g L^{-1} sakkaroz, 12.5 g L^{-1} pepton, 10.0 g L^{-1} yeast ekstrakt, 0.1 g L^{-1} kazein, 0.75 g L^{-1} soya proteini, %5 peynir altı suyu, 1 g L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 1 g L^{-1} NaCl içeren fermantasyon ortamına 1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 g L^{-1} olmak üzere beş farklı derişimde kalsiyum klorür (CaCl_2) ilave edilerek 250 ml'lik erlenlerde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabaniil suşu ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar şekil 6.15. ve şekil 6.16.'de verilmiştir. şekil 6.15. kalsiyum klorür derişiminin zamanla L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine olan etkisini gösterirken şekil 6.16. ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'sının zamanla değişimini göstermektedir.



Şekil 6.15. Farklı CaCl_2 derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, ◻: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L^{-1} CaCl_2 , 10 g L^{-1} yeast ekstrakt, 12.5 g L^{-1} pepton, 2.5 g L^{-1} sakkaroz, 1 g L^{-1} NaCl, 0.1 g L^{-1} kazein, 0.75 g L^{-1} soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L^{-1} amonyum sülfat, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



Şekil 6.16. Farklı CaCl_2 derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'nın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0, ●: 1.0, ◻: 2.5, ■: 5.0, △: 7.5, ▲: 10.0 g L^{-1} CaCl_2 , 10 g L^{-1} yeast ekstrakt, 12.5 g L^{-1} pepton, 2.5 g L^{-1} sakkaroz, 1 g L^{-1} NaCl, 0.1 g L^{-1} kazein, 0.75 g L^{-1} soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L^{-1} amonyum sülfat, pH_b: Doğal pH, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Şekil 6.15'te verilen grafikler incelendiğinde, üretilen L-DOPA ve Dopamin miktarlarının artan kalsiyum klorür konsantrasyonlarında çok fazla değişmediği ve en yüksek miktarlarına sırasıyla 363 mg L⁻¹ ve 471 mg L⁻¹ değerleriyle 1 g L⁻¹ konsantrasyonunda ulaşıldığı görülmektedir. Logaritmik evre sonlarında üretimin neredeyse durmuş olması üretimin büyüme eşlikli olduğunu ve zaman ilerledikçe madde miktarlarında olan azalmalar L-DOPA ve Dopamin maddelerinin ortam şartlarından etkilendiğini göstermektedir.

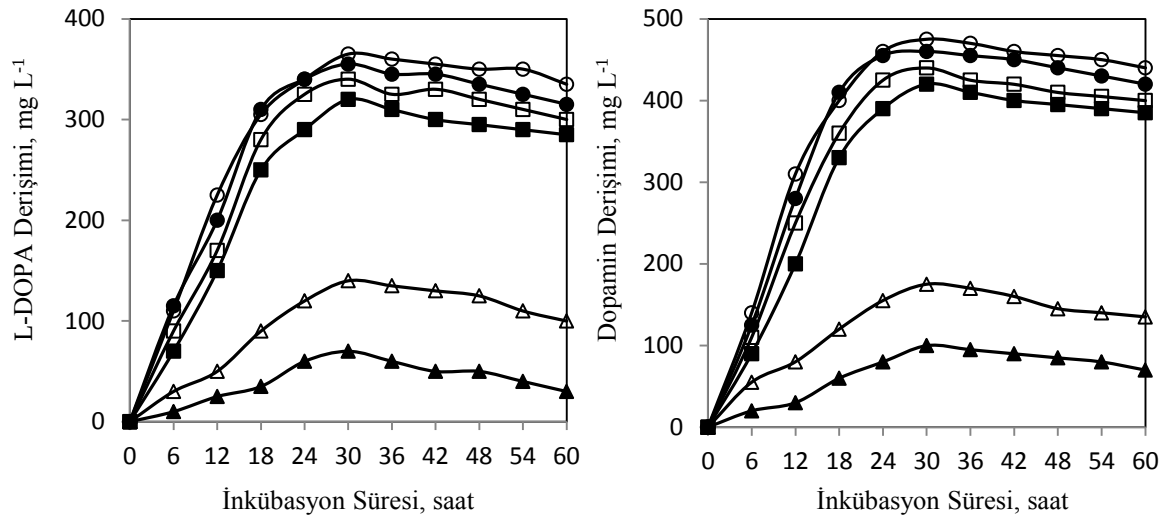
Kalsiyum mikroorganizmaların beslenmelerinde önemli bir madde olduğu için kalsiyum klorür tuzu olarak ortama ilave edilmiştir. Tuzların mikroorganizmalar açısından önemi yukarıda açıklandığı gibi olmakla birlikte fazlasının zararlı olduğu da bilinen bir durumdur. Ortamdaki izotonik denge NaCl ile büyük oranda sağlandığından CaCl₂ miktarı iyi ayarlanmalıdır. Bu tuz aracılığıyla ortama katılan kalsiyum dengenin ayarlanmasına yardım etmekle birlikte bazı enzimleri aktiveleştirme görevini de yapmaktadır [12].

Biyokütle derişimi ve pH değişimini gösteren Şekil 6.16.'daki deney sonuçlarına bakıldığında biyokütle miktarının ürün miktarıyla orantılı bir şekilde değiştiği ve pH'ın da diğer tüm ortamlarda olduğu gibi önce düşüp sonra artarak yaklaşık aynı seviyeye geldiği görülmektedir.

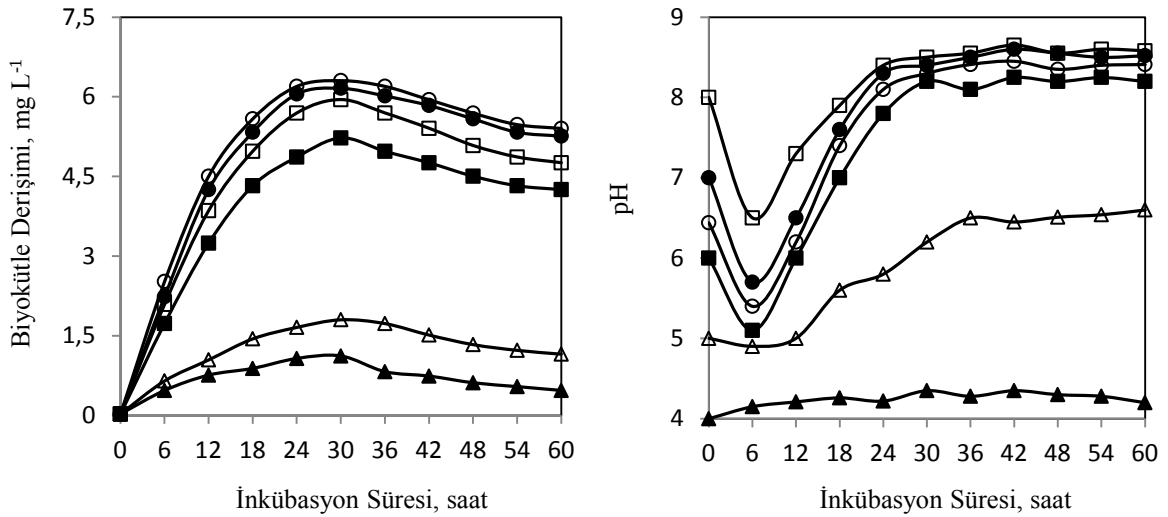
6.1.5. Başlangıç Ortam pH'sının Etkisi

Mikrobiyal üretim proseslerinde ortam pH'ı kullanılan karbon kaynaklarının farklı ürünlere dönüşmesiyle yani bazı organik asitlerin oluşması ve onların yeniden kullanılması olaylarından dolayı zamanla değişim göstermektedir ve bu değişim başlangıç pH değeri ile de yakından ilişkilidir. pH mikroorganizma gelişimi ve ürün üretimi için oldukça önem taşımaktadır bundan dolayı kontrolü de son derece önemlidir.

Başlangıç ortam pH'ının mikrobiyal ürün oluşumuna etkisini incelemek amacıyla 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, %5 peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1 g L⁻¹ NaCl ve 1 g L⁻¹ CaCl₂ içeren fermantasyon ortamında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabani suşu ile doğal, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0 olmak üzere beş farklı başlangıç pH değerinde deneyler gerçekleştirilerek ulaşılan sonuçlar Şekil 6.17. ve Şekil 6.18.'de verilmiştir. Şekil 6.17.'de, başlangıç pH'ının zamanla L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi, Şekil 6.18.'de ise biyokütle miktarı ve ortam pH'ının zamanla değişimi üzerine etkisi görülmektedir.



Şekil 6.17. Farklı pH değerlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: Doğal pH, ●: 7.0, □: 8.0, ■: 6.0, △: 5.0, ▲: 4.0, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



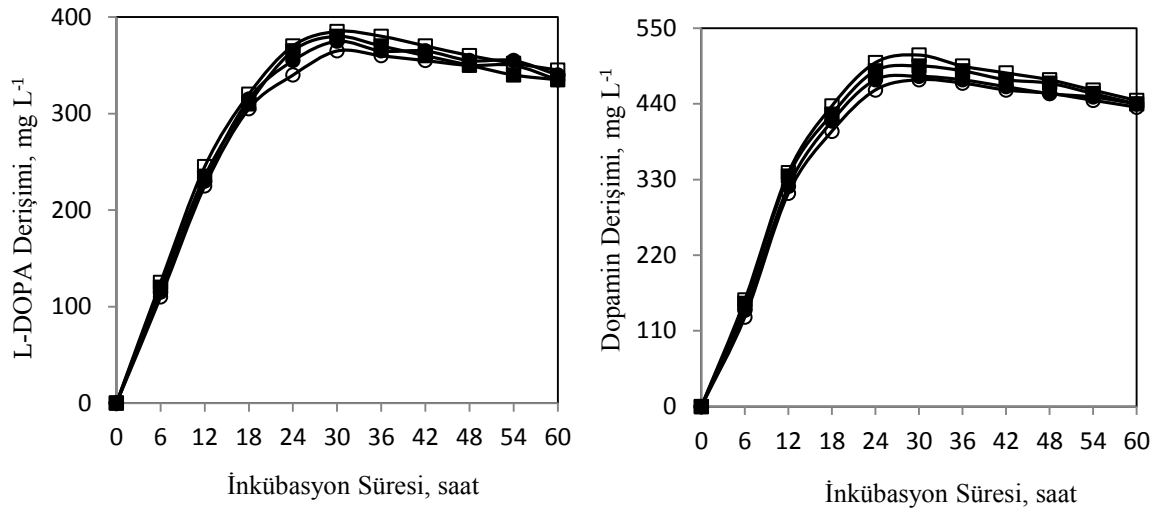
Şekil 6.18. Farklı pH değerlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'nın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: Doğal pH, ●: 7.0, □: 8.0, ■: 6.0, △: 5.0, ▲: 4.0, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 1 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

Yukarıdaki Şekil 6.17. ile verilen grafikler incelendiğinde L-DOPA ve Dopamin üretiminin en yüksek olduğu pH değerinin ortamın doğal pH'ı olan 6.5 civarında sırasıyla 363 mg L⁻¹ ve 471 mg L⁻¹ olduğu ayrıca değişen pH değerlerinin ürün üzerinde negatif bir etki yaptığı görülmektedir. En yüksek üretimin doğal ve doğala yakın pH değerlerinde gerçekleşmiş olması beklenen bir durumdur. Azalan pH değerleriyle ürün üretiminin oldukça fazla düşmesi mikroorganizmaların bu ortamlarda substratın büyük bölümünü kendi iç pH değerini sabit tutmak için kullanmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca L-DOPA ve Dopamin maddelerinin üretimi düşük pH değerlerinde engellenmektedir.

