

***Bacillus pumilus* (NRRL B-212) İLE PEKTİN ve
TARIMSAL ATIKLARDAN PEKTİNAZ
ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

Yük. Müh. Özlem TEPE

**Doktora Tezi
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Arzu Y. DURSUN**

HAZİRAN-2012

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus pumilus* (NRRL B-212) ile PEKTİN ve TARIMSAL ATIKLARDAN
PEKTİNAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Özlem TEPE

(04212202)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 14 Mayıs 2012

Tezin Savunulduğu Tarih: 11 Haziran 2012

Tez Danışmanı :	Doç. Dr. Arzu Y. DURSUN (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri :	Prof. Dr. Zümriye AKSU (H.Ü)
	Prof. Dr. Cevdet AKOSMAN (F.Ü)
	Prof. Dr. Ubeyde İPEK (F.Ü)
	Yrd. Doç. Dr. Gülşad USLU (F.Ü)

HAZİRAN-2012

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Arzu Y. DURSUN' a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın istatistiksel modellenmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat ELİBOL' a teşekkür ederim. Çalışmamın ve hayatımın her aşamasında desteğini gördüğüm aileme teşekkür ederim. Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan, FÜBAP' a ve sağladığı çalışma olanaklarıyla Çevre Mühendisliği Bölümüne şükranlarımı sunarım.

Özlem TEPE
ELAZIĞ –2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
TABLolar LİSTESİ	XV
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	XVII
1. GİRİŞ.....	1
2. ENZİMLER.....	4
2.1. Genel	4
2.2. Enzimlerin Kimyasal Yapısı	5
2.3. Enzimlerin Aktif Merkezi	7
2.4. Enzim Kaynakları.....	9
2.4.1. Hayvansal Enzimler	9
2.4.2. Bitkisel Enzimler.....	9
2.4.3. Mikrobiyal Enzimler	10
2.5. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	10
2.5.1. Adlandırma.....	10
2.5.2. Sınıflandırma	10
2.5.2.1. Oksiredüktazlar	11
2.5.2.2. Transferazlar.....	12
2.5.2.3. Hidrolazlar.....	12
2.5.2.4. Liyazlar.....	12
2.5.2.5. İzomerazlar	12
2.5.2.6. Ligazlar.....	13
2.6. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler.....	13
2.6.1. pH.....	13
2.6.2. Sıcaklık.....	14
2.6.3. Substrat Konsantrasyonu	15
2.6.4. Enzim Konsantrasyonu.....	16
2.6.5. Zaman.....	16
2.6.6. Radyasyon	16

2.6.7.	Aktivatörler ve İnhibitörler	16
2.7.	Enzimatik Aktivitenin Kontrolü	18
3.	MİKROBİYAL ENZİM ÜRETİMİ	19
3.1.	Genel	19
3.1.1.	Tür Seçimi	20
3.1.2.	Türün Geliştirilmesi	20
3.1.3.	Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu	21
3.2.	Fermantasyon Proseslerinde Nutrient İhtiyaçları	21
3.2.1.	Karbon Kaynağı	22
3.2.2.	Azot ve Kükürt Kaynağı.....	23
3.2.3.	Eser Elementler	23
3.2.4.	Vitamin Kaynakları ve Diğer Büyüme Faktörleri	24
3.2.5.	Fiziksel ve İyonik İhtiyaçlar	25
3.3.	Fermantasyon Yöntemleri	26
3.3.1.	Derin Kültür Fermantasyonu.....	27
3.3.2.	Katı Hal Fermantasyonu.....	28
3.3.2.1.	Katı Hal Fermantasyonunda Kullanılan Organizmalar	30
3.3.2.2.	Katı Hal Fermantasyonunu Etkileyen Faktörler.....	30
3.3.2.3.	Katı Hal Fermantasyonu ile Pektinaz Enzimi Üretimi Çalışmaları	31
4.	PEKTİNAZLAR	34
4.1.	Pektik Maddeler	34
4.2.	Pektik Maddelerin Yapısı, Sınıflandırılması ve Adlandırılması	35
4.3.	Pektinazlar	36
4.3.1.	Protopektinazlar.....	37
4.3.1.1.	Sınıflandırılması	39
4.3.1.2.	Oluşumu	39
4.3.1.3.	Ölçüm Metotları	39
4.3.1.4.	Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri	39
4.3.2.	Poligalakturonazlar.....	40
4.3.2.1.	Sınıflandırılması	40
4.3.2.2.	Oluşumu	40
4.3.2.3.	Ölçüm Metotları	40
4.3.2.4.	Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri	41
4.3.3.	Liyazlar.....	43

4.3.3.1. Sınıflandırılması	43
4.3.3.2. Oluşumu	43
4.3.3.3. Ölçüm Metotları	44
4.3.3.4. Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri	44
4.3.4. Pektin Esterazlar	46
4.3.4.1. Oluşumu	46
4.3.4.2. Ölçüm Metodu	46
4.3.4.3. Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri	47
4.4. Mikrobiyal Pektinazların Biyoteknolojik Uygulamaları	47
4.4.1. Meyve Suyu Üretiminin Farklı Aşamalarında Kullanımı	50
4.4.2. Pektinazların Tekstil İşleme ve Pamuk Liflerinin Parlatılmasında Kullanımı	50
4.4.3. Pektinazların Bitki Dokularının Yumuşatılması ve Pişirilmesinde Kullanımı	51
4.4.4. Pektinazların Çay ve Kahvenin Fermantasyonunda Kullanımı	51
4.4.5. Pektinazların Pektik Atık Suların Arıtımında Kullanımı	52
4.4.6. Pektinazların Kâğıt Yapımında Kullanımı	52
4.4.7. Pektinazların Yağların Ekstraksiyonunda Kullanımı	53
4.4.8. Pektinazların Kümes Hayvanlarının Yemlerinde Kullanımı	53
5. DENEY SİSTEMİNİN MATEMATİKSEL ve İSTATİSTİKSEL TANIMLANMASI	55
5.1. Mikroorganizmanın Üremesi	55
5.1.1. Mikroorganizmaların Üreme Kinetiği	56
5.2. Biyoreaktörde Oksijen Transferi	57
5.3. Tepki Yüzey Metodu	62
5.3.1. Deney Sayısının ve Model Katsayılarının Hesaplanması	65
5.3.2. Tepki Yüzey Metodu (TYM) için Kullanılan Tasarım Modelleri	66
5.3.3. Regresyon Analizi	66
5.3.3.1. Bağımlı Değişken	67
5.3.3.2. Bağımsız Değişken	67
5.3.3.3. F- Testi	67
5.3.3.4. Anova	68
5.3.3.5. Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	68
5.3.3.6. Artık Analizi	69
6. MATERYAL VE METOT	70
6.1. Mikroorganizma ve Üretimi	70
6.2. Enzim Üretim Ortamı	70

6.3.	Biyoreaktör Deneyleri	72
6.4.	Analiz Yöntemleri	73
6.4.1.	Mikroorganizma Konsantrasyonu Tayini.....	73
6.4.2.	Enzim Aktivite Tayini	74
6.4.2.1.	Pektin Liyaz Tayini	74
6.4.2.2.	Ekzo Pektinaz Tayini.....	75
6.4.2.3.	Endo Pektinaz Tayini	75
6.4.3.	Protein Tayini	76
6.5.	Biyoreaktörde Sıvı Faz Hacimsel Kütle Transfer Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızının Hesaplanması.....	76
7.	BULGULAR VE TARTIŞMA	78
7.1.	Derin Kültür Fermantasyon Çalışmaları	78
7.1.1.	Başlangıç pH' ının Etkisi	78
7.1.2.	Başlangıç Pektin Konsantrasyonunun Etkisi.....	83
7.1.3.	Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi	87
7.1.4.	Azot Kaynaklarının Etkisi	91
7.1.4.1.	Maya Özü Konsantrasyonunun Etkisi.....	92
7.1.4.2.	Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi	94
7.1.4.3.	Pepton Konsantrasyonunun Etkisi.....	97
7.1.5.	Metal İyonlarının Etkisi	101
7.1.5.1.	Kalsiyum İyonu Konsantrasyonunun Etkisi.....	101
7.1.5.2.	Sodyum İyonu Konsantrasyonunun Etkisi	104
7.1.6.	Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi.....	107
7.1.7.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi	110
7.1.8.	Biyoreaktör Deneyleri	112
7.1.8.1.	Karıştırma Hızının Etkisi.....	113
7.1.8.2.	Hava Akış Hızının Etkisi.....	117
7.1.8.3.	Oksijen Transfer Parametreleri	120
7.2.	Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri	124
7.2.1.	Ortam Seçimi.....	124
7.2.2.	Buğday Kepeği Kullanılarak Katı Hal Fermantasyon Tekniği ile Pektinaz Üretimi ve Üretim Ortamının Tepki Yüzey Metodu Kullanılarak Optimizasyonu.....	129
7.2.3.	Şeker Pancarı Küspesi Kullanılarak Katı Hal Fermantasyon Tekniği ile Pektinaz Üretimi ve Üretim Ortamının Tepki Yüzey Metodu Kullanılarak Optimizasyonu.....	149

8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	166
9.	KAYNAKLAR.....	169
10.	EKLER	181
	ÖZGEÇMİŞ.....	191

ÖZET

Bu çalışmada, pektinaz grubu enzimlerden ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz üretimi, gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus pumilus* ile kesikli sistemde gerçekleştirilmiş, ortam pH' ı, başlangıç pektin konsantrasyonu, farklı karbon kaynakları, farklı azot kaynakları, fosfat konsantrasyonu ve metal iyonlarının enzim üretimine etkileri incelenmiştir. Biyoreaktör deneylerinde, karıştırma hızı ve hava akış hızının enzim üretimine etkisi incelenmiş, oksijen tüketim hızı ve sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayıları hesaplanmıştır. Daha sonra enzim üretimi farklı tarımsal atıklar kullanılarak yapılmış ve enzim üretim ortamı tepki yüzey metodu ile optimize edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında derin kültür fermentasyonu deneyleri gerçekleştirilmiş ve maksimum enzim üretimi pH:8' de elde edilmiştir. Başlangıç pektin konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi incelenmiş ve % 1 pektin konsantrasyonu optimum pektin konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat, maya özütü ve pepton azot kaynağı olarak kullanılmış ve en yüksek aktivite % 0.05 amonyum sülfat içeren ortamda elde edilmiştir. Metal iyonlarının etkisinin incelendiği deneylerde, maksimum aktivite değerleri % 0.02 NaCl içeren ortamda elde edilmiştir. Ayrıca fosfatın enzim üretimine etkileri araştırılmış, en yüksek pektin liyaz ve endo pektinaz aktivitesi % 0.3 K_2HPO_4 +% 0.15 KH_2PO_4 içeren ortamda, ekzo pektinaz aktivitesi ise % 0.6 K_2HPO_4 +% 0.2 KH_2PO_4 içeren ortamda sırasıyla 27.37, 20.51 ve 8.00 U/mL olarak elde edilmiştir.

Pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz enzimlerinin aktivitelerine sıcaklık ve pH' ın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH 5-11 aralığında değiştirilirken sıcaklık ise 30-90 °C aralığında değiştirilmiştir. Pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri için optimum sıcaklık sırasıyla 40, 50 ve 30 °C olarak belirlenmiştir. Tüm enzimler pH=10' da maksimum aktivite göstermişlerdir.

Çalışmanın ikinci aşamasında 6 L hacmindeki bir biyoreaktörde enzim üretimine karıştırma ve havalandırma hızının etkileri incelenmiş, sıvı faz kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı hesaplanmıştır. Karıştırma hızı 200-400 rpm aralığında değiştirilirken hava akış hızı 0.1-0.2 vvm aralığında değiştirilmiş, en yüksek enzim aktivite değerleri 300 rpm ve 0.1 vvm' de elde edilmiş ve pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 19.5, 10.69 ve 102.13 olarak bulunmuştur.

Araştırmanın son aşamasında katı hal fermentasyonu deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla, buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ay çiçeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu, elma posası ve üzüm posası gibi çeşitli tarımsal atıklar kullanılmış ve en yüksek enzim aktivite değerleri buğday kepeği ve şeker pancarı küspesi içeren ortamlarda elde edilmiştir. Ayrıca katı hal fermentasyonu tepki yüzey metodu ile optimize edilmeye çalışılmıştır. Katı substrat (buğday kepeği ve şeker pancarı), amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları bağımsız değişkenler olarak seçilmiş, ikinci dereceden polinom katsayıları Design Expert Software istatistik paketi kullanılarak hesaplanmış ve analizlenmiştir. Modelin istatistiksel analizi, varyans analiz modeli (ANOVA) ile yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Pektinaz, *Bacillus pumilus*, derin kültür fermentasyonu, katı hal fermentasyonu, tarımsal atıklar, Tepki Yüzey Metodu.

SUMMARY

Investigation of Pectinase Production from Pectin and Agricultural Wastes by *Bacillus pumilus* (NRLL B-212)

In this study, production of pectinase group enzymes; exo-pectinase, endo-pectinase and pectin lyase by a gram-positive bacterium, *Bacillus pumilus* was studied in a batch system and the effects of pH, initial concentrations of carbon and nitrogen sources, phosphate and metal ions on enzyme production were investigated. In bioreactor experiments, the effects of mixing speed and air flow rate were examined, oxygen consumption rate and volumetric liquid phase mass transfer coefficients were calculated. Then, the enzyme production was performed using different agricultural wastes and the enzyme production medium was optimized by response surface methodology.

In the first stage of the research, submerged culture fermentation experiments were performed and maximum enzymes production were obtained at pH:8. The effect of initial pectin concentration on enzyme production was examined and 1.0 % pectin was determined as optimum pectin concentration. Ammonium sulfate, yeast extract and peptone were used as nitrogen sources and the highest activity was observed at 0.05% ammonium sulfate. In experiments that examined the effect of metal ions, the highest activity values were obtained in a medium containing 0.02 % NaCl. Phosphate effects were also investigated and maximum exo-pectinase activity was determined as 8.00 U/mL at 0.6 % K_2HPO_4 + 0.2% KH_2PO_4 and pectin lyase and endo-pectinase activity were obtained as 27.37 and 8.00 U/mL at 0.3% K_2HPO_4 + 0.15% KH_2PO_4 concentrations, respectively.

The effects temperature and pH on pectic enzyme activities were tested in the study. For this purpose pH was varied in the range of 5-11, where as temperature was varied from 30°C to 90 °C. The optimum temperatures were found as 40, 50 and 30 °C for pectin lyase, exo and endo pectinase activities, respectively. All the enzymes had maximum activity at pH=10.

In the second stage of the study, the effects of stirring and air flow rates on enzyme production were investigated in a 6 L bioreactor and liquid-phase volumetric mass transfer coefficients (k_{La}) and oxygen consumption rates were also determined. Stirring rate was changed from 200 to 400 rpm, where as air flow rate was changed from 0.1-0.2 vvm. The highest enzyme's activities were obtained at 300 rpm and 0.1 vvm and were pectin lyase, exo and endo pectinase activities found as 19.5, 10.69 and 102.13 U/mL, respectively.

In the last stage of the research, solid state fermentation studies were performed. Agricultural wastes such as wheat bran, sugar beet pulp, sunflower tray, orange peel, banana peel, apple pomace and grape pomace were used and the maximum enzyme activities were determined in the medium containing wheat bran and sugar beet pulp. Furthermore, solid state fermentation parameters were optimized by using response surface method. Solid substrates (wheat bran and sugar beet), ammonium sulfate and yeast extract concentrations were selected as independent variables in the model. The second-order polynomial coefficients were calculated and the results were analyzed using statistical package Design Expert Software. Statistical analysis of the model was carried out using model of variance analysis (ANOVA).

Key words: Pectinase, *Bacillus pumilus*, submerged culture fermentation, solid state fermentation, agricultural wastes, Response Surface Methodology.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyma modeli.....	8
Şekil 2.2. İnhibitörlerin sınıflandırılması	17
Şekil 4.1. Pektik maddelerin birincil yapısı.....	35
Şekil 4.2. Pektinazların hareket şekli	37
Şekil 5.1. Mikroorganizmaların üreme evreleri	56
Şekil 5.2. Bir gaz kabarcığından hücreye oksijen transferinin adımları.....	59
Şekil 5.3. Dinamik metoda göre çözünmüş oksijen konsantrasyonunun değişimi	61
Şekil 5.4. Hacimsel kütle aktarım katsayısının belirlenmesi.....	62
Şekil 5.5.a. Maksimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri.....	64
Şekil 5.5.b. Minimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri	65
Şekil 5.5.c. Eyer noktası için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri.....	65
Şekil 6.1. 6 L hacimli biyoreaktör	72
Şekil 6.2. 6 L hacimli biyoreaktörün şematik gösterimi	72
Şekil 7.1. Farklı pH değerlerinde kuru mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi	79
Şekil 7.2. Farklı pH değerlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	79
Şekil 7.3. Farklı pH değerlerinde enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	81
Şekil 7.4. Farklı pH değerlerinde toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi.....	82
Şekil 7.5. Farklı pH değerlerinde ortam pH' ının zamanla değişimi.....	82
Şekil 7.6. Farklı pektin konsantrasyonlarında kuru mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	83
Şekil 7.7. Farklı pektin konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	84
Şekil 7.8. Pektin içeren ortamda $1/\mu-1/S$ grafiği	84
Şekil 7.9. Farklı pektin konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	85
Şekil 7.10. Farklı pektin konsantrasyonlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	86
Şekil 7.11. Farklı karbon kaynaklarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	88
Şekil 7.12. Farklı karbon kaynaklarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	90
Şekil 7.13. Farklı karbon kaynaklarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	91

Şekil 7.14.	Farklı maya özütü konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları	92
Şekil 7.15.	Farklı maya özütü konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	93
Şekil 7.16.	Farklı maya özütü konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	94
Şekil 7.17.	Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	95
Şekil 7.18.	Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi.....	96
Şekil 7.19.	Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	97
Şekil 7.20.	Farklı pepton konsantrasyonlarda elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	98
Şekil 7.21.	Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	99
Şekil 7.22.	Farklı pepton konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	100
Şekil 7.23.	Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarda elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	102
Şekil 7.24.	Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	103
Şekil 7.25.	Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	104
Şekil 7.26.	Farklı NaCl konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	105
Şekil 7.27.	Farklı NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	106
Şekil 7.28.	Farklı NaCl konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	107
Şekil 7.29.	Farklı fosfat konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	108
Şekil 7.30.	Farklı fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	109
Şekil 7.31.	Farklı fosfat konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	110
Şekil 7.32.	Enzim aktivitesi üzerine pH ' ın etkisi	112
Şekil 7.33.	Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	112
Şekil 7.34.	Farklı karıştırma hızlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	114

Şekil 7.35.	Farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	115
Şekil 7.36.	Farklı karıştırma hızlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	116
Şekil 7.37.	Farklı hava akış hızlarına elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	118
Şekil 7.38.	Farklı hava akış hızlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	119
Şekil 7.39.	Farklı hava akış hızlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	120
Şekil 7.40.	Farklı ortam bileşimlerinde 4. günde elde edilmiş enzim aktiviteleri.....	125
Şekil 7.41.	Buğday kepeği ile farklı azot kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	127
Şekil 7.42.	Şeker pancarı küspesi ile farklı azot kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda enzim aktivitelerinin zamanla değişimi	128
Şekil 7.43.	Buğday kepeğinin kullanıldığı deneylerde, Ekzo, endo pektinaz ve pektin liyaz (sırasıyla R1, R2 ve R3) için gözlenmiş değerlere karşı hesaplanmış tahmini değerlerin değişimi	137
Şekil 7.44.	Referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre, ekzo pektinaz (R1), endo pektinaz (R2) ve pektin liyaz (R3) aktivitelerinde bağımsız değişkenler olan buğday kepeği (A), amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonlarının etkisini gösteren perturbation grafiği.....	138
Şekil 7.45.	Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); buğday kepeği (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	140
Şekil 7.46.	Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); buğday kepeği (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	141
Şekil 7.47.	Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	142
Şekil 7.48.	Endo pektinaz aktivitesinde (R2); buğday kepeği (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	143
Şekil 7.49.	Endo pektinaz aktivitesinde (R2); buğday kepeği (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	144
Şekil 7.50.	Endo pektinaz aktivitesinde (R2); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	145
Şekil 7.51.	Pektin liyaz aktivitesinde (R3); buğday kepeği (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu	

	tepki yüzey eğrileri.....	146
Şekil 7.52.	Pektin liyaz aktivitesinde (R3); buğday kepeği (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	147
Şekil 7.53.	Pektin liyaz aktivitesinde (R3); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	148
Şekil 7.54.	Şeker pancarı küspesinin kullanıldığı deneylerde, ekzo, endo pektinaz ve pektin liyaz (sırasıyla R1, R2 ve R3) için gözlenmiş değerlere karşı hesaplanmış tahmini değerlerin değişimi	155
Şekil 7.55.	Referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre, ekzo pektinaz (R1), endo pektinaz (R2) ve pektin liyaz (R3) aktivitelerinde bağımsız değişkenler olan şeker pancarı küspesi (A), amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonlarının etkisini gösteren perturbation grafiği.....	156
Şekil 7.56.	Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); şeker pancarı küspesi (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	157
Şekil 7.57.	Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); şeker pancarı küspesi (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	158
Şekil 7.58.	Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	159
Şekil 7.59.	Endo pektinaz aktivitesinde (R2); şeker pancarı küspesi (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	160
Şekil 7.60.	Endo pektinaz aktivitesinde (R2); şeker pancarı küspesi (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	161
Şekil 7.61.	Endo pektinaz aktivitesinde (R2); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	162
Şekil 7.62.	Pektin liyaz aktivitesinde (R3); şeker pancarı küspesi (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	163
Şekil 7.63.	Pektin liyaz aktivitesinde (R3); şeker pancarı küspesi (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	164
Şekil 7.64.	Pektin liyaz aktivitesinde (R3); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri.....	165
Ek Şekil 1.1.	Yaş mikroorganizma çalışma doğrusu.....	181
Ek Şekil 1.2.	Yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu.....	182

Ek Şekil 2.1.	% 1 pektin konsantrasyonunda $\ln X'$ in zamanla değişimi	183
Ek Şekil 3.1.	Toplam protein kalibrasyon grafiği	184
Ek Şekil 4.1.	Galakturonik asit kalibrasyon grafiği.....	185
Ek Şekil 5.1.	Çözülmüş oksijen derişiminin zamanla değişimi.....	186
Ek Şekil 5.2.	Mikroorganizma oksijen tüketim hızı eğrisi	186
Ek Şekil 5.3.	Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının ($k_L a$) belirlenmesi.....	187

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Kofaktör olarak işlev gören inorganik iyonlar ve ilgili bazı enzimler	7
Tablo 4.1.	Bazı pektik maddelerin moleküler ağırlıkları.....	34
Tablo 4.2.	Farklı meyve ve sebzelerin pektin içeriği	35
Tablo 4.3.	Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırılması	38
Tablo 4.4.	Poligalakturonazların fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri	42
Tablo 4.5.	Bazı liyazların fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri	45
Tablo 4.6.	Bazı pektin esterazların biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri.....	48
Tablo 4.7.	Ticari pektinazlar.....	49
Tablo 6.1.	<i>B. pumilus</i> ' un üretimi için seçilen zengin besi ortamı bileşimi	71
Tablo 6.2.	Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı.....	71
Tablo 7.1.	Farklı karıştırma hızlarında k_La ve q_0 değerlerinin zamanla değişimi	122
Tablo 7.2.	Farklı hava akış hızlarında k_La ve q_0 değerlerinin zamanla değişimi	123
Tablo 7.3.	Buğday kepeği kullanılarak yapılan deneylerde Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) için kullanılmış ortam bileşimlerinin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	130
Tablo 7.4.	Kodlanmış değerleri içeren MKT' a göre deney tasarımı ve gözlenen aktivite değerleri	131
Tablo 7.5.	Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak ekzo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA).....	132
Tablo 7.6.	Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak endo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA).....	133
Tablo 7.7.	Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak pektin liyaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA).....	134
Tablo 7.8.	Şeker pancarı küspesi kullanılarak yapılan deneylerde Merkezi Kompozit Tasarım için kullanılmış ortam bileşimlerinin kodlanmış ve gerçek değerleri.....	149
Tablo 7.9.	Kodlanmış değerleri içeren MKT' a göre deney tasarımı ve gözlenen aktivite değerleri	150
Tablo 7.10.	Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak ekzo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA).....	151
Tablo 7.11.	Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak endo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA).....	152

Tablo 7.12. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak pektin liyaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA).....	153
--	-----

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

- X : Kuru mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)
- S : Substrat konsantrasyonu (g/L)
- μ : Özgül üreme hızı (s^{-1})
- $\mu_{\max}$: Mikroorganizmanın maksimum özgül üreme hızı (s^{-1})
- K_S : Monod sabiti (Substrat doyumluk konsantrasyonu) (g/ L)
- C_o : Sıvı ortamdaki oksijen konsantrasyonu (mg/L)
- q_o : Oksijen tüketim hızı ($\text{mg L}^{-1} \text{s}^{-1}$)
- k_{La} : Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı (s^{-1})
- C_o^* : Doygunluk çözülmüş oksijen konsantrasyonu (mg/L)
- KH : Karıştırma hızı (rpm)
- $vvm : \frac{\text{cm}^3 \text{ dak hava}}{\text{cm}^3 \text{ reaktördeki çözelti hacmi}}$
- TYM: Tepki Yüzey Metodu
- MKT: Merkezi Kompozit Tasarım

1. GİRİŞ

Çevre, insanları ve diğer canlıları etkileyen dış etkenler bütünü olup, içindeki mevcut olan tüm değerleriyle korunması hayati bir önem taşımaktadır. Çevrenin bozulması ve çevre sorunları ekosistemin bozulmasıyla başlamıştır. Çevre sorunlarının, son yıllarda, başta insanlar olmak üzere tüm canlıları tehdit eder hale gelmesiyle, doğayı ve doğal kaynakları koruma fikri dünya çapında yaygınlık göstermiş, bu parametreler ışığında koruma stratejileri belirlenmiştir. Doğal kaynakların korunması ve sürdürülebilir kalkınmanın sağlanabilmesi için, koruma-kullanma dengelerinin oluşturulması gerekir. Sanayileşirken çevreyi korumak, sürdürülebilir kalkınmayı sağlamak hayati bir önem taşımaktadır. Çevre sorunlarının çözümü için öncelikle çevre ve kalkınmanın birbirine zıt değil, birbirlerini tamamlayan kavramlar oldukları kabul edilmelidir. Bu yaklaşımla çevre korumanın kalkınmanın önünde bir engel olmadığı, aksine sürdürülebilir kalkınma için uzun vadede çevre korumanın gerekliliği anlaşılmalıdır. Bilinmelidir ki; çevre bir atık sahası değil, canlı yaşamının sürdürülebilmesi için bir kaynaktır. Biyoteknolojik uygulamalar da genellikle çevreye zarar vermeyen teknikleri kullanırlar. Bu tekniklerin enerji ihtiyacı azdır, yüksek basınç gerektirmez, oda sıcaklığında veya daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Çevreyi kirleten atıkların değerlendirilmesi ve mikroorganizmalar yardımı ile parçalanması da mümkündür. Biyoteknoloji, modern tekniklerle bitki, hayvan ve mikroorganizmalar kullanılarak kültür ortamında ürün elde etmektir. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin artmasıyla birlikte biyoteknolojik olarak enzim çalışmaları da artmaya başlamıştır.

Enzimler, katalitik olarak aktif proteinlerdir (Soetaert ve Vandamme, 2006). Deterjan endüstrisinde, nişastanın dönüştürülmesinde, yakıt alkol üretiminde, tekstil uygulamalarında, gıda ve yiyecek endüstrilerinde, katı ve sıvı yağların işlenmesinde, organik sentezlerde, kağıt ve kağıt hamuru üretiminde ve bunun gibi birçok alanda kullanılmakta ve endüstriyel kullanımı hızla artmaktadır. Yeni uygulama alanları da daima ilave edilmektedir (Kirk vd., 2002; Ogawa ve Shimizu, 2002).

Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar enzim kaynaklarıdır. Ancak, ticari uygulamalarda en önemli endüstriyel enzim kaynağı mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalarla enzim üretimi, fiziksel ya da fiziko-kimyasal olarak kontrol

edilebilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilmiş enzim miktarı, bitki ve hayvan kaynaklarından daha yüksektir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen özellikle hücre dışı enzimler kolaylıkla ekstrakte edilebilir. Günümüzde mikroorganizmalardan enzim üretimi, derin kültür ve katı hal fermantasyon prosesleriyle başarılı olarak gerçekleştirilmektedir. Enzimler, önemli mikrobiyal metabolitler olarak düşünülmekte ve ticari ölçekte birçok gelişmiş ülkede özellikle Avrupa, ABD ve Japonya’ da başarılı olarak üretilmektedir. Çalışılmış olan enzimler; lipaz, lipoprotein lipaz, proteaz, selulaz, lignin degrade eden enzimler (lignin peroksidaz manganez peroksidaz), lakkaz, mannanaz, kitinaz, fitaz, β -glukosidaz ve pektinazdır (İbrahim, 2008).

Pektinaz, pektik polimerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzim ailesinin genel bir adıdır (Reid ve Ricard, 2000). Pektik maddeler, bitki duvarlarında ve orta lamelde oluşan yapısal polisakkaritlerdir. Bu maddeler, büyük oranda anhidroglakturonik asit birimlerinden oluşan karmaşık kolloidal karbonhidrat türevlerinden meydana gelir ve yüksek su tutma kapasitesine sahiptir. Bu durumda pektik maddeleri oluşturan birim, poliglakturonik asit olup, düz bir zincir yapmak üzere birbirleriyle α -1.4 bağı yapmışlardır. 30000-300000 moleküler ağırlıklı heteropolisakkaritlerdir. Pektik maddeler pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup maddeye verilen genel addır (Willants vd., 2001). Pektik enzimler, pektin molekülünün glakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektinesterazlar (ester bağına hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayrılır (Aksöz ve Aksöz, 1985). Pektinazlar, evlerde kullanılmış olan ilk enzimlerden biridir. Ticari olarak ilk uygulama, 1930’ larda viski ve meyve sularının hazırlanmasında gözlenmiştir. Pektinazlar günümüzde, tekstil, meyve suyu endüstrileri ve çeşitli biyoteknolojik uygulamanın merkezi konumundadır. 1995’ te endüstriyel enzimlerin ulaştığı yıllık satış cirosu 1 milyar dolardır. Bu satış rakamının içinde pektinazların payı ise % 7.5 (75 milyon dolar) olarak hesaplanmıştır. 2005’ te toplam endüstriyel enzim satışlarının yaklaşık olarak 1.7-2.0 milyar dolar olduğu tahmin edilmiştir (Kashyap vd., 2001). Meyve suları ve şarabın ekstraksiyonu ve durultulmasında (berraklaştırılması) asidofilik pektinazlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkali pektinazlar ise, pektinli materyalleri işleyen gıda endüstrisi atıksularının ilk arıtımı, tekstil ve bitki fiberlerin işlenmesi, çay ve kahve fermantasyonu ve yağ ekstraksiyonu gibi çeşitli geleneksel endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Pektini parçalayan mikroorganizmalar ve pektinaz grubu enzimler hakkındaki bilginin artması ile

beraber alkali pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılması ve kağıt yapımı gibi diğer biyoteknolojik proseslerde de kullanılmaktadır (Hoondal vd., 2002).

Pektinaz enzimi üretimi için 30' dan fazla bakteri, mantar ve maya cinsi kullanılmaktadır. Enzim üretim çalışmalarında, *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Rhizopus* sık çalışılan cinsler olmakla birlikte en fazla *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Erwinia* cinsleri kullanılmaktadır (Favela-Torres vd., 2006).

Bu çalışmada, *Bacillus pumilus* ile pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz üretimi kesikli sistemde gerçekleştirilerek enzim üretimine pH, başlangıç pektin konsantrasyonu, farklı karbon kaynakları, farklı azot kaynakları, fosfat konsantrasyonu ve metal iyonlarının etkisi incelenecek, enzimin optimum pH ve sıcaklığı belirlenecektir. Enzim üretimine karıştırma ve hava akış hızlarının etkisini belirlemek için yapılacak deneylerde, laboratuvar ölçekli bir biyoreaktör kullanılacak, oksijen tüketim hızı ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısının değişimi incelenecektir. Daha sonra farklı tarımsal ve tarıma dayalı endüstriyel atıklar kullanarak enzim üretimi gerçekleştirilecek ve en yüksek aktivitelerin elde edildiği iki katı substrat kullanılarak enzim üretim ortamı tepki yüzey metodu ile optimize edilmeye çalışılacaktır. Türk ve Dünya literatüründe, *Bacillus pumilus* ile pektinaz fermantasyonu çalışmaları başlangıç aşamasındadır. Bu açıdan söz konusu çalışmanın Türk ve Dünya literatüründeki önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmekte ve elde edilecek sonuçlar karşılaştırılarak özgün bir çalışma oluşturulacaktır. Ayrıca, enzim üretiminde ortaya çıkabilecek sorunlar belirlenerek, ileride endüstriyel üretime veya değişik birçok bilimsel araştırmalara temel oluşturması sağlanacaktır. Çeşitli atıkların kullanılacak olması araştırmaya, günümüzde dünya genelinde çevre konusuna olan hassasiyet göz önüne alındığında, ayrı bir özellik katmaktadır. Zira artık dünyada yapılan çalışmaların temiz enerji üretimi, atık kullanımı, atık geri döngüsü gibi çerçevesindeki konulara eğilim gösterdiğini görmekteyiz. Substrat olarak, atıkların kullanıldığı ortamlarda enzim üretiminin verimli olması halinde, endüstrideki yüksek üretim maliyeti probleminin üstesinden gelmek bir ölçüde mümkün olacaktır. Türkiye gibi endüstride kullanılan enzimi ithal eden bir ülke için, bu durum dışa bağımlılığı da bir ölçüde bertaraf edecektir. Bunun yanı sıra, söz konusu atık ve artıkların, gelişigüzel alıcı ortamlara salınmasıyla oluşabilecek çevre kirliliğinin önüne geçmek de mümkün olabilecektir. Bu açıdan çalışma, çok yönlü fayda sağlama özelliği kazanmaktadır.

2. ENZİMLER

2.1. Genel

Doğal durumda suda çözünen enzimler, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapısındaki özel katalizörlerdir. Bir biyolojik sisteme ait genetik bilgi, protein zincirinde yer alacak aminoasitlerin diziliş sırasını belirlemektedir. Bu genetik bilgi tarafından kodlanan proteinlerin çoğu, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilme yeteneğine sahiptir (Telefoncu, 1986).

Enzimlerin insanlığın hizmetinde kullanılması hemen hemen insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanlar ilk çağlarda ekmek, şarap, peynir ve benzeri gıda maddelerinin hazırlanmasında ve ayrıca ilaç olarak farkında olmadan enzimlerden yararlanmıştır. Hücre dışı bir enzimatik aktivitenin olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzani tarafından atmacaların mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek ispatlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchoff buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekere dönüştürüldüğünü belirlemiş ve 1830 yıllarında Robiquet ve Boutron ile Chaland amidalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini tespit etmiştir. Pyen ve Persoz, 1833 yılında diastazı bulmuştur. Diastaz, bugün amilaz hazırlanmasında çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır. Nihayet, 1834 yılında Schwann pepsini oldukça saf olarak elde etmeyi başarmış ve 19. yüzyılın ilk yarısında laktaz, pankreatin, üreaz, pityalin, emülsin, tripsin gibi hidrolitik enzimler bulunmuştur. Enzimler için katalizör sözcüğü ilk kez 1838’ de Benzelius, enzim sözcüğü ise ilk kez 1878’ de Kühne tarafından kullanılmıştır. 1897 yılında Buchner’ in alkolik mayalanmanın hücresiz ortamda da gerçekleştiğini bulması enzimolojinin gelişmesinde önemli bir aşamadır (Telefoncu, 1986).

Çağdaş enzim kimyası çalışmaları, enzimatik reaksiyonlarla ilgili Michalis-Menten varsayımı ve Summer tarafından 1926 yılında saf kristal bir enzimin (üreaz) izolasyonu ile başlamıştır. Proteinlerin saflaştırılması ve yapılarının aydınlatılması ile ilgili yeni kimyasal ve fiziksel tekniklerin geliştirilmesi ile Sanger, 1953 yılında 51 amino asitten oluşan insulinin amino asit dizisini saptamıştır. Bundan beş yıl sonra 124 amino asitten oluşan ribonükleazın amino asit dizisi aydınlatılmıştır. Merrifield ve çalışma arkadaşları, 1969 yılında kimyasal sentez yolu ile biyolojik aktivite gösteren bir enzimi (ribonükleaz) elde etmeyi başarmıştır. Bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe daha da yoğunlaşmakta olup yeni

enzimler izole edilip saflaştırılmaktadır. Bugün, binlerce enzim saflaştırılmış ve bunların yüzlercesinin yapısı ve kimyasal mekanizması aydınlatılmıştır.

Laboratuarda çok yüksek sıcaklıklarda ve yüksek basınç altında gerçekleştirilebilecek reaksiyonlar enzimler sayesinde organizmada vücut sıcaklığında problemsiz yürütülebilmektedir. Biyolojik sistemlerde substrat ile son ürün arasında genellikle birden çok sayıda enzimin katalizörlüğü söz konusudur. Bir enzimin oluşumunu katalizlediği ürün başka bir enzim için substrat olmaktadır. Organizmadaki reaksiyonların birçok adımda tamamlanması, bir yandan aktivasyon enerjisi engelini kolay aşılmasını sağlarken bir yandan da açığa çıkan enerjinin kontrolüne olanak vermektedir. Ekzotermik reaksiyon adımlarında açığa çıkan enerjinin bir bölümü endotermik reaksiyonların yürümesini sağlarken kalan kısmı ATP şeklinde depo edilmekte ve diğer vücut faaliyetleri için gerekli enerjiyi karşılamaktadır. Enzimler dengeyi etkilemezler ancak kurulmasını hızlandırırlar. Örneğin, katalizsiz olarak yarılanma süresi 30 yıl olan bir reaksiyonun enzim tarafından 10^9 kez hızlandırıldığı düşünülürse yarılanma süresi yaklaşık bir saniyeye düşmektedir (Telefoncu, 1986).

2.2. Enzimlerin Kimyasal Yapısı

Enzimlerin çoğu proteid sınıfı maddeler olup bir protein ve buna bağlı bir prostetik gruptan oluşurlar. Diğerleri ise böyle grupları aktif şekillerinde tersinir olarak bağlar ve proteine apoenzim, prostetik gruba ise koenzim adı verilir.

Tüm diğer doğal proteinler gibi enzim proteinleri de 20 doğal amino asitin oluşturduğu polipeptidlerdir. Polipeptid zincirindeki aminoasitlerin sayısı 100 ila birkaç bin arasında değişmekte olup doğal protein zincirindeki tüm amino asitler L-formundadır.

Bir proteinin yapısının aydınlatılmasında ilk adım, polipeptid zincirinde aminoasitlerin diziliş sırasının (primer yapı) aydınlatılmasıdır. İkinci adım; polipeptid zincirinin uzaydaki durumunu (amino asitlerin R grupları dikkate alınmaksızın) yani peptid zinciri konformasyonunun aydınlatılmasıdır (sekonder yapı). Zincirin uzaydaki konumu ve katlanma şeklini amino asit dizisi tayin etmektedir. Sekonder yapının belirlenmesinde özellikle protein zincirindeki hidrojen köprü bağları çok etkilidir. Buna göre, proteinlerin sekonder yapıları olarak; katlanmış yapı veya β - yapısı, α -heliks yapısı ve karışık yapılardan bahsedilir. Üçüncü adım; yan zincirlerdeki atomların da uzaydaki konumlarının belirlenmesidir ki bu tersiyer yapı olarak tanımlanır. Tersiyer yapıyı belirleyen etmenler;

hidrojen köprü bağları yanında disülfid bağları, iyonik ilişkiler ve hidrofobik bağlardır. Protein moleküllerinin tersiyer yapılarının aydınlatılmasında özellikle röntgen yapı analizi yöntemlerinden büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Bugün; protein biyosentezi daha tamamlanmadan zincirin sentezlenmiş kısmının uzaydaki şeklini aldığı deneysel olarak kanıtlanmıştır. Protein molekülünün katlanma şekli amino asit dizisince belirlenir. Örneğin; dizi glutamik asit, lösin ve alanin gibi aminoasitler ile başlıyor ve bunların dört veya beşi arka arkaya geliyorsa proteinin uzaydaki yapısı α -heliks yapısınca olacaktır. Bu düzen, dizide heliks kıran bir aminoaside (prolin veya glisin) ulaşıncaya kadar devam eder. Benzer şekilde, metiyonin, valin ve izolosin ile başlayan bir dizi proteini katlanmış yapıya doğru yönlendirir. Bir proteinin yapısının aydınlatılmasında son adım ise kuarter yapısının aydınlatılmasıdır. Kuarter yapı, alt birimlerin karşılıklı durumlarını kapsar. Birçok enzim amino asit dizisi ve tersiyer yapı bakımından birbirinin aynı veya çok benzeri olan iki veya daha fazla sayıda polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Zincirde 700' den fazla amino asit içeren (Mol. Kütlesi 80.000) hemen hemen tüm proteinler alt birimlerden oluşmuştur. Bu alt birimler arasında heteropolar bağlar vardır ve çoğu kez dönüşümlü olarak çözünebilmektedir. Kuarter yapıdaki bir enzimin alt birimlerinin varyasyonu ile (izoenzimler) türer.

Aynı organizmada oluşan ve aynı reaksiyonu katalizleyen, farklı primer yapıdaki iki veya daha fazla enzim izoenzim olarak tanımlanır. Örneğin laktat dehidrogenazın beş değişik şekli tam olarak belirlenmiştir. Çok sayıda reaksiyon adımı üzerinde yürüyen reaksiyon serisini katalizleyen ve çok sayıda enzimden oluşan agregatlara Enzim sistemi veya Çoklu-Enzim kompleksi adı verilir. Bu komplekslerin etki prensibi, her enzimatik reaksiyon ürününün (ara ürün) bir sonraki reaksiyonu katalizleyen enzim için substrat olması temeline dayanır. Yağ asidi sentezinde görev alan enzim sistemi ile 2-oxoasitlerin dekarboksilasyonunda görev alan enzim sistemi bu tür enzim kompleksleri için tanınmış iki örnektir.

Birçok enzimin aktif merkezinde, koenzim adı verilen özel etki grupları bulunur. Bu durumda enzimin protein kısmı Apoenzim, etki grubu ise Koenzim olarak adlandırılır. Koenzimlerin büyük çoğunluğunun yapı taşları vitaminlerdir. Vitaminlerin organizma için önemleri de buradan kaynaklanmaktadır. Etki grubu protein kısmına sağlam bağlanmışsa koenzim olarak değil Prostetik Grup olarak adlandırılırlar. Ayrıca, aktiviteleri bazı inorganik iyonların varlığına bağımlı olan enzimler de vardır. Bu iyonlar Kofaktör veya Aktivatör olarak tanımlanmakta olup fonksiyonları basit değildir. Kofaktör olarak işlev

gören inorganik iyonlar ve ilgili bazı enzimler Tablo 2.1.' de verilmiştir. Kofaktörler, inhibitörün etkisini ortadan kaldırabilir, çoğu durumlarda substratın veya bir koenzimin, enzimin protein kısmına bağlanmasını ve böylece reaksiyonun başlamasını sağlayabilirler. Metal iyonları, enzim molekülünün üç boyutlu yapısının kararlılığını artırır ve enzim konformasyonunda meydana getirdikleri değişmeler sebebiyle, katalizlenen reaksiyonu hızlandırır veya zehirler. Metal iyonları aktif merkez veya prostetik grupların bileşenlerinden biri olarak katalitik prosese doğrudan katılabilirler (Telefoncu, 1986).

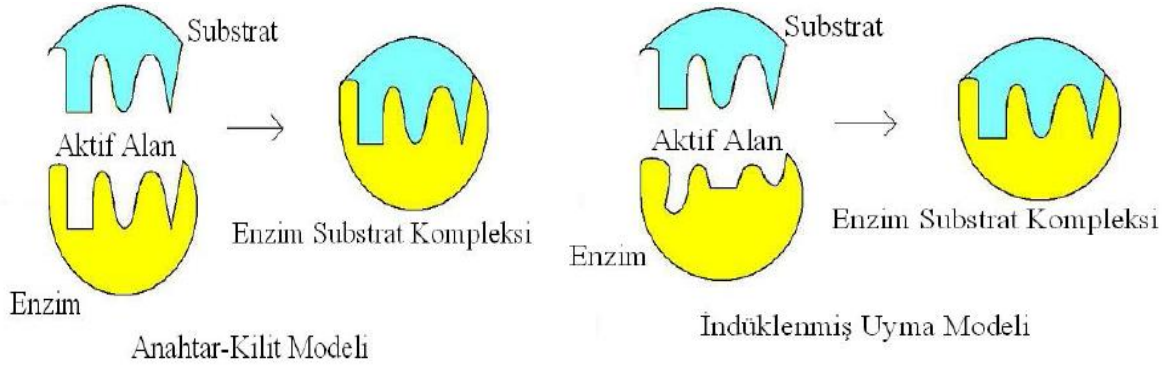
2.3. Enzimlerin Aktif Merkezi

Enzim proteininin belirli bir bölgesinde aktif merkez bulunur. Üç boyutlu yapısı saptanmış olan enzimlerden bilindiği gibi aktif merkez daima bir oyuk veya yarık şeklindedir. Substrat ve koenzim (koenzime gereksinim duyan enzimler durumunda) bu merkeze, hidrojen köprü bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar ve/veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşüme katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asitleri de aktif merkezden sayılırlar. Aktif merkezin böyle bir üç boyutlu yapıda olması, enzimin substrat molekülü ile üç yönden birden etkileşmesine olanak sağlamaktadır. Böylece protein molekülünün üç boyutlu yapısı da bir ölçüde değişmektedir (Telefoncu, 1986).

Tablo 2.1. Kofaktör olarak işlev gören inorganik iyonlar ve ilgili bazı enzimler (Telefoncu, 1986).

İnorganik iyon	İlgili enzim
Fe^{+2} yada Fe^{+3}	Cytochrome oksidaz Katalaz Peroksidaz
Cu^{+2}	Cytochrome oksidaz
Zn^{+2}	Karbonik anhidraz Alkol dehidrogenaz
Mg^{+2}	Kekzokinaz Glukoz-6-fosfataz Prüvat kinaz
Mn^{+2}	Arginaz Ribonukleotid reduktaz
K^{+}	Pürivat kinaz
Ni^{+2}	Üreaz
Mo	Dinitrogenaz
Se	Glutathione peroksidaz

Substrat, enzim üzerindeki aktif merkeze bağlanarak, enzim-substrat kompleksi oluşmaktadır. X-ışını ve Raman spektroskopisi kullanılarak yapılan çalışmalar enzim-substrat (ES) kompleksinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Enzimin aktif merkezde substrata bağlanması hakkında iki hipotez mevcuttur. Birinci model, 1894' te Fischer tarafından ileri sürülen anahtar-kilit modelidir. Bu modele göre enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimeye hangi substratın girdiğine çok büyük bir özgüllük gösterirler. Bunun nedeni ise enzim ve substratının birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından kaynaklanmaktadır. 1958' de Koshland, anahtar ve kilit modelinin bir modifikasyonu olan indüklenmiş uyuma modelini öne sürmüştür. Bu modele göre; aktif merkez esnek bir durum göstermekte, ancak substrat, enzim yüzeyine bağlanınca belirli bir şekil almaktadır. Bu modellerden anahtar ve kilit modeli artık yetersiz sayılmaktadır. İndüklenmiş uyum modeli halen en yaygın kabul gören enzim-substrat-koenzim şeklidir. Şekil 2.1.' de anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyuma modeli şematik olarak gösterilmiştir (Erşan, 2011; Tanyol, 2011).



Şekil 2.1. Anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyuma modeli (Tanyol, 2011).

2.4. Enzim Kaynakları

Doğada bulunan enzim kaynaklarını hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal enzimler olmak üzere başlıca 3 grupta toplayabiliriz.

2.4.1. Hayvansal Enzimler

Hayvanlardan sağlanan bazı enzimler özel kullanım alanlarında bazı avantajlar sağlayabilir. Bu enzimler hayvanların atılan veya az değerli olan organlarından elde edilir. Örneğin pankreas çok zengin bir enzim kaynağıdır. Buradaki proteinin % 23 tripsinojen, % 10-14 kimotripsinojenden ibarettir. Hazmı kolaylaştıran ve pankreatin olarak isimlendirilen amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimleri içerir. Rennet olarak bilinen kimosin peynir üretiminde sütün koagülasyonunda kullanılan asit proteazdır. Bu enzim süttten kesilmemiş danaların midesinden elde edilmektedir. Pepsin, proteolitik bir enzim olup domuzların mide mukozasında bulunmaktadır. Sığır karaciğerinden elde edilen katalaz ise bir peroksidaz enzimi olup, organizmada oluşan H_2O_2 'i parçalayarak hücrenin zarar görmesini önler. Domuz pankreasından tripsin, kimotripsin, at karaciğerinden alkoldehidrogenaz üretilmektedir (Telefoncu, 1986).

2.4.2. Bitkisel Enzimler

Bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilmektedir. Toksik olmayan bu yiyeceklerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır (Tatar, 2007). Tropik bölgelerde uzun zamandan beri kullanılan eti yumuşatma etkisine sahip ve çok yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan papaya bitkisi proteaz ailesinden papain enzimi üretimi için yetiştirilmektedir. Ayrıca, fisin enzimi incir ağacı sütünden, bromealin enzimi ananas meyvesinden ve diğer bazı bitkilerin öz suyundan bol miktarda enzim izole edilmektedir. Bu bitkilerin en önemli avantajı içerdikleri öz suların kolaylıkla alınabilmesidir. Bitkisel enzimlere örnek olarak özellikle maltın içerdiği enzimler verilebilir. Maltta, b-amilaz, proteaz, sitaz, hemiselülaz, fosfataz ve nükleaz gibi enzimler bulunmaktadır (Telefoncu, 1986).

2.4.3. Mikrobiyal Enzimler

Mikrobiyal hücreler enzim kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve birçok avantaj sağlarlar. Büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca mikroorganizmaların ikilenme süreleri çok kısa olduğundan üretim prosesleri kolaylıkla pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir. Kesikli bir fermantasyonda üretim 1.5 ile 10 gün arasında olurken bu daha yüksek organizmalarda 2 ay ile birkaç yıl arasında olmaktadır (Telefoncu, 1986). Mikroorganizmalar sadece enzim üretme yeteneklerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilirler. Bira üretimi, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan enzimler *Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp. tarafından üretilen amilaz ve β -glukanazlardır. *Bacillus* ve *Aspergillus*'dan izole edilen proteazlar, deterjan üretimi ve dericilikte derinin yumuşatılması amacı ile de kullanılmaktadır (Tatar, 2007).

2.5. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

2.5.1. Adlandırma

Eskiden enzimler, gelişmiş güzel biçimde isimlendirilirdi. Saf kristal formda elde edilen enzimlerin sayısı arttıkça zamanla adlandırmada büyük bir kargaşa ortaya çıktı. İlk kez 1961 yılında International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ve International Union of Biochemistry (IUB) tarafından oluşturulan uluslararası bir komisyon enzimlerin adlandırılmasında göz önünde alınacak kuralları tespit etmekle görevlendirildi. Bu komisyon her enzim için bir tavsiye edilen isim (genellikle kısa ve yaygın olarak kullanılan), bir sistematik isim (katalizlenen reaksiyonun tipine uygun) ve bir de sınıflandırma numarası (uluslararası bilimsel dergilerde ve özetlerde kuşkuyla yer vermeyecek biçimde enzimin tanımlanması için) önermiştir (Telefoncu, 1986).

Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasında aşağıdaki temel ilkeler göz önünde bulundurulmaktadır:

- Bütün enzimler –az ekini alırlar. Birden fazla enzimden oluşan enzim sistemleri ise –az sistem şeklinde isimlendirilirler. Örneğin; piruvat-dehidrogenaz sistemi.

- Enzimler, kendilerince katalizlenen reaksiyona uygun olarak adlandırılırlar ve sınıflandırılırlar. Aynı fonksiyonu gösteren fakat farklı kaynaklardan (mikroorganizma, hayvan, bitki) elde edilen enzimler genelde aynı ismi alırlar.
- Birbirinden farklı tipte birden çok reaksiyon adımını katalizleyen enzim adlandırılırken katalizlediği ilk reaksiyon adımı esas alınır.

Yukarıda belirtildiği gibi her enzimin bir sistematik adı ve dört kısımdan oluşan bir kod numarası (EC-Nr) vardır. Enzimlerin sistematik isimlendirilmesinde genel olarak şu sıra izlenir (Telefoncu, 1986):

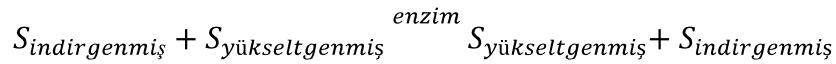
Dönüşüme uğratılan substratın adı + katalizlenen reaksiyonun tipi + az eki

2.5.2. Sınıflandırma

Enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana grupta toplanmıştır.

2.5.2.1. Oksiredüktazlar

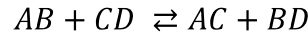
Bu tür enzimler, iki substrat arasındaki yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarını kataliz ederler. Bunlar bir vericinin elektronlarını bir alıcıya aktaran enzimlerdir (hidroksilazlar, dehidrojenazlar, sitokromlar, v.b.). Bu tür reaksiyonların genel denklemi aşağıdaki gibidir.



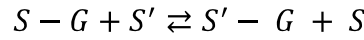
Genel denklemden de görüldüğü gibi, bu tür reaksiyonların oluşabilmesi için substrattan elektron alabilecek özelliği taşıyan bir ikinci maddeye gereksinim duyulmaktadır. Aerobik hücrelerde ikinci substrat olarak oksijen molekülü kullanılabilmektedir. Birçok bitki, bazı fenol türevlerini polifenol oksidaz enzimlerinin etkisi ile yükseltgerler. Bu sırada elektron alıcılığı görevini havadaki oksijen yapar. Bu tür reaksiyonların, çay endüstrisinde fermantasyon sırasında renk, koku ve tat ayarlama açısından büyük önemi vardır.

2.5.2.2. Transferazlar

Donör (verici) üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substart molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Örnekler: Formil-transferazlar, transketolazlar, asetiltransferazlar, glikoziltransferazlar, amino-transferazlar (transaminazlar), fosfotransferazlar (kinazlar), CoA-transferazlar v.b. Bunlara ilişkin reaksiyonun genel denklemi aşağıdaki gibi gösterilebilir.



veya



2.5.2.3. Hidrolazlar

Hidroliz tepkimelerini, yani bir molekül su bağlanması ile bir bağ kopması tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Genel olarak bu tür enzimler ester, eter, peptid, glikozil, asit anhidrit, C-C, C-halojen veya P-N bağlarını parçalarlar. Hidrolizlenen bağın cinsine göre esterazlar, lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar mevcuttur.

2.5.2.4. Liyazlar

Bir alt tepkenden hareketle ve çift bağ oluşumu yoluyla, bir grubun yer değiştirmesini katalizleyen enzimlerdir. Bu gruptaki enzimler, hidroliz dışındaki mekanizmalarla substratlardan bazı grupların çıkışını sağlayan türdendir. Ketonik asit dekarboksilazlar, aminoasit dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar v.b. gibi örnekler verilebilir.

2.5.2.5. İzomerazlar

İzomerazlar, moleküller arası yeniden düzenlemeleri katalizleyen enzimlerdir. Moleküldeki karbon atomlarının yerini değiştiren ya da çeşitli grupları bir karbon atomundan ötekine kaydıran, başka bir deyimle izomerleşmeyi sağlayan enzimler bu gruba

girerler. Glukoz-izomeraz, intramoleküler liyazlar, intramoleküler transferazlar, mütezlar bu gruba dâhil olan enzimlerdir.

2.5.2.6. Ligazlar

ATP' nin AMP ve PP' ye parçalanmasından açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü birbirine bağlayan enzimlerdir. Böylece oluşan bağın cinsine göre, amino-asil-tRNA sentetaz, asetil CoA sentetaz, piruvat karboksilazlar ayırt edilir (Telefoncu, 1986).

2.6. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimlerin katalitik etkinliği 'aktiviteleri' ile tanımlanmaktadır. İki türlü aktivite tanımı yapılmaktadır. Enzim aktivitesi;

1. Birim zamanda bir mol aktif enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı (turnover sayısı) veya
2. Dakikada bir mikromol substratı ürüne dönüştüren miligram enzim miktarı (enzim ünitesi) olarak tanımlanmaktadır.

Molekül içi kuvvetler arasındaki denge, enzimlerin (proteinlerin) bütünlüğü ve kararlılığı açısından çok önemlidir. Çevredeki herhangi bir değişiklik enzimin yapısındaki ve kararlılığındaki dengeyi tayin eder. Bir başka deyişle kararlı veya denatüre (bozunmuş) olmasını sağlar. Doğal enzimler sadece kendi çevrelerinde kararlıdır. Denatürasyon veya inaktivasyon koşullarında enzimlerin yapıları değişir ve bunun sonunda enzimler inaktif hale gelirler. Çevre etkili denatürasyon değişik fiziksel, kimyasal, biyolojik bozucu bileşiklerin etkisiyle meydana gelir (Bulut, 2007).

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını etkileyen faktörler arasında, pH, sıcaklık, ışık ve diğer fiziksel faktörler, enzim ve substrat konsantrasyonu, zaman, reaksiyon ürünleri ile ortamda çeşitli iyonların varlığı, hormonların ve diğer biyokimyasal faktörlerin etkisi sayılabilir.

2.6.1. pH

İnkübasyon ortamının pH' ı protein molekülünün tamamının yük ve ayrışma durumu yanında aktif merkezi de etkilemektedir.

pH etkisi özellikle aşağıdaki sonuçlara neden olmaktadır:

- Enzim proteinin tersinmez şekilde bozunması (aşırı pH değişiminde),
- Optimum pH bölgesi dışında koenzim veya prostetik grupların aktif merkezden ayrılması,
- Substratın iyonlaşma ve ayrışmasında değişimler,
- Enzim proteinin belirli fonksiyonel gruplarının iyonizasyonunda gözlenen değişimler.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH' a optimum pH adı verilir. Bu değerden yüksek ya da düşük pH' larda enzimlerin etken grupları değişime uğrayarak veya kendileri belirli ölçülerde bozunarak etkisiz hale geçerler. H^+ iyonu konsantrasyonundaki değişim özellikle aktif merkezinde asidik veya bazik gruplar taşıyan enzimler ve hidralazlar için çok etkindir ve enzimin aktivite gösterdiği pH skalası oldukça dardır. Kullanılan tampon çözelti de optimum pH' da kaymalara neden olabilir. İzole edilip saflaştırılmış bir enzimin laboratuvar koşullarında ölçülen optimum pH değerinin canlı hücredeki doğal ortamında optimum etki gösterdiği pH değeri ile çakışması beklenmemelidir. Optimum pH bazı durumlarda substrata bağımlılık gösterir. Örneğin; pektinaz enzimi pektik aside karşı pH 5.0' de, trigalakturonik aside karşı ise pH 3.5' da optimum aktivite göstermektedir. Özellikle bitkisel proteazların optimum pH değerleri substata çok bağımlıdır. Kazein, jelatin ve elastine karşı fisinin optimum pH değerleri sırasıyla 3.5, 7.5 ve 5.5' dir (Telefoncu, 1986).

2.6.2. Sıcaklık

Tüm kimyasal reaksiyonlar gibi enzim katalizli reaksiyonlarda sıcaklığa bağımlıdır ve reaksiyon hızı sıcaklıkla artar. Ancak, sıcaklığın kimyasal reaksiyonları ve enzim katalizli reaksiyonları etkilemesi büyük farklılıklar gösterir.

Sıcaklığın her 10 °C artışı klasik bir reaksiyonun hızını bir kat artırırken enzimatik reaksiyonun hızını 1.2-4 kat artırmaktadır. Fakat bu artış sürekli olmayıp özellikle +40 °C' nin üzerinde inkübasyon zamanına bağımlı olarak önce bir duraklama daha sonra da gerileme şeklinde kendini göstermektedir. Bilindiği gibi ana yapı olarak protein olan enzimler sıcaklıkla bozunmaya uğramaktadırlar. Proteinin üç boyutlu yapısını oluşturan sekonder bağların çözülmesi (denatürasyon) enzimatik aktivitenin azalmasına ve giderek

kaybolması sonucunu doğurmaktadır. Sıcaklıktan kaynaklanan aktivite kaybı +30 °C' de (özellikle uzun süreli inkübasyonlarda) de kendini göstermektedir. Belirli çalışma koşullarında değişik sıcaklıklarda enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık adı verilir. Fakat yukarıda da belirtildiği gibi optimum sıcaklık inkübasyon süresine çok bağımlıdır. Örneğin; inkübasyon süresinin 30 dakikadan 60 dakikaya çıkarılması optimum sıcaklığın 10 °C düşmesine neden olur. Hayvansal enzimler için optimum sıcaklık vucüt sıcaklığı dolaylarında iken, bitkisel enzimlerde 60-70 °C arasındadır. Mikrobiyal enzimler durumunda ise mikroorganizmanın büyüme ortamına bağımlı olarak doğal sıcak kaynaklara adaptasyon söz konusudur, hatta optimum sıcaklık suyun kaynama noktası civarında bile olabilir (Telefoncu, 1986).

2.6.3. Substrat Konsantrasyonu

Enzimli tepkimelerde substrat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi de artar. Fakat birçok durumda substrat konsantrasyonunun aşırısında enzim aktivitesinin düştüğü gözlenir. Buradan, substratın fazlasının enzimi inhibe ettiği anlaşılmaktadır. Belirli bir miktardaki enzimin reaksiyon hızı başlangıçta substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Başlangıçta bu ilişki lineer olarak devam ederken daha sonra hiperbolik bir şekil almaktadır. Bu durum reaksiyon kinetiğinin iki fazlı olduğunu göstermektedir. Başlangıç fazında reaksiyon lineer bir şekilde ilerlemekte ve reaksiyon hızı substrat konsantrasyonunun artışına paralel olarak artmaktadır. Enzim reaksiyonu bu durumda sıfırıncı dereceden bir kinetik göstermektedir. Hız substrat konsantrasyonunun artması ile bir maksimuma yaklaşmıştır. Enzim, substratı ile ES kompleksi oluşturmuşsa çalışıyor kabul edilmektedir. Enzim serbest kaldığı zaman, enzimin tekrar bir substrat molekülü ile birleşmesi için bir süre geçmektedir. Bu zaman esnasında enzim molekülü serbesttir. Substrat konsantrasyonu arttıkça serbest enzim daha sık çarpışacak ve substratla daha sık birleşecektir. Reaksiyon hızı substrat konsantrasyonunun artması ile gittikçe artacaktır. Bir süre sonra enzim substrata karşı doygun hale gelecek ve reaksiyon hızını arttırmak mümkün olmayacaktır (Atasağungil, 1965; Bingöl, 1978).

2.6.4. Enzim Konsantrasyonu

Enzim tarafından katalize olunan bir reaksiyonun başlangıç hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bunun nedeni de her enzim molekülünün diğerlerinden bağımsız olarak çalışmasıdır. Bu nedenle de ne kadar çok enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, reaksiyon da o kadar hızlı olacaktır (Erşan, 2011).

2.6.5. Zaman

Enzim reaksiyonlarının başlangıç hızları genellikle çok hızlıdır ve reaksiyon ilerledikçe hız azalır. Reaksiyon hızının azalmasının en önemli nedenleri, substratın tükenmesi ve oluşan son ürünlerle reaksiyonun engellenmesidir. Birçok enzim kullanımları için, reaksiyonun tamamlanması gerekli olmayabilir hatta istenmeyebilir. Örneğin α -amilaz ile yoğun nişasta macununun sıvılaşması ve yapışkanlığının azalması için birkaç dakika yeterlidir. Bununla birlikte reaksiyonun tamamlanmasının istendiği durumlarda enzim reaksiyonlarının tamamlanması için birkaç saat hatta günler gerekebilir (Miller ve Litsky, 1976).

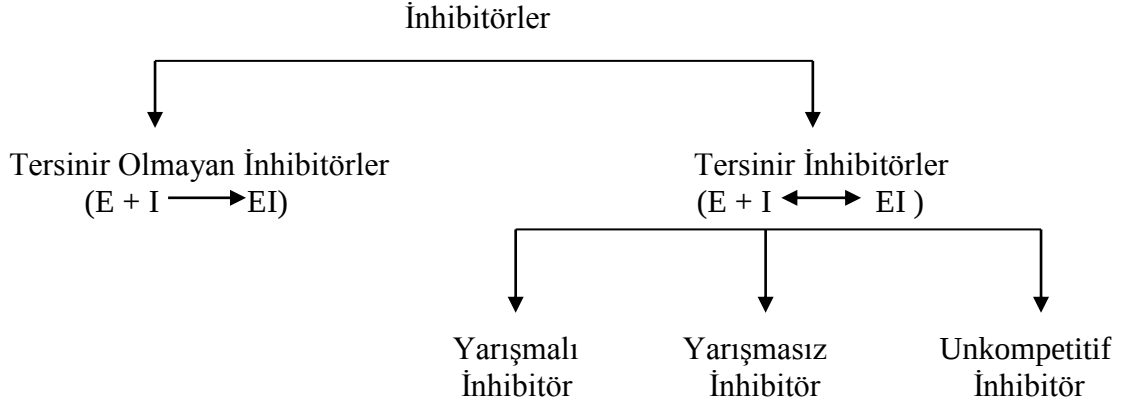
2.6.6. Radyasyon

Foto-oksidasyon, proteinler molekülündeki sistein, triptofan, histidin gibi grupların fotokimyasal reaksiyona girmesini sağlar. Bu tepkimeler sonucunda enzim, aktivitesini kaybeder. Bu tip enzimler ışıktan korunmalıdır.

2.6.7. Aktivatörler ve İnhibitörler

Bazı enzimler aktivitelerini artırmak için aktivatör adı verilen iyonlar veya küçük moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Aktivatörler genellikle metal iyonlarıdır. Aktivatörlerin bir kısmı yalnızca substratla, diğer kısmı ise enzimle birleşerek aktivatör rolü oynamaktadır.

Enzimatik reaksiyonun hızını azaltan maddelere inhibitör adı verilir. İnhibitörleri Şekil 2.2.' de belirtilen biçimde sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 2.2. İnhibitörlerin sınıflandırılması

Tersinir olmayan inhibitörler, ya aktif merkeze doğrudan bağlanarak veya enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek aktif merkezi tamamen bozarlar.

Tersinir inhibitörler ile enzimler arasında bir denge reaksiyonu oluşur. EI- kompleksinin ayrışma sabiti (K_i) aynı zamanda inhibitör sabitidir ve enzimin inhibitöre ilgisinin bir ölçüsüdür. Tersinir inhibitörleri daha önce de belirtildiği gibi üç grupta toplamak mümkündür.

Yarışmalı (kompetitif) İnhibitörler, enzim molekülü ile kompleks oluşturmak için substrat veya koenzim ile yarışma halindedir. İnhibitör genellikle substrat molekülüne yapısal olarak çok benzer. Bu tür inhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonunu artırarak azaltılabilir hatta tamamen ortadan kaldırılabilir ve K_m değeri artarken V_m sabit kalır.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibitörlerin neden olduğu inhibisyonun etkinliği substrat konsantrasyonuna bağımlı değildir. Bu özellikten, bir enzimatik proste reaksiyonun istenen zamanda durdurulmasında yararlanır. Böyle bir inhibisyonun temel özelliği K_m değerinin değişmemesi ve V_m ' nin düşmesidir.

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibitörler, yalnız ES ara kompleksi ile reaksiyon verir ve böylece ürün oluşumunu engellerler. Bu tür inhibisyon ancak bir substratlı enzimlerde görülür ve hem K_m hem de V_m değerleri düşer.

Endüstriyel uygulama alanı bulmuş enzimlerin büyük çoğunluğu hidralaz sınıfı enzimler olup tek substratlıdır. Diğer reaksiyon ortağı olan suyun konsantrasyonu pratikçe değişmediğinden dikkate alınmaz.

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin bu reaksiyonları katalizleyen enzimleri inhibe etmeleri durumu ile sık karşılaşılmasına (ürün inhibisyonu) rağmen substrat inhibisyonu daha enderdir.

Canlı veya cansız ortamda oluşan enzimatik reaksiyonların inhibisyonunun incelenmesi bize çok önemli bilgiler sağlamaktadır. Enzimlere doğrudan etkiyen zehirlerin (veya panzehirlerin) etki şekilleri ve söz konusu enzimlerin metabolizmadaki önemleri bu sayede aydınlatılabilmektedir (Telefoncu, 1986).

2.7. Enzimatik Aktivitenin Kontrolü

Bir enzimin aktivitesi yalnız fiziksel etkenlerden değil aynı zamanda kimyasal etkenlerden de etkilenmektedir. Bu etki olumlu (aktivasyon) veya olumsuz (inhibisyon) yönde gelişebilir. Uyumlu bir metabolizma için metabolik reaksiyon dizisinin her reaksiyonunun kontrol altında tutulması zorunludur. Evrimleşme sürecinde dışarıdan bilerek (ilaçlar) ve istemeyerek (zehirler) alınan maddelerin metabolizmayı etkiledikleri de bir gerçektir. Bazı enzimlerin katalitik aktivitesi allosterik efektörlerin tersinir biçimde bağlanmasına dayanır (modulatörler, regülatörler). Bu efektörler enzimin aktif merkezine değil enzim üzerindeki allosterik merkeze bağlanırlar ve proteinin üç boyutlu yapısını değiştirerek aktiviteyi etkilerler (allosterik aktivatörler, allosterik inhibitörler). Enzimatik reaksiyon dizisinin düzenlenmesinde hücre bu prensipten yararlanmaktadır. Örneğin; bir reaksiyon dizisinin son ürünü dizinin ilk reaksiyonunu katalizleyen enzim için belirli bir konsantrasyondan sonra inhibitör etkisi göstermektedir ki buna geri besleme inhibisyonu (feed-back inhibition) adı verilir. Enzim aktivitesinin kontrolü için diğer bir olanak hücredeki enzim miktarının düzenlenmesidir. Bu, indüksiyon ve represyon yardımıyla enzim biyosentezinin kontrolü ile veya proteolitik enzimlerin etkisi ile sağlanır (enzim aktivitesinin biyojen regülasyonu). Birçok enzim hücre tarafından zimogen halde salgılanmakta ve bir proteazın etkisiyle aktif forma dönüşmektedir. Enzimlerin termal kararlılığı düşük olduğundan aktivitelerini uzun süre korumaları mümkün değildir. Bu nedenle sürekli sentezlenmeleri gerekir. Enzimatik aktivitenin kontrol altında tutulmasının bir yolu da biyosentezin kontrolüdür (Telefoncu, 1986).

3. MİKROBİYAL ENZİM ÜRETİMİ

3.1. Genel

Enzimler, yaşayan her hücrede oluşmakta, her organizma çok sayıda enzim üretmektedir. Ticari enzimler, mayalar, bakteriler ve mantarlardan üretilmektedir. Enzimlerin salt ve göreceli miktarları, türler arasında ve aynı türün suşları arasında farklılık göstermektedir. Bundan dolayı, spesifik enzimlerin ticari üretiminde, istenen enzimi en yüksek miktarlarda üretecek kapasiteye sahip olan türü seçmek gerekir (Underkofler vd., 1958).

Enzim üretimi, biyoteknolojinin büyüyen bir alanıdır. Yıllık dünya satış grafikleri, artan patent sayıları ve bu alandaki araştırma makaleleri ile beraber bir milyar dolara yaklaştığını göstermiştir (Viniğra-Gonzalez vd., 2003). 2009 yılında ise dünya enzim piyasası 5.1 milyar dolara erişmiştir (Sanchez ve Demain, 2011). Enzimlerin ticari üretiminde kaynak olarak sık sık mikrobiyal hücreler kullanılmaktadır. Mikroorganizma kullanımının avantajları aşağıda sıralanmıştır.

- Mikroorganizma izolasyonu kolaydır ve saf kültürlerde korunurlar,
- Üretimde ucuz ham maddeler kullanılır (endüstriyel atıklarda büyüyebilir ve ticari olarak önemli ürünler elde edilebilir),
- Hızlı ve eksponansiyel büyüme, prosesi ekonomik yapar,
- Besiyerinden hücre dışı ürünlerin izolasyonu oldukça kolaydır. Hücre içi enzimlerde ise hücrenin parçalanması için tek adımlı bir proses yeterlidir. Farklı santrifüjleme ya da fraksiyonel izolasyon gerekli değildir,
- Ekstrem şartlardaki mikroorganizmalar ekstrem şartları tolere edebilen enzimlere sahiptir.

Son birkaç yıl içinde 1000' den fazla enzim gıda endüstrisi, biyoteknoloji, immunoloji, ilaç ve benzeri endüstriyel proseslerde düzenli olarak kullanılmaktadır. Bu, aslında ticari olarak işletilebilir enzimleri üretebilen mikroorganizmaların manipulasyonu ve kimliklendirilmesini gerektirmektedir (Kulkarni ve Deshpande, 2007).

3.1.1. Tür Seçimi

Tercih edilen türün seçimi, büyüme ve kültürel özelliklere ve endüstriyel proseslerde kullanılacak optimum şartlara bağlıdır. Yani, eğer bir enzim 45 derece civarı bir sıcaklıkta kullanılacaksa, bu sıcaklık civarında büyüyen organizma, proses için uygun olacak enzimleri içerdiğinde genelde kabul edilebilir. Bir türün bir enzim üretme yeteneğinde olup olmadığı öncelikle normal büyüme şartları altında ya da habitatda substratı kullanabilme yeteneğine bağlıdır. Türlerin izolasyonu için; kültür ortamının zenginleştirilmesi, seçici ortam kullanılması ve çalışmacıların yapıcı tasarımları benzeri geleneksel mikrobiyal teknikler kullanılmaktadır. Biyolojik olarak tehlikeli türlerin toksin üretmeleri nedeniyle ticari olarak kullanımlarından önce karakterizasyonları ve kimliklendirilmeleri gereklidir (Kulkarni ve Deshpande, 2007).

3.1.2. Türün Geliştirilmesi

Ticari olarak önemli bir tür aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- Pahalı olmayan bir ortamda üretilmeli,
- Sabit ve yüksek bir enzim verimi olmalı,
- İstenmeyen ve tehlikeli metabolitler üretmemeli,
- Enzimin geri kazanımı basit olmalı,
- Proses biyolojik olarak tehlikeli maddeler üretmemeli,
- Proses çıktıları çevresel açıdan dost olmalıdır.

Bu sadece tür özelliklerinin ve proses parametrelerinin optimizasyonu ile sağlanabilir (Kulkarni ve Deshpande, 2007). Günümüzde seleksiyon ve mutasyon gibi teknikler yanında, genetik mühendisliği teknikleri ile verim ve seçimliliği yüksek mikroorganizma geliştirilebildiği gibi, protein/enzim mühendisliği teknikleriyle kararlılığı ve aktivitesi yüksek, istenen ortamda ve istenen koşullarda tepkimeleri katalizleyebilen enzimlerin geliştirilmesi araştırma geliştirme ile artık mümkündür (Bulut, 2007).

3.1.3. Fermantasyon Ortamının Optimizasyonu

Yaklaşık olarak 50 yılın aşkın bir süredir geleneksel fermantasyon proseslerinin çoğu derin kültürde yapılmaktadır. Proses kontrolündeki ilerlemeler, elle müdahalenin ve enfeksiyon riskinin azalması derin fermantasyon tekniklerinin kullanımı ile başarılmıştır. Prosesi etkileyen çeşitli faktörler aşağıda verilmiştir.

- a) Aşının hazırlanması: Spesifik enzimlerin üretiminde mutant türler kullanılabildiğinden fermantasyon tankında aşı kültürünün üretilmesi sırasında kararlılığı birincil öneme sahiptir. En iyi metot, yeterince aşığı temin edecek tek bir üretme tankına tohumları aşılama olacaktır. Aşı tankındaki ortam gerçek fermantasyon ortamına benzer.
- b) Üretim ortamının formülasyonu ve hazırlanması (Kulkarni ve Deshpande, 2007).

3.2. Fermantasyon Proseslerinde Nutrient İhtiyaçları

Endüstriyel fermantasyon proseslerinde kullanılan mikroorganizmaların besin ihtiyaçları komplekstir ve mikroorganizmadan mikroorganizmaya değişmektedir. Biyodönüşüm ortamında mikroorganizmanın çoğalması, istenilen ürünü sentezlemesi ve diğer işlevlerini gerçekleştirebilmesi için ortamda gerekli maddeler bulunmalıdır. Bir enerji kaynağının dışında organizmalar hücre maddesinin ve hücre işletimindeki ürünlerin biyosentezi, bakımı ve yeniden üretimi için çeşitli maddelere ihtiyaç duyarlar. Bu maddeler gerekli tüm elementleri içermelidir. Bazı organizmalar basit formdaki bileşikleri kullanırken bazıları daha kompleks bileşiklere ihtiyaç duyarlar. Polimerik hücre bileşenlerinin dört önemli tipi yağlar, polisakkaritler (nişasta, selüloz), polideoksiribonükleik ve poliribonükleik asitler (DNA ve RNA) ve proteinlerdir. Yağlar genelde suda çözünmez ve sulu olmayan biyolojik fazlarda özellikle plazma ve organel membranlarında bulunabilir. Yağlar; lipoproteinler ve liposakkaritler gibi daha kompleks moleküllerin parçalarını da oluştururlar, biyolojik yakıt deposu olarak iş görürler.

Birçok durumda doğal ya da kompleks ortam, inorganik nütrientlerle de desteklenmektedir. Ortam formülasyonunda amaç bazı nütrientlerce zengin ve diğerlerince fakir bileşikleri karıştırmaktır. Fermantasyon nütrientleri genel olarak karbon, azot ve kükürt, mineral ve vitamin kaynakları olarak sınıflandırılır. Biyoproseslerde, mikroorganizmalar için gerekli ortamları oluşturan ana maddeler ve bunların özellikleri aşağıdaki temel gruplara ayrılmıştır (Kampen, 1997).

3.2.1. Karbon Kaynağı

Biyokütlenin kuru ağırlığının % 50' si karbondur. Karbon kaynakları enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Bu sebeple karbonun çoğu enerji oluşturan metabolizma yollarına girer ve sonunda CO₂' e dönüştürülür. Birçok mikroorganizma enerji ve karbon ihtiyaçlarının temini için tek organik kaynağı kullanabilir. Bazı mikroorganizmalar ise ilave birçok organik bileşiğe ihtiyaç duyar. Bu ilave organik maddeler büyüme faktörleri olarak adlandırılır ve mikroorganizmanın sentezleyemediği organik hücre bileşenlerinin öncülleri olarak işlev görürler.

Karbonhidratlar mükemmel karbon, oksijen, hidrojen ve metabolik enerji kaynaklarıdır. Diğer besin maddelerinden daha yüksek konsantrasyonlarda ortamda mevcuttur ve genelde % 0.2 ve 25 oranında kullanılır. Katabolizma sırasında glikoz; karbondioksit, su ve enerjiye dönüşür. Enzimler kompleksten basit şekerlere dönüşümü katalizler.

Katabolik baskılama, geçici baskılama ve katabolit inhibisyon birçok karbonhidratın kullanılmasını düzenler. Katabolit baskılama glikozun ve kolay metabolize olan karbon kaynakların varlığında belirli enzimlerin sentez hızında bir azalmadır (Kampen, 1997). Nişasta, glikoz, sukroz ve melas gibi karbon kaynakları enzim, antibiyotik ve ikincil metabolitlerin fermentasyonla üretiminde büyüme substratı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, kullanılan karbonun negatif etkisinden dolayı üretim sınırlıdır. Bu düzenleyici mekanizma karbon katabolit düzenleme olarak adlandırılmıştır. Fermentasyon ortamında birden fazla karbon kaynağı mevcut olduğu zaman karbon kaynaklarının düzenli ve ardışık bir şekilde kullanımını öncelikle sağlanmaktadır. Bu şartlar altında, hücre ortamda mevcut olan en iyi karbon kaynağını (büyüme için karbon ve enerjiyi en hızlı bir şekilde temin eden) katabolize eder. Eş zamanlı olarak, birincil substrat tükenene kadar diğer substratın kullanıldığı enzim sentezi baskılanır (Sanchez ve Demain, 2002). Bazı karbon ve enerji kaynaklarının fazlası inhibitör ya da katabolik geriletici etkisi göstererek ürün oluşumunu yavaşlatabilir. Bu tür etkilerin, karbon kaynaklarının uygun olarak seçilmesinde göz önüne alınması ve besi ortamına konulacak karbon kaynağının en iyi biçimde kullanılma koşullarının saptanması gerekir (Pekin, 1980). Glikoz içeren ortamda durgun faz sırasında bu baskılamaya ilaveten, hücreler çok yüksek seviyede glikoza maruz kaldıktan sonrada çok etkili bir baskılama periyodu meydana gelebilir. Bu etki bir sonraki jenerasyona kadar ya da glikoz seviyesi daha makul seviyeye inene kadar sürebilir. Bu geçici baskılamadır. Katabolit inhibisyon, biyosentetik yollarda geri besleme inhibisyonla

beraber, enzim oluşumundansa enzim aktivitesinde glikoz tarafından kullanılan bir kontroldür. Diğer karbonhidratların kullanımı ile alakalı enzimler glikozla inhibe olabilir (Kampen, 1997).

3.2.2. Azot ve Kükürt Kaynağı

Karbon kaynağını takiben fermantasyon ortamında en bol bulunan madde genelde azot kaynağıdır. Birkaç mikroorganizma enerji kaynağı olarak azotu kullanabilir. Azot ve kükürt hücrenin organik bileşimini özellikle indirgenmiş halde sırasıyla amino ve sülfhidril gruplarını oluşturur. Birçok fotosentetik organizmalar bu iki elementi oksitlenmiş inorganik halde nitratlar ve sülfatlar şeklinde asimile ederler. Birçok fotosentetik olmayan bakteri ve mantarlar da azot ve kükürt ihtiyaçlarını nitratlar ve sülfatlardan karşılayabilir. Bazı mikroorganizmalar bu anyonlardan biri ya da ikisini indirgeyemezler. İndirgenmiş haldeki elementlerden temin etmek zorundadırlar. Bu durumda, azot; amonyak tuzlarından ve kükürt; sülfid ya da sülfhidril grubu içeren sistin gibi organik bir bileşikten temin edilebilir. Amino asitler ve peptonlar karbon ve enerji kaynağı olduğu kadar azot ve kükürt kaynağı olarak da kullanılır. Çeşitli prokaryotik gruplar, N_2 gibi daha bol doğal azot kaynağını kullanabilir. N_2 ' in amonyağa dönüştürüldüğü azot asimilasyon prosesi azot fiksasyonu olarak da ifade edilir. Azot amino asit, pürinler, DNA ve RNA gibi azot içeren hücresel maddelerin anabolik sentezi için kullanılır. Sentetik ortamda organik azot kaynakları spesifik amino asitler, pürinler, pürimidinler ve üredir (Kampen, 1997). Fermantasyon teknolojilerinde azot kaynağı olarak çoğunlukla amonyak ve amonyum sülfattan yararlanılır. Saf organik azot bileşikleri oldukça pahalıdır. Bunlar arasında en ucuzları soya fasülyesi, balık unu, maya suyu, süt ve peynir atık suları, kazein, mısır unu özütü ve benzeri kompleks azot kaynakları sayılabilir (Pekin, 1980).

3.2.3. Eser Elementler

Demir (Fe^{+2} ve Fe^{+3}), çinko (Zn^{+2}), mangan (Mn^{+2}), molibden (Mo^{+2}), kobalt (Co^{+2}), bakır (Cu^{+2}) ve kalsiyum (Ca^{+2}) gerekli olan iz elementlerdir. İhtiyaçlar çok düşük seviyededir ve bazen suda bulunan miktardan dahi temin edilebilir. İz elementler hem

birincil hem de ikincil metabolit üretimine iştirak edebilir. Mangan enzim üretimini etkileyebilir. Demir ve çinkonun antibiyotik üretimini etkilediği bulunmuştur. Birincil metabolit üretimi genelde iz element konsantrasyonuna çok duyarlı değildir, ancak ikincil metabolit üretiminde bu farklıdır. Mineraller, kùltivasyon sırasında hücrelere gerekli elementleri temin eder. Fosfor inorganik halde kullanılır. Fosfor atomunun değeriği değışmez ve bir fosfat grubunun kısmı olarak kalır. Hücre öldüğünde hidrolizle inorganik fosfor olarak tekrar serbest kalır. Bu elementlerin birçoğu enzimlerle örneğin; Mg^{+2} fosfojidalaz ve fosfotransferaz ile, K^{+} pürivar fosfokinaz ile kompleksleşmiş olarak bulunur (Kampen, 1997).

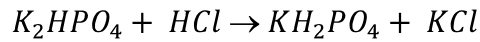
3.2.4. Vitamin Kaynakları ve Diğer Büyüme Faktörleri

Vitaminler, biyosentezde spesifik katalitik ihtiyaçları yerine getiren büyüme faktörleridir ve sadece az miktarlarda gereklidir. Birçok reaksiyonu katalizleyen koenzimlerin parçalarıdır ya da koenzim olarak fonksiyon gören organik bileşiklerdir. Büyük miktarlarda gerekli olan vitaminler; niasin, pantothenate, riboflavin, daha az miktarlarda ihtiyaç duyulan vitaminler ise folik türevleri, biotin, vitamin B12 ve lipoik asittir. En sık olarak ihtiyaç duyulan vitaminler tiamin ve biotindir. Endüstriyel fermentasyonlarda doğru vitamin dengesi kompleks maddelerin uygun karışımıyla başarılabilir. Eğer gerekli ise saf vitaminler de ilave edilebilir. Organik büyüme faktörleri; vitaminler, aminoasitler, pürinler ve pürimidinlerdir (Kampen, 1997).

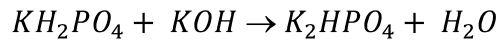
Hücrelerin % 80 ya da daha fazlası sudur ve kantitatif ifade ile bu gerekli bir maddedir. Su hücre içinde bir çözücüdür. Birçok fermentasyonda, mikroorganizmalar hücre içinden daha yüksek su konsantrasyonlarındaki çevrelerde bulunur. Hücre duvarları suyu serbestçe geçirir. Su iç ve dış su konsantrasyonu dengelenene kadar hücreye dolar. Oksijen, sudan temin edilir. Bazı organizmalar, aerobik solunum sırasında moleküler oksijene ihtiyaç duyar. Bunlar, zorunlu aerobiklerdir. Zorunlu anaerobikler için moleküler oksijen toksik maddedir. Bazı organizmalar, fakültatif anaerobiktir ve O_2 ya da O_2 'siz ortamlarda büyüyebilir. Sodyum ve klor iyonları bitki ve hayvanlarda birincil hücre dışı katyon ve anyonlardır. Potasyum hücre içi bir katyondur. Mineral kombinasyonları, hücre içinin elektrolit ve osmotik özelliklerinin düzenlenmesinde önemlidir. Çoğu durumda, kompleks endüstriyel karbon ve/ya da azot kaynakları fermentasyon için gerekli mineralleri temin eder (Kampen, 1997).

3.2.5. Fiziksel ve İyonik İhtiyaçlar

Hücre içinde meydana gelen her bir reaksiyon kendine özgü optimum şartlara sahiptir. Örneğin, verilen bir ortam büyümenin başlangıcı için uygun olabilir. Ancak, mikroorganizmanın büyüme ve metabolizmasıyla alakalı kimyasal değişimler sonucunda bakterinin gelişimi değişebilir. Glikoz içeren ortamlarda fermantasyon sonucu oluşan organik asitler büyümeyi inhibe edebilir. Buna karşın, bir ortamın anyonik bileşenlerinin mikrobiyal ayrışması ya da kullanılması sonucu daha alkali ortam oluşur. Aminoasitlerin ve proteinlerin ayrışması sonucu oluşan amonyak alkali bir ortam oluşturur. Hidrojen iyonu konsantrasyonundaki aşırı değişimleri önlemek için, tamponlar ya da karbonatlar ortama ilave edilebilir. Mono hidrojen ve dihidrojen fosfat karışımlarından oluşan fosfat tamponlar başarılı olarak kullanılmaktadır. KH_2PO_4 zayıf asidik bir tuzken, K_2HPO_4 zayıf bazıktır. İkisinin eşit molar bir çözeltisi nötrale yakındır (pH 6.8). Eğer sınırlı bir miktarda kuvvetli bir asit böyle bir çözeltiye ilave edilirse, bazik tuzun bir kısmı zayıf asidik olana dönüştürülür:



Eğer kuvvetli bir baz ilave edilirse, ters dönüşüm oluşur:



Böylece, ortam asit ya da alkali ürettiği zaman, çözelti bir tampon olarak hareket edecektir. Asidik ya da bazik fosfatların farklı oranları yaklaşık olarak 6.0-7.6 aralığında pH değerleri elde etmek için kullanılabilir. İyi bir tamponlama sadece 6.4-7.2 aralığında elde edilebilir. Çünkü bir tampon çözeltinin kapasitesi onun asidik ya da bazik bileşenlerinin miktarlarıyla sınırlıdır. Ortamda fazla asit üretildiği zaman, istenen pH' ı korumak için kullanılmış olan fosfat tamponu miktarı yetersiz olur. Böyle durumlarda, karbonat tamponlar ortamı nötralleştirmek için ilave edilebilir. Ortama toz halinde $CaCO_3$ ilavesiyle oluşan bikarbonat iyonları, hidrojen iyonlarıyla reaksiyona girecek, karbonik asite dönüşecek, ardışık serbest tersinir reaksiyonlarla CO_2 ve H_2O ' ya ayrışacaktır. Sentetik ortam hazırlanmasında, ortam nispeten yüksek fosfat konsantrasyonlarına sahipse sterilizasyon sırasında çökmeler oluşur. Fosfatlar ve kalsiyum ya da demir katyonları arasında çözünmez komplekslerin oluşmasıyla çökme gerçekleşir. Bu durumda, ayrı olarak

sterillenmiş kalsiyum ve demir tuzları ortama sonradan ilave edilerek problem çözülebilir (Kampen, 1997).

3.3. Fermantasyon Yöntemleri

Fermantasyon proseslerinde, substratın ürünlere dönüşümü için mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Oldukça fazla çeşitte substrat, mikroorganizma ve ürün hesaba katılınca fermantasyon prosesleri çok çeşitli olur. Fermantasyonla üretilmiş birçok farklı çeşitte ki ürüne; ekmek, peynir, bira, kahve, tıbbi ve endüstriyel enzimler, amino asitler, antibiyotikler, soya sosu, kompost, biopolimerler, biyopolastikler, mikrobiyal yağlar, tadlandırıcılar, renklendiriciler ve aşılar örnek verilebilir. Fermantasyon, bir substratın istenilen mikroorganizma ile aşılınmasıyla başlatılır. Aşılınmış substratın, istenilen ürüne dönüşebilmesi için çevresel şartlar sağlanır. Saf ürün, doğrudan kullanılabilir ya da belirli moleküler maddeleri izole etmek gibi ek işlemler uygulanabilir.

Ticari enzim üretiminde kullanılan iki ana proses vardır. Bunlar derin kültür fermantasyonu ve katı hal fermantasyonlarıdır. Günümüzde derin kültür fermantasyonu çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemlerde prosesin kontrolü ve sterilizasyonu mühendislik açısından daha kolaydır. Dünya genelinde fermantasyon ile üretilen ürünlerin yaklaşık % 5' inin katı hal fermantasyonuyla üretildiği tahmin edilmektedir. Katı hal fermantasyonlarına peynir, ekmek, kahve ve kompost yapımı örnek verilebilir. Derin kültür fermantasyonları penisilin, rekombinant insülin, bira ve diğer ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Katı hal ve derin kültür fermantasyonlarının herbiri, oksijenin gerektiği aerobik proseslere ve oksijenin yokluğunda yürülmesi gereken anaerobik proseslere tekrar bölünebilir. Aerobik derin kültür fermantasyonlarına örnek olarak, *Penicillium chrysogenum* mantarı kullanılarak Penisilin üretimi verilebilir. Sucuk ve salam gibi fermente olmuş et ürünleri anaerobik katı hal fermantasyonları ile üretilmektedir. Derin kültür anaerobik fermantasyon yoğurt yapımında oluşmaktadır.

Fermantasyonda, sadece tek bir mikrobiyal tür (monoseptik) gerekli olabilir. Monoseptik fermantasyonlarda, aşılama yapılmadan önce, istenmeyen mikroorganizmaları uzaklaştırmak için substrat sterillenmelidir. Monoseptik fermantasyonlar ya da monokültürler insülin gibi birçok farmakolojik ürünleri üretmek için kullanılmaktadır. Birçok gıda fermantasyonları ve biyolojik atık arıtım proseslerinde, eşzamanlı ya da ardışık olarak hareket eden karışık mikrobiyal türler gereklidir (Chisti, 2010).

3.3.1. Derin Kùltür Fermantasyonu

Derin kùltür fermantasyonda (DKF); mikroorganizmalar ve substrat, büyük miktarlarda ve çözücü formunda mevcut olan sıvı ortamda batık haldedir. Bu yöntem, katı hal fermantasyonuna göre birçok avantaj sağlar. Bileşenler sıvı ortamda batık halde olduğundan ısı ve kütle aktarımları, prosesin modellenmesi, kontrolü ve ölçek büyütme daha kolaydır (Rao, 2010). Karbon ve azot kaynakları, vitaminler ve mineralleri içeren kùltür ortamı bileşenleri, pahalı olmayan maddelerden seçilir (Sabu vd., 2005). Yüksek su içeriğinden dolayı bakteriler için idealdir (URL 1).

Endüstride kullanılan birçok fermantör, derin kùltür tipindedir. Çünkü derin kùltür fermantörlerinin kontrol ve dizayn tekniğı daha kolaydır (Okafor, 2007). Derin kùltür fermantasyonları için kullanılan fermentörlerin önemli tipleri; karıştırıcılı tank fermentörü, kabarcık kolonları, hava köprülü (airlift) fermentörler, akışkan yataklı fermantörler ve damlatmalı filtrelerdir (Chisti, 2010). Endüstriyel fermantasyonlar; kesikli kùltür, yarı kesikli kùltür ve sürekli kùltürler olarak işletilmektedirler. Kesikli ve yarı kesikli işlemler daha yaygın olarak kullanılmakta iken sürekli fermantasyonlar nispeten daha az olarak kullanılmaktadır. Aktif çamur metoduyla atıksu arıtımı genelde sürekli fermantasyonla yürütölmektedir (Chisti, 2010). Kesikli kùltürde mikroorganizmalar, ortama sabit hacimde aşılır. Bununla birlikte substrat tarafından katabolit represyon meydana geldiğı zaman sınırlı karbon koşullarında çalışabilmek için alternatif olarak yarı kesikli fermantasyon kullanılabilir. Bu tür proseslerin esas özeliğı, maksimum üretim periyodunu uzatmak için ilave besin maddelerinin fermantasyon ortamına beslenmesidir. Yarı kesikli sistemlerde, yüksek subsratlı kesikli fermantasyona göre biyokütle üretimi azalmaktadır ve böylece kütle ve oksijen aktarım mekanizmaları kolaylaşmaktadır. Sürekli kùltürde ise sürekli olarak reaktöre steril taze besin maddesi gönderilirken aynı zamanda ortamdan eşit hacimde ürün çekilir. Bu yöntemle fermantasyon çok uzun süre kararlı halde çalıştırılır. Fermantörü terk eden biyokütle ile hücre büyümesi dengededir. Sürekli fermantasyon sisteminin en yaygın kullanılan tipi kemostattır. Besi ortamına mikroorganizma üremesi için gerekli olan temel besinlerden (üremeyi sınırlandıran) birinin fazlası, ötekilerin ise yeterli miktarları sürekli olarak gönderilerek giriş ve çıkış debileri ayarlanır. Bu koşullar altında kararlı halde kùltürün özgül üreme hızı (μ), seyrelme oranı yardımı ile belirlenir. Fermantördeki biyokütle konsantrasyonu besleme ortamındaki sınırlayıcı bileşenin konsantrasyonu ayarlanarak sürekli sabit tutulabilmektedir (Pekin, 1980). Sürekli kùltür,

klasik kesikli fermentasyon kültüründen daha yüksek verimlilik ve spesifik besinin sınırlandırılmasıyla baskılama mekanizmalarının etkilerini hafifletebilmesine rağmen, ticari enzim üretimi proseslerinde oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi dört başlık altında incelenebilir.

- Sürekli proseslerin uzun sürelerinden dolayı ürünlerin kontaminasyon riski vardır.
- Mutasyona uğrayan mikroorganizmaların sürekli üretim esnasında ilk yapılarına dönerek ürün kalitesini ve üretim hızını azaltabilir.
- Sürekli proseslerde çoğu hücre dışı enzim üretim verimi kesikli sistemlerden daha azdır. Sürekli sistemler daha karmaşık kontrol sistemleri ve teçhizat gerektirmesine rağmen toplam verimlilik daha fazla artırılmamaktadır.
- Ticari enzim üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan kompleks ortamda büyümeyi sınırlayan besinin yapısının kesin olarak belirlenebilmesindeki güçlüklerdir (Orhan, 2009).

Hücre dışı enzimler, genellikle ultrafiltrasyon ile hücre giderildikten sonra geri kazanılır. Gerekli olması halinde saflaştırma işlemi iyon değiştirme veya jel filtrasyon ile yapılır (Chisti, 2010; Tanyol, 2011).

3.3.2. Katı Hal Fermantasyonu

Katı hal fermentasyonu (KHF), serbest suyun yokluğunda (veya çok az) katı maddelerin fermentasyon prosesi olarak tanımlanır. KHF’ de, mikrobiyal büyüme için gerekli olan nem absorblanmış halde mevcuttur ya da katı matriks içinde komplekstir. Her ne kadar çoğu çalışmacı katı hal ya da katı substrat fermentasyonunu özellikle bir ya da aynı düşündüğü halde, Pandey ve diğerleri bu iki prosesi ayrı prosesler olarak kabul etmişlerdir (Pandey vd., 2000; Krishna, 2005).

Soya sosu koji ve diğer geleneksel fermente yiyeceklerin, glukonik ve sitrik asitlerin ve selüloz, amilaz, lipaz ve pektinazlar gibi fungal enzimlerin üretiminde, ticari olarak başarılı büyük ölçekli KHF prosesleri kullanılmaktadır. Ayrıca, mavi-damarlı peynirlerin üretiminde kullanılan fungal sporlar aşı olarak KHF ile üretilmektedir.

KHF prosesleri Asya ve Afrika ülkelerinde yaygın olarak kullanılmalarına karşın Batıda ve Avrupa ülkelerinde son yıllara kadar ihmal edilmiştir. Son yirmi yıldan fazla bir süredir KHF uygulamalarına ilgi artmaktadır. Katı hal fermentasyonlarının avantajlarını aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür (Mitchell vd., 1999; Krishna, 2005).

- Tarım ya da yiyecek işlemede oluşan katı atıkların fermente olmuş hayvan yemi olarak kullanımı için kalitesinin iyileştirilmesinde mikroorganizmalar bazen protein içeriğini zenginleştirmek ve bazen de atıklardaki toksik maddeleri parçalamak için kullanılmıştır.
- Çoğu mantar sıvı kültürde iyi sporlaşamadığından KHF fungal spor üretiminde daha başarılı olarak kullanılmaktadır. KHF’ de üretilmiş sporlar daha dayanıklıdır.
- Fungal rennetler, beta-glukanaz ve ksilanaz gibi enzimlerin üretimi, kâğıt üretimi, aroma ve tat bileşikler, antibiyotikler ve etanol gibi çeşitli ürünlerin üretiminde daha başarılı olarak kullanılmaktadır.
- Substrat olarak ham materyaller kullanılmaktadır.
- Az enerji kullanılır ve maliyeti azdır.
- Eğer ürünün ekstraksiyonu gerekli ise, daha az çözücü ihtiyacı vardır ve geri kazanım fiyatı DKF’ den daha azdır.
- Pahalı olmayan aşağı akışlı işletim uygulanır.
- Daha az su kullanımı ve daha az atık su çıkışı vardır.
- Daha yüksek hacimsel üretilebilirlik potansiyeli ve daha yüksek ürün konsantrasyonu vardır.
- Daha az fermentasyon boşluğu (hacimsel substrat yüklemesi KHF’ da daha yüksektir, çünkü kompakt bir fermentörde gerçekleşen KHF’ nin nem içeriği daha azdır) vardır.
- Kontaminasyon daha kolay kontrol edilir ve fermentasyon ortamı daha basittir.

Ancak KHF’ nun DKF’ nun yerini alacak kusursuz bir teknoloji olduğu düşünülemez. KHF bazı dezavantajlara da sahiptir. Bu dezavantajlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- KHF proseslerinde substrat heterojen olarak dağıldığından substrat yatağının karıştırılması ve substratın nem seviyesinin ve havalandırmanın kontrolü zordur.
- Mikrobiyal büyüme ve diğer fermentatif parametrelerin belirlenmesi güçtür.
- Düşük nem seviyesinde büyüeyebilen mikroorganizma tipi sınırlıdır.

Batı ülkelerinde, substrat olarak ucuz ve bol tarıma dayalı endüstriyel atıkların kullanma olanağı nedeniyle son yıllarda daha fazla dikkat toplamaktadır. Bu ülkeler, toprak kirliliği, biyoremediasyon ve alternatif hayvan yemleri gibi problemlere odaklanmıştır. Ekonomik analizler de, KHF teknolojisinin kapital sermaye ve toplam ürün fiyatını azalttığını ve faydayı artırdığına işaret etmiştir. Bu nedenle KHF çeşitli endüstriyel sektörler için ideal bir teknolojidir. Antibiyotik ve diğer ikincil metabolitler, endüstriyel enzimler,

zenginleştirilmiş besin maddeleri, biyoyakıt, organik asitler ve aromatik bileşiklerin üretimi KHF' nin yeni kullanım alanlarıdır (Krishna, 2005).

3.3.2.1. Katı Hal Fermantasyonunda Kullanılan Organizmalar

Fermantasyonda kullanılan en önemli mikroorganizma grupları; mantarlar ve bakterilerdir. Filamentli mantarlar, en ideal ve en iyi adapte olan gruptur. Mantarlar, düşük su aktivitesi ve yüksek osmotik basınç şartlarına toleranslı olduğundan mikroorganizmalara nazaran daha avantajlıdır. Mantarlar çok etkili enzim üreticileridir, aroma ve iyileştirici maddeler üretebilir ve tarımsal zararlılara karşı doğal antagonistik olarak etki edebilir. Ticari olarak yeterli enzim üreten bir türün seçimi zordur. Bu nedenle, türlerin taranmasını gerekir. Genel olarak selüloz, ksilanaz ve pektinazlar gibi hidrolitik enzimler fungal türler tarafından üretilir. Ancak bakteriler de kompostlama ve besin fermantasyonları gibi çeşitli doğal fermantasyonlarda kullanılmaktadır. Çeşitli enzimlerin üretiminde *Staphylococcus sp.* ve *Brevibacterium sp.* gibi çeşitli bakteriyel türler başarıyla kullanılmaktadır (Krishna, 2005).

3.3.2.2. Katı Hal Fermantasyonunu Etkileyen Faktörler

KHF proseslerini etkileyen faktörler, kullanılan substrat ve mikroorganizma tipine ve prosesin büyüklüğüne bağlı olarak değişir. Bu faktörler biyolojik, fizikokimyasal ve çevresel faktörler şeklinde sınıflandırılabilir (Krishna, 2005).

Mantarların büyüme için nemli bir çevreyi tercih ettiği bilinmektedir. Düşük nem seviyesi; besin maddelerinin difüzyonunu, mikrobiyal büyümeyi ve enzim kararlılığını azaltmaktadır. Daha yüksek nem seviyelerinde ise, partikül topaklanması, gaz transfer sınırlaması oluşur. Bu nedenle, işlem süresince optimum nem seviyesi korunmalıdır. Optimum nem seviyesi, bakteriyel kültürlerde de baskıya neden olmaktadır. Çünkü büyüme kinetiklerinin ve katının fizikokimyasal özelliklerinin etkilenmesi sonucu üretilebilirlik değişir. Genelde KHF proseslerinde nem seviyesi % 30-85 arasında olmaktadır. Bakteriyel fermantasyon proseslerinde katı matriksin nemi % 70' den daha yüksek, filamentli mantarlar için ise % 20-70 aralığında olmalıdır.

Fermantasyon proseslerinde diğ er önemli faktör pH' dır ve metabolik aktivitelerden dolayı değişebilir. KHF prosesi süresince organik asitlerin salgılanması, asimilasyonu ve üre hidrolizi nedeniyle pH değişmektedir. KHF performansını etkileyen en önemli fiziksel değişken sıcaklıktır.       mikrobiyal üreme, enzim ve metabolit üretimi sıcaklığa duyarlıdır. KHF' da sıcaklık kontrolü çok zordur.       doğal konveksiyon (bir gaz ve ya sıvının ısınarak hafifleyip yükselmesi ve başka bir yerde soğuyup ağırlaşarak aşağı inmesi), KHF' un statik doğası ve katı substratların termal iletkenliğinin zayıf olması nedeniyle kondüktif soğutma cihazları yetersizdir. Ayrıca, metabolik aktiviteyle sistemde ısı oluşmaktadır. Yerel nem içeriği ve boş alanlar termal tabakalara sebep olmaktadır. Bu nedenle KHF proseslerinde ısı giderimi reaktör dizaynında dikkat edilmesi gereken önemli bir parametredir (Krishna, 2005). KHF' de uygun substrat seçimi diğer bir önemli konudur. KHF' de katı substrat, hem fiziksel bir destek hem de besin kaynağı olarak işlem görmektedir (Pandey, 2003). Tarıma dayalı endüstri atıkları KSF prosesleri ve enzim üretimi için en iyi substratlar olarak düşünülmektedirler.       mikroorganizmaların gelişmesi için ihtiyaç duyulan besinleri temin ederler. şeker kamışı k spesti, buğday, pirinç, mısır ve tahıl kepekleri, buğday ve pirinç sapları, hindistan cevizi lifi özü, muz atıkları, çay ve kahve atıkları, şeker pancarı k spesti, sorgum posası, elma ve üzüm posası, fıstık unu, hardal yağı keki, buğday unu, sebze atıkları, kenevir, perlit ve poliüretan köpük kullanılan substratlardır. Substratın partikül boyutu önemlidir.       mikrobiyal büyüme ve ısı ve kütle transferi substrat karakterizasyonuna bağlıdır. Sabit bir geometride partikül boyutu azalırken yüzey alanının hacme oranı artar. Genelde daha küçük substrat tanecikleri mikrobiyal hareket için daha geniş yüzey alanı sağlamaktadır. Fakat daha küçük parçacıklar substrat topaklanmasına neden olur ve mikrobiyal solunum engellenebilir. Daha küçük partikül boyutu hava ve katı yüzey arasındaki ısı transferi ve oksijen ve karbondioksit değişiminde avantajlıdır. Aynı zamanda daha geniş partiküller mikrobiyal hareket için sınırlı yüzey sağlar. KHF proseslerinde substrat boyutu zamanla azalmaktadır (Raimbault, 1998; Krishna, 2005).

3.3.2.3. Katı Hal Fermantasyonu ile Pektinaz Enzimi  retimi  alışmaları

Biyoteknolojik gelişmelere paralel olarak endüstriyel enzim kullanımı da giderek artmaktadır. Enzimler geleneksel olarak, derin kültür fermantasyon yöntemiyle üretilmelerine rağmen, son yıllarda katı substrat fermantasyonu ile de üretim çalışmaları

yapılmaktadır. Bunun altında yatan en önemli faktörler arasında yüksek verim, düşük maliyet, basit alet-ekipman kullanımı, saflaştırmada kolaylık yer almaktadır. Ayrıca katı hal fermantasyonunda substrat olarak tarımsal ve endüstriyel atık ve atıkların kullanımı hem çevre kirliliği açısından hem de bu maddelerin daha verimli şekilde değerlendirilmesi açısından avantaj sağlar. Çeşitli enzimlerin üretiminde en çok kullanılan mikroorganizma türleri filamentli mantarlar ve mayalardır. KHF ile enzim üretiminde ise çoğunlukla mantarlar kullanılmaktadır. Bu durum, KHF tekniğinin sadece filamentli mantarlara uygulanabileceği kanaatinden kaynaklanmaktadır (Kashyap vd., 2003). Günümüzde KSF sistemlerinde bakterilerinde kullanılabileceği anlaşılmıştır (Hölker vd., 2004). *Staphylococcus sp.* kullanılarak inulinaz enzimi üretimi ve şeker kamışında *Brevibacterium sp.* ile L-glutamik asit üretimi bu alanda başarılı olmuş çalışmalara örnek olarak verilebilir (Pandey vd., 2000). Endüstrilerde, çoğunlukla alkali enzimler kullanılmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen enzimlerin pH optimumu nötral ve asidik aralıktadır. Bu nedenle bu enzimlerin kullanımı daha sınırlıdır. Bakteriler tarafından üretilen birçok ekstraselular enzim yüksek pH optimumuna sahiptir.

Ticari pektinaz üreimi iki farklı fermantasyon tekniğiyle çoğunlukla *Aspergillus niger* türleri kullanılarak yapılmaktadır. Her iki teknikteki pektinaz üretimi karşılaştırıldığında katı hal fermantasyonunun daha verimli olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer bir ilginç bulgu ise KHF ile üretilmiş pektinazların pH ve sıcaklığa karşı daha kararlı olduğu ve katabolik baskılamadan daha az etkilendiğidir (Blandino vd., 2002). Buğday kepeği, soya kepeği, yaban mersini, çilek posası, kahve özü ve kahve kabuğu, kakao, limon ve portakal kabuğu, portakal küspesi, şeker kamışı küspesi, elma posası, mısır kepeği ve turuncgil atıkları gibi farklı tarımsal ve tarıma dayalı endüstriyel katı atıklar pektinaz üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır (Martins vd., 2002; Couto ve Sanroman, 2006; Aguilar vd., 2008). Bai ve arkadaşları (2004), *A. niger* ile karbon kaynağı olarak şeker pancarı küspesi, azot ve su kaynağı olarak mono sodyum glutamat ve atık su kullanarak pektinaz üretmişlerdir. Böylece üretim maliyeti ve kirlilik azaltılmıştır. Diaz-Godinez ve arkadaşları (2001), *Aspergillus niger* ile derin kültür ve katı hal fermantasyonunda ekzo pektinaz üretimi yapmış ve KHF’ de sakkaroz ilavesi ile enzim aktivitesinin arttığını gözlemişlerdir. Bunu, katabolik baskılama olmaması sonucu daha fazla biyokütle üretimi ile açıklamışlardır. Patil ve Dayanand (2006) limon kabuğu, sorgum sapı ve ay çiçeği başı gibi pektince zengin tarımsal atıklardan *Aspergillus niger* DMF 27 ve *A. niger* DMF 45 ile pektinaz üretimini derin kültür ve katı hal fermantasyon sistemlerinde incelemişlerdir. Katı hal sistemde

maksimum endo pektinaz (4.8 U/g) ve ekzo pektinaz (17.2 U/g) aktivitesini ay çiçeği başından elde etmişler bunu limon kabuğundan elde edilen endo pektinaz (2.0) ve ekzo pektinaz (10.2) izlemiştir. Silva ve arkadaşları (2002), *Penicillium viridicatum* Rfc3 ile pektin liyaz ve poligalakturonaz üretimini, katı hal fermantasyonunda karbon kaynağı olarak portakal posası, mısır kepeği, buğday kepeği ve mango ve muz kabuklarını kullanarak incelemiştir. Maksimum poligalakturonaz aktivitesi karbon kaynağı olarak buğday kepeği kullanıldığında elde edilmiş, maksimum pektin liyaz aktivitesi ise portakal posasının bulunduğu ortamda elde edilmiştir. Şeker kamışı posası, muz ve mango kabukları karıştırıldığında bu atıkların kullanılmadığı fermantasyona kıyasla poligalakturonaz ve pektin liyaz aktivitesinde bir artış elde edilmiştir. Jakob ve Prema (2006), *Streptomyces lydicus* ile poligalakturonaz, pektin liyaz ve pektin esteraz üretimini çalışmışlar ve katı hal fermantasyon tekniği ile elde edilen spesifik aktivite değerlerinin derin kültür fermantasyon tekniği ile elde edilen değerlerin 2 katı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca katı hal fermantasyon tekniğinde inkübasyon süresinin kısaldığını ve buğday kepeğinin poligalakturonaz aktivitesi için en iyi substrat olduğunu ifade etmişlerdir.

Literatürde KHF tekniği ile bakterilerden pektinaz enzimi üretimi konusunda çok az sayıda yayın mevcuttur (Kashyap vd., 2003). Tarımsal atıklarla enzim üretiminde, uygun mikroorganizmanın seçilmesi gerekmektedir. Çoğu *Bacillus* spp.' ler birçok hidrolitik enzimi üretebilmekte ve atıkların organik madde içeriğini kullanabilmektedir. Bu gruptaki mikroorganizmalar, toksin üretmeyen zararsız saprofitlerdir ve güvenli olarak (GRAS) isimlendirilen organizma grubunun içindedirler. Bu organizmalar, çok hızlı üreyebilir ve pahalı büyüme faktörlerine ihtiyaç duymazlar. Kolaylıkla saflaştırılabilen ve nispeten düşük moleküler ağırlıklara sahip yüksek konsantrasyonlarda ekstraselüler enzimler üretebilirler. Ayrıca birçok *Bacillus* enzimi, kullanıldığı çevrenin fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki değişimlere karşı daha karardır (Mahmood vd., 1998). Kapoor ve Kuhad (2002), farklı büyüme şartlarında *Bacillus* sp. MG-cp-2 ile alkali poligalakturonaz üretimini araştırmışlar ve DKF' de 342 U ve KHF' da 23.076 U maksimum aktivite elde etmişlerdir.

4. PEKTİNAZLAR

Pektinazlar ya da pektinolitik enzimler pektik maddeleri hidrolizler. Global enzim satışlarında % 25' lik bir paya sahiptirler. Pektinazlar; bakteri, mantar ve bitkilerde en yaygın dağılmış enzimlerden biridir. Protopektinazlar, poligalakturonazlar, liyazlar ve pektin esterazlar yaygın olarak çalışılmış pektinolitik enzimler arasındadır. Protopektinazlar; protopektinin çözünürlüğünü katalizler. Poligalakturonazlar; su ilavesi ile poligalakturonik asit zincirini hidrolizler ve bütün pektinolitik enzimler arasında en verimli olanlardır. Liyazlar; galakturonik asit polimerinin trans eliminasyon kırılmasını katalizler. Pektin esterazlar; pektin omurgasının, metil ester bağlarının de-esterifikasyonu ile pektin ve metanolu serbest bırakır. Pektinazlar, meyve suyu ekstraksiyonu ve çöktürülmesinde, pamuğun ağartılmasında, bitki fiberlerinin yapıştırılmasında, atık su arıtımında, sebze yağı ekstraksiyonunda, çay ve kahvenin fermantasyonunda, kağıdın beyazlatılmasında, kümes hayvanlarının besin katkılarında, alkolllü içeceklerde ve besin endüstrilerinde kullanılmaktadır (Jayani vd., 2005).

4.1. Pektik Maddeler

Pektik maddeler, pektinolitik enzimler tarafından etkilenen bileşikler için kullanılmış kapsamlı bir addır. Yüksek moleküler ağırlıklı, negatif yüklü, asidik, bitki aleminde mevcut olan kompleks glikosidik makromoleküllerdir (polisakkarit). Kalsiyum pektat ve magnezyum pektat formunda hücreler arasında orta lamellanın önemli bileşenidir.

Pektik maddeler, proteinler, yağlar ve nükleik asitler gibi belirli bir molekül ağırlığına sahip değildir. Pektik maddelerin moleküler ağırlıkları 25-360 kDa aralığında değişmektedir. Tablo 4.1.' de bazı pektik maddelerin moleküler ağırlıkları verilmiştir.

Tablo 4.1. Bazı pektik maddelerin moleküler ağırlıkları (Jayani vd., 2005).

Kaynak	Moleküler Ağırlık (kDa)
Elma ve Limon	200-360
Armut ve Kuru Erik	25-35
Portakal	40-50
Şeker pancarı küspesi	40-50

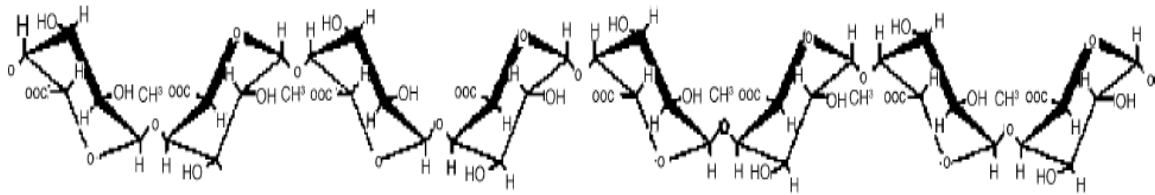
Meyve ve sebzelerin, teknolojik açıdan en önemli polisakkaritleri pektindir. Bu ürünlerde pektin miktarı % 0.5-% 4.0 düzeyindedir. Farklı meyve ve sebzelerin pektin içeriği Tablo 4.2.' de verilmiştir.

Tablo 4.2. Farklı meyve ve sebzelerin pektin içeriği (Jayani vd., 2005).

Meyve	Doku	Pektin, %
Elma	Taze	0.5-1.6
Muz	Taze	0.7-1.2
Şeftali	Taze	0.1-0.9
Çilek	Taze	0.6-0.7
Kiraz	Taze	0.2-0.5
Bezelye	Taze	0.9-1.4
Havuç	Kuru Madde	6.9-18.6
Portakal kabuğu	Kuru Madde	12.4-28.0
Patates	Kuru Madde	1.8-3.3
Domates	Kuru Madde	2.4-4.6
Şeker Pancarı küspesi	Kuru Madde	10.0-30.0

4.2. Pektik Maddelerin Yapısı, Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Pektik maddeler galakturonanlar ve rhamnogalakturonanlardan oluşur. Bunlarda galaktozun C-6 karbonu, bir karboksil grubuna, arabinanlara ve arabinogalaktanlara oksitlenir. Bu maddeler, çoğunlukla bir anhidrogalakturnonik asit birimi kırılmasından meydana gelen bir grup kompleks kolloidal polimerik maddelerdir (Şekil 4.1.). Galakturonik asidin karboksil grupları kısmen metil grupları ile esterleşmiştir ve kısmen ya da tamamen sodyum, potasyum ya da amonyum iyonları ile nötralize edilmiştir.



Şekil 4.1. Pektik maddelerin birincil yapısı (Jayani vd., 2005).

Amerikan Kimya Topluluğu pektik maddeleri aşağıdaki gibi 4 ana grupta sınıflandırmıştır.

Protopektinler: Bozulmamış dokuda mevcut olan suda çözünmeyen pektik maddedir. Sınırlı hidrolizle protopektin, pektin ya da pektik asite dönüşür.

Pektik Asit: İhmal edilebilir miktarda metoksil grupları içeren, suda çözünebilir galakturonan polimeridir. Pektik asitler ya da tuzları pektatlar olarak adlandırılır.

Pektinik Asitler: <% 75 metillenmiş galakturonat birimleri içeren poligalakturonan zinciridir. Pektinik asitler ya da tuzları pektinatlar olarak bilinirler.

Pektin (Polimetil galakturonat): Galakturonat birimlerinin % 75 karboksil grupları, metanolle esterleşmiş polimerik maddedir. Hücre duvarında selüloza bitişik olduğu zaman hücre duvarını sertleştirir.

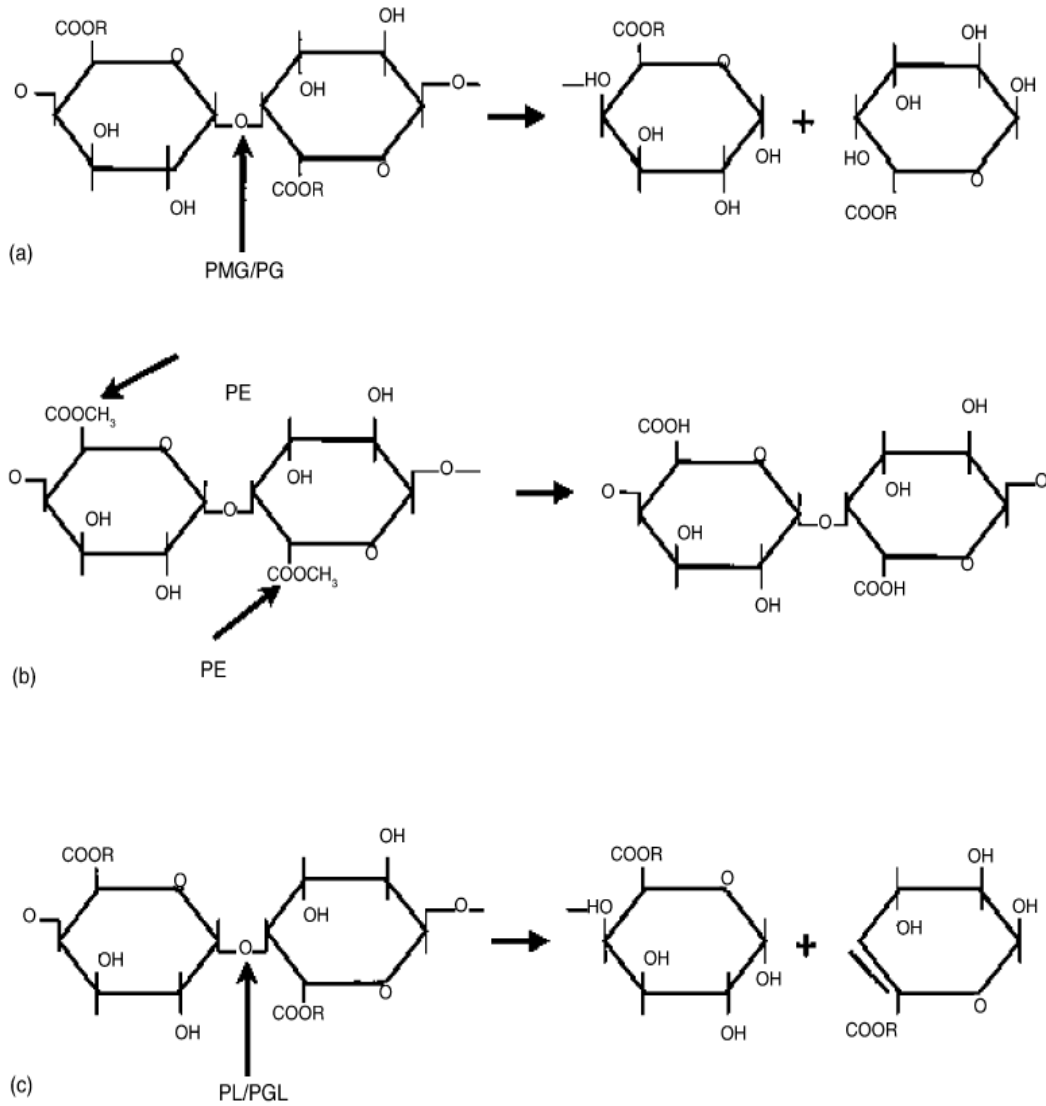
4.3. Pektinazlar

Pektinazlar aşağıdaki gibi belli başlı üç gruba ayrılabilir.

(I) Protopektinazlar: Çözünmez protopektini parçalar ve polimerize çözünür pektine dönüştürür.

(II) Esterazlar: Metoksi esterlerin uzaklaştırılmasıyla pektinin deesterifikasyonunu katalizler.

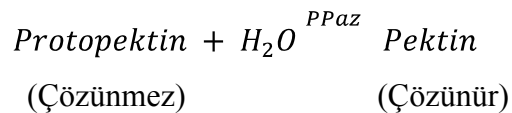
(III) Depolimerazlar: Pektik maddelerin D-galakturonik asit kısımlarındaki α -(1→4) glikosidik bağlarının hidrolitik kırılmasını katalizler. Depolimerazlar, pektik maddelere iki farklı mekanizma ile etki ederler. Bunlar, hidrolitik bölünmenin katalizlendiği hidroliz ve hiçbir su molekülü katılmaksızın transeliminasyonla glikozidik bağın kırıldığı transeliminasyon liziz' dir (Şekil 4.2.). Depolimerazalar; substrat için enzim tercihi, bölünme mekanizması ve glikozidik bağların bölünmesine göre 4 alt kategoriye tekrar bölünebilir. Poligalakturonaz ve polimetil galakturonazlar hidroliz mekanizmasıyla sırasıyla pektat ve pektini parçalar. Bununla beraber, poligalakturonat liyaz ve polimetilgalakturonat liyazlar, β -eliminasyon mekanizmasıyla sırasıyla pektat ve pektini parçalar. Etki şekline göre, yani rastgele ya da uçtan, bu enzimler sırasıyla endo ya da ekzo enzimler olarak adlandırılırlar. Son yıllarda yayınlanan makale ve araştırmaların ışığında yapılan daha yeni ve ayrıntılı sınıflandırma Tablo 4.3.' de verilmiştir.



Şekil 4.2. Pektinazların hareket şekli: (a)PG için R=H ve PMG için CH₃ (b) PE ve (c) PGL için R=H ve PL için CH₃. Ok pektinazın pektik maddelerle reaksiyona girdiği yeri gösterir. PMG, polimetilgalakturonaz; PG, poligalakturonaz (EC 3.2.1.15); PE, pektinesteraz (EC 3.1.1.11); PL, pektin liyaz (EC 4.2.2.10) (Jayani vd., 2005).

4.3.1. Protopektinazlar

Protopektinin çözünürlüğünü katalizleyen enzim, Britton ve diğerleri tarafından esasen protopektinaz olarak adlandırılmıştır. Pektinosinaz, protopektinaz (PPaz) ile de ortak anlamlıdır. Propektinazlar aşağıdaki reaksiyona göre katalizler:



Tablo 4.3. Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırılması (Jayani vd., 2005).

Enzim	E.C. no.	Modifiye EC sistematik adı	Hareket mekanizması	Hareket yolu	Birincil substrat	Ürün
Esteraz						
Pektin metil esteraz	3.1.1.11		Hidroliz	Random	Pektin	Pektik asit + metanol
Depolimerize enzimler						
a. Hidralazlar						
1. Protopektinaz			Hidroliz	Random	Protopektin	Pektin
2. Endopoligalakturonaz	3.2.1.15	Poli-(1-4)-a-D-galaktosiduronat glycanohidralaz	Hidroliz	Random	Pektik asit	Oligogalakturonatlar
3. Ekzopoligalakturonaz	3.2.1.67	Poli-(1-4)-a-D-galaktosiduronat glycanohidralaz	Hidroliz	Terminal	Pektik asit	Monogalakturonatlar
4. Ekzopoligalakturonan-digalakturono hidralaz	3.2.1.82	Poly-(1-4)-a-D-galaktosiduronat digalacturonohidralaz	Hidroliz	Sondanbir önceki bağlar	Pektik asit	Digalakturonatlar
5.Oligogalacturonat hidralaz			Hidroliz	Terminal	Trigalakturonat	Monogalakturonatlar
6. Δ 4:5 Doymamış oligogalakturonat hidralazlar			Hidroliz	Terminal	Δ4:5 (Galakturonat)	Doymamış monogalakturonatlar & doymuş (n-1)
7. Endopolimetil-galakturonazlar			Hidroliz	Random	Çok esterlenmiş pektin	Oligometilgalakturonatlar
8. Endopolimetil-galakturonazlar			Hidroliz	Terminal	Çok esterlenmiş pektin	Oligogalakturonatlar
b. Liyazlar						
1. Endopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.2	Poly-(1-4)-a-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Random	Pektik asit	Doymamış oligogalakturonatlar
2. Ekzopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.9	Poli-(1-4)-a-D-galaktosiduronat ekzoliyaz	Trans-eliminasyon	Sondanbir önceki bağlar	Pektik asit	Doymamış digalakturonatlar
3. Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	4.2.2.6	Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Terminal	Doymamış digalakturonatlar	Doymamış monogalakturonatlar
4.Endopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz	4.2.2. 10	Poli(metil galaktosiduronat) liyaz	Trans-eliminasyon	Random	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)	Doymamış metiloligogalakturonatlar
5.Ekzopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz			Trans-eliminasyon	Terminal	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)	Doymamış metilmonogalakturonatlar

4.3.1.1. Sınıflandırılması

PPazlar, reaksiyon mekanizmaları temel alınarak iki sınıfa ayrılır. A tip PPazlar, iç bölgeyle yani protopektinin poligalakturonik asit kısmıyla reaksiyona girer. B tip PPazlar dış bölgeye etki eder yani poligalakturonik asit zinciri ve hücre duvarı bileşenlerini bağlayabilen polisakkarit zincirinde etki eder.

4.3.1.2. Oluşumu

A tip PPazlar, maya ve maya benzeri mantarların kültür filtratlarında bulunmaktadır. *Kluyveromyces fragilis* IFO 0288, *Galactomyces reesei* L. ve *Trichosporon penicillatum* SNO 3' den izole edilmiş ve sırasıyla PPaz-F, -L ve -S olarak, B tip PPazlar ise *Bacillus subtilis* IFO 12113, *Bacillus subtilis* IFO 3134 ve *Trametes sp.*' den üretilmiş ve sırasıyla PPaz-B-C ve -T olarak ifade edilmiştir. B-tip PPazlar, *Bacillus sp.* kültür filtratlarından da elde edilmiştir.

4.3.1.3. Ölçüm Metotları

PPaz aktivitesi, protopektinden salıverilen pektik maddenin karbazol-sülfirik asit metodu ile ölçülmesiyle belirlenmektedir. Pektin konsantrasyonu, standart eğriden D-galakturonik asit olarak ölçülmektedir. Bir birim PPaz aktivitesi, ölçüm şartlarında reaksiyon karışımının 1 milimitresi başına 1 µmol-d-galakturonik asit eşdeğeri pektik madde salıveren enzim olarak ifade edilmektedir.

4.3.1.4. Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri

Bütün PPazlar benzer biyolojik özelliktedir ve 30 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. PPaz-F asidik bir proteindir ve PPaz-L ve -S bazik proteindir. Enzimler çeşitli kaynaklardan, protopektinden pektin salıverme etkisine sahiptirler. Enzimler, poligalakturonik asitin hidrolizini katalizler ve poligalakturonik asit içeren reaksiyon ortamının viskozitesini azaltırlar. PPaz-B, -C ve -T sırasıyla 45, 30 ve 55 kDa moleküler ağırlıklarına sahiptir. PPaz-B ve -C izoelektrik noktası (pI) 9.0 civarında, PPaz-T' nin pI' ı 8.1' dir.

4.3.2. Poligalakturonazlar

Poligalakturonazlar (PGaz), poligalakturonik asit zincirinin hidrolitik kırılışını katalizleyen pektinolitik enzimlerdir. Pektinolitik enzim ailesinde en çok çalışılan enzimlerdir.

4.3.2.1. Sınıflandırılması

Pektik maddelerin hidrolizi ile ilgili olan PGazlar, endo PGaz (3.2.1.15) ve ekzo PGaz (E.C. 3.2.1.67)' dir (Tablo 4.4.) PGazların gıda işleme ve bitki-fungus etkileşiminde biyolojik, fonksiyonel ve teknik uygulamaları vardır.

4.3.2.2. Oluşumu

Endo poligalakturonazlar birçok mantar, bakteri ve maya tarafından üretilmektedir. Ayrıca, yüksek bitkilerde ve bazı bitki paraziti nematodlar da da bulunmaktadır. *Aureobasidium pullulans*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus sp.*, *Thermomyces lanuginosus*, *Peacilomyces clavisporus* içeren birçok mikroorganizmanın endo poligalakturonaz ürettiği belirtilmektedir. Endo-PGaz' lar birçok sayıda mikrobiyal türden klonlanmış ve genetik olarak çalışılmıştır.

Zıt olarak, ekzo PGaz' lar daha az sıklıkta oluşmaktadır. *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *E. chrysanthemi*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus sp.* içeren birçok mikroorganizmanın ekzo poligalakturonaz ürettiği literatürde belirtilmektedir. Ekzo poligalakturonazlar esas son ürün olarak monogalakturonik asit üreten fungal ekzo poligalakturonazlar ve esas son ürün olarak digalakturonik asit üreten bakteriyel ekzo poligalakturonazlar olarak iki türe ayrılabilir.

4.3.2.3. Ölçüm Metotları

Poligalakturonaz aktivitesi, reaksiyon esnasında indirgenmiş grupların sayılarının artış hızı ve substrat çözeltisinin vizkozitesindeki azalmayla belirlenir. İndirgenmiş şeker

miktarı, 3.5-dinitrosalisilat reaktifi ve arsenomolibdat-bakır reaktif metodu gibi kolorimetrik metotlarla kolayca ölçülebilir. Enzim aktivitesinin 1 birimi standart ölçüm şartlarında 1 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ galakturonik asit salıveren enzim olarak ifade edilmektedir. Poligalakturonaz aktivitesinin belirlenmesinde viskozite azalma ölçümünün yaygın kullanımı bulunmaktadır.

$$\text{Viskozitedeki \% azalma} = \frac{T_o - T_t}{T_o - T_w} \quad (3.1.)$$

Burada T_o , T_t ve T_w , sırasıyla, enzimsiz reaksiyon karışımı, test karışımı ve su için saniyelerce akış hızını (kapiler bir viskozimetrede) göstermektedir. 1 birim enzim aktivitesi, birim zamanda belirli bir viskozitede azalma sağlamak için gerekli enzim miktarı olarak ifade edilmektedir.

4.3.2.4. Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri

Farklı mikrobiyal kaynaklardan izole edilmiş poligalakturonazlar fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri ve etki metoduna göre birbirinden oldukça farklı özelliklere sahiptir. Çeşitli kaynaklardan elde edilmiş poligalakturonazların biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri Tablo 4.4.' de özetlenmiştir. Farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiş poligalakturonazların çoğu 3.5-5.5 optimum pH ve 30-50 °C optimum sıcaklık aralığına sahiptir. *Aspergillus niger*' den izole edilmiş iki endo poligalakturonaz (PG I ve PG II) sırasıyla 3.8-4.3 ve 3.0-4.6 optimum pH aralığına sahiptir. Literatürde belirtilmiş poligalakturonazların çoğu, asidik pH aralığında verimli olarak çalışmaktadır. Fakat optimum pH' ı 11.0 olan birkaç alkali PGaz, *Bacillus licheniformis* ve *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersci*' den de üretilmiştir. Barnby ve diğerleri aynı moleküler ağırlığında, fakat izoelektrik noktaları farklı olan 4 izoenzim, PG I, PG II, PG III, ve PG IV tespit etmiştir. PG' ların çoğu 30-40 °C sıcaklık aralığında çalışır. Fakat daha yüksek sıcaklıklarda pektik maddelerin hidrolizini katalizleyebilen birkaç PGaz, *Bacillus sp.* KSM-P443 ve *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersa*' den izole edilmiştir.

Tablo 4.4. Poligalakturonazların fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri (Jayani vd., 2005).

PGaz Kaynağı	Doğası	Moleküler Ağırlığı (kDa)	pI	Spesifik Aktivitesi (U mg ⁻¹)	Km	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH	Sıcaklık Kararlılığı	pH Kararlılığı
<i>Aspergillus japonicus</i>	Endo	38 (PG I)	5.6	-	-	30	4.0-5.5	-	-
	Endo	65 (PG II)	3.3	-	-	30	4.0-5.5	-	-
<i>Mucor flavus</i>	-	40	8.3	-	-	45	3.5-5.5	40	2.5-6.0
<i>Thermococcus aurantiacus</i>	Endo	35	5.9	5890	0.13	55	5.0	60	4.0-6.5
<i>Aspergillus niger</i>	Endo	61 (PG I)	-	982	0.12	43	3.8-4.3	50	-
	Endo	38 (PG II)	-	3750	0.72	45	3.0-4.6	51	-
<i>Bacillus sp KSM-P410</i>	Ekzo	45	5.8	54	1.3	60	7.0	50	7.0-12.0
<i>Penicillium frequentans</i>	Ekzo	63	-	2571	1.6	50	5.0	-	-
	Ekzo	79	-	185	0.059	50	5.8	-	-
<i>Aspergillus awamori</i>	Endo	41	6.1	487	-	40	5.0	50	4.0-6.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ekzo	63	6.6	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ekzo	38	-	209	-	69	11.0	-	7.0-11.0
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Endo	42 (PG8b)	4.8	-	0.8	50	4.0	-	-
	Endo	41.5 (PG8u)	4.8	-	0.5	50	3.5	-	-
<i>Stereum purpureum</i>	Endo	42 (PG1a)	8.5	488	-	-	5.0	75	-
	Endo	44 (PG1b)	8.5	416	-	-	5.0	75	-
	Endo	46(PG1c)	8.5	457	-	-	5.0	75	-
<i>Sclerotinia borealis</i>	Endo	40	7.5	2088	-	40-50	5.0	50	3.5-5.5
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	-	43	5.4	0.62	-	50	4.2	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae IMI-8b</i>	-	43	-	-	-	45	4.5	-	-
<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersci</i>	Ekzo	38	-	209	-	69	11.0	-	7.0-11.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo	39	-	2870	4.7	45	5.5	50	4.5-6.0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Endo	496 (PG I)	6.3	102.6	-	-	-	-	-
	Endo	496 (PG II)	6.0	102	-	-	-	-	-
	Endo	496 (PG III)	6.3	107.8	-	-	-	-	-
	Endo	496 (PG IV)	5.7	97.6	-	-	-	-	-

4.3.3. Liyazlar

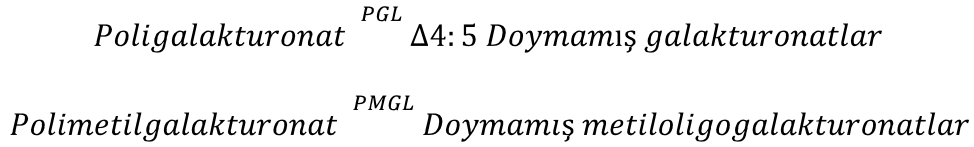
Liyazlar ya da transeliminazlar, pektat ya da pektinatların hidrolitik olmayan kırılmasını yapmaktadır. Liyazlar 4.C' daki glikozidik bağları kırar ve eş zamanlı olarak bir Δ 4:5 doymamış ürün üretir yani 5.C atomundan bir hidrojeni glikozidik bağdaki oksijene taşıyarak (çift bağ oluşumu) parçalar.

4.3.3.1. Sınıflandırılması

Liyazlar etki şekline ve etkilenen substrata göre şu türlere ayrılmıştır:

- (I) **Endopoligalakturonat liyazlar:** (Endo PGL, E.C. 4.2.2.2);
- (II) **Ekzopoligalakturonat liyazlar:** (Ekzo PGL, E.C. 4.2.2.9);
- (III) **Endopolimetilgalakturonat liyazlar:** (Endo PMGL, E.C. 4.2.2.10);
- (IV) **Ekzopolimetilgalakturonat liyazlar:** (Ekzo PMGL).

Liyazlar tarafından katalizlenmiş reaksiyon aşağıda verilmiştir:



4.3.3.2. Oluşumu

Poligalakturonat liyazlar (pektat liyaz ya da PGL), ekzo PGL ve endo PGL birçok bakteri ve bazı patojenik mantarlardan üretilmektedir. PGL' lar gıda çürütücü ve yumuşak köklerle bağlantılı olan bakteri ve mantarlardan izole edilmektedir. *Colletotrichum lindemuthionum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Erwinia carotovora*, *Amucala sp.*, *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*, *Colletotrichum magna*, *E. chrysanthemi*, *Bacillus sp.*, *Bacillus sp. DT-7*, *C. Gloeosporioides*' den üretilmektedir.

Polimetilgalakturonat liyazların (pektin liyaz ya da PMGL lar) üretimi ile ilgili birçok yayın da literatürde yer almaktadır. *Aspergillus japonicus*, *Penicillium paxilli*, *Penicillium sp.*, *Pythium splendens*, *Pichia pinus*, *Aspergillus sp.*, *Thermoascus aurantiacus* ile üretilbileceği kaydedilmiştir.

4.3.3.3. Ölçüm Metotları

Liyaz aktivitesinin takibinde en uygun metot, doymamış ürünlerin indirgenmeyen uçlarında Δ 4:5 çift bağların oluşumuyla 235 nm’ de absorbans artışının ölçülmesidir. Bir birim enzim aktivitesi, ölçüm şartlarında dakikada 1 μ mol doymamış ürün salıveren enzim miktarı olarak ifade edilir. İndirgenmiş grup metotları da liyaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. İndirgenmiş grup metodu ile bir arada ya da HPLC ya da gaz kromatografisi ile ara ürünlerin analizleri ile beraber viskozite azalma metodu, endo ve ekzo parçalama enzimleri arasında ayırım yapmak için kullanılır (Jayani vd., 2005). Liyaz aktivitesinin tayininde, doymamış uronik esterlerinin tiyobarbitürik asit (TBA) ile renkli türlere dönüşümüne dayalı bir metot da kullanılmaktadır (Yadav vd., 2009).

4.3.3.4. Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri

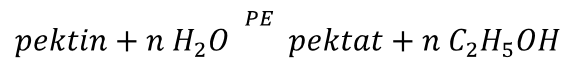
Pektin liyazların çoğu mikroorganizmalar tarafından üretilmekle beraber bitki ve hayvanlarda varlığı konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Bakterilerde, en geniş pektinolitik enzim grubu liyazlardır. PGL, Ca^{+2} iyonlarına mutlak bir ihtiyaç göstermektedir ve EDTA gibi şelatlaştırıcı maddeler inhibitör olarak hareket etmektedir. PMGL’ lar zorunlu olarak katyon ihtiyacı göstermezler, fakat Ca^{+2} ve diğer katyonlarla teşvik edilmektedir. Endo PMGL, diğer enzimlerin etkisi olmaksızın, esterleşmiş pektinlerin α -1,4-glikosidik bağlarını kırabilecek tek enzim olarak bilinir. Liyazların bazı özellikleri Tablo 4.5.’ te verilmiştir. Liyazların çoğu 30-40 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptir ve izoelektrik noktaları 7.0 ve 11.0 arasındadır. Alkali aralıkta (7.5-10.0) pH optimumuna sahiptir ve optimum sıcaklığı 40-50 $^{\circ}C$ ’ dir. *Aureobasidium pullulans* LV-10 iki PMGL, L_1 ve L_2 , 40 $^{\circ}C$ de sırasıyla pH 5.0 ve 7.5’ de optimum aktivite göstermiştir. Singh ve diğerleri, *Bacillus* sp.’ den pH 11.0 ve 69 $^{\circ}C$ ’ de maksimum aktivite gösteren termostabil bir ekzo PGL üretmişler ve aktivitesinin Ca^{+2} , ye bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Termostabil liyazlar *Bacillus* sp. TS 47, *Thermoascus aurantiacus* ve *Fusarium moniliforme*’ den de üretilmiştir. *Aspergillus japonicus*’ dan immobilize edilmiş liyazın K_m değeri 0.16’ dır ve pH’ ı 6.0 ve 55 $^{\circ}C$ ’ de en yüksek aktivitededir.

Tablo 4.5. Bazı liyazların fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri (Jayani vd., 2005).

Liyaz Kaynağı	Doğası	Moleküler Ağırlığı (kDa)	pI	Km	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH	Sıcaklık Kararlılığı	pH Kararlılığı
<i>Erwinia carotovora</i>	PGL (PL I)	36-38	10.7	0.12	50	10.0	-	-
	PGL (PLII)	36-38	10.1	1.1	60	10.0	-	-
<i>Bacteroides thetaitaomicron</i>	PGL	74	7.5	0.04-0.07	-	8.7	-	-
<i>Aureobasidium pullulans LV-10</i>	PMGL (L1)	89	-	-	40	5.0	50	3.5
	PMGL (L2)	55	-	-	40	7.5	40	5.9
<i>Penicillium italicum</i>	PMGL	22	8.6	3.2	40	6.0-7.0	50	8.0
<i>Bacillus macerans</i>	PGL	35	10.3	-	60	9.0	-	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	PMGL	-	7.7	0.16	55	6.0	-	-
<i>Penicillium adametzii</i>	PMGL	-	-	-	60	8.0	40	7.0
<i>P. citrinum</i>	PMGL	-	-	-	45	7.0	40	7.0
<i>P. janthinellum</i>	PMGL	-	-	-	40	6.5	40	7.0
<i>Amycolata sp.</i>	PGL	31	10.0	0.019	70	10.3	50	6.0-8.0
<i>Pythium splendens</i>	PMGL	23	8.0	-	-	8.0	50	-
<i>Bacillus sp.</i>	PGL	38	-	-	69	11.0	60	7.0-11.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	PGL	55	5.2	-	-	-	-	-
<i>Pichia pinus</i>	PMGL	90	-	0.33	-	4.5	50	-
<i>Bacillus sp. TS44</i>	PGL	50	5.3	-	70	8.0	70	11.0
<i>Thermoascus auratniacus</i>	PMGL	-	-	-	65	10.5-11.0	70	4.0
<i>Fusarium monoliforme</i>	PGL	-	-	-	-	8.5	75	

4.3.4. Pektin Esterazlar

Pektin metil esteraz, pektaz, pektin methoksilaz, pektin demethoksilaz ve pektolipaz olarak ifade edilen pektin esterazlar (PE; pektin petilhidralaz, E.C. 3.1.1.11), bir karboksilik asit esterazdır ve hidralaz enzim grubuna mensuptur. Asidik pektinleri ve metanolu ayırarak pektik maddelerin galakturonan omurgasının metil-ester bağlarının deesterifikasyonunu katalizler. Oluşan pektin, daha sonra poligalakturonazlar ve liyazlar tarafından etkilenir. PE tarafından katalizlenen reaksiyon aşağıdaki gibi ifade edilebilir:



4.3.4.1. Oluşumu

PE aktivitesi hücre büyümesi, meyve olgunlaşması, yaşlanma ve pathogenesis içeren hücre duvarı metabolizmasına neden olur. Ticari olarak PE, meyve sularının ekstraksiyonu ve çöktürülmesi, çeşitli işlenmiş meyve ve sebzelerin tekstür ve tazeliğinin korunması ve iyileştirilmesinde kullanılabilir.

PE, bitkilerde, bitki patojeni bakteri ve mantarlarda bulunmaktadır. *Rhodotorula sp.*, *Phytophthora infestans*, *Erwinia chrysanthemi* B341, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachnospira pectinoschiza*, *Pseudomonas solanacearum*, *Aspergillus niger*, *Lactobacillus lactis subsp. Cremoris*, *Penicillium frequentans*, *E. chrysanthemi* 3604, *Penicillium occitanis*, *A. japonicus*' den üretilmiştir.

Literatürde, PE' ların bitkilerde, *Carica papaya*, *Lycopersicum esculentum*, *Prunus malus*, *Vitis vinifera*, *Citrus sp.*, *Pouteria sapota* ve *Malpighia glabra L.* oluşumu konusunda yayınlar mevcuttur.

4.3.4.2. Ölçüm Metodu

PE aktivitesi, Downie ve diğerleri tarafından açıklandığı gibi jel difüzyon ölçümüyle çok kolay takip edilir. Pektine bağlanmış metil esterlerin sayısı azalırken, pektine rutenyum kırmızısının bağlanmasındaki artış ölçümün temeli olarak kullanılır. Nano ya da pikokatal aktivite birimi, log-dönüşümlü ticari enzim aktivitesine karşı boyanmış zon

apından oluşturulmuş standart eğriden hesaplanır. PE aktivitesi, bir pH-stat kullanılarak da belirlenebilir (Jayani vd., 2005).

4.3.4.3. Fizikokimyasal ve Biyolojik zellikleri

PE aktivitesi, % 65-75 oranında metillenmiş pektinde en yüksektir. İki değerlikli iyonlar mevcut olmadığında PE aktivitesi, pektin içeren çözeltinin viskozitesinde çok az etkiye sahiptir. PE' lar oldukça spesifik enzimlerdir. Bazı PE' lar sadece indirgenmiş zincirlere etki ederken bazıları indirgenmeyen uçlara da etki eder. Çoğu PE' ların moleküler ağırlıkları 35-50 kDa aralığındadır (Tablo 4.6.). PE' ların aktif olduğu pH aralığı 4.0-8.0' dır. Fungal PE' lar bakteriyal orjinli olanlardan daha düşük bir pH optimumuna sahiptir. Çoğu PE' lar için maksimum aktivite göstereceği optimum sıcaklık 40-50 C' dir. PE' lar için immobilizasyon çalışmaları da yrtlmektedir.

Aspergillus japonicus' dan izole edilmiş iki PE izoformlarının pI' ı 3.8' dir ve 50 C' de en yüksek aktiviteye sahiptir. *Erwinia chrysanthemi* 3937' den elde edilmiş bir PE, alkali bir pH' da ve 50 C' de en yüksek aktivite göstermiştir (Jayani vd., 2005).

4.4. Mikrobiyal Pektinazların Biyoteknolojik Uygulamaları

Son otuz yılda özellikle genetik ve protein mühendisliği alanındaki biyoteknolojik ilerlemeler, enzimleri birçok yeni endüstriyel proseslere dâhil etmiştir. Mikrobiyal enzimler, çevreyle dost ve ekonomik birçok endüstriyel sektörde rutin olarak kullanılmaktadır. evre kirliliği, teknolojik toplumlarda artık kaçınılmaz olarak kabul edilemez bir olgudur. Geçmiş yüzyılda, kirliliğin etkilerine bililenme artmış ve halk baskısı, endüstrileri ve devletleri etkilemiştir. Bazı geleneksel kimyasal proseslerin yerine, mikroorganizmalar ve pektinaz, ksilanaz, selülaz, mannaz, -galaktosidaz, lakkaz ve ligninaz gibi enzimleri içeren çevreyle daha dost biyoteknolojik proseslerin kullanılmasında artan bir talep vardır. Dünya genelinde çeşitli araştırmacılar; mikroorganizmalar tarafından üretilen ve çeşitli endüstriyel proseslerde iyi bir biyolojik katalizör olan pektinaz enzimlerinin biyoteknolojik potansiyeline dikkat çekmektedir (Hoondal vd., 2002).

Tablo 4.6. Bazı pektin esterazların biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri (Jayani vd., 2005).

PE Kaynağı	Moleküler Ağırlığı (kDa)	pI	Km	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH	Sıcaklık Kararlılığı	pH Kararlılığı
<i>Rhodotorula sp.</i>	-	-	-	40	6.0	50	4.9-9.0
<i>Erwinia chrysanthemi</i> B341	37	9.6-9.9	-	50	5.0-9.0	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	1.01	45	5.0	-	-
Apple PE	36	9.0	0.12	60	7.0	75	-
			3				
<i>E.chrysanthemi</i> 3604	37	-	0.03	50	8.0-9.0	-	-
<i>A. japonicus</i>	46 (PE I)	3.8	-	-	4.0-5.5	50	-
	47 (PE II)	3.8	-	-	4.0-5.5	50	-

Pektinazlar, evde kullanılan ilk enzimler olmakla birlikte ticari hayatta kullanımları 1930' lu yıllarda meyve suyu ve şarap endüstrisi ile başlamıştır. 1960' lı yıllarda bilim adamlarının doğal bitki dokusuna ait elde ettikleri bilgiler, enzimlerin endüstride daha verimli bir şekilde kullanılmasına yol açmıştır. Günümüzde pektinazlar, ticari sektörde oldukça yüksek düzeyde kullanılmaktadır. 1995' te endüstriyel enzimlerin ulaştığı yıllık satış cirosu 1 milyar dolardır. Bu satış rakamının içinde pektinazların payı ise % 7.5 (75 milyon dolar) olarak hesaplanmıştır. 2005' te toplam endüstriyel enzim satışlarının yaklaşık olarak 1.7-2.0 milyar dolar olduğu tahmin edilmiştir (Kashyap vd., 2001). Günümüzde ticari olarak üretilen bazı pektinazların marka adı ve üretici firmaları Tablo 4.7.' de verilmiştir.

Asidofilik pektinazların, meyve sularının ve şarabın ekstraksiyonu ve durultulmasında (berraklaştırılması) oldukça yaygın uygulamaları vardır. Alkali pektinazlar ise, pektinli materyalleri içeren gıda işleme endüstrilerinden kaynaklanan atıksuların ilk arıtımında, tekstil ve bitki fiber işlenmesi, çay ve kahve fermantasyonu ve yağ ekstraksiyonu gibi çeşitli geleneksel endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Pektini parçalayan mikroorganizmalar ve enzimler hakkındaki bilginin artması ile beraber alkali pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılması ve kâğıt yapımı gibi diğer biyoteknolojik proseslerde de dikkat çekmektedir. Aşağıdaki bölümlerde pektolitik enzimlerin bazı klasik ve yeni uygulamaları ele alınmıştır (Hoondal vd., 2002).

Tablo 4.7. Ticari pektinazlar (Kashyap vd., 2001; Prathyusha ve Suneetha, 2011).

Temin edici	Bölge	Marka adı
C.H. Boehringer Sohn	Ingelheim, West Germany	Panzym
Ciba-Geigy, A.G.	Basel, Switzerland	Ultrazyme
Grinsteelevaeket	Aarhus, Denmark	Pectolase
Kikkoman Shoyu, Co.	Tokyo, Japan	Sclase
Schweizerische Ferment, A.G.	Basel, Switzerland	Pectinex
Societe Rapidase, S.A.	Seclin, France	Rapidase, Clarizyme
Wallerstein, Co.	Des Plaines, USA	Klerzyme
Rohm, GmbH	Darmstadt, West Germany	Pectinol, Rohament
Biocon Pvt Ltd.	Bangalore, India	Pectinase

4.4.1. Meyve Suyu Üretiminin Farklı Aşamalarında Kullanımı

Pektinazlar, meyve suyu üretim endüstrilerinde, potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahiptir (Prathyusha ve Suneetha, 2011). Pektik maddelerin, meyve sularının kıvamlarını, bulanıklıklarını ve görünüşlerini etkileyen en önemli faktörler olduğu kabul edilmektedir (Alkorta vd., 1998). Meyve küspesine bu enzimlerin uygulanmasıyla pektin parçalanır, yani viskozite azalır ve meyve suyu kolaylıkla işlenebilir. Bu enzimler, meyvelerin etli kısımlarının yumuşatılması, çözülmesi ve çöktürülmesinde önemli bir role sahiptir. Pektin içeren meyve suyunun geleneksel çöktürme metodu; santrifüjleme, enzimatik olarak pektinin parçalanması, bentonit ve jelatin gibi maddelerle bulanıklığı giderme ve diatomik toprakla filtrasyonu içermektedir. Meyve suyundaki pektinli maddeler membran teknolojisi ile de ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon kullanılarak uzaklaştırılabilir (Arunachalam ve Asha, 2010).

4.4.2. Pektinazların Tekstil İşleme ve Pamuk Liflerinin Parlatılmasında Kullanımı

Tekstil üretiminde enzimlerin kullanımı, hem çevresel açıdan hem de ürün kalitesi açısından oldukça yararlı sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Kumaş üretimi sürecinde ipliklerin aşınmasını engellemek için kumaş iplikleri dokumadan önce kola ajanları ile kaplanmaktadır. Pamuk kumaş üretiminde, düşük maliyeti, kolay elde edilebilirliği ve iyi film tabakası oluşturmamasından dolayı nişasta temel kola ajanı olarak kullanılmaktadır. Kullanılmış olan kola ajanları ve ipliğin yapısındaki selüloz olmayan maddelerin kumaş boyanmadan önce ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Geleneksel yöntemde ise bu maddeleri uzaklaştırmak için kumaşlar, enzimler yerine aşındırıcı soda ile yüksek sıcaklıkta muamele edilmektedir. Soda kullanımı yöntemi, hem pamuğun doğal yumuşak dokusuna hasar vermekte hem de safsızlıkların tamamen uzaklaştırılmasında etkili sonuç vermemektedir (Hoondal vd., 2002). Amilaz, lipaz, selulaz ve diğer hemiselülotik enzimlerle beraber pektinaz gibi enzimlerin kullanılması, tekstil endüstrilerinde sert kimyasalların kullanımını ve çevreye atık kimyasalların deşarjını azaltmakta ve tekstil çalışanlarının çalışma şartlarını ve fabrika kalitesini iyileştirmektedir (Arunachalam ve Asha, 2010). Biyoparlatma, belirli enzimlerle lifden selülozik olmayan maddelerin giderimi için kullanılan bir prosedir. Pektinazlarda selüloz degradasyonunda hiçbir yan etki olmaksızın bu amaç için kullanılmaktadır (Jayani vd., 2005; Wang vd., 2007).

4.4.3. Pektinazların Bitki Dokularının Yumuşatılması ve Pişirilmesinde Kullanımı

Bast fiberleri; çin keneviri ve kenevir gibi gruplardan oluşmuş yumuşak fiberlerdir. Fiberler, tekstilde kullanılmadan önce uzaklaştırılması gerekli olan zamburak türü maddeler içerir. Zamburak gidermek için kullanılan kimyasal pişirme işlemi, toksik ve biyolojik olarak parçalanamayan kirletici oluşturan bir işlemdir. Ksilanaz ile beraber pektinaz kullanılarak yapılan biyoteknolojik pişirme işlemi yukarıda problemlere ekolojik olarak dost ve ekonomik bir alternatif sağlar (Jayani vd., 2005).

Pektinazlar, fiberleri ayırmak ve pektinleri uzaklaştırmak için ketenlerin yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Jayani vd., 2005). Bitki dokularının yumuşatılması, dokuların bütünlüğü bozulmamış hücrelere çevrilmesi işlemidir. Bu şekilde elde edilen ürün; bulanık meyve suları ve nektarları, puding ve yoğurt gibi günlük yiyeceklerin katkı maddeleri ve bebek ek besinleri için temel materyal olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin çoğu bozulmamış olarak korunabilirse, ılımlı bir mekaniksel işlemden sonra pektin moleküllerinin enzimatik parçalanması ürünün özelliklerini arttırmaktadır. Enzimatik işlemin amacı, dokunun bozulmamış hücre süspansiyonlarına dönüştürülmesidir. Pektinlerin parçalanması ile sadece bitki dokusunun orta lameli etkilenmekte, bitki hücresinin bütünlüğüne zarar vermeden süspansiyonlar oluşturulmaktadır (Kashyap vd., 2001).

4.4.4. Pektinazların Çay ve Kahvenin Fermantasyonunda Kullanımı

Pektinazlar çay ve kahvenin fermantasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Pektinolitik mikroorganizmalar, kahvenin fermantasyonunda kahve taneciklerindeki yapışkan tabakayı uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Pektik enzimler, bazen kahve taneciklerinin üzerindeki, dörte üçü pektik maddelerden oluşan etli tabakayı uzaklaştırmak için de kullanılmaktadır. Sulandırılmış ticari enzim preparatları, 15-20 °C’ de ton başına 20 g dozajında kahve taneciklerine spreylenebilir. Kahve işlenmesinin fermantasyon adımı enzimatik muamele ile hızlandırılmış ve süre 40-80 saatten 20 saate azalmıştır (Kashyap vd., 2001).

Fungal pektinazlar çay işletmelerinde de kullanılmaktadır. Pektinazla muamele çayın fermantasyonunu hızlandırır. Ancak, enzim dozajı çay yapraklarının hasar görmesini

önlemek için dikkatli ayarlanmalıdır (Kashyap vd., 2001). Çaydaki pektinlerin parçalanması ile yeni oluşan çay tozlarının köpük oluşturma ihtimalini de önlemektedir (Kashyap vd., 2001; Hoondal vd., 2002; Jayani vd., 2005).

4.4.5. Pektinazların Pektik Atık Suların Arıtımında Kullanımı

Turunçgilleri işleyen endüstrilerin atık suları, aktif çamur arıtımı sırasında mikroorganizmalar tarafından kolayca parçalanamayan pektik maddeler içermektedir. Turunçgilleri işleyen endüstrilerin atık sularının arıtımı; susuzlaştırma, sprey sulama, koagülasyon, aktif çamur yöntemi ve hidrolizi takiben metan fermentasyonu adımlarından oluşmaktadır. Fakat bu süreçlerin, pektik maddelerin kimyasallara karşı dayanıklılığından dolayı düşük verim, maliyetinin fazla olması, işlem süresinin uzunluğu ve işlem süreçlerinin karmaşıklığı gibi bazı zaafiyetlere sahip olduğu bilinmektedir (Kashyap vd., 2001; Hoondal vd., 2002). Endo pektat liyaz salgılayan yumuşak çürükçül patojen *Erwinia carotovora* (FERM P-7576)'ın pektinli atık suların ilk arıtımında faydalı olduğu belirtilmiştir. Ancak, bitki patojenlerinin tehlikeli olmasından dolayı, bakterilerden üretilmiş pektinolitik enzimlerle dolaylı ilk arıtım karşılaştırılmış ve atıksulardaki pektik maddelerin tamamını parçaladığı tespit edilmiştir (Kashyap vd., 2001). Böylece; atık sulardan pektik maddelerin seçici olarak uzaklaştırılmasında bakterilerden elde edilen pektinaz kullanımı, çevreyle dost, uygun maliyetli, alternatif bir metottur. Alkalofilik toprak izolatı, *Bacillus sp.* GIR 621' den üretilmiş hücre dışı endo pektat liyaz (pH 10' da optimum olarak aktif) endüstriyel atık sulardan pektik maddeleri gidermek için etkili olarak kullanılmaktadır (Hoondal vd., 2002).

4.4.6. Pektinazların Kâğıt Yapımında Kullanımı

Kâğıt ve kâğıt hamuru üretimindeki bazı sorunları çözmek için enzimler kullanılmaya başlanmıştır. Kâğıt yapımında su ile süspanse edilmiş liflerin ve inorganik dolgu maddelerinin (kalsiyum karbonat ve kil) sürekli filtrasyonu esastır. Suyun yaprakтан çekilmesi için suyun yanı sıra liflerin ve dolgu materyallerinin de geçmesine izin veren kumaşlar kullanılmaktadır. Modern kâğıt yapımında, suyun çekilmesini hızlandırmak ve kâğıt yaprağını oluşturan dolgu materyallerinin ve lifleri korumak için tutucu maddeler kâğıt hamuruna ilave edilmektedir. Katyonik yapıdaki çeşitli polimerler, tutucu maddeler

olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kağıt hamurunun alkali peroksit ağartılması esnasında, polisakkaritler çözülebilmektedir. Çözülen bu polisakkaritler, pektinler veya poligalakturonik asitlerdir. Poligalakturonik asitlerin katyonik polimerlerle (tutucu maddeler) kompleks yapabilmesi polimerizasyon derecesine bağlıdır. Monomer, dimer ve trimer galakturonik asitler katyonik polimerlerle kompleks oluşturmazken hekzamer ve daha uzun zincirli poligalakturonatlar katyonik polimerlerle kompleks oluşturabilmektedir. Pektinazlar, galakturonik asit polimerlerini parçalayarak katyonik polimerlerle kompleks oluşturmalarına engel olmaktadır. Böylece suyun filtrelenmesi esnasında dolgu maddeleri ve lifler korunarak daha kaliteli kâğıt üretimi sağlanmaktadır (Kashyap vd., 2001).

4.4.7. Pektinazların Yağların Ekstraksiyonunda Kullanımı

Kanola, ayçiçeği tohumu, hindistan cevizi veya zeytin gibi yağlı bitkilerin yağlarını ekstrakte etmek için eskiden organik çözücüler kullanılırdı. Kullanılan organik çözücülerin en yaygın olanı kanserojen olduğu bilinen hekzandır. Günümüzde ise yağlar, hücre duvarını parçalayan enzimler kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Pektinazlar ve diğer enzimler yağlı bitkinin hücre duvarlarını parçalayarak yağların ekstraksiyon işlemine yardımcı olmaktadır. Bu yöntem organik çözücülere tercih edilmektedir. Son zamanlarda, bitki hücre duvarını parçalayan enzim preparatları zeytinyağında kullanılmaya başlanmıştır. Enzimler, zeytinlerin öğütülmesi sırasında ilave edilmektedir. Böylece yağ, uygun ayırma tekniğiyle kolaylıkla salıverilir. Enzimle muamele sonucu zeytinyağı veriminde de artış olmuştur. Verimdeki artış; pK, sıcaklık ve kullanılmış olan enzimin dozajına bağlıdır. Pektinolitik aktivite ve ayrıca hemiselülaz ve selulolitik aktiviteye sahip Olivex isimli enzim preparasyonu, iyi bir yağ ekstraksiyonu ve depolandığında daha iyi kararlılık göstermektedir. Ayrıca, ekşimeye karşı yağın kararlılığını koruyan polifenol ve E vitamini içeriği de artmıştır (Kashyap vd., 2001).

4.4.8. Pektinazların Kümes Hayvanlarının Yemlerinde Kullanımı

1980' lerin başlarında kümes ve diğer hayvan yemlerine çeşitli enzimler ilave edilmeye başlanmıştır. İlk ticari başarı, arpaya dayalı gıda diyetlerine β -glukanaz ilavesidir.

Enzimler buğdaya dayalı diyetlerde de test edilmiştir. Ksilanaz enziminin, bu durumda etkili enzim olduğu bulunmuştur. Enzim ve yem karışımı hazırlanmasında genellikle, glukanaaz, proteaz, pektinaaz ve amilaz enzimleri kullanılmaktadır. Hayvan yemlerine enzim ilave edilmesinin amacı, hayvanlar için aynı miktarda yem tüketerek daha fazla et verimi elde etmektir. Enzimlerin yemlere ilave edilmesi, besinlerin absorpsiyonunu artırmakta, dışkı miktarlarını azaltmakta, lifleri hidrolizleyerek aralarında bulunan besinlerin serbest kalmasını sağlamakta ve böylece besin değerini yükselterek hayvanların aynı miktarda yem yiyerek daha fazla kilo almasını sağlamaktadır. Petersen, piliçlerin sebze ve protein karışımı olan yiyeceklerine pektinaaz, glukanaaz ve selülaaz içeren enzim karışımını ilave etmiştir. İlave edilen bu enzimlerin etkisiyle piliçlerin kilolarının nasıl değiştiği 49 gün boyunca incelenmiş ve sonuçta piliçlerin önemli ölçüde kilo aldıkları belirlenmiştir (Hoondal vd., 2002).

5. DENEY SİSTEMİNİN MATEMATİKSEL ve İSTATİSTİKSEL TANIMLANMASI

5.1. Mikroorganizmanın Üremesi

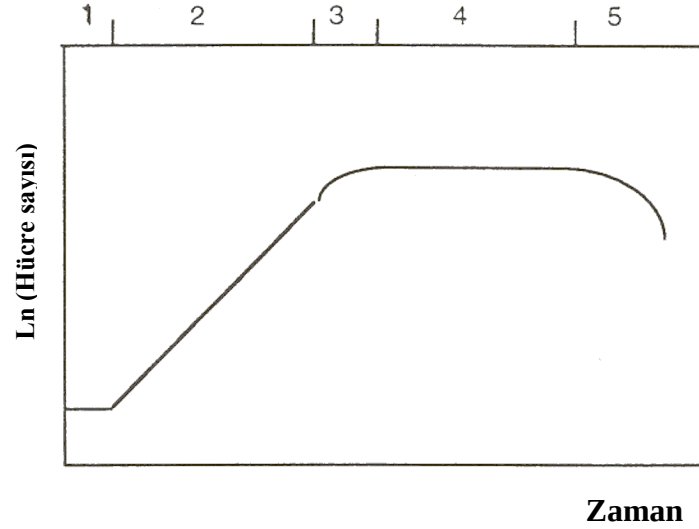
Mikroorganizmalar, bulundukları ortamdaki besin maddelerini alarak hücresel bileşiklere dönüştürürler ve bölünerek ürerler. Üreme ya mikroorganizmaların sayısal artışı ya da kütleli artışı şeklinde olur. Mikroorganizmaların kesikli sistemde üremesinde 5 dönem gözlenir (Şekil 5.1.) (Shuler ve Kargı, 2002).

1- Gelişme ya da Gecikme Evresi: Mikroorganizmaların yeni ortama uyum sağlayıp, çoğalmaya başlayıncaya kadar geçirdikleri bekleme dönemidir. Bu dönemde besi ortamının bileşimine ve şartlara göre mikroorganizmaların içyapısında bazı değişiklikler olur. Yeni enzimler üretilir ve bazı enzimlerinde üretimi durdurulur. Bu evrede hücre ağırlığı çok az artsa bile hücre sayısında bir değişiklik olmaz. Ekonomik açıdan bu sürenin kısa olması istenir. Bu nedenle yüksek derişimde aktif hücre kütlesi aşısı olarak kullanılmalı, ortam şartları uygun olmalı ve ortamda toksik özellik gösterebilecek madde bulunmamalıdır.

2- Logaritmik ya da Üstel Üreme Evresi: Mikroorganizma derişimi belli bir düzeye ulaşıncıa üstel üreme evresine gelinir. Ortama uyum sağlayan mikroorganizmalar, bu dönemde maksimum hızla büyürler. Bu dönemde mikroorganizmaların canlı, genç ve dinç olduğu kabul edilir ve ölüm yok sayılır. Hücrelerin kütlesi zamanla üstel olarak artar ve büyüme hızı besi maddesi derişiminden bağımsızdır.

3- Duraklama Evresi: Bu evrede mikroorganizmaların yaşlanması ve ölüm olayının belirginleşmesi nedeni ile logaritmik evreye kıyasla üreme hızında azalma gözlenir.

4- Sabit Evre: Bu evrede kimi mikroorganizma ürer, kimileri ölür ve bazıları da üremeden yaşamlarını sürdürür. Bu üç etken birbirini dengelediğinden hücre derişiminde zamanla net bir artma ya da azalma olmaz. Sabit evrede toplam hücre kütlesi sabit kalmakla birlikte canlı ve aktif hücre derişimi düşer. Dış ortamda yeteri kadar besin maddesi kalmadığından mikroorganizmalar hücre içi kaynakları tüketirler. Bu dönemi geciktirebilmek için toksik maddeler ortamdaki uzaklaştırılmalıdır.



Şekil 5.1. Mikroorganizmaların üreme evreleri (1-Gelişme veya gecikme evresi, 2-Logaritmik veya üstel üreme evresi, 3-Duraklama evresi, 4-Sabit evre ve 5-Ölüm evresi)

5- Ölüm Evresi: Mikrobiyal kinetiğin son evresi olan bu evrede mikroorganizmanın ölüm hızı arttığı için zamanla derişiminde azalma gözlenir ve bu evreye ölüm evresi adı verilir. Ölüm evresi başlamadan önce hücreler taze besin ortamına aktarılırsa yeniden büyüyebilirler (Bailey ve Ollis, 1986; Kargı, 1993).

5.1.1. Mikroorganizmaların Üreme Kinetiği

Kesikli sistemde üstel üreme bölgesinde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi özgül üreme hızı ile karakterize edilir ve aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (5.1.)$$

Burada;

X: Kuru mikroorganizma derişimi (g/L)

μ : Özgül üreme hızı (sa^{-1}).

Bu eşitlik;

t=0 anında $X=X_0$

t=t anında $X=X$

Sınır şartları ile çözüldüğünde Eşitlik 5.2. elde edilir.

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (5.2.)$$

Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumda mikroorganizmanın büyüme hızı substrat derişimine bağı olarak Monod eşitliği ile ifade edilir (Shuler ve Kargı, 2002).

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad (5.3.)$$

Burada;

μ_{max} : Mikroorganizmanın maksimum özgül üreme hızı (sa^{-1})

K_S : Monod sabiti (Substrat doygunluk derişimi) (g/L)' dir.

Eşitlik 5.3.' ün doğrusallaştırılmış şekli Eşitlik 5.4. ile gösterilebilir:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_S}{\mu_{max}} \frac{1}{S} \quad (5.4.)$$

5.2. Biyoreaktörde Oksijen Transferi

Birçok mikrobiyal proses aerobiktir ve bu proseslerde mikroorganizmalar solunum, çoğalma, ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, bir gaz akımından yeterli oksijen sağlanması önemlidir (Garcia-Ochoa ve Gomez, 2009). Oksijen aktarımının eksikliği ya da fazlalığı ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Bir biyoteknolojik proseste oksijen gereksinimi ve aktarımı, mikroorganizma türüne, üretim ortamının fiziksel özellikleri ile biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonuna bağlıdır. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen aktarımı oksijen/hava giriş hızı ve karıştırma hızı ile birlikte önemli biyoreaktör işletim parametreleridir. Aerobik üretim proseslerinde mikrobiyal hücrelere oksijenin aktarım hızı, biyolojik dönüşüm hızının belirlenmesinde önemli bir kısıtlayıcı etkidir. Çünkü biyokimyasal reaksiyonların hızları üretim ortamına aktarılan oksijenin aktarım hızına oranla genel olarak daha

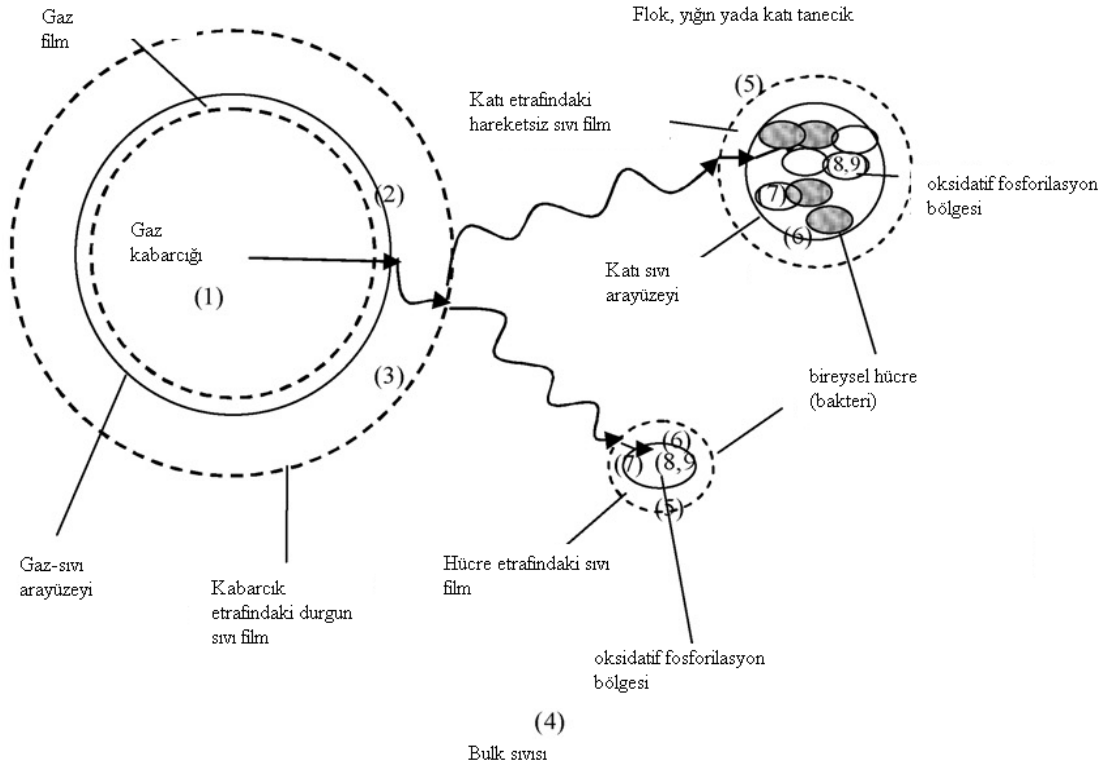
yüksektir (Demirci, 2006; Yılmaz, 2008). Bazı prosesler de yüksek oksijen transfer hızları gerekiyken bazılarında oksijen alım hızlarını düzenlemek için kontrollü oksijen transfer hızları gereklidir. Biyoreaktör dizaynı, ölçek büyütme ve işletimi için, bir fermantasyon prosesinin kütle transfer karakteristiklerinin göstergeleri olan oksijen tüketim hızları ve oksijen transfer katsayıları gereklidir. Ancak, fermantasyon sıvısının kompleks bileşiminden dolayı bu parametreleri tahmin etmek güç olabilir (Korkmaz, 2007).

Oksijen transferi, fiziksel bir olaydır. Bu nedenle, oksijen tüketimi biyokimyasal reaksiyonlar sırasında gerçekleşirken oksijen transfer hızı (OTH) tahmin edilebilir ve oksijen alım hızı (OAH) ölçülebilir (Haykır, 2007).

Bir gaz kabarcığından mikroorganizmaya oksijenin transferi Şekil 5.2.' de görüldüğü gibi dokuz adımda gerçekleşir (Bailey ve Ollis, 1986; Garcia-Ochoa vd., 2010).

1. Oksijenin gaz yığınının gaz-sıvı ara yüzeyine aktarımı,
2. Gaz-sıvı ara yüzeyinde çözünme (Oksijenin gaz fazdan sıvı faza geçişi),
3. Çözünmüş gazın kabarcığı çevreleyen durgun sıvı filminde aktarımı,
4. Çözünmüş gazın sıvı yığında aktarımı,
5. Çözünmüş gazın hücreleri çevreleyen durgun sıvı filminde aktarımı,
6. Çözünmüş gazın sıvı-hücre ara yüzeyi boyunca aktarımı: eğer hücreler bir flock, yığın ya da katı parçacıktaysa, hücrelere katı boyunca aktarım,
7. Reaksiyonların gerçekleştiği yere kadar sitoplazma boyunca aktarım,
8. Oksijen tüketimi ve CO₂ ya da diğer gazların üretimini içeren biyokimyasal reaksiyonlar,
9. Üretilmiş gazların ters yönde taşınımı.

Oksijenin su içerisindeki çözünürlüğü düşüktür. Bu nedenle oksijen aktarımında gaz filminin direnci sıvı film direncine kıyasla ihmal edilebilir düzeydedir. Biyoproses ortamında karıştırma hızının veya havalandırma hızının artırılmasıyla hava kabarcıkları çevresindeki film dirençleri kırılarak oksijenin biyodönüşüm ortamındaki aktarım hızı artırılabilir. Hücre kümeler oluşturmuyorsa altıncı adım ortadan kalkacaktır. Hücreler ara yüzeylere adsorplanma eğiliminde olduklarından çözünmüş oksijen tek bir sıvı film direncini aşmak durumunda kalabilir.



Şekil 5.2. Bir gaz kabarcığından hücreye oksijen transferinin adımları (Garcia-Ochoa vd., 2010).

Oksijenin biyoproses ortamındaki çözünme hızı hava kabarcıkları çevresinde yeni filmin oluşma hızı ile kontrol edilir. Eğer biyoproses ortamı iyi bir şekilde karıştırılamıyor ve sıvı faz içinde derişim profilleri önemli ise sıvı yığındaki oksijen aktarım dirençleri de hızı kısıtlar. Bu nedenle sıvı fazdaki tüm oksijen aktarım dirençlerini azaltmak için biyoproses ortamı mekanik ve/veya gaz girişi ile karıştırılmalıdır. Bu durumda, oksijen moleküllerinin biyoproses ortamında mikrobiyal hücrelere taşınımı hem moleküler aktarım hem de konvektif aktarım ile gerçekleşir (Bailey ve Ollis, 1986).

Hücre kümesi içinde difüzyon ve ara yüzeylerden (gaz-sıvı, sıvı-hücre kümesi ve hücre zarı) geçiş direnç oluşturmuyorsa birim hacim başına gazdan sıvıya oksijen aktarım hızı (OTH), sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı cinsinden aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$OTH = k_L a (C_o^* - C_o) \quad (5.5.)$$

Burada k_L , oksijen aktarım katsayısı (m/saniye), a , gaz-sıvı ara yüzey alanıdır (m^2/m^3). $k_L a$ hacimsel oksijen transfer katsayısı ($saniye^{-1}$), C_o^* doymunluk çözünmüş oksijen

konsantrasyonu (kg/m^3), C_o sıvı besiyerindeki gerçek çözünmüş oksijen konsantrasyonudur (kg/m^3).

Oksijen alım hızı ise OAH ile ifade edilmiştir, q_o ($\text{mg L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) spesifik oksijen tüketim hızıdır;

$$\text{OAH} = q_o \cdot X \quad (5.6.)$$

Oksijenin sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısı k_{La} , biyoreaktörlerde gaz-sıvı kütle akarım hızını gösteren kritik bir parametredir. k_{La} , mikroorganizma türüne, fermantasyon ortamının fizikokimyasal özelliklerine, biyoreaktörün ve karıştırma sisteminin tasarımına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır (Demirci, 2006). k_{La} tahmin edilmesi güç ancak ölçülebilir bir parametredir. k_{La} 'nın hesaplanması için çeşitli deneysel ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Yaygın olarak kullanılan dört yaklaşım; yatışkın olmayan durum, yatışkın durum, dinamik ve sülfite testi yöntemleridir. Tuzların ve yüzey aktif maddelerin varlığı kabarcık boyutunu ve gaz kabarcığı etrafındaki sıvı film direncini oldukça değiştirir. Bu faktörler oksijenin çözünürlüğünü de (C_o^*) etkileyebilir. k_{La} ve C_o^* sıcaklık ve basınçtan da etkilenmektedir (Shuler ve Kargı, 2002).

Dinamik metot biyoreaktör içinde aktif olarak büyüyen organizmaların solunum aktivitesine dayanır. Fermantasyon sıvısına giren hava akışı birkaç dakika boyunca kesilir ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu bir oksijen probuyla takip edilir. Daha sonra hava önceki işletme şartları altında tekrar verilir. OAH, hava akışı kesildikten sonra çözülmüş oksijen konsantrasyonunun azalmasından belirlenir ve prosedür üretim prosesi boyunca birkaç dakika tekrarlanabilir. Bu şartlarda denklem şu şekilde basitleştirilebilir:

$$\frac{dC}{dt} = -q_o \cdot X = \text{OAH} \quad (5.7.)$$

Burada, OAH hava akışı kesildikten sonra zamana karşı çözülmüş oksijen konsantrasyonu eğrisinin eğiminden hesaplanır. Temel varsayım, test sırasında gaz ve sıvı arasında hiçbir oksijen değişiminin olmadığı ve gaz sirkülasyonu durdurulurken bağlantılı akış dinamiklerinde bir değişimin OAH'ı etkilemediğidir. Hava tekrar verildiğinde çözülmüş oksijen konsantrasyonu denge halindeki konsantrasyona kadar artar. Bu şartlarda hem oksijen transfer hızları hem de oksijen alım hızı ifadeleri uygulanır. Zamanla

oksijen derişiminin değişimi şekil 5.3.' de verilmiştir. Dinamik metotda kütle denkleği yazılırsa;

$$\frac{dC}{dt} = OTH - OAH \quad (5.8.)$$

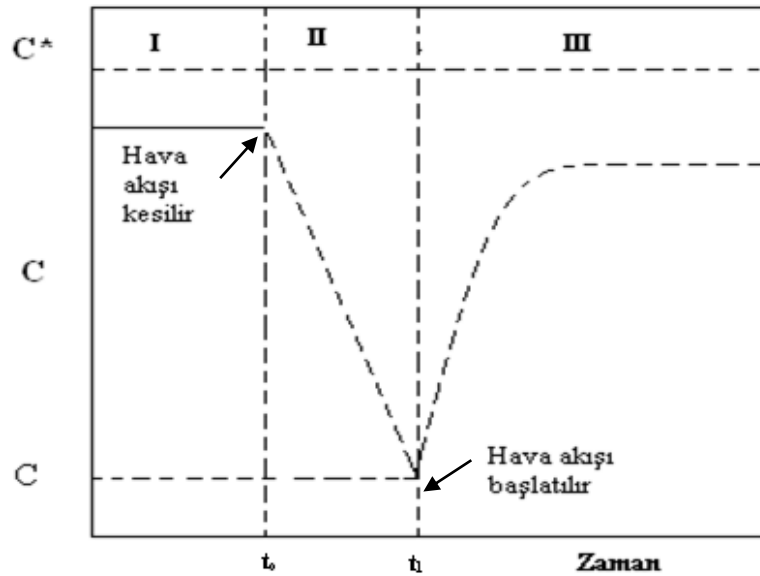
ya da

$$\frac{dC}{dt} = k_L a C^* - C + q_o X \quad (5.9.)$$

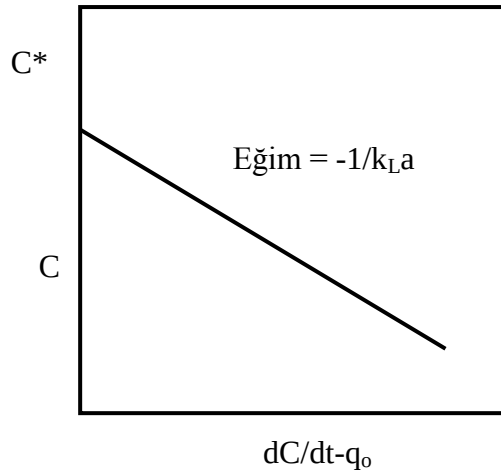
Bu denklem şu hale çevrilir;

$$C = -\frac{1}{k_L a} \frac{dC}{dt} - q_o + C^* \quad (5.10.)$$

Burada C' ye karşı (dC/dt-q_o) grafiğe geçirilirse (şekil 5.4.), eğrinin eğiminden k_La hesaplanır (Bandyopadhyay ve Humphrey, 1967; Garcia-Ochoa vd., 2010).



şekil 5.3. Dinamik metotda göre çözünmüş oksijen konsantrasyonunun değişimi (Ochoa ve Gomez, 2009).



Şekil 5.4. Hacimsel kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

5.3. Tepki Yüzey Metodu

Tepki Yüzey Metodu (Response Surface Methodology) ya da TYM (RSM), problemlerin modellenmesi ve analizlenmesi için faydalı matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamıdır. Bu yöntem, birden fazla faktörün etkilediği birkaç tepkinin optimum değeri alması için optimizasyon yapabilmektedir. Tepki Yüzey Metodu 3 aşamadan (dizayn ve deneyler, tepki yüzey modelleme ve işlemin veya ürünün optimizasyonu) oluşmaktadır (Gönen ve Aksu, 2009). Yöntem ilk kez Box ve Wilson tarafından 1951’ de ortaya atılmıştır. Örneğin bir prosesin verimini maksimum yapacak x_1 ve x_2 ’ nin seviyelerini bulmak amacıyla proses verimi x_1 ve x_2 ’ nin bir fonksiyonu olarak şu şekilde ifade edilebilir:

$$y = f(x_1, x_2) + \epsilon \quad (5.11.)$$

Burada ϵ tepkide gözlenmiş olan hatayı ifade eder. Eğer beklenen tepki $E y = f(x_1, x_2) = \eta$ olarak belirtilirse, tepki yüzeyi olarak ifade edilen yüzey şu şekilde gösterilir:

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (5.12.)$$

Tepki yüzeyler, genelde grafiksel olarak gösterilmektedir. Tepki yüzeyin şeklini görselleştirmeye yardım etmek için tepki yüzeyin kontur eğrileride çizilir. Kontur eğrisinde

sabit tepkinin hatları x_1 ve x_2 düzleminde çizilir. Her bir kontur, tepki yüzeyin belirli bir yüksekliğine tekabül eder.

Çoğu TYM problemlerinde tepki ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin şekli belirsizdir. TYM' de ilk adım, tepki (y) ve bağımsız değişkenler seti arasındaki gerçek fonksiyonel ilişki için uygun bir yaklaşım bulmaktır. Genelde bağımsız değişkenlerin bazı bölgelerinde düşük dereceli bir polinom kurulur. Eğer tepki bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonuyla modellenmişse, yaklaşım fonksiyonu aşağıdaki eşitlikte verildiği gibi birinci derece bir modeldir.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots + \beta_k x_k + \epsilon \quad (5.13)$$

Burada; y , Bağımlı değişken; $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, Bağımsız değişken; β_0 , Sabit değer; $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_n$, Regresyon katsayıları olarak ifade edilmektedir.

Eğer sistemin tepki yüzeyinde bir eğrilik varsa, ikinci derece bir model gibi yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır. İkinci dereceden model ise aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmektedir:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (5.14.)$$

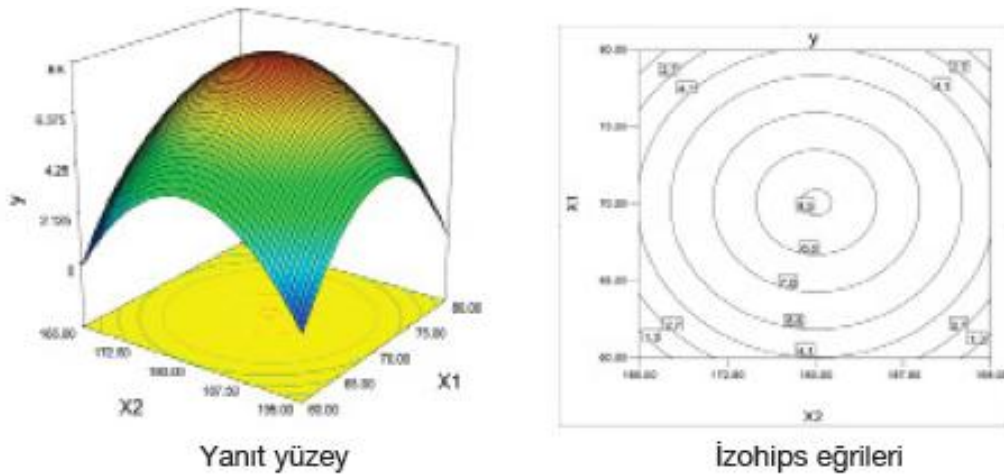
Çoğu TYM problemlerinde bu modellerin her ikisi ya da biri kullanılır. Polinom model, bağımsız değişkenlerin tam boşluğu üzerinde gerçek fonksiyonel ilişkinin tam bir yaklaşımı değildir, fakat nispeten küçük bölgeler için genelde çok iyi çalışır.

En küçük kareler metodu, yaklaşım polinomlarında parametreleri hesaplamak için kullanılmaktadır. Daha sonra uyum yüzeyi kullanılarak tepki yüzey analizleri gerçekleştirilir. Eğer uyum yüzeyi gerçek tepki fonksiyonunun uygun bir yaklaşımı ise, uyum yüzeyinin analizi gerçek sistemin analizi için uygun bir denkliktir. Eğer verileri toplamakta uygun deneysel yöntemler kullanılmışsa model parametreleri çok verimli bir şekilde hesaplanabilir (Montgomery, 2009).

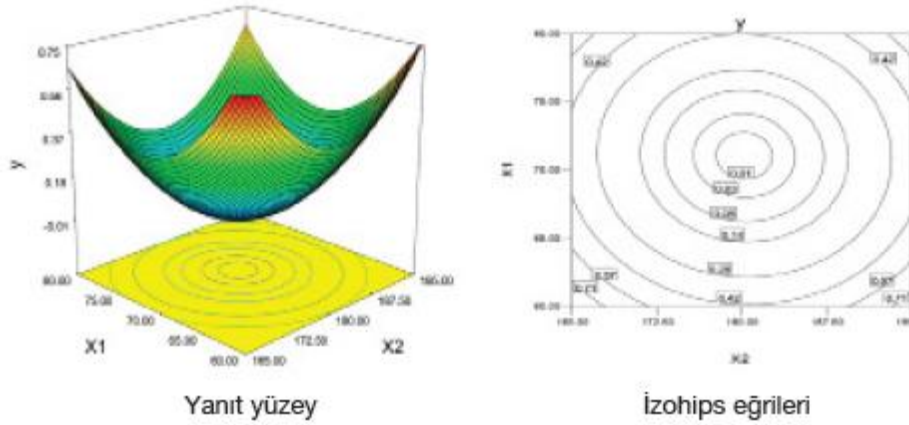
Tepki yüzey yöntemi uygulaması için üretilmiş çoğu paket program ikinci dereceden polinom model kullanmaktadır. İkinci dereceden polinom bir modelde sadece bir tane bölgesel minimum veya bölgesel maksimum noktası olduğu için optimizasyon çalışmasında ikinci dereceden polinom bir model kullanımı kolay bir yaklaşımdır. Eğer ikinci dereceden bir modele uygun değilse yanıtın veya bağımsız değişkenlerin

transformasyonu yapılarak veya bağımsız değişkenlerin aralıkları uygun bir şekilde değiştirilerek yanıtın eğiliminin bu model ile açıklanması sağlanmalıdır. Biyokimyasal proseslerde sıcaklığın etkisi simetrik veya simetrik olmayan çan şeklindeki eğrilerle açıklanabilmektedir. Özellikle simetrik olmayan eğriler için, sıcaklığın etkisini ikinci dereceden polinom bir model ile açıklamak mümkün değildir.

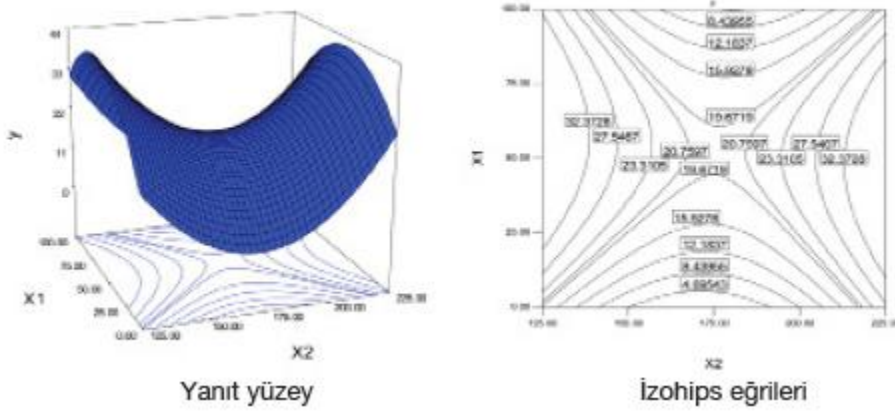
Tepki yüzey metodunda çizilen her bir izohips eğrisi, bir bağımsız değişken merkezdeyken, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Katsayılara bağlı olarak izohips eğrilerinin dairesel, eliptik ya da eğer şeklinde olması; maksimum nokta, minimum nokta, (eyer noktası (saddle point)) durgun tepe ya da yükselen/azalan tepe koşullarını verebilmektedir. Maksimum nokta, minimum nokta ve eyer noktası için tepki yüzey grafikleri ve izohips eğrileri sırasıyla Şekil 5.5. (a-c)' de gösterilmiştir. Tepki yüzeyinin dairesel olması, değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindeki yüzeyler iç etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir. En küçük elips ya da dairesel şekil ile sınırlandırılmış yüzey, öngörülen en yüksek veya en düşük yanıtı belirtmektedir. Ancak bu yaklaşım çok sayıda bağımlı ve bağımsız değişkenin (dört veya daha fazla) bir arada incelendiği durumlar için kullanışlılığını kaybetmektedir. Ayrıca, tepkilerin çok farklı skalaya sahip olması aynı grafik üzerinde gösterilmelerini de zorlaştırmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009).



Şekil 5.5.a. Maksimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri



Şekil 5.5.b. Minimum nokta için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri



Şekil 5.5.c. Eyer noktası için tepki yüzey grafiği ve izohips eğrileri

5.3.1. Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması

Deney tasarımı yapılırken kaç deney yapılacağı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır,

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k < 5 \quad (5.15)$$

$$N = 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (5.16)$$

N = Deney sayısı

k = Bağımsız değişken sayısı

n_0 = Merkezdeki deney sayısını ifade eder.

Bağımsız değişken düzeyleri (α)' de Eşitlik 5.17. ve 5.18. yardımı ile hesaplanır.

$$\alpha = 2^{k/4} \quad k < 5 \quad (5.17.)$$

$$\alpha = 2^{(k-1)/4} \quad k > 5 \quad (5.18.)$$

Bağımsız değişkenler kullanılarak, n tane gözlenen verinin gösterimi aşağıdaki gibidir.

$$\begin{Bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{Bmatrix} + \begin{Bmatrix} \varepsilon_0 \\ \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{Bmatrix} \quad (5.19.)$$

$$y = X\beta + \varepsilon$$

β katsayı vektörü, en küçük kareler farkı yöntemi kullanılarak elde edilen yukarıdaki eşitlik ile hesaplanır.

5.3.2. Tepki Yüzey Metodu (TYM) için Kullanılan Tasarım Modelleri

TYM; tepki (response) değişkenine etki eden çok sayıda değişkenin olması durumunda; problemlerin analiz edilmesinde kullanılan istatistiksel tekniklerin ve matematiksel ifadelerin birleşimidir. Yeni ürünün formülasyonunda, var olan ürün tasarımının iyileştirilmesinde, süreç tasarımında, sürecin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. TYM için kullanılan tasarım modelleri Doehlert Matrix (DM), Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central composite design) ve üç boyutlu dizayn modeli olan Box-Behnken tasarımı (BBD)' dir. Ancak ikinci dereceden modeller içermesi ve üç boyutlu grafikler çizilebilmesi nedeniyle CCD ve BBD tasarımları daha çok kullanılmaktadır.

CCD merkezi bileşke tasarımında, yüksek ve düşük değerler arasında değişen bağımsız değişken değerleri vardır. Yönteme uygunluk açısından, bağımsız değişkenler -1 ve +1 arasında değişmelidir. Bunun için en küçük değer -1 ve en büyük değer +1 olarak tanımlanır. Orta değer olarak ise 0 değeri alınır. Bir merkezi bileşke tasarımı, -1 ve +1 aralığında değişen bir kübün köşelerinde küp noktaları, kübün dışında yıldız noktaları ve orijinde merkez noktaları içermektedir (Erşan, 2011).

5.3.3. Regresyon Analizi

Tepki değişkeni veya bağımlı değişken olarak tanımlanan “y” ve bağımsız değişken veya regresör olarak tanımlanan n adet “ $x_1, x_2 \dots x_n$ ” arasındaki sebep sonuç ilişkisini matematiksel olarak ortaya koyan yöntem regresyon analizi denilmektedir. Regresyon

analizi sonucunda bağımlı değişken bağımsız değişken cinsinden ifade edilerek, bir eşitlik elde edilmekte ve farklı olaylar ile ilgili tahminler yapılabilmektedir.

5.3.3.1. Bağımlı değişken

Tepki değişkeni veya yanıt olarak da adlandırılmaktadır. Çalışmada elde edilen pektin liyaz, endo ve ekzo pektinaz aktiviteleri bağımlı değişken olarak değerlendirilmektedir.

5.3.3.2. Bağımsız Değişken

Regresör olarak ta tanımlanan, bağımlı değişken üzerinde etkisi olan değişkenlerdir. Çalışmada katı substrat, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları bağımsız değişken olarak değerlendirilmektedir.

Regresyon analizi sonucu elde edilen fonksiyon istatistiksel bir fonksiyon olduğundan her x değerine karşılık gelen y değeri aynı olmayıp regresyon denklemi ile elde edilen değer etrafında yer alan ve normal dağılıma benzer dağılım gösteren değerleri içerebilmektedir. Bu nedenle regresyon analizi sonucunda bulunan denklemin geçerliliği belirli bir güven aralığında ifade edilmektedir. Çalışmada kullanılan güven aralığı ise % 95 ($\alpha=0.05$) olarak belirlenmiştir.

5.3.3.3. F- Testi

Normal dağılıma sahip iki kitlenin standart sapmalarının eşit olduğu hipoteze denilmektedir. Standart sapmaların eşit olması halinde iki kitle karşılaştırılabilmektedir.

p-değeri

H_0 : Model uygundur

H_1 : Model uygun değildir

Hipotezler tanımlandığında H_0 hipotezinin reddedilmesini sağlayan en küçük anlamlılık seviyesine p-değeri denilmektedir. İstatistiksel değerlendirmede modelin ortaya çıkardığı parametrelerin modele olan katkısının anlamlı veya anlamsız olarak değerlendirilmesinde kullanılan bir değerdir.

5.3.3.4. Anova

Regresyon modelinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla kullanılan tabloya denilmektedir. Bu tabloda yer alan F-değeri modelin açıkladığı değişimin (modelin kareler toplamı) açıklanamayan değişime (hataların kareler toplamı) oranı olmaktadır. ANOVA tablosunda $p < 0.05$ olması durumunda kurulan modelin anlamlı olduğu anlaşılmaktadır.

Korelasyon katsayısı olarak ifade edilen R, bağımlı değişken ile bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu değer -1...+1 arasında değişmekte olup bağımlı değişken ile bağımsız değişken arasında +1'e yakın bir korelasyon olması istenen bir durumdur. R^2 ise kurulan modelde bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkeni ne kadar açıkladığını yüzde olarak ifade etmektedir. Her ne kadar R^2 modelin açıklanma yüzdesini ifade etse de modele katkısı olmayan terimlerin modelden çıkartılmasıyla daha doğru bir sonuç elde edilir. Elde edilen yeni R^2 değerine ise düzeltilmiş R^2 denilmektedir. Tahmin Edilen R^2 ise modelin yeni olayları tahmin edebilme yeteneğini gösteren bir değer olmaktadır.

PRESS değeri ise (Predicted Error Sum of Squares) modelin tahmin hatalarının bir ölçüsü olarak değerlendirilmektedir. Modelde seçilen bir deney noktası için tahmin edilen değer $\hat{y}_i$ olmak üzere o nokta için bulunan tahmin hatası $e = y_i - \hat{y}_i$ olarak bulunmaktadır. n tane ölçüm noktası için oluşan PRESS değeri ise;

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (5.20.)$$

olmaktadır. Model seçilirken bu değer küçük olması istenmektedir.

5.3.3.5. Uyum Eksikliği (Lack of Fit)

Seçilen modelin uygunluğunu belirlemek amacıyla yapılan teste uyum eksikliği denilmektedir.

H_0 : Model uygundur

H_1 : Model uygun değildir

Hipotezler tanımlandığında elde edilen F-değeri F-tablosunda yer alan değerden büyükse H_0 hipotezi reddedilir. Bu durumda başka bir model seçilmelidir. Uyum

eksikliğinin önemli olması istenmeyen bir durum olduğundan uyum eksikliği tablosunda en yüksek p-değerine sahip olan model seçilmelidir.

5.3.3.6. Artık Analizi

Regresyon analizi ile elde edilen modelin ortaya çıkardığı hata terimleri analiz edilerek modelin tahminlemede kullanılıp kullanılmayacağına karar verilir. Modelden elde edilen hataların dağılımı normal dağılıma uygun olmalıdır. Söz konusu hatalar normal dağılıma uygun bir dağılım gösteriyorsa oluşturulan model tahminlemede kullanılabilir (Beyazıt ve Oğuz, 1998; şen, 2002; Demiryürek, 2009).

6. MATERYAL VE METOT

6.1. Mikroorganizma ve Üretimi

Çalışmalarda, National Center for Agricultural Utilization Research (Microbial Genomics & Bioprocessing Research Unit, Illinois, USA)' den temin edilen NRRL B-212 kodlu *Bacillus pumilus* bakterisi kullanılmıştır. *Bacillus pumilus* bakterisi *Bacillus* cinsinden bir bakteri olup, 0.6-0.7 µm genişlik ve 2-3 µm uzunluğunda çubuksu gram pozitif bir bakteridir. Kimliklendirilmesinde esas problem *Bacillus subtilis*' ten ayrımıdır. *B. pumilus*' un iki önemli ayırt edici özelliği; nütrient agarda çoğu türlerin kolonisinin düz (pürüzsüz) ve hafifce sarı olması ve bazı türlerin aşırı aminoasit ile birlikte biotine ihtiyaç duymasındır. *Bacillus subtilis*' in belirli varyasyonları da bu türün özelliklerine yaklaşıp. Serolojik testler ve spor germinasyon metodu iki türün belirgin bir ayrımını sağlar (Buchanan ve Gibbons, 1974).

Liyofilize halde getirilen bakteri kültürü, önce içinde patates dekstrozu agar bulunan petri tabakları ve tüplerde 30 °C' deki etüvde üretilerek aktifleştirilmiş, daha sonra bu ortamlardan yine glikoz içeren zengin sıvı besin ortamlarına aktarılmıştır. *B. pumilus*' un üretimi için seçilen zengin besi ortamı bileşimi Tablo 6.1.' de verilmiştir. Sterillenip üretime hazırlanan çözeltiliye 1/10 oranında bakteri aşılanmış, üretim, 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL' lik erlenlerde, pH=7, 30 °C sıcaklıkta ve 100 rpm hızındaki çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

6.2. Enzim Üretim Ortamı

Bu çalışmada, *B. pumilus* ile pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz üretimi kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Enzim üretimi çalışmalarında, Quattara ve arkadaşlarının (2008) *Bacillus sp.* ile pektinolitik enzim üretiminde kullandığı besi ortamı kullanılmış ve bileşimi Tablo 6.2.' de verilmiştir. Kesikli düzende derin kültürde yürütülen çalışmalar 150 mL çalışma hacmindeki 500 mL' lik erlenlerde, katı hal fermantasyonu deneyleri ise 100 mL çalışma hacmindeki 250 mL' lik erlenlerde yürütülmüştür. Erlenler, sabit sıcaklık ve çalkalama hızına sahip orbital inkübatöre yerleştirilmiş ve belli bir süre fermantasyona tabi tutulmuştur. Tüm deneylerde zengin besiyerinde üretilen mikroorganizmalar, 1/10 oranında enzim üretim ortamına ilave

edilmiş, fermantasyon çalışmaları 30 °C sıcaklık ve 150 rpm karıştırma hızında yapılmış ve enzim üretimine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir. Çalışılan ortamlarda oluşabilecek her türlü enfeksiyonun engellenmesi için canlı organizmayla yapılan çalışmaların steril şartlarda gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Besin ortamı içeren erlenler, tüpler ve pipetler 1.1 atm ve 121 °C’ de otoklavda 20 dakika tutularak sterillemiştir. Ekim işleminin gerçekleştirildiği çevre, ekimden önce etil alkol ile kimyasal olarak siterillenmiş ve belli bir süre UV lambası kullanılmıştır. Ekimler alev karşısında, sterilizasyonun bozulmayacağı şekilde yapılmıştır. Katı ve sıvı besin ortamında aktif halde üretilmiş mikroorganizma içeren tüp ve erlenler, 4 °C’ de buzdolabında saklanmıştır. Buzdolabında saklanan mikroorganizma 15 günde bir yeni besin ortamlarına nakledilerek mikroorganizmanın aktifliğini koruması sağlanmıştır.

Tablo 6.1. *B. pumilus*’ un üretimi için seçilen zengin besi ortamı bileşimi

Bileşen	Miktar (g/L)
Glukoz	3.0
Pepton	2.0
Maya özütü	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.05

Tablo 6.2. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı (Quattara vd., 2008).

Bileşen	Miktar (% w/v)
Elma pektini	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14
KH ₂ PO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	0.6
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.01

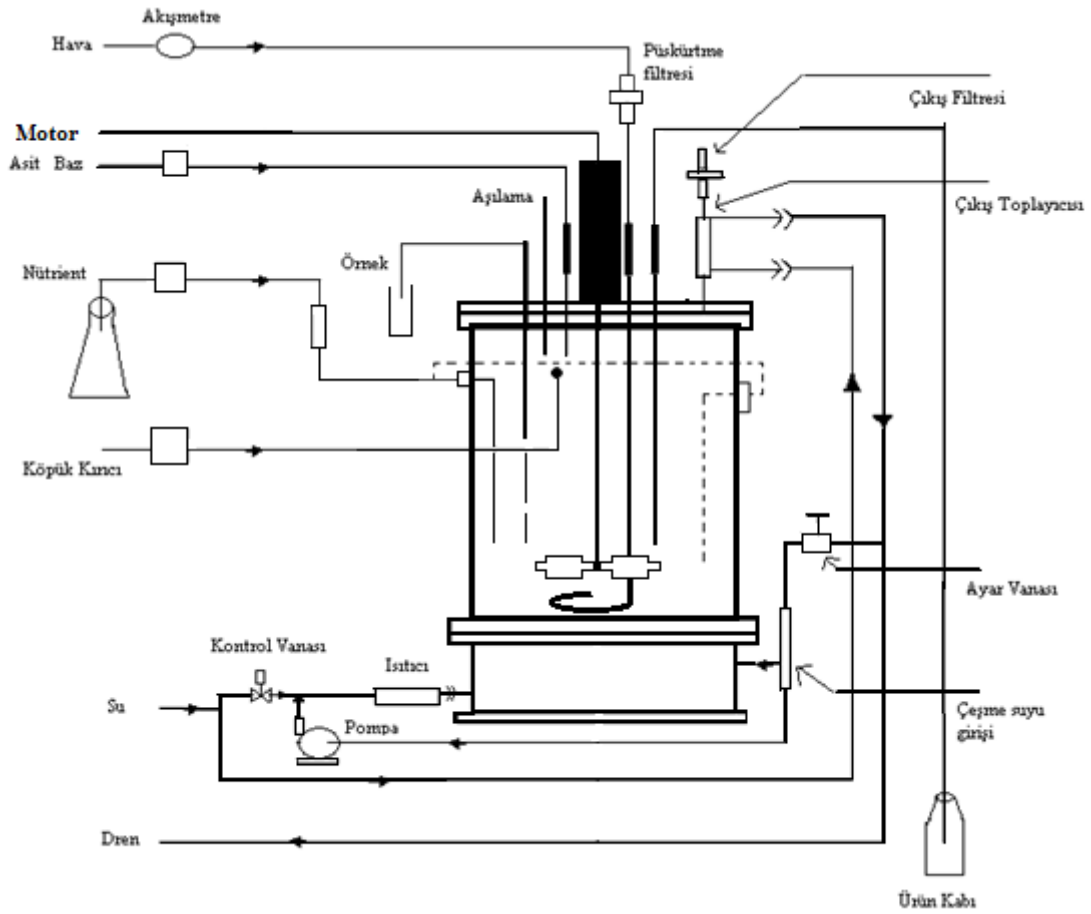
Deneylerde katı substrat olarak kullanılan buğday kepeği yerel bir değirmenden, şeker pancarı küspesi Elazığ Şeker Fabrikasından, portakal kabuğu, elma posası, muz kabuğu, ay çiçeği tablası ve üzüm posası ise yerel pazarlardan temin edilmiş, saf su ile yıkanmış ve 60 °C’ deki etüvde 24 saat süre kurutulmuştur. Daha sonra öğütülmüş ve farklı boyutlardaki eleklerde elenmiştir. 20-100 mesh aralığındaki katı substratlar deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır.

6.3. Biyoreaktör Deneyleri

Pektinaz üretimine karıştırma ve hava akış hızının etkisini belirlemek amacıyla yapılacak deneylerde karıştırma hızı, sıcaklık, çözünmüş oksijen, pH ve hava akış hızı değerlerinin kontrol edilebildiği bir biyoreaktör (New Brunswick Bioflo III) kullanılmıştır. 6 L toplam hacimli, 5 L çalışma hacmine sahip biyoreaktörün hazne bölümü, ısıya dayanıklı silindir şeklinde pyreks camdan oluşmakta ve cam bölmenin üstünde yer alan kapak ile haznenin altına yerleştirilmiş olan çanak şeklindeki taban kısmı paslanmaz çelikten oluşmaktadır. Kapak kısmı üzerinde; steril hava girişi ve çıkışı, pH ve çözünmüş oksijen probları, termovel, aşılama, numune alma, asit-baz, besi ortamı ve köpük kırıcı ilavesi için uygun bağlantılar vardır. Cam kap, üst kapak kablo bağlantıları çıkarıldıktan sonra tümüyle otoklavda sterilize edilebilmektedir (Şekil 6.1.-6.2.). Biyoproses süresince belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde mikroorganizma konsantrasyonu, protein tayini ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.



Şekil 6.1. 6 L hacimli biyoreaktör



Şekil 6.2. 6 L hacimli biyoreaktörün şematik gösterimi

6.4. Analiz Yöntemleri

B. pumilus ile yapılan enzim üretimi çalışmalarında belli aralıklarla fermantasyon ortamından alınan numuneler, 5000 rpm’ de 10 dakika santrifüjlenerek mikroorganizmadan ayrılmıştır. Elde edilen sıvı kısım enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

6.4.1. Mikroorganizma Konsantrasyonu Tayini

Alınan örnekteki yaş *B. pumilus* derişimi g/L cinsinden spektrofotometrik olarak, absorbansa karşı yaş mikroorganizma derişimi çalışma doğrusu yardımıyla tayin edilmiştir. Daha sonra yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusundan yararlanarak g/L cinsinden kuru mikroorganizma derişimine geçilmiştir (EK 1.- EK 2.).

6.4.2. Enzim Aktivite Tayini

Yapılan çalışmada pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

6.4.2.1. Pektin Liyaz Tayini

Pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz aktivitesi, Ramachandran (2005) tarafından önerilen metodun düzenlenmesiyle belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, pektinin parçalanması sonucu oluşan doymamış son ürünler ve tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyona dayanmaktadır (Nedjma vd., 2001). Bir birim aktivite, ölçüm şartları altında birim zamanda birim hacimde 0.01 absorbans değişimine neden olan enzim miktarıdır.

Kullanılan Reaktifler;

- Tris HCl tampon, 0.05 M, pH 8.5
- Pektin, %1.0 (w/v) Tris HCl tamponunda hazırlanmış
- CaCl_2 , 0.01 M distile suda hazırlanmış
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, % 9.0 (w/v) distile suda hazırlanmış
- NaOH, 0.5 M distile suda hazırlanmış
- Tiyobarbitürik asit, 0.04 M distile suda hazırlanmış
- HCl, 0.1 M distile suda hazırlanmış

Yöntem;

5.0 mL pektin çözeltisi, 1.0 mL kalsiyum klorür çözeltisi ve enzim çözeltisi (1.0 mL) içeren reaksiyon karışımının son hacmi distile su ile 10.0 mL' ye tamamlanır. 75 °C' de 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra 0.6 mL ZnSO_4 çözeltisi ve 0.6 mL NaOH çözeltisi ilave edilir. 3000 g' de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek protein ve kullanılmamış substrat çöktürülür. Tiyobarbitürik asit (3.0 mL), hidroklorik asit (1.5 mL) ve distile sudan (0.5 mL) oluşan karışıma 5.0 mL süpernatant eklenir. Karışım kaynayan bir su banyosunda 30 dakika boyunca ısıtılır. Soğutulduktan sonra, ZnSO_4 ve NaOH ilavesinden önce inkübasyon yapılmayan aynı reaktifleri içeren kör çözeltiye (enzim yerine 1.0 mL tampon kullanılmıştır) karşı 550 nm' de absorbansı okunur.

6.4.2.2. Ekzo Pektinaz Tayini

Ekzo pektinaz tayini, pektinin parçalanması sonucu oluşan indirgenmiş şekerlerin (Miller, 1959) ölçümüyle yapılır. Ekzo pektinaz aktivitesi için; pH' ı 10.5 olan 0.1 M glisin-NaOH tamponda hazırlanmış 0.25 mL % 1 pektin çözeltisi ile 0.25 mL enzim örneği 15 dakika boyunca 60 °C' de inkübe edilir. İndirgenmiş şekerler, referans olarak galakturonik asit kullanılarak dinitro salisilik asit (DNS) metoduyla belirlenir. Bir birim ekzo pektinaz aktivitesi, birim zamanda (dakika) 1 µmol galakturonik asit salıveren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde DNS çözeltisinin hazırlanması ve yöntemin uygulama aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. DNS çözeltisi; % 1 DNS, % 0.2 fenol, % 0.05 sodyum sülfat, % 1 sodyum hidroksit, % 30 sodyum potasyum tartarat karıştırılarak saf su ile 100 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
2. Örnek çözeltisi 0.5 mL enzim+substrat çözeltisi (0.25 mL enzim+ pH' ı 10.5 olan 0.1 M glisin-NaOH tamponda hazırlanmış 0.25 mL % 1 pektin çözeltisi 15 dakika boyunca 60 °C' de termo reaktörde inkübe edildikten sonra), kör çözeltisi ise 0.5 mL tampon+substrat (0.25 mL pH' ı 10.5 olan 0.1 M glisin-NaOH tampon çözeltisi+ 0.25 mL % 1 pektin çözeltisi (pH 10.5)) şeklinde hazırlanmıştır.
3. Tüm tüplere 0.5 mL DNS çözeltisi eklenmiştir.
4. Hazırlanan tüpler 5 dakika kaynayan su banyosunda bekletilmiştir.
5. Daha sonra soğuk suda hemen soğutulmuştur.
6. Absorbansları 530 nm dalga boyunda kör çözeltiye karşı okunmuştur.
7. Galakturonik asit miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi yukarıda belirtilen aşamalara göre konsantrasyonu bilinen miktarlarda galakturonik asit içeren standartlar kullanılarak hazırlanmıştır (EK 4.).

6.4.2.3. Endo Pektinaz Tayini

Endo pektinaz aktivitesi viskozimetrik olarak ölçülmüştür (Tuttobello ve Mill, 1961; Mill ve Tuttobello, 1961). Endo pektinaz için, 1 mL enzim örneği pH' ı 10.5 olan 0.1 M glisin-NaOH tamponda hazırlanmış 19 mL % 0.5 pektin çözeltisi ile karıştırılır. 60 °C' de 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, viskozitedeki azalma vibroviskometre ile

takip edilir. Bir birim endo pektinaz aktivitesi, yukarıda açıklanmış şartlar altında dakikada çözeltinin viskozitesini % 50 azaltan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

6.4.3. Protein Tayini

Üretim ortamında toplam protein miktarını belirlemek için, Lowry ve diğerleri (1951) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Protein tayininde kullanılan reaktifler aşağıdaki gibidir:

- **Reaktif 1:** % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - **Reaktif 2:** % 2 Na-K-Tartarat
 - **Reaktif A:** 0.1 N NaOH içinde % 2' lik Na_2CO_3 (2 gr Na_2CO_3 + 0.4 gr NaOH /100 mL)
 - **Reaktif B:** 1 mL **Reaktif 1** + 1 mL **Reaktif 2** alınarak, 100 mL' ye **Reaktif A** ile tamamlanır.
 - **Reaktif C:** Folin Ciocalteu fenol reaktifi distile su ile 1/1 oranında seyreltilir.
1. Örnek tüplerine 0.5 mL seyreltilmiş örnek, kör çözelti tüpüne de 0.5 mL saf su koyulmuştur.
 2. Tüm tüplere 2.5 mL Reaktif B eklenmiştir.
 3. Karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
 4. Tüm tüplere 0.25 mL Reaktif C eklenmiştir.
 5. Karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
 6. Absorbanslar 660 nm dalga boyunda kör çözeltiye karşı okunmuştur.
 7. Protein miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanarak hesaplanmıştır.

Örneklerdeki toplam protein derişimini belirlemek için bovine serum albuminin (BSA) derişimi bilinen örneklerinden yararlanılarak derişim-absorbans kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (EK 3.).

6.5. Biyoreaktörde Sıvı Faz Hacimsel Kütle Transfer Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızının Hesaplanması

Biyoreaktörde enzim üretimi boyunca sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayısı ve oksijen tüketim hızını belirlemek için Bölüm 5.2.' de anlatılan Dinamik Metot kullanılmıştır (Bandyopadhyay ve Humprey, 1967). Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli kesilmesi ve bir oksijen probu yardımıyla biyoreaktör ortamındaki

          ksijen derişimindeki azalmanın; daha sonra havanın tekrar sisteme verilmesiyle  ksijen derişimindeki artışın zamanla     lmesi prensibine dayanmaktadır. Çalışmada, dinamik  ksijen transfer deneyleri mikroorganizmanın biyolojik aktivitelerini etkilemeyecek şekilde çok kısa süreli olarak belli zamanlarda yapılmıştır. Bu sırada hava girişi tamamen kesilmiş ve yüzey havalandırmanın etkisini azaltmak için karıştırma hızı 20-50 rpm arasına d    r lm  t r. Havalandırmanın kesildiği bu zaman periyodunda Eşitlik (5.7.) kullanılarak,  ksijen tüketim hızları, q_o , hesaplanmıştır. Biyoreaktöre havanın tekrar verilmesiyle           ksijen konsantrasyonunun artması sonucu Eşitlik (5.10.) kullanılarak, elde edilen eğrinin ($C_o, dC_o/dt-q_o$) eğiminden k_La değeri belirlenmiştir. EK 5.'de örnek grafik ve hesaplamalar gösterilmiştir.

7. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *B. pumilus* ile liyaz grubu enzimlerden pektin liyaz ve poligalakturonaz grubu enzimlerden ekzo ve endo pektinaz üretimi ilk aşamada kesikli sistemde derin kültür fermantasyonu ile gerçekleştirilmiş ve ortam pH' ı, başlangıç pektin konsantrasyonu, farklı karbon kaynakları, farklı azot kaynakları, fosfat konsantrasyonu ve metal iyonları gibi parametrelerin mikroorganizma özgül üreme ve enzim üretimine etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında, pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık belirlenmiştir. Biyoreaktör çalışmalarında ise, karıştırma ve hava akış hızı parametrelerinin etkileri incelenmiş ve oksijen tüketim hızları ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayıları belirlenmiştir. Daha sonra katı hal fermantasyon yöntemi ile farklı tarımsal ve tarıma dayalı endüstriyel atıklar kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve en yüksek aktivitelerin elde edildiği katı substratlar belirlenmiştir. Çalışmanın son bölümünde ise katı hal fermantasyonu enzim üretim ortamı tepki yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiştir.

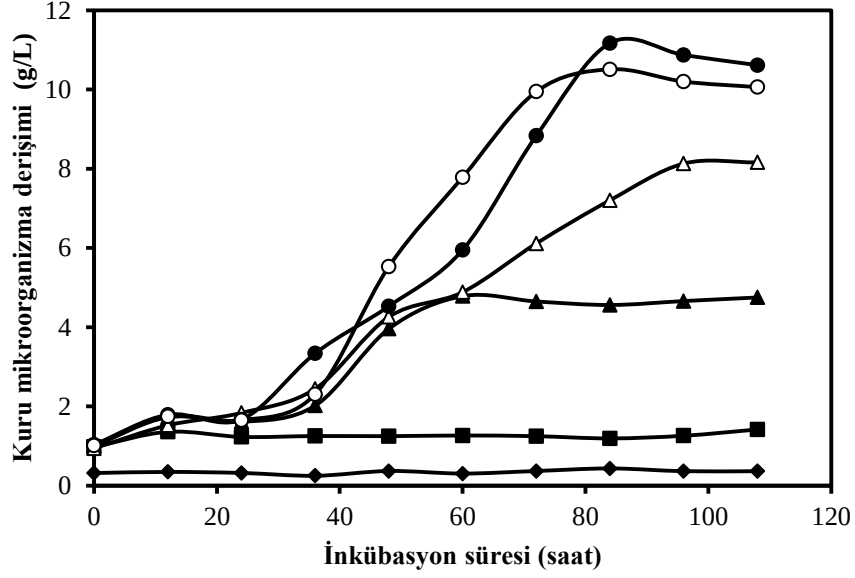
7.1. Derin Kültür Fermantasyon Çalışmaları

7.1.1. Başlangıç pH' ının Etkisi

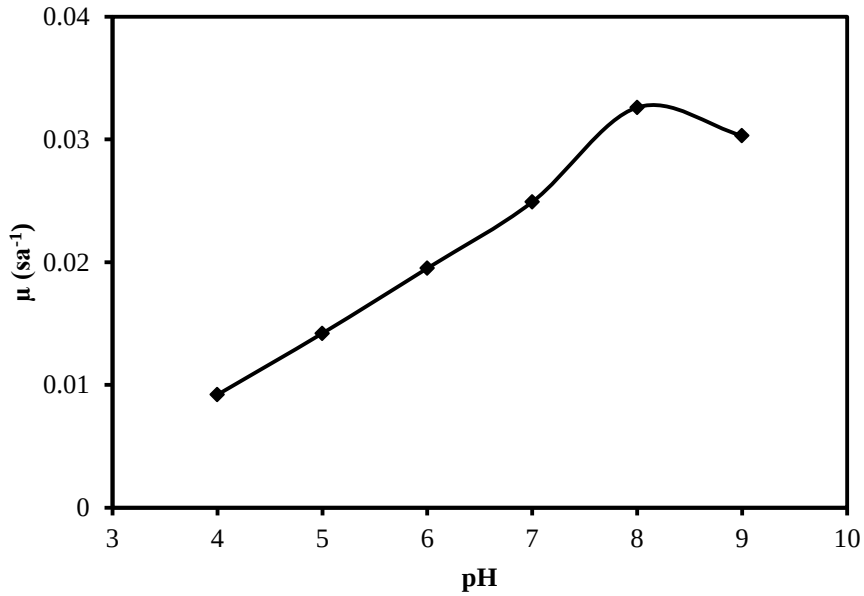
Mikroorganizmanın büyümesi, hücre zarının geçirgenliği, enzim biyosentezi ve kararlılığının korunmasını etkileyen en önemli faktörlerden birisi ortamın başlangıç pH' ıdır. Birçok mantar türü için pektik enzimlerin üretiminde optimum pH asidik, bakteriler için ise bazik aralıktadır. Ancak, pektik enzimlerin üretiminde pH' ın etki ettiği mekanizma tam olarak bilinmemektedir (Murad ve Azzaz, 2011).

Derin kültür fermantasyonunda, ortam pH' ının mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim üretimine etkisini belirlemek amacıyla ortamın başlangıç pH' ı 4-9 aralığında değiştirilmiştir. Şekil 7.1.' de çalışılan pH değerlerinde elde edilen mikroorganizma üreme eğrileri verilmiştir. Tüm pH değerlerinde mikroorganizmalar uzun lag (gecikme) fazından sonra üremeye başlamakta ve üstel üreme evresi görülmektedir. En yüksek mikroorganizma konsantrasyonu 11.17 mg/L olarak pH 8' de elde edilmiştir. Şekil 7.2.' de farklı pH değerlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı pH 8 değerinde

0.0326 (sa⁻¹) olarak elde edilmiş, daha yüksek ve daha düşük pH' larda mikroorganizma özgül üreme hızlarında düşüş gözlenmiştir.

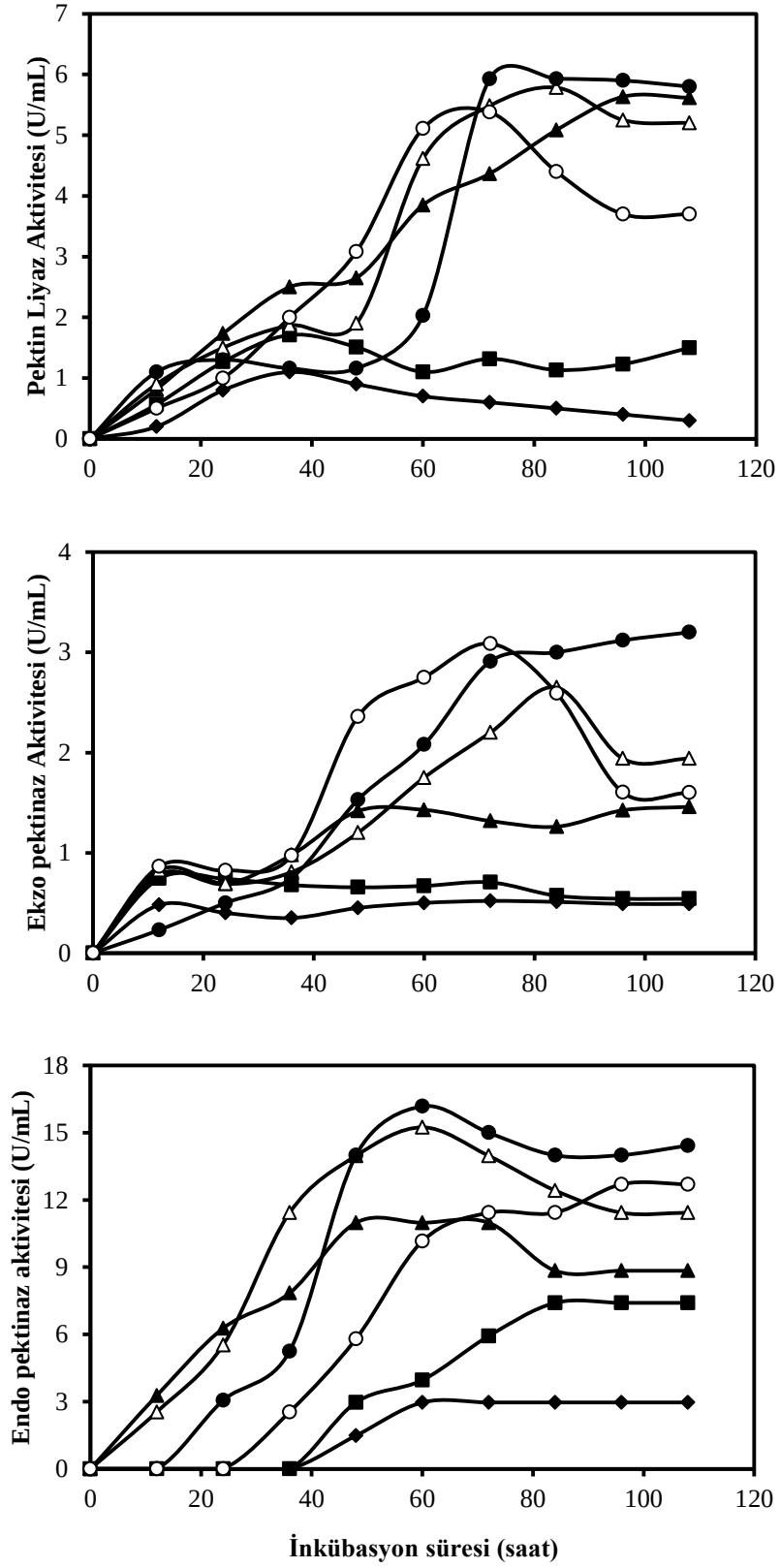


Şekil 7.1. Farklı pH değerlerinde kuru mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (T:30 °C, KH: 150 rpm, % 1 pektin kons., % 10 aşı oranı, ◆:pH 4, ■: pH 5, ▲:pH 6, △:pH 7, ●:pH 8, ○:pH 9)



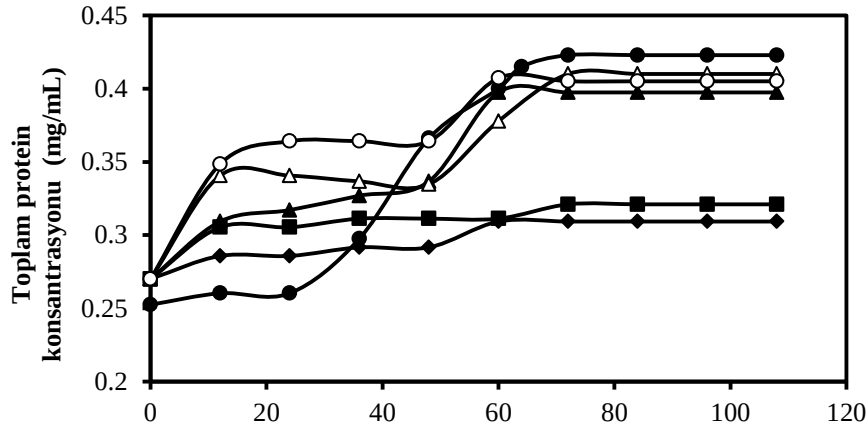
Şekil 7.2. Farklı pH değerlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 (w/v) pektin kons., % 10 aşı oranı)

Farklı pH değerlerinde elde edilen enzim aktivite değerleri ise Şekil 7.3.' de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, pektinaz grubu enzimlerden en yüksek pektin liyaz aktivitesi 72. saatte 5.93 U/mL, ekzo pektinaz aktivitesi 108. saatte 3.20 U/mL ve endo pektinaz aktivitesi 60. saatte 16.17 U/mL olarak pH 8 değerinde elde edilmiştir. pH 8' den daha düşük ve daha yüksek pH değerlerinde daha düşük enzim üretimi olduğu tespit edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda, pH 8, kültür ortamının pH değeri olarak kullanılmıştır. Literatürde de, çoğu bakterinin üremesi ve pektinaz grubu enzimlerin üretimi için optimum pH' ın 7.0-10.0 aralığında değiştiği yer almaktadır (Ahlawat vd., 2009). Enzimin salgılandığı ortam pH' ı, enzimin birincil ve ikincil yapısını oluşturan aminoasitlerin iyonizasyon durumunu etkiler. Fermantasyon ortamı pH' ı ayrıca enzimin kararlılığı ile de doğrudan bağlantılıdır. Örneğin, *P. expansum*' un ürettiği pektin liyaz enziminin optimum pH' ını bulmak için yapılan çalışmalar sonucunda, enzimin optimum pH' ının 7.0 olmasına karşın enzimin pH 6.5-8.0 arasında kararlılığını muhafaza ettiği görülmüştür (Piccoli-Valle vd., 2001). Şekil 7.1 ve 7.3. incelendiğinde enzimin üstel üreme bölgesinde üretildiği görülmektedir. pH artışının enzim aktivitesini, mikroorganizma özgül üreme hızını ve maksimum üreyen mikroorganizma miktarını önemli ölçüde artırdığı, enzim aktivitesindeki artışın mikroorganizma üremesiyle doğrudan ilgili olduğu ve mikroorganizma üremesi arttıkça üreyen mikroorganizmaların daha fazla enzim ürettiği anlaşılmaktadır.

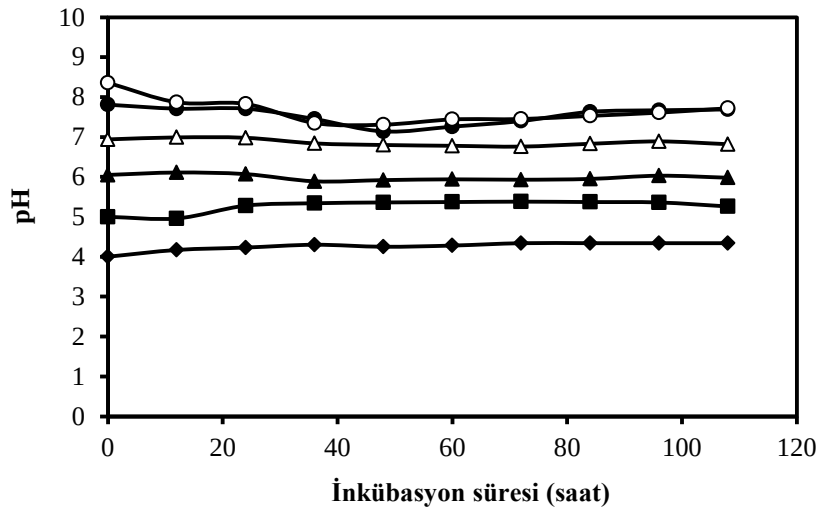


Şekil 7.3. Farklı pH değerlerinde enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 (w/v) pektin kons., ♦:pH 4, ■:pH 5, ▲:pH 6, △:pH 7, ●:pH 8, ○:pH 9)

Farklı pH değerlerinde inkübasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 7.4.' te verilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmış ve en yüksek protein konsantrasyonu pH 8' de 0.42 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Şekil 7.5.' de ise çeşitli başlangıç pH değerlerinde fermentasyon ortamının pH' ının zamanla değişimi görülmektedir. pH 4, 5, 6 ve 7 değerinde ortam pH' ı, zamanla fazla değişmeden aynı seviyede kalmış, pH 8 ve 9 değerinde ise zamanla belli bir değere kadar azalmış ve sonra hafif artışa geçmiştir. Pektinaz üretimi sırasında kültür pH' ındaki bu benzer değişme çeşitli araştırmacılar tarafından da gözlemlenmiştir (Galiotou-Panayotou vd., 1997).



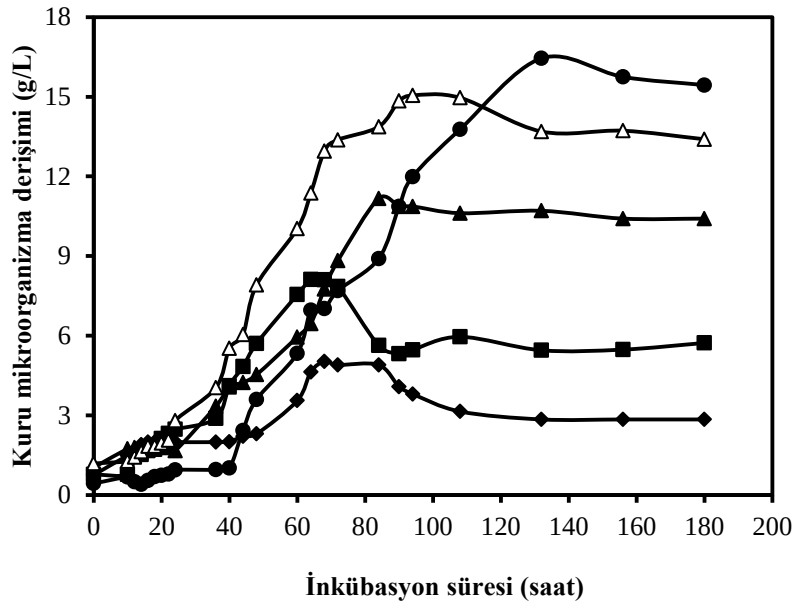
Şekil 7.4. Farklı pH değerlerinde toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 pektin kons., ◆:pH 4, ■:pH 5, ▲:pH 6, △:pH 7, ●:pH 8, ○:pH 9)



Şekil 7.5. Farklı pH değerlerinde ortam pH' ının zamanla değişimi (T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 pektin kons., ◆:pH 4, ■:pH 5, ▲:pH 6, △:pH 7, ●:pH 8, ○:pH 9)

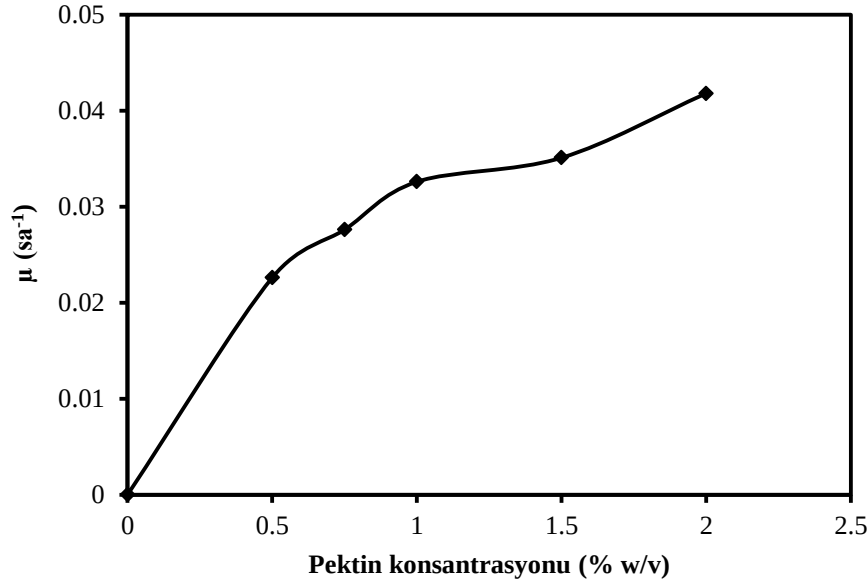
7.1.2. Başlangıç Pektin Konsantrasyonunun Etkisi

Fermantasyon deneylerinde, mikroorganizma üreme ve enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri de başlangıç substrat derişimidir. Pektin, mikrobiyal sistemlerde, pektinolitik enzimlerin üretiminde bir indükleyici olarak görev almaktadır (Dhillon vd., 2004). Başlangıç pektin konsantrasyonu % 0.5-2.0 (w/v) aralığında değiştirilmiş, pektinin kuru mikroorganizma derişimi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Sabit sıcaklık ve karıştırma hızında, farklı başlangıç pektin konsantrasyonlarında mikroorganizma üreme eğrisi Şekil 7.6. ve mikroorganizma özgül üreme hızı ise Şekil 7.7.' de sunulmuştur. Kuru mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla derişiminin verildiği grafikten ortama eklenen pektin miktarı artışının maksimum üreyen mikroorganizma miktarını artırdığı görülmektedir. Şekil 7.7.' den de görüldüğü gibi, başlangıç pektin konsantrasyonunun artmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızı artmış, maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı % 2.0 (w/v) pektin konsantrasyonunda elde edilmiştir. % 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2.0 (w/v) pektin konsantrasyonlarında mikroorganizma özgül üreme hız değerleri (μ , sa^{-1}) sırasıyla 0.0226, 0.0276, 0.0326, 0.0351 ve 0.0418 (sa^{-1}) olarak bulunmuştur. Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi çalışılan aralıkta herhangi bir substrat inhibisyonu gözlenmemiştir.

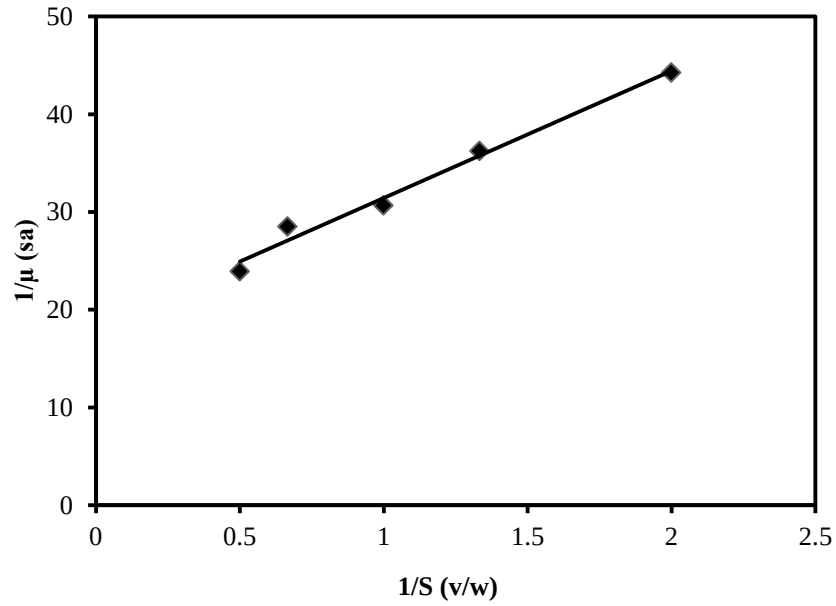


Şekil 7.6. Farklı pektin konsantrasyonlarında kuru mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla derişimi (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, ◆:% 0.50, ■:% 0.75, ▲:% 1, △:% 1.50, ●:% 2 (w/v))

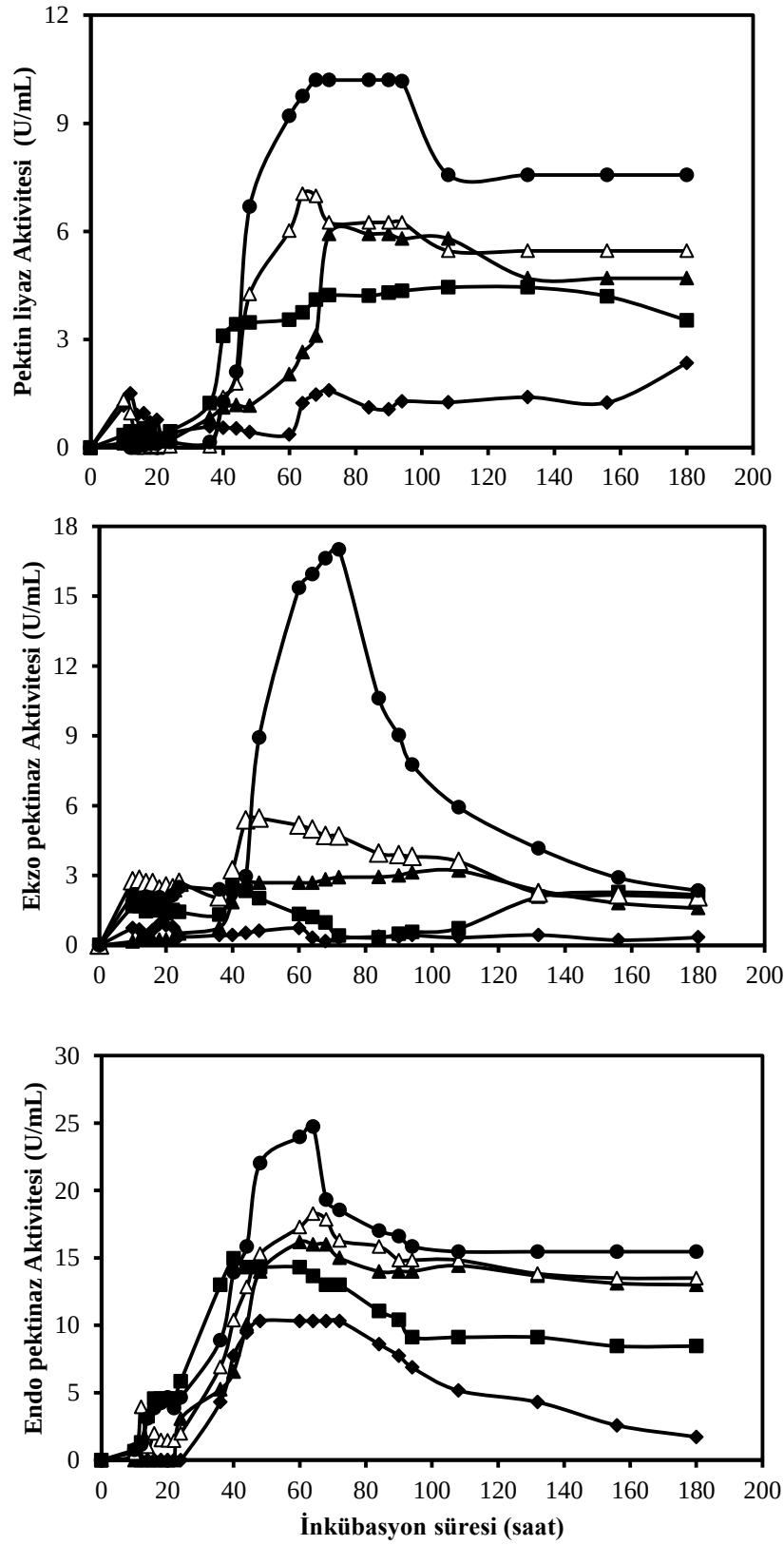
Pektinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı durumda, Monod eşitliğinin uyumluluğu araştırılmış ve sistemi iyi bir şekilde tanımladığına karar verilmiştir. Monod eşitliğinin doğrusallaştırılmasıyla elde edilen Eşitlik (3.4.) göre çizilen, $1/\mu$ ’ ye karşı $1/S$ grafiğinin (Şekil 7.8.) eğiminden ve kesim noktasından maksimum özgül üreme hızı $\mu_{\max}$ 0.054 (sa^{-1}), doygunluk sabiti K_s ise % 0.71 (w/v) olarak saptanmıştır. Farklı oranlarda pektin içeren ortamlarda enzim üretimlerindeki değişim Şekil 7.9.’ da verilmiştir.



Şekil 7.7. Farklı pektin konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm)



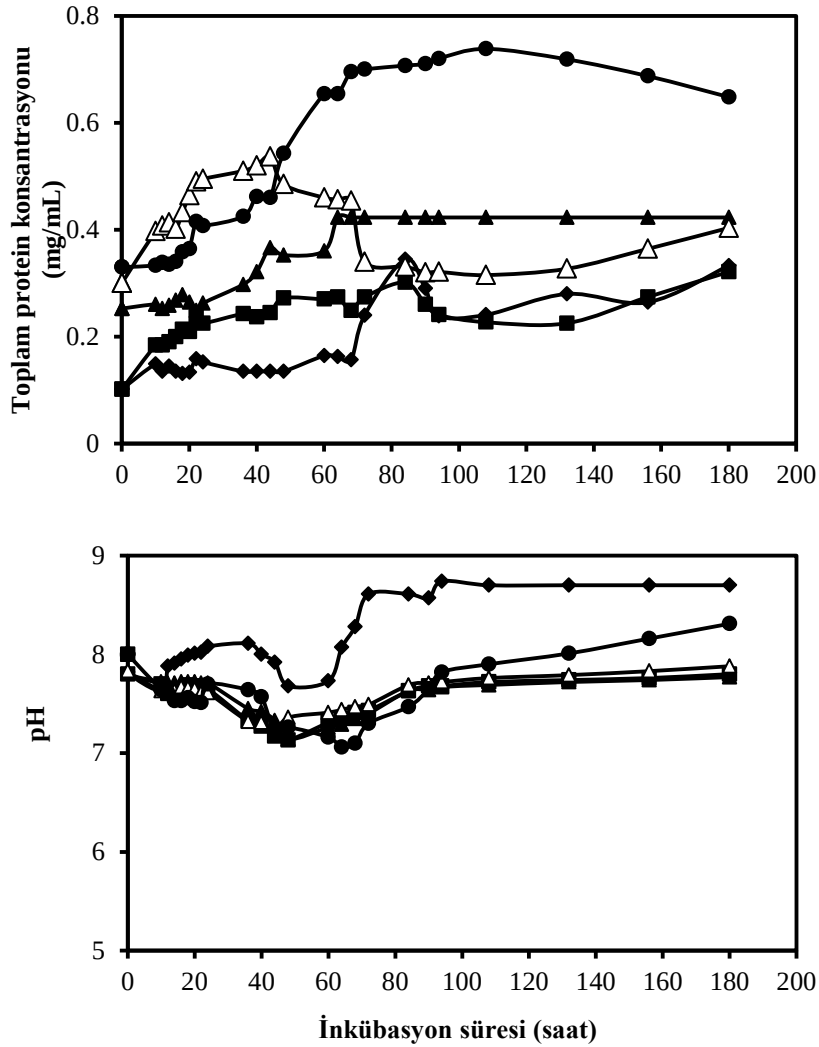
Şekil 7.8. Pektin içeren ortamda $1/\mu$ - $1/S$ grafiği



Şekil 7.9. Farklı pektin konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, ◆: % 0.50, ■: % 0.75, ▲: % 1, △: % 1.50, ●: % 2 (w/v))

Mikroorganizma özgül üreme hızı ile benzer bir şekilde enzim aktivitesi de pektin konsantrasyonu ile artmış ve maksimum aktiviteler % 2.0 (w/v) pektin konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sonuçlar, fermentasyon ortamındaki pektik maddelerin varlığının enzim üretimini etkilediğini göstermektedir. Maksimum pektin liyaz aktivitesi % 2 (w/v) pektin konsantrasyonunda 68. saatte 10.20 U/mL, ekzo pektinaz aktivitesi 72. saatte 17.00 U/mL ve endo pektinaz aktivitesi 64. saatte 24.73 U/mL olarak belirlenmiştir.

Toplam protein konsantrasyonu ve pH' ın zamanla değişimi Şekil 7.10.' da gösterilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. En yüksek protein konsantrasyonu % 2 (w/v) pektin konsantrasyonunda 108. saatte 0.74 mg/mL olarak ölçülmüştür.



Şekil 7.10. Farklı pektin konsantrasyonlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, ◆:% 0.50, ■:% 0.75, ▲: % 1, △:% 1.50, ●: % 2 (w/v))

Fermantasyon ortamının pH' ı zamanla önce azalmış ve daha sonra artmaya başlamıştır. Fermantasyon sırasında kültür sıvısının pH' ındaki azalma, pektinin deesterifikasyonu sonucu pektik asitlerin birikiminden kaynaklanabilir. pH' daki bu azalma enzim salgılanmasını teşvik edebilir (Stutzenberger, 1987). Fermantasyon proseslerindeki pH artışı ise, protein metabolizması sonucu amonyak açığa çıkışı ve enerji kaynağı olarak aminoasit kullanımı ile bağlantılıdır. Diğer muhtemel alkali-oluşturan metabolik reaksiyon, organik asit anyonlarının oksidasyonudur. Fermantasyonda, protein ve aminoasitlerin esas karbon ve enerji kaynağı olmadığı düşünülürse, bu pH artışının asit kullanımından kaynaklandığı açıktır (Silva vd., 2005).

Pektin, mikroorganizma üreme ve enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olmamaktadır. Literatürde, Abbasi ve Fazaelipoor (2010), 50 g/L pektin konsantrasyonunun poligalakturonaz aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olmadığını tespit etmişlerdir. Özeş (1988) tarafından yapılan çalışmada, karbon kaynağı olarak pektin ve poligalakturonik asit kullanıldığında, maksimum üreme ve enzim sentezinin % 2 (w/v) derişime sahip örneklerde olduğu saptanmıştır. Bu değerden sonra üreme ve enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Pektin ve poligalakturonik asitin % 2(w/v)' lik derişiminden sonra üremenin azalması, ortam yoğunluğunun artmasından ve ortamdaki suyun daha çok bağlı su durumuna geçmesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü ortamın yoğunluğu yükseldikçe oksijenin üreme ortamına difüzyonu güçleşmekte, aynı zamanda ortamın osmotik basıncı da yükseldiğinden mikroorganizma üremesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Benzer sonuç, yapılan çalışmada da gözlenmiş % 2 (w/v) pektin konsantrasyonunda besi ortamı daha viskoz bir hal almış ve mikroorganizmanın takibi güçleşmiştir. Bu nedenle, % 2' nin üzerinde pektin konsantrasyonu kullanılmamış ve bundan sonra yapılacak deneylerde % 1 pektin konsantrasyonu kullanılmıştır. % 1 (w/v) pektin konsantrasyonunda elde edilen maksimum pektin liyaz aktivitesi 72. saatte 5.93 U/mL, ekzo pektinaz aktivitesi 108. saatte 3.20 U/mL ve endo pektinaz aktivitesi 60. saatte 16.17 U/mL olarak belirlenmiştir.

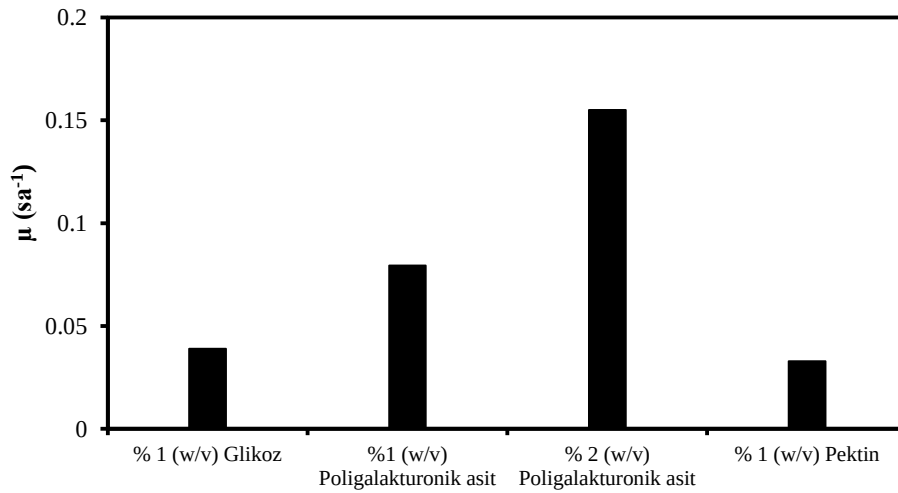
7.1.3. Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Mikroorganizmalar tarafından birçok hücre dışı pektinaz enzimi üretiminin, kültür ortamında pektik maddelerin varlığıyla teşvik edildiği bilinmektedir (Galiotou-Panayotou

vd., 1993). Ancak monosakkaritler, disakkaritler ve şeker alkollerı pektinaz üretiminde ürün verimini düşürmektedir.

Enzim üretimi ve mikroorganizma özgül üreme hızına farklı karbon kaynaklarının etkisini belirlemek için yapılan deneylerde fermantasyon ortamına pektin yerine glikoz ve poligalakturonik asit eklenmiştir. % 1 (w/v) glikoz, % 1 ve % 2 (w/v) poligalakturonik asit ve % 1 (w/v) pektin konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 7.11.' de verilmiştir. % 1 (w/v) glikoz, % 1 (w/v) poligalakturonik asit ve % 2 (w/v) poligalakturonik asit konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları sırasıyla; 0.0389, 0.0794 ve 0.1546 (sa^{-1})' dir. % 2 (w/v) oranında poligalakturonik asit içeren fermantasyon ortamında daha yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı elde edilmiştir ve bu değer % 1 (w/v) pektin konsantrasyonunda belirlenen mikroorganizma özgül üreme hızından (0.0326 sa^{-1}) daha yüksektir. Bu durum, glikoz ve poligalakturonik asitin pektine göre mikroorganizma tarafından daha kolay tüketilebilen karbon kaynakları olmalarından kaynaklanmıştır.

Farklı karbon kaynaklarının denendiği fermantasyon deneylerinde elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 7.12.' de verilmiştir. Glikoz ve poligalakturonik asit içeren ortamlarda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında maksimum pektin liyaz ve ekzo pektinaz aktiviteleri % 1 (w/v) poligalakturonik asit içeren ortamda elde edilmiştir. Maksimum endo pektinaz aktivitesi ise % 1 konsantrasyonunda glikoz içeren üretim koşulunda elde edilmiştir. % 1 glikoz konsantrasyonunda ise ekzo pektinaz aktivitesi elde edilememiştir.

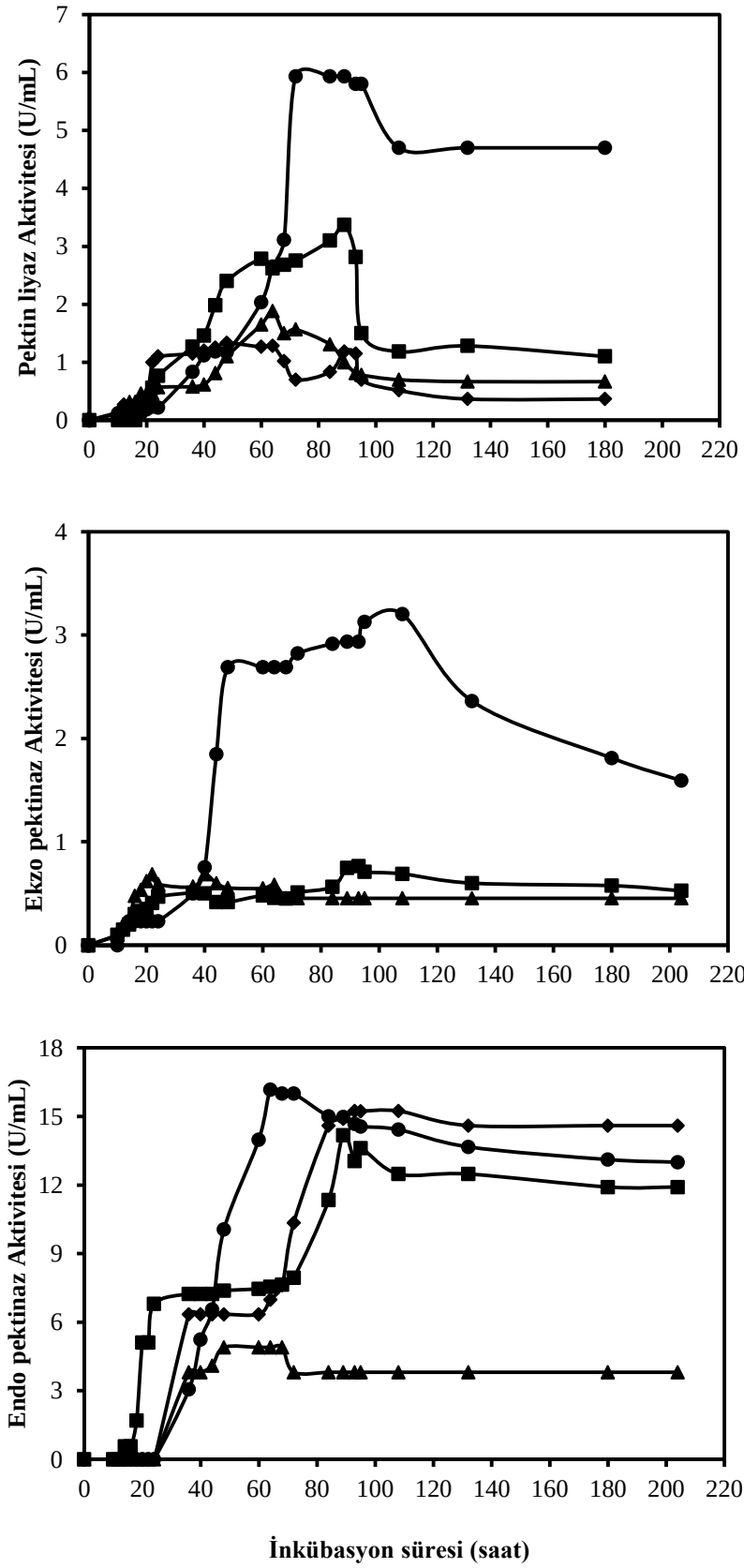


Şekil 7.11. Farklı karbon kaynaklarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm)

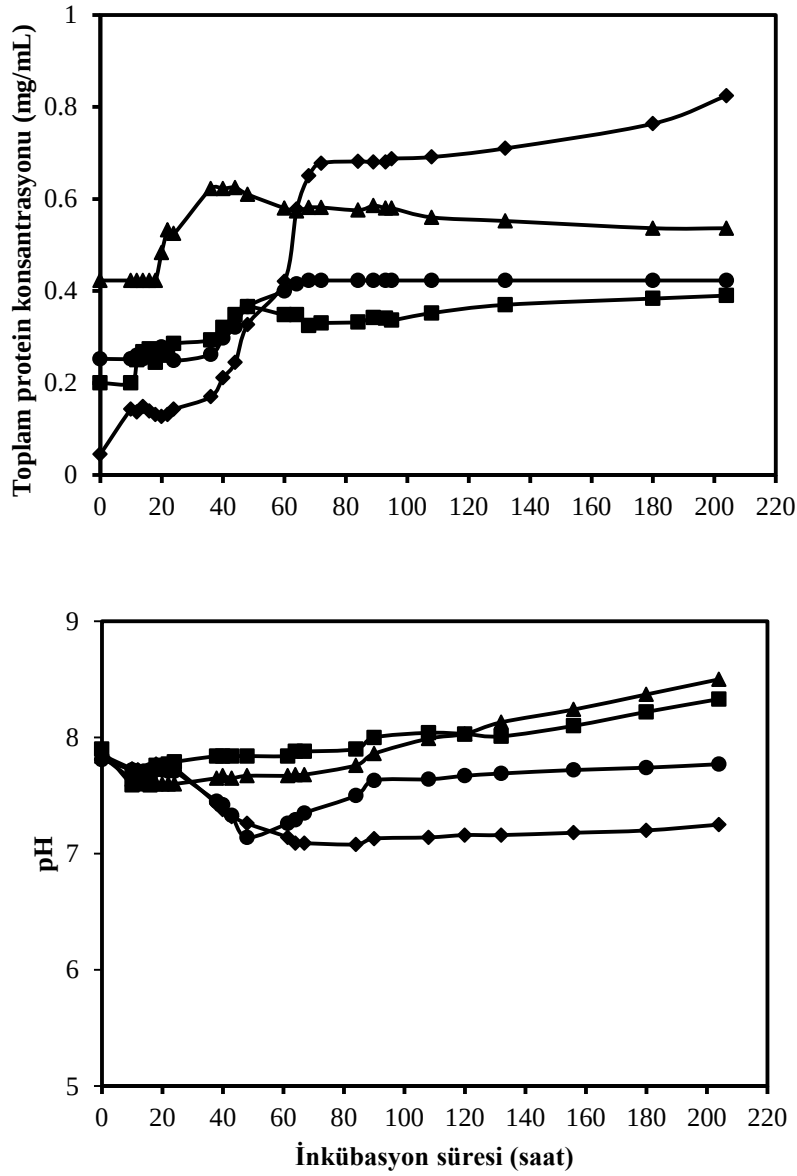
Maksimum pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla, 89. saatte 3.37, 93. saatte 0.77 ve 93. saatte 15.24 U/mL' dir. Ancak bu değerler, % 1(w/v) pektin içeren ortamda elde edilen aktivite değerlerinden daha düşüktür. Poligalakturonik asit farklı moleküler ağırlıktaki pektik bir maddedir. Mikroorganizma farklı türde pektinolitik enzimler salgılayarak poligalakturonik asidi parçalamıştır. Farklı pektik substratlarda elde edilen pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz enzimatik aktivitelerin % 1 (w/v) pektin kullanıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Quattara ve diğerleri (2011) de, farklı *Bacillus* türleri ile yaptıkları çalışmalarında, pektik bileşiklerin pektin liyaz sentezini etkilediğini ve *Bacillus* türlerinin hiçbir pektik madde olmaksızın az miktarda glikoz içeren ortamda pektin liyaz sentezleyebildiklerini tespit etmişlerdir.

Denenen karbon kaynakları arasında mikroorganizma özgül üreme hızları açısından en uygun karbon kaynağı olarak poligalakturonik asit belirlenmiştir. Ancak, enzim aktiviteleri açısından veriler değerlendirildiğinde ise, en yüksek aktivite değerleri % 1 (w/v) pektin içeren ortamda elde edildiğinden, daha sonraki çalışmalarda % 1 (w/v) pektin konsantrasyonu kullanılmıştır.

Farklı karbon kaynakları içeren fermantasyon ortamlarında pH ve toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi Şekil 7.13.' de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. En yüksek protein konsantrasyonu % 1 (w/v) glikoz içeren ortamda belirlenmiş olup 132. saatte 0.90 mg/mL olarak ölçülmüştür. % 1 ve % 2 (w/v) poligalakturonik asit içeren ortamlarda elde edilen en yüksek protein konsantrasyonları ise sırasıyla 108. saatte 0.40 mg/mL ve 36. saatte 0.62 mg/mL'dir. pH diğer ortam koşullarında olduğu gibi zamanla belli bir değere kadar azalmış sonra ise hafif artışa geçmiştir. % 1 (w/v) glikoz içeren ortamda daha fazla pH düşüşü olmuştur.



Şekil 7.12. Farklı karbon kaynaklarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, ◆:% 1 (w/v) Glikoz, ■:% 1 (w/v) Poligalakturonik asit, ▲: % 2 (w/v) Poligalakturonik asit, ●: % 1 (w/v) Pektin)



Şekil 7.13. Farklı karbon kaynaklarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, ♦:% 1 (w/v) Glikoz, ■:% 1 (w/v) Poligalakturonik asit, ▲:% 2 (w/v) Poligalakturonik asit, ●:% 1 (w/v) Pektin)

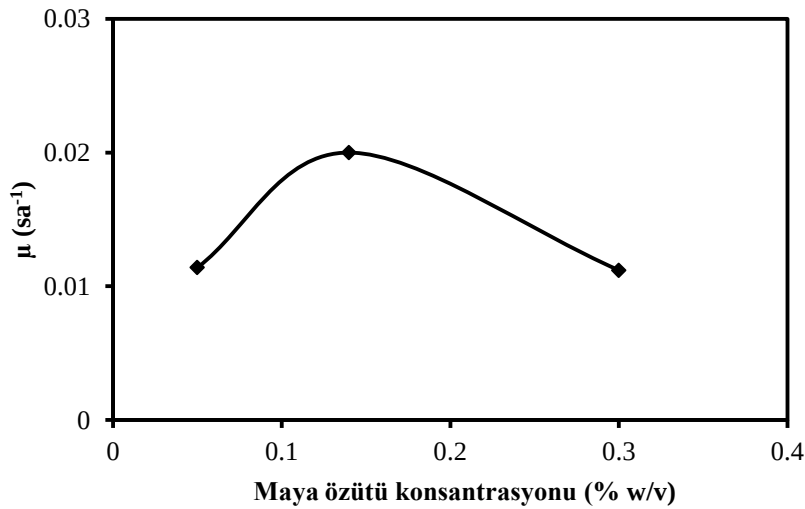
7.1.4. Azot Kaynaklarının Etkisi

Fermantasyon ortamında bulunan azot kaynakları ve konsantrasyonları, mikrobiyal büyüme ve enzim üretiminde önemli bir role sahiptir (Nabi vd., 2003). Enzim üretiminde farklı azot kaynaklarının etkisini araştırmak ve en uygun azot kaynağını belirlemek amacıyla yapılan deneylerde Tablo 6.2.' de verilen besi ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla besin ortamında diğer ortam bileşenleri sabit tutulmuş, azot kaynağı değiştirilmiştir. Azot

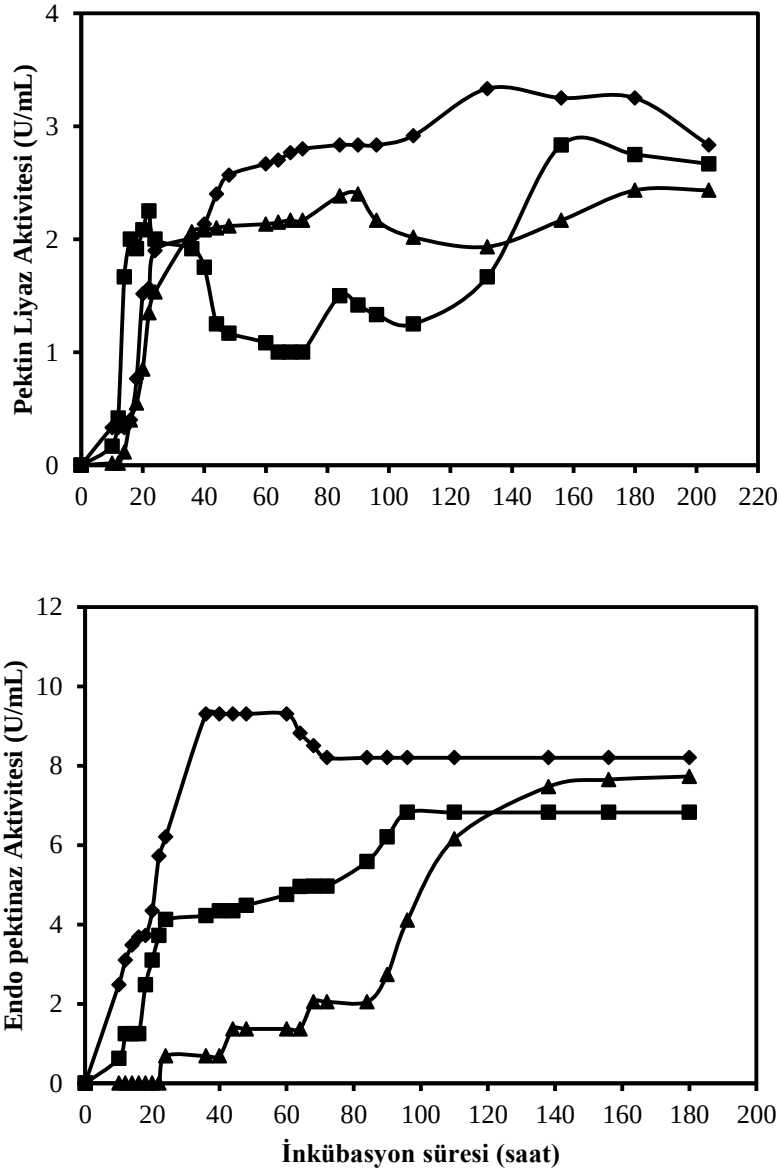
kaynağı olarak; amonyum sülfat, maya özütü ve pepton sıvı besiyerine % 0.05-0.14 ve 0.3 (w/v) oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. Zamana karşı alınan örneklerde mikroorganizma özgül üreme hızları, enzim aktiviteleri ve toplam protein derişimleri tayin edilmiştir.

7.1.4.1. Maya Özütü Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim üretimine maya özütü konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneylerde, fermentasyon ortamına azot kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafiklerde verilmiştir. Şekil 7.14.' de görüldüğü gibi en yüksek özgül üreme hızı % 0.14 (w/v) maya özütü konsantrasyonunda elde edilmiştir. Düşük maya özütü konsantrasyonu (% 0.05 (w/v)) mikroorganizmanın gelişmesi için yeterli olmamaktadır. Yüksek maya özütü konsantrasyonunda (% 0.3 (w/v)) ise mikroorganizma üremesinin inhibe olduğu gözlenmiştir. Düşük substrat konsantrasyonlarında üreme hızı substrat derişimiyle artar ve bir maksimuma ulaşır. Substrat derişiminin daha da artmasıyla üreme hızı azalmaya başlar. Bu olay, substrat inhibisyonu olarak adlandırılır (Shuler ve Kargı, 2002; Türker, 2005). Farklı oranlarda maya özütü içeren fermentasyon ortamlarında elde edilen enzim aktivite değerleri ise Şekil 7.15.' de verilmiştir. En yüksek enzim aktivite değerleri, mikroorganizma özgül üreme hızları ile benzer bir şekilde % 0.14 (w/v) oranında maya özütü içeren ortamda elde edilmiştir. Literatürde, ortamda yeterli konsantrasyonlarda azot kaynağı olmaması halinde



Şekil 7.14. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, KH: 150 rpm)



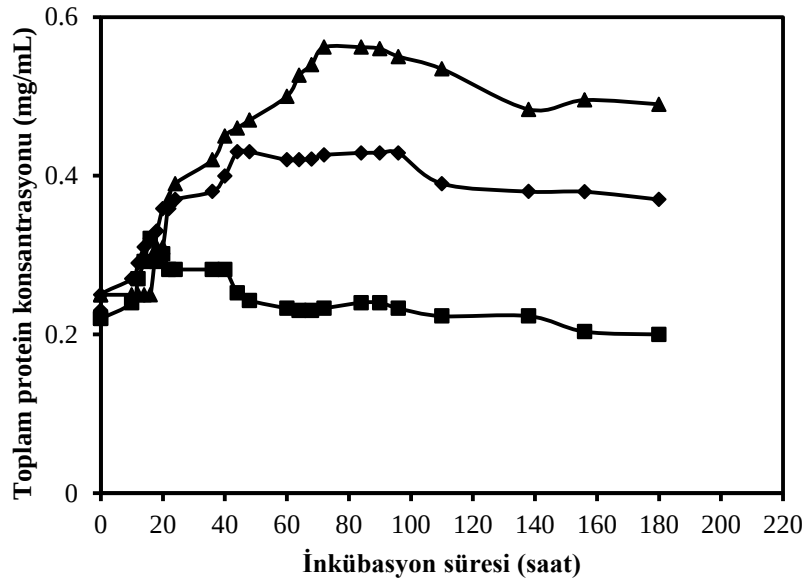
Şekil 7.15. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm, ■:% 0.05, ♦:% 0.14, ▲: % 0.3 (w/v) maya özütü)

enzim üretiminin düşük olacağı, bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda ise enzim üretiminin inhibisyonuna neden olabileceği belirtilmektedir (Tanyıldızı, 2005). Maksimum pektin liyaz aktivitesi 132. saatte 3.33 U/mL, endo pektinaz aktivitesi 64. saatte 9.32 U/mL' dir. Ekzo pektinaz aktivitesi ise fermentasyon süresince elde edilememiştir. Mikroorganizma özgül üreme hızları ve enzim aktivite değerleri, % 0.14 (w/v) oranında amonyum sülfat içeren fermentasyon ortamında elde edilen değerlerden daha düşüktür.

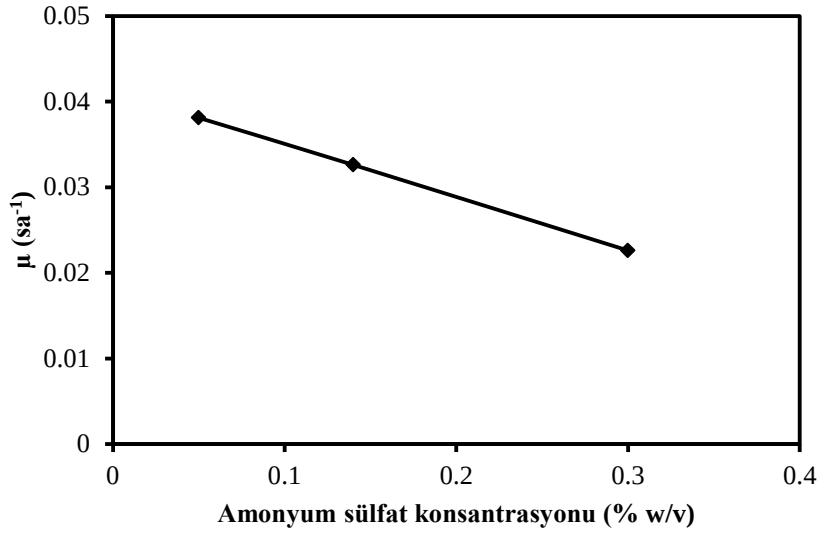
Farklı maya özütü konsantrasyonlarında inkübasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 7.16.'da verilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. % 0.14 (w/v) oranında maya özütü içeren ortamda en yüksek protein konsantrasyonu, 44. saatte 0.43 mg/mL olarak tespit edilmiştir. % 0.05 ve % 0.3 (w/v) maya özütü konsantrasyonlarında ölçülmüş olan en yüksek protein konsantrasyonları ise sırasıyla 16. saatte 0.32 ve 72. saatte 0.56 mg/mL olarak ölçülmüştür.

7.1.4.2. Amonyum Sülfat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim üretimini artıracak en uygun azot kaynağını belirlemek üzere fermantasyon ortamına inorganik bir azot kaynağı olan amonyum sülfat % 0.05, % 0.14 ve % 0.3 (w/v) oranında eklenmiştir. Elde edilmiş olan mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 7.17.'de sunulmuştur. Maksimum mikroorganizma özgül üreme hızına % 0.05 (w/v) oranında amonyum sülfat kullanıldığı zaman ulaşılmış ve özgül üreme hızı $0.0381 \text{ (sa}^{-1}\text{)}$ olarak ölçülmüştür. % 0.14 ve 0.3 (% w/v) oranlarında ise mikroorganizma özgül üreme hızları sırasıyla, 0.0326 ve 0.0226 olarak belirlenmiştir. Amonyum sülfat konsantrasyonun artması mikroorganizma üremesini etkilemiş ve inhibisyona neden olmuştur.

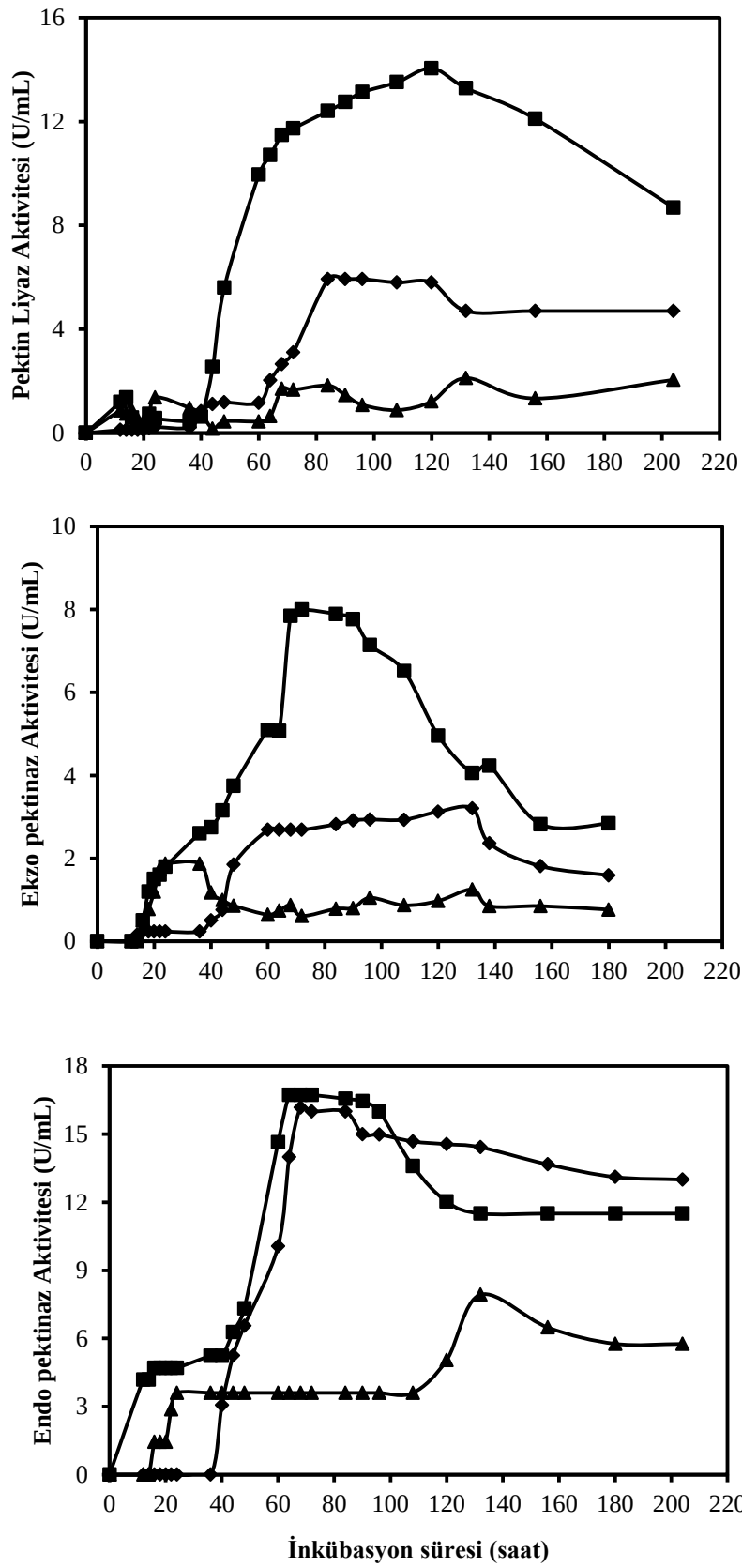


Şekil 7.16. Farklı maya özütü konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm, ■: % 0.05, ◆: % 0.14, ▲: % 0.3 (w/v) maya özütü)



Şekil 7.17. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm)

İnorganik bir azot kaynağı olan amonyum sülfat kullanıldığında elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 7.18.' de verilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, mikroorganizma özgül üreme hızı ile paralel olarak en yüksek enzim aktivite değerleri de % 0.05 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonunda elde edilmiştir. % 0.05 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonunda gözlenen en yüksek pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktivitesi sırasıyla, 120. saatte 14.05 U/mL, 72. saatte 8.00 U/mL ve 64. saatte 16.73 U/mL olup, en yüksek enzim aktivite değerlerinin en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızlarının elde edildiği % 0.05 (w/v) amonyum sülfat derişiminde elde edilmesi beklenen bir sonuçtur. Amonyum sülfat konsantrasyonu arttıkça enzim aktiviteleri azalmaktadır. Yüksek amonyum sülfat konsantrasyonları mikroorganizma üreme ve dolayısıyla enzim üretimi üzerinde inhibisyon etkisi yapmaktadır.

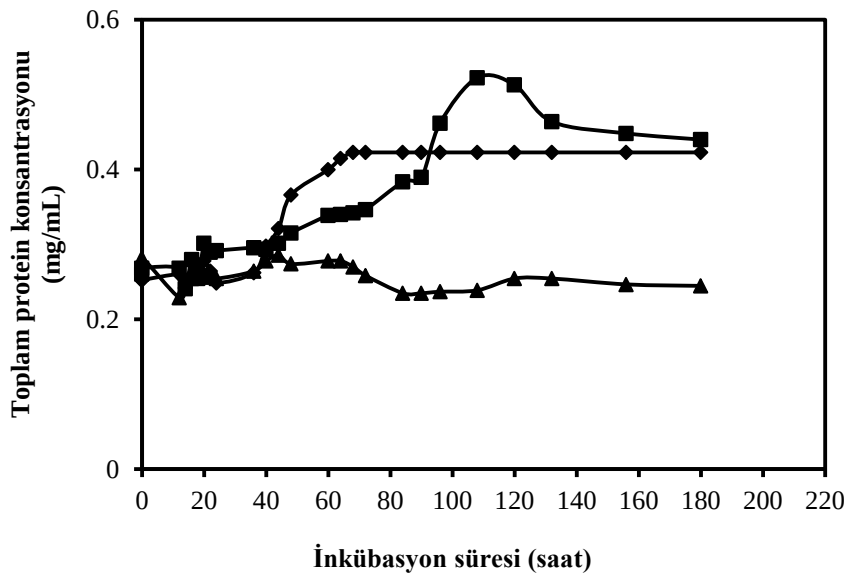


Şekil 7.18. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm, ■:% 0.05, ♦:% 0.14, ▲: % 0.3 (w/v) Amonyum sülfat)

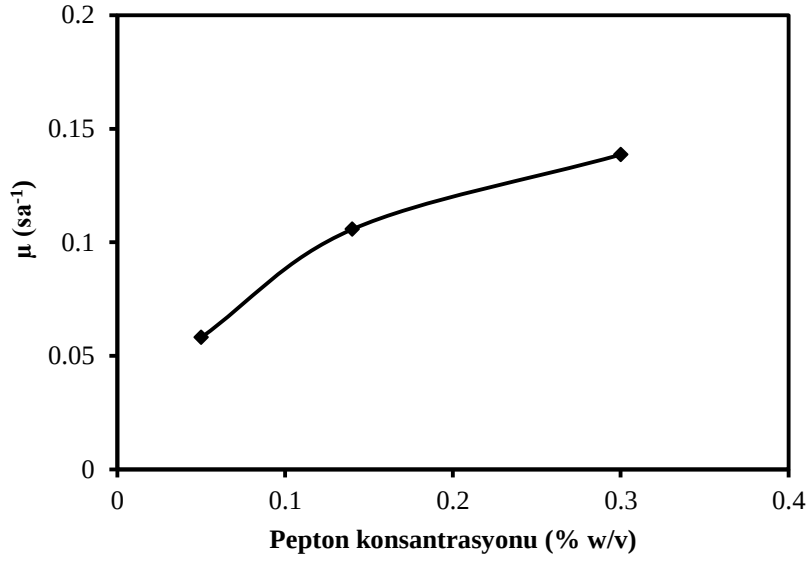
Şekil 7.19.' da % 0.05, 0.14 ve % 0.3 (w/v) oranında amonyum sülfat içeren ortamlarda fermentasyon süresince toplam protein konsantrasyonunun değişimi verilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. En yüksek protein konsantrasyonu maksimum özgül üreme hızı ve enzim aktivitelerinin elde edildiği % 0.05 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonunda ve 108. saatte 0.52 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

7.1.4.3. Pepton Konsantrasyonunun Etkisi

Azot kaynağı olarak peptonun kullanıldığı deneylerde, pepton konsantrasyonun mikroorganizma üreme ve enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla üç farklı konsantrasyonda pepton içeren fermentasyon ortamları hazırlanmış ve deneyler gerçekleştirilmiştir. Sabit sıcaklık ve karıştırma hızında elde edilmiş olan mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 7.20.' de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi pepton konsantrasyonu arttıkça mikroorganizma özgül üreme hızında artış gözlenmiş ve maksimum özgül üreme hızı % 0.3 (w/v) konsantrasyonunda elde edilmiştir. % 0.05, 0.14 ve 0.3 (w/v) pepton konsantrasyonunda elde edilen özgül üreme hızları sırasıyla 0.0581, 0.1057 ve 0.1386 (sa^{-1})' dir. Yapılan deneyler sonucu, azot kaynağı olarak peptonun kullanıldığı fermentasyon ortamında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızının



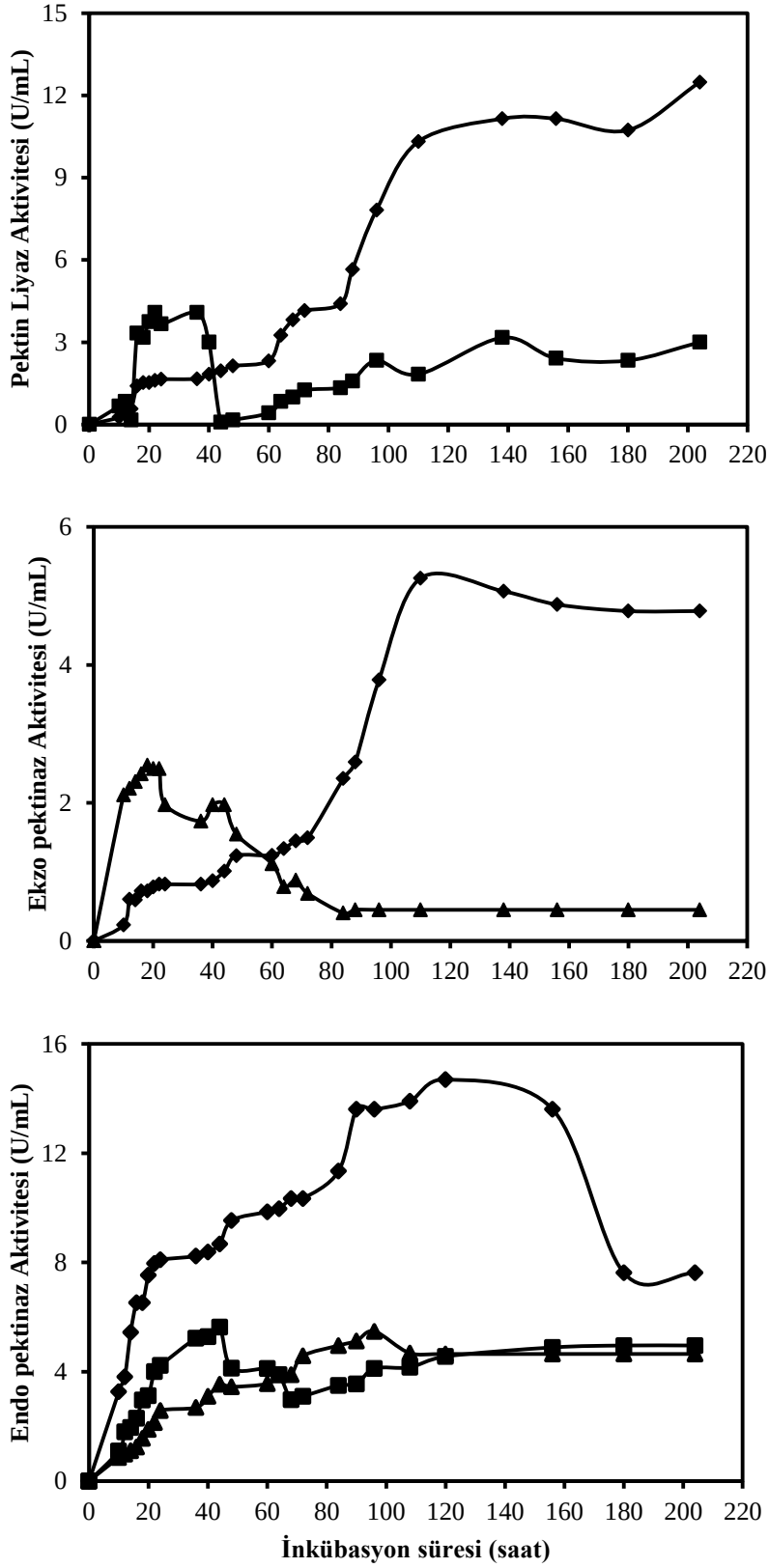
Şekil 7.19. Farklı amonyum sülfat konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T:30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm, ■:% 0.05, ◆:% 0.14, ▲:% 0.3 (w/v) Amonyum sülfat)



Şekil 7.20. Farklı pepton konsantrasyonlarda elde edilen mikroorganizma özgül üreme (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm)

maya özütü ve amonyum sülfat kullanılan ortamda elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bilindiği gibi pepton sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonun bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür (Halkman, 2005).

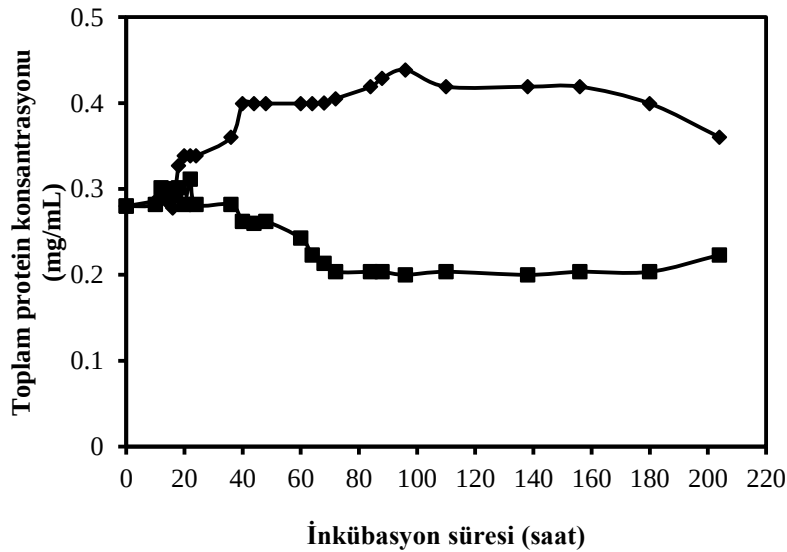
Organik bir azot kaynağı olarak peptonun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 7.21.' de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi artan pepton konsantrasyonu ile % 0.14 (w/v) pepton konsantrasyonuna kadar enzim aktivite değerleri de artmış ancak daha yüksek pepton konsantrasyonunda enzim aktivitelerinde düşme gözlenmiştir. Maksimum enzim aktiviteleri % 0.14 (w/v) pepton konsantrasyonunda elde edilmiştir. En yüksek pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktivitesi sırasıyla 204. saatte 12.48 U/mL, 110. saatte 5.26 U/mL ve 120. saatte 14.69 U/mL olarak tespit edilmiştir. % 0.3 (w/v) pepton konsantrasyonunda pektin liyaz aktivitesi ve % 0.05 (w/v) pepton konsantrasyonunda ise ekzo pektinaz aktivitesi elde edilememiştir. Maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı % 0.3 (w/v) pepton konsantrasyonunda elde edilmesine rağmen maksimum enzim aktiviteleri % 0.14 (w/v) pepton konsantrasyonunda elde edilmiştir.



Şekil 7.21. Farklı pepton konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm, ■:% 0.05, ♦:% 0.14, ▲:% 0.3 (w/v) Pepton)

Farklı pepton konsantrasyonlarında inkübasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 7.22.' de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. % 0.3 (w/v) pepton konsantrasyonunda protein değerleri düzensiz olduğu için verilmemiştir. En yüksek protein konsantrasyonu maksimum enzim aktivitelerinin elde edildiği % 0.14 (w/v) pepton konsantrasyonunda elde edilmiş ve 96. saatte 0.44 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Azot kaynaklarının etkisi toplu olarak değerlendirildiğinde, amonyum sülfatın pektinaz enzimlerinin üretiminde daha kullanışlı olduğu görülmüş ve daha sonra yapılacak deneylerde azot kaynağı olarak amonyum sülfatın (% 0.05 (w/v)) kullanımına karar verilmiştir. İnorganik azot kaynağı olan amonyum sülfatın enzim üretimini arttırması azotlu bileşiklerin sentezinde NH_4^+ iyonunun daha kolay kullanılması ile açıklanabilir (Özeş, 1988). Literatürde de, Ward ve Fogarty (1974), *Bacillus subtilis* ve *Flavobacterium pectinovorum* ile poligalakturonat liyaz üretiminde en yüksek aktivite değerini *Bacillus subtilis* için glutamin ve amonyum sülfat içeren ortamda ve *Flavobacterium pectinovorum* için amonyum sülfat içeren ortamda elde etmişlerdir. Fawole ve Odunfa (2003), *Aspergillus niger* ile pektik enzim üretimini etkileyen faktörleri inceledikleri çalışmalarında amonyum sülfatı en iyi azot kaynağı olarak seçmişlerdir. Buna karşın, Swain ve Ray (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis* CM5 ile ekzo poligalakturonaz üretimi % 1 (w/v) pepton içeren kültür ortamında gerçekleştirilmiştir.



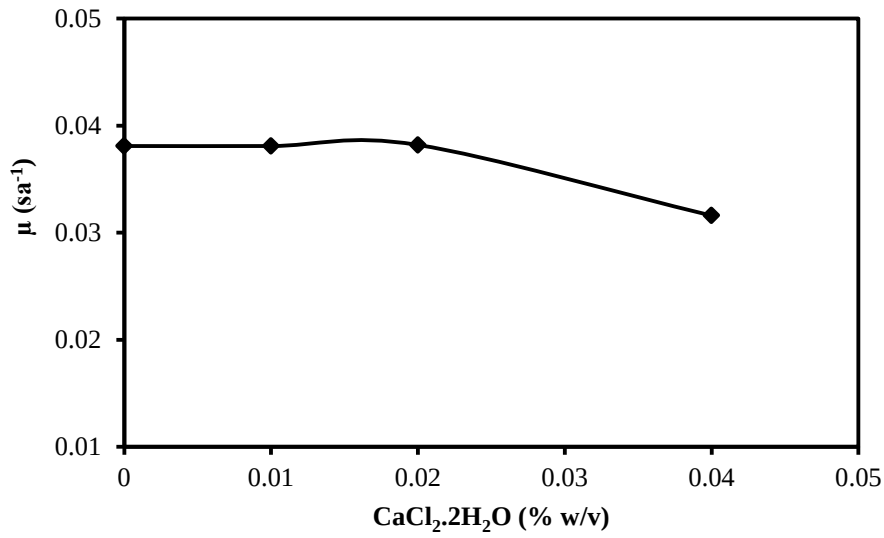
Şekil 7.22. Farklı pepton konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, KH: 150 rpm, ■:% 0.05, ◆:% 0.14 (w/v) Pepton)

7.1.5. Metal İyonlarının Etkisi

Metal iyonları mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olup, enzim sentezini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca, enzim kararlılığının ve preteolitik etkilere karşı korunması için ortamda mutlaka etkili metal iyonlarının bulunması gerekmektedir (Tanyıldızı, 2005). Pektinaz enzimi üretimi ve hücre dışı performansı, çözeltide mevcut iyonlarla doğrudan bağlantılıdır. Bakterilerle pektinaz üretiminde kalsiyum iyonlarının etkisi çeşitli çalışmacılar tarafından araştırılmıştır. Yüksek metal iyonu konsantrasyonlarında dış ortama protein salgılanması engellendiğinden enzim üretimi düşük oranda gerçekleşir (Ahlawat vd., 2009). Genelde, bakteriyal pektat liyazlar, enzimin kalsiyum bağlama bölgesi ve poligalakturonik zincirleri arasında tuz köprüsü oluşumu için kalsiyuma ihtiyaç duyarlar. EDTA benzeri kompleksleştirici maddeler ise, enzim aktivitesinde kuvvetli inhibisyon etkisine sahiptir (Klug-Santner vd., 2006; Ouattara vd., 2008). Ayrıca, kalsiyum iyonları, enzimin yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılığını da arttırabilmektedir (Shevchik vd., 1997; Kobayashi vd., 1999). Verilen bu bilgiler ışığında, metal iyonlarının enzim üretimine etkisini belirlemek amacıyla kalsiyum ve sodyum iyonları incelenmiştir.

7.1.5.1. Kalsiyum İyonu Konsantrasyonunun Etkisi

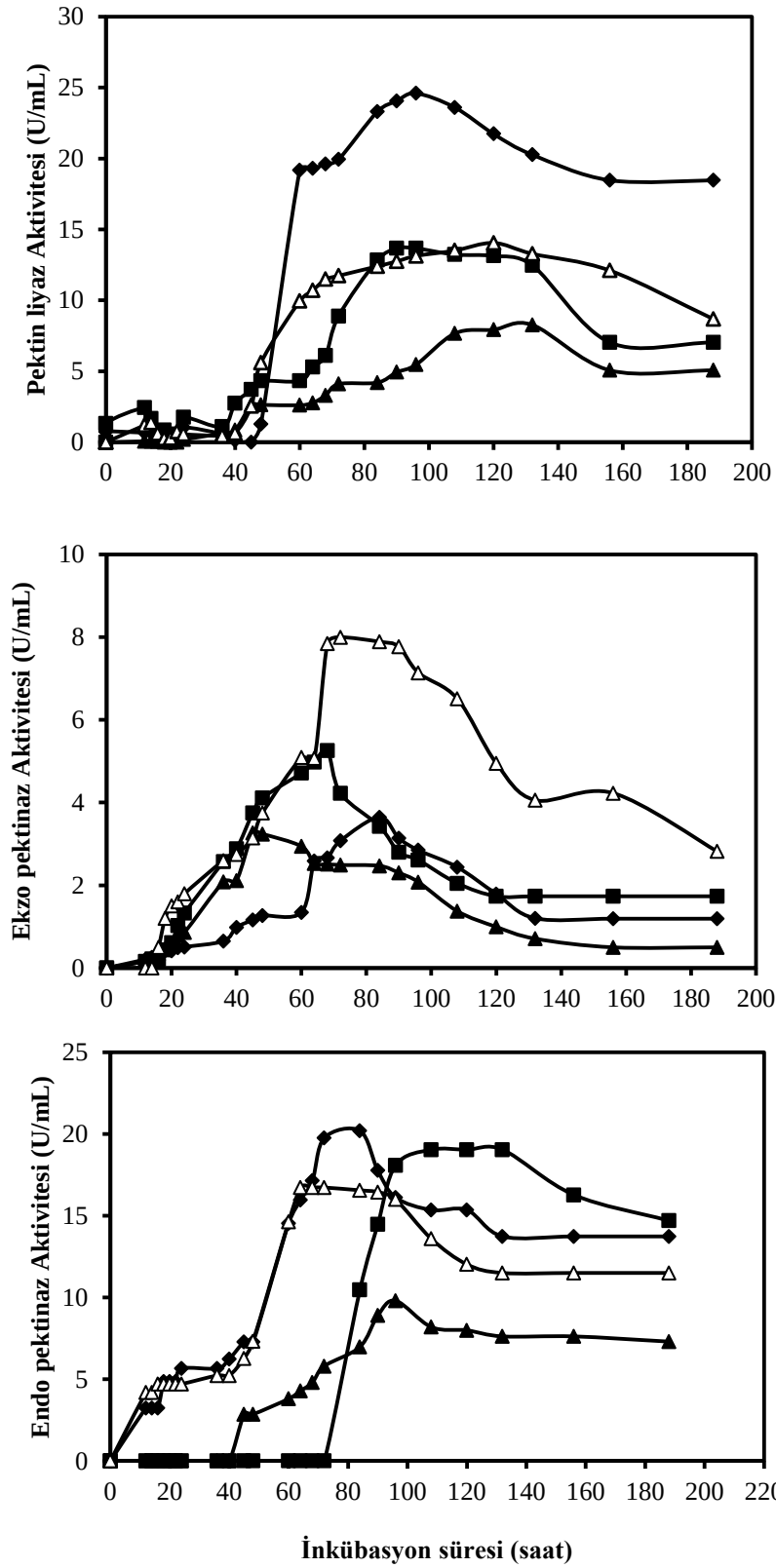
Enzim üretimi ve mikroorganizma özgül üreme hızına kalsiyum iyonu konsantrasyonunun etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonda kalsiyum klorür içeren (% 0.01, 0.02 ve 0.04 (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) fermantasyon ortamlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Azot kaynağı olarak % 0.05 (w/v) konsantrasyonunda amonyum sülfat kullanılmıştır. Mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 7.23.' de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı % 0.02 (w/v) kalsiyum iyonu içeren ortamda $0.0382 \text{ (sa}^{-1}\text{)}$ olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu değerin kalsiyum iyonunun kullanılmadığı ortamda elde edilen özgül üreme hızına çok yakın olduğu tespit edilmiştir.



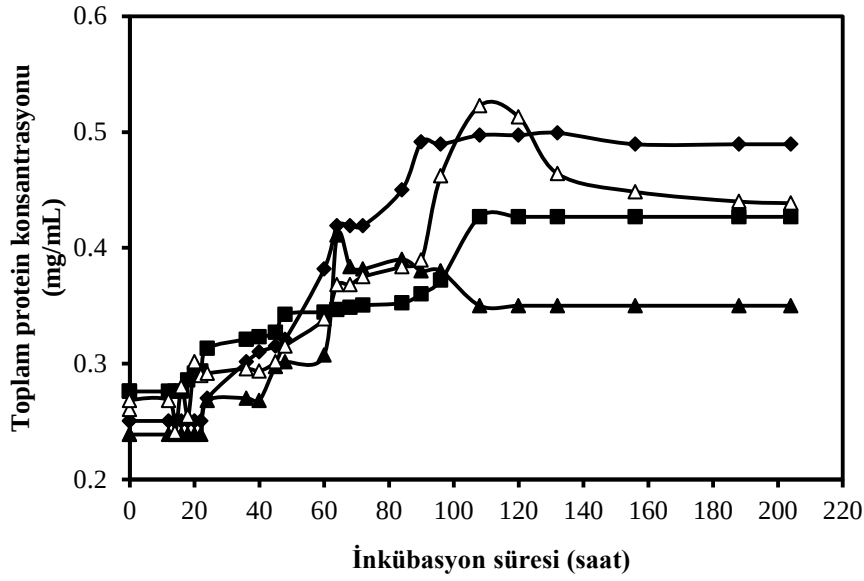
Şekil 7.23. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarda elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T:30 °C, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) amonyum sülfat, KH: 150 rpm)

Kalsiyum iyonunun enzim üretimine etkisinin incelendiği deneylerde elde edilen bulgular Şekil 7.24.' de verilmiştir. Fermantasyon ortamına $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eklenmesiyle pektin liyaz ve endo pektinaz aktivitesinde belli oranlarda artışlar gözlemlenmiş, maksimum pektin liyaz aktivitesi ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 96. saatte 24.60 U/mL, 84. saatte 20.20 U/mL olarak % 0.02 (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda elde edilmiştir. Buna karşın, kalsiyum iyonu ilavesinin ekzo pektinaz üretimi üzerine inhibitör etki yaptığı gözlemlenmiş ve aktivitede 2.74 U/mL' lik bir azalma olduğu hesaplanmıştır.

Toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi Şekil 7.25.' de sunulmuş ve en yüksek protein konsantrasyonu $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ içermeyen fermantasyon ortamında 108. saatte 0.52 mg/mL olarak ölçülmüştür.



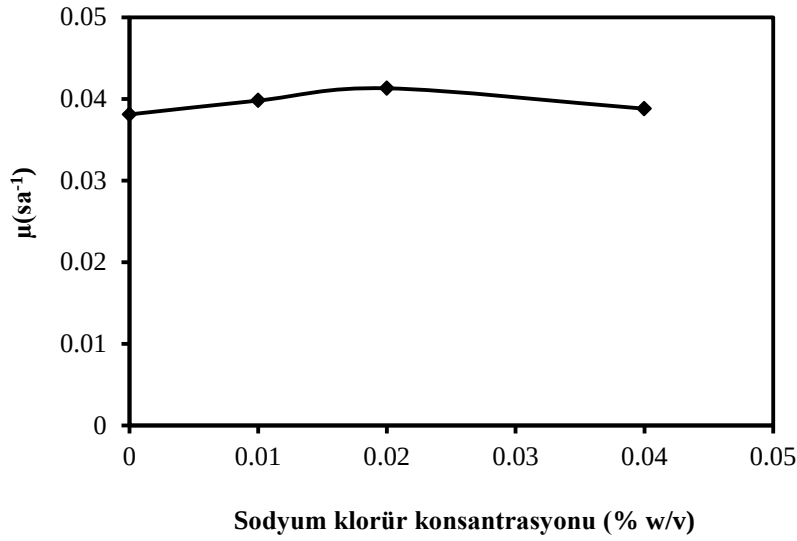
Şekil 7.24. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 amonyum sülfat, KH: 150 rpm, ■: % 0.01, ◆: % 0.02, ▲: % 0.04, △: % 0.00 (w/v) Kalsiyum klorür dihidrat kons.)



Şekil 7.25. Farklı $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T:30 °C, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) amonyum sülfat, KH:150 rpm, ■:% 0.01, ♦:% 0.02, ▲: % 0.04, △:% 0.00 (w/v) Kalsiyum klorür dihidrat kons.)

7.1.5.2. Sodyum İyonu Konsantrasyonunun Etkisi

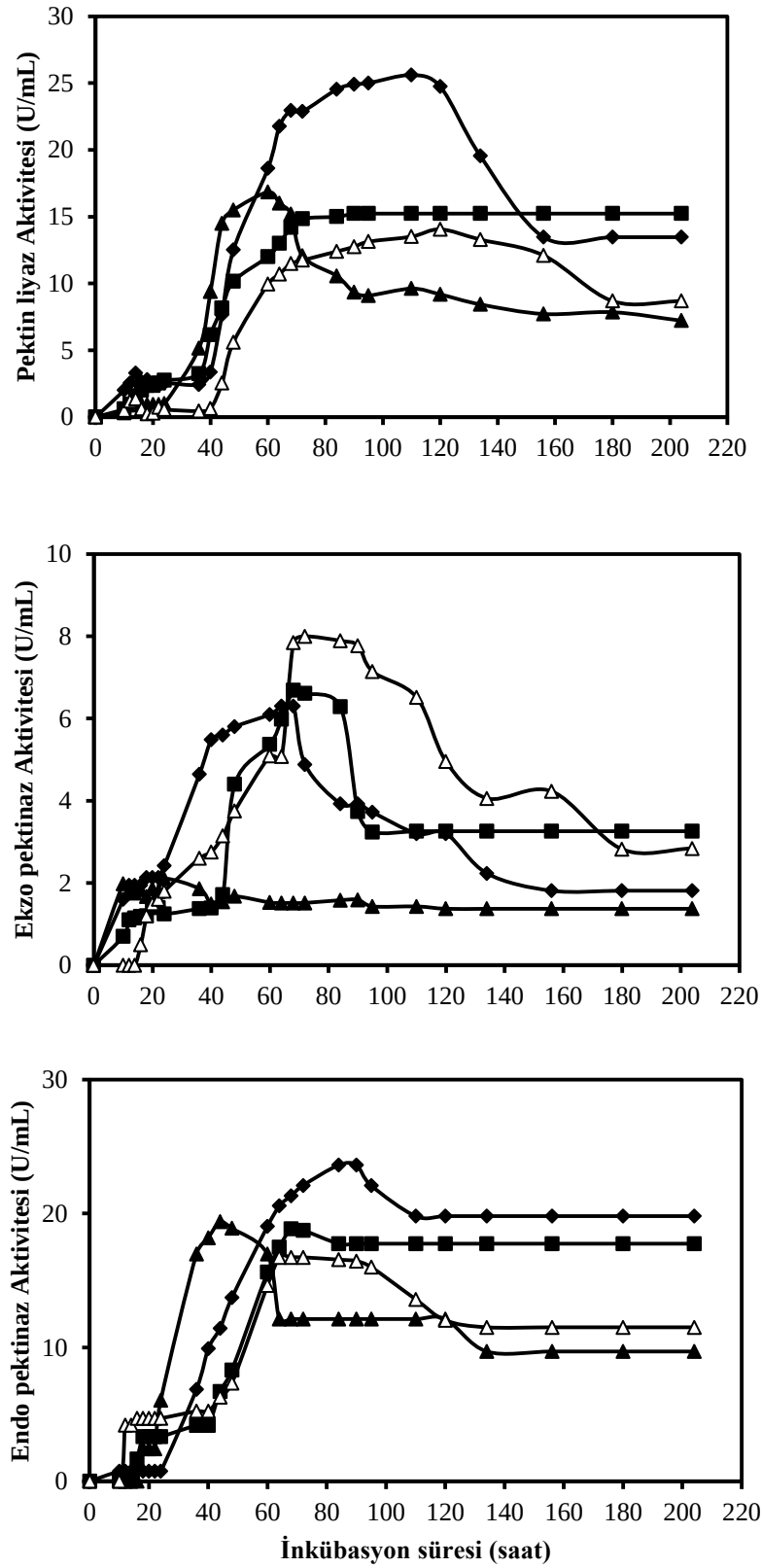
Sodyum iyonunun mikroorganizma üreme ve enzim aktivitesine etkisinin incelendiği çalışmada, üç farklı konsantrasyonda NaCl içeren besiyerlerindeki mikroorganizma özgül üreme ve aktivite değerleri saptanmıştır. Mikroorganizma özgül üreme hızlarındaki değişim Şekil 7.26.' da verilmiş ve eklenen NaCl ile mikroorganizma özgül üreme hızının çok fazla değişmediği gözlenmiştir. Sodyum iyonunun enzim üretimine etkisinin incelendiği deneyler sonucu elde edilen bulgular Şekil 7.27.' de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, NaCl eklenmesiyle pektin liyaz ve endo pektinaz aktivite değerleri % 0.02 (w/v) NaCl konsantrasyonuna kadar artmış, daha sonra ise düşmüştür. % 0.02 (w/v) NaCl konsantrasyonunda maksimum pektin liyaz aktivitesi 110. saatte 25.60 U/mL ve endo pektinaz aktivitesi 84. saatte 23.62 U/mL olarak ölçülmüştür. % 0.02 (w/v) NaCl konsantrasyonunun mikroorganizma özgül üreme hızını artırıcı etkisi yanında enzim aktivitesini de arttırdığı görülmüştür. Fermantasyon ortamına NaCl eklenmesiyle ise ekzo pektinaz aktivitesinde ise 1.32 U/mL' lik bir azalma meydana gelmiştir.



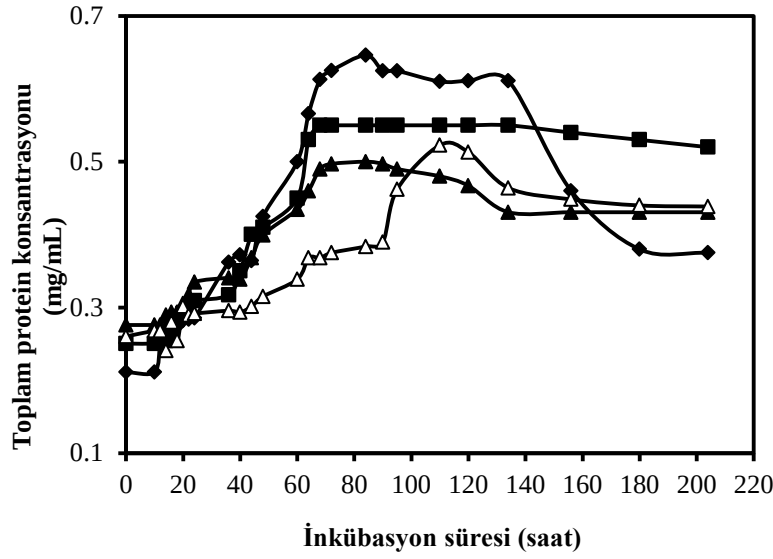
Şekil 7.26. Farklı NaCl konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, KH: 150 rpm)

Gummadi ve diğerleri (2007) tuzların pektinaz üretimine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, 1 M KCl konsantrasyonuna kadar *Debaryomyces nepalensis*' in özgül üreme hızının etkilenmediğini, NaCl ve LiCl ilavesinde ise etkilendiğini belirtmişlerdir. *Debaryomyces nepalensis*' in Na⁺ a karşı bu düşük toleransının, azalan üreme hızı ve osmotik basınç ile beraber katyonun toksik etkisinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Ayrıca, Membre ve Burlot (1994), *Pseudomonas marginalis*' in büyüme ve pektinolitik aktivitesine sıcaklık, pH ve NaCl' ün etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tuz ilavesi ile enzim üretiminin oldukça inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

Farklı NaCl konsantrasyonlarında inkübasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 7.28.' de gösterilmiş ve en yüksek toplam protein konsantrasyonu % 0.02 (w/v) NaCl konsantrasyonunda 0.65 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 7.27. Farklı NaCl konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) amonyum sülfat, KH: 150 rpm, ■:% 0.01, ◆:% 0.02, ▲:% 0.04, △:% 0.00 (w/v) NaCl kons.)

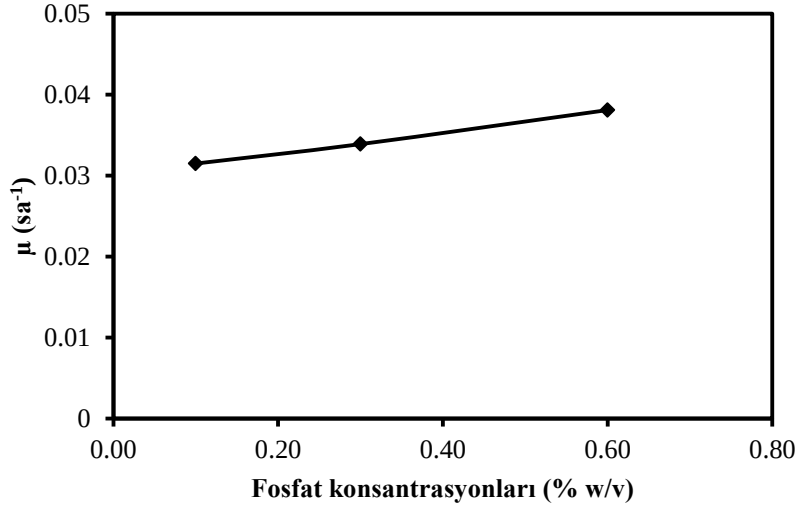


Şekil 7.28. Farklı NaCl konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) amonyum sülfat, ■:% 0.01, ◆:% 0.02, ▲:% 0.04, △:% 0.00 (w/v) NaCl kons.)

7.1.6. Fosfat Konsantrasyonunun Etkisi

Fosfat, mikroorganizmalar tarafından enzim salgılanmasını artıran bir faktör olarak bilinir. Ancak, Andersson ve arkadaşları, fosfatın varlığında yoğun bir karıştırma ve havalandırmanın jel oluşumunu aşırı artırdığını ve üretim sırasında yüksek fosfat kullanımının imkânsız olduğunu belirtmişlerdir (Antov ve Pericin, 2003).

Fosfat konsantrasyonunun mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim üretimine etkisini belirlemek için fermentasyon ortamına farklı konsantrasyonlarda K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 ilave edilmiştir (% 0.1 (w/v) K_2HPO_4 + % 0.1 (w/v) KH_2PO_4 ; % 0.3 (w/v) K_2HPO_4 + % 0.15 (w/v) KH_2PO_4 ; % 0.6 (w/v) K_2HPO_4 + % 0.2 (w/v) KH_2PO_4). Fermentasyon ortamı bileşimi % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) $(NH_4)_2SO_4$, % 0.01 (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve farklı fosfat konsantrasyonlarından oluşmaktadır. Şekil 7.29.' da farklı fosfat konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları verilmiştir. En yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı ($0.0381 \text{ (sa}^{-1}\text{)}$), % 0.6 (w/v) K_2HPO_4 + % 0.2 (w/v) KH_2PO_4 ' ün kullanıldığı ortamdan elde edilmiştir.

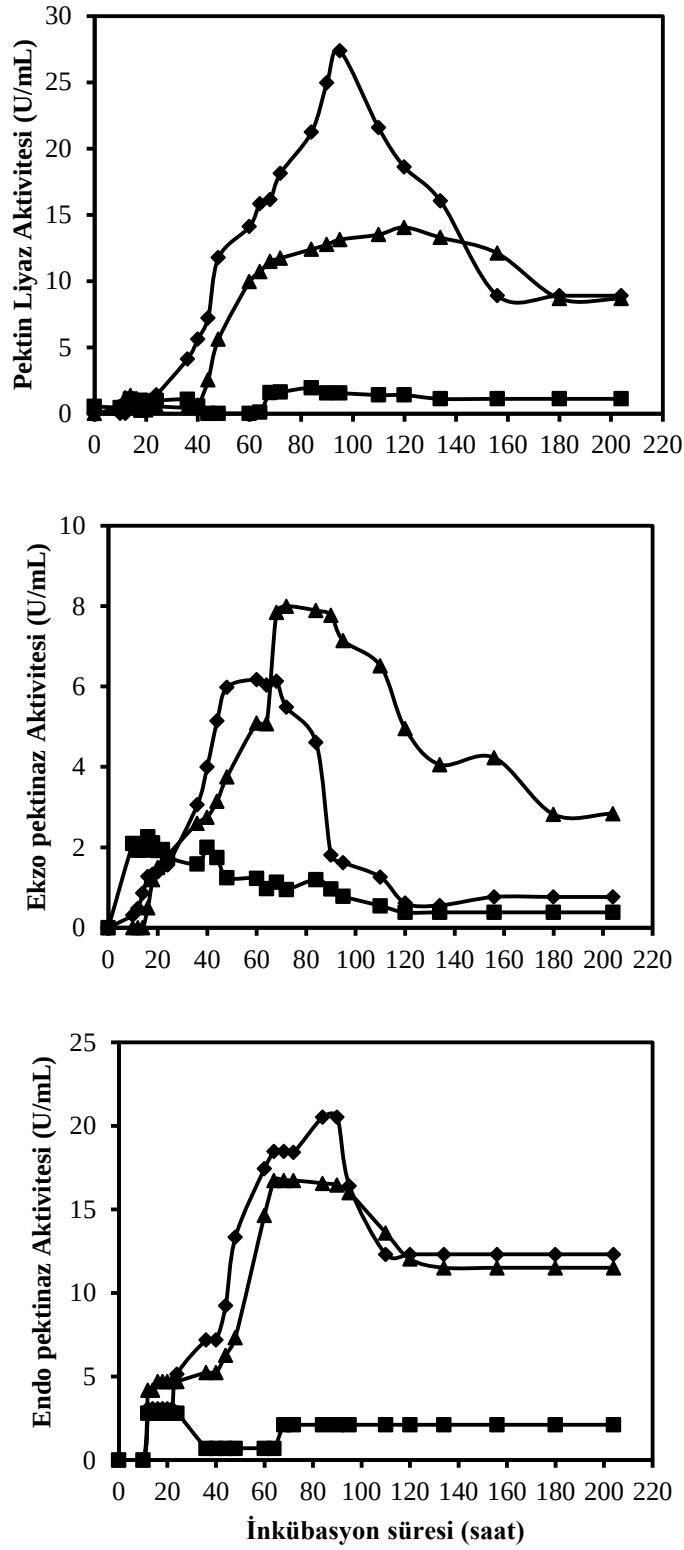


Şekil 7.29. Farklı fosfat konsantrasyonlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) AS)

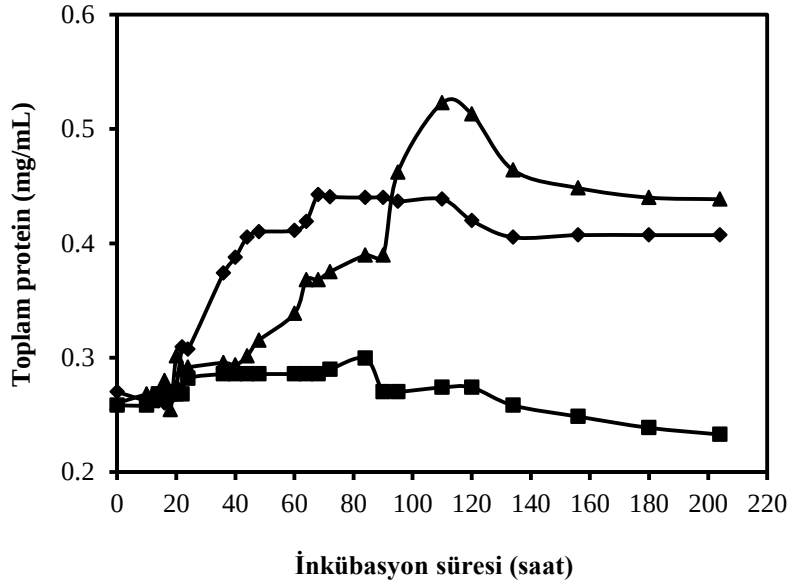
Farklı fosfat konsantrasyonlarının enzim aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 7.30.' da verilmiştir. En yüksek pektin liyaz ve endo pektinaz aktiviteleri % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 (w/v) KH₂PO₄ konsantrasyonunda elde edilirken, en yüksek ekzo pektinaz aktivitesi ise % 0.6 K₂HPO₄ + % 0.2 (w/v) KH₂PO₄ konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Elde edilen maksimum pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 95. saatte 27.37 U/mL, 68. saatte 8.00 U/mL ve 84. saatte 20.51 U/mL' dir.

Hsu ve Vaughn inorganik fosfatın *Aeromonaz liquifaciens*' in poligalakturonik asit transeliminaz oluşumunu artırdığını belirtmişlerdir. *Erwinia aroideae*' nin pektinaz üretimi, 0.1-0.5 M aralığındaki konsantrasyonlarda inorganik fosfatla artmış ve yaklaşık olarak 0.15 M optimum konsantrasyon olarak bulunmuştur (Tomizawa vd., 1970).

Farklı fosfat konsantrasyonlarında inkübasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein konsantrasyonları Şekil 7.31.' de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. En yüksek toplam protein konsantrasyonu % 0.6 K₂HPO₄ + % 0.2 (w/v) KH₂PO₄ konsantrasyonunda 110. saatte 0.52 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 7.30. Farklı fosfat konsantrasyonlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi pH=8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, % 1 (w/v) pektin, % 0.05 (w/v) amonyum sülfat, ■:% 0.1-0.1, ♦:% 0.3-0.15, ▲:% 0.6-0.2 (w/v) K_2HPO_4 - KH_2PO_4 kons.)



Şekil 7.31. Farklı fosfat konsantrasyonlarında toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, KH: 150 rpm, ■: % 0.1-0.1, ◆: % 0.3-0.15, ▲: % 0.6-0.2 (w/v) K₂HPO₄ -KH₂PO₄ kons.)

7.1.7. Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

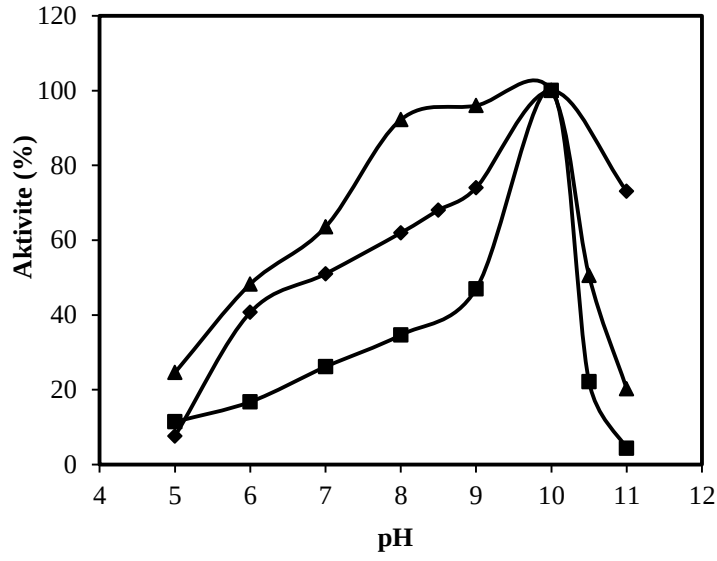
Enzimler, protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Organizmanın iç ortamı, pH' ı ve sıcaklığı proteinler için doğal bir ortam sağlar. Ortamdaki değişim proteinin kısmen ya da tamamen bozunmasını beraberinde getirir. Enzimler açısından bir proteinin bozunması, katalitik aktivitenin azalmasına neden olur (Shubakov ve Elkina, 2002). Bu nedenle, bir enzimin aktivitesini koruyacak optimum pH ve sıcaklık şartlarını bulmak gereklidir.

Enzimin maksimum aktivite göstereceği pH ve sıcaklığı bulmak için enzimin yüksek aktivite gösterdiği ortamda (% 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.6 K₂PO₄, % 0.2 KH₂PO₄ ve % 0.01 (w/v) MgSO₄ · 7H₂O) 84. saatte alınan numune santrifüjlendikten sonra sıvı kısım enzim kaynağı olarak kullanılarak standart ölçüm şartları altında enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık belirlenmiştir.

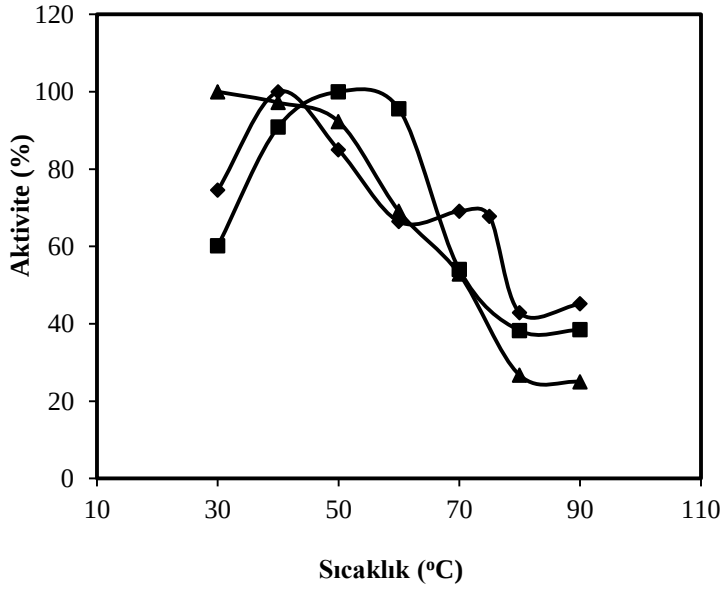
Enzimlerin pH 5-11 arasında bir birim arayla aktiviteleri belirlenerek aktif oldukları pH aralıkları ve optimum pH' ı bulunmuştur. Aktivite tayininde kullanılan substrat çözeltisini hazırlamak için dört farklı tampon çözelti kullanılmıştır. pH 5.0' de sitrat, pH 6.0-7.0 arasında fosfat, pH 8.0-9.0 Tris-HCl, pH 10.0-11.0 arasında glisin-NaOH tamponları kullanılmıştır. Pektin liyaz için 0.05 M, ekzo ve endo pektinaz aktivitesi için 0.1 M' lık tamponlar hazırlanmıştır.

Pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği pH değeri, 10.0 (glisin-NaOH tamponu) olarak bulunmuştur. pH 10.0' daki aktivite % 100 alınarak diğer pH değerleri buna göre oranlanmış ve relatif enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. pH' a karşı % aktivite grafiği Şekil 7.32.' de verilmiştir. *Bacillus pumilus* (NRRL B-212) suşuna ait pektinaz grubu enzimlerin pH 10.0' da aktivite göstermesi nedeniyle bu enzim grubu alkali özelliktedir. Bakteriyal pektinolitik enzimlerin optimal pH' ı 5.0 ve 7.0 arasında, fungal ve bitki kaynaklı olanların ise optimum pH' ı 4.0 ve 5.5 arasındadır (Kobayashi vd., 2001). Çeşitli araştırmacılar yapmış oldukları farklı çalışmalarda alkali özellik gösteren pektinaz enzimi izole etmişlerdir. *Bacillus sp.* DT7' den elde edilen pektinaz pH 7.5-8.5 alkali şartlarda oldukça kararlıdır (Kashyap vd., 2000). Parisot ve diğerleri (2002) *Thermotoga maritima*' dan ekzopoligalakturonat liyaz üretmişler ve enzimin optimum pH' ını 9.5 olarak belirlemişlerdir. Daha alkali aralıkta (10.5-11.0) pH optimumuna sahip pektinazlar *Bacillus sp.* NT-2, NT-6, NT-33 ve NT-82 ve *Bacillus sp.* KSM-P15' den üretilmiştir. Alkali şartlar altında aktif pektinazlar ticari açıdan daha önemlidirler. Çünkü alkalofilik pektinolitik mikroorganizmalar, pektinli materyalleri daha kolay gidermekte ve aktif çamur işleminde daha kolay parçalanmalarını sağlamakta, dolayısıyla, pektik maddelerin pektik atık sulardan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Kapoor vd., 2000).

Pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması amacı ile sıcaklık 30-90 °C aralığında 10' ar birim artırılarak aktivite analizleri yapılmıştır. En yüksek aktivite % 100 alınarak diğer sıcaklıklarda % aktiviteler hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.33.' de verilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre *Bacillus pumilus* suşuna ait pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri sırasıyla, 40, 50 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Bu yüksek sıcaklıklar, endüstriyel proseslerde enzimlerin kullanımı için iyi bir avantaj sağlar (Mahmoud vd., 2008).



Şekil 7.32. Enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi (◆: Pektin liyaz, ■: Ekzo pektinaz, ▲: Endo pektinaz)



Şekil 7.33. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (◆: Pektin liyaz, ■: Ekzo pektinaz, ▲: Endo pektinaz)

7.1.8. Biyoreaktör Deneyleri

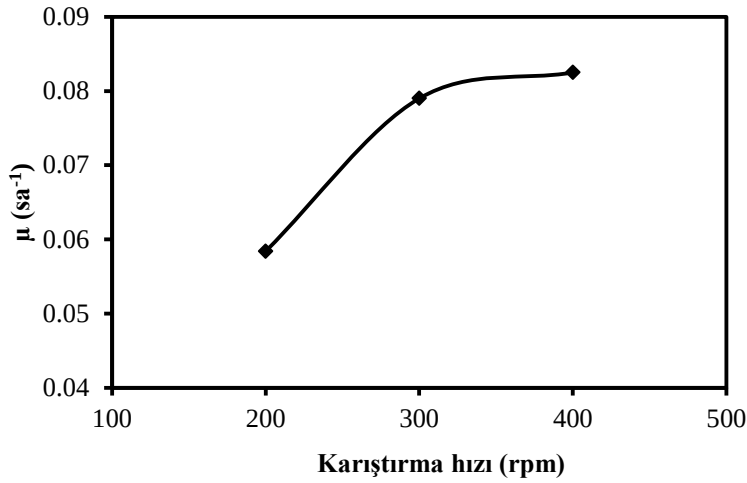
Biyoreaktörler, çalkalamalı erlenler üzerinde çeşitli avantajlara sahiptirler. Biyoreaktörlerde pH, karıştırma ve hava akış hızı gibi proses parametreleri daha iyi kontrol edilir (Gummadi ve Kumar, 2008). Aerobik fermentasyonlarda, oksijen transferi anahtar bir değişkendir ve havalandırma ve karıştırmanın bir fonksiyonudur. Bu nedenle

maksimum ürün eldesi için optimum karıştırma ve hava akış hızı değerlerinin bulunması gereklidir (Potumarthi vd., 2007). Çalışmanın bu kısmında *Bacillus pumilus* ile pektin liyaz, endo pektinaz ve ekzo pektinaz üretimine karıştırma ve hava akış hızının etkisi, kesikli sistemde 5 litre çalışma hacmine sahip 6 litrelik laboratuvar ölçekli biyoreaktör (New Brunswick Bioflo III) kullanılarak incelenmiş, oksijen tüketim hızları ve sıvı faz hacimsel kütle transfer katsayıları belirlenmiştir.

7.1.8.1.Karıştırma Hızının Etkisi

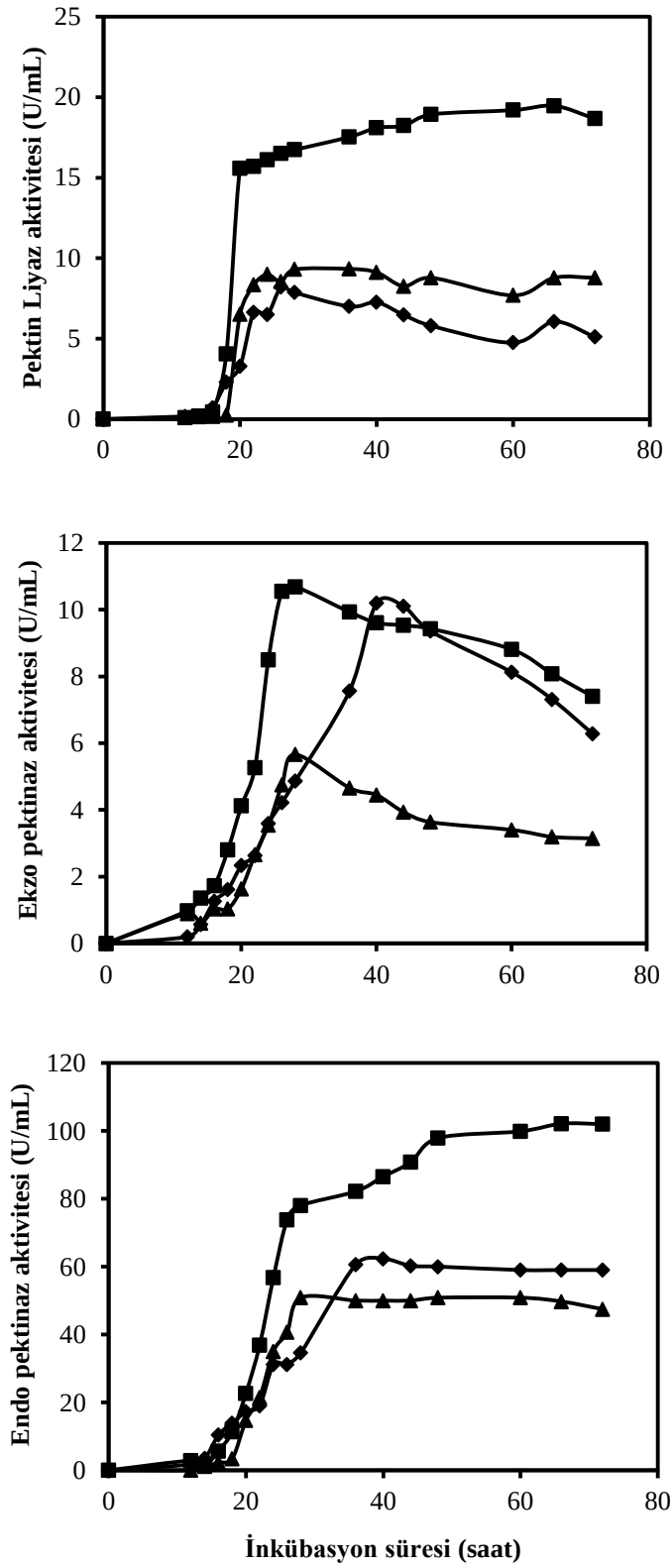
Karıştırma, besiyerinin uygun şekilde karışmasını sağlar ve sistem verimliliğinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu etkiler, hücre duvarının bozulması, hücre morfolojisinde değişimler, substrat kullanımında, üreme hızında ve ürün oluşumu veriminde değişiklikler gibi faydalı ya da zararlı olabilir. Hücre bozulması; genelde tepkime kabındaki kayma geriliminin hücre duvarını kırmak için gerekli kuvvetten daha yüksek olduğu durumda oluşur. Ayrıca yüksek karıştırma hızlarında aşırı köpüklenme meydana gelir (Naik vd., 2008). Karıştırmalı biyoreaktörde karıştırma hızı oksijen aktarımını etkileyen temel parametrelerden biridir.

Optimize edilmiş derin kültür fermantasyon ortamı (% 1 pektin+% 0.05 amonyum sülfat+% 0.3 K_2HPO_4 +% 0.15 KH_2PO_4 +% 0.01 (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) kullanılarak 0.1 vvm hava akış hızında, farklı karıştırma hızlarının (200, 300 ve 400 rpm) mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 7.34.' de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi 200, 300 ve 400 rpm' de elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları sırasıyla 0.0584, 0.0790 ve 0.0825 (sa^{-1}) olarak belirlenmiştir. Karıştırma hızının artmasıyla, mikroorganizma substrat temasının artması sonucu mikroorganizma özgül üreme hızı artmıştır.



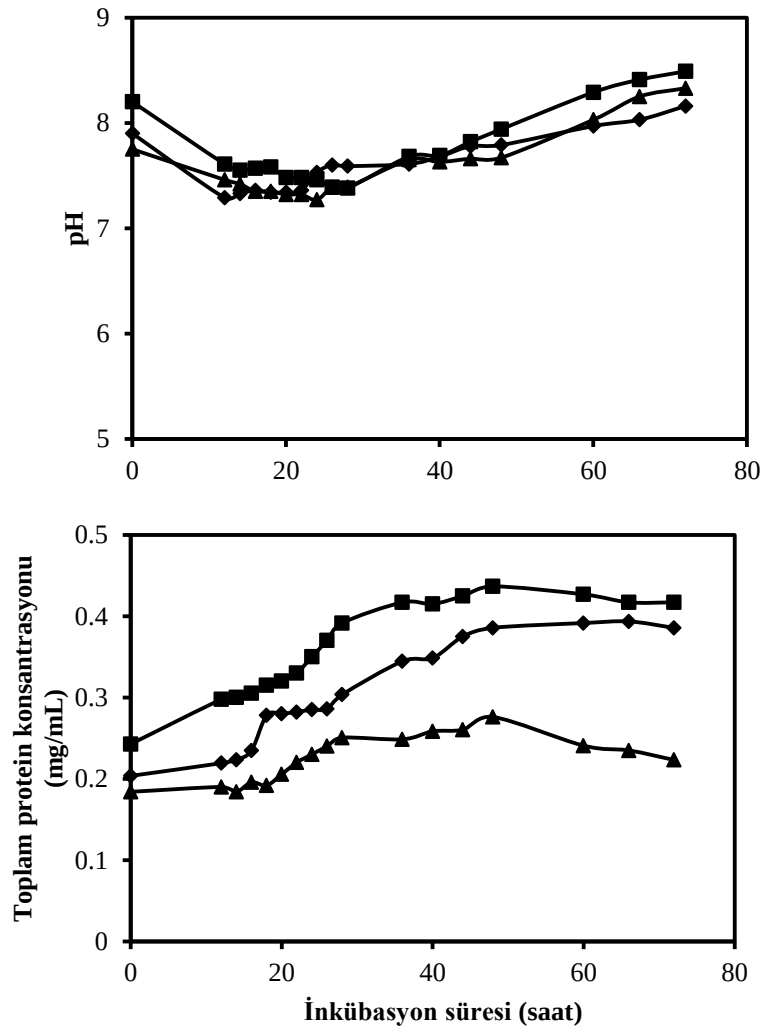
Şekil 7.34. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 KH₂PO₄, % 0.01 (w/v) MgSO₄.7H₂O, Hava akış hızı: 0.1 vvm)

Pektin liyaz, endo ve ekzo pektinaz aktivitelerinin zamanla ve karıştırma hızı ile değişimi Şekil 7.35.' de verilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi, en yüksek pektin liyaz aktivitesi 300 rpm' de 66. saatte 19.5, ekzo pektinaz aktivitesi 28. saatte 10.69, endo pektinaz aktivitesi 66. saate 102.13 U/mL olarak tespit edilmiştir. Bu durum, düşük karıştırma hızında yetersiz karıştırma ya da oksijen kısıtlaması ile açıklanabilir (Kao ve diğ., 2007). Çok yüksek karıştırma hızlarında ise, ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ve makromoleküllerin dağılımı artmakta enzim aktiviteleri negatif olarak etkilenebilmektedir (Feng vd., 2003). Yüksek karıştırma hızlarında metabolit üretimindeki azalma, yüksek kayma gerilmelerine maruz kalan hücrelerin hasarı ve bozunmalarından kaynaklanmaktadır (Bandaiphet ve Prasertsan, 2006). Öncü (2007) tarafından yapılan çalışmada, 500 rpm' de elde edilen maksimum biyokütlenin 200 ve 350 rpm' de elde edilenlerden sırasıyla 3.27 ve 3.67 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Maksimum enzim üretimini ise 200 rpm' de elde etmişlerdir. Oksijenin proses için sınırlayıcı bir adım olmadığını ve enzim sentez metabolizması ile bunun, kısmen bağlantılı olduğunu açıklamışlardır. Benzer sonuçlar Songpim ve diğerleri (2010) tarafından yapılan çalışmada da kaydedilmiştir. Songpim ve diğerleri (2010), *P. polymyxa* ile pektat liyaz aktivitesini etkileyen parametreleri optimize etmek için tepki yüzey metodunu kullanmışlar ve 200 rpm ve üzerindeki karıştırma hızlarında enzim üretiminin azaldığını tespit etmişlerdir. Lee ve diğerleri (2010) ise, pirinç kabuğundan karboksimetilselülaz üretimini optimize ettikleri çalışmalarında, yüksek karıştırma hızlarının karboksimetilselülaz üretimini inhibe ederken *B. subtilis* subsp.*subtilis*' in hücre üremesini teşvik ettiğini belirtmişlerdir.



Şekil 7.35. Farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 KH₂PO₄, % 0.01 (w/v) MgSO₄.7H₂O, Hava akış hızı: 0.1 vvm, ◆:200, ■:300, ▲:400 rpm)

pH ve toplam protein miktarının inkübasyon süresi ile değişimi Şekil 7.36.' da verilmiştir. Ortam pH' ı inkübasyon süresi ile önce azalmış, belli değere geldikten sonra artmaya başlamıştır. Biyoreaktörde havalandırmalı şartlarda kesikli sistem erlen çalışmalarına göre daha hızlı bir pH düşüşü ve ardından alkalinizasyon görülmüştür. Benzer durum, Venugopal ve diğerleri tarafından (2007) termofilik mantar *Mycotypha sp.* AKM 1801 ile kahve posasından endo pektinaz üretiminde havalandırmanın etkisinin araştırıldığı çalışmada da gözlenmiştir. Toplam protein konsantrasyonu enzim aktiviteleri ile paralel olarak en fazla 300 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. Maksimum protein miktarı 48. saatte 0.44 mg/mL olarak bulunmuştur. Daha sonraki biyoreaktör deneylerinde karıştırma hızı olarak, en yüksek enzim aktivitelerinin elde edildiği 300 rpm seçilmiştir.



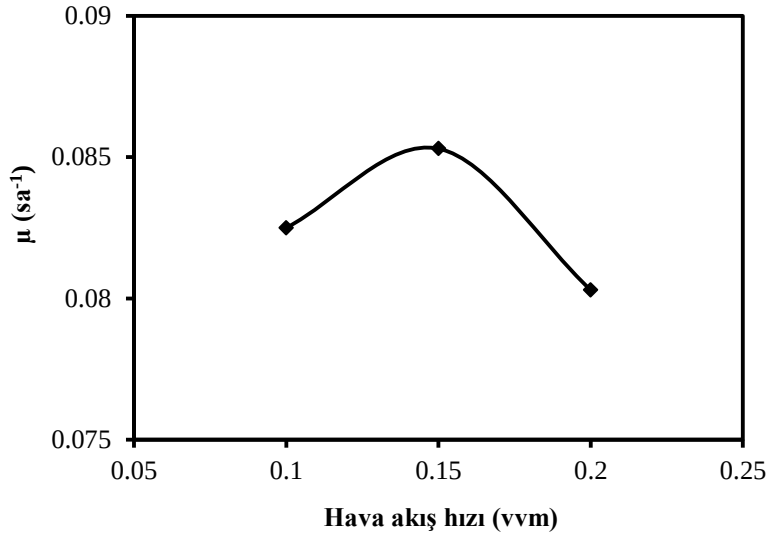
Şekil 7.36. Farklı karıştırma hızlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 KH₂PO₄, % 0.01 (w/v) MgSO₄.7H₂O, Hava akış hızı: 0.1 vvm, ◆: 200, ■:300, ▲:400 rpm)

Biyoreaktör deneylerinde daha yoğun bir karıştırma uygulandığından fermantasyon süresi azalmıştır. Kesikli sistemde erlenlerde yapılan çalışmalarda en yüksek aktivite değerleri pektin liyaz, endo ve ekzo pektinaz için sırasıyla 95, 68 ve 84. saatlerde elde edilmişken biyoreaktör deneylerinde sırasıyla 66, 28 ve 66. saatlerde elde edilmiştir. Fermantasyon zamanının kısalması ve ürün oluşumunun artması üretim maliyetlerini azalttığından biyoreaktörlerde enzim üretimi çok avantajlıdır (Gummadi ve Kumar, 2006). Benzer sonuç, Gummadi ve Kumar (2008) tarafından biyoreaktörde yapılan *Debaryomyces nepalensis* ile pektin liyaz üretimi çalışmasında da gözlenmiş, fermantasyon süresi 95 saatten 65 saate azalmıştır.

7.1.8.2. Hava Akış Hızının Etkisi

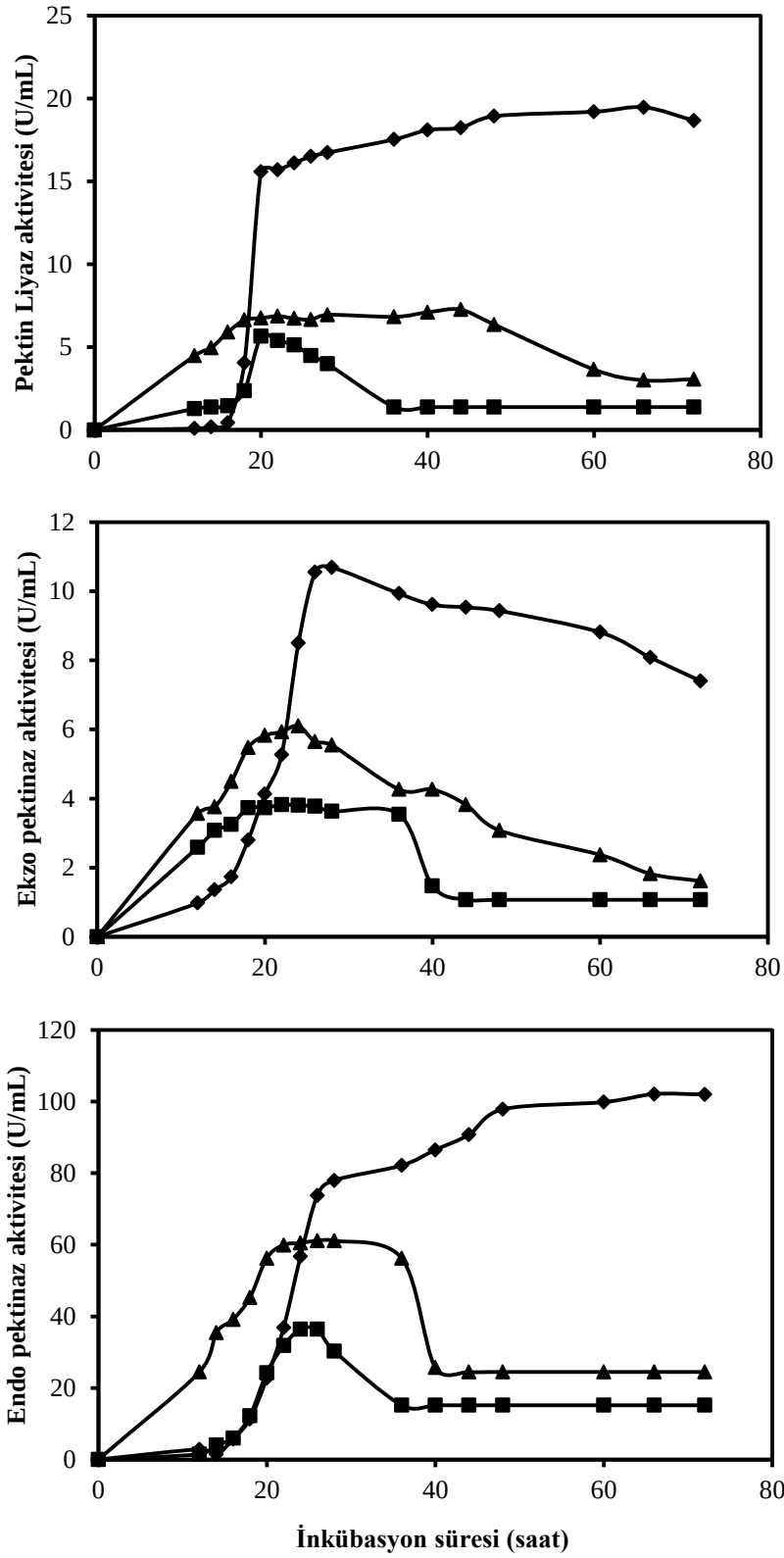
Sulu çözeltilerde oksijen, çözünürlüğünün az olmasından dolayı hız sınırlayıcı faktördür ve aerobik fermantasyonlarda hücre büyümesini, ürün verimini etkiler (Potumarthi vd., 2007). Fermantasyon ortamında çözünmüş oksijen konsantrasyonu, gaz fazdan sıvı faza oksijen transfer hızına, mikroorganizmanın oksijen alım hızına ve oksijen tüketim hızına bağlıdır. Fermantasyon sırasında oksijen transferi; hava kabarcıklarından ortama, hücrelere ve hücre içinde reaksiyon bölgesine transfer ile gerçekleşir. Oksijen transferi, hava akış hızının artması ile artar (Naik vd., 2008). Ancak, yüksek hava akış hızlarında hücre hasarı sonucu inhibisyon oluşabilir (Fadzilah ve Mashitah, 2010).

Optimize edilmiş derin kültür fermantasyon ortamı kullanılarak 300 rpm karıştırma hızında, farklı hava akış hızlarının (0.1, 0.15 ve 0.2 vvm) mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı hava akış hızlarında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 7.37.' de verilmiştir. En yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı 0.15 vvm' de 0.0853 (sa⁻¹) olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, hava akış hızının mikroorganizma özgül üreme hızı üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Havalandırma, mikrobiyal gelişim ve ürün oluşumuna yardımcı olabilir. Havalandırma ile hücrelere oksijen sağlanır ve yüksek biyokütle konsantrasyonlarına ulaşılabilir. Hava akış hızı 0.15 vvm' nin üzerine çıktığında ise inhibisyondan dolayı mikroorganizma özgül üreme hızında düşme gözlenmiştir.

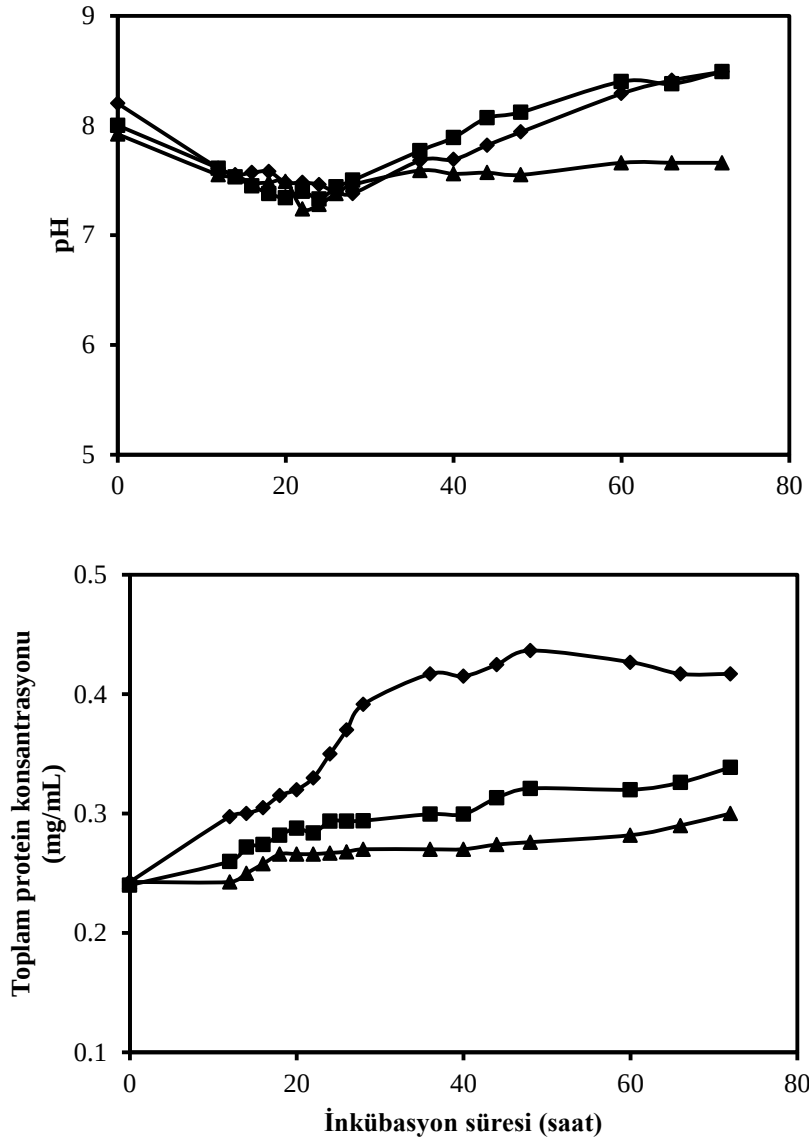


Şekil 7.37. Farklı hava akış hızlarına elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 KH₂PO₄, % 0.01 (w/v) MgSO₄.7H₂O, KH:300 rpm)

Pektin liyaz, endo ve ekzo pektinaz aktivitelerinin zamanla ve hava akış hızı ile değişimi Şekil 7.38.' de sunulmuştur. Şekillerden de görüldüğü gibi en yüksek pektin liyaz aktivitesi 0.1 vvm' de 66. saatte 19.5, ekzo pektinaz aktivitesi 28. saatte 10.69, endo pektinaz aktivitesi 66. saatte 102.13 U/mL olarak kaydedilmiştir. Hava akış hızının artması ile enzim aktivite değerlerindeki düşme enzim proteini moleküllerinin oksidasyonu ile açıklanabilir (Naik vd., 2008). Benzer sonuç, Songpim ve diğerleri (2010) tarafından, *P. polymyxa* ile pektat liyaz üretimi üzerine yapılan bir çalışmada gözlenmiş, 1.0 vvm' nin üzerindeki havalandırma hızlarında enzim üretiminin inhibe olduğu belirtilmiştir. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu yaklaşık olarak 4 mg/L' nin üzerine çıktığında *Bacillus pumilus* ile pektinaz sentezinin baskılandığı gözlenmiştir. Cruz-Guerrero ve diğerleri de (1999), 3.3 mg/L çözünmüş oksijen konsantrasyonunda *K. marxianus* ile endo poligalakturonaz üretiminin tamamen baskılandığını gözlemişlerdir. Farklı hava akış hızlarında pH' ın ve toplam protein miktarının inkübasyon süresi ile değişimi Şekil 7.39.' da verilmiştir. Ortam pH' ı inkübasyon süresi ile önce az miktarda azalmış daha sonra artarak başlangıç pH' ına yakın değerlere ulaşmıştır. En yüksek toplam protein konsantrasyonu ise yine 0.1 vvm hava akış hızında elde edilmiş ve 48. saatte 0.44 mg/mL olarak kaydedilmiştir.



Şekil 7.38. Farklı hava akış hızlarında enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 KH₂PO₄, % 0.01 (w/v) MgSO₄.7H₂O, KH: 300 rpm, ◆:0.1, ■:0.15, ▲:0.2 vvm)



Şekil 7.39. Farklı hava akış hızlarında ortam pH' ı ve toplam protein konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=8, T: 30 °C, % 1 pektin, % 0.05 amonyum sülfat, % 0.3 K₂HPO₄ + % 0.15 (w/v) KH₂PO₄, KH: 300 rpm, ♦:0.1, ■:0.15, ▲:0.2 vvm)

7.1.8.3. Oksijen Transfer Parametreleri

Sulu çözeltilerde oksijen, çözünürlüğünün az olmasından dolayı hız sınırlayıcı faktördür ve aerobik fermentasyonlarda hücre büyümesi ve ürün verimini etkiler. Reaktörlerin işletme ve geometrik özellikleri, ortam bileşimi, viskozite, yüzey gerilimi, konsantrasyon, mikroorganizma morfolojisi ve hava kabarcıklarının yüzeysel alanı gibi birçok faktöre bağlı olan k_{La} , biyoreaktörlerin karıştırma-dağıtma ekipmanlarının dizayn ve işletiminde önemli bir parametredir (Marques vd., 2009). Oksijen aktarım parametreleri olan oksijen

tüketim hızı (q_o) ve hacimsel oksijen transfer katsayısını (k_{La}) bulmak için dinamik metot kullanılmıştır. 300 ve 400 rpm’ de elde edilen sonuçlar Tablo 7.1.’ de verilmiştir. 200 rpm’ de oksijen konsantrasyonu çok düşük olduğu için oksijen tüketim hızı ve hacimsel sıvı faz oksijen transfer katsayısı hesaplanamamıştır. Tablo 7.1.’ de görüldüğü gibi, hacimsel oksijen transfer katsayısı değeri karıştırma hızının artmasıyla artmıştır. Bu etki, karıştırma hızındaki artış ile daha küçük boyutlu hava kabarcıklarının hızlıca parçalanması ve kütle transferi için mevcut gaz-sıvı ara yüzeyindeki artışa bağlanabilir (Gomez vd., 2006; Orman, 2007). 300 rpm karıştırma hızında en yüksek k_{La} değeri 26. saatte 0.1524 s^{-1} , 400 rpm’ de 60. saatte 0.2623 s^{-1} olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, k_{La} değeri inkübasyon süresince önce artmış sonra ise azalmıştır. k_{La} değeri sıvının viskozitesinin artmasıyla azalır (Garcia-Ochoa ve Gomez, 2009). k_{La} değerindeki değişimler inkübasyon süresi boyunca fermantasyon sıvısının viskozitesindeki değişimlere bağlanabilir. Tablo 7.1.’ de inkübasyon süresince kuru mikroorganizma derişimi ile oksijen tüketim hızının değişimi de görülmektedir. Üstel üreme bölgesinde oksijen tüketim hızı zamanla artmış, üstel üreme bölgesinden sonra ise azalmıştır. Karıştırma hızı arttırıldığında ise oksijen tüketim hızında azalma meydana gelmiştir. 300 rpm karıştırma hızında maksimum oksijen tüketim hızı 26. saatte $0.0185\text{ mg L}^{-1}\text{ s}^{-1}$, 400 rpm değerinde en yüksek oksijen tüketim hızı ise 36. saatte $0.0151\text{ mg L}^{-1}\text{ s}^{-1}$ olarak kaydedilmiştir.

Biyoreaktöre hava giriş hızının, oksijen tüketim hızı ve hacimsel kütle transfer katsayısı üzerine etkisini incelemek için, 0.1, 0.15 ve 0.2 vvm hava akış hızları kullanılmıştır. Tablo 7.2.’ de hava akış hızı ile k_{La} ve q_o ’ ın değişimi verilmiştir. Tablo 7.2.’ den görüldüğü gibi hava akış hızının artmasıyla k_{La} değerinde genel bir artış gözlenmiştir. 0.1, 0.15 ve 0.2 vvm’ de elde edilen en yüksek k_{La} değeri sırasıyla 26. saatte 0.1524 , 60. saatte 0.1803 ve 16. saatte $0.2202\text{ (s}^{-1}\text{)}$ ’ dir. İnkübasyon süresince oksijen tüketim hızının değişimi de mikrobiyal büyümeye paralellik göstermektedir. Üstel üreme bölgesinde oksijen tüketim hızı mikroorganizmanın üstel büyüme fazında en yüksek değere ulaşmış, daha sonra da düşüş göstermiştir. Biyoproseslerde, mikroorganizma konsantrasyonundaki artışla oksijen tüketim hızının artması beklenen bir sonuçtur. Literatürde yapılan birçok çalışmada da, mikroorganizmanın üstel büyüme fazında oksijen tüketim hızı artmış, durağan fazda ve karbon kaynağının tükendiği durumlarda ise bu değer azalma göstermiştir (Ulgen ve Mavituna, 1998). 0.1 vvm değerinde maksimum oksijen tüketim hızı 26. saatte $0,0185\text{ mg L}^{-1}\text{ s}^{-1}$ ’ tir. 0.15 vvm değerinde maksimum oksijen tüketim hızı 18. saatte $0,0126\text{ mg L}^{-1}\text{ s}^{-1}$ ’ tir. 0.2 vvm değerinde ise maksimum oksijen tüketim hızı 18. saatte $0,0124\text{ mg L}^{-1}\text{ s}^{-1}$

tir. Demirtaş ve diğerleri (2003), hava akış hızının artmasıyla k_{La} değerlerinin arttığını belirtmişlerdir.

Tablo 7.1. Farklı karıştırma hızlarında k_{La} ve q_o değerlerinin zamanla değişimi

Karıştırma Hızı (rpm)	Zaman (saat)	X (g/L)	$q_o(\text{mg L}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{La}(\text{s}^{-1})$
300 rpm 0.1 vvm	12	2.72	0.0098	0.0704
	16	3.60	0.0078	0.1006
	20	4.72	0.0138	0.0815
	22	5.20	0.0140	0.0769
	24	5.82	0.0151	0.1004
	26	7.26	0.0185	0.1524
	28	7.19	0.0161	0.1101
	36	8.76	0.0135	0.0944
	40	9.37	0.0125	0.0790
	44	10.01	0.0117	0.0727
	48	10.30	0.0098	0.0878
	60	10.80	0.0047	0.0932
	64	11.08	0.0046	0.1242
	68	9.57	0.0050	0.1095
	72	9.56	0.0049	0.1089
400 rpm 0.1 vvm	12	2.49	0.0109	0.2038
	14	3.06	0.0105	0.2134
	16	4.18	0.0104	0.2202
	18	4.15	0.0082	0.2236
	20	4.82	0.0100	0.2142
	22	5.84	0.0111	0.1784
	24	6.43	0.0145	0.1613
	26	6.82	0.0140	0.1776
	28	8.22	0.0122	0.2147
	36	10.39	0.0151	0.2249
	40	12.60	0.0121	0.2265
	44	12.93	0.0070	0.2462
	48	13.24	0.0056	0.2203
	60	14.72	0.0041	0.2623
	66	13.67	0.0027	0.2602
	72	13.71	0.0026	0.2540

Tablo 7.2. Farklı hava akış hızlarında k_{La} ve q_o değerlerinin zamanla değişimi

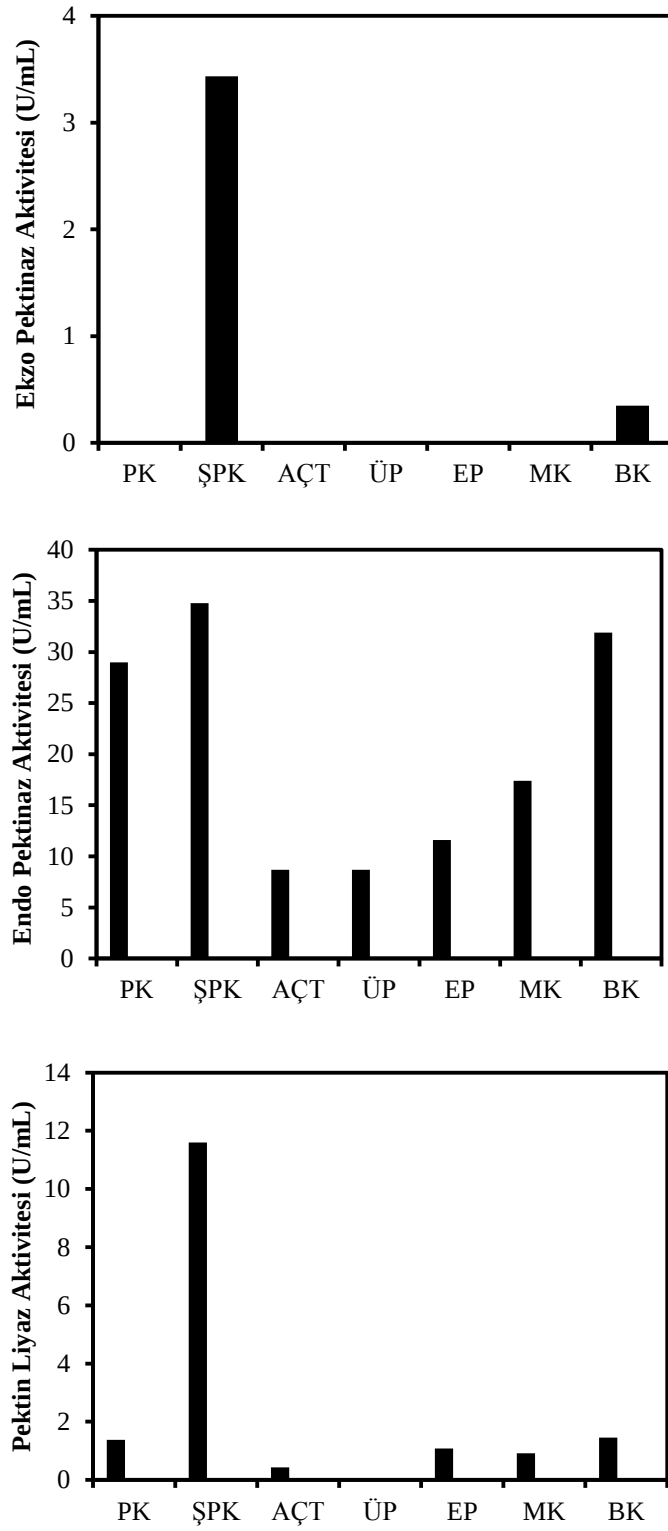
Hava akış hızı (vvm)	Zaman (saat)	X (g/L)	q_o (mg L ⁻¹ s ⁻¹)	k_{La} (s ⁻¹)
0.1 vvm 300 rpm	12	2.72	0.0098	0.0704
	16	3.60	0.0078	0.1006
	20	4.72	0.0138	0.0815
	22	5.20	0.0140	0.0769
	24	5.82	0.0151	0.1004
	26	7.26	0.0185	0.1524
	28	7.19	0.0161	0.1101
	36	8.76	0.0135	0.0944
	40	9.37	0.0125	0.0790
	44	10.01	0.0117	0.0727
	48	10.30	0.0098	0.0878
	60	10.80	0.0047	0.0932
	64	11.08	0.0046	0.1242
	68	9.57	0.0050	0.1095
	72	9.56	0.0050	0.1095
0.15 vvm 300 rpm	12	2.87	0.0110	0.1596
	14	3.31	0.0111	0.1167
	16	3.85	0.0115	0.1183
	18	5.05	0.0126	0.1452
	22	10.00	0.0111	0.1784
	24	8.56	0.0093	0.1237
	26	9.61	0.0092	0.1330
	28	8.97	0.0084	0.1442
	36	11.00	0.0055	0.1164
	40	10.14	0.0064	0.1466
	44	11.88	0.0072	0.1344
	48	10.12	0.0070	0.1663
	60	9.90	0.0049	0.1803
	66	9.92	0.0062	0.1100
	72	9.92	0.0041	0.1123
0.2 vvm 300 rpm	12	4.01	0.0095	0.1245
	14	4.61	0.0104	0.1272
	16	5.38	0.0111	0.2202
	18	5.73	0.0124	0.1126
	20	6.13	0.0122	0.1283
	22	7.25	0.0112	0.1183
	24	8.00	0.0101	0.1088
	26	9.55	0.0085	0.1186
	28	9.10	0.0084	0.1218
	36	9.97	0.0080	0.1334
	40	11.86	0.0086	0.1483
	44	9.52	0.0063	0.1160
	48	10.15	0.0058	0.1445
	60	10.75	0.0048	0.1422
	66	9.10	0.0043	0.1313
	72	8.43	0.0035	0.1155

7.2. Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri

Katı hal fermantasyonu deneylerinde substrat olarak; buğday kepeği (BK), şeker pancarı küspesi (ŞPK), ay çiçeği tablası (AÇT), portakal kabuğu (PK), muz kabuğu (MK), elma posası (EP) ve üzüm posası (ÜP) kullanılmıştır. Yapılan deneylerde *Bacillus pumilus* ile enzim üretimi takip edilmiştir. Bütün deneylerde sıvı kültürde olduğu gibi ortam parametreleri; pH: 8, sıcaklık: 30 °C ve karıştırma hızı: 150 rpm olarak alınmıştır. 20-100 mesh boyutundaki katı substrat % 5 (w/v) konsantrasyonunda kullanılmıştır. Saf su yerine musluk suyu kullanılmıştır. Bu hem ortam maliyetini azaltmış hem de mikroorganizmaların kullanacağı mineralleri içermesi açısından faydalı olmuştur.

7.2.1. Ortam Seçimi

Substrat olarak buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ayçekirdeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu, elma posası ve üzüm posasının kullanıldığı ortamlarda 4. günde elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 7.40.' da verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi ekzo pektinaz aktivitesi sadece şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği içeren ortamlarda elde edilmiştir. Şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği içeren ortamlarda 4. günde elde edilen ekzo pektinaz aktivite değerleri sırasıyla 3.43 ve 0.35 U/mL' dir. En yüksek endo pektinaz aktivite değerleri sırasıyla şeker pancarı küspesi (34.78 U/mL), buğday kepeği (31.88 U/mL) ve portakal kabuğu içeren ortamlarda (28.99 U/mL) elde edilmiştir. En yüksek pektin liyaz aktiviteleri ise, şeker pancarı küspesi, buğday kepeği ve portakal kabuğu içeren ortamlarda sırasıyla 11.60 U/mL, 1.45 U/mL ve 1.38 U/mL olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler tarımsal atık ve artıkların pektinaz grubu enzimlerin eldesi için besiyeri hazırlamak amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir. Her ne kadar bu tip ortamlardaki enzim miktarı zengin içerikli besiyerine kıyasla düşükse de maliyetinin çok az olması nedeniyle atıklarla hazırlanan ortamların pektinaz enzimi üretiminde kullanımının avantajlı sonuç verdiği ileri sürülebilir. *Bacillus pumilus* bakterisiyle farklı atıkların kullanıldığı deney sonuçlarına göre en iyi pektinaz grubu enzim üretiminin şeker pancarı küspesi ve buğday kepeğinin bulunduğu ortamlarda elde edildiği belirlenmiştir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak çalışmalarda, maksimum aktivitelerin elde edildiği katı substratlar olan şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği kullanılmıştır. Mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olan tüm besin maddelerini sağlayan substrat

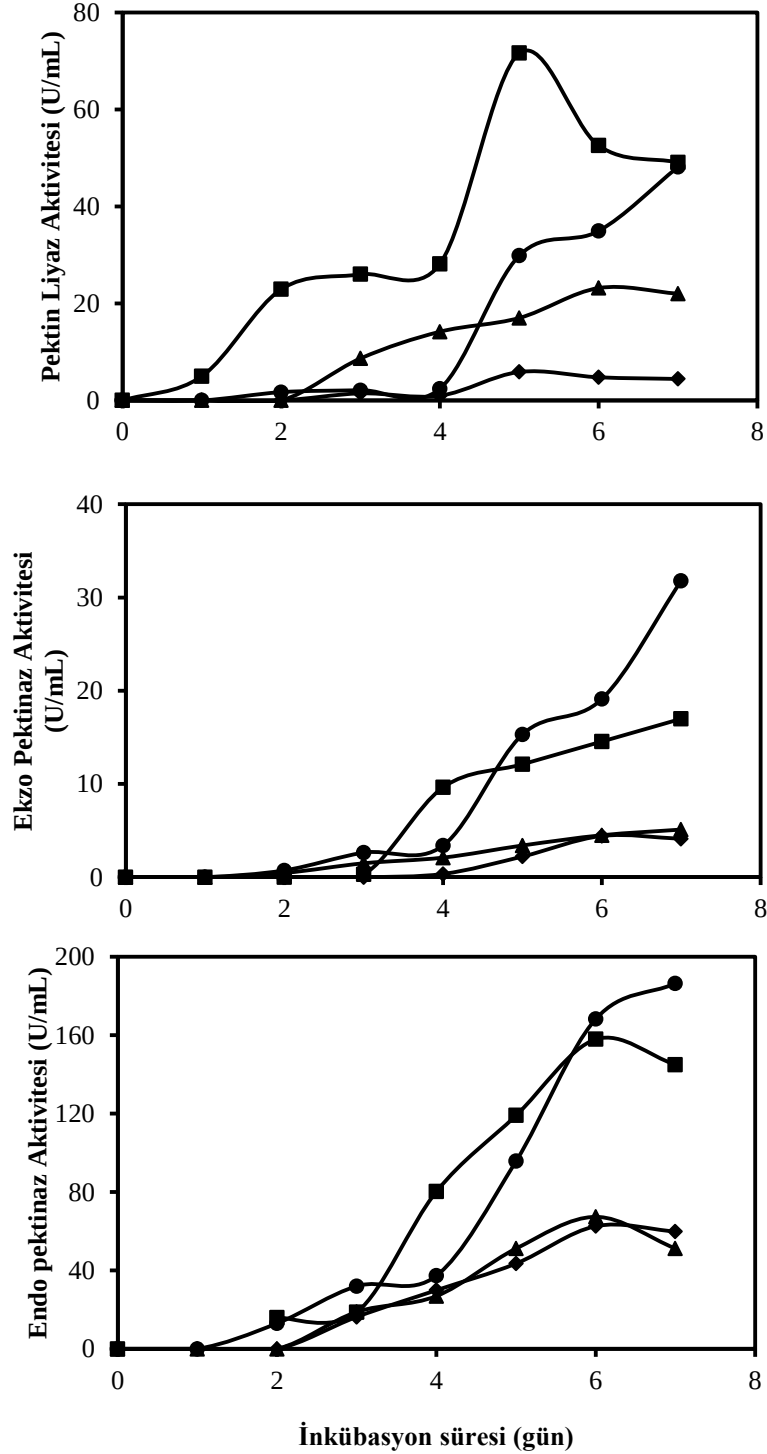


Şekil 7.40. Farklı ortam bileşimlerinde 4. günde elde edilmiş enzim aktiviteleri (% 5 (w/v) katı substrat kon., partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 8, T: 30 °C, KH: 150 rpm, Aşı oranı: % 10 v/v, PK: Portakal kabuğu, ŞPK: Şeker Pancarı Küspesi, AÇT: Ay Çekirdeği Tablası, ÜP: Üzüm Posası, EP: Elma Posası, MK: Muz Kabuğu, BK: Buğday Kepeği)

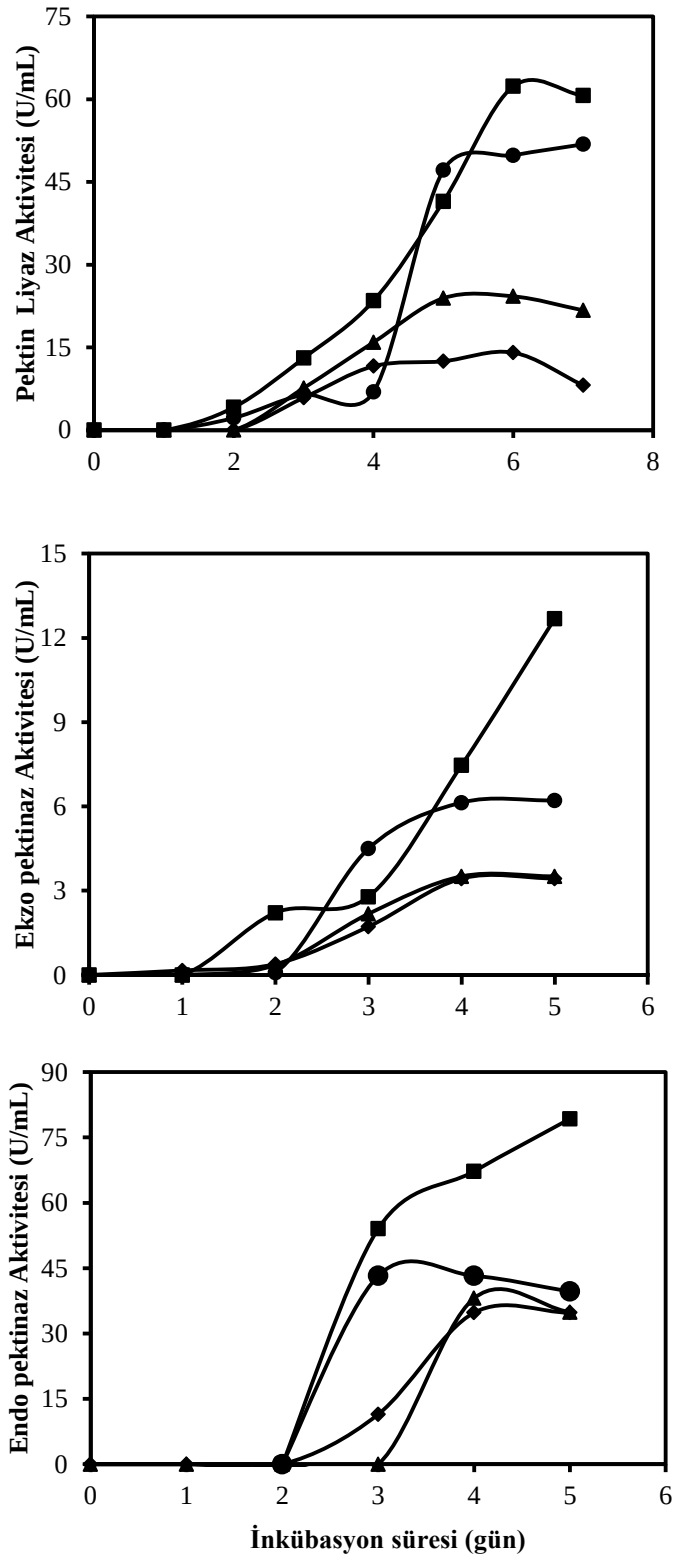
ideal substrat olarak düşünülmektedir. Ancak bazı besin maddeleri substratlarda yetersiz konsantrasyonlarda mevcut olabilir ya da yoktur. Böyle durumlarda ortamı dışarıdan desteklemek gerekir (Kashyap vd., 2003; Tanyıldızı vd., 2009). Bundan dolayı, çalışmanın bu aşamasında % 5 (w/v) oranında katı substrat içeren ortama % 0.3 (w/v) konsantrasyonunda farklı azot kaynakları (amonyum sülfat (AS), pepton (Pep.) ve maya özütü (MÖ)) eklenmiştir.

Buğday kepeği ile hazırlanan ortamlarda yapılan üretimlerden alınan sonuçlar Şekil 7.41.' de verilmiştir. Buğday kepeğinin kullanıldığı ortamlarda maksimum aktiviteler Buğday kepeği+Amonyum sülfat ve Buğday kepeği+Maya özütü içeren ortamlarda elde edilmiştir. Buğday kepeği, Buğday kepeği+Amonyum sülfat, Buğday kepeği+Pepton ve Buğday kepeği+Maya özütü içeren ortamlarda 7. günde elde edilen ekzo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 4.12, 16.99, 5.11 ve 31.79; endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 59.86, 144.98, 51.18 ve 186.41; pektin liyaz aktiviteleri ise sırasıyla 4.42, 49.07, 22.00 ve 48.13 U/mL' dir. Grafiklerden de anlaşılabacağı gibi, azot kaynağı olarak ortama eklenen maddeler bakterinin pektinaz enzimi üretme yeteneği üzerine pozitif bir etki yapmıştır. Azot kaynaklarını mukayese edersek, maksimum enzim üretimi açısından amonyum sülfat ve maya özütünün daha kullanışlı olduğu görülmektedir. Şeker pancarı küspesinin katı substrat olarak kullanıldığı fermantasyon ortamına, farklı azot kaynakları eklenerek yapılan deney sonuçları Şekil 7.42.' de verilmiştir. Azot kaynağının olmadığı fermantasyon ortamında düşük seviyede enzim aktivite değerleri gözlemlenmiştir. 5. günde ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 3.43 ve 34.41 U/mL olarak tespit edilmiştir. 7. günde pektin liyaz aktivitesi 8.13 olarak belirlenmiştir. Peptonun azot kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon deneyleri sonucunda peptonun pektinaz enzimleri üretimini çok az arttırdığı tespit edilmiştir. Şeker pancarı küspesi+Pepton içeren fermantasyon ortamında 5. günde ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 3.51 ve 34.92 U/mL ve 7. günde pektin liyaz aktivitesi 21.73 olarak belirlenmiştir. Bu yüzden peptonun pektinaz grubu enzimlerin sentezi için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır. Amonyum sülfat ve maya özütü ile desteklenmiş fermantasyon ortamlarında ise her üç enzim üretiminin de oldukça arttığı tespit edilmiştir. Şeker pancarı küspesi+Amonyum sülfat ve Şeker pancarı küspesi+Maya özütü içeren ortamlarda 5. günde elde edilen ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 12.68, 6.21 ve 79.28, 39.64' dür. 7. günde pektin liyaz aktiviteleri ise sırasıyla 60.67 ve 51.83 U/mL olarak tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında amonyum sülfat ve maya özütünün *Bacillus pumilus* bakterisi ile pektinaz grubu enzimlerin üretimi için uygun olduğu

sonucuna varılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki kısmında ise katı substrat, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonu tepki yüzey metodu kullanılarak optimize edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 7.41. Buğday kepeği ile farklı azot kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 8, T: 30 °C, KH:150 rpm, ◆:BK, ■:BK+AS, ▲:BK+Pep., ●:BK+MÖ)



Şekil 7.42. Şeker pancarı küspesi ile farklı azot kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (partikül boyutu: 20-100 mesh arası, pH: 8, T: 30 °C, KH:150 rpm, ◆:ŞPK, ■:ŞPK+AS, ▲:ŞPK+Pep., ●:ŞPK+MÖ)

7.2.2. Buğday Kepeği Kullanılarak Katı Hal Fermantasyon Tekniği ile Pektinaz Üretimi ve Üretim Ortamının Tepki Yüzey Metodu Kullanılarak Optimizasyonu

Fermantasyon proseslerinin geliştirilmesinde istatistiksel deneysel dizayn tekniklerinin uygulanması sonucu, ürün verimlerinin iyileştirilmesi ve proses değişkenliğinin, sürenin ve maliyetin azaltılması sağlanabilir (Elibol, 2002). Tepki Yüzey Metodu temel olarak, farklı değişkenlerin sistem üzerine etkilerini belirlemek için matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir metoda dayanmaktadır. Son yıllarda özellikle biyoteknolojik proseslerin optimizasyonunda sıkça kullanılan bir metottur. Birçok prosesi etkileyen çok sayıda parametre vardır. Klasik optimizasyon yöntemi ile, her bir parametrenin sistem üzerine etkileri birer birer incelenebilir; ancak iki, üç ve hatta daha fazla parametrenin etkileşimlerinin de sistemi etkileme ihtimali, özellikle biyolojik üretimlerde, her zaman vardır. Klasik metotlar tüm faktörlerin birleşik etkisini açıklamaz. Bu metotlar aynı zamanda zaman tüketen proseslerdir ve optimum işletme parametrelerini belirlemek için çok sayıda deney yapılmasını gerektirir. Bu anlamda Tepki Yüzey Yöntemi, klasik yöntemde çok uzun çalışma sürelerini ve etkileşimlerini, matematiksel ve istatistiksel yaklaşımlarla çözen bir metottur. Ampirik modeller ve istatistiksel analizler, çok kompleks sistemlerdeki (biyolojik proseslerde olduğu gibi) temel veya daha basit mekanizmaları ortaya çıkarmakta büyük önem taşır; böylelikle prosesin kontrolünde ve daha iyi anlaşılmasında kolaylıklar sağlamış olur (Elibol, 2002; Elibol ve Özer, 2002). Tepki yüzey metodu, son yıllarda fermantasyon ortamı, üreme ve proses şartları, enzim ve metabolit üretimi, enzimle katalizlenmiş reaksiyon şartları, hücre dışı polisakkarit üretimi ve atıksu arıtımı gibi biyoproseslerin modellenmesi ve optimizasyonunda kullanılmaktadır (Açıkel vd., 2010; Lal vd., 2011).

Çalışmanın bu aşamasında, maksimum enzim üretimi elde etmek ve birbirini etkileyen değişkenlerin rollerini anlamak için ortam bileşenleri tepki yüzey metodu ile optimize edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada gerçekleştirilen ön denemelerde, başlangıç katı substrat ve azot konsantrasyonlarının *Bacillus pumilus* ile ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz üretimini etkileyen önemli faktörler olduğu belirlenmiştir. *Bacillus pumilus* ile ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz üretiminde ortam bileşenlerinin optimizasyonu Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) ile yapılmıştır. Burada 2^3 faktöriyel dizayn, 20 deney ile tamamlanmıştır. İkinci dereceden polinomial katsayılar Design Expert Software (versiyon 7.0, State-Ease, Inc., Minneapolis, MN) istatistik paketi kullanılarak hesaplanmış

ve analizlenmiştir. Modelin istatistiksel analizi varsans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır.

Bu çalışmada, buğday kepeği (A), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonları bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve dizaynda her bir faktör beş farklı seviyede ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$) çalışılarak bağımsız değişkenlerin seviyeleri optimize edilmiştir. 7. günde elde edilen maksimum ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz aktivite değerleri dizayn deneylerinin tepkisi (response) olarak alınmıştır. Bu çalışmada araştırılan bağımsız değişkenlerin aralıkları ve seviyeleri Tablo 7.3.' de verilmiştir.

Tablo 7.3. Buğday kepeği kullanılarak yapılan deneylerde Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) için kullanılmış ortam bileşimlerinin kodlanmış ve gerçek değerleri

Değişkenler (konsantrasyon, % w/v)	Sembol	Çalışma aralığı ve değerleri				
		- 1.682($-\alpha$)	-1	0	1	+1.682($+\alpha$)
Buğday kepeği	A	2.0	3.22	5.0	6.78	8.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	B	0.0	0.12	0.3	0.48	0.6
Maya özütü	C	0.0	0.12	0.3	0.48	0.6

Ortamin optimum kombinasyonunu araştırmak için MKT deneysel planına göre deneyler yapılmış ve deneysel sonuçlar Tablo 7.4.' de verilmiştir.

Tablo 7.4. Kodlanmış değerleri içeren MKT' a göre deney tasarımı ve gözlenen aktivite değerleri

Deney No	Değişkenler			Tepkiler		
	A	B	C	Ekzo pektinaz Aktivitesi (U/mL)	Endo pektinaz Aktivitesi (U/mL)	Pekin liyaz Aktivitesi (U/mL)
1	-1	1	-1	7.39	90.61	29.67
2	+1.682	0	0	9.14	93.38	9.77
3	0	0	0	28.80	167.31	23.90
4	1	1	1	6.82	85.44	6.20
5	0	+1.682	0	25.86	150.16	11.73
6	0	0	0	30.58	173.46	23.80
7	1	-1	-1	31.30	157.93	24.33
8	0	0	0	29.24	178.64	24.40
9	0	0	-1.682	16.99	144.98	49.07
10	1	-1	1	6.67	62.14	1.73
11	0	0	0	29.03	175.08	27.80
12	-1	1	1	9.14	106.15	14.73
13	1	1	-1	13.22	103.56	9.43
14	0	0	0	26.66	178.64	29.87
15	-1	-1	-1	25.21	165.70	33.40
16	-1.682	0	0	5.76	80.26	3.32
17	0	0	+1.682	7.89	82.85	3.65
18	-1	-1	1	6.63	64.72	4.13
19	0	-1.682	0	31.79	186.41	48.13
20	0	0	0	23.99	170.87	26.80

Bu değerlere göre TYM analizi gerçekleştirilmiş elde edilen sonuçların varyans analizi (ANOVA) Tablo 7.5, 7.6. ve Tablo 7.7.' de verilmiştir.

Tablo 7.5. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak ekzo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

Kaynak (R1,Ekzo pektinaz)	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	1936.58	9	215.18	21.78	<0.0001 önemli
A-Buğday kepeği	17.20	1	17.20	1.74	0.2165
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	136.73	1	136.73	13.84	0.0040
C- Maya Özü	292.14	1	292.14	29.57	0.0003
AB	0.86	1	0.86	0.087	0.7742
AC	25.20	1	25.20	2.55	0.1413
BC	185.86	1	185.86	18.81	0.0015
A ²	866.16	1	866.16	87.68	< 0.0001
B ²	0.55	1	0.55	0.056	0.8182
C ²	516.79	1	516.79	52.31	< 0.0001
Artık	98.79	10	9.88		
Uyum eksikliği	71.03	5	14.21	2.56	0.1628 önemli değil
Saf hata	27.76	5	5.55		
Doğrulanmış	2035.36	19			
Toplam					

R²; 0.95, Adj R²; 0.91, Pred R²; 0.72, Adeq Precision; 13.267

Tablo 7.6. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak endo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

Kaynak (R ² , Endo pektinaz)	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	35944.59	9	3993.84	30.01	<0.0001 önemli
A-Buğday kepeği	1.15	1	1.15	8.606E-0.003	0.9279
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	1156.87	1	1156.87	8.69	0.0146
C- Maya Özütü	6759.87	1	6759.87	50.79	<0.0001
AB	0.84	1	0.84	6.300E-0.003	0.9383
AC	101.32	1	101.32	0.76	0.4034
BC	4713.72	1	4713.72	35.42	0.0001
A ²	16726.93	1	16726.93	125.67	< 0.0001
B ²	399.72	1	399.72	3.00	0.1138
C ²	8642.79	1	8642.79	64.94	< 0.0001
Artık	1330.98	10	133.10		
Uyum eksikliği	1231.91	5	246.38	12.43	0.0076 önemli
Saf hata	99.07	5	19.81		
Doğrulanmış	37275.57	19			
Toplam					

R²; 0.96, Adj R²; 0.93, Pred R²; 0.74, Adeq Precision; 13.149

Tablo 7.7. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak pektin liyaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

Kaynak (R3,pektin liyaz)	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	3103.18	9	344.80	4.85	0.0107 önemli
A-Buğday kepeği	63.26	1	63.26	0.89	0.3678
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	307.25	1	307.25	4.32	0.0643
C- Maya Özü	1569.97	1	1569.97	22.08	0.0008
AB	37.41	1	37.41	0.53	0.4848
AC	42.23	1	42.23	0.59	0.4587
BC	141.96	1	141.96	2.00	0.1880
A ²	923.50	1	923.50	12.99	0.0048
B ²	0.99	1	0.99	0.014	0.9082
C ²	14.39	1	14.39	0.20	0.6623
Artık	710.97	10	71.10		
Uyum eksikliği	680.35	5	136.07	22.22	0.0020 önemli
Saf hata	30.61	5	6.12		
Doğrulanmış	3814.15	19			
Toplam					

R²; 0.81, Adj R²; 0.65, Pred R²; -0.37, Adeq Precision; 6.955

ANOVA değerlerinden de anlaşılacağı gibi, verilerin modele uygunluğu oldukça anlamlıdır. Örneğin, verilerin dağılımdan uzaklığının ölçüsü olan Fisher's F-test değeri R1, R2 ve R3 için sırasıyla F_{model}=21.78; 30.01 ve 4.85 (ortalama kare regresyon/ ortalama kare artık, 344.80/71.10) olup oldukça düşük olasılık değerlerine sahiptir [sırasıyla (P_{model}>F)= <0.0001, <0.0001 ve 0.0107]. Prob>F değerinin 0.05' den küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Model terimlerinin 0.10' den daha büyük değerleri önemli değildir. Model F değerleri ve çok düşük olasılık değerleri (P değeri<0.0001) modelin oldukça önemli olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca determinasyon katsayısının sırasıyla R² = 0.95, 0.96 ve 0.81 olması da modelin doğruluğunun bir göstergesidir. R² değerleri, deneysel parametreler ve karşılıklı etkileşimlere bakılarak ifade edilen gözlenmiş tepki değerinin ne kadar değiştiğinin bir ölçüsünü verir. R²' nin 1' e yakın değerleri

deneysel ve tahmin edilen değerler arasında iyi bir korelasyon ve tahminler ve yanıtlar arasında iyi bir model olduğunu gösterir. Yüzde olarak ifade edildiği zaman, enzim aktiviteleri için toplam varyasyonun % 95, 96 ve 81' i bağımsız değişkenlere atfedildiği ve toplam varyasyonun sırasıyla % 5, 4 ve 19' unun modelle açıklanamadığını belirtmektedir. Bu özellikle biyolojik üretim proseslerinde oldukça kabullenebilir bir aralıktadır.

Ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz için ayarlanmış (Adj) R^2 değerleri sırasıyla 0.91, 0.93 ve 0.65' dir. Ayarlanmış R^2 örnek hacmi ve modeldeki değişken sayısından dolayı R^2 değerini düzenler. Eğer modelde birçok değişken varsa ve örnek hacmi oldukça fazla değilse ayarlanmış R^2 değeri R^2 ' den daha düşük olabilir (Kaushik vd., 2006). Bu değerler, R^2 değerleri ile uyum içindedir. Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir ve genelde 4' den büyük bir değer olması istenir (Pareek vd., 2011). Ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz aktiviteleri için elde edilen sırasıyla 13.267, 13.149 ve 6.955 'adequate precision' değerleri uygun bir sinyali işaret eder ve modelin dizayn alanı içinde kullanılabileceğini öne sürer. Uyum eksikliği testi, regresyonun içermediği noktalardaki deneysel alanlarda verilen temsil edici verilere modelin yetersizliliğini ölçer (Rastogi ve Rashmi, 1999). Uyum eksikliğinin (lack of fit), önemli değil olması modelin uygun olduğuna işaret eder. Ekzo pektinaz aktivitesi için 'lack of fit' önemli değil, endo pektinaz ve pektin liyaz aktiviteleri için ise önemli çıkmıştır. Bundan dolayı, ekzo pektinaz aktivitesi için model, tepki yüzeyin açıklanması için uygundur. Endo pektinaz ve pektin liyaz aktiviteleri için ise ANOVA' da ikinci dereceden denklemde P değeri yüksek olan ifadeleri çıkarmadığımız için uyum eksikliği önemli çıkmıştır ve daha yüksek dereceden bir modele uymaktadır. Ancak programın prensibi Taylor serisini ikinci dereceden kesmektedir ve bizim çalıştığımız aralıkta modeli etkilememektedir.

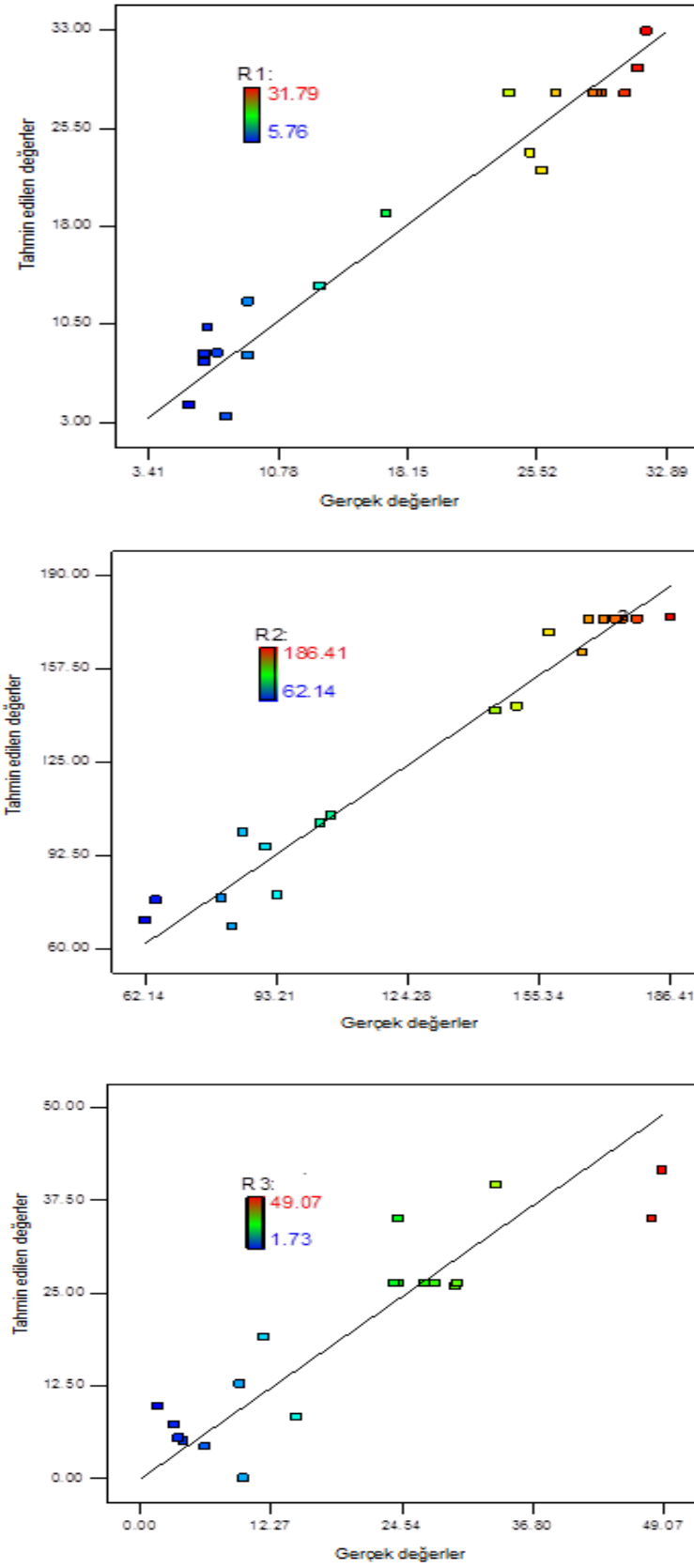
TYM analizi sonucu elde edilen ve enzim aktivitesi ile proses değişkenleri (buğday kepeği, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları) arasındaki amprik ilişkiyi veren kodlanmış birimdeki regresyon eşitlikleri;

$$\begin{aligned} R1 &= +28.12 + 1.12 A -3.16 B -4.63 C -0.33 AB -1.78 AC +4.82 BC -7.75 A^2 -0.20 B^2 -5.99C^2 \\ R2 &= +174.50 + 0.29 A -9.20 B -22.25 C +0.32AB -3.56 AC +24.27 BC -34.07A^2 -5.27 B^2 -24.49 C^2 \\ R3 &= +26.26 -2.15 A -4.74 B -10.72 C -2.16 AB +2.30 AC +4.21BC -8.01A^2 +0.26B^2 -1.0 C^2 \end{aligned} \quad (7.1)$$

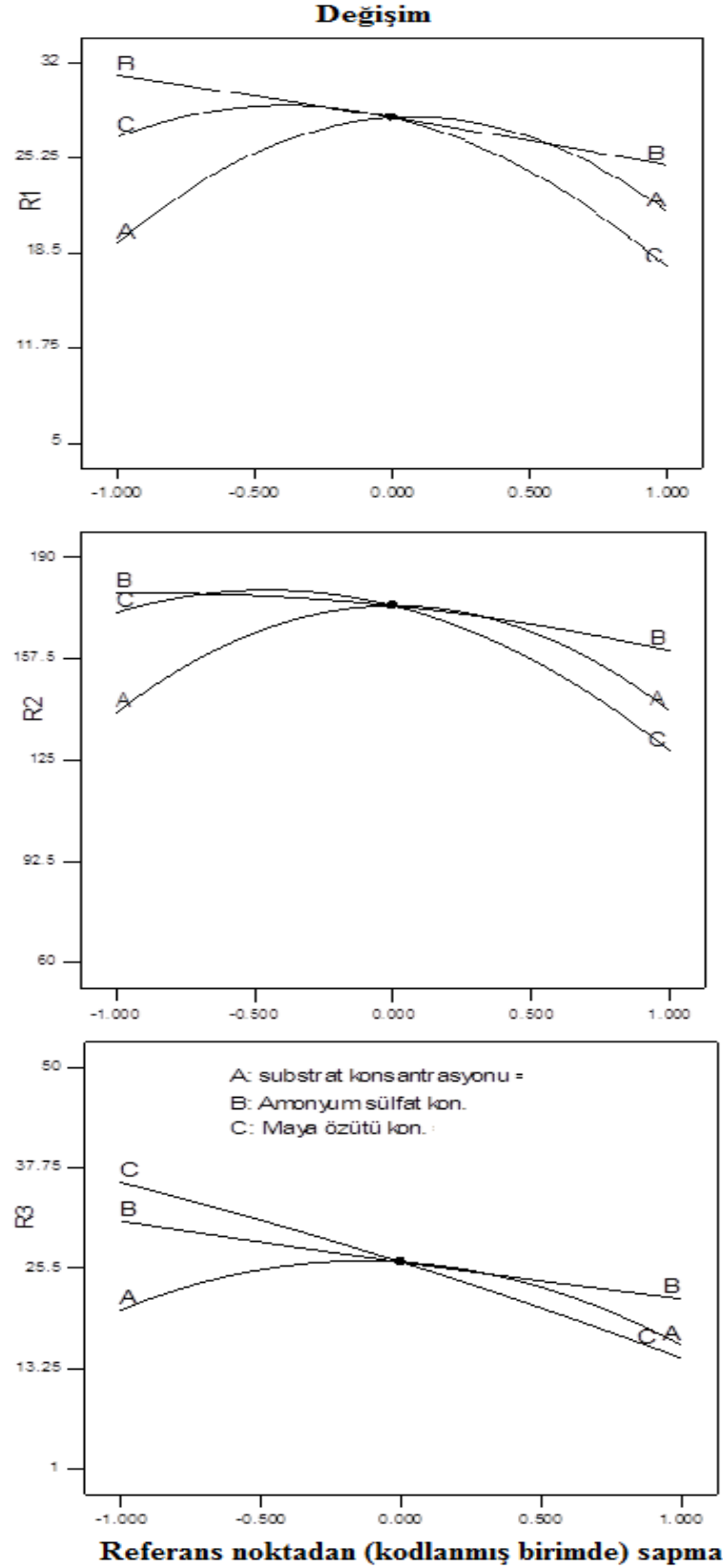
Katsayılara ait P-değerleri kıyaslandığında, B, C, BC, A² ve C², nin 0.05' den küçük değerleri bu proses değişkenlerinin etkisinin ekzo ve endo pektinaz üretiminde önemli olduğunu; bu değişkenlerde yapılacak değişikliklerin enzim aktivitesini değiştireceğini belirtmektedir. Ayrıca bu sonuçlar maya özütü konsantrasyonunun amonyum sülfata göre proses üzerinde çok daha fazla etkili olduğunu söylemektedir (daha küçük p değerlerinden dolayı). C ve A², nin 0.05' den küçük değerleri ise bu proses değişkenlerinin pektin liyaz üretiminde etkisinin önemli olduğunu; bu değişkenlerde yapılacak değişikliklerin enzim aktivitesini değiştireceğini göstermektedir.

Ekzo, endo pektinaz ve pektin liyaz için modele göre hesaplanmış tahmini değerler ve gözlenmiş değerlere karşı çizilmiş eğriler Şekil 7.43.' de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi deneysel gerçek değerlerle modelden tahmin edilen değerler ekzo ve endo pektinaz için iyi bir uyum içindedir. Pektin liyaz için ise biyolojik sistemler için kabul edilebilir bir sınırdadır.

Şekil 7.44.' de referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre aktivitenin A, B ve C ile olan değişimleri görülmektedir.



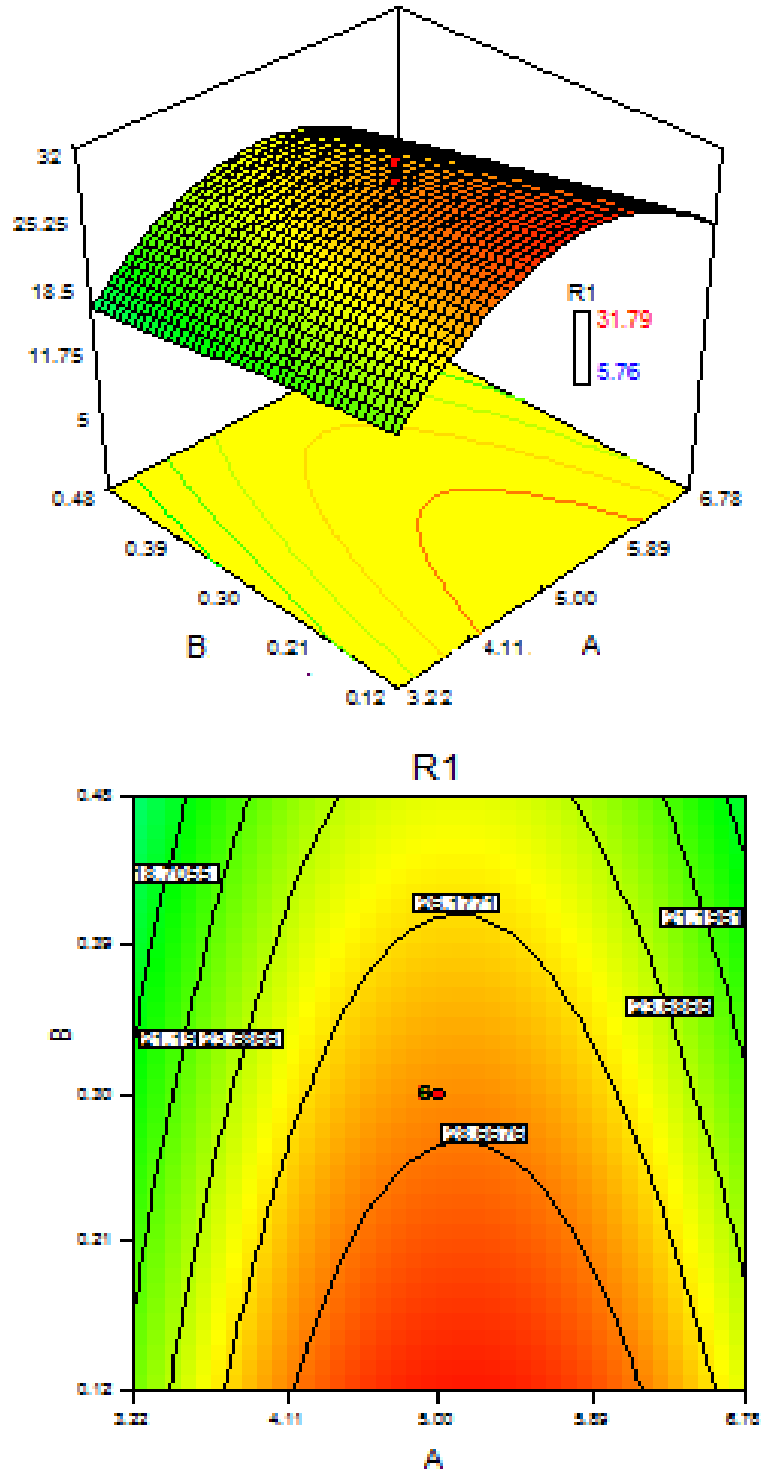
Şekil 7.43. Buğday kepeğinin kullanıldığı deneylerde, Ekzo, endo pektinaz ve pektin liyaz (sırasıyla R1, R2 ve R3) için gözlenmiş değerlere karşı hesaplanmış tahmini değerlerin değişimi



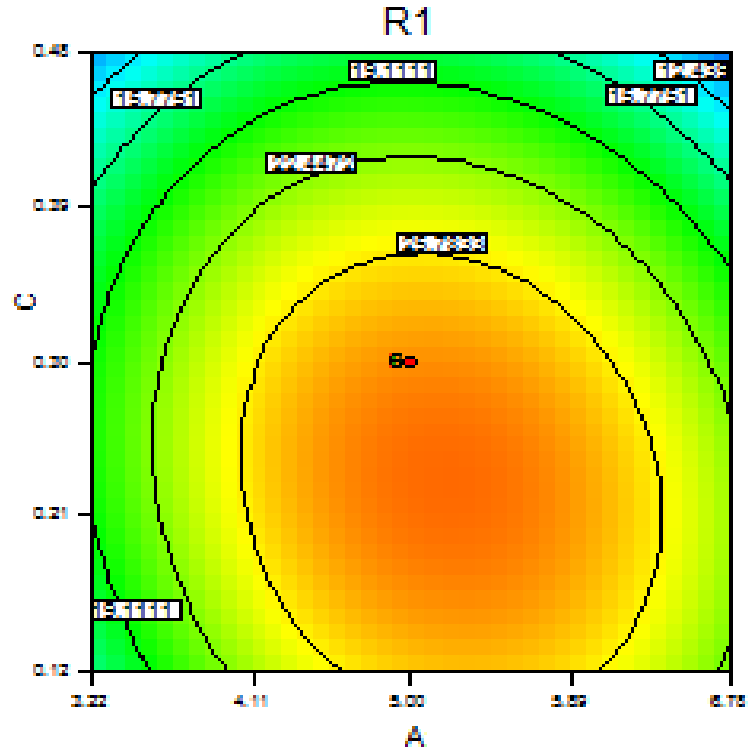
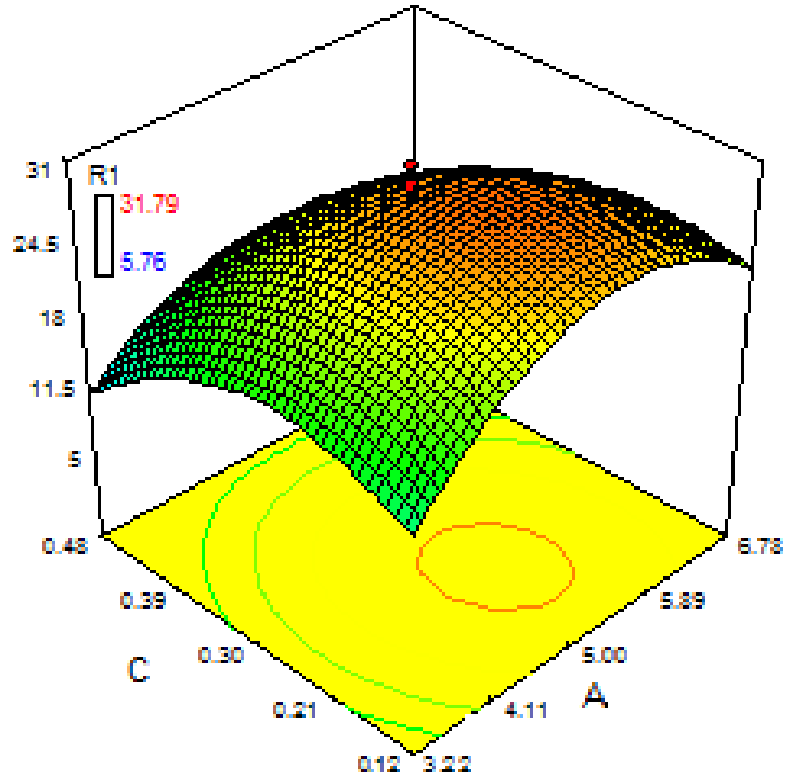
Şekil 7.44. Referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre, ekzo pektinaz (R1), endo pektinaz (R2) ve pektin liyaz (R3) aktivitelerinde bağımsız değişkenler olan buğday kepeği (A), amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonlarının etkisini gösteren perturbation grafiği

TYM analizi sonucu elde edilen regresyon eşitliği üç boyutlu ve iki boyutlu kontur çizim ile ifade edilebilmektedir. Tepki yüzey eğrileri, optimum enzim üretimi için gerekli her bir bileşenin optimum konsantrasyonunu bulmak ve ortam bileşenlerinin etkileşimini anlamak için istatistiksel olarak uygun bir modelle çizilir (Kaushik vd., 2006). Üç boyutlu ve kontur eğrileri Şekil 7.45.-7.53.' de verilmiştir. Her bir eğride, bir değişken sıfır (0) seviyesinde korunurken iki faktörün etkisi verilmiştir. Maksimum tahmini değer, kontur diyagramında en küçük elipsin içindeki hapsedilmiş yüzeyle işaret edilir (Tanyıldızı vd., 2005). Tepki yüzeylerin dairesel konturları, değişkenler arasındaki etkileşimin önemsiz olduğunu işaret eder. Oval ya da eğri şeklindeki kontur eğrileri, değişkenler arasındaki etkileşimin önemli olduğunu gösterir. Eğri şeklindeki kontur eğrilerinde optimum değerler, hattın arakesitindeki noktadan (eğrinin eğilen yerinin birleştirilmesiyle oluşmuş) elde edilir (Murthy vd., 2000; Muralidhar vd., 2001; Le Man vd., 2010). Tepki yüzeyler, oval şekilli olursa maksimum nokta, elipsin en büyük ve en küçük eksenlerinin arakesitindeki noktadan elde edilir (Tanyıldızı vd., 2005; Zhou vd., 2010).

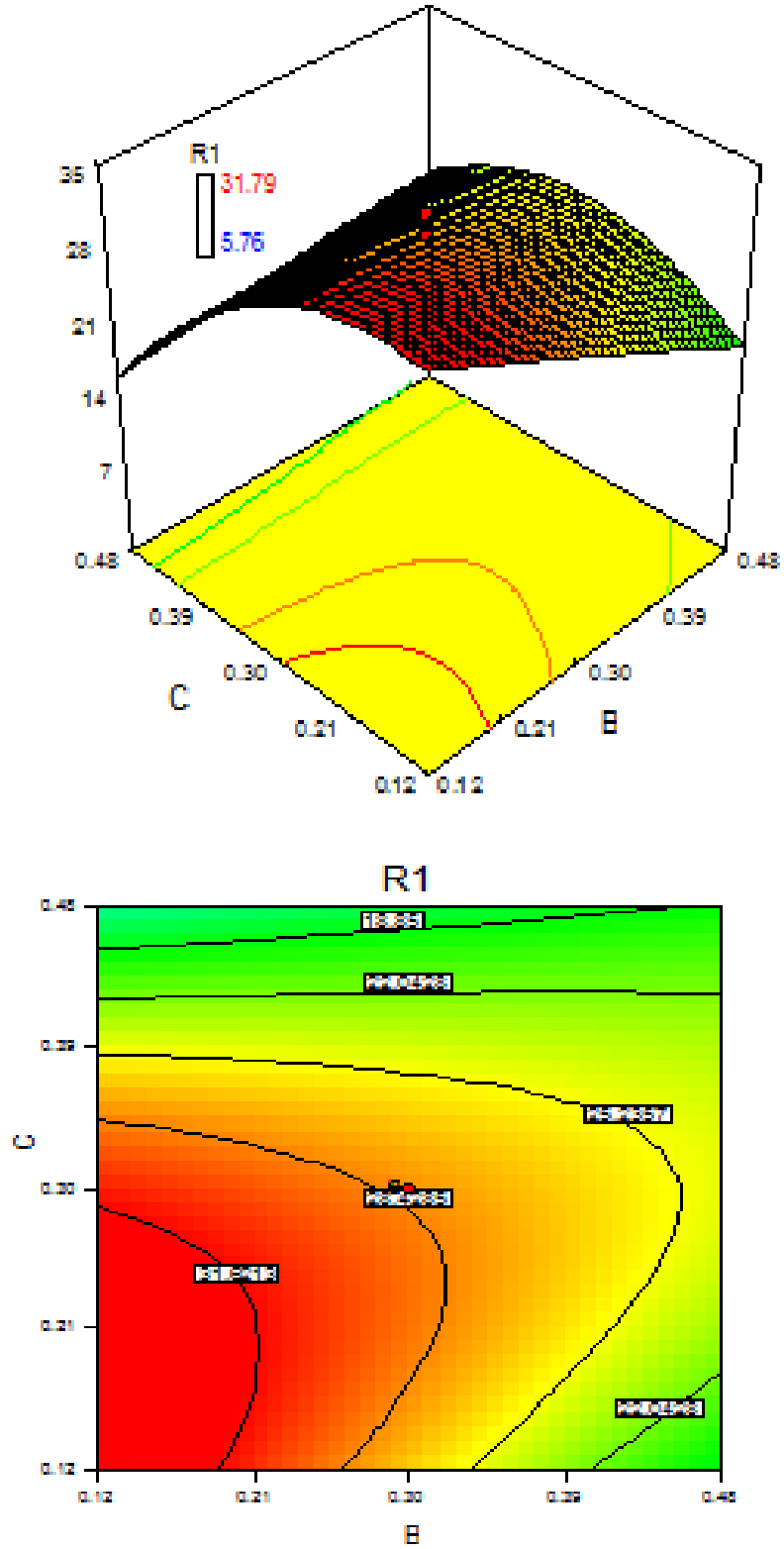
Düşük amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları (% 0.12-0.21 w/v) kullanıldığı zaman, ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz aktivitelerinde bir artış meydana gelmiştir. Maksimum enzim üretimi ise yaklaşık olarak % 5 civarında buğday kepeği içeren ortamlarda elde edilmiştir. Ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz üretiminde, buğday kepeği konsantrasyonu ve amonyum sülfat konsantrasyonu arasında orta derecede bir etkileşim vardır. Ekzo pektinaz ve endo pektinaz üretimi için, kontur eğrilerinin nispeten dairesel doğasından, buğday kepeği konsantrasyonu ve maya özütü konsantrasyonu arasında çok az bir etkileşim olduğu söylenebilir. Pektin liyaz üretiminde ise buğday kepeği konsantrasyonu ve maya özütü konsantrasyonu arasında orta derecede bir etkileşim vardır. Şekillerdeki kontur eğrilerinden, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları arasında önemli bir karşılıklı etkileşim olduğu görülmektedir.



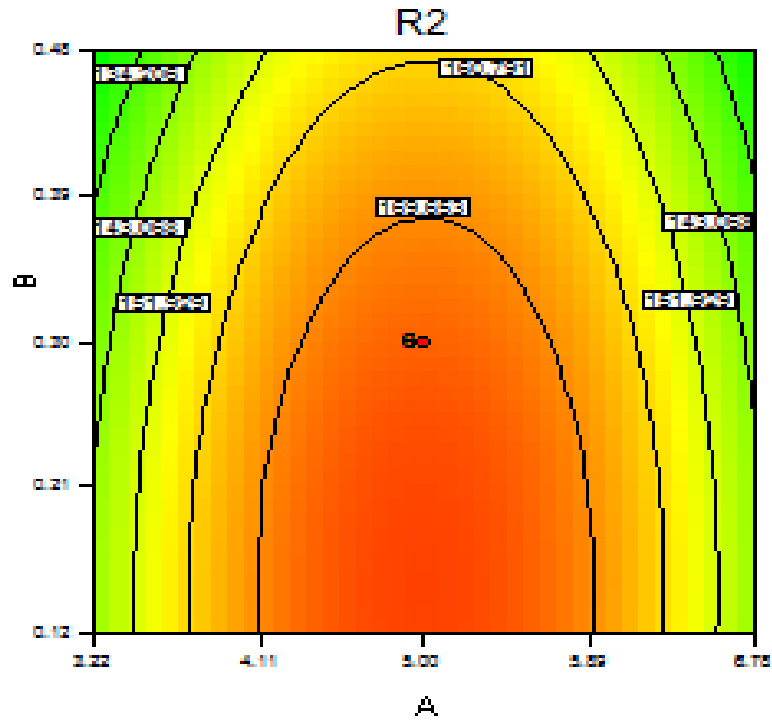
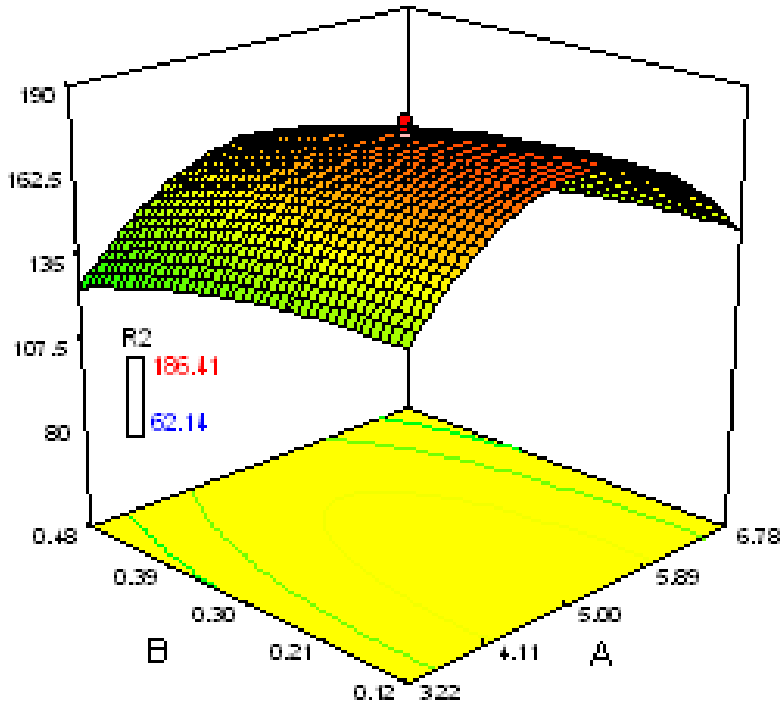
Şekil 7.45. Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); buğday kepeği (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



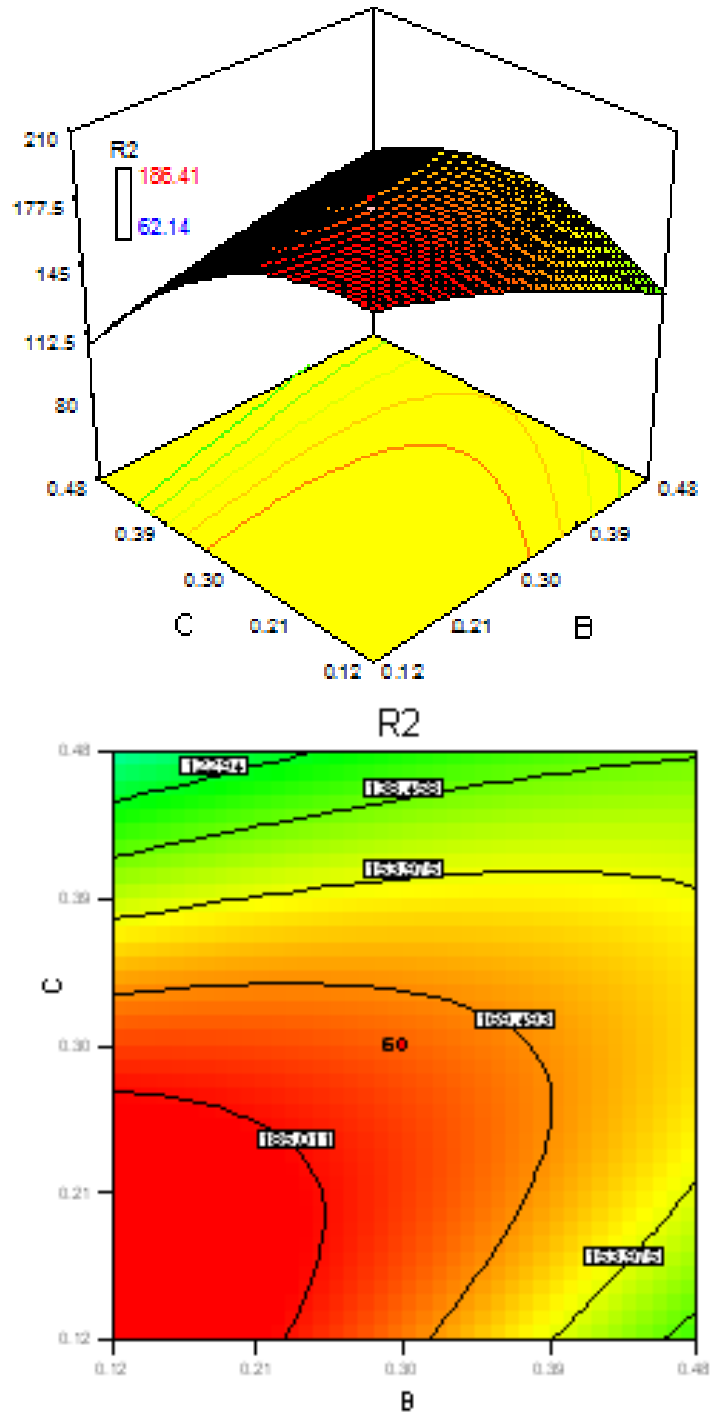
Şekil 7.46. Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); buğday kepeği (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



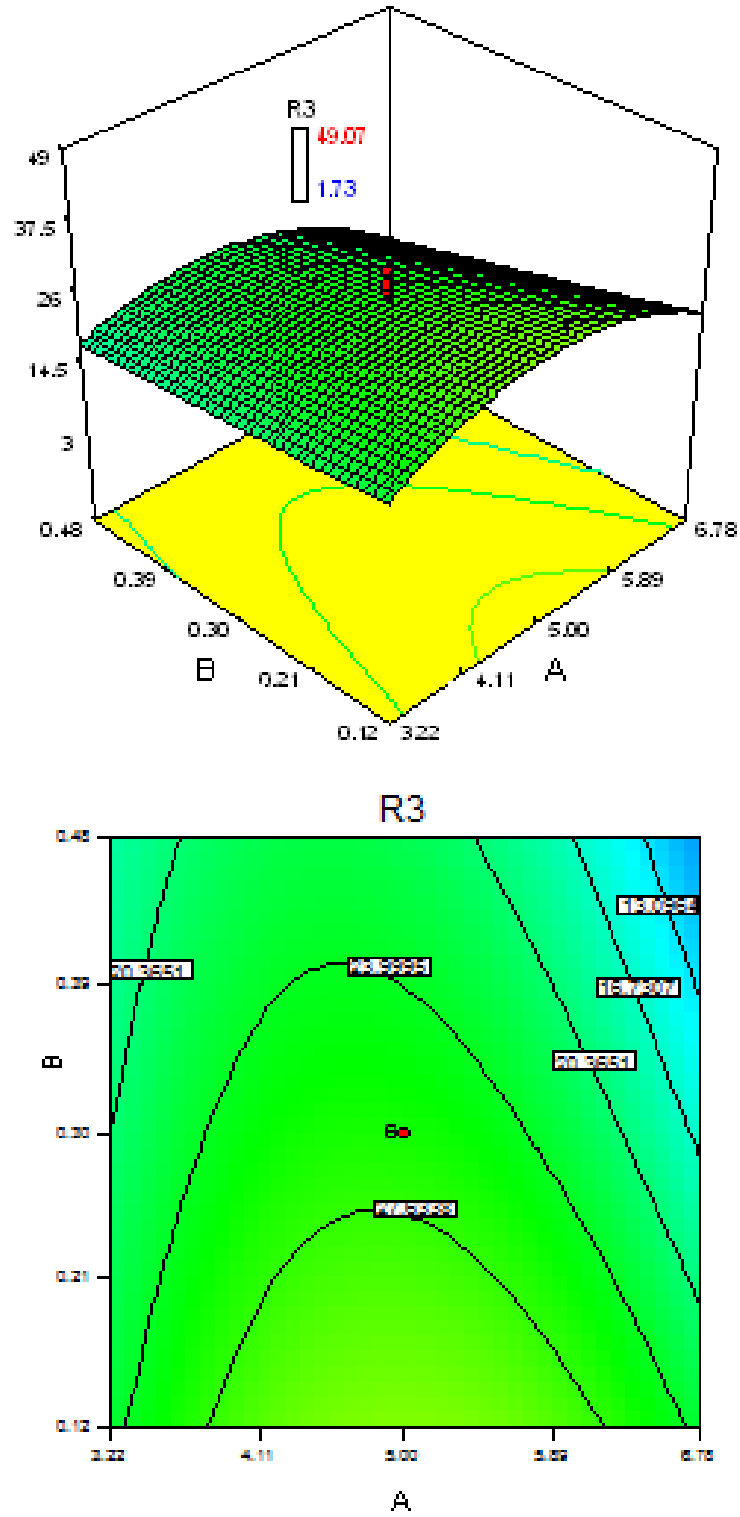
Şekil 7.47. Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



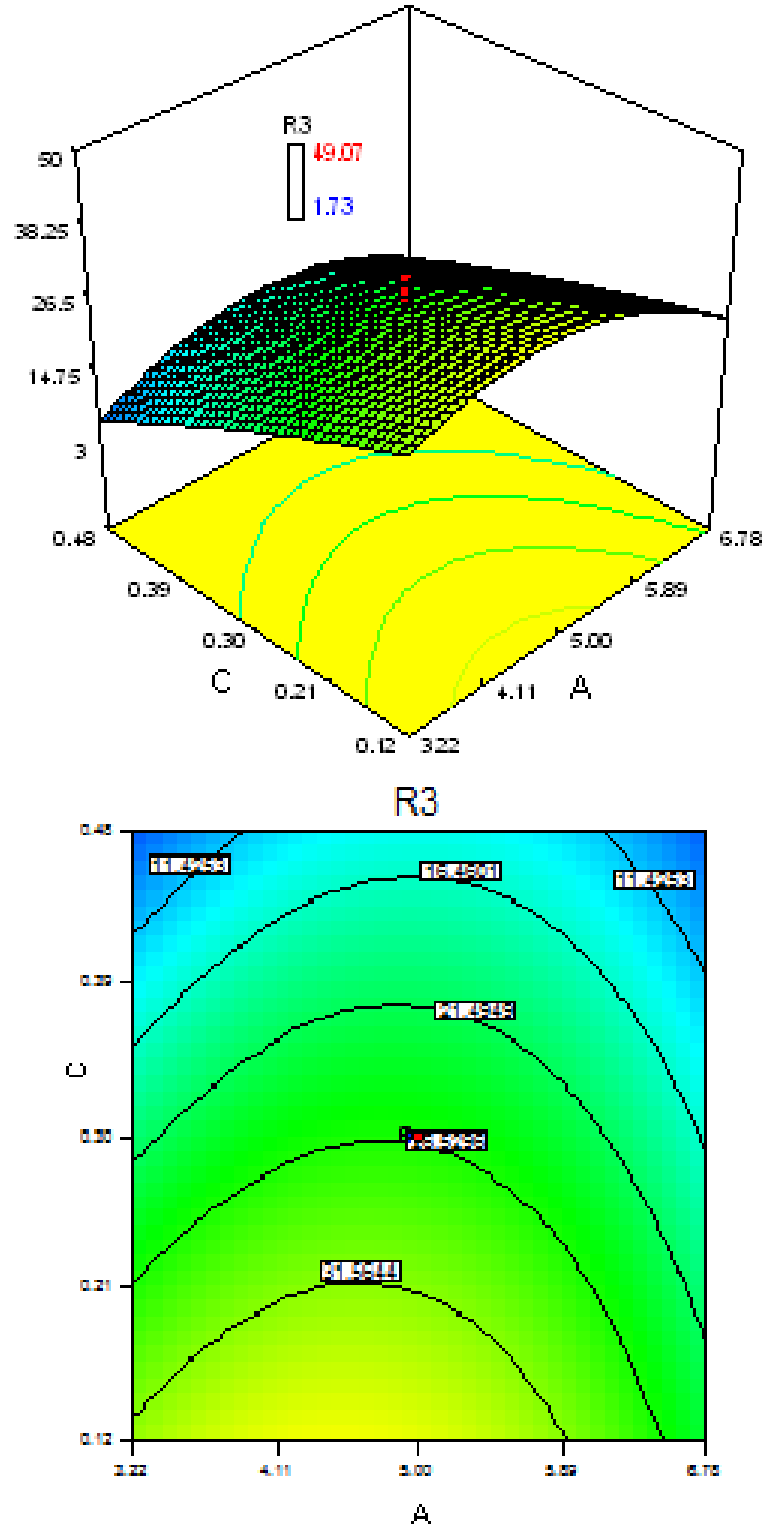
Şekil 7.48. Endo pektinaz aktivitesinde (R2); buğday kepeği (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



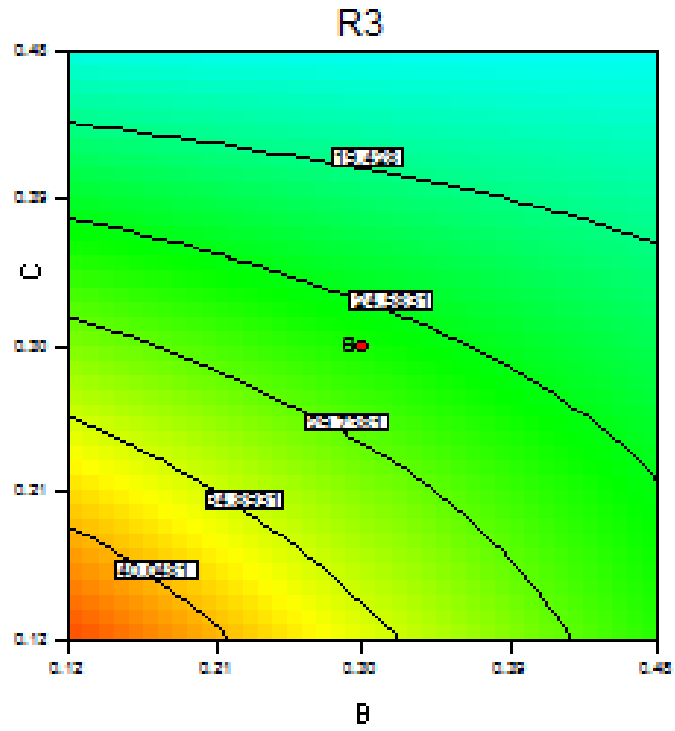
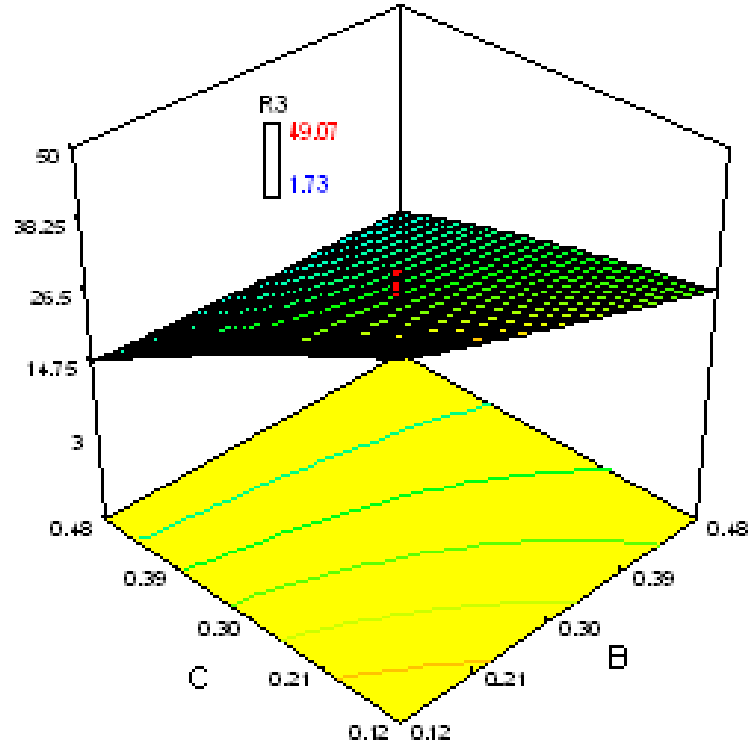
Şekil 7.50. Endo pektinaz aktivitesinde (R2); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 7.51. Pektin liyaz aktivitesinde (R3); buğday kepeği (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 7.52. Pektin liyaz aktivitesinde (R3); buğday kepeği (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 7.53. Pektin liyaz aktivitesinde (R3); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri

7.2.3. Şeker Pancarı Küspesi Kullanılarak Katı Hal Fermantasyon Tekniği İle Pektinaz Üretimi ve Üretim Ortamının Tepki Yüzey Metodu Kullanılarak Optimizasyonu

Son yıllarda, tepki yüzey metodu gibi birçok istatistiksel deneysel dizayn mikroorganizmalarla enzim üretiminin optimizasyonunda kullanılmaktadır (Dutta vd., 2004; Barbosa vd., 2010).

Çalışmanın son aşamasında katı substrat olarak şeker pancarı küspesi kullanılarak pektinaz grubu enzimlerin üretimi Tepki yüzey metodu ile optimize edilmiştir. Bu amaçla, 2^3 faktöriyel dizayn 20 deney ile tamamlanmıştır. Bu çalışmada, şeker pancarı küspesi (A), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonu bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve dizaynda her bir faktör beş farklı seviyede ($-\alpha$, -1, 0, 1, $+\alpha$) çalışılarak bağımsız değişkenlerin seviyeleri optimize edilmiştir. 5. günde elde edilen maksimum ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz aktivite değerleri dizayn deneylerinin tepkisi olarak alınmıştır. Bu çalışmada araştırılan bağımsız değişkenlerin aralıkları ve seviyeleri Tablo 7.8.' de verilmiştir.

Ortamin optimum kombinasyonunu araştırmak için MKT deneysel planına göre deneyler yapılmış ve deneysel sonuçlar Tablo 7.9.' da verilmiştir.

Tablo 7.8. Şeker pancarı küspesi kullanılarak yapılan deneylerde Merkezi Kompozit Tasarım için kullanılmış ortam bileşimlerinin kodlanmış ve gerçek değerleri

Değişkenler (konsantrasyon, % w/v)	Sembol	Çalışma aralığı ve değerleri				
		-1.682($-\alpha$)	-1	0	1	+1.682($+\alpha$)
Şeker pancarı küspesi	A	2	3.22	5	6.78	8.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	B	0	0.12	0.3	0.48	0.6
Maya özütü	C	0	0.12	0.3	0.48	0.6

Tablo 7.9. Kodlanmış değerleri içeren MKT' a göre deney tasarımı ve gözlenen aktivite değerleri

Deney No	Değişkenler			Tepkiler		
	A	B	C	Ekzo pektinaz Aktivitesi (U/mL)	Endo pektinaz Aktivitesi (U/mL)	Pektin liyaz Aktivitesi (U/mL)
1	+1.682	0	0	23.42	118.92	62.73
2	-1	-1	+1	10.59	86.49	34.27
3	0	0	0	17.98	93.69	62.27
4	+1	+1	+1	33.43	145.75	94.33
5	0	0	0	22.43	100.90	65.83
6	-1	1	+1	9.71	54.05	30.93
7	+1	-1	-1	18.81	82.88	73.33
8	0	0	0	17.10	100.90	65.20
9	0	-1.682	0	6.21	39.64	47.13
10	0	0	0	22.03	109.99	66.60
11	-1	-1	-1	7.47	46.85	48.20
12	0	0	0	18.53	93.24	60.53
13	-1	1	-1	6.94	28.83	25.73
14	0	0	0	19.19	102.70	61.53
15	0	0	+1.682	20.45	93.69	84.60
16	+1	+1	-1	29.24	147.75	76.53
17	0	0	-1.682	12.68	79.28	41.47
18	+1	-1	+1	31.57	136.94	76.33
19	-1.682	0	0	6.33	28.83	23.67
20	0	+1.682	0	3.62	36.04	27.93

Bu değerlere göre Tepki Yüzey Metodu (TYM) analizi gerçekleştirilmiş elde edilen sonuçların varyans analizi (ANOVA) Tablo 7.10.-7.12.' de verilmiştir.

Tablo 7.10. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak ekzo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

Kaynak (R1,Ekzo pektinaz)	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	1195.42	9	132.82	4.92	0.0102 önemli
A-Şeker pan. küspesi	839.62	1	839.62	31.11	0.0002
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	3.12	1	3.12	0.12	0.7410
C- Maya Özütü	94.41	1	94.41	3.50	0.0910
AB	23.46	1	23.46	0.87	0.3731
AC	15.29	1	15.29	0.57	0.4690
BC	9.95	1	9.95	0.37	0.5573
A ²	0.67	1	0.67	0.025	0.8782
B ²	201.20	1	201.20	7.46	0.0212
C ²	2.11	1	2.11	0.078	0.7856
Artık	269.88	10	26.99		
Uyum eksikliği	245.79	5	49.16	10.21	0.0117önemli değil
Saf hata	24.08	5	4.82		
Doğrulanmış	1465.29	19			
Toplam					
R ² ; 0.82, Adj R ² ; 0.65, Pred R ² ; -0.30, Adeq Precision; 7.180					

Tablo 7.11. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak endo pektinaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

Kaynak (R ² , Endo pektinaz)	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	22784.46	9	2531.61	7.16	0.0025 önemli
A-Şeker pan. küspesi	14736.44	1	14736.44	41.69	< 0.0001
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	21.58	1	21.58	0.061	0.8099
C- Maya Özü	1458.95	1	1458.95	4.13	0.0696
AB	1926.34	1	1926.34	5.45	0.0417
AC	20.48	1	20.48	0.058	0.4034
BC	620.93	1	620.93	1.76	0.2145
A ²	184.77	1	184.77	0.52	0.4862
B ²	3838.81	1	3838.81	10.86	0.0081
C ²	11.10	1	11.10	0.031	0.8629
Artık	3534.41	10	353.4		
Uyum eksikliği	3340.52	5	668.10	17.23	0.0036 önemli
Saf hata	193.89	5	38.78		
Doğrulanmış	26.318.87	19			
Toplam					

R²; 0.87, Adj R²; 0.74, Pred R²; 0.02, Adeq Precision; 8.604

ANOVA değerlerinden de anlaşılacağı gibi, verilerin modele uygunluğu oldukça anlamlı görülmektedir. Örneğin, verilerin dağılımdan uzaklığının ölçüsü olan Fisher's F-test değeri R1, R2 ve R3 için sırasıyla F_{model}=4.92; 7.16 ve 5.75 (ortalama kare regresyon/ ortalama kare artık) olup oldukça düşük olasılık değerlerine sahiptir [sırasıyla (P_{model}>F)= 0.0102, 0.0025 ve 0.0057]. Prob>F değerinin 0.05 den küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca determinasyon katsayısının sırasıyla R² = 0.82, 0.87 ve 0.84 olması da modelin uygunluğunun bir göstergesidir; yani toplam varyasyonun sırasıyla % 18, 13 ve 16' unun modelle açıklanamadığını belirtmektedir. Bu özellikle biyolojik üretim proseslerinde oldukça kabullenebilir bir aralıktadır.

Tablo 7.12. Ortam bileşenlerinin bir fonksiyonu olarak pektin liyaz aktivitesinin ikinci dereceden polinom (kuadratik) modeli için varyans analizi (ANOVA)

Kaynak (R3,Pektin liyaz)	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama Kare	F değeri	p değeri Prob > F
Model	6745.60	9	749.51	5.75	0.0057 önemli
A-Şeker pan. küspesi	4470.20	1	4470.20	34.32	0.0002
B-(NH ₄) ₂ SO ₄	99.70	1	99.70	0.77	0.4022
C- Maya Özütü	524.14	1	524.14	4.02	0.0727
AB	276.24	1	276.24	2.12	0.1760
AC	109.00	1	109.00	0.84	0.3818
BC	143.91	1	143.91	1.10	0.3180
A ²	363.20	1	363.20	2.79	0.1259
B ²	711.18	1	711.18	5.46	0.0416
C ²	57.21	1	57.21	0.44	0.5225
Artık	1302.59	10	130.26		
Uyum eksikliği	1270.60	5	254.12	39.72	0.0005 önemli
Saf hata	31.99	5	6.40		
Doğrulanmış	8048.19	19			
Toplam					

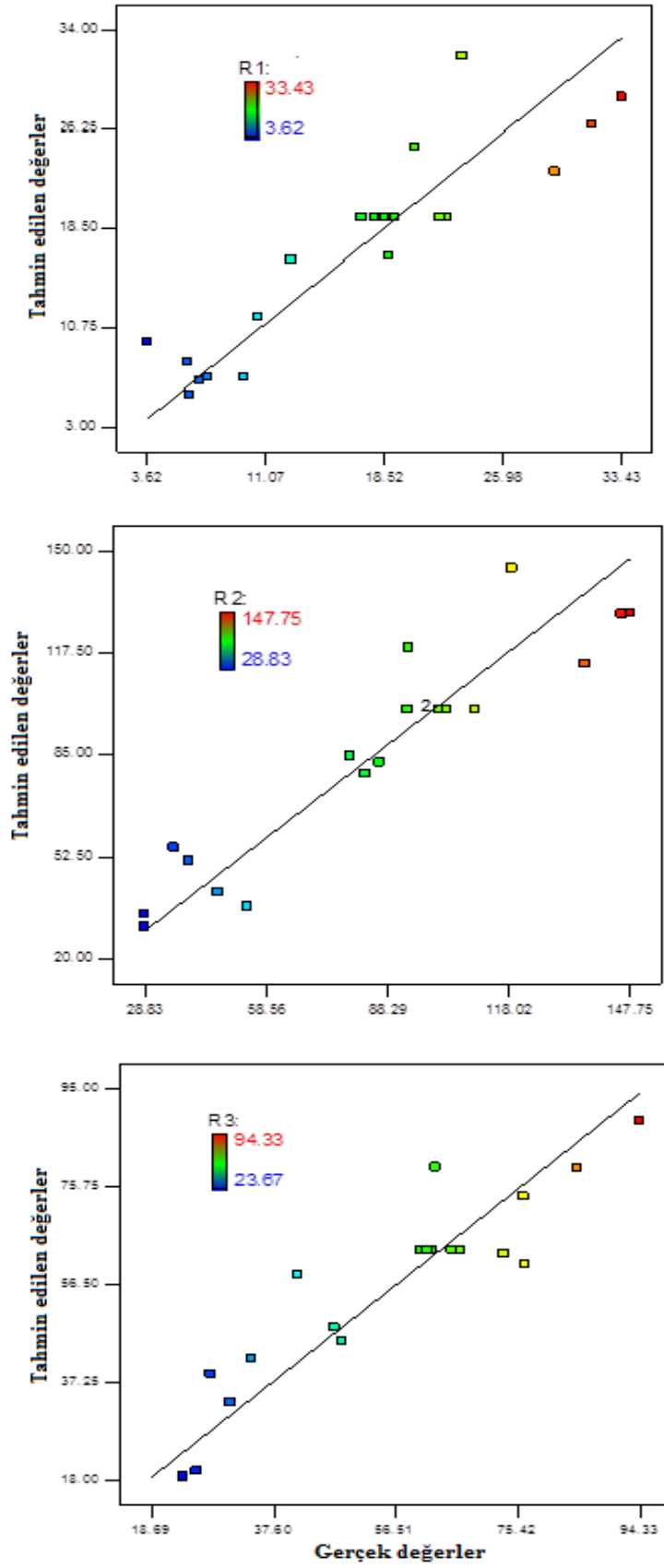
R²; 0.84, Adj R²; 0.69, Pred R²; -0.20, Adeq Precision; 6.955

Oluşturulan modelde ayarlanmış (Adj) R² değerleri sırasıyla 0.65, 0.74 ve 0.69 olarak bulunmuştur. Bu değerler, R² değerleri ile uyum içindedir. 7.18, 8.604 ve 6.955 ‘adequate precision’ değerleri uygun bir sinyali işaret eder ve modelin dizayn alanı içinde kullanılabileceğini desteklemektedir. Ekzo pektinaz aktivitesi için ‘lack of fit’ önemli değil olması modelin tepki yüzeyin açıklanması için uygun olduğunu göstermektedir. Endo pektinaz ve pektin liyaz aktiviteleri için ise uyum eksikliği önemli çıkmıştır.

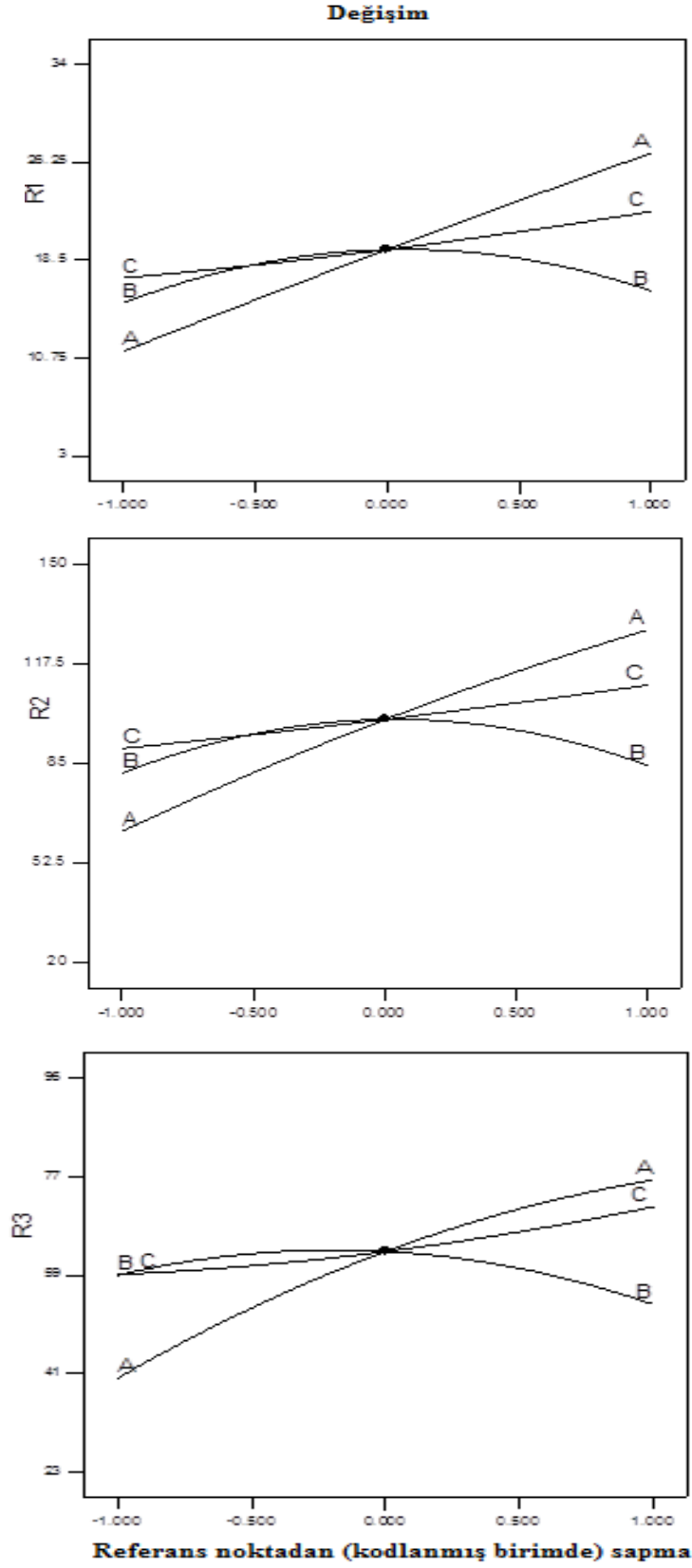
TYM analizi sonucu elde edilen ve enzim aktivitesi ile proses değişkenleri (şeker pancarı küspesi, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları) arasındaki amprik ilişkiyi veren kodlanmış birimdeki regresyon eşitlikleri;

$$\begin{aligned}
R1 &= +19.32 + 7.84 A + 0.48 B + 2.63 C + 1.71AB + 1.38 AC - 1.12 BC - 0.22 A^2 - 3.74 B^2 + 0.38 C^2 \\
R2 &= +99.36 + 32.85 A + 1.26 B + 10.34 C + 15.52 AB - 1.60 AC - 8.81 BC - 3.58 A^2 - 16.32 B^2 + 0.88 C^2 \\
R3 &= +63.32 + 18.09 A - 2.70B + 6.20 C + 5.88 AB + 3.69 AC + 4.24BC - 5.02A^2 - 7.02B^2 + 1.99 C^2 \quad (7.2.)
\end{aligned}$$

Katsayılar a ait P-değerleri kıyaslandığında, A ve B², nin 0.05 den büyük olmayan değerleri bu proses değişkenlerinin ekzo pektinaz ve pektin liyaz üretiminde etkisinin önemli olduğunu; bu değişkenlerde yapılacak değişikliklerin enzim aktivitesini değiştireceğini belirtmektedir. Ayrıca bu sonuçlar şeker pancarı küspesi konsantrasyonunun (A) amonyum sülfata göre proses üzerinde çok daha fazla etkili olduğunu söylemektedir (daha küçük p değerlerinden dolayı). A, AB ve B², nin 0.05' den küçük değerleri bu proses değişkenlerinin endo pektinaz üretiminde etkisinin önemli olduğunu; bu değişkenlerde yapılacak değişikliklerin enzim aktivitesini değiştireceğini göstermektedir. Model denklemden yararlanarak gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişkiler ise Şekil 7.54.' de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi deneysel gerçek değerlerle modelden tahmin edilen değerler biyolojik sistemler için kabul edilebilir bir sınırdadır. Şekil 7.55.' de referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre aktivitenin A, B ve C ile olan değişimleri görülmektedir.

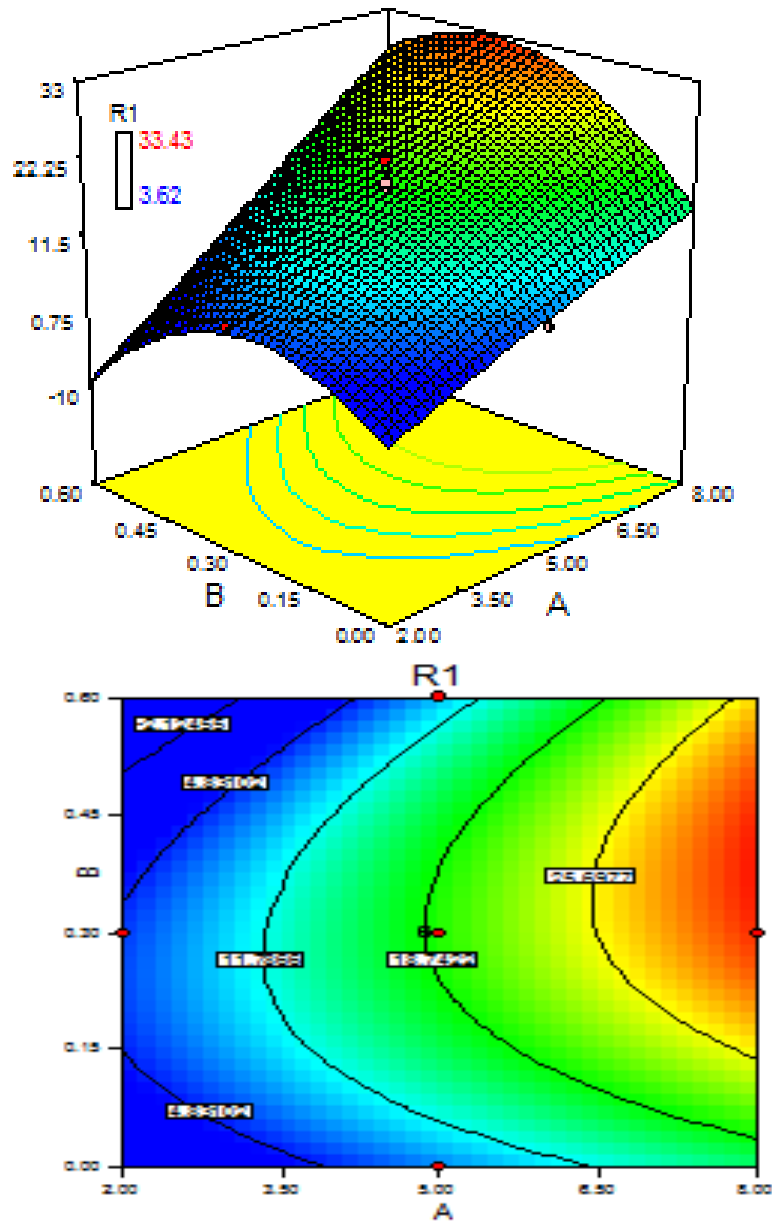


Şekil 7.54. Şeker pancarı küspesinin kullanıldığı deneylerde, ekzo, endo pektinaz ve pektin liyaz (sırasıyla R1, R2 ve R3) için gözlenmiş değerlere karşı hesaplanmış tahmini değerlerin değişimi

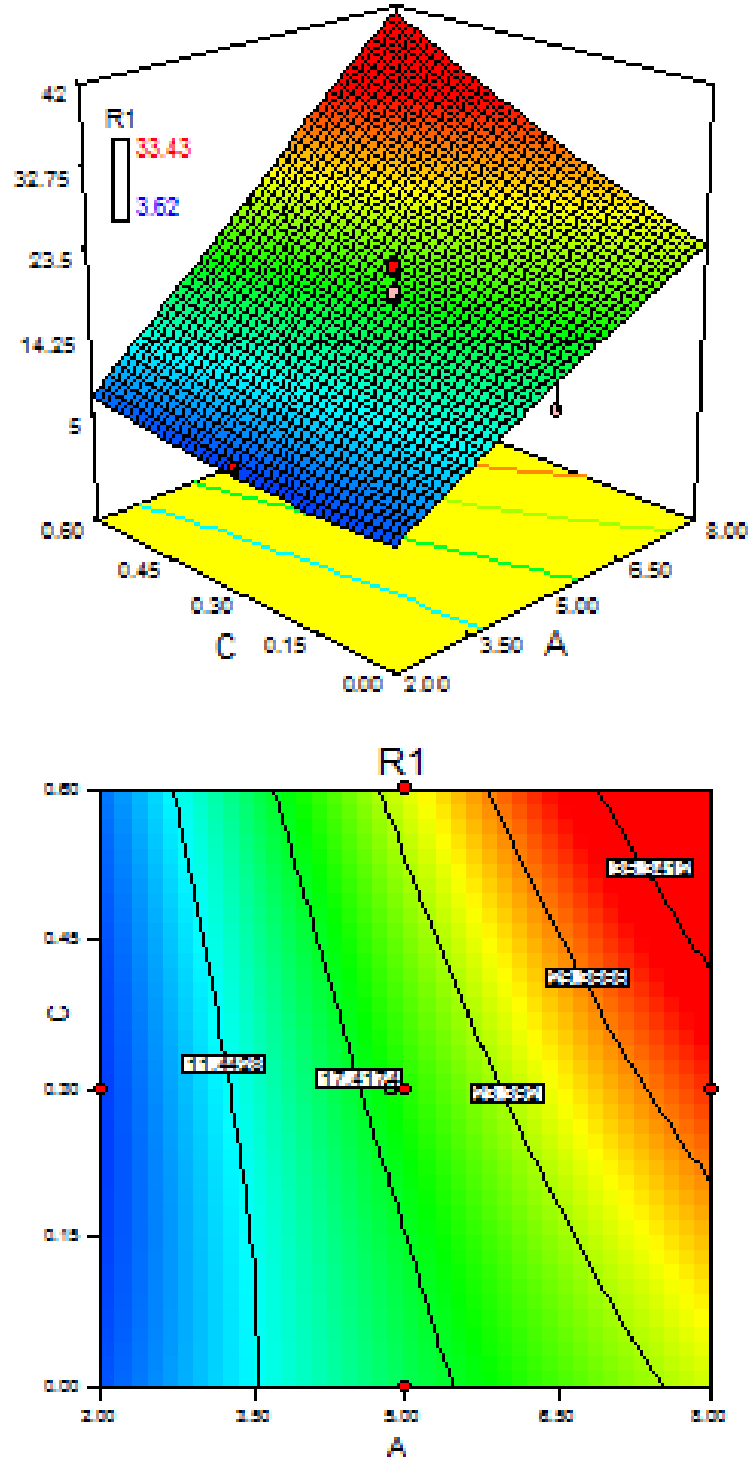


Şekil 7.55. Referans noktasına göre seçilmiş bir değere göre, ekzo pektinaz (R1), endo pektinaz (R2) ve pektin liyaz (R3) aktivitelerinde bağımsız değişkenler olan şeker pancarı küspesi (A), amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonlarının etkisini gösteren perturbation grafiği

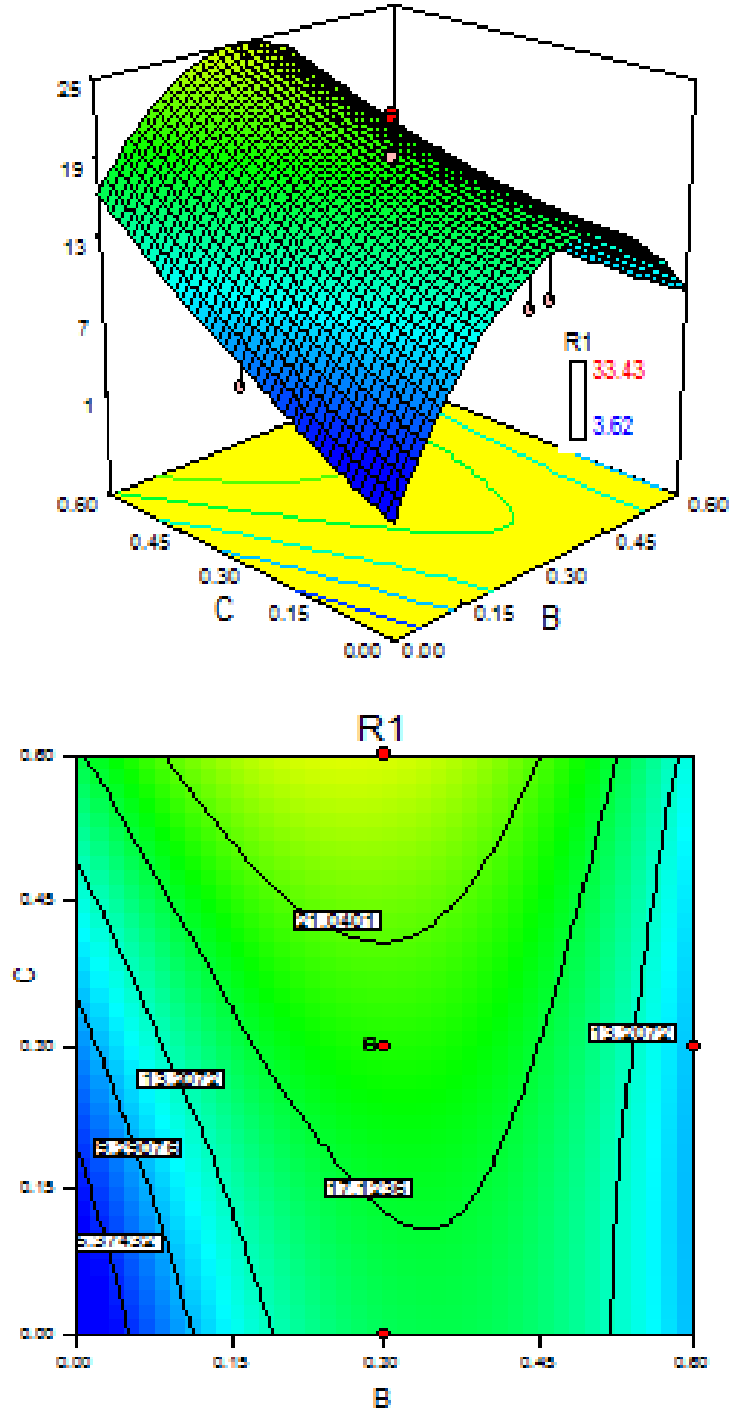
Enzim aktivitelerinin şeker pancarı küspesi, amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonuna göre değişimini gösteren üç boyutlu ve kontür eğrileri Şekil 7.56.-7.64.' de görülmektedir. Kontür (izdüşüm) grafiklerinde görüldüğü gibi elde edilen tepki değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilmektedir. Bu düzleme ait koordinatlar bağımsız değişkenlerin seviyelerini göstermektedir. Şekildeki grafiklerden şeker pancarı küspesi ve maya özütü konsantrasyonu arttıkça enzim üretiminin arttığı, ayrıca enzim aktivitelerinin en yüksek olacağı amonyum sülfat konsantrasyonu aralığının yaklaşık olarak % 0.15-0.30 (w/v) olduğu görülmektedir.



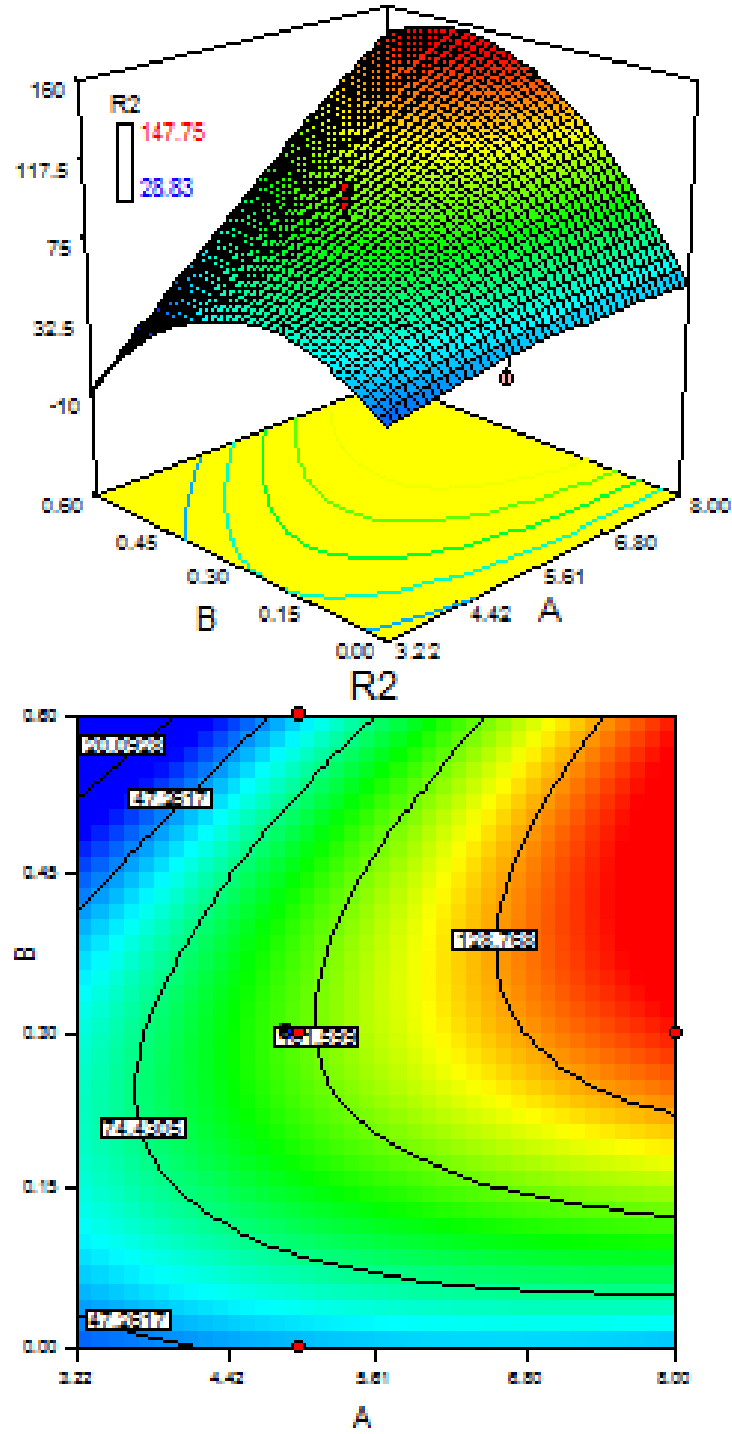
Şekil 7.56. Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); şeker pancarı küspesi (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



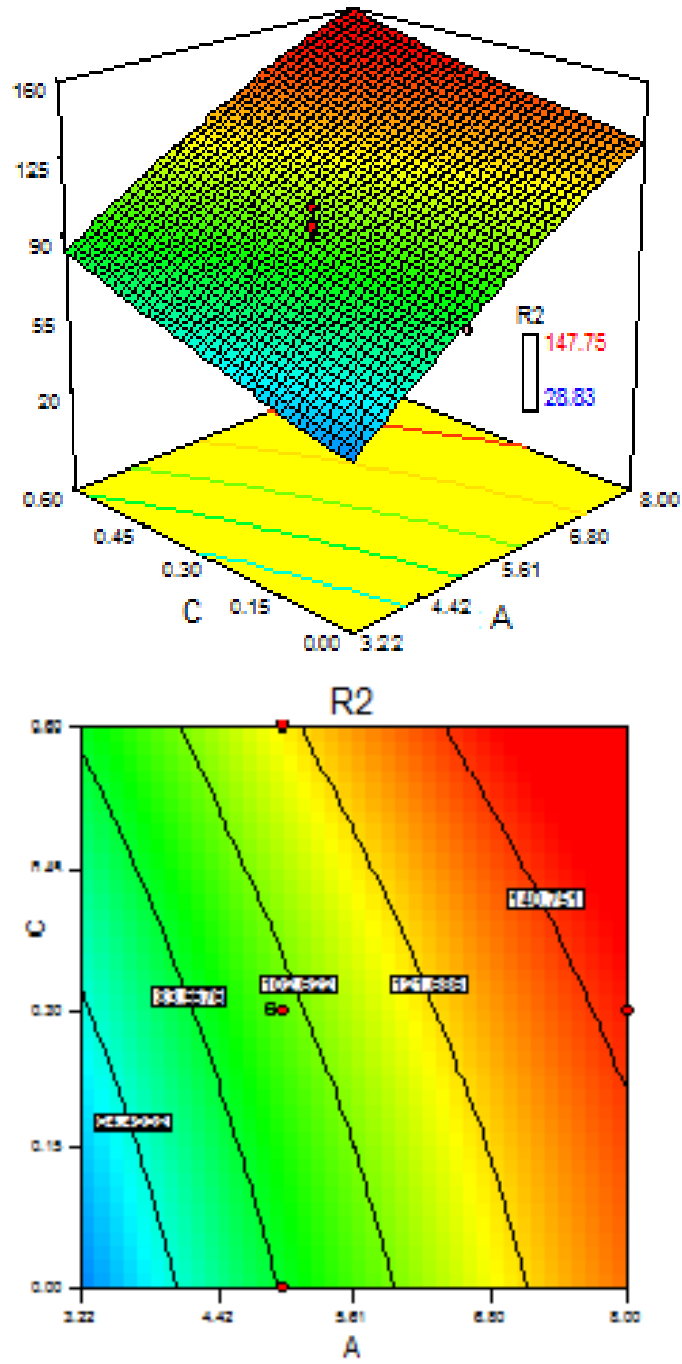
Şekil 7.57. Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); şeker pancarı küspesi (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



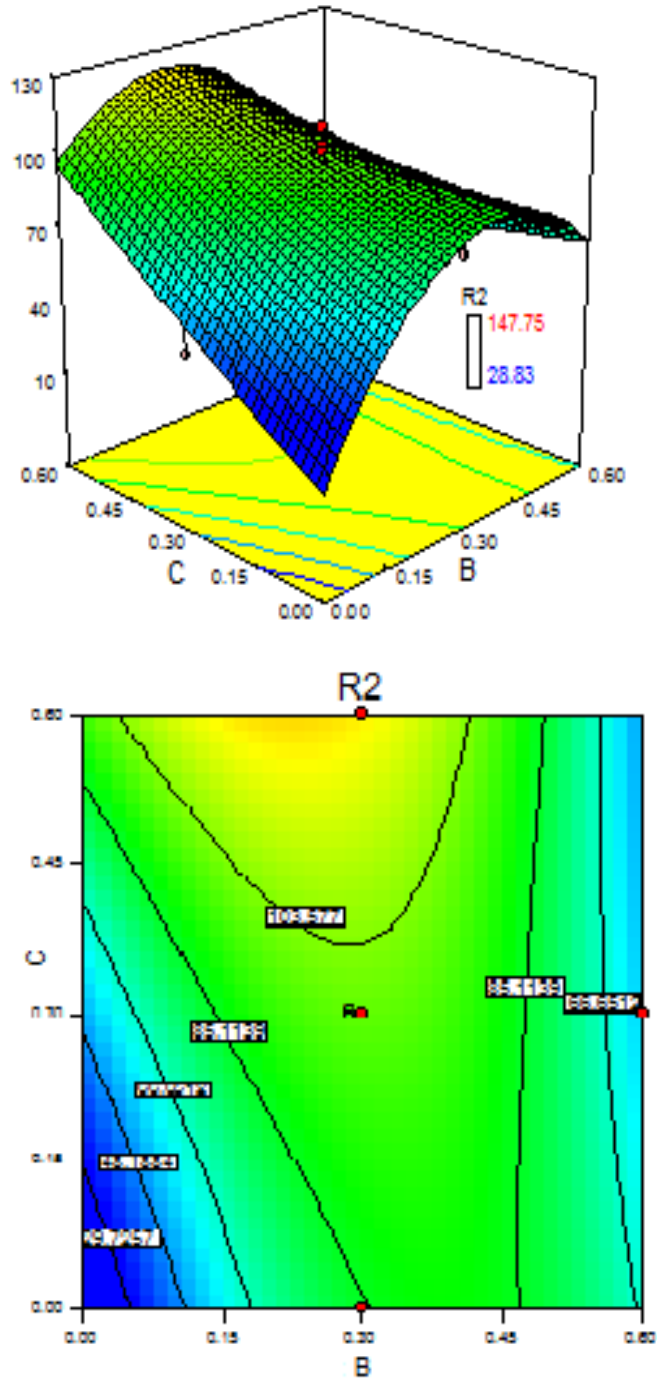
Şekil 7.58. Ekzo pektinaz aktivitesinde (R1); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



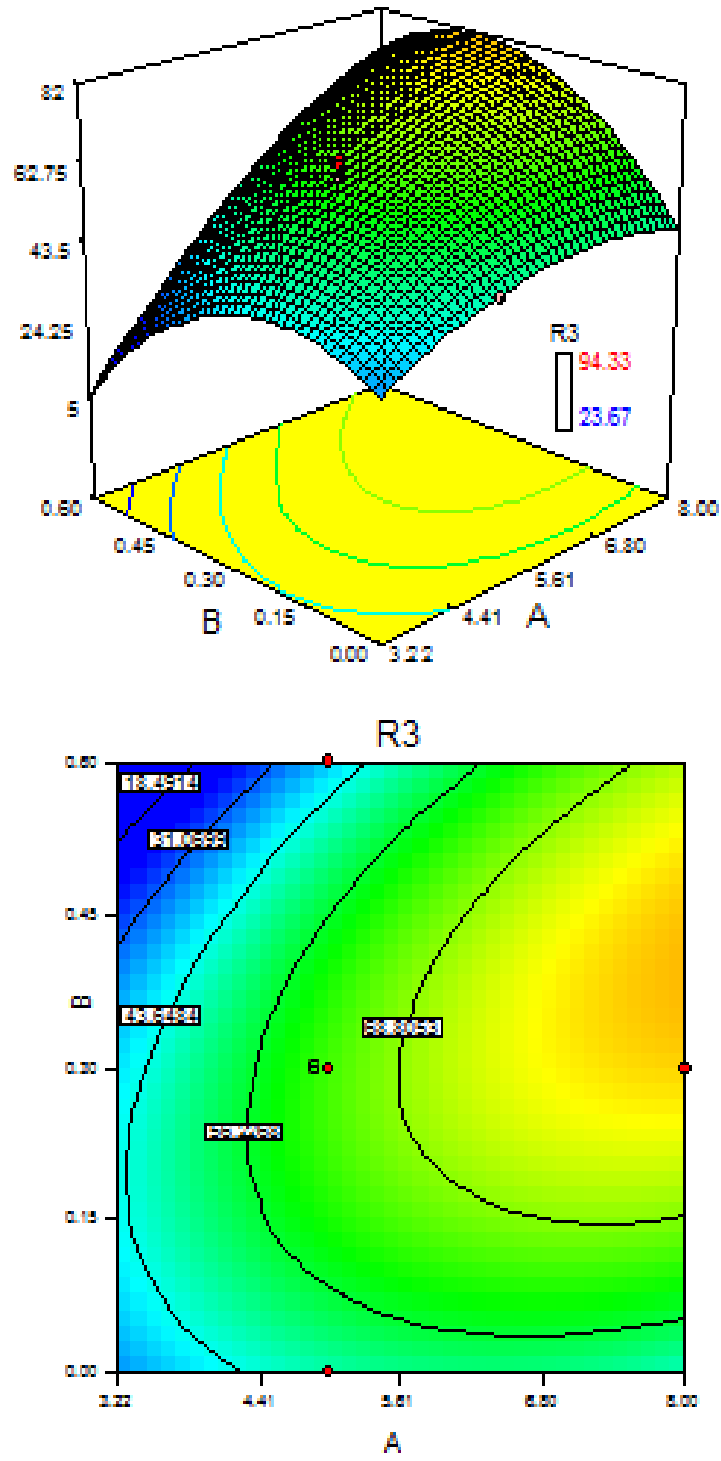
Şekil 7.59. Endo pektinaz aktivitesinde (R2); şeker pancarı küspesi (A) ve amonyum sülfat (B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



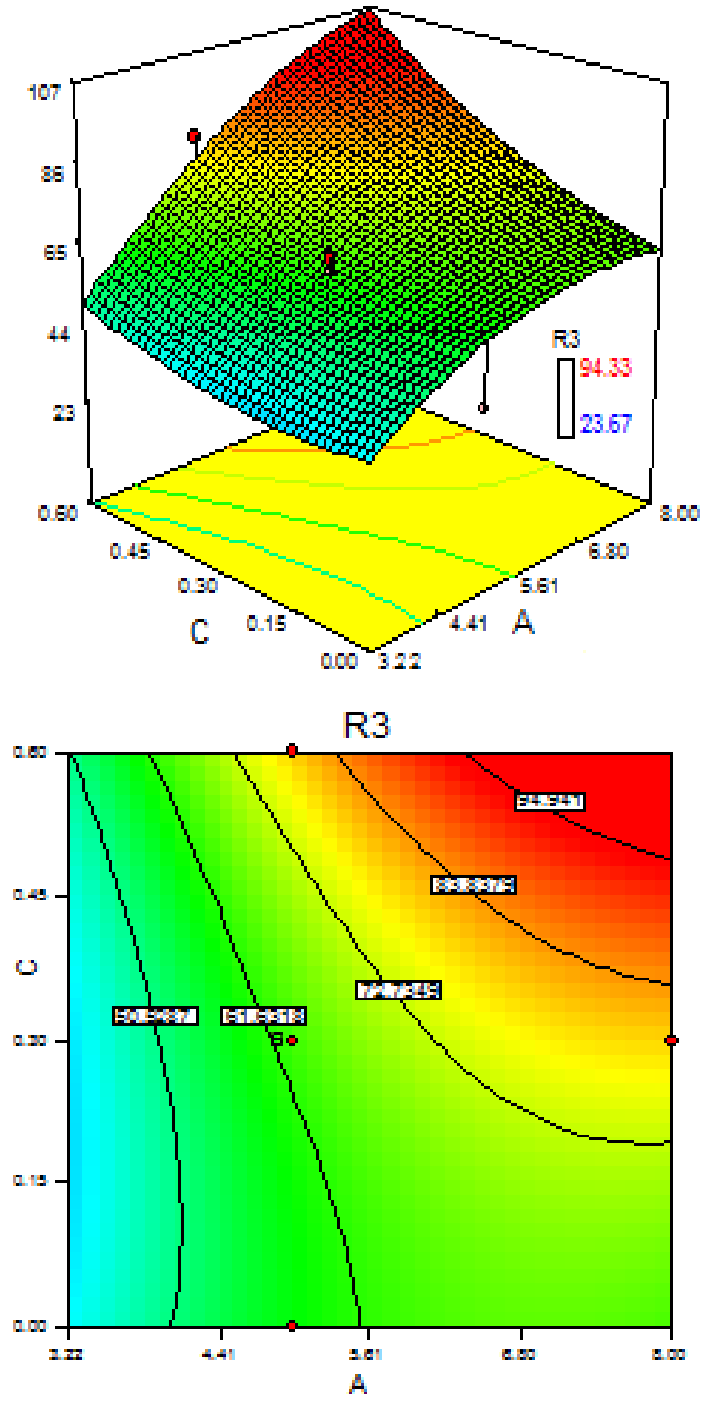
Şekil 7.60. Endo pektinaz aktivitesinde (R2); şeker pancarı küspesi (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



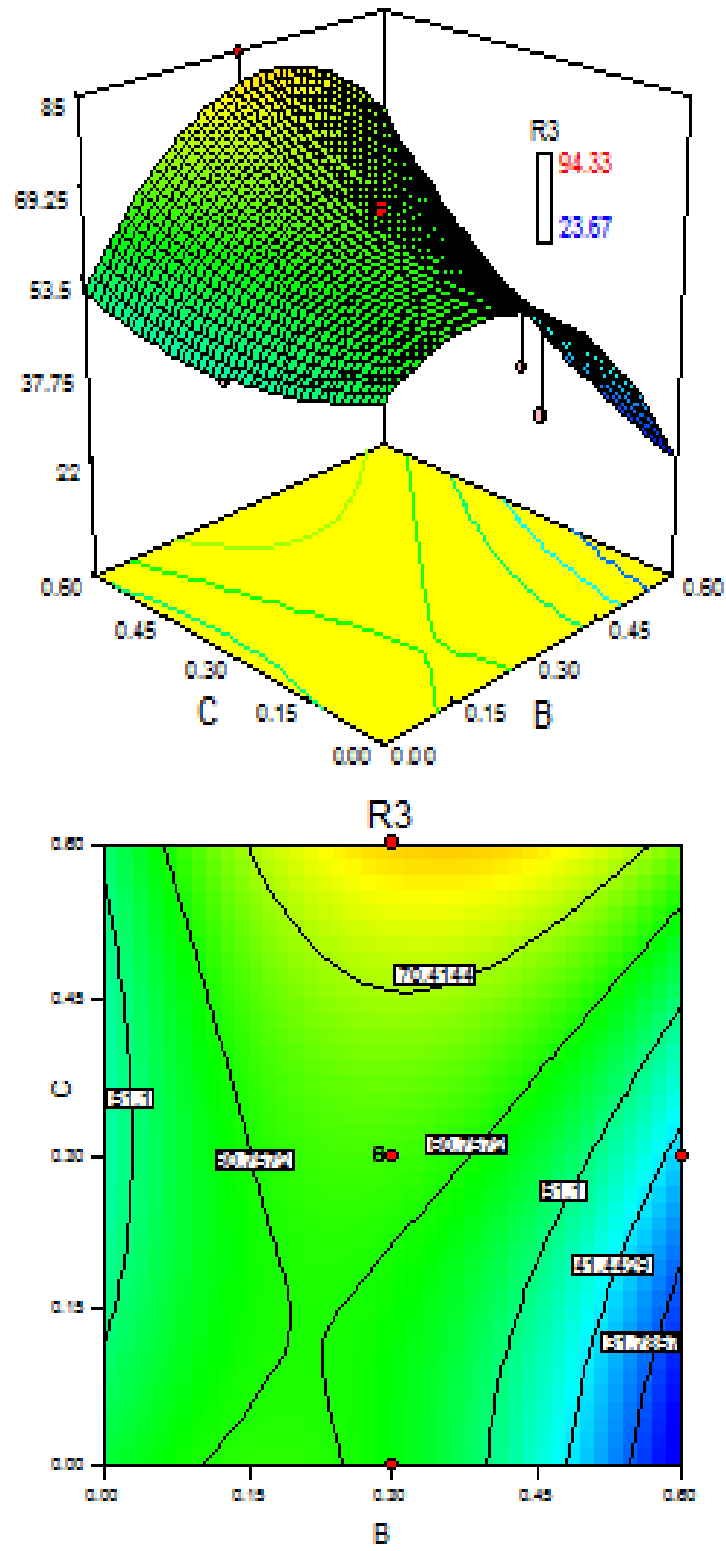
Şekil 7.61. Endo pektinaz aktivitesinde (R2); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 7.62. Pektin liyaz aktivitesinde (R3); şeker pancarı küspesi (A) ve amonyum sülfat B) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 7.63. Pektin liyaz aktivitesinde (R3); şeker pancarı küspesi (A) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri



Şekil 7.64. Pektin liyaz aktivitesinde (R3); amonyum sülfat (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonunun etkisini gösteren üç boyutlu ve iki boyutlu tepki yüzey eğrileri

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında, *B. pumilus* ile endo, ekzo pektinaz ve pektin liyaz enzimi üretimi ve mikroorganizma özgül üreme hızına fermantasyon bileşenlerinin etkisi incelenmiştir. Çalışmada öncelikle, enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri olan ortamın başlangıç pH' ının etkisi incelenmiş ve en yüksek enzim aktiviteleri ve mikroorganizma özgül üreme hızı pH 8' de elde edilmiştir. Daha sonra yapılacak olan deneylerde pH 8 değeri uygun değer olarak seçilmiştir. Literatürde de, çoğu bakterinin üremesi ve pektinaz grubu enzimlerin üretimi için optimum pH' ın 7.0-10.0 aralığında değiştiği yer almaktadır. Fermantasyon deneylerinde mikroorganizma üreme ve enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri de başlangıç substrat derişimidir. Pektin, mikrobiyal sistemlerde, pektinolitik enzimlerin üretiminde bir indükleyici olarak görev almaktadır. Pektinin farklı konsantrasyonlarının enzim aktivite ve mikroorganizma özgül üreme hızına etkisi incelenmiş ve bununla ilgili bir dizi deney yapılmıştır. Pektin konsantrasyonu arttıkça hem mikroorganizma özgül üreme hızı hem de enzim üretimi artmıştır. Yaptığımız çalışmada, % 2 pektin konsantrasyonunda besi ortamı daha viskoz bir hal almış ve mikroorganizma takibi güçleşmiştir. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak deneylerde % 1 pektin konsantrasyonu kullanılmıştır. Daha sonra, yapılacak çalışmalarda enzim üretimi için en uygun karbon kaynağının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla farklı karbon kaynakları olarak glikoz ve poligalakturonik asit kullanılmıştır. Yapılan bir dizi deney sonucunda, glikoz ve poligalakturonik asit içeren ortamda elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızının % 1 pektin içeren ortamdaki daha yüksek olmasına rağmen enzim aktivitelerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bundan dolayı, daha sonraki çalışmalar için % 1 pektin konsantrasyonu uygun bir değer olarak seçilmiştir. Enzim üretiminde farklı azot kaynaklarının etkisini amacıyla yapılan deneylerde, farklı azot kaynakları olarak amonyum sülfat, maya özütü ve pepton kullanılmış, amonyum sülfatın pektinaz enzimlerinin üretiminde daha kullanışlı olduğu görülmüş ve daha sonra yapılacak deneylerde azot kaynağı olarak amonyum sülfatın (% 0.05) kullanımına karar verilmiştir. Literatürde de, Ward ve Fogarty (1974), *Bacillus subtilis* ve *Flavobacterium pectinovorum* ile poligalakturonat liyaz üretiminde en yüksek aktivite değerini *Bacillus subtilis* için glutamin ve amonyum sülfat içeren ortamda ve *Flavobacterium pectinovorum* için amonyum sülfat içeren ortamda elde etmişlerdir. Metal iyonlarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için kalsiyum ve sodyum iyonları enzim üretim ortamına eklenmiştir.

Kalsiyum klorür iyonunun etkisinin incelendiği deneylerde, % 0.02 konsantrasyonunda $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eklenmesiyle pektin liyaz ve endo pektinaz aktivitesinin artmasına rağmen ekzo pektinaz aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Sodyum iyonunun etkisinin incelendiği deneylerde, % 0.02 oranına kadar NaCl konsantrasyonunun artmasıyla enzim aktivite değerleri artmış daha yüksek konsantrasyonda ise değerlerde düşüş gözlenmiştir. Kalsiyum iyonu ile kıyaslandığında ise sodyum iyonunda daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Fermantasyon ortamında bulunan fosfat miktarı değiştirilmiş ve artan fosfat konsantrasyonunun mikroorganizma özgül üreme hızını artırdığı bulunmuştur. % 0.3 K_2HPO_4 + % 0.15 KH_2PO_4 konsantrasyonunda maksimum pektin liyaz ve endo pektinaz aktiviteleri elde edilmiştir. Maksimum ekzo pektinaz aktivitesi ise % 0.6 K_2HPO_4 + % 0.2 KH_2PO_4 konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Enzimin maksimum aktivite göstereceği pH ve sıcaklığı bulmak için yapılan deneyler sonucunda, pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz için optimum pH, 10.0, optimum sıcaklık ise sırasıyla, 40, 50 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Çeşitli araştırmacılar da yapmış oldukları farklı çalışmalarda alkali özellik gösteren pektinaz enzimi üretmişlerdir.

Bacillus pumilus ile pektin liyaz, endo pektinaz ve ekzo pektinaz üretimine karıştırma ve hava akış hızının etkisi, 5 litre çalışma hacmine sahip 6 litrelik laboratuvar ölçekli biyoreaktör kullanılarak incelenmiştir. Optimize edilmiş derin kültür fermantasyon ortamı kullanılarak 0.1 vvm hava akış hızında, farklı karıştırma hızlarının (200, 300 ve 400 rpm) mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Karıştırma hızının artmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızı artmıştır. Ancak, en yüksek pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktivitesi ise 300 rpm’ de tespit edilmiştir. Biyoreaktör deneylerinde daha yoğun bir karıştırma uygulandığından dolayı fermantasyon süresi azalmıştır. Biyoreaktör deneylerinin ikinci aşamasında, 300 rpm karıştırma hızında, farklı hava akış hızlarının (0.1, 0.15 ve 0.2 vvm) mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. En yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı 0.15 vvm’ de elde edilmiştir. En yüksek enzim aktiviteleri ise 0.1 vvm’ de elde edilmiştir. Hava akış hızının artması ile enzim aktivite değerlerinde düşme olmuştur. Benzer sonuç, Songpim ve diğerleri (2010) tarafından, *P. polymyxa* ile pektat liyaz üretimi üzerine yapılan bir çalışmada gözlenmiş, 1.0 vvm’ nin üzerindeki havalandırma hızlarında enzim üretiminin inhibe olduğu belirtilmiştir. Hacimsel oksijen transfer katsayısı karıştırma hızı ve hava akış hızının artmasıyla artmıştır. k_{La} değeri inkübasyon süresince önce artmış sonra ise azalmıştır. k_{La} değerindeki değişimler inkübasyon süresi boyunca fermantasyon

sıvısının viskozitesindeki değişimlere bağlanabilir. Karıştırma hızı arttırıldığında ise oksijen tüketim hızında azalma meydana gelmiştir.

Katı hal fermantasyonu deneylerinde substrat olarak; buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ay çiçeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu, elma posası ve üzüm posası kullanılmıştır. 20-100 mesh boyutundaki katı substrat % 5 (w/v) konsantrasyonunda kullanılmıştır. Saf su yerine musluk suyu kullanılmıştır. Şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği içeren ortamlarda maksimum aktiviteler elde edilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, maksimum aktivitelerin elde edildiği katı substratlar olan şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında % 5 oranında katı substrat içeren ortama % 0.3 (w/v) konsantrasyonunda farklı azot kaynakları (amonyum sülfat, pepton ve maya özütü) eklenmiştir. Amonyum sülfat ve maya özütünün *Bacillus pumilus* bakterisi ile pektinaz grubu enzimlerin üretimi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise, katı hal fermantasyonunda maksimum enzim üretimi elde etmek ve birbirini etkileyen değişkenlerin rollerini anlamak için ortam bileşenleri Tepki Yüzey Metodu ile Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak optimize edilmeye çalışılmıştır. Burada 2³ faktöriyel dizayn, 20 deney ile tamamlanmıştır. Katı substrat (A), (NH₄)₂SO₄ (B) ve maya özütü (C) konsantrasyonları bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve deneyler yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre TYM analizi gerçekleştirilmiş ve enzim üretim için kuadratik eşitliğe iyi bir uyum gözlenmiştir. Buğday kepeğinin kullanıldığı ortamlarda düşük amonyum sülfat ve maya özütü konsantrasyonları (% 0.12-0.21) kullanıldığı zaman, ekzo pektinaz, endo pektinaz ve pektin liyaz aktivitelerinde bir artış meydana gelmiştir. Maksimum enzim üretimi ise yaklaşık olarak % 5 civarında buğday kepeği içeren ortamlarda elde edilmiştir. İstatistiksel deney tasarımı ve analiz metodu ile yapılan, şeker pancarı küspesinden pektinaz enzimleri üretimi çalışmaları sonucunda şeker pancarı ve maya özütü konsantrasyonu artıkça enzim üretiminin arttığı görülmüştür. Yaklaşık olarak % 0.15-0.30 amonyum sülfat konsantrasyonu seviyelerinde ise en yüksek enzim aktivite değerleri elde edilmiştir.

Daha sonra yapılacak çalışmalarda hücre çöktürme, ultrafiltrasyon ve iyon değişimi kromatografisi gibi basamaklarla enzimler saflaştırılabilir ve karakterizasyonu yapılabilir, mikroorganizmanın genetik yapısı düzenlenerek, enzim üretimini arttırma çalışmaları yapılabilir, sürekli sistemde çalışılarak enzim üretimi gerçekleştirilebilir ve tutuklanmış mikroorganizma ile enzim üretimi incelenebilir.

9. KAYNAKLAR

- Abbasi H., Fazelipour H.M.**, 2010, Pectinase production in a defined medium using surface culture fermentation, *Int. J. Ind. Chem.*, Vol. 1, No. 1, pp. 5-10.
- Açikel Ü., Erşan M., Sağ Açikel Y.**, 2010, Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*, *Food and Bioproducts Processing* 88, 31-39.
- Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.L.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C.**, 2008, Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4 (4): 354-366.
- Ahlawat S., Dhiman S.S., Battan B., Mandhan R.P., Sharma J.**, 2009, Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric, *Process Biochemistry* 44, 521–526.
- Aksöz E., Aksöz N.**, 1985, Pektik enzimler (derleme), *Biyokimya Dergisi* 10 (1), 38-51.
- Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L.**, 1998, Industrial applications of pectic enzymes: a review, *Process Biochemistry* Vol. 33, No. I, 21-28.
- Antov M., Pericin D.**, 2003, Effect of some inorganic salts on the partitioning of pectinase of *Polyporus squamosus* in polyethylene glycol/crude dextran aqueous two-phase system, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 151–156.
- Arunachalam C., Asha S.**, 2010, Pectinolytic Enzyme - A Review of New Studies, *Advanced Biotech Journal – Online*, May., 01-05.
- Atasagünlü M.**, 1965, Enzimler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 8, 140 s. Ankara.
- Bai Z.H., Zhang H.X., Qi H.Y., Peng X.W., Li B.J.**, 2004, Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance, *Bioresource Technology*, 95, 49–52.
- Bailey J.E., Ollis D.F.**, 1986, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition, McGraw-Hill Book Company, Singapore, 983 p.
- Bandaipheth C., Prasertsan P.**, 2006, Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_{La} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7, *Carbohydrate Polymers* 66 (2006) 216–228.
- Bandyopadhyay B., Humphrey A.E.**, 1967, Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol IX, 533-544.

- Barbosa A.M., Giese E.C., Dekker R.F.H., Borsato D., Briones Perez A.I., Ubede Iranzo J.U.,** 2010, Extracellular β -glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS/A: optimization using surface methodology, *New Biotechnology* Vol. 27 Number 4, 374-381.
- Beyazıt M., Oğuz, B.,** 1998, *Mühendisler İçin İstatistik*, Birsen Yayınevi, İstanbul.
- Bingöl G.,** 1978, *Biyokimya*, Ankara Üniversitesi Eczacılık fakültesi Yayınları, No: 50, Ankara.
- Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C.,** 2002, Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 58:164–169.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.,** 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eight edition, 1268 p., U.S.A.
- Bulut Ş.,** 2007, Marinal Bakteri *Teredinobacter turnirae*' den Proteaz Üretimi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ.
- Chisti Y.,** 2010, *Industrial Biotechnology Sustainable Growth and Economic Success*, Edited by Wim Soetaert and Erick J. Vandamme, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 149-173, 552 p, Weinheim, Germany.
- Couto S.R., Sanroman M.A.,** 2006, Application of solid-state fermentation to food industry-A review *Journal of Food Engineering* 76, 291–302.
- Cruz-Guerrero A., Barzana E., Garcia-Garibay M., Gomez-Ruiz L.,** 1999, Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*, *Process Biochemistry* 34, 621–624.
- Demirci Y.,** 2006, Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Rekombinant L-Fenilalanin Üretimi için Biyoproses Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara.
- Demirtas M.U., Kolhatkar A., Kilbane II J.J.,** 2003, Effect of Aeration and Agitation on Growth Rate of *Thermus thermophilus* in Batch Mode, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 95, No. 2, 113-117.
- Demiryürek O.,** 2009, Polyester/Viskon Karışımli Open-End Rotor İplik Özelliklerinin Yapay sinir Ağları ve İstatistiksel Modeller Kurularak Tahmin Edilmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Dhillon S.S., Gill R.K., Gill S.S., Singh M.,** 2004, Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*, *International Journal of Environmental Studies*, Volume 61, Issue 2 April 2004, pages 199 – 210.

- Diaz-Godinez G., Sorino-Santos J., Augur C., Viniegra-Gonzalez G.,** 2001, Exopectinase produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 271-275.
- Dinand E., Chanzy H., Vignon M.R.,** 1999, Suspensions of cellulose microfibrils from sugar beet pulp, *Food Hydrocolloids* 13, 275–283.
- Dutta J.R., Dutta P.K., Banerjee R.,** 2004, Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models, *Process Biochemistry* 39, 2193-2198.
- Elibol M.,** 2002, Response surface methodological approach for inclusion of perfluorocarbon in actinorhodin fermentation medium, *Process Biochemistry* 38 667-673.
- Elibol M., Özer D.,** 2002, Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry* 38, 367-372.
- Erşan, M.,** 2011, *Rhizopus deleamar* ile Lipaz ve Asit Fosfataz Enzimlerinin Üretimi ve Ağır Metal Biyobirikiminin Eş Zamanalı Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Fadzilah K., Mashitah M.D.,** 2010, Cellulases Production in Palm Oil Mill Effluent: Effect of Aeration and Agitation, *Journal of Applied Sciences* 10 (24), 3307-3312.
- Favela-Torres E., Volke-Sepulveda T., Viniegra-Gonzales G.,** 2006, Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases, *Biotechnol.* 44 (2), 221–227.
- Fawole O.B., Odunfa S.A.,** 2003, Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*, *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 223–227.
- Feng Y., He Z., Ong S. L., Hu J., Zhang Z., Ng W. J.,** 2003, Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β -mannanase production Enzyme and Microbial Technology 32, 282–289.
- Galiotou-Panayotou M., Rodis P., Kapantai M.,** 1993, Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin, *Lettery in Applied Microbiology* 17, 145-148.
- Galiotou-Panayotou M., Kapantai M., Kalantzi O.,** 1997, Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production, *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 425-429.
- Garcia-Ochoa F., Gomez E.,** 2009, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview, *Biotechnology Advances* 27, 153–176.

- Garcia-Ochoa F., Gomez E., Santos V.E., Merchuk J.C.,** 2010, Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, *Biochemical Engineering Journal* 49, 289–307.
- Gehalt H., Herstellung K.,** 2010, Durum wheat pasta with high dietary bran content and process for the production thereof, European Patent Specification, EP 1 785 192 B1, Printed by Jouve, 75001 Paris (Fr).
- Gomez E., Santos V.E., Alcon A., Garcia-Ochoa F.,** 2006, Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: Effect on growth and BDS capability, *Chemical Engineering Science* 61 4595 – 4604.
- Gönen F., Aksu Z.,** 2009, Predictive expressions of growth and Remazol Turquoise Blue-G reactive dye bioaccumulation properties of *Candida utilis*, *Enzyme and Microbial Technology* 45, 15–21
- Gummadi S.N., Kumar D.S.,** 2006, The effect of microbiological parameters on production of pectin lyase and pectate lyase by *Debaryomyces nepalensis*: a statistical approach, *Research Journal of Microbiology* 1(3), 220-227.
- Gummadi S.N., Kumar S., Aneesh C.N.A.,** 2007, Effect of Salts on Growth and Pectinase Production by Halotolerant Yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413, *Current Microbiology* Vol. 54, 472–476.
- Gummadi S.N., Kumar D.S.,** 2008, Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor, *Bioresource Technology* 99, 874–881.
- Halkman A.K.,** 2005, Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara, 358 sayfa.
- Haykır I.,** 2007, Investigation of Bioprocess Parameters For Glucose Isomerase Production by *Bacillus thermoantarcticusthe*, Middle East Technical University, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Hoondal G.S., Tiwari R. P., Tewari R., Dahiya N., Beg, Q.K.,** 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review, *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 409–418.
- Hölker U., Höfer M., Lenz J.,** 2004, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Applied Microbiol Biotechnol*, 64, 175–186.
- Hutnan M., Drtil M., Mrafkova L.,** 2000, Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp, *Biodegradation* 11: 203–211.
- Ibrahim C.O.,** 2008, Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources, *Bioresource Technology* 99, 4572–4582.

- Jacob N., Prema P.,** 2006, Influence of Mode of Fermentation on Production of Polygalacturonase by a Novel Strain of *Streptomyces lydicus*, Food Technol. Biotechnol, 44 (2) 263–267.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R.,** 2005, Microbial pectinolytic enzymes: A review, Process Biochemistry 40, 2931–2944.
- Kampen, W.H.,** 1997. Nutritional requirements in fermentation processes, Fermentation and Biochemical Engineering Handbook Principles, Process Design and Equipment, 2nd Edition, Edited by Henry C. Vogel and Celeste L. Todaro, New Jersey.
- Kao P.-M., Chen C.-I., Huang S.-C., Chang Y.-C., Tsai P.-J., Liu Y.-C.,** 2007, Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1, Biochemical Engineering Journal 34, 172–178.
- Kapoor M., Beg Q.K., Bhushan B., Dadhich K.S., Hoondal G.S.,** 2000, Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2, Process Biochemistry 36, 467–473.
- Kapoor M., Kuhad R.C.,** 2002, Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation., Lett Appl Microbiol 34:317–322.
- Kargı F.,** 1993, Çevre Mühendisliğinde Biyoprosesler, D.E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları, No: 234, 57-83, İzmir.
- Kashyap D.R., Chandra S., Kaul A., Tewari R.,** 2000, Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7, World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 277-282.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R.,** 2001, Applications of pectinases in the commercial sector: a review, Bioresource Technology 77, 215-227.
- Kashyap D.R., Soni S.K., Tewari R.,** 2003, Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation, Bioresource Technology 88, 251–254.
- Kaushik R., Saran S., Isar J., Saxena R.K.,** 2006, Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 40, 121–126.
- Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C.,** 2002, Industrial enzyme applications, Current Opinion in Biotechnology 13, 345–351.
- Klug-Santner B.G., Schnitzhofer W., Vrsanska M., Weber J., Agrawal P.B., Nierstrasz V.A., Guebitz G.M.,** 2006, Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2, Journal of Biotechnology 121, 390–401.

- Kobayashi T., Koike K., Yoshimatsu T., Higaki N., Suzumatsu A., Ozawa T., Hatada Y., Ito S.**, 1999, Purification and Properties of a Low-molecular-weight, High-alkalina Pectate Lyase from an Alkaliphilic Strain of *Bacillus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1), 65-72.
- Kobayashi T., Higaki N., Suzumatsu A., Sawada K., Hagihara H., Kawai S., Ito S.**, 2001, Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*, *Enzyme and Microbial Technology* 29, 70–75.
- Koç B., Kaymak-Ertekin F.**, 2009, Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, Derleme,/Review, *Gıda* (3), 1-8.
- Korkmaz, N.**, 2007, Recombinant Therapeutic Protease Production By *Bacillus* sp., Middle East Technical University, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Krishna C.**, 2005, Solid-State Fermentation Systems—An Overview, *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1–30.
- Kulkarni, N.S., Deshpande, M.S.**, 2007, General Enzymology. Global Media, Mumbai, p 266.
- Lal P., Kumar S., Gummadi S.N.**, 2011, Use of Response Surface Methodology to Study the Combined Effect of Salt, pH, and Temperature on the Growth of Food-Spoiling Halotolerant Yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413, *Food Bioprocess Technol* 4:723–730.
- Lee B.-H., Kim B.-K., Lee Y.-J., Chung C.H., Lee J.-W.**, 2010, Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53, *Enzyme and Microbial Technology* 46, 38–42.
- Le Man H., Behera S.K., Park H.S.**, 2010, Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate, *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 7 (1), 157-164.
- Lowry, O., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.**, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Madruga M.S., Camara F.S.**, 2000, The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement, *Food Chemistry* 68, 41-44.
- Mahmood A.U., Greenman J., Scragg A.H.**, 1998, Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture, *Enzyme and Microbial Technology* 22: 130-137.
- Mahmoud D.A.R., Mahmoud A.A., Gomaa A.M.**, 2008, Antagonistic Activities of Potato Associated Bacteria via Their Production of Hydrolytic Enzymes with

Special Reference to Pectinases, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4(5): 575-584.

- Marques D. de A.V., Torres B.R., Porto A. L.F., Pessoa-Júnior A., Converti A.,** 2009, Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractivefermentation systems, Biochemical Engineering Journal 47, 122–126.
- Martins E.S., Silva D., Da Silva R., Gomes E.,** 2002, Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*, Process Biochemistry 37: 949–954.
- Membre J.M., Burlot P.M.,** 1994, Effects of Temperature, pH, and NaCl on Growth and Pectinolytic Activity of *Pseudomonas marginalis*, Applied and Environmental Microbiology June, p. 2017-2022.
- Mill P.J., Tuttobello R.,** 1961, The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger* 2. Endopolygalacturonase, Biochem. J. 79, 57-64.
- Miller G.L.,** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, Anal. Chem. 31, 426-428.
- Miller M., Litsky W.,** 1976. Industrial Microbiology, McGraw-Hill Book Company, 465p.
- Mitchell D.A., Stuart D.M., Tanner R.D.,** 1999, Solid State Fermentation, Microbial Growth Kinetics, Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Volumes 1-5, Editorial Board, Edited by Michael C. Flickinger and Stephen W. Drew, Wiley Biotechnology Encyclopedias, by John Wiley & Sons, Inc., Canada, 2407-2516.
- Montgomery D.C.,** 2009, Design And Analysis Of Experiments, Arizona State University, Seventh Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Murad H.A., Azzaz H.H.,** 2011, Microbial Pectinases and Ruminant Nutrition, Research Journal of Microbiology 6(3), 246-269.
- Muralidhar R.V., Chirumamila R.R., Marchant R., Nigam P.,** 2001, A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources Biochemical Engineering Journal 9, 17–23.
- Murthy M.S.R.C., Swaminathan T., Rakshit S.K., Kosugi Y.,** 2000, Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyl oleate by response surface methodology, Bioprocess Engineering 22, 35-39.
- Nabi N.G., Asgher M., Shah A.H. , Sheikh M.A., Asad M.J.,** 2003, Production of Pectinase by *Trichoderma harzianum* in Solid State Fermentation of Citrus Peel, Pak. J. Agri. Sci., Vol. 40(3-4), 193-201.

- Naik S.C., Kaul P., Barse B., Banerjee A., Banerjee U.C.,** 2008, Studies on the production of enantioselective nitrilase in a stirred tank bioreactor by *Pseudomonas putida* MTCC 5110, *Bioresource Technology* 99, 26–31.
- Nedjma M., Hoffmann N., Belarbi A.,** 2001, Selective and Sensitive Detection of Pectin Lyase Activity Using a Colorimetric Test: Application to the Screening of Microorganisms Possessing Pectin Lyase Activity, *Analytical Biochemistry* 291, 290–296.
- Ogawa J., Shimizu S.,** 2002, Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan, *Current Opinion in Biotechnology* 13, 367–375.
- Okafor N.,** 2007, *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Science Publishers, Clemson, South Carolina, Enfield, NH, USA, 551 p.
- Orhan R.,** 2009, Aşağı Doğru Birlikte Akışlı Temas Reaktöründe Farklı Sıvı Ortamları İçin Hidrodinamik Özelliklerin ve Kütle Transferinin İncelenmesi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Elazığ.
- Orman M.A.,** 2007, Extracellular Recombinant Human Growth Hormone Production By *Pichia Pastoris*, Middle East Technical University, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Ouattara H.G., Koffi B. L., Karou G. T., Sangare A., Niamke S.L., Diopoh J.K.,** 2008, Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation, *World J Microbiol Biotechnol* 24, 1753–1760.
- Ouattara H.G., Reverchon S., Niamke S. L., Nasser W.,** 2011, Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation, *Food Microbiology* 28, 1-8.
- Öncü Ş.,** 2007, Investigation of the effects of dissolved oxygen concentration, aeration and agitation on the morphology and rheology in submerged fungal fermentation, İzmir Institute of Technology, Master of Science in Food Engineering, İzmir.
- Özeş O.N.,** 1988, *Aspergillus niger*’ in poligalakturonaz sentezine etki eden fizyolojik parametrelerin saptanması ve enzimin bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D.,** 2000, New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products, *Process Biochemistry* 35, 1153–1169.
- Pandey, A.,** 2003. Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 13, 81-84.
- Pareek N., Singh R.P., Ghosh S.,** 2011, Optimization of medium composition for enhanced chitin deacetylase production by mutant *Penicillium oxalicum* SAEM-51

using response surface methodology under submerged fermentation, *Process Biochemistry* 46, 1693-1697.

Parisot J., Ghochikyan A., Langlois V., Sakanyan V., Rabiller C., 2002, Exopolysaccharide lyase from *Thermotoga maritima*: cloning, characterization and organic synthesis application, *Carbohydrate Research* 337, 1427–1433.

Patil S.R., Dayanand A., 2006, Exploration of Regional Agrowastes for the Production of Pectinase by *A. niger*, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2), 289–292.

Pekin, B., 1980, *Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)*, Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayınları, No. 3, İzmir.

Piccoli-Valle, R.H., Passos F. M.L., Passos F.J.V., Silva, D.O., 2001, Production of Pectin Lyase by *Penicillium griseoroseum* in Bioreactors in the Absence of Inducer, *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 135-140.

Potumarthi R., Subhakar C., Jetty A., 2007, Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes, *Biochemical Engineering Journal* 34, 185–192.

Prathyusha K., Suneetha V., 2011, Bacterial Pectinases and Their Potent Biotechnological Application in Fruit Processing/Juice Production Industry: A Review, *Journal of Phytology* 3(6), 16-19.

Ramachandran S., 2005, Isolation, purification and Characterization of Pectinase from *Penicillium citrinum*, Doctoral Thesis, School of Biosciences Mahatma Gandhi University Kottayam, Kerala India.

Rao, D.G., 2010., *Introduction to Biochemical Engineering*, Second edition, Tata McGraw Hill Education, New Delhi.

Raimbault, M., 1998, General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 1, No. 3, 174-188.

Rastogi N.K., Rashmi K.R., 1999, Optimisation of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology, *Eur Food Res Technol* 209, 57–62.

Reid I., Ricard M., 2000, Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide, *Enzyme and Microbial Technology* 26, 115–123.

Sabu A., Nampoothiri K.M., Pandey A., 2005, L-Glutaminase as a Therapeutic enzyme of microbial origin, *Methods in Biotechnology*, Vol. 17: Microbial enzymes and biotransformations, Edited by Jose-Luis Barredo, Humana Press, 7-90, 319 p., Totowa, New Jersey, USA.

Sanchez S., Demain A.L., 2002, Metabolic regulation of fermentation processes, *Enzyme and Microbial Technology* 31, 895-906.

- Sanchez S., Demain A.L.,** 2011, Enzymes and Bioconversions of industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance, Organic Process Research&Development 15, 224-230.
- Shenoy A.H., Prakash J.,** 2002, Wheat Bran (*Triticum aestivum*): Composition, Functionality and Incorporation in Unleavened Bread, Journal of Food Quality 25, 197-211.
- Shevchik V.E., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N.,** 1997, Pectate Lyase Peli of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Belongs to a New Family, Journal of Bacteriology, Dec., p. 7321–7330.
- Shubakov A.A., Elkina E.A.,** 2002, Thematic Division, Chemistry and Technology of Plant Substances, Biotechnology of pectinolytic enzymes as instruments for structural research of plant polysaccharides. Part I. Production of Polygalacturonases by Filamentous Fungi *Aspergillus niger* AcM F-1119 and *Penicillium Dierckxii* AcM F-152, Chemistry and Computational Simulation Butlerov Communications Vol.2. No.7, 65-68.
- Shuler, M.L., Kargi, F.,** 2002, Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd Ed., Prentice Hall Inc., USA.
- Silva D., Martins E.S., Silva R., Gomes E.,** 2002, Pectinase Production By *Penicillium viridicatum* Rfc3 By Solid State Fermentation Using Agricultural Wastes And Agro-Industrial By-Products, Brazilian Journal of Microbiology 33:318-324.
- Silva D., Tokuioshi K., Martins S.E., Silva R., Gomes E.,** 2005, Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3, Process Biochemistry 40, 2885–2889.
- Soetaert W., Vandamme E.,** 2006, The impact of industrial biotechnology, Biotechnology Journal 1, 756–769.
- Songpim M., Vaithanomsat P., Chuntranuluck S.,** 2010, Optimization of Pectate Lyase Production from *Paenibacillus polymyxa* N10 using Response Surface Methodology, The Open Biology Journal 3, 1-7.
- Stutzenberger F.J.,** 1987, Inducible Thermoalkalophilic Polygalacturonate Lyase from Thermomonospora Fusca, Journal Of Bacteriology, June, P. 2774-2780.
- Swain M.R., Ray R.C.,** 2010, Production, Characterization and Application of a Thermostable Exopolygalacturonase by *Bacillus subtilis* CM5, Food Biotechnology, 24:37–50.
- Şen Z.,** 2002, İstatistik Veri İşleme Yöntemleri (Hidroloji ve Meteoroloji), Su Vakfı Yayınları, İstanbul.

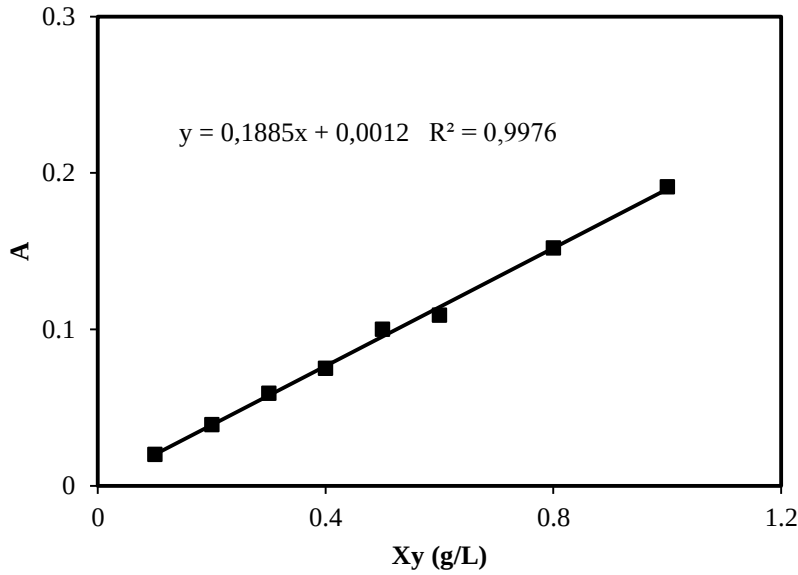
- Tanyıldızı M.S.**, 2005, Çeşitli bakteri türleriyle farklı ortam ve çalışma şartlarında α -amilaz üretiminin incelenmesi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Elazığ.
- Tanyıldızı M.S., Özer D., Elibol M.**, 2005, Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology, Process Biochemistry 40, 2291–2296.
- Tanyıldızı M.Ş., Selen V., Özer D.**, 2009, Optimization of amylase production in solid substrate fermentation, The Canadian Journal of Chemical Engineering, Volume 87, 493-498.
- Tanyol M.**, 2011, *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641) Bakterisi Kullanılarak Lipaz Üretimi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 161 sayfa, Elazığ.
- Tatar S.**, 2007, Termofil Moderately Halofilik *Bacillus* Sp. Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 109 sayfa, Adana.
- Telefoncu A.**, 1986, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Tubitak, İzmir.
- Tomizawa H., Izaki K., Takahashi H.**, 1970, Stimulation of Pectolytic Enzyme Formation of *Erwinia aroideae* by an Active Factor in Carrot Extracts Part II. Partial Purification of the Factor and the Stimulating Effect of Some Other Compounds, Agr. Biol. Chem., Vol. 34, No. 7, p. 1064-1070.
- Tuttobello R., Mill P.J.**, 1961, The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger* 1. The Production Of Active Mixtures of Pectic Enzymes, Biochem. J. Vol.79, 51-57.
- Türker M.**, 2005, Biyoreaksiyon Mühendisliği Biyolojik Proseslerin Kinetiği ve Modellenmesi, Su vakfı yayınları, Kocaeli.
- Ulgen, K., Mavituna, F.**, 1998, Oxygen Transfer and Uptake in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Culture in a Batch Bioreactor, J. Chem. Technol. Biotechnol. 73, 243-250.
- Underkofler L.A., Barton R.R., Rennert S.S.**, 1958, Production of Microbial Enzymes and Their Applications, Microbiological Process Report, Vol. 6, 212-221.
- Venugopal C., Jayachandra T., Anu Appaiah K.A.**, 2007, Effect of Aeration on the Production of Endo-Pectinase from Coffee Pulp by a Novel Thermophilic Fungi *Mycotypha* sp. Strain No. AKM 1801, Biotechnology 6 (2), 245-250.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., Romero-Gomez S.J., Diaz-Godínez G., Augur C.**, 2003, Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, Biochemical Engineering Journal 13, 157–167.

- Wang Q., Fan X., Hua Z., Gao W., Chen J.,** 2007, Degradation kinetics of pectins by an alkaline pectinase in bioscouring of cotton fabrics, *Carbohydrate Polymers* 67, 572–575.
- Ward O.P., Fogarty W.M.,** 1974, Polygalacturonate Lyase Production by *Bacillus subtilis* and *Flavobacterium pectinovorum*, *Applied Microbiology*, Feb., 346-350.
- Willants W.G., Mc Cartney L., Mackie W., Knox J.P.,** 2001, Pectin: cell biology and structural prospects for functional analysis, *Plant Molecular Biology* 47 (1-2), 9-27.
- Yadav S., Yadav P.K., Yadav D., Yadav K.D.S.,** 2009, Pectin lyase: A review, *Process Biochemistry* 44, 1–10.
- Zhou W.-W., He Y.-L., Niu T.-G., Zhong J.-J.,** 2010, Optimization of fermentation conditions for production of anti-TMV extracellular ribonuclease by *Bacillus cereus* using response surface methodology, *Bioprocess Biosyst Eng* 33, 657-663.
- Yılmaz Ö.D.,** 2008, Metabolik Mühendislik Ve Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Hücre Dışı Rekombinant İnsan Büyüme hormonu Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara.
- URL 1.** www.dcu.ie/~oshead/BE401/lectures/pres4381fa94a4194.pdf, 10.10.2011, Weir E., McSpadden C., Production of Industrial Enzymes in Fermentation.

10. EKLER

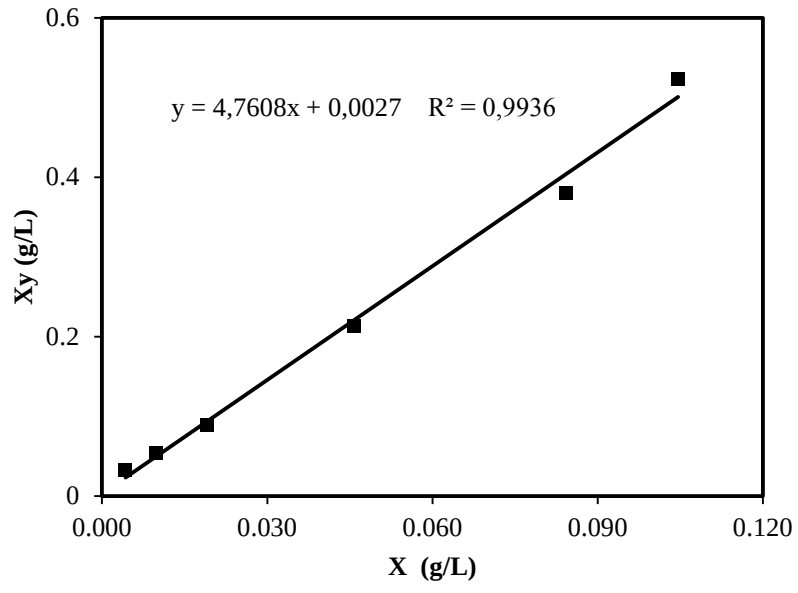
EK 1. Mikroorganizma Derişimi Tayini

Mikroorganizma derişimi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bunun için öncelikle, 1 g/L ye kadar farklı derişimlerde hazırlanan mikroorganizma çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 400 nm’ de absorbanslarının okunmasıyla yaş mikroorganizma çalışma doğrusu oluşturulmuştur (Ek Şekil 1.1.). Verilerin değerlendirilmesinde kuru mikroorganizma ağırlığı kullanıldığından, yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere mikroorganizma, sıvı ortamda üretilip santrifüjlenerek ayrılmış, ayrılan mikroorganizmalar değişik ağırlıklarda tartılarak, 50 °C’ deki etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları saptanmıştır. Kuru ağırlığa karşı yaş mikroorganizma ağırlığı grafiğe geçirilerek *Bacillus pumilus* bakterisi için kuru mikroorganizma çalışma doğrusu elde edilmiştir (Ek Şekil 1.2.).



Ek Şekil 1.1. Yaş mikroorganizma çalışma doğrusu

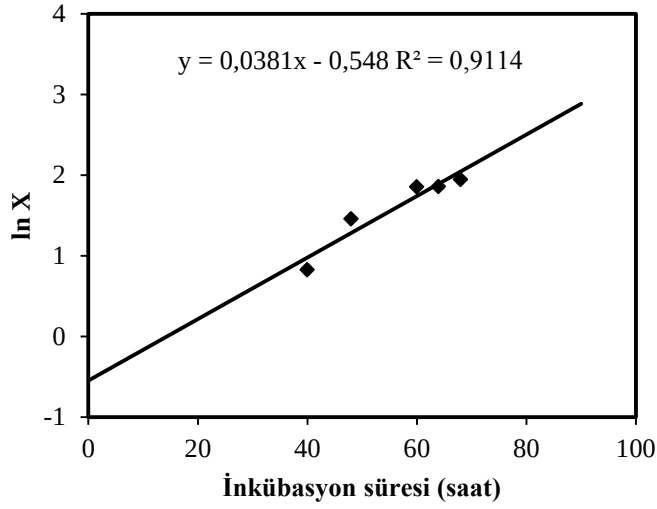
Analiz için, fermentasyon ortamından alınan 5 mL örnek 5000 devirde 5 dakika santrifüjlenmiş, tüpte kalan mikroorganizma kütlesi su ile tekrar 5 mL ye seyreltilerek 400 nm’ de suya karşı absorbans okunmuş ve çalışma doğruları kullanılarak kuru mikroorganizma ağırlığı saptanmıştır.



Ek Şekil 1.2. Yaş ağırlık-kuru ağırlık çalışma doğrusu

EK 2. Kesikli Karıştırmalı Kaptaki Mikroorganizma Özgöl Üreme Hızının Hesaplanması

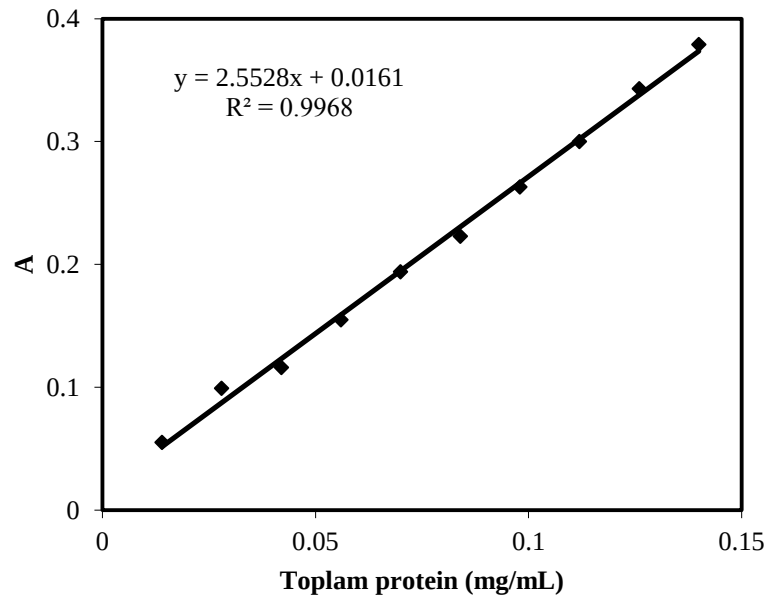
Üstel üreme bölgesinde mikroorganizmanın özgöl üreme hızı Eşitlik 5.2.' den hesaplanmıştır. Bu amaçla $\ln X'$ e karşı t grafiğı çizilmiş ve üstel üreme bölgesindeki en uygun noktalardan geçen doğrunun eğimi hesaplanarak μ değeri bulunmuştur. Örnek olarak, Ek Şekil 2.1.' de % 1 pektin ve % 0.05 amonyum sülfat içeren besin ortamında elde edilen $\ln X'$ e karşı t grafiğinden $\mu = 0.0381 \text{ sa}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Ek Şekil 2.1. % 1 pektin konsantrasyonunda $\ln X'$ in zamanla değışimi (pH= 8, T= 30 °C, KH= 150 rpm)

EK 3. Toplam Protein Konsantrasyonu Kalibrasyon Doğrusu

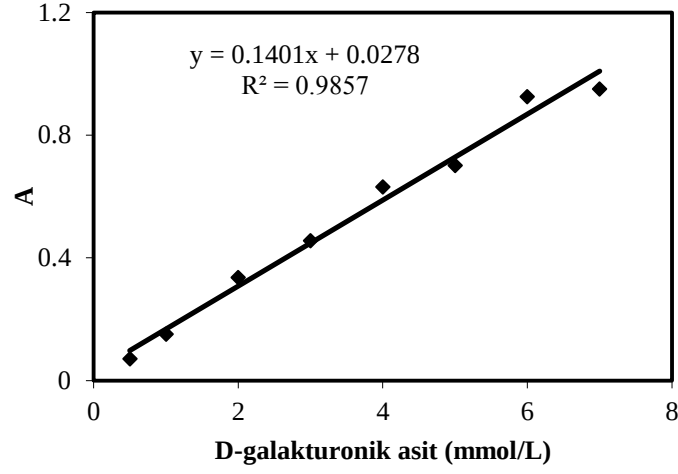
Bovine serum albuminin (BSA) distile suda hazırlanan 1 mg/mL' lik standart stok çözeltisinden belli konsantrasyonlarda hazırlanan protein çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 660 nm' de absorbanslarının okunmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiği Ek Şekil 3.1.' de verilmiştir.



Ek Şekil 3.1. Toplam protein kalibrasyon grafiği

EK 4. Galakturonik Asit İçin Kalibrasyon Doğrusu

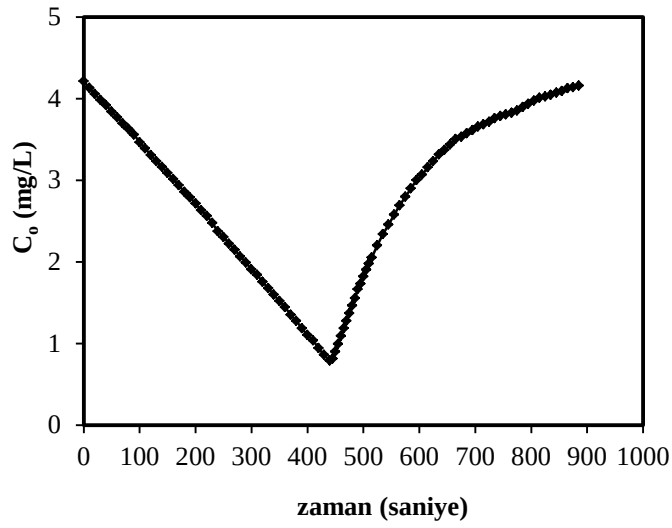
50 mmol/L' lik galakturonik asit çözeltisinden belli konsantrasyonlarda hazırlanan galakturonik asit çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 530 nm' de absorbanslarının okunmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiği Ek Şekil 4.1.' de verilmiştir.



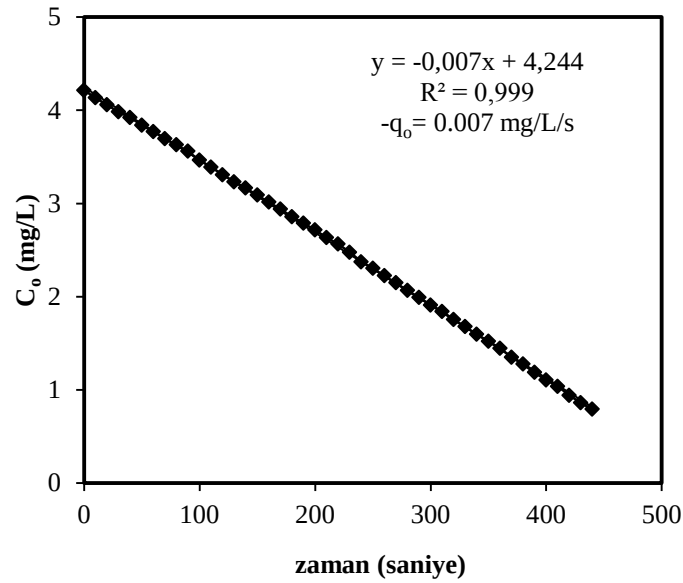
Ek Şekil 4.1. Galakturonik asit kalibrasyon grafiği

EK 5. Sıvı Faz Hacimsel Kütle Aktarım Katsayısı ve Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının Dinamik Metot ile Belirlenmesi

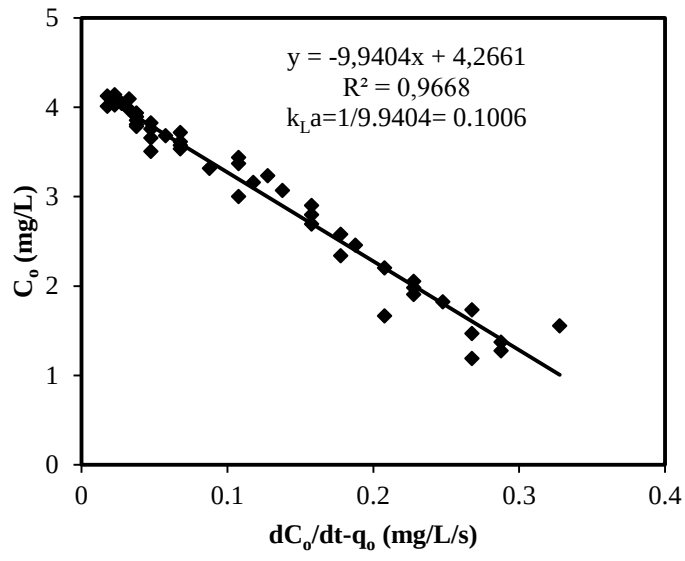
Biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi sonucunda çözünmüş oksijen konsantrasyonunda azalmanın gözlemlendiği (t , C_o) grafiğinde, azalan doğrusal ilişkiden q_o değeri bulunmuştur. $\{(dC_o/dt-q_o); C_o\}$ grafiği çizilerek buradaki eğimden $(-1/k_L a)$ değeri bulunmuş ve $k_L a$ değeri hesaplanmıştır. Aşağıda 0.1 vvm hava giriş hızı ve 300 rpm karıştırma hızı için 16.saatteki q_o ve $k_L a$ değerlerinin hesabı gösterilmiştir.



Ek Şekil 5.1. Çözünmüş oksijen derişiminin zamanla değişimi



Ek Şekil 5.2. Mikroorganizma oksijen tüketim hızı eğrisi



Ek Şekil 5.3. Sıvı faz hacimsel kütle aktarım katsayısının (k_La) belirlenmesi

Ek 6. Buğday Kepeğinin Kimyasal Bileşimi (Madruga ve Camara, 2000; Shenoy ve Prakash, 2002; Gehalt ve Herstellung, 2010).

Bileşen (100 g)	
Nem (g)	2.17
Protein (g)	15.0-18.0
Yağ (g)	4.08-5.35
Karbonhidrat (g)	28.1
Toplam kül (g)	4.99-5.02
Çözünmez fiber (g)	52.8
Çözünür fiber (g)	2.8
Demir (mg)	13.0-15.0
Fosfor (mg)	560-1134
Kalsiyum (mg)	78.3-90.31
Potasyum (mg)	1018
Magnezyum (mg)	396-400
Çinko (mg)	8.32
E Vitamini (tocopherol) (mg)	3.0
B1 Vitamini (Thiamin) (mg)	1.0
B2 Vitamini (Riboflavin) (mg)	0.5
B6 Vitamini (Pyridoksin) (mg)	0.3
Niacin (mg)	20
Pantothenic Asit (mg)	1.0
Folik asit (µg)	60
Phytik Asit (mg)	45

Ek 7. Şeker Pancarı Küspesinin Kimyasal Bileşimi (Dinand vd.,1999; Hutnan vd.,2000).

Bileşen (% Kuru ağırlık)	
Protein	7-11.3
Lignin	2
Yağ	2
Kül	3.6-5
Glukoz	20-21.1
Mannoz	1-1.1
Galakturonik asit	21.1
Ksiloz	1-1.7
Arabinoz	20-20.9
Rhamnoz	1-2.4
Üronik asit	18
Galaktoz	4-5.1
Metanol	1.8
Asetik asit	3.9
Ferulik asit	0.8
Diferulik asit	0.04

Ek 8. Musluk Suyunun Mineral İçeriği

Mineraller	ppm
Kalsiyum	67.9
Fosfor	-
Potasyum	1.28
Klor	18
Magnezyum	% 0.29
Kükürt	% 0.6
Sodyum	26.1
Demir	-
Çinko	18 ppm
Mangan	-
pH	6.94

ÖZGEÇMİŞ

1977 tarihinde Elazığ’ da doğdum. İlk ve orta ve lise eğitimimi Elazığ’ da tamamladım. Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünden 1998 yılında mezun oldum. 2002 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2005 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladım.