

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARİNAL BAKTERİ *TEREDINOBACTER TURNIRAE*' DEN
PROTEAZ ÜRETİMİ

Şule BULUT

DOKTORA TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Dursun ÖZER

2007

ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARİNAL BAKTERİ *TEREDINOBACTER TURNIRAE*' DEN
PROTEAZ ÜRETİMİ

Şule BULUT

DOKTORA TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez , ... tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Dursun ÖZER

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZER

Üye : Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL

Üye : Doç. Dr. Cevdet AKOSMAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Arzu YADİGAR DURSUN

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Doktora Tezi

MARİNAL BAKTERİ *TEREDINOBACTER TURNIRAE*'DEN PROTEAZ ÜRETİMİ

Şule BULUT

Fırat üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

2007, Sayfa: 176

Marinal bakteri *Teredinobacter turnirae*'den ekstraselular alkali proteaz enzim üretimi hem sentetik hem de kompleks ortamda çalışılmıştır. Araştırmada proteaz enzim miktarının artırılması amaçlanmıştır. Deneyler, erlenlerde ve 1-L hacmindeki biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, karbon kaynağı, indükleyici, karıştırma hızı ve hava giriş hızı gibi bazı fermentasyon şartlarının, proteaz üretimi üzerine etkisi sentetik ortamda kesikli sistemde incelenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi Placket-Burman ortamında (PB), Standart ortama (SM) göre daha yüksek belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, farklı besleme stratejileri ile yarı kesikli sistemde *T. turnirae*'den proteaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Proteaz üretimi üzerine, belirli aralıklarla beslemeli (pulse) ve sabit hızla beslemeli gibi farklı yarı kesikli sistem metotlarının etkisi belirlenmiştir. Kesikli sisteme göre, yarı kesikli sistemde proteaz üretiminin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Biyoreaktörde kesikli sistemde fermentasyon ortamında kütle aktarım parametreleri araştırılmıştır. Karıştırma ve hava giriş hızı arttıkça hacimsel kütle transfer katsayısı, $k_L a$ ve oksijen tüketim hızı, r_o değerinin de arttığı görülmüştür.

Katı substrat fermentasyonu ile marinal bakteri *T. turnirae*'den proteaz üretimi optimize edilmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak mısır proteini, soya unu ve kazein kullanılmıştır. Erlenlerde yapılan çalışmalarda, en uygun partikül boyutu, substrat konsantrasyonu, başlangıç pH'sı, inokulum oranı, karıştırma hızı, ilave karbon kaynağı ve ortam sıcaklığı belirlenmiştir. Aynı zamanda, 1 L'lik biyoreaktörde kompleks ortamda, karıştırma ve hava giriş hızının etkisi incelenmiştir.

Kesikli sistemde, *T. turnirae*'den proteaz fermentasyon kinetiği incelenmiştir. Bu çalışmada literatürde mevcut çeşitli kinetik modeller ile Yapay Sinir Ağ (YSA) ile oluşturulan model kıyaslanmıştır. Kinetik parametrelerin değerleri Genetik Algoritma Toolbox'ı ile optimizasyon yapılarak belirlenmiştir. Mikrobiyal büyüme, proteaz üretimi ve sakkaroz tüketimine ait deneysel sonuçlar ile modellerden elde edilen sonuçlar kıyaslanmış ve YSA modelinin sistemin davranışını daha iyi tanımladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Serin alkali proteaz, *Teredinobacter turnirae*, Katı-substrat fermentasyonu, Proses şartları, Kesikli fermentasyon, Yarı kesikli fermentasyon, Kinetik model, Genetik algoritma, Yapay sinir ağı.

ABSTRACT

PhD Thesis

PROTEASE PRODUCTION BY A MARINE BACTERIUM *TEREDINOBACTER TURNIRAE*

Şule BULUT

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemical Engineering

2007, Page 176

The production of extracellular alkaline protease by a shipworm bacterium *Teredinobacter turnirae* was studied in both defined and complex media. The research focused on the improvement of protease level. Investigations were carried out in shake-flask as well as 1-L bioreactor.

In the first part of the study, some fermentation conditions such as carbon source, inducer, agitation rate and air rate on protease production were performed with batch culture in defined medium. The maximum enzyme activity value obtained in Plackett-Burman media (PB) was higher than that obtained in Standard media (SM). The second part of the work, the protease production by *T. turnirae* fermentation using different fed-batch feeding strategies was studied. The effects of different fed-batch methods such as pulse fed-batch and constant feed rate fed-batch on protease production were determined. Compared with batch culture, the fed-batch culture had better protease production. Mass transfer characteristics of fermentation broth in batch bioreactor were investigated. Increases in both the agitation rate and the air feed rate increased volumetric mass transfer coefficients, k_La and oxygen uptake rates, r_o values.

Production of protease by a shipworm bacterium *T. turnirae*, under solid substrate fermentation (SSF) was optimised. Corn protein, soybean flour and casein were used as a sole carbon and nitrogen sources. The appropriate particle size, substrate concentration, initial pH, inoculum level, agitation rate, supplementation of additional carbon sources and medium temperature was determined in shake-flask. Concurrently, the effects of agitation speed and air rate were investigated in a 1-L bioreactor with the complex medium.

The fermentation kinetics of protease by *T. turnirae* were studied in a batch system. This study focuses on comparing different kinetic models in literature and the use of neural networks model. Various kinetic parameters were obtained for protease fermentation optimising with Genetic Algorithm Toolbox. The experimental results of growth, protease production and sucrose consumption are compared model results, and neural networks model appeared to provide a reasonable description.

Key Words : Alkaline protease, *Teredinobacter turnirae*, Solid substrate fermentation, Process conditions, Batch fermentation, Fed-Batch fermentation, Kinetic modelling, Genetic Algorithm, Neural network modelling.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında yakın ilgilerini ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Dursun ÖZER ve Prof. Dr. Murat ELİBOL' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. M. Şaban TANYILDIZI, Arş. Gör. Veyis SELEN ve Arş. Gör. Oğuz YAKUT' a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında en büyük desteği gördüğüm sevgili aileme teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan FÜBAP'a ve sağlanan uygun çalışma koşulları nedeniyle Kimya Mühendisliği Bölümü'ne şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	I
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIV
TABLolar LİSTESİ	XIX
SİMGELER	XX
1. ENZİMLER	1
1.1. Genel	1
1.2. Enzimlerin Yapısı	2
1.3. Enzim Kaynakları	3
1.4. Enzimlerin Sınıflandırması ve Adlandırılması	5
1.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Parametreler	8
1.5.1. pH'nın Etkisi	8
1.5.2. Sıcaklığın Etkisi	9
1.5.3. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	9
1.5.4. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi	9
1.5.5. Radyasyon	10
1.5.6. Kimyasal denatürasyon bileşikleri	10
1.5.7. Biyolojik etkenler	10
1.6. Enzim Etkin Bölgesi ve Enzim-Substrat Etkileşimi	10
1.7. Enzimatik Tepkimelerin Kinetiği	12
1.7.1. Tek Etkin Bölgesi Enzimler İçin Türetilen Henry-Michaelis Menten ve Briggs-Haldene Eşitliği	12
2. PROTEAZLAR	14
2.1. Genel	14
2.2. Proteazların Kullanım Alanları	15
2.2.1. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı	15
2.2.2. Deri Endüstrisi	15
2.2.3. X Işını Filmlerinden Gümüşün Geri Kazanımı	15
2.2.4. Tıp Alanında Kullanımı	16
2.2.5. Gıda Endüstrisi	16
2.2.6. Atık Arıtım Endüstrisi	16

2.2.7. Kimya Endüstrisi	16
2.3. Proteazların Sınıflandırılması	17
2.3.1. Serin Proteazlar	17
2.3.2. Sistein (tiyol) proteazlar	18
2.3.3. Aspartik (karboksil) proteazlar	18
2.3.4. Metalloproteazlar (nötral proteazlar)	18
2.4. Uygun Mikroorganizmanın Belirlenmesi	19
2.4.1. Serin Alkali Proteaz Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	20
2.5. Enzim Üretimi İçin Uygun Ortam Bileşimi	20
2.6. Proteaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	23
2.7. Endüstriyel Proteaz Üretim Prosesi	24
 3. BİYOPROSES İŞLETİM PARAMETRELERİ	 26
3.1. Biyoteknolojik Proseslerde Üretimi Etkileyen Biyoproses Parametreleri	26
3.1.1. Mikroorganizma seçimi	26
3.1.2. Ortam tasarımı: Bileşenler ve bileşimleri	27
3.1.2.1. Karbon kaynakları	28
3.1.2.2. Azot kaynakları	28
3.1.2.3. Eser elementler	28
3.1.2.4. Diğer bileşikler	29
3.1.3. Biyoreaktör işletim türü	29
3.1.3.1. Daldırmalı Kültür Tekniği	29
3.1.3.2. Yüzey Kültür Tekniği (Katı Hal Fermantasyonu)	31
3.1.4. Biyoreaktör işletim parametreleri	33
3.1.4.1. pH	33
3.1.4.2. Sıcaklık	33
3.1.4.3. Oksijen aktarımı	34
 4. REAKSİYON KİNETİĞİNİN MODELLENMESİ	 37
4.1. Giriş	37
4.2. Kesikli kültürde fermantasyon kinetiği	38
4.2.1. Balans ve hız denklemleri	38
4.2.2. Mikrobiyal büyüme	39
4.2.2.1. Üreme hızına etki eden faktörler	41
4.2.3. Substrat tüketimi	47
4.2.4. Ürün oluşumu	48

4.2.5. Kinetik parametrelerin hesaplanması	49
4.2.5.1. μ_m ve K_S 'in hesaplanması	49
4.2.5.2. $Y_{X/S}$ ve m 'in hesaplanması	49
4.2.5.3. Ürün oluşum parametreleri α ve β 'in hesaplanması	50
5. MATERYAL VE METOD	51
5.1. Mikroorganizma	51
5.2. Mikroorganizma büyüme ortamı ve şartları	52
5.3. Biyoproses ortamı	55
5.4. Biyoreaktör işletim şartları	55
5.5. Analitik yöntemler	56
5.5.1. Mikroorganizma derişimi	56
5.5.2. Proteaz aktivitesi	57
5.5.3. DNS yöntemi ile indirgenmiş şeker derişimi	57
5.5.4. Sakkaroz derişimi	57
5.5.5. Protein derişimi	58
5.5.6. Sıvı faz kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı	59
5.6. İstatistiksel Testler	59
6. SONUÇLAR VE TARTIşMA	61
6.1. PB Ortamında Küme Halindeki (Aggregated) Hücrelerle Proteaz Üretimi	61
6.1.1. Karbon Kaynağının etkisi	62
6.1.2. İndükleyici Etkisi	64
6.1.3. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	66
6.1.3.1. Karbon Kaynağı Etkisi	66
6.1.3.2. Karıştırma Hızı Etkisi	68
6.1.3.3. Hava Giriş Hızı Etkisi	70
6.1.3.4. Oksijen Aktarım Parametreleri	71
6.1.3.5. Kazein İlavesinin Etkisi	73
6.1.4. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Sakkaroz İlavesi ile Proteaz Üretimi	74
6.1.4.1. Sürekli Beslemeli Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	75
6.1.4.2. Belirli Aralıklarla Beslemeli (Pulse) Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	76
6.1.5. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Kazein İlavesi ile Proteaz Üretimi	79
6.2. SM Ortamında Rod Halindeki Hücrelerle Proteaz Üretimi	80
6.2.1. Karbon Kaynağının Etkisi	80

6.2.2. İndükleyici Etkisi	82
6.2.3. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	83
6.2.3.1. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	83
6.2.3.2. Kazein İlavesinin Etkisi	85
6.2.4. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Sakkaroz İlavesi ile Proteaz Üretimi	86
6.2.4.1. Sürekli Beslemeli Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	86
6.2.4.2. Belirli Aralıklarla Beslemeli (Pulse) Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	87
6.2.5. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Kazein İlavesi ile Proteaz Üretimi	89
6.3. Doğal Ortamda Yapılan Deneyler	91
6.3.1. Substrat Olarak Mısır Proteininin Kullanıldığı Deneyler	91
6.3.1.1. Ortam Seçimi	91
6.3.1.2. Tanecik Boyutunun Etkisi	92
6.3.1.3. Mısır Proteini Konsantrasyonunun Etkisi	93
6.3.1.4. Başlangıç pH'sının Etkisi	94
6.3.1.5. Başlangıç İnokulum Miktarının Etkisi	96
6.3.1.6. Çalkalama Hızının Etkisi	96
6.3.1.7. Sıcaklığın Etkisi	98
6.3.1.8. İlave Karbon Kaynağı Etkisi	99
6.3.1.9. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	100
6.3.1.9.1. Karıştırma Hızı Etkisi	101
6.3.1.9.2. Hava Giriş Hızı Etkisi	101
6.3.2. Substrat Olarak Soya Unu'nun Kullanıldığı Deneyler	103
6.3.2.1. Ortam Seçimi	103
6.3.2.2. Soya Unu Konsantrasyonunun Etkisi	104
6.3.2.3. Başlangıç pH'sının Etkisi	105
6.3.2.4. Başlangıç İnokulum Miktarının Etkisi	105
6.3.2.5. Çalkalama Hızının Etkisi	108
6.3.2.6. Sıcaklığın Etkisi	109
6.3.2.7. İlave Karbon Kaynağı Etkisi	110
6.3.2.8. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	111
6.3.2.8.1. Karıştırma Hızı Etkisi	111
6.3.2.8.2. Hava Giriş Hızı Etkisi	111
6.3.3. Substrat Olarak Kazein'in Kullanıldığı Deneyler	113
6.3.3.1. Ortam Seçimi	113
6.3.3.2. Kazein Konsantrasyonunun Etkisi	114

6.3.3.3. Başlangıç pH'sının Etkisi	115
6.3.3.4. Başlangıç İnokulum Miktarının Etkisi	117
6.3.3.5. Çalkalama Hızının Etkisi	117
6.3.3.6. Sıcaklığın Etkisi	117
6.3.3.7. İlave Karbon Kaynağı Etkisi	119
6.3.3.8. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi	121
6.3.2.8.2. Hava Giriş Hızı Etkisi	121
6.3.3.8.1. Karıştırma Hızı Etkisi	123
 7. BİYOPROSESİN MATEMATİKSEL MODELLENMESİ	 124
7.1. GENETİK ALGORİTMA	124
7.1.2. Genetik Algoritmanın Tarihçesi	126
7.1.3. Genetik algoritmanın tanımı	126
7.1.4. Genetik Algoritma Sürecinde Kullanılan İşlemler	127
7.1.4.1. Kodlama yöntemleri	127
7.1.4.2. Uygunluk teknikleri	128
7.1.4.3. Tekrar Üretme	129
7.1.4.4 Çaprazlama	130
7.1.4.5. Mutasyon	131
7.1.4.6. Yerine Geçme Yöntemleri	131
7.1.5. Genetik Algoritmaların Çalışma Prensipleri	132
7.1.6. Uygulama Alanları	132
7.2. YAPAY SİNİR AĞLARI	134
7.2.1. Biyolojik Sinir Sistemi	134
7.2.2. Yapay Sinir Ağı (YSA)	136
7.2.2.1 Yapay Sinir Ağlarının Özellikleri	136
7.2.2.2 YSA' nın Uygulama Alanları	138
7.2.3. Yapay Sinir Ağlarında Öğrenme	138
7.2.3.1 Öğrenme Yöntemleri	139
7.2.4 Yapay Sinir Ağı Yapıları	141
7.2.4.1 İleri Beslemeli Yapay Sinir Ağları (İBYSA)	141
7.2.4.2 Geri Beslemeli Yapay Sinir Ağları (GBYSA)	142
7.2.4.3 Bellek Hücreli YSA Yapıları (BHYS)	144
7.3. GENETİK ALGORİTMA VE YSA KULLANILARAK BİYOPROSESİN MODELLENMESİ	 146

8. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER	164
9. KAYNAKLAR	168
EKLER	177

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Anahtar ve kilit modeli	11
Şekil 1.2. Uyarılmış biçimleme modeli	12
Şekil 3.1. Sıcaklığın fonksiyonu olarak spesifik büyüme hızı	34
Şekil 3.2. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi	35
Şekil 3.3. Sıvı faz kütle aktarım katsayısının belirlenmesi	36
Şekil 4.1. Kesikli fermentasyonda büyüme eğrisi	40
Şekil 4.2. Üreme hızının substrat derişimine bağlılığı	43
Şekil 4.3. Kesikli fermentasyon proses kinetiklerinin genel modelleri	48
Şekil 4.4. Luedeking-Piret modeli kullanılarak ürün oluşum parametrelerinin bulunması	50
Şekil 5.1. Mikroorganizmanın izole edildiği Deshayes salgı bezi.	52
Şekil 5.2. Deneylerin yapılışında takip edilen yöntem.	54
Şekil 5.3. Biyoreaktör Düzenegi	56
Şekil 6.1. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	63
Şekil 6.2. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	64
Şekil 6.3. Farklı kazein konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi	65
Şekil 6.4. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	67
Şekil 6.5. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	68
Şekil 6.6. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	69
Şekil 6.7. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	70
Şekil 6.8. Biyoreaktörde kesikli sistemde kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi	74
Şekil 6.9. Biyoreaktörde sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	76

Şekil 6.10. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass ve toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi	77
Şekil 6.11. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi	78
Şekil 6.12. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistem ile kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi	79
Şekil 6.13. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	81
Şekil 6.14. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	82
Şekil 6.15. Farklı kazein konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi	83
Şekil 6.16. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	84
Şekil 6.17. Biyoreaktörde kesikli sistem ile kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi	85
Şekil 6.18. Biyoreaktörde sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi	87
Şekil 6.19. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass ve toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi	88
Şekil 6.20. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi	89
Şekil 6.21. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistem ile kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi	90
Şekil 6.22. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	92
Şekil 6.23. Farklı mısır proteini boyutlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	93
Şekil 6.24. Farklı mısır proteini konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	94
Şekil. 6.25. Farklı başlangıç pH değerlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	95
Şekil 6.26. Farklı başlangıç inokulum miktarlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	97
Şekil 6.27. Farklı çalkalama hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	98

Şekil 6.28. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	99
Şekil 6.29. Farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim aktivitesi ve ortam pH'sı üzerine etkisi	100
Şekil 6.30. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	102
Şekil 6.31. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	103
Şekil 6.32. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	104
Şekil 6.33. Farklı soya unu konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	105
Şekil 6.34. Farlı başlangıç pH değerlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	106
Şekil 6.35. Farklı başlangıç inokulum miktarlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	107
Şekil 6.36. Farklı çalkalama hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	108
Şekil 6.37. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	109
Şekil 6.38. Farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim aktivitesi ve ortam pH'sı üzerine etkisi	110
Şekil 6.39. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	112
Şekil 6.40. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	113
Şekil 6.41. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	114
Şekil 6.42. Farklı kazein konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	115
Şekil 6.43. Farlı başlangıç pH değerlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	116
Şekil 6.44. Farklı başlangıç inokulum miktarlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	118
Şekil 6.45. Farklı çalkalama hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	119
Şekil 6.46. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	120
Şekil 6.47. Farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim aktivitesi ve ortam pH'sı üzerine etkisi	121

Şekil 6.48. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	122
Şekil 6.49. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi	123
Şekil 7.1. 15 bit uzunluğunda bir bireyin hazırlanışı	128
Şekil 7.2. Tek Noktalı Çaprazlama	131
Şekil 7.3. Üç Noktalı Çaprazlama	131
Şekil 7.4. Eski kromozomun 4. Bitine Uygulanan Bit Mutasyonu.	131
Şekil 7.5. Genetik Algoritmanın Akış Diyagramı	133
Şekil 7.6. Genetik Algoritmanın Temeli	133
Şekil 7.7. Biyolojik sinir sisteminin blok gösterimi	135
Şekil 7.8. Biyolojik Sinir Hücresi ve Bileşenleri.	135
Şekil 7.9. Eğitici Öğrenme Yöntemi	140
Şekil 7.10. Eğitici Öğrenme yöntemi	140
Şekil 7.11. Takviyeli öğrenme yöntemi	141
Şekil 7.12. İleri beslemeli 3 katmanlı YSA.	142
Şekil 7.13. Geri Beslemeli İki Katmanlı YSA.	143
Şekil 7.14. YGKI Yapay Sinir Ağı	144
Şekil 7.15. Bellek hücreli yapay sinir ağı ve bellekli bir hücrenin yapısı.	145
Şekil 7.16. Spesifik üreme hızının başlangıç substrat konsantrasyonu ile değişimi	147
Şekil 7.17. 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Teissier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	156
Şekil 7.18. 2.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Teissier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	156
Şekil 7.19. 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Teissier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	157
Şekil 7.20. 10 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	157
Şekil 7.21. 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	158
Şekil 7.22. Oluşturulan YSA modeli	159

Şekil 7.23. YSA'nın eğitimi için blok diyagramı.	160
Şekil 7.24. 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	161
Şekil 7.25. 2.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	161
Şekil 7.26. 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	162
Şekil 7.27. 10 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	162
Şekil 7.28. 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	163
Şekil 7.29. 7.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi	163
Şekil E3.1. 600 nm'de mikroorganizma kalibrasyon grafiği	178
Şekil E4.1. 550 nm'de glikoz kalibrasyon grafiği	179
Şekil E6.1. 660 nm'de protein kalibrasyon grafiği	181
Şekil E7.1. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değişimi.	182
Şekil E7.2. Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi.	182
Şekil E7.3. Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısının k_{La} 'nın Belirlenmesi	183
Şekil E8.1. 5 g/l başlangıç sakkaroz konsantrasyonuna ait spesifik üreme hızının (μ) belirlenmesi	184

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1 Mikroorganizmaların dışındaki enzim kaynakları	5
Tablo 1.2. Enzimlerin sınıflandırılması	7
Tablo 2.1. GRAS Mikroorganizmalar ve Enzimleri	20
Tablo 2.2. Bildirilen karbon kaynakları ve derişimleri	21
Tablo 2.3. Bildirilen inorganik bileşikler ve derişimleri	22
Tablo 2.4. Enzim üretimi için kullanılacak bir besiyerinin temel bileşenleri	22
Tablo 2.5. Proteaz aktivitesi tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemler	24
Tablo 4.1. Tek substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini modellemek için öne sürülen kinetik modeller	42
Tablo 4.2. Substrat inhibisyon kinetiği için önerilen modeller	44
Tablo 4.3. Ürün inhibisyon kinetiği için önerilen modeller	45
Tablo 5.1. Shipworm <i>Teredinobacter turnirae</i> 'nin bazı karakteristik özellikleri	51
Tablo 5.2. Standart besi ortamı (SM)	52
Tablo 5.3. Plackett-Burman besi ortamı (PB)	53
Tablo 6.1. Farklı karıştırma hızında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.	72
Tablo 6.2. Farklı hava giriş hızında k_{La} ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi	73
Tablo 7.1. Biyolojik Çaprazlama Örneği	130
Tablo 7.2. İki Bitlik Çaprazlama Örneği	130
Tablo 7.3 Biyoproses ortamını tanımlamak amacıyla uygunluğu test edilen modeller	149
Tablo 7.4. MATLAB 7.04 Genetik Algortima Toolbox'ı ile hesaplanmış, modellere ait kinetik parametrelerin değerleri	152
Tablo 7.5. İstatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar.	154
Tablo 7.6. YSA uygulaması sonucu istatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar	160
Tablo E 1.1. Doğal substratların spesifikasyonları	176

SİMGELER

E	: Enzim konsantrasyonu (mol/l, mg/l)
E_o	: Toplam enzim konsantrasyonu (mol/l, mg/l)
S	: Substrat konsantrasyonu (g/l)
ES	: Enzim-Substrat ara bileşiği konsantrasyonu (mol/l, g/l)
P	: Ürün konsantrasyonu
V	: Başlangıç tepkime hızı
V_{max}	: Maksimum başlangıç tepkime hızı
K_s	: Enzim-Substrat ara bileşiğinin bozunma hızı sabiti
E_o	: Toplam enzim konsantrasyonu
C_o	: Sıvı ortamdaki oksijen konsantrasyonu (mg/l)
C_x	: Sıvı ortamdaki mikroorganizma konsantrasyonu (g/l)
r_o	: Oksijen tüketim hızı ($\text{mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$)
r_o'	: Birim hücre başına oksijen tüketim hızı ($\text{mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$)
$k_L a$	: Sıvı faz kütle aktarım katsayısının (s^{-1})
V	: Sıvı kültür hacmi (l)
K_m	: Michaelis- Menten sabiti
μ	: Spesifik üreme hızı
x	: Hücre derişimi
r_x	: Büyüme hızı
r_s	: Substrat tüketim hızı
r_p	: Ürün oluşum hızı
r_d	: Hücrelerin ölüm hızı
K_{sx}	: Monod doyma sabiti (g lt-1)
K_{sp}	: Kinetik parametre (g lt-1)
K_{is}	: Substrat inhibisyon sabiti (g lt-1)
K_{ip}	: Ürün inhibisyon sabiti (g lt-1)
K_{ps}	: Kinetik parametre (g lt-1)
K_{pp}	: Kinetik parametre (g lt-1)
K_{ipp}	: Kinetik parametre (g lt-1)
n	: Katsayı
q_{pmax}	: Spesifik üretim hızı ($\text{U g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
$Y_{X/S}$	: Hücre için verim faktörü (g hücre/g substrat)

- $Y_{P/S}$: Ürün için verim faktörü (g ürün/g substrat)
- m : Hücre için bakım katsayısı (g substrat/g hücre-h)
- α : Üremeye bağlı ürün oluşum sabiti
- β : Üremeye bağlı olmayan ürün oluşum sabiti

1. ENZİMLER

1.1. Genel

Biyolojik sistemlerde meydana gelen tepkimeler laboratuvar koşullarında oluşturulmak istendiğinde çok yüksek sıcaklık, basınç gibi fizikokimyasal yöntemlerin uygulanması gerekir. Bu şartlarda bile tepkimelerin birçoğu izlenemeyecek kadar yavaştır. Örneğin, karbonhidrat, lipid ve proteinler ancak derişik asidik yada bazik çözeltilerde kaynatılarak hidroliz edilebilmesine karşın bu maddeler sindirim sisteminde çok daha kolay koşullarda (örneğin 37 °C’de) hidroliz edilebilirler. Biyolojik sistemlerdeki tepkimelerin böylesine kolay ve hızlı oluşu “enzim” adı verilen biyolojik katalizörlerle gerçekleştirilebilmektedir. Enzim, canlı hücreler tarafından oluşturulan fakat etki yapabilmesi için hücreye ihtiyaç göstermeyen ısıya dayanıksız organik katalizörlerdir.

Enzimlerin insanlık tarihinde kullanılması hemen hemen insanlık tarihi kadar eskidir. Enzimler, ya enzim açısından zengin sebzeler olarak, ya da ekmek ve bira yapımı gibi çeşitli amaçlarla kullanılan mikroorganizmalar olarak, insanoğlu tarafından yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Enzimlerin işlevleri anlaşılmış ve tarih boyunca kullanılmış olsa da, bunların gerçek özelliklerinin anlaşılması yakın geçmişte olmuştur. Hücre dışı bir enzimatik aktivitenin olduğu ilk kez 1783 yılında Spallanzani tarafından atmacaların mide suyunun eti eritebildiği gösterilerek ispatlanmıştır. Daha sonra 1811 yılında Kirchhoff buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekere dönüştüğünü belirledi. 1830 yıllarında Robiquet ve Boutron ile Chaland amidalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini tespit ettiler. Payen ve Persoz 1833’de maltın kendisi gibi, jelatinleşmiş nişastayı şekere, özellikle de maltoza, çeviren diastazi buldular. 1834 yılında Schwann pepsini oldukça saf olarak elde etmeyi başardı. 19. yüzyılın ilk yarısında laktaz, pankreatin, üreaz, pityalin, emulsin, tripsin gibi hidrolitik enzimler de bulunmuştu. Enzimler için ‘katalizatör’ sözcüğü ilk kez 1838’ de Berzelius, ‘enzim’ sözcüğü ise ilk kez 1878’de Künhe tarafından kullanılmıştır. Enzim kelimesi “mayanın içinde” anlamına gelmektedir. Yunancada “en “içinde” ve “zyme” de “maya” ya da “hamur mayası” anlamına geliyor. 1897 yılında Buchner’in alkolik mayalanmanın hücresiz ortamda da gerçekleştiğini bulması enzimolojinin gelişmesinde önemli bir aşamadır.

İki Dünya savaşı arasında, enzim teknolojisi alanında, yavaş da olsa, ilerleme kaydedildi. Bitki ve hayvan hammaddelerinden enzim ayrıştırılması yöntemleri geliştirilerek ayrıştırılan enzimlerin saflaştırılması alanında da gelişmeler olmuştur. Ekmek ve meyve suyu endüstrileri gibi enzimlerin kullanılabileceği yeni endüstri alanları keşfedilmiştir.

Çağdaş enzim kimyası çalışmaları, 1926 yılında Sumner tarafından saf kristal formda bir enzimin (üreaz) izolasyonundan sonra başlamıştır. 1930 yıllarında Northrop ve çalışma arkadaşları tripsin, kimotripsin ve pepsini saf olarak kristallendirmeyi başardılar. 1943 yılına kadar yaklaşık 25 enzim, 1950 yılına kadar ise yaklaşık 100 enzim kristal formda elde edilebilmiştir. Proteinlerin saflaştırılması ile ilgili yeni kimyasal ve fiziksel yöntemler geliştirildikten sonra, F. Sanger 1953 yılında insulinin amino asit dizisini belirledi. Bundan beş yıl sonra da sığır pankreası ribonükleazının amino asit dizisi aydınlatıldı.

Endüstriyel fermantasyon yöntemlerinin geliştirilmesi düşüncesi, penisilinin keşfedilmesiyle filizlenmiştir. Aslında penisilin 1928 yılından beri ihmal edilmişti. Savaşın başlamasından kısa bir süre sonra penisiline duyulan ilgi inanılmayacak ölçüde arttı, ve araştırmacılar penisilini endüstriyel boyutlarda üretebilecekleri yöntemler aramak zorunda kalmışlardır. Bir süre sonra ticari üretimi başarılmış ama üretim için yüzey kültürü yöntemi kullanıldığı için çok büyük miktarlarda bir üretim sağlanamamıştır. Sıvı kültür (Submerged) yönteminin geliştirilmesine yönelik çalışmalar savaş boyunca devam etmiş ve savaştan sonra iyice hız kazanmıştır. Böylece artık penisilin çok miktarlarda ve ekonomik yollarla üretilmeye başlanmıştır. Bu yöntemin geliştirilmesi sadece penisilin üretimine değil, enzim üretimine de büyük katkı sağlamıştır. 1950'lerde bu yöntem kullanılarak Novo'nun (Dünyadaki enzim üretiminin yaklaşık 1/4'ünü gerçekleştiren Danimarka'da bulunan şirket) laboratuvarlarında, tekstil endüstrisinde kullanılmak üzere, bakteriyel amilaz üretilmeye başlanmıştır.

1959'da deterjan endüstrisinde önemli bir gelişme yaşanmıştır. İsviçreli kimyager Dr. Jaag, Bio40 adı verilen ve bakteriyel proteaz içeren bir ürün geliştirdi. Her ne kadar bu yeni ürün tripsinden daha iyi çalışıyor olsa da, yine de ideal bir ürün değildi. Daha sonra 1962'de bütün ihtiyaçlara cevap veren yeni bir ürün geliştirildi. Bu alkali proteazı, deterjanın içinde bulunan diğer maddelerden pek etkilenmiyordu ve istenilen sıcaklıkta çalışabiliyordu. Enzimlerin endüstriyel amaçla kullanılmaları 1965'ten sonra iyice yaygınlaştı (Sağiroğlu,1999).

1.2.Enzimlerin Yapısı

Enzimler, sarmal biçimde kıvrılmış yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Enzim molekülünü oluşturan aminoasit monomerlerinin sayısı ve dizilişi her enzimin kendine özgü yapısını belirler. Kimyasal yapı olarak protein özelliğindeki enzimlerin en belirgin fonksiyonu canlı bir hücrede oluşan kimyasal tepkimeleri katalizlemeleridir. Katalizleme olayı, enzimin üzerinde bulunan ve etkin bölge olarak bilinen çok küçük bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Katalizleme sırasında substrat molekülleri etkin bölgeye bağlanır. Maksimum katalitik etki, bu bölgede bulunan fonksiyonel grupların en uygun konuma gelmesiyle gerçekleşir.

Enzim etkin bölgesinin bu özel geometrik biçimlenişi, birçok enzime dönüştürdükleri substrat için spesifik olma özelliği kazandırır. Enzimlerin çoğu sadece belirli özelliklere sahip bileşiklere karşı etki gösterirler. Aynı bileşiğin çok küçük bir yapısal değişikliğe uğraması bile etkinliği bozabilir. Bir enzimin ancak belli bir nitelikteki tepkiyi dönüştürebilmesine “spesifiklik” adı verilir. Bu özellikleri yanında, enzimler çok düşük sıcaklıkta ve atmosferik basınç altında kimyasal dönüşümleri, yüksek bir katalitik etki ile gerçekleştirirler. Enzim etkinliği, tepkime ortamı koşullarına (sıcaklık, pH, mekanik kuvvetler, etkinleştirici (aktivatör) ve geriletici (inhibitör), kimyasal maddeler vb.) bağlı olarak değişim gösterirler.

Enzim molekülü, birbirine peptid bağlarıyla bağlanmış aminoasit moleküllerinden oluşan biyolojik bir polimerdir. Bu nedenle, enzim moleküllerine belirli bazı biyokimyasal tepkimeleri katalizleyebilecek özellikleri olan bir protein molekülü olarak bakılabilir. Enzimlerin katalitik etkileri, molekülü oluşturan aminoasitlerin sayısı ve diziliş sırasına, amino asit zincirinin hidrojen bağları, hidrofobik bağlar, elektrostatik çekim kuvveti ve disülfid bağları tarafından oluşturulan üç boyutlu sarmal yapısına ve etkin bölge olarak bilinen bölgesindeki fonksiyonel grupların özelliklerine bağlıdır.

Enzimlerin yapısında genel olarak bileşimce ve ödevce farklı olan iki kısım bulunur. Bunlardan birine “apoenzim” diğetine de “kofaktör” (bazı hallerde koenzim) adı verilir. Bunların her ikisine birden “haloenzim” de denilmektedir. Saf haldeki enzimlerin mikroskop, elektron mikroskobu ve X ışınları spektroskopisi yöntemleriyle incelenmesi sonucunda bunların farklı yapıda katı ve kristal özellikte oldukları saptanmıştır.

Enzimlerin apoenzim kısmı büyük protein moleküllerinden oluşmuştur. Apoenzim protein yapısı yani proteinler içindeki aminoasitlerin türleri ve dizilişleri enzimden enzime değişir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve spesifikliğini sağlayan kısım apoenzimdir.

Bir kısım enzimler sadece proteinden oluştuğu halde bir kısım da metal iyonlarını da içerirler ve konjuge protein yapısındadırlar. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve genellikle metal iyonlarından meydana gelen gruplara kofaktör denir. Protein olmayan kısım prostetik grup, katalitik etkiden sorumludurlar. Ancak enzim etkisi için protein kısmına da ihtiyaç vardır. Apoenzime katalitik etki özelliği veren kısım kofaktördür. Apoenzimler yalnız başına hiçbir katalitik etki göstermezler. Kofaktörlerin ise yalnız oldukları zaman çoğunlukla enzime kıyasla çok düşük, bazı hallerde hiç katalitik etkileri yoktur. Ancak bir apoenzimle kofaktör bir arada olduğu zaman gerçek etkisi gözlenebilir.

1.3. Enzim Kaynakları

Bütün enzimler canlı kaynaklardan elde edilir. Enzimlerin eldesinde bitkisel ve hayvansal dokulardan veya mikroorganizmalardan yararlanılır. Günümüzde özellikle ilaç ve

besin endüstrisinde kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu uygun mikroorganizmalardan üretilmektedir. Doğada bulunan enzim kaynakları, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal enzimler olmak üzere 3 grupta toplanabilir.

Bitkiler birçok enzim üretimine kaynak teşkil etmiştir. Örneğin, sistein proteinaz enzimi, papatya, incir, ananas ve diğer bazı bitkilerin özsuysundan bol miktarda izole edilmektedir. Bu bitkilerin en büyük avantajı içerdikleri özsuysunun kolaylıkla alınabilmesidir. Bir diğer bitki kökenli enzim kaynağı da içki endüstrisinde sıkça kullanılan malttır. Malttan β -amilaz, proteaz, sitaz, hemiselülaz, fosfataz ve nükleaz gibi enzimler kolaylıkla izole edilmektedir. Papatya bitkisinden elde edilen papain, incir ağacı sütünden elde edilen ficin ve ananas meyvesinden elde edilen bromelain gibi enzimler bira sanayinde ve etlerin terbiyesinde kullanılmaktadır.

Hayvansal kaynaklı enzimlere lab, pepsin, tripsin, rennin, katalaz vs. örnek verilebilir. Ancak, mikroorganizmalardan elde edilen benzer enzimler daha etkin olmasına rağmen, prosese zararlı olabilecek bir takım farklı özellik gösterebilir. Bu enzimler hayvanların atılan veya az değerli olan organlarından elde edilir. Örneğin pankreas çok zengin bir enzim kaynağıdır. 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.

Enzim ekstraksiyonunda kullanılan hayvansal dokuların sınırlı olması ve taleplerin ani olarak değişmesine cevap verememesi, bitkisel kaynaklı enzimlerin üretiminde çoğunlukla büyük hacimlerde çalışılması, bu iki kaynağın enzim içeriklerinin ekolojik ve diğer çevre koşullarına bağlı olarak değişmesi sonucu, mikrobiyal kaynaklı enzim üretimi üzerine araştırmalar yaygınlaşmıştır. Bu arada biyoteknoloji alanındaki gelişmeler (özellikle daha büyük ve kontrollü fermentörlerin tasarımı, gen mühendisliği yardımıyla elde edilen yeni mikroorganizmalar) oluşan enzimlerin ortamdan ayrılması ve saflaştırılması konularında geliştirilen yeni teknikler, daha önceleri laboratuvar düzeyinde üretilen enzimlerin endüstriyel boyutta ekonomik olarak üretilmelerini sağlamıştır.

Tablo 1.1.'de mikroorganizmaların dışındaki kaynaklardan elde edilen enzimler verilmiştir.

Tablo 1.1 Mikroorganizmaların dışındaki enzim kaynakları (Rehm,1987)

Enzim	Temin Edilen Kaynak
Hayvansal Enzimler	
α -amilaz	Pankreatik bezler(sığır, domuz)
Trypsin	Pankreatik bezler(sığır, domuz)
Kimotripsin	Pankreatik bezler(sığır, domuz)
Pepsin(asit proteaz)	Domuz midesi
Rennet(sütü pıhtılaştırıcı enzim)	Danaların 4. Midesinde
Esteraz	Pankreatik bezler
Lipaz	Pankreatik bezler(sığır, domuz)
Glukozoksidaz	Karaciğer
Katalaz	Karaciğer
Bitkisel Enzimler	
α -amilaz	Çimlenmiş arpa (malt)
β -amilaz	Arpa, buğda, pirinç, tatlı patates, soya fasulyesi
R-Enzim (debraching enzimler)	Fasulyeler, pataesler
Endo-b-Glukonaz	Çimlenmiş arpa (malt)
Papain (SH-Proteaz)	Carica Papaya bitkisi lateksi
Bromelain (SH-Proteaz)	Ananas bitkisi tohumları
Fisin	Ficus Carica bitkisi lateksi
Lipoxigenaz	Fasulyeler ve patatesler

1.4. Enzimlerin Sınıflandırması ve Adlandırılması

Enzimlere önceleri düzensiz ve özel adlar verilmiştir (Pepsin, tripsin, papain gibi). Sonradan, diğer bileşiklerden ayırt etmek için sonuna "-az" eki getirilerek adlandırılmışlardır (katalaz, karboksipeptidaz gibi). 1970' lere kadar binlerce enzim incelenmiş ve yeni bulunanlar yine "-az" son ekine göre adlandırılmıştır. Uluslararası Enzim Komisyonu (E.C.) enzimleri etki ettikleri fonksiyonlu gruplara göre belirlemek için bir numara sistemi ve düzenli adlandırma geliştirmiştir. Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında aşağıdaki temel ilkeler göz önüne alınmaktadır.

- Bütün enzimler -az son ekini alırlar. Birden fazla enzimden oluşan enzim sistemleri ise -az sistem şeklinde adlandırılırlar (örnek : Piruvat – dehidrogenaz sistemi) .
- Enzimler, kendilerince katalizlenen reaksiyona uygun olarak adlandırılırlar ve sınıflandırılırlar. Burada enzimin ve substratın kimyasal yapısı dikkate alınmaktadır. Aynı fonksiyonu gösteren fakat farklı kaynaklardan (mikroorganizma, hayvan, bitki) elde edilen enzimler genellikle aynı adı alırlar.
- Birbirinden farklı tipte birden çok reaksiyon adımı katalizleyen enzim adlandırılırken katalizlediği ilk reaksiyon adımı esas alınır.

Her enzimin bir sistematik adı ve dört kısımdan oluşan bir kod numarası (EC-Nr) vardır. Enzimlerin sistematik isimlendirilmesinde genel olarak şu sıra izlenir. Dönüşüme

uğrılan substratın adı + katalizlenen reaksiyon tipi + az eki. Sistematik isimler çok uzun olduğundan çoğu kez geleneksel isimler tercih edilmektedir.

Her enzimin kod numarası 4 rakam ile tarif edilmektedir.

1. İlk numara enzimin sınıfını belirtmektedir
2. İkinci numara etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu
3. Üçüncü numara alt sınıfını
4. Dördüncü numara enzimin seri numarasını belirtmektedir.

Örneğin sakkarozun inversiyonu olayında kullanılan invertaz enzimi, 3 (hidrolaz), 2 (glikoz bileşiklerine etki yapan sınıf), 1 (glikozit hidrolaz), 26 (alt sınıftaki enzimlerin arasındaki invertazın yeri), 3.2.1.26 rakamları ile tarif edilir (Arslan,1999).

Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında uyulacak kuralları tespit etmek üzere oluşturulan uluslararası komisyon katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı ana grupta toplamıştır (Tablo 1.2.).

1. **Oksidoreduktazlar** : Redoks reaksiyonları katalizleyen bu enzimler –dehidrogenaz veya –reduktaz çerçeve isimleriyle tanınırlar. Oksijen, elektron veya hidrojen alıcısı ise bu durumda oksidaz adı ile anılırlar. Örnekler: Alkol–dehidrogenaz, reduktaz , peroksidaz , glukoz-oksidaz , sitokromoksidaz vb.
2. **Transferazlar**: Donör (verici) üzerindeki bir fonksiyonel grubun alıcı substrat molekülüne taşınmasını katalizleyen enzimlerdir. Örnekler : Formil–transferazlar (transaminazlar), fosfotransferazlar (kinazlar) , CoA –transferazlar v.b
3. **Hidrolazlar**: Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, glikozid, peptid, C-N, asitanhidridi, C-C, C-X veya P-N bağlarını parçalarlar. Örnekler: lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar, vb.
4. **Liyazlar**: Çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Etkiledikleri substrattan ya kimyasal bir grubu ayırır yada ilave ederler. Önemli örnekler: dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar (fumaraz, akonitaz), karboksilazlar, amonyak-liyazlar.
5. **İzomerazlar**: Molekül içini yeniden düzenlenmeleri katalize ederler. Molekülün geometrik veya yapısal çevrilmesini katalizlerler. Bunlar, molekül içinde oksidoredüksiyonu, grup transferini ve çift bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (intramoleküler- Liyazlar, İntramoleküler – Transferazlar)
6. **Ligazlar**: Bağ oluşturan enzimlerdir. Enzimin etkilediği iki maddenin birleşmesini katalize ederler. Amino asitleri aktive eden enzimler piruvat –karboksilazlar, açılaz CoA-sentazlar.

Tablo 1.2. Enzimlerin sınıflandırılması (Telefoncu,1986).

1. Oksidoreduktazlar	Redoks reaksiyonlarını katalizlerler $A^- + B \rightleftharpoons A + B^-$ 1.1 CH-OH grubuna etkileyenler 1.2 C-O grubuna etkileyenler 1.3 C-CH grubuna etkileyenler 1.4 CH-NH ₂ grubuna etkileyenler 1.5 CH-NH grubuna etkileyenler
2. Transferazlar	Fonksiyonel grupların transferinden görev alırlar $A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$ 2.1 Cl ⁻ gruplarını transfer edenler. 2.2 Karbonil gruplarını transfer edenler. 2.3 Açıl gruplarını transfer edenler. 2.4 Glikozil- gruplarını transfer edenler. 2.5 N- içeren grupları transfer edenler. 2.6 Fosfat gruplarını transfer edenler. 2.7 S- içeren grupları transfer edenler.
3. Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$ 3.1 Esteri hidrolizleyenler. 3.2 Glikozid bağlarını hidrolizleyenler. 3.4 Peptid bağlarını hidrolizleyenler. 3.5 Diğer C-N bağlarını hidrolizleyenler. 3.6 Asit anhidritlerini hidrolizleyenler.
4. Liyazlar	Çift bağa katılma ve çift bağ oluşturan reaksiyonları katalizleyenler $\begin{array}{cc} X & Y \\ & \\ I & I \end{array}$ $A - B \rightleftharpoons A=B + X-Y$ 4.1 C - C Liyazlar 4.2 C - O Liyazlar 4.3 C - N Liyazlar
5. İzomerazlar	İzomerleşme reaksiyonlarını katalizlerler $\begin{array}{cc} X & Y & Y & X \\ & & & \\ I & I & I & I \end{array}$ $A - B \rightleftharpoons A + B$ 5.1 Rasamezler 5.3 İntramoleküler oksidoreduktazlar 5.4 İntramoleküler transferazlar
6. Ligazlar (Sentazlar)	Sentez reaksiyonlarını katalizlerler $A + B \rightleftharpoons A - B$ 6.1 C - O bağını oluşturanlar 6.2 C - S bağını oluşturanlar 6.3 C - N bağını oluşturanlar 6.4 C - C bağını oluşturanlar

1.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Parametreler

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 (Aiba, 1973).

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 (Bailey ve Ollis, 1986; Schmid, 1979). Enzim aktivitesi;

- pH,
- Sıcaklık,
- Substrat konsantrasyonu,
- Enzim konsantrasyonu,
- Radyasyon,
- Kimyasal bileşenler (alkol, üre, hidrojen peroksit vd.),
- Biyolojik etkenler

gibi faktörlerden etkilenir.

1.5.1. pH’nın Etkisi

Enzimler asidik, bazik veya nötral gruplar içeren amino asitlerden oluşurlar. Bu gruplar çoğu kez enzimin aktif konumunun önemli bir parçasıdır ve katalitik aktivite için belli bir iyonlaşma durumunda olmaları gereklidir. Bu nedenle her enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğu özgün bir pH değeri vardır. Bu değer altıda ve üstünde aktivitede düşüş gözlenir.

Enzimlerin en yüksek etkinlik gösterdiği belirli pH’lar vardır. Bu değerden yüksek yada düşük pH’larda enzimlerin etken grupları değişime uğrayarak yada kendileri belirli ölçülerde denatüre olarak etkisiz (inaktif) hale geçerler.

Belirli bir optimum pH’nın altında ve üstünde enzim aktivitelerindeki düşme, enzimatik tepkimeye ilişkin K_m ve k_2 sabitlerinin pH ile birlikte değişik değerler almasından ileri gelir. Çünkü, çözeltinin pH’sının değişmesi, enzimlerin etken noktalarında bulunan gruplara etki

ederek bunları belirli pH bölgelerinde iyonlaştırır. Aktif gruplardaki bu değişimler ise enzimatik tepkimenin K_m ve k_2 sabitlerini, yani hızlarını etkiler.

1.5.2. Sıcaklığın Etkisi

Kimyasal tepkimelerde olduğu gibi, enzim katalitik biyokimyasal tepkimelerde de tepkime hızı Arrhenius kanununa uyar ve sıcaklığın artmasıyla artar. Enzimin protein yapısı kritik bir sıcaklığın üzerinde bozulduğundan bu değerin üzerindeki sıcaklıklarda deaktivasyon gözlenir. Bu nedenle enzimler, maksimum aktivite gösterdikleri bir optimum sıcaklığa sahiptirler (Lehninger, 1979; Bailey ve Ollis, 1986).

1.5.3. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

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 sıfıncı 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 doymuş hale gelecek ve reaksiyon hızını arttırmak mümkün olmayacaktır.

1.5.4. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim tarafından katalize olunan bir reaksiyonun başlangıç hızı (V) enzim konsantrasyonu (E) 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.

1.5.5. 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.

1.5.6. Kimyasal denatürasyon bileşikleri

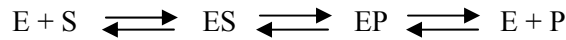
Asitler ve bazlar, organik hidrojen bağ yapıcılar, inorganik bileşikler, organik çözücüler, yüzey aktif maddeler, oksidantlar ve ağır metaller enzimin aktivitesini etkileyen etmenler arasındadır.

1.5.7. Biyolojik etkenler

Polipeptit yapısında olmalarından dolayı enzimler, proteolitik enzimler veya proteaz aktivitesi olan mikroorganizmalar tarafından parçalanabilirler. Genellikle asidik proteinler bazik ve nötral proteinlerden, büyük proteinler de küçük proteinlerden daha kolay parçalanırlar. Bu nedenle çoğunlukla küçük ve bazik proteinler daha çok kararlıdır.

1.6. Enzim Etkin Bölgesi ve Enzim-Substrat Etkileşimi

En basit enzim katalizli sistem tek bir substratın tek bir ürüne dönüştüğü reaksiyondur.



Burada "S" tepkimeye giren maddeyi, "E" enzim, "ES" enzim-substrat kompleksini, "EP" enzim-ürün kompleksini, "P" ise oluşan ürünü göstermektedir.

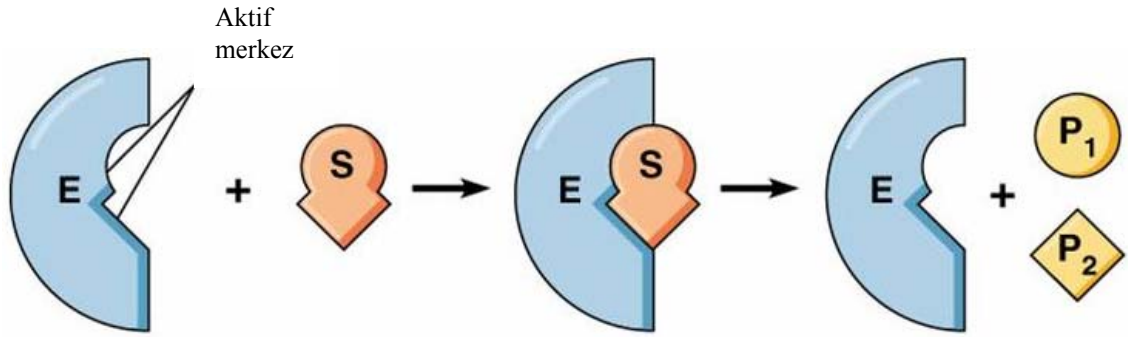
Enzimlerin katalitik özellikleri enzim molekülünün tümünden ileri gelmez. Bu özellik molekülde bulunan bazı küçük bölgelerde gözlenmiştir. Bu kısımlara "aktif merkezler" veya "etkin bölge" denilmektedir.

Enzimlerin dönüştürdükleri substrata karşı gösterdikleri yüksek spesifiklik, tepkime hızının substrat konsantrasyonu ile değişim karakteri ve substrat moleküllerin enzim deaktivasyonunu önleme özelliğinin belirlenmesi, enzimli tepkimelerde ilk basamağın bir Enzim-Substrat (ES) ara bileşiğinin oluşumu olduğunu ortaya koymuştur. Bu ara bileşik, substrat molekülünün enzim üzerinde "etkin bölge" olarak adlandırılan bir bölgeye tutunması sonucu oluştuğu bilinmektedir (Dixon ve Webb, 1967; Segel, 1975). Etkin bölgenin substrat molekülleri üzerinde bulunan bazı gruplarla etkileşim özelliğine sahip aminoasit yan gruplarının

çok özgül ve üç boyutlu bir yapı oluşturabilecek şekilde dizilişi sonucu oluştuğu kabul edilmektedir.

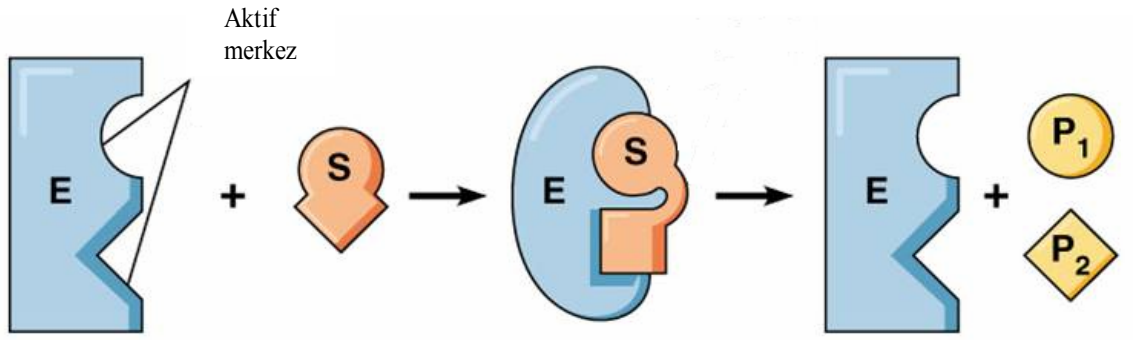
Enzimlerin dönüştürdükleri substrat için gösterdikleri seçicilik, enzim-substrat etkileşimi için ileri sürülen modellerin çıkış noktası olmuştur. Tek evreli tepkime sistemleri için geliştirilen bu modellerden en temel olanları Ficher tarafından ileri sürülen “anahtar ve kilit” ve Koshland tarafından ileri sürülen “uyarılmış biçimleme modelleri”dir (Segel, 1975).

Anahtar ve Kilit Modeli: Bu model substrat molekülünün, enzim üzerinde kendisine geometrik olarak benzer ve değişmez bir şekli olan etkin bölgeye bağlanarak tepkimeye girdiğini varsayar (Şekil 1.1) (Segel, 1975).



Şekil 1.1. Anahtar ve kilit modeli (E: Enzim, S: Substrat, ES: Enzim-Substrat arabileşigi) (Segel, 1975)

Uyarılmış Biçimleme Modeli: Anahtar ve kilit modelinin birçok enzim tepkime mekanizmasını açıklayabilmesine karşın, modelin açıklayamadığı etkileşim türlerinin bulunması sonucunda, uyarılmış biçimleme modeli ileri sürülmüştür (Şekil 1.2) (Segel, 1975). Substrat molekülüne kimyasal yapı olarak benzeyen ancak değişik yan gruplar içeren moleküllerin enzime sıkıca bağlanmasına karşın tepkimeye girmemesi, iki substratlı enzim tepkimelerinde gözlenen substratların sıralı etkileşim özelliği, allosterik enzim davranışı, “cooperative” substrat bağlanması gibi gözlemler, substrat moleküllerinin enzimde konformasyonel bir değişime sebep olması ve bu değişim sonucunda enzim üzerindeki gruplarla etkileşebilecek şekilde yönlendirilip biçimlenmesi, uyarılmış biçimleme modeli ile açıklanabilmektedir. Bu modele göre, bir molekülün tepkimeye girebilmesi için hem etkin bölgeye tutunması hem de etkin bölgedeki grupların uygun şekilde yönlendirilmesini sağlayacak değişimi gerçekleştirmesi gerekmektedir.



Şekil 1.2. Uyarılmış biçimleme modeli (Segel, 1975).

1.7. Enzimatik Tepkimelerin Kinetiği

Enzim için ileri sürülen kinetik modellerin tümünde, substrat moleküllerinin enzim üzerinde etkin bir bölgeye/bölgelere tutunarak bir Enzim-Substrat ara bileşiği oluşturduğu düşünülmüştür.

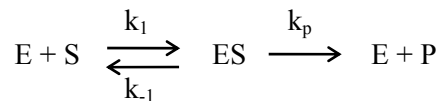
1.7.1. Tek Etkin Bölgesi İçin Türetilen Henry-Michaelis-Menten ve Briggs-Haldane Eşitliği

Enzimli tepkimeler için ilk eşitlik 1903 yılında Henry (Segel, 1975) tarafından türetilmiştir. Bu eşitlik türetilirken, aşağıdaki varsayımlar yapılmıştır:

- 1) Enzim katalizleyicidir
- 2) Enzim ve substrat, enzim-substrat arabileşiği oluşturur
- 3) Enzim ve substrat, önce enzim-substrat, sonra arabileşik-ürün ve enzime dönüşür
- 4) Enzim ve substrat ile enzim-substrat arabileşiği dengededir. ES arabileşiği aynı anda E+S'ye bozunmakta ve E+P'ye dönüşmektedir
- 5) Substrat konsantrasyonu enzim konsantrasyonundan çok fazladır ve ES arabileşiğinin oluşması substrat konsantrasyonunu etkilemez
- 6) Hız kısıtlayan basamak ES arabileşiğinin ürün ve enzime dönüşme basamağıdır
- 7) Substrat hızı, başlangıç tepkime hızı olarak alındığında;



basamağına doğru olan tepkime ihmal edilir. Bu varsayımlar sonucunda, tepkime mekanizması ve türetilen hız eşitliği aşağıdadır.



$$V = \frac{K S}{1 + \frac{S}{K_s}} \quad (1.1)$$

Henry'den 10 yıl sonra Michaelis ve Menten tarafından bu eşitlik;

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_s + S} \quad (1.2)$$

şeklinde değiştirilmiştir. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği olarak bilinmektedir.

S : Substrat konsantrasyonu

V : Başlangıç tepkime hızı

K : Sabit ($k_p E_o / K_s$)

K_s : Enzim-Substrat ara bileşiğinin bozunma hızı sabiti (k_{-1} / k_1)

$V_{\max}$: Maksimum başlangıç tepkime hızı ($k_p E_o$)

E_o : Toplam enzim konsantrasyonu

Briggs ve Haldene, 1925 yılında enzim, substrat, enzim-substrat arabileşiği arasında hızlı bir dengenin olması gerekmediğini ancak tepkimenin başlamasından çok kısa bir süre sonra ES arabileşiği konsantrasyonunun yaklaşık olarak sabit bir değere ulaştığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, tepkime hızının, ES ara bileşiğinin yatışkın durum derişimi ile doğru orantılı olduğunu varsaymışlardır. Bu varsayımlar sonucunda kendi adları ile bilinen,

$$V = \frac{k_p E_o S}{K_m + S} \quad (1.3)$$

eşitliğini türetmişlerdir.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1}$$

2. PROTEAZLAR

2.1. Genel

Canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için kısa bir sürede çoğu biyokimyasal dönüşümü tamamlamaları gereklidir. Bu reaksiyonlar, belirli koşullar altında, 'enzim' adı verilen biyolojik katalizörler tarafından gerçekleştirilmektedir.

Proteinlerin enzimatik hidrolizinden, yıllar boyu çeşitli amaçlar için bilinçsiz olarak yararlanılmıştır. Etleri yumuşatılmasında papaya sıvısının, derilerin tabaklanmasında gübrenin ve peynir yapımında buzağuların mide mukozasının kullanılması ilk uygulamalara örnek olarak gösterilebilmektedir (Noordervliet, 1983).

Proteinlerin peptid bağlarının hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler, Uluslararası Biyokimya Birliği 'nin Enzim Komisyonu tarafından, 'proteazlar' ve 'peptidazlar' olarak iki gruba ayrılmıştır. Proteazlar, protein molekülündeki iç peptid bağlarına, peptidazlar ise peptid zincirinin amino veya karboksil uçlarına etki etmekte ve buna göre de aminopeptidaz veya karboksipeptidaz adını almaktadır (Kalisz, 1988).

Proteazlar üzerinde ilk çalışmalar, 1783 yılında, Spallanzani ile başlamıştır. Bu araştırmacı mide sıvısının protein parçalama özelliğinde olduğunu saptamıştır (Aunstrup, 1973). 1836 yılında ise Schwann, pepsinin de benzer etkiyi gösterdiğini ortaya koymuş ve bu enzimi yüksek oranda saflaştırabilmiştir. Aynı yıllarda çeşitli kaynaklardan proteolitik enzimler izole edilmiş ve mide sıvısından elde edilene 'pepsin', pankreastan salgılanana 'tripsin', bağırsak mukozasından elde edilene ise 'erepsin' adı verilmiştir (Keay vd., 1972). 1913 yılında, Boidin ve Effront, bir *Bacillus subtilis* spp'den amilaz ve çok az da proteaz içeren enzim preparatı hazırlamışlardır (Aunstrup, 1980). 1930'larda Bergman ve arkadaşları, proteinlerin peptid bağlarının enzimlerle parçalandığını bildirmişlerdir. 1940-42 yıllarında ise, enzimlerin spesifikliği üzerine yapılan çalışmalarda, her enzimin belirli etkileri olduğu açıklanmış ve pepsin, tripsin, kimotripsin, papain gibi hayvansal ve bitkisel orjinli proteazlarla saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. *Bacillus* ve *Aspergillus* sp'ler tarafından sentezlenen mikrobiyal proteazlar ise, 1950-52 yılları arasında izole edilmiştir .

Proteaz enzimi, tüm canlı varlıklarda bulunan, büyüme ve çoğalma için gerekli olan bir enzimdir. Proteinlerin hidrolizinde spesifik olarak katalitik rol oynayan, fizyolojik ve ticari açıdan oldukça öneme sahip enzimlerden biridir. 1998 yılındaki verilere göre, toplam 1.3 milyar \$'lık endüstriyel enzim üretiminin, yaklaşık 400 milyon \$ kısmı deterjan endüstrisi için harcanmıştır (Godfrey, 2000). Önümüzdeki on yıl içinde bu oranın çok daha artacağı beklenilmektedir .

Günümüzde elde edilen değişik özellikteki proteazlar, deterjan ve gıda endüstrisi başta olmak üzere; tekstil, deri, fotoğraf, ipek ve yem sanayileri ile çeşitli klinik uygulamalar, eczacılık gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Taylor ve Richardson, 1979; Kalisz, 1988). Dünyada, yılda üretilen ve çeşitli endüstrilerde kullanılan enzimlerin %80'den fazlasının hidrolazlar grubuna ait olduğu ve bununda yaklaşık % 60'ını proteazların, % 30'unu karbohidrazların, % 3'ünü lipazların ve % 7'sini de diğer enzimlerin oluşturduğu bildirilmiştir (Sheppard, 1986).

2.2. Proteazların Kullanım Alanları

2.2.1. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı

Proteazlar yaklaşık 15 yıldır yaygın bir biçimde kullanılmaktadır ve bu amaçla kullanılan serin proteazların yıllık üretimi de saf protein olarak, yaklaşık 500 tondur. Alkaofilik enzimlerin esas endüstriyel uygulama alanı deterjan endüstrisidir ve deterjan enzimleri dünya çapındaki enzim üretiminin yaklaşık % 30'unu kapsamaktadır.

2.2.2. Deri Endüstrisi

Proteaz enzimlerinin elastolitik ve keratinolitik aktivitelerine sahip olmaları, bu enzimlerin dericilikte, özellikle kılların uzaklaştırılması işleminde etkin olarak kullanımını sağlamıştır (Taylor vd., 1987). Bazik şartlar kıl köklerinin şişmesini sağlar ve daha sonra kıl proteinleri üzerine proteaz enziminin saldırısıyla kıllar kolaylıkla deriden uzaklaşır. Kıl gideriminde; mikrobiyal proteazlar, maliyetlerinin daha düşük olması nedeniyle, pankreatik tripsine oranla daha çok kullanılmaktadır (Aunstrup, 1980).

2.2.3. X Işını Filmlerinden Gümüşün Geri Kazanımı

Alkaline proteaz enzimi, gümüşün geri kazanılması için kullanılmış röntgen filmlerinin biyolojik proseslerinde de kullanım alanı bulmuştur. Röntgen filmlerindeki gümüş miktarı polyester film tabakası üzerindeki emülsiyon tabakasının ağırlığına bağlı olarak % 1.5-2 arası değişmektedir. Kullanımdan sonra atılan bu filmler, iyi birer gümüş kaynağıdır ve elde edilen gümüş ışığa duyarlı materyaller olarak kullanımı dahil daha birçok amaçla tekrar kullanılabilir (Fujiwara vd. 1989, 1993). Klasik metot olan, filmlerin yakılarak gümüşün kazanılması işlemi, önemli derecede çevre kirliliği problemi yaratmaktadır. Dolayısıyla, filmlerin enzimatik olarak işlenmesi hem gümüşün geri kazanılmasını hem de poliestere film maddesinin geri devir ettirilmesini sağlar (Ishikawa vd., 1993).

2.2.4. Tıp Alanında Kullanımı

Alkaline proteaz içeren kollagenazların kullanımı, özellikle dozaj formlarının hazırlanmasında tedavi amacıyla, tıpta gittikçe artmaktadır. Yüksek kollagenolitik aktiviteye sahip yeni bir semialkaline-proteaz enzimi *Aspergillus niger* tarafından üretilmiştir. Ayrıca fibrinolitik aktiviteye sahip bir proteaz enziminin trombolitik ajan olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Kim vd., 1996).

2.2.5. Gıda Endüstrisi

Proteazlar, bitkilerden, balık ve diğer hayvanlardan proteinleri hidrolize edebilir. Ticari olarak kullanılan proteaz enzim, *Alcalase*, terminal hidrofobik amino asitler için önemli derecede spesifikliğı sahiptir. Bu enzimin kullanılmasıyla, daha az acı veya tamamen acılığı giderilmiş enzimatik peynir altı suyu protein hidroliz ürünleri elde edilebilir. Genellikle kazein, peynir altı suyu proteini ve soya proteinlerinden elde edilen protein hidroliz ürünleri, bebek maması yapımında sıkça kullanılmaktadır. Bu ürünler ayrıca, meyve suları veya hafif içkilerin kuvvetlendirilmesinde ve diyet maddelerin yapımında da kullanılmaktadır.

Proteazlar, etlerin yumuşatılması işleminde de kullanılmaktadır. Yumuşatma işlemi, toz halindeki enzimin et üzerine serpilmesi, ya da etin proteaz enzim çözeltisine daldırılması veya konsantre proteazın ete enjeksiyonu ile yapılabilmektedir.

2.2.6. Atık Arıtım Endüstrisi

Proteaz enzimler, evsel ve gıda endüstrisi atıklarının işlenmesinde önemli derecede kullanılmaktadır. Bu proteazlar, atıklardaki proteinleri birkaç adımda hidrolize edebilir ve dolayısıyla balık ve diğer ev hayvanları için kullanılabilir konsantre sıvı ürünler veya kuru katı maddeler kazanabilir.

2.2.7. Kimya Endüstrisi

Yapılan çalışmalar, organik çözücü içindeki enzimlerin, sentetik kimyasal madde üretiminde biyokatalizör olarak belli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Ancak bu uygulamanın en önemli dezavantajı, enzimlerin anhidrik şartlarda aktivitesinin azalmasıdır. Bazı çalışmalar, organik çözücülerde peptid sentezini katalizlemek için, proteaz enziminin kullanılabilirliğini göstermiştir.

2.3. Proteazların Sınıflandırılması

Proteolitik enzimler peptid bağlarını hidrolize eden enzimlerdir; katalizleme biçimine bağlı olarak peptidazlar ve proteazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Peptidazlar ancak uç amino asitleri veya dipeptitleri uzaklaştırabildiğinden ikincil öneme sahiptir. Proteazlar ise fizikokimyasal ve katalitik özellikleri dikkate alındığında kompleks enzimlerdir. Proteazları sınıflandırmak ve sistematik olarak adlandırmak zor olduğundan üretildiği kaynak ve katalitik mekanizma dikkate alınarak adlandırılırlar (Yağız, 2000).

Proteazlar biyokatalitik mekanizmaları dikkate alındığında dört gruba ayrılırlar. Bunlar; serin proteazlar, sistein (tiyol) proteazlar, aspartik (karboksil) proteazlar ve metallo (nötral) proteazlardır.

2.3.1. Serin Proteazlar

Serin proteazlar, bakteri ve funguslar tarafından yaygın olarak üretilirler ve hayvansal enzimler olan tripsin ve kimotripsine benzerler. Alternatif isimleri alkalin proteazlardır. Serin proteazlar karakteristik olarak molekülün aktif bölgesinde bir serin grubuna sahiptir. Tepkimenin katalizlenmesinde bu grup kullanılır. Birçok substrata karşı spesifik olarak aktif olan serin proteaz enzimlerinin molekül ağırlıkları küçüktür (18.5-35 kDa). Serin proteazlar genellikle nötral ve alkali pH' larda aktiftirler. Optimum pH'ları 7-11 arasındadır. Bir çoğunun izoelektrik noktası pH 4.4-6.2 arasındadır. Proteazlar bazı tiyol bileşikleri tarafından inhibe edilirler. Serin proteazlar dört ana gruba ayrılırlar. Bunlar;

Tripsin benzeri proteazlar

Alkali proteazlar

Miksobakter α -olitik (myobacter α -lytic) proteaz

Stafilokokal (staphylococcal) proteazdır.

Serin alkali proteaz endüstriyel enzimlerin en önemlilerindendir. Deterjan endüstrisinde kullanılan serin alkali proteaz toplam enzim üretiminin % 35' ini oluşturmaktadır. Bu enzim ayrıca gıda endüstrisinde, deri sanayinde ve fotoğraf endüstrisinde de kullanılmaktadır. Optimum pH değerleri yaklaşık pH=10'dur. Molekül ağırlıkları 15-30 kDa arasında; izoelektrik noktası ise pH=9 dolayındadır.

Serin alkali proteazlar içinde ticari adı 'Subtilisin Carlsberg' olan enzim Carlsberg Laboratory'de (1947) bulunmuş; 1960 da endüstriyel üretimi başlamış ve deterjan enzimi olarak en yaygın olarak kullanılmıştır. 'Subtilisin Novo' ise ikincil ticari öneme sahiptir. Subtilisin Carlsberg (SC)'in *B. licheniformis*, Subtilisin Novo (SN)'nun ise *B. amyloliquefaciens* ile üretildiği bildirilmektedir. Bu iki ticari alkali proteaz enzimin yapısı

incelenmiş ve protein yapılarında 58 amino asit dizininin farklı olduğu bildirilmiştir (Aunstrup 1980). SC ve SN enzimlerin molekül ağırlıkları 27.5 kDa; optimum sıcaklıkları 60 °C, optimum pH'ları da 10 civarındadır.

Novo firması tarafından üretilen enzimin aktivitesi Ca^{+2} iyonunun varlığına bağlıdır. Hipoklorit, hidrojen peroksit gibi oksitleme özelliğine sahip maddeler bu enzimleri bozarlar. Fakat enzim aktivitesi sodyumperborat ile stabilize edilmiş H_2O_2 ' den etkilenmezler.

2.3.2. Sistein (tiyol) proteazlar

Sistein proteazlar sınırlı sayıda fungus tarafından hücre içi ve hücre dışı olarak üretilirler. Funguslar tarafından üretilen bu enzimler $5 < \text{pH} < 8$ aralığında aktiftirler. Protozoa türleri tarafından üretilen sistein proteazlar hücre içi enzimlerdir ve daha düşük pH'larda aktiftirler. Sistein proteazlar aktif konumlarına göre ikiye ayrılırlar. Bunlar; Klostripain (clostripain) proteazlar ve streptokokal (streptococcal) proteazlardır.

2.3.3. Aspartik (karboksil) proteazlar

Aspartik proteazların en önemli özellikleri, düşük pH'larda (3-4) maksimum aktiviteye sahip olmalarıdır. Çoğunlukla fungus türleri tarafından üretilirler. Bakteri ve protozoa türleri tarafından üretilen aspartik proteazlar da vardır. Aspartik proteazların çoğu, ortamda bakır katyonları bulunması durumunda epoksi ve diazo keton bileşiklerine karşı hassastırlar. Ayrıca pepsitatin yani *Streptomyces* pepsin inhibitörü tarafından inhibe edilirler.

Birçok aspartik proteazın molekül ağırlıkları 30-45 kDa arasında; izoelektrik noktaları ise pH 3.4-4.6 arasındadır. Bu enzimler protein zinciri üzerindeki aromatik veya büyük amino asit grupları ile spesifik olarak tepkime verirler. Katalitik aktivite iki aspartik asit grubunu içerir. Protein substratı üzerindeki peptid bağı ile nükleofilik tepkime öncesi, aspartik proteazın katalitik etki mekanizmasına göre önce bir su molekülünün aktif konuma bağlanması gereklidir. Fungal proteazların çoğu pH=7'nin üzerinde kararsızdır ve bu pH değerlerinde üretimleri gerçekleşmemektedir. Nötral ve alkali pH'larda çoğalamazlar. İki çeşit aspartik proteaz vardır. Bunlar; pepsin benzeri proteazlar ve rennin benzeri proteazlardır.

2.3.4. Metalloproteazlar (nötral proteazlar)

Bu enzimlerin optimum pH'ları 5 ile 9 arasındadır. Metal iyonlarla şelat kompleksler veren (EDTA gibi) bileşiklere karşı hassastırlar. Serin proteaz inhibitörlerinden ve sülfhidril bileşiklerden etkilenmezler. EDTA ile inhibe edilen enzimlerin çoğu çinko, kalsiyum, kobalt iyonları ile tekrar aktive edilebilirler. Bakteri ve fungus metalloproteazları her bir enzim

molekölü başına bir atom çinko içeren enzimlerdir; çinko atomu enzim aktivitesi için şarttır. Kalsiyum iyonu ise protein yapısını kararlı tutmak için gereklidir; kalsiyum miktarı molekül başına 4 ile yaklaşık 0.2 atom arasında değişmektedir.

Metalloproteazlar beş gruba ayrılır. Bunlar ; asit proteazlar, nötral proteazlar, alkali proteazlar, myxbacter proteazlar I ve myxbacter proteazlar II ‘dır.

2.4. Uygun Mikroorganizmanın Belirlenmesi

Bir mikrobiyal enzim üretimindeki ilk basamak, istenilen enzimi üretebilen uygun mikroorganizmayı seçebilmektir.

Proteolitik enzimler, hemen hemen her organizmada bulunabilmekte ise de, günümüzde endüstriyel amaçla üretilen proteazlar, bazı *Bacillus*, *Aspergillus* ve *Mucor* türlerinden elde edilmektedir. Bu mikroorganizmalar genellikle toksik maddeler oluşturmamaları, basit substratlar üzerinde kolayca gelişebilmeleri, enzim verimlerinin stabil olması ve geri kazanımlarının kolaylığı gibi avantajlar sağlamaları nedeniyle tercih edilmektedirler (Atkinson ve Mavituna, 1983). Pek çok ülkede, enzimlerin ticari üretimi ve endüstriyel boyutta kullanımı, belirli kurumların denetimi altındadır. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri’nde FDA (U.S. Federal Food and Drug Administration)’nın bir enzimin üretiminde kullanılacak mikroorganizma için GRAS (Generally Recognised As Safe) belgesinin olması koşulu aranır. FDA’nın programına göre, bu ürünlerin her biri güvenilirlik açısından değerlendirilmektedir. Bu kuruma göre bazı enzimlerin üretiminde kullanılan GRAS mikroorganizmalar ve enzimleri Tablo 2.1.’de verilmiştir (Taylor ve Richardson, 1979).

Bazı mikroorganizmalar çok sıcak veya çok soğuk, asidik veya bazik gibi ekstrem şartlarda üretim yapabilirler. Örneğin denizden izole edilen mikroorganizmalar (izole edildiği yerlere bağlı olarak) çok yüksek basınçlara dayanabilirler. Birçok mikroorganizma için ürettikleri spesifik kararlı proteinler belirlenmiş ve özellikleri araştırılmıştır. İstenilen kararlılıkta ve istenilen katalitik aktiviteye sahip enzimi üreten mikroorganizmayı bulmak için birçok mikrobiyal türün araştırılması gerekir.

Tablo 2.1. GRAS Mikroorganizmalar ve Enzimleri (Taylor ve Richardson 1979).

Mikroorganizma	Enzimler
<i>Bacillus subtilis</i>	Nötral proteaz, alkali proteaz ve termostabil amilaz
<i>Aspergillus oryzae</i> ve <i>A. Niger</i>	Amilaz, glukoamilaz, proteaz, katalaz, glukozoksidaz, lipaz, antosiyanaz, naringinaz, selülaz, hemiselülaz, pentozanaz, invertaz.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	İnvertaz
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Laktaz

2.4.1. Serin Alkali Proteaz Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Bacillus türü bakteriler serin alkali proteaz üretebilen bakteri grubudur. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines*, *Bacillus firmus*, *Bacillus brevis* türleri serin alkali proteaz için potansiyel bakteri türleridir. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* en çok bilinen, serin alkali proteaz üretebilen mikroorganizmalardır. *Bacillus* türü bakteri toksik olmayan hücre duvarına sahip, tek membranlı olan, ürettiği proteinleri (enzimleri) hücre dışına aktaran, patojen olmayan mikroorganizmalardır.

Bacillus türü alkalofilik bakteriler kullanıldığında ortam pH'ını bazik bölgede (pH>7.5) tutmak için ortama sodyum karbonat gibi alkali bileşikler veya laktatlar gibi metabolizmaya girebilecek asitlerin tuzları eklenmelidir.

Serin alkali proteaz, *Arthrobacter*, *Flavobacterium arborescens* ve *Streptomyces* gibi diğer bakteri türleri; *Aspergillus*, *Neurospora crassa*, *Malbranchea pulchella*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi fungus türleri tarafından da üretilmektedir.

Frankena vd. (1985) yaptıkları araştırmalarda *Bacillus licheniformis* 'i; Kole vd. (1988), Kadrekar ve Ramasarma (1990), Wright vd. (1992) *Bacillus brevis* 'i; Manachini vd. (1988) *Bacillus thermoruber* 'i; Moon ve Parulekar (1991) 'da *Bacillus firmus* 'u; Elibol ve Moreira (2003), Ahuja vd. (2004), Usama (2003) *Teredinobacter turnirae* 'i alkali proteaz üretimi ile ilgili yaptıkları çalışmalarda kullanmışlardır.

2.5. Enzim Üretimi İçin Uygun Ortam Bileşimi

Mikrobiyal enzim üretiminde, kullanılacak besiyerinin bileşimi büyük önem taşımaktadır. Seçilecek besiyerinde, enzim verimi, bileşenlerin yararlılığı, maliyeti, enzimin kalitesi gibi

önemli faktörler göz ardı edilmemelidir (Keay vd., 1972). Mikroorganizmalar türüne bağlı olarak farklı bileşikleri tüketirler. Bu yüzden mikroorganizmadan mikroorganizmaya ortam tasarımı değişmektedir. Literatürde ortam tasarımı ile ilgili bilgi yeterli değildir. Tüm kaynaklarda yarı tanımlanmış ortamlar verilmiş olup enzim üretimindeki kritik bileşikler verilmemiştir.

Anaerobik mekanizmaya sahip mikroorganizmalar besi yerindeki karbonun yaklaşık % 10'unu aerobik mekanizmaya sahip olanlar ise % 50-55'ini hücre yapısını oluşturmada kullanırlar. Karbon kaynakları mikroorganizmanın gelişmesi, çoğalması ve biyosentezi için gerekli olan, aynı zamanda mikroorganizmaya metabolik enerji sağlayan bileşiklerdir.

Enzim aktivitesini arttırmak için ortama karbon kaynağı olarak şekerin eklenmesi de proteaz üretiminde kullanılan bir prosedürdür. Ortama şeker eklendiğinde;

1. Hidrojen bağları kuvvetlenir ve enzimin yapısı sağlamlaşır,
2. Hidrofobik etkileşimler kuvvetlenir, veya
3. Her iki etki birlikte görülebilir.

Bu maddelerin eklenmesiyle enzimin aktivitesinin korunması enzimin kimyasal karakteri ve enzimin yapısıyla da ilgilidir.

Halbern (1981), bir çok *Bacillus sp*' den farklı özellikteki proteazların üretimi için uygun sıvı besiyerlerinin bileşimleri ile bu enzimlerin bazı özellikleri ve uygulama alanlarını incelemiştir. Değişik araştırmacılar, proteaz üretimi için seçilecek ortamda, esas olarak belli oranda karbonhidrat ve protein kaynakları ile çeşitli tuzların bulunmasının yeterli olduğunu belirtmişlerdir. (Keay vd., 1972). Frankena vd., Kole vd., Manachani, Kadrekar vd. ve Moon 'nın proteaz üretimi için önerdikleri besi yeri bileşimi Tablo 2.2. ve 2.3. 'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Bildirilen karbon kaynakları ve derişimleri.

Bileşen (g/L)	Frankena vd (1985)	Kole vd. (1988)	Manachani (1988)	Kadrekar vd. (1990)	Moon (1991)
Mikroorganizma	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thermoruber</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus formis</i>
Glukoz	10 mM	5.0 g/L	15 g/L	1.0 g/L	6.0 g/L
Fruktoz	-	-	-	-	-
Maya özütü	-	-	5.0 g/L	3.0 g/L	0.3 g/L
Pepton	-	-	-	6.0 g/L	-
Et özütü	-	-	-	1.5 g/L	-
Na-glutamat	-	-	-	-	-

Tablo 2.3. Bildirilen inorganik bileşikler ve derişimleri.

Bileşen (g/L)	Frankena vd (1985)	Kole vd. (1988)	Manachani (1988)	Kadrekar vd. (1990)	Moon (1991)
Mikroorganizma	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thermoruber</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus formis</i>
NH ₄ Cl	2.0 g/L	-	-	-	4.0 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.2 g/L	-	-	-	20.0 mg/L
MgSO ₄	-	-	-	-	0.7 g/L
MgSO ₄ .4H ₂ O	-	-	-	10 g/L	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/L	0.5 g/L	--	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	10 g/L	0.024 g/L
Ca ⁺²	-	-	2.0 mM	-	-
CaCl ₂	-	0.015 g/L	-	10 g/L	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.2 mg/L	3 mg/L	2.0 mM	-	-
CuSO ₄	-	-	-	-	-

Tablo 2.4. Enzim üretimi için kullanılacak bir besiyerinin temel bileşenleri (Aunstrup 1979).

Proteinler	Soya unu, pamuk tohumu unu, mısır ıslatma suyu, maya hidrolizati, peynir altı suyu, gluten
Karbonhidratlar	Nişasta hidrolizati, sakkaroz, mısır, arpa, buğday
Tuzlar	Fosfat, nitrat, magnezyum ve amonyum tuzları ile kalsiyumlu tuzlar

Aunstrup (1979), bir araştırmasında endüstriyel amaçlar için enzim üretiminde kullanılabilecek bir besi yerinin genel bileşenlerini belirlemiştir (Tablo 2.4.). Keay vd. (1972), *Bacillus* proteazlarında maksimum verimi sağlayabilmek için üretim besiyerinde, sıcaklığın 30-40 °C ve pH'nın ise 7.0-8.0 civarında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Changir (1987), bir *Bacillus* spp.'den proteaz enziminin saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin saptanmasına yönelik bir çalışmada ise gelişme ve proteaz üretimi için en uygun karıştırma hızının 150 rpm olduğunu belirtmiştir. Keay vd. (1972) ise, bir çok bakteri ve küften proteaz üretimi üzerine yaptığı araştırmalarda, 240 rpm çalkalama hızına ayarlı inkübatör kullanmışlardır. Atkinson ve

Mavituna (1983), tüm enzim fermentasyonlarının aerobik olduğunu ve bu nedenle havalandırmanın önemli olduğunu vurgulamışlardır.

pH ve sıcaklık mikroorganizmanın gelişmesi, çoğalması ve protein (enzim) üretmesi açısından çok önemlidir. Her mikroorganizma için optimum pH ve sıcaklık değerleri farklı olduğu gibi, mikroorganizmaların çoğaldıkları ve üretim yaptıkları pH ve sıcaklıklar da birbirinden genellikle farklıdır. Çeşitli mikroorganizmalarla birbirinden farklı pH ve sıcaklıklarda çalışmalar yapıldığı bildirilmektedir. Frankena vd. (1992) pH=7 ve 37 °C’de, Kole vd. (1988) pH=6.9-7.2 ve 35 °C’de, Wright vd. (1992) pH=7.5 ve 34 °C’de, Kadrekar ve Ramasarma (1990) pH=7 ve 37 °C’de, Manachani vd (1988) pH=9 ve 45 °C’de, Moon ve Parulekar (1991) pH=7.7 ve 37 °C’de, Janssen vd. (1991) pH=7.5 ve 70 °C’de çalıştıklarını bildirmişlerdir.

2.6. Proteaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

Herhangi bir enzimin katalitik aktivitesi genelde teorik maksimum hızı sağlayacak optimum koşullar altında substratı dönüşüme uğratma hızı olarak tanımlanmaktadır. Burada söz konusu olan substrat, her zaman için enzimin doğal ortamındaki substratın aynısı olmak durumunda değildir (Dinçkaya, 1997).

Enzimler, birim miktardaki aktiviteleri temelinde satılmaktadır. Dolayısıyla enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan yöntem, öncelikli olarak ekonomik bir önem arz eder. Ne yazık ki, proteaz aktivitesini belirlemek kolay değildir. Örneğin; enzim aktivitesini belirlemek için kullanılan protein substratının birden fazla sayıda oluşu, aktivite ölçümleri arasında korelasyon kurmayı güçleştirmektedir. Proteaz aktivitesi ölçümlerinde kullanılan substratlardan, azocoll, kazein, hammerstain kazein, hemogloblin, azokazein, okside edilmiş insülin βzinciri ve 30 farklı sentetik peptiddir. Proteazların sustratlardaki hangi bağı ve ne kadarını hidrolizlediklerini direkt olarak belirlemek ve bu hidrolizin otodigestion olup olmadığını saptamak çok zordur. Bu nedenle proteaz aktivitesinin belirlenmesi kısmen iyi tanımlanmış, ucuz ve kolay bulunan bir substratın enzim ile muamelesini, reaksiyon sonunda enzim inaktivasyonunu ve reaksiyon ürünlerinin belirlenmesini içermektedir .

Hidroliz ürünlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan spektrofotometrik yöntemde, hidroliz ürünlerinin 280 nm’de UV absorbanslarını ve folin reaktifi ile 660 nm’de absorbanslarını ölçmek, proteaz aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesinde birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Horikoshi, 1971; Manachini, 1988; Takami vd., 1990). 280 nm’deki UV absorpsiyonunun büyük bir kısmından aromatik aminoasitler sorumlu olduğu için, elde edilen absorbans veya proteaz aktivitesi çözünmüş formda bulunan bir aromatik aminoasit olan

trozin miktarı ile ilişkilidir. Bu nedenle, proteaz aktivite birimleri standart ölçüm koşullarında, enzim tarafından dakikada oluşturulan trozin miktarı (μgr veya μmol) larak ifade edilmektedir.

Aunstrup (1980), enzim aktivitesi tayinlerinde kullanılan yöntemlerin, 1890 yılında üretilen ilk ticari enzim preparatı olan Takadiastazından bugüne kadar temel olarak çok fazla değişmediğini bildirmiştir. Bu yöntemlerde kısaca, aktivitesi belirlenecek enzim ile bu enzime uygun bir substrat, optimum pH ve sıcaklıkta belli süre reaksiyona sokulmakta, bu süre sonunda reaksiyon durdurulmakta ve oluşan ürün miktarına göre enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Buna göre, proteaz aktivitesi tayinlerinde en çok kullanılan yöntemler Tablo 2.5. 'de verilmiştir.

Tablo 2.5. Proteaz aktivitesi tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemler (Aunstrup 1980).

Yöntem Adı	Substrat	Aktivite Tayin Yöntemi
Anson	Kazein, hemoglobin	Aromatik amino asitlere göre spektrofotometrik olarak
Kunitz	Kazein	Aromatik amino asitlere göre spektrofotometrik olarak
Löhlein Volhard	Kazein	Hidroklorik asit ile titrasyon
Dimetil Kazein	Dimetil kazein	Trinitrobenzen sülfonik asit ile birincil amino gruplarının reaksiyon ürününe göre kolorimetrik olarak
Azokazein	Diazotize kazein	Hidroliz ürünlerine göre kolorimetrik olarak
Berridge	Süt	Sütün pıhtılaşmasına göre

2.7. Endüstriyel Proteaz Üretim Prosesi

Proteaz üretiminde iki ortam kullanılmaktadır. Bunlar yarı katı ve sıvı ortamdır (Keay, 1972). Yarı katı ortam geleneksel olarak kullanılan mikrobiyal enzim üretim prosesidir. Hala bazı fungal proteazların üretiminde kullanılmaktadır. Sıvı kültürle enzim üretiminin; düşük maliyet, düşük bulaşma riski ve prosesin kontrolünün kolay olması gibi üstünlükleri vardır. Günümüzde enzim üretimi sıvı ortam kullanılarak yapılmaktadır. Proteaz üretiminde;

1. Biyodönüşüm,
2. Ürünün geri kazanımı

prosesin iki önemli aşamasıdır.

Mikrobiyal enzim üretimi için kullanılan biyoreaktörler ve biyoproses ayırma üniteleri genellikle küçük sistemlerdir. Geleneksel olarak endüstride kullanılan ekipmanlar özellikle antibiyotik sanayinin etkisi altında kalınarak tasarlanan sistemlerdir.

Serin alkali proteaz üretiminde kullanılabilecek potansiyel bakteri türleri aerobik olduğundan biyoreaktör tasarımında oksijen aktarımı (özellikle ürün seçimliliği de düşünülerek) kritik parametre olmalıdır. Hücre dışı enzimler kesikli sistemlerde 30-150 st arasında üretilirler.

Endüstriyel enzimlerin biyoproses ürün karışımından ayrılması için genellikle kesikli üretim sonunda biyoproses ürün karışımı (mikrobiyal bulaşmayı önlemek için) hızla yaklaşık 5 °C 'ye soğutulur. Soğutma işleminden sonra hücre ve çözünmeyen katılar filtrasyon ve santrifüj işlemleri ile uzaklaştırılır. Ayırma işlemi, çözeltiye bir koagülasyon veya flokülasyon bileşiğinin eklenerek enzimin çöktürülmesi ile devam eder. Koagülasyon için kalsiyum sülfat veya fosfat, sodyum sülfat gibi elektrolitler; veya daha etkin koagülasyon için poliaminler gibi sentetik polielektrolitler kullanılır. Klasik filtrasyon kullanıldığında ise diatome toprağı kullanılarak filtrasyonda ön kaplama yapılmalıdır.

Modern biyoproseslerde ince film buharlaştırma, ultrafiltrasyon, kolon kromatografisi, afinite kromatografisi, iyon değişimi, dondurarak kurutma gibi ayırma işlemleri kullanılmalıdır.

3. BİYOPROSES İŞLETİM PARAMETRELERİ

3.1. Biyoteknolojik Proseslerde Üretimi Etkileyen Parametreler

C kaynağı, N kaynağı, P kaynağı, inorganik tuzlar, vitaminler girdi olarak kullanılarak, mikrobiyal, bitki doku veya hayvansal doku hücrelerinin, enzimlerin veya biyolojik sistemlerin kullanılmasıyla üretilen ürünlere "biyoteknolojik ürünler", bu ürünlerin (antibiyotikler, farmasötik proteinler, amino asitler, organik asitler, enzimler) elde edildiği ve çeşitli ayırma işlemleri ile istenen niteliğe getirildiği proseslere de "biyoteknolojik prosesler" denir.

Biyoteknolojik proseslerde üretimi etkileyen biyoproses ve biyoreaktör parametreleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir :

1. Mikroorganizma
2. Ortam tasarımı
3. Biyoreaktör işletim türü
4. Biyoreaktör işletim parametreleri
 - a) pH ve sıcaklık
 - b) Oksijen aktarımı ve stratejisi
 - Havalandırma hızı
 - Karıştırma hızı

3.1.1. Mikroorganizma seçimi

Biyoteknolojik proseslerde istenilen nitelikte ve nicelikte ürün üretmenin birinci koşulu onu üretebilen uygun mikroorganizmayı seçmektir. Mikroorganizmalar farklı ürünler üretebildikleri gibi, aynı ürünü üretebilen farklı mikroorganizmalar da vardır. 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 de geliştirilmesi araştırma geliştirme ile artık mümkündür.

Bazı mikroorganizmalar çok sıcak veya çok soğuk, asidik veya bazik gibi ekstrem şartlarda üretim yapabilirler. Örneğin denizden izole edilen mikroorganizmalar (izole edildikleri yerlere bağlı olarak) çok yüksek basınçlara dayanabilirler. Birçok mikroorganizma için ürettikleri spesifik kararlı proteinler belirlenmiş ve özellikleri araştırılmıştır. İstenilen kararlılıkta ve istenilen katalitik etkiye sahip enzimi üreten mikroorganizmayı bulmak için birçok mikrobiyal türün araştırılması gerekir.

3.1.2. Ortam tasarımı: Bileşenler ve bileşimleri

Üretim potansiyeli olan mikroorganizma seçimi yapıldıktan sonra biyoteknolojik proses ile istenilen ürünün maksimum ürün verimi ve seçimliliği sağlanarak üretilmesi için uygun ortam bileşenlerinin belirlenmesi ve optimum bileşimlerin bulunması için fizyolojik araştırma gerekmektedir. Biyodönüşüm ortamında mikroorganizmanın çoğalması, istenilen ürünü sentezlemesi ve diğer işlevlerini gerçekleştirebilmesi için ortamda gerekli maddeler bulunmalıdır. Ortam bileşimi ürün için farklı, hücre çoğalması için farklı olabilir. Bu nedenle amaç doğrultusunda ortam tasarımı yapılır. Hazırlanan biyoproses ortamı, belirli bir mikroorganizmanın çoğalması, fizyolojik yaşamını sürdürebilmesi ve istenen ürünü üretebilmesini sağlayacak nitelikte gerekli maddeleri içermelidir. Mikroorganizmalar için gerekli bileşikler, genel olarak aşağıdaki temel gruplara ayrılır:

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

Mikroorganizmalar için gerekli bileşikleri içeren ortamlar "tanımlanmış", "yarı tanımlanmış" ve "kompleks" olmak üzere üç grupta incelenebilir. Tanımlanmış ortama "sentetik ortam" da denilebilir. Bu durumda bileşenlerin derişimleri net olarak bilinir. Yarı tanımlanmış ortam az sayıda derişimi net bilinmeyen bileşen içerir. Kompleks ortam ise çok sayıda derişimi net bilinmeyen bileşen içerir. Örneğin ortamda kazein, soya, mısır altı şurubu, nişasta, melas vb. maddeler varsa hücrenin ilgili enzimleri üretmesiyle bu maddeler proses boyunca hidrolizlenecek ve miktarları çok iyi tanımlanamayan bir biçimde değişecektir. Çok sayıda bileşen içermeleri sebebiyle kompleks ortamların analizlerini yaparak tam olarak bileşimlerinin bulunması güçtür.

Mikroorganizmalar türüne de bağlı olarak farklı bileşikler tüketirler. Bu yüzden mikroorganizmadan mikroorganizmaya ortam tasarımı değişmektedir. Biyoproseslerde, mikroorganizmalar için gerekli ortamları oluşturan ana maddeler ve bunların özellikleri aşağıdaki temel gruplara ayrılmıştır:

3.1.2.1. Karbon kaynakları

Anaerobik metabolizmada biyoproses ortamındaki karbonun yaklaşık % 10'u; aerobik metabolizmada ise % 50-55'i hücre yapısını oluşturmak üzere kullanılır. Genel olarak ortama katılan karbonlu bileşikler mikroorganizmalar tarafından aynı zamanda enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Karbon kaynağı olarak en sık kullanılan bileşikler karbonhidratlardır. Özellikle kompleks ortamı oluşturan melas, nişasta, selüloz vb. karbonhidratların kullanılması ekonomik açıdan da yararlıdır. Ayrıca hidrokarbonlar, alkoller, yağ ve yağ asitleri de karbon kaynağı olarak kullanılabilir.

Bazı mikroorganizmalar, karbon kaynaklarını seçimli olarak kullanılabilir. Yani ortamda birden fazla karbon kaynağı varsa mikroorganizma önce en az enerji harcayarak metabolize edilecek kaynaktan başlamak üzere sıra ile karbon kaynaklarını kullanır.

Bir çok proseste karbon kaynakları ürün oluşumunu hızlandırdığı halde bunların fazlası katabolit gerilettiği etkisi göstererek ürün oluşumunu yavaşlatabilir. Bu tür proseslerde çoğalmayı hızlandıran karbon kaynağının fazlasından kaçınılmalı, buna ek olarak ürün oluşum hızına olumsuz etki etmeyen yada bu olayı hızlandıran karbon kaynağı ile ortamdaki karbon eksikliği giderilmelidir (Pekin, 1980).

3.1.2.2. Azot kaynakları

Biyoteknolojik proseslerde kullanılan azot, basit inorganik kaynaklardan (amonyak, nitrat ve amonyum tuzları gibi) kompleks karışımlara (maya ekstraktı, pepton, pamuk çekirdeği unu gibi) kadar geniş bir alandan sağlanabilir. Çoğunlukla amonyak, amonyum sülfat yada amonyum fosfattan yararlanılır. Bazı mikroorganizmalar ise yalnız organik asit kullanırlar. Saf organik azot bileşikler oldukça pahalıdır. Soya, kazein, mısır altı şurubu, balık unu, maya unu, peynir altı suyu gibi kompleks azot kaynaklarının kullanımı ise oldukça ekonomiktir. Azotlu maddelerin de fazlası üretime olumsuz yönde etki edebilir. Azot kaynakları da bazı durumlarda enerji kaynağı yerine geçebilmektedir (Pekin, 1980).

3.1.2.3. Eser elementler

Mikroorganizmalar karbon ve azot kaynaklarının dışında Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn vb. elementlere de ihtiyaç duyarlar. Fosfor, sülfür ve esansiyel katyonlar genellikle inorganik tuzlardan sağlanır. İz elementler bazen özellikle ortama eklenir, fakat sıklıkla su ve diğer ortam bileşenlerindeki safsızlık olarak bulunur.

Eser elementlerin fazlası mikroorganizmanın gelişmesine karşı inhibitör etkisi gösterebilir. Ayrıca bazı iyonlar ortamda bulunan amino asit, hidroksi asit, protein vb.

maddelerle yada oluşan ürünlerle kompleks oluşturarak biyoproses işlemine olumsuz etki yapabilmektedir. İnhibitör etkisi gösteren bu elementlerin fazlasının çıkarılması, mikroorganizmalar için gerekli ortamın hazırlanmasında göz önüne alınması gereken en önemli hususlardan biridir (Pekin, 1980).

3.1.2.4. Diğer bileşikler

Bazı durumlarda mikroorganizmaların büyümeleri için ortamda vitamin (tiamin, biyotin) gibi büyüme faktörüne de ihtiyaç bulunabilir (Rehm, 1987; Pekin, 1980). Ortam dizaynında, indüktör etkisi de göz önünde bulundurulmalıdır. Bazı ürünler sadece spesifik indüktörlerin varlığında sentezlenirler. Tablo 2.1.'de bazı ticari enzimler için örnek indüktörler verilmiştir. Ortam bileşiminde ürün veriminin etkilendiği bir diğer durum ise yüzey aktif maddelerle temas halinde bulunan mikrobiyal hücrelerden ekstraselüler enzimlerin salgılanımının artırılmasıdır. Ortama yüzey aktif maddelerin eklenmesiyle meydana gelen bu artış, hücre duvarının geçirgenliğinin artmasından kaynaklanabilir.

3.1.3. Biyoreaktör işletim türü

Biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde kullanılan iki ana proses vardır. Biyoprosesler daldırmalı (derin) kültür tekniği veya yüzey kültür tekniği (katı hal fermantasyonu) ile gerçekleştirilir ve biyoreaktörlerde uygulanan tekniğe göre şekillenirler.

3.1.3.1. Daldırmalı Kültür Tekniği

Daldırmalı fermantasyon, sıvı ortamda çözünmüş yada katı süspansiyon halindeki nütriyentleri kullanan, süspanse haldeki mikroorganizmaların gelişmesiyle oluşur. Bu yöntemde mikroorganizma besiyerinin içerisinde geliştirilir. Gerekli hava substratın yüzeyi üstünde bulunur veya havalandırma düzeni yardımıyla substrat içerisine verilir.

En basit daldırma metodu, aşılınmış sıvı kültürünün çalkalanmasıdır. Bunun için dairesel veya yatay hareketler yapan çalkalama makinelerine yerleştirilen erlenler, istenilen hız, süre ve sıcaklıkta çalkalanır. Fakat daha büyük hacimde çalışmalar için daldırma biyoreaktörleri kullanılır. Daldırmalı fermantasyon için bir çok reaktör sistemi vardır.

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

Mevcut sistemlerinin çeşitliliğine rağmen pratikte ağırlıklı olarak 1. türden karıştırmalı reaktörler kullanılır.

Bu yöntemde uygun büyüklükteki (10-15 lt) karıştırmalı bir tanka gerekli bileşimde hazırlanan hammaddeler beslenir. Burada istenen pH'ya ayarlanır ve sürekli HTST sterilizasyon birimi yardımıyla daha önceden buharla sterilize edilmiş fermentör kaplarına pompalanır. Eğer gerekirse, köpük kırıcı maddeler, viskozite ve çözünübilirliğini ayarlayan bazı maddeler steril ortama ayrıca ilave edilir (Topal, 1985). Diğer koldan mikroorganizma fermentasyon prosesi üretim tankına gelmeden önce birkaç aşı hazırlama safhasından geçer. Kullanılan tanklar fermentasyon ortamının korozif özelliklerine uygun bir paslanmaz çelikten geniş bir basınç aralığında (tipik olarak vakumdan 20 kPa basıncına kadar) çalışacak şekilde dizayn edilir. Proseste, aerobik mikroorganizmalar kullanılırsa, fermentasyon ortamına steril hava verilmesi gerekir. Ayrıca oksijenin gaz fazdan sıvı faza transferi için ortamın karıştırılması gerekmektedir. Verilen hava içerisindeki mikrobiyal hücrelerin uzaklaştırılmasında endüstride kullanılan temel iki prosesten birincisi, hidrofobik silikon esaslı membran filtreler kullanarak yapılır, diğeri ise ısıyla ön sterilize edilebilen lifli maddeleri içeren derin filtreler kullanılarak yapılır (Rehm,1987). Sterilize edilen hava fermentasyon ortamına tek veya çok girişli dağıtıcı bir sistem yardımıyla verilir. Karıştırma ise dikey olarak dönen bir şaft üzerine bindirilmiş çok bıçaklı disk türbinlerle yapılır.

Aerobik mikrobiyal büyüme ekzotermik bir prosestir ve ısı üretilir. Havalandırma ve karıştırma prosesleriyle ısı dağılımına ilave olarak fermentasyon sıcaklığını 30-35°C'de tutmak için ortamdaki ısı uzaklaştırılmalıdır. Bakteriyel fermentasyonda daha fazla metabolik ısı üretilmektedir ve bu bazı durumlarda diğer organizmalar için olan değerin iki katı olabilir. Büyümeyi ve enzim üretimini kontrol edilen bir ortamda sürdürebilmek için çeşitli parametreler hem aşı geliştirme hem de fermentasyonla üretim aşamasında dikkatlice incelenmelidir. Fermentasyon ortamının sıcaklığını, soğutma suyunun sıcaklığını, sıvı hacmini, karıştırıcı hızını, gücünü veya torkunu, hava ve sıvı besleme hızını kültür ortamındaki köpük varlığı gibi fiziksel parametreleri izlemek için çeşitli cihazlar kullanılır.

Fermentasyon kesikli, yarı kesikli ve sürekli kültürasyon metotlarından biriyle yapılabilir. Kesikli kültür fermentasyonda başlangıçta gerekli olan tüm bileşenler (nütriyentler ve hücreler) fermentöre ilave edilir. Kültür ortamında büyüme ilerledikçe nütriyentler harcanır mikrobiyal kütle artar. Bir kesikli fermentasyon için gerekli zaman, sağlanacak çalışma koşullarına göre birkaç saatten birkaç haftaya kadar değişebilir. Bu süre sonunda fermentör ortamı çeşitli ayırma yöntemleri ile ayrılır. Ürün kazanımı amacıyla alt akım işlemleri uygulanır.

Kesikli fermentasyon biyoteknolojik ürünlerin üretiminde tercih edilen bir metot olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Bununla birlikte substrat tarafından katabolit represyon meydana

geldiği zaman sınırlı karbon koşullarında çalışabilmek için alternatif olarak yarı kesikli fermantasyon kullanılabilir. Bu tür proseslerin esas özeliği, maksimum üretim periyodunu uzatmak için ilave nütriyentlerin fermantasyon ortamına beslenmesidir. Yarı kesikli sistemlerde, yüksek substratlı kesikli fermantasyona göre biokütle üretimi azalmaktadır ve böylece kütle ve oksijen transfer mekanizmaları kolaylaşmaktadır.

Alternatif bir operasyon şekli sürekli kùltivasyondur. Burada sürekli olarak kùltüre steril taze nütrient beslenirken aynı zamanda ortamdan eşit hacimde karışım fermantörden çekilir. Fermantörü terk eden biokütle ile hücre büyümesi dengededir. Kemostat olarak adlandırılan sürekli kùltür sisteminin en yaygın kullanılan tipi ortamın beslenmesini içeren biri hariç tüm nütriyentleri aşırı olacak şekilde dizayn edilir. Bu koşullar altında kararlı halde kùltürün spesifik büyüme hızı, seyrelme oranı olarak adlandırılan besleme hacminin kùltür hacmine oranı yardımı ile belirlenir. Kùltürün biokütle konsantrasyonu besleme ortamındaki sınırlayıcı komponentin konsantrasyonu tarafından belirlenir. Sürekli kùltür, klasik kesikli fermantasyon kùltüründen daha yüksek verimlilik ve spesifik nütriyentin sınırlandırılmasıyla represyon mekanizmalarının etkilerini hafifletebilmesine rağmen, ticari üretim proseslerinde oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebini dört başlık altında inceleyebiliriz.

- a) Sürekli proseslerin uzun sürelerinden dolayı mikropların oluşmasıyla ürünlerin kontaminasyonu muhtemeldir.
- b) Hızlı büyümek için suş ilkel özelliklerini tekrar gösterirse dejenerasyonla düşük enzim üreten suş oluşur.
- c) Gerçektende kesikli kùltürde çoğu ekstraselüler enzim verimi daha azdır ancak daha yüksek verimine rağmen sürekli kùltürün teknik olarak daha karmaşık ve daha yüksek riske sahip olmasından dolayı fazla tercihe edilmektedir
- d) Ticari enzim üretim proseslerinde yaygın olarak kullanılan kompleks ortamda büyümeyi sınırlayan nütriyentin yapısının kesin olarak belirlenebilmesindeki güçlüklerdir.

3.1.3.2. Yüzey Kùltür Tekniğı (Katı Hal Fermantasyonu)

Bu yöntemde mikroorganizma sıvı, yarı katı veya katı substratın yüzeyinde gelişir. Bu sırada genellikle besiyeri üzerinde, mikroorganizma hücreleri ve bunların metabolitlerinden ibaret bir tabaka yada misel örtüsü oluşmaktadır. Mikroorganizmalar besiyerinin üzerindeki bu zar üzerinde gelişirler. Metabolizma ürünü hücre içinde kalır, ortama salgılanır ya da her iki halde de bulunur. Besi ortamı sıvı, katı veya yarı katı karakterde olabilir. Bu yöntemde geniş ve yayvan biçiminde çeşitli tür kaplar kullanılır. Yüzey büyüdükçe yüzeydeki misel örtüsünün havalandırılması o kadar kolay olur.

Katı hal fermantasyonu (KHF), düşük nem seviyesi veya su aktivitesinde katı substratların fermantasyonudur. Tipik bir daldırma fermantasyonunun su içeriği % 95'den fazladır. KHF'nda su içeriği % 40 ile % 80 arasında değişir.

Katı hal fermantasyonu, biyokimya ve mikrobiyoloji prensipleri tam olarak anlaşılmadan yüzyıllarca ürün eldesi için kullanılmıştır. Katı hal fermantasyonuyla üretim "koji" prosesine dayanır. Japonların geleneksel koji prosesi, 25-30 °C' de havalandırmalı bir ortamda tabakalarca istiflenmiş sepetlerde yüksek nemlilikte aşılanmış substratın fermantasyonuyla meydana gelmektedir. Substrat olarak genellikle pirinç, buğday veya soya fasulyesi gibi nemli maddeler kullanılırdı. Bu substratlar üzerinde *Aspergillus oryzae* gibi filamentli mantarların gelişmesiyle enzim karışımı üretilir ve besinlerin tadı değiştirilirdi. Bu tür endüstriyel proseslerin kontrolü çok güçtür. Bu proseslerde hedeflenen modifikasyonlar sıcaklık, pH ve nemlilik gibi çevresel koşulların kontrolünü kolaylaştırmak ve bu kontrolleri fermantasyon yığının tümünü etkileyecek şekilde geliştirmektir. Yakın zamanda yem olarak kullanılan tarımsal yan ürünlerde protein zenginleştirmede, enzim, organik asit ve diğer metabolitlerin üretiminde kullanımı yaygınlaşmıştır (Ooijkaas vd., 2000; Orhan, 2002).

Endüstriyel katı hal fermantasyonunun pek çoğu aerobik ortamda gerçekleştirildiğinden fermantasyon şartları oksijen transferinin ve CO₂ ' yi ortamdan uzaklaştıracak şekilde ayarlanmalıdır. Ayrıca substrat olarak kullanılan partiküllerin büyüklüğü de katı hal fermantasyonunda oldukça önemlidir. Çünkü iyi bir gaz ve ısı transferi için partiküller arasındaki boşluğun optimize edilmesi gerekir. Isının uzaklaştırılması, sistemin hava akış hızının artırılmasıyla nispeten kolaylaştırılabilir.

Katı hal fermantasyonunun avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- a) Daha düşük maliyet; kullanılan substratlar genellikle kolay elde edilebilir ve ekonomik olan buğday kepeği, tahıl tanesi, baklagiller v.b.maddelerdir
- b) Daha basit bir teknik ve daha az enerjiye ihtiyaç vardır. Kullanılan ekipmanlar düşük güç harcarlar
- c) Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için kontaminasyona sebep olacak bakteri türlerinin üremesi inhibe edilmiş olur
- d) Sistemi terkeden atık suyun daha az olması
- e) Köpük oluşumunun olmaması
- f) Daha fazla prodaktivite

Bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Bunları da şöyle sıralanabilir.

- a) Düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen mikroorganizmalar ile sınırlı olması.
- b) Proses parametrelerinin ölçümü kültürün homojen olmamasından dolayı güçtür. Sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi parametrelerin kontrolü zordur.
- c) Biyokütle miktarının kolaylıkla ölçülememesi.
- d) Substrat için nem oranının tam olarak kontrol edilememesi.

3.1.4. Biyoreaktör işletim parametreleri

İşletim sistemine bakılmaksızın (kesikli, yarı kesikli yada sürekli) havalandırma hızı, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen, pH ve kültür sıcaklığı fermentasyonu etkileyebilen faktörlerdir.

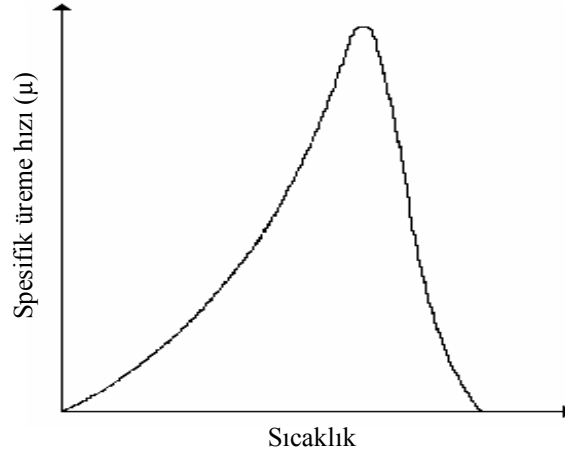
3.1.4.1. pH

Her mikroorganizmanın özgün bir iç pH değeri vardır ve hücreler yaşamları süresince bu pH değerini sabit tutmaya çalışırlar. Ortamdaki hidrojen iyonu derişimi hücrenin metabolik faaliyetlerine bağlı olarak değişir ve hücre dışındaki değişimlere rağmen hücre, iç pH değerini sabit tutar. Ortam pH' sına bağlı olarak hücreiçi tepkimeler ve hızları değiştiğinden, biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, çoğalma ve istenen ürünün üretimi için farklı optimum pH değerine yada aralığına sahip olabilirler. Ayrıca biyoproses süresince pH, kullanılan karbon kaynaklarının farklı ürünlere dönüşmesiyle değişme eğilimindedir. Karbonhidratlar , örneğin glikoz kullanıldığında, hücreiçi tepkimelerle oluşan organik ve amino asitlerin ortama salgılanmasıyla birlikte ortam pH' sında önce düşme, ortama salgılanan metabolitlerin tekrar hücreye transferi ve kullanımıyla da sonra artış gözlenir. Sonuç olarak biyoüretim sürecinde verim ve seçimlilik açısından dış ortamın pH' sını belli değerde ya da aralıkta tutmak gerekebilir (Pekin, 1980).

3.1.4.2. Sıcaklık

Mikroorganizmalar genel olarak üç gruba ayrılabilirler. 20°C veya daha düşük sıcaklıklarda optimum büyüme gösteren psikrofiller, 35°C civarında optimum gösteren mezofiller, büyüme sıcaklığı 50°C' den fazla olan termofillerdir. Her bir sınıf içinde optimum değere doğru sıcaklık artarken spesifik büyüme hızı Arhenius eşitliğindeki ($\mu = Ae^{-E/RT}$) gibidir (Şekil.3.1). Ancak optimum değer in ötesinde sıcaklığın daha fazla artmasına rağmen büyüme hızlı bir şekilde azalmaktadır. Büyüme zamanlarını minimize etmek için kültür sıcaklığı mümkün olduğunca optimum sıcaklığa yakın olmalıdır.

Biyodönüşüm ortam sıcaklığı, mikroorganizma çoğalma hızını olduğu gibi karbon ve enerji kaynaklarının kullanım hızını ve ürün oluşum verimliliğini de etkiler. Her biyoproses için mikroorganizmanın çoğalmasının ürün oluşumunun maksimum olduğu bir sıcaklık veya sıcaklık aralığı vardır.



Şekil 3.1. Sıcaklığın fonksiyonu olarak spesifik büyüme hızı (Rehm,1987)

3.1.4.3. Oksijen aktarımı

Aerobik proseslerde mikrobiyal hücreler solunum, çoğalma, substrat tüketimi ve ürün sentezi gibi metabolik faaliyetlerini sürdürebilmek için gerekli olan temel girdilerden biri oksijendir. Bu nedenle biyoproses ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı önemlidir. Oksijen aktarımı, ürün verimi ve seçimliliğini etkiler. Bir biyoproseste oksijen gereksinimi ve aktarım hızı, mikroorganizma türüyle, biyodönüşüm ortamının fiziksel özelliği ile, biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu ile ilgilidir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen/hava giriş hızı ve karıştırma hızı önemli işletim parametrelerindendir.

Çözünmüş oksijenin metabolizmaya yeterli hızda aktarılıp aktarılmadığının bilinmesi, oksijen aktarım katsayısı (k_La) belirlenmesi ile mümkündür. k_La , mikroorganizma türüne, biyo ortamın özelliklerine (viskozite, sıcaklık vs.), biyoreaktörün ve karıştırıcının boyutlarına, karıştırma ve havalandırma hızlarına bağlıdır (Aiba vd., 1973). k_La 'nın belirlenmesi için çeşitli deneysel ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir (Wang vd., 1979). Bunlardan en yaygın olarak kullanılan dinamik yöntemdir. Kolay uygulanabilir olması ve gaz içerisindeki bileşenlerin analizine ihtiyaç duyulmaması yöntemin avantajları arasındadır (Van't Riet, 1983). Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu ile çözünmüş oksijen derişiminde azalmanın, havanın tekrar sisteme verilmesi ile de artışın incelenmesi prensibine dayanır (Rainer, 1990).

Yatışkın olmayan koşulda kütle korunum denklemi $k_L a$ cinsinden yazılacak olursa denklem (3.1) elde edilir.

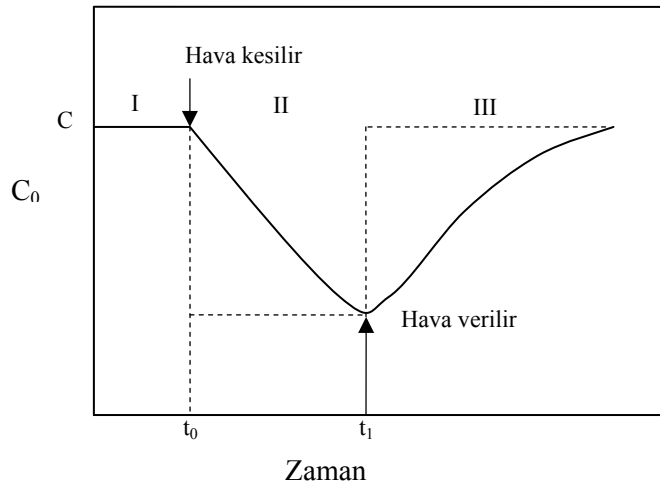
$$k_L a (C_o^* - C_o) + r_o' C_x = \frac{dC_o}{dt} \quad (3.1)$$

Zamanla oksijen derişimi değışimi Şekil 3.2.'deki gibi karakterize edilmektedir. Havanın kesildiği t_0 anına kadar biyoreaktörde çözünmüş oksijen derişimi yatışkın koşulda C gibi bir değerdedir ve t_1 anında hava yeniden verilmektedir. t_0 anından t_1 anına kadar zamanla çözünmüş oksijen derişimindeki azalma gözlenir. Burada oksijen aktarımı gerçekleşmediğinden $k_L a(C_o^* - C_o)$ terimi sıfıra eşittir ve denklem 3.1 denklem 3.2'ye indirgenir.

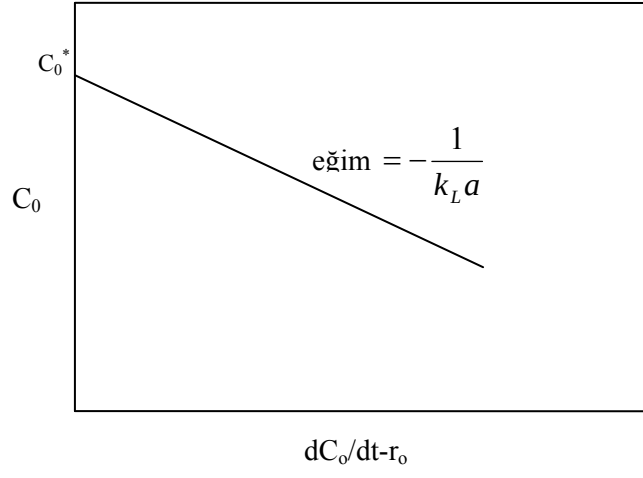
$$\frac{dC_o}{dt} = r_o \quad (3.2)$$

$$r_o = r_o' C_x \quad (3.3)$$

Denklem (3.2.)'den oksijen tüketim hızı r_o bulunabilir. t_1 anında hava gönderilmesi ile çözünmüş oksijen derişiminin zamanla artışı gözlenmektedir. Bu durumda denklem (3.1) geçerlidir. Denklem (3.1) ve (3.2)'den yararlanılarak $\{(dC_o/dt-r_o); C_o\}$ grafiği elde edilir (Şekil 3.3). Bu grafiğin eğiminden $k_L a$ hesaplanır.



Şekil 3.2. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değışimi



Şekil 3.3. Sıvı faz kütle aktarım katsayısının belirlenmesi

4. REAKSİYON KİNETİĞİNİN MODELLENMESİ

4.1. Giriş

Biyolojik proseslerin performansı genellikle amprik yöntemlerle incelenmektedir. Bu yaklaşımda biyoreaktörün davranışı tüm işletme koşullarında incelenir ve sonuçlardan yeni işletme koşulları için biyoreaktörün performansı tahmin edilir. Bu amprik yaklaşım prosesin ayrıntıları üzerinde çok az düşünce gerektirir. Uygun görünmesine karşın bu yöntemin pek çok olumsuz yanı vardır. Her türlü proses koşullarını kapsamaları için çok sayıda deney gereklidir.

Buna karşın modelleme yaklaşımının amacı biyoreaktörün gerçek performansını iyi kurulmuş teoriye dayanarak öngörmeye çalışmaktır. Modelleme sırasında modeli kuran, en önemli proses parametrelerinin proses üzerine etkisini ve her bir parametrenin nicel olarak nasıl belirleneceğini göz önüne almak zorundadır. En önemli değişkenlerin belirlenmesi ve proses üzerine ayrı ayrı etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Dolayısıyla ilgili teorinin kritik bir yaklaşımla sürekli olarak değerlendirilmesi gerektiğinden, modelleme, prosesin daha iyi anlaşılması için bizi zorlar (Sinclair, 1987).

Model kurulduktan sonra ortaya çıkan denklemler çözülür ve modelin öngördüğü ile deneysel veriler karşılaştırılır. Eğer ikisi arasında fark varsa model ile deneysel veriler arasında uyum sağlanıncaya kadar model yeniden gözden geçirilir. Modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu gösterildikten sonra artık model biyoreaktörün performansını çeşitli işletme koşulları altında öngörmek, yeni proses tasarımı yapmak ve optimizasyon ve kontrol için kullanılabilir. Modelin geçerliliğini doğrulamak için deneysel veri gereklidir. Fakat deney sayısı geleneksel amprik yöntemde göre oldukça azdır. Bunun yanı sıra modellemenin en önemli avantajı prosesin daha iyi anlaşılmasını sağlamasıdır (Dunn vd., 1992). Kısaca; amprik yöntemde, biyoreaktörün tüm işletme koşulları altında performansı ölçülür ve aralarında bir ilişki oluşturulmaya çalışılır. Az düşünce fakat çok deney gerektirir. Modelleme de ise model kurulur ve model parametrelerini belirlemek için deney yapılır. Modelin davranışı deneylerle karşılaştırılır ve model, proses tasarımı, optimizasyon ve kontrol için kullanılır. Az deney gerekir ve prosesi daha iyi tanımlar.

Prosesin modellemesinin faydaları şunlardır (Dunn vd., 1992):

- Modelleme prosesin anlaşılmasını kolaylaştırır: Proses modelini kurarken prodesteki karmaşık neden-sonuç ilişkileri ayrıntılı olarak göz önüne alınır. Modelin öngördüğü ile prosesin gerçek davranışının karşılaştırılması prosesin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur. Simulasyon sonuçları bazen uygulamada karşılaşılan fakat açıklanamayan olayların sebeplerinin açıklanmasına yardımcı olur.

- Model deney tasarımına yardımcı olur: Modelin doğru olarak test edilebileceği deneylerin tasarlanması önemlidir. Model parametrelerinin bilinmesi için bazı özel deneyler gerekecektir. Ayrıca hassasiyet analizi (sensitivity analysis) bazı parametrelerin modelin davranışı üzerine etkisinin ihmal edilebilir olduğunu öngörebilir. Dolayısıyla bu etkiler modelden ve deney programından çıkarılabilir.
- Model, tasarım ve kontrol için kullanılabilir: Model kurulduğu zaman prosesin performansını farklı koşullarda öngörmesi gerekir. Ayrıca matematiksel modeller kontrol algoritmalarının tasarımında kullanılabilir ve hatta kontrol algoritmalarının bir parçası olabilir.
- Model eğitimde kullanılabilir: Biyoprosesin çeşitli yönleri basit modeller kullanılarak simüle edilebilir. Herhangi bir etkenin biyoproses performansı üzerine etkisi bu modelleri kullanarak bilgisayarda gösterilebilir. Deneysel olarak bunu yapmak pahalı ve zordur.
- Model proses optimizasyonunda kullanılabilir: Optimizasyon genellikle iki veya daha fazla değişkenin etkisini göz önüne almayı gerektirir. Örneğin birisi karla ilgili iken diğeri maliyetle ilgilidir. Reaktörü maksimum hızda ürünü üretmek üzere işletmek olabilir.

Mikrobiyal üreme ve ürün oluşumu, hücrenin içinde bulunduğu fiziksel ve kimyasal ortama gösterdiği tepkidir. Dolayısıyla üreme ve ürün oluşumunu anlamak için organizmanın içinde bulunduğu ortam ile metabolizması arasındaki ilişkiyi anlamak gerekir. Bir miktar canlı organizma gerekli bileşenleri içeren besiyerine aşılandığı zaman ürer. Üreme iki şekilde gerçekleşir: 1) Hücrelerin sayısı artar ve 2) kütlesi artar. Tek hücreli mikroorganizmaların kütlelerindeki artışa paralel olarak sayıları artar. Küfler (molds) gibi bazı organizmaların ise üreme sırasında kütleleri ve boyutları artar, fakat sayıları artmayabilir. Uygun koşullarda hücreler ortamdaki bileşikleri kullanarak enerji üretirler ve makromoleküllerin yapı taşlarını sentezlerler.

4.2. Kesikli kültürde fermantasyon kinetiği

4.2.1. Balans ve hız denklemleri

Kesikli sistem, biyoproses ortamına giriş ve çıkış akımları olmadığı için kapalı bir sistem olarak değerlendirilir. Kontrol hacmi olarak biyoreaktör içerisindeki fermantasyon ortamı seçilirse, balans eşitlikleri aşağıdaki şekilde yazılabilir:

Giriş hızı - Çıkış hızı + Üretim hızı - Tüketim hızı = Birikim hızı

$$\text{Biomass balansı: } 0 - 0 + r_x V - r_d V = \frac{dx}{dt} V \quad (4.1)$$

$$\text{Ürün balansı: } 0 - 0 + r_p V - 0 = \frac{dP}{dt} V \quad (4.2)$$

$$\text{Substrat balansı: } 0 - 0 + 0 - r_s V = \frac{ds}{dt} V \quad (4.3)$$

Burada;

x : Hücre konsantrasyonu (g/l)

P : Ürün konsantrasyonu (g/l)

S : Substrat konsantrasyonu (g/l)

V : Sıvı kültür hacmi (l)

r_x : Büyüme hızı (g/l-st)

r_s : Substrat tüketim hızı (g/l-st)

r_p : Ürün oluşum hızı (g/l-st)

r_d : Hücrelerin ölüm hızı (g/l-st)

Kesikli fermantasyonda, biyoproses ortamına madde giriş ve çıkışı olmadığından sıvı kültür hacmi sabittir. Mikrobiyal üreme sırasında hücrelerin ölüm hızı (r_d) ihmal edilebilir. Bu durumda eşitlikler şu şekilde ifade edilebilir:

$$r_x = \frac{dx}{dt} \quad (4.4)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (4.5)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (4.6)$$

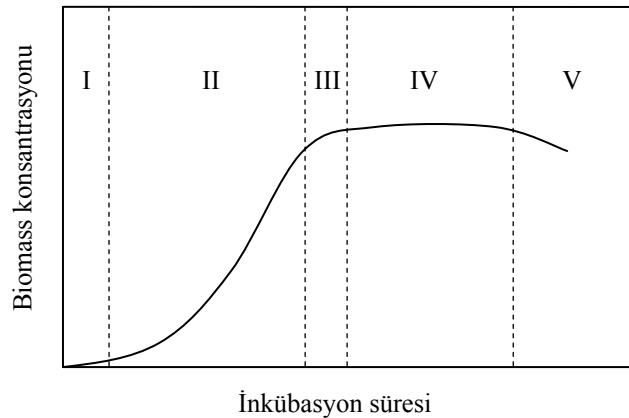
4.2.2. Mikrobiyal büyüme

Herhangi bir besiyeri bir mikroorganizma ile aşılandığı zaman hücreler ortamdan sırasıyla ihtiyacı olduğu bileşikleri alır ve onları biyokütleye dönüştürür. Kesikli (batch) kültürde üreme aşağıdaki safhalardan geçer:

- lag fazı
- logaritmik veya üstel üreme fazı

- yavaşlama fazı
- durağan (stationary) faz
- ölüm fazı

Bu safhalar Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Her safha biyolojik proseslerde oldukça önemlidir. Prosesin amacı lag fazını kısaltmak, logaritmik üreme fazının süresini ve hızını uzatmak olabilir. Lag fazı, hücrelerin besiyerine aşılmasından sonra gözlenen ilk safhadır. Bu sırada hücrelerin yeni ortama adaptasyonu gerçekleşir. Hücreler kendi moleküler yapılarını yeni ortama uyumlu kılacak şekilde yeniden düzenler. Besiyerinde bulunan bileşikleri parçalayıp biyokütle veya ürünlere dönüştürmek için yeni enzimler sentezlenir. Hücreler ortama adapte olduktan sonra logaritmik üreme safhasında hızla çoğalırlar. Hücre sayısı ve kütlesi zamanla üstel olarak artar. Üremenin dengeli olduğu safhadır. Besiyerindeki bileşiklerin derişimleri yüksek olduğundan üreme hızı derişimden bağımsızdır ve hücre derişimine göre birinci mertebededir. Üreme hızı özgül üreme hızı (specific growth rate) ile karakterize edilir. Yavaşlama fazı logaritmik üreme fazını izleyen safhadır. Bu fazda üreme hızı, bazı bileşenlerin azalması veya toksik ürünlerin ortamda birikmesi sonucu yavaşlar. Organizma üzerine uygulanan stres, hücrenin kendisine zararlı olan ortamda yaşama şansını artırmak için hücre iç yapısının yeniden yapılanmasına sebep olur. Durağan faz (stationary phase), yavaşlama safhasından sonra başlar. Bu sırada net üretim hızı sıfırdır. Net üreme hızının sıfır olmasına rağmen metabolizma ve ürünlerin hücre içinde veya ortamda birikmesi devam edebilir. Ölüm fazı (death phase) durağan fazı izleyen safhadır. Fakat ölüm bir önceki fazda başlayabilir ve bu iki fazı net olarak birbirinden ayırmak bazen zordur.



Şekil 4.1. Kesikli fermantasyonda büyüme eğrisi (I: lag fazı, II: logaritmik veya üstel üreme fazı, III: yavaşlama fazı, IV: durağan (stationary) faz, V: ölüm fazı)

Üreme hızı mikroorganizma konsantrasyonu ile orantılı olarak artar.

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.7)$$

Burada μ özgül üreme hızı (h^{-1}), x hücre derişimidir. Logaritmik fazda, özgül üreme hızı sabit ve maksimum değerdedir. Yani;

$\mu = \mu_{\max}$ 'dır. Denklem (4.7)'nin integrasyonu şu bağıntıyı verir:

$$\ln \frac{x}{x_o} = \mu t \quad (4.8)$$

$\ln x$ 'e karşı t 'nin grafiğe geçirilmesi ile μ bulunur.

Fermantasyon sürecinde, mikroorganizmaların bir kısmı canlılığını, fizyolojik aktivitelerini kaybederler. Genellikle ölü hücreler otoliz olur ve ortama bırakılan bileşikler canlı organizmalar tarafından kullanılır. Ölüm hızı matematiksel olarak birinci derecedendir:

$$r_d = \frac{dx}{dt} = -k_d x \quad (4.9)$$

burada k_d , ölüm hızı için sabittir.

$$\ln \frac{x}{x_s} = -k_d t \quad (4.10)$$

$\ln x$ 'e karşı t 'nin grafiğe geçirilmesi ile k_d bulunur. (4.10) eşitliğinde, x_s , durağan fazın sonunda bulunan hücre derişimidir.

4.2.2.1. Üreme hızına etki eden faktörler

Üreme hızı için kullanılan kinetik modellerin çoğu enzim kinetiği için kullanılan kinetik modellere dayanır. Hücrenin minyatür bir kimyasal reaktör olduğu ve bu reaktörün içinde substratların, enzimlerin katalizlediği karmaşık reaksiyonlar zinciri ile canlı hücreye ve ürünlere dönüştürüldüğü düşünülmektedir. Biri dışında bütün substratların ortamda aşırı miktarda bulunduğu ve bu substratın kısıtlayıcı substrat olduğu, reaksiyon zincirindeki en yavaş adımın toplam reaksiyon hızını kontrol ettiği kabul edilmektedir.

Enzim reaksiyon hız ifadelerinin en basiti Michaelis- Menten ifadesidir:

$$V = \frac{kE_o S}{K_m + S} \quad (4.11)$$

Burada V reaksiyon hızı, k hız sabiti, E_o toplam enzim miktarı, K_m Michaelis-Menten sabiti ve S substrat derişimidir. kE_o çarpımı reaksiyonun ilerleyebileceği maksimum hızdır ve $V_{\max}$ olarak gösterilir.

Eğer böyle bir enzim reaksiyonunu hızı kontrol eden adım olarak belirler ve enzim derişiminin hücre derişimine orantılı olduğunu varsayarsak hücre üremesi için enzim kinetiğine benzer bir ifade yazılabilir:

$$r_x = \mu(S)x \quad (4.12)$$

Burada r_x hücre üreme hızı (kg hücre/m³h), x hücre derişimidir (kg hücre/m³).

$$\mu(S) = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (4.13)$$

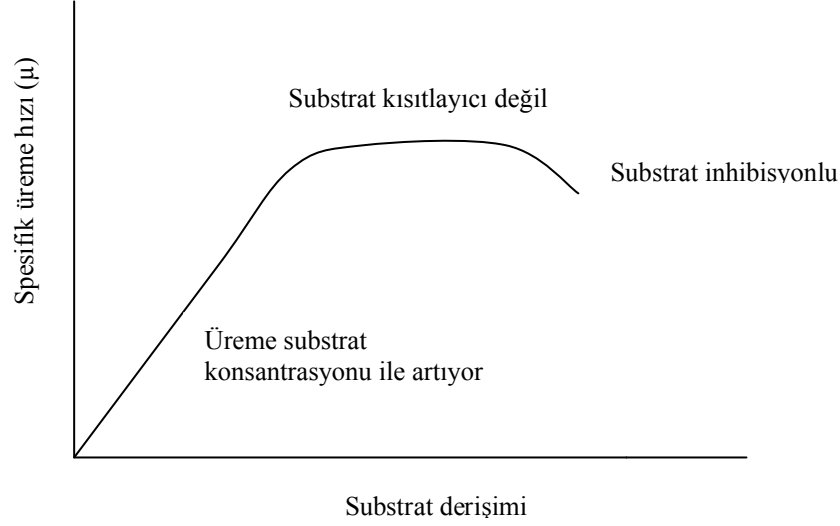
şeklindedir ve Monod denklemi olarak bilinir. Burada K_s Monod doyma sabitidir (kg substrat/m³) ve organizmanın substrata olan affinitesinin bir ölçüsüdür. Monod denklemi en çok kullanılan yapısal olmayan (unstructured) üreme modellerinden biridir. Genellikle üreme hızının yavaş ve hücre yoğunluğunun düşük olduğu zaman deneysel verilerle oldukça iyi uyushmaktadır. Monod denkleminin deneylerle uyuşmadığı durumları açıklamak için yeni üreme hızı modelleri literatürde önerilmiştir. Bunlardan bazıları Tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tek substrat limitasyonu ve inhibisyonsuz üreme kinetiğini modellemek için önerülen kinetik modeller (Moser 1985)

Tessier	$\mu = \mu_m (1 - e^{-S/K_s})$
Moser	$\mu = \mu_m \frac{S^n}{K_s + S^n}$
Contois	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s x + S}$
Blackman	$\mu = \frac{1}{2} \mu_m \frac{S}{K_s} \quad S < 2K_s \text{ için}$
	$\mu = \mu_m \quad S > 2K_s \text{ için}$

Tessier denkleminde iki sabit (μ_m , K_s) vardır ve difüzyon kontrollü substrat beslenmesi sırasındaki üremeyi modellemek için önerilmiştir. Moser denklemi daha genel bir denklemdir ve üç tane sabiti (μ_m , K_s , n) vardır. $n=1$ olduğu zaman Monod denklemine indirgenir. Contois denkleminde doyma sabiti K_s hücre derişiminin bir fonksiyonudur. Yüksek hücre derişimlerinde üreme hızını modellemek için kullanılmaktadır. Deneysel verilere Monod denkleminin daha iyi uymasına rağmen Blackman denklemindeki süreksizlik denklemin istenmeyen bir özelliğidir.

Üreme hızı üzerine substrat derişiminin etkisi incelediğinde, düşük substrat derişimlerinde üreme hızının substrat derişimi ile arttığı ve bir maksimuma ulaştığı görülür. Substrat derişiminin daha da artmasıyla üreme hızı azalmaya başlar. Bu olay "substrat inhibisyonu" olarak adlandırılır. Bu durum Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Üreme hızının substrat derişimine bağıllığı

Hücrelerin değişen substrat derişimine karşı davranışı sürpriz değildir. Hücrelerin özgül üreme hızı (μ), termodinamik su aktivitesinden etkilenir. Besiyerinin fizikokimyasal özelliklerindeki değişimler (osmotik basınç, iyon gücü, dielektrik sabiti gibi) hücre zarının geçirgenliğini etkileyebilir.

Yüksek substrat derişimlerinin üreme hızı üzerine etkisini nicel olarak ifade etmek üzere çeşitli denklemler öne sürülmüştür. Bunlardan yaygın olarak kullanılanlardan biri Andrews (1968) tarafından önerilen denklemdir:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S + S^2 / K_i} \quad (4.14)$$

Denklem (4.14), 1930’larda Haldane tarafından inaktif enzim-substrat kompleksi oluşumunu modellemek için önerilen denkleme dayandırılmıştır. Denklem (4.14)’in kesikli veya sürekli kültürde çeşitli organizmaların substrat inhibisyon kinetiğini öngördüğü gösterilmiştir. Substrat inhibisyonunu modellemek için öne sürülen bazı denklemler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Substrat inhibisyon kinetiği için önerilen modeller (Mulchandani & Luong 1989)

Kinetik model	Denklem No
$\mu = \mu_m \frac{S(1 + S/K)}{K_S + S + S^2/K_{SI}}$	1
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S + (S^2/K_{SI})(1 + S/K)}$	2
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} e^{-S/K_{SI}}$	3
$\mu = \mu_m (e^{-S/K_{SI}} - e^{-S/K_S})$	4
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} - K_{SI}(S - S^*) \text{ eger } S > S^*$	5a
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \text{ eger } S < S^*$	5b

Tablo 4.2’deki 1-4 nolu denklemler ile denklem (4.14) karşılaştırılmış ve pek farklı olmadıkları görülmüştür. Denklem 5 ise deneylere bu denklemlerden daha iyi uymasına rağmen denklemdeki süreksizlik bir dezavantajdır. Luong (1987), substrat inhibisyonunu modellemek için aşağıdaki denklemi öne sürmüştür:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{S}{S_m}\right)^n \quad (4.15)$$

Bu denklem düşük substrat derişimlerinde üreme hızının artışı ve yüksek substrat derişimlerinde substrat inhibisyonunun etkisini hesaba katmaktadır. Ayrıca bu denklem, üremenin tamamen durduğu maksimum substrat derişimi öngörmektedir.

İki substratın düşük derişimlerde bulunduğu ve üremenin her iki substrat tarafından sınırlandırıldığı durumlarda (çift substrat kısıtlaması) üreme hızı için aşağıdaki bağıntı yazılabilir:

$$\mu = \mu_m \frac{S_1}{K_{S1} + S_1} \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \quad (4.16)$$

Bu ifade substratlardan birinin derişimi doyma sabitinden büyük olduğu zaman klasik Monod denklemine indirgenir.

Biyolojik reaksiyonların son ürünlerinin mikrobiyal üreme üzerine olumsuz etkileri fermantasyon endüstrisinde önemli bir problemidir. Fermantasyon ürünlerinin üreme üzerine olumsuz etkileri ”ürün inhibisyonu (product inhibition)” olarak adlandırılır. Etanol, bütanol, laktik asit gibi ürünlerin ortamda birikmesi özgül üreme hızının sonuç olarak ürün oluşum hızının düşmesine sebep olur. Bu ürünler üreme hızı üzerine enzim reaksiyonlarındakine benzer bir etki yaparlar. Eğer oluşan ürün üreme hızını etkiliyorsa genel olarak şöyle yazılabilir.

$$\mu = f(S, P) \quad (4.17)$$

Ürünün, üreme hızı üzerine etkisini modellemek üzere önerilen denklemlerden bazıları Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Ürün inhibisyon kinetiğı için önerilen modeller (Mulchandani & Luong 1989)

Kinetik model	Denklem No
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} (1 - K_1 P)$	1
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} [1 - K_1 (P - K_2)]$	2
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \frac{K_{PI}}{K_{PI} + P}$	3
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} e^{-K_3 P}$	4
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - K_4 \frac{P}{K_2 - P_m} \right)$	5
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)$	6
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^\beta$	7
$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^\gamma \right)$	8

Tablo 4.3'deki denklemlerdeki K sabitleri her bir denklem için ayrı anlamlara sahiptir. Denklemler arası seçim tamamen keyfidir ve gerçek gözlemlere ve geniş aralıkta elde edilen deney sonuçlarına dayanarak yapılır. Denklemin birini manipüle etmek diğerinden daha kolay olabilir. Eğer deneysel bulgular çok hassas değilse ve sınırlı sayıda veri varsa modeller arasındaki farkı görmek zordur.

Üreme sırasında elde edilen sigmoidal x-t eğrisi amprik olarak aşağıdaki denklemle (lojistik üreme denklemi) ifade edilebileceği gösterilmiştir:

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x_m} \right) \quad (4.18)$$

Bu denklem üremeyi logaritmik fazın başlangıcından durağan faza kadar (yavaşlama fazı dahil) temsil eder.

Han ve Levenspiel (1988), Monod modelini substrat, hücre ve ürün inhibisyon etkilerini hesaba katacak şekilde genelleştirmiştir. Önerilen denklem genelleştirilmiş Monod denklemi olarak adlandırılır ve genel olarak:

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{I}{I^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{I}{I^*} \right)^m} \quad (4.19)$$

şeklindedir. Burada I=S, x veya P olabilir. m ve n sabittir. I^* ise kritik inhibitör derişimidir. Yukarıdaki denklem substrat, hücre ve ürün inhibisyonu için şöyle yazılabilir:

Substrat inhibisyonu için;

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{S}{S^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{S}{S^*} \right)^m} \quad (4.20)$$

Hücre inhibisyonu için;

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{x}{x^*} \right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{x}{x^*} \right)^m} \quad (4.21)$$

Ürün inhibisyonu için;

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P^*}\right)^n \frac{S}{S + K_s \left(1 - \frac{P}{P^*}\right)^m} \quad (4.22)$$

$I \ll I^*$ olduğu durumlarda denklem (4.20)-(4.22) klasik Monod denklemine indirgenir.

4.2.3. Substrat tüketimi

Üreme, substrat tüketim sonucu gerçekleşen bir olaydır. Substratlar biyoprosesler için enerji ve hammadde kaynağıdır. Hücreler şu üç fonksiyonu yerine getirmek için substratlara gereksinim duyarlar (Sinclair ve Kristiansen 1987):

- hücre sentezlemek
- ürün sentezlemek
- enerji sağlamak

Üreme sırasında elde edilen enerji hücre sentezinde, ürün sentezinde ve bakım (maintenance) fonksiyonlarını yerine getirmek için kullanılır. Burada bakım hücrenin canlı olarak tutulabilmesi (bazal metabolizma) için gerekli minimum enerjiyi gösterir. Substrat tüketim hızı matematiksel olarak şu şekilde ifade edilir:

$$r_S = r_{Sx} + r_{SP} + r_{Sm} \quad (4.23)$$

r_{Sx} : hücre sentezi için substrat tüketim hızı (g/l-h)

r_{SP} : ürün sentezi için substrat tüketim hızı (g/l-h)

r_{Sm} : hücre bakımı için substrat tüketim hızı (g/l-h)

Hız eşitliği, verim faktörünü içerecek şekilde aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$r_S = \frac{r_x}{Y_{x/S}} + \frac{r_p}{Y_{p/S}} + m x \quad (4.24)$$

$Y_{x/S}$: hücre için verim faktörü (g hücre/g substrat)

$Y_{p/S}$: ürün için verim faktörü (g ürün/g substrat)

m : hücre için bakım katsayısı (g substrat/g hücre-h)

4.2.4. Ürün oluşumu

Ürün oluşum kinetikleri son derece komplekstir. Ürünler, bazen büyüme esnasında büyümeye paralel olarak, bazen de büyüme durduktan sonra oluşur. Biyoproseslerde elde edilen ürünler, literatürde çeşitli yöntemler ile sınıflandırılmıştır. Bunlar içinde en yaygın olarak kabul göreni Gaden (1959) tarafından oluşturulan sınıflandırmadır. Gaden'e göre oluşan ürünler üç gruba ayrılır:

Tip 1 ürünler: Enerji metabolizmasının sonucu ortaya çıkan ürünlerdir. Büyüme ve ürün oluşumu paralel oluşur.

Tip 2 ürünler: Enerji metabolizmasında dolaylı olarak çıkan ara ürünlerdir (sitrik asit gibi).

Tip 3 ürünler: Enerji metabolizmasının doğrudan sonucu olmayan kompleks moleküllerdir.

Basit kinetik modellere dayalı sınıflandırmanın faydalı olduğu görülmüştür:

I . Üremeye bağlı ürünler (growth associated) $r_p = \alpha r_x$ (4.25)

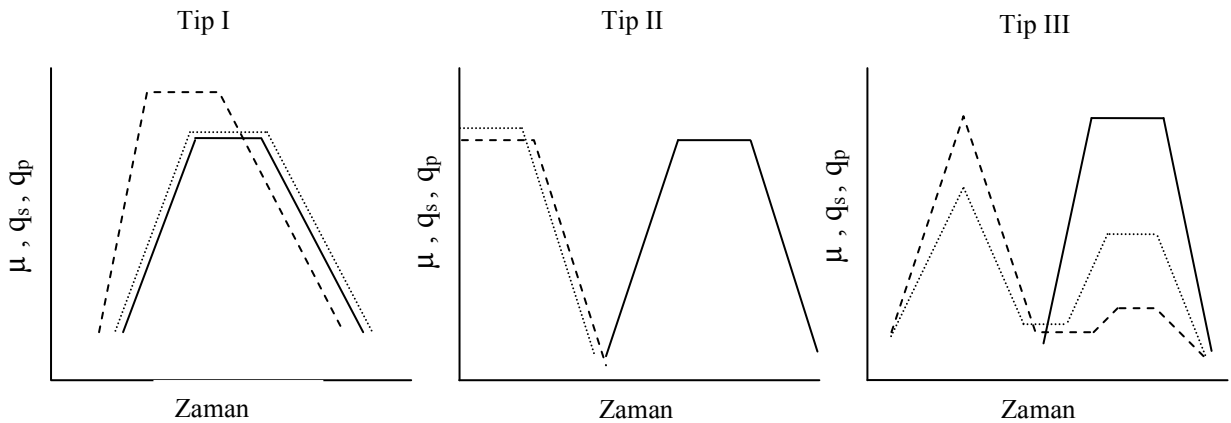
II . Üremeye bağlı olmayan ürünler (non-growth associated) $r_p = \beta x$ (4.26)

III. Karışık ürün oluşumu (mixed type product formation) $r_p = \alpha r_x + \beta x$ (4.27)

α : Üremeye bağlı ürün oluşum sabiti

β : Üremeye bağlı olmayan ürün oluşum sabiti

Bu üç durum Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Kesikli fermantasyon proses kinetiklerinin genel modelleri (Gaden 1959). (---- μ , spesifik üreme hızı, ... q_s , spesifik substrat tüketim hızı, — q_p , spesifik ürün oluşum hızı)

4.2.5. Kinetik parametrelerin hesaplanması

Kesikli kültürde en çok uygulanan yöntem deneysel verilerin ”doğruya uydurulması”dır. Bu yöntem grafik çizilerek kolaylıkla uygulanabilir. Diğer yöntem deneysel verilerin ”eğriye uydurulması”dır. Bu bilgisayar yardımıyla uygun programlar kullanılarak yapılır.

4.2.5.1. μ_m ve K_s 'in hesaplanması

Deneysel verilerin doğruya uydurulmasına en yaygın örnek Lineweaver-Burke grafiğidir. Aşağıdaki üreme hızı denklemini ele alırsak;

$$r_x = \mu_m \frac{S}{K_s + S} x \quad (4.28)$$

Burada r_x , S ve x değişkenler μ_m ve K_s parametrelerdir. Yukarıdaki denklem düzenlenirse;

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (4.29)$$

elde edilir. Eğer $1/\mu$ $1/S$ ’e karşı grafiğe geçirilirse bir doğru elde edilir. Bu doğrunun kaymasından ve eğiminden μ_m ve K_s değerleri bulunur.

4.2.5.2. $Y_{x/S}$ ve m 'in hesaplanması

Verim faktörü ve bakım katsayısının hesaplanması için Luedeking-Piret tarafından geliştirilen substrat tüketim hız eşitliği (4.24) kullanılır. Bu eşitlikte ürün oluşumu için kullanılan substrat miktarı ihmal edilir ve düzenlenirse denklem (4.30) elde edilir. Literatürde yapılan bir çok çalışmada da ürün oluşumu için tüketilen substrat miktarının ihmal edilebilir olduğu ifade edilmiştir.

$$\frac{r_s}{x} = \frac{1}{Y_{x/S}} \frac{r_x}{x} + m \quad (4.30)$$

Eğer r_s/x ’in r_x/x ’e karşı grafiği çizilirse bir doğru elde edilir. Bu doğrunun kaymasından ve eğiminden $Y_{x/S}$ ve m değerleri bulunur.

4.2.5.3. Ürün oluşum parametreleri α ve β 'in hesaplanması

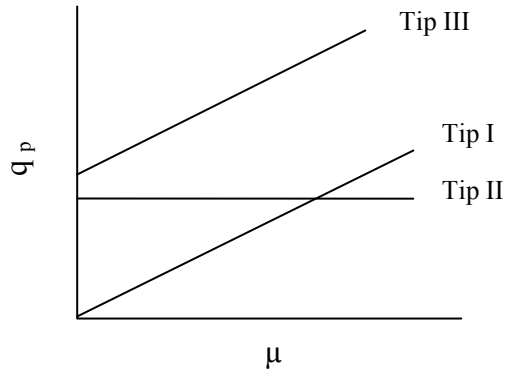
Ürün oluşum parametreleri α ve β 'in hesaplanması için, eşitlik (4.27) x ile bölünür ve düzenlenerek kullanılırsa;

$$\frac{r_p}{x} = \alpha \frac{r_x}{x} + \beta \quad (4.32)$$

(4.32) eşitliği elde edilir. $r_p/x = q_p$ ve $r_x/x = \mu$ olduğundan eşitlik aşağıdaki hali alır:

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (4.33)$$

μ ve q_p grafiği çizilirse, α ve β değerleri bulunur.



Şekil 4.4. Luedeking-Piret modeli kullanılarak ürün oluşum parametrelerinin bulunması.

Tip I: Üremeye bağlı ürünler (growth associated) $\alpha > 0$, $\beta = 0$

Tip II: Üremeye bağlı olmayan ürünler (non-growth associated) $\alpha = 0$, $\beta > 0$

Tip III: Karışık ürün oluşumu (mixed type product formation) $\alpha > 0$, $\beta > 0$

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Mikroorganizma

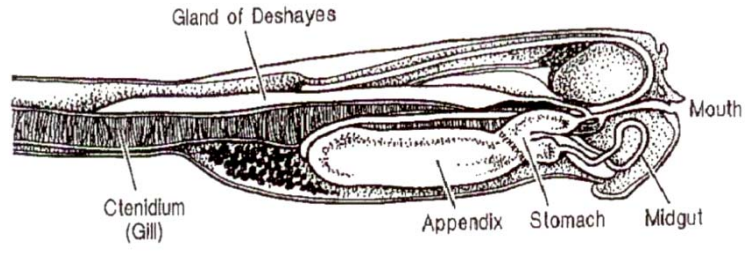
Teredinobacter turnirae bakterisi USDA(United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois) 'den temin edilmiştir.

Bir marinal bakteri olan mikroorganizma, simbiotik olarak yaşadığı shipworm Teredinidae familyasından ve Deshayes salgı bezlerinden izole edilmiştir (Şekil 5.1). Proteaz enziminin yanı sıra selüloz (endocgluconase) enzimi de üretmektedir. *T. turnirae* anaerobik, mikroaerobik ve aerobik ortamlarda canlı kalabilmektedir (Imam vd. 1990). Ayrıca azot fiksasyonunu gerçekleştirebilmekte ve % 80'i ekstrasellular olan proteolitik aktiviteye sahip enzimi ortama salgılamaktadır. *T. turnirae*, selülozu parçalaması ve azot fiksasyonunu gerçekleştirebilmesi özellikleriyle tek hücrelilerde rastlanmayan bir durum sergilemektedir.

Bakteri normal şartlarda Gram-negatif, rijit-rod şeklinde (0.5 µm x 5 µm) ve gelişmesi esnasında sarı renkli pigment salgılamaktadır. Bir diğer önemli özelliği de çok uzun süre canlı halde kalabilmesidir (5 yıldan fazla). Bakterinin diğer bazı özellikleri Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1. Shipworm *Teredinobacter turnirae*'nin bazı karakteristik özellikleri

Hücre duvarı	Gram-negatif
Morfoloji	Rijit-rod (0.5 µm x 5 µm)
Hareketlilik	Flajel sayesinde oldukça hareketli
Kendine has özelliği	Selülozu parçalaması ve azot fiksasyonu
Tuz gereksinimi	NaCl, KCl, MgSO ₄ , MgCl ₂ ve CaCl ₂
Yarılma süresi	2 gün (N ₂ fiksasyon şartları); 8-15 saat (Azotlu ve aerobik ortamda)
Ekstrasellular enzim	Proteaz, selüloz ve xylanase



Şekil 5.1. Mikroorganizmanın izole edildiği Deshayes salgı bezi.

5.2. Mikroorganizma Büyüme Ortamı ve Şartları

Rod şeklindeki bakteri ile yapılan deneylerde bileşimi Tablo 5.2.’de verilen ve orijinal olarak Greene ve Ferrer (1986) tarafından geliştirilen standart besi ortamı kullanılmıştır.

Tablo 5.2. Standart besi ortamı (SM)

Bileşen	Miktar (g/L)
Sakkaroz	5
NH ₄ Cl	1
NaCl	18.8
KCl	0.4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.9
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.4
HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid)	4.9
Çözelti A	10 ml/L
Tuz çözeltisi	1 ml/L

Çözelti A (g/L)		Tuz çözeltisi (g/L)	
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	2	H ₃ BO ₃	2.9
Na ₂ CO ₃	1	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.8
Na-Sitrat	0.4	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.3	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.04
		CoSO ₄ .7H ₂ O	0.05
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08

Küme halindeki bakteri için de, *T. turnirae* için Plackett-Burman metoduyla optimize edilmiş besi ortamı (PB) kullanılmıştır (Ahuja, 2000). PB ortamının bileşimine ait değerler Tablo 5.3.'de verilmiştir. Rod hücreler yüksek NaCl konsantrasyonuna gereksinim duyarken (marinal orijinli olması sebebiyle), küme hücreler NaCl'e ihtiyaç duymaksızın gelişimlerini sürdürebilirler.

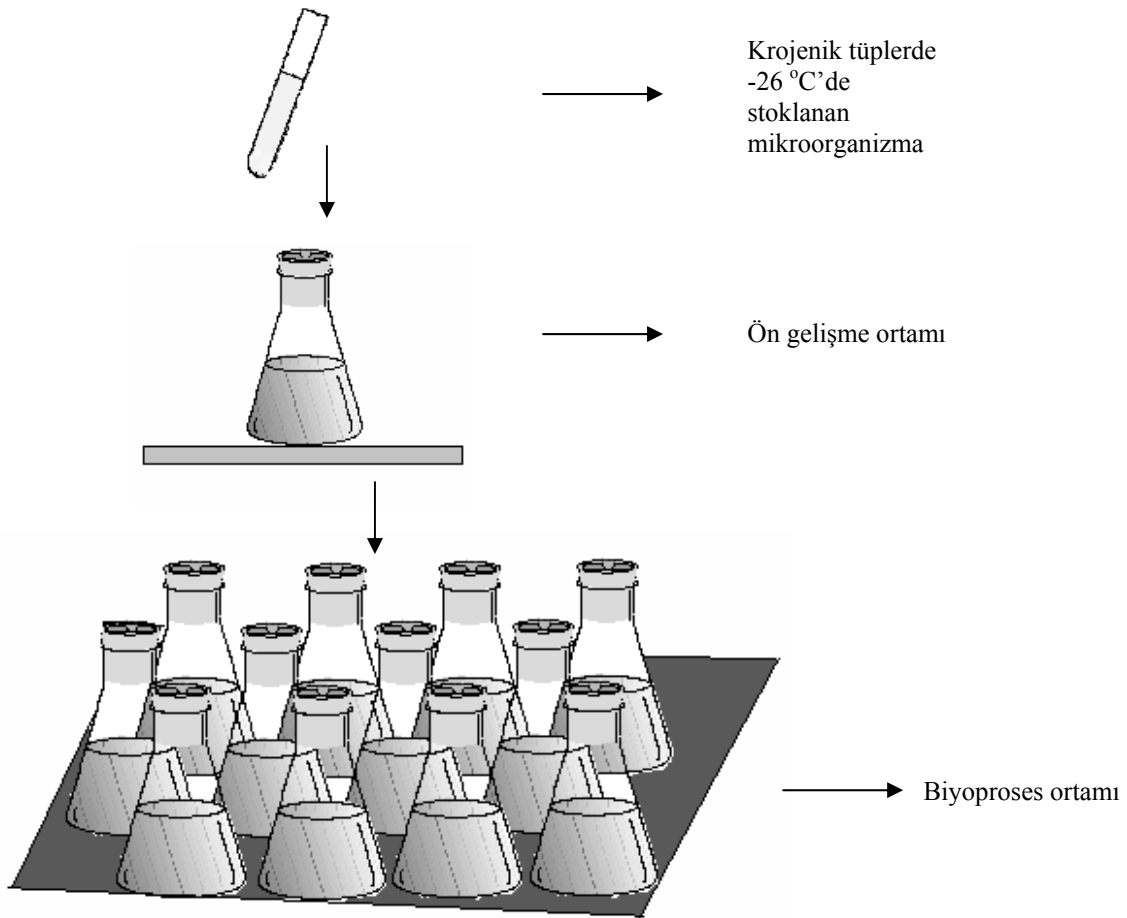
Rod şeklindeki bakteri ile yapılan deneylerde, bileşimi Tablo 5.2.'de verilen SM ortamından, küme halindeki bakteri için de bileşimi Tablo 5.3.'de verilen PB besi ortamından 50 ml alınarak 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. Başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmıştır. Ayarlamalar için 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk ve sargı bezinden yapılmış bir tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Tablo 5.3. Plackett-Burman besi ortamı (PB)

Bileşen	Miktar (g/L)
Sakkaroz	5
NH ₄ Cl	1
KCl	0.4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.9
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.4
HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid)	4.9
Antifoam 204	1 ml/L
Çözelti A	10 ml/L
Tuz çözeltisi	1 ml/L

Çözelti A (g/L)		Tuz çözeltisi (g/L)	
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	24	H ₃ BO ₃	2.9
Na ₂ CO ₃	12	MnCl ₂ .4H ₂ O	7.2
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.3	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.04
		CoSO ₄ .7H ₂ O	0.05
		CuSO ₄ .5H ₂ O	0.08

Bu şekilde hazırlanan besiyeri 121 °C'de ve 1.2 bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda (Prior Clave 129) sterillemiştir. Sterilleneni besiyeri laminar flowda ortam sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Kriyojenik tüplerde -26 °C'de stoklanan mikroorganizmadan steril şartlarda 500 µl alınarak 50 ml'lik besiyerine ilave edilmiştir. Erlenlerde, 30 °C ve 125 rpm'de çalışan inkübatör çalkalayıcıda (Selecta Rotabit) rod hücreler için 36 saat, küme hücreler için 24 saat süre ile mikroorganizma gelişimi sağlanmıştır. Gelişme ortamındaki mikroorganizma % 10 (v/v) oranında enzim üretim ortamına eklenmiştir. Üretim ortamına göre farklı sürelerde fermentasyona tabii tutulmuştur (Şekil 5.2).



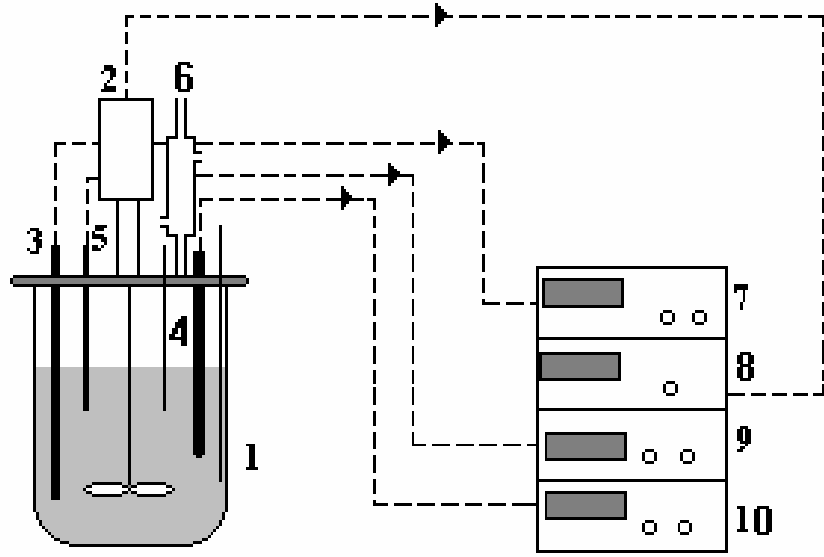
Şekil 5.2. Deneylerin yapılışında takip edilen yöntem.

5.3. Biyoproses Ortamı

Ön gelişme ortamında periyodunu tamamlayan mikroorganizmalar % 10 (v/v) oranında farklı bileşimde hazırlanan enzim üretim ortamlarına aktarılmıştır. Sentetik enzim üretim ortamlarında, erlenlerde ve biyoreaktörde yapılan deneylerde, rod halindeki bakteriler için bileşimi Tablo 5.2.'de verilen SM ortamı, küme halindeki bakteriler için ise bileşimi Tablo 5.3.'de verilen PB besi ortamı kullanılarak, enzim üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir. Doğal substrat olarak, Cargill işletmesinden temin edilen mısır proteini, lokal marketlerden temin edilen soya unu ve ticari kazein kullanılarak oluşturulan kompleks ortamlarda yapılan deneylerde de, yine erlenlerde ve biyoreaktörde çeşitli parametreler incelenmiştir. Deneylerde, doğal substrat olarak kullanılan mısır proteininin elek analizi yapılmış ve belli boyutlara getirilerek (100, 50, 30, 16 ve 8 mesh) kullanılmıştır. Kullanılan doğal substratların bazı özellikleri Ek 1'de, kompleks üretim ortamında kullanılan musluk suyunun mineral içeriği Ek 2'de verilmiştir.

5.4. Biyoreaktör İşletim Şartları

Kesikli ve yarı kesikli sistemde çalışan karıştırmalı biyoreaktörde de, sentetik veya farklı bileşenlerden oluşan kompleks ortamlar kullanılarak proteaz enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör olarak 800 ml çalışma hacminde ısıya dayanıklı pyreks camdan yapılmış, 1-L hacimli silindirik bir fermentör kullanılmıştır. Paslanmaz çelik malzemeden yapılmış kapak üzerinde pH elektrodu, oksijen probu, sıcaklık sensörü, aşı ekleme, ürün çıkışı, hava giriş ve çıkışı, karıştırıcı, asit veya baz ilavesi için uygun bağlantılar vardır. Sistem pH metre ve buna bağlı pH kontrol ünitesi, asit ve baz pompaları, numune alma kabı ve numune alma pompası, karıştırıcı motor, hava pompası, rotametre ve sıcaklık ölçerden oluşmaktadır. Biyoproses süresince elektrotlar ve kontrol sistemi yardımıyla karıştırma hızı, çözünmüş oksijen derişimi, sıcaklık ve pH değerleri izlenmiştir. Hava akış hızı rotametreden kontrol edilmekte, hava 0.2 µ gözenekliliğindeki filtrelerden geçirildikten sonra karıştırıcının alt kısmındaki hava dağıtıcısından biyoreaktöre gönderilmektedir. Çalışmalar steril koşullarda yapıldığından reaktörün tüm bağlantıları önceden yapılmış ve daha sonra da otoklavlanmıştır. Sterilizasyondan sonra besi ortamına, aşı ekleme, ürün analizi için numune alma işlemleri sterilliği bozmayacak şekilde yapılmıştır Şekil (5.3).



Şekil 5.3. Biyoreaktör Düzeneği

1.Reaktör 2.Karıştırıcı motor 3.Oksijen probu 4.pH probu 5.Sıcaklık sensörü 6.Kondensör
7.Oksijen metre 8.Karıştırma hızı kontrol ünitesi 9.Sıcaklık kontrol ünitesi 10.pH metre

5.5. Analitik Yöntemler

Biyoproses süresince, farklı kalma sürelerinde alınan örneklerde, biomass konsantrasyonu ve toplam protein derişimi belirlenmiştir. Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 7000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiş (Hettich Eba21), mikroorganizmalardan ayrılan sıvı kısımda, proteaz aktivitesi ve substrat derişimi belirlenmiştir.

5.5.1. Mikroorganizma Derişimi

Mikroorganizma gelişimi türbidimetrik olarak UV-spektrofotometrede absorbans ölçümüyle takip edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu, belirli derişimde hücre içeren ortam için 200-800 nm arasında yapılan dalga boyu taraması sonucu en uygun dalga boyu olarak seçilen 600 nm’de hazırlanmıştır (Ek 3). Absorbans değerleri hazırlanan standart doğrudan faydalanılarak, kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Referans çözelti olarak mikroorganizma içermeyen biyodönüşüm ortamları kullanılmıştır.

5.5.2. Proteaz Aktivitesi

Üretilen proteaz enziminin aktivitesi, azokazeinin enzimatik hidrolizi sonucunda açığa çıkan hidrolizatların absorbansının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenmiştir. Proteolitik aktivite substrat olarak % 0.8 (w/v) azokazeinin kullanıldığı ve Cotta ve Hespell (1986) tarafından verilen metot ile bulunmuştur. 0.5 ml azokazein çözeltisi (100 mM potasyum fosfat tamponunda hazırlanmış, pH:7) ile 0.5 ml mikroorganizmadan ayrılmış enzim kaynağı, 1.8 ml kapasiteli Eppendorf tipi mikrosantrifüj tüplerde karıştırılmıştır. Karışım 39 °C’de 3 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, 0.5 ml soğuk 1.5 M HClO₄ ilave edilerek reaksiyonun durması sağlanmış ve buz banyosu içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Çöken protein, N=12000 dk⁻¹ hızında 5 dakika süresince santrifüjlenmiştir. Üstte kalan sıvı kısımdan alınan 1 ml numune, 1 ml 1 N NaOH ile karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışımın 440 nm’ de absorbansı ölçülmüştür. Bu metoda göre, 1 OD (Optical density) = 320 µg/ml azokazein yada 640 U/ml olarak alınmıştır (Greene vd.,1989).

5.5.3. DNS Yöntemi İle İndirgenmiş Şeker Derişimi

Mikroorganizmanın tüketmediği toplam indirgenmiş şeker (glikoz ve früktoz) derişimi DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemi ile ölçülmüştür (Miller, 1959). Bunun için önce derişimi bilinen miktarlarda glikoz içeren ortamlar kullanılarak kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Oluşturulan kalibrasyon doğrusu Ek 4’de, DNS çözeltisi hazırlama yöntemi ise Ek 5’te verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin ve örneklerin analizinde kullanılan yöntem aşağıda verilmiştir.

1. Farklı derişimlerdeki glikoz ve früktoz içeren ortamlardan 1 ml alınarak üzerine 3 ml DNS çözeltisi eklenmiştir.
2. Karışım 5 dakika kaynayan su banyosunda tutulduktan sonra 5 dakika buz banyosunda bekletilmiştir.
3. İndirgenmiş şeker içermeyen ve aynı basamaklardan geçen çözelti ile UV-spektrometre sıfır ayarı yapılmıştır. Çözeltilerin absorbansları en uygun dalga boyu olarak seçilen 550 nm’de ölçülmüştür.

5.5.4. Sakkaroz Derişimi

Mikroorganizmanın tüketmediği sakkarozu belirlemek için, mikroorganizmadan ayrılmış sıvı kısımdan 1 ml alınarak, üzerine 50 µl % 37’lik HCl ilave edilmiş ve 10 dakika kaynayan su banyosunda bekletilerek hidroliz tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra üzerine 20 µl 5 N KOH ilave edilmiştir. Bu şekilde ortamdaki sakkarozun hidrolizi ile oluşan glikoz ve fruktoz

derişimleri DNS yöntemi ile belirlenerek inversiyon tepkimesine göre sakkaroz derişimi hesaplanmıştır.

5.5.5. Protein Derişimi

Üretim ortamında toplam protein miktarını belirlemek için, Lowry et. al. (1951) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.

Protein tayininde kullanılan reaktifler:

Reaktif 1: % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Reaktif 2: % 2 Na-K-Tartarat

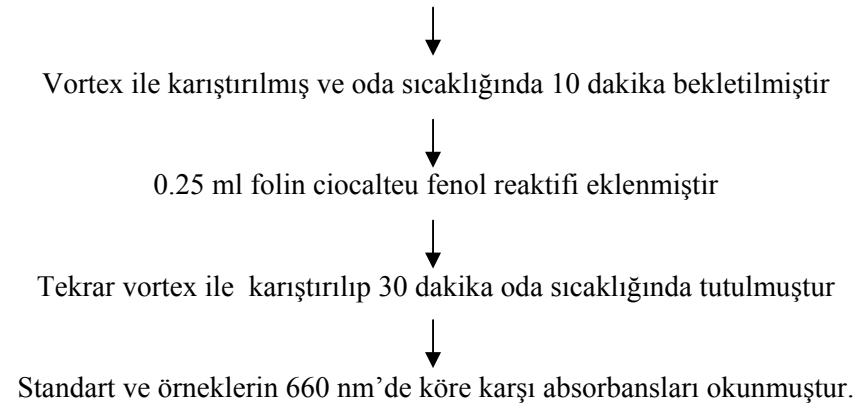
Reaktif A: 0.1 N NaOH içinde % 2'lik Na_2CO_3 (2 gr Na_2CO_3 + 0.4 gr NaOH /100ml)

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.

Örneklerdeki toplam protein derişimini belirlemek için bovine serum albuminin (BSA) derişimi bilinen örneklerinden yararlanılarak derişim-absorbans kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır (Ek 6). Protein standardı, örnek ve kör aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur.

Kör	Örnek
0.5 ml distile su	0.5 ml seyreltilmiş örnek
+	+
2.5 ml reaktif B	2.5 ml reaktif B



Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, örnekteki protein miktarı aşağıdaki formülle göre mg/ml olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Protein (mg/ml)} = (A_{660}/\text{eğim}) \times \text{seyreltme faktörü (Uçar vd., 1998)}.$$

5.5.6. Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı ve Oksijen Tüketim Hızı

Proteaz üretim prosesi boyunca, sıvı faz kütle aktarım katsayısı ve oksijen tüketim hızı "Dinamik Yöntem" ile belirlenmiştir. Yöntem biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi ve bir oksijen elektrodu yardımıyla biyoreaktör ortamındaki çözünmüş oksijen derişimindeki azalmanın; daha sonra havanın tekrar sisteme verilmesi ile oksijen derişimindeki artışın zamanla ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Van't Riet, 1983).

Belirli sürelerde, biyoreaktöre beslenen hava mikroorganizmanın biyolojik faaliyetlerini etkilemeyecek şekilde çok kısa süreli olarak kesilmiş, yüzey havalandırma etkisini azaltmak amacıyla karıştırma hızı da 20-50 dk⁻¹ arasında tutulmuştur. Fermantasyon ortamında çözünmüş oksijen derişiminin doğrusal azalmasından yararlanılarak mikroorganizmanın oksijen tüketim hızı r_o hesaplanmıştır (Denklem 3.2.). Sıvı faz kütle aktarım katsayısının belirlenebilmesi için incelenen oksijen aktarım koşullarında sisteme tekrar hava verilerek çözünmüş oksijen derişimindeki doğrusal olmayan artış incelenmiştir. Denklem (3.1)'in düzenlenmesi ile Şekil 3.2.'de gösterildiği gibi $\{C_o ; (dC_o/dt)-r_oC_x\}$ grafiğinin eğiminden k_La değeri hesaplanmıştır. Örnek grafikler ve hesaplama Ek 7'de görülmektedir.

5.6. İstatistiksel Testler

T. turnirae 'den serin alkali proteaz üretim prosesinde, sistemin davranışını tanımlayan en uygun modelin belirlenebilmesi için literatürden elde edilen kinetik modellerin çözümü MATLAB 7.04 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Modellerden elde edilen sonuçların güvenilirliğini araştırmak amacıyla modelleme yeteneği (EF), hata karelerinin ortalama karekökü RMSE ve Khi-kare(χ^2) gibi çeşitli istatistiksel mukayese metotları kullanılmış ve uygun model belirlenmeye çalışılmıştır.

Modelleme Yeteneği ;

$$EF = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{di} - x_{dort})^2 - (x_{hi} - x_{di})^2}{\sum_{i=1}^N (x_{di} - x_{dort})^2}$$

EF = Modelleme yeteneği

x_{di} = Deneysel değer

x_{hi} = Modelden hesaplanan değer

x_{dort} = Deneysel değerlerin ortalaması

N = Ölçüm sayısı

Hata Karelerinin Ortalama Karekökü;

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_{hi} - x_{di})^2}{N}}$$

RMSE = Ortalama hata

x_{di} = Deneysel değer

x_{hi} = Modelden hesaplanan değer

N = Ölçüm sayısı

Khi-kare;

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{di} - x_{hi})^2}{N - n}$$

χ^2 = Khi-kare

x_{di} = Deneysel değer

x_{hi} = Modelden hesaplanan değer

N = Ölçüm sayısı

n = Modeldeki parametre sayısı

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda, yakın geçmişte potansiyel bir proteaz enzimi üreticisi olduğu tespit edilen ve marinal bakteri olan *Teredinobacter turnirae* kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar, bakterinin farklı ortamlarda değişik morfolojik yapı içerisine girdiğini ve farklı morfolojik yapılarda değişik oranlarda proteaz enzimi ürettiğini göstermiştir (Ferreira vd 2001). Orijinal yapısı rod (çubuk) şeklinde olan bakteri, farklı gelişme aşamalarında (özellikle stasyonier fazda) ve farklı besi ortamlarında agregasyona uğrayarak morfolojisini rod şeklinden küme halinde bulunan yuvarlak bakteri şekline değiştirmektedir. Bu yeni morfoloji, bazı mekanizmaları tetiklemekte ve daha fazla proteaz üretimine neden olmaktadır. Ancak, bakterinin kümeleşmesine neden olan mekanizma halen bilinmemekle birlikte, bazı varsayımlar mevcuttur. Bunlar, inkübasyon sırasında ortama ekstrasellularpolisakkaritlerin (EPS) salgılanması ve EPS'nin hücreleri bir arada tutması, agregasyona neden olan genlerin tetiklenmesi, bakterinin besin limitasyonuna karşı aldığı bir strateji şeklinde sıralanabilir.

Sentetik ortamda yapılan tüm deneylerde, rod şeklindeki bakteri için orijinal olarak Greene ve Freer (1986) tarafından geliştirilen standart besi ortamı (SM), küme morfolojisindeki bakteri için de Plackett-Burman metoduyla optimize edilmiş besi ortamı (PB) kullanılmıştır (Ahuja 2000). Sentetik ortamda yapılan deneylerde, SM ve PB ortamı kullanılarak, *T.turnirae*'den proteaz enzimi üretim şartları optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçların ışığında, mikroorganizmayı küme halinde tutabilecek olan katı-substrat fermentasyonu (KSF) teknikleri ile proteaz enzimi üretiminin artırılması hedeflenmiştir. *T.turnirae*'den proteaz enzimi üretimi, hem 250 ml'lik erlenmayer'lerde hem de sıcaklığın, pH'nın, karıştırma ve havalandırma hızının direkt olarak kontrol edildiği 0.8 L çalışma hacmine sahip 1 L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir.

6.1. PB Ortamında Küme Halindeki (Aggregated) Hücrelerle Proteaz Üretimi

Literatürden edinilen bilgiler ışığında, *T.turnirae* 'nin küme halinde kullanımının proteaz enzimi üretimini artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında, küme halindeki bakterinin PB ortamındaki davranışına bağlı olarak proteaz üretimi incelenmiştir. Deneyler iki kısımda gerçekleştirilmiştir. Birinci kısmını erlenlerde yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Erlenlerde, karbon kaynağı olarak çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan glikoz ve sakkarozun proteaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Yine erlenlerde yapılan deneylerde, besi ortamına kazein ilave edilerek indükleme etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmını ise 0.8 L'lik çalışma hacmine sahip 1 L'lik biyoreaktörde yapılan deneyler oluşturmaktadır.

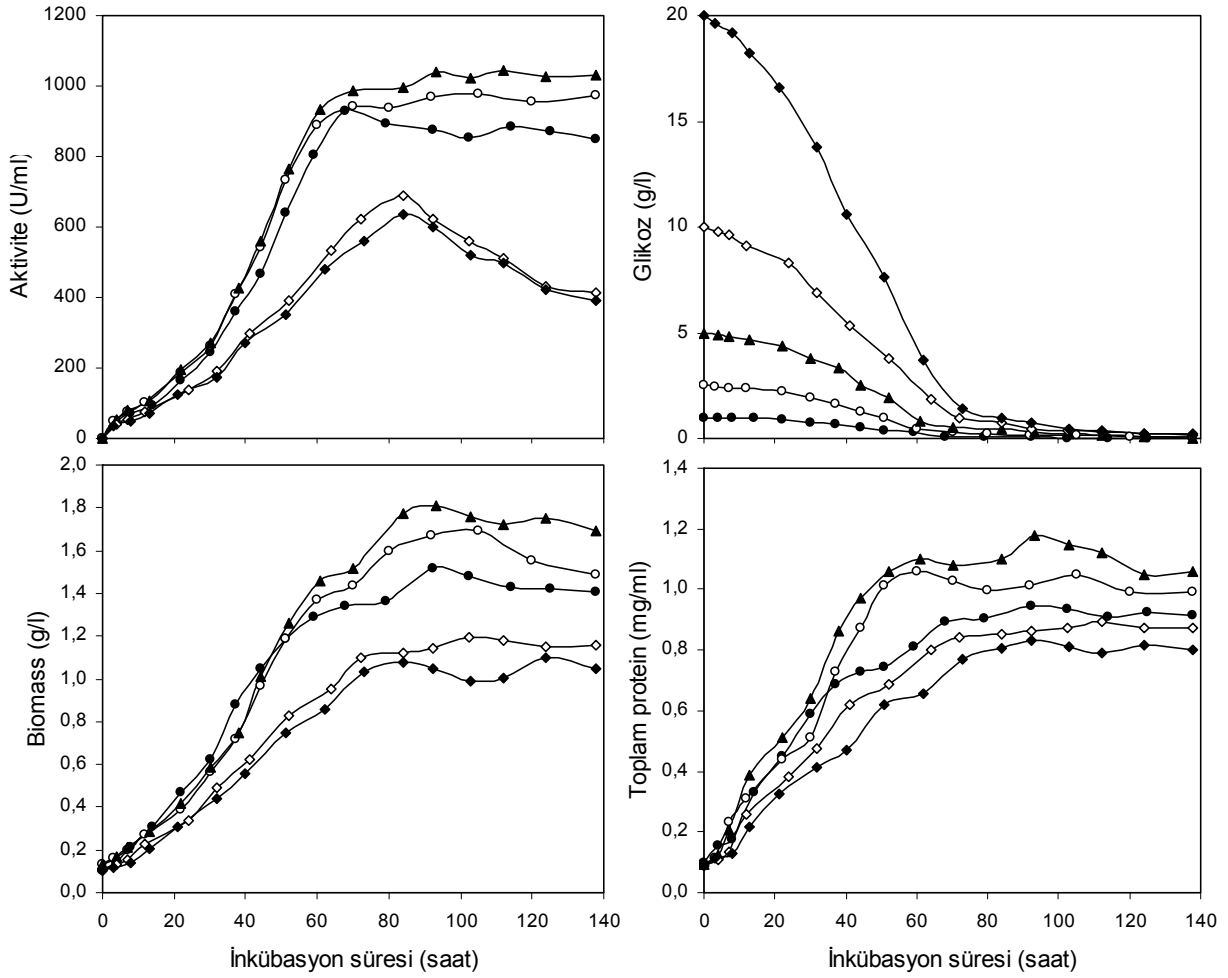
Biyoreaktörde kesikli ve yarı kesikli sistemler kullanılarak ve farklı stratejiler geliştirilerek, bazı parametrelerin mikroorganizma gelişimi ve enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

6.1.1. Karbon Kaynağının Etkisi

Fermantasyon ile enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri ortam bileşimidir. Ortam bileşenleri içerisinde karbon kaynağı ortam maliyetinin yaklaşık % 60-80'ini oluşturmaktadır (Rehm, 1987). Karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda glikoz ve sakkaroz kullanılmıştır.

Beş farklı başlangıç glikoz konsantrasyonunda (1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l) 250 ml'lik erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.1'de verilmiştir. Şekilde, başlangıç glikoz konsantrasyonunun, enzim aktivitesi, biomass oluşumu, substrat tüketimi ve toplam protein üzerine etkisi görülmektedir. Başlangıç glikoz konsantrasyonunun, enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, 1 g/l glikoz konsantrasyonunda enzim aktivitesinin maksimum 927 U/ml 'ye, 2.5 ve 5 g/l konsantrasyonunda ise maksimum enzim aktivitesinin sırasıyla 979 ve 1045 U/ml değerine ulaştığı görülmektedir. 10 ve 20 g/l glikoz konsantrasyonunda ise maksimum enzim aktivitesi sırasıyla 688 ve 630 U/ml'dir. Mikroorganizma büyüme evreleri ve enzim üretimi arasında yakın bir ilişki olduğu belirlenmiştir. 1, 2.5 ve 5 g/l glikoz konsantrasyonlarında maksimum aktiviteye logaritmik evre sonlarına doğru ulaşıp bu değere yakın aktivite değerlerinde sabit kalırken, 10 ve 20 g/l glikoz konsantrasyonlarında ise logaritmik evre sonunda ulaşılan maksimum aktivite değeri durağan evrede düşmektedir. Glikoz konsantrasyonundaki artışın enzim üretimi üzerine represyon etkisi yaptığı görülmektedir. Literatürde bulunan diğer çalışmalarda da, fermantasyon ortamında bazı karbon kaynaklarının yüksek konsantrasyonlarda represyon etkisi yaptığı gözlenmiş ve bu durum mikroorganizmaların salgıladıkları enzimlerin azalması ile ifade edilmiştir (Prudence vd., 1989; Pimpa, 2003; Tanyıldızı, 2005). Şekil 6.1.'de görüldüğü gibi, beş farklı glikoz konsantrasyonu için, mikroorganizma konsantrasyonu artarken, enzim aktivitesi ve protein konsantrasyonu da artmaktadır. Mikroorganizma 1, 2.5 ve 5 g/l glikoz konsantrasyonlarında yaklaşık 80. saatte, 10 ve 20 g/l glikoz konsantrasyonunda ise 70. saatte durağan faza ulaşmaktadır.

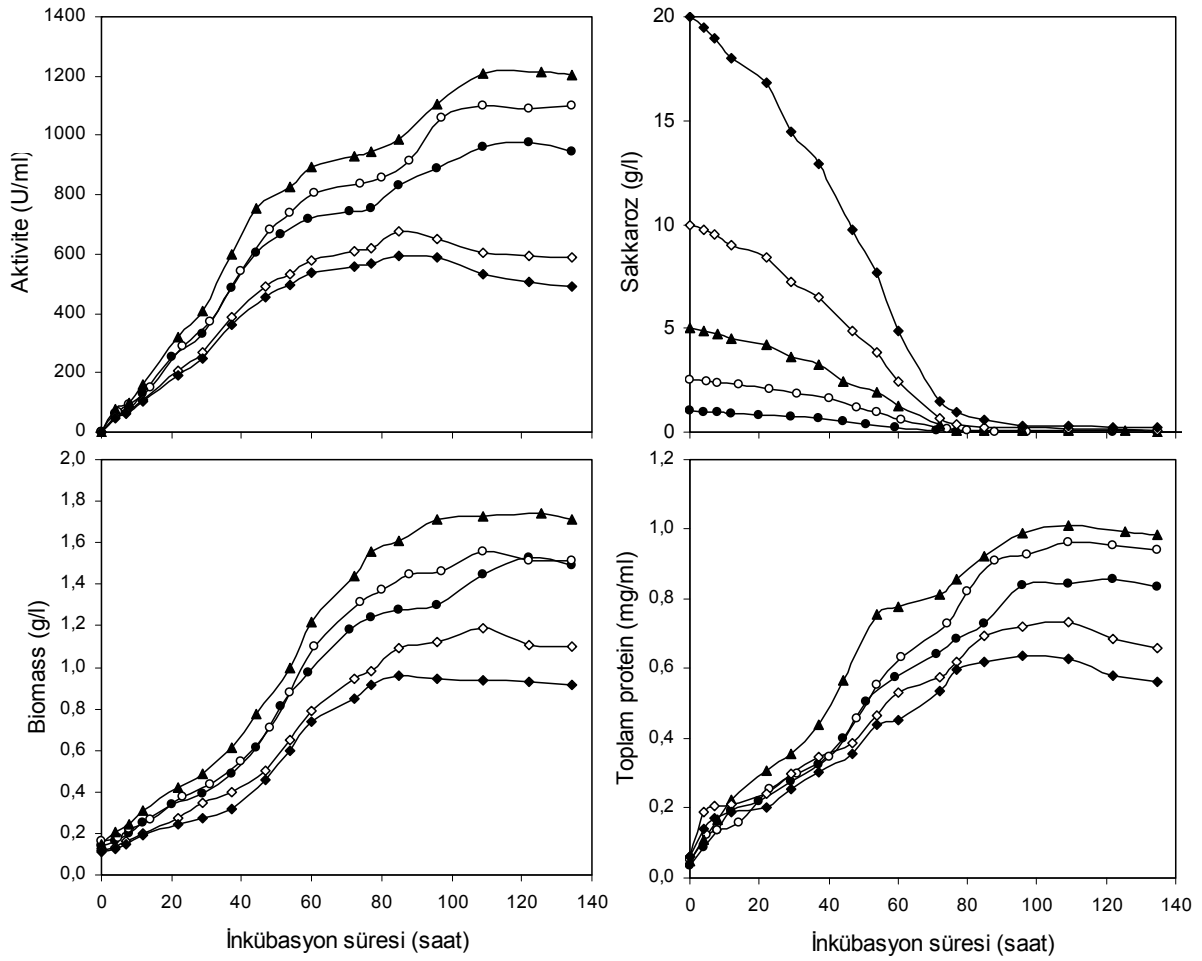
Karbon kaynağı olarak sakkarozun enzim üretimi üzerine etkisini görebilmek için 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.2.' de verilmiştir. 1, 2.5 ve 5 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında, konsantrasyon artışı ile enzim aktivitesi de artış göstermektedir. Maksimum aktivite ise sırasıyla 977, 1102 ve 1213 U/ml olarak ölçülmüştür. 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinin diğer konsantrasyonlara göre düşük olduğu görülmüş ve maksimum aktivite sırasıyla 675 ve



Şekil 6.1. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ●: 1, ○: 2.5, ▲: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l glikoz)

594 U/ml değerine ulaşmıştır. Yüksek sakkaroz konsantrasyonunda mikroorganizma, ortamda aşırı miktarda bulunan sakkarozu parçalayarak ortamda indirgen şekerin birikmesine neden olmaktadır. Şeker konsantrasyonundaki bu artış enzim üretiminin represyonu ile sonuçlanmaktadır. Şekil 6.2.'de görüldüğü gibi, beş farklı sakkaroz konsantrasyonunda, mikrobiyal büyümeye paralel olarak, enzim aktivitesi ve protein miktarı da artmaktadır. Substrat tüketim hızının, yüksek substrat konsantrasyonlarında daha büyük olduğu görülmektedir.

PB ortamında küme halindeki *T.turnirae* ile proteaz üretiminde, karbon kaynağı etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda glikoz ve sakkaroz kullanıldığı deneylerde, karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı biyoproses ortamında enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.



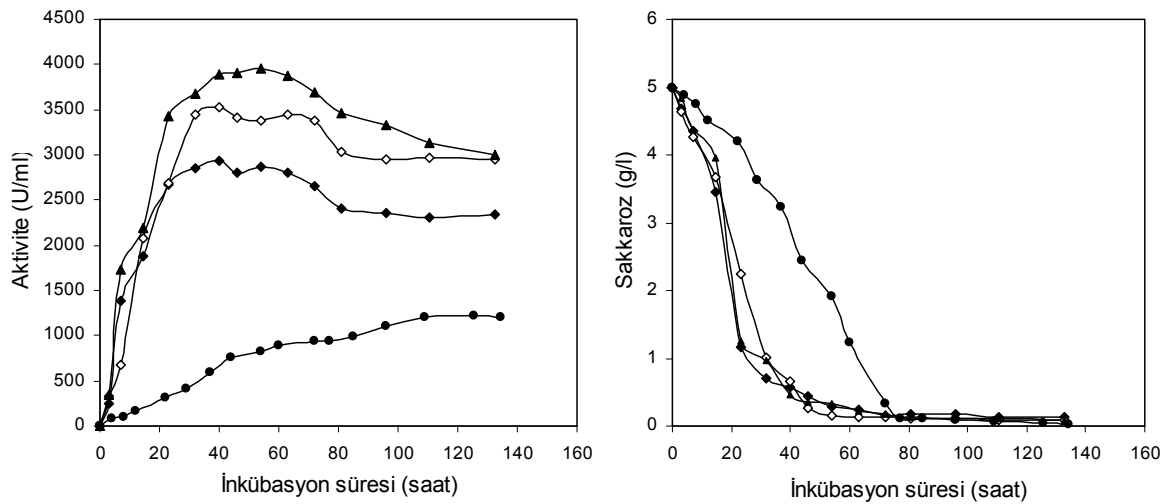
Şekil 6.2. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı:125 rpm, T: 30 °C, ●: 1, ○: 2.5, ▲: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l sakkaroz)

6.1.2. İndükleyici Etkisi

Biyoproseslerde besiyerine katılan bazı maddeler mikroorganizmayı uyarak enzim sentezini başlatabilir ya da hızlandırabilir. Özellikle mikroorganizmadan üretilcek enzim substratının besiyerine konulması ile söz konusu enzimin biyosentezi hızlandırılabilir (Pimentel vd., 1994).

Bu çalışmada *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzim üretiminde bir indükleyici ilavesiyle elde edilen enzim aktivitesinin daha da arttırılacağı düşünülmüş ve bunun için protein içeriği yüksek olan kazein kullanılmıştır.

Karbon kaynağı denemelerinde, en yüksek aktivitenin elde edildiği 5 g/l sakkaroz içeren besiyerine 0.1, 0.2 ve 0.3 g/l konsantrasyonunda kazein ilave edilmiştir. 5 g/l sakkaroz içeren ortama kazein ilavesi ile enzim üretimindeki ve sakkaroz tüketimindeki değişim Şekil 6.3.'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, ilave edilen kazein miktarı arttıkça enzim aktivitesi de artmaktadır. Kazein ilave edilmeden 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda ulaşılan maksimum aktivite 1213 U/ml iken, 0.1, 0.2 ve 0.3 g/l kazein ilavesiyle sırasıyla maksimum aktiviteler 2930, 3526 ve 3957 U/ml'dir. Kazein ilavesiyle maksimum aktivite, ilave edilmemiş duruma göre yaklaşık 3-4 kat artmıştır. Bu durumda, kazeinin mikroorganizma tarafından kolaylıkla tüketilebildiği ve enzim sentezinde indükleyici görevi yaptığı sonucuna varılabilir. Elde edilen bu sonuç, daha önce yapılan çalışmalarla da (lipaz üretiminde ortama çeşitli yağların ilave edilmesi) benzerlik göstermiştir (Ünsaçarar, 1998; Bulut vd., 2006). Ayrıca ortama kazein ilavesinin, mikroorganizmanın daha yüksek miktarlarda proteaz ürettiği küme halindeki morfolojisine daha uygun bir ortam sağladığı düşünülmektedir. Bu durumda mikroorganizma yoğunluğu daha fazla olup, mikroorganizmanın mikroskop altındaki görüntüsü daha büyük kümeler halindedir. Ayrıca, fermantasyon ortamı daha yoğun bir sarı renk almaktadır. Yapılan deneyler sonucunda, enzim aktivitesi ve substrat tüketiminde elde edilen sonuçlar düzenli bir eğilim gösterirken, biomass oluşumu ve protein oluşumunda elde edilen sonuçlar düzensiz bir eğilim göstermektedir. Bu nedenle biomass ve protein derişim sonuçları verilmemiştir.



Şekil 6.3. Farklı kazein konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 5 g/l sakkaroz + 0.1 g/l kazein, ◇: 5 g/l sakkaroz + 0.2 g/l kazein, ▲: 5 g/l sakkaroz + 0.3 g/l kazein, ●: 5 g/l sakkaroz)

6.1.3. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

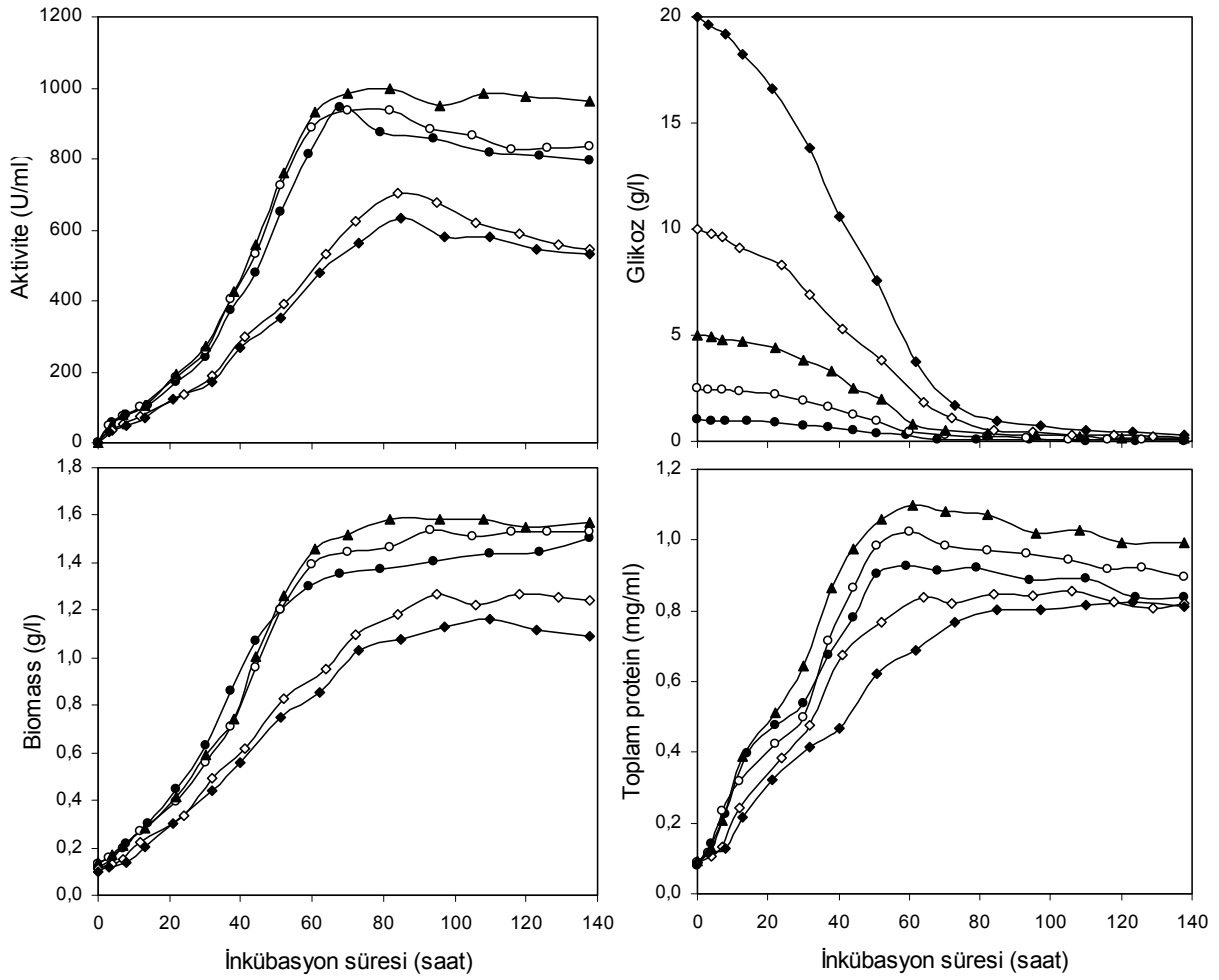
Çalışmanın bu kısmında, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve hava akış hızının kontrol edilebildiği 800 ml çalışma hacmine sahip 1 l'lik laboratuvar ölçekli bir biyoreaktör kullanılmıştır. Kesikli sistem uygulanarak gerçekleştirilen fermantasyonda, karbon kaynağı, karıştırma hızı ve havalandırma hızı gibi bazı proses parametrelerinin proteaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

6.1.3.1. Karbon Kaynağı Etkisi

Biyoproseslerde, hücre ve ürün oluşum verimliliğini etkileyen en önemli parametrelerden biri seçilen karbon kaynağıdır. Çalışmanın bu aşamasında, laboratuvar ölçekli 1 l'lik biyoreaktörde kesikli sistemde, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz enzim üretiminde karbon kaynağının etkisini araştırmak amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda glikoz ve sakkaroz kullanılmıştır.

Karbon kaynağı olarak 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l konsantrasyonlarındaki glikozun kullanıldığı deneylerde elde edilen, proteaz aktivitesi, hücre, protein ve substrat miktarının zamanla değişimi Şekil 6.4' de verilmiştir. Maksimum aktivite 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l glikoz konsantrasyonlarında sırasıyla 943, 938, 996, 702 ve 632 U/ml olarak ölçülmüştür. Şekil 6.4.'den de görüldüğü gibi, 5 g/l glikoz konsantrasyonuna kadar enzim aktivitesi, biomass ve protein miktarı artarken, 10 ve 20 g/l glikoz konsantrasyonunda bu değerlerin düştüğü, yüksek glikoz konsantrasyonunun inhibisyon etkisi yaptığı gözlenmiştir. Biomass miktarı ile enzim aktivitesi ve ortamdaki protein miktarındaki artış paralellik göstermektedir. Mikroorganizma yaklaşık 60-75 saat kalma süresi sonunda durağan evreye geçmekte ve hücre konsantrasyonunun maksimum olduğu bu evrede, proteaz aktivitesi ve protein miktarı da maksimum değerlere ulaşmaktadır. Maksimum biomass ve protein konsantrasyonu, 5 g/l glikoz konsantrasyonunda sırasıyla 1.58 g/l ve 1.1 mg/ml olarak belirlenmiştir. Kesikli sistemle proteaz üretiminde elde edilen enzim aktivitesi, hücre konsantrasyonu, glikoz konsantrasyonu ve protein miktarı değerlerinin erlenlerde elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiği görülmüştür.

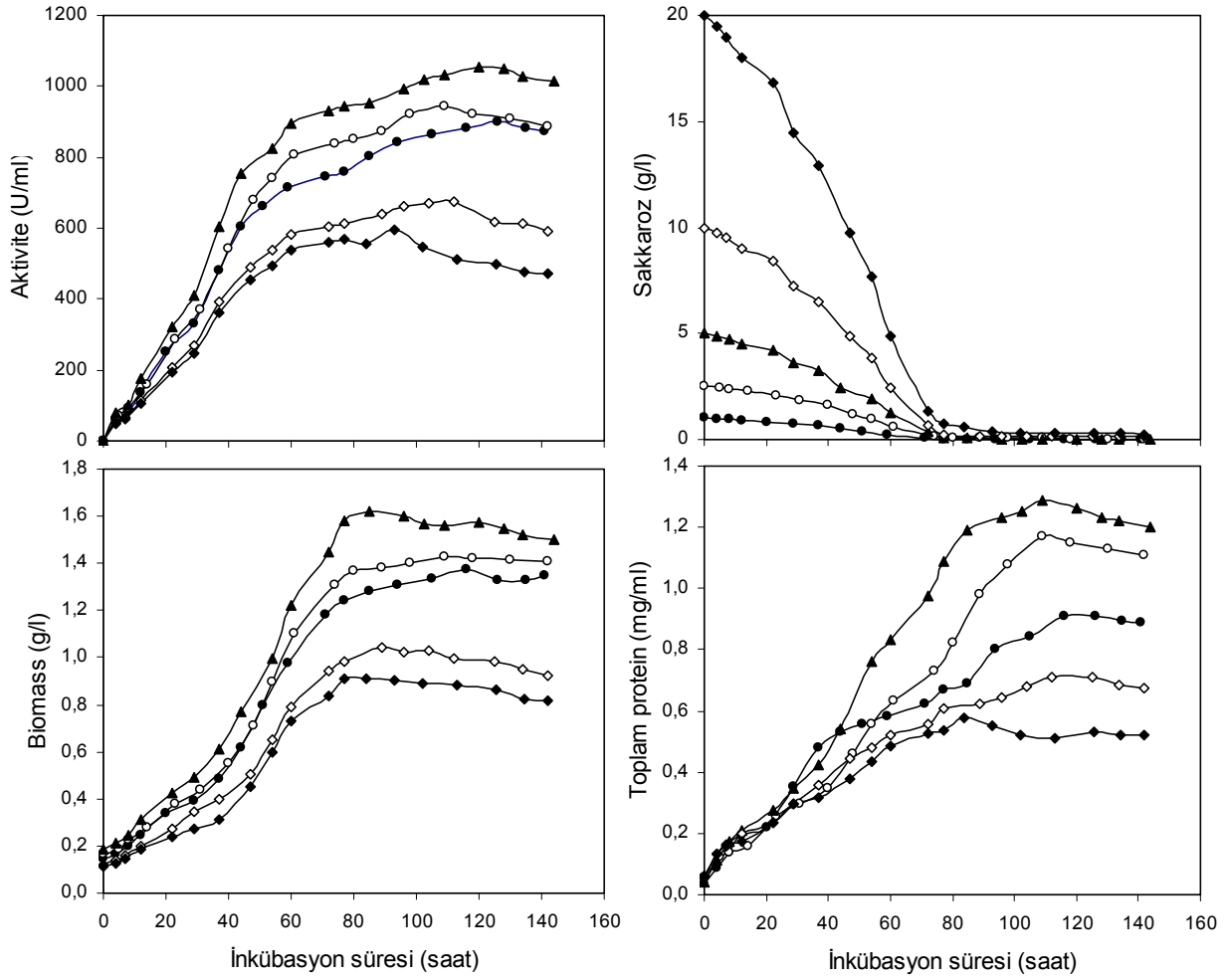
Beş farklı sakkaroz konsantrasyonunda yapılan deneyler sonucunda elde edilen mikrobiyal büyüme, enzim aktivitesi, protein miktarı ve substrat tüketimindeki değişim sonuçları Şekil 6.5'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, artan sakkaroz konsantrasyonu ile 5 g/l sakkaroz konsantrasyonuna kadar enzim aktivitesi de artmış, ancak daha yüksek sakkaroz konsantrasyonlarında (10 ve 20 g/l) enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Maksimum aktivite 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda 1054 U/ml olarak ölçülürken, 1, 2.5, 10 ve 20 g/l sakkaroz



Şekil 6.4. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 500 rpm, T: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ●: 1, ○: 2.5, ▲: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l glikoz)

konsantrasyonlarında ulaşılan maksimum aktiviteler ise sırasıyla 902, 943, 673 ve 593 U/ml değerindedir. Bütün konsantrasyonlar için, mikrobiyal büyüme, enzim aktivitesi ve protein miktarı paralel eğilimler göstermiştir. Ayrıca grafiklerden de görüldüğü gibi durağan evrede enzim aktivitesi ve protein miktarı maksimum değere ulaşmıştır. Maksimum biomass ve protein konsantrasyonu, 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda sırası ile 1.62 g/l ve 1.28 mg/ml olarak bulunmuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda, en iyi sonuçların elde edildiği 5 g/l sakkaroz konsantrasyonu kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

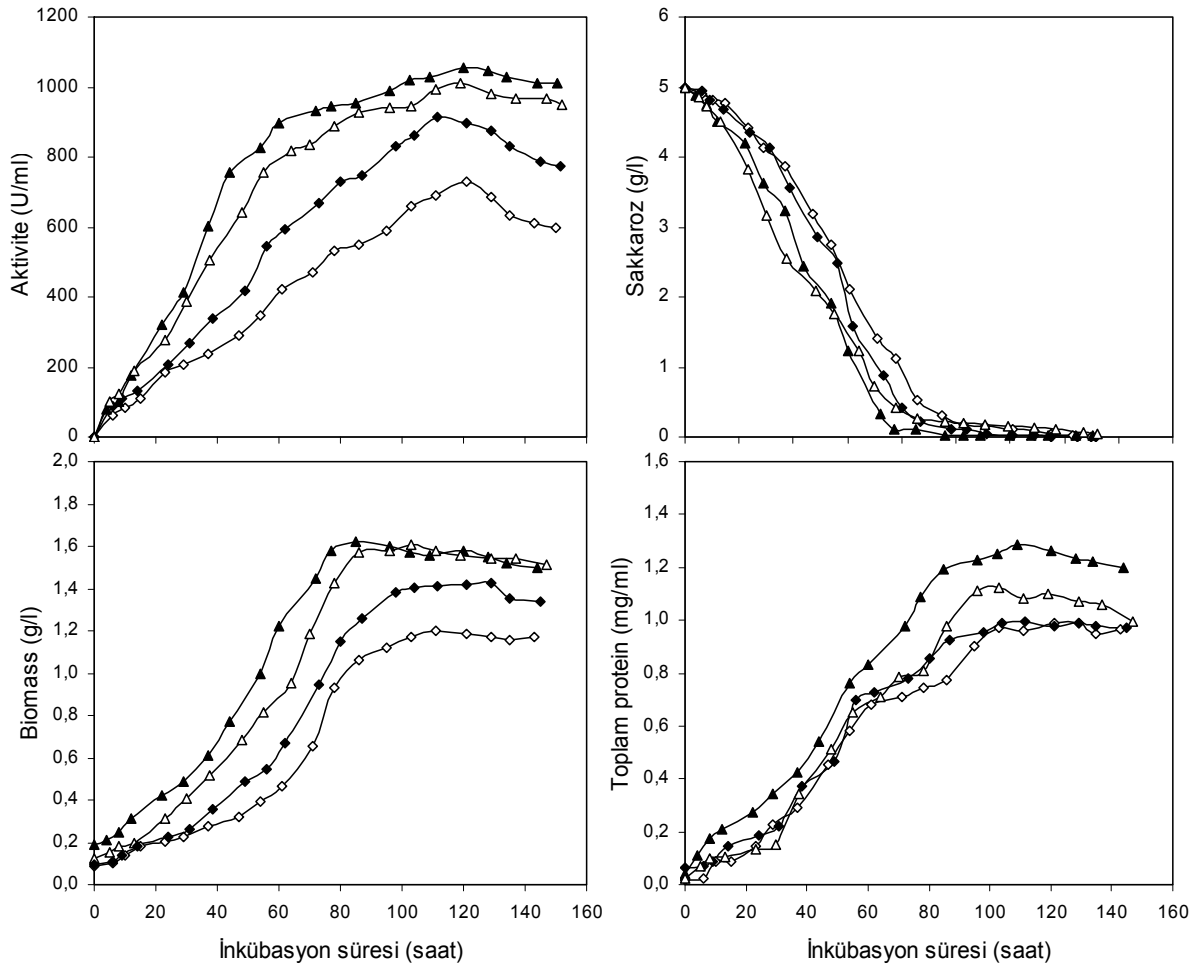


Şekil 6.5. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 500 rpm, T: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ●: 1, ○: 2.5, ▲: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l sakkaroz)

6.1.3.2. Karıştırma Hızı Etkisi

Aerobik proseslerde mikrobiyal hücrelerin metabolik faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli olan temel girdilerden biri oksijendir. Bu nedenle biyoproses ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı, mikrobiyal büyüme ve ürün verimini etkiler. Karıştırmalı biyoreaktörlerde, karıştırma hızı, oksijen aktarımını etkileyen temel parametrelerden biridir. Karbon kaynağı denemelerinde belirlenen optimum şartlarda, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretimi üzerine karıştırma hızının etkisini incelenmek amacıyla, 300, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında çalışılmıştır. Fermantasyon ortamından alınan örneklerde, mikroorganizma derişimi, proteaz aktivitesi, toplam protein miktarı ve substrat derişimlerinin zamanla değişimi belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 6.6.'da verilmiştir.

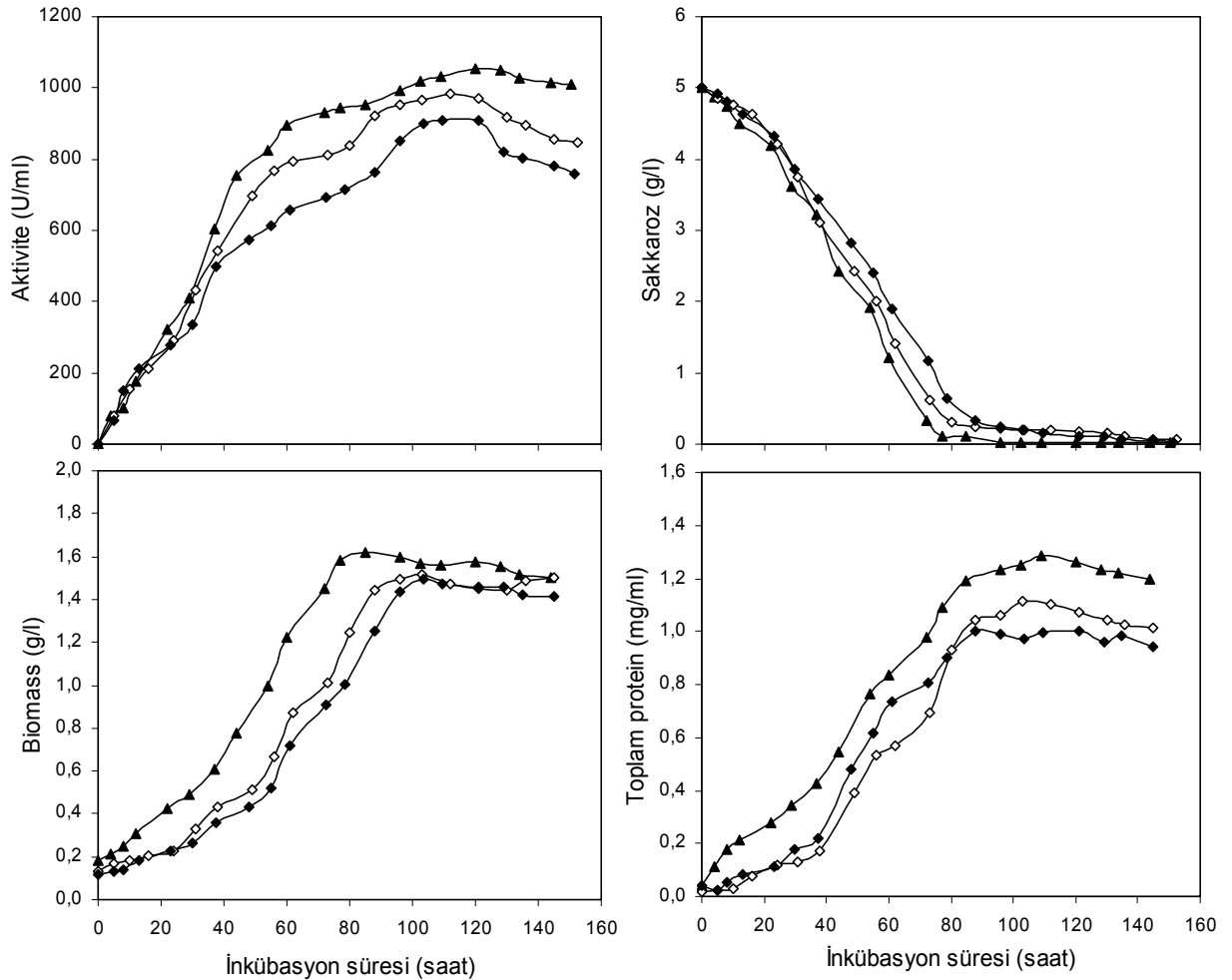
Şekil 6.6.'da görüldüğü gibi, karıştırma hızının artmasıyla enzim aktivitesi artmış ancak 500 rpm'den sonra, karıştırma hızı sistem üzerine olumsuz yönde etki etmiştir. 300, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında yaklaşık 120 saat sonunda ulaşılan maksimum enzim aktiviteleri sırasıyla 728, 912, 1054 ve 1008 U/ml olarak ölçülmüştür. Mikroorganizma ve toplam protein derişiminin 500 rpm karıştırma hızına kadar arttığı gözlenmiş ve en yüksek mikroorganizma ve protein derişimi, 500 rpm karıştırma hızında sırasıyla 1.62 g/l ve 1.28 mg/ml olarak belirlenmiştir. Dört karıştırma hızında da mikroorganizma yaklaşık 85-100 saat sonunda durağan evreye ulaşmıştır. Enzim aktivitesi ve protein miktarı, mikrobiyal büyümeye paralel bir eğilim göstermiştir. Substrat tüketim hızı, karıştırma hızının artmasıyla artış göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda karıştırma hızı 500 rpm olarak kullanılmıştır.



Şekil 6.6. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (5 g/l sakkaroz, pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, Karıştırma hızı: ◇: 300, ◆: 400, ▲: 500, △: 600 rpm)

6.1.3.3. Hava Giriş Hızı Etkisi

Biyoproses işletim parametrelerinden hava giriş hızının, serin alkali proteaz üretimi için en uygun değerinin belirlenmesi amacıyla biyoreaktörde kesikli sistemde, 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm hava giriş hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Hava giriş hızı ile enzim aktivitesi, mikroorganizma derişimi, protein miktarı ve substrat konsantrasyonunun değişimi Şekil 6.7’de verilmiştir. Enzim aktivitesinin biyoreaktöre beslenen hava miktarı ile arttığı, maksimum aktivitenin 0.6 vvm hava giriş hızında 1054 U/ml olduğu görülmüştür. Maksimum mikroorganizma ve protein derişiminin, 0.6 vvm hava giriş hızında, sırasıyla 1.62 g/l ve 1.28 mg/ml olduğu gözlenmiştir. Mikroorganizma üç hava giriş hızında da 85-95. saat sonunda durağan evreye geçmiştir. Yüksek hava giriş hızının enzim aktivitesini arttırması, *T. turnirae*’den serin alkali proteaz üretiminde yüksek oksijen gerekliliğini ortaya koymuştur.



Şekil 6.7. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (5 g/l sakkaroz, pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: ◆: 0.4, ◇: 0.5, ▲: 0.6 vvm)

6.1.3.4. Oksijen Aktarım Parametreleri

Aerobik proseslerde oksijen aktarımı, ürün verimi ve seçimliliğini etkileyen önemli bir parametredir. Bir biyoprosesle oksijen gereksinimi ve aktarım hızı, mikroorganizma türüyle, biyodönüşüm ortamının fiziksel özelliği ile, biyoreaktör ve karıştırıcı konfigürasyonu ile ilgilidir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde oksijen/hava giriş hızı ve karıştırma hızı önemli biyoreaktör işletim parametreleridir. Bu parametrelerin etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar bölüm 6.1.3.2 ve 6.1.3.3 ' de verilmişti. Karıştırma hızı olarak 300, 400, 500 ve 600 rpm, havalandırma hızı olarak 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm değerleri ile oluşturulan biyoproses işletim şartları incelenmiştir.

Karıştırma hızı ve hava giriş hızı gibi temel biyoproses işletim parametrelerinin farklı değerlerinde dinamik oksijen aktarım deneyleri gerçekleştirilmiş, oksijen aktarım parametreleri; sıvı faz kütle aktarım katsayısı, k_La ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı, r_o , serin alkali proteaz enzim üretim prosesinin farklı kalma sürelerinde bulunmuştur. Karıştırma hızı ve hava giriş hızıyla, sıvı faz kütle aktarım katsayısı, k_La ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı, r_o ' ın değişimleri sırasıyla Tablo 6.1. ve 6.2.'de verilmiştir.

Tablo 6.1.'de görüldüğü gibi, karıştırma hızının artmasıyla k_La ve r_o değerleri de artış göstermiştir. r_o değerindeki artış, mikrobiyal büyümeye paralellik göstermektedir. Oksijen tüketim hızı, r_o , mikroorganizmanın üstel büyüme fazında en yüksek değere ulaşmış, daha sonra da düşüş göstermiştir. Biyoproseslerde, mikroorganizma konsantrasyonundaki artışla oksijen tüketim hızı, r_o 'ın artması beklenen bir sonuçtur. Literatürde yapılan bir çok çalışmada da , mikroorganizmanın üstel büyüme fazında oksijen tüketim hızı, r_o artmış, durağan fazda ve karbon kaynağının tükendiği durumlarda ise bu değer azalma göstermiştir (Ulgen, 1998; Özer, 2000).

Havalandırma hızının, sıvı faz kütle aktarım katsayısı, k_La ve mikroorganizma oksijen tüketim hızı, r_o değerlerine etkisini değerlendirmek amacıyla oluşturulan Tablo 6.2.'den de görüldüğü gibi, havalandırma hızının artmasıyla k_La ve r_o değerlerinde genel olarak artış görülmüştür. Elde edilen sonuçların ışığında, *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzim üretiminde, yüksek karıştırma ve havalandırma hızının en uygun oksijen aktarım koşullarını oluşturduğu söylenebilir.

Literatürde farklı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda, oksijen tüketim hızı, r_o ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı, k_La değerlerini sırasıyla; Ulgen ve Mavituna (1998) *Streptomyces coelicolor* ile $4.1-15.3 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.011-0.029 \text{ s}^{-1}$, Bilir (2002) *Bacillus licheniformis* ile $4-16.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.034-0.074 \text{ s}^{-1}$, Pehlivan (2001) *Bacillus subtilis* ile $1.2-29.7 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}\text{s}^{-1}$ ve $0.020-0.066 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir.

Tablo 6.1. Farklı karıştırma hızında $k_L a$ ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.

Karıştırma Hızı (rpm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	$k_L a$ (s ⁻¹)
300 rpm 0.6 vvm	5	6.2	0.019
	10	8.4	0.018
	15	9.1	0.020
	22	9.6	0.017
	37	9.2	0.021
	47	10.3	0.023
	54	11.5	0.018
	65	12.0	0.021
	80	11.9	0.019
	95	10.8	0.022
	103	9.4	0.020
	121	6.3	0.022
	135	5.0	0.021
400 rpm 0.6 vvm	6	7.0	0.028
	9	7.3	0.030
	14	9.7	0.029
	24	10.6	0.033
	31	11.2	0.027
	40	13.0	0.031
	50	13.5	0.030
	62	12.4	0.032
	73	14.6	0.029
	87	14.4	0.033
	96	13.6	0.027
	112	9.3	0.029
	129	7.1	0.024
500 rpm 0.6 vvm	5	7.9	0.035
	10	9.5	0.038
	15	9.3	0.039
	29	12.6	0.045
	37	14.7	0.044
	47	15.5	0.042
	61	18.3	0.039
	71	16.8	0.043
	86	17.3	0.038
	95	16.9	0.042
	111	10.2	0.040
	121	9.3	0.036
	135	6.7	0.037
600 rpm 0.6 vvm	6	8.6	0.040
	9	9.9	0.045
	14	12.2	0.052
	24	14.0	0.050
	31	16.3	0.056
	40	17.8	0.051
	50	19.0	0.043
	62	18.3	0.055
	75	19.4	0.052
	96	16.9	0.046
	112	9.0	0.042
	120	8.5	0.037
	135	7.6	0.035

Tablo 6.2. Farklı hava giriş hızında k_La ve r_o değerlerinin kalma süresi ile değişimi.

Hava Giriş Hızı (vvm)	Zaman (st)	$r_o \times 10^4$ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	k_La (s ⁻¹)
0.4 vvm 500 rpm	5	6.8	0.023
	8	8.2	0.027
	13	9.0	0.020
	22	9.3	0.026
	30	10.1	0.027
	47	10.4	0.024
	60	11.3	0.028
	72	12.2	0.026
	88	10.3	0.024
	104	9.7	0.027
	120	9.0	0.025
	137	6.4	0.022
0.5 vvm 500 rpm	5	7.0	0.033
	10	9.5	0.036
	16	8.9	0.028
	24	10.5	0.035
	38	12.2	0.029
	49	14.4	0.030
	56	13.7	0.032
	73	14.0	0.033
	89	12.3	0.035
	103	9.0	0.029
	120	9.1	0.031
	130	7.2	0.030
0.6 vvm 500 rpm	5	7.9	0.035
	10	9.5	0.038
	15	9.3	0.039
	29	12.6	0.045
	37	14.7	0.044
	47	15.5	0.042
	61	18.3	0.039
	71	16.8	0.043
	86	17.3	0.038
	95	16.9	0.042
	111	10.2	0.040
	121	9.3	0.036
	135	6.7	0.037

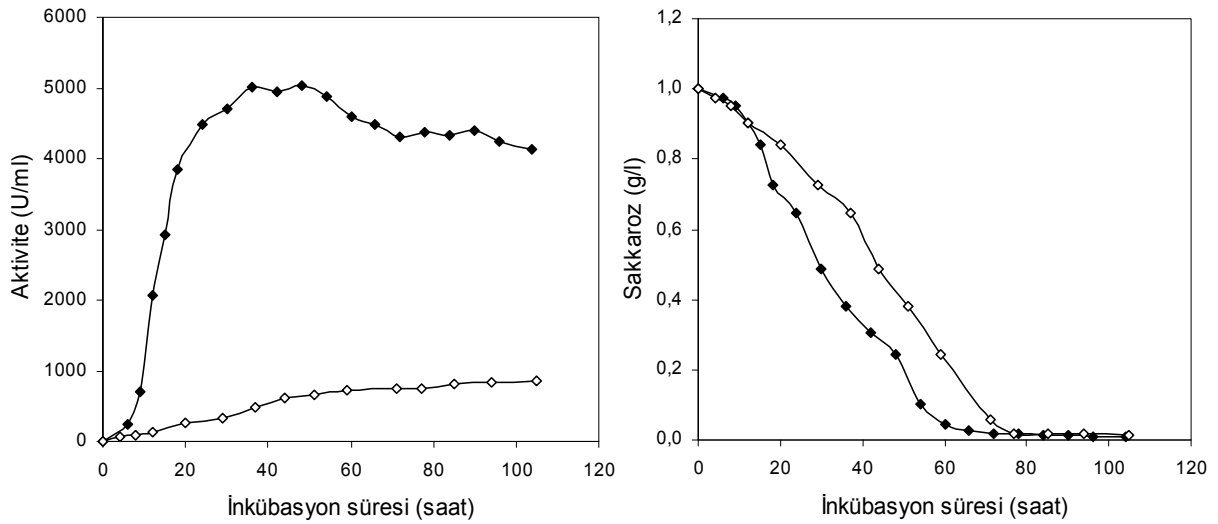
6.1.3.5. Kazein İlavesinin Etkisi

Biyoproseslerde mikroorganizmadan elde edilecek enzim substratının besiyerine konulması ile enzimin biyosentezinin hızlandırılabileceği düşüncesiyle daha önce erlenlerde yapılan çalışmalarda *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzimi üretiminde indükleyici görevi görmesi amacıyla belirli konsantrasyonlarda kazein ilave edilmişti. Çalışmanın bu aşamasında ise biyoreaktörde kesikli sistemle, 1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein içeren besi ortamında gerçekleştirilen fermentasyon sonunda enzim üretimindeki ve sakkaroz tüketimindeki değişim

incelenmiş ve sonuçlar 1 g/l sakkaroz içeren ortam sonuçlarıyla birlikte Şekil 6.8.'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, besi ortamında kazein varlığı enzim aktivitesini arttırmaktadır. Kazein içermeyen 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda kesikli sistemle gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda ulaşılan maksimum aktivite 902 U/ml iken, kazein içeren ortamda maksimum enzim aktivitesi 5030 U/ml değerine ulaşmıştır. Kazein ilavesiyle maksimum aktivite, ilave edilmemiş duruma göre yaklaşık 5-6 kat artmıştır. Sonuçlar daha önce elde edilen sonuçlarla benzerlik göstererek, ortama kazein ilavesinin mikroorganizmanın daha yüksek miktarlarda proteaz ürettiği küme halindeki morfolojisine daha uygun bir ortam sağladığı ve indüklemeye görevi yaptığı sonucuna varılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, enzim aktivitesi ve substrat tüketiminde elde edilen sonuçlar düzenli bir eğilim gösterirken, biomass oluşumu ve protein oluşumunda elde edilen sonuçlar düzensiz bir eğilim göstermektedir. Bu nedenle biomass ve protein derişim sonuçları grafiklerde verilmemiştir.

6.1.4. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Sakkaroz İlavesi ile Proteaz Üretimi

Biyoproseslerin bir çoğunda, yüksek konsantrasyondaki karbon kaynağı inhibisyon etkisine sahiptir. Yapılan deneyler sonucunda, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde de yüksek glikoz ve sakkaroz konsantrasyonunda benzer bir etki görülmüştür. Karbon kaynağının



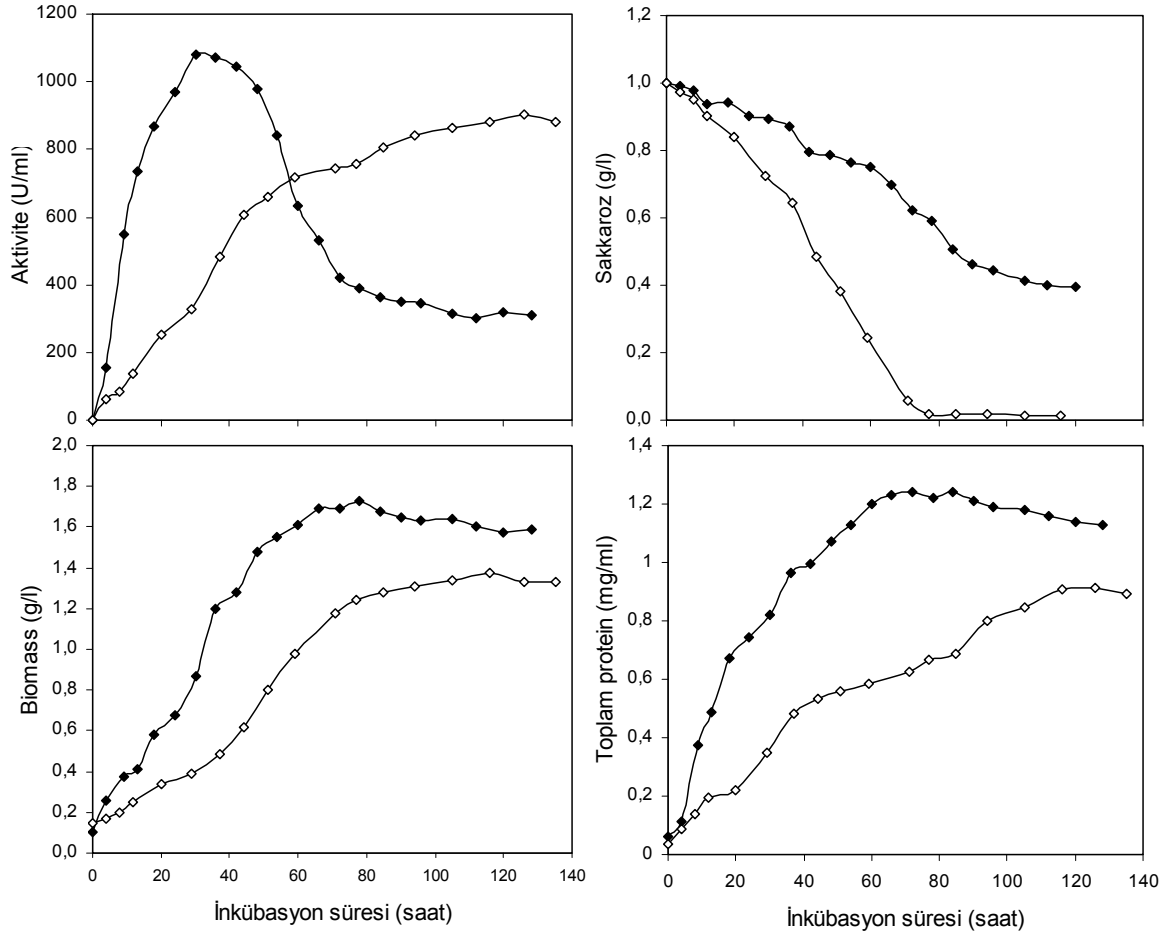
Şekil 6.8. Biyoreaktörde kesikli sistemde kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ◆: 1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein, ◇: 1 g/l sakkaroz)

bu etkisini elimine etmek veya en azından minimuma indirmek için karbon kaynağının biyoproses ortamında düşük seviyede tutulması gerekmektedir. Bunun için de genellikle yarı kesikli (fed-batch) sisteme başvurulur. Bu çalışmada, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde karbon kaynakları etkisinin incelendiği deneylerde, optimum karbon kaynağı olarak belirlenen sakkaroz kullanılmıştır. Yüksek sakkaroz konsantrasyonunun inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için, sakkaroz çözeltisi;

- Düşük hızda sürekli olarak
 - Proses süresince belirli aralıklarla (6, 8 ve 12 saat)
 - Logaritmik evrenin sonuna kadar 6 saat aralıklarla
- olmak üzere farklı stratejiler uygulanarak biyoreaktöre beslenmiştir.

6.1.4.1. Sürekli Beslemeli Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

Çalışmanın bu aşamasında, sürekli beslemeli yarı kesikli sistem uygulanarak, sakkaroz çözeltisi düşük ve sabit bir hızda peristaltik pompa ile biyoreaktöre beslenmiştir. Başlangıçta biyoproses ortamı düşük karbon kaynağı (1 g/l sakkaroz) konsantrasyonunda hazırlanmış ve kesikli sistem uygulanmıştır. Yaklaşık 12 saatten itibaren, yani sakkaroz mikroorganizma tarafından bir miktar tüketildikten sonra konsantre sakkaroz çözeltisi (20 g/l sakkaroz), 6 ml/st sabit hızla biyoreaktöre steril şartlarda beslenmiştir (yarı kesikli sistem). Çalışma süresince alınan örneklerde, enzim aktivitesi, mikroorganizma, toplam protein ve sakkaroz değişimleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.9'de verilmiştir. Sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde maksimum enzim aktivitesi 30. saatte 1080 U/ml, kesikli sistemde ise bu değer 120. saatte 902 U/ml olarak ölçülmüştür. Bu durum, sürekli beslemeli yarı kesikli sistemle biyoproses ortamına sakkaroz ilavesinin, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde üretim mekanizması üzerine, zaman ve enzim aktivitesi yönünden olumlu bir etki yaptığını göstermektedir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde 1.73 g/l olarak belirlenirken kesikli sistemde 1.37 g/l , maksimum protein miktarı ise her iki durum için sırasıyla 1.24 ve 0.91 mg/ml olarak ölçülmüştür.

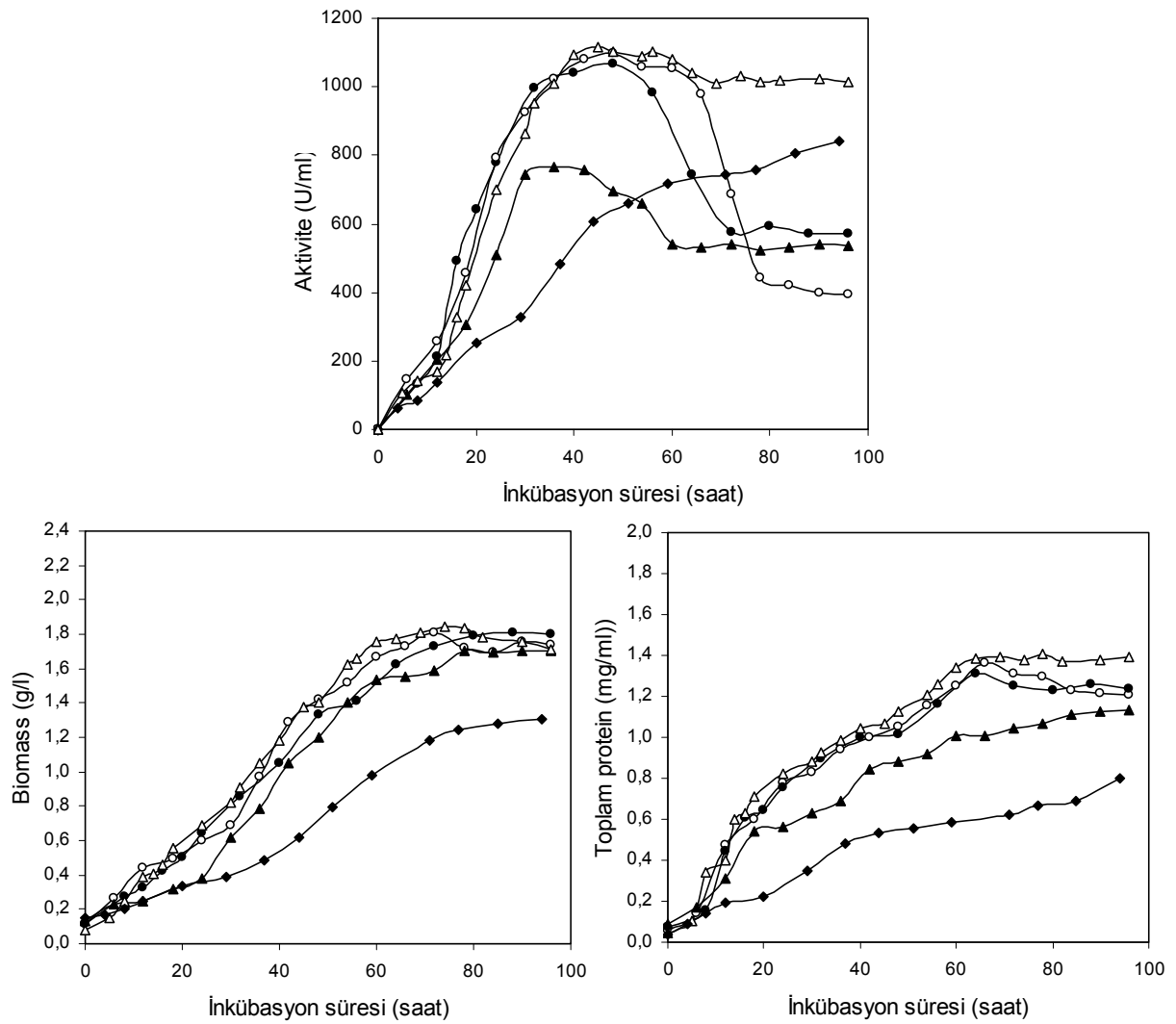


Şekil 6.9. Biyoreaktörde sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ◆: Sürekli beslemeli yarı kesikli sistem, ◇: Kontrol, Kesikli sistem (1 g/l sakkaroz))

6.1.4.2. Belirli Aralıklarla Beslemeli (Pulse) Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

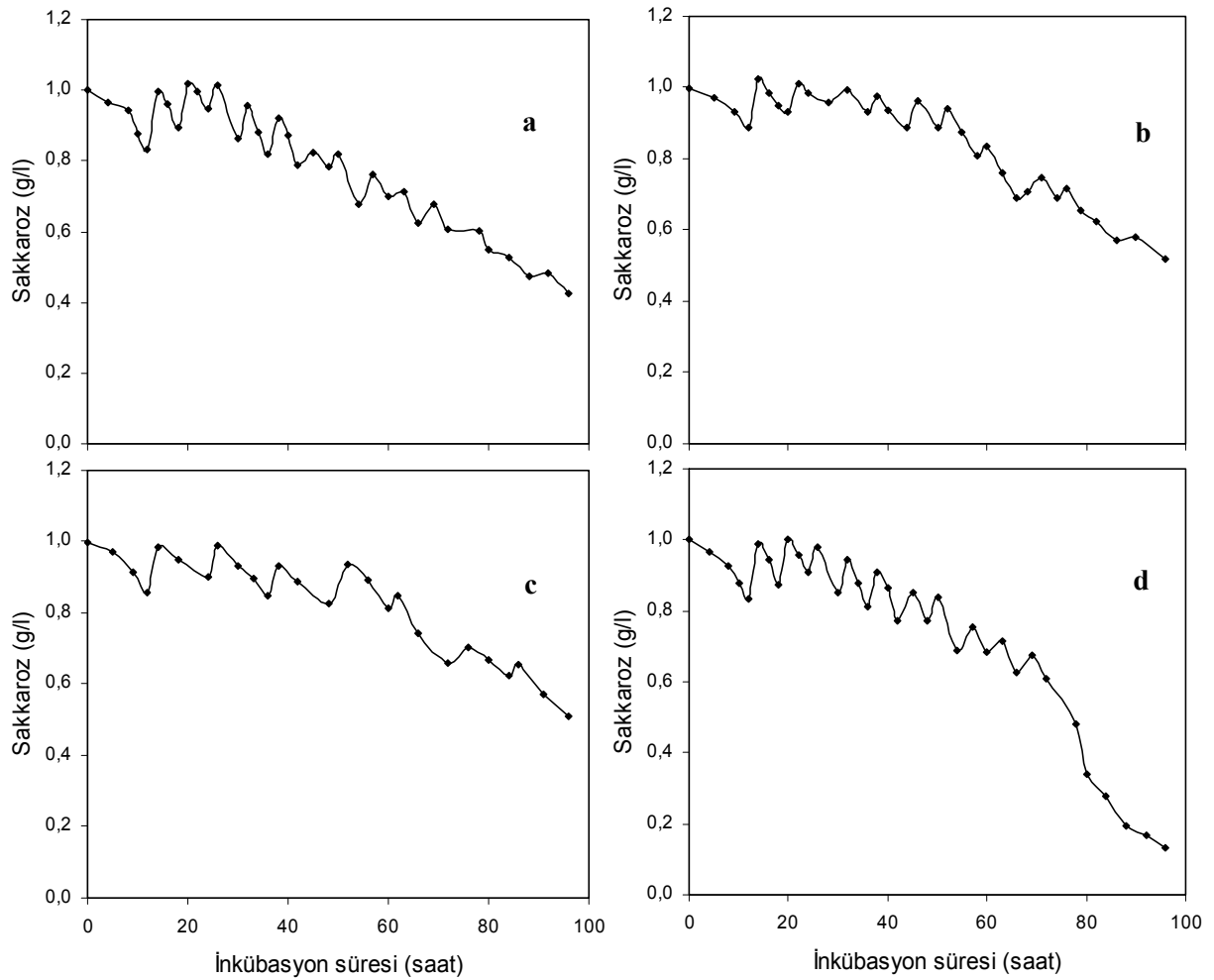
Yarı kesikli sistemle gerçekleştirilen deneylerin ikinci aşamasında, yüksek konsantrasyondaki (20 g/l) sakkaroz çözeltisi belirli aralıklarla biyoreaktöre beslenmiştir. Biyoproses ortamı başlangıçta 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda hazırlanmış, 12 saat kesikli fermentasyon sonunda, 20 g/l sakkaroz çözeltisi 6, 8, 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar ve diğer bir durumda da exponansiyel faz sonuna kadar 6 saat aralıklarla 10' ar ml ilave edilmiştir. Fermentasyon ortamındaki enzim aktivitesi, mikroorganizma, protein ve sakkaroz derişimlerinin zamanla değişimi Şekil 6.10' da gösterilmiştir. Uygulanan dört farklı strateji içerisinde en yüksek enzim aktivitesi, 12 saatlik kesikli fermentasyon sonrasında, exponansiyel faz sonuna kadar her 6 saatte bir 20 g/l sakkaroz çözeltisinin ilave edildiği durumda gözlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 45. saatte 1117 olarak ölçülmüş ve yaklaşık 96 saatlik sonuna kadar enzim aktivitesinin bu değere yakın değerlerde olduğu

görülmüştür. 6, 8 ve 12 saat aralıklarla yapılan beslemeler sonucunda elde edilen maksimum enzim aktivitesi ve süreleri ise sırasıyla 48. saatte 1100, 48. saatte 1069 ve 36. saatte 767 U/ml'dir. Maksimum mikroorganizma derişimi 6, 8, 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar ve exponansiyel faz sonuna kadar 6 saat aralıklarla ilave durumları için sırasıyla 1.81, 1.8, 1.7 ve 1.84 g/l 'dir. Toplam protein derişimi ise 1.37, 1.31, 1.13 ve 1.4 mg/ml olarak ölçülmüştür. Belirli aralıklarla beslemeli yarı kesikli sistemin uygulandığı durumda, enzim aktivitesinin kesikli sisteme göre çok daha kısa bir sürede maksimum değere ulaştığı, ancak 6, 8, 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar yarı kesikli sistemin uygulandığı durumda yaklaşık 55-70. saatten sonra düşüş gösterdiği, exponansiyel faz sonuna kadar 6 saat aralıklarla ilave edildiği durumda ise ulaşılan maksimum aktivitenin korunduğu gözlenmiştir.



Şekil 6.10. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass ve toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ○: 6, ●: 8, ▲: 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar beslemeli, Δ: 6 saat aralıklarla exponansiyel faz sonuna kadar beslemeli yarı kesikli sistem, ◆: Kontrol, 1 g/l sakkaroz kesikli sistem)

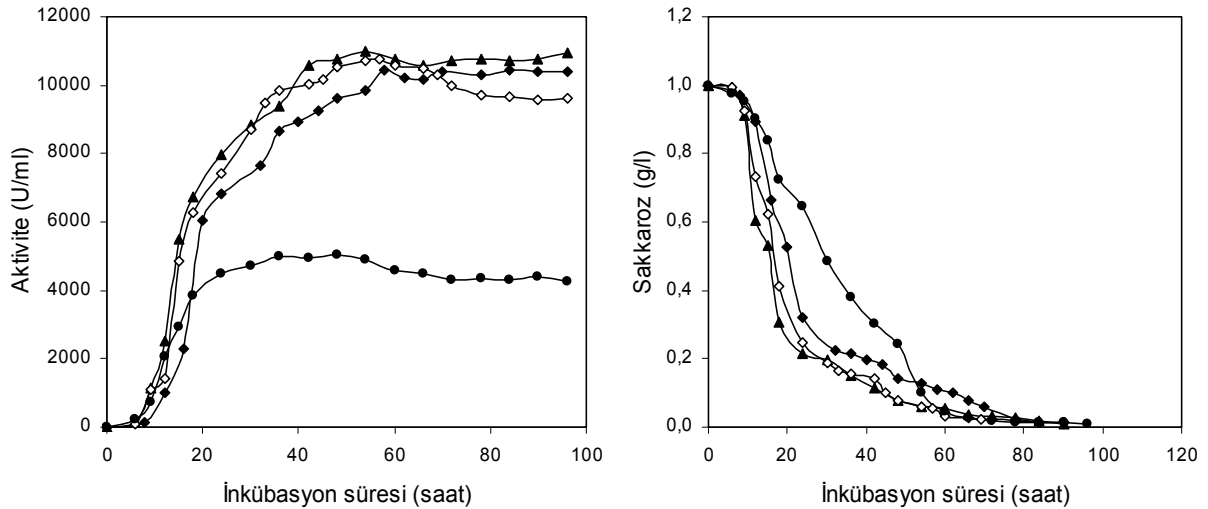
Bu durum, belirli aralıklarla beslemeli yarı kesikli sistemle biyoproses ortamına sakkaroz ilavesi ile yaratılan pulse etkinin, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde üretim mekanizması üzerine olumlu bir etki yaptığını göstermektedir. Literatürde; Ding ve Tan (2006) tarafından, farklı yarı kesikli besleme stratejileri uygulayarak *Lactobacillus casei*'den L-laktik asit üretiminin incelendiği çalışmada, kesikli sisteme göre yarı kesikli sistemin ürün konsantrasyonunu % 57 oranında arttırdığı belirlenmiştir. Exponansiyel faz sonuna kadar yarı kesikli sistemin uygulandığı stratejinin uygulanan diğer stratejilere göre daha avantajlı olduğu görülmüştür. Gao vd. (2003) tarafından yapılan çalışmada ise, *Saccharomyces cerevisiae*'den ergosterol üretiminde uygulanan farklı yarı kesikli besleme stratejileri içerisinde en iyi sonuç, belirli zamanlarda yaratılan pulse etkiyle oluşturulan strateji ile elde edilmiştir. Uygulanan dört strateji için sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 6.11.'de verilmiştir.



Şekil 6.11. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, **a:** 6 , **b:** 8, **c:** 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar beslemeli, **d:** 6 saat aralıklarla exponansiyel faz sonuna kadar beslemeli yarı kesikli sistem)

6.1.5. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Kazein İlavesi ile Proteaz Üretimi

Daha önce yapılan çalışmalarda, biyoproses ortamına kazein ilavesinin, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde indükleyici görevi yaptığı ve ilave edilmemiş duruma göre maksimum aktiviteyi yaklaşık 5-6 kat arttırdığı görülmüştü. Bu nedenle biyoproses ortamına kazein belirli aralıklarla beslenerek farklı besleme stratejileri uygulanmıştır. Biyoproses ortamı başlangıçta 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda hazırlanmış, 12 saat kesikli fermentasyon sonunda, 0.1 g kazein steril şartlarda, 6 ve 8 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar ve diğer bir durumda da kazeinsiz ortama göre exponansiyel faz sonuna kadar (yaklaşık 70 saat) 6 saat aralıklarla ilave edilmiştir. Her durum için, oluşturulan pulse etki sonucunda biyoproses ortamındaki enzim aktivitesi ve sakkaroz derişiminin zamanla değişimi Şekil 6.12' de görülmektedir. Mikroorganizma ve toplam protein derişimleri düzenli bir eğilim göstermediğinden sonuçlar içerisinde verilmemiştir. Uygulanan üç farklı strateji içerisinde en yüksek enzim aktivitesi, her 6 saatte bir fermentasyon sonuna kadar 0.1 g kazein ilave edildiği durumda 54. saatte 11010 U/ml olarak belirlenmiştir. 8 saatlik aralıklarla yapılan besleme durumunda maksimum enzim aktivitesi 58. saatte 10447 U/ml'dir. Logaritmik faz sonuna kadar 6 saat aralıklarla yapılan besleme durumunda ise maksimum aktivite 57. saatte 10765 U/ml olarak ölçülmüş ancak logaritmik faz sonunda besleme kesildiğinden dolayı aktivitede bir miktar düşüş gözlenmiştir. Biyoproses ortamına, kazein daha sık aralıklarla ilave edildikçe, proteaz enzim aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Bu durumda, ortama belirli aralıklarla eklenen kazeinin, mikroorganizmanın enzim sentez mekanizmasını tetiklediği ve enzim sentezinde indükleyici görevi yaptığı sonucuna varılabilir.



Şekil 6.12. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistem ile kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ◆: 8 saat, ▲: 6 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar beslemeli, ◇: 6 saat aralıklarla exponansiyel faz sonuna kadar beslemeli yarı kesikli sistem, ●: Kontrol, 1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein kesikli sistem)

Elde edilen sonuçlardan, *T.turnirae*'den proteaz enzimi üretiminde, belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemle besi ortamına kazein ilavesinin, kesikli sistem uygulamasına göre daha avantajlı olduğu görülmüştür. Maksimum enzim aktivitesi, kesikli sistemle sadece 1 g/l sakkaroz içeren ortamda 902 U/ml, kesikli sistemle kazein içeren ortamda (1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein) 5030 U/ml iken belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemle kazein ilave edilen (6 saatte bir) ortamda 11010 U/ml ölçülmüştür.

6.2. SM Ortamında Rod Halindeki Hücrelerle Proteaz Üretimi

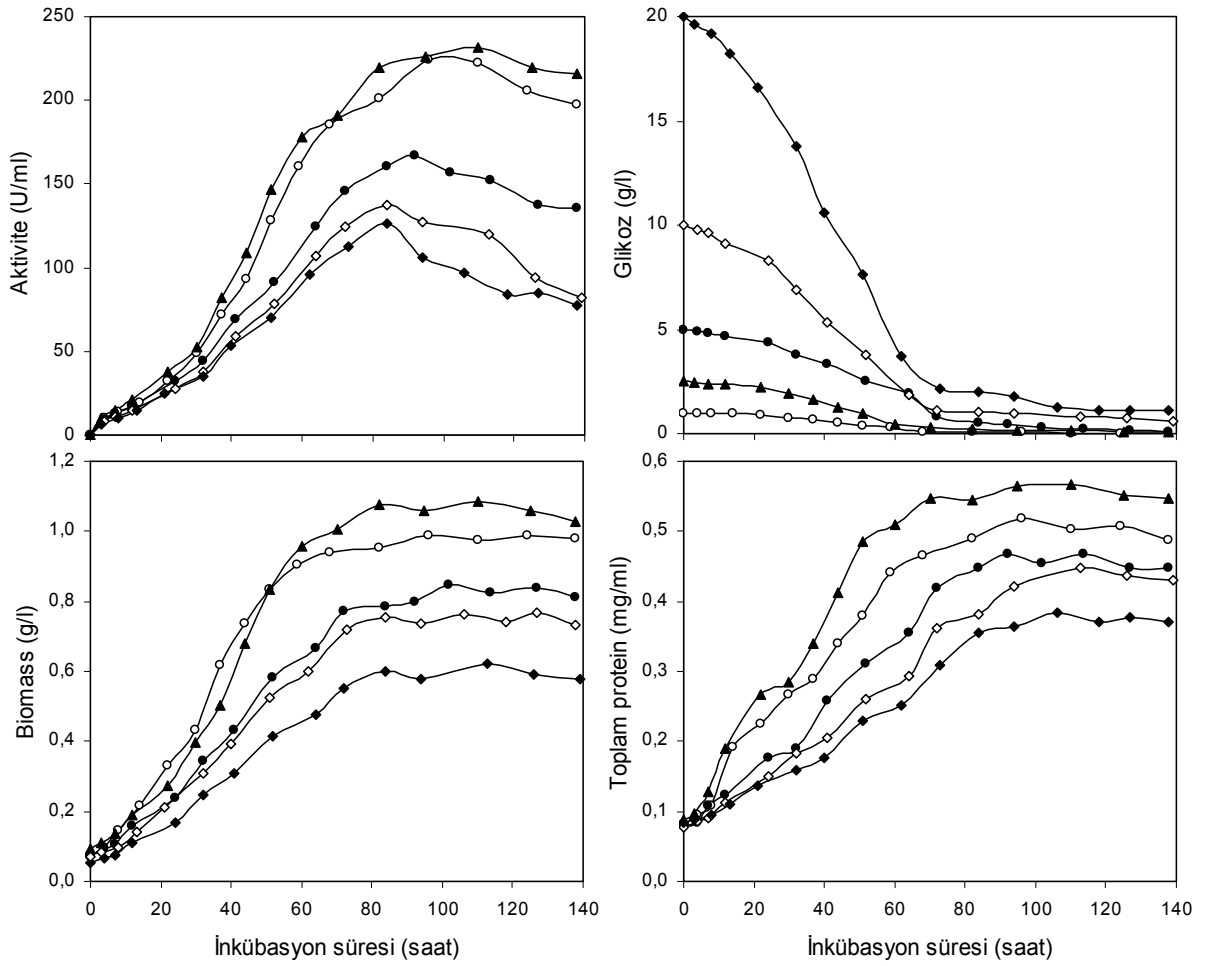
Çalışmanın bu aşamasında, rod şeklindeki bakteri için orijinal olarak Grene ve Ferrer (1986) tarafından geliştirilen standart besi ortamı (SM) kullanılmış ve rod halindeki bakterinin SM ortamındaki davranışına bağlı olarak *T.turnirae*'den proteaz üretimi optimize edilmiştir. Deneyler iki kısımda gerçekleştirilmiştir. Birinci kısımda erlenlerde, karbon kaynağı olarak çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan glikoz ve sakkarozun proteaz üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve karbon kaynağı içeren besi ortamına kazein ilave edilerek indükleme etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında ise 0.8 L'lik çalışma hacmine sahip 1 L'lik biyoreaktörde kesikli ve yarı kesikli sistemler kullanılarak ve farklı stratejiler geliştirilerek, bazı parametrelerin mikroorganizma gelişimi ve enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

6.2.1. Karbon Kaynağının Etkisi

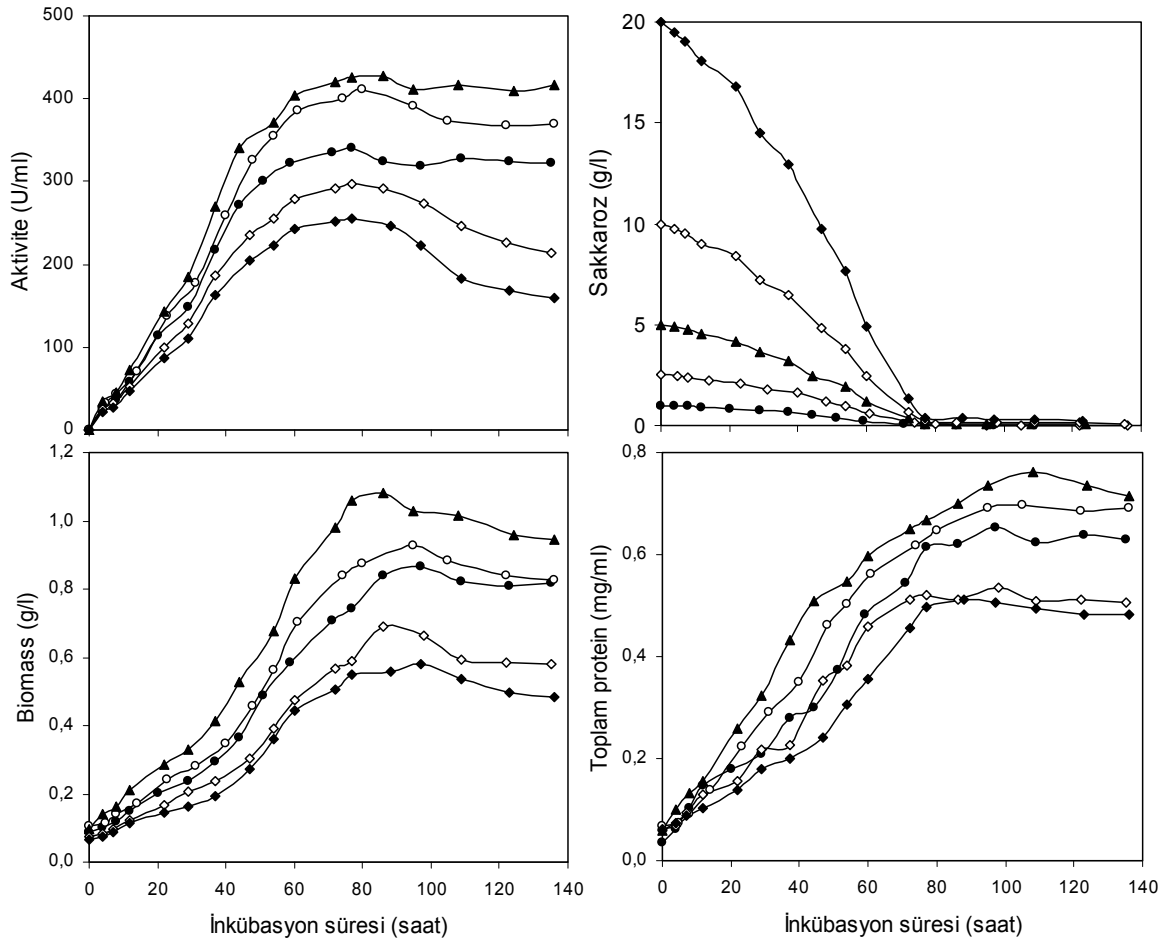
Karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı deneylerde, başlangıç glikoz konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla beş farklı glikoz konsantrasyonunda (1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l) 250 ml'lik erlenlerde fermantasyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.13'de verilmiştir. Şekilde, başlangıç glikoz konsantrasyonunun, enzim aktivitesi, biomass oluşumu, substrat tüketimi ve toplam protein üzerine etkisi görülmektedir. Glikoz konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gözlenmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, maksimum enzim aktivitesi 2.5 g/l glikoz konsantrasyonunda 231 U/ml olarak ölçülmüş ve mikrobiyal büyümeye paralel olarak, enzim aktivitesi ve protein miktarının da arttığı gözlenmiştir. Mikroorganizma yaklaşık 72-82. saat aralığında durağan faza ulaşmaktadır. Maksimum biomass konsantrasyonu 2.5 g/l glikoz konsantrasyonunda 1.08 g/l, maksimum protein miktarı ise 0.56 mg/ml olarak ölçülmüştür.

Karbon kaynağı olarak sakkarozun enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda fermantasyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.14'de verilmiştir. 1, 2.5 ve 5 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında, konsantrasyon artışı ile enzim aktivitesi de artış göstermiş ve maksimum enzim aktivitesi sırasıyla 339, 411 ve

427 U/ml olarak ölçülmüştür. 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinin diğer konsantrasyonlara göre daha düşük olduğu görülmüş ve sırasıyla maksimum enzim aktivitesi 296 ve 255 U/ml olarak belirlenmiştir. Yüksek sakkaroz konsantrasyonun enzim üretimi üzerine represyon etkisi yaptığı gözlenmiştir. Şekil 6.14.'de görüldüğü gibi, beş farklı sakkaroz konsantrasyonunda, mikrobiyal büyümeye paralel olarak, enzim aktivitesi ve protein miktarı artmaktadır. Ayrıca substrat konsantrasyonu arttıkça substrat tüketim hızı da artmaktadır. Yapılan deneyler sonucunda, karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı fermentasyon ortamında enzim aktivitesinin glikoz kullanılan ortama göre daha yüksek olduğu görülmüştür.



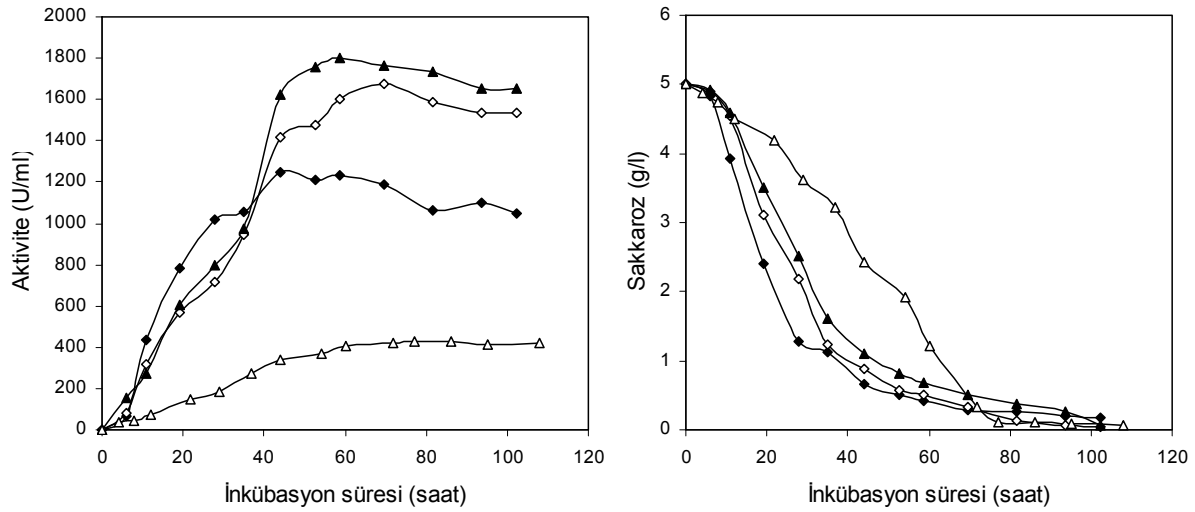
Şekil 6.13. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve glikoz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ○: 1, ▲: 2.5, ●: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l glikoz)



Şekil 6.14 Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ●: 1, ○: 2.5, ▲: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l sakkaroz)

6.2.2. İndükleyici Etkisi

Bu çalışmada *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzimi üretiminde bir indükleyici ilavesiyle elde edilen enzim aktivitesinin daha da arttırılacağı düşünülmüş ve bu amaçla PB ortamında küme halindeki hücrelerle yapılan çalışmalarda olduğu gibi indükleyici olarak kazein kullanılmıştır. Karbon kaynağı denemelerinde, en yüksek aktivitenin elde edildiği 5 g/l sakkaroz içeren besiyerine 0.1, 0.2 ve 0.3 g/l konsantrasyonunda kazein ilave edilmiştir. Bu durumun, enzim üretimi ve sakkaroz tüketimi üzerine olan etkisi Şekil 6.15.'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, ilave edilen kazein miktarı arttıkça enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketim hızı da artmaktadır. Kazein ilave edilmemiş durumda (5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda) elde edilen maksimum enzim aktivitesi 427 U/ml iken, 0.1, 0.2 ve 0.3 g/l kazein ilave edilmiş durumda sırasıyla maksimum enzim aktiviteleri 1244, 1674 ve 1797 U/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.15. Farklı kazein konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 5 g/l sakkaroz + 0.1 g/l kazein, ◇: 5 g/l sakkaroz + 0.2 g/l kazein, ▲: 5 g/l sakkaroz + 0.3 g/l kazein, △: Kontrol , 5 g/l sakkaroz)

Kazein ilavesinin enzim aktivitesini yaklaşık 3-4 kat arttırdığı ve *T.turnirae*'den proteaz üretiminde indükleyici görevi yaptığı görülmüştür. Ayrıca ortama kazein ilavesinin, mikroorganizmanın daha yüksek miktarlarda proteaz ürettiği küme halindeki morfolojisine geçişi sağladığı gözlenmiştir. Bu durumda fermentasyon ortamında mikroorganizma yoğunluğu daha fazla olup, mikroorganizmanın mikroskop altındaki görüntüsünün kümeleşme eğiliminde olduğu görülmüştür. Yapılan deneyler sonucunda, enzim aktivitesi ve substrat tüketiminde elde edilen sonuçlar düzenli bir eğilim gösterirken, biomass oluşumu ve protein oluşumunda elde edilen sonuçlar düzensiz bir eğilim göstermektedir. Bu nedenle biomass ve protein derişim sonuçları verilmemiştir.

6.2.3. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

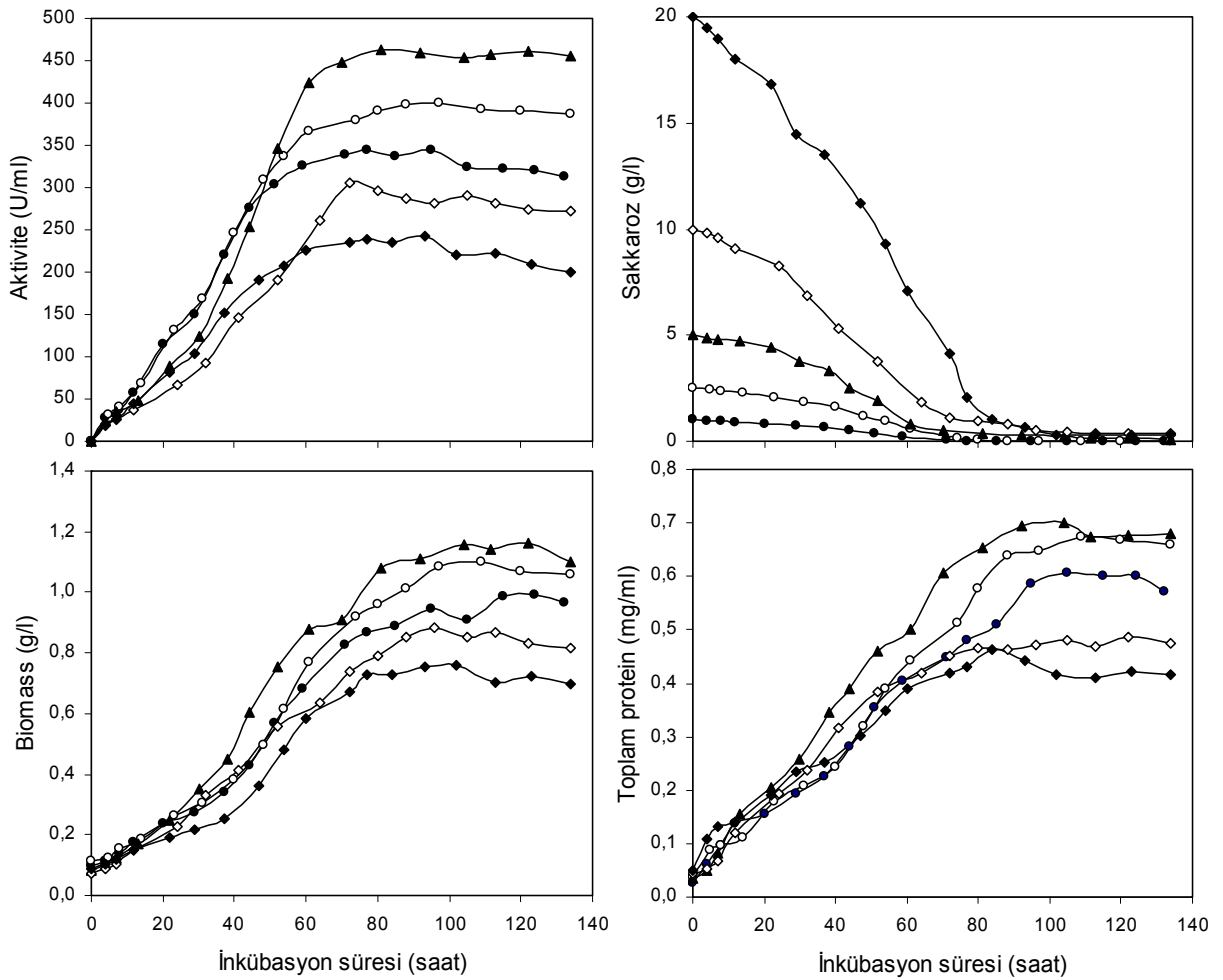
T. turnirae'den serin alkali proteaz üretiminde rod hücrelerle erlenlerde yapılan deneylerden elde edilen sonuçların ışığında, 1 l'lik laboratuvar ölçekli bir biyoreaktörde kesikli sistemle fermentasyon gerçekleştirilmiş ölçek büyütmenin ve substrat konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca sakkaroz içeren fermentasyon ortamına kazein ilavesinin enzim üretimi üzerine etkisi kesikli sistemde işletilen biyoreaktörde araştırılmıştır.

6.2.3.1. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

T. turnirae'den serin alkali proteaz üretiminde rod hücrelerle erlenlerde yapılan deneyler sonucunda maksimum enzim aktivitesi karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı

durumda elde edilmiştir. Bu nedenle biyoreaktörde yapılan çalışmalarda, karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanılmıştır.

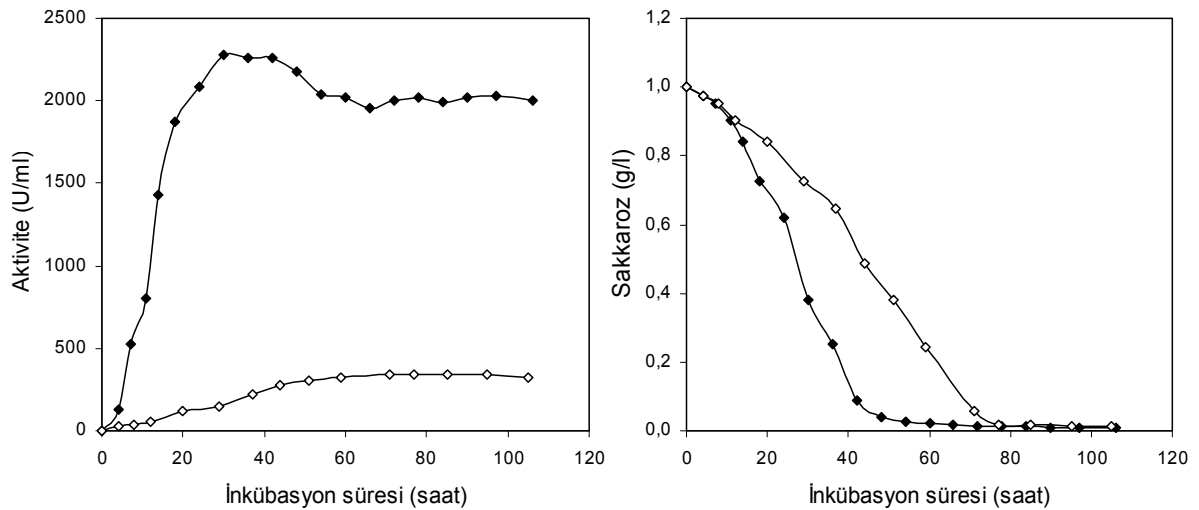
Sakkaroz konsantrasyonunun serin alkali proteaz üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında fermentasyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.16'da verilmiştir. Sonuçlar erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiş, maksimum enzim aktivitesi 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda 463 U/ml olarak ölçülmüştür. Şekil 6.16'da görüldüğü gibi bütün konsantrasyonlar için, mikrobiyal büyüme ile enzim aktivitesi ve protein miktarı arasında paralel bir ilişki görülmektedir. Biyoreaktörde elde edilen deney sonuçları ile erlenlerde elde edilen deney sonuçlarının birbiriyle uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Ölçek büyütmenin sistem üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir.



Şekil 6.16. Biyoreaktörde kesikli sistemde farklı sakkaroz konsantrasyonlarında enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 500 rpm, T: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ●: 1, ○: 2.5, ▲: 5, ◇: 10, ◆: 20 g/l sakkaroz)

6.2.3.2. Kazein İlavesinin Etkisi

Daha önce erlenlerde SM ortamında rod hücrelerle yapılan çalışmalarda *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzimi üretiminde indükleyici görevi görmesi amacıyla belirli konsantrasyonlarda kazein ilave edilmişti ve enzim aktivitesini 3-4 kat arttırdığı gözlenmişti. Çalışmanın bu aşamasında ise biyoreaktörde kesikli sistemle, 1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein içeren besi ortamında gerçekleştirilen fermentasyon sonunda enzim üretimindeki ve sakkaroz tüketimindeki değişim incelenmiş ve sonuçlar kazeinsiz ortamda elde edilen değerlerle karşılaştırmalı olarak Şekil 6.17.'de verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi kazein içermeyen 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda kesikli sistemle gerçekleştirilen fermentasyon sonunda 343 U/ml, kazein içeren ortamda ise 2280 U/ml olarak belirlenmiştir. Sonuçlar daha önce erlenlerde elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiş ve kazein ilavesiyle maksimum aktivite, ilave edilmemiş duruma göre yaklaşık 7 kat artmıştır. Rod halindeki hücrelerle SM besi ortamında gerçekleştirilen fermentasyon ortamına kazein ilavesinin, mikroorganizmanın daha yüksek miktarlarda proteaz ürettiği küme halindeki morfolojisine geçişi sağladığı ve indüklemeye görevi yaptığı sonucuna varılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, enzim aktivitesi ve substrat tüketiminde elde edilen sonuçlar düzenli bir eğilim gösterirken, biomass oluşumu ve protein oluşumunda elde edilen sonuçlar düzensiz bir eğilim göstermektedir. Bu nedenle biomass ve protein derişim sonuçları verilmemiştir.



Şekil 6.17. Biyoreaktörde kesikli sistem ile kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ◆: 1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein , ◇: Kontrol, 1 g/l sakkaroz)

6.2.4. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Sakkaroz İlavesi ile Proteaz Üretimi

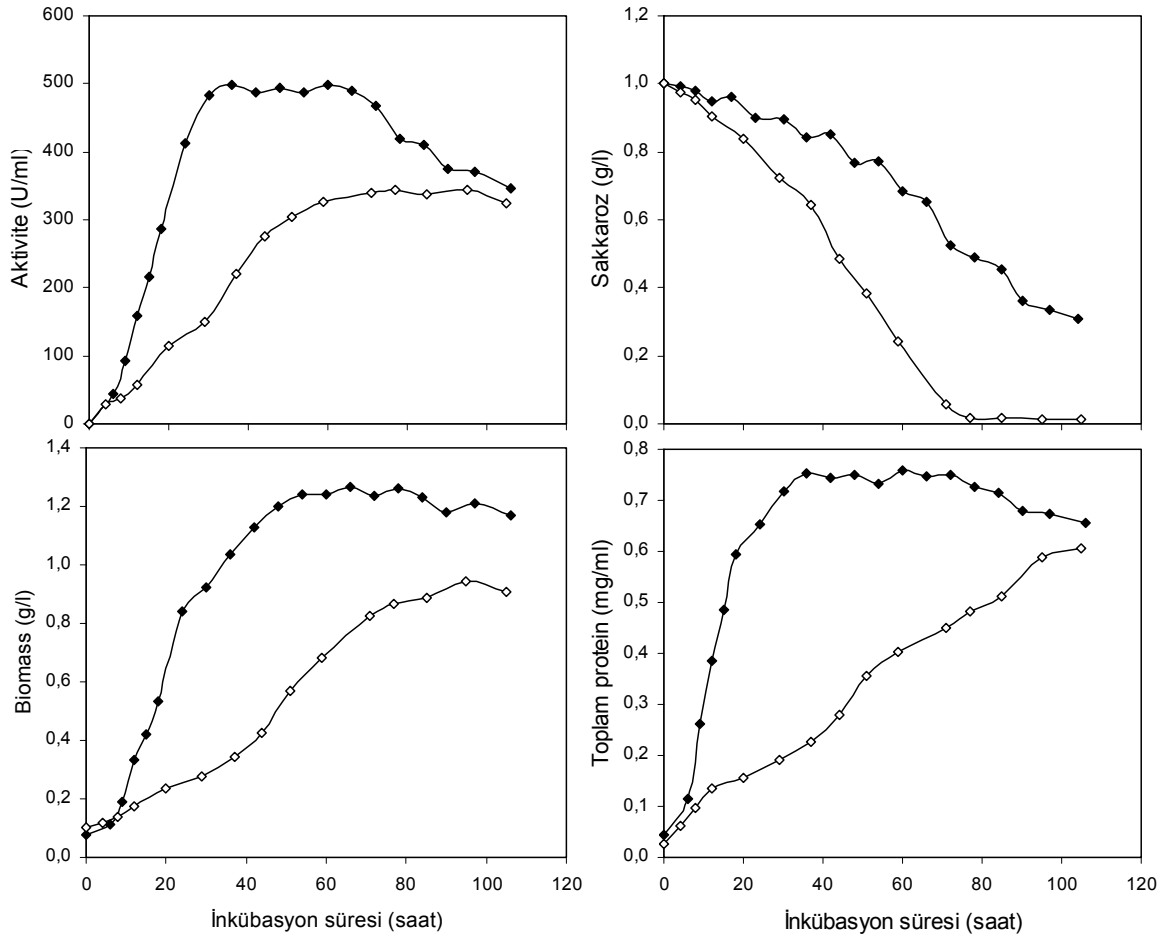
Yüksek karbon kaynağı konsantrasyonunda represyon etkisinin gözlemlendiği biyoproseslerde, bu etkiyi elimine etmek amacıyla karbon kaynağının biyoproses ortamında düşük seviyede tutulması planlanabilir. Bunun için de genellikle yarı kesikli (fed-batch) sistem uygulanarak fermentasyon gerçekleştirilir. Bu amaçla çalışmanın bu kısmında, rod haldeki *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde yüksek sakkaroz konsantrasyonunun inhibisyon etkisini ortadan kaldırmak için, sakkaroz biyoreaktöre farklı stratejiler uygulanarak yarı kesikli beslenmiştir. Sakkaroz çözeltisi;

- Düşük hızda sürekli olarak
- Proses süresince belirli aralıklarla (6, 8 ve 12 saat)
- Logaritmik evrenin sonuna kadar 6 saat aralıklarla

olmak üzere farklı besleme stratejileri uygulanmıştır.

6.2.4.1. Sürekli Beslemeli Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

Çalışmanın bu aşamasında, sakkaroz çözeltisi düşük ve sabit bir hızda peristaltik pompa ile sürekli beslemeli yarı kesikli sistem uygulanarak biyoreaktöre beslenmiştir. Başlangıçta 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda fermentasyon gerçekleştirilmiş (kesikli sistem) ve yaklaşık 12 saat sonra yani sakkarozun bir kısmı mikroorganizma tarafından tüketildikten sonra konsantre sakkaroz çözeltisi (20 g/l sakkaroz), 6 ml/st sabit hızda steril şartlarda biyoreaktöre beslenmiştir. Şekil 6.18.'de zamanla enzim aktivitesi, mikroorganizma derişimi, toplam protein derişimi ve substrat konsantrasyonu değişimleri verilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi 36. saat sonunda 497 U/ml olarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesi maksimum değere ulaştıktan sonra bu değerlerde kalmış ancak 72 saat kalma süresi sonunda düşüş göstermiştir. Sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde maksimum enzim aktivitesine 25. saatte ulaşılırken, kesikli sistemde 75. saatte ulaşılmıştır. Bu sonuçların ışığında, sürekli beslemeli yarı kesikli sistemle biyoproses ortamına sakkaroz ilavesinin, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde üretim mekanizması üzerine olumlu bir etki yaptığı gözlenmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde 1.26 g/l olarak ölçülürken kesikli sistemde bu değer 0.99 g/l olarak ölçülmüştür. Aynı durum için maksimum protein miktarı sırasıyla 0.75 ve 0.60 mg/ml olarak bulunmuştur.

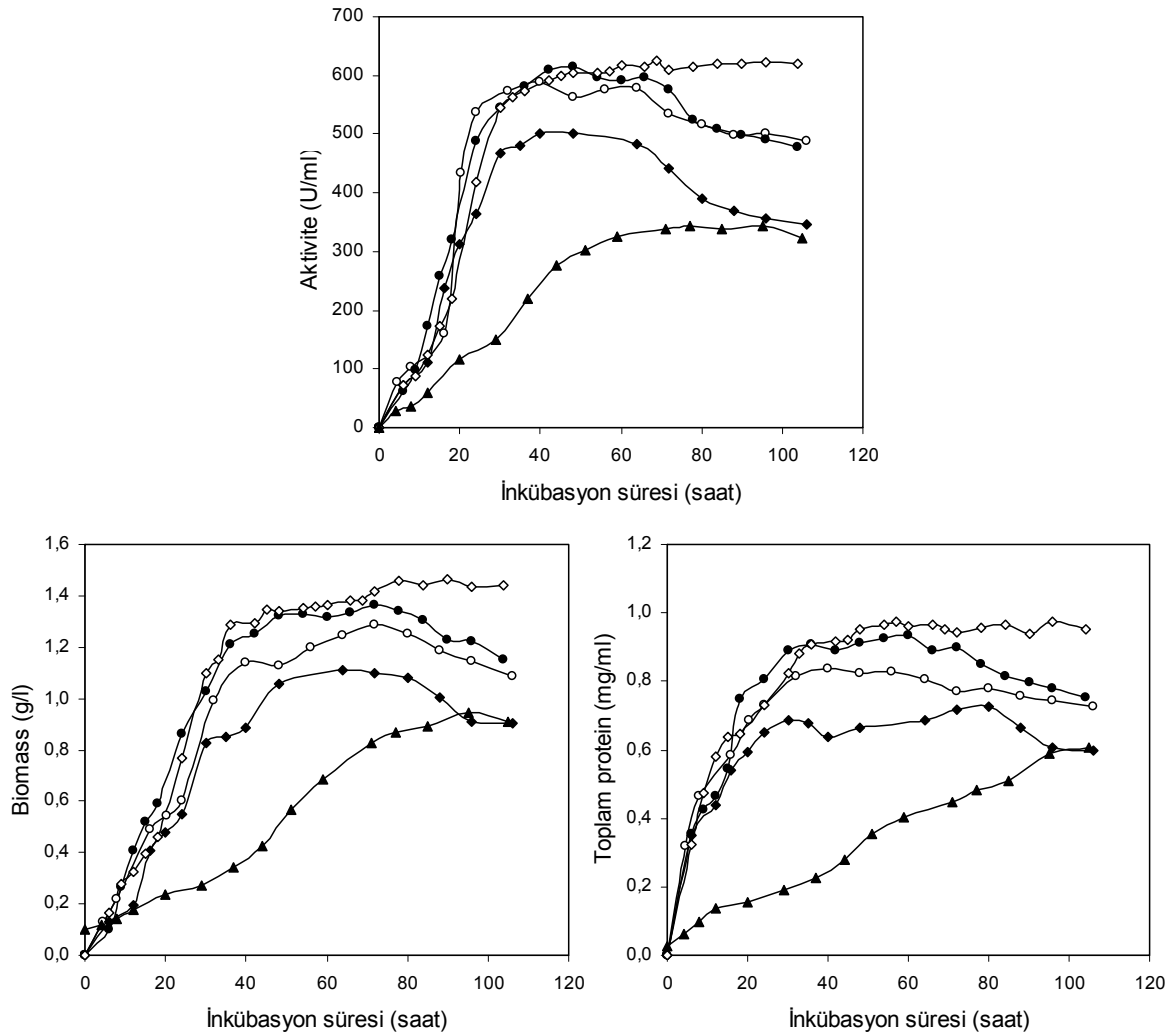


Şekil 6.18. Biyoreaktörde sürekli beslemeli yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass, toplam protein ve sakkaroz konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, ◆: Sürekli beslemeli yarı kesikli sistem, ◇: Kontrol, Kesikli sistem (1 g/l sakkaroz))

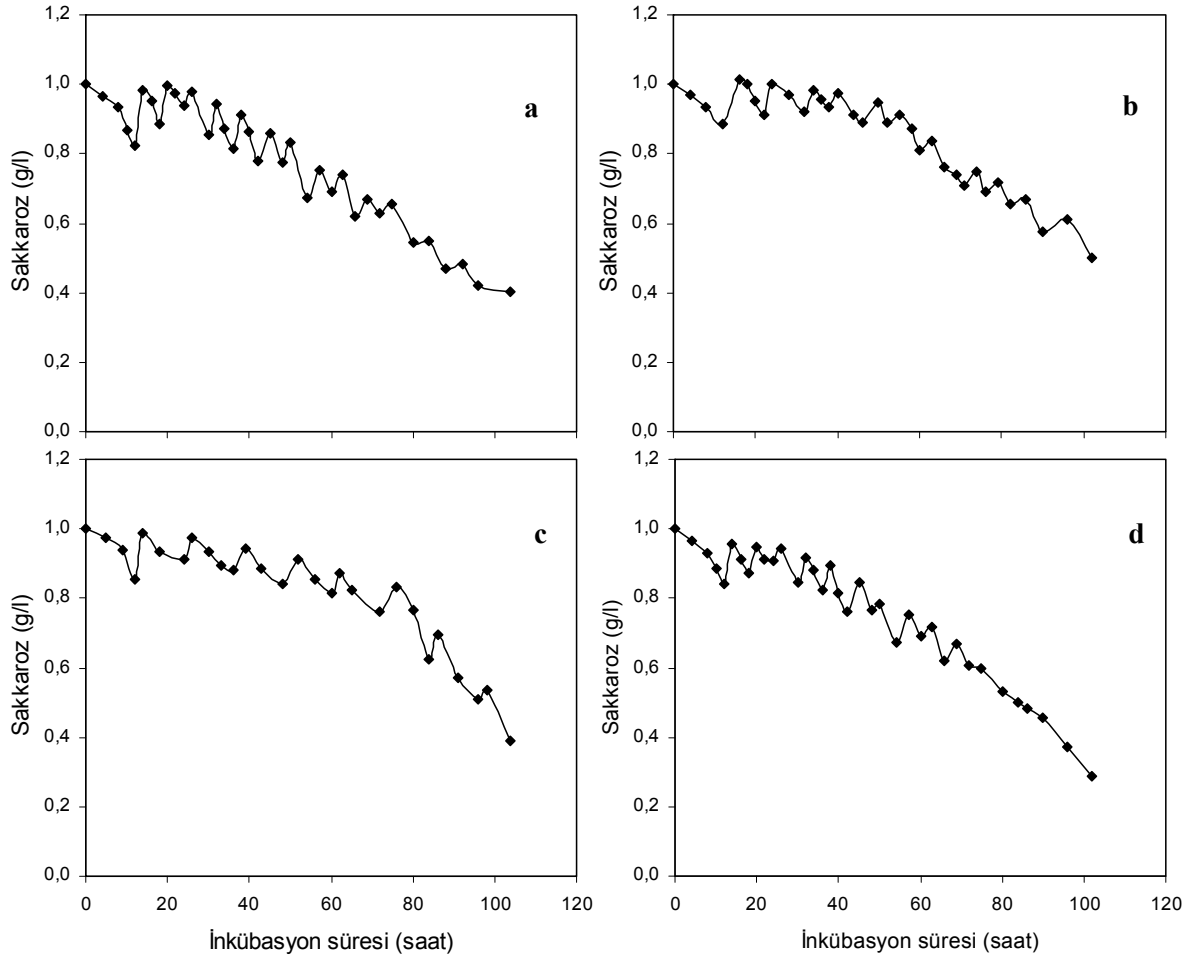
6.2.4.2. Belirli Aralıklarla Beslemeli (Pulse) Yarı Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

Rod hücrelerle yarı kesikli sistemle gerçekleştirilen deneylerin ikinci aşamasında, yüksek konsantrasyondaki (20 g/l) sakkaroz çözeltisi belirli aralıklarla biyoreaktöre beslenmiştir. 1 g/l sakkaroz konsantrasyonundaki biyoproses ortamına, 12 saat kesikli fermentasyon sonunda, 20 g/l sakkaroz çözeltisi 6, 8, 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar ve exponansiyel faz sonuna kadar 6 saat aralıklarla 10'ar ml ilave edilmiştir. Oluşturulan pulse etki sonucunda biyoproses ortamındaki enzim aktivitesi, mikroorganizma ve protein konsantrasyonunun zamanla değişimi Şekil 6.19' da verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi exponansiyel faz sonuna kadar her 6 saatte bir 20 g/l sakkaroz çözeltisinin ilave edildiği durumda 624 U/ml olarak ölçülmüş, yine bu stratejide en yüksek biomass ve protein konsantrasyonları sırasıyla 1.45 g/l ve 0.97 mg/ml olduğu belirlenmiştir. 6, 8 ve 12 saat aralıklarla yapılan beslemeler sonucunda elde edilen maksimum enzim aktiviteleri ise sırasıyla

614, 589 ve 502 U/ml, maksimum mikroorganizma derişimleri de sırasıyla 1.36, 1.28 ve 1.11 g/l ve toplam protein konsantrasyonları ise 0.93, 0.83 ve 0.72 mg/ml 'dir. Enzim aktivitesinin kesikli sisteme göre çok daha kısa sürede maksimum değere ulaştığı ancak 6, 8 ve 12 saat aralıklarla yapılan besleme stratejilerinde 72. saatten sonra bir miktar düşüş gösterdiği görülmüştür. Kesikli sistemle 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda gerçekleştirilen deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivitesi 343 U/ml iken belirli aralıklarla beslemeli yarı kesikli sistemle gerçekleşen fermentasyonda bu değer 624 U/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, belirli aralıklarla beslemeli yarı kesikli sistemle biyoproses ortamına sakkaroz ilavesi ile yaratılan pulse etkinin, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde üretim mekanizması üzerine olumlu bir etki yaptığı gözlenmiştir. Şekil 6.20'de uygulanan dört strateji için sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi verilmiştir.



Şekil 6.19. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde enzim aktivitesi, biomass ve toplam protein konsantrasyonlarının zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, hava giriş hızı: 0.6 vvm, ●: 6, ○: 8, ◆: 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar beslemeli, ◇: 6 saat aralıklarla eksponansiyel faz sonuna kadar beslemeli yarı kesikli sistem, ▲: Kontrol, 1 g/l sakkaroz kesikli sistem)

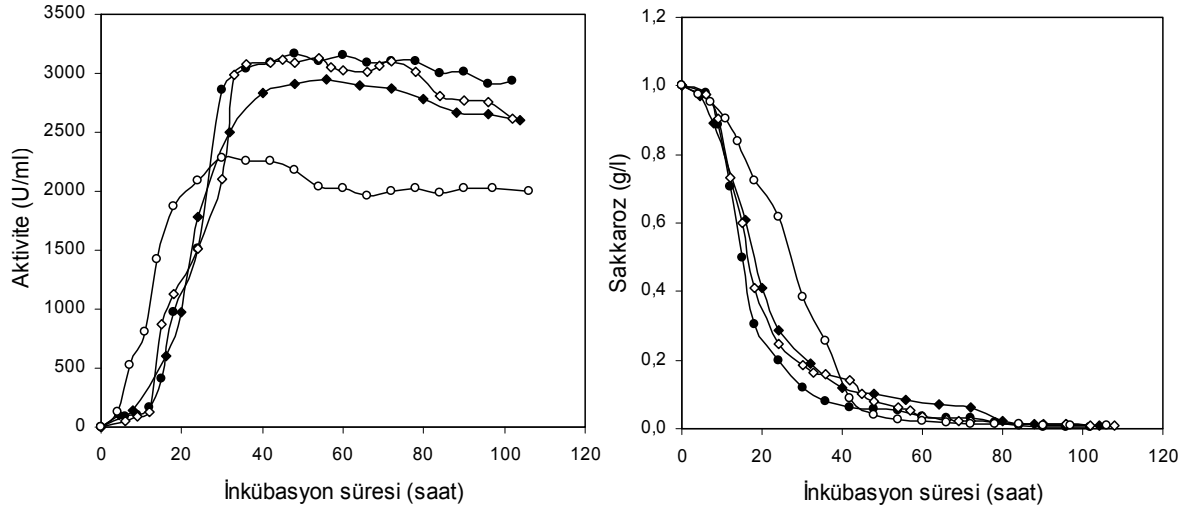


Şekil 6.20. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemde sakkaroz konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, hava giriş hızı: 0.6 vvm, **a:** 6, **b:** 8, **c:** 12 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar beslemeli, **d:** 6 saat aralıklarla exponansiyel faz sonuna kadar beslemeli yarı kesikli sistem)

6.2.5. Biyoreaktörde Yarı Kesikli Sistemle Kazein İlavesi ile Proteaz Üretimi

Rod halindeki *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde daha önce yaptığımız çalışmalarda, kazein ilavesinin indükleyici etki yaptığı ve maksimum aktiviteyi arttırdığı görülmüştü. Bu nedenle farklı besleme stratejileri uygulanarak kazein biyoproses ortamına yarı kesikli olarak beslenmiştir. Başlangıçta 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda hazırlanan biyoproses ortamına, 12 saat kesikli fermentasyon sonunda, 0.1 g kazein steril şartlarda, 6 ve 8 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar ve 6 saat aralıklarla exponansiyel faz sonuna kadar ilave edilmiş ve oluşturulan pulse etki sonucunda enzim aktivitesi ve sakkaroz derişiminin

zamanla değişimi Şekil 6.21.' de verilmiştir. Mikroorganizma ve toplam protein derişimlerinin değişimi düzenli bir eğilim göstermediğinden sonuçlar içerisinde verilmemiştir. Uygulanan üç farklı strateji içerisinde en yüksek enzim aktivitesi, 12 saatlik kesikli fermentasyon sonrasında, her 6 saatte bir 0.1 g kazeinin fermentasyon sonuna kadar ilave edildiği durumda 3164 U/ml olarak belirlenmiştir. 8 saatlik aralıklarla yapılan besleme durumunda maksimum enzim aktivitesi 2949 U/ml, logaritmik faz sonuna kadar 6 saat aralıklarla yapılan besleme durumunda ise 3126 U/ml olarak ölçülmüştür. Biyoproses ortamına, kazein daha sık aralıklarla ilave edildikçe, proteaz enzim aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Kazeinin mikroorganizma tarafından kolaylıkla tüketilebildiği ve enzim sentezinde indükleyici etki yaparak enzim aktivitesini arttırdığı sonucuna bir kez daha varılmıştır. Elde edilen sonuçlardan, *T.turnirae*'den proteaz enzimi üretiminde, belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemle besi ortamına kazein ilavesinin, kesikli sistem uygulamasına göre daha avantajlı olduğu görülmüştür. Maksimum enzim aktivitesi, kesikli sistemle sadece 1 g/l sakkaroz içeren ortamda 343 U/ml, kesikli sistemle kazein içeren ortamda (1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein) 2280 U/ml iken belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistemle kazein ilave edilen (6 saatte bir) ortamda 3164 U/ml ölçülmüştür.



Şekil 6.21. Belirli aralıklarla beslemeli (pulse) yarı kesikli sistem ile kazein ilavesinin enzim aktivitesi ve sakkaroz tüketimi üzerine etkisi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 500 rpm, hava giriş hızı: 0.6 vvm, ●: 6 saat, ◆: 8 saat aralıklarla fermentasyon sonuna kadar beslemeli, ◇: 6 saat aralıklarla eksponansiyel faz sonuna kadar beslemeli yarı kesikli sistem, ○: Kontrol, 1 g/l sakkaroz + 1 g/l kazein kesikli sistem)

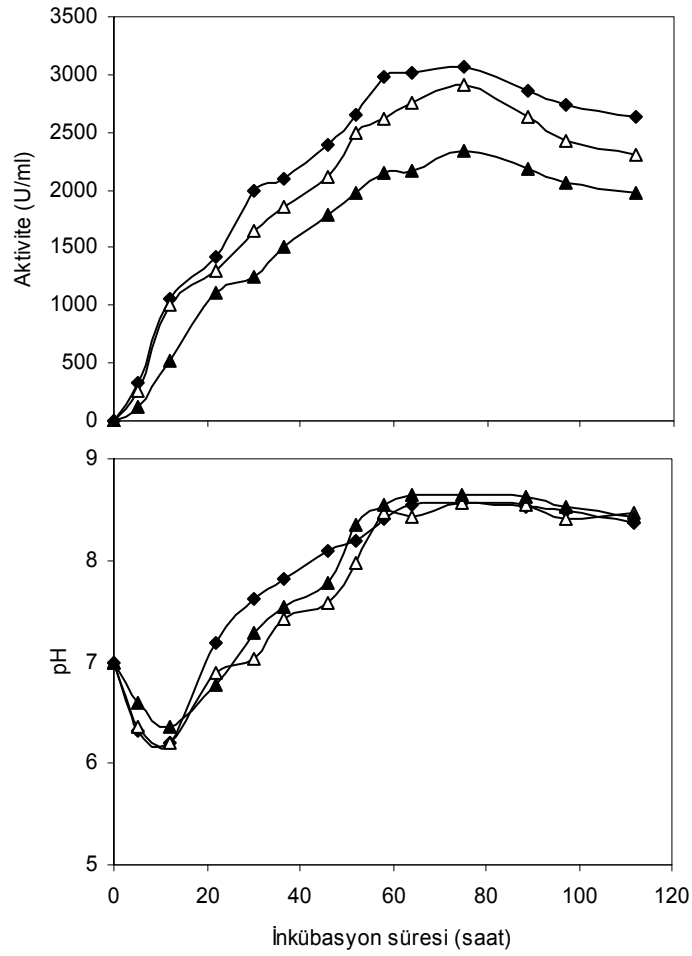
6.3. Doğal Ortamda Yapılan Deneyler

T. turnirae'den proteaz üretiminde daha önce yapılan çalışmalar, mikroorganizmanın rod halindeki orijinal morfolojisini, farklı ortamlarda agregasyona uğrayarak küme haline değiştirdiğini göstermektedir (Ahuja, 2000; Ferreira vd., 2001). Bu yeni morfoloji daha fazla proteaz üretime neden olmaktadır. Tüm bu bilgiler, bakterinin küme halinde tutularak proteaz enzim üretiminin artırılabilirliği fikrini vermektedir. Bu nedenle çalışmanın bu kısmında, mikroorganizmayı küme halinde tutabilecek olan katı-substrat fermantasyonu (KSF) teknikleri ile proteaz üretiminin artırılması hedeflenmiştir. Substrat olarak protein içeriği yüksek olan mısır proteini, soya unu ve kazein kullanılmış ve proses şartları optimize edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesi ile tarımsal ve endüstriyel atıkların katı substrat fermantasyonunda ucuz substratlar olarak kullanımının araştırılması giderek yaygınlaşmaktadır (Baysal vd., 2003; Pandey vd., 2000; Abate vd., 1999). Bu substratların kullanılmasıyla enzim maliyetinde önemli bir kısmı oluşturan ortam maliyetlerinin azaltılması da çalışmanın bir diğer amacıdır.

6.3.1. Substrat Olarak Mısır Proteininin Kullanıldığı Deneyler

6.3.1.1. Ortam Seçimi

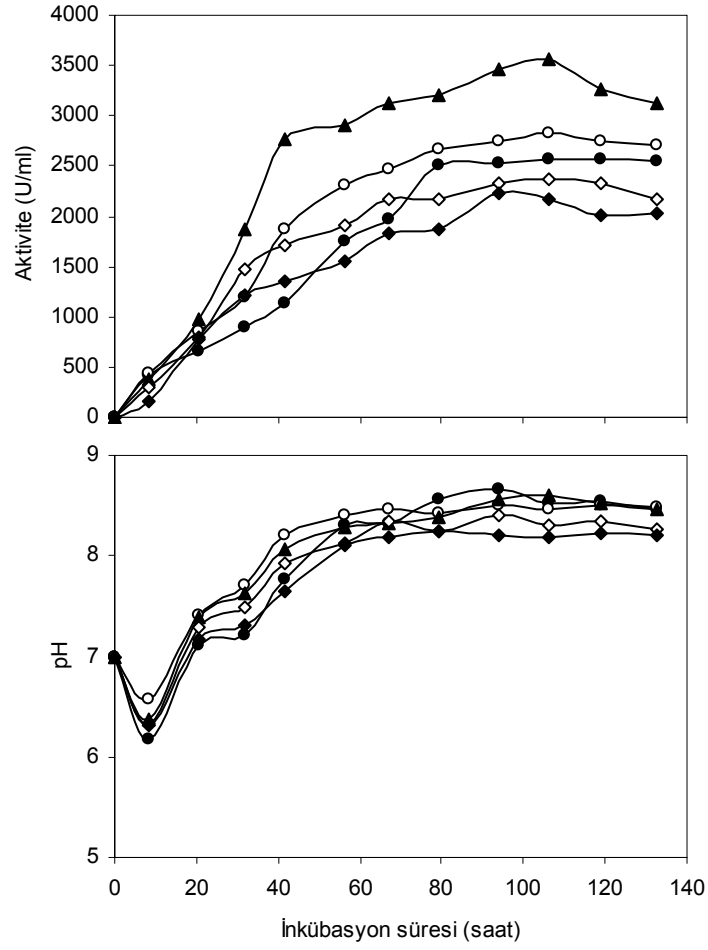
Mısır proteininin substrat olarak kullanıldığı deneylerde, ilk olarak mısır proteini + çeşme suyu, mısır proteini + saf su ve mısır proteini + PB besi ortamı (sakkaroz ve NH_4Cl olmadan) olmak üzere üç farklı ortam hazırlanmış ve proteaz enzim üretimi her bir ortam için kıyaslanmıştır. Mısır proteini herhangi bir boyut analizi yapılmadan besi yerinde kullanılmıştır. Şekil 6.22'de her üç ortam için elde edilen sonuçlar zamana bağlı olarak verilmiştir. Maksimum aktivite, mısır proteini + PB ortamında 3018 U/ml, mısır proteini + çeşme suyu ortamında 2851 U/ml, mısır proteini + saf su ortamında ise 2340 U/ml olarak ölçülmüştür. Mısır proteini + PB ortamındaki enzim aktivitesi, mısır proteini + çeşme suyu ortamındaki enzim aktivitesinden daha yüksek olmasına rağmen, büyük bir fark olmadığı görülmektedir. Mikroorganizmanın hayatsal faaliyetleri için gerekli olan diğer minerallerin çeşme suyu tarafından karşılandığı ve maliyet açısından da daha uygun olduğu düşünülerek, çalışmanın bundan sonraki kısımlarında biyoproses ortamı olarak mısır proteini + çeşme suyu kullanılmıştır. Şekilden de görüldüğü gibi, ortam pH'sı belli bir değere düşüp sonra yükselmiş ve pH 8-9 aralığında sabit kalmıştır.



Şekil 6.22. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ▲ : mısır proteini + saf su, Δ: mısır proteini + çeşme suyu, ◆: mısır proteini + PB besiy ortamı)

6.3.1.2. Tanecik Boyutunun Etkisi

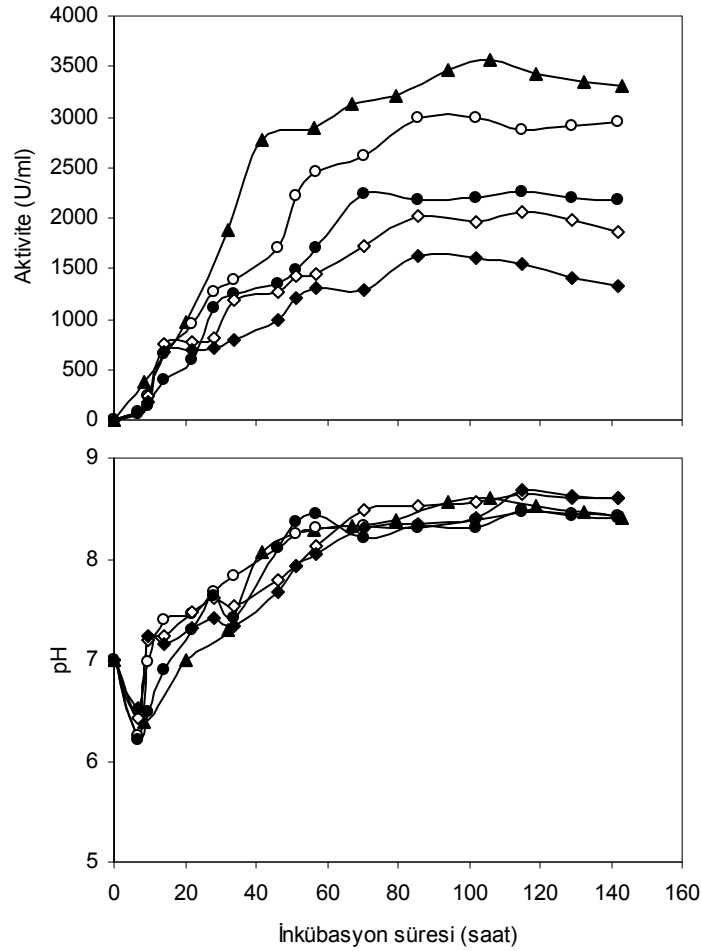
Elektanalizi ile beş farklı boyuta (100, 50, 30, 16 ve 8 mesh) ayrılan mısır proteininin biyoproses ortamında substrat olarak kullanıldığı deneylerde, tanecik boyutunun enzim üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.23 'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi 3558 U/ml olarak 30 mesh boyutundaki taneciklerin kullanıldığı ortamda elde edilmiştir. Diğer tanecik boyutlarında enzim aktivitesinin daha düşük olduğu görülmektedir. Küçük boyutlu taneciklerin kullanılması durumunda, yüzey alanı büyük olmasına rağmen tanecik içerisindeki porozite küçüktür. Dolayısıyla mikroorganizma gözeneklere girerek substratı etkin bir biçimde kullanamamaktadır. Çok büyük tanecik boyutunda ise yüzey alanı küçük ancak porozite büyük olacaktır. Bu durumda da aktif yüzey alanının küçük olması enzim üretiminde azalmaya sebep olmaktadır (Pandey vd., 2000; Krishna ve Chandrasekaran, 1996).



Şekil 6.23. Farklı mısır proteini boyutlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 8, ◇: 16, ▲: 30, ○: 50, ●: 100 mesh mısır proteini)

6.3.1.3. Mısır Proteini Konsantrasyonunun Etkisi

Biyoteknolojik proseslerde, ürün verimi ortamda bulunan substrat miktarından önemli derecede etkilenecektir. Mikroorganizmalar mevcut substratı çoğalma, üretim, yaşamlarının devamı gibi bazı gereksinimler için kullanırlar. Ancak ortamda fazla veya az substrat bulunması her zaman için üretim mekanizması ile doğru orantılı olarak değişmez. Bunu incelemek amacıyla, beş farklı mısır proteini konsantrasyonunda (1, 5, 10, 20, 30 g/l) proteaz üretimi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 6.24'de verilmiştir. Maksimum aktivite 1, 5, 10, 20 ve 30 g/l mısır proteini konsantrasyonları için sırasıyla 2237, 3558, 2995, 2054 ve 1630 U/ml olarak ölçülmüştür. Katı substrat fermantasyonunda ortamın nem içeriği kritik öneme sahiptir. Enzimin biyosentezi ve salgılanması katı haldeki substratın nemle etkileşimiyle ilişkilendirilebilir.

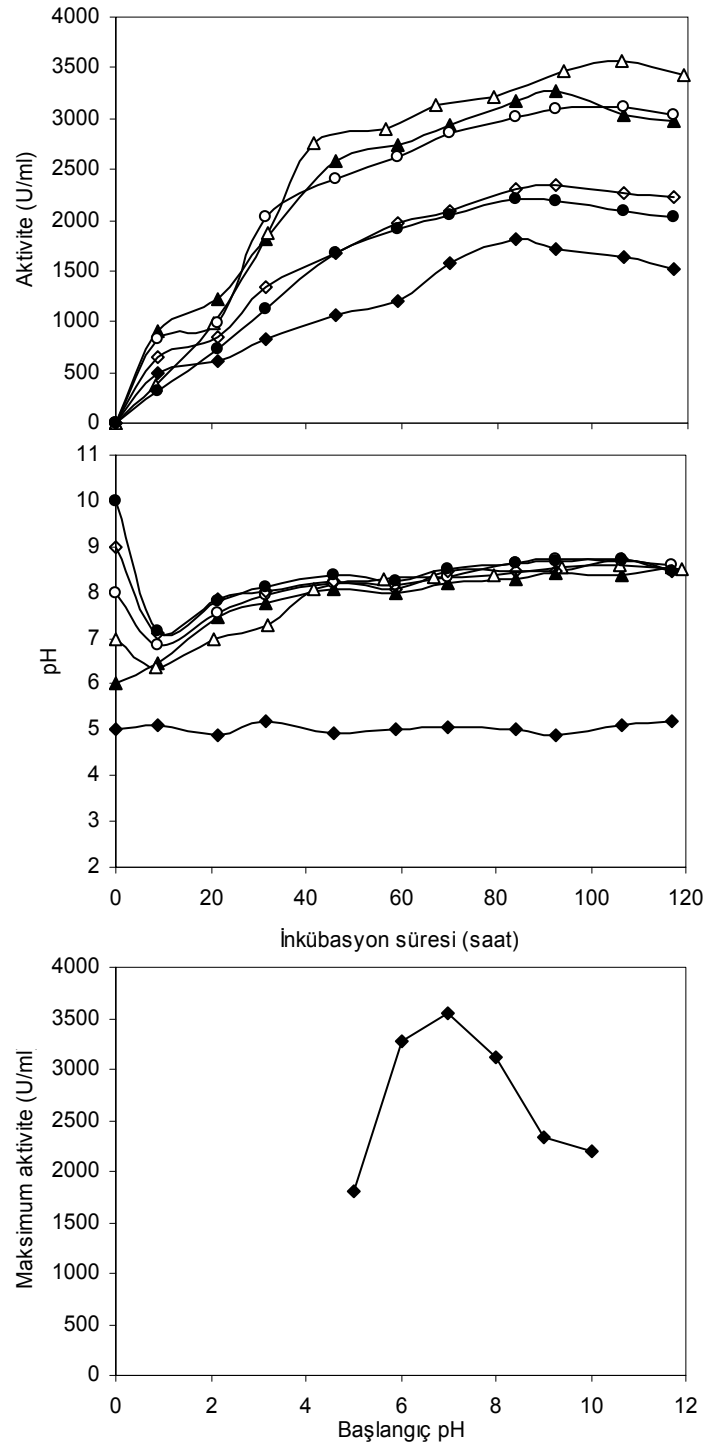


Şekil 6.24. Farklı mısır proteini konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ●: 1, ▲: 5, ○: 10, ◇: 20, ◆: 30 g/l mısır proteini)

Yüksek nem içeriği substratın gözeneklerini tıkar, yapışkanlık özelliğini artırır, gaz hacmini azaltır, difüzyonu düşürür ve oksijen limitasyonuna sebep olur iken, düşük nem içeriği katı haldeki nutrientlerin ortama geçebilmesi için yeterli olmayabilir (Ellaiah vd., 2002; Sodhi vd., 2005).

6.3.1.4. Başlangıç pH'sının Etkisi

Biyoproseslerde ortam pH'sı zamanla değişim göstermektedir. Bu değişim başlangıç pH değeri ile ilişkilidir. Mikroorganizmanın söz konusu ürün üretim faaliyetlerini optimum düzeyde gerçekleştirebilmesi için fermentasyon öncesi belirli bir pH değerine ayarlanması gerekir. Sentetik ortamda (PB ve SM ortamı) *T. turnirae*'den proteaz üretimi için başlangıç pH değeri 8 olarak ayarlanmıştı. Ancak mısır proteini ortamında bunun değişebileceği göz önüne alınarak, farklı başlangıç pH değerlerinde (pH 5, 6, 7, 8, 9, 10) enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 6.25.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, maksimum



Şekil. 6.25. Farklı başlangıç pH değerlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, Başlangıç pH: ◆: 5, ▲: 6, △: 7, ○: 8, ◇: 9, ●: 10)

enzim üretimi pH 7 değerinde gözlenmiştir. Ortam pH'sı kısa süre sonra tüm deneylerde aynı noktaya gelirken pH 5 değerinde değişmeden aynı seviyede kalmıştır.

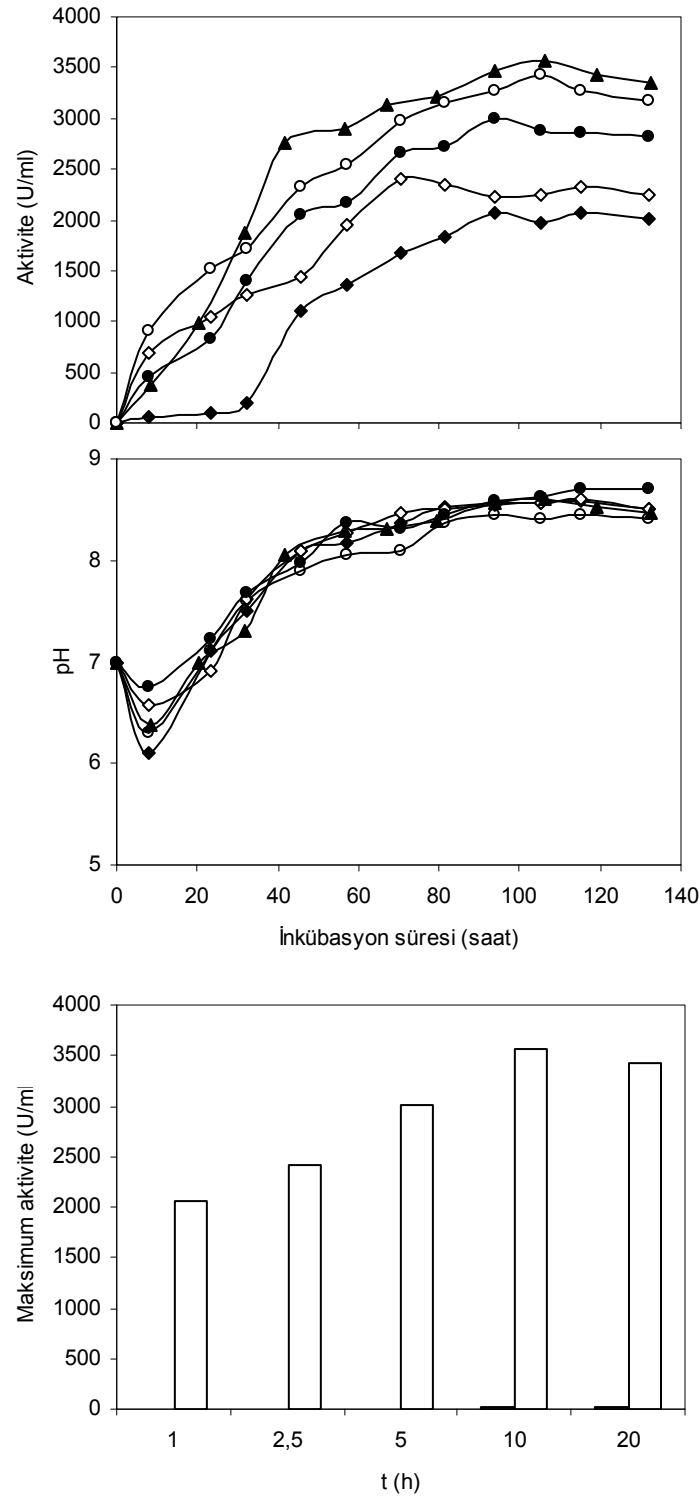
Şekil 6.25'de başlangıç pH'sının maksimum enzim aktivitesi üzerine etkisi görülmektedir. Nötr ve hafif bazik ortamlarda enzim aktivitesi yüksek, düşük pH ve çok bazik ortamlarda aktivite düşüktür.

6.3.1.5. Başlangıç İnokulum Miktarının Etkisi

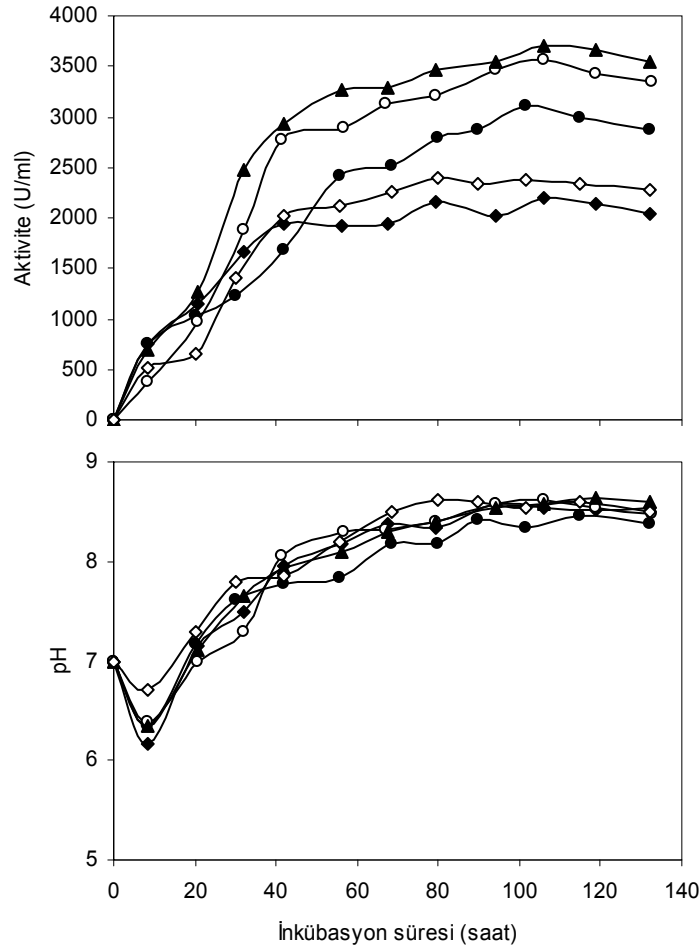
Fermantasyon ortamında kullanılan mikroorganizma miktarı, üretim prosesini etkileyen parametrelerden biridir (Gutarra vd., 2007). *T. turnirae*'den proteaz üretiminde, inokulum miktarını incelemek amacıyla fermantasyon ortamına % 1 ve % 20 (v/v) arasında değişen beş farklı oranda kültür ekimi yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 6.26.'da görülmektedir. Düşük inokulum miktarında (%1 (v/v)), enzim aktivitesi 33. saatten sonra gözlenebilmiştir. İnokulum miktarının artması ile % 10 (v/v) oranına kadar enzim aktivitesi de artmıştır. Maksimum enzim aktivitesinin inokulum miktarı ile değişimi Şekil 6.26.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesi % 10 (v/v) inokulum oranında elde edilmiştir. Literatürde Ahuja vd. (2003) tarafından yapılan, *T. turnirae*'den proteaz üretimi çalışmalarında da inokulum oranı olarak % 10 (v/v) değeri belirlenmiştir.

6.3.1.6. Çalkalama Hızının Etkisi

Enzim üretimi üzerine ortam bileşenlerinin yanında ortam şartlarının da etkin olduğu bilinmektedir. Aerobik ortamda gelişen mikroorganizmalar ihtiyaç duydukları oksijeni ancak optimum şartlardaki karıştırma ile temin ederler. Sentetik ortama göre, doğal substratların kullanıldığı ortamlarda oksijen transferinin daha yavaş olduğu bilinmektedir. Özellikle küçük ölçekli erlenmayer deneylerinde iyi bir kütle transferi için, en iyi karıştırma hızının belirlenmesi gerekir. *T. turnirae*'den proteaz üretimi beş farklı karıştırma hızında gerçekleştirilmiş ve proteaz enzim aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 6.27.'de verilmiştir. Karıştırma hızı arttıkça enzim aktivitesi de artmakta, ancak 175 ve 125 rpm karıştırma hızında elde edilen maksimum enzim aktivitelerinin (sırasıyla 3696 ve 3558 U/ml) yakın değerler olduğu görülmektedir. Daha düşük karıştırma hızlarında ise sentetik ortama göre daha viskoz olan doğal ortamda oksijen transferinin sınırlandığı bu nedenle proteaz üretiminin düşük olduğu söylenebilir. Bundan sonraki deneylere, optimum karıştırma hızı olarak 175 rpm seçilerek devam edilmiştir.



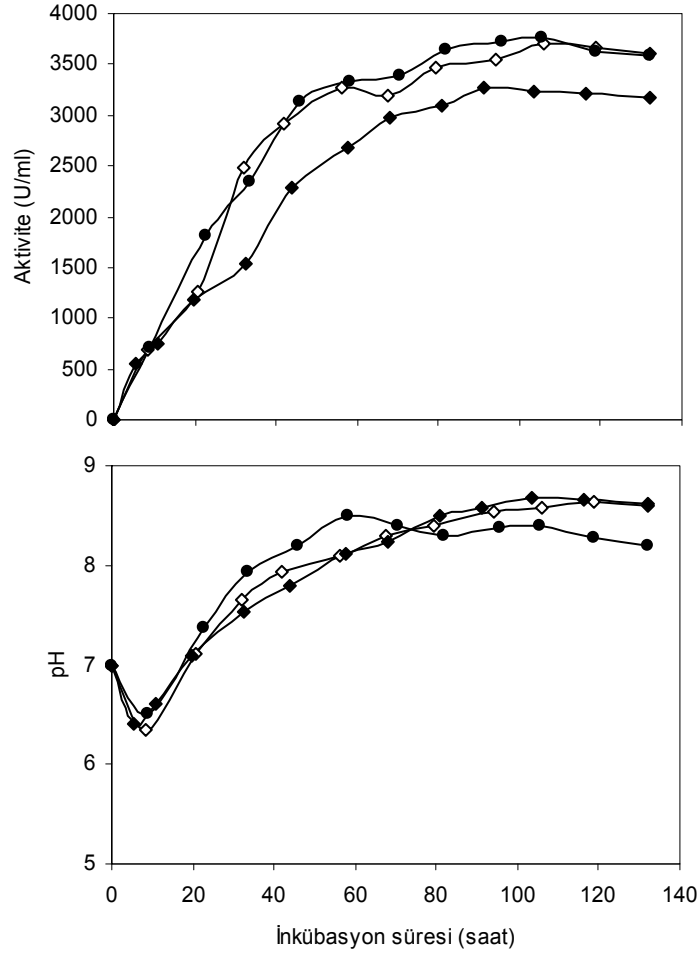
Şekil 6.26. Farklı başlangıç inokulum miktarlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, İnokulum oranı % v/v: ◆: 1, ◇: 2.5, ●: 5, ▲: 10, ○: 20)



Şekil 6.27. Farklı çalkalama hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Çalkalama hızı: ◆: 75, ◇: 100, ○: 125, ▲: 175, ●: 250rpm)

6.3.1.7. Sıcaklığın Etkisi

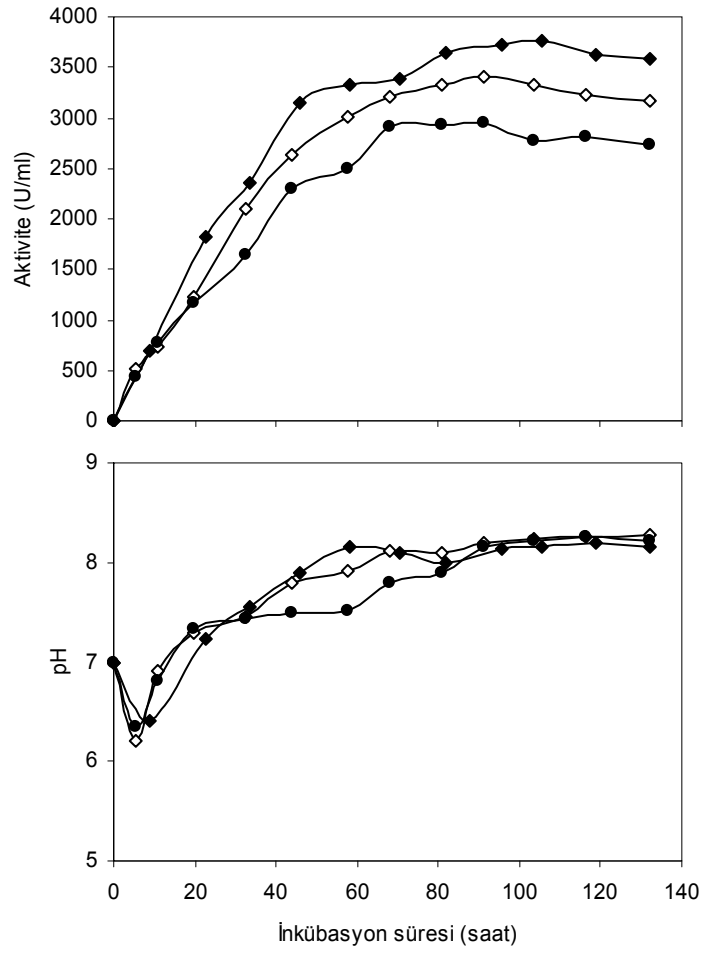
Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.28.'de verilmiştir. Bu amaçla 25, 30 ve 35 °C ortam sıcaklığında deneyler yapılmıştır. KHF' nunda sıcaklık kontrolünün çok önemli olduğu ve mikroorganizmanın gelişebilmesinin, enzim ya da metabolitleri üretebilmesinin ortam sıcaklığı ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Prakasham vd., 2005; Sumantha vd., 2006). Sıcaklığın artırılmasıyla enzim aktivitesi de artmış, 25, 30 ve 35 °C ortam sıcaklığında elde edilen maksimum aktiviterler sırasıyla 3270, 3696 ve 3756 U/ml olarak ölçülmüştür. 25 °C 'de yapılan deneylerde enzim aktivitesi maksimum değere daha geç ulaşmıştır. Bundan sonra yapılan deneylerde ortam sıcaklığı olarak 35 °C uygulanmıştır.



Şekil 6.28. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 175 rpm ◆: 25, ◇: 30, ●: 35 °C)

6.3.1.8. İlave Karbon Kaynağı Etkisi

Çalışmanın bu kısmında, doğal ortamda mısır proteini ile yapılan deneylerde, ortama karbon kaynağı olarak glikoz ve sakkarozun ilave edilmesinin, enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 5 g/l mısır proteini içeren fermantasyon ortamına % 1 (w/w) glikoz ve sakkaroz eklenmiştir. Deney sonuçları Şekil 6.29.'da görüldüğü gibidir. Ortama karbon kaynağı ilave edilmesi, ilave edilmemiş duruma göre enzim aktivitesini düşürmüştür. Sadece mısır proteini içeren ortamda maksimum enzim aktivitesi 3756 U/ml iken, % 1 (w/w) glikoz ilave edildiği durumda 2960 U/ml, % 1(w/w) sakkaroz ilave edildiği durumda ise 3410 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu durum mısır proteinin, biyoproses ortamında herhangi bir karbon kaynağı ilavesine gerek duymadan enzim üretimini gerçekleştirdiğini, başka bir karbon kaynağının ilavesinin inhibisyona sebep olduğunu göstermektedir. Nandakumar vd.(1999) tarafından *Aspergillus niger*'den α -amilaz üretiminde, buğday kepeğinden oluşan ortama glikoz ilave edilmesi durumunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 6.29. Farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim aktivitesi ve ortam pH'sı üzerine etkisi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 175 rpm, T: 35 °C, ◆: 5 g/l mısır proteini, ●: 5 g/l mısır proteini + % 1 (w/w) glikoz, ◇: 5 g/l mısır proteini + % 1 (w/w) sakkaroz)

6.3.1.9. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

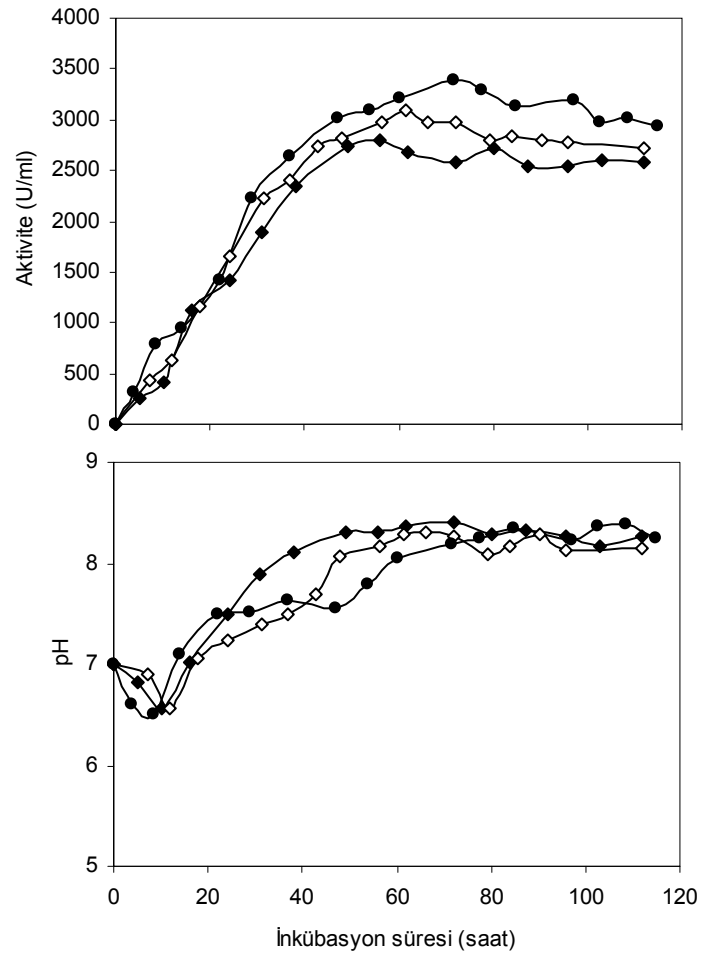
Çalışmanın bu kısmında, doğal ortamda erlenlerde yapılan ve substrat olarak mısır proteini kullanıldığı deneylerden elde edilen optimum sonuçların ışığında, biyoreaktörde kesikli sistemde ölçek büyütmenin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve hava akış hızının kontrol edilebildiği 800 ml çalışma hacmine sahip 1 l'lik laboratuvar ölçekli bir biyoreaktör kullanılmıştır. Kesikli sistem uygulanarak gerçekleştirilen fermentasyonda, mısır proteini ve çeşme suyu içeren ortamda, karıştırma hızı ve havalandırma hızı gibi proses parametrelerinin *T. turnirae*'den proteaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

6.3.1.9.1. Karıştırma Hızı Etkisi

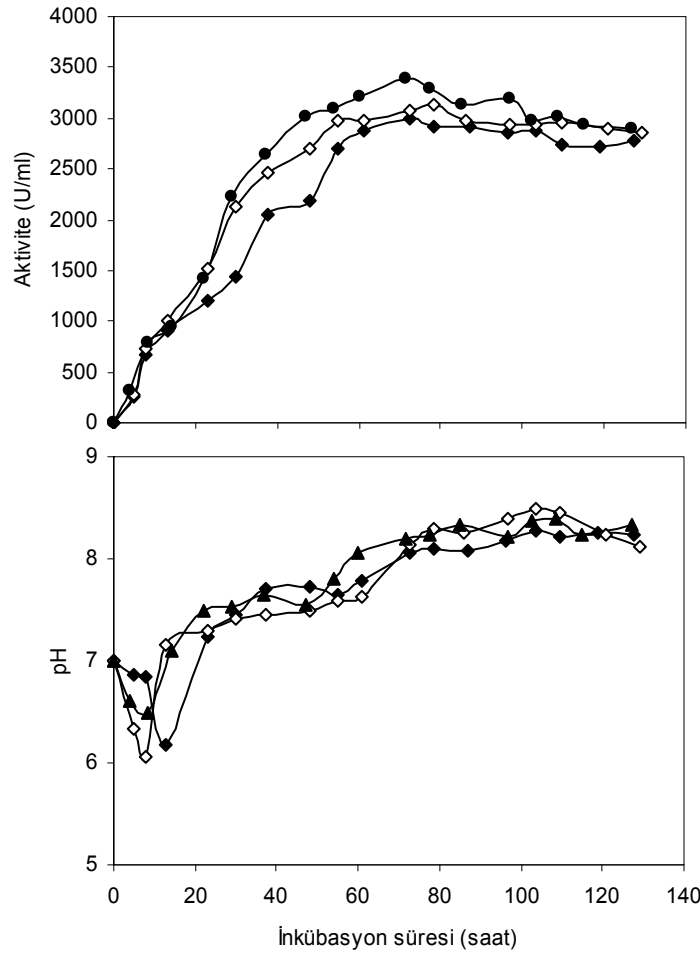
Aerobik proseslerde, biyoproses ortamındaki çözünmüş oksijen derişimi ve oksijenin aktarım hızı, mikrobiyal büyüme ve ürün verimini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Karıştırmalı biyoreaktörlerde, karıştırma hızı, oksijen aktarımına direkt olarak etki etmektedir. Daha önce erlenlerde mısır proteini ile yapılan deneylerde belirlenen optimum şartlarda (5 g/l mısır proteini konsantrasyonu, 30 mesh tanecik boyutu, başlangıç pH'sı 7, T=35 °C sıcaklık, % 10 aşu oranı), karıştırma hızının *T. turnirae*'den serin alkali proteaz enzimi üretimi üzerine etkisini incelenmek amacıyla, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.30.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi karıştırma hızı artıkça enzim aktivitesi de artış göstermektedir. Daha düşük karıştırma hızlarında ise sentetik ortama göre daha viskoz olan doğal ortamda oksijen transferinin sınırlandığı bu nedenle proteaz üretiminin düşük olduğu söylenebilir. Bu durum erlenlerde yapılan deney sonuçları ile de benzerlik göstermektedir. Şekil 6.30.'da görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesi 600 rpm de 3392 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu aktivite değerinin, mısır proteini ile erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite değeri olan 3756 U/ml değerinden daha düşük olduğu görülmüş ve ölçek büyütme sonucunda enzim aktivitesinde az da olsa bir düşüş olduğu sonucuna varılmıştır.

6.3.1.9.2. Hava Giriş Hızı Etkisi

Doğal ortamda substrat olarak mısır proteininin kullanıldığı fermantasyon ortamında biyoreaktörde kesikli sistemde, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz enzimi üretimi üzerine hava giriş hızının etkisini incelenmek amacıyla, 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm hava giriş hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bir önceki çalışmada optimum karıştırma hızı olarak belirlenen 600 rpm ve optimum biyoproses şartları kullanılmıştır. Hava giriş hızı ile enzim aktivitesindeki değişim Şekil 6.31.'de verilmiştir. Enzim aktivitesinin biyoreaktöre beslenen hava miktarı ile arttığı, maksimum aktivitenin 0.6 vvm hava giriş hızında 3392 U/ml olduğu görülmüştür. Yüksek hava giriş hızının enzim aktivitesini arttırması, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde yüksek oksijen gerekliliğini ortaya koymuştur.



Şekil 6.30. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 35 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, Karıştırma hızı: ◆: 400, ◇: 500, ●: 600 rpm)

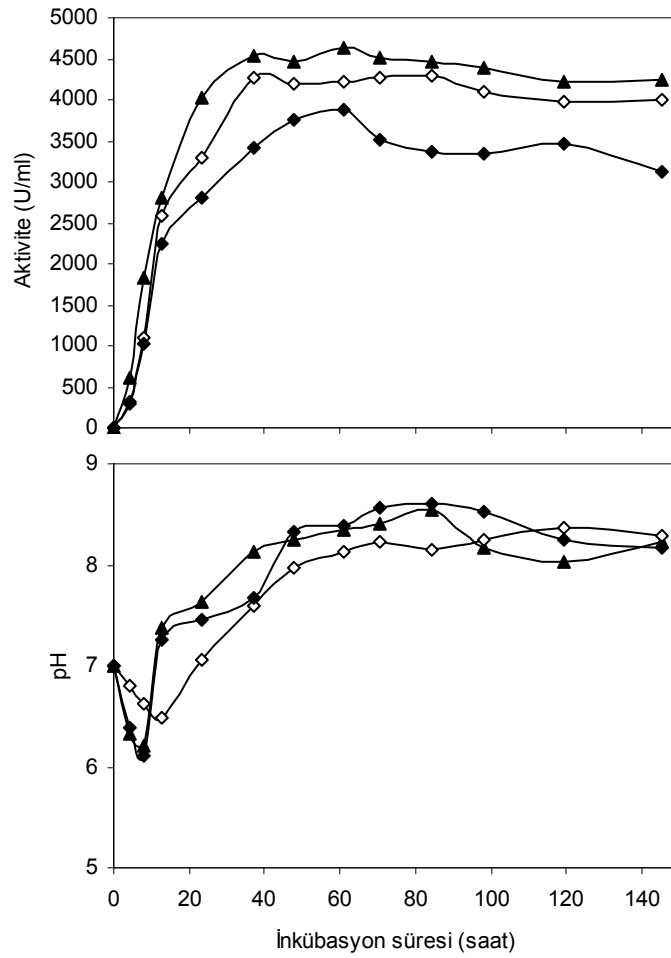


Şekil 6.31. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l mısır proteini, Tanecik boyutu: 30 mesh, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 35 °C, Karıştırma hızı: 600 rpm, Hava giriş hızı: ◆: 0.4, ◇: 0.5, ●: 0.6 vvm)

6.3.2. Substrat Olarak Soya Unu'nun Kullanıldığı Deneyler

6.3.2.1. Ortam Seçimi

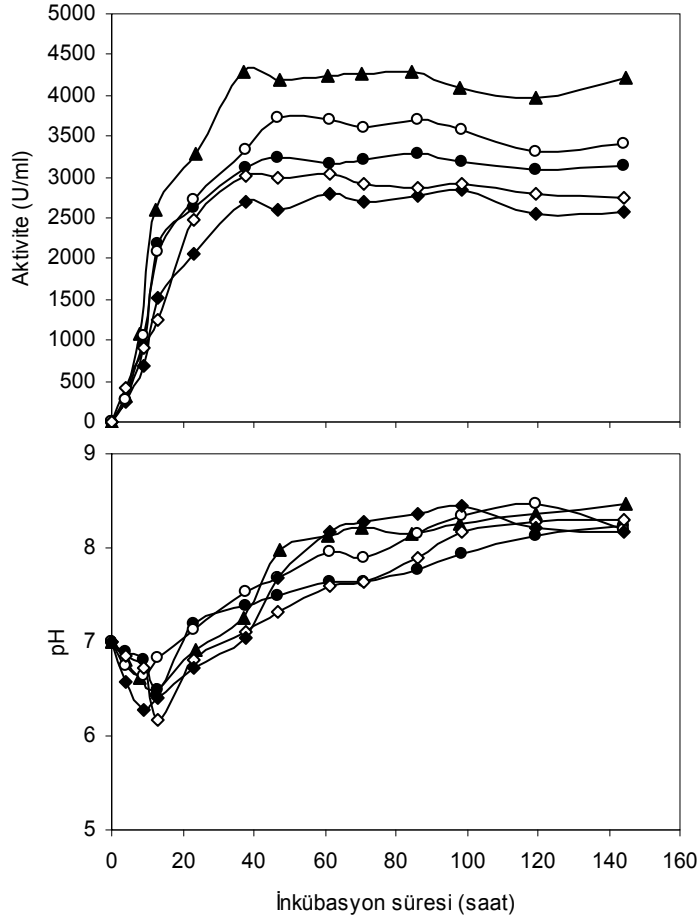
Doğal ortamda yapılan deneylerin bir diğer kısmında, substrat olarak protein içeriği yüksek olduğu bilinen soya unu kullanılmıştır. Soya unu + çeşme suyu, soya unu + saf su ve soya unu + PB besi ortamı (sakkaroz ve NH_4Cl olmadan) olmak üzere oluşturulan üç farklı ortamda proteaz enzim üretimi incelenmiştir. Her üç ortam için elde edilen sonuçlar Şekil 6.32.'de verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi, soya unu + PB ortamında 4637 U/ml, soya unu + çeşme suyu ortamında 4285 U/ml, soya unu + saf su ortamında ise 3871 U/ml olarak ölçülmüştür. Soya unu + PB ortamındaki enzim aktivitesinin, soya unu + çeşme suyu ortamındaki enzim aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmüş ancak ortam maliyeti açısından değerlendirildiğinde ve mikroorganizmanın hayatsal faaliyetleri için gerekli olan diğer mineralleri çeşme suyundan karşıladığı düşünülerek, çalışmanın bundan sonraki kısımlarında soya unu + çeşme suyu kullanılmıştır.



Şekil 6.32. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ▲: soya unu + PB besî ortamı, ◇: soya unu + çeşme suyu, ◆: soya unu + saf su)

6.3.2.2. Soya Unu Konsantrasyonunun Etkisi

Soya unu konsantrasyonunun (1, 5, 10, 20, 30 g/l) enzim üretimi üzerine olan etkisinin incelendiği deney sonuçları Şekil 6.33.'de verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 5 g/l soya unu konsantrasyonunda 4285 U/ml olarak ölçülmüştür. Şekil 6.33.'den de görüldüğü gibi 1, 10, 20 ve 30 g/l soya unu konsantrasyonlarında maksimum enzim aktivitesi sırasıyla 2841, 3717, 3293 ve 3028 U/ml olarak bulunmuştur. Enzim aktiviteleri arasındaki bu fark, düşük substrat konsantrasyonunun enzim üretimi ve mikroorganizma gelişimi için yetersiz kalması, yüksek substrat konsantrasyonunun ise mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu serbest su miktarını karşılayamaması ile açıklanabilir.



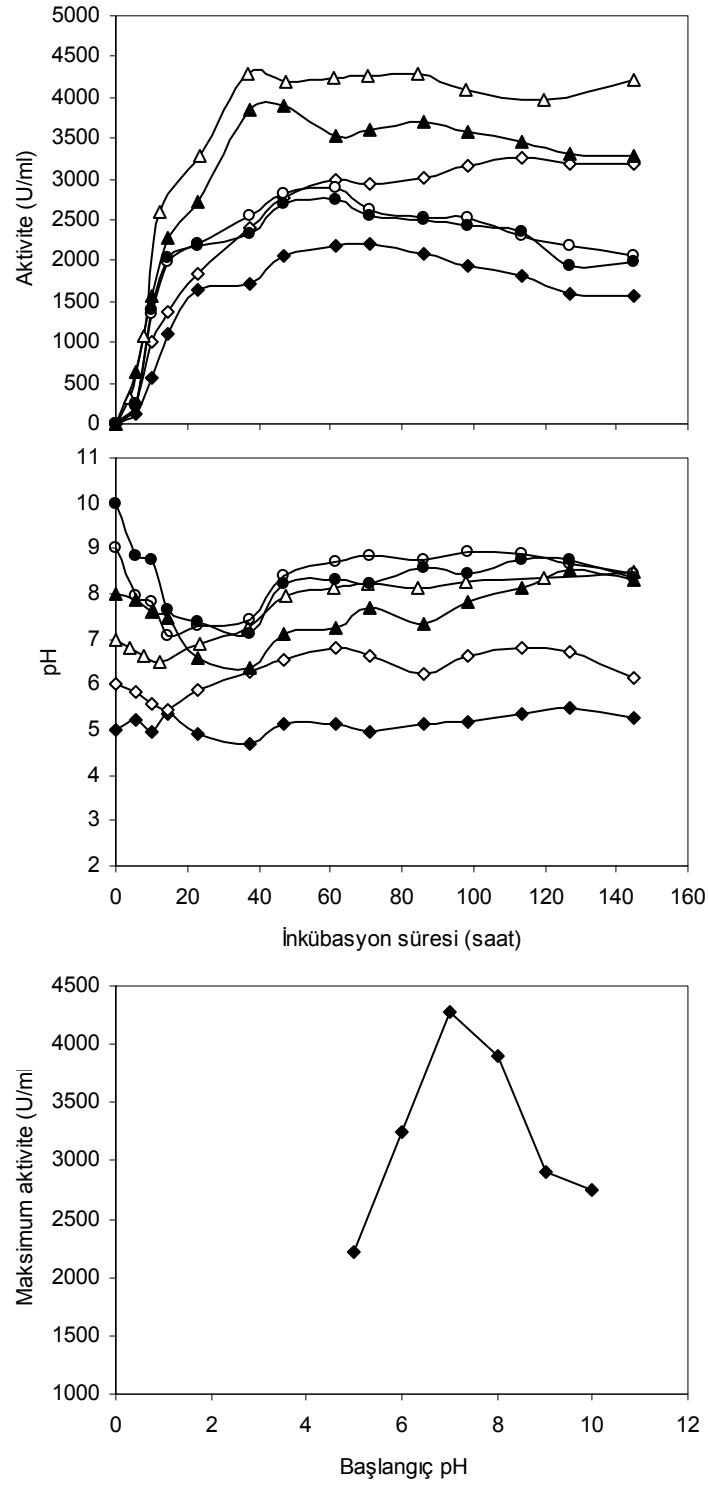
Şekil 6.33. Farklı soya unu konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 1, ▲: 5, ○: 10, ●: 20, ◇: 30 g/l soya unu)

6.3.2.3. Başlangıç pH'sının Etkisi

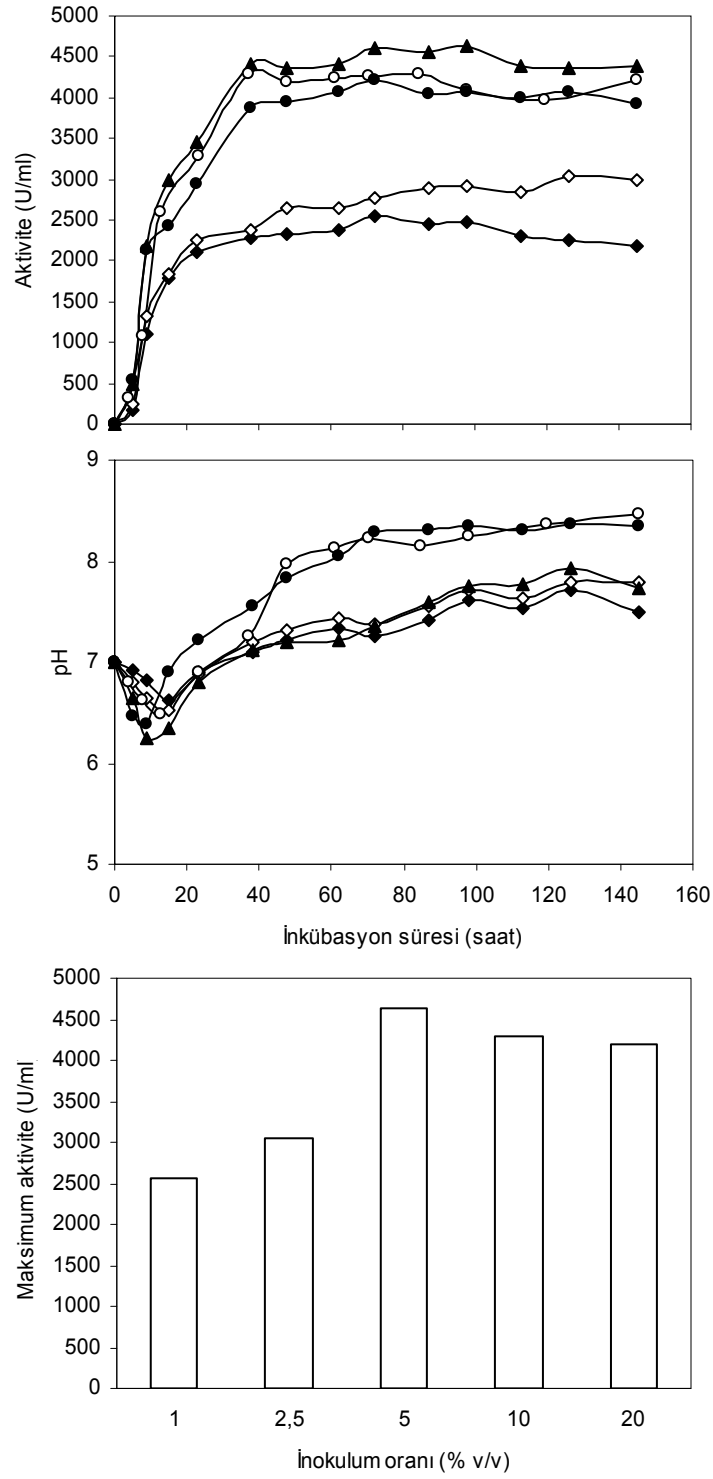
Proteaz üretimi üzerine, başlangıç pH etkisinin incelendiği deneylerde elde edilen sonuçlar Şekil 6.34.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesi pH 7 değerinde gözlenmiştir. Nötr ve hafif bazik ortamlarda enzim aktivitesi yüksek, düşük pH ve çok bazik ortamlarda aktivite düşüktür. Şekil 6.34.'de ayrıca başlangıç pH'sının maksimum enzim aktivitesine etkisi görülmektedir.

6.3.2.4. Başlangıç İnokulum Miktarının Etkisi

T. turnirae'den proteaz üretiminde, inokulum miktarının etkisini incelemek amacıyla fermentasyon ortamına % 1 ve % 20 (v/v) arasında değişen beş farklı oranda kültür ekimi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.35.'de verilmiştir. % 5 (v/v) oranına kadar, inokulum miktarının artması ile enzim aktivitesinin de arttığı, maksimum enzim aktivitesinin % 5 inokulum oranında 4625 U/ml olduğu gözlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesinin inokulum miktarı ile değişimi de Şekil 6.35.'de verilmiştir.



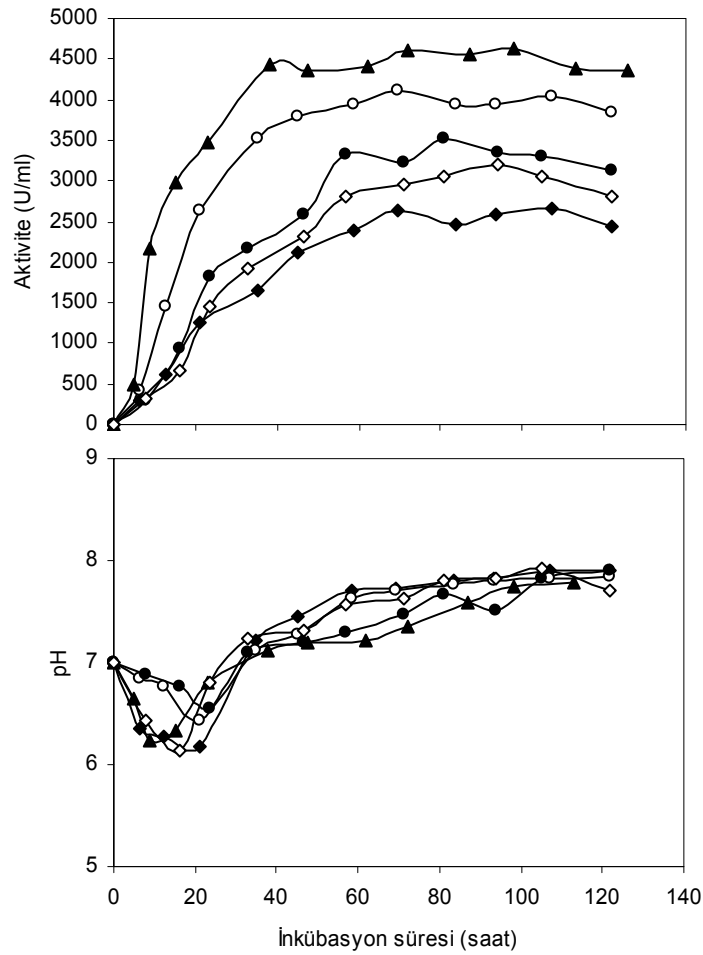
Şekil 6.34. Farklı başlangıç pH değerlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, Başlangıç pH: ◆: 5, ◇: 6, Δ: 7, ▲: 8, ○: 9, ●: 10)



Şekil 6.35. Farklı başlangıç inokulum miktarlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, İnokulum oranı % v/v: ◆: 1, ◇: 2.5, ▲: 5, ○: 10, ●: 20)

6.3.2.5. Çalkalama Hızının Etkisi

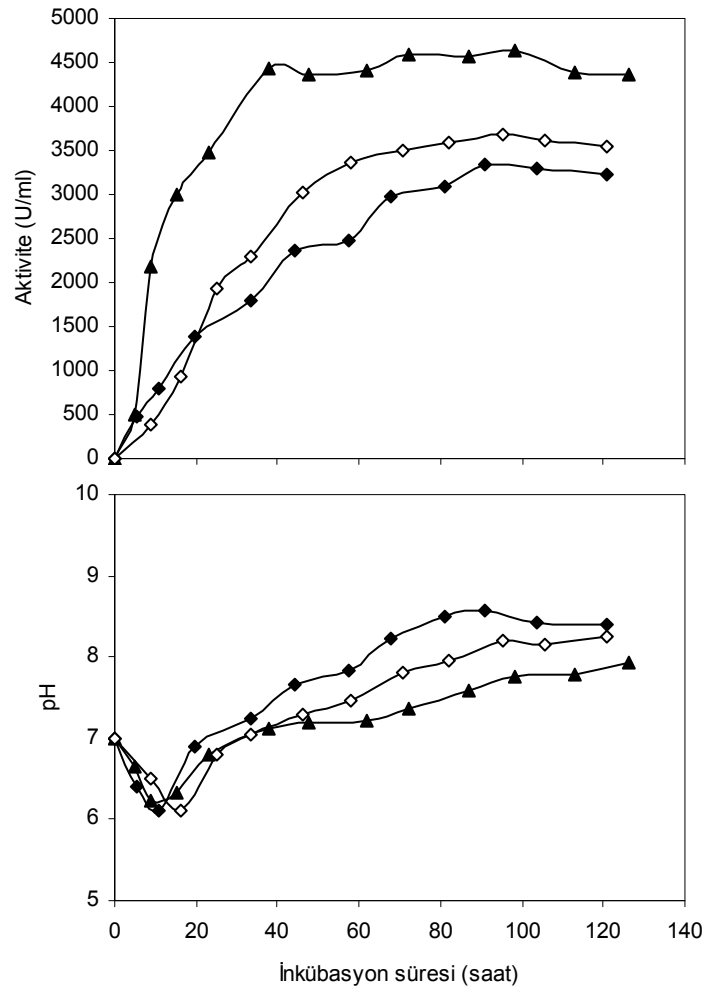
Substrat olarak soya ununun kullanıldığı deneylerde, karıştırma hızının enzim üretimi üzerine etkisi incelemek amacıyla beş farklı karıştırma hızı denenmiştir. Şekil 6.36.'de verilen sonuçlarda da görüldüğü gibi, maksimum enzim üretimi karıştırma hızının artmasıyla 125 rpm'e kadar artmıştır. Daha yüksek karıştırma hızlarında ise enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Bu durum, sentetik ortama göre daha viskoz olan doğal ortamda düşük karıştırma hızının oksijen transferini sınırlamasından ve katı substrata bağlı nutrientlerin ortama yeterince geçememesinden, yüksek karıştırma hızının ise fermantasyon ortamının kararlılığını olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklanabilir.



Şekil 6.36. Farklı çalkalama hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 5 v/v, T: 30 °C, Çalkalama hızı: ◆: 75, ○: 100, ▲: 125, ●: 175, ◇: 250 rpm)

6.3.2.6. Sıcaklığın Etkisi

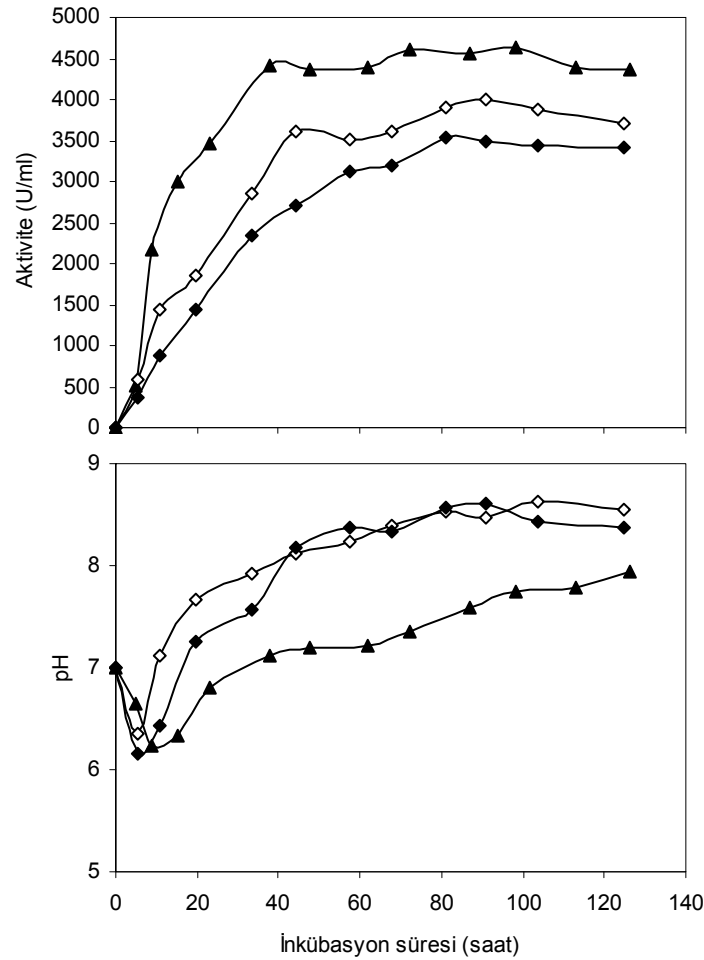
Fermantasyon ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 25, 30 ve 35 °C sıcaklığında yapılan deney sonuçları Şekil 6.37.'de verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 30 °C'de 4625 U/ml olarak ölçülmüştür. 25 ve 35 °C sıcaklıklarında enzim aktivitesinin daha düşük olduğu ve ortam sıcaklığının enzim üretimini etkileyen önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6.37. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 5 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: ◆: 25, ▲: 30, ◇: 35 °C)

6.3.2.7. İlave Karbon Kaynağı Etkisi

Fermantasyon ortamına farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 5 g/l soya unu içeren fermantasyon ortamına % 1 (w/w) glikoz ve sakkaroz eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.38.'de verilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü gibi 5 g/l soya unu içeren fermantasyon ortamına glikoz ve sakkaroz ilave edilmesi enzim aktivitesinde düşüşe neden olmuştur. Sadece soya unu ve çeşme suyundan oluşan ortamda maksimum enzim aktivitesi 4625 U/ml iken, % 1 (w/w) glikoz ilavesinde bu değer 3536 U/ml, % 1 (w/w) sakkaroz ilavesinde ise 3993 U/ml olarak ölçülmüştür. Bu durum soya ununun, *T. turnirae*'den proteaz üretiminde herhangi bir karbon kaynağı ilavesine ihtiyaç duymadan enzim üretimini gerçekleştirdiğini ve ilave karbon kaynağının inhibisyonu sebep olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.38. Farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim aktivitesi ve ortam pH'sı üzerine etkisi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 5 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 5 g/l soya unu + % 1 (w/w) glikoz, ◇: 5 g/l soya unu + % 1 (w/w) sakkaroz, ●: 5 g/l soya unu)

6.3.2.9. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

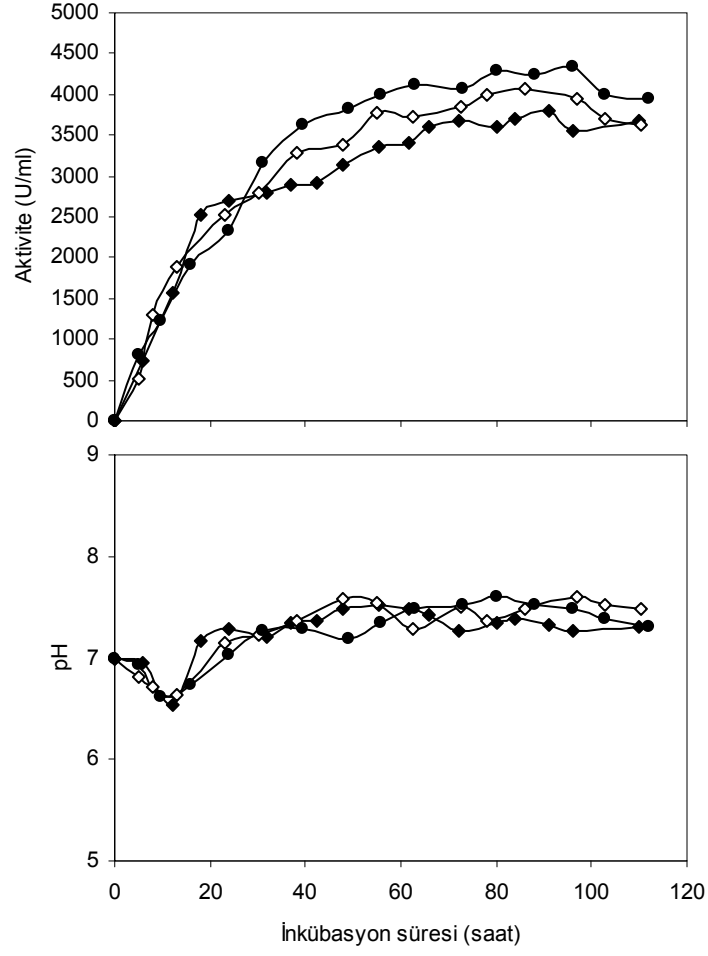
Doğal ortamda erlenlerde yapılan ve substrat olarak soya ununun kullanıldığı deneylerden elde edilen optimum sonuçlar ışığında, biyoreaktörde kesikli sistemde ölçek büyütmenin etkisi incelemek amacıyla, pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve hava akış hızının kontrol edilebildiği 800 ml çalışma hacmine sahip 1 l'lik laboratuvar ölçekli bir biyoreaktör kullanılmıştır. Kesikli sistem uygulanarak gerçekleştirilen fermantasyonda, soya unu ve çeşme suyu içeren ortamda, karıştırma ve havalandırma hızının *T. turnirae*'den proteaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

6.3.2.9.1. Karıştırma Hızı Etkisi

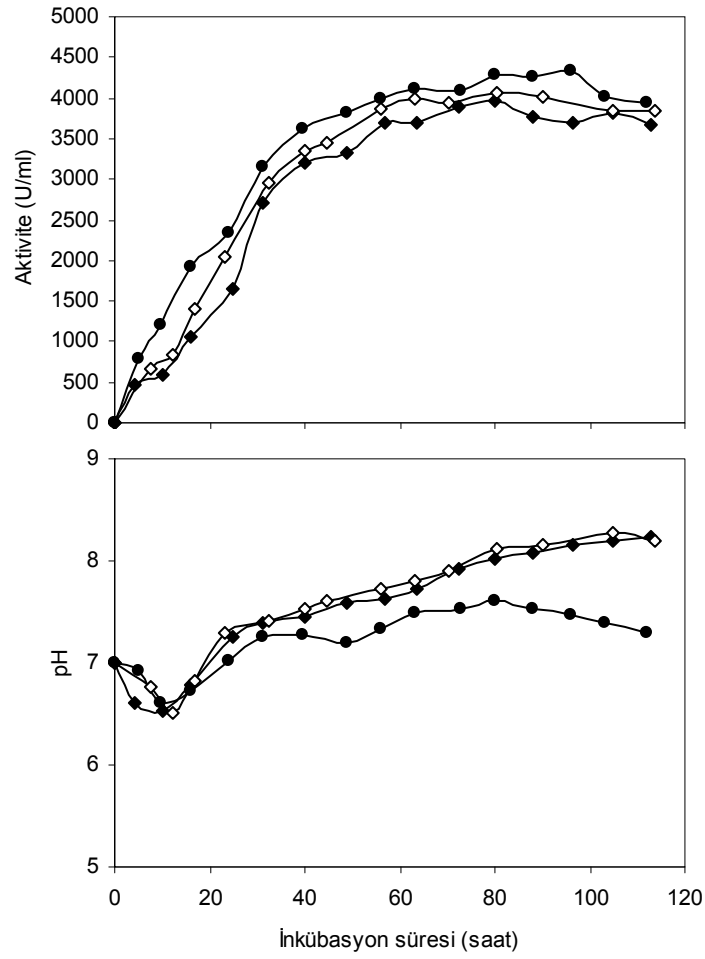
Daha önce erlenlerde soya unu ile yapılan deneylerde belirlenen optimum şartlar (5 g/l soya unu konsantrasyonu, başlangıç pH'sı 7, T=30 °C sıcaklık, % 10 aşı oranı) kullanılarak, karıştırma hızının *T. turnirae*'den serin alkali proteaz enzimi üretimi üzerine etkisini incelenmek amacıyla, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.39.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi karıştırma hızı arttıkça enzim aktivitesi de artış göstermektedir. 400 rpm karıştırma hızında enzim aktivitesinin daha düşük olduğu gözlenmiş ve düşük karıştırma hızının oksijen limitasyonu meydana getirdiği düşünülmüş ve *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde yüksek oksijen gerekliliğini ortaya koymuştur. Şekil 6.39.'da görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesi 600 rpm de 4332 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu aktivite değerinin, soya unu ile erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivite değeri olan 4625 U/ml değerine yakın bir değer olduğu görülmüş ve ölçek büyütmenin enzim aktivitesi üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

6.3.2.9.2. Hava Giriş Hızı Etkisi

Biyoreaktörde kesikli sistemde, doğal ortamda substrat olarak soya ununun kullanıldığı fermantasyon ortamında, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz enzimi üretimi üzerine hava giriş hızının etkisini incelenmek amacıyla, 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm olan üç farklı hava giriş hızında deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.40.'de verilmiştir. Enzim aktivitesinin biyoreaktöre beslenen hava miktarı ile arttığı, maksimum aktivitenin 0.6 vvm hava giriş hızında 4332 U/ml olduğu görülmüştür. Yüksek hava giriş hızının enzim aktivitesini arttırması, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde yüksek oksijen gerektiğini göstermiştir.



Şekil 6.39. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 5 v/v, T: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, Karıştırma hızı: ◆: 400, ◇: 500, ●: 600 rpm)

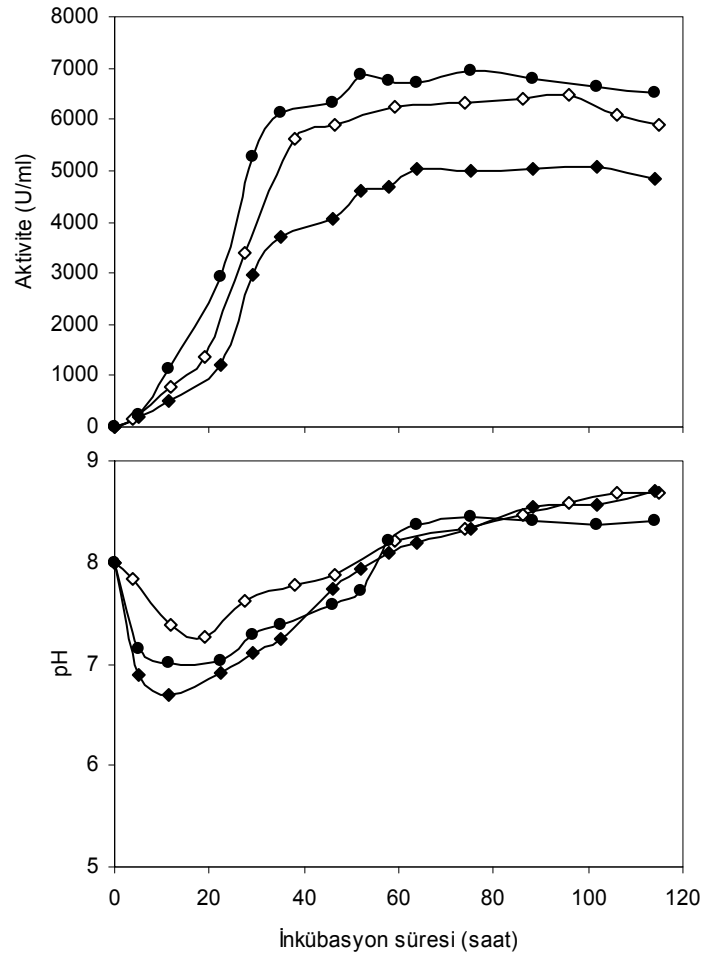


Şekil 6.40. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (5 g/l soya unu, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 5 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 600 rpm, Hava giriş hızı: ◆: 0.4, ◇: 0.5, ●: 0.6 vvm)

6.3.3. Substrat Olarak Kazein'in Kullanıldığı Deneyler

6.3.3.1. Ortam Seçimi

Doğal ortamda yapılan deneylerin bir diğer aşamasında substrat olarak kazein kullanılmıştır. Proteaz üretimi için uygun ortamı belirlemek amacıyla kazein + çeşme suyu, kazein + saf su, kazein + PB besi ortamı (sakkaroz ve NH_4Cl olmadan) olmak üzere üç farklı ortam hazırlanmıştır. Her üç ortam için elde edilen sonuçlar Şekil 6.41.'de verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi, kazein + PB ortamında 6948 U/ml, kazein + çeşme suyu ortamında 6477 U/ml, kazein + saf su ortamında ise 5068 U/ml olarak ölçülmüştür. Kazein + PB ortamındaki enzim aktivitesinin, kazein + çeşme suyu ortamındaki enzim aktivitesinden daha yüksek olduğu görülmüş ancak ortam maliyeti açısından değerlendirilerek ve

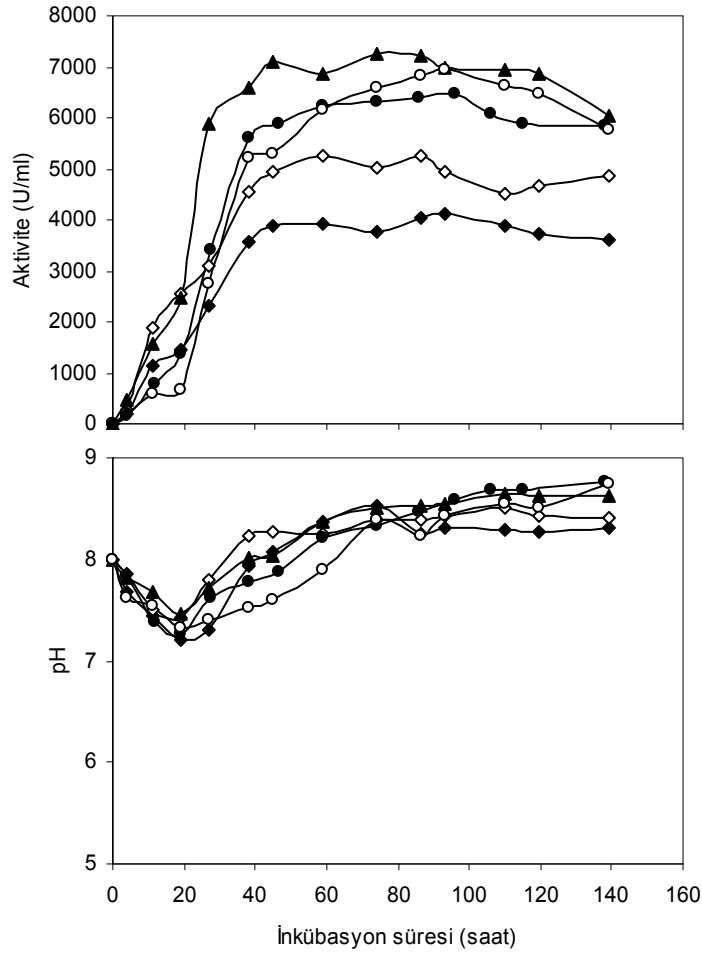


Şekil 6.41. Farklı ortam bileşimlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (20 g/l kazein, Başlangıç pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: kazein + saf su, ◇: kazein + çeşme suyu, ●: kazein + PB besisi ortamı)

mikroorganizmanın hayatsal faaliyetleri için gerekli olan diğer mineralleri çeşme suyundan karşıladığı düşünülerek, çalışmanın bundan sonraki kısımlarında kazein + çeşme suyu kullanılmıştır.

6.3.3.2. Kazein Konsantrasyonunun Etkisi

T. turnirae'den proteaz üretiminde substrat olarak kazeinin kullanıldığı deneylerde enzim üretimi üzerine kazein konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 1, 5, 10, 20 ve 30 g/l kazein konsantrasyonlarında enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 6.42.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi kazein konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi de artmış ve en yüksek enzim aktivitesi 10 g/l kazein konsantrasyonunda 7238 U/ml olarak ölçülmüştür. Doğal ortamda kullanılan mısır proteini ve soya unu sonuçlarına göre,

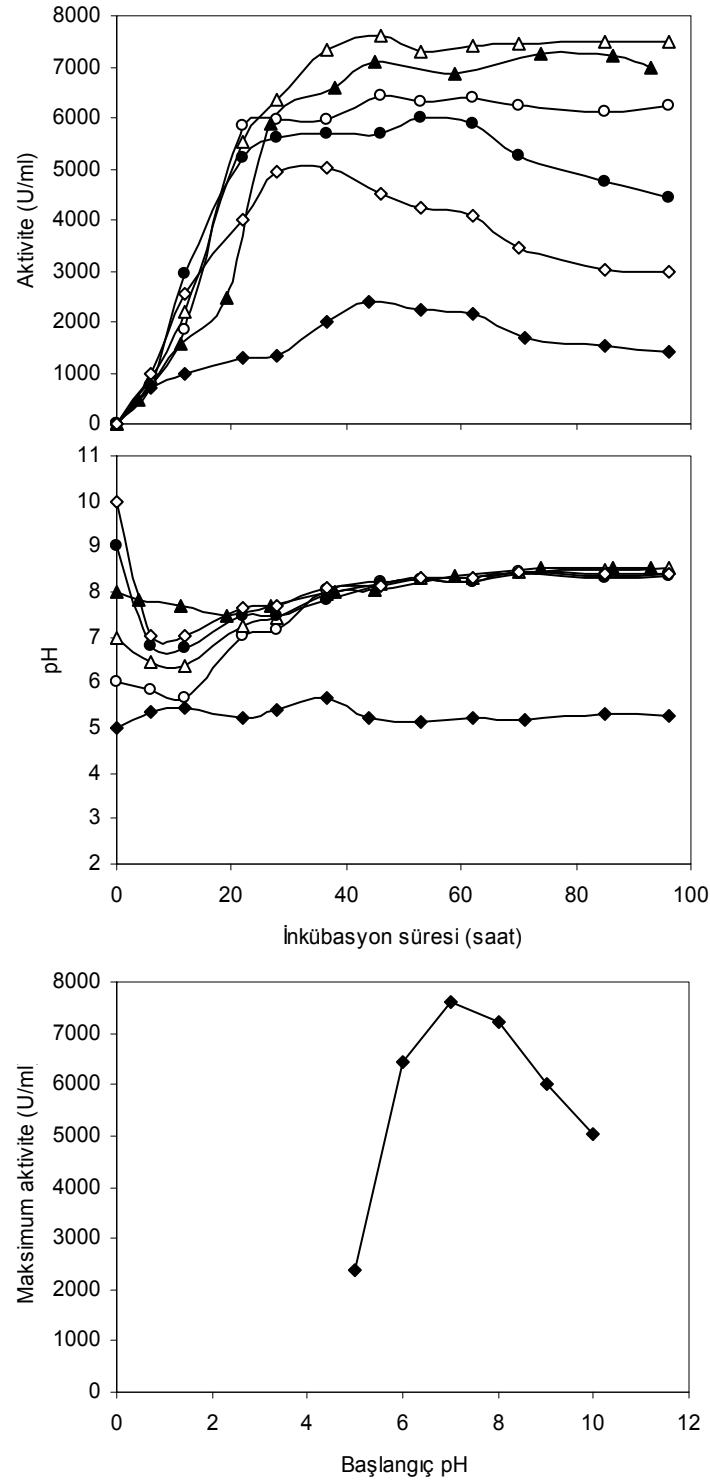


Şekil 6.42. Farklı kazein konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 1, ◇: 5, ▲: 10 , ●: 20, ○: 30 g/l kazein)

kazein kullanılan ortamda daha yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. Daha yüksek kazein konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinde düşüş görülmüştür. Bu sonuçlara göre, *T. turnirae*'den proteaz üretiminde kazeinin uygun bir substrat olduğu söylenebilir.

6.3.3.3. Başlangıç pH'sının Etkisi

Proteaz üretimi üzerine fermentasyon ortamının başlangıç pH'sının etkisini incelemek amacıyla pH 5 ile 10 aralığında değişen altı farklı pH değerinde deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.43.'de verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi pH 7 değerinde 7617 U/ml olarak ölçülmüştür. pH 5 değerinde enzim aktivitesinin çok düşük olduğu görülmektedir. Ortam pH'sı kısa süre sonra tüm deneylerde aynı noktaya gelirken pH 5 değerinde değişmeden aynı seviyede kalmıştır. Şekil 6.43.'de ayrıca, başlangıç pH'sının maksimum enzim aktivitesine etkisi görülmektedir. Sonuçların diğer substrat sonuçları ile benzerlik gösterdiği, nötr ve hafif bazik ortamlarda enzim aktivitesinin yüksek, düşük pH ve çok bazik ortamlarda aktivitenin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 6.43. Farklı başlangıç pH değerlerinde enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (10 g/l kazein, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, pH: ◆: 5, ○: 6, △: 7, ▲: 8, ●: 9, ◇: 10)

6.3.3.4. Başlangıç İnokulum Miktarının Etkisi

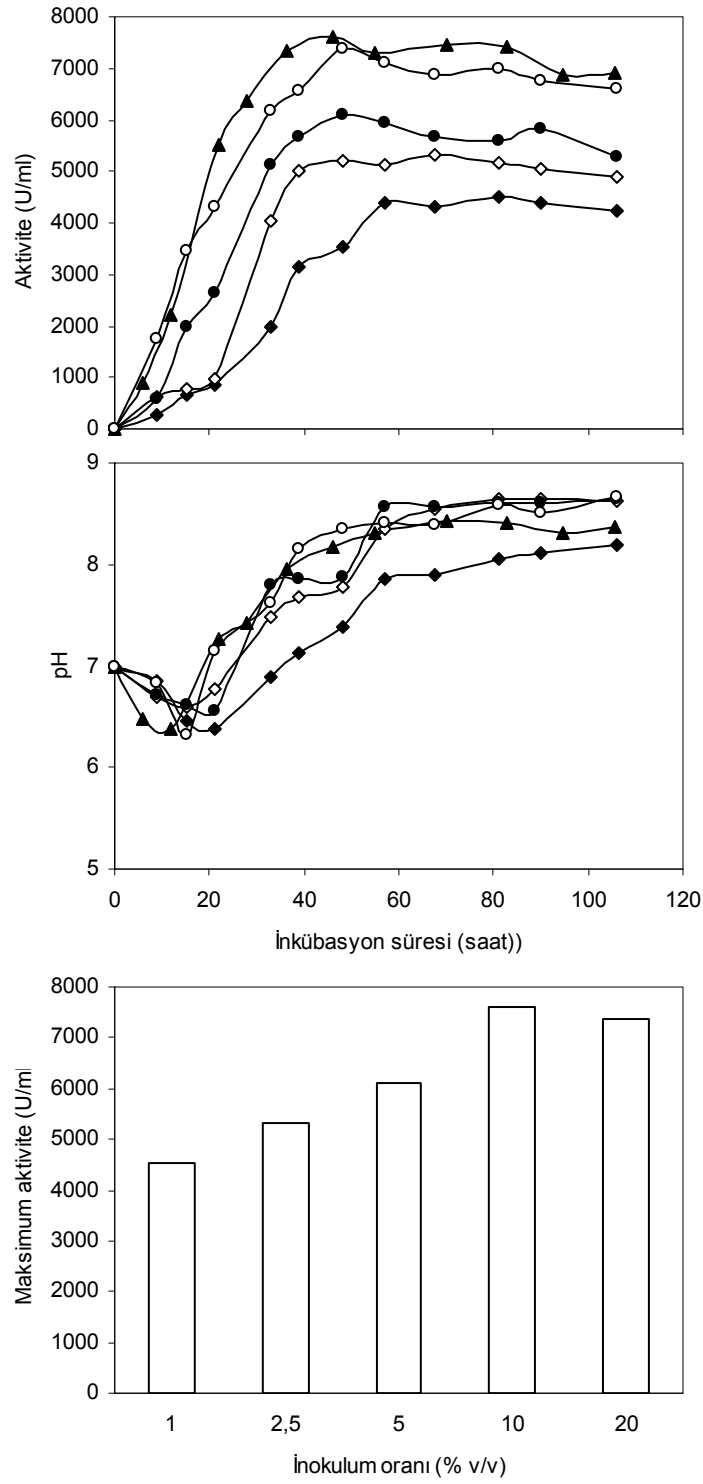
Fermantasyon ortamında kullanılan mikroorganizma miktarı, üretim prosesini etkileyen en önemli parametrelerden biridir (Elibol vd., 1995). Substrat olarak kazeinin kullanıldığı deneylerde *T. turnirae*'den proteaz üretiminde, inokulum miktarının etkisini incelemek amacıyla fermantasyon ortamına % 1 ve % 20 arasında değişen beş farklı oranda kültür ekimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.44.'de verilmektedir. % 10 inokulum oranına kadar, inokulum miktarının artması ile enzim aktivitesinin arttığı, maksimum enzim aktivitesinin % 10 inokulum oranında 7617 U/ml olduğu gözlenmiştir.

6.3.3.5. Çalkalama Hızının Etkisi

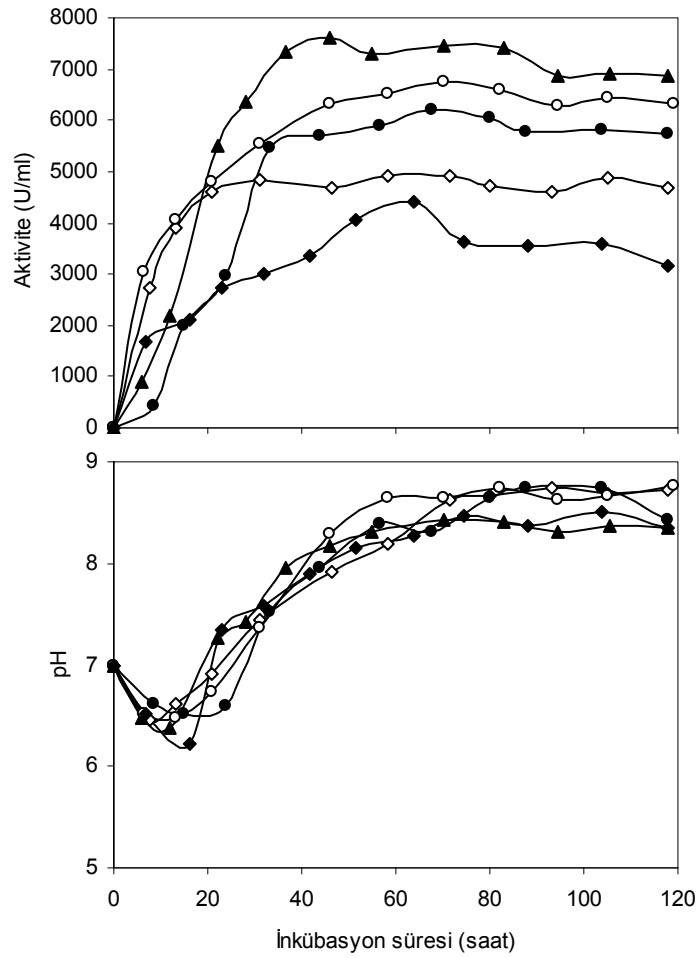
Substrat olarak kazeinin kullanıldığı deneylerde çalkalama hızının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 75, 100, 125, 175 ve 250 rpm hızlarında çalışılmış ve çalkalama hızının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi Şekil 6.45.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi maksimum enzim aktivitesi 125 rpm hızında 7617 U/ml olarak bulunmuştur. Bu durum, sentetik ortama göre daha viskoz olan doğal ortamda düşük karıştırma hızının oksijen transferini sınırlamasından ve katı substrata bağlı nutrientlerin ortama yeterince geçememesinden, yüksek karıştırma hızının ise fermantasyon ortamının kararlılığını olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklanabilir.

6.3.3.6. Sıcaklığın Etkisi

Ortam sıcaklığının enzim üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla 25, 30 ve 35 °C'de deneyler yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.46.'da verilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 30 °C ortam sıcaklığında 7617 U/ml olarak gözlenmiştir. 25 ve 35 °C ortam sıcaklığında elde edilen maksimum enzim aktivitesi ise sırasıyla 5977 ve 7050 U/ml olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar ışığında, fermantasyon ortam sıcaklığının proteaz üretimini etkileyen önemli bir parametre olduğu görülmüştür.



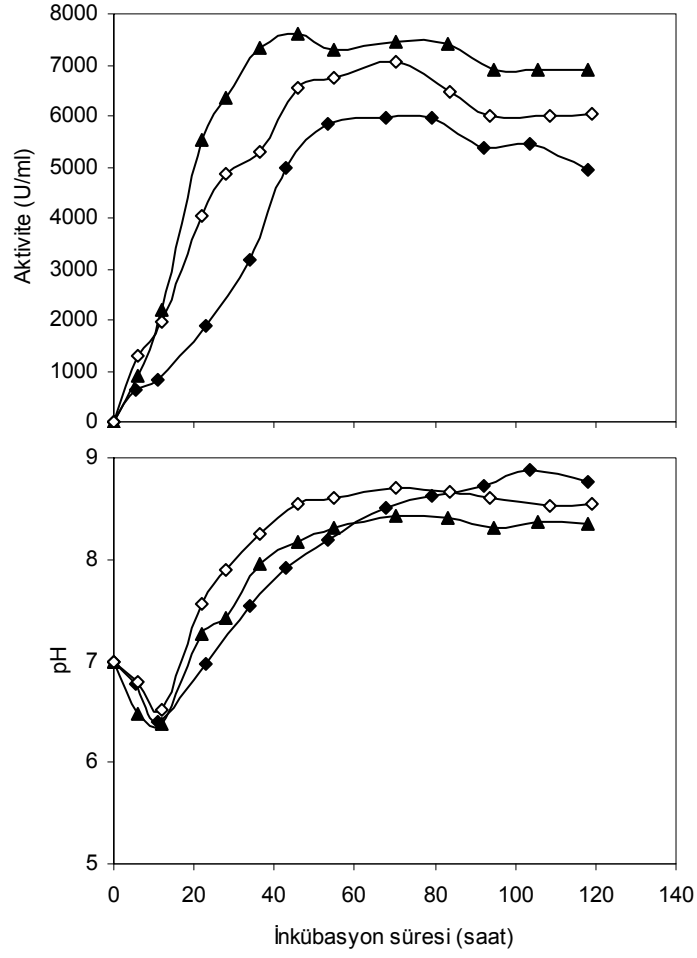
Şekil 6.44. Farklı başlangıç inokulum miktarlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (10 g/l kazein, Başlangıç pH: 7, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, İnokulum oranı % v/v: ◆: 1, ◇: 2.5, ●: 5, ▲: 10, ○: 20)



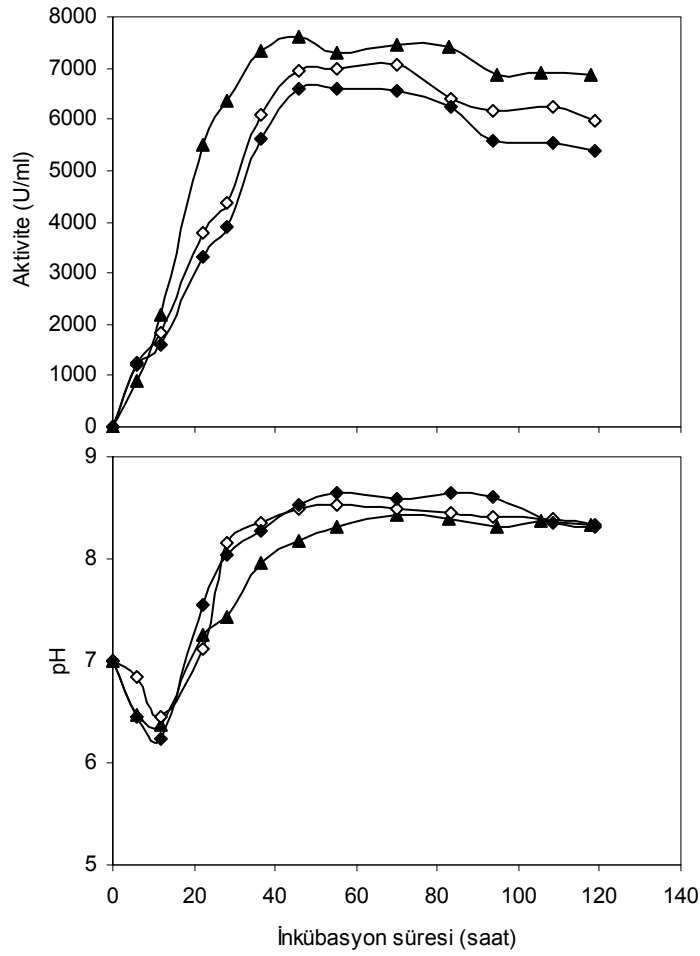
Şekil 6.45. Farklı çalkalama hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (10 g/l kazein, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Çalkalama hızı: ◇: 75, ●: 100, ▲: 125, ○: 175, ◆: 250 rpm)

6.3.3.7. İlave Karbon Kaynağı Etkisi

Çalışmanın bu kısmında, sadece kazein ve çeşme suyundan oluşan fermantasyon ortamına karbon kaynağı olarak glikoz ve sakkarozun ilave edilmesinin, enzim üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 10 g/l kazein ve çeşme suyu içeren fermantasyon ortamına % 1 (w/w) glikoz ve sakkaroz eklenmiştir. Elde edilen deney sonuçları Şekil 6.47.'de verilmiştir. Ortama farklı karbon kaynağı ilavesi, enzim aktivitesini düşürmüştür. Sadece kazein ve çeşme suyu içeren ortamda maksimum enzim aktivitesi 7617 U/ml iken, % 1 (w/w) glikoz ilave edildiği durumda 6658 U/ml, % 1(w/w) sakkaroz ilave edildiği durumda ise 7061 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu durum, protein içeriği bakımından zengin olan kazeinin, *T. turnirae*'den proteaz üretiminde biyoproses ortamında herhangi bir ilave karbon kaynağına gerek duymadan enzim üretimini gerçekleştirdiğini, ilave karbon kaynağının inhibisyona sebep olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.46. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (10 g/l kazein, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: ◆: 25, ▲: 30, ◇: 35 °C)



Şekil 6.47. Farklı karbon kaynağı ilavesinin enzim aktivitesi ve ortam pH'sı üzerine etkisi (10 g/l kazein, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, Karıştırma hızı: 125 rpm, T: 30 °C, ◆: 10 g/l kazein + % 1 (w/w) glikoz, ◇: 10 g/l kazein + % 1 (w/w) sakkaroz, ▲: 10 g/l kazein)

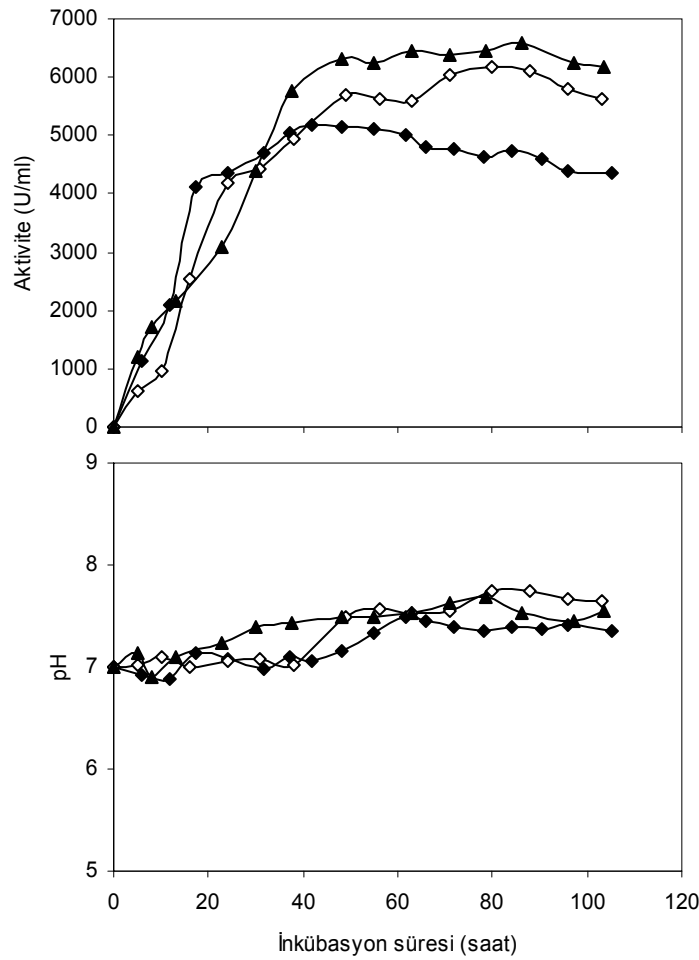
6.3.3.9. Biyoreaktörde Kesikli Sistemle Proteaz Üretimi

Doğal substrat olarak kazeinin kullanıldığı deneylerden elde edilen optimum sonuçlar ışığında, 1 l'lik laboratuvar ölçekli biyoreaktörde kesikli sistem uygulanarak, kazein ve çeşme suyu içeren ortamda, *T. turnirae*'den proteaz üretimi üzerine, karıştırma ve havalandırma hızının etkisi incelenmiştir.

6.3.3.9.1. Karıştırma Hızı Etkisi

Biyoreaktörde, karıştırma hızının *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla, 400, 500 ve 600 rpm karıştırma hızlarında fermentasyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.48.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi

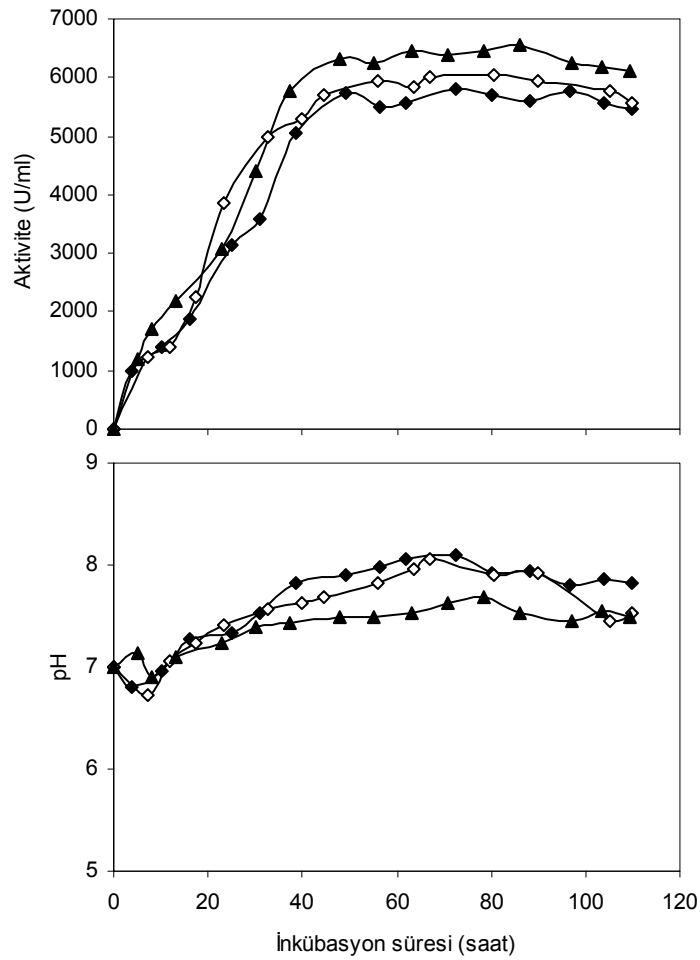
karıştırma hızı artıkça enzim aktivitesi de artış göstermektedir. Düşük karıştırma hızının oksijen limitasyonu meydana getirdiği düşünülmüş ve *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde yüksek oksijen gerekliliğini ortaya koymuştur. Maksimum enzim aktivitesi 600 rpm de 6571 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerin, kazein ile erlenlerde yapılan deneylerde elde edilen maksimum enzim aktivitesi 7617 U/ml değerinden daha düşük olduğu görülmüş ve ölçek büyütme sonucunda enzim aktivitesinde bir düşüş olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 6.48. Biyoreaktörde farklı karıştırma hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (10 g/l kazein, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Hava giriş hızı: 0.6 vvm, Karıştırma hızı: ◆: 400, ◇: 500, ▲: 600 rpm)

6.3.2.9.2. Hava Giriş Hızı Etkisi

Kesikli biyoreaktör sisteminde, enzim üretimi üzerine hava giriş hızının etkisini incelenmek amacıyla, 0.4, 0.5 ve 0.6 vvm olan üç farklı hava giriş hızında deneyler gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 6.49.'da verilmiştir. Enzim aktivitesinin biyoreaktöre beslenen hava miktarı ile arttığı, maksimum enzim aktivitesinin 0.6 vvm hava giriş hızında 6571 U/ml olduğu görülmüştür. Yüksek hava giriş hızının enzim aktivitesini arttırması, *T. turnirae*'den serin alkali proteaz üretiminde yüksek oksijen gerekliliğini göstermektedir.



Şekil 6.49. Biyoreaktörde farklı hava giriş hızlarında enzim aktivitesi ve ortam pH'sının zamanla değişimi (10 g/l kazein, Başlangıç pH: 7, İnokulum oranı: % 10 v/v, T: 30 °C, Karıştırma hızı: 600 rpm, Hava giriş hızı: ◆: 400, ◇: 500, ▲: 0.6 vvm)

7. BİYOPROSESİN MATEMATİKSEL MODELLENMESİ

7.1. Genetik Algoritma

Modern bilimde veri kümeleri arasındaki ilişkileri, tecrübelerden de faydalanarak belirlemek, üzerinde çokça çalışılan ve araştırılan bir taslaktır. Günümüzdeki araştırma konuları ve problemleri eskiye nazaran çok daha karışıktır. Bu karışıklık problemi etkileyen parametre sayısının fazlalığından ve problemin çözüm kümesinin boyutunun büyümesinden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı eldeki verilerin analizi ve sonucu bu verilerden kestirme yöntemlerinin önemi, araştırmacılar için gittikçe artmaktadır. Faydalı iyi bir veri analiz yöntemi şu kriterlere göre değerlendirilebilir. İyi tahmin veya sonucu kestirmeye yönelik olmalı, sistemin içindeki her bir mekanizmanın analiz edilebilmesi ve sonuçların mümkün olabilecek çözüm uzayı kümesinde olmasıdır.

Geçmişte araştırmacılar tarafından çalışılan, parametreler arasındaki ilişkiler, genelde deneme yoluyla, zor olan örneklerde karmaşık veya sabit olmayan ilişkiler için yapılmış; fakat parametre sayısı artınca çözümsüzlük veya elde edilen çözümü değerlendirememeye problemini getirmiştir. İstatistiksel yöntemler, araştırmacılara ilişkileri bulmada faydalı olan ilk araçlardandır. İstatistiksel yöntemlerde: (1) verinin normal toplandığı, (2) verinin eşitlik ilişkisinin belirli bir formda olması (ör: lineer, quadratic, veya polinomsal), (3) değişkenlerin bağımsız olması gerekir. Eğer problem bu kriterleri sağlarsa, istatistiksel yöntem ilişkileri bulmada faydalı olabilir. Oysa gerçek hayatta problemler bu kriterleri nadiren sağlarlar.

Modern sonuç kestirme veya sonuç geliştirme algoritmaları bu kriterlerle sınırlandırılmazlar. Neural network (Yapay sinir ağları) veya Artificial intelligence (Yapay zeka) teknikleri karmaşık ilişkileri kapsamayabilir; fakat mekanizmanın önemli ilişkilerini tanımlayabilen güçlü tahmin modelleridir. Buna rağmen, diğer bir teknik Genetik Algoritma (GA) ve Genetik Programlama teknikleri çok daha güçlüdürler ve karışık çözüm uzayını daha da geniş bulabilirler. Bağımsız olan veri ve parametreler ile mekanizmanın ilişkilerini bulmada başarılı örnekleri vardır.

Genetik Algoritma, biyolojik bir sistemin, çevresine adaptasyonunda kullandığı metodun örneklendirilmesidir. Bilgisayarda, bu tür çok parametrelili optimum bulma problemlerine çözüm modeli olarak alınabilir.

Doğal adaptasyondan esinlenen GA' nın basit olarak iskeleti:

- a) Bireyin bulunduğu ortamda hayatta kalmak için, kendi kendisini değiştirerek ortama uygun hale gelmesi,

b) Bu adaptasyon boyunca, yeni üretilecek nesillere, bu özellikler ile birlikte mümkün olabilecek daha çok değişim aktararak, bireylerin daha çok uyumlu hale getirilmesi olarak özetlenebilir.

Genetik algoritma, tam olarak rasgele arama tekniğidir. İlk defa Michigan Üniversitesi'nde John Holland tarafından geliştirilmiştir. Araştırmalarını, arama ve optimumu bulma için, doğal seçme ve genetik evrimden yola çıkarak yapmıştır. İşlem boyunca, biyolojik sistemde bireyin bulunduğu çevreye uyum sağlayıp daha uygun hale gelmesi örnek alınarak, optimum bulma problemlerinde, bilgisayar yazılımı modellenmiştir.

Mühendislik, bilim, ekonomi, finansman v.s. deki problemleri çözmede kullanılan arama teknikleri, hesap-temelli ve doğrudan arama teknikleri olarak sınıflandırılabilir. Eğer problemler sayısal veya analitik olarak iyi tanımlanabiliyorsa veya çözüm uzayı küçük ve tek ise, hesap temelli arama tekniği daha iyi çalışır. Buna rağmen hesap-temelli teknik mühendislik optimizasyonların da gittikçe artan optimum bulma fonksiyonlarında oldukça zayıf kalır. Sadece fonksiyon bilgisi gerekli olan Doğrudan arama tekniği, hesap-temelli teknikten daha kısa sürede işler ve daha etkilidir. Doğrudan arama tekniğinin esas problemi, ulaşılabilen bilgisayar zamanı ile optimal çözümün kesinliği arasındaki bağıntıdır (Goldberg, 1989).

GA, arama problemlerinde oldukça etkilidir, çözüm kümesinden optimum veya optimuma yakın çözümleri bulabilir. GA, adım-adım çözüm topluluğuna genetik operatörler uygular, uygun topluluktan arama yoluyla yeni nesiller üreterek en iyi çözümlere ulaşmasını sağlar. GA' lar geçmiş yıllarda, robot optimum bulma problemlerin çeşitliliği ve çözüm kümesinin doğrudan bulunamadığı problemlerde ve değişik alanlarda karşılaşılan benzer problemlerden dolayı mühendislikte popülerite kazanmıştır. İlk olarak Hollanda' da makine öğrenme sistemlerine yardımcı olarak kullanılmış daha sonra De Jong Goldberg ve diğerleri tarafından analiz edilmiştir. Goldberg, GA'nın çok sayıda kollara ayrılmış gaz borularında, gaz akışını düzenlemek ve kontrol etmek için uygulamasını tanımlamıştır. Ayrıca kendisinin kullandığı makine öğrenmesi, nesne tanıma, görüntü işleme ve işlemsel arama gibi alanlarda kullanıldığını vurgulamıştır.

Genetik algoritma normal arama işleminden 4 yönden farklıdır.

- 1) GA parametrelerin kendisiyle değil, oluşturulabilir bir koduyla çalışır.
- 2) GA çözüm kümesine doğrudan tek nokta ile değil, noktalar topluluğuyla yaklaşır.
- 3) GA sadece fonksiyon bilgisini kullanır. Matematik bilgisine ihtiyaç duymaz.
- 4) GA deterministik bir alanda randomize edilmiş operatörler kullanır. Determinizm kurallarını değil ihtimal kurallarını kullanır.

GA, sonlu uzunlukta tanımlanan bit katarı gibi bir kod nesnenin fonksiyonunun parametrelerini ihtimal kurallar kümesini kullanarak işletir. GA kördür, problem hakkında uygunluk fonksiyonundan başka hiç bir şey bilmez. Yeni nesil oluşturmayı ve bireysel katarlar topluluğunu test etmeyi adım-adım işletir. Topluluktaki bireylerin uygunluk değerlerini yükseltmeye çalışırlar. Basit bir genetik algoritma, tekrar üretme, çaprazlama ve mutasyon operatörlerine sahiptir.

7.1.2. Genetik Algoritmanın Tarihçesi

Michigan Üniversitesinde psikoloji ve bilgisayar bilimi uzmanı olan John Holland bu konuda ilk çalışmaları yapan kişidir. Mekanik öğrenme (machine learning) konusunda çalışan Holland, Darwin'in evrim kuramında etkilenecek canlılarda yaşanan genetik süreci bilgisayar ortamında gerçekleştirmeyi düşündü. Tek bir mekanik yapının öğrenme yeteneğini geliştirmek yerine böyle yapılarda oluşan bir topluluğun çoğalma, çiftleşme, mutasyon, vb. genetik süreçlerden geçerek başarılı (öğrenebilen) yeni bireyler oluşturabildiğini gördü. Araştırmalarını, arama ve optimumu bulma için, doğal seçme ve genetik evrimden yola çıkarak yapmıştır. İşlem boyunca, biyolojik sistemde bireyin bulunduğu çevreye uyum sağlayıp daha uygun hale gelmesi örnek alınarak, optimum bulma problemlerinde, bilgisayar yazılımı modellenmiştir.

7.1.3. Genetik Algoritmanın Tanımı

Genetik algoritma, doğadaki evrim mekanizmasını örnek alan bir arama metodudur ve bir veri grubundan özel bir veriyi bulmak için kullanılır. Genetik algoritmalar 1970'lerin başında John Holland tarafından ortaya atılmıştır. Genetik Algoritmalar, Evrimsel Genetik ve Darwin'in doğal seleksiyonuna benzerlik kurularak geliştirilmiş ihtimali bir arama metodudur.

Genetik algoritmalar doğada geçerli olan en iyinin yaşaması kuralına dayanarak sürekli iyileşen çözümler üretir. Bunun için "iyi"nin ne olduğunu belirleyen bir *uygunluk* (fitness) fonksiyonu ve yeni çözümler üretmek için *yeniden kopyalama* (recombination), *değiştirme* (mutation) gibi operatörleri kullanır. Genetik algoritmaların bir diğer önemli özelliği de bir grup çözümle uğraşmasıdır. Bu sayede çok sayıda çözümün içinden iyileri seçilip kötülerini elenebilir. Genetik algoritmaları diğer algoritmalarından ayıran en önemli özelliklerden biri de seçmedir. Genetik algoritmalarda çözümün uygunluğu onun seçilme şansını artırır ancak bunu garanti etmez. Seçim de ilk grubun oluşturulması gibi rasgeledir ancak bu rasgele seçimde seçilme olasılıklarını çözümlerin uygunluğu belirler.

Genetik Algoritmaları (GA) diğer metotlardan ayıran noktalar şu şekilde sıralanabilir:

- GA , sadece bir arama noktası değil , bir grup arama noktası (adaylar) üzerinde çalışır. Yani arama uzayında , **yerel** değil **global** arama yaparak sonuca ulaşmaya çalışır. Bir tek yerden değil bir grup çözüm içinden arama yapar.
- GA , arama uzayında bireylerin uygunluk değerini bulmak için sadece “amaç - uygunluk fonksiyonu” (objective-fitness function) ister.
- Bireyleri seçme ve birleştirme aşamalarında deterministik kurallar değil “ olasılık kuralları” kullanır.
- Diğer metodlarda olduğu gibi doğrudan parametreler üzerinde çalışmaz .Genetik Algoritmalar, optimize edilecek parametreleri kodlar ve parametreler üzerinde değil, bu kodlar üzerinde işlem yapar. Parametrelerin kodlarıyla uğraşır. Bu kodlamanın amacı, orjinal optimizasyon problemini kombinezonsal bir probleme çevirmektir.
- Genetik algoritma ne yaptığı konusunda bilgi içermez, nasıl yaptığını bilir. Bu nedenle kör bir arama metotudur.
- Olasılık kurallarına göre çalışırlar. Programın ne kadar iyi çalıştığı önceden kesin olarak belirlenemez. Ama olasılıkla hesaplanabilir.

Genetik Algoritmalar, yeni bir nesil oluşturabilmek için 3 aşamadan geçer :

1. Eski nesildeki her bir bireyin uygunluk değerini hesaplama.
2. Bireyleri, uygunluk değerini göz önüne alarak (uygunluk fonksiyonu) seçme.
3. Seçilen bireyleri, çaprazlama (crossover), mutasyon (mutation) gibi genetik operatörler kullanarak uyuşturma.

Algoritmik bakış açısından bu aşamalar, mevcut çözümleri lokal olarak değiştirip birleştirmek olarak görülebilir.

Genetik Algoritmalar; başlangıçta bilinmeyen bir arama uzayından topladığı bilgileri yığıp, daha sonraki aramaları alt arama uzaylarına yönlendirmek için kullanılır.

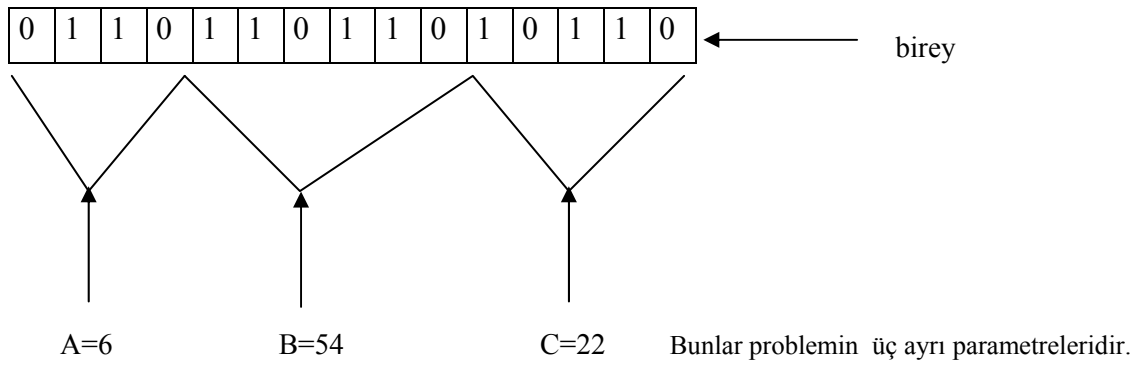
7.1.4. Genetik Algoritma Sürecinde Kullanılan İşlemler

7.1.4.1. Kodlama yöntemleri

Kodlama planı Genetik algoritmanın önemli bir kısmını teşkil eder. Çünkü bu plan bilginin çerçevesini şiddetle sınırlayabilir. Öyle ki probleme özgü bilginin bir kromozomsal gösterimiyle temsili sağlanır. *Kromozom* genellikle, problemdeki değişkenlerin belli bir düzende sıralanmasıdır. Kromozomu oluşturmak için sıralanmış her bir değişkene “*gen*” adı verilir. Buna göre bir *gen* kendi başına anlamlı genetik bilgiyi taşıyan en küçük genetik yapıdır. Mesela; 101

bit dizisi bir noktanın x-koordinatının ikilik düzende kodlandığı gen olabilir. Aynı şekilde bir *kromozom* ise bir ya da daha fazla genin bir araya gelmesiyle oluşan ve problemin çözümü için gerekli tüm bilgiyi üzerinde taşıyan genetik yapı olarak tanımlanabilir. Örnek vermek gerekirse; 100011101111 x1, y1, x2, y2 koordinatlarından oluşan iki noktanın konumu hakkında bize bilgi verecektir.

GA' yı bir probleme uygulamadan önce, verinin nasıl kodlanacağı ve mümkün olabilen çözümler kümesinden örnek çözümlerin bilinmesi gerekir. Genel olarak en yaygın kodlama uzunluğu belirlenmiş bit katarı şeklindedir. Klasik GA' da, topluluktaki her bir birey, problemdeki parametreler kümesinin kodlandığı belirli uzunlukta ikili (binary) kattan oluşur. Bu kodlanan katar tekrar kod çözülerek parametrelerin ondalık değerini verebilir.



Şekil 7.1. 15 bit uzunluğunda bir bireyin hazırlanışı

Başlangıç topluluğu, rasgele veya kestirme ile genelleştirilmiş potansiyel çözümler kümesidir. Rasgele olarak seçilen ilk topluluk, çözümler hakkında hiç bilgi yoksa kullanılır. İkinci yöntemde yaklaşıma bilinen bir çözüm kümesinden başlanılır. Buda iyi çözüme ulaşmayı, daha kısa sürede imkan sağlayacaktır. Fakat genelde çözüm topluluğu program içinde birey oluşturma işlemi kullanılarak rasgele yapılır.

7.1.4.2. Uygunluk teknikleri

Başlangıç topluluğu bir kez oluşturulduktan sonra evrim başlar. Genetik algoritma bireylerin uygunluk ve iyiliklerine göre ayrılıp fark edilmesine gerek duyar. Uygunluk, topluluktaki bir kısım bireyin problemi nasıl çözeceği için iyi bir ölçüdür. O problem parametrelerini kodlamayla ölçülür ve uygunluk fonksiyonuna giriş olarak kullanılır. Yüksek ihtimalle uygun olan bu üyeler tekrar üreme, çaprazlama ve mutasyon operatörleriyle seçilirler.

Bazı problemler için bireyin uygunluğu, bireyden elde edilen sonuç ile tahmin edilen sonuç arasındaki hatadan bulunabilir. Daha iyi bireylerde bu hata sifıra yakın olur. Bu hata

genellikle, girişin tekrar sunulacak kombinezonlarının ortalaması veya toplamıyla hesaplanır (değerler değişkenlerden bağımsızdır). Beklenen ve üretilen değer arasındaki korelasyon etkeni, uygunluk değerini hesaplamak için kullanılabilir.(Koza 1994).

Objektif fonksiyonu (Değerlendirme fonksiyonu) her bir kromozomun durumunu değerlendirmek için mekanizmayı sağlayan ana bir kaynaktır. Bu GA ve sistem arasında önemli bir bağlantıdır. Fonksiyon giriş olarak kodu çözülmüş şekilde kromozom (Phenotype) alır, ve kromozomun performansına bir ölçü olarak bir objektif değer üretir. Bu diğer kromozomlar için de yapıldıktan sonra bu değerler kullanılarak, uygun değerler uygunluk fonksiyonuyla hesaplanıp belli bir düzende planlanır. Bu planlamayı sağlayan ve uygunluk teknikleri olarak bilinen birçok yöntem vardır. Çoğu ortak kullanılan bu yöntemler şunlardır:

7.1.4.3. Tekrar Üretme

Yeniden üretme operatörü, hazır topluluktan uygun olan bireylerin seçilmesi ve bunların sonraki topluluğa kopyalanarak hayatta kalmalarıyla ilgilidir. Seçim modeli, tabiatın hayatta kalabilmek için uygunluk mekanizması modelidir. Yeniden üretme işleminde, bireyler onların uygunluk fonksiyonlarına göre kopya edilirler. Uygunluk fonksiyonu, mümkün olduğu kadar yükseltilmesi gereken bazı faydalı ve iyi ölçülerdir. Topluluk uzayındaki her bir bireyin uygunlukları baz alınarak ne kadar sayıda kopyasının olacağına karar verilir. En iyi bireylerden daha fazla kopya alınır, en kötü bireylerden kopya alınmaz. Bu hayatta kalmak için uygunluk stratejisinin GA ya sağladığı avantajdır.

GA tarafından üretilen döllerin sayısını belirlemede birkaç yol vardır. Birbirine yakın parametrelerden kaçınmak için uygun bir seçim metodu kullanılmalıdır. Tekrar üretme başlangıcında basit bir yöntem “roulette wheel selection” (rulet tekerleğiyle seçim)’e göre bireylerin uygunluk değerlerini bir rulet tekerleğinde hazırlar. Rasgele tekerleğin döndürülmesinden sonra, bireyin bir sonraki nesil için seçilmesi, tekerlek üzerinde kapladığı alanla doğrudan bağlantılıdır. Bu yöntem düşük uygunluğa sahip bireylere de seçilme hakkı verir.

$$P_{\text{seçilen}} = \frac{F_i}{\sum_{i=1}^N F_i} \quad (7.1.)$$

F_i : i. Eleman için uygunluk değeri

N: Birey sayısı

7.1.4.4. Çaprazlama

Çaprazlama iki kromozomun bir araya gelerek genetik bilgi değişimi yapmasıdır. Bunun yanında iki ebeveynden yeni kromozomlar üreten genetik algoritmaların temel bir özelliğidir. Çaprazlama, bir önceki nesilde bireylerin uygunluklarına göre seçilip, gen havuzuna kopyalanmalarından sonra olmaktadır.

Biyolojik kromozomlar üzerinde yapılan çaprazlamada amaç daha iyi, daha dayanıklı birey oluşturup ait olduğu bireyler topluluğunun neslini dışarıdan etkiyle daha mükemmel hale getirmektir. Bu işlem yapılırken her zaman sonuçlar önceden tahmin edilemez. Bu yüzden gelişigüzel yapılan değişikliklerde sonucun mükemmelliğe doğru gitmesi için belirli kriterler bulmak için çalışılır. Kromozomlardaki genlerin yapısı ve etkileri araştırılarak, bu genlere yapılan müdahalelerle bireye bazı iyi özellikler kazandırılabilir. Tablo 7.1.'de biyolojik çaprazlamaya bir örnek verilmiştir.

Tablo 7.1. Biyolojik Çaprazlama Örneği

1.ebeveyn	AA	BB	2. ebeveyn	aa	bb
1. döl	AABB		2. Döl	aabb	

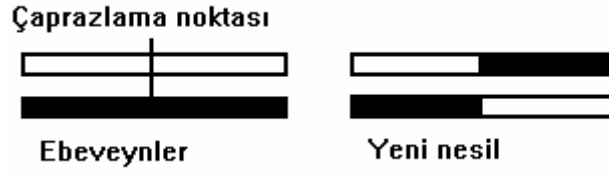
Benzer şekilde GA, çaprazlama işlemini uygunluk değerlerine göre seçilmiş iki ebeveyn bireyden, iyi özellikte yeni bireyler elde etmek için kullanır. Çaprazlama rasgele seçilmiş iki çift katarın içindeki alt küme bilgilerin değiştirilmesi işlemidir. Kendi içindeki bilgilerini 1. pozisyondan itibaren, katarın uzunluğunun bir eksik pozisyonuna kadar, aradaki bilgi kısmen karşılıklı bireyler arasında yer değiştirilir.

Eğer iki bireyin problemin çözümünde bazı etkileri var ise onların bir parçaları faydalı, iyi veya uygun nitelenebilecek bilgi taşımaktadır. Çaprazlama belki problemin çözümünde, bu faydalı bilgileri birleştirerek, daha çok etkili yeni bireyler üretecektir. Tablo 7.2.'de ikili kodda verilmiş bir katarda, örnek 2 bitlik bir çaprazlama işlemi verilmiştir.

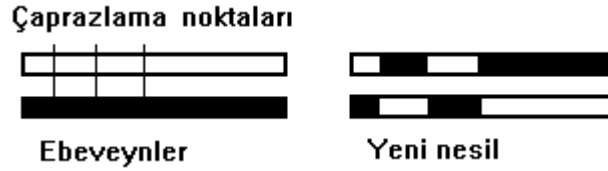
Tablo7.2. İki Bitlik Çaprazlama Örneği

1. ebeveyn	100110 00	1. Döl	10011001
2. ebeveyn	110111 01	2. Döl	11011100

Tek noktalı çaprazlama Şekil 7.2.'de, üç noktalı çaprazlama Şekil 7.3.'de gösterilmiştir. Buna göre her iki bireyde bir çaprazlama noktası seçilir ve üçüncü adım olarak bu noktadan sonraki kısımlar karşılıklı yer değişir.



Şekil 7.2. Tek Noktalı Çaprazlama

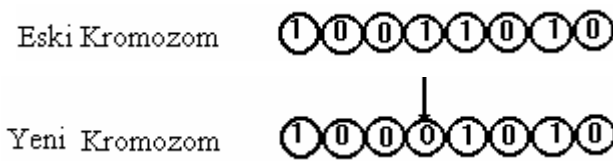


Şekil 7.3. Üç Noktalı Çaprazlama

Çoğu genetik algoritma uzmanları çaprazlama işleminin GA'yı diğer bütün optimizasyon algoritmalarından ayıran belirleyici bir faktör olarak göz önüne alır.

7.1.4.5. Mutasyon

GA' nın ikinci mekanizması olan mutasyon, katardaki rasgele bir bit bilginin alternatifinin alınmasıyla ilgilidir. Mutasyon aramada kısır döngüye girilmemesini sağlamak, toplulukta çözüm olmayan birbirine benzer bireylerden kurtulmak ve yeni alt optimal çözümler bulunmasını sağlamak için kullanılır. İkili kodda bu ilişki 0' ın 1' e ve 1' in 0' a değiştirilmesidir. Şekil 7.4.'de bit katarında hazırlanmış bir mutasyon operatörünü göstermektedir.



Şekil 7.4. Eski kromozomun 4. Bitine Uygulanan Bit Mutasyonu.

Burada mutasyona uğratılacak kromozomun biti 1 ise 0'a, 0 ise 1'e set edilir.

7.1.4.6. Yerine Geçme Yöntemleri

Alt populasyon oluşturulduktan sonra eski generasyonun yerini alması için iki tipik yöntem önerilir.

Bunlardan biri, Generasyonel Yerine Geçme'dir. Bu yöntemde göre boyutu n bir alt populasyon tüm kromozomlarıyla yeni generasyonu oluşturur. Yani bir alt populasyon hiç değişikliğe uğramadan bir sonraki neslin başlangıç populasyonunu oluşturur. Bunun yanında populasyonun en iyi üyesi bir sonraki generasyonda yeni nesli üretmede başarısız olabilir.

Diğeri ise, Sabit Durumlu Çoğalma'dır. Bu yöntemde ise alt populasyon oluşturulduktan sonra; uygunlukları hesaplanarak, en kötü kromozomlar yerlerini başlangıç populasyondaki en iyi kromozomlara terk eder. Bunun diğer adı Elitist seçmedir. Bu yöntemle populasyonun uygunluğu süper kromozomlar sayesinde artar ve algoritmanın performansı gelişir.

7.1.5. Genetik Algoritmaların Çalışma Prensipleri

Genetik algoritmanın çalışma adımlarını şöyle özetleyebiliriz;

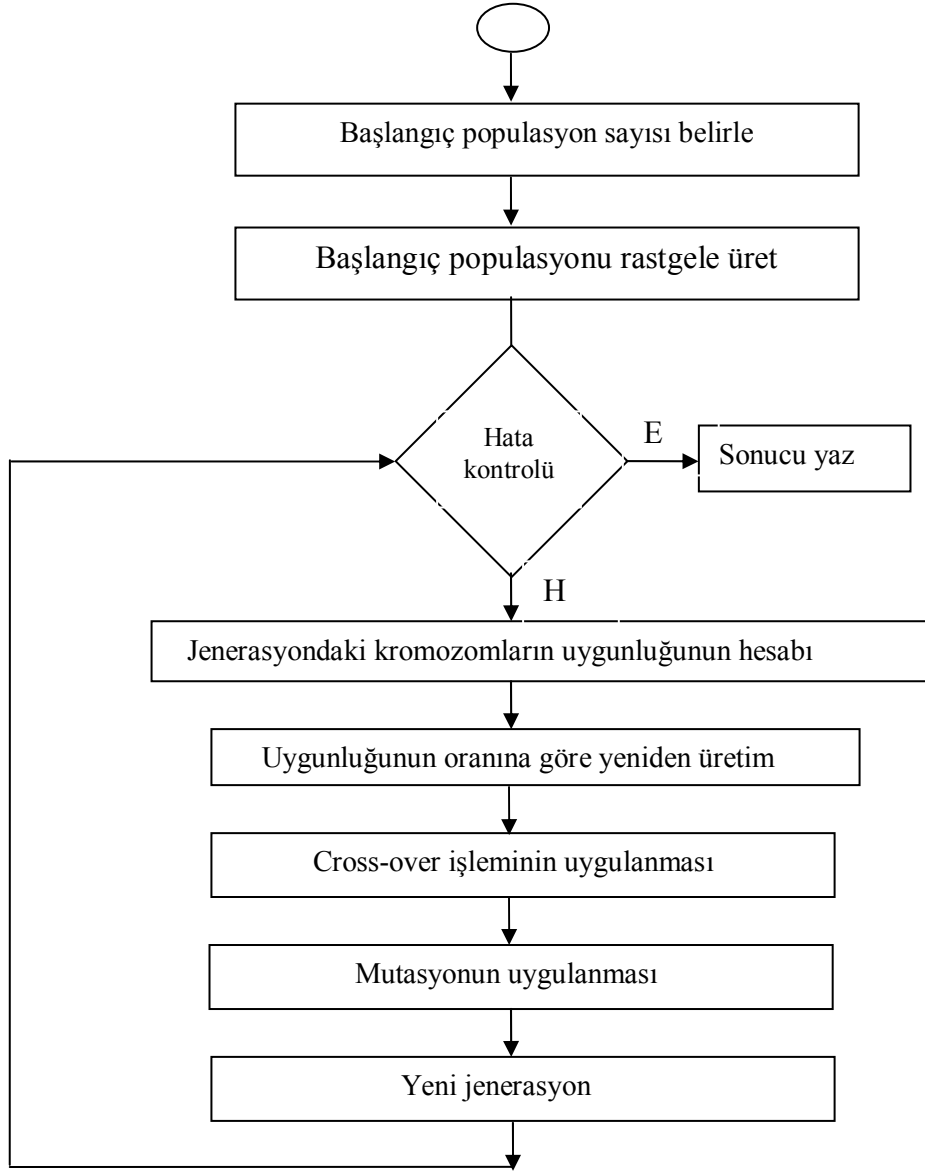
- Adım 1** Olası çözümlerin kodlandığı bir çözüm grubu oluşturulur (çözüm grubu, biyolojideki benzerliği nedeniyle, toplum (population), çözümlerin kodları (string) da kromozom olarak adlandırılır).
- Adım 2** Her kromozomun ne kadar iyi olduğu bulunur (fitness function).
- Adım 3** Bu kromozomlar eşlenerek (mating), yeniden kopyalama (recombination) ve değiştirme (crossover) operatörleri uygulanır. Bu sayede yeni bir toplum oluşturulur.
- Adım 4** Yeni kromozomlara yer açmak için eski kromozomlar ortadan kaldırılır.
- Adım 5** Tüm kromozomların uygunlukları tekrar hesaplanır.
- Adım 6** Eğer jenerasyon süresi dolmamışsa 3. adıma gidilir.
- Adım 7** O ana kadar bulunmuş en iyi kromozom sonuçtur.

Ayrıca GA'nın akış diyagramı Şekil 7.5'de verilmiştir.

7.1.6. Uygulama Alanları

Genetik algoritmaların en uygun olduğu problemler geleneksel yöntemler ile çözümü mümkün olmayan ya da çözüm süresi problemin büyüklüğü ile üstel orantılı olarak artanlardır. Bugüne kadar GA ile çözümüne çalışılan konulardan bazıları şunlardır:

- *Optimizasyon*: GA, sayısal optimizasyon ve kombinatoral optimizasyon problemleri olan devre tasarımı, doğrusal olmayan denklem sistemlerinin çözümünde ve fabrika-üretim planlamasında kullanılır.
- *Otomatik Programlama (automatic programming)*: GA, bilgisayar programları yardımıyla network sıralamasında (sorting), sınav/ders programı hazırlanmasında kullanılır.



Şekil 7.5. Genetik Algoritmanın Akış Diyagramı

- *Makine öğrenmesi (machine learning)*: GA, robot sensorlerinde, neural networklerde, VLSI yonga tasarımı ve protein yapısal analizinde kullanılır.
- *Ekonomi (economics)*: GA, ekonomik modellerin geliştirilmesinde ve işleminde kullanılır. Mesela seralarda salatalık yetiştirilmesinde iklim kontrolünü yapabilmek ve optimal sıcaklığın nasıl yayılmasını belirlemek için GA yöntemi kullanılmıştır. Yöntem

optimal kontrol teorisinde kullanılan dinamik optimumlaştırmaya bir alternatif olarak ele alınmıştır

- *İmmün sistemler (Immune systems)*: GA, çok-gen'li ailelerin evrimi esnasında ve doğal immün sistem modellerinde kullanılır.
- *Popülasyon genetiği (population genetics)*: GA, evrim ile ilgili sorulara cevap bulmada kullanılır.
- *Evrime ve öğrenme (evolution and learning)*: GA, fertlerin öğrenmesini ve türlerin evrilmesinde kullanılır.
- *Sosyal sistemler (social systems)*: GA, sosyal sistemlerin analizinde kullanılır.
- *Müzik*. Stokastik müzik üreticinin çıktısından elde edilen materyali sınırlayan bir takım veri filtreleri ile müzik oluşturma GA' nın bir uygulamasıdır. Bunun için algoritmik düzenin yapısındaki değişiklikler tanımlanır ve bunların çıktıları müzikal örnekler olarak alınır.

7.2. Yapay Sinir Ağları

Son yıllarda, insan beyninin çalışma prensibini yapay olarak modellemeyi amaçlayan Yapay Sinir Ağları (YSA); nesne/örüntü tanıma, sinyal işleme, arıza analizi ve tespiti, sistem tanılama (modelleme) ve denetimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve kullanıldığı alanlardaki problemlerin çözümüne yeni yaklaşımlar getirmiştir. Genel olarak bir YSA, tek katmanlı ya da çok katmanlı olarak düzenlenebilen ve paralel olarak çalışan çok sayıda doğrusal olmayan yapay hücreden (işlem elemanı) meydana gelen bir sistem ya da matematiksel model olarak tanımlanır. Hücreler arasındaki ağırlıklar, arzu edilen tasarım amaçlarını sağlayacak şekilde çeşitli öğrenme kuralları ile ayarlanır. Bu yapısı ile YSA, öğrenme sürecinde bilgiyi toplayan ve ağırlıkları yardımıyla bu bilgiyi saklayan paralel bir işlemcidir. Bugün, çeşitli YSA yapıları ve öğrenme algoritmaları geliştirilmiştir. Herhangi bir uygulama için uygun YSA yapısını ve öğrenme algoritmasını seçmek yada geliştirmek gerekir.

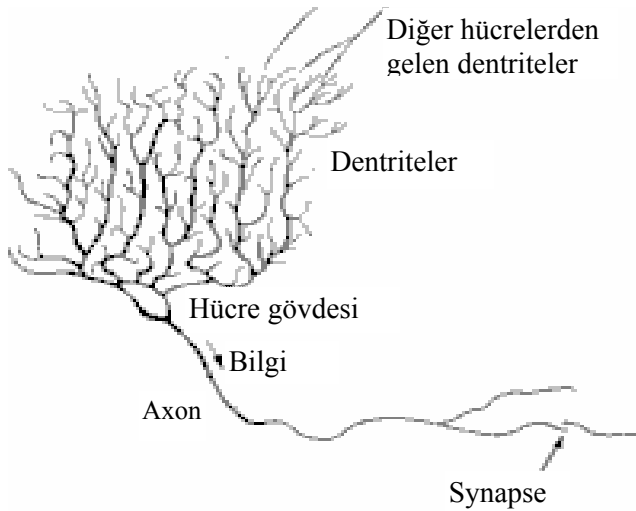
7.2.1. Biyolojik Sinir Sistemi

Biyolojik sinir sistemi, merkezinde sürekli olarak bilgiyi alan, yorumlayan ve uygun bir karar üreten beyin (merkezi sinir ağı) bulunduğu 3 katmanlı bir sistem olarak açıklanır. Alıcı sinirler (receptor) organizma içerisinden ya da dış ortamlardan algıladıkları uyarıları, beyne bilgi ileten elektriksel sinyallere dönüştürür. Tepki sinirleri (effector) ise, beyinin ürettiği elektriksel darbeleri organizma çıktısı olarak uygun tepkilere dönüştürür. Şekil 7.7 de bir sinir sisteminin blok gösterimi verilmiştir.



Şekil 7.7. Biyolojik sinir sisteminin blok gösterimi.

Merkezi sinir ağında bilgiler, alıcı ve tepki sinirleri arasında ileri ve geri besleme yönünde değerlendirilerek uygun tepkiler üretilir. Bu yönüyle biyolojik sinir sistemi, kapalı çevrim denetim sisteminin karakteristiklerini taşır. Merkezi sinir sisteminin temel işlem elemanı, sinir hücresi (nöron) dir ve insan beyinde yaklaşık 10 milyar sinir hücresi olduğu tahmin edilmektedir. Sinir hücresi; hücre gövdesi, dendritler ve axonlar olmak üzere 3 bileşenden meydana gelir. Dendritler, diğer hücrelerden aldığı bilgileri hücre gövdesine bir ağaç yapısı şeklinde ince yollarla iletir. Axonlar ise elektriksel darbeler şeklindeki bilgiyi hücreden dışarı taşıyan daha uzun bir yoldur. Axonların bitimi, ince yollara ayrılabilir ve bu yollar, diğer hücreler için dendritleri oluşturur. Şekil 7.8.'de görüldüğü gibi axon-dendrite bağlantı elemanı synapse olarak söylenir.



Şekil 7.8. Biyolojik Sinir Hücresi ve Bileşenleri.

Synapse gelen ve dendriteler tarafından alınan bilgiler genellikle elektriksel darbelerdir ancak, synapsedeki kimyasal ileticilerden etkilenir. Belirli bir sürede bir hücreye gelen girişlerin değeri, belirli bir eşik değerine ulaştığında hücre bir tepki üretir. Hücrenin tepkisini artırıcı yöndeki girişler uyarıcı, azaltıcı yöndeki girişler ise önleyici girişler olarak söylenir ve bu etkiyi synapse belirler.

İnsan beyninin 10 milyar sinir hücresinden ve 60 trilyon synapse bağlantısından oluştuğu düşünülürse son derece karmaşık ve etkin bir yapı olduğu anlaşılır. Diğer taraftan bir sinir hücresinin tepki hızı, günümüz bilgisayarlarına göre oldukça yavaş olmakla birlikte duyuşal bilgileri son derecede hızlı değerlendirebilmektedir. Bu nedenle insan beyni; öğrenme, birleştirme, uyarılma ve genelleştirme yeteneği nedeniyle son derece karmaşık, doğrusal olmayan ve paralel dağılmış bir bilgi işleme sistemi olarak tanımlanabilir.

7.2.2. Yapay Sinir Ağı (YSA)

Beynin üstün özellikleri, bilim adamlarını üzerinde çalışmaya zorlamış ve beynin nörofiziksel yapısından esinlenerek matematiksel modeli çıkarılmaya çalışılmıştır. Beynin bütün davranışlarını tam olarak modelleyebilmek için fiziksel bileşenlerinin doğru olarak modellenmesi gerektiği düşüncesi ile çeşitli yapay hücre ve ağ modelleri geliştirilmiştir. Böylece Yapay Sinir Ağları denen yeni ve günümüz bilgisayarlarının algoritmik hesaplama yönteminden farklı bir bilim alanı ortaya çıkmıştır. Yapay sinir ağları; yapısı, bilgi işleme yöntemindeki farklılık ve uygulama alanları nedeniyle çeşitli bilim dallarının da kapsam alanına girmektedir.

Genel anlamda YSA, beynin bir işlevi yerine getirme yöntemini modellemek için tasarlanan bir sistem olarak tanımlanabilir. YSA, yapay sinir hücrelerinin birbirleri ile çeşitli şekillerde bağlanmasından oluşur ve genellikle katmanlar şeklinde düzenlenir. Donanım olarak elektronik devrelerle ya da bilgisayarlarda yazılım olarak gerçekleştirilebilir. Beynin bilgi işleme yöntemine uygun olarak YSA, bir öğrenme sürecinden sonra bilgiyi toplama, hücreler arasındaki bağlantı ağırlıkları ile bu bilgiyi saklama ve genelleme yeteneğine sahip paralel dağılmış bir işlemcidir. Öğrenme süreci, arzu edilen amaca ulaşmak için YSA ağırlıklarının yenilenmesini sağlayan öğrenme algoritmalarını ihtiva eder.

7.2.2.1 Yapay Sinir Ağlarının Özellikleri

Yukarıda verilen açıklamalardan, YSA' nın hesaplama ve bilgi işleme gücünü, paralel dağılmış yapısından, öğrenebilme ve genelleme yeteneğinden aldığı söylenebilir. Genelleme, eğitim ya da öğrenme sürecinde karşılaşılmayan girişler için de YSA' nın uygun tepkileri üretmesi olarak tanımlanır. Bu üstün özellikleri, YSA' nın karmaşık problemleri çözebilme

yeteneğini gösterir. Günümüzde birçok bilim alanında YSA, aşağıdaki özellikleri nedeniyle etkin olmuş ve uygulama yeri bulmuştur.

Doğrusal Olmama : YSA' nın temel işlem elemanı olan hücre doğrusal değildir. Dolayısıyla hücrelerin birleşmesinden meydana gelen YSA da doğrusal değildir ve bu özellik bütün ağı yayılmış durumdadır. Bu özelliği ile YSA, doğrusal olmayan karmaşık problemlerin çözümünde en önemli araç olmuştur.

Öğrenme : YSA' nın arzu edilen davranışı gösterebilmesi için amaca uygun olarak ayarlanması gerekir. Bu, hücreler arasında doğru bağlantıların yapılması ve bağlantıların uygun ağırlıklara sahip olması gerektiğini ifade eder. YSA' nın karmaşık yapısı nedeniyle bağlantılar ve ağırlıklar önceden ayarlı olarak verilemez yada tasarlanamaz. Bu nedenle YSA, istenen davranışı gösterecek şekilde ilgilendiği probleminden aldığı eğitim örneklerini kullanarak problemi öğrenmelidir.

Genelleme : YSA, ilgilendiği problemi öğrendikten sonra eğitim sırasında karşılaşmadığı test örnekleri için de arzu edilen tepkiyi üretebilir. Örneğin, karakter tanıma amacıyla eğitilmiş bir YSA, bozuk karakter girişlerinde de doğru karakterleri verebilir yada bir sistemin eğitilmiş YSA modeli, eğitim sürecinde verilmeyen giriş sinyalleri için de sistemle aynı davranışı gösterebilir.

Uyarlanabilirlik : YSA, ilgilendiği problemdeki değişikliklere göre ağırlıklarını ayarlar. Yani, belirli bir problemi çözmek amacıyla eğitilen YSA, problemdeki değişimlere göre tekrar eğitilebilir, değişimler devamlı ise gerçek zamanda da eğitime devam edilebilir. Bu özelliği ile YSA, uyarlamalı örnek tanıma, sinyal işleme, sistem tanılama ve denetim gibi alanlarda etkin olarak kullanılır.

Hata Toleransı : YSA, çok sayıda hücrenin çeşitli şekillerde bağlanmasından oluştuğundan paralel dağılmış bir yapıya sahiptir ve ağına sahip olduğu bilgi, ağıdaki bütün bağlantılar üzerine dağılmış durumdadır. Bu nedenle, eğitilmiş bir YSA nın bazı bağlantılarının hatta bazı hücrelerinin etkisiz hale gelmesi, ağına doğru bilgi üretmesini önemli ölçüde etkilemez. Bu nedenle, geleneksel yöntemlere göre hatayı tolere etme yetenekleri son derece yüksektir.

Donanım ve Hız : YSA, paralel yapısı nedeniyle büyük ölçekli entegre devre (VLSI) teknolojisi ile gerçekleştirilebilir. Bu özellik, YSA nın hızlı bilgi işleme yeteneğini artırır ve gerçek zamanlı uygulamalarda arzu edilir.

Analiz ve Tasarım Kolaylığı: YSA' nın temel işlem elemanı olan hücrenin yapısı ve modeli, bütün YSA yapılarında yaklaşık aynıdır. Dolayısıyla, YSA' nın farklı uygulama alanlarındaki yapıları da standart yapıdaki bu hücrelerden oluşacaktır. Bu nedenle, farklı

uygulama alanlarında kullanılan YSA' ları benzer öğrenme algoritmalarını ve teorilerini paylaşabilirler. Bu özellik, problemlerin YSA ile çözümünde önemli bir kolaylık getirecektir.

7.2.2.2 YSA' nın Uygulama Alanları

Son yıllarda YSA' ları, özellikle günümüze kadar çözümü güç ve karmaşık olan yada ekonomik olmayan çok farklı alanlardaki problemlerin çözümüne uygulanmış ve genellikle başarılı sonuçlar alınabilmiştir. YSA' ları çok farklı alanlara uygulanabildiğinden bütün uygulama alanlarını burada sıralamak zor olmakla birlikte genel bir sınıflandırma ile YSA' nın uygulama alanları aşağıdaki gibi 6 grup içerisinde toplanabilir.

Arıza Analizi ve Tespiti : Bir sistemin, cihazın yada elemanın düzenli (doğru) çalışma şeklini öğrenen bir YSA yardımıyla bu sistemlerde meydana gelebilecek arızaların tanımlanma olanağı vardır. Bu amaçla YSA; elektrik makinalarının, uçakların yada bileşenlerinin, entegre devrelerin v.s. arıza analizinde kullanılmıştır.

Tıp Alanında : EEG ve ECG gibi tıbbi sinyallerin analizi, kanserli hücrelerin analizi, protez tasarımı, transplantasyon zamanlarının optimizasyonu ve hastanelerde giderlerin optimizasyonu v.s gibi uygulama yeri bulmuştur.

Savunma Sanayi : Silahların otomasyonu ve hedef izleme, nesneleri/görüntüleri ayırma ve tanıma, yeni algılayıcı tasarımı ve gürültü önleme gibi alanlara uygulanmıştır.

Haberleşme : Görüntü ve veri sıkıştırma, otomatik bilgi sunma servisleri, konuşmaların gerçek zamanda çevirisi gibi alanlarda uygulama örnekleri vardır.

Üretim : Üretim sistemlerinin optimizasyonu, ürün analizi ve tasarımı, ürünlerin (entegre, kağıt, kaynak v.s.) kalite analizi ve kontrolü, planlama ve yönetim analizi alanlarına uygulanmıştır.

Otomasyon ve Kontrol : Uçaklarda otomatik pilot sistemi otomasyonu, ulaşım araçlarında otomatik yol bulma/gösterme, robot sistemlerin kontrolü, doğrusal olmayan sistem modelleme ve kontrolü, elektrikli sürücü sistemlerin kontrolü gibi yaygın bir uygulama yeri bulmuştur.

7.2.3. Yapay Sinir Ağlarında Öğrenme

YSA' nın en önemli özelliklerinden biri, ilgilendiği problemten aldığı örneklerle problemi öğrenerek öz yeteneğini düzeltebilmesidir. YSA, tanımlanan bir ölçüte göre ağıın serbest parametrelerinin ardışıl olarak uyarlanmasıyla problemi öğrenir. YSA açısından öğrenme aşağıdaki gibi tanımlanır.

Öğrenme, YSA'nın ilgilendiği ortam tarafından ağı'nın belirli bir süre uyarılmasıyla YSA'nın serbest parametrelerinin, arzu edilen öz yeteneği sağlayacak şekilde ayarlanması işlemidir ve öğrenmenin tipi, parametre değişikliklerinin yapılış şekline bağlıdır.

Bu tanıma göre öğrenme (yada eğitim) sürecinde; ağı'nın uyarılması, bu uyarının sonucu olarak ağı'nın parametrelerinin ayarlanması ve ağı'nın probleme yeni tepkisini vermesi gerekir. YSA'daki herhangi bir ağırlık ele alınırsa öğrenme, matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilir.

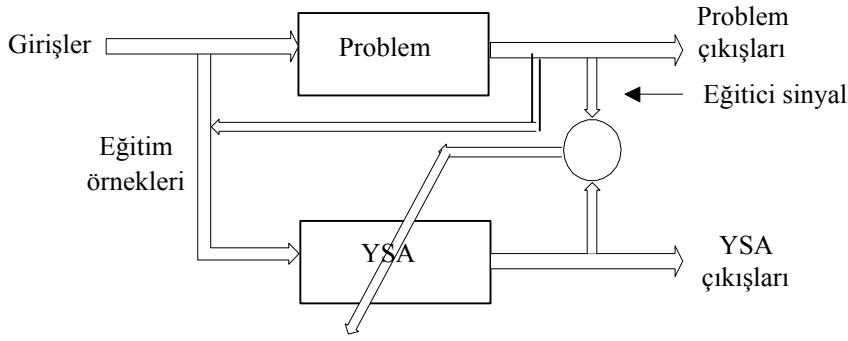
$$W_{yeni} = W_{eski} \pm \Delta W \quad (7.1)$$

Burada ΔW , belirli bir kurala göre hesaplanarak o anki ağırlıklara uygulanacak düzeltme miktarını verir ve ΔW yı belirlemek için tanımlanmış kurallara öğrenme algoritmaları yada kuralları denir. YSA'nın ilgilendiği ortam tarafından uyarılma yöntemi de öğrenmede önemli bir etkidir ve bu tanımlara göre öğrenme çeşitli sınıflara ayrılır.

7.2.3.1 Öğrenme Yöntemleri

Öğrenmenin tanımından, YSA'nın bir problemi çözebilmesi için ilgilendiği problem tarafından uyarılması gerektiği anlaşılmaktadır. YSA'nın ağırlıklarının ayarlanabilmesi için ihtiyaç duyduğu uyarı sinyallerine göre öğrenme 3 gruba ayrılır.

- **Eğiticili Öğrenme** - YSA'nın öğrenebilmesi için ağı'nın ilgilendiği ortamın (problemin) davranışlarını ihtiva eden bir eğitici sinyal kullanılır ve bu sinyal, YSA için arzu edilen tepkiyi temsil eder. Eğitici sinyalle birlikte problemde alınan ağ girişleri eğitim örneklerini oluşturur. Eğitici çıkış ile gerçek ağ çıkışı arasındaki hata sinyaline göre YSA ağırlıkları ayarlanır. Sonuçta, eğitici sinyalde bulunan ilgili problemin davranışları YSA tarafından bilinir ve eğitimsiz de aynı davranışı gösterebilir. Bu özelliği ile eğiticili öğrenme fonksiyon yaklaştırma, nesne tanıma, sistem tanılama ve uyarlamalı denetim alanlarında kullanılan YSA'ları için etkin bir öğrenme yöntemidir. Eğiticili öğrenme yöntemi, Şekil 7.9.'da verilen blok şema ile gösterilebilir.

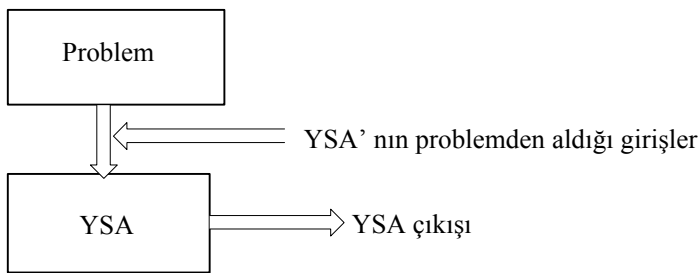


Şekil 7.9. Eğitici Öğrenme Yöntemi

• **Eğitici ÖĞrenme** - Eğitici ya da kendiliğinden düzenlemeli öğrenme yönteminde ağın öğreneceği belirgin davranış örnekleri yani eğitici bir sinyal yoktur. Ağ girişleri üzerinden gerçekleştirilmek istenen bir amaca göre YSA ağırlıkları ayarlanır. Eğitici öğrenme genellikle,

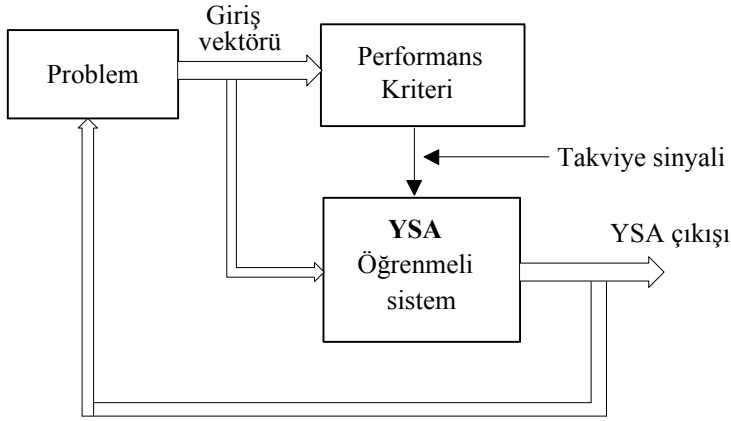
- o ağ giriş verilerini kümelemek ,
- o sürekli zaman ağ girişlerini nitelendirmek,
- o ağ giriş verilerini daha farklı boyutlu uzayda göstermek,
- o ağ giriş sinyalini temsil eden özellikleri belirlemek

gibi amaçlar için kullanılır. RTFA’ da, YSA’ nın giriş verilerini kümeleyerek en iyi taban fonksiyonu merkezlerinin belirlenmesi , bir sinyalin öz niteliklerini çıkararak sinyal, nesne ve ses tanıma gibi uygulamalarda eğitici öğrenme yöntemleri kullanılmıştır (Şekil 7.10).



Şekil 7.10. Eğitici ÖĞrenme yöntemi

• **Takviyeli ÖĞrenme** - Takviyeli öğrenme yönteminde, YSA’ nın öğrenmesi için bir eğitici sinyal bulunmaz ancak, ağın davranışının uygun olup olmadığını bildiren bir öz yetenek bilgisine göre ağırlıklar ayarlanır. Bu nedenle genellikle gerçek zamanda öğrenme yöntemidir ve deneme yanılma esasına göre YSA öğrenir (Şekil 7.11).



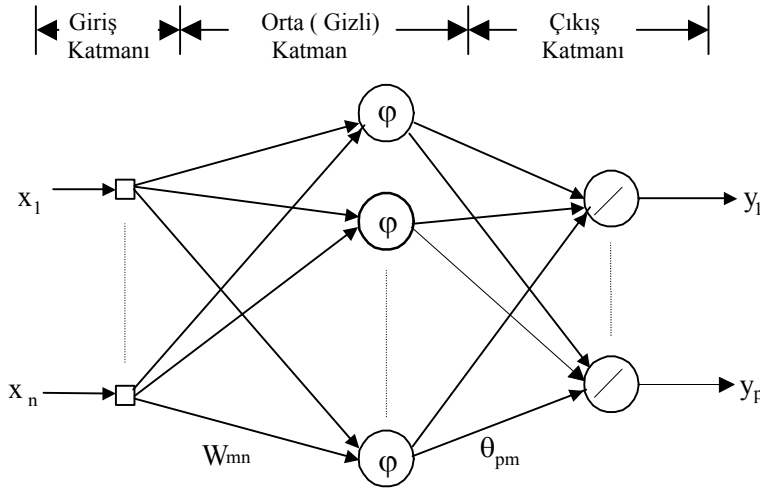
Şekil 7.11. Takviyeli öğrenme yöntemi

7.2.4 Yapay Sinir Ağı Yapıları

Yapay sinir ağları, hücrelerin birbirleri ile çeşitli şekillerde bağlanmalarından oluşur. Hücre çıkışları, ağırlıklar üzerinden *diğer hücrelere* ya da *kendisine* giriş olarak bağlanabilir ve bağlantılarda gecikme birimi de kullanılabilir. Hücrelerin bağlantı şekillerine, öğrenme kurallarına ve aktivasyon fonksiyonlarına göre çeşitli YSA yapıları geliştirilmiştir. Bu bölümde, çeşitli problemlerin çözümünde kullanılan ve kabul görmüş bazı YSA yapıları ayrıntısına girmeksizin genel özellikleri ile tanıtılacaktır.

7.2.4.1 İleri Beslemeli Yapay Sinir Ağları (İBYSA)

İleri beslemeli YSA' da, hücreler katmanlar şeklinde düzenlenir ve bir katmandaki hücrelerin çıkışları bir sonraki katmana ağırlıklar üzerinden giriş olarak verilir. Giriş katmanı, dış ortamlardan aldığı bilgileri hiçbir değişikliğe uğratmadan orta (gizli) katmandaki hücelere iletir. Bilgi, orta ve çıkış katmanında işlenerek ağ çıkışı belirlenir. Bu yapısı ile ileri beslemeli ağlar doğrusal olmayan statik bir işlevi gerçekleştirir. İleri beslemeli 3 katmanlı YSA' nın, orta katmanında yeterli sayıda hücre olmak kaydıyla, herhangi bir sürekli fonksiyonu istenilen doğrulukta yaklaştırabileceği gösterilmiştir. En çok bilinen geriye yayılım öğrenme algoritması, bu tip YSA ların eğitiminde etkin olarak kullanılmakta ve bazen bu ağlara geriye yayılım ağları da denmektedir. Şekil 7.12.'de giriş, orta ve çıkış katmanı olmak üzere 3 katmanlı ileri beslemeli YSA yapısı verilmiştir.



Şekil 7.12. İleri beslemeli 3 katmanlı YSA.

İleri beslemeli 3 katmanlı ve *çıkış katmanı doğrusal* olan YSA' nın matematiksel modeli, **x**- giriş vektörünü, **o**- orta katman çıkış vektörün ü, **y**- ağ çıkış vektörünü göstermek üzere Denklem 7.2.'deki gibi yazılabilir. x_0 ve o_0 girişleri, polarma girişleri olarak alınmıştır.

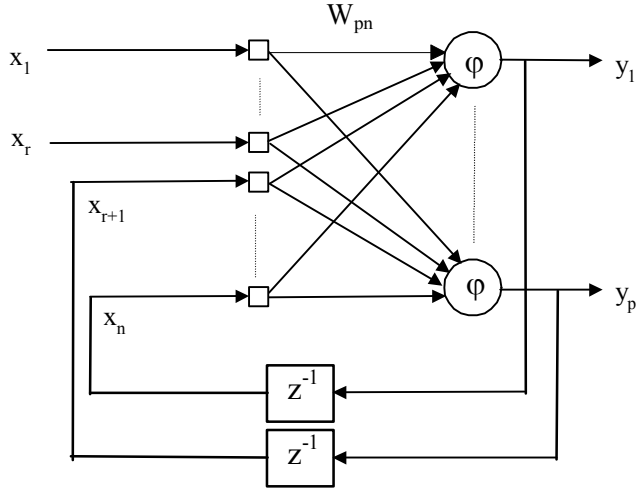
$$v_j = \sum_{i=0}^n W_{ji} \cdot x_i, \quad o_j = \phi(v_j) \quad j = 1, 2, \dots, m \quad (7.2)$$

$$y_\ell = \sum_{j=0}^m \theta_{\ell j} \cdot o_j \quad \ell = 1, 2, \dots, p$$

Herhangi bir problemi çözmek amacıyla kullanılan YSA da, katman sayısı ve orta katmandaki hücre sayısı gibi kesin belirlenememiş bilgilere rağmen nesne tanıma ve sinyal işleme gibi alanların yanı sıra ileri beslemeli YSA, sistemlerin tanınması ve denetiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

7.2.4.2 Geri Beslemeli Yapay Sinir Ağları (GBYSA)

Geri beslemeli YSA' da, en az bir hücrenin çıkışı kendisine ya da diğer hücelere giriş olarak verilir ve genellikle geri besleme bir geciktirme elemanı üzerinden yapılır. Geri besleme, bir katmandaki hücreler arasında olduğu gibi katmanlar arasındaki hücreler arasında da olabilir. Bu yapısı ile geri beslemeli YSA , doğrusal olmayan dinamik bir davranış gösterir. Dolayısıyla, geri beslemenin yapılış şekline göre farklı yapıda ve davranışta geri beslemeli YSA yapıları elde edilebilir. Bu nedenle, bu bölümde bazı geri beslemeli YSA yapılarında örnekler verilecektir. Şekil 7.13.'de iki katmanlı ve çıkışlarından giriş katmanına geri beslemeli bir YSA yapısı görülmektedir.



Şekil 7.13. Geri Beslemeli İki Katmanlı YSA.

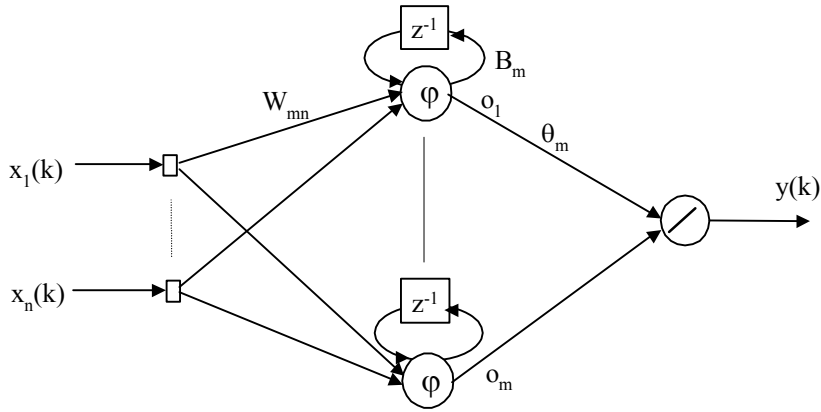
Şekil 7.13.'de verilen geri beslemeli YSA da giriş vektörü, r adet dış giriş ve p adet gecikmiş ağ çıkışlarından oluşmaktadır. Buna göre YSA' nın giriş vektörü aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$x = (x_1, x_2, \dots, x_r, y_1(-1), y_2(-1), \dots, y_p(-1)) \quad (7.3)$$

Denklem 7.3. ile tanımlanan toplam $n = r + p$ adet ağ girişine göre YSA' nın çıkışları Denklem 7.4.'deki gibi yazılabilir.

$$y_j = \phi\left(\sum_{i=0}^n W_{ji} \cdot x_i\right) \quad j=0,1,2,\dots,p \quad (7.4)$$

Geri beslemeli YSA'ları; hücreler arası yada katmanlar arası geri besleme yapılış şekline göre farklı isimlerle söylenir. Genellikle derecesi bilinmeyen dinamik sistemlerin tanımlanmasında kullanılan diğer bir YSA yapısı, gizli katman hücrelerinde öz geri beslemenin kullanıldığı ve yöresel geri-küresel ileri beslemeli (YGKİ) olarak söylenen Şekil 7.14.'de verilen YSA' dır.



Şekil 7.14. YGKI Yapay Sinir Ağı .

YGKİ ağılar, ileri beslemeli YSA' nın eğitim algoritmalarında gerçekleştirilen küçük değişikliklerle eğitilebilmeleri nedeniyle ileri ve geri beslemeli YSA' nın ortak özelliklerini taşımaktadır. Şekil 7.14.'e göre YGKİ YSA' nın matematiksel ifadesi aşağıdaki gibi yazılabilir.

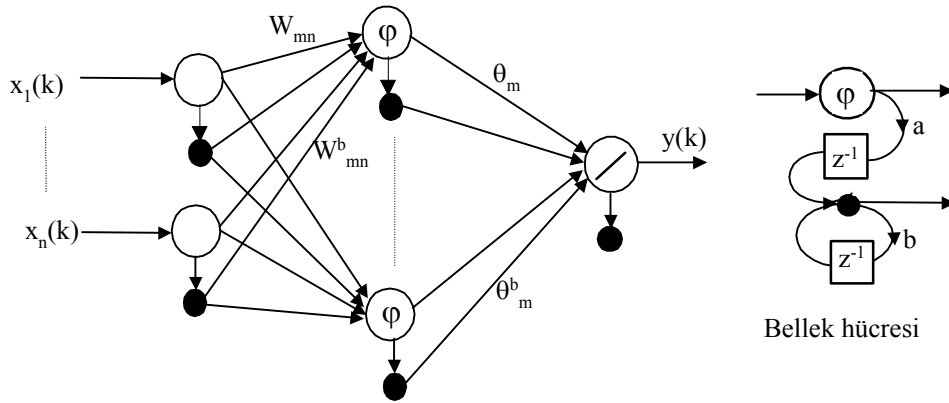
$$v_j(k) = \sum_{i=0}^n W_{ji} . x_i(k) + B_j . o_j(k-1) \quad , \quad o_j(k) = \phi(v_j(k)) \quad (7.5)$$

$$y(k) = \sum_{j=0}^m \theta_j . o_j(k) \quad (7.6)$$

Özellikle bozucu ve ölçülemeyen girişleri olan dinamik sistemleri modellemek amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

7.2.4.3 Bellek Hücreli YSA Yapıları (BHYSA)

Doğrusal olmayan sistemlerin tanılanması ve denetiminde, katmanlı YSA yapıları etkin olarak kullanılmaktadır. YSA ile sistem tanılamada, doğru model yapısının seçilebilmesi ve model girişlerinin belirlenebilmesi için sistemin giriş ve çıkışının gecikme derecelerinin bilinmesi gerekir. Sistemin derecesinin doğru belirlenememesi, modelde temsil edilemeyen dinamikler nedeniyle kararlı ve değişen dinamik şartlarda doğru bir model elde edilmesini etkiler. Bu nedenle, geri beslemeli YSA yapıları kullanılarak sistemin derecesine ihtiyaç duymayan tanı modelleri geliştirilmiştir. Şekil7.15.'de Bellek Hücreli Yapay Sinir Ağları (BHYSA) olarak söylenen ve ağdaki her bir hücre için bir bellek hücresinin kullanıldığı katmanlı-geri beslemeli bir ağ yapısı verilmiştir.



Şekil 7.15. Bellek hücreli yapay sinir ağı ve bellekli bir hücrenin yapısı.

BHYSA’ da her bir ağı hücrelerine ait olan bellek hücresi, bir ağırlık (b_j) üzerinden öz geri besleme girişine ve başka bir ağırlık üzerinden (a_j) ait olduğu hücrenin gecikmiş girişine göre bir çıkış üretir. Çıkış katmanında ise genellikle sadece öz geri besleme kullanılır. Buna göre BHYSA’ nın matematiksel ifadesi aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$x_i^b(k) = w_j^a \cdot x_i(k-1) + w_j^b \cdot x_i^b(k-1) \quad (7.7)$$

$$v_j(k) = \sum_{i=1}^n \{W_{ji} \cdot x_i(k) + W_{ji}^b \cdot x_i^b(k)\} \quad (7.8)$$

$$o_j(k) = \varphi\{v_j(k)\} \quad (7.9)$$

$$o_j^b(k) = \theta_j^a \cdot o_j(k-1) + \theta_j^b \cdot o_j^b(k-1) \quad (7.10)$$

$$y(k) = \sum_{j=1}^m \{\theta_j^c \cdot o_j(k) + \theta_j^b \cdot o_j^b(k)\} + \theta^c \cdot y(k-1) \quad (7.11)$$

BHYSA’ nın doğrusal olmayan bir sistemi modelleme ve denetim yeteneği, sadece sistemin o an ki giriş ve bir önceki çıkış verileri model girişi alınarak incelenmiş ve tatmin edici sonuçlar alındığı gösterilmiştir. İleri beslemeli katmanlı YSA’ nın sadece gizli katmanında bellek hücreleri kullanılarak bellek hücresinin, ait olduğu hücre çıkışının geçmişteki örneklerini giriş olarak aldığı ve zaman gecikmeli YSA olarak söylenen geri beslemeli ağı yapıları da incelenmiştir.

7.3. Genetik Algoritma ve YSA Kullanılarak Biyoprosesin Modellenmesi

Biyoproseslerde, üreme ve ürün oluşumu hücre içinde cereyan eden binlerce biyokimyasal reaksiyon sonucu meydana gelen karmaşık bir olaydır. Mikrobiyal üreme ve ürün oluşumu, hücrenin içinde bulunduğu fiziksel ve kimyasal ortama gösterdiği tepkidir. Dolayısıyla üreme ve ürün oluşumunu anlamak için organizmanın içinde bulunduğu ortam ile metabolizması arasındaki ilişkiyi anlamak gerekir. Bu amaçla literatürde, biyoproseslerde mikrobiyal üreme, ürün oluşumu ve substrat tüketimini tanımlamak için kullanılan çok sayıda kinetik model mevcuttur. Mikrobiyal prosesleri ifade eden kinetik modeller genel olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$\frac{dx}{dt} = f_x(x, S, P) \quad (7.12.)$$

$$\frac{dP}{dt} = f_p(x, S, P) \quad (7.13.)$$

$$\frac{dS}{dt} = f_s(x, S, P) \quad (7.14.)$$

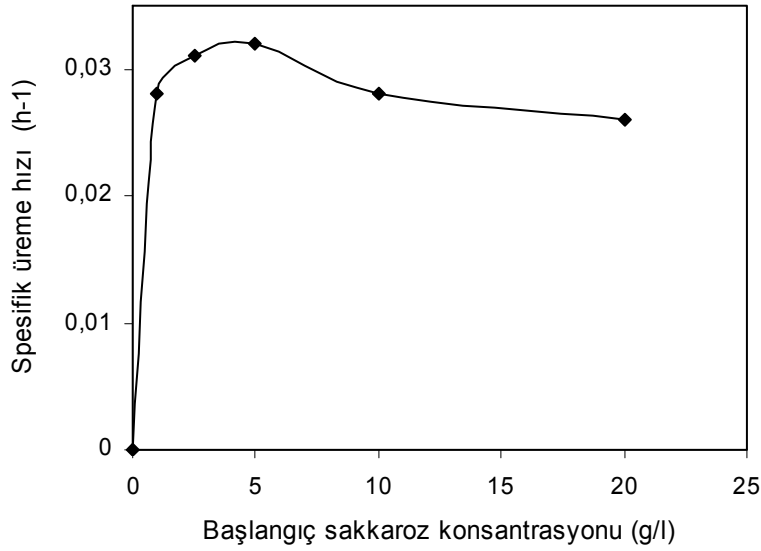
Mikrobiyal üreme, ürün oluşum ve substrat tüketim hızları, biomass (x), ürün (P) ve substrat (S) ile ilişkili olarak değişir. Mikrobiyal proseslerde üreme hızı mikroorganizma konsantrasyonu ile orantılı olarak artar.

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.7)$$

Denklem 4.7. 'nin integrasyonu aşağıdaki bağıntıyı verir:

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (4.8)$$

t 'ye karşı $\ln x$ 'in grafiğe geçirilmesi ile spesifik üreme hızı (μ) bulunur. Logaritmik fazda, spesifik üreme hızı sabit ve maksimum değerdedir. Yani, $\mu = \mu_{\max}$ 'dır. Deneysel olarak elde edilen verilerin logaritmik faza ait olan kısmından yararlanılarak, her bir başlangıç substrat derişimine ait hesaplanan μ değerlerinin değişimi Şekil 7.16.'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi başlangıç substrat konsantrasyonun artması ile spesifik üreme hızı



Şekil 7.16. Spesifik üreme hızının başlangıç substrat konsantrasyonu ile değişimi

5 g/l sakkaroz konsantrasyonuna kadar artmış, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda ise spesifik üreme hızı düşüş göstermiştir. Bu durum substrat inhibisyon etkisi ile açıklanabilir. *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzim üretimi üzerine sakkaroz konsantrasyonu etkisinin incelendiği biyoproses ortamında elde edilen deney sonuçlarına göre çizilen grafiklerde de yüksek substrat konsantrasyonunun inhibisyon etkisi yaptığı görülmüştü. Hücrelerin değişen substrat derişimine karşı davranışının değişmesi doğal bir olaydır. Hücrelerin spesifik üreme hızı (μ) termodinamik su aktivitesinden etkilenir. Besiyerinin fizikokimyasal özelliklerindeki değişimler (osmotik basınç, iyon gücü, dielektrik sabiti gibi) hücre zarının geçirgenliğini etkileyebilir (Türker, 2005).

Biyoteknolojik çalışmalarda, biyoproseslerin modellenmesi, proses hakkında fikir edinmek ve tanımlamak için önemlidir. Biyolojik proseslerin tasarımında kullanılan kinetik modeller, yapısal olan (structured) ve yapısal olmayan (unstructured) olmak üzere iki farklı mekanizma ile ifade edilir. Yapısal olmayan modellerde hücre sabit kimyasal bileşime sahip reaksiyona giren tek tür olarak kabul edilir. Yapısal olmayan modeller biyolojik proseslerin anlaşılmasında ve gelişmesinde temel oluşturmaktadır. Ancak bazı durumlarda hücre içerisinde meydana gelen reaksiyonların daha ayrıntılı olarak ele alınması gerekebilir. Bu durumda da yapısal olan modellere başvurulur. Yapısal modeller ise organizmayı birden fazla değişkenle tanımlayan ve organizmanın fizyolojik durumunu dikkate alan

modellerdir (Harder ve Roels, 1982; Sinclair,1987). Hücrenin DNA, RNA, protein ve karbonhidrat gibi önemli bileşenlerini göz önüne alır. Ancak modele çok sayıda parametre sokmak ve bu parametreleri ölçmek için çok kritik deneyler yapmak gerektirmektedir. Bu durum yapısal olan modeller için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Kesikli sistemde, modelde mevcut olan kinetik parametrelerin hesaplanması için uygulanan yöntemlerden biri, deneysel verilerin “doğruya uydurulması” dır (fit). Bu yöntem modelin doğruya uydurulması sonucu grafik çizilerek uygulanır ve kinetik parametreler doğrunun eğim ve kaymasından yararlanılarak bulunur. Diğer yöntem ise deneysel verilerin “eğriye uydurulması” dır (curve fitting). Bu yöntem bilgisayar yardımıyla uygun programlar kullanılarak yapılır ve sistemi tanımlayan model ve kinetik parametreler daha hassas olarak belirlenir.

T. turnirae 'den serin alkali proteaz üretiminin gerçekleştirildiği bu çalışmada biyoproses ortamını tanımlamak amacıyla literatürde mevcut olan çeşitli modellerin uygunluğu denenmiştir. Bu amaçla, daha önce çeşitli sakkaroz konsantrasyonlarında PB besisi ortamında küme halindeki hücrelerle kesikli sistem kullanılarak gerçekleştirilen deney sonuçları kullanılmış ve modellerle uyumuna bakılmıştır. Test edilen modeller Tablo 7.3.' de verilmiştir. Bunlar içerisinde, Monod, Moser ve Tessier modelleri (1-3) tek substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade ederken, Andrews-Noack, Aiba ve Loung modelleri (4-6) substrat inhibisyon kinetiğini, Levenspiel, Aiba, Jerusalimsky, Ghose-Tyagi ve Hinshelwood modelleri (7-11) ise ürün inhibisyon kinetiğini ifade etmektedir.

Tablo 7.3' de verilen denklemler içerisinde, Monod en yaygın olarak kullanılan yapısal olmayan (unstructured) kinetik modellerden biridir. Mikrobiyal üreme ve ürün oluşumu substrat konsantrasyonu tarafından kontrol edilmektedir. Moser ve Tessier modelleri, Monod modeline alternatif olarak verilmiştir ve yine substrat sınırlaması hakimdir. Moser modelinde $n=1$ olduğu zaman Monod denkleminde indirgenir. Tessier modeli, substrat difüzyon kontrollü üremeyi modellemek için önerilmiştir. Üreme hızı üzerine yüksek substrat derişimlerinin etkisini nicel olarak ifade etmek üzere geliştirilen modeller içerisinde en yaygın olarak kullanılanlardan Andrews-Noack, Aiba ve Loung modelleri substrat inhibisyon kinetiğini ifade etmektedir. Bazı biyoproseslerde ürün inhibisyonu önemli bir rol oynadığından, test edilen modeller arasında, Levenspiel, Aiba, Jerusalimsky, Ghose-Tyagi ve Hinshelwood tarafından ürün inhibisyon kinetiği için önerilen modeller de yer almaktadır.

Tablo 7.3. Biyoproses ortamını tanımlamak amacıyla uygunluğu test edilen modeller

Model No	Model	dx/dt	dP/dt	dS/dt
1	Monod	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
2	Moser	$\mu_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{sx} + S^n} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{sp} + S^n} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
3	Tessier	$\mu_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{sx}} \right) \right) x$	$q_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{sp}} \right) \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
4	Andrews-Noack	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{sx}}{S} + \frac{S}{K_{is}}} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{sp}}{S} + \frac{S}{K_{ip}}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
5	Aiba	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{is}} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{ip}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$

6	Luong	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{s \max}} \right)^n x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(1 - \frac{S}{S_{p \max}} \right)^n x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
7	Levenspiel	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{s \max}} \right)^n x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{p \max}} \right)^n x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
8	Aiba	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp(-K_{px} P) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \exp(-K_{pp} P) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
9	Jerusalimsky	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(\frac{K_{ip}}{K_{ip} + P} \right) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(\frac{K_{ipp}}{K_{ipp} + P} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
10	Ghose-Tyagi	$\mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{x \max}} \right) x$	$q_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{p \max}} \right) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$
11	Hinshelwood	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) (1 - K_{px} P) x$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) (1 - K_{pp} P) x$	$-\left(\frac{1}{Y_{s/x}} \frac{dx}{dt} \right) - mx$

Kullanılan modeller, 4. dereceden Runge-Kutta metodu kullanılarak sayısal çözüm tekniği ile çözülmüştür. Nümerik hesaplamalar MATLAB 7.04 versiyonuna sahip paket programı kullanılarak yapılmıştır. Model içerisindeki kinetik parametreler, MATLAB'ın Genetik Algoritma Toolbox'ından yararlanılarak belirlenmiştir. Model eşitliklerinin Runge-Kutta metodu ile sayısal çözümü, ve modellere ait kinetik parametrelerin belirlenmesi için optimizasyon işlemi, programda eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir. Genetik algoritma ile optimizasyon işlemi için amaç fonksiyonu olarak en küçük kareler metodu kullanılmıştır. En küçük kareler metodu, deneysel ve model değerleri arasındaki hatanın karelerinin toplamının ortalamasını ifade etmektedir. Biyoproseslerde, deneysel bulgular çok hassas değilse ve sınırlı sayıda veri varsa modeller arasındaki farkı görmek zordur (Türker 2005). Biyoproses ortamını tanımlayan en uygun modeli belirlemek için, birinci kriter olarak, deneysel sonuçlarla modelin uygulanması sonucunda elde edilen sonuçların birbiriyle uyumuna grafiksel olarak bakılmış ve istatistiksel testler kullanılarak bu uyum sayısal olarak ifade edilmiştir. İkinci kriter olarak ise modelde yer alan kinetik parametrelerin, nümerik çözümde elde edilen değerlerinin büyüklükleri dikkate alınmıştır.

T. turnirae 'den serin alkali proteaz üretimini incelediğimiz biyoproses ortamını tanımlamak, literatürde mevcut olan kinetik modellere uygunluğunu belirlemek amacıyla, PB besisi ortamında 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında kesikli sistemde elde edilen deney sonuçları kullanılmıştır. Bu sonuçlardan yararlanılarak, Genetik Algoritma ile yapılan optimizasyon sonucu kinetik parametrelerin değerleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 7.4.'de verilmiştir. Literatürde yapılan modelleme çalışmalarının bir çoğunda, her bir substrat konsantrasyonu için sistem ayrı ayrı modellenmiştir. Yapılan bu çalışmada da, her bir substrat konsantrasyonu için kullanılan modeller çok daha iyi uyum sağlamasına rağmen, sistemi tüm sakkaroz konsantrasyonları için tanımlayan tek bir model belirlenmeye çalışılmıştır.

1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonları ile oluşturulan fermantasyon ortamlarından deneysel olarak elde edilen biomass (x), ürün (P) ve substrat (S) değerleri kullanılarak, MATLAB 7.04 Genetik Algoritma Toolbox'ı ile Tablo 7.3.'de verilen modellerde yer alan katsayılar belirlenmiştir. Aynı sakkaroz konsantrasyonlarında elde edilen deneysel sonuçlar, katsayıları belirlenerek tanımlanmış 11 modelde test edilmiştir. Deneysel sonuçlarla modellerden elde edilen bu sonuçlar arasındaki uyum, modelleme yeteneği (EF), hata karelerinin ortalama karekökü (RMSE) ve Khi-kare(χ^2) gibi istatistiksel testler kullanılarak ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 7.5.'de verilmiştir. Sistemin davranışını en iyi tanımlayan modelin seçilmesi hedeflenmiştir. En uygun modeli seçerken her başlangıç konsantrasyonu için, biomass (x), ürün (P) ve substrat (S) değerlerinin üçü için de en yüksek EF, en düşük RMSE ve χ^2 değerine sahip olan model tercih edilmiştir.

Tablo 7.4. MATLAB 7.04 Genetik Algoritma Toolbox'ı ile hesaplanmış, modellere ait kinetik parametrelerin değerleri .

Model	Kinetik parametreler									
Monod	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)		K_{sp} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.034	0.116		12.761		0.0012		0.631		0.0010
Moser	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	n		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	n		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.0646	1.242	0.2224		15.082	0.0021	0.0205		0.631	0.0002
Tessier	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)		K_{sp} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.0301	0.1638		29.076		0.3562		0.4940		0.0011
Andrews and Noack	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	K_{is} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	K_{ip} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.079	2.959	0.41		10.86	1.508	4.247		0.0448	0.0243
Aiba	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	K_{is} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	K_{ip} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.1750	2.514	2.508		13.072	0.0001	7.956		0.3763	0.0366
Luong	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	S_{smax} (g lt ⁻¹)	n	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	S_{pmax} (g lt ⁻¹)	n	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.0303	0.6084	0.916	0.3182	0.4633	0.9060	0.5268	1.6658	0.1985	0.0989
Levenspiel	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	P_{smax} (g lt ⁻¹)	n	q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	P_{pmax} (g lt ⁻¹)	n	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.054	0.629	1.788	0.03	7.85	0.041	0.299	0.165	1.532	0.083
Aiba	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	K_{ps} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	K_{pp} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.069	0.052	0.0017		33.02	0.148	0.0001		1.541	0.0076
Jerusalimsky	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	K_{ip} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	K_{ipp} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.336	0.0003	22.31		54.79	0.0010	48.43		2.7	0.016
Ghose and Tyagi	μ_{max} (h ⁻¹)	P_{xmax} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)		P_{pmax} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)		m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.0002	46.87		0.0001		52.75		26.22		0.026
Hinshelwood	μ_{max} (h ⁻¹)	K_{sx} (g lt ⁻¹)	K_{px} (g lt ⁻¹)		q_{pmax} (U g hücre ⁻¹ h ⁻¹)	K_{sp} (g lt ⁻¹)	K_{pp} (g lt ⁻¹)		$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	m (g g hücre ⁻¹ h ⁻¹)
	0.606	10.18	0.0001		21.09	0.0010	0.0011		1.91	0.0117

Yapılan çalışmada, sistem bir bütün olarak değerlendirilmiş, *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzim üretiminin gerçekleştiği biyoproses ortamını tanımlayan tek bir modelin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ancak Tablo 7.5.'den de görüldüğü gibi, tüm konsantrasyon aralıklarında sistem tek bir modelle ifade edilememiştir. Yine aynı tablodan görüldüğü gibi, 1, 2.5 ve 5 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında en yüksek modelleme yeteneği (EF), en düşük RMSE ve Khi-kare(χ^2) değerleri Tessier modelinde belirlenmiştir. Benzer şekilde 10 ve 20 g/l gibi daha yüksek sakkaroz konsantrasyonları için en yüksek modelleme yeteneği (EF), en düşük RMSE ve Khi-kare(χ^2) değerleri Andrews-Noack modelinde belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre test edilen modeller içerisinde; 1-5 g/l sakkaroz konsantrasyonu aralığında sistemi en iyi tanımlayan modelin Tessier modeli olduğu, 10-20 g/l sakkaroz konsantrasyonu aralığında ise Andrews-Noack modeli olduğu görülmüştür. Tessier modeli, substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden modeller içerisinde yer alırken, Andrews-Noack modeli, substrat inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden modeller içerisinde yer almaktadır. *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz üretiminde, yüksek substrat konsantrasyonunun inhibisyon etkisi yarattığı daha önce yapılan çalışmalarda da belirlenmişti. 1, 2.5 ve 5 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesinin de arttığı, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda ise enzim aktivitesinin daha düşük olduğu görülmüştü. Bu durum test edilen modellerden elde edilen sonuçlarla da paralellik göstermektedir. Yani 1, 2.5 ve 5 g/l sakkaroz konsantrasyonlarındaki biyoproses ortamı substrat limitasyonu ve inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden Tessier modeli ile tanımlanırken, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonundaki ortam substrat inhibisyonlu üreme kinetiğini ifade eden Andrews-Noack modeli ile tanımlanmaktadır.

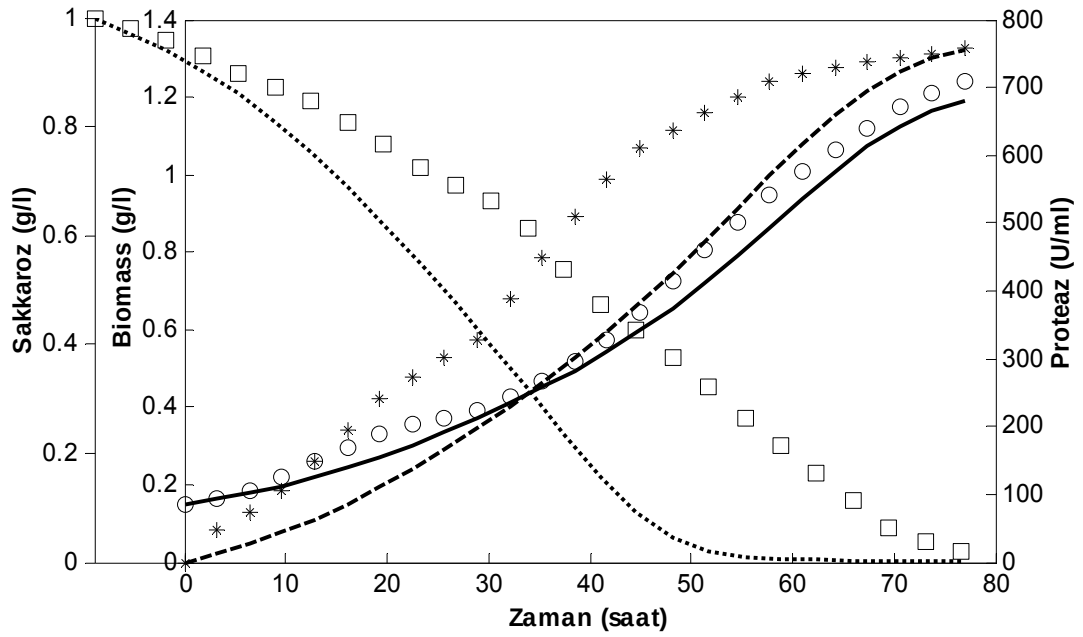
Test edilen modeller içerisinde ürün inhibisyonunu ifade eden modellerin hiçbiri sistemi tanımlamamıştır. Bu durum da, üretilen enzimin proses üzerinde inhibisyon etkisi yapmadığını göstermektedir.

1, 2.5 ve 5 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında elde edilen deneysel biomass (x), ürün (P) ve substrat (S) değerleri ile bu şartlarda sistemi en iyi tanımlayan model olarak seçilen Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimleri karşılaştırmalı olarak Şekil 7.17 ile 7.19. arasında verilirken, 10 ve 20 g/l derişimlerinde elde edilen deneysel sonuçlar ile Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçlar Şekil 7.20 ile 7.21.'de verilmiştir. Tablo 7.5. ışığında, ilgili şekiller incelendiğinde modelleme yeteneği (EF) değeri 1'e ne kadar yakınsa, deneysel değerler ile model değerleri o kadar uyum içerisindedir.

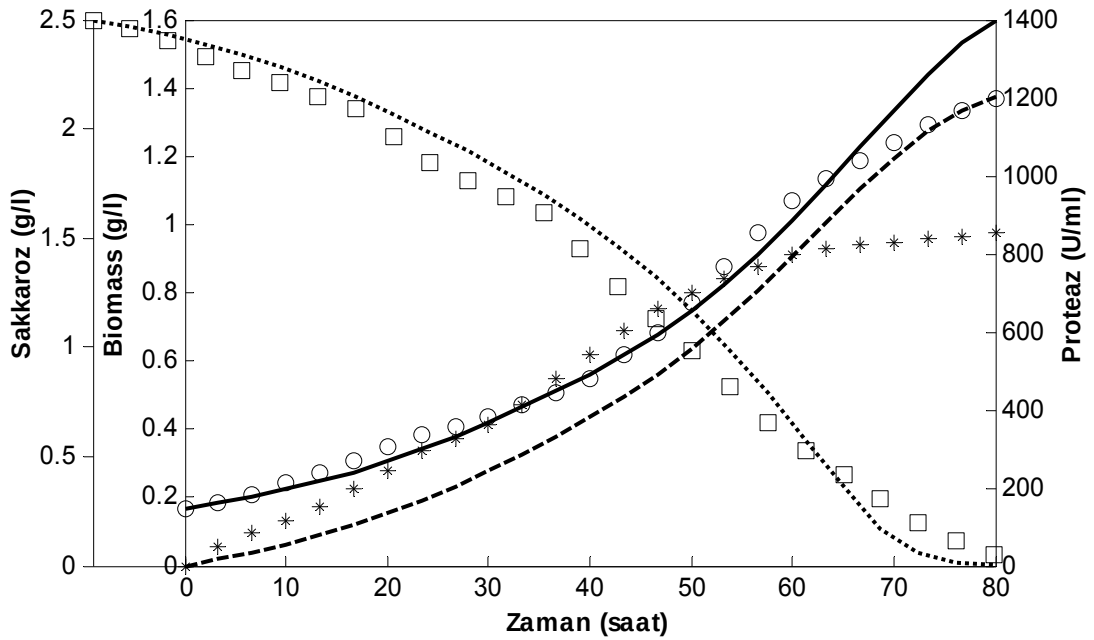
Tablo 7.5. İstatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar.

Model	Sakkaroz konsantrasyonu (g/l)	EF			RMSE			Khi-kare (χ^2)		
		EF _x	EF _p	EF _s	RMSE _x	RMSE _p	RMSE _s	χ^2_x	χ^2_p	χ^2_s
Monod	1	0.9354	0.4821	0.8330	0.00501	0.08615	0.00718	0.00668	0.09723	0.01226
	2.5	0.9812	0.5612	0.9201	0.00427	0.06108	0.00521	0.00302	0.07215	0.00693
	5	0.9724	0.5834	0.5012	0.00451	0.06010	0.06431	0.00335	0.07027	0.09261
	10	0.9012	0.5523	0.6013	0.00588	0.06179	0.03794	0.00672	0.08237	0.01576
	20	0.8961	0.5037	0.6314	0.00593	0.06331	0.03733	0.00703	0.09238	0.01514
Moser	1	0.9619	0.3999	0.2741	0.00572	0.09596	0.11231	0.00346	0.09996	0.25931
	2.5	0.9680	0.1747	0.8162	0.00545	0.11424	0.00753	0.00338	0.26456	0.00814
	5	0.9462	0.2654	0.4927	0.00578	0.11284	0.06451	0.00583	0.25983	0.09259
	10	0.8360	0.2805	0.6023	0.00722	0.11201	0.03786	0.00757	0.25734	0.01639
	20	0.7667	0.5478	0.6131	0.01802	0.06347	0.03655	0.01545	0.01248	0.01578
Tessier	1	0.9810	0.7277	0.6360	0.00435	0.03011	0.03720	0.00312	0.01231	0.01672
	2.5	0.9650	0.7123	0.9810	0.00561	0.04901	0.00435	0.00612	0.01345	0.00312
	5	0.9657	0.9057	0.8681	0.00555	0.00591	0.00624	0.00594	0.00712	0.00754
	10	0.9485	0.4860	0.2360	0.00588	0.08623	0.12033	0.00656	0.09712	0.24815
	20	0.9604	0.5088	0.1524	0.00561	0.06532	0.13443	0.00623	0.09234	0.26671
Andrews and Noack	1	0.7647	0.5032	0.5674	0.01345	0.06642	0.05893	0.01581	0.09586	0.08631
	2.5	0.4224	0.5107	0.1907	0.09483	0.06314	0.14593	0.09942	0.00911	0.26341
	5	0.8599	0.5520	0.2354	0.00713	0.06031	0.13451	0.00761	0.01237	0.24138
	10	0.9913	0.8289	0.6173	0.00376	0.00741	0.03861	0.00426	0.00794	0.01567
	20	0.9821	0.7655	0.9598	0.00421	0.00946	0.00624	0.00302	0.01423	0.00573
Aiba	1	0.8827	0.3191	0.5012	0.00587	0.11074	0.06431	0.00725	0.21247	0.09261
	2.5	0.9523	0.4031	0.5335	0.00631	0.09580	0.06431	0.00588	0.09982	0.26738
	5	0.9290	0.7023	0.8569	0.00687	0.00991	0.00622	0.00612	0.01676	0.00773
	10	0.3079	0.3982	0.1505	0.10356	0.11017	0.11423	0.23472	0.22761	0.28134
	20	0.5810	0.1324	0.6161	0.06011	0.11891	0.03825	0.01116	0.31453	0.01572

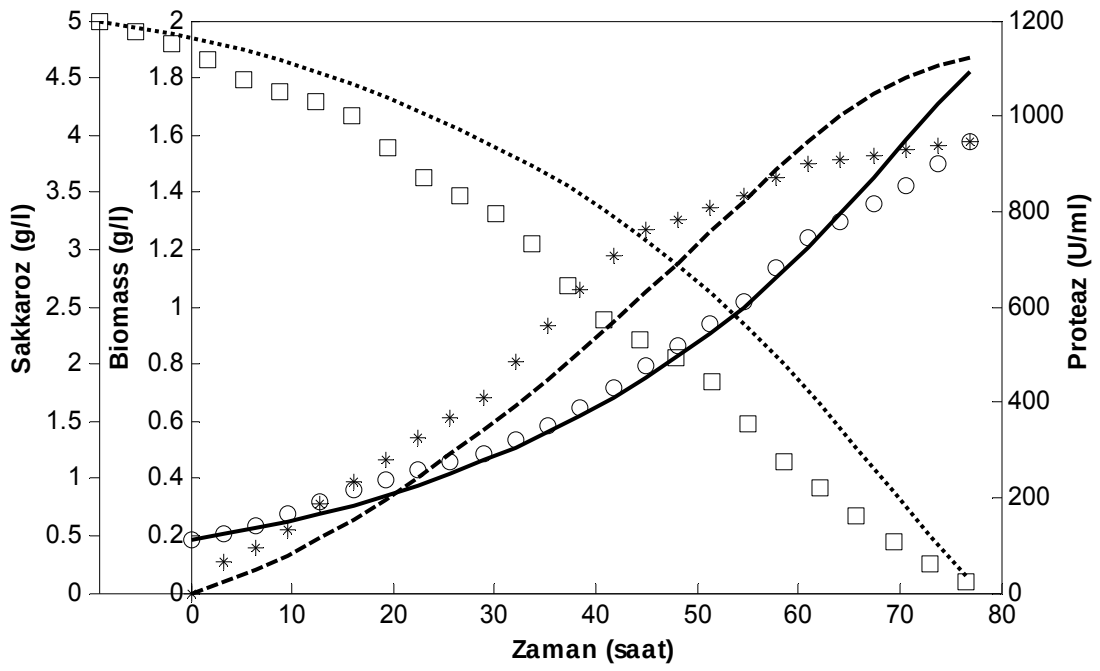
Luong	1	0.3980	0.1374	0.5851	0.09605	0.14768	0.05943	0.10578	0.31441	0.01102
	2.5	0.5246	0.1562	0.2354	0.06134	0.14312	0.12241	0.09018	0.26041	0.24138
	5	0.4680	0.2315	0.1524	0.09170	0.13443	0.14400	0.09042	0.24141	0.26671
	10	0.3569	0.2456	0.2036	0.09864	0.12942	0.13593	0.12305	0.21021	0.25346
	20	0.3658	0.2045	0.2315	0.09573	0.13356	0.13443	0.12048	0.25321	0.24141
Levenspiel	1	0.5612	0.2654	0.4023	0.06010	0.11284	0.06516	0.07215	0.25983	0.09987
	2.5	0.6173	0.2360	0.2805	0.03861	0.12033	0.11201	0.01567	0.24815	0.25734
	5	0.5520	0.3126	0.4031	0.06031	0.11286	0.06431	0.01237	0.21355	0.09982
	10	0.5983	0.3460	0.3459	0.05941	0.10345	0.10354	0.01103	0.12405	0.12427
	20	0.5335	0.4269	0.4216	0.06431	0.09025	0.09046	0.26738	0.09014	0.09137
Aiba	1	0.4322	0.3126	0.2456	0.08286	0.11286	0.12942	0.10355	0.21355	0.21021
	2.5	0.3569	0.1562	0.3014	0.09864	0.14312	0.12745	0.12305	0.26041	0.22452
	5	0.4259	0.2369	0.3112	0.08104	0.11187	0.11294	0.09974	0.24807	0.21388
	10	0.3689	0.1524	0.2045	0.09428	0.14400	0.13356	0.12041	0.26671	0.25321
	20	0.3698	0.2036	0.2805	0.09271	0.13593	0.11001	0.11756	0.25346	0.25734
Jerusalimsky	1	0.3191	0.4821	0.2169	0.11074	0.08615	0.12124	0.21247	0.09020	0.24723
	2.5	0.2690	0.3169	0.4561	0.11203	0.01114	0.07284	0.21304	0.21010	0.10145
	5	0.3691	0.2456	0.3126	0.09282	0.12942	0.11286	0.11763	0.21021	0.21355
	10	0.4026	0.3561	0.2459	0.06445	0.09879	0.12930	0.09991	0.11978	0.21010
	20	0.3480	0.1324	0.2047	0.10828	0.11891	0.13478	0.12354	0.31453	0.25149
Ghose and Tyagi	1	0.4018	0.3569	0.3378	0.09886	0.09860	0.11228	0.10471	0.11966	0.12361
	2.5	0.4569	0.3079	0.3112	0.07279	0.10356	0.11294	0.10140	0.23472	0.21388
	5	0.4680	0.2045	0.2136	0.09170	0.13356	0.12163	0.09042	0.25321	0.24781
	10	0.3698	0.1524	0.2456	0.09276	0.14400	0.12942	0.11752	0.26671	0.21021
	20	0.4023	0.2315	0.3459	0.09816	0.13443	0.10354	0.10453	0.24141	0.12427
Hinshelwood	1	0.4354	0.3598	0.2459	0.08014	0.12110	0.12934	0.10125	0.12014	0.21430
	2.5	0.3589	0.3156	0.2456	0.12164	0.12808	0.12942	0.12287	0.21033	0.21453
	5	0.4322	0.4259	0.3478	0.08286	0.08104	0.12831	0.10355	0.09974	0.12649
	10	0.3777	0.5335	0.2036	0.11033	0.06431	0.13593	0.11895	0.26738	0.25346
	20	0.3349	0.2345	0.4426	0.12282	0.13408	0.08976	0.11943	0.24016	0.11761



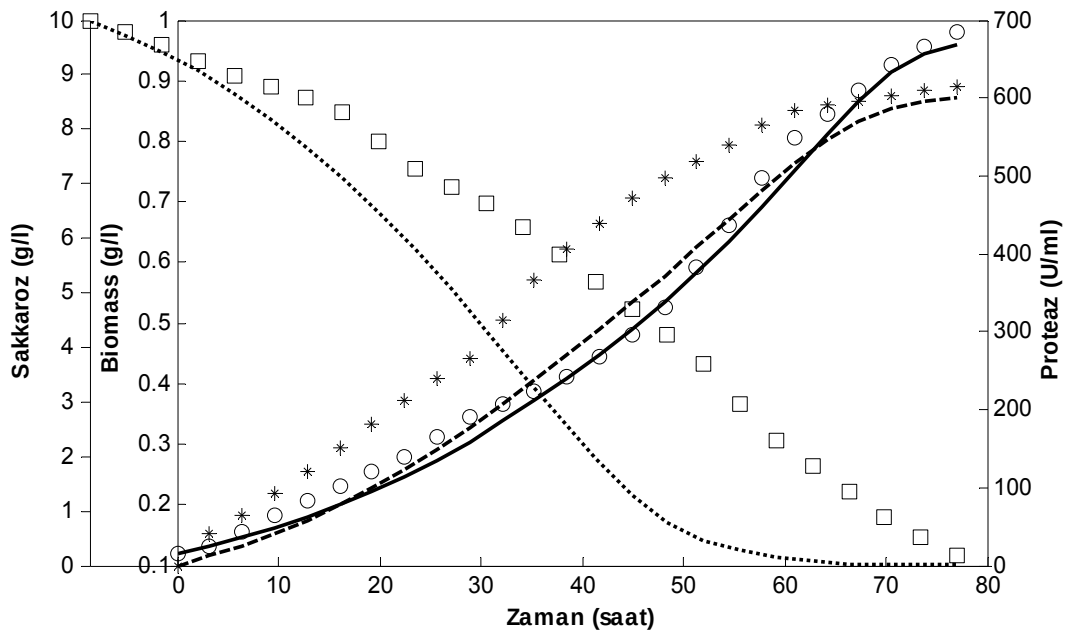
Şekil 7.17. 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH:8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



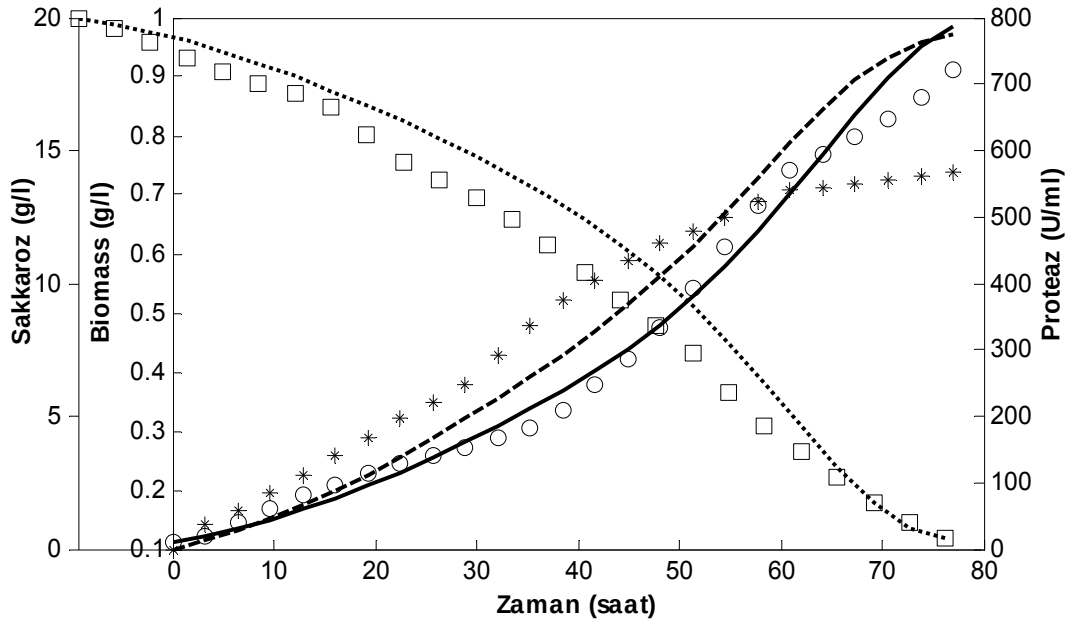
Şekil 7.18. 2.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH:8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



Şekil 7.19. 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Tessier modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH:8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



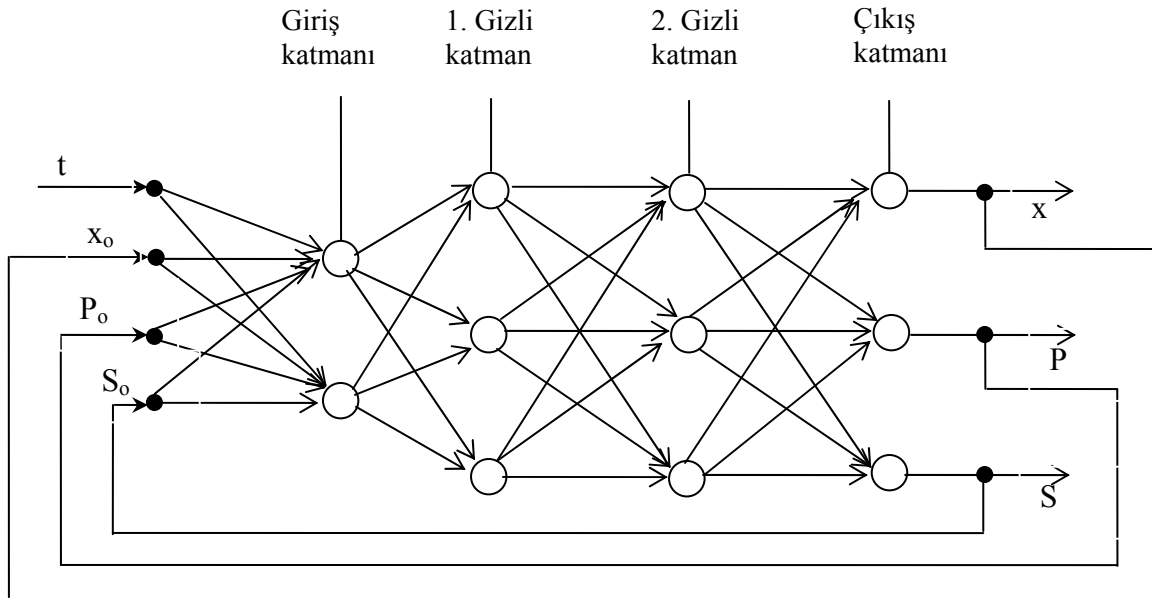
Şekil 7.20. 10 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



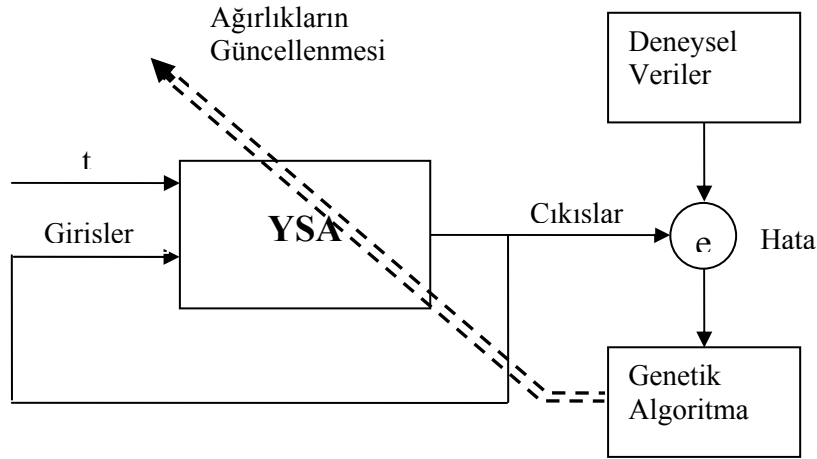
Şekil 7.21. 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla Andrews-Noack modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})

Buraya kadar yapılan modelleme çalışmasında, *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz üretiminde, 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l gibi farklı sakkaroz konsantrasyonlarında oluşturulan biyoproses ortamının, literatürde mevcut 11 modele uygulanması sonucu sistemi tanımlayan modelin belirlenmesi amaçlanmıştır. Model içerisindeki optimum kinetik katsayılar MATLAB 7.04 paket programı içerisindeki Genetik Algoritma Toolbox'ı kullanılarak belirlenmiştir. 1, 2.5 ve 5 g/l gibi düşük sakkaroz konsantrasyonunda sistem davranışını en iyi tanımlayan modelin Tessier, 10 ve 20 g/l gibi yüksek sakkaroz konsantrasyonunda ise Andrews-Noack modelinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bütün konsantrasyon aralıkları için biyoproses ortamını tanımlayan tek bir model elde edilememiştir. Elde edilen bu sonuçların ışığında, sistemi bir bütün olarak ele alıp tanımlayacak yeni bir yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Son yıllarda, insan beyninin çalışma prensibini yapay olarak modellemeyi amaçlayan Yapay Sinir Ağları (YSA); sistem tanımlama (modelleme) ve denetimi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve kullanıldığı alanlardaki problemlerin çözümüne yeni yaklaşımlar getirmiştir. YSA, öğrenme sürecinde bilgiyi toplayan ve ağırlıkları yardımıyla bu bilgiyi saklayan paralel bir işlemcidir. *T. turnirae* 'den serin alkali proteaz enzim üretiminde, 1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonlarında oluşturulan PB fermantasyon ortamında, elde edilen deney sonuçları, YSA'yı eğitmek için eğitim dataları olarak kullanılmıştır. YSA ile sistemin

davranışını tanımlayan model için gerekli yazılım, MATLAB 7.04 versiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan YSA modeli, bir giriş, iki gizli ve bir çıkış katmanından ibarettir. Giriş katmanında 2 nöron, diğer katmanlarda ise 3'er nöron kullanılmıştır. Çıkış katmanındaki nöronlarda aktivasyon fonksiyonu olarak purelin, diğer katmanlardaki nöronlarda ise tansigmoid fonksiyonu kullanılmıştır. Oluşturulan YSA modeli Şekil 7.22.'de gösterilmiştir. YSA modelinin eğitimi için yaygın olarak kullanılan geriye yayılım metodu, bu çalışmada kullanılmamıştır. Bunun yerine YSA'ya ait ağırlık katsayıları Genetik Algoritma ile optimize edilmiştir. Bunun için MATLAB 7.04 versiyonunun Genetik Algoritma Toolbox'ından yararlanılmıştır. Eğitim sırasında çıkıştaki hatayı denetlemek için, amaç fonksiyonu olarak en küçük kareler yöntemi kullanılmıştır. YSA'nın eğitimi için kurulan blok diyagram Şekil 7.23.'de gösterilmiştir. YSA'nın eğitimi tamamlandıktan sonra, oluşturulan modelin doğruluğunu test etmek amacıyla, eğitim için kullanılan beş farklı sakkaroz konsantrasyonunda oluşturulan biyoproses ortamından elde edilen deneysel dataların dışında, farklı bir sakkaroz konsantrasyonunda (7.5 g/l) oluşturulan biyoproses ortamından elde edilen deney dataları kullanılmıştır.



Şekil 7.22. Oluşturulan YSA modeli



Şekil 7.23. YSA'nın eğitimi için blok diyagramı.

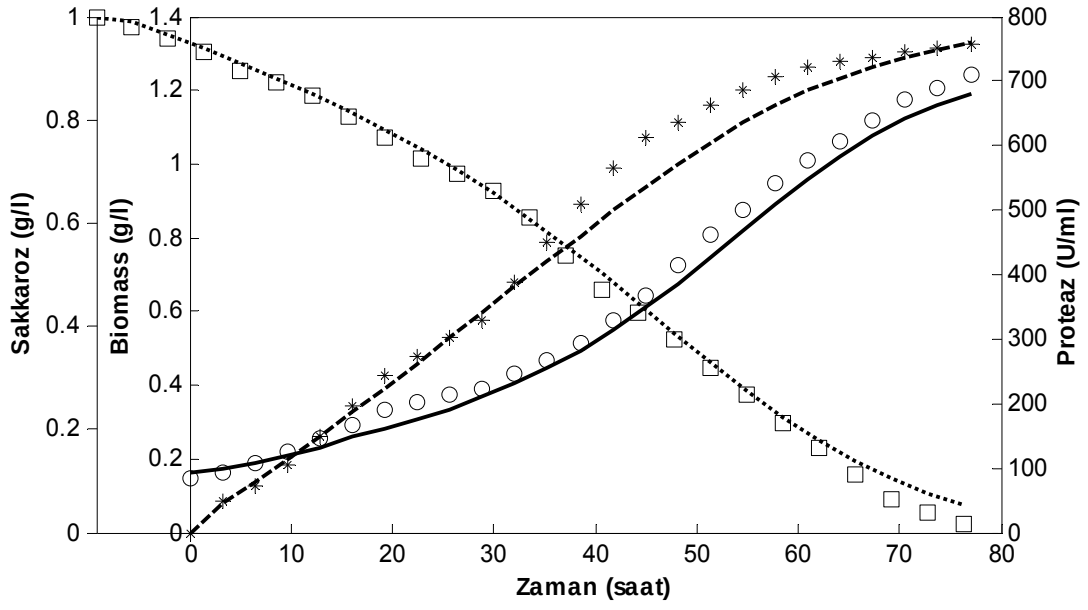
Eğitimi tamamlanmış olan YSA modelinden elde edilen veriler ile deneysel veriler arasındaki uyum, çeşitli istatistiksel mukayese metotları kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. modelleme yeteneği (EF), hata karelerinin ortalama karekökü (RMSE) ve Khi-kare(χ^2) gibi istatistiksel testler sonucunda elde edilen değerler Tablo 7.6.'da verilmiştir. EF değeri 1'e, RMSE ve χ^2 değerleri de 0'a ne kadar yakınsa, YSA modeli sistemi o kadar iyi tanımlamaktadır. Tablo 7.6.'da, ölçülen bütün parametreler için (x, P, S), EF değerleri 1'e yakın, RMSE ve χ^2 değerlerinin de oldukça düşük olduğu görülmektedir.

1, 2.5, 5, 10 ve 20 g/l sakkaroz konsantrasyonlarındaki deney sonuçları ile, aynı konsantrasyonlarda elde edilen YSA model çıkışları karşılaştırmalı olarak Şekil 7.24.-7.28.'de verilmiştir. Ayrıca 7.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda elde edilen deneysel veriler ve bu verilerin test amaçlı uygulandığı YSA model sonuçları karşılaştırmalı olarak Şekil 7.29.'da, istatistiksel test sonuçları ise Tablo 7.6.'da verilmiştir. Bu sonuçlar da, kurulan YSA modelinin sistem davranışını büyük bir doğrulukla tanımladığını göstermektedir.

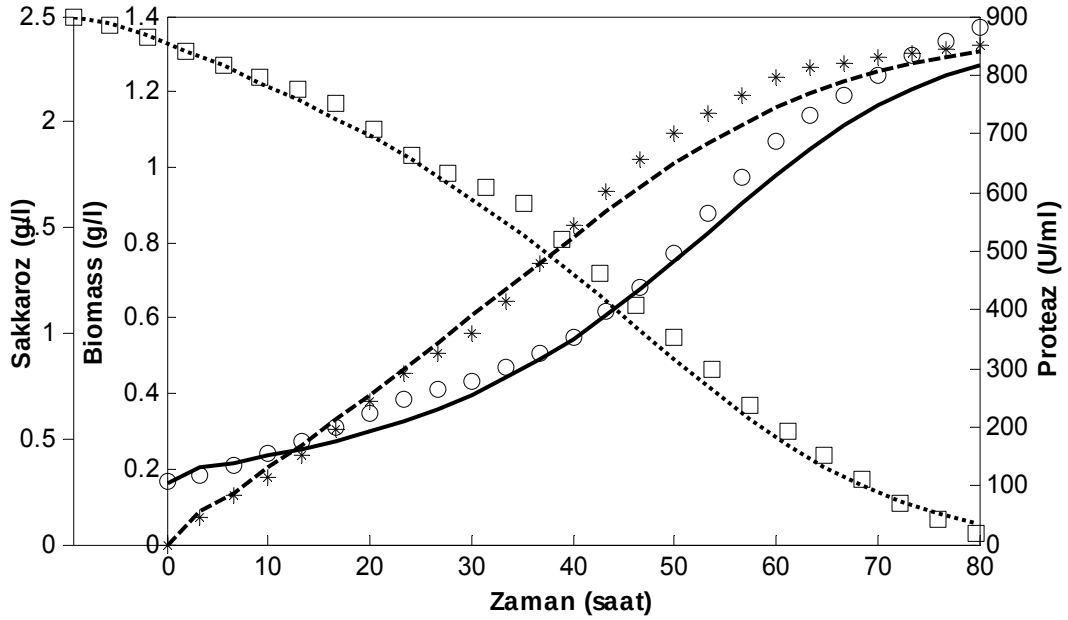
İlgili tablolar ve grafikler ışığında, YSA modelinin, Genetik Algoritma Toolbox'ı ile optimum katsayıları belirlenen modellere göre, sistemin davranışını daha iyi açıkladığı görülmüştür.

Tablo 7.6. YSA uygulaması sonucu istatistiksel testler ile elde edilen sonuçlar

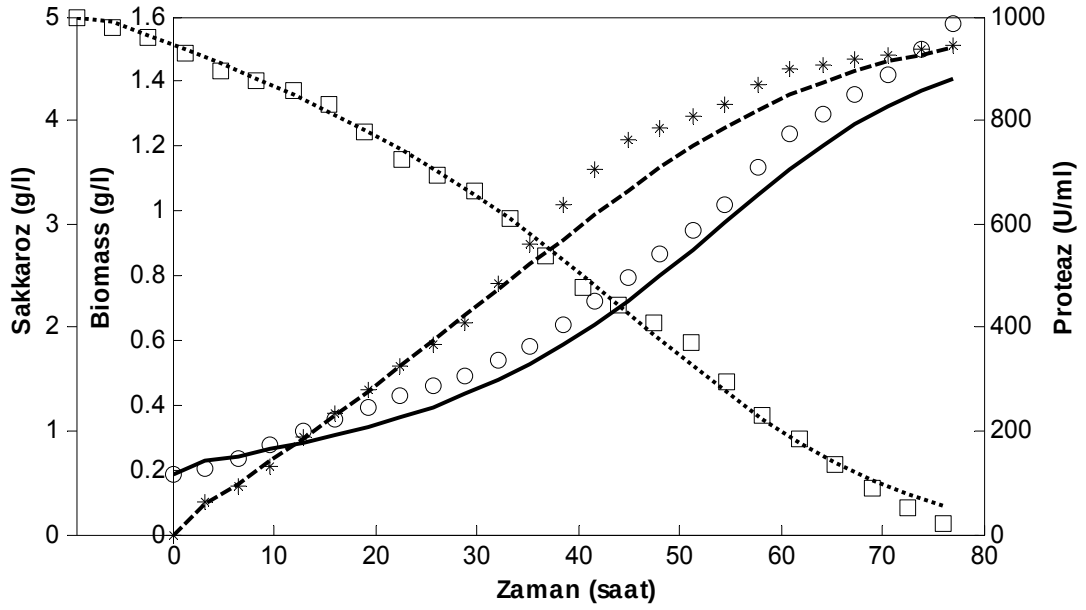
Sakkaroz konsantrasyonu (g/l)	EF			RMSE			Khi-kare (χ^2)		
	EF _x	EF _P	EF _S	RMSE _x	RMSE _P	RMSE _S	χ^2_x	χ^2_P	χ^2_s
1	0.9833	0.9745	0.9966	0.00410	0.00481	0.00305	0.00301	0.00543	0.00403
2.5	0.9701	0.9792	0.9923	0.00500	0.00468	0.00332	0.00588	0.00509	0.00443
5	0.9120	0.9774	0.9968	0.00726	0.00475	0.00301	0.00867	0.00512	0.00398
10	0.9338	0.8916	0.9963	0.00705	0.00805	0.00316	0.00635	0.00901	0.00420
20	0.9725	0.9196	0.9965	0.00498	0.00715	0.00310	0.00574	0.00823	0.00412
Test 7.5	0.8910	0.9071	0.9967	0.00811	0.00730	0.00303	0.00914	0.00886	0.00401



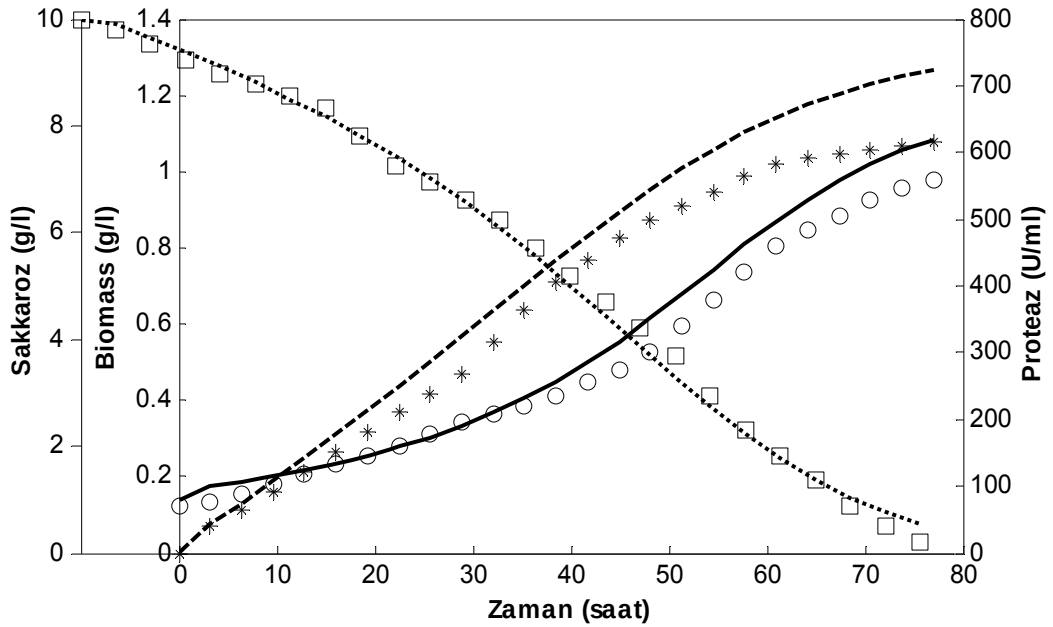
Şekil 7.24. 1 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



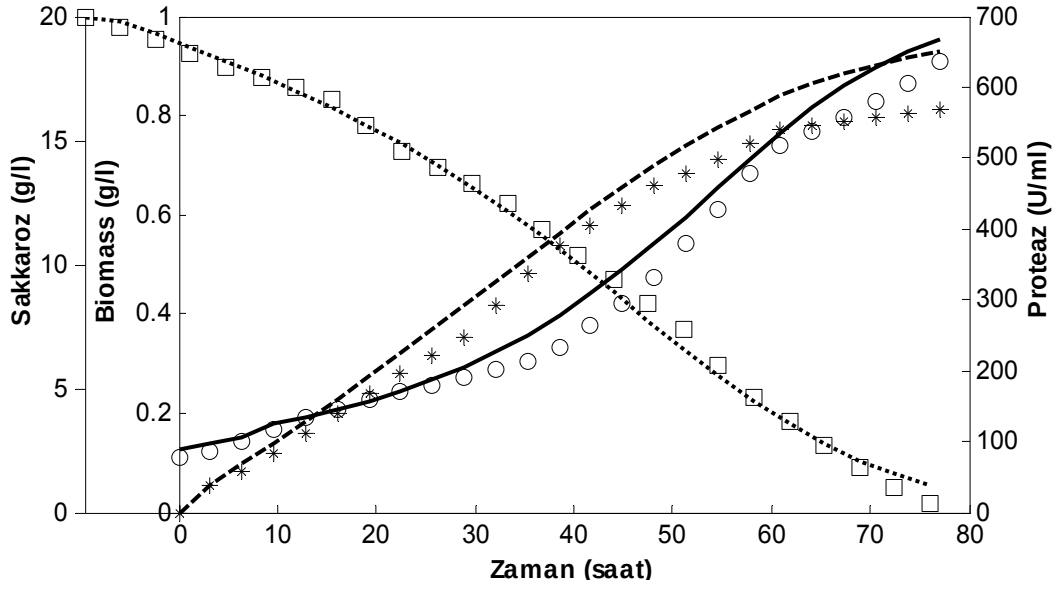
Şekil 7.25. 2.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



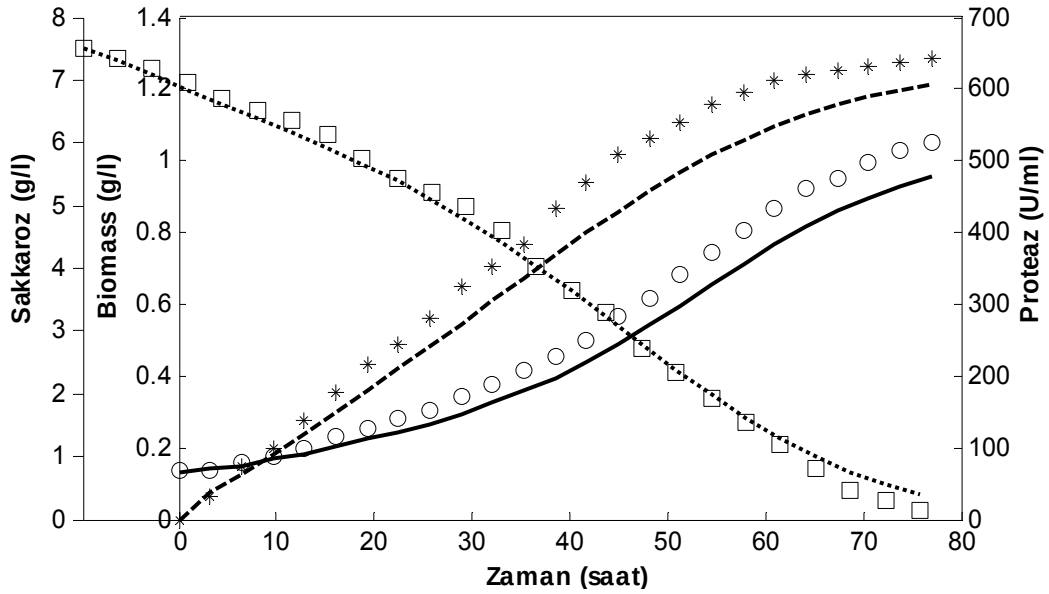
Şekil 7.26. 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



Şekil 7.27. 10 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı:0.6 vvm, $\square$: S_{deney} , $*$: P_{deney} , $\circ$: X_{deney} , ... : S_{model} , --- : P_{model} , — : X_{model})



Şekil 7.28. 20 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı: 0.6 vvm, $\square$: S_{deney}, $*$: P_{deney}, $\circ$: X_{deney}, ... : S_{model}, --- : P_{model}, — : X_{model})



Şekil 7.29. 7.5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda biyoproses ortamında deneysel olarak elde edilen sonuçlarla YSA modelinden elde edilen sonuçların zamanla değişimi (pH: 8, İnokulum oranı: % 10 v/v, KH: 500 rpm, T: 30 °C, hava giriş hızı: 0.6 vvm, $\square$: S_{deney}, $*$: P_{deney}, $\circ$: X_{deney}, ... : S_{model}, --- : P_{model}, — : X_{model})

8. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Marinal bakteri *Teredinobacter turnirae*'den proteaz üretiminin gerçekleştirildiği bu çalışmada aşağıdaki genel sonuçlar elde edilmiştir.

Sentetik ortamda elde edilen sonuçlar;

1. Hem PB hem de SM ortamında erlenlerde yapılan deneylerde farklı konsantrasyonlarda sakkaroz ve glikoz kullanılmış, maksimum enzim aktivitesi her iki durum için de 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Ayrıca en yüksek aktivite PB ortamında belirlenmiştir.
2. Erlenlerde her iki ortama da kazein ilavesi enzim üretimini 3-4 kat arttırmıştır.
3. Biyoreaktörde PB ortamında kesikli sistemde yapılan deneylerde farklı konsantrasyonlarda glikoz ve sakkaroz kullanılmış ve erlenlerde elde edilen sonuçlara benzer durum gözlenmiştir.
4. Biyoreaktörde PB ortamında maksimum aktivite 500 rpm karıştırma hızında ve yüksek hava giriş hızlarında elde edilmiştir.
5. PB ortamında karıştırma ve hava giriş hızı arttıkça oksijen tüketim hızı, r_o ve sıvı faz kütle aktarım katsayısı, k_La değeri de artmıştır.
6. Biyoreaktörde PB ortamına ilave edilen kazein enzim üretimini 5 kat artırırken süreyi yaklaşık 110 saatten 30 saate düşürmüştür.
7. Biyoreaktörde PB ortamında, yarı kesikli sürekli beslemeli sistemde enzim üretimi artarken maksimum aktiviteye ulaşmak için gerekli süre 120 saatten 30 saate düşmüştür.
8. Biyoreaktörde PB ortamında, belirli aralıklarla beslemeli yarı kesikli sistemde sakkaroz ilavesi durumunda enzim aktivitesi exponansiyel faz sonuna kadar her 6 saatte bir yapılan besleme şartlarında elde edilmiş ve proses süresi ortalama 45 saate düşmüştür.
9. Biyoreaktörde PB ortamında, sisteme belirli aralıklarla kazein ilave edilmesi durumunda, maksimum enzim aktivitesi her 6 saatte bir yapılan şartlarda elde edilmiş, üretim miktarı yaklaşık 11 katına çıkmış ve üretim süresi ise 54 saate düşmüştür.

10. Biyoreaktörde SM ortamında, kesikli sistemde farklı sakkaroz konsantrasyonlarında yapılan deneylerde en yüksek enzim aktivitesi 5 g/l sakkaroz konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sonuçlar erlenlerdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.
11. Biyoreaktörde SM ortamına 1 g/l kazein ilavesi enzim üretimini yaklaşık 7 kat artırırken, süreyi 70 saatten 30 saate düşürmüştür.
12. Başlangıçta 1 g/l sakkaroz içeren SM ortamına, yarı kesikli sürekli beslemeli olarak sakkarozun beslenmesi durumunda, enzim üretimi artarken üretim süresi 70 saatten 35 saate düşmüştür.
13. Başlangıçta 1 g/l sakkaroz içeren SM ortamına, belirli aralıklarla beslemeli yarı kesikli sistem uygulayarak sakkaroz ilave edilmesi durumunda, maksimum aktivite exponansiyel faz sonuna kadar her 6 saatte bir yapılan beleme stratejisinde elde edilmiştir.
14. Sakkaroz içeren SM ortamına, belirli aralıklarla kazein ilave edilmesi durumunda maksimum enzim aktivitesi her 6 saatte bir yapılan besleme şartlarında elde edilmiş , enzim üretimi yaklaşık 10 kat artarken üretim süresi 70 saatten 45 saate düşmüştür.

Substrat Olarak Mısır Proteinin Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar;

15. Deneylerde mısır proteini + çeşme suyu, mısır proteini + saf su ve mısır proteini + PB besiyeri olmak üzere 3 farklı ortam kullanılmıştır olup proteaz üretimi için en uygun besiyerinin mısır proteini + çeşme suyu olduğu belirlenmiştir.
16. Substrat olarak mısır proteinin kullanıldığı deneylerde proteaz üretimi için , 30 mesh tanecik boyutu, 5 g/l mısır proteini, başlangıç pH'sı 7, % 10 (v/v) inokulum miktarı, 175 rpm çalkalama hızı ve 35 °C sıcaklık optimum şartlar olarak belirlenmiştir.
17. Mısır proteini içeren ortama, glikoz ve sakkaroz ilavesinin enzim üretimini düşürdüğü görülmüştür.
18. Biyoreaktörde yapılan deneylerde karıştırma hızı ve hava giriş hızı arttıkça enzim üretimi de artmıştır. Ayrıca biyoreaktörde elde edilen maksimum enzim aktivitesi erlenlere göre bir miktar azalırken bu aktiviteye ulaşmak için gereken süre 105 saatten 72 saate düşmüştür.

Substrat Olarak Soya Unu'nun Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar;

19. Substrat olarak soya unu'nun kullanıldığı deneylerde, proteaz üretimi için en uygun ortamın soya unu + çeşme suyu olduğu belirlenmiştir.
20. Proteaz üretimi için 5 g/l soya unu, başlangıç pH' ı 7, % 5 (v/v) inokulum oranı, 125 rpm çalkalama hızı ve 30 °C sıcaklık optimum şartlar olarak belirlenmiştir.
21. Soya unu içeren ortama glikoz ve sakkaroz ilavesinin enzim üretimini düşürdüğü gözlenmiştir.
22. Biyoreaktörde yapılan deneylerde yüksek karıştırma ve hava giriş hızının enzim üretimini arttırdığı görülmüştür.

Substrat Olarak Kazein'in Kullanıldığı Deneylerden Elde Edilen Sonuçlar;

23. Substrat olarak kazeinin kullanıldığı deneylerde proteaz üretimi için en uygun ortamın kazein + çeşme suyu olduğu belirlenmiştir.
24. Proteaz üretimi için 10 g/l kazein, başlangıç pH' ı 7, % 10 (v/v) inokulum oranı, 125 rpm çalkalama hızı ve 30 °C sıcaklık optimum şartlar olarak belirlenmiştir.
25. Kazein içeren ortama glikoz ve sakkaroz ilavesinin enzim üretimini düşürdüğü gözlenmiştir.
26. Biyoreaktörde yapılan deneylerde yüksek karıştırma ve hava giriş hızının enzim üretimini arttırdığı görülmüştür. Ayrıca biyoreaktörde elde edilen maksimum enzim aktivitesinin erlen sonuçlarına göre düşük olduğu gözlenmiştir.

Biyoprosesin Modellenmesi Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar;

27. Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında oluşturulan PB besi ortamındaki mikrobiyal büyüme, ürün oluşumu ve substrat tüketimini modellemek amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde; literatürde mevcut modellerin katsayıları, Genetik Algoritma Toolbox'ı ile optimizasyon yapılarak belirlenmiş, ancak test edilen modellerden hiç birinin sistemi bir bütün olarak tanımlayamadığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında, düşük sakkaroz konsantrasyonlarında Teissier modeli, yüksek konsantrasyonlarda ise Andrews-Noack modeli sistemi en iyi tanımlayan model olarak

seçilmiştir. İkinci yöntemde; biyoproses ortamının davranışı oluşturulan YSA modeli ile tanımlanmıştır. YSA modelinin, Genetik algoritma Toolbox'ı ile optimum katsayıları belirlenen modellere göre sistemin davranışını daha iyi açıkladığı görülmüştür.

Öneriler;

1. Daha sonra yapılacak çalışmalarda enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu incelenebilir.
2. Mikroorganizmanın genetik yapısı düzenlenerek, enzim üretimini artırma çalışmaları yapılabilir.
3. Proteaz üretimi, sürekli sistemde çalışarak gerçekleştirilebilir ve biyoproses ortamı modellenebilir.
4. Tutuklanmış mikroorganizma ile enzim üretimi incelenebilir.
5. Daha ekonomik farklı karbon kaynakları araştırılarak enzim üretimi gerçekleştirilebilir.

9. KAYNAKLAR

Abate, M.A., Catsro, G.R., Sineriz, F., Callieri D.A.S., 1999, Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*, *Biotechnology Letters*, 21, 249-252.

Ahuja, S.K., 2000, Bioprocess engineering of *Teredinobacter turnirae*: Effect of morphology on metabolic activities on a marine bacterium. PhD Thesis, University of Maryland, Baltimore County, Dept. Of Chem. And Biochem. Eng., Baltimore, USA.

Ahuja, S.K., Ferreira, G.M., Moreira, A.R., 2004, Application of Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology to Achieve Exponential Growth for Aggregated Shipworm Bacterium, *Biotechnology and Bioengineering* , 85, 6, 666-675.

Aiba, S.S., Humphrey, A.E., Milles, N.F., 1973, *Biochemical Engineering*, Academic Press Inc. New York.

Andrews, J.F., 1968, A mathematical model for continuous culture of microorganisms utilizing inhibiting substrates, *Biotech. Bioeng.*, 10, 707-723.

Arslan, N., 1999, Gıda Kimyasına Giriş, Çağ ofset, Elazığ.

Atkinson, B. ve Mavituna, F., 1983, Properties of Industrially Important Microorganisms. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. The Nature Press, New York, London, 1:1-69.

Aunstrup, K., 1973, Industrial Production of Proteolytic Enzymes, *Industrial Aspects of Biochemistry*, Federation of European Biochemical Societies, 30: 23-46.

Aunstrup, K., 1980, Proteinases in Microbial Enzymes and Bioconversions, Vol:55, London, 50-114.

Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1986. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2nd Edition, McGraw Hill, New York.

- Baysal, Z., Uyar, F., Aytekin, Ç., 2003, Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water, *Process Biochemistry*, 38, 1665-1668.
- Bilir, E., 2002, Rekombinant Proteaz Üretiminde Biyoreaktör İşletim Parametrelerinin Hücre içi Tepkime Hızlarına ve Verime Etkisi, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Bulut, Ş., Tanyıldızı, M.Ş., Özer, D., Elibol, M., 2006, Use of different carbon sources in lipase production by *Rhizopus oryzae*, *J. Food Sci. Technol.*, 43(6), 643-647.
- Cihangir N. 1987, Proteaz Enziminin Bakteriyel Kaynaklardan Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerin İncelenmesi. HÜ. Mikrobiyoloji Programı, Bilim Uzmanlığı Tezi, 53.
- Çoşkun, B., Şeker, E., İnal, F., 2003, Yemler ve Teknolojisi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Cotta, M.A., Hespell, R.B., 1986, Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 51-58.
- Dinçkaya, E., 1997. Enzimolojiye Genel Bakış, Enzimoloji, Ed. Azmi Telefoncu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, 446.
- Ding, S., Tan, T., 2006, L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies, *Process Biochemistry*, 41, 1451-1454.
- Dixon, M., Webb, C. E., (1967), "Enzymes", Longman S. Green and Co. Ltd, London.
- Dunn, I.J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, I.E., 1992, Biological Reaction Engineering, VCH Weinheim.
- Elibol, M., Ulgen, K., Kamarulzaman, K., Mavituna, F., 1995, Effect of inoculum type on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor*. *Biotechnol Lett.*, 17, 579-582.
- Elibol, M., Moreira, A.R., 2003, Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*, *Process Biochemistry*, 38, 10, 1445-1450.

Elibol, M., Moreira, A.R., 2005, Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation, *Process Biochemistry*, 40, 1951-1956.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu, B., 2002, Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species, *Process Biochemistry*, 38, 615-620.

Ergün, A., Çolban, İ., Yıldız, G., Küçükeraslan, S., Tuncer, Ş.D., Yalçın, S., Küçükeraslan, M.K., Şehu, A., 2004, *Yemler Yem Hijyeni ve Teknolojisi*, Ankara.

Ferreira, G.M., Ahuja, S.K., Sierks, M.R., Moreira, A.R., 2001, Pleomorphism of the marine bacterium *Teredinobacter turnirae*, *Lett. Appl. Microb.*, 92, 1-5.

Frankena, J., Verseveld, H.W., Stouthamer A.H., 1985, A Continuous Culture Study of The Bioenergetic Aspects of Growth and Production of Exocellular Protease In *Bacillus licheniformis*, *Appl. Microbial. Biotech.*, 22, 169-176.

Fujiwara, N. and Yamamoto, K., 1987, Production of Alkaline Protease in a Low Cost Medium by Alkalophilic *Bacillus sp.* and Properties of the Enzyme, *J. Ferment. Technol.*, 65 (3), 345-348.

Fujiwara, N. and Tsumiya, T., Katada, T., Hosbhishi, T., Yamamoto, K., 1989, Continuous Recovery of Silver from Used X-Ray Films Using a Proteolytic Enzyme, *Process Biochem*, 1989 August, 155-156.

Fujiwara, N., Masumi, A., Imanaka, T., 1993, Purification and Properties of Highly Thermostable Alkaline Protease from an Alkaliphilic and Thermophilic, *Bacillus sp.*, *J. Biotech.*, 30, 245-256.

Gacesa, P., Hubble, J., 1992, 'Enzyme Technology', Open University Press, Milton Keynes, UK.

Gaden, E., 1959, Fermentation process kinetics, *Biotech. Bioeng.*, 1, 4, 413-429.

Gao, H., Tan, T., 2003, Fed-batch fermentation for ergosterol production, *Process Biochemistry*, 39, 345-350.

Godfrey, T., 2000, The industrial enzymes market: A summary. <http://www.biocatalysts.com>

Goldberg D.E., 1989, *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*, Addison-Wesley.

Gökbulut, M., 2005, *Yapay Sinir Ağları, Ders notları*, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

Greene, R.V., Freer, S.N., 1986, Growth characteristics of a novel nitrogen-fixing cellulolytic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 982-986.

Greene, R.V., Cotta, M., Griffin, H.L., 1989, A novel symbiotic bacterium isolated from marine shipworm secretes proteolytic activity. *Current Microbiology*, 19, 353-356.

Gutarra M. L. E. , Godoy M.G. , Castilho R.L. , Freire D.M.G., 2007, Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry, 82,3, 313-318.

Han, K., Levenspiel, O., 1988, Extended Monod Kinetics for Substrate, Product and Cell Inhibition, *Biotech. Bioeng.*, 32, 430-437.

Horikoshi, K., 1971, Production of alkaline enzymes by alkaliphilic microorganism. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No: 221, *Agric. Biol. Chem.* 35; 1407-1414.

Imam, S.H., Greene, R.V., Griffin, H.L., 1990, Adhesive properties of a symbiotic bacterium from a wood-boring marine shipworm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1317-1322.

Ishikawa, H., Ishimi, K., Sugiura, M., Sowa, A., Fujiwara, N., 1993, Kinetics and mechanism of enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray film and release of silver particles. *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 300-305.

Janssen, P.T., Morgan, H.W., Daniel, R.M., 1991, Effects of medium composition on extracellular proteinase stability and yield in batch cultures of *Thermus* sp., Appl. Microbiol. Biotech., 34, 789-793.

Kadrekar, S.N., Ramasarma, G.B., 1990. Amylase and Protease Production by *Bacillus subtilis*: Studies on Improvement of strain and Medium, J. Food Sci. Technol., 27 (1), 4-6.

Kalisz, M.H., 1988, Microbial Proteinases. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. 36: 3-29.

Keay, L., Moseley, M.H., Anderson, R.G., Connor, R.J., Wildi, B.S., 1972. Production and Isolation of Microbial Proteases in Enzyme Engineering, New York.

Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S., Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp., Strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62, 2482-2488.

Kole, M.M., Draper, I., Gerson, D., 1988, Protease Production by *Bacillus subtilis* In oxygen Controlled, Glucose Fed-Batch Fermentations, App. Microbiol. Biotech., 28, 404-408.

Krishna, C., Chandrasekaran, M., 1996, Banana waste as substrate for α -amylase production by *Bacillus subtilis* (CBTK 106) under solid-state fermentation, App. Microbiol. Biotech., 46, 106-111.

Lehninger, A.L., 1979, Biotechnology, 2nd ed., Worth Publishers, INC.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent., J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Luong, J.H.T., 1987, Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition, Biotech. Bioeng., 29, 242-248.

Manachini, P.L., Fortina, M.G., Parani, C., 1988, Thermostable Alkaline Protease Produced by *Bacillus thermoruber*, App. Microb. Biotech, 28, 409-413.

Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical. Chemistry., 31, 426-428.

Moon, S.H., Parulekar, S.J., 1991, A parametric Study of Protease Production In Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firmus*, Biotechnology and Bioengineering., 37(5), 467-483.

Moser, A., 1985, Kinetic of Batch Fermentations, Biotechnology, Cilt 2, Bölüm 14, VCH Weinheim.

Mulchandani, A., Luong, J.H.T., 1989, Microbial inhibition kinetics revisited, Enz. Microb. Technol., 11, 66-73.

Nandakumar, M.S., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S.M.S., Ghildyal, N.P., 1999, Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases, Letters in Applied Microbiology, 29, 380-384.

Noordervliet, P.F., 1983, Food Enzymes-Uses and safety. Microbiologie-Aliments-Nutrition.1:1-17.

Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A., 2000, Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems, Tibtech, 18, 356-360.

Orhan, A., 2002, *Rhizopus arrhizus*'dan Katı Hal Fermantasyonu ile Lipaz Üretimi, Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

Özer, D., Elibol, M., 2000, Effects of some factors on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, J. Food Sci. Technol., 37, 6, 661-664.

Pandey, A., Nigam, P., Scicol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., 2000, Advances in microbial amylases, Biotechnol. Appl. Biochem., 31, 135-153.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000, New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products, Process Biochem., 35, 1153-1169.

Pehlivan, N., 2001, Rekombinant *Bacillus* Türleri ile Serin Alkali Proteaz Üretimi İçin Kompleks Ortamda Oksijen Aktarım Etkilerinin Araştırılması, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Pekin, B., 1980, "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)", E.Ü.Kimya Fak. Yayınları, No. 3, İzmir.

Pimentel M.C.B, Krieger N., Coelho L.C., Fontana J.O., Melo E.H.M., Ledingham W.M., Lima Filho J.L., 1994, Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. Appl Biochem Biotechnol, 49 , 59-73.

Pimpa, W., 2003, Potential application of wastewater from rice noodle manufacture in α -amylase production, Suranare J. Science Technology, 11, 151-157.

Prakasham, R.S., Subba, C.R., Sreenivas, R.R., Sarma, P.N., 2005, Alkaline protease production by an isolated *Bacillus circulans* under solid-state fermentation using agroindustrial waste: process parameters optimization, Biotechnol Prog., 21(5),1380-1388.

Prudende, K.W., Katz, A., Sugrue, J.A., Thomson, A., 1989, The effect of glucose on the expression of a cloned *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase gene in strains *Bacillus subtilis*, Current Microbiology, 18, 27-31.

Rainer, B.W., 1990, Determination methods of the volumetric oxygen transfer K_La in bioreactors, Chem. Biochem. Eng. Q., 4, 4, 185-186.

Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F., 1987, Biotechnology, 7a, 5-100, Vch. New York.

Roberts, D. V., (1977), 'Enzyme Kinetics', Cambridge Univ. Press, London.

Sağiroğlu, A.K., 1999, Bilim ve Teknik, N:383, 74-80.

Schmid, R.D., 1979, Stabilized Soluble Enzymes, Adv. Biochem. Eng., 12, 41.

Schonheydek, F., Wolqvartz, K., 1948, "Acta Physiologica Scandinavica", 9, 57.

Segel, I. H., (1975), "Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems", Wiley-Interscience Publication, New York.

Sheppard, G., 1986. The Production and Uses of Microbial Enzymes in Food Processing. Progress in Industrial Microbiology. Elviesier Science Publishers B.V., New York, 23: 237-281.

Sinclair, C.G., 1987, Microbial Process Kinetics, In: Bu'Lock J, Kristiansen B (eds) Basic Biotechnology, academic, London, pp 75-131.

Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K., Soni, S.K., 2005. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process Biochem. 40: 525–534.

Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya C., Szakacs, C., Soccol, C.R., Pandey, A., Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production, 2006, Brazilian Archives of Biology and Technology 49 (5), 843-851.

Takami, H., Akiba, T., Horikosshi, K., 1990, Characterization of an alkaline Protease from *Bacillus* sp. No:AH-101, App. Microb. Biotech., 33-519-523.

Tanyıldızı, M.Ş., 2005, Çeşitli Bakteri Türleriyle Farklı Ortam ve Çalışma Şartlarından α -amylase Üretiminin İncelenmesi, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

Taylor, J.M., Richardson, T., 1979. Applications of Microbial Enzymes in Food Ssystems and in Biotechnology. Advences in Applied Microbiology. 25: 7-31.

Taylor, M.M., Bailey, D.G. and Fairheller, S.H., 1987. A review of the use of enzymes in the tannery. J. Am. Leather Chem. Assoc., 82, 153-165.

Telefoncu, A., 1986, 'Temel ve Uygulamalı Enzimoloji', Ege Üniv., İzmir.

Topal, S., 1985, Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri, Gıda, 10(1), 25-37.

Türker, M., 2005, Biyoreaksiyon Mühendisliği, Su Vakfı Yayınları,

Uçar, F., Yaşa, İ., Gezer, T., 1998, İzolasyon identifikasyonları yapılmış 23 Alkalofilik *Bacillus* suşunun alkali proteaz aktivitelerinin saptanması, Fen Fakültesi Araştırma fonu Proje Raporu, No:1996, Fen 16.

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.

Usama, B., 2003, Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in Ca-alginate beads, African Journal of Biotechnology, Vol. 2 (3), pp. 60-65.

Ünsaçar, M., 1998, Serbest ve Tutuklanmış *Rhizopus arrhizus*' dan Lipaz Üretimi, Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

Yağız, M., 2000, Rekombinant *Bacillus sp.* ile Alkali Proteaz Üretimi İçin Kompleks Üretim Ortamı Tasarımı, Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Van't Riet, K., 1983, Mass transfer in fermentation, Trends in Biotechnol., 1, 113-119.

Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A., Dunnill, P., Humphrey, A.E. ve Lilly, M.D., 1979, Fermentation and Enzyme Technology, J. Wiley & Sons.

Wright, C.P., Whitney, G.K., Dauglis, A.J., White, B.N., 1992. Enhancement and Regulation of Extracellular Protein Production by *Bacillus brevis* 47 Through Manipulation of Cell Culture Conditions, Biotechnology and Bioengineering, 40(1), 46-52.

EKLER

Ek 1. Kullanılan Doğal Substratların Bileşimleri

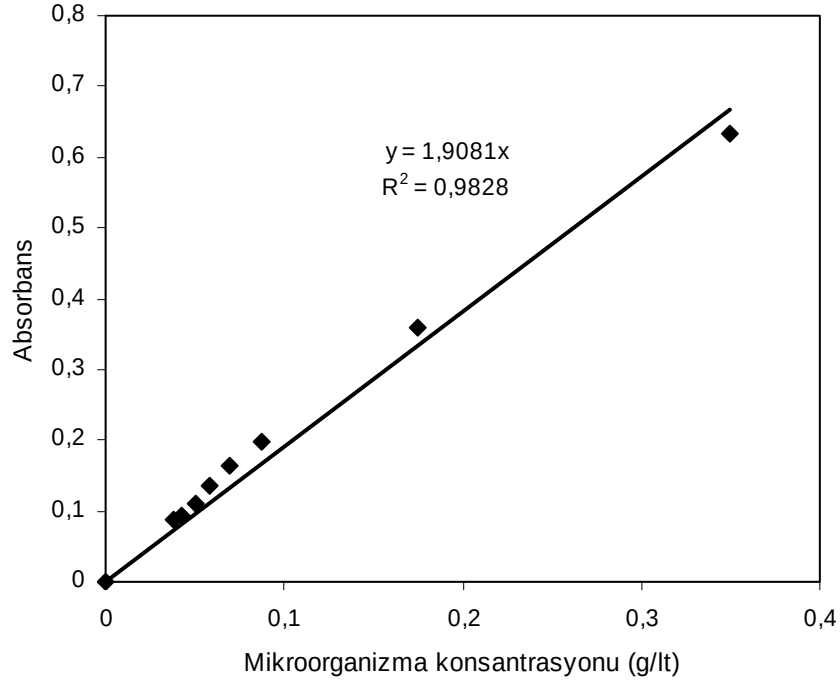
Tablo E 1.1. Doğal substratların spesifikasyonları (Ergün vd., 2004, Coşkun vd., 2003).

	Kazein	Soya unu	Mısır Pproteini (Gluten)
Nem	%10.9	%13	%13
Protein(KM)	%70	%41.2	%60
Yağ	%4.3	%4 max	%3 max
Kül	%6.3	%10	%4.5
Nişasta	-	%18	%15
Metabolik Enerji (ME)	2550 kcal/kg	3050 kcal/kg	3300 kcal/kg
MİNERAL İÇERİKLERİ			
Kalsiyum	% 1.25	% 0.25	% 0.07
Fosfor	% 0.29	% 1	% 0.2
Potasyum	% 0.72	% 0.59	% 10.23
Klor	% 0.69	% 0.5	% 0.08
Magnezyum	% 0.1	% 0.5	% 0.08
Kükürt	% 0.1	% 0.3	% 0.65
Sodyum	% 0.59	% 0.15	% 0.06
Demir	252 ppm	363 ppm	282 ppm
Çinko	30 ppm	250 ppm	31 ppm
Mangan	4 ppm	% 0.05	% 0.07
VİTAMİN İÇERİKLERİ			
Kolin	980 mg/kg	1540mg/kg	3584mg/kg
Niasin	7.7 mg/kg	72 mg/kg	61 mg/kg
Riboflavin	17.2 mg/kg	2 mg/kg	2 mg/kg
Tiamin	6 mg/kg	2 mg/kg	0.22 mg/kg
Biotin	380 mg/kg	0.34 mg/kg	0.18 mg/kg
Karoten	6 mg/kg	-	-
AMİNO ASİT İÇERİKLERİ (% protein)			
Arjinin	3.4	0.78	2.08
Histidin	2.5	0.61	1.4
izolöysin	5.7	2.2	10.23
Löysin	8.7	0.64	1.01
Lizin	7.0	0.64	1.01
Metiyonin	2.7	0.37	1.78
Treonin	3.8	0.78	2.2
Valin	6.8	3.36	4.7
Fenilalanin	4.6	2.71	2.93

Ek 2. 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

EK 3. Mikroorganizma Derişimi Kalibrasyonu



Şekil E3.1. 600 nm’de mikroorganizma kalibrasyon grafiği

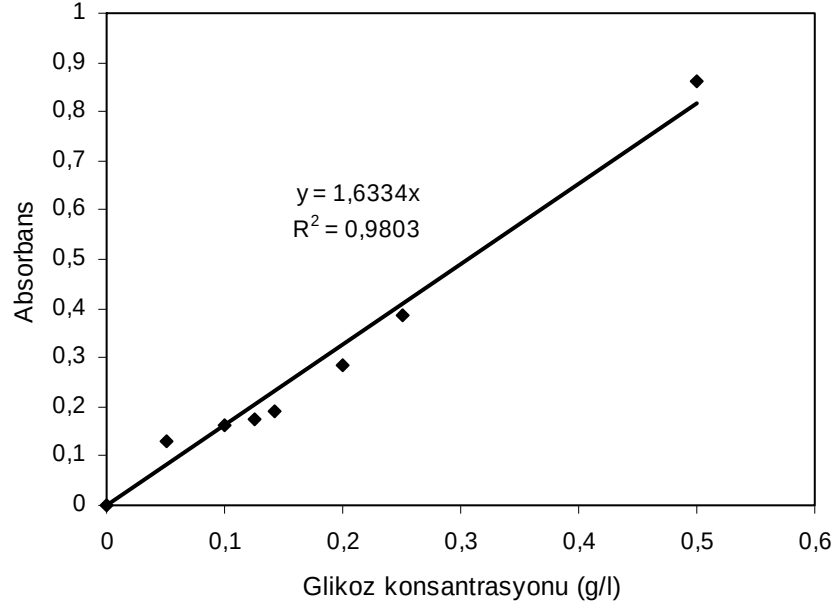
Mikroorganizma konsantrasyonunu belirlemek için $C = \left(\frac{Abs}{1.9081} \right) \times SF$ kalibrasyon

denklemini kullanılmıştır. PB besiyerinde kesikli fermantasyonla glikoz konsantrasyonu etkisinin incelendiği çalışmalarda, 2.5 g/l glikoz başlangıç konsantrasyonu için 30 saatte 5 kat seyreltilmiş numune için mikroorganizma konsantrasyonu;

$$C = \left(\frac{0.213}{1.9081} \right) \times 5 = 0.56 \text{ g/l olarak belirlenmiştir.}$$

Ek 4. DNS Yöntemi İçin İndirgenmiş Şeker Derişimi Kalibrasyonu

İndirgenmiş şeker (glukoz, fruktoz) derişimi DNS (dinitrosalisilikasit) yöntemi ile ölçülmüştür. Bunun için derişimi bilinen miktarlarda glukoz içeren ortamlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Örnek hesaplama aşağıda verilmiştir.



Şekil E4.1. 550 nm’de glukoz kalibrasyon grafiğı

İndirgenmiş şeker derişimi belirlemek için $C = \left(\frac{Abs}{1.633} \right) \times SF$ kalibrasyon denklemi

kullanılmıştır. PB besiyerinde kesikli fermantasyonla glukoz konsantrasyonu etkisinin incelendiğı çalışmalarda, 2.5 g/l glukoz başlangıç konsantrasyonu için 30 saatte 20 kat seyreltilmiş numune için glukoz konsantrasyonu;

$$C = \left(\frac{0.156}{1.6334} \right) \times 20 = 1.91 \text{ g/l olarak belirlenmiştir.}$$

EK 5. DNS Yöntemi ile Toplam İndirgenmiş Şeker Analizi İçin Reaktif Hazırlanması

1. a) 880 cm^3 % 1 (a/h)'lik DNS çözeltisi hazırlanır.
8.8 g dinitrosalisilik asit (DNS) tartılarak 880 cm^3 damıtık suda çözülür.

b) 225 g ROCHELLE tuzu (sodyum potasyum tartarat) çözeltiye eklenerek karıştırılır.

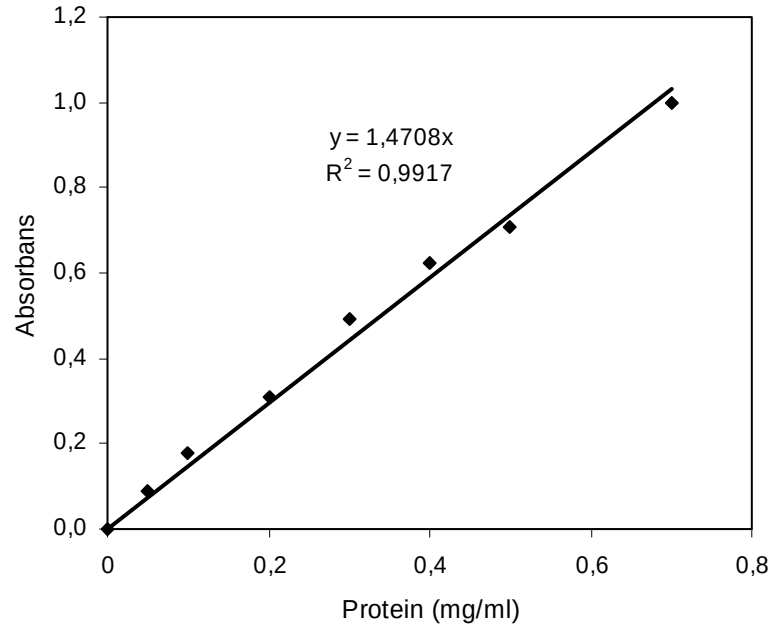
c) Bu çözeltiye 300 cm^3 % 4.5 NaOH çözeltisi eklenir.
% 4.5 NaOH çözeltisi, 13.5 g NaOH 300 cm^3 damıtık suda çözülerek hazırlanır.
2. a) 22 cm^3 % 10 NaOH çözeltisi hazırlanır
2.2 g NaOH 22 cm^3 damıtık suda çözülür

b) Çözeltiye 10 g kristalize fenol katılır ve karışıma 100 cm^3 damıtık su ilave edilir

c) Bu alkali fenol karışımından 60 cm^3 alınarak 6.9 g NaHCO_3 ile karıştırılır.

Birinci basamaktan elde edilen DNS-alkali çözeltisine ikinci basamaktan elde edilen çözelti eklenerek ROCHELLE tuzu çözününceye kadar karıştırılır. Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede saklanır ve hazırlandıktan 48 saat sonra kullanılır.

Ek 6. Toplam Protein Derişimi Kalibrasyonu



Şekil E6.1. 660 nm’de protein kalibrasyon grafiğı

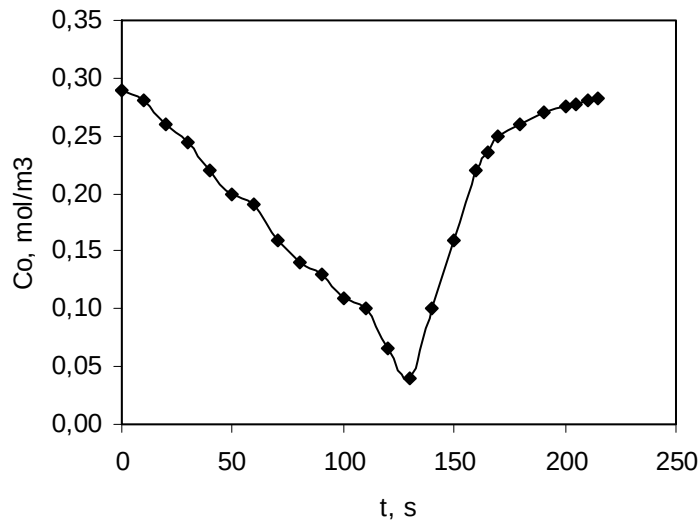
Toplam protein miktarını belirlemek için $C = \left(\frac{Abs}{1.4708} \right) \times SF$ kalibrasyon denklemi

kullanılmıştır. PB besiyerinde kesikli fermantasyonla glikoz konsantrasyonu etkisinin incelendiğı çalışmalarda, 2.5 g/l glikoz başlangıç konsantrasyonu için 30 saatte 5 kat seyreltilmiş numune için toplam protein miktarı;

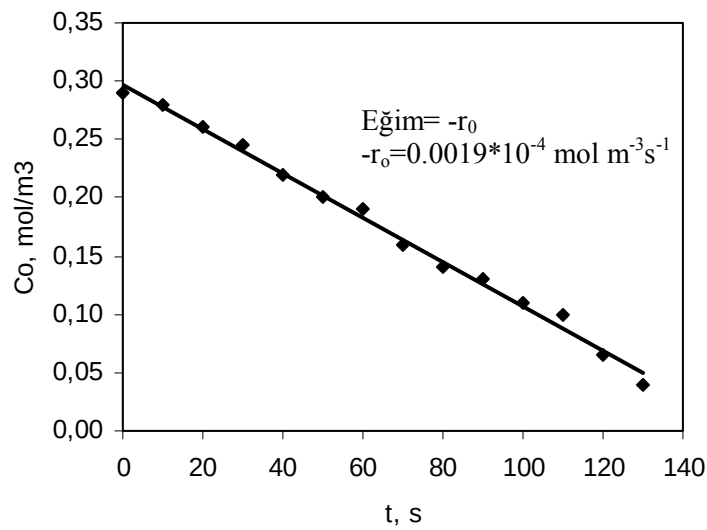
$$C = \left(\frac{0.146}{1.4708} \right) \times 5 = 0.497 \text{ mg/ml olarak belirlenmiştir.}$$

Ek 7. Dinamik Yöntem İle Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısı ve Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi

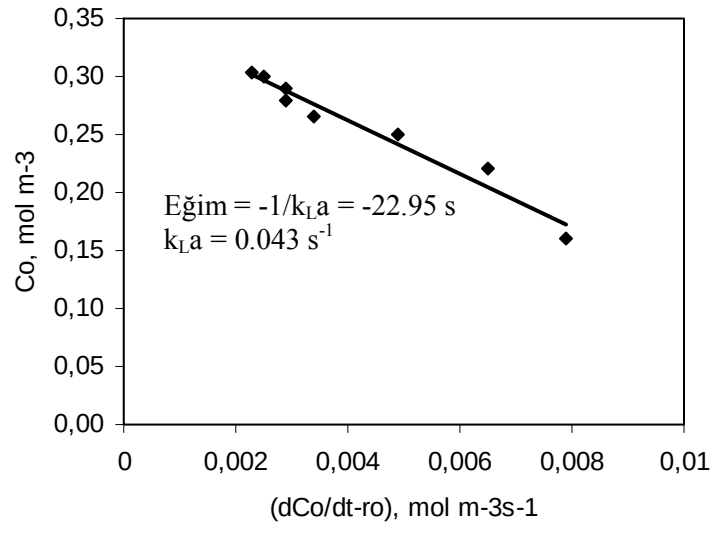
Biyoreaktöre gönderilen havanın kısa süreli olarak kesilmesi sonucunda çözünmüş oksijen derişiminde azalmanın gözlemlendiği (t, C_o) grafiğinde, azalan doğrusal ilişkiden r_o değeri bulunmuştur. $\{(dC_o/dt-r_o); C_o\}$ grafiği çizilerek buradaki eğimden $-1/k_L a$ değeri bulunmuş ve $k_L a$ hesaplanmıştır. Aşağıda 600 rpm karıştırma hızı, 0.6 vvm hava giriş hızı koşulları için $t=50$ st'deki r_o ve $k_L a$ değerlerinin hesabı örnek olarak gösterilmiştir.



Şekil E7.1. Çözünmüş oksijen derişiminin kalma süresi ile değışimi.



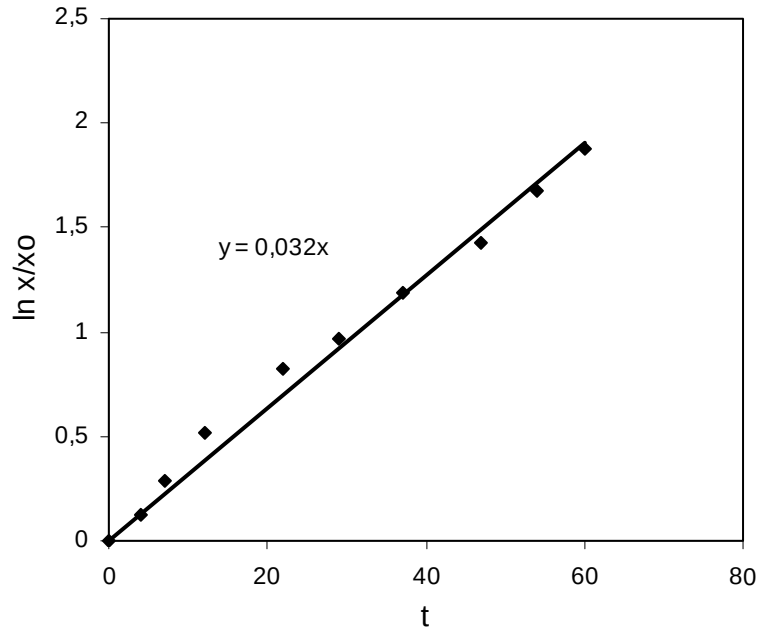
Şekil E7.2. Mikroorganizmanın Oksijen Tüketim Hızının Belirlenmesi.



Şekil E7.3. Sıvı Faz Kütle Aktarım Katsayısının k_{La} 'nın Belirlenmesi

Ek 8. Spesifik Üreme Hızının (μ) Bulunması

Deneysel olarak elde edilen verilerin logaritmik faza ait olan kısmından yararlanılarak, her bir başlangıç substrat derişimine ait hesaplanan μ değerlerinin değışimi Şekil 7.16.'da verilmişti. Denklem 7.16'ya göre, t 'ye karşı $\ln x/x_0$ 'ın grafiğe geçirilmesi ile elde edilen doğrusal ilişkinin eğiminden spesifik üreme hızı (μ) bulunur. PB besiyerinde kesikli fermantasyonla sakkaroz konsantrasyonunun etkisinin incelendiğı çalışmalarda, 5 g/l başlangıç sakkaroz konsantrasyonuna ait bulunan spesifik üreme hızı (μ) değeri aşağıdaki grafikte gösterilmiştir.



Şekil E8.1. 5 g/l başlangıç sakkaroz konsantrasyonuna ait spesifik üreme hızının (μ) belirlenmesi

$$\mu = 0.032$$