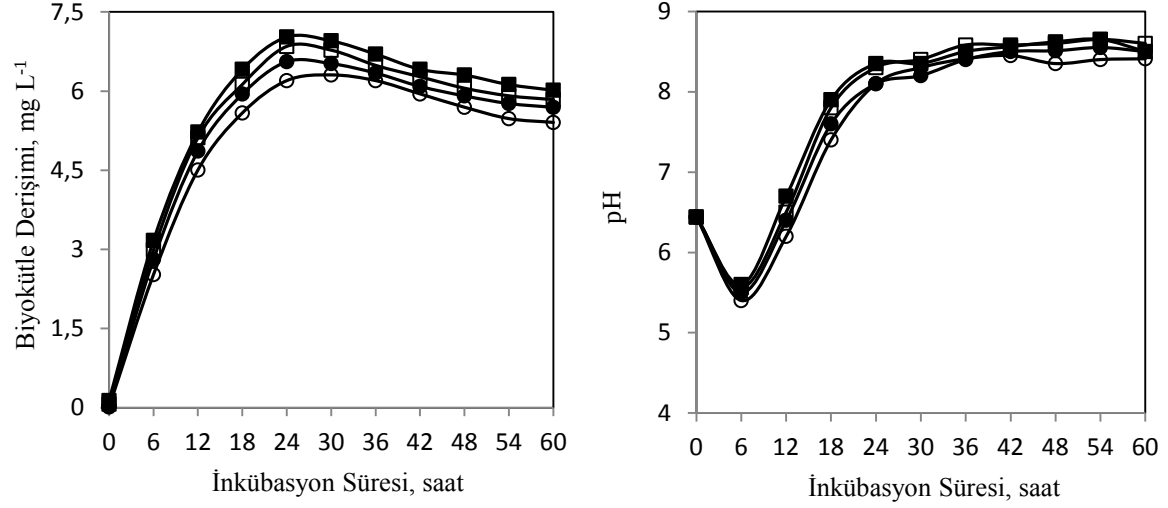
Biyokütle derişiminin ve pH değışiminin verildiğı Şekil 6.18.'deki grafiklere bakıldığında biyokütle oluşumunun doğal pH değerinden uzaklaştıkça, iç dengeyi bozduğundan, azaldığı görülmektedir. Bu tarz durumlarda mikroorganizma mevcut enerjisini çoğalmak için değil de yaşam fonksiyonlarını yerine getirebilmek için kullanmaktadır. Ayrıca pH değerlerine bakıldığında özellikle pH'ın 4 olduğu noktada mikroorganizmaların çok olumsuz etkilendiğı ve normal fonksiyonlarını yerine getiremediğinden bu ortamın pH'ının normal seviyeye yükselemediğı görülmektedir.

6.1.6. Başlangıç Mikroorganizma Konsantrasyonunun Etkisi

L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine farklı mikroorganizma konsantrasyonlarının etkisini araştırmak amacıyla 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 12.5 g L⁻¹ pepton, 10.0 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, %5 peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1 g L⁻¹ NaCl ve 1 g L⁻¹ CaCl₂ içeren doğal pH değerindeki fermantasyon ortamlarına hacimce % 0.5, 1, 2.5 ve 5 olacak şekilde mikroorganizma ekimi yapılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Ulaşılan sonuçlar Şekil 6.19. ve 6.20.'de verilmiştir. Şekil 6.19.'da, ekim konsantrasyonunun zamanla L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisi, Şekil 6.20.'de ise biyokütle oluşumu ve ortam pH'ının zamanla değışimi üzerine etkisi görülmektedir.



Şekil 6.19. Farklı ekim derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: % 0.5, ●: % 1, □: % 2.5, ■: % 5 v v⁻¹ mikroorganizma, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Çalkalama hızı: 150 rpm, pH_b: Doğal pH, Ortam sıcaklığı: 37 °C).



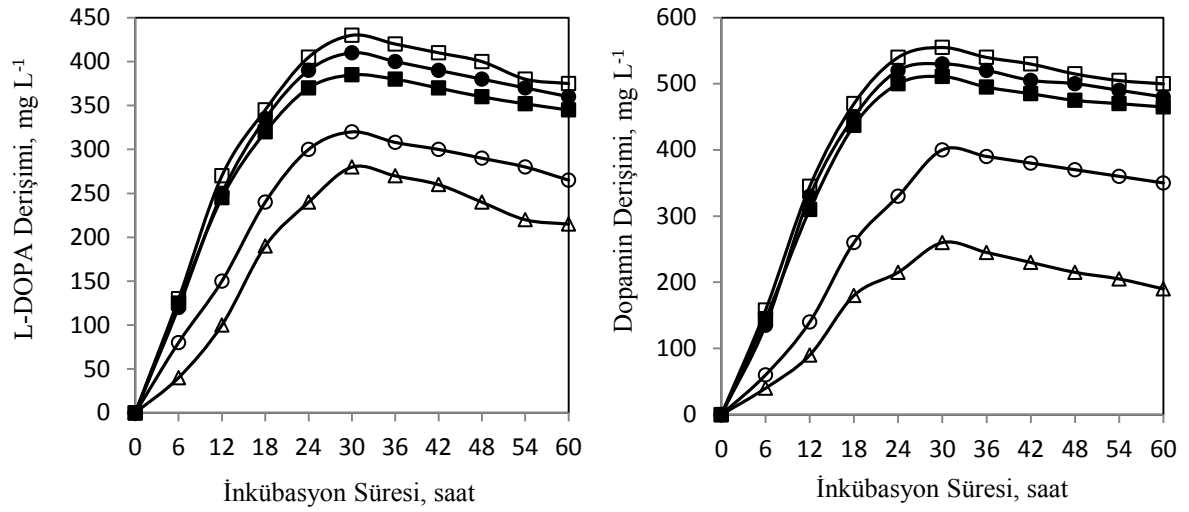
Şekil 6.20. Farklı ekim derişimlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: % 0.5, ●: % 1, □: % 2.5, ■: % 5 v v⁻¹ mikroorganizma, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Çalkalama hızı: 150 rpm, pH_b: Doğal pH, Ortam sıcaklığı: 37 °C).

L-DOPA ve Dopamin üretim miktarlarını gösteren Şekil 6.20.'deki grafikler incelendiğinde ekim konsantrasyonunun artması üretim üzerinde büyük bir fark yaratmamakla birlikte en yüksek üretim düzeyine hacimce % 2.5 oranında mikroorganizma ekimi yapılan ortamda ulaşılmıştır. Bu değerler sırasıyla 382 mg L⁻¹ ve 511 mg L⁻¹'dir. Şekil 6.21. ile verilen grafiklere bakıldığında ekim konsantrasyonuyla biyokütle değişiminin arttığı ve pH'ın da beklenildiği gibi önce düşüp sonra artarak normal seviyeye ulaştığı görülmektedir.

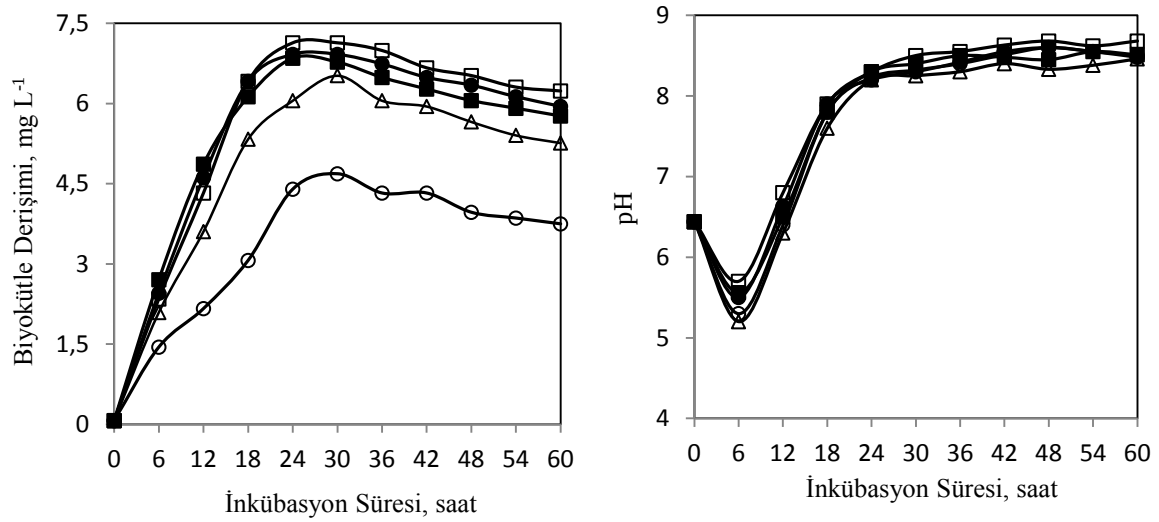
6.1.7. Fermantasyon Sıcaklığının Etkisi

Fermantasyon proseslerinde sıcaklık önemli bir parametredir ve iyi ayarlanması gerekmektedir. Çünkü yüksek sıcaklık hücre denatürasyonunu artırır ve hücre yapımı üzerinde negatif bir etki yapar. Ayrıca yüksek sıcaklık değerlerinde, mikroorganizma proteinlerinin bozulmasıyla birlikte oluşan ürünlerin yapısı da bozulabilir. Düşük sıcaklık değerlerinde ise besin maddelerinin mikroorganizmaya difüzyonu azaldığından mikroorganizma yeterli oranda gelişemez ve üretim miktarında düşüş olur. Sıcaklık değişiminin bir diğer etkisi de pH üzerinedir. Sıcaklık değişiminin yüksek olması ortam pH'ının bir miktar düşmesine neden olur. Sonuç olarak mikroorganizma gelişiminin sağlanabilmesi ve mikrobiyal ürün üretiminin iyi bir şekilde gerçekleştirilebilmesi sıcaklıkla yakından ilişkilidir [118-119].

Sıcaklığın L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla optimum şartlara göre hazırlanan fermantasyon ortamlarında 27, 30, 33, 37 ve 40 °C'de yapılan deneylere ait sonuçlar Şekil 6.21 ve Şekil 6.22' de sunulmuştur.



Şekil 6.21. Farklı sıcaklık değerlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 27, ●: 30, □: 33, ■: 37, △: 40 °C, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, pH_b: Doğal pH).



Şekil 6.22. Farklı sıcaklık değerlerinde *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'ın inkübasyon süresi ile değışimi (Şartlar: ○: 27, ●: 30, □: 33, ■: 37, △: 40 °C, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.10 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Çalkalama hızı: 150 rpm, pH_b: Doğal pH).

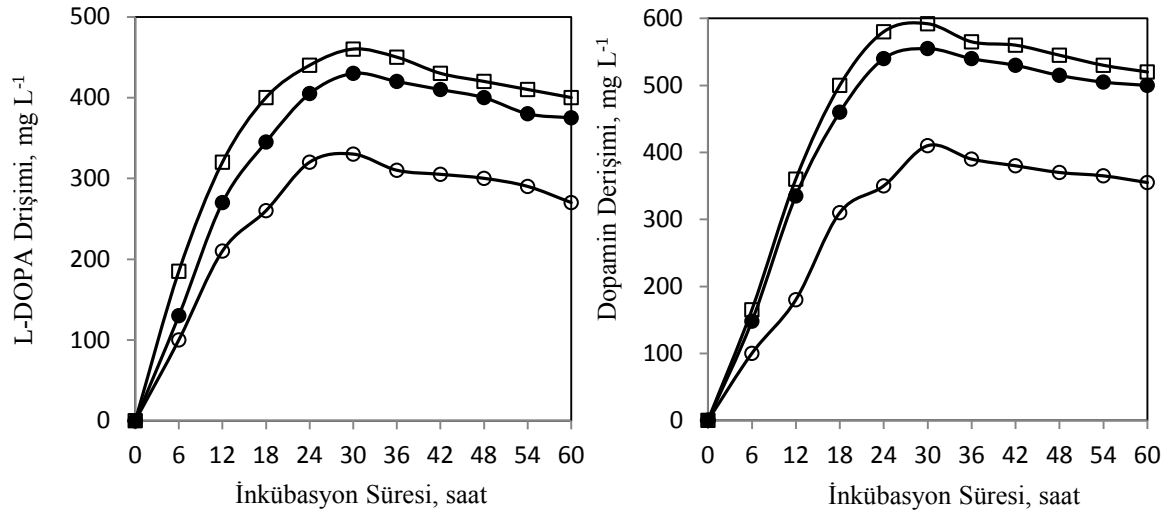
Şekil 6.21.'deki grafikler en yüksek L-DOPA ve Dopamin üretiminin 33 °C sıcaklık değerinde gerçekleştiğini göstermektedir. Ulaşılan bu değerler sırasıyla 428 mg L⁻¹ ve 553 mg L⁻¹'dir. Sıcaklık arttıkça ürün miktarlarında bir azalma meydana geldiği görülmektedir. Buradan kullanılan mikroorganizmanın gelişim ve üreme gösterdiği optimum sıcaklık değerinin 33 °C civarında olduğu sonucu çıkarılabilir. Yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça mikroorganizma proteinleri bundan etkilenmiş dolayısıyla ürün verimi düşmüştür. En az miktarda ürünlerin elde edildiği ortam en düşük sıcaklık değeri olan 27 °C'ye ayarlanan ortamdır. Sıcaklık düştükçe beslenme, gelişme gibi hücresel faaliyetler azalacağından bu beklenen bir durumdur.

Şekil 6.22. ile gösterilen grafiklere bakıldığında hücre büyümesinin ürün oluşumuyla paralel olduğu ve ayrıca mikroorganizmaların lag fazını geçmesiyle tüm ortamlardaki pH değerlerinin yükselerek yaklaşık aynı seviyeye geldiği görülmektedir.

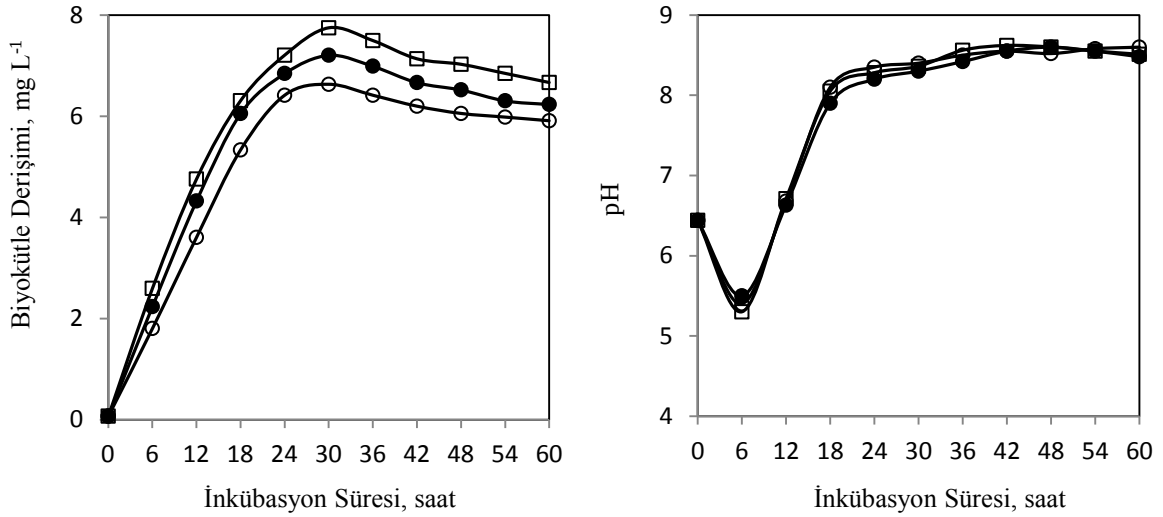
6.1.8. Çalkalama Hızının Etkisi

Çalkalama faktörü oksijene ve besin maddelerine ulaşımı kolaylaştırdığından mikrobiyal üreme ve ürün üretimi için oldukça önemli bir etkidir. Çünkü ihtiyaç duyulan oksijen iyi bir karıştırma vasıtasıyla sağlanır [120]. Karıştırma ya da çalkalama işlemi yapılmazsa mikroorganizmalar erlenin altına doğru çökecek, oksijen ve substrat kullanımları kısıtlanacaktır. Ayrıca karıştırma ile mikroorganizma hücreleri etrafındaki film tabakası inceleyeceğinden hücrelere olan oksijen ve besin maddesi transferi de artacaktır. Çalkalama hızının çok yüksek olması da mikroorganizmalar açısından bir dezavantaj oluşturacağından hız ayarının iyi yapılması gerekmektedir. Yüksek hız santrifüj etkisi yaratacağından mikroorganizmalar erlen duvarına yapışır ve besin maddelerinden yararlanamaz. Laboratuvar ölçekli çalkalayıcılarla çok yüksek hızlara çıkmak zaten mümkün değildir.

Çalkalama hızının etkisini araştırmak amacıyla optimum şartlara göre hazırlanmış fermentasyon ortamlarında 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) yabanıl suşu ile özellikle oksijen transferini önemli ölçüde etkileyen çalkalama hızının etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.23. ve Şekil 6.24.'te verilmiştir. Şekil 6.23 çalkalama hızının zamanla L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine yaptığı etkiyi gösterirken, Şekil 6.24. zamanla değişen biyokütle derişimi ve pH değerlerini göstermektedir.



Şekil 6.23. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 100, ●: 150, □: 200 rpm, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Sıcaklık: 33 °C, pH_b: Doğal pH).



Şekil 6.24. Farklı çalkalama hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde biyokütle derişimi ile pH'nın inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 100, ●: 150, □: 200 rpm, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Sıcaklık: 33 °C, pH_b: Doğal pH).

Şekil 6.23.'te sunulan deneysel sonuçlara bakıldığında çalkalama hızının artırılmasıyla üretilen L-DOPA ve Dopamin miktarlarında da artış olduğu görülmektedir. En yüksek L-DOPA ve Dopamin miktarlarına sırasıyla 458 mg L⁻¹ ve 592 mg L⁻¹ değerleriyle 200 rpm çalkalama hızında ulaşılmıştır. Sonuçlardan yola çıkılarak düşük çalkalama hızlarında kütle transferinin kısıtlandığı ve böylece ürün oluşumunun daha az olduğu deneysel olarak da görülmüştür.

Biyokütle derişimi ve pH değişiminin verildiği Şekil 6.24.'e bakıldığında maksimum hücre oluşumunun ürün oluşumundaki gibi çalkalama hızıyla arttığı pH'ın ise tüm ortamlarda birbirine çok yakın değerlerle önce azalıp sonra artarak normal seviyeye ulaştığı görülmektedir.

Erlenlerde yapılan deneyler sonucunda maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimine yönelik optimum ortam şartları belirlenmiştir. Tablo 6.1.'de en yüksek ürün miktarlarının elde edildiği optimum ortam bileşimleri verilmiştir.

Tablo 6.1. L-DOPA ve Dopamin üretimi için tasarlanan optimum ortam bileşimleri

Ortam bileşeni	Optimum madde miktarı
Sakkaroz	2.5 g L ⁻¹
Pepton	12.5 g L ⁻¹
Yeast ekstrakt	10 g L ⁻¹
Kazein	0.1 g L ⁻¹
Soya	0.75 g L ⁻¹
Peynir altı suyu	% 5 (v v ⁻¹)
Amonyum sülfat	1 g L ⁻¹
Sodyum klorür	1 g L ⁻¹
Kalsiyum klorür	1 g L ⁻¹
Başlangıç pH'ı	Doğal pH
Ekim derişimi	% 2.5 (v v ⁻¹)
Sıcaklık	33 °C
Çalkalama hızı	200 rpm

Belirlenen optimum şartlarda gerçekleştirilen deneylerde maksimum L-DOPA ve Dopamin miktarları sırasıyla 458 mg L⁻¹ ve 592 mg L⁻¹ olarak bulunmuştur. Deneyin sonraki kısmında optimum bileşimlere göre hazırlanan fermentasyon ortamı kullanılarak L-DOPA ve Dopamin maddelerinin biyoreaktördeki üretimleri incelenmiştir. Bahsedilen biyoreaktör deneyleri sonraki bölümde detaylı bir şekilde verilmiştir.

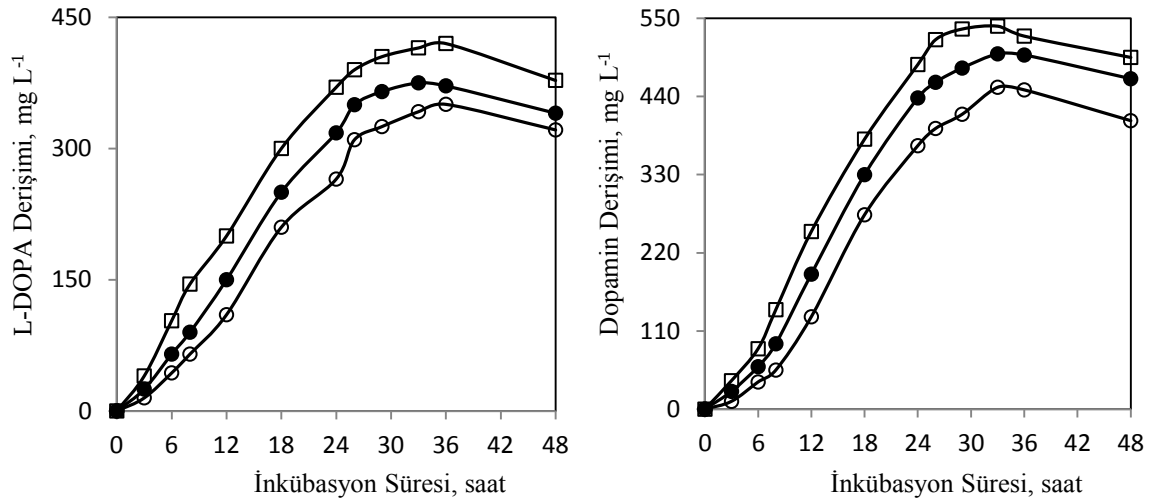
6.2. Kesikli Olarak İşletilen Biyoreaktörde L-DOPA ve Dopamin Üretimi

Erlenlerde gerçekleştirilen deneylerde L-DOPA ve Dopamin üretimi için gerekli optimum ortam şartları belirlenmiş ve üretim üzerine havalandırma hızının etkisi ile sisteme ait hacimsel kütle tranfer katsayısının belirlenebilmesi için kesikli olarak işletilen biyoreaktörde deneyler yapılmıştır.

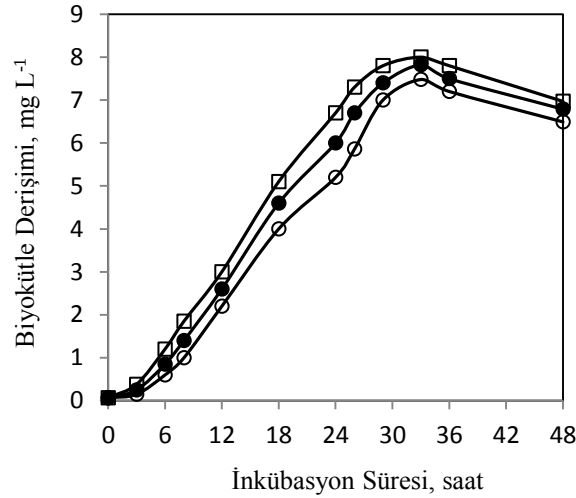
6.2.1. Hava Giriş Hızının Etkisi

Aerobik proseslerde mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumu için gereken oksijenin önemi daha önce de anlatıldığı gibi oldukça fazladır. Bundan dolayı fermantasyon ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin ortama olan aktarım hızı oldukça önemlidir. Mikrobiyal proseslerde ihtiyaç duyulan oksijen miktarı genellikle ortama aktarılan oksijen miktarından daha fazladır. Bundan dolayı oksijen aktarımının kontrolü önemlidir [26].

Hava giriş hızının L-DOPA ve Dopamin üretimi ile biyokütle oluşumu üzerine etkisini araştırmak amacıyla optimum şartlara göre hazırlanmış ve 500 rpm hızında karıştırılan fermantasyon ortamında 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm olmak üzere üç farklı hava giriş hızında deneyler yapılmıştır. Bu deneylere ait grafikler Şekil 6.25 ve Şekil 6.26'da gösterilmiştir. Şekil 6.25 zamanla oluşan L-DOPA ve Dopamin miktarını Şekil 6.26 ise zamanla oluşan biyokütle miktarını göstermektedir.



Şekil 6.25. Farklı havalandırma hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneylerde L-DOPA ve Dopamin derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0.4 ●: 0.5, □: 0.6 vvm, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Sıcaklık: 33 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, pH_b: Doğal pH).



Şekil 6.26. Farklı havalandırma hızlarında *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) ile yapılan deneyde biyokütle derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi (Şartlar: ○: 0.4 ●: 0.5, □: 0.6 vvm, 10 g L⁻¹ yeast ekstrakt, 12.5 g L⁻¹ pepton, 2.5 g L⁻¹ sakkaroz, 1 g L⁻¹ NaCl, 0.1 g L⁻¹ kazein, 0.75 g L⁻¹ soya proteini, % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu, 1 g L⁻¹ amonyum sülfat, 1 g L⁻¹ kalsiyum klorür, Ekim oranı: % 2.5 v v⁻¹, Sıcaklık: 33 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, pH_b: Doğal pH).

Şekil 6.25.'teki grafikler incelendiğinde L-DOPA ve Dopamin miktarlarının 30. saatte neredeyse sabitlendiği ve en yüksek üretim miktarlarına sırasıyla 420 mg L⁻¹ ve 525 mg L⁻¹ değerleriyle 0.6 vvm havalandırma hızında ulaşıldığı görülmektedir. Maksimum ürün miktarlarına en yüksek havalandırma hızında ulaşılması üretimin oksijen miktarıyla yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca Şekil 6.26.'da zamanla değişen biyokütle derişimine bakıldığında bu değerlerin ürün oluşumuna paralel olarak yüksek havalandırma hızında daha yüksek olduğu görülmektedir. Havalandırma hızı mikroorganizmaların oksijen tüketim hızlarına göre ayarlanmalıdır. Bu deney sonuçlarına bakılarak hücrelerin metabolik faaliyetlerini gerçekleştirebilmeleri ve ürün üretebilmeleri için tükettikleri oksijen miktarının yüksek olduğu söylenebilir.

6.2.2. Oksijen Aktarımı Etkisi

Aerobik proseslerde oksijen, mikroorganizmaların besinleri kullanabilmeleri ve metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için gereken temel bir substrattır. Ayrıca hedeflenen biyokütle ve ürünlerin üretilebilmesi için ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun belirli bir aralıkta tutulması ve özellikle kritik oksijen konsantrasyonunun altına düşmesi engellenmelidir.

Oksijenin mikroorganizmaya aktarılmasında karıştırma hızı ve havalandırma hızı da önemlidir. Bu durumlar göz önüne alınarak uygun işletim şartlarının oluşturulabilmesi için oksijenin sıvı besin ortamındaki mikroorganizmaya aktarılma derecesinin bilinmesi gerekmektedir. Bu da hacimsel sıvı faz kütle aktarım katsayısı k_{La} 'nın bulunmasıyla mümkündür [20, 28].

L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine oksijen aktarımının etkisini belirlemek amacıyla 500 rpm karıştırma hızında farklı havalandırma hızlarında yapılan deneylere ait oksijen transfer hızı ve hacimsel kütle aktarım katsayısının zamanla değişimine ait sonuçlar Tablo 6.2.'de verilmiştir. Ayrıca bu değerlerin nasıl hesaplandığını göstermek için örnek olarak 0.6 vvm havalandırma hızının 26. saatteki verilerine ilişkin örnek hesaplama (Ek-4)'te verilmiştir.

Tablo 6.2 *Citrobacter freundii* mikroorganizması ile yapılan deneylerde farklı hava giriş hızlarında r_o ve k_La değerlerinin zamanla değişimi

Hava Giriş Hızı (vvm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	k_La (s ⁻¹)
0.4 vvm	6	16.1	0.035
	26	40.2	0.037
	48	16.8	0.028
0.5 vvm	6	15.5	0.045
	26	45.9	0.048
	48	18.3	0.035
0.6 vvm	6	17.1	0.052
	26	55.3	0.055
	48	21.5	0.051

Tablo 6.2.'de verilen deney verilerine bakıldığında havalandırma hızı arttıkça oksijen transfer hızı ve sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının da arttığı görülmektedir. Bu değerler aynı zamanda prosesin oksijen gereksiniminin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Farklı havalandırma hızlarında zamanla değişen değerlere bakıldığında logaritmik evrenin sonlarına kadar oksijen transferi ile kütle aktarım katsayısının, mikroorganizma gelişmesi ve ürün üretimi yüksek olduğu için, arttığı ve logaritmik evreyi geçtikten sonra büyüme ve ürün üretiminin yavaşlamasıyla birlikte bahsedilen bu değerlerde bir azalma olduğu görülmektedir.

7. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Citrobacter freundii (NRRL B-2643) mikroorganizması kullanılarak L-DOPA ve Dopamin maddesinin eş zamanlı üretiminin amaçlandığı fermantasyon prosesinde aşağıda verilen genel sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Erlenlerde yapılan deneylerde karbon kaynağı olarak seçilen sakarozun farklı konsantrasyonları denenmiş ve en yüksek üretim miktarına 2.5 g L^{-1} sakkaroz konsantrasyonunda ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 6.1.).
2. Fermantasyon prosesinde organik azot kaynaklarının etkisini araştırmak amacıyla farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan deneylerde 12.5 g L^{-1} pepton (Şekil 6.3.), 10 g L^{-1} yeast ekstrakt (Şekil 6.5.), 0.1 g L^{-1} kazein (Şekil 6.7.), 0.75 g L^{-1} soya (Şekil 6.9.), ve % 5 v v⁻¹ peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamında L-DOPA ve Dopamin üretiminin arttığı belirlenmiştir (Şekil 6.11.). Ayrıca bu maddelerin üretiminin organik azot kaynaklarına yüksek derecede bağlı olduğu ortaya konulmuştur.
3. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2643) mikroorganizması ile L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine inorganik azot kaynaklarının etkisi araştırılmış ve bunlardan amonyum sülfatın pozitif yönde etki ettiği görülürken sodyum nitratın ise negatif bir etki yaptığı belirlenmiştir. Ürün oluşumunu arttıran amonyum sülfatın 1 g L^{-1} konsantrasyonunda en fazla ürün artışı sağlanmıştır (Şekil 6.13).
4. Yapılan bu çalışmada NaCl ve CaCl₂'nin etkisi araştırılarak bu maddelerden CaCl₂'nin ürün oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimine ise 1 g L^{-1} CaCl₂ konsantrasyonunda ulaşılmıştır (Şekil 6.15).
5. Başlangıç ortam pH'sının L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı deneylerde doğal ve doğala yakın pH değerlerinde L-DOPA ve Dopamin üretiminin iyi derecede olduğu buna karşın düşük pH değerlerinde ise üretimin oldukça olumsuz etkilenecek azaldığı belirlenmiştir (Şekil 6.17).

6. Ekim derişiminin L-DOPA ve Dopamin üretimi üzerine olan etkisinin araştırıldığı deneylere bakıldığında ortama aşıl原因 mikroorganizma miktarının üretimi çok fazla değiştirmediği fakat diğer konsantrasyonlara nazaran % 2.5 v v⁻¹ ekim derişimindeki ortamda daha yüksek bir üretime ulaşıldığı görölmüştür (Şekil 6.19).

7. Sıcaklığın proses üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla farklı sıcaklıklarda yapılan deneylerde maksimum L-DOPA ve Dopamin üretimine 33 °C sıcaklık değerinde ulaşıldığı görölmüştür (Şekil 6.21).

8. L-DOPA ve Dopamin miktarının çalkalama hızıyla değişimini belirlemek amacıyla farklı çalkalama hızlarında yapılan deneylerde en yüksek ürün miktarına 200 rpm çalkalama hızında ulaşıldığı belirlenmiştir (Şekil 6.23).

9. Erlenlerde yapılan deneylerle optimum ortam bileşimleri belirlenmiş ve bu ortam kullanılarak havalandırma hızı ile hacimsel sıvı faz kütle aktarım katsayısı k_{La}'nın belirlenmesi amacıyla biyoreaktör deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarına bakıldığında hava giriş hızı arttıkça oksijen tüketim hızı r_o'ın ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı k_{La}'nın arttığı belirlenmiştir.

Öneriler;

1. Bundan sonraki çalışmalarda farklı karbon ve azot kaynaklarının ürün üretimi üzerine etkisi araştırılabilir.

2. L-DOPA ve Dopamin üretimini sağlayan genin farklı mikroorganizmalara aktarılmasıyla elde edilen rekombinant mikroorganizmaların kullanılmasıyla deneysel çalışmalar gerçekleştirilebilir.

3. L-DOPA ve Dopamin maddelerinin sürekli reaktördeki üretimi incelenebilir.

4. Fermantasyon ortamından L-DOPA ve Dopamin maddelerinin saflaştırılarak ayrılması üzerine deneysel çalışma yapılabilir.

5. Ürün üretimi ve mikroorganizma gelişim ortamı için modelleme yapılabilir.

8. KAYNAKLAR

- [1] **Niosi, J., Reid S. E.,** 2007. "Biotechnology and Nanotechnology: Science-based Enabling Technologies as Windows of Opportunity for LDCs?", World Development, Vol.35, No:3, s.426-438.
- [2] **Rawat, H.,** 2008. Textbook of Biotechnology, Global Media, Jaipur.
- [3] **Yaşgöl, Y.S., Turguter, Y.,** 2015. OECD Üyesi Doğu-Orta Avrupa Ülkelerinin Biyoteknolojik Gelişme Performansı Açısından Karşılaştırmalı Analizi, Yıl:8 Sayı:15, ISSN 1307-9832
- [4] **Mandıracıoğlu A.,** 2010. Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine 49(3) Ek/Supplement:39-45
- [5] **Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M., Walsh, D.M.,** 2008. Protein aggregation in the brain: The molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. Molecular Medicine, 14(7-8): 451-464.
- [6] **Pekin, B.,** 1980. Biyokimya Mühendisliği, Birinci Kitap İkinci Kısım, Ege Üniv., İzmir.
- [7] **Ayhan, K.,** 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara s. 522, 02. Bölüm, 02. kısım.
- [8] **Selen, V.,** 2007. Fındık küspesinden *Bacillus amyloliquefaciens* kullanılarak alfa amilaz enzimi üretiminin katı substrat fermentasyonu ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [9] **Doran, P. M.** (1995). Bioprocess engineering principles, Academic press.
- [10] **Bulut, Ş.,** 2007. Marinal bakteri *teredinobacter turnirae*'den proteaz üretimi, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- [11] **Halkman, A.K., Tunail, N.,** 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara s. 522 07. Bölüm
- [12] **Halkman, A.K.,** 2005. Anonymous, Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa." adlı kitabın 03. bölümüdür.
- [13] **Özel, O.T., Sarıççek, B.Z.,** 2009. Ruminantlarda Rumen Mikroorganizmalarının Varlığı ve Önemi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü, Kurupelit, Samsun, Tübvav Bilim Dergisi, Cilt:2, Sayı:3, Sayfa:277-285
- [14] **Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F.,** 1987. Biotechnology, Vch. New York, 7a, 5-100.
- [15] **Bailey, J. E. and Ollis D.F.** 1976. "Biochemical engineering fundamentals." Chemical Engineering Education.
- [16] **Topal, S.,** 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri, Gıda, **10**, 25-37.
- [17] **Morales, N., Figueroa M., et al.** 2012. "Aerobic granular-type biomass development in a continuous stirred tank reactor" Separation and Purification Technology **89**: 199-205
- [18] **Ooijskaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A.,** 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems, Tibtech, **18**, 356-360.
- [19] **Orhan, A.,** 2002. *Rhizopus arrhizus*'dan Katı Hal Fermentasyonu ile Lipaz Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

- [20] **Boyacıoğlu, H., Akay, B., Ertunç, S., Hapoğlu, H., Albaz, M.,** Ekmek Mayası Üretilen Kesikli Bir Biyoreaktörde Kütle Aktarım Katsayısının Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06100, Tandoğan, ANKARA
- [21] **Garcia-Ochoa, F., Gomez, E.,** 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview, *Biotechnology Advances* 27 153–176
- [22] **Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E.,** 2000a. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production, *Enzyme Microb Technol*; 27: 680–90.
- [23] **Calik, P., Yilgör, P., Ayhan, P., Demir, A.S.,** 2004. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehydelyase production. *Chem Eng Sci*; 59: 5075–83.
- [24] **Liu, Y.S., Wu, J.Y., Ho, K-p.,** 2006a. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures, *Biochemical Engineering Journal*, 27: 331–5
- [25] **Telefoncu, A.,** 1986. "Temel ve Uygulamalı Enzimoloji." Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi yayını (Der) 59.
- [26] **Bailey, J.N. and Ollis, D.F.,** 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals* 2nd ed. Mc Graw Hill, s.1-984, New York.
- [27] **Aiba, S.S., Humphrey, A.E., Milles, N.F.,** 1973. *Biochemical Engineering*, Academic Press Inc. New York.
- [28] **Rainer, B.W.,** 1990. Determination Methods of Volumetric Oxygen Transfer Coefficient k_La in Bioreactors, *Chem. Biochemical Engineering*, 4, 185-196.
- [29] **Sanchez, A., Garcia, F., Contreras, A., Molina, E., Chisti, Y.,** 2000. Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J*;46: 1872–87.
- [30] **Puthli, M.S., Rathod, V.K., Pandit, A.B.,** 2005. Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor, *Biochem Eng J* 2005;23:25–30.
- [31] **Djelal, H., Larher, F., Martin, G., Amrane, A.,** 2006. Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *J Biotechnol* 2006;125: 95-103.
- [32] **Shuler, M. L. and Kargi, F.,** 2002. *Bioprocess engineering*, Prentice Hall New York.
- [33] **Sinclair, C.G.,** 1987. *Microbial Process Kinetics*, Basic Biotechnology, London, 75-131.
- [34] **Gaden, E.L.,** 1959. Fermentation process kinetics, *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1, 413-429.
- [35] **Moser, A.,** 1985. Kinetic of Batch Fermentations, *Biotechnology*, VCH Weinheim, 2.
- [36] **Nagatsu, T. and Sawada, M.,** 2009. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future, *Parkinsonism & Related Disorders*, 15, S3-S8.
- [37] **Aytan, E., Kurt, A.G., Geçkil, H.,** 2011. *Vitreoscilla Hemoglobin Geninin Erwinia herbicola'ya Klonlanması ve L-DOPA Üretimi Üzerine Etkisi*, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, Yıl: 2011 Cilt: 09 Sayı: 3 Sayfa: 8-13
- [38] **Fling, G., and Paul, J.,** 2001. Radiation induced production of L–3,4 dihydroxy phenylalanine by *Aspergillus oryzae*. *Journal of Analytical Chemistry*, 67,185–187.
- [39] **Haq, I., Iqbal, F., and Qadeer, M.A.,** 1998. Production of L-DOPA from L-tyrosine by *Aspergillus oryzae*. *Biologia*, 44, 31–39.
- [40] **Sih, C.J., Foss, P., Rosazza, J., and Lembagar, M.,** 1969. *Microbial synthesis of L–3,4-dihydroxy phenylalanine*. *Journal of Amniotic and Chemistry Society*, 91, 62–64.

- [41] **Hornykiewicz, O.**, 2002. L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent, *Amino Acids*, **23**, 65-70.
- [42] **Min, K., Park, D.H., Yoo, Y.J.**, 2010 Electroenzymatic synthesis of l-DOPA. *J Biotechnol* 146(1–2):40–44.
- [43] **Koyanagi, T., Katayama, T., Suzuki, H., Nakazawa, H., Yokozeki, K. And Kumagai, H.**, 2005. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine 191 (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR, *Journal of Biotechnology*, **115**, 303-306.
- [44] **Knowles, W.S.**, 2004. Asymmetric Hydrogenations – The Monsanto L-Dopa Process. In: Blaser H-U, Schmidt E (eds) *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p 21–38
- [45] **Kruk, Z.L. and Pycock, C.J.**, 1991. Dopamine. In: *Neurotransmitters and drugs*, Suffolk, UK: St. Edmundsbury Press, **3rd ed.**, 87–115.
- [46] <http://druginfo.nlm.nih.gov/drugportal/name/dopamine>
- [47] **Pereda A.E.**, 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses, *Nat Rev Neurosci.* 2014 April; 15(4): 250–263. doi:10.1038/nrn3708.
- [48] **Ganong, W.F.**, 1995. Review of Medical Physiology, *Appleton & Lange*, **17th edition**, 89-93.
- [49] **Sharma, S., Singh, S., Sharma, V., Singh, V. P. and Deshmukh, R.**, 2015. "Neurobiology of l-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies." *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 70, 283-293.
- [50] **Sarkar, C., Chakroborty, D., Dasgupta, P. S. and Basu, S.** 2015. "Dopamine is a safe antiangiogenic drug which can also prevent 5-fluorouracil induced neutropenia." *International Journal of Cancer*.
- [51] **Özer, U.**, 2006. L-DOPA ve dopaminin bakteriyel biyosentezi, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, MALATYA.
- [52] **Güleç, F., Çolakoğlu, Z., Eker, Ç., ve ark.** 2008. Psikotik manik atak ile başvuran bir dopamin disregülasyon sendromu olgusu. *J Neurol Sci (Turk)*, 25: 176-181.
- [53] **Selikhova, M., Williams, D.R., Kempster, P.A., Holton, J.L., Revesz, T., Lees, A.J.**, 2009. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease, *Brain*, 132: 2947–57.
- [54] **Growdon, J.H., Melamed, E., Logue, M., Hefti, F. and Wurtman, R.J.**, 1982. Effects of Oral L-Tyrosine Administration on Csf Tyrosine and Homovanillic-Acid Levels in Patients with Parkinsons-Disease, *Life Sciences*, **30**, 827-832.
- [55] **Jankovic, J.**, 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79:368-376.
- [56] **Rochester, L., Galna, B., Lord, S., Burn, D.**, 2014. The nature of dual-task interference during gait in incident Parkinson's disease, *Neuroscience*, 265, pp. 83–94
- [57] **Yang, Y.R., Lee, Y.Y., Cheng, S.J., Lin, P.Y., Wang, R.Y.**, 2008. Relationships between gait and dynamic balance in early Parkinson's disease *Gait Posture*, 27 (4), pp. 611–615
- [58] **Zampieri, C., Salarian, A., Carlson-Kuhta, P., Aminian, K., Nutt, J.G., Horak, F.B.**, 2010. The instrumented timed up and go test: potential outcome measure for disease modifying therapies in Parkinson's disease *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 81 (2) (2010), pp. 171–176

- [59] **Walton, C.C., Shine, J.M., Hall, J.M., O'Callaghan, C., Mowszowski, L., Gilat, M., Szeto, J.Y., Naismith, S.L., Lewis, S.J.,** 2015. The major impact of freezing of gait on quality of life in Parkinson's disease, *J. Neurol.*, 262 (1), pp. 108–115
- [60] **Muslimovic, D., Post B., Speelman, J.D., Schmand, B., De Haan, R.J.,** 2008. Determinants of disability and quality of life in mild to moderate Parkinson disease, *Neurology*, 70 (23), pp. 2241–2247
- [61] **Smulders, K., Dale, M.L., Carlson-Kuhta, P., Nutt, J.G., Horak, F.B.,** 2016. Pharmacological treatment in Parkinson's disease: Effects on gait, *Parkinsonism & Related Disorders*, October 2016, Pages 3–13.
- [62] **Aytan, E.,** 2009. Vitreoscilla hemoglobin geninin *Erwinia herbicola*'ya klonlanması ve L-DOPA üretimi üzerine etkisi, *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, MALATYA.
- [63] **Çakmur, R.,** 2011. Parkinson Hastalığı ve Medikal Tedavisi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, İzmir.
- [64] **Sayyed, I.A., Sudalai, A.,** 2004. Asymmetric synthesis of L-DOPA and (R)-selegiline via OsO₄- catalyzed asymmetric dihydroxylation, *Tetrahedron Asymmetry*, 15(19):3111–3116.
- [65] **Valdes, R., Puzer, L., Gomes, M., Marques, C., Aranda, D., Bastos, M., Gernal, A., Antunes, O.,** 2004. Production of L-DOPA under heterogeneous asymmetric catalysis. *Catal Commun* 5(10):631–634.
- [66] **Kurt, A.G., Aytan, E., Ozer, U., Ates, B., Geckil, H.,** 2009. Production of L-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the *Vitreoscilla* hemoglobin gene, *Biotechnology Journal*, 4, 1077-1088.
- [67] **Haq, I., Ali, S., Qadeer, M.A.,** 2002. Biosynthesis of l-DOPA by *Aspergillus oryzae*. *Bioresourch Technology* 85(1):25–29.
- [68] **Ates, S., Cortenlioglu, E., Bayraktar, E., Mehmetoglu, U.** 2007. Production of l-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4):683–687.
- [69] **Katayama, T., Suzuki, H., Koyanagi, T., Kumagai, H.,** 2000. Cloning and random mutagenesis of the *Erwinia herbicola* tyrR Gene for high level expression of tyrosine phenol-lyase, *Applied and Environmental Microbiology* 66(11):4764–4771.
- [70] **Foor, F., Morin, N., Bostian, K.A.,** 1993. Production of L-dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9):3070–3075.
- [71] **Bielecki, S., Bolek, R.,** 1996. Immobilization of recombinant *E. coli* cells with phenol-lyase activity. In: Wijffels RH, Buitelaar RM, Bucke C, Tramper J (eds) *Progress in Biotechnology*, vol 11. Elsevier, Amsterdam, pp 472–478.
- [72] **Lee, S.G., Ro, H.S., Hong, S.P., Kim, E.H. and Sung, M.H.,** 1996. Production of L-DOPA by thermostable tyrosine phenol-lyase of a thermophilic *Symbiobacterium* species overexpressed in recombinant *Escherichia coli*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 98-102.
- [73] **Krishnaveni, R., Rathod, V., Thakur, M.S., Neelgund, Y.F.,** 2009. Transformation of L-Tyrosine to L-Dopa by a Novel Fungus, *Acremonium rutilum*, under submerged fermentation, *Curr Microbiol* 58(2):122–128.
- [74] **Min, K., Park, K., Park, DH., Yoo, Y.J.,** 2015. Overview on the biotechnological production of L-DOPA, *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 575–584

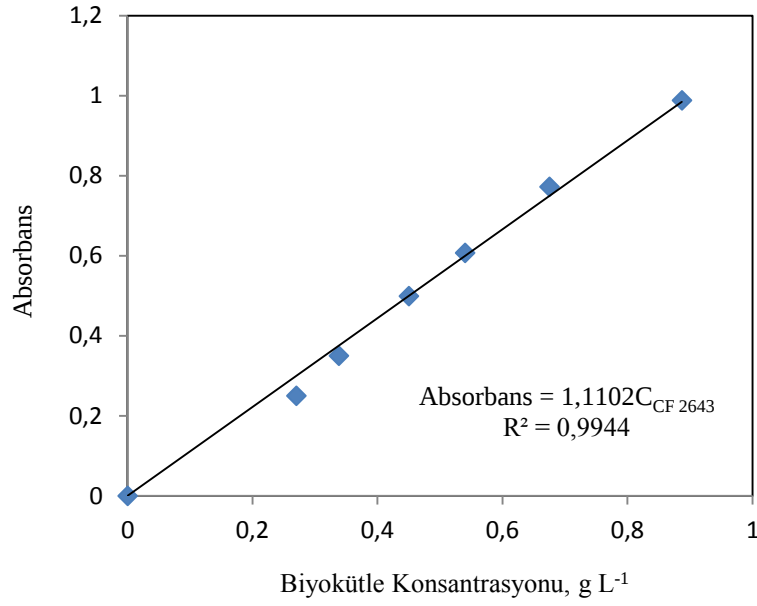
- [75] **Lee, S.G., Hong, S.P. and Sung, M.H.**, 1999. Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonia, *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 298-302.
- [76] **Antson, A.A., Demidkina, T.V., Gollnick, P., Dauter, Z., Vontersch, R.L., Long, J., Berezchnoy, S.N., Phillips, R.S., Harutyunyan, E.H. and Wilson, K.S.**, 1993. 3 Dimensional Structure of Tyrosine Phenol-Lyase, *Biochemistry*, **32**, 4195-4206.
- [77] **Kim, J.H., Song, J.J., Kim, B.G., Sung, M.H. and Lee, S.C.**, 2004. Enhanced stability of tyrosine phenol-lyase from *Symbiobacterium toebii* by DNA shuffling, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**, 153-157.
- [78] **Luetke-Eversloh, T., Santos, C.N.S. and Stephanopoulos, G.**, 2007. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **77**, 751-762.
- [79] **Yamada, H., Torii, H., Enei, H., Kashima, N., Okumura, S. and Kumagai, H.**, 1972. Synthesis of L-Tyrosine from Pyruvate, Ammonia and Phenol by 192 Crystalline Tyrosine Phenol Lyase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **46**, 370-&.
- [80] **Enei, H., Okumura, S., Yamashita, K., Yamada, H. and Matsui, H.**, 1972. Microbiological Synthesis of L-Tyrosine and 3,4-Dihydroxyphenyl-L-Alanine .1. Distribution of Tyrosine Phenol Lyase in Microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, **36**, 1861-&.
- [81] **Min, K., Yoo, Y.J.** 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode. *Talanta* 80(2):1007-1011
- [82] **Faria, R.O., Moure, V. R., Almeida, M.A.L., Krieger A.N., Mitchell D.A.**, 2007. The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases, *Food Technology and Biotechnology* 45 (3), 287-294.
- [83] **Pialis, P., Jimenez Hamann, M.C., Saville, B.A.**, 1996. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on nylon 6,6. *Biotechnol Bioeng* 51(2):141-147.
- [84] **Seetharam, G., Saville, B.A.**, 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite, *Enzyme Microb Technol* 31(6):747-753.
- [85] **Xu, D.Y., Chen, J.Y., Yang, Z.**, 2012. Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of l-DOPA. *Biochem Eng J* 63:88-94.
- [86] **Becerik, S.Ç., Dinçer, A., Aydemir, T.**, 2010. Tirozinaz Enziminin Kitosan-Kil Kompozit Boncuklar Üzerine İmmobilizasyonu, 24. Ulusal Kimya Kongresi, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak.
- [87] **Mayer, A.M.**, 1987. Polyphenol Oxidases in Plants - Recent Progress .2., *Phytochemistry*, **26**, 11-20.
- [88] **Prota, G. and Thomson, R.H.**, 1976. Melanin Pigmentation in Mammals, *Endeavour*, **35**, 32-38.
- [89] **Hearing, V.J. and Jimenez, M.**, 1989. Analysis of Mammalian Pigmentation at the Molecular-Level, *Pigment Cell Research*, **2**, 75-85.
- [90] **Katzenschlager, R., Lees, A.J.**, 2002. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice, *J. Neurol.*, **249**, 1119-1124.
- [91] **Lancaster, G.A. and Sourkes, T.L.**, 1972. Purification and Properties of Hog Kidney 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase, *Canadian Journal of Biochemistry*, **50**, 791-&.

- [92] **Andoyamamoto, M., Hayashi, H., Sugiyama, T., Fukui, H., Watanabe, T. and Wada, H.**, 1987. Purification of L-Dopa Decarboxylase from Rat-Liver and Production of Polyclonal and Monoclonal-Antibodies against It, *Journal of Biochemistry*, **101**, 405-414.
- [93] **Cabrera-Valladares, N., Martinez, A., Pinero, S., Lagunas-Munoz, V.H., Tinoco, R., de Anda, R., Vazquez-Duhalt, R., Bolivar, F. and Gosset, G.**, 2006. Expression of the mela gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase, *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 772-779.
- [94] **Lüleyap, Ü., Pazarcı, P., Cömertpay, G., Önenli, H.N., Pazarbaşı, A., Alptekin, D., Kasap, H., Froster, U.**, 2016. The analysis of the phenylalanine hydroxylase gene mutations by sequencing and ARMS techniques in Turkish patients, *Cukurova Med J* 41(4):702-708.
- [95] **Vandermeer, J.R., Devos, W.M., Harayama, S. and Zehnder, A.J.B.**, 1992. Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds, *Microbiological Reviews*, **56**, 677-694.
- [96] **Erdal, N., Erdal, M.E., Camdeviren, H., Gokdoğan, T., Herken, H.**, 2002. Bir Grup Sağlıklı Gönüllüde Katekol-O-Metiltransferaz (COMT) Gen Polimorfizmi, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, **12**, 174-178
- [97] **Belay, T. and Sonnenfeld, G.**, 2002. Differential effects of catecholamines on in vitro growth of pathogenic bacteria, *Life Sciences*, **71**, 447-456.
- [98] **Lyte, M. and Ernst, S.**, 1992. Catecholamine Induced Growth of Gram-Negative Bacteria, *Life Sciences*, **50**, 203-212.
- [99] **Bertani, G.**, 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **62**, 293-300.
- [100] **Van't Riet, K.**, 1983. Mass transfer in fermentation, *Trends in Biotechnology*, **1**, 113-119.
- [101] **Geckil, H., Gencer, S. and Uckun, M.**, 2004. Vitreoscilla hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 182-189.
- [102] **Prudende, K.W., Katz, A., Sugrue, J.A. and Thomson, A.**, 1989. The effect of glucose on the expression of a cloned *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase gene in strains *Bacillus subtilis*, *Current Microbiology*, **18**, 27-31.
- [103] **Yun, J.S. and Ryu, H.W.**, 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Process Biochemistry*, **37**, 235-240.
- [104] **Farezvidal, M.E., Fernandezvivas, A. and Arias, J.M.**, 1992. Production of Alpha-Amylase by *Myxococcus-Coralloides-D*, *Journal of Applied Bacteriology*, **73**, 148-156.
- [105] **Ülger, C.**, 1997. Production of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase in aqueous two phase systems, *Hacettepe Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Ankara.
- [106] **Hamilton, L.M., Kelly, C.T. and Fogarty, W.M.**, 1999. Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of *Bacillus sp* IMD 435, *Process Biochemistry*, **35**, 27-31

- [107] **Akkoç N.**, 2008. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MBL9 Suşunda endüstriyel öneme sahip özelliklerin genetik determinantları, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- [108] **Yaraş, A., Selen, V., Özer, D.**, 2014. *Bacillus Amyloliquefaciens* Kullanılarak α -Amilaz Üretimine Substrat Partikül Boyutunun Etkisi, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, Cilt: 9, No: 1, (1-5).
- [109] **Öner, T.**, 2006. Soya sektör raporu, İstatistik Şubesi, Ekim 2006.
- [110] **Altuntaş, S., Ertunç, S., Hapoğlu, H., Alpbaz, M.**, 2011. Discrete-Time Modelling of the Cheese Whey Drink Production and Servo Control of pH, *Ordu Univ. J. Sci.Tech.*, 1 (1), 15-21.
- [111] **Balas, L., Inan, A., Numanoglu Genç A.**, 2013. Modelling of dilution of thermal discharges in enclosed coastal waters, *Research, Journal of Chemistry and Environment*, 17 (10), 82-89.
- [112] **Özçelik, F., Molavi, S.S., Balk M.**, 1994. Peynir altı suyundan etil alkol üretiminde laktoz konsantrasyonunun fermantasyon üzerine etkisi, *Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü*, 19 (1), 45-48.
- [113] **Demain, A.L. and Vaishnav, P.**, 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology Advances*, 27, 297-306.
- [114] **Bories, P.N., Bories, C.**, 1995. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase, *Clinical Chemistry*, 41: 904- 907.
- [115] **Altuğ, T.**, 2006. *Gıda Katkı Maddeleri*, 6. Bölüm, Koruyucular, Meta Basım, İzmir, 276s.
- [116] **Pamir, M.H.**, 1964. *Effect of Some Metal Ions on Growth Rate of Lactic Acid Bacteria*. Uni. of. Ankara. Yearbook of the Faculty of Agriculture.
- [117] **Manning, G.B., Campbell, L.L.**, 1961. Thermostable alpha-amylase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 2952-2957.
- [118] **Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K. and Soni, S.K.**, 2005. Production of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus* sp PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, *Process Biochemistry*, 40, 525-534.
- [119] **Prakasham, R.S., Rao, C.S., Rao, R.S. and Sarma, P.N.**, 2005. Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: Process parameters optimization, *Biotechnology Progress*, 21, 1380-1388.
- [120] **McDaniel, L.E., Bailey, E.G.**, 1969. Effect of Shaking Speed and Type of Closure on Shake Flask Cultures, *Applied Microbiology*, 17, 286-290.

9. EKLER

EK-1. *Citrobacter freundii* (NRRL B-2633) Derişimi İçin Çalışma Doğrusu



Şekil E1.1. 600 nm’de *Citrobacter freundii* (NRRL B-2633) Konsantrasyonu İçin Çalışma Doğrusu

Citrobacter freundii (NRRL B-2633) mikroorganizmasının konsantrasyonunu belirlemek için çalışma doğrusunun denkleminde yararlanarak aşağıdaki gibi konsantrasyon hesabı yapılmıştır.

$$C_{CF\ 2643} = (\text{Absorbans} / 1.1102) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

EK-2. L-DOPA ve Dopamin için HPLC Spektrumları

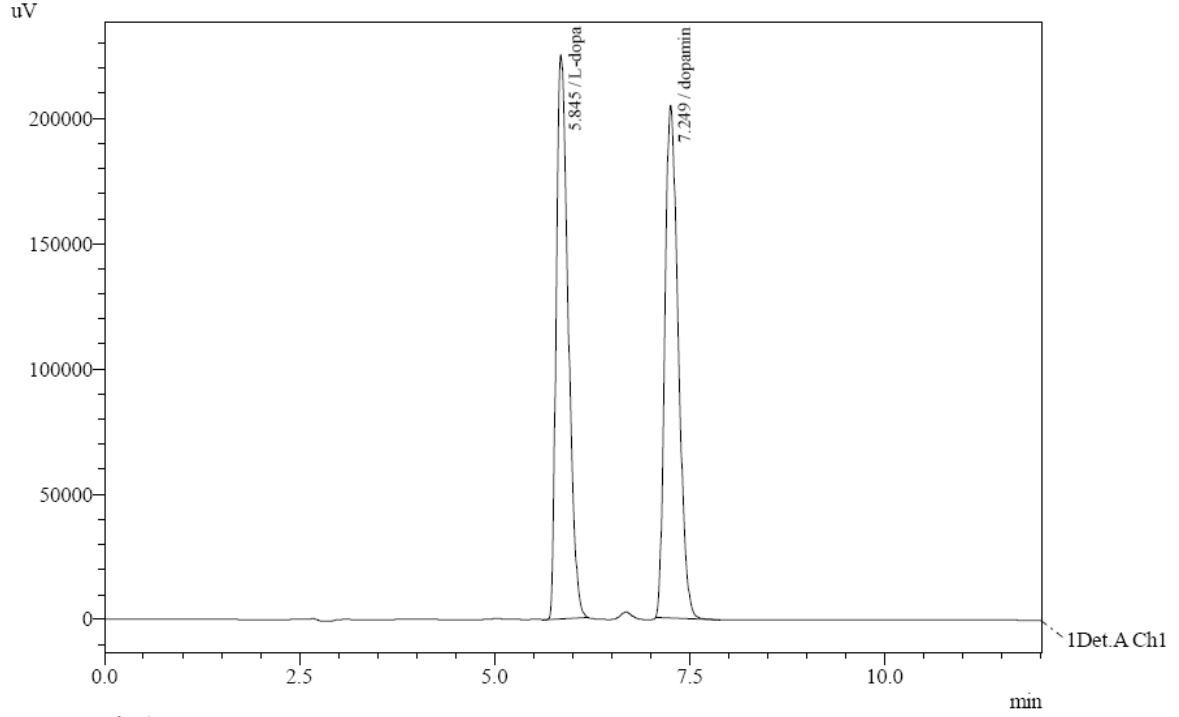
FIRAT ÜNİVERSİTESİ KİMYA MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

Sample Information

Acquired by : Veyis SELEN
Sample Name : 250 ppm
Sample ID :
Tray# : 1
Vial# : 4
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : 250 ppm.lcd
Method Filename : DOPA-DOPAMİN.lcm
Batch Filename : kalibrasyon mx.lcb
Report Filename : Default.lcr

Chromatogram

250 ppm C:\Users\Veyis SELEN\Desktop\L-Dopa-dopMIN\sonuçlar\kalibrasyon\250 ppm.lcd



1 Det.A Ch1 / 22.04.2014

Quantitative Results

Detector A

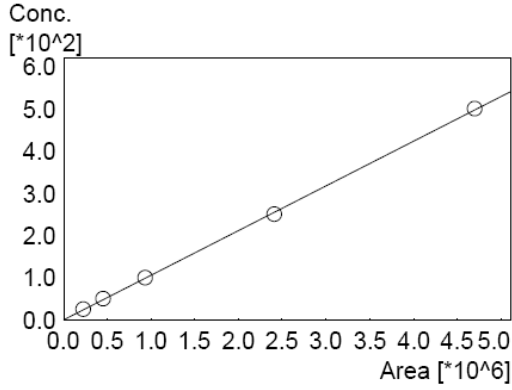
ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units
1	L-dopa	5.845	2397879	225320	253.930	ppm
2	dopamin	7.249	2440943	204632	254.452	ppm

EK-3. L-DOPA ve Dopamin İçin HPLC Çalışma Doğruları

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

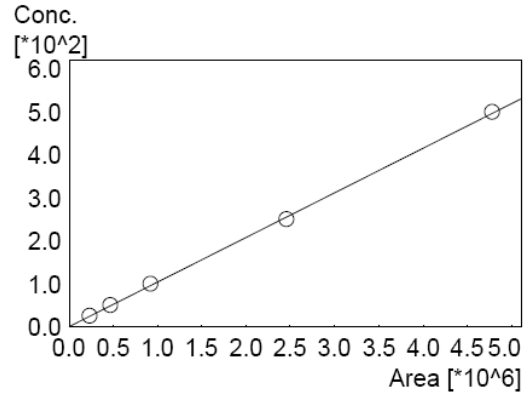
<Calibration Curve>

ID# : 1
 Name : dopa
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.000106047*x-0.117154$
 Rr1=0.9998880 Rr2=0.9997760
 MeanRF:0.000106887 RFSD:1.98866e-006 RFRSD:1.86054
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	25.000	230448.4	230448
2	50.000	459214.8	459215
3	100.000	937345.0	937345
4	250.000	2406886.0	2406886
5	500.000	4694187.5	4694187

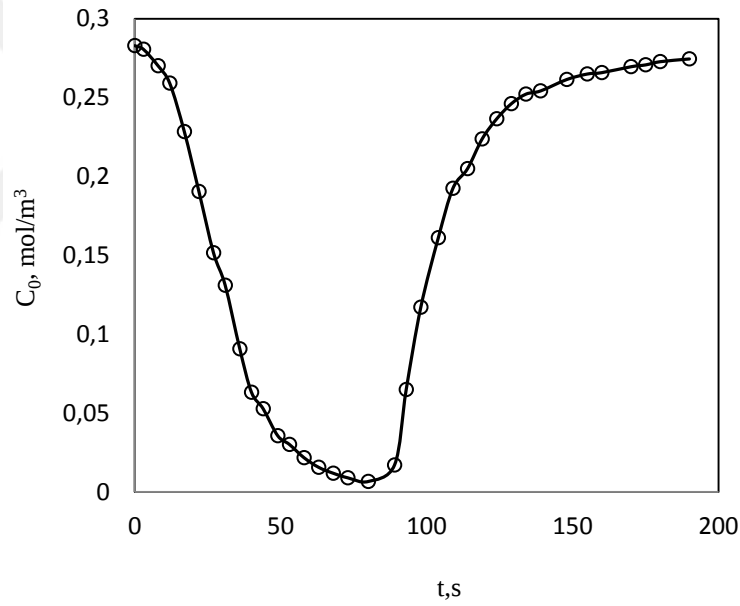
ID# : 2
 Name : dopamin
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.000104023*x+0.640015$
 Rr1=0.9998159 Rr2=0.9996318
 MeanRF:0.000105537 RFSD:2.46612e-006 RFRSD:2.33674
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A



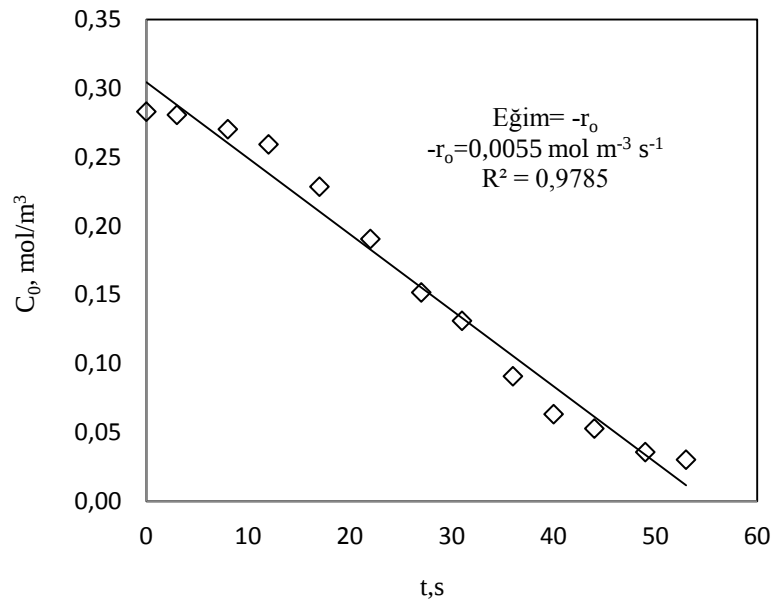
#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	25.000	235045.4	235045
2	50.000	468437.2	468437
3	100.000	924487.0	924487
4	250.000	2457731.9	2457732
5	500.000	4775798.5	4775799

EK-4. Dinamik Yöntem İle Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı (k_{La}) ve Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının ($-r_o$) Belirlenmesi

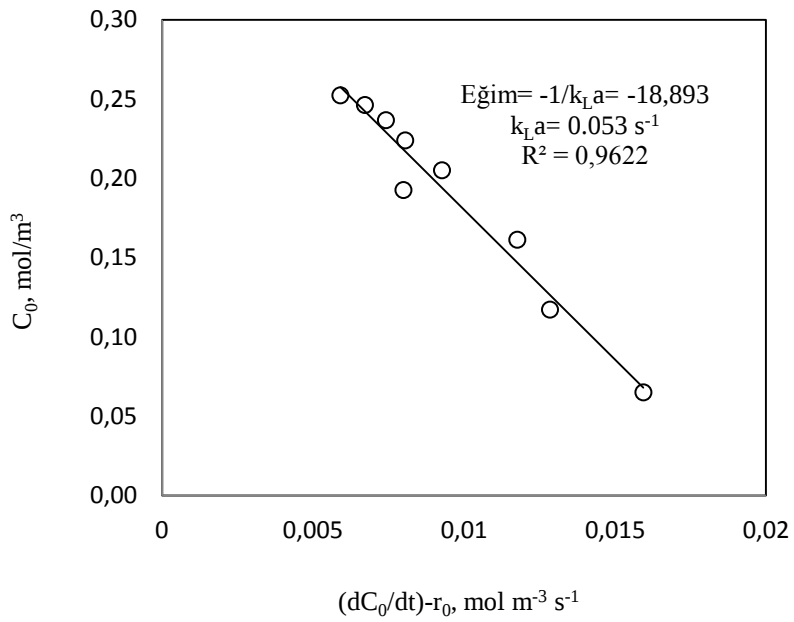
Biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi sonucunda çözünmüş oksijen derişiminde azalmanın gözlemlendiği (t, C_o) grafiğinde (Şekil E4.1.), azalan doğrusal ilişkiden r_o değeri bulunmuştur. ($dC_o/dt = -r_o$); C_o grafiği çizilerek buradaki eğimden $-1/k_{La}$ değeri bulunmuş ve k_{La} hesaplanmıştır. Aşağıda *Citrobacter freundii* (NRRL B-2633) yabani suşunun kullanıldığı fermantasyon ortamında ve 500 rpm karıştırma hızı, 0.6 vvm hava giriş hızı için 26. saatteki r_o ve k_{La} değerlerinin örnek hesaplaması sırasıyla Şekil E4.2. ve Şekil E4.3. 'te gösterilmiştir.



Şekil E4.1. Havanın kesilmesiyle çözünmüş oksijen derişimin zamanla değışimi



Şekil E4.2. Mikroorganizmanın oksijen tüketim hızının belirlenmesi.



Şekil E4.3. Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının belirlenmesi.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meltem ÇAKMAK
Doğum Yeri ve Tarihi : ELAZIĞ – 08.06.1989

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : Dumlupınar İlköğretim Okulu (ELAZIĞ, 1996-2001).
Ortaokul : Mezre İlköğretim Okulu (ELAZIĞ, 2001-2004).
Lise : Atatürk Lisesi (ELAZIĞ, 2004-2006).
Lisans : Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (MERSİN, 2008-2012).

YAYINLANMIŞ ESERLER

a) Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar:

1. Hamdi Soner Altundoğan, Aykut Topdemir, **Meltem Çakmak**, Nurdan Bahar, Hardness removal from waters by using citric acid modified pine cone, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Volume 58, January 2016, Pages 219–225.
2. **Meltem Çakmak**, Şeyda Taşar, Veyis Selen, Dursun Özer, Ahmet Özer, Removal of Astrazon Golden Yellow 7GL from Colored Wastewater Using Chemically Modified Clay, **Journal of Central South University of Technology** (In press)

b) Uluslararası Konferans ve Sempozyumlar:

1. Bahar, N., Altundogan, H.S., Topdemir, A., **Çakmak**, M., 2014, Hardness Removal from Waters by using Citric Acid Modified Pine Cone, SICBENS-634, **Seoul International Conference on Biological Engineering & Natural Science**, August 29-31, Seoul, Korea.
2. **Çakmak M**, Taşar Ş, Selen V, Özer A, Özer D, Removal of Astrazon Golden Yellow 7GL from Colored Wastewater Using Activated Clay, **International Conference on Civil and Environmental Engineering** (ICOCEE – Cappadocia 2015), Nevşehir, TURKEY, May 20-23, 2015.
3. Selen V, Taşar Ş, **Çakmak M**, Özer D, Özer A, Adsorption of Methylene Blue Dye on Multi-walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) - A Response Surface Methodology (RSM) approach, **International Conference on Civil and Environmental Engineering** (ICOCEE – Cappadocia 2015), Nevşehir, TURKEY, May 20-23, 2015.

c) Ulusal Konferans ve Sempozyumlar:

1. Veyis Selen, Özlem Selen, **Meltem Çakmak**, Dursun Özer, " Ayçiçeği Küspesi ile Sulu Çözeltilerden Boyarmadde Giderimi ", 11. **Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi**, 2014, ESKİŞEHİR.
2. Taşar Ş, Selen V, **Çakmak M**, Özer D, Özer A, Çevresel pH Değişimi İle Renk Değiştirebilen Akrilamid Esaslı Hidrojellerin Sentezi, **27. Ulusal Kimya Kongresi**, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale.
3. Selen V,Taşar Ş, **Çakmak M**, Özer A, Özer D, Evsel Atık Nitelikli Çay Posasından Aktif Karbon Üretimi ve Karakterizasyonu, **27. Ulusal Kimya Kongresi**, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale.
4. Selen V,Taşar Ş, **Çakmak M**, Özer A, Özer D, Modifiye Edilmiş Soya Küspesi İle Basic Blue 3 Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerden Giderimi, **27. Ulusal Kimya Kongresi**, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale.