

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FARKLI BESİYERİ BİLEŞİMLERİ VE FERMENTASYON STRATEJİLERİ
KULLANILARAK MİKROBİYAL POLİGALAKTURONAZ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Ercan KARAHALİL

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ŞUBAT 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**FARKLI BESİYERİ BİLEŞİMLERİ VE FERMENTASYON STRATEJİLERİ
KULLANILARAK MİKROBİYAL POLİGALAKTURONAZ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Ercan KARAHALİL

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ŞUBAT 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI BESİYERİ BİLEŞİMLERİ VE FERMENTASYON STRATEJİLERİ
KULLANILARAK MİKROBİYAL POLİGALAKTURONAZ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU

Ercan KARAHALİL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 03 / 02 / 2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

Dr. Öğr. Üyesi Ziba GÜLEY

ÖZET

FARKLI BESİYERİ BİLEŞİMLERİ VE FERMENTASYON STRATEJİLERİ KULLANILARAK MİKROBİYAL POLİGALAKTURONAZ ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Ercan KARAHALİL

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Şubat 2020; 121 sayfa

Üretim maliyetlerini düşürmek amacıyla fermentasyon ortamında düşük maliyetli materyallerin kullanımı son yıllarda araştırmacılar tarafından benimsenen bir yaklaşım olmuştur. Bu çalışmada *Aspergillus sojae* ile poligalakturonaz enzimi üretiminde 11 farklı karbon kaynağı ve 9 farklı azot kaynağı denenmiş olup en verimli seçilenler ile biyoreaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon ortamındaki aşırı fungal gelişimin kontrolü için mikropartikül tekniği kullanılmış ve tüm denemelerde tekrar edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde substrat miktarı ile hava akış hızı Merkezi Kompozit Tasarımı kullanılarak en yüksek enzim aktivitesi için optimize edilmiştir. Bu amaçla, optimum koşullarda (54.14 g/L substrat miktarı, 0.25 vvm havalandırma hızı) gerçekleştirilen fermentasyonlar için en yüksek enzim aktivitesi ultrafiltrasyon sonrasında 126.91 U/ml olarak tespit edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar kullanılarak küçük ve büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörlerde gerçekleştirilen enzim üretimlerine ait deneysel sonuçların 10 farklı matematiksel model ile uyumu incelenmiştir. Küçük ölçekli biyoreaktör denemeleri için deneysel veriler ile en uyumlu modeller Modifiye Gompertz, Modifiye Richards, Modifiye Lojistik ve Huang modelleri olarak tespit edilmiştir. Büyük ölçekli üretim için ise deneysel verilere en yakın aktivite tahminleri Modifiye Richards ve Modifiye Lojistik modelleri ile sağlanmıştır.

Fermentasyonlardan elde edilen fermente sıvı örnekleri enzimin kısmi saflaştırması için 10 ve 100 kDa'lık ayırma sınırlarında ultrafiltrasyon kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrasında ait örneklerde protein miktar tayini yapılmış ve böylece spesifik aktivite değerleri belirlenmiştir. Ayırma sınırının 100 kDa olduğu ultrafiltrasyonda spesifik enzim aktivitesinde 2.45 kat artış sağlanmış ve 278.90 U/mg olarak belirlenmiştir. Ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen permeat ve retentat örnekleri, enzimin toz formda ticari bir preparat olarak üretilebilme potansiyelini belirlemek amacıyla liyofilizasyon (dondurarak kurutma) işlemine tabi tutulmuş ve saflaştırma katsayıları tespit edilmiştir. Üretilen poligalakturonazın pektin, karboksimetil selüloz ve poligalakturonik asite olan ilgisi incelenmiş ve K_m değerleri sırasıyla 21.2, 10.8 ve 4.1 mg/ml olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, enzimin pektin, karboksimetil selüloz ve poligalakturonik asit substratlarında V_{max} değerleri sırasıyla 101.7, 33.7 ve 40.2 $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Üretilen poligalakturonaz Ag^+ , K^+ ve Na^+ iyonları ile etkileşime geçtiğinde aktivitesi stabil kalırken EDTA ajanı, Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve Sr^{2+} iyonlarının enzim üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Son olarak,

fermentasyon öncesi, fermentasyon süreci ve fermentasyon sonrası aşamalarda kullanılmış olan hammadde, sarf ve enerji giderlerinin güncel birim fiyatları esas alınarak temel bir maliyet analizi hazırlanmıştır.

Tez sonucunda; fermentör ortamında aşırı küf gelişimi ile kontrolü zorlaşan çalışma koşulları mikropartikül kullanımı ile iyileştirilerek standart-tekrar edilebilir üretimler gerçekleştirilmiş, üretim verilerinin matematiksel modellerle uyumlulukları belirlenmiş, üretilen poligalakturonaz başarılı bir şekilde karakterize edilmiş, kısmi olarak saflaştırılmış ve liyofilizasyon ile toz formda elde edilmiştir. Ayrıca doğal karbon kaynaklarının kullanımı için temel bir maliyet analizi yapılarak poligalakturonazın düşük maliyet ile üretim potansiyeli ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Poligalakturonaz, Biyoreaktör, Mikropartikül, Merkezi Kompozit Tasarım, Matematiksel modelleme, Ultrafiltrasyon, Liyofilizasyon, Maliyet analizi

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

Dr. Öğr. Üyesi Ziba GÜLEY

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF MICROBIAL POLYGALACTURONASE PRODUCTION USING DIFFERENT MEDIA COMPOSITIONS AND FERMENTATION STRATEGIES

Ercan KARAHALIL

PhD Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

February 2020; 121 pages

In recent years, the evaluation of low-cost materials in fermentation media to reduce production costs has been an approach adopted by researchers. In this study, 11 different carbon sources and 9 different nitrogen sources were used in the production of polygalacturonase enzyme from *Aspergillus sojae*, and bioreactor experiments were carried out with the most efficient ones. To control excessive fungal growth in fermentation media, microparticle technique was used and thus repeatable results were obtained in all trials. In a small-scale bioreactor, the concentration of substrate and aeration rate are optimized using the Central Composite Design for the highest enzyme activity. For this purpose, after ultrafiltration, the highest enzyme activity was determined as 126.91 U/ml for the fermentations performed under optimum conditions (54.14 g/L substrate concentration, 0.25 vvm aeration rate). Enzyme production was performed in small (5-L) and large-scale (30-L) bioreactors using the determined optimum conditions and the compatibility of the experimental results with 10 different mathematical models was investigated. The most compatible models with experimental data for small-scale bioreactor trials were determined to be Modified Gompertz, Modified Richards, Modified Logistics and Huang models. For large-scale production, activity estimates closest to experimental data were calculated with Modified Richards and Modified Logistics models.

Broth samples obtained from fermentations were passed through an ultrafiltration system using the membranes of 10 and 100 kDa as cut-off value for partial purification of the enzyme. Crude enzyme and ultrafiltered solutions were analyzed for quantification of total protein, and thus specific activity values were determined. Lyophilization (freeze-drying) process was implemented to the permeate and retentate samples obtained from ultrafiltration to determine the potential of the enzyme to be produced as a commercial preparation, and its purification coefficients were calculated. The affinity of the produced polygalacturonase to the substrates of pectin, carboxymethyl cellulose, and polygalacturonic acid was examined, and K_m values were calculated as 21.2, 10.8 and 4.1 mg/ml, respectively. Further, V_{max} values of the enzyme in the substrates of pectin, carboxymethyl cellulose, and polygalacturonic acid were determined as 101.7, 33.7 and 40.2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively. It was found that EDTA agent, Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} and Sr^{2+} ions have an inhibitory effect on the enzyme, although the produced polygalacturonase was stable during interaction of the enzyme with Ag^+ , K^+ and Na^+

ions. Finally, basic a cost analysis was prepared based on the current unit prices of raw materials, consumables and energy expenditures for upstream and downstream processing.

In the fermenter, operation conditions that are difficult to control due to excessive fungal growth were improved with the use of microparticles and standard-repeatable productions were achieved. The compatibility of production data with the mathematical models was determined. Polygalacturonase was successfully characterized, partially purified and lyophilized. In addition, an economic analysis was prepared for the fermentation performed with natural carbon sources to show the low-cost production potential of the polygalacturonase.

KEYWORDS: Polygalacturonase, Bioreactor, Central Composite Design, Cost analysis, Lyophilization, Mathematical modeling, Microparticle, Ultrafiltration

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

Prof. Dr. Mehmet INAN

Asst. Prof. Dr. Ercan YATMAZ

Asst. Prof. Dr. Hatice Reyhan OZIYCI

Asst. Prof. Dr. Ziba GULEY

ÖNSÖZ

Dünyada başta tarım ve gıda endüstrisi olmak üzere birçok üretim alanında açığa çıkan atık ve yan ürünler değerli bileşenler açısından zengin olmasına rağmen katma değeri yüksek ürünlere dönüştürmede yeterince değerlendirilememektedir. Hızlı kentleşmeye karşın atık yönetimi stratejilerinin geliştirilmesindeki yavaş ilerleme endüstriyel atıkların birikmesine yol açmaktadır. Bu atıkların birçoğunun hastalıklara neden olan mikroorganizmalar için iyi bir gelişme ortamı olması ve uzun süre çevrede kalmaları endişelere neden olmaktadır. Dünya nüfusunun gelecek yıllarda daha yüksek bir ivme ile artmasının beklenmesi ve buna paralel olarak da küresel gıda talebinin artması söz konusu olduğundan endüstriyel atık miktarında da önemli bir yükseliş olacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle sürdürülebilir atık yönetimi modellerinin ve alternatif değerlendirme alanlarının araştırılması daha fazla önem kazanmaya başlamıştır. Ayrıca atık değerlendirme için araştırmacılar tarafından öne sürülen değerlendirme alanlarının ekonomik değeri de önem taşımaktadır. Dolayısı ile atık bir materyalin kompozisyonunda bulunan bileşenlerden mümkün olan en değerli ürünlerin üretiminin gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Örneğin bir endüstriyel atığın gıda katkı maddesi ya da nutrasötik bileşen üretimi gibi bir amaçla kullanımı yem ya da gübre zenginleştirilmesinde kullanımına nispeten ekonomiye daha fazla katkı sağlayabilmektedir. Atıkların değerlendirilmesinde uygulanabilir en etkin teknolojilerden birisi de fermentasyon işlemidir. Sınırlı değerlendirme alanına sahip ve karbonhidratlarca zengin olan birçok endüstriyel atık fermentasyon tekniği ile katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılabilir. Üstelik büyük ölçekli fermentasyonlar için maliyeti yüksek saf kaynakların yerine zengin karbon ve azot içeriğine sahip tarımsal ve endüstriyel atıkların kullanılarak proses maliyetlerinin düşürülmesi son yıllardaki çalışmaların odak noktalarından birisi olmuştur.

Narenciye meyveleri (portakal, greyfurt, limon, mandalina vb.) dünyada en çok yetiştirilen meyveler arasında olup artan tüketici talebi nedeniyle ülkemizde ve dünyada da üretimi her yıl artmaktadır. Bu artış ile birlikte narenciye işleme endüstrilerinde açığa çıkan yıllık toplam atık miktarının da artması beklenmektedir. Narenciye meyvelerinde yaş meyve kütlesinin yaklaşık yarısını atıkların oluşturması ve ülkemizin de önemli narenciye üreticilerinden biri olması açığa çıkan büyük miktardaki atık hakkında fikir vermektedir. Yapısında çeşitli flavonoidler, karotenoidler, diyet lifi, polifenoller, uçucu yağlar, askorbik asit ve bazı eser elementlerin önemli miktarda bulunması bu atıkların ekonomik değerini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte narenciye atıklarındaki yüksek şeker içeriğinin enzim gibi katma değeri yüksek metabolitlerin fermentasyonla üretimi için kullanılabilme potansiyeli son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bu amaçla enzim, organik asit ve etanol gibi pek çok ürünün mikrobiyal üretiminde substrat olarak değerlendirildiği çok sayıda araştırma yapılmış olup farklı fermentasyonlar için kullanım olanakları araştırılmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada ülkemizdeki endüstriyel atıklar içinde önemli bir paya sahip olan narenciye atıklarından portakal kabuğunun substrat olarak kullanılmasıyla poligalakturonaz enzimi üretimleri gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen bu üretimlere ait sonuçların endüstriye aktarılabilir ve gelecek yıllarda yapılacak daha kapsamlı projelere de ışık tutacak nitelikte bir çalışma olduğu düşünülmektedir. Dünyada birçok biyoteknoloji şirketi tarafından üretilen söz konusu

enzim saflaştırıldıktan sonra oldukça yüksek bir fiyatla satışa sunulmaktadır. Ülkemizin de ithal ettiği bu ürünlerin endüstriyel ölçekte üretilmesi hem ülke ekonomisine katkı sağlayabilecek hem de üretici açısından yeni iş alanları oluşabilecek.

Bana bu konuyu araştırma imkânını sağlayan, çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlükleri aşmada yardım ve desteğini esirgemeyen ve ürettiği çözümler ile her zaman ufkumu açan danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim. Araştırma sürecinde tavsiyelerini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet İNAN (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ'a (Akdeniz Üniversitesi Göynük Mutfak Sanatları Meslek Yüksek Okulu) teşekkür ederim. Çalışmanın zaman içerisinde gelişimine katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI ve Dr. Öğr. Üyesi Ziba GÜLEY'e ayrıca teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullandığım mikroorganizmanın tedarikinde yardımcı olan Prof. Dr. Canan TARI (İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) ve Prof. Dr. Hector Marcelo FERNANDEZ LAHORE'a (Jacobs University, Department of Life Sciences and Chemistry, Germany) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Firuze Ergin (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi), Arş. Gör. Fatma ERSÖZ, Ahmet Oktay KÜÇÜKÖZET, Emrah EROĞLU'na teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmalarım boyunca aynı laboratuvar ortamını paylaştığım arkadaşlarım Mustafa GERMEÇ, Ali ÖZCAN, Selime Benemir ERKAN, Hilal Nur GÜRLER, Cansu YILMAZER ve Ahmet HACIOĞLU'na tüm yardımları için teşekkür ederim.

Son olarak, lisansüstü eğitimim boyunca bana her zaman güvenen ve desteklerini esirgemeyen aileme, çalışmalarım sırasında zamanından çok çaldığım hayat arkadaşım Esra Betül KARAHALİL ve kızım Zeynep Vera KARAHALİL'e teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Farklı Besiyeri Bileşimleri ve Fermentasyon Stratejileri Kullanılarak Mikrobiyal Poligalakturonaz Üretiminin Optimizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

03 / 02 / 2020

Ercan KARAHALİL



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Pektik Maddeler ve Moleküler Yapıları.....	3
2.2. Pektinazlar ve Etki Mekanizmaları	5
2.3. Pektinazların Endüstriyel Uygulamaları	5
2.3.1.Meyve sularının durultulmasında kullanımı.....	6
2.3.2.Tekstil endüstrisinde kullanımı	6
2.3.3.Pektik madde içeren atık suların işlenmesinde kullanımı	6
2.3.4.Çay ve kahve fermentasyonlarında kullanımı	7
2.3.5.Kâğıt ve pulp endüstrisinde kullanımı.....	7
2.3.6.Hayvansal yemlerde kullanımı	7
2.3.7.Yağ ekstraksiyonunda kullanımı	8
2.3.8.Tarımsal atıkların sakkarifikasyonu	8
2.4. Mikrobiyal Pektinaz Üretimi ve Kullanılan Mikroorganizmalar	8
2.4.1.Yapılmış çalışmalar	9
2.5. Mikrobiyal Gelişim için Gerekli Unsurlar	12
2.6. Enzim Üretiminde Düşük Maliyetli Substrat Kullanımı.....	13
2.6.1.Portakal kabuğu	13
2.6.2.Keçiboynuzu atığı.....	14
2.7. Fungal Gelişimin Kontrolü ve Yeni Bir Kontrol Yöntemi Olarak MPEC.....	15
2.8. Derin Kültür Fermentasyon Tekniği	18
2.9. Hücre Morfolojisinin Fermentasyon Verimine Etkisi.....	18
2.10.Merkezi Kompozit Tasarım	19
2.11.Ultrafiltrasyon ile Kısmi Saflaştırma	20
2.12.SDS-PAGE Yöntemi ile Moleküler Ağırlık Tayini	21

2.13.Liyofilizasyon.....	21
2.14.Matematiksel Modelleme	22
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal	25
3.2. Mikroorganizma ve İnokülasyonun Hazırlanması	25
3.3. Keçiboynuzu Ekstraksiyonu.....	25
3.4. Çalışmanın Deneme Deseni	26
3.5. Çalkalamalı İnkübatörde Poligalakturonaz Üretimi.....	26
3.6. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde Poligalakturonaz Üretimi.....	27
3.7. Büyük Ölçekli (30-L) Biyoreaktörde Poligalakturonaz Üretimi.....	27
3.8. Mikropartikül Uygulama.....	27
3.9. Poligalakturonaz Aktivitesinin Belirlenmesi	27
3.10.Enzimin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	28
3.11.Enzim Miktarının Aktivite Üzerine Etkisi	28
3.12.Merkezi Kompozit Tasarımla Optimizasyon	28
3.13.Hücre Görüntüleme	29
3.14.Toplam Protein Analizi	29
3.15.Ultrafiltrasyon Denemesi	30
3.16.SDS- PAGE ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi	30
3.17.Liyofilizasyon.....	31
3.18.Farklı Reaktiflerin Enzim Aktivitesine Etkisi	31
3.19.Enzimin Substrat Spesifikliği ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	31
3.20.Termostabilite ve Termodinamik Parametreler.....	31
3.21.Fermentasyonların Modellenmesi ve Farklı Modellerin Karşılaştırılması.....	33
3.22.Enzim Üretimi için Temel bir Maliyet Analizi	36
3.23.İstatistiksel Değerlendirmeler	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Ön Denemeler ve Suş Seçimi.....	37
4.1.1.A. <i>sojae</i> (WT) ile glukoz substratında flask denemeleri.....	37
4.1.2.A. <i>sojae</i> (WT) ile düşük maliyetli substratlarda flask denemeleri.....	37
4.1.3.A. <i>sojae</i> DH56 ile glukoz substratında flask denemesi ve suş seçimi	39
4.2. Besiyeri Bileşimi için Flask Denemeleri.....	39
4.2.1.Farklı karbon kaynakları ile flask denemeleri	39
4.2.2.Farklı azot kaynakları ile flask denemeleri.....	41

4.2.3. Diğer zenginleştirme unsurlarının etkisi.....	42
4.3. Besiyeri Bileşeni Seçimi için Reaktör Denemeleri	43
4.3.1. Reaktörde <i>A. sojae</i> (WT) ve <i>A. sojae</i> (DH56) ile yapılan reaktör denemeleri.....	43
4.3.2. Biyoreaktörde karıştırma hızının enzim üretimine etkisi	44
4.3.3. Biyoreaktörde en iyi 3 azot kaynağı ile enzim üretimi.....	45
4.3.4. Keçiboynuzu ekstraktı ve portakal kabuğu substratında enzim üretimi.....	46
4.4. Mikropartikül Uygulaması ile Biyoreaktörde Enzim Üretimi	47
4.4.1. Portakal kabuğu ve talc ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi	48
4.4.2. Portakal kabuğu ve Al ₂ O ₃ ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi	49
4.4.3. Portakal kabuğu, keçiboynuzu ekstraktı ve talc ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi.....	50
4.4.4. Portakal kabuğu, keçiboynuzu ekstraktı ve Al ₂ O ₃ ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi.....	51
4.4.5. Mikropartikül denemelerine ait enzim üretimlerinin karşılaştırılması	51
4.5. Farklı Başlangıç pH Değerinde Besiyerleri Kullanılarak Biyoreaktörde Enzim Üretimi	52
4.5.1. Başlangıç pH değeri ayarlanmaksızın enzim üretimi	53
4.5.2. Başlangıç pH değeri 4 olan besiyerinde enzim üretimi	54
4.5.3. Başlangıç pH değeri 3 olan besiyerinde enzim üretimi	55
4.5.4. Başlangıç pH değeri 2 olan besiyerinde enzim üretimi	55
4.5.5. Genel değerlendirme.....	57
4.6. Substrat Konsantrasyonu ve Havalandırma Hızının Optimizasyonu	58
4.7. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde Enzim Üretimi ve Matematiksel Modellemesi	61
4.8. Büyük Ölçekli (30-L) Biyoreaktörde Enzim Üretimi ve Matematiksel Modellemesi	65
4.9. Enzimin Karakterizasyonu	70
4.9.1. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi	70
4.9.1.1. Optimum pH	70
4.9.1.2. Optimum sıcaklık	70
4.9.1.3. Optimum inkübasyon süresi.....	71
4.9.1.4. Optimum seyreltme faktörü	72
4.9.1.5. Enzim miktarının aktivite üzerine etkisi	73
4.9.2. Enzimin termostabilitesi	73

4.9.2.1. Farklı sıcaklıklarda depolama	73
4.9.2.2. Farklı Sürelerde Depolama	74
4.9.3. E_a , A, Q_{10} -Değeri, termal inaktivasyon ve termodinamik parametreler	75
4.9.4. Enzimin farklı substratlara ilgisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi	81
4.9.5. Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	82
4.9.6. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi	84
4.10. Ultrafiltrasyon ile Enzimin Kısmi Saflaştırması	84
4.11. Liyofilizasyon	86
4.12. Ekonomik Analiz	87
5. SONUÇLAR	91
6. KAYNAKLAR	93
7. EKLER	110
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
[S]	: Substrat konsantrasyonu
$[S]_0$	: Başlangıç substrat konsantrasyonu
$[S]_L$	: $A_S = A_m/2$ olduğu nokta
A	: İnaktivasyon sıcaklıklarındaki nispi enzim aktivitesi
Abs	: Absorbans
a	: Gecikme fazı geçiş katsayısı
Å	: Angström
A_0	: Nispi başlangıç enzim aktivitesi, Minimum asimptot
A_m	: Maksimum asimptot
A_S	: "S"inci substrat konsantrasyonunda tahmin edilen değerler
A_t	: "t" inci zamanda tahmin edilen değerler
B_t	: Bir geçiş fonksiyonu
d	: Birimsiz bir dizayn parametresi
D	: Denatüre olmuş enzim
Da	: Dalton
dev/dk	: Dakikadaki devir sayısı
E	: Faktör sayısı
e	: Euler sayısı
E_a	: Aktivasyon enerjisi
E_{ia}	: İnaktivasyon enerjisi
g	: Gram
H_t	: Bir geçiş fonksiyonu

h	: Planck sabiti
h_0	: Üretimin ve tüketimin başlangıç fizyolojik durumunu hesaplayan parametre
I	: İnaktif enzim
J	: Joule
K	: Kelvin
K	: Cevap değişkeninin potansiyel maksimum değerine yaklaşma oranını yöneten bir parametre
k_b	: Boltzman sabiti
k_d	: İnaktivasyon hız sabiti
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
L	: Litre
m	: Metre
N	: Toplam deneme sayısı
n	: Gözlem sayısı
nm	: Nanometre
N	: Model parametrelerinin sayısı
N	: Doğal yapıdaki enzim
$^{\circ}Bx$	: Briks
$^{\circ}C$	: Santigrat derece
pH	: Hidrojenin gücü
Q_{10}	: Sıcaklık katsayısı
R	: Üniversal gaz sabiti
R^2	: Belirleme katsayısı
S_0	: Başlangıç substrat konsantrasyonu
T	: Sıcaklık
t	: Süre

$t_{1/2}$	: Yarılanma ömrü
T_L	: $A_t = A_m/2$ olduğu nokta
U	: Ünite
V	: Volt
v	: Şekil parametresi
V_c	: Santrifüjle çöktürme hızı veya tanecik hızı
V_{max}	: Maksimum enzim hızı
β	: Tüketimi, üretimi veya aktiviteyi kaydırma değeri
β_0	: Matematiksel modellemede kullanılan bir sabit
β_t	: Doğrusal katsayı
δ	: Allometrik sabit
ΔG	: Serbest enerji
ΔH	: Entalpi
ΔS	: Entropi
λ	: Gecikme süresi

Not: Tez metninde ondalık yazım olarak nokta (.) kullanımı tercih edilmiştir.

Kısaltmalar

[E] _t	: Toplam enzim
[ES]	: Enzim-substrat kompleksi
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μmol	: Mikromol
3D	: Üç boyutlu
A.Ş.	: Anonim Şirket
a/h	: Ağırlık/Hacim

Abs	: Absorbans
AF	: Kesinlik faktörü
ANOVA	: Varyans analizi
ATCC	: American Type Culture Collection
BF	: Ön yargı faktörü
BKH	: Buğday kepeği hidrolizatı
BSA	: Bovine serum albümin
CMC	: Karboksimetil selüloz
D	: Dekstran
DDT	: Dikloro difenil trikloroetan
D_f	: Seyreltme katsayısı ya da dilüsyon faktörü
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DoE	: Deney tasarımı
Düz. KO.	: Düzeltilmiş kareler ortalaması
Düz. KT.	: Düzeltilmiş kareler toplamı
E.C	: Enzim kodu
GH	: Glikozit hidrolaz
GRAS	: Generally Recognized as Safe
h/h	: Hacim/Hacim
HCl	: Hidroklorik asit
HG	: Homogalakturnan
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IDK	: İyon değişim kromatografisi
J	: Jelatin
JFK	: Jel-filtrasyon kromatografisi

kDa : Kilo dalton

KE : Keçiboynuzu ekstraktı

KT : Kareler toplamı

MAE : Ortalama mutlak hata

MF : Mikrofiltrasyon

mg : Miligram

MGM : Modifiye Gompertz Model

MKT : Merkezi Kompozit Tasarım

mL : Mililitre

MLM : Modifiye Lojistik Model

mM : Milimolar

mm : Milimetre

MMF : Morgan-Mercer-Flodin

MPEC : Mikropartikülle zenginleştirilmiş fermentasyon

MRM : Modifiye Richards Model

MSD : Ortalama standart sapma

MT : Mutant tip mikroorganizma

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NaOH : Sodyum hidroksit

NP : Nükleosit fosforilaz

nm : Nanometre

NRRL : ARS Culture Collection

OFAT : Her-defada-tek-etken

P : Permeat

PAS : Peynir altı suyu

PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi

PDA : Patates dekstroz agar

PG : Poligalakturonaz

PK : Portakal kabuğu

P-PAGE : Preparatif poliakrilamid jel elektroforezi

R : Retentat

RFLP : Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

RG : Ramnogalakturonan

RMSE: Ortalama karesel hata

RNA: : Riboksinükleik asit

RSS : Artık kareler toplamı

s : Saniye

sa : Saat

S : Sukroz

SD : Serbestlik derecesi

SDS : Sodyum dodesil sülfat

SK : Saflaştırma katsayısı

UF : Ultrafiltrasyon

vvm : vessel volume per minute

XOD : Ksantin oksidaz

WT : Doğal tip mikroorganizma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pektinlerin temel yapısı (Venkatanagaraju ve Divakar 2017).....	4
Şekil 2.2. Pektinazların etki mekanizması (Venkatanagaraju ve Divakar 2017).....	5
Şekil 2.3. Mikropartikül ilavesi yapılan ve yapılmayan fermentasyon ortamlarında küflerin gelişimi (Karahalil vd. 2019a).....	16
Şekil 4.1. <i>A. sojae</i> (WT) kullanılarak farklı ekonomik materyallerin substratında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait sonuçlar.....	38
Şekil 4.2. Farklı karbon kaynaklarının denendiği flask denemelerine ait aktivite sonuçları.....	40
Şekil 4.3. Farklı azot kaynakları ile poligalakturonaz denemeleri.....	41
Şekil 4.4. Zenginleştirmenin poligalakturonaz üretimine etkisi.....	43
Şekil 4.5. Biyoreaktörde <i>A. sojae</i> (WT) ve <i>A. sojae</i> DH56 suşları ile yapılan poligalakturonaz üretimleri.....	44
Şekil 4.6. Farklı karıştırma hızları ile gerçekleştirilen poligalakturonaz üretimleri.....	45
Şekil 4.7. En iyi 3 azot kaynağı ile yapılan reaktör denemelerine ait enzim aktiviteleri.....	46
Şekil 4.8. Keçiboynuzu ekstraktı ve portakal kabuğu ile biyoreaktörde enzim üretimi.....	47
Şekil 4.9. Portakal substratı ve talc (5g/L) ile zenginleştirilmiş besiyeri kullanılarak biyoreaktörde enzim üretimi.....	48
Şekil 4.10. Portakal kabuğu ve Al ₂ O ₃ ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimine ait sonuçlar.....	49
Şekil 4.11. Portakal kabuğu, keçiboynuzu ekstraktı ve talc ile zenginleştirilmiş besiyerindeki enzim üretimine ait sonuçlar.....	50
Şekil 4.12. Portakal kabuğu, keçiboynuzu ekstraktı ve Al ₂ O ₃ ile zenginleştirilmiş besiyerindeki enzim üretimine ait sonuçlar.....	51
Şekil 4.13. Mikropartikül denemelerine ait enzim aktivitesi sonuçları.....	52
Şekil 4.14. Besiyeri başlangıç pH değeri ayarlanmaksızın biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar.....	53
Şekil 4.15. Başlangıç pH değeri 4 olan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar.....	54
Şekil 4.16. Başlangıç pH değeri 3 olan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar.....	55
Şekil 4.17. Başlangıç pH değeri 2 olan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar.....	56
Şekil 4.18. Fermentasyonun 48. saatinde pH değeri 2'ye ayarlanan fermentasyona ait sonuçlar.....	57

Şekil 4.19. Farklı başlangıç pH değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması	58
Şekil 4.20. Farklı pH koşullarında enzim aktivitesinin değişimi.....	70
Şekil 4.21. Farklı sıcaklıklara göre enzimdeki aktivite değişimi.....	71
Şekil 4.22. Farklı inkübasyon sürelerinde enzim aktivitesinin değişimi	72
Şekil 4.23. Farklı seyreltme faktörlerine göre enzim aktivitesinin değişimi	72
Şekil 4.24. Enzim miktarının poligalakturonaz aktivitesi üzerine etkisi	73
Şekil 4.25. Farklı sıcaklıklarda depolamanın poligalakturonaz aktivitesine etkisi.....	74
Şekil 4.26. Farklı sürelerde depolamanın poligalakturonaz aktivitesine etkisi	75
Şekil 4.27. Birinci derece kinetik model enzimatik reaksiyonların Arrhenius grafiği (a: Aktivasyon enerjisi (Ea), b: İnaktivasyon enerjisi (Eia))	77
Şekil 4.28. Enzimin farklı konsantrasyonlardaki substratlarda gösterdiği aktivite değişimi	81
Şekil 4.29. SDS-PAGE analiz sonucu, P: Permeat, R: Retentat, Ham: Fermente besiyeri ve M: Marker	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı fermentasyon koşullarında pektinaz üretimleri.....	10
Çizelge 2.2. Literatürden seçilen MPEC uygulamalı fermentasyonlar.....	17
Çizelge 3.1. Temel besiyeri	27
Çizelge 3.2. Merkezi kompozit tasarımında kullanılan limit değerler.....	29
Çizelge 3.3. Merkezi kompozit tasarımı için oluşturulan deneme deseni	29
Çizelge 3.4. Üretimin matematiksel modellenmesinde kullanılan model tipleri ve hesaplamalarda kullanılan denklemler	34
Çizelge 3.5. Model validasyon değerlerinden AF ve BF'nin yorumu için güven seviyeleri	36
Çizelge 4.1. <i>A. sojae</i> (WT) ile glukoz substratında yapılan denemelere ait sonuçlar.....	37
Çizelge 4.2. <i>A. sojae</i> (DH56) ile glukoz substratında gerçekleştirilen denemeye ait sonuçlar	39
Çizelge 4.3. Merkezi kompozit tasarımı ile oluşturulan deneme desenine ait sonuçlar	59
Çizelge 4.4. Varyans analiz (ANOVA) sonuçları.....	59
Çizelge 4.5. Merkezi Kompozit Tasarım ile yapılan optimizasyonun doğrulama denemesine ait sonuçlar	60
Çizelge 4.6. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel enzim aktivite değerleri ve enzim aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri.....	61
Çizelge 4.7. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde deneysel enzim üretim verilerinin modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılması	62
Çizelge 4.8. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen enzim üretiminin matematiksel modellemesi.....	64
Çizelge 4.9. Model validasyon değerlerinden AF ve BF'nin yorumlanması için güven seviyeleri	64
Çizelge 4.10. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde denemeye ait aktivite değerleri.....	65
Çizelge 4.11. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde deneysel enzim enzim aktiviteleri ve aktivitelerin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri.....	66
Çizelge 4.12. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde deneysel enzim üretim verilerinin modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılması	67
Çizelge 4.13. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen enzim üretiminin matematiksel modellemesi	69
Çizelge 4.14. Birinci derece kinetik modele uygun enzimatik reaksiyonun sonuçları	76
Çizelge 4.15. Sıcaklığın 10°C artmasıyla enzimin Q_{10} -değerlerinin değişimi.....	79
Çizelge 4.16. Poligalakturonazın kinetik ve termodinamik parametreleri	80

Çizelge 4.17. Poligalakturonazın farklı substratlarda hesaplanan kinetik parametreleri	82
Çizelge 4.18. Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi	83
Çizelge 4.19. UF denemelerinden elde edilen solüsyonlarda protein miktarı ve spesifik aktivite tayini	85
Çizelge 4.20. Liyofilizasyona tabi tutulan ultrafiltrasyon örneklerine ait analiz sonuçları	86
Çizelge 4.21. Fermentasyon öncesi ve sonrasında kullanılan hammadde, sarf ve kimyasalların maliyetleri.....	88
Çizelge 4.22. Fermentasyon öncesi ve sonrasında gerçekleştirilen işlemlerin enerji maliyetleri	89



1. GİRİŞ

Enzimler, herhangi bir reaksiyonu hızlandıran katalitik etkiye sahip protein bazlı makromoleküllerdir. Reaksiyona girdikleri substrata yüksek düzeyde spesifiklik gösteren enzimler substratlara etki mekanizmasına bağlı olarak rastgele ya da terminal uçlardan başlamak üzere etki ederler ve rastgele olanlar endoenzimler, terminal uçlardan etki edenler ise ekzo enzimler olarak adlandırılırlar. Gıda, yem, madencilik, deterjan ve kâğıt üretim prosesleri başta olmak üzere endüstrinin farklı kollarında çok geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimlerin kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldığında birçok üstünlüğü bulunmaktadır (Dubey vd. 2019). Daha spesifik ve çevre dostu olmasının yanında enerji tasarrufu da sağlaması enzimatik katalizi kimyasal yöntemler karşısında daha avantajlı bir konuma getirmiştir. Bitki, hayvan ve mikroorganizma gibi farklı biyolojik kaynaklardan elde edilebilen enzimlerin endüstriyel amaçlı kullanımlar için gereken özellikte ve yüksek miktarda eldesi mikrobiyal kaynaklardan sağlanabilmektedir. Ayrıca üretim kolaylığı açısından ve fizikokimyasal özellikleri daha iyi olan bir enzimin üretimi için de mikrobiyal kaynaklar tercih edilmektedir.

Pektinazlar, yaygın olarak bitkilerin orta lamelinde ve primer hücre çeperinde bulunan kompleks heteropolisakkaritlerin (pektin ve pektik maddeler) parçalanmasından sorumlu bir kolektif enzim grubudur (Fratebianchi vd. 2018). Ayrıca pektinazlar bazı meyveler başta olmak üzere yüksek bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmakta ve doğal olgunlaşma süreçlerinde pektik materyallerin modifikasyonunda yer almaktadırlar. Meyvelerde en fazla bulunan bileşen olan glikozidik bağları parçalama, dallanmayı giderme veya değiştirme yeteneğine sahiptirler. Pektinaz grubu enzimler de-esterifiye edici enzimler (pektin esterazlar), depolimerize edici enzimler (hidrolazlar ve liyazlar) ve protopektinazlar şeklinde reaksiyon mekanizmaları ve pektik materyallerin galakturonan yapısına etkisine göre sınıflandırılırlar. Genel olarak sınıflandırılmaları pektat liyazlar (EC 4.2.2.2), pektin esterazlar (EC 3.1.1.11) ve poligalakturonazlar (EC 3.2.1.15) olmak üzere üç alt kategoride yapılmaktadır. Bu çalışmada üretilen poligalakturonaz, homopoligalakturonan omurgasında α -1,4-glikozidik bağlarının hidrolizini katalize eden depolimerize edici bir pektinazdır (Nakkeeran vd. 2012).

Fermentasyon tekniği ile enzim üretimine yönelik yapılan güncel çalışmaların odak noktalarından birisi de düşük maliyetli substrat kullanımı ile düşük maliyetli enzim üretimi olmuştur. Düşük maliyetli substratların kullanılması fermentasyonun proses maliyetini düşürmekle birlikte atıkların çevreden uzaklaştırılmasıyla ilgili sorunları da ortadan kaldırır. Özellikle tarım ve gıda endüstrisinde açığa çıkan karbon ve azot içeriği bakımından zengin atıklar araştırmacılar tarafından fermentasyon besiyerinde değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Endüstride açığa çıkan atıklar arasında ülkemizde ve dünyada yıllık olarak en yüksek miktara sahip materyallerden biri de portakal kabuğudur. Dünyada yıllık portakal üretimi yaklaşık 51 milyon ton, önemli bir portakal üreticisi konumunda olan ülkemizde ise 4.3 milyon ton olarak tespit edilmiş olması açığa çıkan kabuk miktarı hakkında bir fikir verebilir (TAGEM 2018). Portakal kabuğu gibi atıkların elden çıkarılması, hayvan yemi ya da pektin ön maddesi olarak değerlendirmek amacıyla kabuğun soyulması endüstri için zorluk teşkil etmektedir. Alternatif bir kullanım alanı olarak, yapısında galakturonik asit içeriği cinsinden yaklaşık %23 pektin bulunan portakal kabuğu poligalakturonaz üretiminde bir süredir

değerlendirilmektedir (Fratebianchi vd. 2017; Rodríguez-Fernández vd. 2011). Bu çalışmada da portakal kabuğu fermentasyon besiyerinde substrat olarak kullanılmıştır.

Fermentasyonların gerçekleştirildiği biyoreaktör gibi sistemlerden elde edilen veriler arasındaki ilişkiler dizisini açıklamak amacıyla bazı matematiksel modeller kullanılmaktadır. Yeni gelişmelere bağlı olarak biyoteknoloji ve biyoproses mühendisliği alanlarında hem nicelik hem de nitelik bazında önemli bir veri artışı olmuştur. Ancak bu verilerin anlamlı hale getirilebilmesi için veriler arasındaki ilişkiler ağının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli yazılım araçları kullanılmaktadır. Öte yandan, fermentasyon çalışmalarında üretimin modellenmesi araştırmacılara pek çok kolaylık sağlamaktadır. Farklı matematiksel modeller ile tahmin edilen değerler ile suş seçimi, substrat tercihi gibi kararlar daha kolay verilebilmektedir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Farklı fermentasyon proseslerinde üretici olarak kullanılan mikroorganizma gruplarından biri de küflerdir. Oldukça verimli sonuçlar verdiği bilinen başta *Aspergillus* cinsi olmak üzere çok sayıda küf, katı ve sıvı kültür tekniklerinde kullanılabilir. Fermentasyon ortamının kontaminasyona karşı daha kolay kontrol edilebilmesi, fermentasyon sonrası daha az işleme ihtiyaç duyması gibi üstünlükleri olan sıvı kültür fermentasyonlarının küf uygulamalarında ise bazı dezavantajları bulunmaktadır. Aşırı hücresel gelişim funguslar ile gerçekleştirilen fermentasyon çalışmalarında karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. Fungal türlerin besiyeri ortamında aşırı gelişiminin ısı-kütle-oksijen transferinin homojenitesini ve hücre duvarından substrat geçişini olumsuz etkilediği bilinmektedir (Karahalil vd. 2019a). Bu sorunu aşmak için fermentasyon parametrelerinde değişikliklerin yapıldığı uygulamalar ile birlikte güncel teknikler de kullanılmaktadır. "Mikropartikülle zenginleştirilmiş gelişme ortamı" (MPEC) tekniği güncel yöntemler arasında en dikkat çekicilerinden birisidir. İnorganik nano ve mikropartiküllerin ipliksi mikroorganizmaların gelişme morfolojisi üzerine geniş bir etkiye sahip olduğu pek çok çalışma ile ortaya konulmuştur (Karahalil vd. 2019a).

Farklı substratlar ile poligalakturonaz üretimine yönelik literatürde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, MPEC tekniği ile fermentörde poligalakturonaz üretiminin incelenmesine yönelik bir araştırmanın yapılmadığı ve üretimin matematiksel modellenmesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışmanın olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasının düşük maliyetli poligalakturonaz üretimine katkı sağlayacağı ve gelecekte yapılacak pilot ölçekli ve daha kapsamlı çalışmalara ışık tutucu nitelikte verilerin elde edildiği düşünülmektedir.

2. KAYNAK TARAMASI

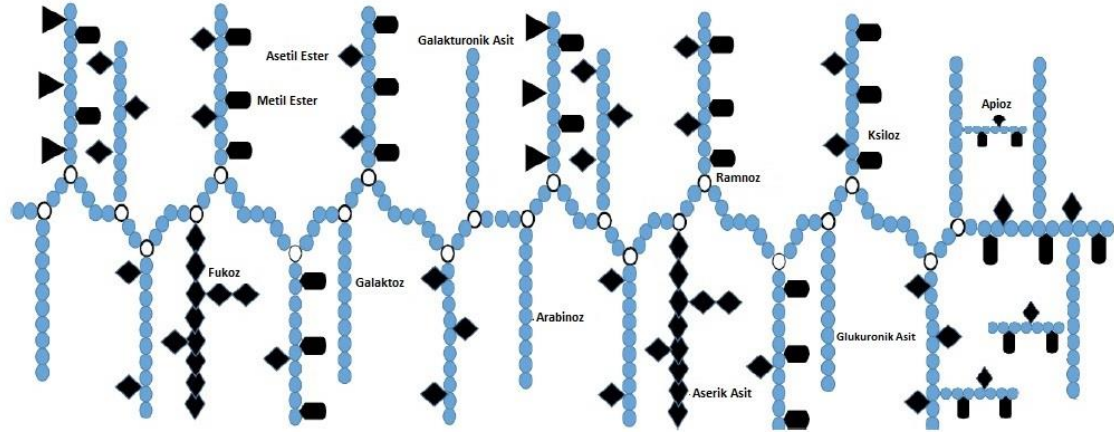
2.1. Pektik Maddeler ve Moleküler Yapıları

Pektik maddeler, bitkilerde meydana gelen ya da bitkilerden hazırlanan, yüksek miktarda anhidro-galakturonik asit birimi içeren karmaşık kolloidal karbonhidratlar için kullanılan bir grup tanımıdır. Bitkisel dokularda pektik maddelerin gelişimi tüm çekirdeklerin bölünmeye başladığı bir zamanda ortaya çıkmaktadır (Allen 1901). Pektin içeren bir zar, hücreyi iki parçaya bölerken, orta tabakada pektik madde ile selülozik membranlar oluşur. Bitki hücrelerinin orta lamelinde pektin varlığını gösteren ilk kişi Mangin (1888)'dir (Bonner 1936). Pektik maddeler üzerine yapılan araştırmalar ilk zamanlar rutenyum kırmızısı ile boyamaya dayanıyordu. Bunun yanında bitkilerde pektinin yerini tespit etmek için in situ hidroksamik asit testi de kullanılmıştır (McCready ve Reeve 1955). Ancak, ince yapıya sahip olan hücre duvarının ortaya çıkması elektron mikroskobu çalışmaları ile mümkün olmuştur (Frey-Wyssling 1948). Pektik maddelerin, istisnasız olarak tüm fotosentetik yeşil bitkilerin hücre duvarlarında ve hücreler arasında bulunduğu bilinmektedir.

Son 20 yıldan bu yana farklı birçok meyvedeki pektin yapısı üzerine yapılan araştırmalar, farklı kaynaklardaki pektinlerin yapı ve kompozisyonlarının çok değişken olduğunu göstermiştir (Nighojkar vd. 2019). Chan vd. (2017) ticari pektin üretiminde elma püresi, narenciye kabuğu, şeker pancarı küspesi, muz kabuğu, mango kabuğu, karpuz kabuğu, domates kabuğu, ayçiçeği kabuğu, papaya kabuğu, tutku meyvesi kabuğu, erik tozu, sisal atıkları gibi çeşitli meyve kaynaklarının kullanıldığını ve içerdikleri pektin miktarının %1.8 (kolza keki) ile %83.5 (domates kabuğu) arasında değiştiğini bildirmiştir. Öte yandan, aktif olarak büyüyen genç bitki dokuları, pektin bakımından yüksektir. Pektik maddeler 1950'li yıllarda, bazı arabanlar ve galaktanlar ile birlikte temel olarak galakturonandan oluşan bir polisakkarit üçlüsü olarak kabul edilmiştir (Nighojkar vd. 2019). Pektik polisakkaritlerin ana üronid zincirini α - (1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağlar ile birleştirilmiş D-galakturonik asit birimleri oluşturmaktadır. Ramnoz, (1 $\rightarrow$ 2) bağlarla uronidin indirgeyici ucuna ve (1 $\rightarrow$ 4) bağlarla bir sonraki üronit ünitesinin indirgenmeyen ucuna bağlanır, aksi halde düz zincirde bir bükülme meydana getirir. Bununla birlikte, ramnozun mol yüzdesi pektin kaynağına bağlı olarak değişmektedir (Ryden ve Selvendran 1990). Genellikle, arabinan, galaktan veya arabinogalaktan yan zincirleri (1 $\rightarrow$ 4) ramnoza bağlanır. Bunlara ek olarak, Şekil 2.1'de görüldüğü gibi, yan zincirlerde D-glukuronik asit, L-fruktoz, D-glukoz, D-mannoz ve D-ksiloz gibi başka şekerler de bazen bulunabilmektedir (Venkatanagaraju ve Divakar 2017).

Atmodjo vd. (2013) yaptıkları bir derleme çalışmasında üç ana pektik polisakkarit olan homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan-I (RG-I) ve ramnogalakturonan-II (RG-II) 'yi yapısal olarak detaylı bir şekilde açıklamıştır. Pektinin yaklaşık %65'i (α -1,4) bağlı D-galakturonik asitlerin bir homopolimeri olan HG'dir. Altıncı konumdaki kısmi metil esterifikasyonu, O₂ ve O₃ konumundan daha az asetile HG verir. RG-II, bir oktasakaritin yan zinciri ile ikame edilmiş bir HG temel yapısına (backbone) ve HG temel yapısı üzerinde O₃'e bağlı bir O₂ ya da disakkarite bağlı bir monosakarite sahiptir. RG-II, pektinin %10'unu oluşturur ve pektinin %20-25'ini oluşturan RG-I ile karşılaştırıldığında yapısal olarak daha karmaşık ve korunmuş bir yapısı vardır. RG-I, yüksek asetillenmiş

(O₂ veya O₃) galakturonik asit kalıntılarını tekrarlayan bir yapıdadır. Ayrıca yapısal veriler, HG, RG-I ve RG-II'nin, hücre duvarı içinde birbirine bağlı bir pektin yapısı oluşturan temel yapısı sayesinde kovalent bağlarla bağlandığını göstermektedir (Venkatanagaraju ve Divakar 2017). Bununla birlikte, doğal pektinin tüm yapısı hücre duvarından henüz izole edilmemiştir.



Şekil 2.1. Pektinlerin temel yapısı (Venkatanagaraju ve Divakar 2017)

Pektik maddeler, özellikle metanol ile kısmen esterlenmiş olan büyük miktarlarda karboksil gruplarının varlığından dolayı kimyasal özellikler açısından diğer polisakkaritlerden farklılık gösterir. Esterifikasyon derecesi/metoksil içeriği, pektin kaynağına ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine göre değişebilir. Poligalakturonik asidin yapısındaki tüm karboksil grupları esterleştiğinde metoksil içeriği %16.32, dolayısı ile esterleşme derecesi de %100 olur. Bununla birlikte, karboksil gruplarının bazıları serbest asitlerdir ve bir kısmı da çeşitli iyonlarla nötrleştirilir. C₂ veya C₃ üzerindeki bazı hidroksil gruplarının %0.18-2.5 oranında asetillenmesi sağlanabilir (McComb ve McCready 1957).

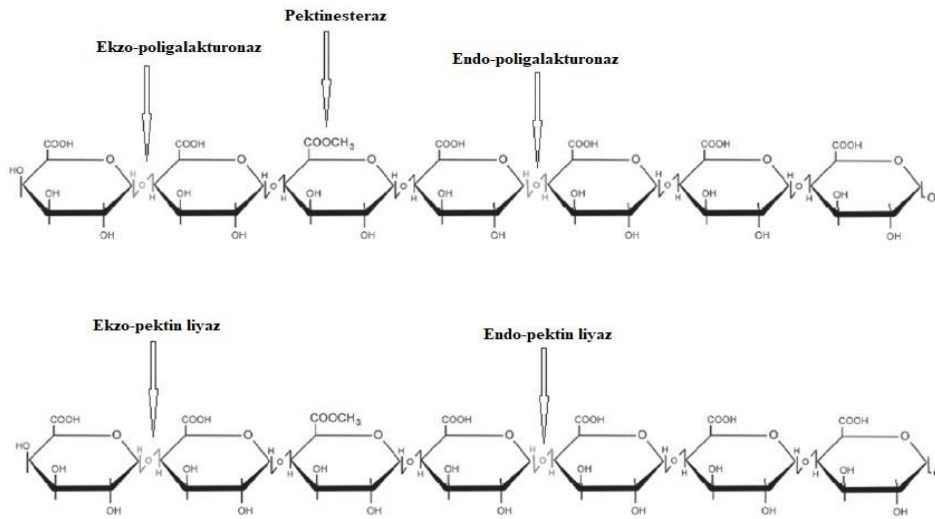
Yapılan bazı çalışmalarda çeşitli kaynaklardan elde edilen pektik polisakkaritlerin moleküler ağırlığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda turuncgillerin moleküler ağırlığı, 23000-71000 Dalton; elma, erik ve armut, 25000-35000 Dalton; elma ve limonun 200000-360000 Dalton olduğu bildirilmiştir. Değerler, ekstraksiyon işlemine ve moleküler ağırlık tayin yöntemine bağlı olarak değişebilmektedir. Pektin çözeltileri, polimerizasyon derecesine bağlı olan yüksek pozitif optik rotasyona sahiptir. D-galakturonik asitin spesifik rotasyonu (α^{20}) +51.7° iken pektik polisakkaritlerinki yaklaşık +235°'dir (Nighojkar vd. 2019).

Gelişim ve farklılaşma sırasındaki pektin yapısının değişimi ve çevresel uyarılara karşı cevabı konusundaki bilgi birikimi sürekli artmaktadır. Bununla birlikte, pektik polisakkaritlerin, bitkisel dokularda hücre gücü, hücre adezyonu, stoma fonksiyonu ve savunma cevabı konusunda önemli bir rol oynadığını belirtmek gerekir (Caffall ve Mohnen 2009). Ayrıca bu polisakkaritlerin, sanayi ve tıp alanında yapılarındaki modifikasyona göre değişen farklı uygulama tipleri bulunmaktadır (Amin vd. 2019).

2.2. Pektinazlar ve Etki Mekanizmaları

Bitkisel dokulardaki hücre duvarlarının oluşumunda önemli bir rol oynayan, çekirdeği selüloz ve hemiselülozla tamamlayarak hücresel yapıya güç ve bütünlük kazandıran pektini indirgeyen pektinazlar, hidrolaz grubu enzimlerdendir (Fratebianchi vd. 2018). Bunun yanında, pektinazlar bitkisel dokularda yaygın bir şekilde bulunmakta ve meyve sebzelerin doğal olgunlaşma süreçlerinde pektik materyallerin modifikasyonunda rol oynamaktadırlar. Pektik bileşenlerdeki glikozidik bağlara etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler (Nakkeeran vd. 2012).

Pektinaz grubu enzimler pektik maddeler üzerinde farklı etki mekanizmalarına sahiptir (Şekil 2.2). Ekzo-poligalakturonazlar, PGA zincirinin indirgeyici olmayan ucundan başlayarak monomerler ya da dimerleri serbest hale getirir. Ayrıca poligalakturonazlar endo-pektinliyzazlar ve pektin esterazlar ile kombine edilerek yüksek oranda metillenmiş pektinler parçalanabilmektedir (Sharma vd. 2013).



Şekil 2.2. Pektinazların etki mekanizması (Venkatanagaraju ve Divakar 2017)

İlk ticari uygulaması 1930'da elma suyunun berraklaştırılması ile gerçekleştirilen pektinazların daha sonraki yıllarda kullanım alanı oldukça genişlemiş ve günümüzde de artmaya devam etmektedir. Küresel gıda ve içecek piyasasındaki %25'lik payıyla pektinazlar enzim pazarında önemli bir yere sahiptir. 2016 yılında 30 milyon dolar seviyesine çıkan piyasa değerinin 2021 yılında 35.5 milyon dolara çıkması beklenmektedir (Amin vd. 2019). Doğal ve rekombinant pektinazlara yönelik artan bu küresel talep, suş gelişimi, genetik mühendisliği, metagenomik çalışmalar, alan hedefli mutajenez, yönlendirilmiş evrim ve besiyeri mühendisliğindeki gelişmeler ile de yakından ilişkilidir (Amin vd. 2019).

2.3. Pektinazların Endüstriyel Uygulamaları

Pektinazlar endüstride geniş kullanım alanına sahip enzim gruplarından biridir. Bilinen belli başlı kullanım alanları aşağıda sunulmuştur.

2.3.1. Meyve sularının durultulmasında kullanımı

Meyve suyunun jelatinimsi yapısı meyve suyunun ekstraksiyonunda bazı zorluklara neden olmaktadır. Pektolitik enzimler, uygulandıkları meyve pulpundaki pektini parçalayarak viskoziteyi düşürmekte ve kolay işlenmesini sağlamaktadır. Mekanik ekstraksiyona nispeten % 90'dan fazla verim sağlayabilen söz konusu enzimler meyve sularının maserasyonunda ve çözündürülmesinde de önemli rol oynamaktadır. Meyve sularında pektik bileşenlerin indirgenmesi ya da uzaklaştırılması amacıyla uygulanan geleneksel yöntem birkaç adımdan oluşmaktadır. Bunlar, süspanse katıları uzaklaştırmak için santrifüj, depektinizasyon için enzim uygulama, bulanıklığı gidermek için bentonit ve jelatin gibi ajanlar ekleme ve son olarak bu ajanları uzaklaştırmak için diatome toprağıyla filtrasyondur. Meyve suyu, membran teknolojisi ile önce depektinizasyon sonra da ultrafiltrasyon ya da mikrofiltrasyon uygulanarak durultulabilir. Ağırlıklı olarak elma suyu hazırlamada kullanıldığı bildirilmektedir (Arunachalam ve Asha 2010; Rebello vd. 2017).

2.3.2. Tekstil endüstrisinde kullanımı

Kumaşa iplik dokuma yapılmadan önce dokuma sırasında yıpranmadan korumak ve rahat hareket etmesini sağlamak için çözgü iplikleri bir boyutlandırma ajanı ile kaplanmaktadır. Geçmiş yıllardan beri pamuklu kumaşlar için mükemmel film oluşumu, uygunluk ve düşük maliyetinden dolayı nişasta kullanılmaktadır. Ancak daha sonra kumaştan nişastanın uzaklaştırılmasında kullanılan kimyasal işlem tamamen etkili olmamaktadır (Arunachalam ve Asha 2010). Ayrıca kimyasal yöntemlerle gam gidermenin çevresel kirliliğe neden olması, alternatif bir yöntem olarak pektinaz kullanımını öne çıkarmaktadır. Özellikle ksilanaz ile birlikte kullanıldığında biyolojik olarak çözünmeyen kirleticilerin neden olduğu kirlilik için pektinazlar çevre dostu ve ekonomik bir çözüm olabilmektedir (Sharma ve Satyanarayana 2012). Rami, keten ve hint keneviri gibi liflerin yumuşatılmasında ve istenmeyen mumsu yapıların uzaklaştırılmasında alkalın pektinazlar kullanılmaktadır (Liao 1989). Uygulandığı bitkisel liflere zarar vermeyen bu enzimatik uygulama aynı zamanda düşük enerji gereksinimi ile çevre dostudur (Gurucharanam ve Deshpande 1986). Bu nedenle birçok araştırmacı tarafından pamuk temizliği için en uygun enzim grubu olarak kabul edilmiştir (Tzanov vd. 2001; Wang vd. 2007). Yapılan bir çalışmada, pamuğun farklı enzim kombinasyonlarıyla işlenmesi sırasında yeterli ıslanabilirlik ve emiciliğin selülaz + pektinaz ve selülaz + pektinaz + proteaz kombinasyonları ile elde edildiği bildirilmiştir (Karapinar ve Sariisik 2004).

2.3.3. Pektik madde içeren atık suların işlenmesinde kullanımı

Turunçgil işleme endüstrisinde açığa çıkan pektik madde içeren atık suların geri kazanımı için işlenmesine yönelik prosedürler birkaç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; metan oluşumuna neden olan fiziksel su giderme, kimyasal koagülasyon, doğrudan aktif çamur uygulama ve kimyasal hidroliz şeklindedir. Ancak bu uygulamalar, uzun süre gerektirdiği ve maliyetli olmasının yanında kullanılan kimyasalların kirlilik oluşturmaları gibi dezavantajlara da sahiptir. Bundan dolayı alternatif bir yöntem olarak mikrobiyal pektinazlar pektik bileşenlerin atık sulardan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Sebze işleme endüstrisinde pektik madde içeren bu atık suların alkali

pektinazlar ya da alkali pektinolitik organizmalarla ön işleme kararlı materyalleri uzaklaştırmakta ve aktif çamur uygulaması ile dekompoze etmektedir (Rebello vd. 2017).

2.3.4. Çay ve kahve fermentasyonlarında kullanımı

Pektinazlar, çay fermentasyonlarını hızlandırmakta ve instant çay tozlarının köpük oluşumunu engellemektedir (Pasha vd. 2013; Praveen ve Suneetha 2014). Poligalakturonaz, çay kalitesini artırmak için yaygın olarak kullanılır. Fermentasyon sırasında çayın rengindeki değişim, aynı zamanda karakteristik aromanın gelişimini de sağlamaktadır (Thakur ve Gupta 2012). Ayrıca pektolitik mikroorganizmalar kahve çekirdeklerindeki yapışkan kabuğun (musilaj) uzaklaştırılmasında ve pektik maddeler içeren fasulye kabuğunun uzaklaştırılmasında kullanılabilmektedir (Arunachalam ve Asha 2010).

Kahve ve çay fermentasyonunda genellikle *Bacillus* türü bakteriler tarafından üretilen alkalın pektinazlar kullanılmaktadır (Pedrolli vd. 2009). Yapılan ilginç bir çalışmada, substrat olarak kahve posasının kullanıldığı bir fermentasyonda üretilen pektinaz ile kahve posasında musilaj giderilmesi üzerinde çalışılmış, bu uygulama kahve endüstrisi için de hem ekonomik, hem de katma değeri olan atık geri dönüşümünü gösteren bir uygulama olmuştur (Murthy ve Naidu 2011).

2.3.5. Kâğıt ve pulp endüstrisinde kullanımı

Biyoteknolojideki gelişmeler sonucunda, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinin biyo-ağartma için enzimlerin kullanımına olan bağımlılığı arttıkça, bu endüstrilerde ksilanaz, ligninaz, mannanaz ve pektinaz gibi enzimlerin kullanımı artmaktadır (Bajpai 1999; Kirk ve Jeffries 1996). Pektinlerin varlığı, yüksek katyonik istekleri nedeniyle kâğıdın oluşumunda kurumayı zayıflatır ve kâğıdın sararmasına neden olur. Pektinazlar PGA'ları depolimerize eder ve böylece süzöntüdeki katyonik isteği, termo-mekanik kâğıt hamurunun peroksit ağartmasını azaltır (Viikari vd. 2000). Tek başına ya da farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen diğer enzimlerle (mannanazlar, ksilanazlar, ligninazlar vb) kombinasyonu halinde pektinazlar, karışık sert ağaç ve bambu kraft hamurlarının biyolojik olarak ağartılması için etkili bir şekilde kullanılmıştır (Ahlawat vd. 2008; Dhiman vd. 2009; Kaur vd. 2010). Ayrıca ağartma kimyasallarındaki azalmanın atık sularındaki organoklorlu bileşiklerin azalmasını sağladığı bildirilmiştir. Bir diğer uygulama alanı olarak ambalaj kâğıdı hamurunun biyolojik olarak ağartılması ve mürekkebin uzaklaştırılması, atık suyun tahliye edilmeden önce biyolojik ve kimyasal oksijen ihtiyacının azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Singh vd. 2012).

2.3.6. Hayvansal yemlerde kullanımı

Kümes hayvanları ve diğer hayvanların yemlerinde çeşitli enzimlerin kullanımı 1980'li yılların başında denenmeye başlanmıştır. Enzim kullanımının ilk ticari başarısı arpaya dayalı besleme diyetlerinde β -glukanaz ilavesidir. Besleme enzim preparatları genellikle pektinazlar, glutanazlar, ksilanazlar, proteinazlar ve amilazları içeren enzim karışımlarıdır. Enzim ilavesi viskoziteyi azaltır ve besin öğelerinin absorpsiyonunu artırır. Ayrıca parçalanmayan lifleri hidrolize ederek ya da söz konusu liflerdeki yapısal unsurları bozarak besin maddelerinin serbest kalmasını sağlar, yüzey miktarını azaltır.

Yemdeki enzim kullanımının önemli etkilerinden biri de net hayvan ağırlığını artırmak olmuştur (Praveen ve Suneetha 2014; Rebello vd. 2017).

2.3.7. Yağ ekstraksiyonunda kullanımı

Bitkisel yağ üretiminde ham yağ eldesi potansiyel bir kanserojen olan hekzan gibi organik çözücülerin kullanıldığı ekstraksiyonlar ile yapılmaktadır. Pektinazların, ayçiçeği (Kashyap vd. 2001), turunçgil (Scott 1978), zeytinyağı (Ortiz vd. 2017), keten tohumu (Kulkarni vd. 2017), hurma (Mehanni vd. 2017), gibi çeşitli kaynaklardan yağ eldesindeki kullanışlılığı geniş çapta incelenmiştir. Pektinaz muamelesi düşük yağ asitleri, peroksit değeri ve renk yoğunluğu ile organik olarak ekstrakte edilen yağlardan daha üst kalitede yağ vermektedir (Mehanni vd. 2017). Bununla birlikte polifenolik madde ve E vitamini içeriğini arttırabilmektedir (Iconomou vd. 2010). Ayrıca, fosfolipitlerin katı fazda tutulması, rafinasyon maliyetini düşürmektedir. Zeytinyağı üretiminde ekstraksiyon dışında zeytin taşılama işlemi sırasında da eklenen enzimler daha sonraki aşamalarda ayırma işlemleri ile kolayca zeytinden uzaklaştırılabilmektedir (Arunachalam ve Asha 2010).

2.3.8. Tarımsal atıkların sakkarifikasyonu

Pektinazlar ayrıca pektik bileşen içeriği bakımından zengin tarımsal atıklarda bulunan pektini hidrolize etmek için biyorafinerilerde de kullanılmaktadır (Biz vd. 2014). Bu atıklar basit şekerler halinde işlenerek biyoetanole dönüştürülebilmekte ya da fermente edilebilir şekerler olarak kullanılabilir (Collares vd. 2012; Hossain vd. 2011). Biyokütlenin enzimatik hidrolizi, toksik atık açığa çıkarmaması ve ekonomik olarak uygulanabilir olduğu için etkili bir işlem olarak gösterilmektedir (Rebello vd. 2017).

2.4. Mikrobiyal Pektinaz Üretimi ve Kullanılan Mikroorganizmalar

Endüstriyel enzimlerin, %50'si fungus ve maya, %35'i bakteriyel ve %15'i bitki veya hayvansal kökenlidir (Anisa ve Girish 2014). Mikrobiyal kaynaklar arasında önemli bir paya sahip olan fungal organizmaların endüstriyel ölçekli enzim üretimindeki verimliliği araştırmacıların fungal türler üzerine yoğunlaşmasına sebep olmuş ve ticari enzimlerin üretimi için kapsamlı araştırmalar yapmaya sevk etmiştir (Amin vd. 2019; Garg vd. 2016). Bitkilerin ürün (meyve, sebze vb.) olgunlaşma sürecinde doğal olarak bulunmasına rağmen bitkisel materyallerden pektinaz eldesinin mevsimsel sınırlamalar ve zayıf biyokimyasal özellikler gibi dezavantajları nedeni ile mikrobiyal kaynaklar daha fazla öne çıkmıştır. Bunun dışında, endüstriyel kullanım için gereken özellikteki enzimlerin üretimi bakım ve üretim kolaylığı, büyük ölçekli üretim, daha az yan ürün oluşumu, yüksek aktivite eldesi, düşük maliyet, yüksek stabilite, yüksek saflıkta üretilebilirlik gibi üstünlüklerinden dolayı mikrobiyal kaynaklar ile mümkün olmaktadır. Mikrobiyal pektinazların çok yönlülükleri, geniş substrat özgüllükleri, uyarılabilirlikleri (inducibility) ve çok çeşitli pektik maddelere etki etme kabiliyetleri biyoteknolojik açıdan büyük bir potansiyel olmalarının diğer nedenleri olarak bildirilmiştir (Coskun 2010).

Pektinolitik organizmalar çürümüş meyvelerin duvarı, toprak, çürüyen tarımsal atıklar ve hayvanlar gibi pek çok kaynaktan izole edilebilmektedir. Başlıca pektinaz

üreten mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Actinomycetes* ve *Streptomyces* gibi çeşitli bakteriler bulunmaktadır. Ticari pektinaz üretiminde kullanılan en önemli mikroorganizma gruplarından biri de, başta *Aspergillus* türleri olmak üzere ipliksi funguslardır. Örneğin, *Aspergillus niger* iyi bir pektinaz kaynağıdır. *A. niger* dışında mikrobiyal pektinaz üretimi için en fazla tercih edilen fungal organizmalar ise *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium jensenii*, *Penicillium citrinum* ve *Trichoderma viride* şeklinde sıralanabilir (Rebello vd. 2017). *Aspergillus* cinsi mikroorganizmaların pektinaz üretiminde sıkça tercih edilmesinde GRAS statüye sahip olmalarının etkili olduğu bilinmektedir (Naidu ve Panda 1998). Literatürde farklı *Aspergillus* türleri kullanılarak pektinaz üretiminin yapıldığı pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Poligalakturonazların üretiminde de genellikle karakteristik olarak yüksek aktivite gösteren *Aspergillus* cinsine ait mantarlar kullanılmaktadır. Bu cinsin, *Aspergillus japonicus* (Teixeira vd. 2000), *Aspergillus awamori* (Blandino vd. 2002), *Aspergillus nidulans* (MacCabe vd. 2002), *Aspergillus oryzae* (Fontana ve da Silveira 2012), *Aspergillus niger* (Sandri vd. 2013), *Aspergillus sojae* (Tari vd. 2008) ve *Aspergillus fumigatus* (Baffi vd. 2012) gibi farklı türleri pektinolitik enzimlerin üretiminde değerlendirilmiştir. Bu tez çalışması için de; son yıllarda etkin bir şekilde poligalakturonaz üretimi yapılan *Aspergillus sojae* ATCC 20235 tercih edilmiştir. *Aspergillus sojae*, Asya'da miso (fermente edilmiş soya fasulyesi macunu) ve soyu (soya sosu) gibi iki fermente gıdanın üretiminde güvenli bir geçmişi olan *Aspergillus oryzae* ile yakından ilişkili bir mezofilik ipliksi mantardır. ATCC'de hala *A. sojae* olarak bırakılan *A. sojae* ATCC 20235'in, morfolojik parametrelere dayanarak *Aspergillus sojae* olarak sınıflandırılma şartlarını karşılamadığı belirtilmiş (Ushijima vd. 1982) ve alpA kısıtlama restriksiyon parça uzunluk polimorfizmine (RFLP) dayanarak *Aspergillus oryzae* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Heerikhuisen vd. 2005).

2.4.1. Yapılmış çalışmalar

Önceki bölümlerde de ifade edildiği gibi poligalakturonaz üretimine yönelik yapılan çalışmalarda farklı organizma ve substratlardan faydalanılmıştır. Bu çalışmaların son yıllarda gerçekleştirilen bir kısmı Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı fermentasyon koşullarında pektinaz üretimleri

Mikroorganizma	Pektinaz türü	Substrat	FT*	Sonuç	Kaynak
<i>Bacillus sonorensis</i> MPTD1	Pektinaz	Pektin	Sıvı	240 U/mL	(Mohandas vd. 2018)
<i>C. indologenes</i>	Pektinaz	Pektin	Sıvı	0.7 U/mL***	(Roy vd. 2018)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Z6	Protopektinaz	-	-	221 U/mL	(Zhang vd. 2018)
<i>Bacillus subtilis</i> ZGL14	Alkaline pektinaz	Glukoz	Sıvı	~52.37 U/mg	(Yu vd. 2017)
<i>Coriolus versicolor</i>	Ekzo-PG**	Buğday kepeği	Sıvı	~90 U/gds	(Amin vd. 2017)
<i>Penicillium notatum</i>	Ekzo-PG	Buğday kepeği	Sıvı	~110 U/gds	(Amin vd. 2017)
<i>Aspergillus fumigatus</i> R6	PG	Pirinç kepeği	Katı	565 U/g	(Wong vd. 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> strain Btk27	Pektinaz	Buğday kepeği	Katı	2103.3 U/g	(Oumer ve Abate 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Pektinaz	Pektin	Katı	217.4 U/mg	(Mercimek Takcı ve Turkmen 2016)
<i>Aspergillus terreus</i> NCFT4269.10	Pektinaz	Muz kabuğu	Katı	6500 U/g	(Sethi vd. 2016)
<i>Rhizopus</i> sp. C4	Pektinaz	Portakal kabuğu	Katı	11.63 U/mL	(Handa vd. 2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Pektinaz	Portakal kabuğu	Katı	117.1 U/mL	(Ahmed vd. 2016)
<i>Trichoderma viridi</i>	Pektinaz	Portakal kabuğu	Katı	325 U/mL	(Irshad vd. 2014)
<i>Penicillium notatum</i>	PG	Buğday kepeği	Katı	1129.62 U/gds	(Amin vd. 2013)
<i>Rhizomucor pusillus</i>	PG	Pektin	Katı	~43.17 U/mL	(Siddiqui vd. 2013)

*FT: Fermentasyon tipi, **PG: Poligalakturonaz, ***Uluslararası Birim (IU), dakikada bir μ mol galakturonik asitin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

Aspergillus türleri tarafından üretilen ve bitkilerin hücre duvarındaki polisakkaritleri indirgeyen enzimlerin büyük miktarı gıda ve yem endüstrisinde değerlendirilmektedir. Çeşitli protein bazlı bileşenlerin üretiminde kullanılabilmesi son yıllarda bazı *Aspergillus* türlerine olan ilgiyi artırmıştır (de Vries ve Visser 2001). Öte yandan, *Aspergillus* türü bazı mikroorganizmalardan poligalakturonaz üretiminde de faydalanılmaktadır.

Poligalakturonaz üretimi için sıvı ve katı kültür fermentasyon yöntemlerinin her ikisi de kullanılmaktadır. Katı kültür yöntemi ile gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde enzim aktivitesi nispeten yüksek çıktığı için bu yöntem daha fazla tercih edilmekte ancak enzimin besiyerinden geri kazanımı için yapılan fermentasyon sonrası işlemler açısından sıvı kültür yöntemi daha avantajlı kabul edilmektedir. Daha önce sıvı kültür çalışmalarında kullanılan *Aspergillus sojae* 20235, bu çalışma açısından da en verimli mikroorganizma olacağı düşünülerek tercih edilmiştir (Demir ve Tari 2014; Dogan ve Tari 2008; Fratebianchi vd. 2017; Göğüş vd. 2006; Oncu vd. 2007; Tokatlı vd. 2009).

Daha önce yapılmış poligalakturonaz çalışmalarından bazı örneklerin verildiği aşağıdaki literatür özetinde sonuçlar, spesifik aktivite ya da birim hacimdeki enzim aktivitesi şeklinde sunulmuştur. Mikrobiyal poligalakturonaz üretimine yönelik ilk çalışmalardan birini gerçekleştiren Riou vd. (1992) fermentasyon sonucu elde ettikleri solüsyonlara 4 farklı saflaştırma işlemi uygulamıştır. *Sclerotinia sclerotiorum*'un kullanıldığı çalışmada besiyeri ortamı turuncgil pektini ile zenginleştirilmiş ve fermentasyon sonrasında ham süzöntü, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat flokülasyonu, CGMC- biyojel A ve ultrajel Aca 44 uygulamaları sonucu elde edilen örnekler için hesaplanan spesifik aktivite değerleri sırasıyla 12.1 U/mg, 22.1 U/mg, 357.0 U/mg, 473.9 U/mg ve 803.2 U/mg şeklindedir.

Galiotou-Panayotou vd. (1993) sıvı faz kültür fermentasyonu ile yaptıkları poligalakturonaz üretimine yönelik araştırmada *Aspergillus niger* NRRL-364'ü kullanmışlardır. Karbon kaynağı olarak pektik maddelerden faydalanılan fermentasyon sonucunda enzim aktivite değeri 145.5 IU/ml olarak tespit edilmiştir.

Su aktivitesi ve glukoz ilavesinin pektinaz üretimine etkisini araştıran Taragano vd. (1997) sıvı faz kültür tekniği ile gerçekleştirdikleri fermentasyonun 50. saatinde *Aspergillus niger* 148 tarafından üretilen poligalakturonazın aktivitesini 34.0 IU/ml olarak belirlemiştir. Pektinaz üretimine aminoasitlerin etkisini incelemek amacıyla çalkalama hızının 200 rpm ve pH'nın 8 olduğu fermentasyon koşullarında yapılan bir çalışmada fermentasyon ortamına DL-Norlösin (%1 w/v), L-Lösin (%1 w/v) ve DL-İzolösin (%1 w/v) eklenmiştir. *Streptomyces sp.* QG-11-3 kullanılarak gerçekleştirilen söz konusu fermentasyon denemelerinde ulaşılan en yüksek enzim aktivite değeri 161.85 U/ml olarak tespit edilmiştir (Beg vd. 2000).

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler ile birlikte daha verimli ürün sentezi yapabilen mikroorganizmalar geliştirilmiştir. Örneğin doğal türünden 50 kat daha fazla enzim salgılayabilen *Penicillium occitanis* CT1 mutanlığı geliştirilerek turuncgil pektini ile zenginleştirilmiş bir fermentasyon ortamında kullanılmıştır. Fermentasyon

sonrası elde edilen ekzopoligalakturonazın aktivite değeri 231.0 U/ml olarak ölçülmüştür (Hadj-Taieb vd. 2002).

Oncu vd. (2007) tarafından gerçekleştirilen bir optimizasyon çalışmasında biyokütle miktarı, pellet boyutu ve poligalakturonaz enzimi üretimi için en uygun şartlar çalkalama hızı 350 rpm, inokülasyon oranı 2×10^7 olarak belirlenmiştir. Sıvı kültür yönteminin kullanıldığı araştırma kapsamında en yüksek poligalakturonaz aktivitesi 13.5 U/ml olarak belirlenmiştir. Sıvı kültür fermentasyonu ile ekzopoligalakturonaz enzimin üretimi için besiyeri optimizasyonu yapılan bir araştırmada en yüksek enzim aktivite değerine (150 U/ml) ulaşılan fermentasyon denemesine ait besiyerinin 10 g/L portakal kabuğu, şeker pancarı şurubu 61.87 g/L ve 8.43 g/L amonyum sülfattan oluşturulduğu bildirilmiştir (Buyukkileci vd. 2010).

Katı kültür ortamında poligalakturonaz üretimi için substrat olarak portakal kabuğunun kullanım olanaklarının araştırıldığı bir çalışmada *Aspergillus sojae*'nin ürettiği en yüksek aktiviteye sahip enzimin spesifik aktivitesi 42.3 U/g olarak tespit edilmiştir (Demir vd. 2012). Rehman vd. (2012) azot kaynağı olarak maya ekstraktı, karbon kaynağı olarak ise elma pektini kullandıkları kesikli fermentasyon çalışmasında *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21'ten ürettikleri poligalakturonazın spesifik aktivitesini nötral pH'da 1015 U/mg olarak tespit ettiklerini bildirmiştir.

Göğüş vd. (2014) tarafından yapılan bir araştırmada substrat olarak endüstriyel bir atık olan portakal kabuklarının kullanımının *Aspergillus sojae* tarafından poligalakturonaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Morfolojik ve reolojik etkilerin incelendiği çalışmada ulaşılan en yüksek poligalakturonaz aktivitesi 93.48 U/ml olarak belirlenmiştir.

Buğday kepeğinin substrat olarak değerlendirildiği bir katı kültür fermentasyonunda *Aspergillus sojae* mutanları kullanılarak üretilen poligalakturonaza ait en yüksek spesifik aktivite 535.4 U/g olarak bildirilmiştir (Demir ve Tarı 2014). Derin kültür ortamında poligalakturonaz üretimine yönelik bir çalışmada *Aspergillus sojae* mutanları kullanılarak flask ölçeğinde ve portakal kabuğu substratında fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiş olup maksimum poligalakturonaz aktivitesi 80 U/ml olarak belirlenmiştir (Fratebianchi vd. 2017).

2.5. Mikrobiyal Gelişim için Gerekli Unsurlar

Endüstriyel ve laboratuvar ölçekli çalışmalarda mikrobiyal gelişim için en kritik işlemlerden birisi de besiyeri tasarımıdır (Stanbury vd. 2003). İyi bir besiyeri bileşimi mikroorganizmanın tüm besinsel gereksinimini içermeli ve işlemin teknik amaçlarını karşılar nitelikte olmalıdır. Ayrıca biyokütle ve ürün oluşumunu da teşvik edici bir bileşime sahip olması önemlidir (Waites vd. 2009). Araştırmacılar tarafından fermentasyon proseslerinde kullandıkları mikroorganizmanın gelişimi için gerekli süreyi en aza düşürerek hedef ürünün en kısa sürede üretilmesini sağlamaya yönelik besiyerinde farklı bileşenler ile optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Mikrobiyal gelişim için en fazla gereksinim duyulan iki unsurun karbon ve azot olduğu bilinmektedir. Bunun yanında vitaminlerin ve bazı elementlerin (K, P, Ca vb.) de fermentasyon ortamında bulunması gelişim için zorunlu olmamakla birlikte, genellikle fermentasyonu olumlu etkilemektedir. Dolayısıyla mikrobiyal gelişim için fermentasyon ortamında ilave edilen

bileşenleri iki grupta toplamak mümkündür: i) Majör besinler (yüksek miktarda gereksinim duyulan bileşenler): Karbon ve azot; ii) Minör besinler (az miktarda gereksinim duyulan bileşenler): Vitaminler, K, P, Ca, Mg, Fe vb.

2.6. Enzim Üretiminde Düşük Maliyetli Substrat Kullanımı

Fermentasyon tekniği ile enzim üretimine yönelik yapılan güncel çalışmaların odak noktalarından birisi de düşük maliyetli substrat kullanımı ile düşük maliyetli üretim olmuştur. Ucuz substratların kullanılması fermentasyonun proses maliyetini düşürmekle birlikte bir atık olarak çevreden uzaklaştırılmasıyla ilgili sorunları da ortadan kaldırır. Özellikle tarım ve gıda endüstrisinde açığa çıkan karbon ve azot içeriği bakımından zengin atıkların fermentasyon besiyerinde değerlendirmek amacıyla araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır.

2.6.1. Portakal kabuğu

Turunçgil (narenciye), günümüzde dünyanın hemen hemen tüm bölgelerinde yetişebilen bir bitki topluluğudur. Portakal, limon, mandalina gibi pek çok meyve türü turunçgil familyasına aittir. Bu ekonomik değeri yüksek meyveler doğrudan tüketilmelerinin yanı sıra meyve suyu, reçel gibi birçok endüstriyel gıdanın üretiminde de kullanılmaktadır. Portakal, narenciye grubu ürünlerde endüstriyel olarak değerlendirilebilen ve ekonomik değeri yüksek en önemli meyvelerden biridir. Dünya portakal üretimi 2013-2014 yılları arasında bir önceki yıla göre % 5 artarak 51.8 milyon metrik tona ulaşmış ve bu artışa paralel olarak portakal suyu üretimi de 2 milyon metrik tona yükselmiştir (Martín vd. 2018).

Narenciye işleme endüstrisinin üretim proseslerinde her yıl kabuk ve meyve içindeki zararlar da dâhil olmak üzere tonlarca atık üretilmektedir. Genel olarak narenciye işleme endüstrisinin yan ürünleri, hammadde ağırlığının yaklaşık% 50'sini oluşturur. Kötü koku oluşumu ve toprak kirliliğine neden olmaması için açığa çıkan bu atıkların yönetimi gıda endüstrisi için oldukça önemlidir. Bu amaçla, narenciye atıkları flavonoidler, pektin, lif, hayvan yemi, uçucu yağlar gibi yüksek ekonomik değeri olan çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Narenciye atıkları arasında önemli bir paya sahip olan portakal kabuğu zengin bileşen içeriğine sahip olan yapısı ile ilgi çekicidir. Portakal kabuklarının temel bileşenleri çözünür şekerler ve pektindir. Rivas vd. (2008), portakal kabuğunun kompozisyonundaki bileşen dağılımını incelemiş ve ayrıntılı olarak ağırlık yüzdesi olarak şu şekilde bildirmiştir: %42.5 pektin, %16.9 çözünür şekerler, %10.5 hemiselüloz, %9.21 selüloz, % 6.50 protein %3.75 nişasta, % 3.50 kül, % 1.95 yağ ve % 0.84 lignin. Portakal kabuğunun bileşen oranı bakımından en yüksek ve ekonomik olarak ilgi çekici bileşenleri olan şekerlerin toplam kabuk ağırlığındaki oranı % 29-44 arasında değişmektedir. Kabuk yapısında glukoz, fruktoz ve sukroz ana şekerler olmakla birlikte az miktarda da ksiloz bulunabilmektedir. Pektin ve hemiselülozlar galakturonik asit, arabinoz ve galaktoz bileşenleri bakımından zengin bir yapıya sahiptir. Selülozik kısımda değişen miktarlarda ksiloz, arabinoz, galaktoz ve mannoz bulunması ile birlikte, baskın şeker glukozdur (Martín vd. 2018).

Ancak atık değerlendirme uygulamalarına rağmen, yıllık olarak halen değerlendirilemeyen büyük miktarda narenciye atığı çevre güvenliği açısından risk

oluşturmaktadır (Torrado vd. 2011). Portakal kabuğu gibi atıkların elden çıkarılması, hayvan yemi ya da pektin ön maddesi olarak değerlendirmek amacıyla kabuğun soyulması endüstri için zorluk teşkil etmektedir. Alternatif bir kullanım alanı olarak, yapısında yüksek oranda pektin bulunan portakal kabuğu poligalakturonaz enzimi üretiminde bir süredir kullanılmaktadır (Fratebianchi vd. 2017; Rodríguez-Fernández vd. 2011). Günümüzde organik asit, enzim, biyogaz üretimi gibi pek çok mikrobiyal proseste başarıyla uygulanmaktadır (Ricci vd. 2019). Bu çalışmada da portakal kabuğu fermentasyon besiyerinde substrat olarak değerlendirilmiştir.

2.6.2. Keçiboynuzu atığı

Keçiboynuzu genellikle Akdeniz bölgesinde yetişen ve yaprak dökmeyen bir ağaç türüdür. Bilimsel adı *Ceratonia siliqua* L., olan keçiboynuzu ülkeden ülkeye değişen geleneksel isimlere de sahiptir. Örneğin, İspanyolca *Algarrobo* veya *Garrofero*, İtalyanca *Carrubo*, Fransızca *Caroubier*, Almanca *Karubenbaum*, Portekizce *Alfarrobeira*, Yunanca *Charaoupi* ve Türkçe *Harnup* olarak bilinir. Dünyada 2010-2013 yılları arasındaki toplam keçiboynuzu üretimi yaklaşık 166 bin ton olup, en büyük üretici ülkeler İspanya (% 26.31), İtalya (% 16.62), Portekiz (% 13.77), Fas (% 12.27), Yunanistan (% 12,05) ve Türkiye (% 8.53)'dir. Bu Akdeniz ülkeleri kıyı şeritlerinde bulunan keçiboynuzu ağaçları nedeniyle keçiboynuzunun en büyük tedarikçi ülkeleri olmuştur (Yatmaz ve Turhan 2018).

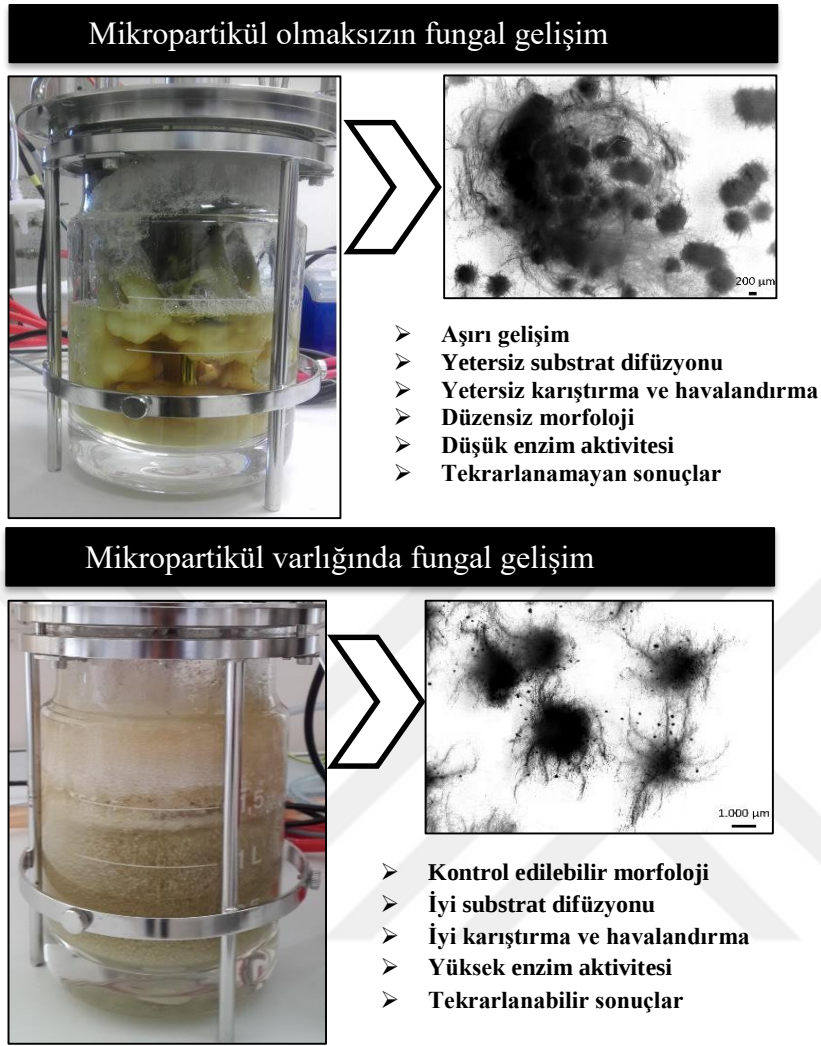
Genel olarak meyve eti ve çekirdeği olmak üzere iki kısımdan oluşan keçiboynuzu meyvesi şeker içeriği açısından zengin bir kompozisyona sahiptir. Keçiboynuzu, temel olarak % 34-42 sukroz, % 7-10 glukoz, % 10-12 fruktoz ve az miktarda amino asit, mineral ve fenolik bileşikler içeren yüksek bir toplam kuru madde içeriğine (yaklaşık% 91-92) sahiptir (Karkacier ve Artık 1995). Ülkemizde yüksek şeker içeriğinden dolayı geleneksel pekmez, sirke gibi ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Öte yandan farklı ülkelerde keçiboynuzu bazı katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde değerlendirilmektedir. Çekirdeği, gam (*Locust bean gum*) üretiminde kullanılan keçiboynuzunun meyvesi de D-pinitol gibi bazı katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Yatmaz ve Turhan 2018). Ancak yaygın bir ürün ağında kullanılan keçiboynuzunun atığı diğer tarımsal atık gibi çevre için sorun oluşturmaktadır. Karbonhidrat, protein, pektin ve mineral madde kaynağı olarak zengin bir içeriğe sahip olan keçiboynuzu meyvesinin posası hayvan yemi rasyonlarına katılması dışında değerlendirilmemektedir. Üstelik posanın yoğun bir aromaya sahip olması yem rasyonlarına ilavesini sınırlandırmakta olup önemli bir kısmı da atılmaktadır. Bu nedenle uygun içeriğe sahip bu meyvenin ekstraktının fermentasyonla değerlendirilebilecek niteliklere sahip olduğu bilinmektedir. Keçiboynuzu meyvesinden içki ispiertosu üretimi üzerine yürütülmüş çalışmalar ileriye götürülemedi; endüstriye adapte edilebilecek nitelikte sonuçlara ulaşılamamıştır. Bunun yanında keçiboynuzu ekstraktından etanol, laktik asit, sitrik asit ve çeşitli enzimlerin üretimleri üzerine çalışmalar yapılarak meyvenin bu konudaki potansiyeli de ortaya konulmuştur. Literatürdeki birçok çalışmada bu meyvenin etanol (Turhan vd. 2010), enzim (Karahalil vd. 2019b), biyohidrojen (Bahry vd. 2019), organik asit (Carvalho vd. 2016; Turhan vd. 2010b) üretiminde başarıyla uygulandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada da bazı denemelerde poligalakturonaz üretimi için kullanılmıştır.

2.7. Fungal Gelişimin Kontrolü ve Yeni Bir Kontrol Yöntemi Olarak MPEC

Endüstriyel üretime yönelik önemli kullanım üstünlüklerine sahip olan ipliksi organizmaların sıvı kültür ortamındaki gelişiminde fermentasyon verimliliğini olumsuz etkileyen bazı etkenler de bulunmaktadır. Bu etkenlerden üretim verimliliği üzerindeki en duyarlı parametrenin fungal morfoloji olduğu bildirilmiştir (Yang vd. 2016). Kompleks bir morfolojik yaşam döngüsüne sahip olan ve aşırı gelişim gösteren fungal türlerin oluşturduğu morfolojik yapıların kontrolü fermentasyon çalışmalarında bazı zorluklara neden olmaktadır (Walisko vd. 2017). Fungal morfolojinin oluşum mekanizması henüz tamamen aydınlatılamamakla birlikte bu konudaki bilgiler sürekli bir gelişim içerisinde.

İpliksi organizmalar ile yapılan fermentasyon çalışmalarında farklı metabolitler için farklı morfolojilerin uygun olduğu bilinmektedir. Amilaz gibi enzimlerin üretiminde misel gelişimi üretimi artırırken sitrik asit, penisilin gibi sekonder metabolitlerin sentezinde pellet morfolojisinin daha uygun olduğu görülmüştür. Diğer bir ifadeyle, misel ya da pellet oluşumlarının her bir biyolojik prosese göre avantaj-dezavantajları ayrı ayrı göz önüne alınmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda metabolit salgılamasının yoğunlukla hifal uçlarda meydana geldiği görüldüğünden hücre morfolojisindeki dallanma sıklığının önemli olduğu anlaşılmıştır (Walisko vd. 2015). Bundan dolayı fungal morfolojide yapılmak istenen değişikliklerin çoğu zaman hedefi pellet oluşumunu engelleyerek daha küçük ve daha düşük yoğunlukta pelletler oluşturmaktır. Böylece daha iyi bir substrat tüketimi ve ürün üretimi sağlanabilmektedir (Antecka vd. 2016).

Son zamanlarda yeni bir strateji olarak ilgi çeken mikropartikülle zenginleştirilmiş fermentasyon (MPEC) tekniği ipliksi organizmaların spor agregasyonunu fiziksel bir etki ile engelleyerek morfolojinin kontrol edilmesine olanak tanımaktadır (Şekil 2.3). Prosesin diğer parametrelerini minimum düzeyde etkilemesi ile birlikte kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli bir yöntemdir (Antecka vd. 2016; Gao vd. 2014; Ren vd. 2015). Bundan dolayı MPEC, artan enerji maliyetlerini düşürmek için de iyi bir alternatif olarak görünmektedir (Driouch vd. 2010b).



Şekil 2.3. Mikropartikül ilavesi yapılan ve yapılmayan fermentasyon ortamlarında küflerin gelişimi (Karahalil vd. 2019a)

Bu yöntemin bir diğer üstünlüğü ise mikropartiküllerin ürün ile etkileşime girmeyerek kalite kaybına neden olmamasıdır (Driouch vd. 2010a). Çizelge 2.2'den de anlaşıldığı üzere, morfoloji mühendisliğine yeni bir imkân sunan MPEC yöntemini konu alan yayın sayısının hızla artması bu tekniğe olan ilgiyi de açıkça göstermektedir (Walisko vd. 2015). İlk defa Kaup vd. (2008) tarafından uygulanan ve kavramsallaştırılan MPEC'in, Driouch vd. (2012; 2010a; 2010b) tarafından yapılan çalışmalar ile fungal morfolojinin şekillendirilmesinde etkin bir biçimde kullanılabilen, zekice ve esnek bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 2.2. Literatürden seçilen MPEC uygulamalı fermentasyonlar

Fungal Tür	MP Türü	Ürün	VAK*	Kaynak
<i>Cerrena unicolor</i>	Al ₂ O ₃	Lakkaz	3.5	(Anteckka vd. 2016)
<i>Pleurotus sapidus</i>	Al ₂ O ₃	Lakkaz	2.0	(Anteckka vd. 2016)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Al ₂ O ₃	Fitaz	2.0	(Coban vd. 2015a)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Talc	Fitaz	2.9	(Coban vd. 2015a)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Talc	Fitaz	1.9	(Coban vd. 2015a)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Talc	Fitaz	2.8	(Coban vd. 2015b)
<i>Aspergillus ficuum</i>	Talc	Fitaz	1.3	(Coban vd. 2015b)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Al ₂ O ₃	Laktik asit	2.3	(Coban ve Demirci 2016)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Talc	Laktik asit	4.0	(Coban ve Demirci 2016)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Talc	Laktik asit	2.0	(Coban ve Demirci 2016)
<i>Trichoderma viride</i>	Al ₂ O ₃	Selülaz	1.2	(Dong vd. 2018)
<i>Trichoderma viride</i>	Al ₂ O ₃	Endoglukanaz	1.1	(Dong vd. 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Talc	Glukoamilaz	3.6	(Driouch vd. 2010b)
<i>Aspergillus niger</i>	Talc	Fruktofuranozidaz	2.0	(Driouch vd. 2010b)
<i>Aspergillus niger</i>	Titanat	Glukoamilaz	9.5	(Driouch vd. 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Titanat	Fruktofuranozidaz	3.7	(Driouch vd. 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Titanat	Glukoamilaz	6.4	(Driouch vd. 2012)
<i>T. atroviride</i>	Demir oksit	6-pentil- α -piron	2	(Etschmann vd. 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Talc	2-feniletanol	1.3	(Etschmann vd. 2015)
<i>M. isabellina</i>	Talc	Lipid	2.5	(Gao vd. 2014)
<i>Aspergillus sojae</i>	Talc	β -mannanaz	8.6	(Germec vd. 2017)
<i>Aspergillus terreus</i>	Talc	Lovastatin	2	(Gonciarz ve Bizukojc 2014)
<i>Aspergillus terreus</i>	Talc	Lovastatin	3.5	(Gonciarz vd. 2016)
<i>Aspergillus sojae</i>	Al ₂ O ₃	Poligalakturonaz	2.2	(Karahalil vd. 2017)
<i>C. fumago</i>	Talc	Kloroperoksidaz	10	(Kaup vd. 2008)
<i>C. fumago</i>	Al ₂ O ₃	Kloroperoksidaz	6	(Kaup vd. 2008)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Talc	Anidulafungin	1.3	(Niu vd. 2015)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Cam boncuk	Anidulafungin	1.4	(Niu vd. 2015)
<i>Grifola frondosa</i>	Talc	FGİ	1.2	(Tao vd. 2018)
<i>Grifola frondosa</i>	Talc	UDPGP	1.2	(Tao vd. 2018)
<i>Grifola frondosa</i>	Talc	UDPGD	1.3	(Tao vd. 2018)
<i>Grifola frondosa</i>	Talc	GDPM	1.3	(Tao vd. 2018)
<i>Grifola frondosa</i>	Talc	UDPGE	3.1	(Tao vd. 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Talc	β - fruktofuranozidaz	3	(Wucherpennig vd. 2012)
<i>Curvularia sp.</i>	Talc	Kurvulamine	1.9	(Yang vd. 2016)
<i>Aspergillus sojae</i>	Al ₂ O ₃	β -mannanaz	2.6	(Yatmaz vd. 2016)
<i>Aspergillus sojae</i>	Talc	β -mannanaz	1.8	(Yatmaz vd. 2016)

*VAK: Verimdeki artış katsayısı, UDPGP: UDP-glukoz pirofosforilaz, UDPGD: UDP-glukoz dehidrogenaz, GDPM: GDP-mannoz pirofosforilaz, UDPGE: UDP-glukoz-4-epimeraz, FGİ: Fosfoglukoz izomeraz

2.8. Derin Kültür Fermentasyon Tekniği

Fermentasyon yoluyla katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılan birçok yöntem vardır. Bununla birlikte, fermentasyon tipleri genel olarak derin kültür ve katı kültür olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu iki yöntem arasındaki temel farklılık substratın serbest su içeriğidir. Katı kültür fermentasyonu serbest su içermeyen nemlendirilmiş katı substratlar üzerinde mikroorganizma gelişimini ve metabolik faaliyeti ifade eder. Bu fermentasyonda mikrobiyal gelişim için gerekli su, substratın içindeki nemden karşılanır (Mitchell ve Von Meien 2000). Derin kültür yönteminin kullanıldığı fermentasyon işlemlerinde ise genellikle en yüksek substrat miktarı 50 g/L ve substrattaki minimum nem oranı %12 olarak gerçekleştirilmektedir (Robinson vd. 2001).

Sıvı (derin) kültür fermentasyonları sterilizasyon sonrası mikroorganizmanın sıvı besiyerine inoküle edildiği bir yöntemdir. Endüstriyel enzimlerin üretiminde sıklıkla tercih edilen bu fermentasyon yöntemi, kapalı tanklarda daha önceden seçilmiş organizmanın (bakteri, küf veya maya) zengin bir sıvı besiyeri içinde gelişiminin sağlanmasını kapsamaktadır (Renge vd. 2012). Genellikle silindirik tankların kullanıldığı derin kültür tekniğinde yeterli düzeyde karıştırma ve havalandırmanın yapılması fermentasyonun verimliliği açısından kritiktir. İnokülasyon ile ortama verilen milyonlarca hücre ve sporlar besiyerinde bulunan besin elementlerini hızla tüketerek biyokütleye dönüştürürler (Stanbury vd. 2013).

Fermentasyon süresince besinleri parçalayan organizma, ortama arzu edilen hedef ürünü (etanol, enzim, vitamin vb.) salgılamaktadır. Salgılanan bu ürün fermentasyon sonrasında çeşitli işlemler ile fermente sıvıdan safsızlıkların uzaklaştırılmasıyla elde edilmektedir. Tüm hücrelerin ortamın fiziksel ve kimyasal koşullarından aynı oranda etkilenmesi ve substrat ile doğrudan temas halinde olması derin kültür yönteminin en önemli avantajlarından biridir. Diğer yandan katı kültür yöntemine nispeten daha kısa süreli fermentasyon süresine sahip olan derin kültür yöntemi için kullanılan düzenek daha kompleks ve pahalıdır (Yatmaz ve Turhan 2019). Sıvı faz fermentasyonlarının yüksek maliyetli ekipman ve malzeme gerekliliği gibi dezavantajları olmasına rağmen proses maliyetlerinde önemli bir yer tutan saflaştırma işlemlerinin daha kolay ve ucuz olması son ürün maliyeti bakımından avantaj sağlamaktadır (Berenjian 2019).

2.9. Hücre Morfolojisinin Fermentasyon Verimine Etkisi

Morfoloji tipi, inokülasyon oranı ve reoloji ile birlikte proses performansını etkileyen üç önemli faktörden biridir. Öte yandan, funguslar ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda morfoloji aynı zamanda reolojiyi de etkilemektedir. Örneğin derin kültür tekniğinde kompleks bir sıvı sistemi olan besiyeri Newtonsal tip akış gösterirken, fermentasyon sırasında ortamda artan hif yoğunluğu ile birlikte viskozitesi artan heterojen fermente sıvı Newtonsal olmayan tip bir akış göstermektedir (Posch vd. 2013). Morfolojinin fermentasyon ortamında meydana getirdiği bu değişiklik enerji ihtiyacı, oksijen ve kütle transferi gibi parametreler üzerinde etkili olmaktadır. Ayrıca fermentasyon sonrası yapılan saflaştırma işlemlerinde morfolojik açıdan sık (compact) yapıdaki bir biyokütlenin oluşması halinde arzu edilen ayırım genelde daha kolay ve düşük maliyetli olarak sağlanabilmektedir (Walisko vd. 2017). Dolayısı ile iplikli funguslar ile

yapılan çalışmalarda gerek fermentasyon sırasında gerekse de fermentasyon sonrası işlemlerde morfolojinin belirleyici rol oynadığı görülmektedir.

Morfolojiyi etkileyen ana faktörler şunlardır: Genetik faktörler, mikroorganizmanın türü, pH, sıcaklık, ortam bileşimi, havalandırma ve inokülasyon oranı. Genel olarak, filamentöz büyüme, yüksek viskoziteden kaynaklı Newtonsal olmayan davranışları ile daha yüksek biyokütle oluşumunu sağlamaktadır (Papagianni 2004). Yüksek viskozite, istenen karıştırmanın ve oksijen transferinin sağlanması için daha yüksek bir karıştırma hızını gerektirmekte ve dolayısı ile de daha fazla güç ihtiyacına neden olmaktadır (Amanullah vd. 2002). Pellet morfolojisi, Newtonsal davranışı ile viskoz olmayan bir fermentasyon sıvısı oluşturma avantajına sahiptir. Böylece daha iyi bir karışım ve havalandırma sağlanabilir ve ayrıca biyokütlenin fermentasyon sıvısından ayrılması daha da kolaylaşır (Göğüş vd. 2006). Bununla birlikte, pelletlerin yoğunluk derecesine bağlı olarak iç kısımlarına bazen besin ve oksijen iletimi sınırlı kalabilir, bu da büyüme ve verimli ürün sentezine engel olur (Grimm vd. 2005; Papagianni 2004).

İpliksi organizmalar ile yapılan fermentasyonlarda morfoloji-metabolit üretimi arasındaki ilişkinin ortam viskozitesinin artması, fermentör tasarımı, karıştırıcı tipi ve boyutu, havalandırma oranı, enerji dağılımı ve partikül kaynaklı mekanik gerilim gibi faktörlerden nasıl etkilendiği uzun süredir araştırılmaktadır (Walisko vd. 2015). Ancak bir metabolitin üretimi için pellet oluşumu ya da dağılık halde bulunan daha basit morfolojik yapılardan hangisinin uygun olduğu kesin bir şekilde belli değildir (Gonciarz vd. 2016; Papagianni 2004).

2.10. Merkezi Kompozit Tasarım

Yanıt yüzey yöntemi (response surface methodology) matematiksel ve istatistiksel verileri bir arada değerlendirmek ve optimum deney koşullarını belirlemek amacıyla son yıllarda sıklıkla kullanılan bir istatistik metodudur. Hem endüstriyel hem de bilimsel çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanımı ile ön plana çıkan yanıt yüzey yönteminde fonksiyonların belirlenmesi için bazı tasarımlardan yararlanılır. Bu tasarımların en fazla kullanılan tipleri kısmi faktöriyel tasarım, tam faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit tasarımıdır. Merkezi kompozit tasarımı (MKT) eksenel noktalar (α) ve merkez noktalar olmak üzere iki faktöriyel nokta bulunmaktadır. Yöntemdeki iki faktöriyel nokta, bir faktörün + (en yüksek) veya – (en düşük) seviyelerinden oluşur (Türk 2016). Eksenel noktalar, araştırmacının belirlemiş olduğu iki seviye noktasının daha ötesinde olan ve program tarafından Eşitlik (2.1) ile belirlenen $+\alpha$ ve $-\alpha$ değerleridir.

$$\alpha = 2k/4 \text{ (k çalışılan bağımsız değişken sayısı)} \quad (2.1)$$

Deneyisel hatayı tahmin etmek için tekrar edilen noktalar ise merkez noktalarıdır. Aynı zamanda parametrelere ait iki seviye (faktöriyel) noktalarının da orta noktalarıdır. Sonuç olarak MKT’de her bir parametrenin beş seviyesi vardır. Her bir faktörün beş seviyesinin olması kübik cevap davranışı ve güçlü eğrilik sağlamaktadır. Bunlar $+1$ ve -1 ile ifade edilen faktöriyel noktalar $+\alpha$ ve $-\alpha$ ile ifade edilen eksenel noktalar, 0 olarak ifade edilen ise merkez noktadır. MKT modelinde ulaşılan deney sonuçları Eşitlik (2.2) kullanılarak değerlendirilir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \quad (2.2)$$

Bu karesel model n tane değişkenin lineer etkilerini, karesel etkilerini ve aralarındaki etkileşimlerini göstermektedir. Modelde Y tahmini yanıt, β_0 sabit katsayı, β_i lineer katsayı, β_{ij} , i ve j değişkenleri arasındaki etkileşim etkisini ve k faktör sayısını ifade etmektedir. En küçük kareler yöntemi ile regresyon analizi sayesinde de ikinci derece modeldeki katsayılar tahmin edilmiş olup böylece regresyon denklemi oluşturulmaktadır. Oluşturulan denklem kullanılarak yanıtlar için tahmini sonuçları elde edilebilmekte ve tahminlerin doğruluğu, modelin yeterliliği kontrol edilmektedir. Karşılaştırılabilir sonuçlar veren MKT, daha az deneme gerektirdiği için, tam faktöriyel ve üç seviyeli tasarıma önemli bir alternatiftir. Bu nedenle MKT, ikinci dereceden polinom modeller için en çok kabul gören deneysel tasarımıdır (Keskin Gündoğdu vd. 2016; Türk 2016).

MKT, daha az sayıda deneme yapılarak faktörler arasındaki interaksiyonların ortaya çıkarılmasını mümkün kıldığı için her-defada-tek-etken (one-factor-at-a-time, OFAT) yönteminden daha avantajlı bir uygulamadır. Dolayısı ile zaman açısından OFAT'a nispeten daha verimli ve faktörler arası etkileşimleri daha net ortaya koyabilir. Ayrıca her bir faktörün cevap üzerindeki etkisini ve önemini belirleyebilir. MKT, bir sistemi etkileyen doğrusal, kuadratik ve interaksiyon etki faktörleri incelenirken kalitesi yüksek tahminler sağlar. Böylece daha güvenilir sonuçlar üretilmesini sağlar. MKT, Box-Behnken tasarımı ile kıyaslandığında da bazı üstünlüklere sahiptir. Örneğin her iki tasarımın da doğrusal polinom modeline uygun olduğu bir durumda genellikle MKT daha yüksek (güvenilir) bir R^2 değeri verir. Bununla birlikte MKT, genelde Box-Behnken'a nispeten daha düşük standart hata değerleri elde edilmesini sağlar. Dolayısı ile MKT'nin ikinci dereceden modeller için en çok uygulanan deneysel tasarım olduğu bildirilmektedir (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

2.11. Ultrafiltrasyon ile Kısmi Saflaştırma

Fermentasyon sonrası işlemler (downstream processing), endüstrideki enzimlerin verimli ve ekonomik bir şekilde üretilmesi ve bu biyolojik ürünlerin stabilitesinin geliştirilmesi için önemlidir. Bu anlamda, doğru bir tekniğin seçimi için enzim aktivitesindeki olası bir kaybın önlenmesi esastır. Özellikle son otuz yılda, membran teknikleri ile proteinlerin konsantrasyonu ve kısmi saflaştırma işlemleri üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. En yaygın kullanılan membran uygulamalarından biri de saflaştırma işlemlerinde eşzamanlı olarak yüksek verimlilik ve saflık elde etmeyi sağlayan ultrafiltrasyondur. Günümüzde ultrafiltrasyon (UF), protein konsantrasyonu için en yaygın kullanılan tekniklerden biri haline gelmiş olup genelde çok aşamalı saflaştırma proseslerinde birincil adım olarak değerlendirilmektedir. UF, kromatografik yöntemlere nispeten daha düşük enerji gereksiniminden dolayı farklı biyoteknolojik işlemlerde geniş kullanım alanı bulmuştur. Aynı zamanda ticari üretim için ölçeklendirme kolaylığı sağlamaktadır. Küçük boyutlu protein ve enzim moleküllerinin fermentasyon ortamından verimli bir şekilde ayrıştırılmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Öte yandan, membran seçiciliğindeki eksiklikler ve filtrasyon sırasında protein emilimine bağlı kirlilik UF uygulamalarını sınırlandırmıştır. Bununla birlikte, sistemde üretilen kayma kuvveti ve enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkiye sahip olan iyonların uzaklaştırılması

nedeniyle, birçok durumda enzim aktivitesinde kayıpların meydana geldiği gözlenmiştir. UF yoluyla konsantrasyon işlemi, fiziksel/kimyasal faktörlerden (yani pH, enzim konsantrasyonu, sıcaklık ve kompozisyon), ekipmanın karakteristik özellikleri ve geometrik konfigürasyonundan ve membranların tipi ve ön işleminden etkilenir. Her ne kadar UF kapsamlı bir şekilde araştırılsa da UF ile proteinlerin saflaştırılması hala daha fazla araştırma çalışması gerektiren bir sorundur. Yayınlanan çalışmaların çoğu model protein çözümlerine odaklanmıştır ve daha karmaşık protein sistemlerine ekstrapolasyon her zaman kolay değildir (Golunski vd. 2011; Rodríguez-Fernández vd. 2013).

2.12. SDS-PAGE Yöntemi ile Moleküler Ağırlık Tayini

Jel elektroforezi, proteinler, enzimler, DNA ve RNA gibi makromoleküllerin ayrılması ve analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Elektroforezde yüklü moleküller, bir elektrik alan uygulayarak tampon bir çözelti içinde hareket eder. Hareketlilik, moleküllerin yüküne, şekline ve boyutuna bağlı olarak değişir. Tamponun konsantrasyonu ve pH'sı, sıcaklık ve alan kuvveti, moleküler hareketi etkiler. Akış hızı, daha küçük moleküllerin daha büyük moleküllerden daha hızlı göç ettiği moleküler ağırlıkla belirlenir. Jel matrisi, moleküllerin boyut bazında ayırma yardımcı olmak için moleküler elek görevi görür (Dolník 1997). Nükleik asitlerin ve proteinlerin ayrılması için en yaygın kullanılan malzemeler agaroz ve poliakrilamittir. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) akrilamidin bir çapraz bağlayıcı madde ile polimerizasyonu sonucu oluşan kimyasal olarak çapraz bağlanmış jellerdir. Daha büyük bir çözme gücüne sahiptirler ve çözünürlükte düşüş olmaksızın daha fazla miktarda örnek alabilirler. Proteinler, elektroforezden önce sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ısıtılır, böylece tüm proteinlerin yük yoğunluğu kabaca eşit hale getirilir. Sonuç olarak, bu numuneler elektroforezlendiğinde, proteinler sadece kütleyle göre ayrılırlar ve bileşim farklılıklarından çok az etkilenirler (Muharram ve Abdel-Kader 2017). SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ise saflaştırma sırasında proteinleri tanımlamak, izlemek ve saflaştırılmış fraksiyonların homojenliğini değerlendirmek için mükemmel bir yöntemdir. Bu yöntem protein alt birim moleküler ağırlıkların tahmin edilmesi ve saflaştırılmış proteinlerin alt birim bileşimlerinin belirlenmesi için rutin olarak kullanılır. SDS-PAGE ayrıca, yeterli protein elde etmek amacıyla gerçekleştirilen daha ileri çalışmaların hazırlık aşamasında kullanılmak üzere ölçeklendirilebilir. Ayrıca, izoelektrik odaklanmayı SDS-PAGE ile birleştiren iki boyutlu analiz, protein fraksiyonlama için yüksek çözünürlüklü bir yöntemdir ve binlerce polipeptidin tek bir jel içinde çözünmesini sağlar. SDS-PAGE, boyama yöntemleri (blotting methods) ile birlikte kullanıldığında ise protein analizi için en güçlü araçlardan biri hline gelir (Garfin 2009; Rhodes vd. 2009).

2.13. Liyofilizasyon

Gıda teknolojisinde en fazla kullanılan muhafaza tekniklerinden biri de kurutma yöntemidir. Bir ürünün kurutulması üç mekanizma ile sağlanabilmektedir: (i) atmosfer basıncındaki sıcak hava veya yüzey teması ile, (ii) vakum altında suyun uzaklaştırılması ile veya (iii) dondurarak kurutmada dondurulmuş gıdadan suyun süblimleştirilmesi ile. İlk iki teknik proses maliyetleri açısından daha avantajlı olmasına rağmen kurutma dengesi ve homojenizasyon bakımından ürün kalitesinde düşmelere neden olabilmektedir. Özellikle de ısıya duyarlı ürünlerde arzu edilen sonuçlar elde

edilememektedir. Bunun yanında, yüksek sıcaklıklarda ve uzun süre kurutma, gıdaların lezzetinde, renginde, besleyici ve duyuşsal özelliklerinde istenmeyen değışikliklere neden olabilmektedir. İyi kalitede kurutulmuş bir gıda üretmenin yolu, taze ürünlerin düzeyine yakın organoleptik özelliklere sahip ve daha tekdüze ürünler sunmaktır. Dolayısı ile geleneksel kurutma yöntemleri ile kurutulamayacak kadar hassas olan biyolojik maddeler, ilaçlar ve gıdalar için daha etkili bir yöntemin uygulanması gerekmektedir (Gürses 1986).

Dondurarak kurutma, yüksek aroma tutma ve iyi düzeyde rehidrasyon sağlama vb. özellikleri taşıyan ve böylece yüksek kalitede ürünler sunan bir kurutma tekniğidir. Ayrıca ürün ağırlığının azalması, daha az depolama alanı gereksinimi, ürünün soğukta muhafazaya gerek duyulmaksızın oda sıcaklığında muhafaza edilebilmesi ve raf ömrünün uzaması gibi avantajları da vardır. Dondurarak kurutmada genel olarak yığın (bulk), manifold ve grup (batch) olmak üzere üç yöntem kullanılır. Kurutulacak maddenin yapısal özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilen teknik ana hatlarıyla üç safhadan oluşmaktadır: (i) donma safhası; (ii) birinci kurutma safhası ve (iii) ikinci kurutma safhası (Sosa vd. 2012). Kurutulacak ürün işlem öncesinde bir -80°C cihazında ya da başka bir dondurucuda dondurulur. Dondurulan ürün cihaza alındıktan sonra kurutma odasının basıncı çözücünün süblimasyonunu sağlamak için düşürülerek birinci kurutma safhası başlatılır. Su buharının üründen uzaklaştırılmasını sağlayacak koşulları oluşturmak için su buharı, kurutma hücresinden yoğunlaştırıcıya vakum vasıtası ile taşınır. Su molekülleri süblime olup buhar hale geçerken, süblimasyon ısını (2840 kJ/kg) kurutulan materyalden aldığı donmuş haldeki tabakanın sıcaklığı daha fazla düşer. Eğer kurutucu sisteme herhangi bir ısı girişı olmazsa, ürünün içindeki donmuş suyun buhar basıncı kurutma odasındaki su buharının kısmi basıncı ile dengeye ulaşır. Bunun sonucunda üründen suyun süblimasyonu durur. Kısacası materyaldeki donmuş haldeki su (buz) birinci kurutma aşamasında süblimasyonla uzaklaştırılır, süblimasyon ara yüzeyinin aşağıya doğru ilerlemesiyle geriye gözenekli yapıda bir kurumuş tabaka kalır. Birinci kurutma aşaması boyunca kurumuş tabakadaki donmamış suyun (bağlı su) sadece bir kısmı desorpsiyonla uzaklaştırılabilir. Bununla birlikte ürün içerisindeki donmuş suyun tamamen uzaklaştırıldığı an birinci kurutma aşamasının sonu olarak kabul edilir. İkinci kurutma aşaması donmamış suyun (bağlı suyun) uzaklaştırılmasını içerir. Bağlı suyun uzaklaştırılması kurutma hızı ve toplam kurutma süresi üzerinde etkilidir. Bağlı suyun uzaklaştırılması için gereken süre serbest suyun uzaklaştırılması için gereken süreye eşit ya da daha fazla olabilir. Kurutulacak maddede bulunan bağlı su vakum altında ısı verilerek uzaklaştırılır. Ancak her iki kurutma periyodunda da sisteme verilen ısı için bazı sınırlamalar bulunur. Bu sınırlamalar kurutulan ürünün sıcaklığı ve nem oranı ile ilgilidir. Bu iki değışken, kurutma sırasındaki ve kurutma sonrasındaki yapısal kararlılığı ve ürünün kalitesinde belirleyicidirler. Sıcaklığa duyarlı ürünler için genellikle 10-35 °C arası, daha az duyarlı ürünler için ise 50 °C ve üzerindeki sıcaklıklar tercih edilir (Eren 2016; Sadıkoğlu ve Özdemir 2003).

2.14. Matematiksel Modelleme

Matematiksel model, bir sistem incelenirken söz konusu sisteme ait ilgi değışkenleri arasındaki ilişkiler dizisi şeklinde tanımlanabilen bir olgudur. Ayrıca model (ilişkiler dizisi) matematiksel denklemler, tablolar, grafikler ya da neden-sonuç ilişkilerinin açıklanmamış bir kümesi olabilir. İlişkiler dizisi açıklanmaya çalışılan

sistem, bir biyoreaktör, hücre gelişimi, immobilize hücre, enzim, mikrobiyal kültür gibi bir birim işlem olabilir. Sistemin ilgi alanı değişkenleri sıcaklık, pH, besleme hızı, karıştırma hızı, inokulum kalitesi ve proses maliyetleri gibi faktörlerden biri olabilir. Bir model, matematiksel olması fark etmeksizin sistemin kendisinde ya da çevresinde yapılan değişikliklere cevap olarak sistemin nasıl davranacağını açıklar. Örneğin, matematiksel bir modelde, sıcaklık arttırılırsa, substrat konsantrasyonu düşürülürse, inokulumdaki spor sayısı düşürülürse, azot kaynağı olarak nitrat yerine amonyak kullanılırsa, daha küçük ölçekli bir fermentör kullanılırsa, karıştırma hızı yükseltirirse, havalandırma oranı düşürülürse ne olur? gibi sistem hakkındaki soruları yanıtlamak için kullanabileceğimiz bir veya daha fazla denklemimiz olabilir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Moleküler biyoloji, enstrümantal cihazların geliştirilmesi ve ölçüm-bilgi teknolojisindeki yeni gelişmeler biyoteknoloji ve biyoproses mühendisliği alanlarında hem nicelik hem de nitelik olarak veri düzeyinde önemli bir artışı meydana getirmiştir. Ancak bu yüksek miktardaki ham veriyi anlamlandırmak için aralarındaki ilişkileri çözümlmek önemlidir. Bu ilişki ağlarını açıklamaya yönelik çeşitli yazılım araçları mevcuttur. İlişkinin kurulması ile ham ya da karmaşık da olsa bir model elde edilebilir. Modelleme için geleneksel başlangıç noktaları deney, gözlem ve literatür bilgileridir. Bu bağlantı döngüsel bir yapıya sahip olduğundan, bir hipotez ile başlanarak hipoteze dayanan basit bir model inşa edilebilir. Ardından hipotez ve modele dayalı bazı denemeler tasarlanarak tahmin modelinin sonuçları ile deneysel sonuçlar karşılaştırılarak test edilebilir (Mavituna ve Sinclair 2008).

Modellemeye başlamak için küçük ölçekli kesikli fermentasyonlardan elde edilen sonuçlar kullanılabilir. Bir bileşiğin veya hücrenin zamana karşı konsantrasyonunda meydana gelen değişimler çizilerek bile bir modelleme yapılabilir. Ayrıca, bir mikroorganizmanın farklı suşları arasında bir karşılaştırma yapabilmek için, spesifik gelişim hızları ya da bir metabolitin spesifik üretim oranı gibi basit modellere dayanan kantitatif tanımlar kullanılarak göreceli performansları belirlenebilir. Böyle bir karşılaştırma yardımıyla, hangi suşun seçileceğine ya da suşun arzu edilen bir özelliğini iyileştirmek için hangi genetik değişimlerin uygulanacağına karar verilebilir. Model bazlı tanımlar veya terimler kullanılarak farklı disiplinlerden bilim insanları ve mühendislerle iletişim kurularak tartışılabilir. Bu nedenle modelleme, bir yönüyle de bilimsel bir iletişim dilidir (Germec 2019; Mavituna ve Sinclair 2008).

Matematiksel modelleme fermentasyon prosesleri için pek çok kolaylık sağlayabilmektedir. Flask ya da biyoreaktör ölçeğindeki bir ortamda mikroorganizmaların gelişme hızını tahmin edebilecek bir model oluşturulabilirse, ne kadar inokulumun gerekli olduğu ve fermentasyona ne zaman başlanılabileceğini bilerek denemeler planlanabilir. Bunun yanında bazen matematiksel bir model, düşünülmeyen ya da göz ardı edilen faktörlerin önemini de vurgulayabilir. Ayrıca modeller denemeler ile birlikte ekipman ve biyoproseslerin tasarımında da kullanılabilir. Örneğin, belirli bir süre boyunca gerekli miktarda enzim üretmek için, belirli bir suşu ve bir kültür aktivitesinin bir modelini kullanarak, biyoreaktördeki besiyeri hacmini, fermentasyon ortamının karıştırılmasını ve havalandırılmasını, inokulum miktarını, azot kaynağını ve substratın başlangıç konsantrasyonunu seçmek gerekebilir. Bu uygulamalar modellemenin önemini açıkça göstermektedir (Germec 2019; Mavituna ve Sinclair 2008).

Enzimin üretimi ile ilgili literatür incelendiğinde, farklı substratlar ile poligalakturonaz üretimine yönelik çalışmalar bulunmasına rağmen MPEC tekniği ile fermentörde poligalakturonaz üretiminin incelenmesine yönelik herhangi bir araştırmanın yapılmamış olduğu ve üretimin matematiksel modellemesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışmanın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca üretilen *A. sojae* poligalakturonazının ultrafiltrasyon ile konsantre edilmesi ve liyofilizasyon ile toz formda elde edilmesi enzimin ticarileştirilmesine önemli bir katkı sunmaktadır. Bu çalışma ile elde edilen verilerin gelecekte yapılacak daha kapsamlı ve pilot ölçekli çalışmalar için ışık tutucu nitelikte olduğu düşünülmektedir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Fermentasyon besiyerinde kullanılan portakal kabuğu ve parçalanmış keçiboynuzu meyvesi Antalya'da bulunan yerel bir işletmeden tedarik edilmiştir. Parçalanmış halde tedarik edilen keçiboynuzu meyvesi Bölüm 3.3.' de açıklandığı şekliyle ekstraksiyona tabi tutulmuş ve elde edilen ekstraktın briks değeri ayarlanarak besiyerinde değerlendirilmiştir. Meyveden ayrılan portakal, limon ve turuncgil kabukları ise mutfak tipi bir öğütücü (Bosch MKM 6000, Germany) ile 2-3 mm boyutundaki parçacıklara ayrılarak fermentasyon ortamına doğrudan ilave edilmiştir. Karbon kaynağı denemelerinde kullanılan melas, Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A. Ş'den (Kocaeli), buğday kepeği de Çorum'daki bir yerel işletmeden alınmıştır. Bir diğer materyal olan peyniraltı suyu tozu ise Ekso Süt A.Ş'den (Antalya) temin edilmiştir. Azot kaynağı denemelerinde kullanılan tüy unu ve et-kemik unu Keskinoglu Tavukçuluk ve Damızlık İşl. San. Tic. AŞ.'den (Manisa) sağlanmıştır.

3.2. Mikroorganizma ve İnokülasyonun Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan doğal (wild-type) *Aspergillus sojae* (ATCC 20235) İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Canan TARI'dan (kendisi de American Type Culture Collection'dan temin etmiştir), aynı mikroorganizmanın mutanlığı *Aspergillus sojae* (DH56) ise Prof. Dr. Hector Marcelo LAHORE (Jacobs University, Life Science & Chemistry, Germany)'den temin edilmiştir. Söz konusu suşların geliştirilmesi için Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanılmıştır. *Aspergillus sojae* için stok kültürler, PDA içeren petrilere 30°C'de bir hafta geliştirildikten sonra 4°C'de depolanmıştır. Geliştirilen stok kültürler her ay periyodik olarak yenilenmiştir.

PDA'da hazırlanan stok kültürlerin üzerine steril Tween 80 çözeltisi dökülerek spor süspansiyonu hazırlanmış ve *Aspergillus sojae* sporları süspanse halde steril falcon tüpünde toplanmıştır. Süspansiyondaki spor sayısı "thoma lamı" kullanılarak mikroskopta belirlenmiştir. Fermentasyon öncesi başlangıç besiyeri içeriği tespit edilmek üzere "başlangıç örneği" alındıktan sonra bir haftalık inkübasyonu tamamlanmış *Aspergillus sojae* sporları stoğundan besiyerine steril koşullarda %1 oranında (en az 2×10^7 spor içerecek şekilde) inokülasyon yapılmıştır.

3.3. Keçiboynuzu Ekstraksiyonu

Fermentasyon ortamında substrat olarak değerlendirmek amacıyla 5-7 mm kalınlığındaki keçiboynuzu parçaları daha önce Turhan vd. (2010) tarafından belirlenen optimum şartlarda (80°C, 2 saat ve 1:4 meyve:su oranında) ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Her bir üretim işlemi için 1.5 kg keçiboynuzu meyvesi 80°C sıcaklığındaki 6 litre su kullanılarak 2 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminin tamamlanmasının ardından ekstrakt süzme yoluyla katı partiküllerinden ayrılmış ve doğrudan fermentasyonda kullanılmıştır.

3.4. Çalışmanın Deneme Deseni

Tez çalışması için oluşturulan deneme deseninde ilk önce flask ölçeğinde kullanılan iki üretici mikroorganizmanın verimleri, besiyeri bileşimi için farklı karbon ve azot kaynakları denenmiştir. Ardından seçilen suş ile biyoreaktörde en iyi substrat ve karıştırma hızını tespit etmek amacıyla denemeler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, elde edilen aktiviteyi artırmak için 3 farklı strateji (mikropartikül tekniği, başlangıç pH ayarlama ve optimizasyon) uygulanmıştır. Bu denemeler sonucunda en yüksek aktivite değerinin ulaşıldığı fermentasyon parametreleri ile 5-L ve 30-L ölçekli biyoreaktörlerde gerçekleştirilen üretimlerin matematiksel modellemesi yapılmıştır. Son olarak, kısmi saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerinin yapıldığı deneme desenin detaylı şeması aşağıda verilmiştir:

- ❖ Ön denemeler ve suş seçimi
- ❖ Enzim üretimi için en iyi azot kaynağının seçimi
- ❖ Enzim üretimi için en iyi karbon kaynağının seçimi
- ❖ Zenginleştirmenin enzim üretimine etkisinin incelenmesi
- ❖ Biyoreaktörde (5-L) farklı iki suş ile yapılan üretimlerin karşılaştırılması
- ❖ Biyoreaktörde karıştırma hızının enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi
- ❖ Biyoreaktörde en iyi 3 azot kaynağı ile yapılan fermentasyonlar
- ❖ Biyoreaktörde 4 farklı substrat ile yapılan fermentasyonlar
- ❖ Talc mikropartiküllerinin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi
- ❖ Al₂O₃ mikropartiküllerinin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi
- ❖ Başlangıç pH değerinin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi
- ❖ Enzim üretimi için havalandırma-substrat konsantrasyonunun optimizasyonu
- ❖ Büyük ölçekli reaktörde (30-L) enzim üretimi
- ❖ Enzimin ultrafiltrasyon ile kısmi saflaştırılması
- ❖ SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi
- ❖ Enzimin dondurarak kurutma yöntemiyle toz halde üretilmesi
- ❖ Enzimin substrat spesifikliğı ve kinetik parametrelerinin (V_{max} ve K_m) belirlenmesi
- ❖ Farklı metal iyonlarının aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi
- ❖ Enzimatik reaksiyonun aktivasyon enerjisi ve Arrhenius sabitinin belirlenmesi
- ❖ Enzimin termostabilitesi ve termodinamik özelliklerinin belirlenmesi
- ❖ En verimli üretimin matematiksel modellemesi
- ❖ Enzimin üretiminin maliyet analizi

3.5. Çalkalamalı İnkübatörde Poligalakturonaz Üretimi

Flask denemeleri için besiyeri içeriğı hazırlandıktan sonra 250 ml'lik erlenmayerlere 50 ml aktarılmış ve 121°C'de 20 dakika sterilize edilmiştir. Fermentasyon öncesi "başlangıç örneğı" alındıktan sonra bir haftalık inkübasyonu tamamlanmış *Aspergillus sojae* sporları stoğundan steril şartlarda erlenmayerlere inokülasyon yapılmış (%1- en az 2×10^7 spor içerecek şekilde) ve "0. zaman" örneğı de alınarak fermentasyon çalkalamalı inkübatörde (CERTOMAT® IS, Goettingen, Almanya) başlatılmıştır. Fermentasyon 30°C ve 200 dev/dk'da gerçekleştirilmiş ve 4 günlük fermentasyon süresince her 24 saatte bir örnek alınmıştır (Oncu vd. 2007). Çalışmada kullanılan temel besiyeri Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Temel besiyeri

İçerik	Miktar (g/L)
Karbon kaynağı	25
Pepton	2.5
Disodyum fosfat	3.2
Monosodyum fosfat	3.3

3.6. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde Poligalakturonaz Üretimi

Fermentör denemeleri için 5-L'lik Sartorius Biostat B tipi biyoreaktör (Goettingen, Almanya) kullanılmıştır. Çalışma hacmi 1.5-L olarak belirlenen fermentasyon denemeleri 144 saat sürmüş ve fermentasyon süresince her 24 saat için örnekler periyodik olarak alınmıştır. Fermentasyon ortamının havalandırılması optimizasyon öncesi denemeler için 0.15 vvm iken optimizasyon denemelerinde merkezi kompozit tasarımının 0.10-1.10 vvm aralığı için verdiği konsantrasyon değerlerinde yapılmıştır. Besiyerinin pH değerinin ayarlanması için 4 N HCl kullanılmış olup gereken çalışma hızında (350, 475 ya da 600 dev/dk) karıştırma yapılmıştır. Yarı kesikli beslemeli fermentasyonda besiyeri ilavesi (300 ml) 48. ve 96. saatlerin sonunda gerçekleştirilmiştir.

3.7. Büyük Ölçekli (30-L) Biyoreaktörde Poligalakturonaz Üretimi

Büyük ölçekli poligalakturonaz üretimi için 30-L kapasiteye sahip Sartorius Biostat C Plus tipi biyoreaktör (Goettingen, Almanya) kullanılmıştır. Çalışma hacmi 18-L olarak belirlenen kesikli fermentasyon denemesi 144 saat sürmüş ve örnekler 24 saatte bir periyodik olarak alınmıştır. Besiyerinin pH değeri 4 N HCl kullanılarak ayarlanmış olup gereken çalışma hızında (350, 475 ya da 600 dev/dk) karıştırma yapılmıştır. Büyük ölçekli reaktör denemesi için Bölüm 4.6'da yapılan MKT optimizasyonunu ile belirlenen optimum koşullar kullanılmıştır.

3.8. Mikropartikül Uygulama

Mikropartikül uygulaması yapılan denemeler için besiyeri ve pH'sı 6.5'e ayarlanmış ilgili tamponun (talc: 50 mM sodyum asetat; Al₂O₃: 100 mM sitrat) kullanıldığı mikropartikül çözeltisi ayrı ayrı hazırlanmıştır (Kaup vd 2007). Mikropartikül konsantrasyonu için daha önce yapılan poligalakturonaz çalışmalarının optimum koşulları kullanılmış olup bunlar talc ve Al₂O₃ solüsyonları için sırasıyla 5 g/L (Karahalil 2018) ve 20 g/L (Karahalil vd. 2017) şeklindedir. Olası bir topaklanmanın önlenmesi için besiyeri ve mikropartikül solüsyonları ayrı ayrı otoklava tabi tutulmuştur. Sterilizasyon sonrası oda sıcaklığına gelen biyoreaktöre inokülasyon yapılarak fermentasyon başlatılmıştır. Fermentasyonun 48. saatinde mikropartikül solüsyonu besiyerine aseptik olarak ilave edilmiştir.

3.9. Poligalakturonaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Fermentasyon ortamından alınan örnekler Panda vd. (1999) tarafından geliştirilen prosedürde birkaç değişiklik yapılarak hazırlanan bir yöntem ile analiz edilmiş ve

poligalakturonaz aktivitesi belirlenmiştir. Enzim analizinde substrat olarak PGA (2.4 g/L, pH 4.8, 26°C) kullanılmıştır. Öncelikle bir test tüpüne 0.10 ml fermentasyon örneği ve 0.4 ml substrat eklenerek test tüpü 50°C'a ayarlanmış su banyosunda 10 dk süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İlk inkübasyon sonrasında test tüplerine bakır çözeltisi reaktifi ilave edilerek tüpler ikinci inkübasyon için su banyosunda 20 dk bekletilmiştir. Enzim analizinde her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanan körlerin diğer örneklerden farklı olarak fermentasyon örneği üzerine substrattan önce demir reaktifi ilave edilerek enzim ile etkileşimi engellenmiştir. İkinci inkübasyon sonrasında sıcaklığı oda sıcaklığına getirilen analiz karışımının üzerine 1 ml arsenomolibdat çözeltisi eklendikten sonra örnekler spektrofotometrede (Thermo Scientific Evolution, Şangay, Çin) saf suya karşı 500 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ve galakturonik asit standart kurvesi kullanılarak enzim aktivite değerleri hesaplanmıştır. Poligalakturonaz aktivitesinin tanımlanmasına uygun olarak elde edilen aktivite değerleri U/ml olarak verilmiştir. Enzim aktivitesinin bir birimi (1U=16.7 nkat) standart analiz koşullarında (pH 4.8, 26°C), bir dakikada 1 µmol galakturonik asiti serbest hale geçiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi hesaplanırken Eşitlik (3.1) kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = (\text{Absorbans} / 212.12) \times (1000) \times (1/20) \times (1/0.10) \quad (3.1)$$

$$\text{Aktivite (U/ml)} = (\text{galakturonik asit miktarı (µg)} / \text{galakturonik asitin moleküler ağırlığı}) \times (\text{Seyreltme Faktörü}) \times (1 / \text{ilk inkübasyon süresi (dk)}) \times (1 / \text{enzim solüsyon miktarı})$$

Farklı konsantrasyonlarda (0.05-0.10 mg) galakturonik asit çözeltileri hazırlanmış ve ayrı ayrı yapılan enzim analizlerinde karışımların saf suya karşı 500 nm'de absorbanslarının ölçülmesi ile Ek-1'de verilen standart curve elde edilmiştir.

3.10. Enzimin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Üretilen enzimin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla öncelikle pH 3.6-6.6 aralığında PGA solüsyonları (2.4 g/L) hazırlanmıştır. Ardından Bölüm 3.9'da detaylıca açıklanan yöntem ile enzim aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla da optimum pH değerinde hazırlanan PGA solüsyonu kullanılarak ilk inkübasyonun farklı sıcaklıklarda (30-80°C) yapıldığı aktivite analizleri ile enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir (Duruksu vd. 2009).

3.11. Enzim Miktarının Aktivite Üzerine Etkisi

Enzim aktivitesi analizinde reaksiyon ortamına (2.4 g/L PGA içeren çözelti üzerine) eklenen ham enzim solüsyonu miktarının aktivite üzerine etkisi incelenmiş olup bu amaçla reaksiyon ortamına 50, 75, 100, 200, 300 ve 400 µL ham enzim solüsyonu eklenerek poligalakturonaz analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.12. Merkezi Kompozit Tasarımla Optimizasyon

Yapılan flask ve reaktör denemeleri ile belirlenen en verimli substratın miktarı ve mikrobiyal gelişimi etkileyen havalandırma hızının optimizasyonu için Çizelge 3.2'deki değerler çalışılmıştır.

Çizelge 3.2. Merkezi kompozit tasarımında kullanılan limit değerler

	+1	0	-1
Havalandırma (vvm)	1.1	0.6	0.1
Substrat konsantrasyonu (g/L)	60	40	20

Merkezi kompozit tasarım optimizasyonu için Design Expert programının verdiği deneme deseni Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Merkezi kompozit tasarımı için oluşturulan deneme deseni

	Havalandırma Hızı (vvm)	Substrat Miktarı (g/L)
Deneme #1	0.60	40.00
Deneme #2	0.10	40.00
Deneme #3	0.25	54.14
Deneme #4	0.95	25.86
Deneme #5	0.95	54.14
Deneme #6	0.60	40.00
Deneme #7	0.60	20.00
Deneme #8	0.60	60.00
Deneme #9	1.10	40.00
Deneme #10	0.60	40.00
Deneme #11	0.25	25.86

3.13. Hücre Görüntüleme

Çalışma sırasında alınan örneklerde süzme işlemi öncesi mikroskopik görüntüler alınmıştır. Bu amaçla, dâhili kamera sistemine sahip stereo mikroskop sistemi (Stemi 2000-C ve AxioCam ERc5s (Zeiss, Germany)) kullanılmıştır (Ek-2). Ardından ImageJ 1.50b (The National Institutes of Health, ABD) programı kullanılarak alınan görüntülerde *A. sojæ* için ortalama hücresel alan hesaplanmıştır (Yatmaz vd. 2016).

3.14. Toplam Protein Analizi

Saflaştırılan enzim solüsyonundaki toplam protein miktarını tespit etmek için yöntem olarak Coomassie Bradford Metodu (Bradford 1976), protein standartı olarak da Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılmıştır. Bir BSA kiti (Thermo, BSA Ampules-2g/L) ile analizler yapılmış olup albüminin stabilitesinden kaynaklanacak olası hataları engellemek için her analiz öncesi yeni bir standart kurve oluşturulmuştur (Ek-3). Analiz için örneklerden 30 µl alınarak 1.5 ml Coomassie reaktifi ile karıştırılmıştır. Ardından tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için karışımlar oda sıcaklığındaki minimum ışık alan bir ortamda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede 595 nm’de ölçülen örneklerin absorbansları ve standart kurve kullanılarak toplam protein miktarı mg/ml cinsinden tespit edilmiştir. Ayrıca, spesifik aktivite değerleri toplam enzim aktivitesinin toplam protein miktarına mg cinsinden bölünmesiyle hesaplanmıştır.

3.15. Ultrafiltrasyon Denemesi

Üretilen enzimin konsantre hale getirilebilmesi için laboratuvar tipi bir UF cihazı (Sartocon Slice 200, Goettingen, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla, literatürde fungal kaynaklı poligalakturonaz enziminin molekül ağırlığı 30-70 kDa olarak bildirildiğinden (Tounsi vd. 2016), enzimin kısmi olarak saflaştırılmasında maksimum 4 bar basınca kadar dayanabilen, yüzey alanı 200 cm² olan, 10 ve 100 kDa'lık ayırma sınırlarına sahip polietersülfon UF kartuşları kullanılmıştır. Sistemin çalışma öncesinde, membranlardan enzim içeren sıvı preperat geçirilmeden önce membranlarda bulunan etil alkol kalıntılarının uzaklaştırılması ve UF işleminden önce membran yüzeyinin ıslatılması için 2000 mL saf su çalışma basıncı değerlerinde sistemden geçirilmiştir. Sistem içinden su geçirildikten sonra membranlardan dakikada geçebilen permeat (saf su) miktarı UF öncesi akış hacmi (mL/dk) olarak kayıt edilmiştir. Bu değer ultrafiltrasyonda kullanılan membranların filtrasyon sonrası yapılan temizleme işlemlerinin ardından membranın etkin bir şekilde temizlenip temizlenemediğinin kontrolünde kullanılmıştır. Akış hacmi belirlendikten sonra kalan saf su da sistemden geçirilmiştir. Bu şekilde membranların muhafazasında kullanılan etil alkol tamamen uzaklaştırılmış ve membranlar ultrafiltrasyona hazır hale getirilmiştir. Yaklaşık 100 ml örnek ile sistem şartlandırıldıktan sonra asıl örnekler sistemden geçirilmiştir. Genel bir değer vermek gerekirse hacmen %90 permeat ve %10 retentat oranlarında bir UF gerçekleştirilmiştir. Retentat ve permeattan alınan örneklerde enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı analizleri yapılmış olup spesifik poligalakturonaz aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Saflaştırma katsayısının hesaplanmasıyla prosesin etkinliği de belirlenmiştir. UF prosesi tamamlandıktan sonra öncelikle sistemden 1000 mL deiyonize su geçirilmiştir. Daha sonra sıcaklığı 50°C olan 1 N NaOH çözeltisinin sistem içerisinde 1 saat süreyle sirkülasyonu sağlanmıştır. Sirkülasyon süresi sonunda bazik çözelti permeat vanası açılarak sistemden tahliye edilmiştir. Ardından bazik çözeltiyi sistemden tamamen uzaklaştırmak için 1000 mL deiyonize su geçirilmiştir. Son olarak sistemden 500 mL %20'lik etanol çözeltisi geçirilerek ultra filtre kartuşun tamamen temizlenmesi sağlanmıştır. Proses tamamlandıktan sonra temizlenen ultra filtre kartuş bir sonraki kullanıma kadar +4°C'deki %20'lik etanol çözeltisinde muhafaza edilmiştir.

3.16. SDS- PAGE ile Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için OWL P8D8 cihazı (ThermoScientific, IL, ABD), gradient jel (%5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli, 0.8 mm) kullanılmıştır. Fermentasyon sonrasında elde edilen ham enzim sıvısı kaba filtre kağıdından geçirildikten sonra 5 dk süreyle 10000 dev/dk çevirme hızında santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatantlar 10 kDa Spin-X UF membranları ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. UF prosesinden elde edilen retentat ve permeatlar, toplam 50 µL olacak şekilde 3:1 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-CI, pH 6.8, %8 SDS, %0.4 Bromfenol mavisi, %40 gliserol ve 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70°C sıcaklıkta 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 25 µL'si, hazırlanan jellere yüklenmiştir. Elektroforez işlemi, jelin, 1X TGS tamponunda (0.025 M Tris bazı, 0.192 M glisin, %0.1 SDS, pH 8.3) 150 V akımda 1 saat yürütülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında jeller, IRD'ye® Blue Protein Stain (Li-Cor, NE, ABD) ile 1 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmış, boyası giderilene kadar metanol-asetik asit çözeltisinde yıkandıktan sonra Odyssey® FC görüntüleme sistemi (Li-Cor, NE, ABD) ile

görüntülenmiştir. Protein standardı olarak, PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) kullanılmıştır (Ersöz 2016).

3.17. Liyofilizasyon

Üretilen yığın (bulk) enzim solüsyonundan toz enzim preparatı üretmek amacıyla ham fermente sıvının ultrafiltrasyondan geçirildikten sonra elde edilen örnekler dondurarak kurutma prosesine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, laboratuvar tipi bir dondurarak kurutucu (LABCONCO, Freezone 2.5 Plus, USA) kullanılmış olup çalışma şartları; -85 °C, 200 mTorr'da 24 saattir. Liyofilizasyon sonrası elde edilen toz ürün fosfor pentoksit ile oda sıcaklığındaki vakumlu desikatörde 7 gün muhafaza edilerek yapısındaki nem uzaklaştırılmıştır. Elde edilen toz preparatta enzim aktivitesi analizi yapılarak dondurarak kurutmanın etkinliği belirlenmiştir (Srirangsan vd. 2011).

3.18. Farklı Reaktiflerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Kısmi saflaştırılmış ve aktivite değeri analizle belirlenmiş olan enzim preparatı 1 mM konsantrasyonda hazırlanan metal iyonları (Na^+ , K^+ , Sr^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Ag^+) ve metal şelat ajanı (EDTA) ile enzimin optimum çalışma sıcaklığında ve optimum pH tamponunda 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra enzim analizi yapılarak aktivite kaybı belirlenmiştir (Katrolia vd. 2012).

3.19. Enzimin Substrat Spesifikliği ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

A. sojæ ile üretilen poligalakturonaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesinde substrat olarak poligalakturonik asit (PGA), pektin ve karboksimetil selüloz (KMS) kullanılmıştır. Optimum pH değerindeki 100 mM Na-asetat tamponu ile PGA, pektin ve KMS'den farklı konsantrasyonlarda (0, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 ve 19.2 g/L) çözeltiler hazırlanmış ve enzim aktivitesi analizlerinde substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar aracılığıyla substrat-enzim aktivitesi grafiği GraphPad Prism 7 programı (Versiyon 7.03, GraphPad Software, Inc.) kullanılarak elde edilmiştir. Oluşturulan grafikten enzimin substrat ilgisi ve enzimin hızı hakkında bilgi veren Michaelis-Menten sabiti (K_m), maksimum enzim aktivitesi (V_{max}) ve belirleme katsayısı (R^2) değerleri hesaplanmıştır.

3.20. Termostabilite ve Termodinamik Parametreler

Poligalakturonaz enziminin yüksek sıcaklıklara karşı ısı kararlılığını belirlemek amacıyla, enzim solüsyonu (2 ml) 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda 30 dk boyunca su banyosunda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda enzim analizleri yapılmıştır. Daha sonra en yüksek aktivitenin elde edildiği sıcaklık koşullarında 30, 60, 120, 150, 180, 240, 300 dk zaman aralıklarıyla örnekler alınarak kalan aktiviteler ölçülmüş ve böylece termostabilite için optimum süre ve sıcaklık belirlenmiştir. Veriler, %100 etkinlik için normalize edilmiştir. En yüksek enzim aktivite değeri %100 olarak tanımlanmış ve her sıcaklık için belirlenen enzim aktivitesi %100'e göre hesaplanmıştır. Diğer yandan, poligalakturonaz enziminin termodinamik parametreleri, termostabilite analizinden elde edilen değerler ile aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Cemeroğlu 2015; Pal ve Khanum 2010). Öncelikle, poligalakturonaz enziminin termostabilitesi ile ilgili

analizden elde edilen veriler kullanılarak inaktivasyon hız sabiti (k_d , sa^{-1}) hesaplanmıştır (Eşitlik 3.2).

$$k_d = \left(\frac{2.303}{t} \right) \times \log \left(\frac{A_0}{A} \right) \quad (3.2)$$

İnaktivasyon hız sabiti değerleri kullanılarak poligalakturonazın yarı ömrü ($t_{1/2}$, sa) Eşitlik 3.3 ile hesaplanmıştır.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (3.3)$$

D-değeri (sa), desimal azalma süresi veya bir enzimin sabit bir sıcaklıkta %90'ının inaktivasyonunu sağlamak için gereken süre olarak adlandırılır. Poligalakturonaz enziminin D-değerleri, Eşitlik 3.4 ile hesaplanmıştır.

$$D - \text{değeri} = \frac{\ln 10}{k_d} \quad (3.4)$$

Poligalakturonaz enziminin inaktivasyon enerjisi (E_{ia} , kJ/mol), mutlak sıcaklığın tersine ($1/K$) karşı aktivite değerlerinin logaritması ($\ln V$) Arhenius grafiği üzerinden hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5 ve 3.6).

$$V = A \times e^{E_a/(RT)} \quad (3.5)$$

$$\text{Eğim} = \frac{E_{ia}}{R} \quad (3.6)$$

Q_{10} -değeri, bir enzimatik reaksiyonda sıcaklığın 10°C artması ile reaksiyon hızının kaç kat artacağını ifade eder. Bu değer, boyutsuz bir büyüklüktür. Eşitlik 3.7, Q_{10} -değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$Q_{10} - \text{değeri} = \frac{V_{max_2}}{V_{max_1}} \quad (3.7)$$

Bunlarla birlikte, Z-değeri ($^\circ\text{C}$) de hesaplanmıştır (Eşitlik 3.8). Z-değeri, bir enzimin sabit bir sıcaklıktaki desimal azalma süresinin yani D-değerinin 10 kat azalması için bu sıcaklığın kaç derece artırılması gerektiğini ifade eder. Z-değeri, sıcaklık ($^\circ\text{C}$) değerlerine karşı log D değerleri arasındaki grafiğin eğiminden hesaplanmıştır.

$$\text{Eğim} = \frac{-1}{Z} \quad (3.8)$$

Poligalakturonaz enziminin termal denatürasyonu sırasında entalpi (ΔH , kJ/mol, Eşitlik 3.9), serbest enerji (ΔG , kJ/mol, Eşitlik 3.10) ve entropideki (ΔS , J/molK, Eşitlik 3.11) değişim, aşağıdaki eşitliklerin yardımıyla belirlenmiştir:

$$\Delta H = E_{ia} - RT \quad (3.9)$$

$$\Delta G = -R \times T \times \ln\left(\frac{k_d \times h}{k_b \times T}\right) \quad (3.10)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (3.11)$$

Burada,

k_d = inaktivasyon hız sabiti (sa⁻¹)

t = süre (sa)

A_0 = nispi başlangıç enzim aktivitesi (%)

A = inaktivasyon sıcaklıklarındaki nispi enzim aktivitesi (%)

E_{ia} = inaktivasyon enerjisi (kJ/mol)

T = mutlak sıcaklık (K)

R = üniversal gaz sabiti (8.314 J/molK)

h = Planck sabiti (6.626×10⁻³⁴ J×san)

k_b = Boltzman sabiti (1.38×10⁻²³ J/K)

3.21. Fermentasyonların Modellenmesi ve Farklı Modellerin Karşılaştırılması

Bu çalışmada, Merkezi Kompozit Tasarım ile optimize edilen besiyeri koşullarında gerçekleştirilen fermentasyon sonuçları literatürde sıkça kullanılan matematiksel modeller ile modellenmiştir. Bu amaçla, optimal fermentasyon koşulları ile gerçekleştirilen fermentasyonların enzim üretiminin deneysel verilerini tahmin etmek için 10 farklı matematiksel model (Modifiye Gompertz (MRM), Modifiye Lojistik (MLM), Modifiye Richards (MRM), Stannard, Weibull, Morgan-Mercer-Flodin (MMF), Asimetrik, Baranyi, Huang ve Fitzhugh Modeli) kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Optimal koşullarda gerçekleştirilen en az iki fermentasyonun deneysel sonuçlarının ortalama değerleri, kullanılan matematiksel modellerin en uygununu belirlemek için kullanılmıştır. Modellemelerde, Microsoft Office Excel 2016 programı kullanılmıştır.

Burada (Çizelge 3.4),

A_t = " t "inci zamanda tahmin edilen değerler (g/L, U/mL veya U/mg)

A_m = maksimum asimptot (g/L, U/mL veya U/mg)

Q = maksimum üretim (Q_{PG} U/mL/gün), spesifik üretim (Q_{PG} , U/mg/gün)

B_t ve H_t = geçiş fonksiyonları

λ = poligalakturonaz aktivitesi,

e = Euler sayısı, sabit (2.718)

t = örneğin alındığı zaman (gün)

v (v_1, v_2, v_3 , ve v_4) = birimsiz şekil parametresi.

Bu parametreler, en az hata değeri ve 1'e en yakın olan belirleme katsayısını (R^2) elde etmek için doğrusal olmayan en küçük kareler regresyon prosedürüyle hesaplanmıştır.

Çizelge 3.4. Üretimin matematiksel modellenmesinde kullanılan model tipleri ve hesaplamalarda kullanılan denklemler

Model	Model denklemi	Kaynak
Modifiye Gompertz Modeli	$A_t = A_o + (A_m - A_o) \times \exp \left[-\exp \left\{ \frac{Q \times e \times (\lambda - t)}{A_m} + 1 \right\} \right]$	(Zwietering vd. 1990)
Modifiye Lojistik Modeli	$A_t = A_o + \frac{A_m - A_o}{1 + \exp \left(\frac{4 \times Q \times (\lambda - t)}{A_m} + 2 \right)}$	(Zwietering vd. 1990)
Modifiye Richards Modeli	$A_t = A_o + \frac{A_m - A_o}{\left\{ 1 + v_1 \times \exp (1 + v_1) \times \exp \left(\frac{Q \times (1 + v_1)^{(1+\frac{1}{v_1})} \times (\lambda - t)}{A_m} \right) \right\}^{\frac{1}{v_1}}}$	(Zwietering vd. 1990)
Stannard Modeli	$A_t = A_o + \frac{A_m - A_o}{\left[1 + \exp \left(-\frac{\beta + Q \times t}{v_2} \right) \right]^{v_2}}$	(Stannard vd. 1985)
Weibull Modeli	$A_t = A_m - (A_m - A_o) \times \exp [-(k_1 \times t)^{\delta_1}]$	(Weibull 1951)
Morgan-Mercer-Flodin Modeli	$A_t = A_m - \frac{(A_m - A_o)}{1 + (k_2 \times t)^{\delta_2}}$	(Morgan vd. 1975)
Asimetrik Modeli	$A_t = A_o + (A_m - A_o) \times \left[1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{T_f} \right)^d} \right]$	(Dantigny vd. 2011)
Baranyi Modeli	$A_t = A_o + Q \times B_t - \ln \left[1 + \frac{\exp (Q \times B_t) - 1}{\exp (A_m - A_o)} \right]$ $B_t = t + \frac{1}{Q} \times \ln [\exp (-Q \times t) + \exp (-h_o) - \exp (-Q \times t - h_o)]$	(Baranyi ve Roberts 1994)
Huang Modeli	$A_t = A_o + A_m - \ln [\exp (A_o) + [\exp (A_m) - \exp (A_o)] \times \exp (-Q \times H_t)]$ $H_t = t + \frac{1}{a} \times \ln \left[\frac{1 + \exp (-a \times (t - \lambda))}{1 + \exp (a \times \lambda)} \right]$	(Huang 2013)
Fitzhugh Modeli	$A_t = A_o + (A_m - A_o) \times [1 - \exp (-k_2 \times t)]^{v_3}$	(Fitzhugh Jr 1976)

Bu çalışmada kullanılan 10 farklı matematiksel modelin karşılaştırılması ve en iyi model(ler)in seçimi için ortalama karesel hata (RMSE), ortalama mutlak hata (MAE), R^2 , yanlılık faktörü (BF) ve kesinlik faktörü (AF) değerleri kullanılmıştır. RMSE, proseslerin performansını incelemek amacıyla standart bir istatistiksel metrik olarak kullanılmış olup Eşitlik 3.11 ile hesaplanmıştır (Chai ve Draxler 2014).

$$RMSE = \sqrt{\left[\sum_{t=1}^n (x_t - y_t)^2 \right] / n}, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.11)$$

Model değerlendirmelerinde yaygın olarak kullanılan bir diğer ölçüt MAE de Eşitlik 3.12 ile hesaplanmıştır (Chai ve Draxler 2014).

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n |x_t - y_t|, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.12)$$

Matematiksel modeller kullanılarak tahmin edilen veriler elde edildikten sonra, tahmin edilen değerlerin deneysel verilere karşı grafiği çizilmiş ve R^2 değeri, çizilen doğru denklemine göre tespit edilmiştir. Bununla birlikte, BF değeri, deneysel ve tahmin edilen değerler arasındaki ortalama fark için bir tahmin değeri olup Eşitlik 3.13 kullanılarak hesaplanmıştır. Herhangi bir yapısal sapma yoksa ve BF değeri 1'e eşit ise kesindir (Cayré vd. 2003; Ross 1996).

$$BF = 10^{\sum_{t=1}^n \frac{\log(x_t/y_t)}{n}}, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.13)$$

AF değeri, deneysel ve tahmin edilen değerler arasındaki ortalama mutlak fark için bir tahmin değeri olup Eşitlik 3.14 kullanılarak hesaplanmıştır. Daha büyük değer, daha uzak tahmin demektir (Cayré vd. 2003; Ross 1996).

$$AF = 10^{\sum_{t=1}^n \frac{|\log(y_t/x_t)|}{n}}, \quad t = 1, 2, \dots, n \quad (3.14)$$

Burada,

n = gözlem sayısı,

N = model parametrelerinin sayısı,

RSS = artık kareler toplamı

x_t ve y_t = sırasıyla " t " inci zamandaki deneysel ve tahmin edilen verilerdir.

Ayrıca farklı modeller için hesaplanan BF ve AF değerleri karşılaştırılırken Germec vd. (2019) tarafından kullanılan ve Çizelge 3.5'de verilen güven seviyeleri ve değer aralıkları dikkate alınmıştır.

Çizelge 3.5. Model validasyon değerlerinden AF ve BF'nin yorumu için güven seviyeleri

İdeal Olan	İyi	Kabul edilebilir	Kabul edilemez
AF=1	$1.00 \leq AF < 1.20$	$1.20 \leq AF \leq 1.30$	$AF > 1.30$
BF=1	$0.95 \leq BF \leq 1.11$	$0.87 \leq BF < 0.95$	$BF < 0.87$
		$1.11 < BF \leq 1.43$	$BF > 1.43$

3.22. Enzim Üretimi için Temel bir Maliyet Analizi

Fermentasyon öncesi ve sonrasında ihtiyaç duyulan sarf, kimyasal ve enerji girdilerinin birim fiyatları ile tüketim miktarları üzerinden enzim üretiminin kısa bir maliyet analizi yapılmıştır. Bu amaçla en yüksek aktivitenin elde edildiği fermentasyon için tüm girdiler ayrı ayrı hesaplanmış olup her aşamanın maliyeti için ara toplam verilmiştir. Son olarak da toplam maliyet belirlenmiştir (Turhan 2015). Enerji ve su maliyetleri çalışmanın endüstriyel perspektiften değerlendirilebilmesi için ilgili kuruluşların birim fiyatları kullanılarak hesaplanmıştır. Enerji giderleri için Antalya Organize Sanayi Bölgesi'nin 1 kWa için tanımladığı elektrik tüketim bedeli kabul edilmiştir. Benzer şekilde, fermentasyon öncesi ve sonrası işlemler için kullanılan suyun maliyeti hesaplanırken Antalya Su ve Atıksu İdaresi'nin ticari işletmelere yönelik 1 metreküp su için belirlediği ücretlendirme esas alınmıştır. Hesaplama için çalışma hacmi 1500 ml olan fermentasyondan 750 ml fermente sıvı elde edildiği varsayılmıştır. Hesaplanan maliyet piyasada yaygın olarak bulunan bazı ticari pektinazların fiyatları ile karşılaştırılmıştır.

3.23. İstatistiksel Değerlendirmeler

Enzim üretiminde kullanılan deneme deseni ve istatistiksel analizinde Design-Expert® istatistik programı (Version 7.0.0, Stat-Ease, MN, USA) kullanılmıştır. Varyans analizi (ANOVA) ile program tarafından oluşturulan modele ait sonuçların deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güvenlik seviyesinde tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar varyans analizine ve önemli bulunan ana varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar %95 önem seviyesinde Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine tabi tutulmuştur ($P=0.05$). Bu amaçla SAS istatistik programı (SAS Institute, Cary, NC, USA) kullanılmıştır. Tüm sonuçlar, en az iki tekerrürün ortalaması olarak verilmiş olup tablolarda ortalama±standart sapma (aynı çalışma ise) veya ortalama±standart hata (grupların ortalamaları karşılaştırılırken) şeklinde verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön Denemeler ve Suş Seçimi

Çalışmanın ilk bölümünde iki farklı mikroorganizmanın farklı substratlarda poligalakturonaz üretimleri karşılaştırılmış ve çalışmanın daha sonraki aşamalarına daha verimli olan suş ile devam edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla doğal (wild-type) *Aspergillus sojae* (WT) ve *Aspergillus sojae* (DH56) suşları fermentasyonlarda değerlendirilmiştir.

4.1.1. *A. sojae* (WT) ile glukoz substratında flask denemeleri

Glukoz substratında *A. sojae* (WT) ile aynı koşullarda her biri 96 saat süren 4 fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon sırasında her 24 saat için alınan örneklerin enzim analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *A. sojae* (WT) ile glukoz substratında yapılan denemelere ait sonuçlar

Örnek (Saat)	Deneme #1 PG Akt. (U/ml)	Deneme #2 PG Akt. (U/ml)	Deneme #3 PG Akt. (U/ml)	Deneme #4 PG Akt. (U/ml)	Ortalama PG Akt. (U/ml)
0	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^c
24	1.76 ^c ±0.12	5.64 ^c ±0.61	3.86 ^c ±0.09	3.32 ^c ±0.23	3.65 ^{bc} ±1.39
48	7.26 ^b ±1.23	11.58 ^b ±0.74	6.73 ^c ±0.17	6.85 ^b ±0.98	8.11 ^{bc} ±2.02
72	8.46 ^b ±0.88	13.80 ^{ab} ±1.51	10.19 ^b ±1.25	6.92 ^b ±1.17	9.84 ^{ab} ±2.56
96	12.83 ^a ±1.02	16.02 ^a ±1.69	14.87 ^a ±1.52	12.16 ^a ±1.32	13.97 ^a ±1.55

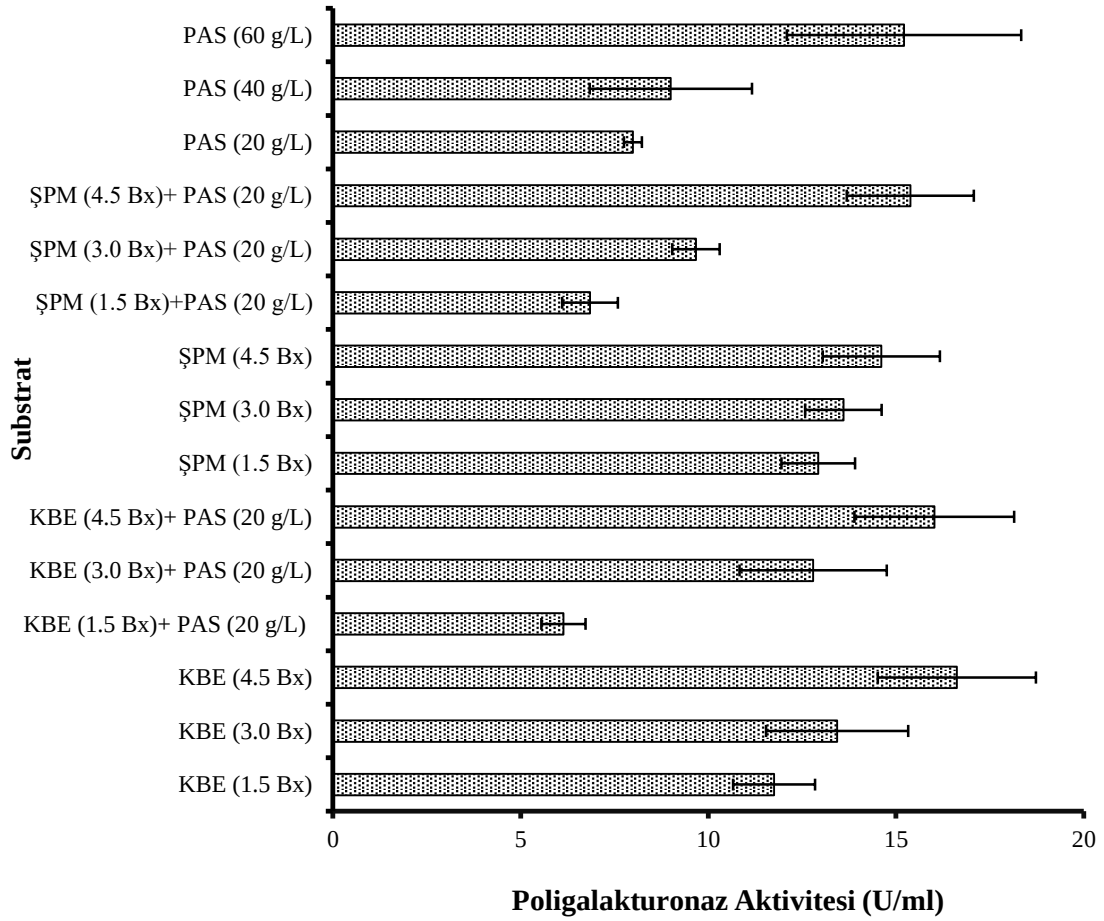
Aynı sütunlardaki farklı harfler için fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$)

Gerçekleştirilen fermentasyonların enzim analizi sonuçlarına göre en düşük poligalakturonaz aktivitesi 12.16 ± 1.32 U/ml olarak Deneme #4’te belirlenirken en yüksek aktivite değeri ise 16.02 ± 1.69 U/ml olarak Deneme #2’de tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bunun yanında her deneme için elde edilen maksimum aktivite değerleri (12.83, 16.02, 14.87 ve 13.97 U/ml) arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır ($P > 0.05$). Her deneme için tespit edilen bu maksimum aktivite değerlerinin ortalaması alınmış ve 13.97 ± 1.55 U/ml olarak belirlenmiştir.

4.1.2. *A. sojae* (WT) ile düşük maliyetli substratlarda flask denemeleri

Bazı ekonomik substratlarda *A. sojae* (WT) ile denemeler yapılmıştır. Düşük maliyetli ve yüksek karbon/azot içeriğine sahip keçiyoynuzu ekstraktı (KBE), şeker pancarı melası (ŞPM) ve peyniraltı suyu (PAS) ile zenginleştirilmiş farklı besiyeri kompozisyonları kullanılarak 15 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Denemeler KBE (1.5, 3.0 ve 4.5°Bx), ŞPM (1.5, 3.0 ve 4.5°Bx) ve PAS’ın (20, 40 ve 60 g/L) farklı konsantrasyonları ile farklı besiyeri kompozisyonları oluşturularak uygulanmıştır.

Gerçekleştirilen denemeler 96 saat sürmüş ve fermentasyon süresi sonunda yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. *A. sojæ* (WT) kullanılarak farklı ekonomik materyallerin substratında gerçekleştirilen fermentasyonlara ait sonuçlar

Şekil 4.1’de verilen bulgulara göre, en yüksek enzim aktivite değerleri KBE (4.5°Bx) ve KBE (4.5°Bx)+PAS (20 g/L) besiyeri kompozisyonlarında sırasıyla 16.62 ± 2.11 ve 16.02 ± 2.13 U/ml olarak tespit edilmiştir. ŞPM+PAS şeklindeki besiyeri kompozisyonlarında kullanılan ŞPM konsantrasyonu arttıkça poligalakturonaz aktivitesi de artmış ve bu şekilde oluşturulan üç besiyerinde elde edilen enzim aktiviteleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Bununla birlikte, en düşük aktiviteler KBE (1.5°Bx)+PAS (20 g/L) ve ŞPM (1.5°Bx)+PAS (20 g/L) kompozisyonlarının kullanıldığı fermentasyonlarda sırasıyla 6.14 ± 0.59 ve 6.85 ± 0.74 U/ml olarak belirlenmiştir. Fermentasyon ortamında substrat olarak sadece ŞPM’nin kullanıldığı denemelerde elde edilen aktiviteler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($P > 0.05$).

4.1.3. *A. sojae* DH56 ile glukoz substratında flask denemesi ve suş seçimi

Daha yüksek aktiviteye sahip poligalakturonaz üretimi için *A. sojae* DH56 ile glukoz substratında denemeler yapılmış ve elde edilen poligalakturonaz aktivite değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *A. sojae* (DH56) ile glukoz substratında gerçekleştirilen denemeye ait sonuçlar

Örnek (Saat)	Poligalakturonaz Akt. (U/ml)
0	0.00±0 ^c
24	7.66±1.12 ^b
48	11.48±0.88 ^b
72	21.36±2.09 ^a
96	23.89±1.63 ^a

*Aynı sütundaki değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$)

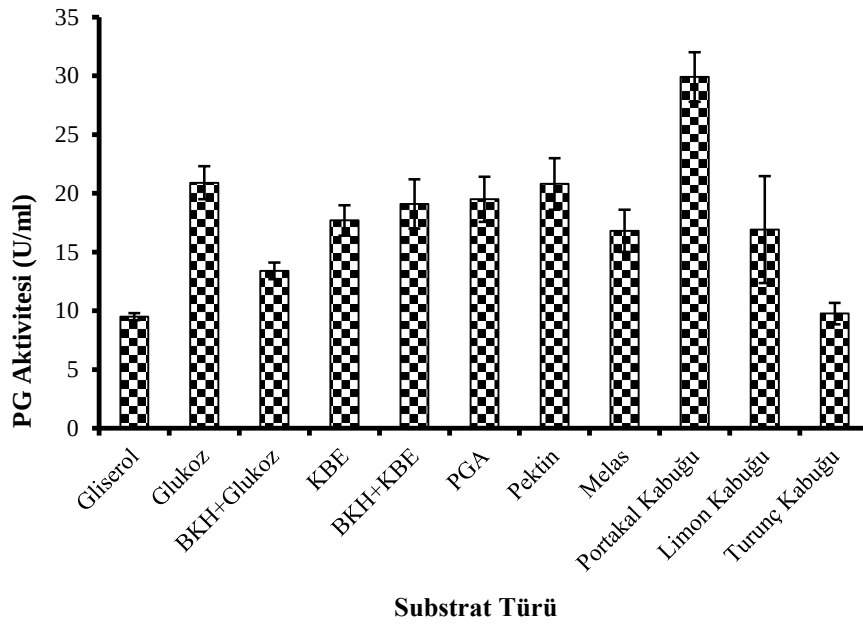
Şekil 4.1, Çizelge 4.1 ve 4.2 incelendiğinde *A. sojae* (WT) suşu ile üretilen en yüksek enzim aktivitesi 16.62 U/ml iken *A. sojae* (DH56) ile yapılan denemede 23.89 U/ml’ye ulaşılmıştır. *A. sojae* (DH56)’nın bu denemede *A. sojae* (WT) suşundan yaklaşık %44 daha yüksek aktivite göstermesi nedeniyle çalışmanın bundan sonraki aşamalarındaki flask denemelerinde *A. sojae* (DH56)’nın kullanımı tercih edilmiştir.

4.2. Besiyeri Bileşimi için Flask Denemeleri

Besiyeri bileşiminin fermentasyonla üretilen ürünlerin verimi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da *A. sojae* (DH56) ile poligalakturonaz üretiminde daha iyi sonuçlar elde edebilmek için fermentasyon ortamında farklı materyallerin ayrı ayrı kullanıldığı flask ölçekli denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerin sonuçları ile en verimli karbon ve azot kaynağı belirlenmiştir.

4.2.1. Farklı karbon kaynakları ile flask denemeleri

Çalışmanın bu aşamasında yüksek saflığa sahip karbon kaynaklarından glukoz, gliserol, PGA ve pektinin yanı sıra düşük maliyetli ve kompleks bir bileşime sahip KBE, ŞPM, buğday kepeği hidrolizatı (BKH), portakal kabuğu (PK), limon kabuğu (LK) ve turunc kabuğu (TK) ve bunların bazı karışımları substrat olarak değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen bu 11 farklı fermentasyonun enzim analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı karbon kaynaklarının denendiği flask denemelerine ait aktivite sonuçları

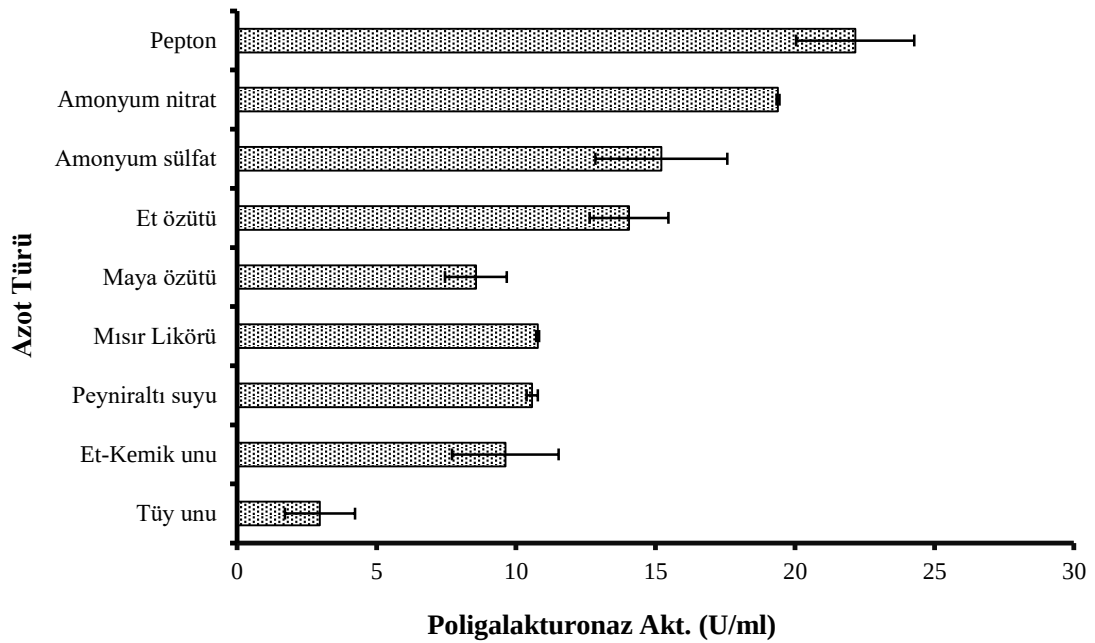
Elde edilen sonuçlara göre en yüksek enzim aktivitesi portakal kabuğunun kullanıldığı fermentasyonda 29.9 ± 2.1 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Diğer turuncgil atıkları olan limon ve turunç kabuğunun değerlendirildiği denemeler için maksimum poligalakturonaz aktiviteleri ise sırasıyla 16.9 ± 4.6 ve 9.8 ± 0.9 U/ml olarak belirlenmiştir. Öte yandan, şeker içeriği açısından zengin ve ekonomik materyaller olan melas ve keçiboynuzu ekstraktının substrat olarak kullanıldığı fermentasyonlar için en yüksek enzim aktiviteleri sırasıyla 17.7 ± 1.3 ve 16.8 ± 1.8 U/ml olarak bulunmuştur. Saf kaynaklar glukoz, gliserol, pektin ve PGA için ulaşılan en yüksek aktivite değerleri ise sırasıyla 20.9 ± 1.4 , 9.5 ± 0.3 , 20.8 ± 2.2 ve 19.5 ± 1.9 U/ml olarak tespit edilmiştir. Bir diğer ekonomik materyal olan buğday kepeği hidrolizatı ile zenginleştirilmiş glukoz ve keçiboynuzu substratında gerçekleşen fermentasyonlara ait enzim aktiviteleri sırasıyla 13.4 ± 0.7 ve 19.1 ± 2.1 U/ml olarak belirlenmiştir.

Glukoz, sukroz, fruktoz gibi yüksek saflıktaki karbon kaynaklarının proses maliyetlerinde artışa neden olmasından dolayı endüstriyel ölçekteki fermentasyonlarda çok nadiren kullanılmaktadır. Bunun yerine tarımsal/endüstriyel atıklar gibi hem kompleks/zengin bileşen içeriğine sahip hem de daha ekonomik olan materyaller tercih edilmektedir. Mikrobiyal enzimlerin üretiminde de bu unsurlar değerlendirilmektedir. Literatürde ekonomik substratlar ile yapılmış en fazla çalışılan enzim gruplarından biri de pektinazlardır. Özellikle narenciye atıklarının pektinaz üretiminde indükleyici etkiye sahip olması araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu çalışmada da 11 farklı besiyeri denenmiş ve en yüksek aktivite (29.9 U/ml) portakal kabuğu ile gerçekleştirilen fermentasyonda elde edilmiştir (Şekil 4.2). Pektinazların ucuz materyaller ile üretimine yönelik yapılan araştırmalarda portakal kabuğunun üretimi artıran bir etkiye sahip olduğunun bildirildiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada pirinç kepeği, buğday kepeği, şeker kamışı, limon kabuğu, muz kabuğu ve portakal kabuğunun

ayrı ayrı denendiği katı kültür ortamında *Aspergillus niger* ile pektinaz üretimleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen aktivite değerlerinin sırasıyla 541, 850.5, 760, 927.5, 335 ve 1224 U/g olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Mrudula ve Anitharaj 2011). Düşük maliyetli substratların kullanıldığı başka bir çalışmada, portakal kabuğu, elma kabuğu, turunc kabuğu, buğday kepeği, pirinç kepeği ve şeker kamışı substratında *Aspergillus nomius* MR103 kullanılarak ekzo-poligalakturonaz üretimleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen aktivite değerleri sırasıyla 4.83, 1.80, 1.94, 1.88, 1.56 ve 2.01 IU/mg olarak bildirilmiştir (Ketipally vd. 2019). Benzer bir çalışmada, Doughari (2019) tarafından besiyerinde tatlı patates, portakal kabuğu, muz kabuğu, pişirme muzu (plantain) kabuğu, fruktoz, glukoz, maltoz, mannitol, laktoz, sukroz ve pektin kullanılarak *Aspergillus flavus* suşu ile poligalakturonaz üretilmiştir. Bildirilen sonuçlara göre en yüksek enzim aktivitesi (3.7 U/ml) portakal kabuğu substratında, en düşük aktivite değeri (~0.25 U/ml) ise glukoz substratında belirlenmiştir.

4.2.2. Farklı azot kaynakları ile flask denemeleri

Tipik bir fermentasyon besiyeri için en önemli içeriklerden olan azotun poligalakturonaz üretimine etkisini incelemek için 9 farklı azot kaynağı ayrı ayrı denenmiştir. Azot kaynağı olarak eklenen materyallerden 3 tanesi ekonomik endüstriyel atık (peynir altı suyu, et-kemik unu ve tüy unu), 6 tanesi ise yüksek saflıktaki (amonyum nitrat, amonyum sülfat, mısır likörü, maya özütü, et özütü ve pepton) azot kaynaklarıdır. Fermentasyon sonunda alınan örneklerde enzim analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı azot kaynakları ile poligalakturonaz denemeleri

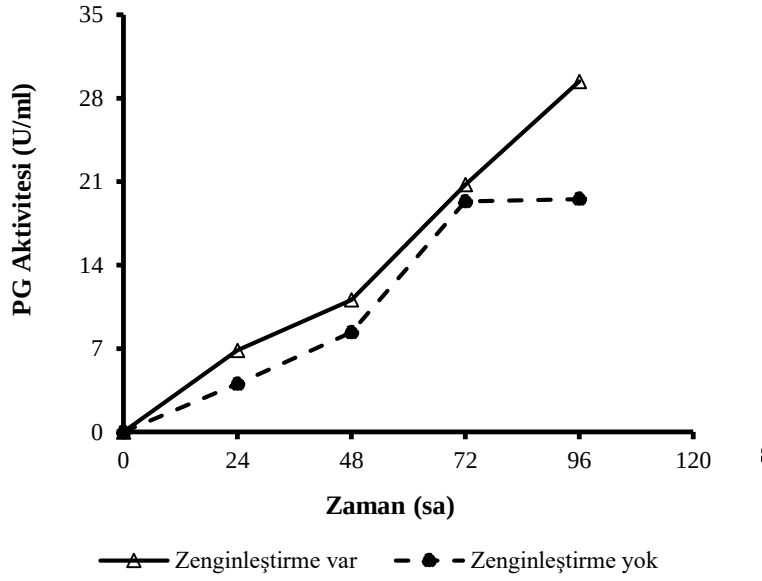
Yapılan enzim analizleri sonucunda en yüksek poligalakturonaz aktivitesi 22.16 ± 2.12 U/ml olarak pepton kullanılan besiyerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Diğer saf kaynaklar maya özütü, et özütü, mısır likörü, amonyum sülfat ve amonyum nitrat için

enzim aktiviteleri ise sırasıyla 8.56 ± 1.41 , 14.05 ± 2.37 , 10.78 ± 1.11 , 15.21 ± 1.91 ve 19.39 ± 1.26 U/ml olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, peynir altı suyu, et-kemik unu ve tıy unu için aktivite değerleri sırasıyla 10.58 ± 0.20 , 9.62 ± 0.05 ve 2.67 ± 0.04 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Araştırmacılar son yıllarda karbon kaynaklarında olduğu gibi azot kaynağı tercihinde de daha düşük maliyetli mikrobiyal ürünler üretebilmek için alternatif kaynaklara odaklanmıştır. Alternatif bir azot kaynağının mikrobiyal gelişim ve üretim üzerinde herhangi bir inhibisyona neden olmaması, verime pozitif etkisinin olması beklenir. Bu amaçla başta gıda endüstrisi olmak üzere birçok endüstri kolunda açığa çıkan atıklar değerlendirilebilmektedir. Bu çalışmada da üç farklı alternatif denenmiş ancak en iyi sonuç (22.16 U/ml) saf bir kaynak olan peptonun kullanıldığı fermentasyondan elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis strain Btk 27* ile sıvı kültür ortamında pektinaz üretimi üzerine pepton, üre, glisin, kazein, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve amonyum klorür etkisi incelenmiş olup elde edilen bulgulara göre enzim aktivitelerinin sırasıyla 33.8 , 32.2 , 33.9 , 67.7 , 34.9 , 29.4 ve 44.7 U/ml olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Oumer ve Abate 2018). Başka bir çalışmada maya özütü, pepton, kazein, üre ve amonyum sülfatın *Aspergillus flavus* ile poligalakturonaz üretimine olan etkisi araştırılmış ve tespit edilen aktive değerleri sırasıyla 0.40 , 0.42 , 0.37 , 1.1 , 1.6 U/ml şeklinde belirtilmiştir. Bu çalışmada olduğu gibi en iyi azot kaynağının pepton olarak belirlendiği bir başka çalışmada ise Ketipally vd. (2019), amonyum sülfat, amonyum nitrat, et özütü, potasyum klorit, sodyum nitrat, maya özütü ve pepton ile zenginleştirilmiş fermentasyon ortamında *Aspergillus nomius* MR103 suşunu kullanarak yaptıkları poligalakturonaz üretimlerinin sonuçlarını sırasıyla 3.86 , 2.95 , 2.59 , 2.80 , 4.23 , 5.60 ve 5.94 IU/mg olarak bildirmiştir.

4.2.3. Diğer zenginleştirme unsurlarının etkisi

A. sojae 20235 ile poligalakturonaz üretimine dönük daha önceki çalışmalarda (Karahalil vd. 2017; Oncu vd. 2007) fermentasyon ortamının zenginleştirilmesi için karbon ve azot kaynakları ile birlikte zenginleştirme unsuru olarak monosodyum fosfat ve disodyum fosfat kullanılmıştır. Bu aşamada, söz konusu zenginleştirme unsurlarının üretime etkisi incelenmiş ve herhangi bir zenginleştirme yapılmayan kontrol denemesi ile kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.4’de verilmiştir.



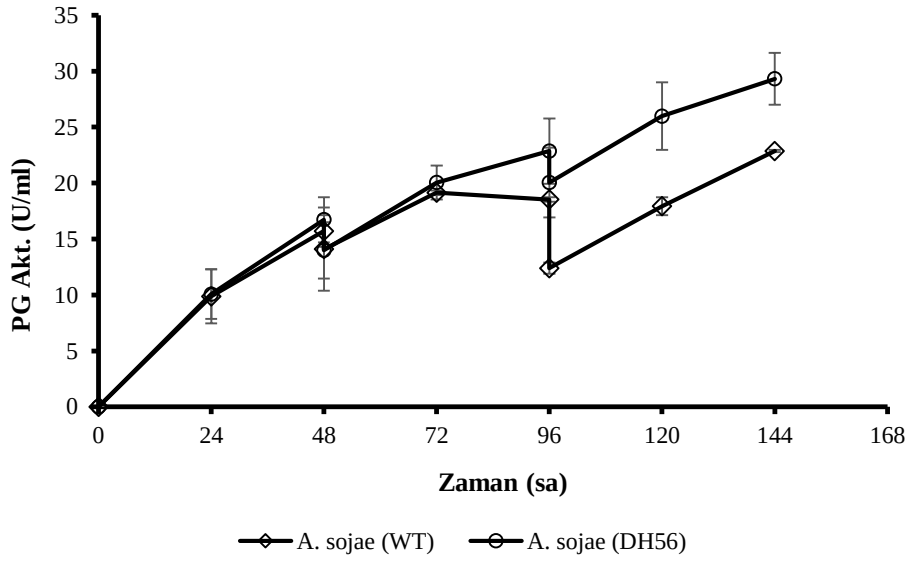
Şekil 4.4. Zenginleştirmenin poligalakturonaz üretimine etkisi

Yapılan enzim analizlerinin sonuçlarına göre, fermentasyon sonunda zenginleştirilmiş besiyerindeki enzim aktivitesi 29.41 ± 4.9 U/ml, kontrol denemesinde ise 19.54 ± 1.1 U/ml olarak tespit edilmiştir. Bu denemeler ile zenginleştirmenin enzim aktivitesini yaklaşık %50 artırdığı görülmüş ve bu nedenle çalışmanın bundan sonraki tüm aşamalarında zenginleştirme uygulanmıştır.

4.3. Besiyeri Bileşeni Seçimi için Reaktör Denemeleri

4.3.1. Reaktörde *A. sojæ* (WT) ve *A. sojæ* (DH56) ile yapılan reaktör denemeleri

Bölüm 1’de *A. sojæ* (WT) ve *A. sojæ* (DH56) ile flask düzeyinde denemeler yapılmış ve *A. sojæ* (WT)’nin kullanıldığı fermentasyonlarda daha verimli sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında da her iki suşun portakal kabuğu substratı ile karıştırmalı tank biyoreaktördeki poligalakturonaz üretimleri incelenmiştir. Fermentasyonlar 144 saat süre ile devam etmiş olup yarı-kesikli beslemeli olarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla fermentasyonun 48. ve 96. saatlerinde fermentasyon ortamına 300 ml steril besiyeri ilavesi yapılmıştır. Fermentasyon sonrası yapılan analize ait sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir.

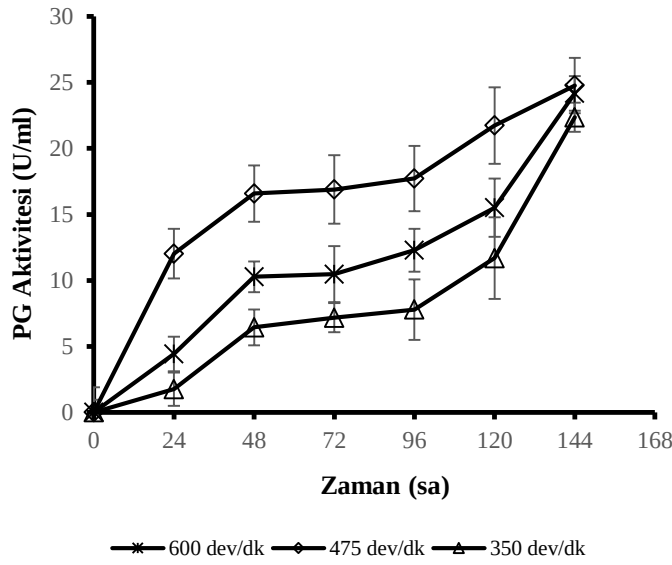


Şekil 4.5. Biyoreaktörde *A. sojae* (WT) ve *A. sojae* DH56 suşları ile yapılan poligalakturonaz üretimleri

Elde edilen sonuçlara göre *A. sojae* DH56 ile yapılan denemede enzim aktivitesi düzenli bir artış göstermiş ve en yüksek enzim aktivitesi değeri fermentasyonun 144. saatinde 29.31 U/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). Benzer şekilde, *A. sojae* (WT) ile yapılan denemede de en yüksek poligalakturonaz aktivitesi 22.86 U/ml olarak 144. saatte belirlenmiştir. Sonuç olarak, gerçekleştirilen analiz sonuçları dikkate alındığında flask denemelerine benzer şekilde biyoreaktörde de *A. sojae* DH56 ile poligalakturonaz üretiminin *A. sojae* (WT) ile gerçekleştirilen üretimlere nispeten %28 daha verimli olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmanın bu aşamadan sonraki reaktör denemelerinde de *A. sojae* DH56 kullanılmıştır.

4.3.2. Biyoreaktörde karıştırma hızının enzim üretimine etkisi

Biyoreaktörde karıştırma hızının poligalakturonaz üretimine etkisini incelemek amacıyla 350, 475 ve 600 dev/dk'da fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Denemelerden 24 saatte bir periyodik olarak alınan örnekler fermentasyon sonunda analiz edilmiş ve tespit edilen enzim aktiviteleri Şekil 4.6'da sunulmuştur.

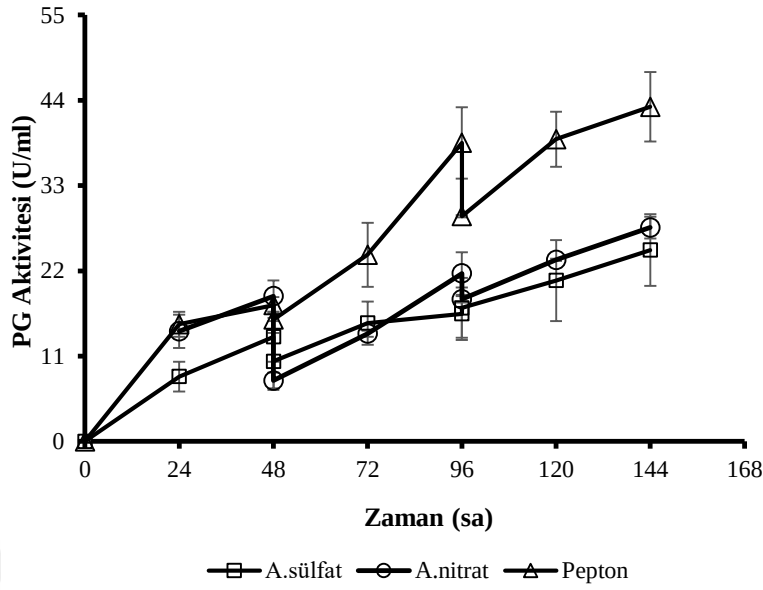


Şekil 4.6. Farklı karıştırma hızları ile gerçekleştirilen poligalakturonaz üretimleri

Şekil 4.6’da da görüldüğü gibi, her 24 saat için hesaplanan enzim aktivite değerleri dikkate alındığında her üç denemenin de kendi içindeki 48, 72 ve 96. saatleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Benzer şekilde, fermentasyonların 96-144 saatleri arasında düzenli aktivite artışı olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli bir artış olmadığı hesaplanmıştır ($P>0.05$). Fermentasyonlara ait aktivite sonuçlarına göre her üç denemede de en yüksek aktivite değerleri denemelerin 144. saatlerinde tespit edilmiştir. Karıştırma hızının 350, 475 ve 600 dev/dk olduğu denemelerin en yüksek poligalakturonaz aktiviteleri sırasıyla 22.36, 24.78 ve 24.17 U/ml olarak tespit edilmiş olup aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). Ancak bununla birlikte 475 dev/dk karıştırma hızı ile gerçekleştirilen fermentasyondaki farklı günlere ait poligalakturonaz aktivitelerinin diğer iki fermentasyona ait aktivite değerlerinden yüksek olduğu için çalışmanın bundan sonraki aşamalarında karıştırma hızı olarak 475 dev/dk tercih edilmiştir.

4.3.3. Biyoreaktörde en iyi 3 azot kaynağı ile enzim üretimi

Bölüm 1’de flask ölçeğinde 9 farklı azot kaynağı denenmiş ve en yüksek ilk 3 aktivite değeri pepton (22.16 U/ml), amonyum nitrat (19.39 U/ml) ve amonyum sülfatın (15.21 U/ml) kullanıldığı fermentasyonlardan elde edilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde de bu 3 azot kaynağı kullanılarak biyoreaktör ortamında gerçekleştirilen fermentasyonlarda poligalakturonaz üretimindeki değişim incelenmiştir. Fermentasyonlar yarı-kesikli beslemeli olarak yapılmış olup 48. ve 96. saatlerde 300 ml besiyeri ilavesi yapılmıştır. Fermentasyon süresince alınan örneklerde yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de sunulmuştur.

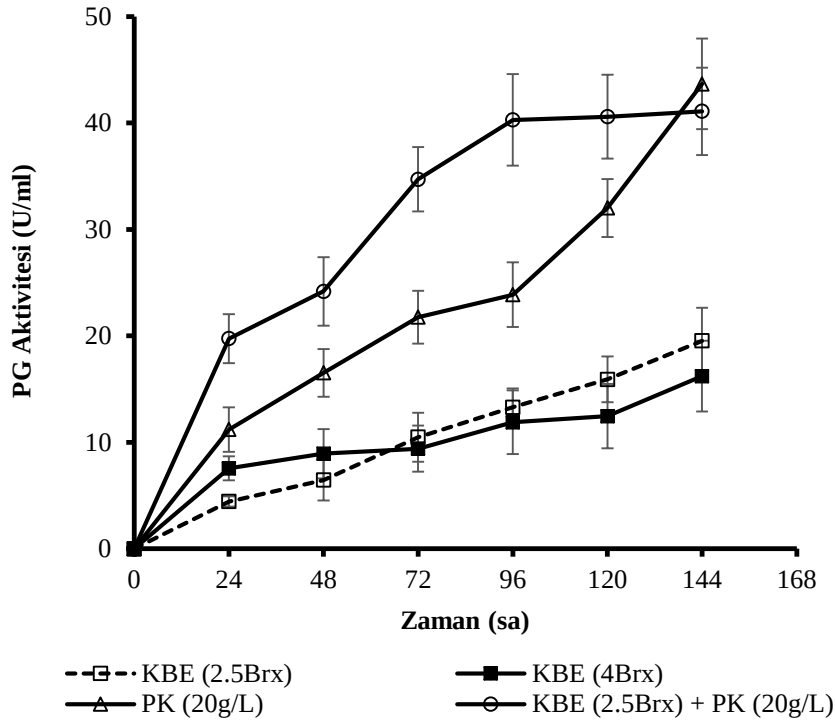


Şekil 4.7. En iyi 3 azot kaynağı ile yapılan reaktör denemelerine ait enzim aktiviteleri

Yapılan fermentasyona ait analiz sonuçlarına göre en yüksek poligalakturonaz aktivitesi değeri pepton ile zenginleştirilmiş besiyeri ortamında gerçekleştirilen fermentasyonun 144. saatinde 44.16 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Her üç denemede de enzim aktivitesi düzenli bir şekilde artmış olup 48. ve 96. saatlerde besiyeri ilavesinden kaynaklı düşüşler olmuştur. Amonyum sülfat ve amonyum nitrat ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ulaşılan en yüksek enzim aktivitesi 144. saat sonunda sırasıyla 24.68 ve 27.60 U/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pepton ile zenginleştirilen fermentasyonda ulaşılan en yüksek aktivite ile amonyum sülfat ve amonyum nitratın kullanıldığı fermentasyonlardan elde edilen en yüksek aktivite değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Böylece pepton en verimli azot kaynağı olarak seçilmiş olup bundan sonraki aşamalarda gerçekleştirilen biyoreaktör denemelerinde pepton kullanılmıştır.

4.3.4. Keçiboynuzu ekstraktı ve portakal kabuğu substratında enzim üretimi

Flask denemelerinde en iyi sonuçları veren PK ve bir diğer düşük maliyetli materyal olan KBE kullanılarak biyoreaktörde fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir (Ek-4). Bu amaçla 4 farklı besiyeri denenmiştir: (i) KBE (2.5°Bx), (ii) KBE (4.0°Bx), (iii) KBE (2.5°Bx)+PK (20 g/L), (iv) PK (20 g/L). Poligalakturonaz üretimi için kullanılan suşun (*A. sojae* ATCC 20235) temel besiyeri kompozisyonunda (Tari vd. 2008) şeker miktarının düşük olmasından dolayı yapılan denemelerde olası bir karbon baskılamasına (karbon katabolit represyon) neden olmamak için bu iki materyal besiyerine düşük konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Fermentasyon ortamı 0.15 vvm'e ayarlanan bir kompresör ile fermentasyon süresince havalandırılmış olup herhangi bir pH kontrolü yapılmamıştır. Fermentasyon sonrası alınan örneklerde yapılan enzim aktivitesi analizlerine ait sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Keçiyoynuzu ekstraktı ve portakal kabuğu ile biyoreaktörde enzim üretimi

Şekil 4.8 incelendiğinde, fermentasyon ortamında substrat olarak sadece PK (20 g/L)'nin değerlendirildiği denemenin 0-96. saatler arasında enzim aktivitesinin düzenli olarak arttığı görülmektedir. Bununla birlikte fermentasyonun 96, 120 ve 144. saatleri için belirlenen poligalakturonaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$). Aynı deneme için en yüksek aktivite değeri ve maksimum üretim oranı ise sırasıyla 43.68 U/ml ve 0.431 U/ml/sa olarak belirlenmiştir. İkinci deneme olarak besiyerinde KBE (2.5°Bx) ve PK (20 g/L)'nin birlikte kullanıldığı fermentasyon gerçekleştirilmiş olup elde edilen en yüksek aktivite 144. saatte 41.09 U/ml olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun 0-72 ve 96-144. saatleri arasında poligalakturonaz aktivitesi düzenli olarak artmış ve bu deneme için maksimum üretim oranı 0.336 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Üçüncü olarak, besiyerinde sadece KBE (2.5°Bx)'nin substratında fermentasyon yapılmış olup en yüksek aktivite değeri ve üretim oranı sırasıyla 19.54 U/ml ve 0.143 U/ml/sa olarak tespit edilmiştir. Son fermentasyon KBE (4.0°Bx) substratında gerçekleştirilmiş olup ulaşılan en yüksek aktivite değeri ve üretim oranı sırasıyla 16.22 U/ml ve 0.090 U/ml/sa olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen dört fermentasyona ait bulgular incelendiğinde, KBE (4.0°Bx) daha yüksek şeker içeriğine sahip olmasına rağmen, KBE (2.5°Bx) ile daha yüksek poligalakturonaz aktivitesi elde edilmiştir. Ayrıca sadece KBE substratında yapılan denemelerin PK'nın kullanıldığı denemelerden daha düşük sonuçlar verdiği ve sadece PK kullanımının daha verimli olduğu görülmüştür.

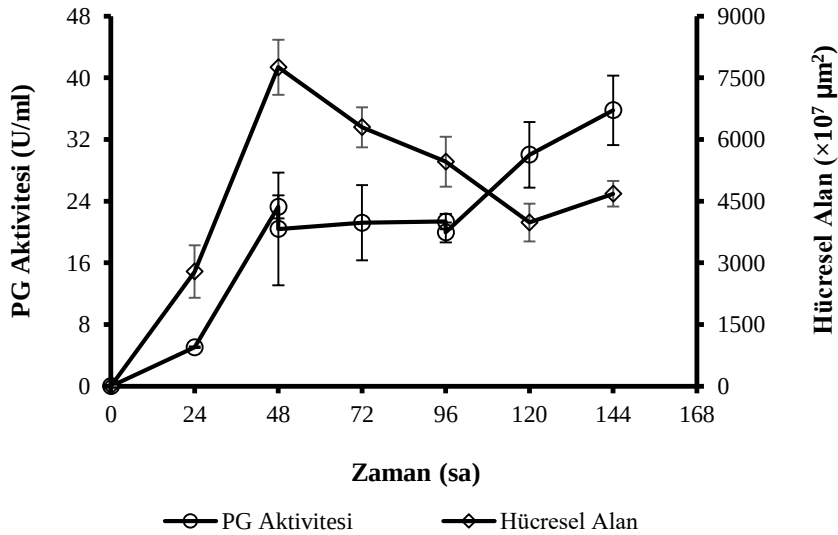
4.4. Mikropartikül Uygulaması ile Biyoreaktörde Enzim Üretimi

Farklı karbon ve azot içerikli materyaller ile besiyerinin zenginleştirilmesine yönelik denemelerden sonra çalışmanın bu aşamasında enzim aktivitesini artırmak

amacıyla mikropartikül uygulaması denenmiştir. Daha önce tez yazarının da aralarında bulunduğu bir ekip tarafından yapılan çalışmalarda (Germec vd. 2017; Karahalil vd. 2017; Yatmaz vd. 2016) aşırı fungal gelişimi sınırlayarak enzim aktivitesini artırdığı bilinen mikropartikül ajanlarının bu çalışmada da fermentasyon ortamına ilave edilerek poligalakturonaz aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Mikropartikül türü olarak literatürde en sık kullanılan iki mikropartikül türü olduğu bildirilen (Karahalil vd. 2019a) alüminyum oksit ve talc tercih edilmiştir. Bununla birlikte, mikropartikül konsantrasyonu için daha önce alüminyum oksit (Karahalil vd. 2017) ve talc (Karahalil 2018) ile flask ölçeğinde yapılan konsantrasyon tarama (screening) çalışmalarında belirlenen optimum sonuçlar (Al_2O_3 : 20 g/L; talc: 5g/L) kullanılmıştır. Ayrıca substrat olarak en verimli materyal olan PK ile birlikte daha önceki denemelerde aktiviteyi artırmamasına rağmen biyoreaktörde yüksek biyokütle oluşumu sağlayan (bkz. Ek-4) KBE'nin de mikropartikül ile birlikte kullanılmasının enzim aktivitesine olumlu etkisinin olabileceği düşünülmüştür. *A. sojae* 'nin gelişimini desteklemek amacıyla deneme süresince fermentasyon ortamına 0.15 vvm hava verilmiştir. Karıştırma hızı 475 dev/dk olarak ayarlanmıştır. Besiyerinden ayrı bir şekilde sterilizasyona tabi tutulan mikropartikül solüsyonu mikrobiyal gelişimin olumsuz etkilenmemesi için 24 saat sonunda fermentasyon ortamına aseptik olarak ilave edilmiştir. Periyodik olarak 24 saatte bir alınan örneklerde morfolojik görüntüleme yapılarak ortalama hücresel alan değeri hesaplanmıştır.

4.4.1. Portakal kabuğu ve talc ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi

Substrat olarak PK'nın (60 g/L) değerlendirildiği fermentasyon sterilizasyon ve inokülasyonun ardından karıştırmalı tank biyoreaktörde başlatılmıştır. Fermentasyon yarı-kesikli beslemeli olarak gerçekleştirilmiş olup 48 ve 96. saatlerde 300 ml besiyeri ilavesi yapılmıştır. Günlük alınan örneklerden elde edilen enzim aktivitesi ve ortalama hücresel alan değerleri Şekil 4.9'da sunulmuştur.



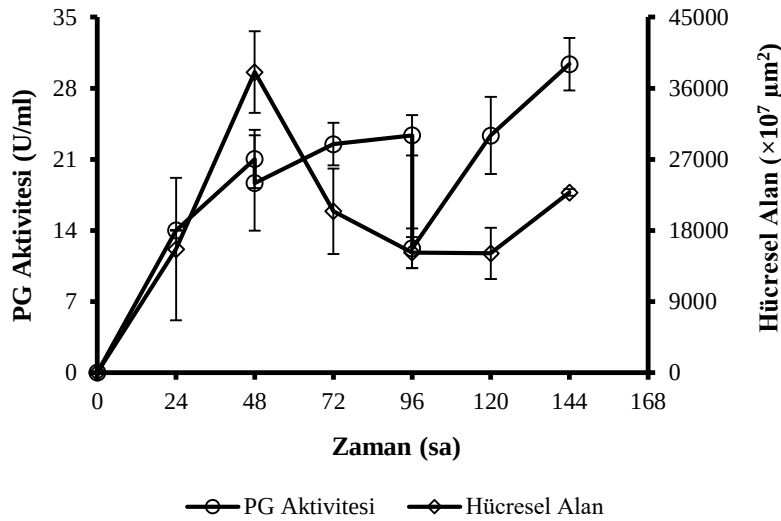
Şekil 4.9. Portakal substratı ve talc (5g/L) ile zenginleştirilmiş besiyeri kullanılarak biyoreaktörde enzim üretimi

Elde edilen bulgulara göre fermentasyonun ilk 48 saatinde enzim aktivitesi düzenli olarak artmış ve 48. saatte 23.27 U/ml'ye ulaşmıştır (Şekil 4.9). Bununla birlikte fermentasyona ilk besiyeri ilavesinin yapıldığı 48. saatten sonra 48, 72 ve 96. saatler için belirlenen enzim aktiviteleri (sırasıyla 20.40, 21.20 ve 21.35 U/ml) arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$). Bununla birlikte en yüksek poligalakturonaz aktivitesi fermentasyonun son gününde 35.79 U/ml olarak belirlenmiştir. Fermentasyonun maksimum üretim oranı ise 0.330 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır.

A. sojæ 'nin ortalama hücresel alanı fermentasyonun 48. saatinde $7757 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanmış olup bu değer 120. saate kadar düzenli olarak azalmış ve $4680 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ 'ye kadar düşmüştür. Bunun nedeni besiyerine 24. saatte talc mikropartikülü ilave edilmesi ile birlikte *A. sojæ* 'nin oluşturduğu yoğun fungal oluşumların daha basit morfolojik yapılara indirgenmiş olmasıdır. Diğer yandan denemenin 120. saatinden sonra ortalama hücresel alanda bir artış olmakla beraber 120 ve 144. saatler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir ($P>0.05$).

4.4.2. Portakal kabuğu ve Al_2O_3 ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi

Karıştırmalı tank biyoreaktörde PK (60 g/L) ile hazırlanan besiyerinin sterilizasyonu ve inokülasyon işleminin ardından fermentasyon başlatılmıştır. Fermentasyon yarı-kesikli beslemeli olarak gerçekleştirilmiş olup denemenin 48 ve 96. saatlerinde 300 ml besleme yapılmıştır. Her 24 saatte bir periyodik olarak alınan örneklerde tespit edilen enzim aktivitesi sonuçları ve hesaplanan ortalama hücresel alan değerleri Şekil 4.10'da sunulmuştur.



Şekil 4.10. Portakal kabuğu ve Al_2O_3 ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimine ait sonuçlar

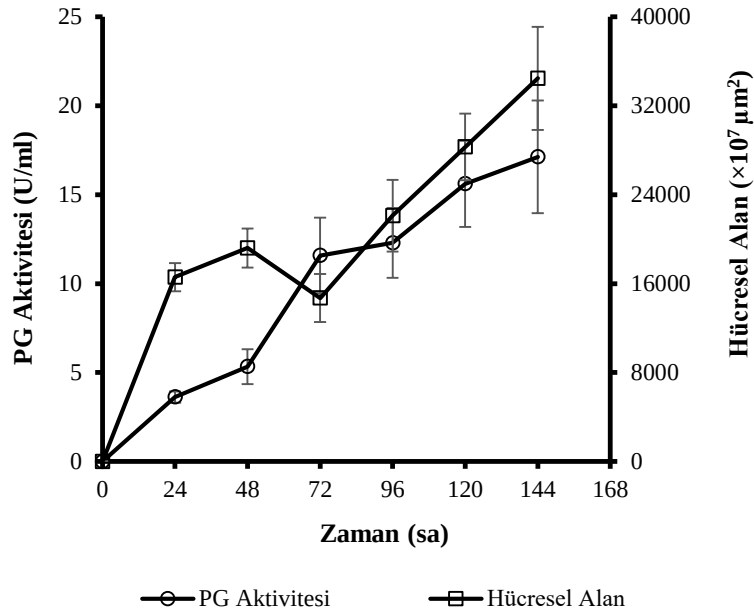
Elde edilen sonuçlara göre fermentasyonun 48, 72 ve 96. saatlerinde enzim aktivitesi sırasıyla 21.03, 22.49 ve 23.37 U/ml olarak belirlenmiş olup aralarında

istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$) (Şekil 4.10). Bununla birlikte 96. saatte yapılan beslemenin ardından 96, 120 ve 144. saatler için belirlenen poligalakturonaz aktiviteleri sırasıyla 12.24, 23.35 ve 30.37 U/ml olarak belirlenmiş ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Ayrıca 144. saat için belirlenen 30.37 U/ml’lik enzim aktivitesi aynı zamanda denemeye ait en yüksek aktivite değeridir. Fermentasyonun maksimum üretim oranı ise 0.378 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır.

Ortalama hücresel alan, sonuçları Şekil 4.9’da verilen talc denemesinde olduğu gibi, 48. saatte kadar artış göstermiştir. Denemenin 48. saatinde $38034 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanan ortalama hücresel alan değeri bu noktadan sonra 24. saatte ortama eklenmiş olan Al_2O_3 mikropartiküllerinin etkisi ile 120. saate ($15100 \times 10^7 \mu\text{m}^2$) kadar düzenli olarak azalmıştır.

4.4.3. Portakal kabuğu, keçiyoynuzu ekstraktı ve talc ile zenginleştirilmiş besiyerinde enzim üretimi

Karıştırmalı tank biyoreaktörde gerçekleştirilen deneme için PK (20 g/L) ve KBE (2.5°Bx) ile hazırlanan bir fermentasyon ortamı kullanılmıştır. Günlük olarak alınan örneklerde tespit edilen enzim aktivitesi sonuçları ve hesaplanan ortalama hücresel alan değerleri Şekil 4.11’de sunulmuştur.



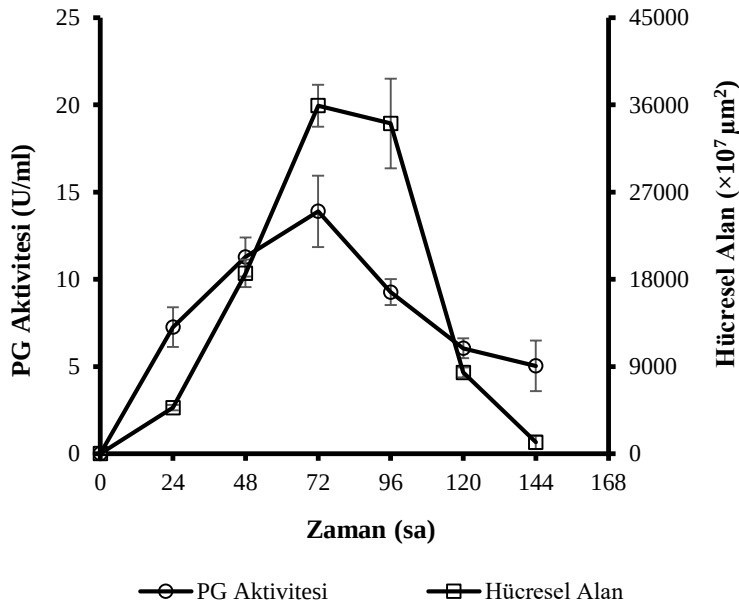
Şekil 4.11. Portakal kabuğu, keçiyoynuzu ekstraktı ve talc ile zenginleştirilmiş besiyerindeki enzim üretimine ait sonuçlar

Elde edilen sonuçlara göre fermentasyon süresince enzim aktivitesi artmış olup en yüksek aktivite değeri 144. saatte 17.12 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Bununla birlikte fermentasyonun maksimum üretim oranı 0.166 U/ml olarak

hesaplanmıştır. *A. sojæ* 'nin morfolojik değişimine bakıldığında, 48. saatte $19203 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanan ortalama hücresel alan değeri 72. saatte $14702 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ 'ye düşmüştür. Ancak bu noktadan sonra hücresel alan değeri fermentasyon sonuna (144. saat) kadar artmış ve $34454 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ olarak belirlenmiştir.

4.4.4. Portakal kabuğu, keçiyoynuzu ekstraktı ve Al_2O_3 ile zenginleştirilmiş besiğinde enzim üretimi

PK (20 g/L) ve KBE (2.5°Bx) kullanılarak hazırlanan besiyeri ile karıştırmalı tank biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyona ait enzim aktivitesi ve ortalama hücresel alan değerleri belirlenerek Şekil 4.12'de sunulmuştur.



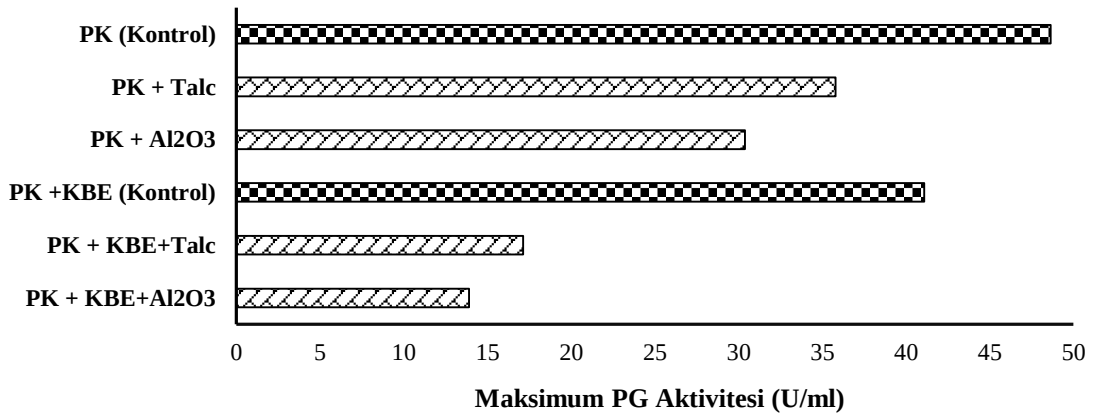
Şekil 4.12. Portakal kabuğu, keçiyoynuzu ekstraktı ve Al_2O_3 ile zenginleştirilmiş besiyerindeki enzim üretimine ait sonuçlar

Denemeden elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesi fermentasyonun 72. saatinde 13.90 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Bununla birlikte 72 ve 96. saatlerde sırasıyla 35912×10^7 ve $34085 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanan ortalama hücresel alan değeri fermentasyonun devamında dramatik olarak düşmüş olup 120 ve 144. saatler için sırasıyla 8389×10^7 ve $1177 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanmıştır ($P < 0.05$). Hücresel alan değerindeki bu düşüşe rağmen diğer mikropartikül uygulamalarının aksine bu denemede enzim aktivitesi sürekli artış göstermemiş olup 72. saatten sonraki 96, 120 ve 144. saatler için enzim aktivitesi sırasıyla 9.27, 6.04 ve 5.04 U/ml olarak tespit edilmiştir. Maksimum üretim oranı ise 0.138 U/ml/sa olarak belirlenmiştir.

4.4.5. Mikropartikül denemelerine ait enzim üretimlerinin karşılaştırılması

Mikropartikül uygulamasından önce biyoreaktörde enzim üretimine yönelik en yüksek sonuca (44.16 U/ml) Bölüm 4.3.3'deki azot kaynağı denemelerinde ulaşılmıştır.

Bu deneme mikropartikül uygulamalarının kıyaslanmasında kontrol olarak değerlendirilmiştir. Mikropartikül uygulanarak gerçekleştirilen dört denemeye ait sonuçlar incelendiğinde mikropartikül ile zenginleştirilmiş besiyerinde yapılan fermentasyonlara ait aktivite değerlerinin herhangi bir mikropartikül ilavesinin yapılmadığı denemelerden (kontrol) daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.13). Ayrıca substrat olarak sadece PK'nın kullanıldığı mikropartikül denemelerinden elde edilen enzim aktiviteleri (35.79 ve 30.37 U/ml) PK+KBE substratında gerçekleştirilen enzim üretimlerine ait sonuçlardan (17.12 ve 13.90 U/ml) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber aynı substratın kullanıldığı fermentasyon ortamlarına eklenen mikropartiküller kendi aralarında kıyaslandığında talc ile yapılan fermentasyonlardan Al_2O_3 ile gerçekleştirilenlere nispeten daha yüksek aktivite elde edilmiştir. Bunun nedeni talc ($10\ \mu m$)'ın Al_2O_3 ($> 63\ \mu m$)'e göre daha küçük partikül boyutuna sahip olması ve morfolojik yapılar arasına daha kolay girerek enzim salınımına etki etmesi olarak açıklanabilir (Karahalil 2018). Yatmaz vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, glukoz ve KBE substratında Al_2O_3 ve talc mikropartiküllerinin 7 farklı konsantrasyonu (0-25g/L) kullanılarak flask ölçeğinde mannanaz üretimleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre Al_2O_3 ile yapılan denemelerde sadece 1 ve 20 g/L'lik konsantrasyonlar kontrol denemesinden daha yüksek çıkmış olup talc ile yapılan denemelerin ise tamamının aktivite açısından kontrolden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında aktivitedeki düşüşe rağmen pellet yarıçapı 25g/L'lik denemede kontrol denemesine göre nispeten 2.5 kat azalmıştır. Benzer şekilde, KBE substratında da 1 ve 15 g/L Al_2O_3 ile yaklaşık olarak %10 artırılan enzim aktivitesinin diğer beş konsantrasyonda kontrol örneğinden daha düşük olduğu tespit edilmiş olup pellet yarıçapı ise 10 g/L'lik denemede kontrole göre yaklaşık %50 azalmıştır. Bu tez çalışması kapsamında mikropartikül kullanılarak enzim aktivitesinde artış sağlanamamakla birlikte aşırı fungal gelişim sınırlandırılmış ve böylece tekrar edilebilirliği yüksek sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Mikropartikül denemelerine ait enzim aktivitesi sonuçları

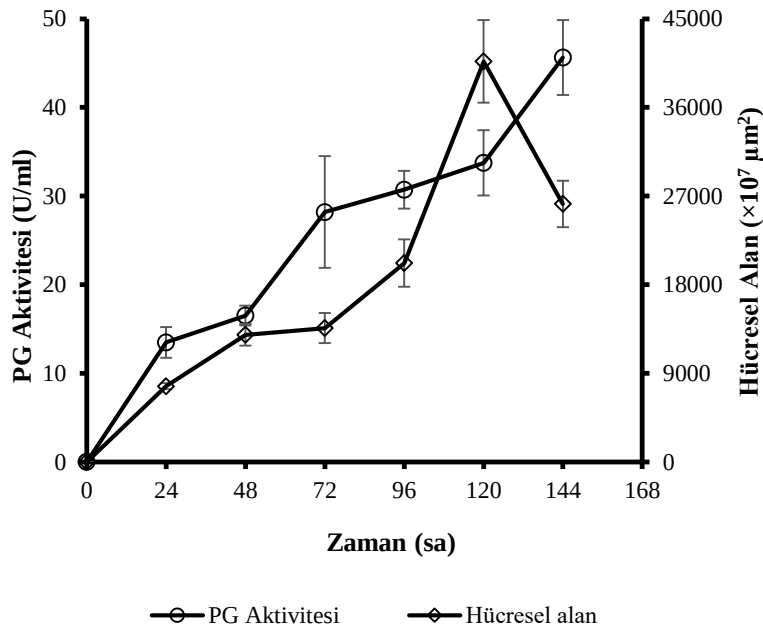
4.5. Farklı Başlangıç pH Değerinde Besiyerleri Kullanılarak Biyoreaktörde Enzim Üretimi

Fermentasyon ortamının pH değerinin enzim üretimi üzerinde etkili olduğu ve küflerin (*A. sojae*, *A. niger* vb.) asidik besiyerinde daha yüksek enzim aktivitesi değerleri

elde edildiği bilinmektedir (Hassan vd. 2019). Bununla birlikte literatürdeki bazı çalışmalarda (Buyukkileci vd. 2015; Buyukkileci vd. 2011) *A. sojæ* 20235'in düşük pH değerlerinde daha verimli çalıştığı bildirilmiştir. Bu noktadan hareketle, daha yüksek aktivite değerlerine ulaşabilmek için Bölüm 4.3.3'deki en iyi sonucun (44.16 U/ml) alındığı besiyeri (PK, 60 g/L) ve fermentasyon koşullarında (0.15 vvm, 475 dev/dk) denemeler gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon başlangıcında pH değeri 6.10 ± 0.05 olarak tespit edilen besiyeri herhangi bir pH ayarlamasının yapılmadığı kontrol denemesi ve 4N HCl kullanılarak 3 farklı asidik pH değerlerine (4, 3 ve 2) ayarlanan besiyerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, *A. sojæ* 20235 ile poligalakturonaz üretimine yönelik bazı çalışmalarda (Buyukkileci vd. 2015; Göğüş vd. 2014) pH kontrolsüz denemelerin daha yüksek enzim üretimi sağladığı bildirildiğinden bu çalışmada herhangi bir pH kontrolü yapılmamıştır. Mikrobiyal gelişimin olumsuz etkilenmemesi için pH değişimi fermentasyonun 24. ya da 48. saatinde gerçekleştirilmiştir. Periyodik olarak 24 saatte bir alınan örneklerin morfoloji görüntüleri alınmış olup bu görüntüler ile ortalama hücresel alan değeri hesaplanarak başlangıç pH değerinin hücresel alan üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.5.1. Başlangıç pH değeri ayarlanmaksızın enzim üretimi

Karıştırmalı tank biyoreaktörde hazırlanan besiyerinin pH değeri 6.11 ± 0.06 olarak ölçülmüş olup fermentasyon boyunca herhangi bir pH ayarlaması yapılmaksızın denemeler gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince 24 saatte bir periyodik olarak alınan örneklerde enzim analizi ve ortalama hücresel alan hesaplamaları Şekil 4.14'de verilmiştir.

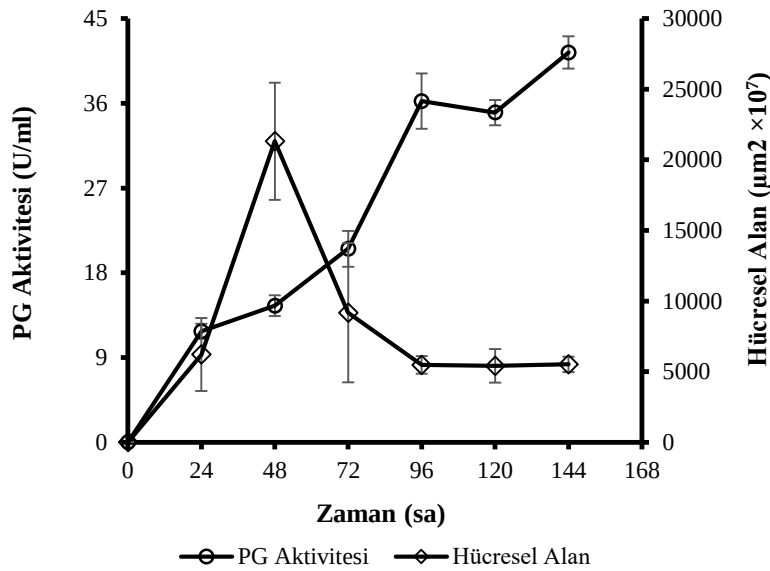


Şekil 4.14. Besiyeri başlangıç pH değeri ayarlanmaksızın biyoreaktörde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

Elde edilen sonuçlara göre, fermentasyon süresi boyunca enzim aktivitesi düzenli olarak artmış ve en yüksek poligalakturonaz aktivitesi 144. saatte 45.63 U/ml olarak tespit edilmiştir. Denemenin maksimum üretim oranı ise 0.311 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Besiyeri ortamında *A. sojae* 'nin ortalama hücresel alan değeri fermentasyon başlangıcından itibaren 120. saate kadar sürekli bir artış göstermiş olup 120. saatte $40672 \times 10^7 \mu m^2$ olarak belirlenmiştir. Bununla beraber ortalama hücresel alan değerinde 120. saat sonrasında istatistiksel olarak önemli bir düşüş azalma meydana gelmiş ($P < 0.05$) ve 144. saatte $26199 \times 10^7 \mu m^2$ olarak tespit edilmiştir.

4.5.2. Başlangıç pH değeri 4 olan besiyerinde enzim üretimi

Hazırlanan besiyerinin fermentasyon öncesi pH değeri 6.09 ± 0.03 olarak ölçülmüş olup bu değer fermentasyonun 24. saatinde 5.82 ± 0.14 'e düşmüştür. Bu noktada peristaltik pompa ile biyoreaktör ortamına HCl çözeltisi verilerek pH değeri 4'e düşürülmüştür. Deneme süresince biyoreaktörden alınan örneklerde enzim analizi ve ortalama hücresel alan hesaplamaları yapılarak sonuçlar Şekil 4.15'de sunulmuştur.



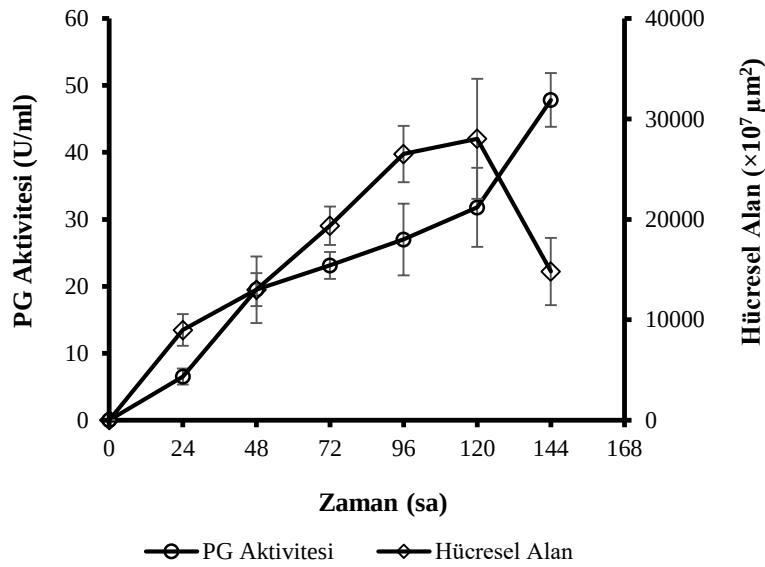
Şekil 4.15. Başlangıç pH değeri 4 olan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

Şekil 4.15 incelendiğinde, enzim üretiminin 96. saate kadar sürekli bir artış gösterdiği ($P < 0.05$) ve en yüksek poligalakturonaz aktivitesinin (41.40 U/ml) fermentasyonun 144. saatinde tespit edildiği görülmektedir. Denemenin maksimum üretim oranı ise 0.453 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Ortalama hücresel alan değeri fermentasyonun ilk 48 saatinde istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($P < 0.05$). Denemenin 24. saatinde $6210 \times 10^7 \mu m^2$ olarak belirlenen ortalama hücresel alan 48. saatte $21315 \times 10^7 \mu m^2$ 'ye yükselmiştir. Bununla beraber hücresel alan değerinde 48-96. saatler arasında keskin ve istatistiksel olarak önemli bir düşüş meydana gelmiştir ($P < 0.05$). Diğer yandan fermentasyonun 96, 120 ve 144. saatleri

için hesaplanan hücresel alan değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$).

4.5.3. Başlangıç pH değeri 3 olan besiyerinde enzim üretimi

Başlangıç pH'sı 6.07 ± 0.08 olan fermentasyon ortamının pH değeri fermentasyonun 24. saatinde 5.86 ± 0.09 olarak ölçülmesinin hemen ardından HCl çözeltisi ile pH 3'e ayarlanmıştır. Denemeden alınan örneklerde enzim analizi ve ortalama hücresel alan hesaplamaları yapılmış olup sonuçlar Şekil 4.16'da sunulmuştur.



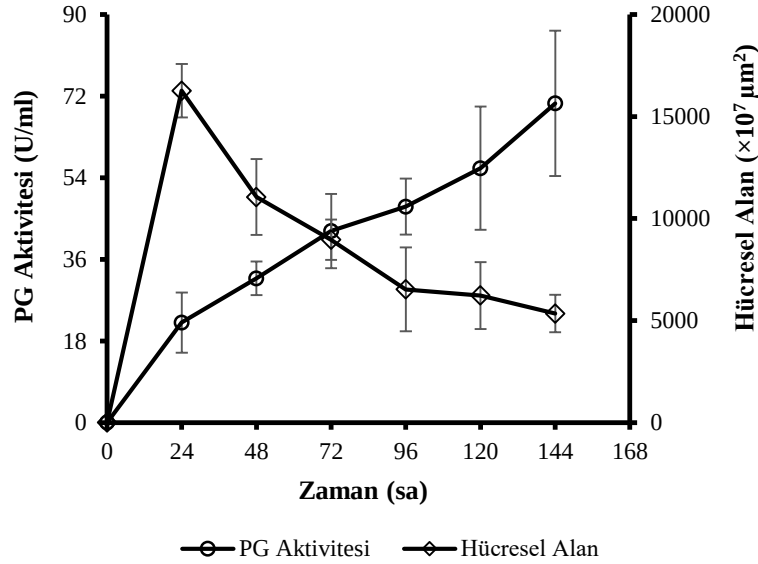
Şekil 4.16. Başlangıç pH değeri 3 olan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

Şekil 4.16'daki elde edilen bulgular incelendiğinde, fermentasyonun 120-144. saatleri arasında enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana geldiği ve en yüksek poligalakturonaz aktivitesinin (47.84 U/ml) fermentasyonun 144. saatinde tespit edildiği görülmektedir ($P<0.05$). Bunun yanında fermentasyonun 24-120. saatleri arasında enzim aktivitesi pH 4 denemesine (Şekil 4.14) nispeten daha stabil seyretmiştir. Ayrıca denemenin maksimum üretim oranı 0.434 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan *A. sojae* 'nin ortalama hücresel alan değeri fermentasyon başlangıcından 120. saate kadar düzenli bir şekilde artarak $28024 \times 10^7 \mu m^2$ 'ye ulaşmıştır. Bununla birlikte fermentasyonun son 24 saatinde ise istatistiksel olarak önemli bir düşüş meydana gelmiştir ($P<0.05$).

4.5.4. Başlangıç pH değeri 2 olan besiyerinde enzim üretimi

Kullanılan besiyerinin fermentasyon öncesi pH değeri 6.04 ± 0.13 olarak ölçülmüş olup fermentasyonun 24. saatinde 5.79 ± 0.18 'e düşmüş olan bu değer biyoreaktör

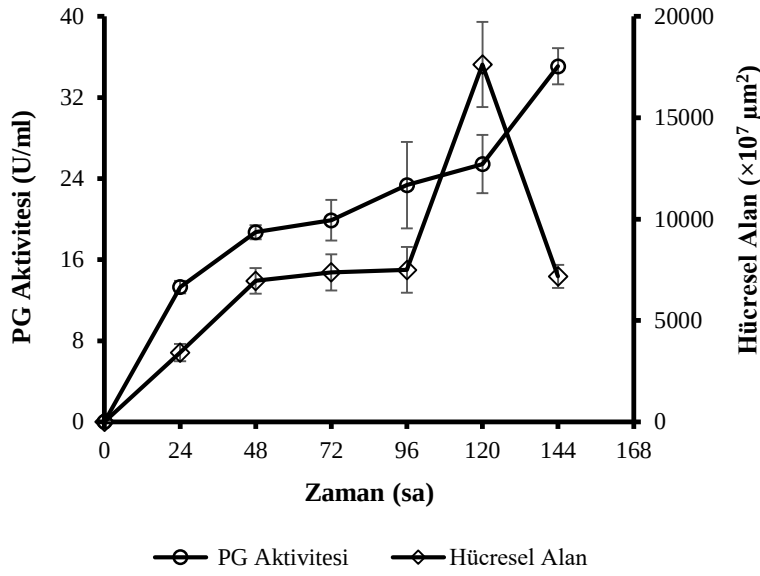
ortamına HCl çözeltisi eklenerek 2'ye düşürülmüştür. Deneme süresince biyoreaktörden alınan örneklerde enzim analizi ve ortalama hücresel alan hesaplamaları yapılarak sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Başlangıç pH değeri 2 olan besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait sonuçlar

Şekil 4.17'de görüldüğü gibi, fermentasyon süresince enzim aktivitesi düzenli olarak artmış ve fermentasyon sonunda 70.41 U/ml'ye ulaşmıştır. Denemenin maksimum üretim oranı ise 0.474 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan *A. sojæ* 'nin ortalama hücresel alan değeri fermentasyonun ilk 24 saatinde keskin bir artış ile $16258 \times 10^7 \mu m^2$ 'ye ulaşmıştır. Bununla birlikte hücresel alan değeri 24. saatten fermentasyon sonuna kadar düzenli olarak azalmıştır ve 144. saatte $5346 \times 10^7 \mu m^2$ olarak hesaplanmıştır.

Besiyerinin başlangıç pH değeri 4, 3 ve 2 olan fermentasyonlarda gelişimin olumsuz etkilenmemesi amacıyla pH ayarlama için 24 saat beklenmiştir. Bu sürenin uzatılmasının enzim aktivitesini nasıl değiştirdiğini belirlemek için pH değişiminin 48 saat sonra yapıldığı başlangıç pH'sı 2 olan denemeler gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.18'de sunulmuştur.



Şekil 4.18. Fermentasyonun 48. saatinde pH değeri 2'ye ayarlanan fermentasyona ait sonuçlar

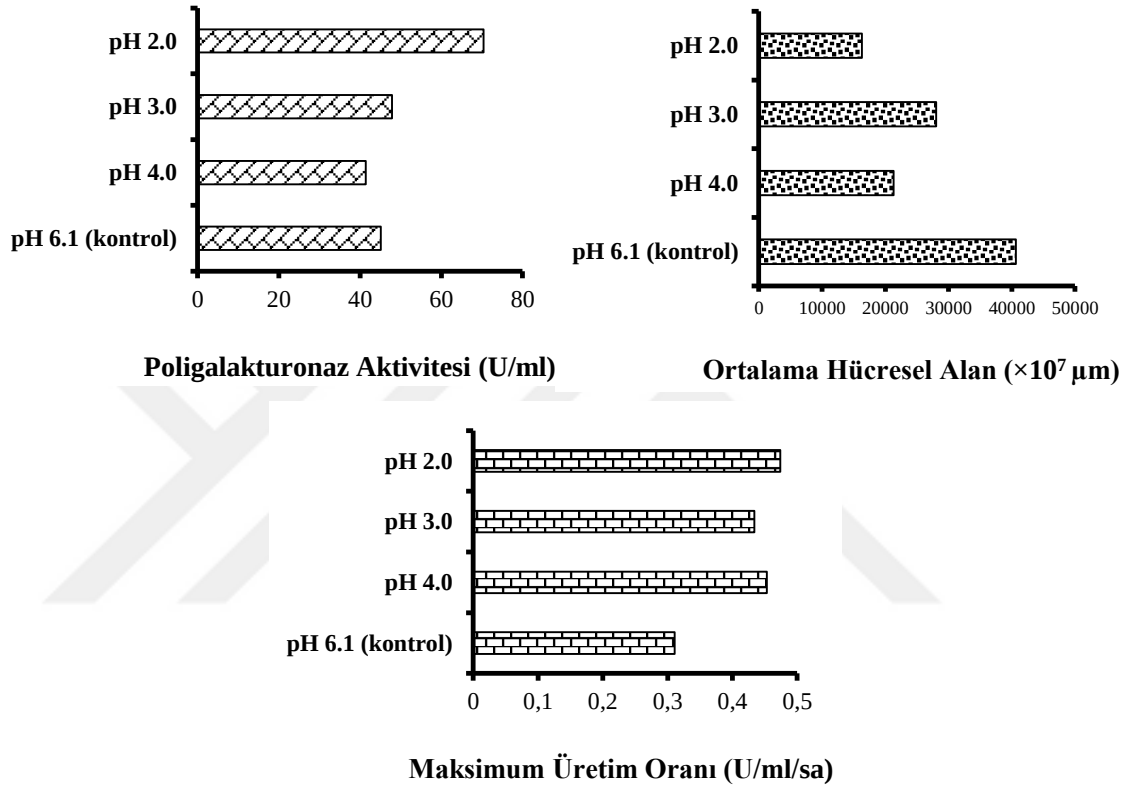
Elde edilen sonuçlar incelendiğinde başlangıç pH'sının düşürüldüğü diğer denemelere benzer şekilde enzim aktivitesinin düzenli olarak artmış ve en yüksek enzim aktivitesinin 144. saatte 35.08 U/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18). Ayrıca, fermentasyon için maksimum üretim oranı 0.244 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Ortalama hücresel alan değeri 48. saatte $6959 \times 10^7 \mu m^2$ olarak tespit edilmiş olup daha sonrasındaki 72 ve 96. saatlerde istatistiksel olarak önemli bir artış olmamıştır ($P > 0.05$). Fermentasyonun 120. saatinde $17623 \times 10^7 \mu m^2$ olarak belirlenen ortalama hücresel alan değerinde 144. saatte istatistiksel olarak önemli bir düşüş olmuş ve $7128 \times 10^7 \mu m^2$ olarak tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

4.5.5. Genel değerlendirme

Başlangıç pH değerinin üretime etkisini incelemek için yapılan denemelere ait bulgulara göre en yüksek poligalakturonaz aktivitesi (70.41 U/ml) başlangıç pH'sının 2 olduğu denemelerde tespit edilmiştir. Herhangi bir pH ayarlaması yapılmayan fermentasyonda elde edilen enzim aktivitesinde yaklaşık %60'lık bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.19).

Poligalakturonaz üretimleri için hesaplanan maksimum üretim oranları pH 6.1, pH 4, pH 3 ve pH 2 denemeleri için sırasıyla 0.311, 0.453, 0.434 ve 0.474 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte başlangıç pH değeri 2, 3 ve 4 olan fermentasyon ortamlarında gelişen *A. sojae* 'nin en yüksek hücresel alan değerleri ise sırasıyla 16284×10^7 , 28024×10^7 ve $21315 \times 10^7 \mu m^2$ olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, Göğüş vd. (2014) tarafından mutant *A. sojae* ile sıvı kültür ortamında poligalakturonaz üretimi gerçekleştirilmiş olup pH kontrolsüz ve pH 4, 5 ve 6'da kontrol edilen denemeler yapılmış olup farklı boyutlardaki pelletler sayılmış ve fermente kültür sıvısının birim hacmine düşen pellet sayıları belirlenmiştir. Elde ettikleri bulgulara göre bir mililitredeki

pelletlerin tamamına yakınının boyutu 0-5-1.5mm aralığında değişmekte olup pellet sayılarına ait dağılımın oransal olarak büyükten küçüğe doğru pH 5 > pH kontrolsüz > pH 4 > pH 6 şeklinde olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre üretim verimliliği pH kontrolsüz, pH 6, pH 5 ve pH 4 için sırasıyla 0.781, 0.004, 0.008 ve 0.191 U/ml/sa olarak hesaplandığı ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada, *Aspergillus foetidus* NRRL 341 ile poligalakturonaz üretimi için fermentasyon ortamının pH 6.0, pH 5.0 ve pH 4.0'de kontrol edildiği denemeler yapılmış ve ulaşılan en yüksek aktivite değerlerinin sırasıyla 1.64, 1.94 ve 1.00 U/ml olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Li vd. 2018).



Şekil 4.19. Farklı başlangıç pH değerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonların karşılaştırılması

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar literatürdeki değerler ile kıyaslanabilir niteliktedir. En yüksek aktivitenin (70.41 U/ml) yüksek asitlikteki (pH 2) besiyerinde tespit edilmesinin fermentasyon ortamında olası bir kontaminasyonun önlenmesi açısından önemli bir avantaj olduğu literatürde vurgulanmaktadır (Göğüş vd. 2014). Ayrıca pH kontrolsüz bir denemenin asit ve baz tüketiminin azalması ve dolayısı ile proses maliyetlerinin düşürülmesi açısından önemli olduğu bilinmektedir. Bunlarla birlikte düşük pH ortamında besiyerinin viskozite değerinin azalmasından dolayı fermentasyon sonrası işlemleri kolaylaştırması bir diğer avantaj olarak görülmektedir.

4.6. Substrat Konsantrasyonu ve Havalandırma Hızının Optimizasyonu

Karıştırmalı tank biyoreaktörde *A. sojae* ile poligalakturonaz üretimi MKT aracılığıyla optimize edilmiştir. Bu amaçla, substrat konsantrasyonu ve havalandırma

hızının poligalakturonaz üretimi üzerine etkisi MKT'nin önermiş olduğu 11 farklı fermentasyon denemesi ile incelenmiştir (Çizelge 4.3). MKT ile yapılan optimizasyon için kullanılan fermentasyon koşulları: sıcaklık 30°C, karıştırma hızı 475 dev/dk, başlangıç pH: 2.0, besiyeri hacmi 1500 ml, inokülasyon oranı: %1 (h/h) ve fermentasyon süresi: 144 saat şeklindedir. Fermentasyon ortamından alınan örneklerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.3'de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Merkezi kompozit tasarımı ile oluşturulan deneme desenine ait sonuçlar

	Havalandırma Hızı (vvm)	Substrat Kons. (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)
Deneme #1	0.60	40.00	44.5
Deneme #2	0.10	40.00	37.2
Deneme #3	0.25	54.14	83.4
Deneme #4	0.95	25.86	40.5
Deneme #5	0.95	54.14	43.2
Deneme #6	0.60	40.00	44.7
Deneme #7	0.60	20.00	40.8
Deneme #8	0.60	60.00	58.6
Deneme #9	1.10	40.00	41.1
Deneme #10	0.60	40.00	44.1
Deneme #11	0.25	25.86	29.5

Sonuçlara göre en yüksek enzim aktivitesi (83.4 U/ml) havalandırma hızının 0.25 vvm, substrat konsantrasyonunun 54.14 g/L olduğu deneme #4'te tespit edilmiştir. En düşük enzim aktivitesi ise havalandırma hızının 0.25 vvm, substrat konsantrasyonunun 25.86 g/L olduğu deneme #11'de 29.5 U/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile ilgili MKT'nin verdiği varyans analiz (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Varyans analiz (ANOVA) sonuçları

Kaynak	SD	KT	KO	F	P
Model	5	1684	337	5.27	0.0461 **
A-Hava (vvm)	1	70	70	1.10	0.3427
B-Substrat (g/L)	1	836	836	13.09	0.0153
AB	1	654	654	10.23	0.0240
A ²	1	12	12	0.19	0.6793
B ²	1	82	82	1.28	0.3084
Artık hata	5	319	64		
Uyum eksikliği	3	319	106	1123.98	0.0090 **
Saf hata	2	0	0		
Toplam	10	2003			

$R^2 = 0.841$, Düzeltilmiş $R^2 = 0.681$, SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, ** $P < 0.05$, güven seviyesi %95'dir.

ANOVA sonuçlarına göre 0.05'den düşük *P*-değerleri model kaynaklarının önemli olduğunu 0.10'dan büyük değerler ise önemli olmadığını gösterir. Bu durumda B (substrat) ve AB (havalandırma*substrat)'nin önemli model kaynakları olduğu görülmektedir. R^2 , düzeltilmiş R^2 , tahmin edilen R^2 ve yeterli hassasiyet değerleri (adequate precision) sırasıyla 0.841, 0.681, -0.133 ve 7.794 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu da; örnek varyasyonlarının %84'ünün model tarafından tam temsil edildiği anlamına gelmektedir. Tahmin edilen R^2 değerinin düzeltilmiş R^2 değerine yakın olmaması, geniş bir blok etkisini gösterir. Negatif "tahmin edilen R^2 " değeri, çalışmadan elde edilen deneysel sonuçların mevcut modelden daha iyi bir tahmin edici olduğunu gösterir. Yeterli hassasiyet değeri, sinyalin sese oranını ölçer ve bu oranın 4'ten büyük olması beklenir. Uyum eksikliğinin 0.05'ten küçük olmasına rağmen poligalakturonaz aktivitesi için hesaplanan yeterli hassasiyet değerinin (7.794) 4'ten büyük olması, yeterli bir sinyalin olduğunu gösterir ve dolayısıyla model, tasarım alanını yönlendirmek için kullanılabilir.

Yapılan optimizasyon sonucunda MKT optimizasyonu sonucu yazılımın verdiği doğrulama denemesi ve arzu edilebilirliği (desirability) şu şekildedir; substrat konsantrasyonu: 54.14 g/L, havalandırma hızı: 0.25 vvm, arzu edilebilirlik: 0.802. Doğrulama denemesi için sistemin seçtiği parametreler Çizelge 3.3'de verilen deneme desenindeki Deneme#3 ile aynı olduğu görülmektedir. Modelin doğrulaması amacı ile bu koşullarda fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Merkezi Kompozit Tasarım ile yapılan optimizasyonun doğrulama denemesine ait sonuçlar

Zaman (sa)	Poligalakturonaz Aktivitesi (U/ml)
0	0.0 ^d ±0.0
24	17.5 ^{cd} ±0.83
48	30.4 ^c ±2.12
72	63.8 ^b ±0.91
96	71.9 ^{ab} ±3.63
120	89.7 ^a ±8.16
144	91.3 ^a ±14.50

Çizelge 4.5 incelendiğinde doğrulama denemesinde en yüksek aktivitenin 91.3 U/ml olarak tespit edildiği görülmektedir. Bu sonuç optimizasyondaki aynı parametreler ile gerçekleştirilen Deneme #3'ün en yüksek enzim aktivitesi (83.4 U/ml) ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde örtüştüğü ve Deneme #3'ten yaklaşık %9 daha yüksek bir aktiviteye ulaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında portakal kabuğu konsantrasyonunun enzim üretimi üzerinde etkili olduğu açıkça görülmektedir. Substrat miktarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada (Göğüş vd. 2014), 5, 10, 15, 20, 40 ve 60 g/L konsantrasyonlarda portakal kabuğu kullanılarak herhangi bir pH ayarlaması ya da kontrolü yapılmaksızın *A. sojae* ile küçük ölçekli (1-L) biyoreaktörde poligalakturonaz üretimine dönük fermentasyonlar gerçekleştirilmiş olup en yüksek aktivite değerinin 40 g/L'de 88.55 U/ml olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Çalışmanın diğer konsantrasyonları için sonuçlar ayrı ayrı verilmemiş olmakla birlikte farklı konsantrasyonlarda elde edilen enzim aktivite değerleri için büyükten küçüğe doğru

sıralama $PK_{40g/L} > PK_{20g/L} > PK_{15g/L} > PK_{60g/L} > PK_{10g/L} > PK_{5g/L}$ şeklindedir. Yapılan başka bir çalışmada, Büyukkileci vd. (2015) tarafından mutant *A. sojae* ile 5-L'lik karıştırmalı tank biyoreaktörde poligalakturonaz üretiminin optimizasyonu için yüz merkezli (face-centered) kompozit tasarım aracılığıyla portakal kabuğu miktarı için uç ve orta nokta değerleri olarak 5.0, 22.5 ve 40.0 g/L konsantrasyonları denenmiş olup gerçekleştirilen 20 fermentasyondan en yüksek aktiviteler 40 g/L portakal kabuğunun kullanıldığı üç denemede (186.4, 165.9 ve 156.5 U/ml) tespit edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular ve literatürdeki çalışmaların sonuçları dikkate alındığında, portakal kabuğunun konsantrasyonundaki artışın enzim aktivitesini olumlu etkilediği belirlenmiş olmakla birlikte 60 g/L ve üzeri konsantrasyonlarda aktivite değerlerinin düştüğü görülmektedir. Bu durum karbon katabolit represyonu ile açıklanabilir. Maldonado ve De Saad (1998) yüksek şeker konsantrasyonunun katı hal fermentasyonunda pektinaz üretimini teşvik ederken, sıvı kültür fermentasyonunda ise bu üretimin muhtemelen katabolit baskısı ile inhibe edildiğini bildirmiştir.

4.7. Küçük Ölçekli (5-L) Biyoreaktörde Enzim Üretimi ve Matematiksel Modellemesi

Poligalakturonaz üretimine ait deneysel verilerin matematiksel modellemesi için Bölüm 4.6'da en yüksek aktivitenin elde edildiği fermentasyon sonuçları (Çizelge 4.5) kullanılmıştır. Modelleme işlemlerinde kullanılan model parametreleri hesaplanarak Çizelge 4.6'da sunulmuştur. Fermentasyonun deneysel enzim üretim verileri, modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup hem deneysel hem de hesaplanan veriler Çizelge 4.7'de ve Ek-7'deki grafiklerde gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyona ait deneysel enzim aktivite değerleri ve enzim aktivite değerlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri

Parametre	Değer	Zaman (gün)	Enzim Akt. (U/ml)
A_0 (U/mL)	0.000	0	0.000
A_m (U/mL)	91.251	1	17.525
Q (U/mL/day)	20.416	2	30.417
λ (day)	0.132	3	63.755
v_1	0.99	4	71.913
v_2	76	5	89.741
v_3	0.65	6	91.251
β	308		
h_0 (U/mL)	2.699		
d	3.22		
T_L	2.456		
k_1	0.35		
k_2	0.445		
k_3	0.26		
$\delta 1$ (sabit)	3		
$\delta 2$	2.84		
e (sabit)	2.718		
a (sabit)	4		

Çizelge 4.7. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde deneysel enzim üretim verilerinin modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılması

Zaman (gün)	Deneysel (U/mL)	Matematiksel modeller (U/mL)									
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh
0	0.00	4.80	9.79	9.88	24.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	17.53	18.36	20.74	20.73	33.47	3.83	8.32	4.79	17.72	15.51	35.00
2	30.42	38.11	38.20	37.89	42.34	26.50	38.14	31.06	38.13	35.77	50.75
3	63.76	56.73	58.21	57.52	50.70	62.58	63.36	59.83	58.55	56.18	61.25
4	71.91	70.45	74.07	73.13	58.21	85.38	76.40	75.54	78.96	76.60	68.73
5	89.74	79.26	83.35	82.35	64.69	90.82	82.72	82.85	91.25	91.25	74.20
6	91.25	84.52	87.85	86.87	70.14	91.24	85.97	86.38	91.25	91.25	78.28
Ortalama	52.09	50.32	53.17	52.63	49.17	51.48	50.70	48.64	53.69	52.37	52.60

Elde edilen model tahminlerine göre, MMF, Weibull, Asimetrik, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile tahmin edilen minimum enzim aktivite değerlerinin (0.0 U/ml) fermentasyonun deneysel başlangıç aktivitesi (0.0 U/mL) ile eşit olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Bu dört modelin ilk 3 gün için tahmin ettiği değerlerin deneysel enzim aktivite değerlerine nispeten yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte deneysel verilerdeki en yüksek enzim aktivitesi (91.25 U/ml) Baranyi ve Huang modelleri ile eşit tahmin edilmiş olup diğer modellerin tamamının deneysel sonuca nispeten daha düşük değerler tahmin ettiği saptanmıştır. Fermentasyonun 1.günü için belirlenen deneysel aktivite değeri (17.53 U/ml) MGM ve Baranyi modelleri ile %5'ten daha az bir sapma ile tahmin edilmiştir. Öte yandan Stannard, Weibull, MMF, Asimetrik ve Fitzhugh modelleri aynı gün için oldukça %50'nin üzerinde bir sapma ile deneysel sonuca nispeten oldukça farklı tahminler vermiştir. Fermentasyonun 2. gününde belirlenen deneysel aktivite değeri (30.42 U/ml) sadece Asimetrik model ile %2'lik bir sapma ile doğru tahmin edilebilmiş olup Stannard ve Fitzhugh modelleri ise %30'un üzerinde bir sapma ile deneysel sonuca nispeten oldukça yüksek tahminlerde bulunmuştur. Deneysel aktivite değerinin 63.76 U/ml olarak tespit edildiği fermentasyonun 3. günü için Weibull, MMF ve Fitzhugh modelleri %5'in altında bir sapma ile tahminler verirken Stannard model ise %20'den fazla bir sapma ile deneysel sonuca en uzak tahmini vermiştir. Ayrıca MGM, MLM, MRM ve Asimetrik modeller fermentasyonun 4. günü için enzim aktivitesini %5'in altında bir sapma ile deneysel sonucun (71.91 U/ml) üzerinde tahmin etmiştir. Aynı gün için Stannard ve Weibull modelleri deneysel sonuçtan %15'in üzerinde bir sapma göstermiş olup tüm modeller arasında deneysel sonuca en uzak tahminleri yapmıştır. Bunun yanında, fermentasyonun 5. günü için Weibull, Baranyi ve Huang modelleri %5'in altında bir sapma ile deneysel sonuçtan (89.74 U/ml) daha yüksek tahminlerde bulunmuştur. Aynı gün için yapılan diğer tahminler incelendiğinde, Stannard ve Fitzhugh modellerinin %25'in üzerinde bir sapma ile deneysel sonuçtan daha düşük ve tüm modeller arasında deneysel sonuca en uzak tahminleri yaptıkları belirlenmiştir. Son olarak en yüksek enzim aktivitesinin tespit edildiği 6. gün için MLM, MRM, Weibull ve Asimetrik modeller %5'in altında bir sapma ile deneysel sonuca nispeten daha düşük elde edilmiş olup tüm modeller arasında Stannard ve Fitzhugh modelleri ise deneysel sonuca en uzak tahminleri vermiştir.

Çizelge 4.7'de verilen model parametreleri kullanılarak gerçekleştirilen poligalakturonaz üretimi deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.4) ile tanımlanmış olup elde edilen model doğrulama sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çizelge 4.8'deki sonuçlara göre, en düşük RMSE (4.04 U/mL) ve MAE (3.02 U/mL) değerleri Huang modeli ile tespit edilmiştir. En yüksek R^2 değeri (0.9882) ise MLM ve MRM modellerinin kullanımı ile belirlenmiştir. Öte yandan en yüksek RMSE (16.85 U/mL) ve MAE (17.92 U/mL) değerleri Stannard modeli ile tespit edilmiştir. En düşük R^2 değeri (0.8877) ise Fitzhugh modelinde hesaplanmıştır. Ayrıca, BF ve AF değerleri de belirlenmiş ve Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen enzim üretiminin matematiksel modellenmesi

	Poligalakturonaz Aktivitesi (U/ml)				
	RMSE	MAE	R ²	BF	AF
MGM	6.43	5.57	0.9860	1.01	1.05
MLM	6.03	5.47	0.9882	0.98	1.05
MRM	6.30	5.69	0.9882	0.99	1.05
Stannard	18.65	17.92	0.9782	1.00	1.17
Weibull	7.43	4.76	0.9706	1.12	1.15
MMF	5.88	4.87	0.9709	1.05	1.09
Asimetrik	6.12	4.89	0.9777	1.12	1.13
Baranyi	4.45	3.10	0.9848	0.98	1.03
Huang	4.04	3.02	0.9858	1.00	1.04
Fitzhugh	10.29	9.38	0.8877	0.94	1.13

RMSE: Ortalama karesel hata, **MAE:** Ortalama mutlak hata, **BF:** Önyargı faktörü, **AF:** Kesinlik faktörü, **R:** Regresyon faktörü

Modellerin deneysel veriler ile karşılaştırılmasında AF ve BF değerleri kullanılmıştır. Bu değerlerin hangi değer aralıklarında nasıl yorumlanabileceği ile ilgili bilgiler Germec vd. (2019)'den derlenerek Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Model validasyon değerlerinden AF ve BF'nin yorumlanması için güven seviyeleri

İdeal	İyi	Kabul edilebilir	Kabul edilemez
AF=1	$1.00 \leq AF < 1.20$	$1.20 \leq AF \leq 1.30$	$AF > 1.30$
BF=1	$0.95 \leq BF \leq 1.11$	$0.87 \leq BF < 0.95$ $1.11 < BF \leq 1.43$	$BF < 0.87$ $BF > 1.43$

Çizelge 4.9 dikkate alındığında, BF değeri Stannard ve Huang modeli için ideal değere (BF=1) eşittir. Aynı zamanda BF değerleri MGM, MLM, MRM ve Baranyi modelleri için “iyi”, Weibull ve Asimetrik modeller için “kabul edilebilir”, Fitzhugh model için “kabul edilemez” seviyede tespit edilmiştir. AF değerleri incelendiğinde ise tüm modeller için AF değerleri “iyi” seviyesindeki güven aralığında hesaplanmıştır. AF değerlerinden 1'e en yakın değerler Baranyi (1.03), Huang (1.04), MGM (1.05), MRM (1.05) ve MLM (1.05) modellerinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, Stannard (1.17), Weibull ve Asimetrik (1.13) modellerin AF değerleri diğer modellere nispeten 1'e daha uzak olmuştur. Böylelikle tüm veriler incelendiğinde MGM, MLM, MRM ve Huang modelleri poligalakturonaz aktivitesinin deneysel verilerini bu çalışmada kullanılan diğer matematiksel modellerden daha iyi tahmin etmiştir. Ayrıca, Huang modellerinin kullanılmasıyla hesaplanan değerler, poligalakturonaz aktivitesinin deneysel verileri ile oldukça iyi bir uyum göstermiştir.

4.8. Büyük Ölçekli (30-L) Biyoreaktörde Enzim Üretimi ve Matematiksel Modellemesi

Flask ve küçük ölçekli (5-L) biyoreaktör uygulamalarının ardından enzim üretiminin endüstriyel ölçeğe aktarılma potansiyelini incelemek amacıyla büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Bölüm 4.6'da yapılan optimizasyon ile en verimli koşul için belirlenen substrat konsantrasyonu (54.14 g/L) ve havalandırma hızı (0.25 vvm) kullanılmıştır. Ayrıca fermentasyonun 24. saatinde besiyerinin pH değeri 2'ye düşürülmüştür. Fermentasyondan elde edilen aktivite değerleri Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde denemeye ait aktivite değerleri

Zaman (sa)	Poligalakturonaz Akt. (U/ml)
0	0.0±0
24	7.9±0.81 ^d
48	18.9±1.66 ^c
72	29.6±2.42 ^b
96	30.4±3.93 ^b
120	34.1±2.12 ^b
144	46.2±4.97 ^a

Elde edilen sonuçlara göre, büyük ölçekli biyoreaktörde yapılan poligalakturonaz üretiminin ilk 72 saatinde hızlı bir artış meydana gelmiştir. Fermentasyon boyunca enzim aktivitesi düzenli olarak artmış olmakla birlikte fermentasyonun 72, 96 ve 120. saatleri için tespit edilen aktivite değerleri (sırasıyla 29.6, 30.4 ve 34.1 U/ml) arasında ise istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.10). Ayrıca, denemenin maksimum üretim oranı 0.453 U/ml/sa olarak hesaplanmıştır. Bununla birlikte, fermentasyona ait en yüksek aktivite değeri 144. saatte 46.2 U/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değer Bölüm 4.6'da gerçekleştirilen optimizasyon sonucu 5-L'lik biyoreaktörde ulaşılan en yüksek aktivite değerinden (91.25 U/ml) nispeten düşük olması ölçek büyütme stratejisinin sorunlarından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Crater vd. 2018). Bu nedenle benzer sonuçların 30-L'lik biyoreaktörde de alınabilmesinin karıştırma hızı, hava akış hızı, substrat konsantrasyonu gibi parametrelerin aynı ölçekteki denemeler ile optimize edilerek sağlanabileceği düşünülmektedir. Poligalakturonazın büyük ölçekli üretimine yönelik yapılan bir çalışmada, *Aspergillus niger* VTT-D-77050 ve onun mutanı *Aspergillus niger* VTT-D-86267 ile şeker kamışı ekstraktı substratında 16-L ve 200-L'lik biyoreaktörler ölçeğinde fermentasyonlar gerçekleştirilerek mutant suş doğal suş ile karşılaştırılmıştır (Bailey ve Pessa 1990). Yazarların bildirdiğine göre mutant suş her iki ölçekte de daha yüksek aktivite sağlamıştır. Ayrıca elde ettikleri bulgulara göre, 16-L'lik biyoreaktörde mutant suş ile poligalakturonaz aktivitesi ~12500 nkat/ml'ye ulaşmasına rağmen aynı parametreler ile gerçekleştirilen 200-L'lik biyoreaktörde en yüksek aktivite ~700 nkat/ml'de kalmıştır.

30-L'lik biyoreaktörde gerçekleştirilen ve sonuçları Çizelge 4.10'da sunulan poligalakturonaz üretiminin matematiksel modellemesi de yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan model parametreleri Çizelge 4.11'de verilmiştir. Fermentasyonun deneysel

enzim üretim verileri, farklı modeller kullanılarak hesaplanan veriler ile karşılaştırılmış olup hem deneysel hem de hesaplanan tahminler grafiklerde gösterilmiştir (Ek-8).

Çizelge 4.11. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde deneysel enzim aktivite ve aktivite tahminlerinin matematiksel modellemesinde kullanılan model parametreleri

Parametre	Değer	t (gün)	Enzim Akt. (U/ml)
A_0 (U/mL)	0.000	0	0.00
A_m (U/mL)	46.23	1	7.86
Q (U/mL/gün)	9.98	2	18.94
λ (gün)	0.087	3	29.61
v_1	0.93	4	30.42
v_2	72.2	5	34.14
v_3	0.90	6	46.23
β	306		
h_0 (U/mL)	0.870		
d	1.95		
T_L	2.393		
k_1	0.31		
k_2	0.390		
k_3	0.276		
$\delta 1$	3		
$\delta 2$	2.1		
e	2.718		
a	4		

Çizelge 4.12. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde deneysel enzim üretim verilerinin modellerden hesaplanan veriler ile karşılaştırılması

Zaman (gün)	Deneysel (U/mL)	Matematiksel modeller (U/mL)									
		MGM	MLM	MRM	Stannard	Weibull	MMF	Asimetrik	Baranyi	Huang	Fitzhugh
0	0.00	2.64	5.15	5.46	16.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	7.86	9.42	10.60	10.57	18.75	1.36	5.62	7.13	9.11	7.84	12.85
2	18.94	19.08	19.13	18.15	21.05	9.80	17.21	19.10	19.09	17.76	21.35
3	29.61	28.26	28.94	26.69	23.29	25.53	26.87	28.11	29.07	27.74	27.55
4	30.42	35.15	36.92	33.78	25.43	39.34	33.16	33.79	39.05	37.72	32.15
5	34.14	39.69	41.77	38.32	27.46	45.08	37.08	37.33	46.14	46.00	35.59
6	46.23	42.46	44.23	40.76	29.36	46.13	39.56	39.61	46.20	46.20	38.18
Ortalama	23.88	25.24	26.68	24.82	23.11	23.89	22.79	23.58	26.95	26.18	23.95

Çizelge 4.12’de verilen tahminlere göre, MMF, Weibull, Asimetrik, Baranyi, Huang ve Fitzhugh modelleri ile tahmin edilen minimum enzim aktivite değerleri fermentasyonun deneysel başlangıç aktivitesinin (0.00 U/mL) eşit olduğu tespit edilmiştir. Fermentasyonun 1. günü için deneysel olarak 7.86 U/ml olarak belirlenen enzim aktivitesi Huang modeli ile oldukça yakın bir değer (7.84 U/ml) ile tahmin edilmiş olup diğer modellerin tahminleri deneysel sonuçtan oldukça düşük ya da yüksek olmuştur. Deneysel sonucun 18.94 U/ml olarak tespit edildiği 2. gün için MGM (19.08 U/ml), MLM (19.13 U/ml), MRM (18.15 U/ml), Asimetrik (19.10) ve Baranyi (19.09 U/ml) modelleri ile deneysel sonuçtan %5’ten daha küçük bir sapmanın görüldüğü tahminler elde edilmiştir. Aynı gün için Stannard (21.05 U/ml) ve Fitzhugh (21.35 U/ml) modelleri deneysel sonuçtan oldukça yüksek, Weibull (9.80 U/ml) modeli ise oldukça düşük tahminler vermiştir. Fermentasyonun 3. günü için MGM (28.26 U/ml), MLM (28.94 U/ml) ve Baranyi (29.07 U/ml) modelleri deneysel sonuçtan (29.61 U/ml) %5’ten daha düşük bir sapma göstererek diğer modellere nispeten daha yakın tahminler sunmuştur. Stannard modeli (23.29 U/ml) 3.gün deneysel enzim aktivite değerine göre en düşük tahmini yapmıştır. Deneysel sonucun 30.42 U/ml olarak belirlendiği 4. gün için en yakın tahmin (32.15 U/ml) yaklaşık %6 sapma ile Fitzhugh modeli kullanılarak hesaplanmıştır. Öte yandan aynı gün için deneysel sonuçtan düşük olan tek tahmini (25.43 U/ml) Stannard modeli vermiş olup diğer tüm modeller deneysel sonuçtan daha yüksek tahminler vermiştir. Fermentasyonun 5. günü için hesaplanan farklı tahminlere göre deneysel sonuca (34.14 U/ml) en yakın tahmin (35.59 U/ml) %5’ten daha düşük bir sapma ile Fitzhugh modeli kullanılarak elde edilmiş olup Weibull (45.08 U/ml), Baranyi (46.14 U/ml) ve Huang (46.00 U/ml) modelleri deneysel sonuca nispeten oldukça yüksek ve uzak tahminler vermiştir. Aynı gün için deneysel sonuçtan düşük tek tahmin (27.46 U/ml) Stannard modeli ile tespit edilmiştir. En yüksek deneysel sonucun (46.23 U/ml) elde edildiği 6. gün için modellerin verdiği tahminler incelendiğinde Baranyi (46.20 U/ml), Huang (46.20 U/ml), Weibull (46.13 U/ml) ve MLM (44.23 U/ml) modellerinin deneysel sonuçtan %5’ten daha düşük bir sapma gösterecek en yakın tahmin değerlerini verdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.11’de verilen model parametreleri kullanılarak gerçekleştirilen poligalakturonaz üretimi deneysel verilere bağlı olarak sigmoidal gelişim fonksiyonları (Çizelge 3.4) ile tanımlanmış olup elde edilen model validasyon sonuçları Çizelge 4.13’de sunulmuştur.

Çizelge 4.13. Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilen enzim üretiminin matematiksel modellenmesi

	Poligalakturonaz Akt. (U/ml)				
	RMSE	MAE	R ²	BF	AF
MGM	3.36	2.82	0.9726	0.97	1.05
MLM	4.47	3.56	0.9764	0.95	1.06
MRM	3.87	3.55	0.9797	0.98	1.06
Stannard	10.58	9.17	0.9782	1.01	1.17
Weibull	7.00	5.67	0.9460	1.17	1.27
MMF	3.30	2.73	0.9579	1.04	1.07
Asimetrik	3.12	1.29	0.9474	1.01	1.04
Baranyi	5.63	3.23	0.9686	0.95	1.06
Huang	5.34	3.18	0.9745	0.97	1.05
Fitzhugh	2.83	2.96	0.9290	0.97	1.08

RMSE: Ortalama karesel hata, **MAE:** Ortalama mutlak hata, **BF:** Önyargı faktörü, **AF:** Kesinlik faktörü, **R:** Regresyon faktörü

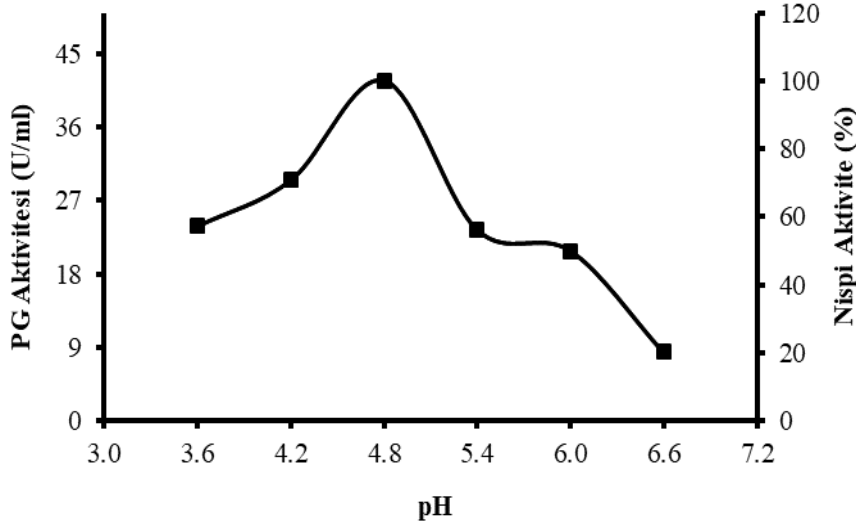
Elde edilen bu sonuçlara göre, en yüksek RMSE (10.58 U/mL) ve MAE (9.17 U/mL) değerleri Stannard modeli ile tespit edilirken en düşük RMSE (2.83 U/mL) ve MAE (1.29 U/mL) değerleri sırasıyla Fitzhugh ve Asimetrik modeller kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.13). Öte yandan en yüksek R² değeri (0.9797) ise MRM modelinde, en düşük R² değeri (0.9290) Fitzhugh modelinde belirlenmiştir. Farklı modeller için hesaplanan R² değerleri incelendiğinde Weibull (0.9460), Asimetrik (0.9474) ve Fitzhugh (0.9290) modellerinin güven seviyesinden (0.9500) daha düşük oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, BF ve AF değerleri de hesaplanarak sunulmuştur (Çizelge 4.13). En düşük BF değeri (0.95), MRM ve Baranyi modelleri ile belirlenmiş olup en yüksek BF değeri (1.17) ise Weibull modeli ile hesaplanmıştır. Çizelge 4.9’da verilen güven seviyelerine göre bu deneme için belirlenen tüm BF değerlerinin “iyi” ya da “kabul edilebilir” seviyede oldukları saptanmıştır. En iyi (1’e en yakın) BF değeri (1.01) ise Stannard ve Asimetrik model tahminlerinde tespit edilmiştir. BF değerlerine benzer şekilde, AF değerlerinin de tamamı “iyi” ya da “kabul edilebilir” seviyede değerlendirilmiştir. En yüksek AF değeri Weibull modeli ile 1.27 olarak tespit edilmiştir. Bu değer (1.27) kabul edilebilir güven seviyesi aralığında olmakla birlikte diğer modellerin AF değerlerine nispeten 1’den daha uzak bir değerdir. En düşük ve 1’e en yakın AF değeri (1.04) ise Asimetrik model kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, farklı model tipleri kullanılarak elde edilen tüm değerler incelendiğinde deneysel sonucu temsil etme güvenilirliğini artıran minimum ve maksimum noktaların tek bir modelde toplanmamasının yanı sıra özellikle MGM ve MRM modellerinin büyük ölçekli biyoreaktörde poligalakturonaz üretimini bu çalışmada kullanılan diğer model tiplerine nispeten daha iyi temsil ettiği saptanmıştır.

4.9. Enzimin Karakterizasyonu

4.9.1. Enzimin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

4.9.1.1. Optimum pH

Poligalakturonazın optimum çalıştığı pH değerinin belirlenmesi amacıyla pH'sı 3.6-6.6 arasında 6 farklı tampon ile hazırlanan 2.4g/L'lik PGA solüsyonu ile enzim analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.20'de verilmiştir.



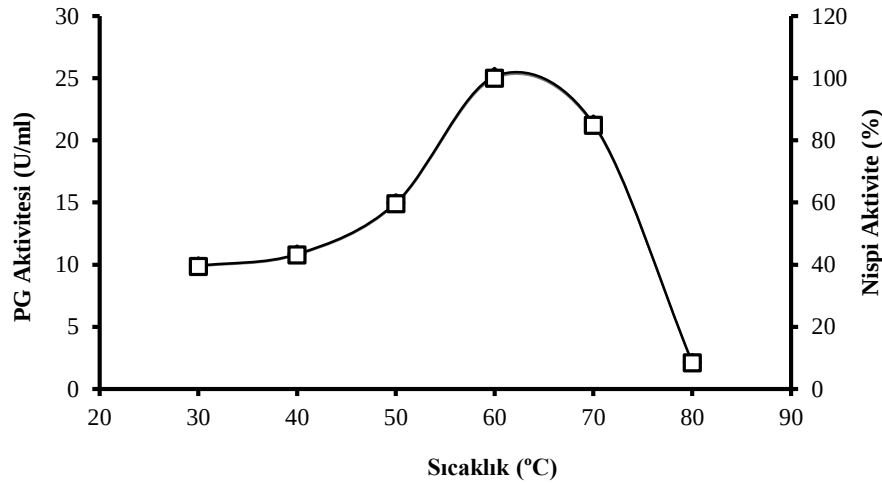
Şekil 4.20. Farklı pH koşullarında enzim aktivitesinin değişimi

Elde edilen aktivite değerleri incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesine (41.67 U/ml) pH değeri 4.8 olan tampon çözeltide hazırlanan substrat solüsyonu ile yapılan analizde ulaşıldığı görülmektedir. Substrat pH'sının 4.8'den büyük olduğu aralıkta (4.8-6.6) ise pH değeri yükseldikçe enzim aktivitesi azalmış ve en düşük nispi aktivite (%20) pH 6.6'da tespit edilmiştir. En düşük pH değerinde (pH 3.6) enzimin aktivitesinin 23.84 U/ml olarak tespit edilmesi en yüksek aktivitenin (41.67 U/ml) nispeten (%57'sinin) korunduğunu göstermektedir. Enzimin düşük pH değerlerinde aktivitesini önemli ölçüde korumuş olması farklı endüstriyel alanlarda kullanılabilen poligalakturonazın çalışma verimi açısından oldukça önemlidir.

4.9.1.2. Optimum sıcaklık

Poligalakturonaz enziminin optimum çalıştığı sıcaklık değeri ya da değer aralığını belirlemek için farklı inkübasyon sıcaklıklarında (30-80°C) enzim aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.21'de verilmiştir. En yüksek aktivite değeri 25.15 U/ml olarak 60°C'lık inkübasyon sıcaklığında tespit edilmiş ve nispi aktivite olarak %100 kabul edilmiştir. 60°C'ın üzerindeki sıcaklık değerlerinde ise enzim aktivitesinin 70°C'da 21.32 U/ml olarak belirlenmiş ve bunun %85'lik bir nispi aktivite değerine denk geldiği hesaplanmıştır. Öte yandan 70-80°C aralığında enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş meydana gelmiş ($P < 0.05$) ve en düşük aktivite değeri

ise 80°C’da 2.12 U/ml olarak tespit edilmiştir. Bu aktivitenin yaklaşık %8’lik bir nispi aktiviteye karşılık geldiği belirlenmiştir. Enzimlerin protein bazlı yapısının 80°C’da önemli ölçüde denatüre olması istatistiksel olarak önemli bir aktivite düşüşüne neden olmuştur. Bununla birlikte 30, 40 ve 50°C sıcaklık değerlerinde enzim aktivite değeri sırasıyla 9.90, 10.84 ve 14.97 U/ml olarak belirlenmiş ve buna bağlı olarak gösterdikleri nispi aktivite değerleri de sırasıyla %40, %43 ve %60 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde enzimin geniş bir sıcaklık aralığında aktivite gösterdiği ancak istatistiksel olarak en yüksek aktivite değerleri 60-70°C aralığında elde edilmiştir ($P<0.05$). Ayrıca 30-70°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında en az %40 seviyesinde aktivite göstermesi farklı endüstriyel alanlarda kolaylıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

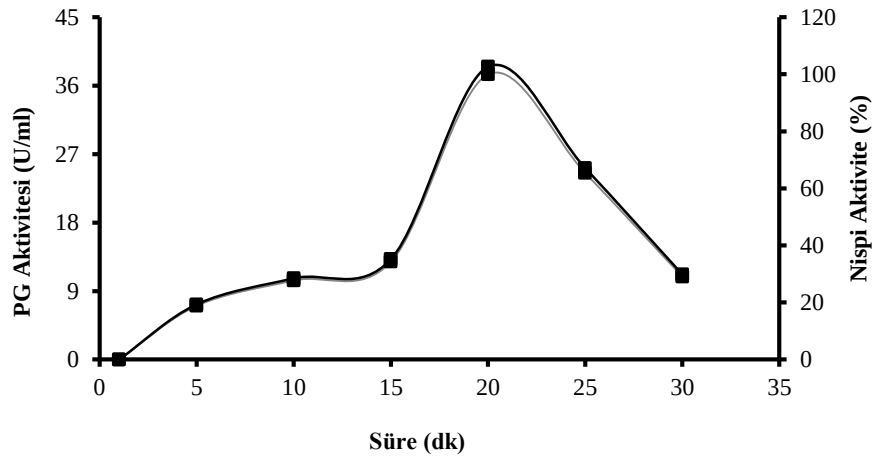


Şekil 4.21. Farklı sıcaklıklara göre enzimdeki aktivite değişimi

4.9.1.3. Optimum inkübasyon süresi

Enzim aktivitesi analizi için optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlendikten sonra aynı sıcaklıkta koşulunda enzim-substrat karışımı solüsyonları farklı sürelerde (1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dk) inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon sonrası elde edilen aktivite değerleri belirlenmiş ve en yüksek enzim aktivitesi %100 kabul edilerek nispi aktiviteler hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.22’de sunulmuştur.

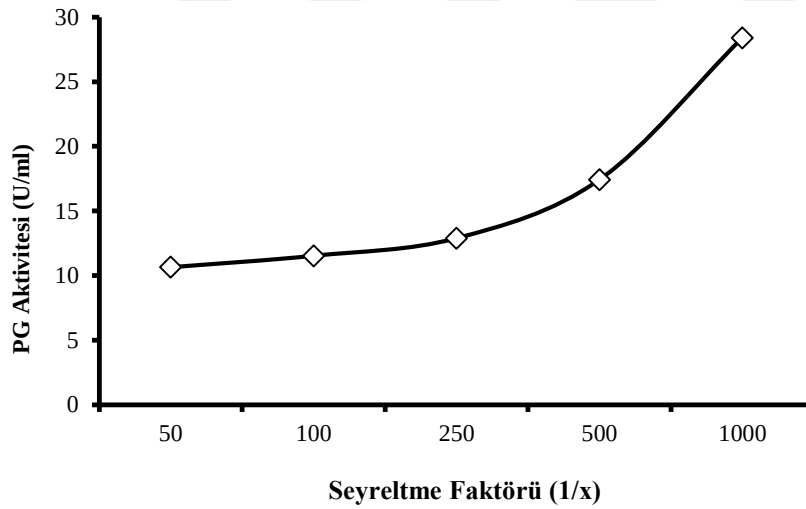
Şekil 4.22 incelendiğinde en yüksek poligalakturonaz aktivitesinin 38.49 U/ml olarak 20 dk’lık inkübasyon sonucunda belirlendiği görülmektedir. Daha uzun süreli olan 25 ve 30 dk’lık inkübasyonların aktivite değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş meydana gelmiş ($P<0.05$) ve optimum süreye göre nispi aktiviteleri sırasıyla %65 ve %29 olarak hesaplanmıştır. Inkübasyon süresi 1 dk olan analizde herhangi bir aktivite tespit edilememiştir (0.0 U/ml).



Şekil 4.22. Farklı inkübasyon sürelerinde enzim aktivitesinin değişimi

4.9.1.4. Optimum seyreltme faktörü

Fermentasyon ortamından alınan besiyeri örneklerinin enzim analizlerinde optimum seyreltme faktörünü tespit etmek için 1/50-1/1000 arasındaki farklı oranlarda seyreltmeler yapılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.23'de verilmiştir.

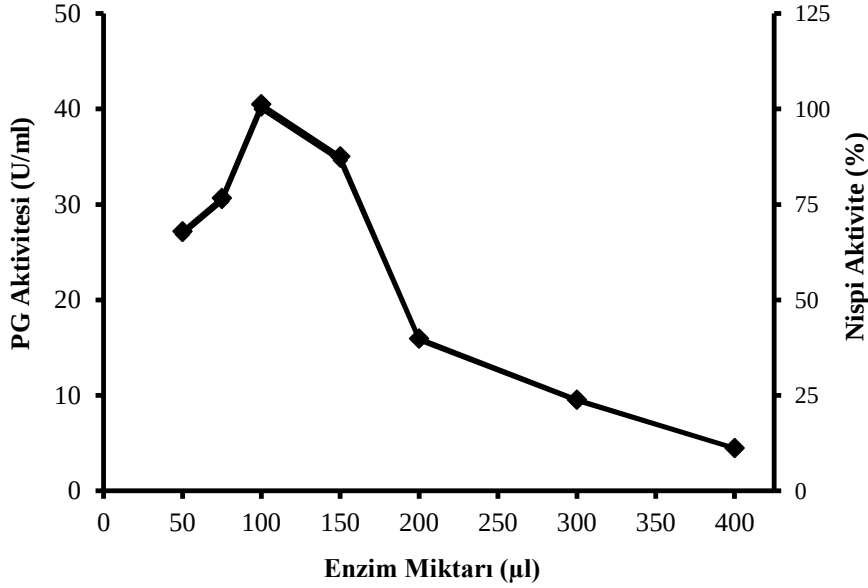


Şekil 4.23. Farklı seyreltme faktörlerine göre enzim aktivitesinin değişimi

Şekil 4.23 incelendiğinde en yüksek aktivitenin (28.40 U/ml) 1000 kat seyreltmenin yapıldığı analizde, en düşük aktivitenin (10.65 U/ml) ise seyreltme faktörünün 1/50 olduğu analizde tespit edildiği görülmektedir. Seyreltme faktörlerinin 1/100, 1/250 ve 1/500 olarak gerçekleştirildiği analizlerde ise enzim aktiviteleri sırasıyla 11.53, 12.89 ve 17.42 U/ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar dikkate alınarak çalışmada yapılan tüm analizlerde seyreltme oranı olarak 1/1000 kullanılmıştır.

4.9.1.5. Enzim miktarının aktivite üzerine etkisi

Enzim analizi için kullanılan örnek miktarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için farklı konsantrasyonda (50, 75, 100, 150, 200, 300 ve 400 µl) enzim kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde tespit edilen aktivite değerleri Şekil 4.24’de verilmiştir.



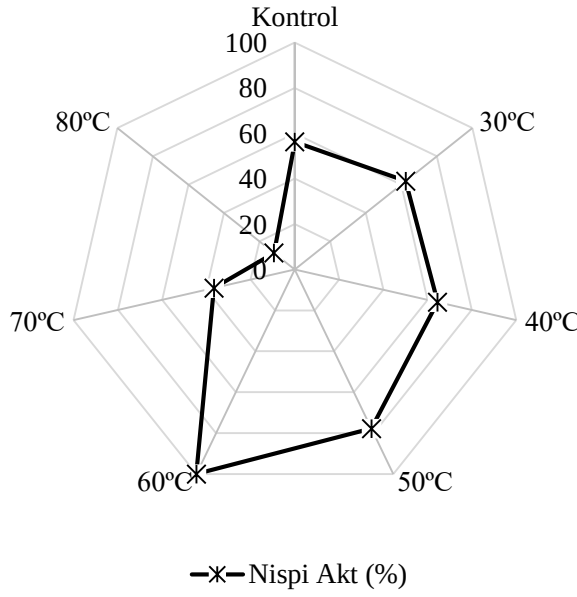
Şekil 4.24. Enzim miktarının poligalakturonaz aktivitesi üzerine etkisi

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite (40.5 U/ml) enzim miktarının 100 µl olduğu analizde tespit edilmiştir. Daha yüksek miktarların (150, 200, 300 ve 400 µl) kullanıldığı analizlerde elde edilen aktivite değerleri daha düşük olmuştur. Bu durum enzimin aktif bölgelerinin yeterince substrata doyması ve aşırı enzim miktarının aktiviteyi düşürmüş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Benzer şekilde 100 µl’den daha düşük miktarların (50 ve 75 µl) kullanıldığı analizlerde de daha düşük aktivite değerleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, çalışmanın bundan sonraki aşamalarında yapılan enzim analizleri için kullanılacak örnek miktarı 100 µl olarak belirlenmiştir.

4.9.2. Enzimin termostabilitesi

4.9.2.1. Farklı sıcaklıklarda depolama

Farklı sıcaklık koşullarında depolamanın enzimin aktivitesinde meydana getirdiği değişiklikleri incelemek için aynı enzim solüsyonu altı farklı sıcaklıkta (30-80°C) eşit süreli (30 dk) bir depolamaya tabi tutulmuştur. Ulaşılan en yüksek aktivite %100 kabul edilerek nispi aktiviteler hesaplanmıştır. Depolama sonrası örneklerin aktivite analizlerinden elde edilen bulgular Şekil 4.25’de verilmiştir.

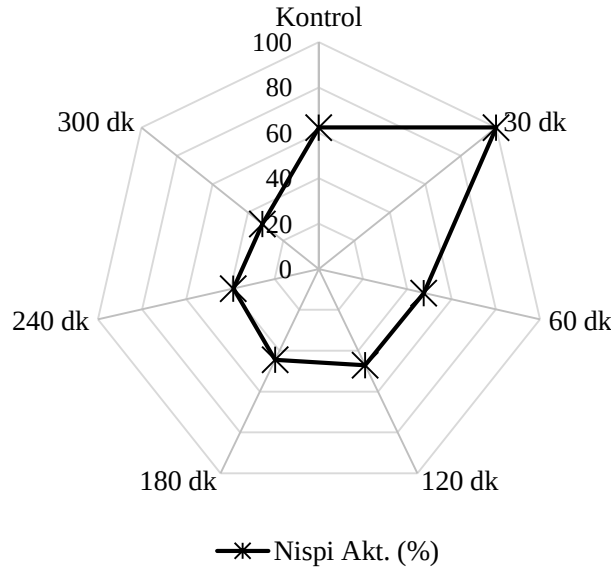


Şekil 4.25. Farklı sıcaklıklarda depolamanın poligalakturonaz aktivitesine etkisi

Şekil 4.25 incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesi 49.35 U/ml olarak 60°C’da depolanan örneklerde tespit edilmiş ve kontrol örneğine (27.76 U/ml) nispeten %78 daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol örneğine nispeten daha yüksek enzim aktivitesine ulaşılan 30, 40 ve 50°C sıcaklıklarının nispi aktiviteleri de sırasıyla %111, 115 ve 138 olarak hesaplanmıştır. 70°C’da istatistiksel olarak önemli bir aktivite kaybı olmuş ve nispi aktivite %65 olarak tespit edilmiştir. Sıcaklığın 80°C olduğu koşullarda enzimlerin denatüre olmasıyla nispi aktivite %21’e düşmüştür. Enzimin 30-60°C aralığında kontrol örneğine nispeten yüksek aktiviteler göstermesi ticarileştirilerek endüstride geniş bir uygulama alanı bulabilmesi açısından oldukça önemlidir. Tari vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Söz konusu araştırmada *A. sojae* ile sıvı kültür ortamında üretilen poligalakturonazın temostabilitesini incelemek için 25, 37, 45, 55 ve 60°C’da 30 ve 60 dk süreli inkübasyonlar yapılmıştır. Çalışmada 25°C sıcaklığında 60 dk inkübasyon sonucu tespit edilen kalıntı enzim aktivitesi yaklaşık %60 iken, daha yüksek sıcaklıklar için (37, 45, 55 ve 60°C) ise kalıntı enzim aktivitelerinin daha yüksek (sırasıyla %90, 85, 80 ve 80) tespit edildiği bildirilmiştir.

4.9.2.2. Farklı Sürelerde Depolama

Üretilen enzimin en yüksek aktiviteyi gösterdiği optimum sıcaklık (60°C) ile şartlandırılan etüv ortamında farklı sürelerde depolamaya bırakılan örneklerde enzim aktivitesi üzerindeki değişim incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardaki en yüksek değer %100 kabul edilmiş ve nispi aktivite olarak Şekil 4.26’da verilmiştir.



Şekil 4.26. Farklı sürelerde depolamanın poligalakturonaz aktivitesine etkisi

Şekil 4.26’de verilen bulgulara göre, enzimin en yüksek aktiviteye 30 dk’lık inkübasyon sonucunda ulaşılmış ve aktivite değeri kontrol örneğine nispeten %60 artış göstermiştir. İnkübasyonun başlamasından 60 dk sonra ise enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş olmuş ve nispi enzim aktivitesi %48 olarak hesaplanmıştır ($P < 0.05$). İnkübasyonun 120. ve 180. dk’sında gerçekleştirilen analizlerde nispi aktiviteler sırasıyla %47 ve %44 olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi inkübasyonun 240. ve 300. dk’sındaki nispi aktiviteler sırasıyla %39 ve %32 olarak tespit edilmiştir. Pektinaz grubu enzimlerin, meyve suyu ekstraksiyonu gibi işlemlerde sıcaklığa karşı direnci önemli bir parametredir. Elde edilen bulgular incelendiğinde enzim aktivitesinin 180 dk sonunda %44’ün üzerinde olması enzimin sıcaklığa karşı stabilitesinin iyi olduğunu göstermektedir. Tari vd. (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sıvı kültür ortamında *A. sojae* ile üretilen poligalakturonazın temostabilitesini incelemek için 25, 37, 45, 55 ve 60°C’da 30 ve 60 dk süreli inkübasyonlar yapılmıştır. Çalışmada 25°C sıcaklığında 30 dk inkübasyon sonucu enzim aktivitesinin %10 arttığı, 60 dk sonunda ise %40 azaldığı, diğer sıcaklık-süre kombinasyonlarında ise %10-35 arasında aktivite düşüşlerinin tespit edildiği bildirilmiştir.

4.9.3. E_a , A , Q_{10} -Değeri, termal inaktivasyon ve termodinamik parametreler

Fermentör denemelerinden elde edilen ham poligalakturonaz solüsyonu kullanılarak aktivasyon enerjisi (E_a), inaktivasyon enerjisi (E_{ia}), frekans faktörü (A), Q_{10} -değeri, termal inaktivasyon ve termodinamik parametreleri hesaplanmıştır. Enzimin farklı sıcaklıklarda (30-80°C) enzim analizi yapılarak belirlenen aktivite değerleri ile poligalakturonaz için reaksiyon hızları belirlenmiş olup sıcaklık birimleri (T , °C), Kelvin (K) birimlerine çevrilmiş ve bunların resiprokalleri ($1/T$, K⁻¹) hesaplanmıştır. Daha sonra elde edilen V_{PG} değeri, $\ln(V_{PG})$ değerine dönüştürülmüştür (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Birinci derece kinetik modele uygun enzimatik reaksiyonun sonuçları

T (°C)	V_{PG} ($\mu\text{mol/mLdk}$)	T (K)	$1/T$ (K^{-1})	$\ln(V_{PG})$
30	30.82 ± 7.96	303	0.0033	3.428
40	31.83 ± 2.22	313	0.0032	3.460
50	38.37 ± 5.64	323	0.0031	3.647
60	46.20 ± 6.40	333	0.0030	3.833
70	18.06 ± 3.35	343	0.0029	2.894
80	5.79 ± 1.22	353	0.0028	1.756

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.14 incelendiğinde en yüksek V_{PG} değerinin 30°C’da ($30.82 \pm 7.96 \mu\text{mol/mLdk}$), en düşük değerin ise 80°C’da ($5.79 \pm 1.22 \mu\text{mol/mLdk}$) belirlendiği görülmektedir. Son olarak $1/T$ (K^{-1}) değerine karşı $\ln(V_{PG})$ değerlerinin grafiği çizilerek negatif (Şekil 4.27a) ve pozitif eğimli (Şekil 4.27b) doğrular elde edilmiştir. Şekil 4.27a’deki doğruların eğim değeri 1403.2 olarak belirlenmiş ve bu değer kullanılarak poligalakturonaz için aktivasyon enerjisi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Eğim} = E_{aPG} / R$$

$$1403.2 = E_{aPG} / 8.314 \text{ (J/molK)}$$

$$E_{aPG} = 11666.20 \text{ (J/molK)}$$

$$E_{aPG} \approx 11.67 \text{ (kJ/molK)}$$

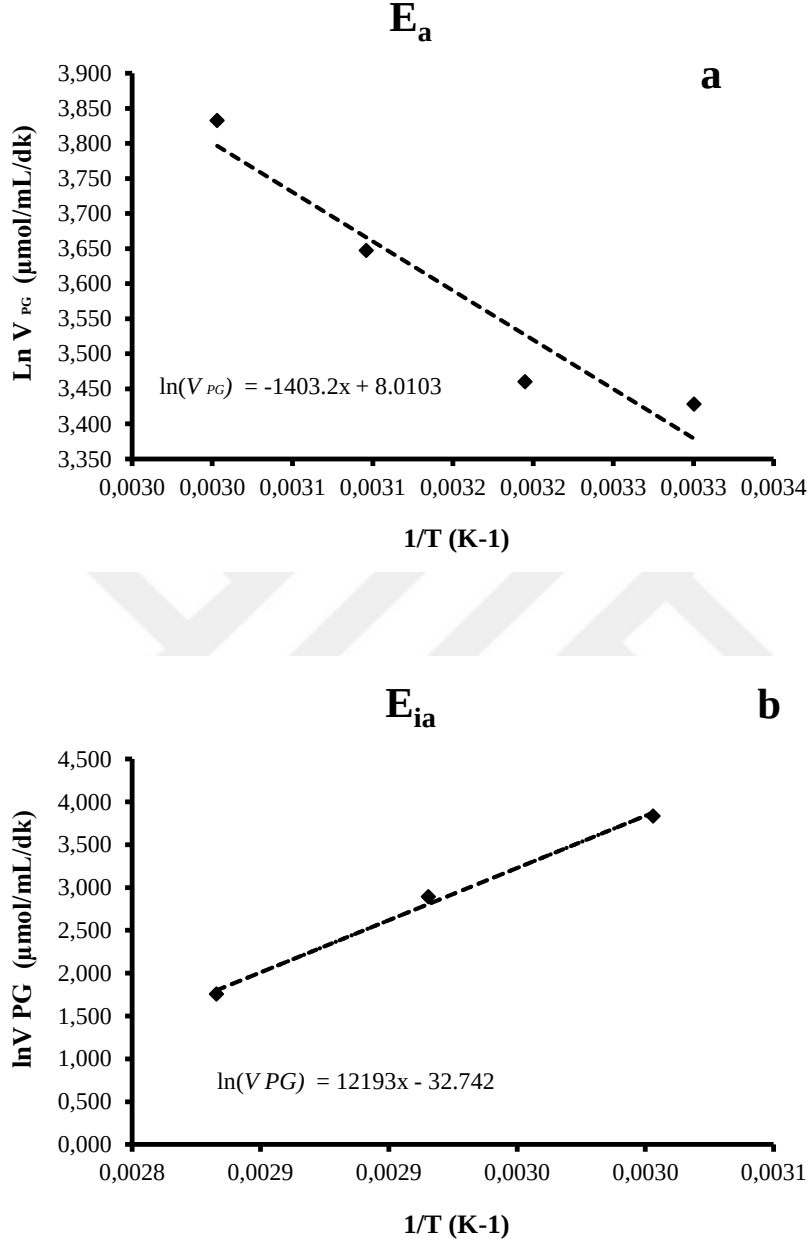
Kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzimatik reaksiyonlarda da hedeflenen reaksiyonun gerçekleşmesi için aşılması gereken bir enerji engeli vardır. Aktivasyon enerjisi bu enerji engelini aşılması için gereken minimum enerji düzeyidir. Kimyasal katalizörler gibi enzimler de bu aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızının artmasını sağlarlar (Saldamlı 2007). Bu çalışmada da poligalakturonazın substrat (PGA) ile etkileşime geçip ürün oluşum safhasına geçmesi için gerekli enerji miktarı 11.67 kJ/molK olarak hesaplanmıştır. Öte yandan enzimatik reaksiyonlarda enzim-substrat reaksiyonu için gerekli olan aktivasyon enerjisi ile birlikte enzimin artan sıcaklık etkisiyle meydana gelen inaktivasyonu için de bir “enzim inaktivasyon enerjisinin” gerekli olduğu bilinmektedir. Enzimin inaktivasyonunun nedeni artan sıcaklığın protein bazlı bir biyomolekül olan enzimin denatürasyonuna neden olmasıdır. Aktivasyon enerjisi ile inaktivasyon enerjisi birbirinden farklı iki enerji seviyesidir. Enzimin substrat ile girdiği reaksiyonda inaktivasyon enerjisi (E_{ia}), aktivasyon enerjisinden (E_a) mutlaka daha yüksektir (Cemeroğlu 2015). Bu çalışmada da üretilen poligalakturonaz enzimi için inaktivasyon enerjisi (E_{ia}) 101.37 kJ/molK olarak hesaplanmıştır. Hesaplama aşağıda verildiği şekilde yapılmıştır.

$$E_{aPG} = E_{iaPG} / R$$

$$12193 = E_{iaPG} / 8.314 \text{ (J/molK)}$$

$$E_{iaPG} = 101372.60 \text{ (J/molK)}$$

$$E_{iaPG} \approx 101.37 \text{ (kJ/molK)}$$



Şekil 4.27. Birinci derece kinetik model enzimatik reaksiyonların Arhenius grafiği (**a**: Aktivasyon enerjisi (E_a), **b**: İnaktivasyon enerjisi (E_{ia}))

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde enzimin aktivasyon (11.67 kJ/molK) ve inaktivasyon enerjileri (101.37 kJ/molK) arasında yaklaşık 8.7 kat fark olduğu görülmektedir. Ayrıca, Şekil 4.27'deki doğru denkleminin y-kesen noktası kullanılarak frekans faktörü (A_{PG}) de hesaplanmıştır. Doğrunun y-eksenini kestiği nokta $\ln(A)$ değerine eşit olduğundan $\ln(A_{PG})$ değeri Şekil 4.27'deki denklemden 8.010 olarak

belirlenmiştir. Şekil 4.27'deki doğruların y-kesen değerleri kullanılarak poligalakturonazın aktivasyon enerjisi (E_a) ve inaktivasyon enerjisi (E_{ia}) için frekans faktörleri (A) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

E_{aPG} için frekans faktörü:

$$\ln(A_{PG}) = 8.010$$

$$A_{PG} = e^{8.010}$$

$$A_{PG} = 3.01 \times 10^3 \mu\text{mol/mL.dk}$$

E_{iaPG} için frekans faktörü:

$$\ln(A_{PG}) = 32.742$$

$$A_{PG} = e^{32.742}$$

$$A_{PG} = 1.66 \times 10^{11} \mu\text{mol/mL.dk}$$

Arhenius sabiti olarak da bilinen frekans faktörü substratın aktivasyon sınırına birim zamandaki yaklaşma sayısıdır. Üretilen poligalakturonaz için hesaplanan bu değerler ile $3.01 \times 10^3 \mu\text{mol/mL.dk}$ 'lık enerji engelini aşmak için aktivasyon enerjisinin seviyesine yaklaşmış olduğu anlaşılmaktadır. Yine benzer şekilde; $1.66 \times 10^{11} \mu\text{mol/mL.dk}$ 'lık enerji engelini aşmak için gereken inaktivasyon enerjisine yaklaştığı anlaşılmaktadır. Elde edilen aktivasyon ve inaktivasyon enerji değerleri ile oluşturulan Arhenius denklemleri (Eşitlik 4.1 ve 4.2) aşağıda verilmiştir.

Aktivasyon enerjisi için;

$$V_{PG} = 3.01 \times 10^3 \times e^{-\frac{11666.20}{8.314} \times \frac{1}{T}} \quad (4.1)$$

İnaktivasyon enerjisi için;

$$V_{PG} = 1.66 \times 10^{11} \times e^{-\frac{101372.60}{8.314} \times \frac{1}{T}} \quad (4.2)$$

Q_{10} -değeri, reaksiyon kinetiğinde bir reaksiyonun hızının sıcaklıktan etkilenme düzeyini tanımlamada kullanılan bir katsayıdır. Sıcaklıktaki her 10°C 'lık artışın reaksiyon hızında kaç kat artış meydana getireceğini gösteren boyutsuz bir büyüklüktür. Bunun yanında, belli bir sıcaklık (genelde 60°C) aşıldıktan sonra enzimler de diğer proteinler gibi denatürasyona uğrayarak etkilerini kaybederler (Cemeroğlu 2015). Yapılan bu çalışmada Q_{10} -değerleri, Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.15. Sıcaklığın 10°C artmasıyla enzimin Q_{10} -değerlerinin değişimi

T (°C)	Q_{10} -değeri
30-40	1.03±0.02
40-50	1.21±0.04
50-60	1.20±0.03
60-70	0.39±0.01
70-80	0.32±0.02

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir

Çizelge 4.15’de de görüldüğü gibi en yüksek Q_{10} -değeri 40-50°C sıcaklık aralığında 1.21±0.04 olarak belirlenmiştir. Bu değer (1.21±0.04) sıcaklığın 50-60°C arası sıcaklık için hesaplanan Q_{10} -değeri (1.20±0.03) ile arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). Bununla birlikte sıcaklık 60°C üzerine çıktığında enzimin denatüre olmasına bağlı olarak aktivitesinde meydana gelen kayıp nedeniyle Q_{10} -değeri de düşmüştür. Böylelikle, Q_{10} -değeri 1’in altında değerler almış ve 60-70°C arasında 0.39±0.01’a gerilemiştir. En düşük Q_{10} -değeri ise 70-80°C aralığında 0.32±0.02 olarak hesaplanmıştır.

Joshi vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis* ile üretilen pektinaz enziminin 0-80°C sıcaklık aralığında en yüksek Q_{10} -değerini 1.0 olarak tespit etmiştir. Benzer bir çalışmada, *Erwinia carotovora* BR1 suşu kullanılarak üretilen poligalakturonaz için 20-70°C arasındaki genel Q_{10} -değeri 1.03 olarak belirlenmiştir (Maisuria vd. 2010). Trindade vd. (2016) sıvı kültür ortamında *Rhizomucor pusillus* A13.36 suşu ile üretilen ekzo-poligalakturonazın Q_{10} -değerini 1.57-1.46 arasında belirlendiği bildirmiştir. Literatürdeki sonuçlar dikkate alındığında, bu çalışmada hesaplanan Q_{10} -değerlerinin literatür ile uyum içinde olduğu görülmektedir.

Poligalakturonaz üretiminde aktivasyon enerjisinin belirlendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Zeni vd. (2015) *Aspergillus niger* ve *Penicillium brasilianum* ile ürettikleri poligalakturonazlar için aktivasyon enerjilerini sırasıyla 9.13 ve 5.76 kJ/mol olarak belirlemiştir. Başka bir çalışmada, sıvı kültür tekniği ile *Rhizomucor pusillus* A13.36 suşu kullanılarak üretilen ekzo-poligalakturonaz için aktivasyon enerjisinin 15.1 kJ/mol, inaktivasyon enerjisinin 125.5 kJ/mol olarak belirlendiği bildirilmiştir (Trindade vd. 2016). Bu çalışmada elde inaktivasyon (101.37 kJ/mol) enerjisine benzer sonuçlar bildiren Amin vd. (2017), ürettikleri *Penicillium notatum* poligalakturonazının 50-80°C arası için hesapladıkları serbest inaktivasyon enerjisinin 97.99 ile 109.20 kJ/mol arasında değiştiğini saptamıştır. Bir diğer çalışmada Demir ve Tari (2016) mutant *Aspergillus sojae*’den ürettikleri poligalakturonazın inaktivasyon enerjisini 125.3 kJ/mol olarak tespit etmiştir. Ayrıca bu çalışmada hesaplanan aktivasyon enerjisi (10.67 kJ/mol) poligalakturonazın substratı hidrolize etmek için küçük bir enerji engelini aşması gerektiğini göstermektedir.

Enerji değerlerinin yanı sıra, poligalakturonazın 70°C ve 80°C’da inaktivasyon hız sabiti (k_d), yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), D-değeri, entalpi (ΔH), serbest enerji (ΔG) ve entropi (ΔS) değerleri de hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Poligalakturonazın kinetik ve termodinamik parametreleri

T (°C)	70	80
T (K)	343	353
k_d (dk ⁻¹)	0.047±0.001	0.057±0.002
$t_{1/2}$ (dk)	14.76±0.11	12.18±0.00
D-değeri (dk)	49.03±0.03	40.46±0.01
ΔH (kJ/mol)	98.52±0.03	98.44±0.03
ΔG (kJ/mol)	93.12±0.52	95.36±0.05
ΔS (J/molK)	-245.80±0.32	-245.41±0.63

Z = 15.20°C

 E_a = 11.67 kJ/mol E_{ia} = 101.37 kJ/molA = 3.01×10^3 µmol/mL.dk

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; sıcaklığın 70°C'dan 80°C'a yükselmesiyle birlikte k_d değerinin de arttığı görülmektedir ($P < 0.05$). Trindade vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *Rhizomucor pusillus* A13.36 poligalakturonazının 70 ve 80°C sıcaklıkları için k_d değerleri sırasıyla 0.0072 ve 0.0213 dk⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bir başka çalışmada ise *Penicillium notatum* tarafından üretilen poligalakturonazın 70 ve 80°C'daki k_d değerleri sırasıyla 0.0135 ve 0.0236 dk⁻¹ olarak belirlenmiştir (Amin vd. 2017). Bununla beraber sıcaklığa bağlı olarak k_d değerindeki artışın enzimin yarılanma ömründe azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da artan sıcaklık $t_{1/2}$ değerinde azalmaya neden olmuştur. Sıcaklığın 70 ve 80°C olduğu koşullarda enzimin $t_{1/2}$ değeri sırasıyla 14.76 ve 12.18 dk olarak belirlenmiştir. Amin vd. (2017) ekzo-PG 1 ve ekzo-PG 2 olarak adlandırdıkları iki tip poligalakturonazın 70 ve 80°C sıcaklıkları için yarılanma sürelerini sırasıyla 2.36 ve 22.72 dk olarak hesaplandığını bildirmiştir. Bir diğer çalışmada ise 70 ve 80°C sıcaklığında poligalakturonazın yarılanma süresi sırasıyla 96.3 ve 32.5 dk olarak belirlenmiştir (Trindade vd. 2016).

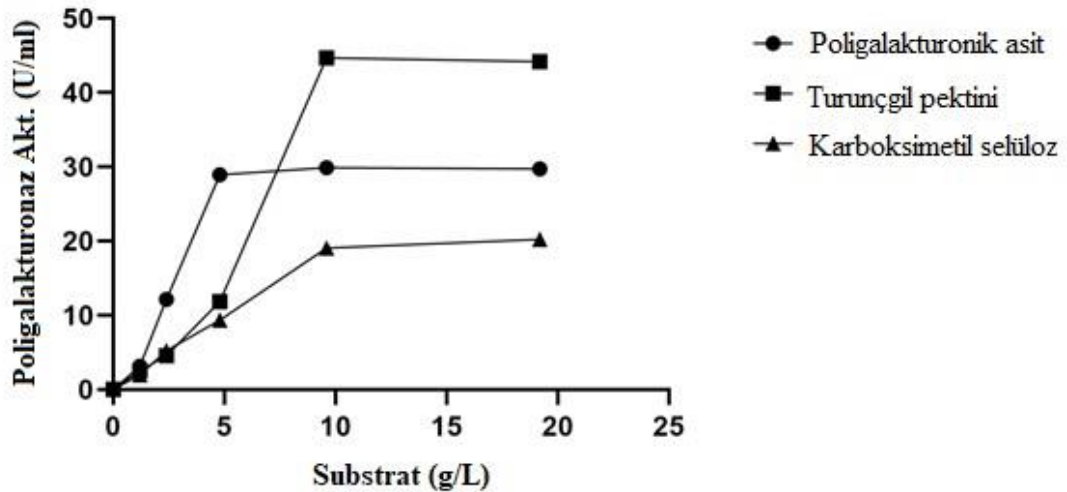
Çalışma kapsamında hesaplanan D-değerleri Çizelge 4.16'da verilmiştir. D-değeri, k_d değerinin bir fonksiyonu olup aralarında ters orantı vardır. Dolayısıyla, k_d değerinin artmasıyla D-değeri azalır. Bu çalışmada da sıcaklığın 70°C'dan 80°C'a yükselmesi ile birlikte k_d değeri artarken D-değerinin 49.03dk'dan 40.06 dk'ya düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.16). Benzer bir çalışmada, poligalakturonazın D-değeri 70°C'da 8.82 dk iken sıcaklığın 80°C'a yükselmesi ile birlikte 7.94 dk'ya düştüğü bildirilmiştir (Amin vd. 2017). Öte yandan hesaplanan D-değeri kullanılarak enzimin Z-değeri 15.20°C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.16). Geniş tanımıyla reaksiyon hız sabitinde 10 kat değişmeye neden olabilecek düzeydeki sıcaklık değişimi olarak ifade edilen Z-değeri, enzimler özelinde ise “desimal azalma süresinin (D-değerinin) 10 kat kısalması için sıcaklığın kaç derece artması gerektiğini” ifade eder. Dolayısı ile enzimin Z-değerinin yüksek olması ısıl işlemin süresine karşı daha duyarlı olduğuna, düşük Z-değeri ise sıcaklıktaki artışa karşı daha duyarlı olduğuna işaret eder. de Carvalho Silva vd. (2018) *Aspergillus aculeatus* URM4953 ile ürettikleri serbest ve immobilize poligalakturonazların Z-değerlerini sırasıyla 4.6 ve 9.5°C olarak hesaplandığını bildirmiştir. Bu çalışmada hesaplanan Z-değeri (15.2°C) dikkate alındığında, de Carvalho Silva vd. (2018) tarafından üretilen poligalakturonazların bu çalışmada üretilen poligalakturonaza nispeten sıcaklık artışına karşı daha duyarlı olduğu anlaşılmaktadır.

Termal geri dönüşümsüz inaktivasyon, temelde denatürasyon ve inaktivasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Yüksek sıcaklığa uzun süre maruz kalan enzimin yapısındaki kovalent olmayan bağlar ya da aminoasitler arası hidrofobik etkileşimler bozulur (Saldamlı 2007). Bu çalışmada üretilen poligalakturonazın ΔH değeri 70 ve 80°C için sırasıyla 98.52 ve 98.44 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Dolayısı ile sıcaklık artarken ΔH değeri azalmıştır (Çizelge 4.16). Bu düşüş enzimin geniş aralıklı termostabilitesini doğrulamaktadır. Bir diğer termodinamik parametre olarak serbest enerji değişimi (ΔG) 70 ve 80°C sıcaklık koşulları için sırasıyla 93.12 ve 95.36 kJ/mol olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın artması ile birlikte ΔG değerinin de arttığı görülmüştür. Bir diğer parametre olan entropi değişimi (ΔS) ise 70 ve 80°C sıcaklık değerlerinde -245.80 ve -245.41 J/mol.K olarak hesaplanmıştır. Bunun yanında bu iki sıcaklık içi hesaplanan ΔS değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Yapılan bir çalışmada, *Rhizomucor pusillus* A13.36 ile sıvı kültür ortamında üretilen ekzo-poligalakturonazın 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklar için ΔS değerleri sırasıyla 238.2, 226.1, 214.7 ve 203.9 J/mol.K olarak belirlenmiş olup sıcaklığın artması ile birlikte ΔS değerlerinin azaldığı bildirilmiştir (Trindade vd. 2016). Bir diğer çalışmada ise *Aspergillus aculeatus* URM 4953 poligalakturonazının 30, 40, 50 ve 60°C sıcaklıkları için ΔS değerleri sırasıyla -225.2, -225.0, -221.8, -224.8 olarak hesaplanmıştır (de Carvalho Silva vd. 2018). Bu iki çalışmada olduğu gibi sıcaklık ile ΔS değerinin ters orantılı olarak değişmesi bu tez çalışmasında hesaplanan ΔS değerlerinin literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

4.9.4. Enzimin farklı substratlara ilgisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi

Üretilen poligalakturonazın farklı substratlara karşı ilgisinin tespit edilmesi amacıyla poligalakturonik asit (PGA), pektin ve KMS'nin farklı konsantrasyonlarda (1.2, 2.4, 4.8, 9.6 ve 19.2 g/L) hazırlanan solüsyonları ile enzim analizleri gerçekleştirilerek elde edilen aktivite değerleri Şekil 4.28'de sunulmuştur.



Şekil 4.28. Enzimin farklı konsantrasyonlardaki substratlarda gösterdiği aktivite değişimi

Farklı substratlar ile yapılan enzim analizlerinde elde edilen en yüksek aktivite değerleri sırasıyla 44.7 U/ml (9.6 g/L pektin), 29.9 U/ml (9.6 g/L PGA) ve 20.2 U/ml (9.2 g/L KMS) olarak tespit edilmiştir. Substratların farklı konsantrasyonlarında belirlenen ve Şekil 4.28’de sunulan enzim aktivite değerleri ile Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hesaplanmış olup Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Poligalakturonazın farklı substratlarda hesaplanan kinetik parametreleri

	PGA	Pektin	KMS
V_{max} (U/ml)	40.2±4.9	101.7±7.2	33.7±6.3
K_m (g/L)	4.1±0.7	21.2±4.1	10.8±2.4
R^2	0.89	0.85	0.96

Michaelis-Menten denklemi, enzim kinetiğinde reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen değişimini gösterir. Enzimin maksimum hızının yarısı K_m olarak ifade edilmektedir. Diğer bir ifade ile K_m değeri, enzimdeki aktif merkezin yarısını doldurmak için gerekli substrat konsantrasyonudur ve her enzim için farklıdır. Dolayısı ile substratın enzime olan ilgisinin bir ölçüsü olarak görülmektedir (Saldamlı 2007).

Çizelge 4.17 incelendiğinde en küçük K_m değerinin PGA’nın substrat olarak kullanıldığı analizlerde tespit edildiği görülmektedir. PGA substratı için V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 40.2±4.9 ve 4.1±0.7 olarak hesaplanmıştır. En yüksek V_{max} ve K_m değerleri ise pektin substratında yapılan analizlerde sırasıyla 98.9±7.2 ve 19.5±4.1 olarak belirlenmiştir. En düşük V_{max} değeri KMS’ye ait enzim aktivitelerinden 33.7±6.3 olarak hesaplanmış, aynı substrata ait K_m değeri 10.8±2.4 olarak bulunmuştur. Hesaplanan bu kinetik parametreler incelendiğinde birer pektik bileşen olan pektin ve PGA’nın enzime olan spesifitesinin istatistiksel olarak önemli olduğu, bir selüloz polimeri olan KMS’ye etki etmesine rağmen daha düşük bir hızla etki gösterdiği görülmektedir ($P<0.05$).

Yapılan bir çalışmada Cheng vd. (2016) mutant *Penicillium oxalicum* ile sıvı kültür ortamında ürettikleri endo-poligalakturonazın PGA substratındaki K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 1.27 mg/ml ve 5504.6 U/mg olarak belirlendiğini bildirmiştir. Bir başka çalışmada *Aspergillus flavus* MTCC 7589’den üretilen ekzo-poligalakturonazın PGA substratında K_m değeri 2.08 mg/ml olarak tespit edilmiştir (Anand vd. 2017). Farklı sıcaklıklar için *Aspergillus aculeatus* URM4953 ile derin kültür ortamında üretilen poligalakturonazın pektin substratındaki K_m ve V_{max} değerlerini hesaplayan de Carvalho Silva vd. (2018), 60°C için bu değerleri sırasıyla 15.9 mg/ml ve 5.13 U/ml olarak tespit etmiştir. Substrat spesifikliğı, enzimler için önemli ve substrat türü, kaynak türü ve reaksiyon türüne bağlı olarak değişkenlik gösteren bir özelliktir. Bir enzimin geniş substrat spesifikliğı sergilemesi yüksek esnekliğe sahip olduğunun kanıtıdır (Singh ve Kumar 2019).

4.9.5. Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Üretilen enzimin farklı metal iyonları ile etkileşimlerinde aktivitenin nasıl değiştiğini incelemek için sekiz farklı iyon (Ba^{2+} , Ag^+ , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , K^+ ve Na^+) ve bir şelasyon ajanı (Etilendiamin tetraasetik asit, EDTA) kullanılmıştır. Na-asetat

tamponunda (100 mM) konsantrasyonları 1mM olacak şekilde hazırlanan bu dokuz farklı çözelti ile enzim örnekleri 50°C sıcaklıkta 30 dk süreyle ayrı ayrı inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında aktivite tayini yapılmıştır. Herhangi bir metal etkileşimine uğramayan kontrol örneği ve metal çözeltisi ile inkübe edilen örnekler analiz edilmiş ve kontrol örneğine nispeten kalan poliglakturonaz aktiviteleri Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Farklı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi

Reaktif	Nispi Aktivite (%)
Kontrol	100.0±4.9 ^a
EDTA	65.0±2.9 ^b
Ba ²⁺	59.4±3.9 ^b
Ag ⁺	106.4±2.4 ^a
Fe ³⁺	26.7±0.5 ^d
Mn ²⁺	28.8±0.3 ^d
Co ²⁺	57.5±1.6 ^b
Sr ²⁺	42.9±1.0 ^c
K ⁺	107.8±5.9 ^a
Na ⁺	106.2±1.9 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0.05$).

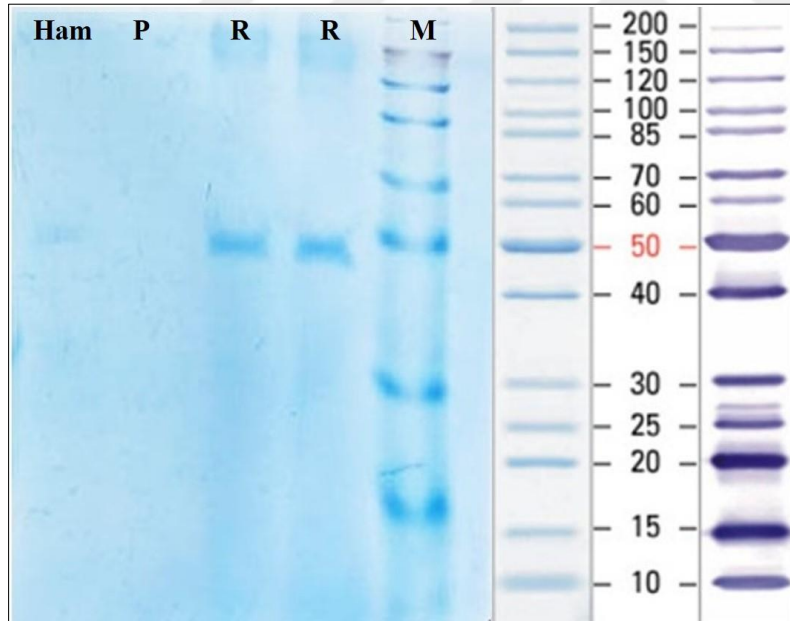
Çizelge 4.18 incelendiğinde, Ag⁺, K⁺ ve Na⁺ iyonlarının enzim aktivitesini yaklaşık %6-7 artırmasıyla birlikte bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$). EDTA ajanı, Ba²⁺ ve Co²⁺ iyonları ise poliglakturonaz aktivitesinde yaklaşık %35-43 arasında ve istatistiksel olarak önemli bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Bununla birlikte, Fe³⁺ ve Mn²⁺ iyonları nispi enzim aktivitesini sırasıyla %26.7 ve %28.8’ye düşürmüş ve istatistiksel olarak önemli bir aktivite kaybına neden olmuştur ($P<0.05$). Bu sonuçlar dikkate alındığında üretilen poliglakturonazın Ag⁺, K⁺ ve Na⁺ metallerinin bulunduğu koşullarda aktivite kaybı olmaksızın çalışabileceğini göstermektedir. Diğer yandan EDTA şelatı, Ba²⁺, Co²⁺, Fe³⁺ ve Mn²⁺ iyonlarının poliglakturonaz üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Metal iyonları, enzimler için stabilizatör/aktivatör veya inhibitör etki gösterme fonksiyonlarına sahiptir. Bunlar enzim ko-faktörü olarak işlev görür ve enzim-substrat kompleksi yakınlığını artırarak enzim-katalizli reaksiyonları hızlandırır. Farklı metal iyonlarının poliglakturonaz aktivitesine etkisinin incelendiği bir çalışmada, *Aspergillus sojae* 20235 kullanılarak sıvı besiyerinde üretilen ekzo-poliglakturonaza bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde K⁺ (%174.8) ve Na⁺ (%124.5) iyonları aktivatör etkisi yaparken Mn⁺ (%0) ve Fe⁺ (%74.6)’nin ise inhibitör etkisi yaptığı bildirilmiştir (Doğan et al. 2008). Bir başka çalışmada, *Penicillium occitanis* ile sıvı kültür ortamında üretilen poliglakturonaza K⁺ (%100) ve Na⁺ (%99.2) iyonları uygulandığında aktivite değerinde istatistiksel olarak önemli bir kayıp olmadığı, EDTA’nın (%108.8) uygulandığı örneklerde ise aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Fe⁺ (%93.8), Ba⁺ (%87.9) ve Mn⁺ (%21.1) iyonlarının ise aktivite üzerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Anand vd. (2017) tarafından gerçekleştirilen güncel bir incelemede katı kültür ortamında *Aspergillus flavus*’un ürettiği ekzo-poliglakturonazın EDTA ve bazı

metalik katyonlar ile inkübasyona bırakılmaları sonucu aktivitedeki değişim nispi olarak hesaplanmıştır. İlgili çalışmanın sonuçları incelendiğinde K^+ (%157.0), Na^+ (%128.0) ve Co^{+} (%178.0) iyonlarının aktivite üzerinde indükleyici bir etki göstermekle birlikte EDTA ajanının (%64.2) ve Ag^+ (%50.0) iyonunun inhibitör etkisi yaptığı bildirilmiştir.

4.9.6. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi

Gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinden elde edilen fermentasyon sonrası ham besiyeri 10 kDa'luk bir ayırma sınırı kullanılarak ultrafiltrasyona tabi tutulmuştur. Ultrafiltrasyon sonrası elde edilen retentat ve permeat sıvılarında ve ham fermente besiyeri solüsyonunda bulunan poligalakturonaz için SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlık tespiti yapılmıştır. Analiz sonrası elde edilen bantlar incelendiğinde üretilen poligalakturonazın moleküler ağırlığının 40-50 kDa arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29). Dogan ve Tari (2008), ürettikleri ekzo-poligalakturonazın moleküler ağırlığını SDS-PAGE metodu ile 36-53 kDa aralığında belirlediklerini bildirmiştir. Bu sonuçlara benzer şekilde, Heerd vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada katı kültür yöntemi ile üretilen poligalakturonazın moleküler ağırlığı 46-58 kDa aralığında belirlenmiştir. Yine bir başka çalışmada *Penicillium occitanis* ile üretilen poligalakturonaza ait tekli homojen bandı 45 kDa'da tespit edilmiştir (Tounsi vd. 2016). Daha önce yapılan çalışmalarda moleküler ağırlık düzeyleri göz önüne alındığında bu çalışmada tespit edilen değer aralığı ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.29. SDS-PAGE analiz sonucu, **P:** Permeat-10kDa, **R:** Retentat-10kDa, **Ham:** Fermente besiyeri ve **M:** Marker

4.10. Ultrafiltrasyon ile Enzimin Kısmi Saflaştırması

Fermentasyon sonrası daha konsantre bir enzim solüsyonu elde edebilmek için fermente besiyeri sıvısı UF'ye tabi tutulmuştur (Ek-9). UF işlemlerinde iki farklı ayırma sınırına sahip (10 ve 100 kDa) membranlar kullanılmıştır. Bununla beraber, ham enzim solüsyonu ve UF'ye tabi tutulan örneklerde toplam protein analizi yapılarak spesifik

aktiviteler belirlenmiştir. Ayrıca UF'den elde edilen permeat ve retentat örneklerinde tespit edilen aktiviteler ham solüsyonun aktivitesi ile oranlanarak saflaştırma katsayısı hesaplanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. UF denemelerinden elde edilen solüsyonlarda protein miktarı ve spesifik aktivite tayini

	Toplam Protein	Enzim Akt. (U/ml)	Spesifik Akt. (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı
Ham solüsyon	0.434±0.008 ^{ab}	51.75±6.15 ^c	119.24	1.00
Permeat (10 kDa)	0.425±0.010 ^b	25.55±2.95 ^d	68.82	0.53
Retentat (10 kDa)	0.444±0.007 ^{ab}	78.56±8.14 ^b	176.91	1.52
Permeat (100 kDa)	0.455±0.009 ^a	126.91±11.81 ^a	278.90	2.45
Retentat (100 kDa)	0.422±0.004 ^b	28.21±3.65 ^d	66.83	0.54

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($P<0.05$).

Yapılan enzim analizleri sonucu elde edilen verilere göre UF için başlangıç örneği olarak kullanılan ham solüsyonun enzim aktivitesi ve spesifik aktivite değeri sırasıyla 51.75 U/ml ve 119.24 U/mg olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Ham fermente sıvının 10 kDa'luk ayırma sınırına sahip membrandan geçirilmesi ile elde edilen permeat ve retentat sıvılarında enzim aktiviteleri sırasıyla 25.55±2.95 ve 78.56±8.15 U/ml olarak belirlenmiştir. Aynı permeat ve retentat örnekleri için spesifik aktivite miktarı sırasıyla 68.82 ve 176.91 U/mg olarak hesaplanmıştır. Ayrıca 10 kDa'luk membran ile yapılan UF işleminde permeat için saflaştırma katsayısı 0.53 olarak belirlenirken retentat için 1.52 olarak hesaplanmıştır. Diğer ayırma sınırı olan 100 kDa'luk membran ile gerçekleştirilen UF prosesinden elde edilen permeat ve retentat örneklerinin enzim aktiviteleri sırasıyla 126.91±11.8 ve 28.21±3.65 U/ml olarak tespit edilmiştir. Aynı permeat ve retentat örnekleri için protein analizleri yapılmış olup elde edilen sonuçlar kullanılarak spesifik aktivite değerleri sırasıyla 278.90 ve 66.83 U/mg olarak belirlenmiştir. Ayrıca 100 kDa ayırma sınırı ile yapılan UF'de saflaştırma katsayıları permeat ve retentat örnekleri için hesaplanmış ve sırasıyla 2.45 ve 0.54 olarak bulunmuştur. Her iki ayırma sınırında da elde edilen permeat ve retentat örneklerinin aktivite değerleri aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Bunun yanında elde edilen sonuçlar dikkate alındığında enzimin moleküler ağırlığının 10-100 kDa aralığında olduğu anlaşılmaktadır.

UF, enzim gibi biyomoleküllerin fermentasyon ortamından geri kazanımında uzun yıllardır kullanılan bir yöntemdir. Düşük sıcaklık altında gerçekleşen, yüksek ayırma faktörüne sahip bir sistem olması ve kromatografik saflaştırma tekniklerine nispeten düşük maliyetli olması gibi avantajlar endüstriyel enzim üretimine dönük çalışmalarda tercih edilmesini kolaylaştırmıştır. UF ile enzim konsantrasyonu yapılan bir çalışmada; glukoz ve KBE substratında rekombinant *A. sojae* (ATCC 11906) ile ayrı ayrı mannanaz üretimleri gerçekleştirilmiş olup 10 kDa ayırma sınırı kullanılarak elde edilen retentatlarda saflaştırma katsayıları sırası ile 2.64 ve 3.33 olarak hesaplandığı bildirilmiştir (Turhan 2015). Başka bir çalışmada, Poletto vd. (2015), buğday kepeği substratı ile hazırladıkları katı kültür ortamında *Aspergillus niger* LB-02-SF ile pektinaz üretmiş ve ham pektinaz solüsyonunu 10 kDa'luk bir membrandan geçirerek enzim aktivitesini 1.32 katına çıkarmışlardır. Buğday kepeği ile yapılan bir başka çalışmada ise,

Streptomyces lydicus MTCC 7505 kullanılarak poligalakturonaz üretilmiş ve ayırma sınırı 10 kDa olan bir UF sisteminden geçirilen enzim solüsyonunun aktivite değeri 4.1 kat artırılmıştır (Jacob vd. 2008). Aktarılan bu çalışmalar dikkate alındığında, bu tez çalışması kapsamında hesaplanan saflaştırma katsayısının (2.45 kat) enzimlerin UF ile konsantre edilmesine yönelik farklı çalışmalarda belirlenen saflaştırma katsayıları ile kıyaslanabilir nitelikte olduğu saptanmıştır.

4.11. Liyofilizasyon

Fermentasyonlardan elde edilen ham enzim solüsyonu 10 kDa ayırma sınırına sahip UF sisteminden geçirilmiştir. Elde edilen permeat (40 ml) ve retentat (30 ml) sıvıları enzimin toz formda ticari bir preparat olarak üretilebilme potansiyelini belirlemek amacıyla herhangi bir stabilizör ilavesi olmaksızın liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Liyofilizasyon işlemlerinin ardından toz formdaki örnekler (Ek-10) 5 ml sodyum asetat tamponu ile tekrar sıvı forma getirilerek enzim analizleri yapılmıştır. Örneklerin enzim aktivite değerleri, protein miktarı, spesifik aktivite değerleri ve spesifik aktivite değerleri üzerinden liyofilizasyon işlemi için hesaplanan verim katsayıları Çizelge 4.20’de sunulmuştur.

Çizelge 4.20. Liyofilizasyona tabi tutulan ultrafiltrasyon örneklerine ait analiz sonuçları

	Enzim Akt. (U/ml)	Protein Mik. (mg/ml)	Spesifik Akt. (U/mg)	Hacim (ml)	Verim Katsayısı
LF* Öncesi Permeat	14.13±2.13 ^d	0.441	32.0	40	
LF Sonrası Permeat	42.10±6.21 ^b	0.463	91.0	5	2.84
LF Öncesi Retentat	61.24±8.63 ^c	0.450	136.0	30	
LF Sonrası Retentat	97.09±12.36 ^a	0.513	189.4	5	1.39

*LF: Liyofilizasyon

**Aynı sütundaki farklı harfler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$)

UF sonrası elde edilen permeat ve retentat sıvılarının enzim aktiviteleri sırasıyla 14.13±2.13 ve 61.24±8.63 U/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.20). Aynı permeat ve retentat örnekleri için protein miktarları sırasıyla 0.441 ve 0.450 mg/ml olarak belirlenmiş olup spesifik aktiviteleri de yine sırasıyla 32.0 ve 136.0 U/mg olarak hesaplanmıştır. Daha sonra aynı örnekler liyofilizasyon işleminin ardından tampon çözelti ile tekrar sıvı forma getirilmiş ve enzim aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyona tabi tutulan permeat örneğinin enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite değeri sırasıyla 42.10±6.21 U/ml, 0.463 mg/ml ve 91.0 U/mg olarak belirlenmiş olup retentat örneği için ise aynı değerler sırasıyla 97.09±12.36 U/ml, 0.513 mg/ml ve 189.4 U/mg olarak tespit edilmiştir. Hesaplanan spesifik aktiviteler dikkate alındığında liyofilizasyon öncesine nispeten, permeat örneğinde %184, retentat örneğinde ise %39 aktivite artışı belirlenmiştir.

Liyofilizasyon, sulu çözeltilerin dondurulduğu ve sonra bir vakum otamına yerleştirildiği hassas bir dehidrasyon işlemidir. Katılaştıran çözelti erimeden vakum etkisiyle buharlaşır ve geriye katı bir formda uçucu olmayan bileşenler kalır. Liyofilizasyon ile enzimin toz hale getirildiği işlemlerde aktivite kaybını önleyebilmek

için stabilize edici ajanlar kullanılmaktadır. Ancak stabilizör ilave edilmeksizin aktivitesini maksimum düzeyde korunmasının da enzimin ticarileştirilmesi açısından önemli bir üstünlük olduğu bilinmektedir (Klibanov 2001). Bu çalışmada herhangi bir stabilizör ilavesi olmaksızın en yüksek ticari saflıkta (yığın, dökme vb.) enzim elde edilmiştir. Gerçekleştirilen liyofilizasyon işlemleri sırasında retentat ve permeat örneklerinin enzim aktivitelerinin, işlem öncesine nispeten artması işlem öncesi preparattaki suda çözünür safsızlıkların işlem sırasında uzaklaşmış olması ile açıklanabilir. Bu sonuçlar üretilen poligalakturonazın endüstriye aktarılabilirliği açısından önemli bir avantajdır. Bununla beraber literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde; elde edilen sonuçlar liyofilizasyon ile toz formda enzim üretimine dönük çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilir nitelikte olduğu görülmüştür. Örneğin, Srirangsan vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, nükleosit fosforilaz (NP) ve ksantin oksidazın (XOD) birleşiminden oluşan bir enzim karışımına (NP-XOD) farklı stabilizör çözeltileri (sukroz (S), sukroz+sığır serum albümini (S+SSA), sukroz+jelatin (S+J), sukroz+dekstran (S+D), sukroz+polietilenglikol (S+PEG)) ilave edilerek liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve kalan nispi aktivitelerin şu şekilde tespit edildiği bildirilmiştir: Kontrol: %34, S: %64, S+SSA: %86, S+J: %84, S+D: %48 ve S+PEG: %61. Başka bir çalışmada, Sánchez vd. (2015) *Aspergillus niger* ile katı kültür ortamında ürettikleri ksilanazı stabilizör (yağsız süt) ilaveli ve ilavesiz olarak liyofilizasyon işlemine tabi tutmuş ve kalan aktivite oranlarının sırasıyla %16 ve %13 olarak tespit edildiği belirtilmiştir. Turhan (2015) ise glukoz ve KBE substratında mannanaz enzimi üretimleri gerçekleştirmiş ve elde edilen fermente sıvıların UF'den geçirilmesinin ardından liyofilizasyona tabi tutmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, glukoz substratında gerçekleştirilen besiyerinden alınarak elde edilen retentat örneğinin liyofilizasyon öncesi 970 U/ml olan aktivite değeri liyofilizasyon sonrası 959 U/ml olarak tespit eden Turhan (2015), substrat olarak KBE'nin kullanıldığı besiyerinden alınan fermente sıvının retentatı için ise liyofilizasyon öncesi 997 U/ml olan mannanaz aktivitesini liyofilizasyon sonrası 1091 U/ml olarak hesaplamıştır (Turhan 2015).

4.12. Ekonomik Analiz

Bölüm 4.8'deki en yüksek aktivitenin (91.25 U/ml) elde edildiği fermentasyon için temel bir ekonomik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, fermentasyon öncesi, fermentasyon süreci ve fermentasyon sonrası aşamalarda kullanılmış olan hammaddeler, kimyasallar ve sarf malzemelerin güncel birim fiyatları ile kullanım miktarları esas alınarak maliyetleri ayrı ayrı belirlenmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. Fermentasyon öncesi ve sonrasında kullanılan hammadde, sarf ve kimyasalların maliyetleri

İşlem	Materyal	Birim Fiyatı (₺/g)	Kullanılan Miktar (g)	Maliyet (₺)
Besiyeri bileşenleri	Portakal kabuğu	0.002	90	0.180
	Pepton	1.34	3.75	5.025
	Monosodyum fosfat	0.26	1.5	0.390
	Disodyum fosfat	0.72	0.75	0.540
	Su (Toplam)	4.75E-6	2500	0.019
	Asetik asit	0.088	2	0.176
	Sodyum asetat	0.360	2.5	0.900
	Hidroklorik asit	0.166	40	6.656
ARA TOPLAM				13.879
Kültür gelişimi	PDA	0.72	4.875	3.5100
	Su (PDA için)	4.75E-6	500	0.0024
	Tween çözeltisi	0.56	0.02	0.0112
	Su (inokulum için)	4.75E-6	100	0.0005
	Agar-agar	1.68	0.3	0.5040
	Melas	10.3E-4	0.75	0.0008
	Gliserol	0.33	0.75	0.2475
	NaCl	0.09	0.08	0.0075
	Steril petri	1.04	2	2.0833
ARA TOPLAM				6.3672
UF'nin hazırlanması ve temizlenmesi	Su (Temizlik 1)	4.75E-6	1500	0.0071
	NaOH	0.155	4	0.6200
	Su (Çözelti)	4.75E-6	1000	0.0048
	Su (Temizlik 2)	4.75E-6	2000	0.0095
	Etanol	0.128	200	25.6000
	Su (Çözelti)	4.75E-6	800	0.0038
ARA TOPLAM				26.2452
Sarf	Steril şırınga (20ml)	4.5	1	4.500
	Alüminyum folyo (cm)	0.0002	50	0.011
	Falcon tüpü (50ml)	5.5	2	11.000
ARA TOPLAM				15.511
TOPLAM SARF VE KİMYASAL MALİYETİ				62.0023

Hesaplanan değerler incelendiğinde; en yüksek sarf ve kimyasal maliyeti kısmi saflaştırmanın yapıldığı ultrafiltrasyon aşamasında 26.25 ₺ olarak belirlenmiştir. Fermentasyonda kullanılan *A. sojae* 'nin kültür gelişimi ve inokülasyon hazırlıkları için gerekli olan kimyasalların maliyet değeri ise 4.28 ₺ olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon

ortamının oluşturulması için gerekli materyaller ve ortam pH'sının ayarlanması için gereken kimyasalların toplam maliyeti de 13.88 ₺ olarak tespit edilmiştir. Bunlarla birlikte, tüm süreçlerde kullanılan sarfların hesaplanan toplam maliyeti ise 15.51 ₺'dir. Fermentasyon öncesi ve sonrasında kullanılan tüm hammadde, sarf ve kimyasalların maliyetlerine ait genel toplam 59.92 ₺ olarak belirlenmiştir. Enzim üretimi için sarf ve kimyasalların dışında kullanılan cihazlar için gerekli enerjinin maliyetleri de hesaplanmış ve Çizelge 4.22'de sunulmuştur.

Çizelge 4.22. Fermentasyon öncesi ve sonrasında gerçekleştirilen işlemlerin enerji maliyetleri

İşlem Aşaması	Kullanılan cihaz	Elektrik Birim Fiyatı (kuruş)	Elektrik Sarfıyatı (kW/saat)	Kullanım Süresi (saat)	Maliyet (₺)
Fermentasyon hazırlık	Hassas terazi	54.3673	0.006	0.50	0.0016
	Manyetik karıştırıcı	54.3673	0.825	0.50	0.2243
	Otoklav (2 kez)	54.3673	3.800	2.50	5.1649
	Steril kabin	54.3673	0.285	1.50	0.2324
ARA TOPLAM					5.6232
Fermentasyon	Biyoreaktör	54.3673	1.84	144	144.052
	Hava pompası	54.3673	0.75	144	58.717
ARA TOPLAM					202.769
Saflaştırma ve Liyofilizasyon	Ultrafiltrasyon (Hazırlık ve Temizleme)	54.3673	0.080	1.25	0.0544
	Ultrafiltrasyon	54.3673	1.000	0.50	0.2718
	Liyofilizatör	54.3673	2.300	24.00	30.011
	Liyofilizasyon öncesi - 80°C'de dondurma	54.3673	0.758	24.00	9.8948
ARA TOPLAM					40.2318
TOPLAM ENERJİ MALİYETİ (TL)					248.623

Çizelge 4.22 incelendiğinde, en yüksek enerji maliyetinin 202.77 ₺ olduğu ve fermentasyon sırasında biyoreaktör ve havalandırma pompasının (kompresör) kullanımı için hesaplandığı görülmektedir. Fermentasyon öncesinde farklı işlemler için kullanılan hassas terazi, manyetik karıştırıcı, otoklav ve steril kabin için kullanılan elektriğin maliyeti 5.62 ₺ olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon sonrası işlemler (ultrafiltrasyon ve

liyoofilizasyon) için hesaplanan enerji maliyeti ise 40.23 ₺'dir. Tüm aşamaların enerji giderleri dikkate alınmış ve enzim üretimi için yapılan tüm işlemlerin toplam enerji maliyeti 248.62 ₺ olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışma kapsamında portakal kabuğu substratında üretilen poligalakturonazın hammadde, sarf, kimyasal ve enerji maliyetlerinin genel toplamı 310.63 ₺ olarak tespit edilmiştir. Ultrafiltasyon ve liyoofilizasyon işlemlerinin enzim aktivitesini sırasıyla 2.45 ve 2.84 kat artırabildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.19 ve 4.20). Elde edilen sıvının 10 ml olduğu düşünüldüğünde hesaplanan maliyet ile yaklaşık 7000 U'lık enzim preparatı üretilmektedir. Öte yandan, piyasada bulunan ticari poligalakturonazların fiyatları oldukça yüksektir. Örneğin, Sigma-Aldrich tarafından satışı yapılan *Aspergillus niger*'den elde edilmiş 5000U'lık poligalakturonazın günümüz (Ocak 2020, 1 € = 6.44 ₺) fiyatı 657 ₺, aynı enzimin 10000U'lık preparatının fiyatı ise 1225 ₺'dir. *Rhizopus sp.* ile üretilen bir başka poligalakturonazın 500U'lık preparatı 1146 ₺, 1000 U'lık preparatı ise 1784 ₺ olarak fiyatlandırılmıştır (Anonim 2020). Bu çalışmada üretilen enzimin hesaplanan maliyetinin piyasadaki ticari muadillerine nispeten oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Endüstriyel bir enzimin maliyet açısından rekabet edebilirliğinin önemli olması üretilen enzimin temel bir maliyet analizini gerekli kılmaktadır. Yapılan bu maliyet analizi ile çalışmada elde edilen toz formundaki yığın enzimin piyasada satılan ticari pektinaz preparatlarına nispeten oldukça düşük bir maliyetle üretilbildiği gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında *A. sojae* ile poligalakturonaz üretimleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında *Aspergillus sojae* 20235 ve *A. sojae* (DH56) suşları ile glukoz substratında flask denemeleri yapılmış olup elde edilen ortalama aktivite değerleri sırasıyla 13.97 ve 23.89 U/ml olarak belirlenmiştir. Böylelikle çalışmanın ilerleyen aşamalarında daha yüksek sonuçlar alabilmek için yaklaşık 1.8 kat daha verimli olan *A. sojae* (DH56)'nın kullanımı tercih edilmiştir.

Farklı materyaller ile oluşturulan besiyeri kompozisyonlarının *A. sojae* (DH56) ile enzim üretimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 11 farklı karbon ve 9 farklı azot kaynağı erlenmayer ölçeğinde denenmiştir. Karbon kaynağı olarak en yüksek aktivite değeri (29.9 U/ml) ve tekrar edilebilirliği en yüksek sonuçlar portakal kabuğu substratında elde edilmiştir. Azot kaynakları içinde ise en iyi sonuç (22.16 U/ml) pepton ile zenginleştirilen besiyerinde tespit edilmiştir. Bunlarla birlikte, diğer zenginleştirme unsurlarının (monosodyum fosfat ve disodyumfosfat) üretime etkisi de incelenmiştir. Zenginleştirme yapılan ve yapılmayan (kontrol) denemeler için enzim aktiviteleri sırasıyla 29.41 ve 19.54 U/ml olarak belirlenmiş olup enzim aktivitesinde artış sağlaması nedeniyle çalışmanın daha sonraki aşamalarında da besiyeri bu iki inorganik bileşik ile zenginleştirilmeye devam edilmiştir.

Biyoreaktörde poligalakturonaz üretimi için ilk önce iki mikroorganizma ile yapılan üretimler karşılaştırılmış ve elde edilen bulgulara göre *A. sojae* (DH56), *A. sojae* 20235'e nispeten yaklaşık %28 daha verimli olmuştur. Ek olarak, biyoreaktörde karıştırma hızının üretime etkisini incelemek için 350, 475 ve 600 dev/dk hızlarda denemeler gerçekleştirilmiş olup elde edilen aktivite değerleri sırasıyla 22.36, 24.78 ve 24.17 U/ml olarak tespit edilmiştir. Karıştırma hızları ile ilgili sonuçlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmamakla birlikte çalışmanın devam eden aşamalarında biyoreaktörde hız olarak 475 dev/dk kullanılmıştır. Azot kaynağı seçimi için flask denemelerinde en iyi ilk üç sonucu veren amonyum nitrat, amonyum sülfat ve pepton kullanılarak biyoreaktörde üretimler gerçekleştirilmiş ve ulaşılan enzim aktivite değerleri sırasıyla 27.60, 24.68 ve 44.16 U/ml olarak belirlenmiştir. Biyoreaktörde düşük maliyetli substrat olarak KBE, PK ve ikisinin karışımlarından oluşan besiyeri kompozisyonları denemiştir. Bu denemeler ve elde edilen enzim aktiviteleri şu şekilde olmuştur: (i) KBE (2.5°Bx): 19.54 U/ml, (ii) KBE (4.0°Bx): 16.22 U/ml, (iii) KBE (2.5°Bx)+PK (20 g/L): 41.09 U/ml ve (iv) PK (20 g/L): 43.68 U/ml.

Aşırı fungal gelişiminin kontrolü için yeni bir yaklaşım olan mikropartikül tekniği kullanılmış olup Al_2O_3 ve talc'ın kullanıldığı denemelerde tekrar edilebilirliği yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte enzim aktivitesindeki değişimi incelemek amacıyla başlangıç pH değeri 2, 3 ve 4 olan fermentasyon ortamları kullanılmış ve enzim aktivitesi sonuçları sırasıyla 70.4, 47.8 ve 41.4 U/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde substrat miktarı (20-60 g/L) ile hava akış hızı (0.1-1.1 vvm) Merkezi Kompozit Tasarımı kullanılarak optimize edilmiş ve optimum koşullar; 54.14 g/L portakal kabuğu ve 0.25 vvm şeklinde tespit edilmiştir. MKT optimizasyonu için koşulları sistem tarafından verilen doğrulama denemesinde enzim aktivitesi 91.25 U/ml'ye ulaşmıştır. Belirlenen optimum koşullar kullanılarak küçük ölçekli biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimin deneysel sonuçları 10 farklı matematiksel model

ile elde edilen tahminler ile karşılaştırılmış ve deneysel sonuçlar ile en uyumlu modellerin Modifiye Gompertz, Modifiye Richards, Modifiye Lojistik ve Huang modelleri olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde enzim üretimleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar yine 10 farklı matematiksel model kullanılarak hesaplanan aktivite taminleri ile karşılaştırılmış olup deneysel verilere en yakın aktivite tahminlerini Modifiye Richards ve Modifiye Lojistik modelleri vermiştir.

Enzimin kısmi saflaştırması için fermentasyon sonrası elde edilen fermente sıvı örnekleri 10 ve 100 kDa'luk ayırma sınırlarının kullanıldığı ultrafiltrasyon sitemlerinden geçirilmiştir. Ham solüsyonda ve ultrafiltrasyon sonrasında elde edilen permeat ve retentat örneklerinde protein miktar tayini yapılmış ve böylece spesifik aktivite değerleri belirlenmiştir. Ayırma sınırının 10 ve 100 kDa olduğu işlemler için hesaplanan saflaştırma katsayıları sırasıyla 1.52 ve 2.45 olmuştur. Enzimin toz formda ticari bir preparat olarak üretilebilme potansiyelini belirlemek amacıyla ultrafiltrasyondan elde edilen permeat ve retentat örnekleri dondurarak kurutma işlemine tabi tutulmuş ve işlem sonrası enzim aktivitesindeki artış katsayıları sırasıyla 2.84 ve 1.39 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte, fermentasyon öncesi, fermentasyon süreci ve fermentasyon sonrası aşamalarda kullanılmış olan hammaddeler, kimyasallar ve sarf malzemelerin güncel birim fiyatları esas alınarak temel bir maliyet analizi hazırlanmıştır. Söz konusu analiz ile bu çalışma kapsamında üretilen enzimin endüstriye aktarılması durumunda piyasa fiyatlarının oldukça altında bir maliyetle üretilebileceği ortaya konmuştur.

Üretilen enzim için optimum çalışma koşulları pH 4.8, inkübasyon sıcaklığı 60°C ve inkübasyon süresi 20 dk olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, enzimin pektin, KMS ve PGA'ya olan ilgisi incelenmiş ve K_m değerleri sırasıyla 21.2, 10.8 ve 4.1 mg/ml şeklinde hesaplanmıştır. Bununla birlikte, enzimin pektin, KMS ve PGA substratlarında V_{max} değerleri sırasıyla 101.7, 33.7 ve 40.2 $\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Enzimin termal stabilitesini incelemek için farklı sıcaklık ve sürelerde inkübasyonlar gerçekleştirilmiş olup enzimin 30°C-60°C sıcaklık aralığında ve 30 dk süre koşullarında stabil olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, enzimatik reaksiyonun termal inaktivasyon ve termodinamik parametreleri de tespit edilmiştir. Buna göre E_a , E_{ia} ve Z değerleri sırasıyla 11.67 kJ/mol.K, 101.37 kJ/mol.K ve 15.20°C olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık 70°C'den 80°C'ye artırıldığında, enzimin inaktivasyon hız sabiti ve serbest enerjisi artarken, entropisi, yarılanma ömrü, D-değeri ve entalpisi azalmıştır. Bunun yanı sıra, enzimin moleküler ağırlığının 40-50 kDa arasında olduğu belirlenmiştir. Üretilen enzimin aktivitesi Ag^+ , K^+ ve Na^+ iyonları ile etkileşime geçtiğinde stabil kalırken EDTA ajanı, Ba^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve Sr^{2+} iyonlarının inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, fermentör ortamında mikrobiyal poligalakturonaz enzimi üretiminin mikropartikül uygulaması ile koşulları iyileştirilerek tüm denemelerde tekrar edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca üretimlerin matematiksel modellerle uyumlulukları ortaya konmuş, poligalakturonaz başarılı bir şekilde karakterize edilmiş, kısmi olarak saflaştırılmış ve liyofilize edilerek toz formda elde edilmiştir. Ayrıca yapılan temel bir maliyet analizi hazırlanarak poligalakturonazın düşük maliyetli alternatifler ile üretim potansiyeli ortaya konmuştur. Elde edilen bulguların gelecek yıllarda yapılacak daha kapsamlı araştırmalar için temel oluşturacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ahlawat, S., Mandhan, R., Dhiman, S.S., Kumar, R. ve Sharma, J. 2008. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149 (3): 287-293.
- Ahmed, I., Zia, M.A., Hussain, M.A., Akram, Z., Naveed, M.T. ve Nowrouzi, A. 2016. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9 (2): 148-154.
- Allen, C.E. 1901. On the origin and nature of the middle lamella. *Botanical Gazette*, 32 (1): 1-34.
- Amanullah, A., Christensen, L., Hansen, K., Nienow, A. ve Thomas, C. 2002. Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 77 (7): 815-826.
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bhatti, I.A. ve Asgher, M. 2013. Utilization of wheat bran for enhanced production of exopolysaccharide by *Penicillium notatum* using response surface methodology. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 50 (3): 469-477.
- Amin, F., Bhatti, H.N. ve Bilal, M. 2019. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122 1017-1026.
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M. ve Asgher, M. 2017. Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exo-polygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification. *International Journal of Food Engineering*, 13 (2).
- Anand, G., Yadav, S. ve Yadav, D. 2017. Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589. *Biocatalysis and Agricultural biotechnology*, 10 264-269.
- Anisa, S. ve Girish, K. 2014. Pectinolytic activity of *Rhizopus* sp. and *Trichoderma viride*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 4 (2): 28-31.
- Anonim 2020. www.sigmaaldrich.com. (Son erişim tarihi: 07.01.2020)
- Antecka, A., Bizukojc, M. ve Ledakowicz, S. 2016. Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32 (12): 193.
- Arunachalam, C. ve Asha, S. 2010. Pectinolytic enzyme-A review of new studies. *Biotechnology Advances*, 561 1-5.

- Atmodjo, M.A., Hao, Z. ve Mohnen, D. 2013. Evolving views of pectin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64 747-779.
- Baffi, M.A., Romo-Sánchez, S., Úbeda-Iranzo, J. ve Briones-Pérez, A.I. 2012. Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. *New Biotechnology*, 29 (3): 451-456.
- Bahry, H., Abdallah, R., Chezeau, B., Pons, A., Taha, S. ve Vial, C. 2019. Biohydrogen production from carob waste of the Lebanese industry by dark fermentation. *Biofuels*, 1-11.
- Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 15 (2): 147-157.
- Baranyi, J. ve Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4): 277-294.
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M. ve Hoondal, G. 2000. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2): 211-213.
- Berenjian, A. 2019. Essentials in Fermentation Technology. Springer.313 s.
- Biz, A., Farias, F.C., Motter, F.A., De Paula, D.H., Richard, P., Krieger, N. ve Mitchell, D.A. 2014. Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works. *PloS One*, 9 (10): e109529.
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D. ve Webb, C. 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (2): 164-169.
- Bonner, J. 1936. The chemistry and physiology of the pectins. *The Botanical Review*, 2 (10): 475-497.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.
- Buyukkileci, A., Tari, C., Fernandez-Lahore, H., Demir, H.G. ve Gogus, N. 2010. Optimization of exo-polygalacturonase production from orange peel by *Aspergillus sojae*. *Journal of Biotechnology*, (150): 414-415.
- Buyukkileci, A.O., Lahore, M.F. ve Tari, C. 2015. Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (4): 749-760.

- Buyukkileci, A.O., Tari, C. ve Fernandez-Lahore, M. 2011. Enhanced production of exo-polygalacturonase from agro-based products by *Aspergillus sojae*. *BioResources*, 6 (3): 3452-3468.
- Caffall, K.H. ve Mohnen, D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344 (14): 1879-1900.
- Carvalho, M., Roca, C. ve Reis, M.A. 2016. Improving succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods. *Bioresource Technology*, 218 491-497.
- Cayré, M.a.E., Vignolo, G. ve Garro, O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiology*, 20 (5): 561-566.
- Cemeroğlu, B. 2015. Reaksiyon Kinetiği. Bizim Grup Basımevi, Ankara, Türkiye. 256 s.
- Chai, T. ve Draxler, R.R. 2014. Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)?—Arguments against avoiding RMSE in the literature. *Geoscientific Model Development*, 7 (3): 1247-1250.
- Chan, S.Y., Choo, W.S., Young, D.J. ve Loh, X.J. 2017. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 161 118-139.
- Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., Luo, Z. ve Huang, R. 2016. A novel acid-stable endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: Purification, characterization, and application in the beverage industry. *J Microbiol Biotechnol*, 26 (6): 989-998.
- Coban, H.B. ve Demirci, A. 2016. Enhancement and modeling of microparticle-added *Rhizopus oryzae* lactic acid production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (2): 323-330.
- Coban, H.B., Demirci, A. ve Turhan, I. 2015a. Microparticle-enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production and evaluation of fungal morphology in submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (6): 1075-1080.
- Coban, H.B., Demirci, A. ve Turhan, I. 2015b. Enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production in fed-batch and continuous fermentations in the presence of talcum microparticles. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (8): 1431-1436.
- Collares, R.M., Miklasevicius, L.V., Bassaco, M.M., Salau, N.P., Mazutti, M.A., Bisognin, D.A. ve Terra, L.M. 2012. Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13 (7): 579-586.

- Coskun, A. 2010. Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.115 s.
- Dantigny, P., Nanguy, S.P.-M., Judet-Correia, D. ve Bensoussan, M. 2011. A new model for germination of fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2): 176-181.
- De Carvalho Silva, J., De França, P.R.L., Converti, A. ve Porto, T.S. 2018. Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginate-immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, 74 61-70.
- De Vries, R.P. ve Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 (4): 497-522.
- Demir, H., Göğüş, N., Tari, C., Heerd, D. ve Lahore, M.F. 2012. Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain. *Turkish Journal of Biology*, 36 (4): 394-404.
- Demir, H. ve Tari, C. 2016. Effect of physicochemical parameters on the polygalacturonase of an *Aspergillus sojae* mutant using wheat bran, an agro-industrial waste, via solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96 (10): 3575-3582.
- Demir, H. ve Tari, C. 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*, 54 302-309.
- Dhiman, S.S., Garg, G., Mahajan, R., Garg, N. ve Sharma, J. 2009. ‘Single lay out’ and ‘mixed lay out’ enzymatic processes for bio-bleaching of kraft pulp. *Bioresource Technology*, 100 (20): 4736-4741.
- Dogan, N. ve Tari, C. 2008. Characterization of three-phase partitioned exo-polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. *Biochemical Engineering Journal*, 39 (1): 43-50.
- Dolník, V. 1997. Capillary zone electrophoresis of proteins. *Electrophoresis*, 18 (12-13): 2353-2361.
- Dong, M., Wang, S., Xu, F., Li, Q. ve Li, W. 2018. Addition of aluminum oxide microparticles to *Trichoderma viride* my preculture enhances cellulase production and influences fungal morphology. *Engineering in Life Sciences*, 18 (6): 353-358.
- Doughari, J.O., Gc 2019. Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus flavus* grown on orange peel. *Applied Microbiology: Open Access*, 4 (3).

- Driouch, H., Hänsch, R., Wucherpennig, T., Krull, R. ve Wittmann, C. 2012. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 109 (2): 462-471.
- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P. ve Wittmann, C. 2010a. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (6): 2011-2024.
- Driouch, H., Sommer, B. ve Wittmann, C. 2010b. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (6): 1058-1068.
- Dubey, K.K., Pramanik, A. ve Yadav, J. 2019. Enzyme Engineering. *Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, 325-347 s.
- Duruksu, G., Ozturk, B., Biely, P., Bakir, U. ve Ogel, Z.B. 2009. Cloning, expression and characterization of endo- β -1, 4-mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 25 (1): 271-276.
- Eren, Ö. 2016. Isı pompası destekli bir dondurarak kurutma sistem tasarımı ve deneysel analizi/The designing and experimental analysis of a freeze drying system assisted with heat pump. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, Türkiye. 72 s.
- Ersöz, F. 2016. Rekombinant kimoziin üretiminde glikozilasyonun etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye. 80 s.
- Etschmann, M., Huth, I., Walisko, R., Schuster, J., Krull, R., Holtmann, D., Wittmann, C. ve Schrader, J. 2015. Improving 2-phenylethanol and 6-pentyl- α -pyrone production with fungi by microparticle-enhanced cultivation (MPEC). *Yeast*, 32 (1): 145-157.
- Fitzhugh Jr, H. 1976. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. *Journal of Animal Science*, 42 (4): 1036-1051.
- Fontana, R.C. ve Da Silveira, M.M. 2012. Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal-and external-loop airlift reactors. *Bioresource Technology*, 123 157-163.
- Fratebianchi, D., Acosta, M.A. ve Cavalitto, S.F. 2018. Harnessing soybean hulls for improved polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* through fine-tuning of ambient pH. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93 (3): 667-674.
- Fratebianchi, D., Crespo, J.M., Tari, C. ve Cavalitto, S. 2017. Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged

- fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92 (2): 305-310.
- Frey-Wyssling, A. 1948. Submicroscopic morphology of protoplasm. Elsevier Publishing s.
- Galiotou-Panayotou, M., Rodis, P. ve Kapantai, M. 1993. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Letters in Applied Microbiology*, 17 (4): 145-148.
- Gao, D., Zeng, J., Yu, X., Dong, T. ve Chen, S. 2014. Improved lipid accumulation by morphology engineering of oleaginous fungus *Mortierella isabellina*. *Biotechnology and Bioengineering*, 111 (9): 1758-1766.
- Garfin, D.E. 2009. One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. Elsevier, 497-513 s.
- Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J. ve Mahajan, R. 2016. Microbial pectinases: An ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6 (1): 47.
- Germec, M. 2019. İnülinaz enziminin üretimi, kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve fermentasyonlarının matematiksel modellenmesi üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya. 275 s.
- Germec, M., Cheng, K.-C., Karhan, M., Demirci, A. ve Turhan, I. 2019. Application of mathematical models to ethanol fermentation in biofilm reactor with carob extract. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-16.
- Germec, M., Yatmaz, E., Karahalil, E. ve Turhan, I. 2017. Effect of different fermentation strategies on β -mannanase production in fed-batch bioreactor system. *3 Biotech*, 7 (1): 77.
- Golunski, S., Astolfi, V., Carniel, N., De Oliveira, D., Di Luccio, M., Mazutti, M.A. ve Treichel, H. 2011. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*, 78 (3): 261-265.
- Gonciarz, J. ve Bizukojc, M. 2014. Adding talc microparticles to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 preculture decreases fungal pellet size and improves lovastatin production. *Engineering in Life Sciences*, 14 (2): 190-200.
- Gonciarz, J., Kowalska, A. ve Bizukojc, M. 2016. Application of microparticle-enhanced cultivation to increase the access of oxygen to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mycelium and intensify lovastatin biosynthesis in batch and continuous fed-batch stirred tank bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 109 178-188.
- Göğüş, N., Tari, C., Oncü, S., Unluturk, S. ve Tokatli, F. 2006. Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae*

- ATCC 20235 in submerged cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 32 (3): 171-178.
- Göğüş, N., Taze, B.H., Demir, H., Tari, C., Ünlütürk, S. ve Lahore, M.F. 2014. Evaluation of orange peel, an industrial waste, for the production of *Aspergillus sojae* polygalacturonase considering both morphology and rheology effects. *Turkish Journal of Biology*, 38 (4): 537-548.
- Grimm, L., Kelly, S., Krull, R. ve Hempel, D. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69 (4): 375.
- Gurucharanam, K. ve Deshpande, K. 1986. Polysaccharases of *Curvularia lunata*—use in degumming of ramie fibres. *Indian Phytopathology*, 39 (3): 385-389.
- Gürses, Ö.L. 1986. Gıda İşleme Mühendisliği-II. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara. 132 s.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdallah, F. ve Gargouri, A. 2002. Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (5): 662-666.
- Handa, S., Sharma, N. ve Pathania, S. 2016. Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus* sp. C4 under solid state fermentation. *Fermentation*, 2 (2): 1-10.
- Hassan, N., Rafiq, M., Rehman, M., Sajjad, W., Hasan, F. ve Abdullah, S. 2019. Fungi in acidic fire: A potential source of industrially important enzymes. *Fungal Biology Reviews*, 33 (1): 58-71.
- Heerd, D., Diercks-Horn, S. ve Fernández-Lahore, M. 2014. Efficient polygalacturonase production from agricultural and agro-industrial residues by solid-state culture of *Aspergillus sojae* under optimized conditions. *Springer Plus*, 3 (1): 742.
- Heerikhuisen, M., Van Den Hondel, C. ve Punt, P. 2005. *Aspergillus sojae*. Production of recombinant proteins, 191-215 s.
- Hossain, A., Ahmed, S., Alshammari, A.M., Adnan, F.M., Annuar, M., Mustafa, H. ve Hammad, N. 2011. Bioethanol fuel production from rotten banana as an environmental waste management and sustainable energy. *Afr J Microbiol Res*, 5 (6): 586-598.
- Huang, L. 2013. Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. *Food Control*, 32 (1): 283-288.
- Iconomou, D., Arapoglou, D. ve Israilides, C. 2010. Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *Grasas Yaceites*, 61 (3): 303-311.

- Irshad, M., Anwar, Z., Mahmood, Z., Aqil, T., Mehmmod, S. ve Nawaz, H. 2014. Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (1).
- Jacob, N., Poorna, C.A. ve Prema, P. 2008. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, 99 (14): 6697-6701.
- Joshi, M., Nerurkar, M. ve Adivarekar, R. 2015. Characterization, kinetic, and thermodynamic studies of marine pectinase from *Bacillus subtilis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45 (3): 205-220.
- Karahalil, E., Coban, H.B. ve Turhan, I. 2019a. A current approach to the control of filamentous fungal growth in media: microparticle enhanced cultivation technique. *Critical reviews in biotechnology*, 39 (2): 192-201.
- Karahalil, E., Demirel, F., Evcan, E., Germeç, M., Tari, C. ve Turhan, I. 2017. Microparticle-enhanced polygalacturonase production by wild type *Aspergillus sojae*. *3 Biotech*, 7 (6): 361.
- Karahalil, E., Germeç, M. ve Turhan, I. 2019b. β -Mannanase production and kinetic modeling from carob extract by using recombinant *Aspergillus sojae*. *Biotechnology Progress*, 35 (6).
- Karahalil, E.Y., Ercan; Turhan, İrfan, 2018. Magnezyum silikat kullanılarak *Aspergillus sojae*'nin hücre morfolojisinin kontrolü ve poligalakturonaz enziminin üretimi, BAP Raporu, FAY-2016-1547. Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Karapinar, E. ve Sariisik, M.O. 2004. Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 12 (3): 79-82.
- Karkacıer, M. ve Artık, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları. *GIDA*, 20 (3): 131-136.
- Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S. ve Tewari, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, 77 (3): 215-227.
- Katrolia, P., Zhou, P., Zhang, P., Yan, Q., Li, Y., Jiang, Z. ve Xu, H. 2012. High level expression of a novel β -mannanase from *Chaetomium* sp. exhibiting efficient mannan hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 87 (1): 480-490.
- Kaup, B.A., Ehrich, K., Pescheck, M. ve Schrader, J. 2008. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnology and bioengineering*, 99 (3): 491-498.

- Kaur, A., Mahajan, R., Singh, A., Garg, G. ve Sharma, J. 2010. Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. *Bioresource Technology*, 101 (23): 9150-9155.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E.S. ve Azbar, N. 2016. Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (2): 368-388.
- Ketipally, R., Kumar, G.K. ve Ram, M.R. 2019. Polygalacturonase production by *Aspergillus nomius* MR103 in solid state fermentation using agro-industrial wastes. *Journal of Applied and Natural Science*, 11 (2): 305-310.
- Kirk, T.K. ve Jeffries, T.W. 1996. Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. ACS Publications, 2-14 s.
- Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409 (6817): 241.
- Kulkarni, N.G., Kar, J.R. ve Singhal, R.S. 2017. Extraction of flaxseed oil: A comparative study of three-phase partitioning and supercritical carbon dioxide using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 10 (5): 940-948.
- Li, Q., Al Loman, A., Callow, N.V., Islam, S.M. ve Ju, L.-K. 2018. Leveraging pH profiles to direct enzyme production (cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectinase, α -galactosidase, and invertase) by *Aspergillus foetidus*. *Biochemical Engineering Journal*, 137: 247-254.
- Liao, C.-H. 1989. Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (7): 1677-1683.
- Maccabe, A., Orejas, M., Tamayo, E., Villanueva, A. ve Ramón, D. 2002. Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology*, 96 (1): 43-54.
- Maisuria, V., Patel, V. ve Nerurkar, A. 2010. Biochemical and thermal stabilization parameters of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* BR1. *J Microbiol Biotechnol*, 20 (7): 1077-1085.
- Maldonado, M. ve De Saad, A.S. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20 (1): 34-38.
- Martín, M., Fernández, R., Gutiérrez, M. ve Siles, J. 2018. Thermophilic anaerobic digestion of pre-treated orange peel: Modelling of methane production. *Process Safety and Environmental Protection*, 117 245-253.
- Mavituna, F. ve Sinclair, C.G. 2008. Modelling the kinetics of biological activity in fermentation systems. *Practical Fermentation Technology*, 167-230 s.

- Mccomb, E.A. ve Mccready, R. 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Analytical Chemistry*, 29 (5): 819-821.
- Mccready, R. ve Reeve, R. 1955. Plant tissue analysis, test for pectin based on reaction of hydroxamic acids with ferric ion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3 (3): 260-262.
- Mehanni, A.E.S., El-Reffaei, W.H.M., Melo, A., Casal, S. ve Ferreira, I.M. 2017. Enzymatic extraction of oil from *Balanites Aegyptiaca* (desert date) kernel and comparison with solvent extracted oil. *Journal of Food Biochemistry*, 41 (2): e12270.
- Mercimek Takcı, H.A. ve Turkmen, F.U. 2016. Extracellular pectinase production and purification from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *International Journal of Food Properties*, 19 (11): 2443-2450.
- Mitchell, D. ve Von Meien, O. 2000. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (2): 127-135.
- Mohandas, A., Raveendran, S., Parameswaran, B., Abraham, A., Athira, R.S., Mathew, A.K. ve Pandey, A. 2018. Production of Pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (1): 110.
- Morgan, P.H., Mercer, L.P. ve Flodin, N.W. 1975. General model for nutritional responses of higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72 (11): 4327-4331.
- Mrudula, S. ve Anitharaj, R. 2011. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6 (2): 64-71.
- Muharram, M.M. ve Abdel-Kader, M.S. 2017. Utilization of gel electrophoreses for the quantitative estimation of digestive enzyme papain. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25 (3): 359-364.
- Murthy, P.S. ve Naidu, M.M. 2011. Improvement of robusta coffee fermentation with microbial enzymes. *European Journal of Applied Sciences*, 3 (4): 130-139.
- Naidu, G. ve Panda, T. 1998. Production of pectolytic enzymes—a review. *Bioprocess Engineering*, 19 (5): 355-361.
- Nakkeeran, E., Gowthaman, M.K., Umesh-Kumar, S. ve Subramanian, R. 2012. Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113 (5): 634-640.

- Nighojkar, A., Patidar, M.K. ve Nighojkar, S. 2019. Pectinases: Production and applications for fruit juice beverages. *Processing and Sustainability of Beverages*. Elsevier, 235-273 s.
- Niu, K., Hu, Y., Mao, J., Zou, S. ve Zheng, Y. 2015. Effect of microparticles on echinocandin B production by *Aspergillus nidulans*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 31 (7): 1082-1088.
- Oncu, S., Tari, C. ve Unluturk, S. 2007. Effect of various process parameters on morphology, rheology, and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in a batch bioreactor. *Biotechnology Progress*, 23 (4): 836-845.
- Ortiz, G.E., Ponce-Mora, M.C., Nosedá, D.G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M.C., Gil, G.P., Blasco, M. ve Albertó, E.O. 2017. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: Optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44 (2): 197-211.
- Oumer, O.J. ve Abate, D. 2017. Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. *Enzyme Research*, Vol. 2017, 7 s.
- Oumer, O.J. ve Abate, D. 2018. Comparative studies of pectinase production by *Bacillus subtilis* strain Btk 27 in submerged and solid-state fermentations. *BioMed Research International*, 2018.
- Pal, A. ve Khanum, F. 2010. Characterizing and improving the thermostability of purified xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 grown on solid-state-medium. *Journal of Biochemical Technology*, 2 (4): 203-209.
- Panda, T., Naidu, G. ve Sinha, J. 1999. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: A statistical view. *Process Biochemistry*, 35 (1-2): 187-195.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22 (3): 189-259.
- Pasha, K.M., Anuradha, P. ve Subbarao, D. 2013. Applications of pectinases in industrial sector. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 16 (1): 89-95.
- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E. ve Carmona, E.C. 2009. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*, 3 (3): 9-18.
- Poletto, P., Da Rocha Renosto, D., Baldasso, C., Zeni, M. ve Da Silveira, M.M. 2015. Activated charcoal and microfiltration as pretreatment before ultrafiltration of

- pectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Separation and Purification Technology*, 151: 102-107.
- Posch, A.E., Herwig, C. ve Spadiut, O. 2013. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 31 (1): 37-44.
- Praveen, K. ve Suneetha, V. 2014. A cocktail enzyme-pectinase from fruit industrial dump sites: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5 (2): 1252-1258.
- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E.M., Sindhu, R., Binod, P. ve Pandey, A. 2017. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: An overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16 (3): 381-394.
- Rehman, H.U., Qader, S.a.U. ve Aman, A. 2012. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydrate Polymers*, 90 (1): 387-391.
- Ren, X.-D., Xu, Y.-J., Zeng, X., Chen, X.-S., Tang, L. ve Mao, Z.-G. 2015. Microparticle-enhanced production of ϵ -poly-l-lysine in fed-batch fermentation. *Rsc Advances*, 5 (100): 82138-82143.
- Renge, V., Khedkar, S. ve Nandurkar, N.R. 2012. Enzyme synthesis by fermentation method: A review. *Sci Rev Chem Comm*, 2 (4): 585-590.
- Rhodes, D.G., Bossio, R.E. ve Laue, T.M. 2009. Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. *Methods in Enzymology*. Elsevier, 691-723 s.
- Ricci, A., Diaz, A.B., Caro, I., Bernini, V., Galaverna, G., Lazzi, C. ve Blandino, A. 2019. Orange peels: From by-product to resource through lactic acid fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (15): 6761-6767.
- Riou, C., Freyssinet, G. ve Fevre, M. 1992. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (2): 578-583.
- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A. ve Domínguez, J.M. 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (7): 2380-2387.
- Robinson, T., Singh, D. ve Nigam, P. 2001. Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55 (3): 284-289.
- Rodríguez-Fernández, D., Rodríguez-León, J., De Carvalho, J., Sturm, W. ve Soccol, C. 2011. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 102 (22): 10657-10662.

- Rodríguez-Fernández, D.E., Parada, J.L., Medeiros, A.B., De Carvalho, J.C., Lacerda, L.G., Rodríguez-León, J.A. ve Soccol, C.R. 2013. Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 48 (2): 374-379.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 81 (5): 501-508.
- Roy, K., Dey, S., Uddin, M., Barua, R. ve Hossain, M. 2018. Extracellular pectinase from a novel bacterium *Chryseobacterium indologenes* strain SD and its application in fruit juice clarification. *Enzyme Research*, Vol. 2018, 7 s.
- Ryden, P. ve Selvendran, R.R. 1990. Structural features of cell-wall polysaccharides of potato (*Solanum tuberosum*). *Carbohydrate Research*, 195 (2): 257-272.
- Sadıkoğlu, H. ve Özdemir, M. 2003. Dondurarak kurutma teknolojisi ve evreleri. *GIDA*, 28 (6): 643-649.
- Saldamlı, İ. 2007. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara. 587 s.
- Sánchez, S.R., Sánchez, I.G., Arévalo-Villena, M. ve Pérez, A.B. 2015. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (3): 587-593.
- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M.T., Fontana, R.C. ve Da Silveira, M.M. 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT-Food Science and Technology*, 51 (2): 469-475.
- Scott, D. 1978. Industrial Enzymes. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 173-224.
- Sethi, B.K., Nanda, P.K. ve Sahoo, S. 2016. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. *3 Biotech*, 6 (1): 6-36.
- Sharma, A., Shrivastava, A., Sharma, S., Gupta, R. ve Kuhad, R.C. 2013. Microbial pectinases and their applications. In: *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Springer, 107-124 s.
- Sharma, D.C. ve Satyanarayana, T. 2012. Biotechnological potential of agro residues for economical production of thermoalkali-stable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 by solid-state fermentation and its efficacy in the treatment of ramie fibres. *Enzyme Research*, Vol. 2012, 7 s.
- Siddiqui, M.A., Veena, P. ve Arif, M. 2013. Polygalacturonase production from *Rhizomucor pusillus* isolated from fruit markets of Uttar Pradesh. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (3): 252-259.

- Singh, A., Yadav, R.D., Kaur, A. ve Mahajan, R. 2012. An ecofriendly cost effective enzymatic methodology for deinking of school waste paper. *Bioresource Technology*, 120 322-327.
- Singh, P. ve Kumar, S. 2019. Microbial Enzyme in Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier, 19-28 s.
- Sosa, N., Salvatori, D.M. ve Schebor, C. 2012. Physico-chemical and mechanical properties of apple disks subjected to osmotic dehydration and different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (5): 1790-1802.
- Srirangsan, P., Kawai, K., Hamada-Sato, N., Watanabe, M. ve Suzuki, T. 2011. Stabilizing effects of sucrose-polymer formulations on the activities of freeze-dried enzyme mixtures of alkaline phosphatase, nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase. *Food Chemistry*, 125 (4): 1188-1193.
- Stanbury, P., Whitaker, A. ve Hall, S. 2003. Principles of fermentation technology. Oxford: Butterworth-Heinemann. 351 s.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. ve Hall, S.J. 2013. Principles of fermentation technology. Elsevier s.
- Stannard, C., Williams, A. ve Gibbs, P. 1985. Temperature/growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 2 (2): 115-122.
- Tagem, 2018. Tarım Ürünleri Piyasaları (Portakal Raporu). Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Tao, T.-L., Cui, F.-J., Chen, X.-X., Sun, W.-J., Huang, D.-M., Zhang, J., Yang, Y., Wu, D. ve Liu, W.-M. 2018. Improved mycelia and polysaccharide production of *Grifola frondosa* by controlling morphology with microparticle Talc. *Microbial Cell Factories*, 17 (1): 1.
- Taragano, V., Sanchez, V. ve Pilosof, A. 1997. Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 19 (3): 233-236.
- Tari, C., Dogan, N. ve Gogus, N. 2008. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry*, 111 (4): 824-829.
- Teixeira, M.F., Lima Filho, J.L. ve Durán, N. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31 (4): 286-290.
- Thakur, J. ve Gupta, R. 2012. Improvement of tea leaves fermentation through pectinases. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59 (3): 321-334.

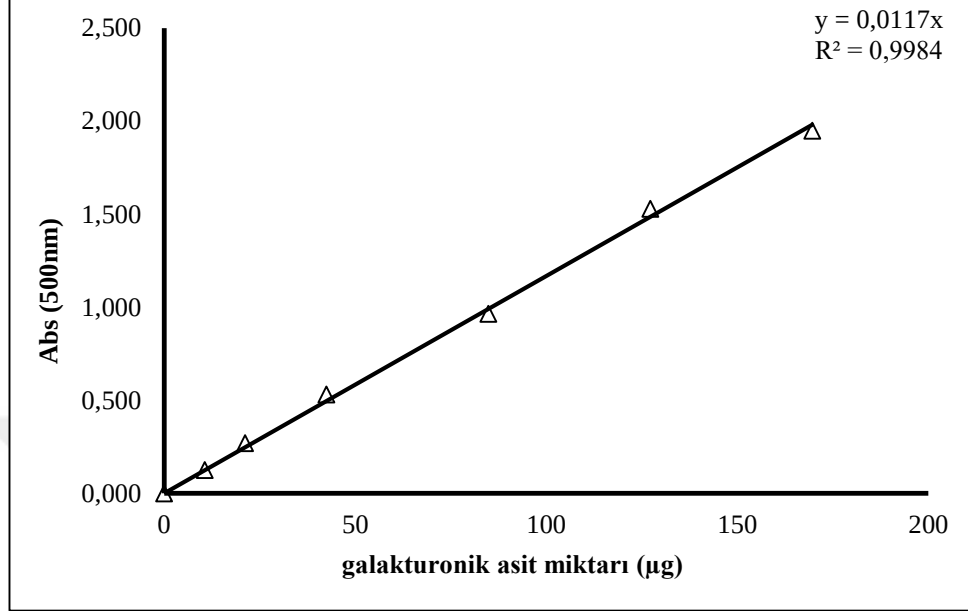
- Tokatli, F., Tari, C., Unluturk, S.M. ve Baysal, N.G. 2009. Modeling of polygalacturonase enzyme activity and biomass production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 (9): 1139-1148.
- Torrado, A.M., Cortés, S., Salgado, J.M., Max, B., Rodríguez, N., Bibbins, B.P., Converti, A. ve Domínguez, J.M. 2011. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (1): 394-409.
- Tounsi, H., Sassi, A.H., Romdhane, Z.B., Lajnef, M., Dupuy, J.-W., Lapailierie, D., Lomenech, A.-M., Bonneau, M., Gargouri, A. ve Hadj-Taieb, N. 2016. Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127 56-66.
- Trindade, L.V., Desagiacomo, C., Polizeli, M.D.L.T.D., Damasio, A.R.D.L., Lima, A.M.F., Gomes, E. ve Bonilla-Rodriguez, G.O. 2016. Biochemical characterization, thermal stability, and partial sequence of a novel exo-polygalacturonase from the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* A13. 36 obtained by submerged cultivation. *BioMed Research International*, Vol. 2016, 10 s.
- Turhan, I., 2015. Yarı-kesikli beslemeli fermentasyon ile farklı immobilizasyon teknikleri kullanılarak mannanaz üretiminin artırılması ve optimizasyonu, üretilen enzimin farklı yöntemlerle saflaştırılması, muhafaza edilmesi ve gıda endüstrisinde kullanılabilirliğinin deneysel olarak belirlenmesi. TUBITAK 1001 Proje Raporu, 112O167, Antalya.
- Turhan, I., Bialka, K.L., Demirci, A. ve Karhan, M. 2010. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 101 (14): 5290-5296.
- Turhan, I., Bialka, K.L., Demirci, A. ve Karhan, M. 2010b. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*, 24 (4): 364-374.
- Türk, T. 2016. Merkezi kompozit tasarımı kullanılarak bakır cürufundan arsenik liçinin incelenmesi. *Yerbilimleri Dergisi*, 37 (3): 193-202.
- Tzanov, T., Calafell, M., Guebitz, G.M. ve Cavaco-Paulo, A. 2001. Bio-preparation of cotton fabrics. *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (6-7): 357-362.
- Ushijima, S., Hayashi, K. ve Murakami, H. 1982. The current taxonomic status of *Aspergillus sojae* used in shoyu fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 (9): 2365-2367.

- Venkatanagaraju, E. ve Divakar, G. 2017. Purification strategies for microbial pectinases. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 11 (2): 144-159.
- Viikari, L., Oksanen, T., Suurnäkki, A., Buchert, J. ve Pere, J. 2000. Cellulases in pulp and paper processing. *Cellulosic Pulps, Fibres and Materials*. Elsevier, 69-80 s.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. ve Higton, G. 2009. Industrial microbiology: An introduction. John Wiley & Sons. 287 s.
- Walisko, J., Vernen, F., Pommerehne, K., Richter, G., Terfehr, J., Kaden, D., Dähne, L., Holtmann, D. ve Krull, R. 2017. Particle-based production of antibiotic rebeccamycin with *Lechevalieria aerocolonigenes*. *Process Biochemistry*, 53 1-9.
- Walisko, R., Moench-Tegeder, J., Blotenberg, J., Wucherpfennig, T. ve Krull, R. 2015. The taming of the shrew-controlling the morphology of filamentous eukaryotic and prokaryotic microorganisms. In: *Filaments in Bioprocesses*. Springer, 1-27 s.
- Wang, Q., Fan, X., Hua, Z., Gao, W. ve Chen, J. 2007. Influence of combined enzymatic treatment on one-bath scouring of cotton knitted fabrics. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25 (1): 9-15.
- Weibull, W. 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics*, 18 (3): 293-297.
- Wong, L.Y., Saad, W.Z., Mohamad, R. ve Tahir, P.M. 2017. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Industrial Crops and Products*, 97 175-183.
- Wucherpfennig, T., Lakowitz, A., Driouch, H., Krull, R. ve Wittmann, C. 2012. Customization of *Aspergillus niger* morphology through addition of talc microparticles. *Journal of Visualized Experiments*, (61): e4023.
- Yang, J., Jiao, R.-H., Yao, L.-Y., Han, W.-B., Lu, Y.-H. ve Tan, R.-X. 2016. Control of fungal morphology for improved production of a novel antimicrobial alkaloid by marine-derived fungus *Curvularia* sp. IFB-Z10 under submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 51 (2): 185-194.
- Yatmaz, E., Karahalil, E., Germec, M., Ilgin, M. ve Turhan, I. 2016. Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced β -mannanase production. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39 (9): 1391-1399.
- Yatmaz, E. ve Turhan, I. 2018. Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and Agricultural biotechnology*, 16 (2018): 200-208.
- Yatmaz, E. ve Turhan, I. 2019. Liquid State Bioreactor. *Essentials in Fermentation Technology*. Springer, 135-168 s.

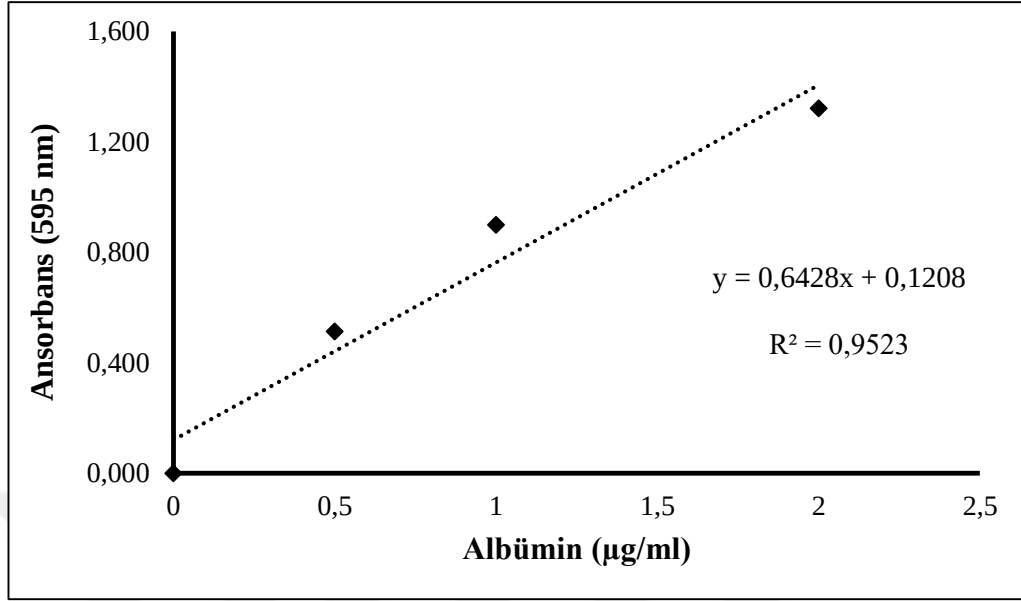
- Yu, P., Zhang, Y. ve Gu, D. 2017. Production optimization of a heat-tolerant alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* ZGL14 and its purification and characterization. *Bioengineered*, 8 (5): 613-623.
- Zeni, J., Pili, J., Cence, K., Toniazzi, G., Treichel, H. ve Valduga, E. 2015. Characterization of novel thermostable polygalacturonases from *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus niger*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (12): 2497-2502.
- Zhang, J., Zhao, L., Gao, B., Wei, W., Wang, H. ve Xie, J. 2018. Protopectinase production by *Paenibacillus polymyxa* Z6 and its application in pectin extraction from apple pomace. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42 (1): e13367.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. ve Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (6): 1875-1881.

7. EKLER

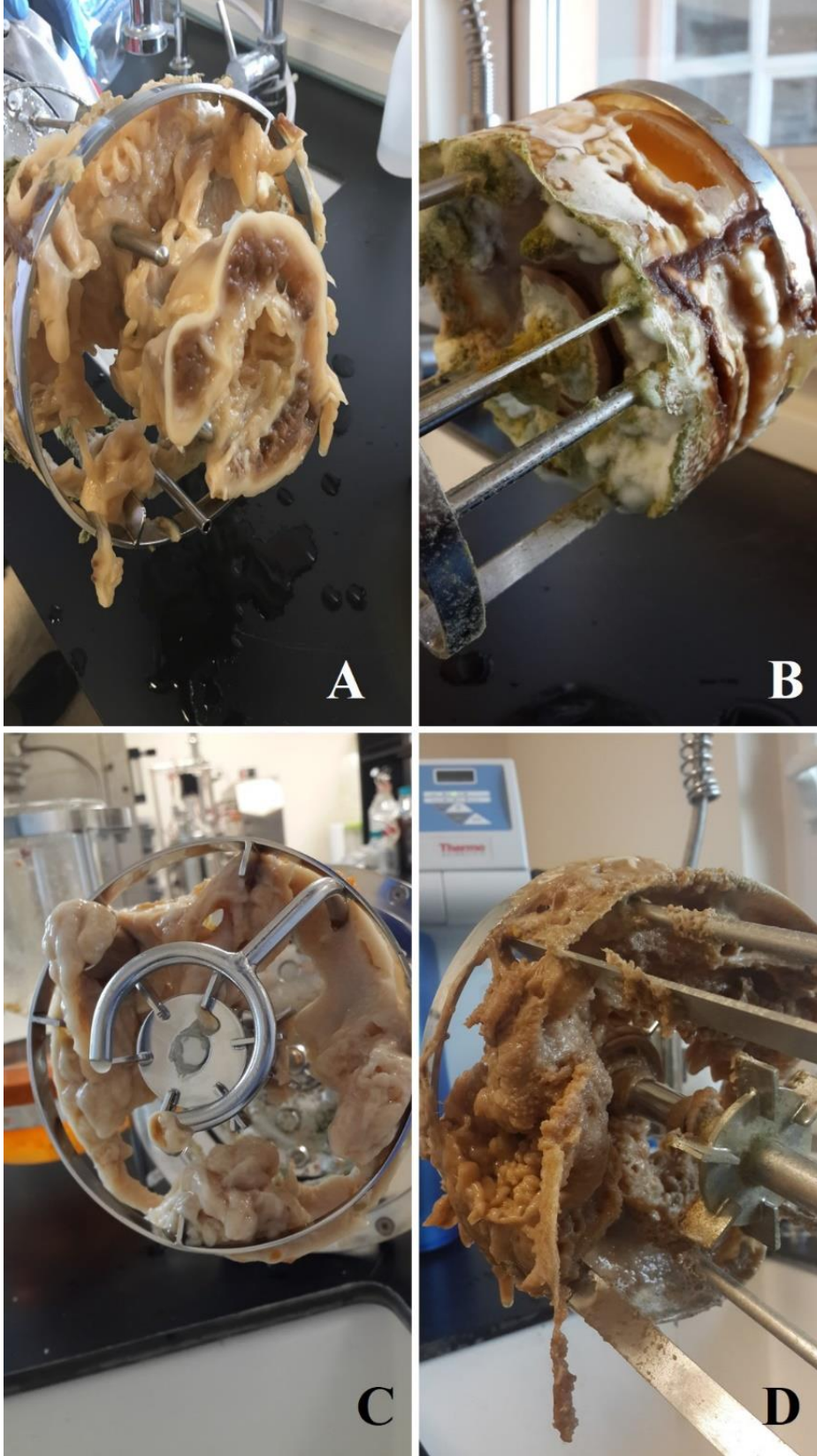
EK-1 Enzim aktivitesi hesaplamaları için kullanılan standart kurve



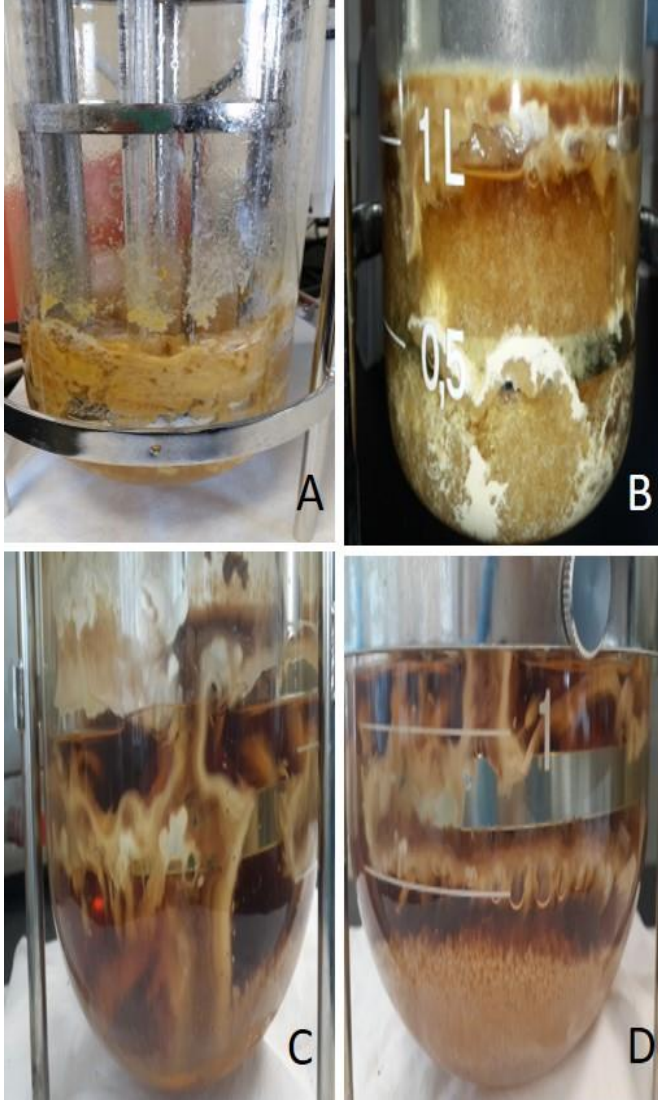
EK-2 Hücre görüntülerinin alındığı stereomikroskop sistemi

EK-3 Protein miktarı hesaplamalarında kullanılan standart kurve

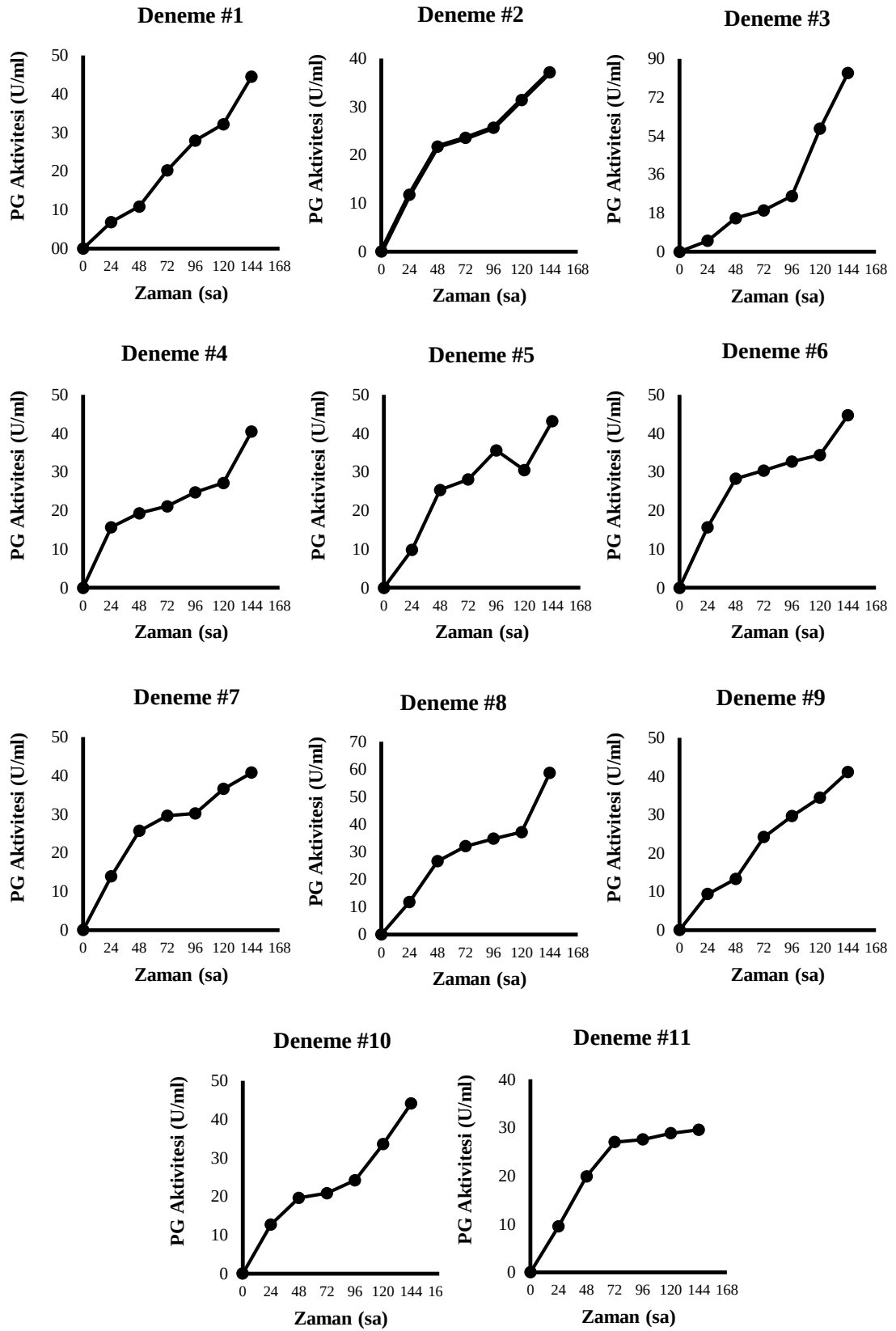
EK-4 KBE ve PK substratında gerçekleştirilen reaktör denemelerine ait görüntüler (**A:** PK (20 g/L), **B:** KBE (4°Bx), **C:** KBE (2.5°Bx), **D:** PK (20 g/L)+ KBE (2.5°Bx))



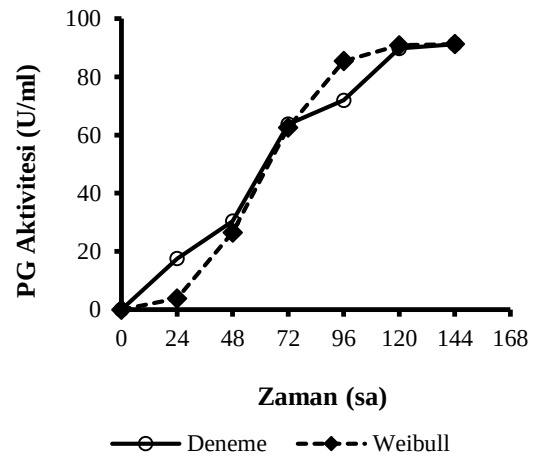
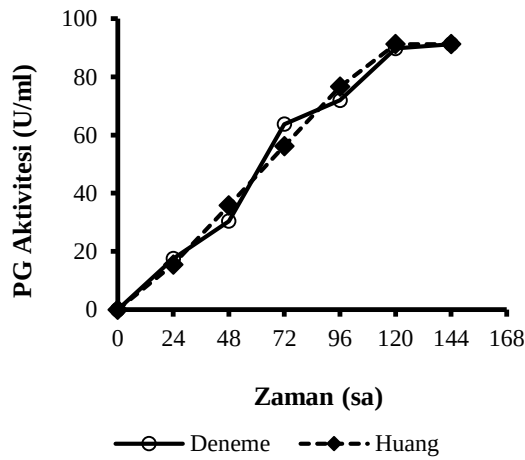
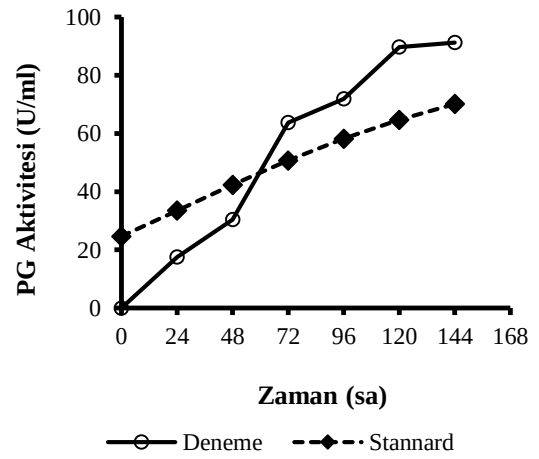
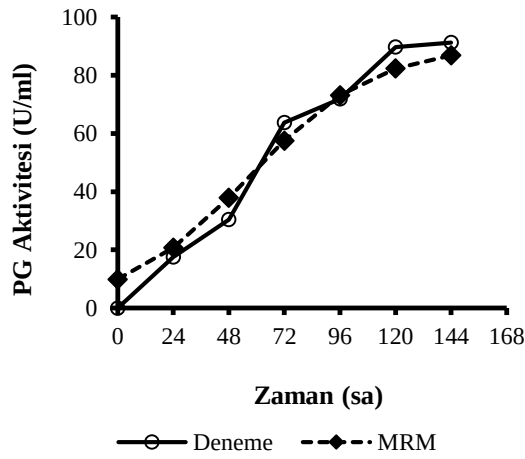
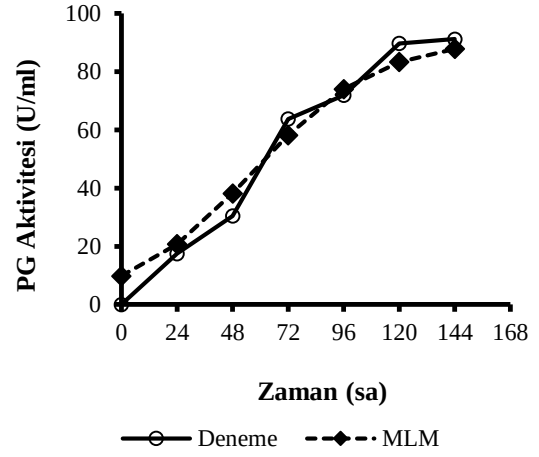
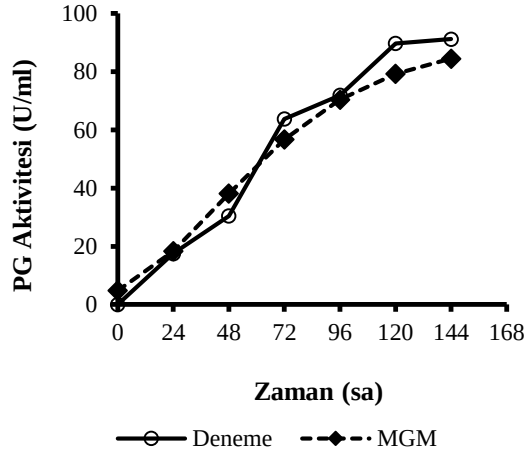
EK-5 Mikropartikül ilaveli ve ilavesiz gerçekleştirilen fermentasyonlara ait reaktör görüntüleri. **A:** PK substratında mikropartikülsüz deneme; **B:** PK substratında Al_2O_3 uygulanan deneme; **C:** KBE substratında mikropartikülsüz deneme; **D:** KBE substratında Al_2O_3 uygulanan deneme



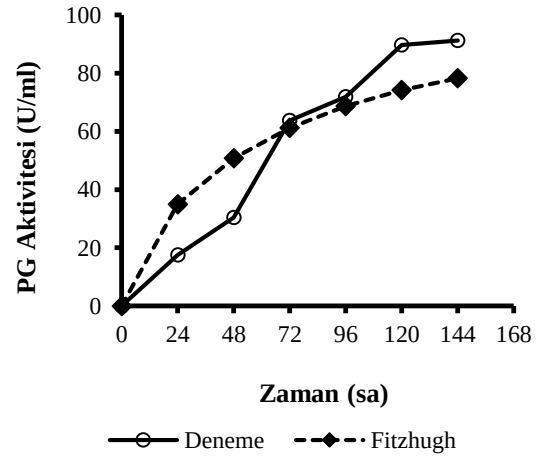
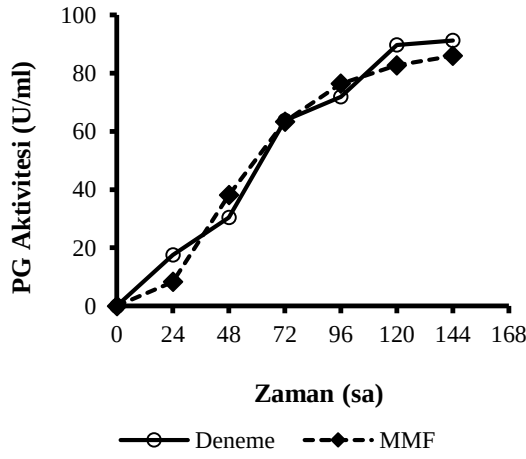
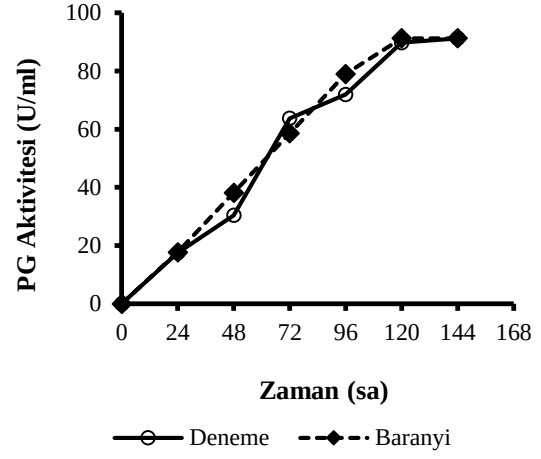
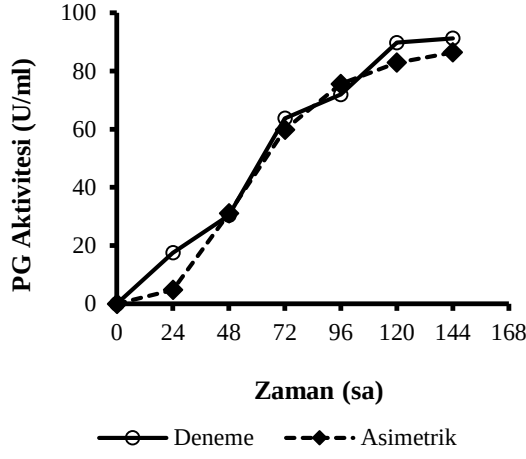
EK-6 MKD ile optimizasyon kapsamında gerçekleştirilen fermentasyonların enzim aktivitesi sonuçları



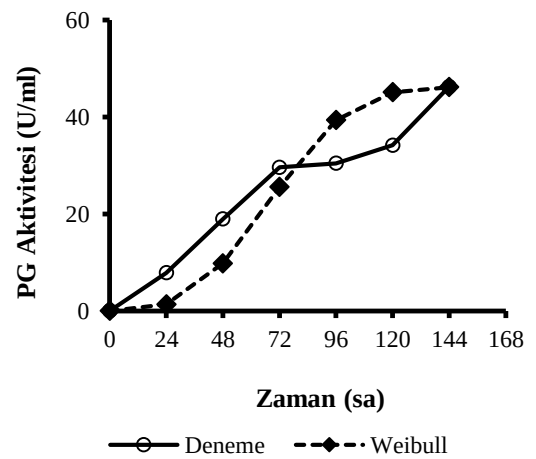
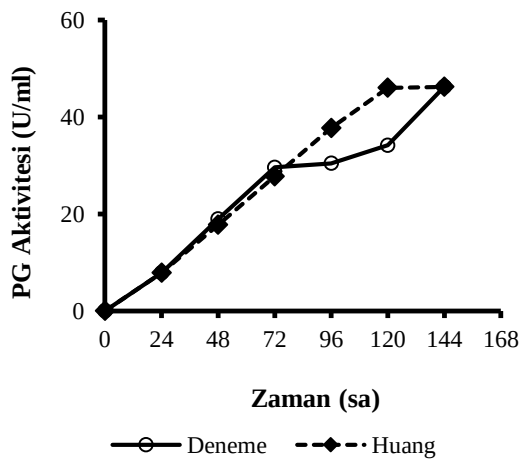
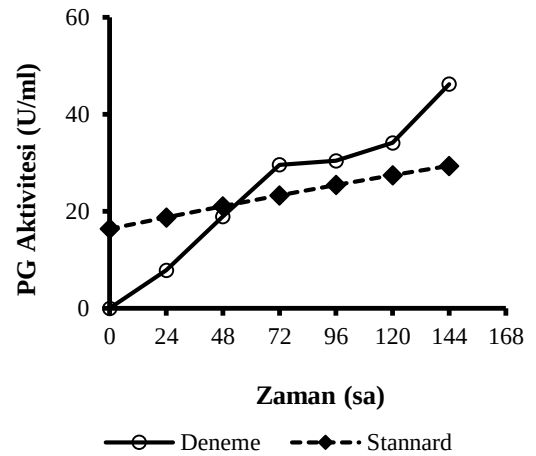
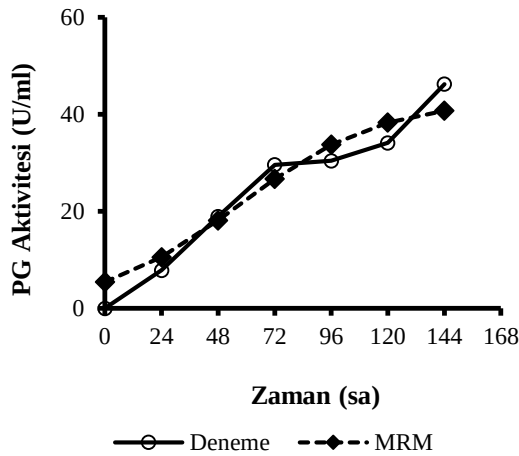
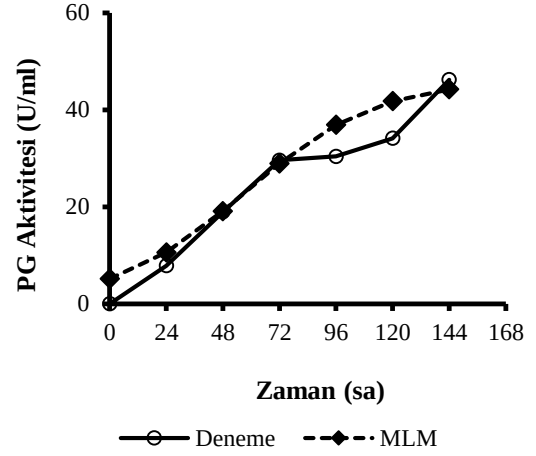
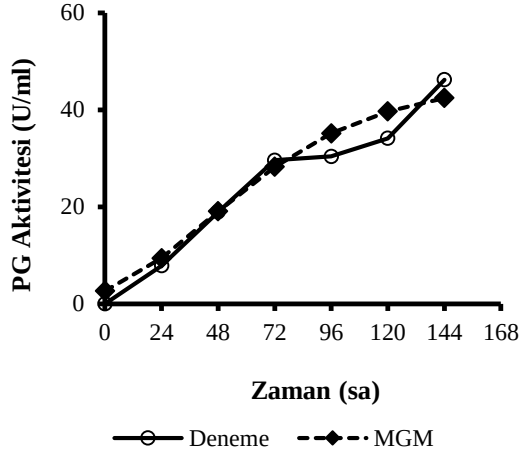
EK-7 Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde enzim üretiminin matematiksel modellemesinde deneysel sonuçların model tahminleri ile karşılaştırıldığı grafikler



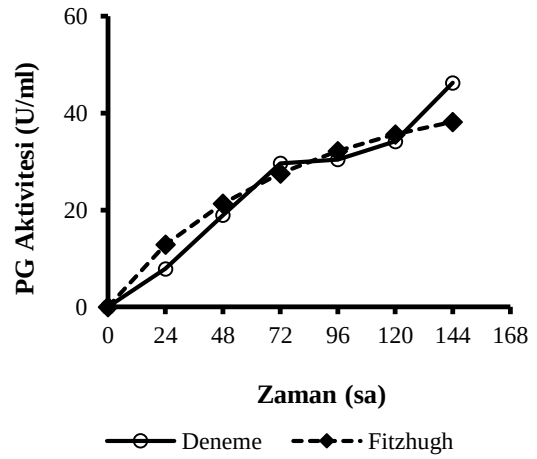
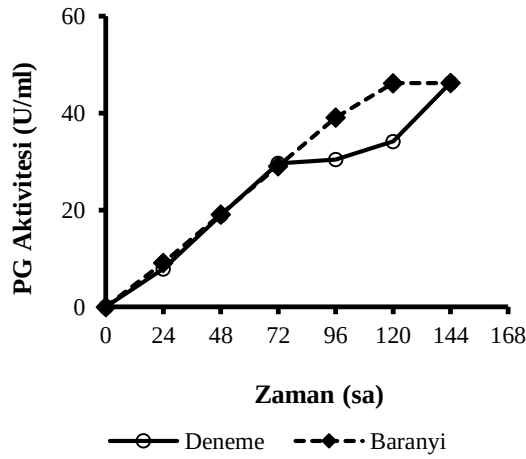
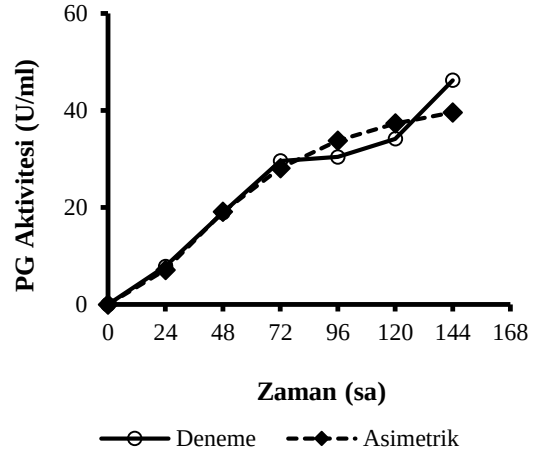
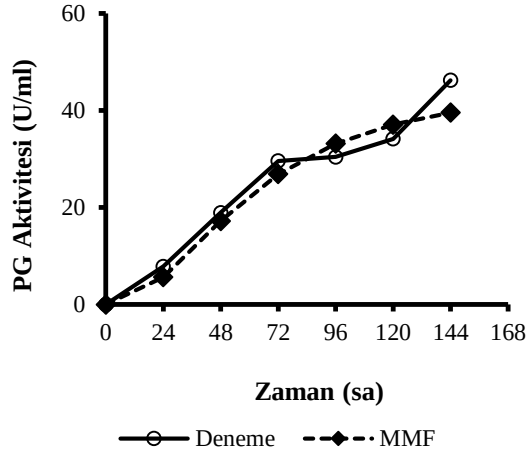
EK-7 Küçük ölçekli (5-L) biyoreaktörde enzim üretiminin matematiksel modellemesinde deneysel sonuçların model tahminleri ile karşılaştırıldığı grafikler (Devamı)



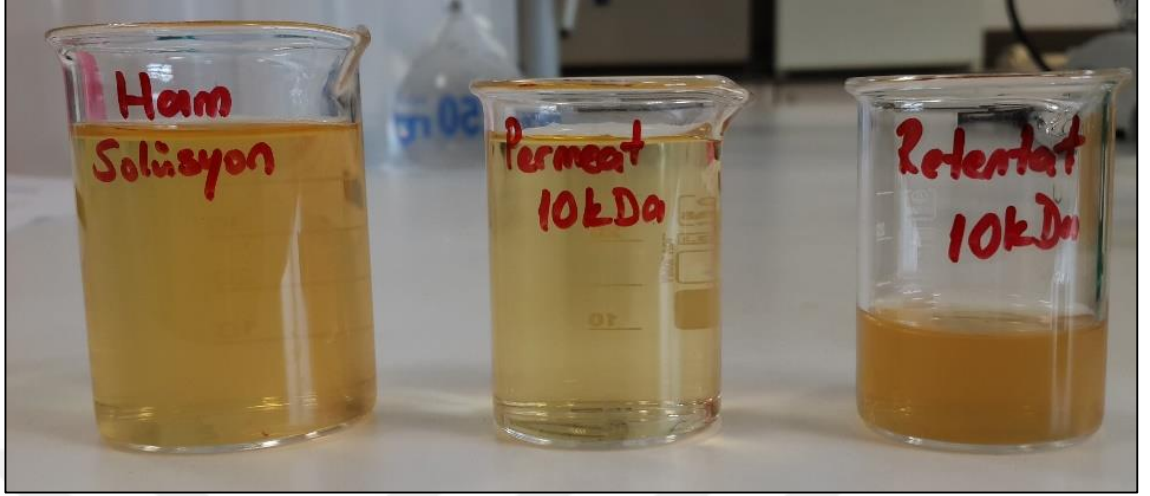
EK-8 Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde enzim üretiminin matematiksel modellemesinde deneysel sonuçların model tahminleri ile karşılaştırıldığı grafikler

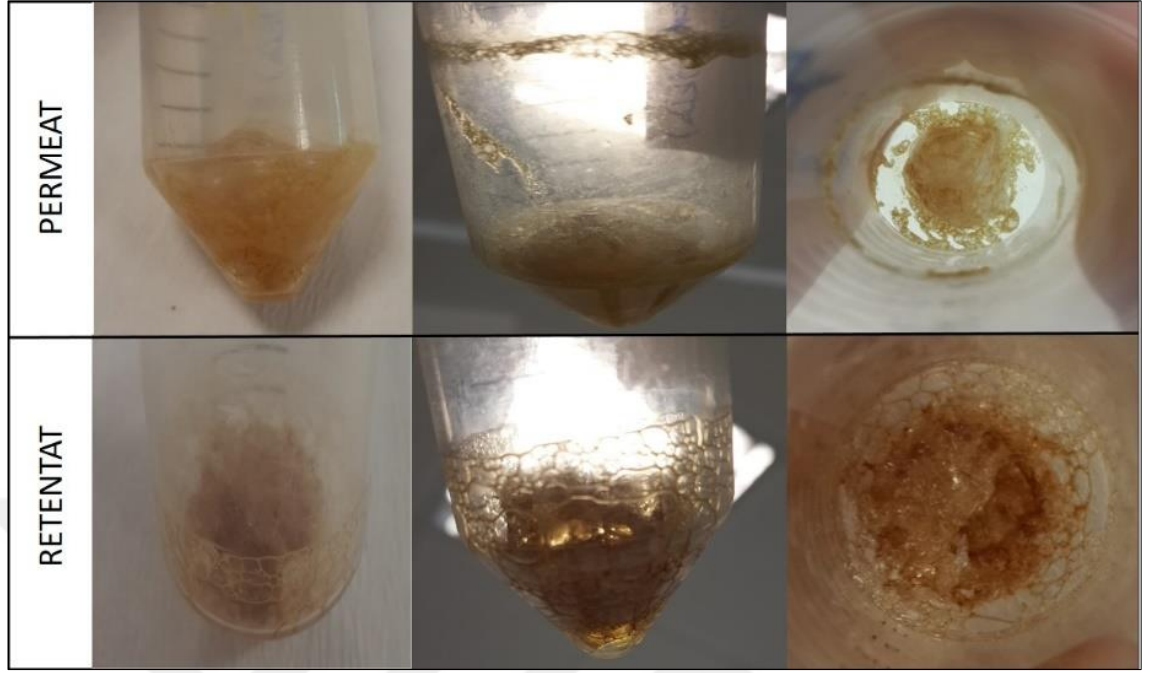


EK-8 Büyük ölçekli (30-L) biyoreaktörde enzim üretiminin matematiksel modellemesinde deneysel sonuçların model tahminleri ile karşılaştırıldığı grafikler (Devamı)



EK-9 Ultrafiltrasyon işlemlerinde kullanılan ham solüsyon ve işlem sonrası elde edilen permeat ve retentat örnekleri



EK-10 Liyofilizasyon sonrası permeat ve retentat örneklerine ait görüntüler

ÖZGEÇMİŞ

ERCAN KARAHALİL

ercankarahalil@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2014-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği ABD, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2012-2014	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği ABD, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2007-2012	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

SCI-Expanded indeksinde taranan hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Karahalil, E. (2020). Principles of halal-compliant fermentations: Microbial alternatives for the halal food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 98 (2020), 1-9

Yatmaz, E., Germec, M., **Karahalil, E.**, Turhan, I. (2020). Enhancing β -mannanase production by controlling fungal morphology in the bioreactor with microparticle addition. *Food and Bioproducts Processing*, 120, 123-130.

Germec M., Gürler HN., Ozcan A., Erkan SB., **Karahalil E.**, Turhan I. (2020) Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-6

Karahalil E., Germec M., Karaoglan M., Yatmaz E., Coban HB., Inan M., Turhan I. (2019). Partial purification and characterization of a recombinant β -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-17

Karahalil E., Germec M., Turhan I. (2019) β -Mannanase production and kinetic modeling from carob extract by using recombinant *Aspergillus sojae*. *Biotechnology Progress*, 35(6)

Karahalil, E., Coban HB & Turhan, I (2018). A current approach to the control of filamentous fungal growth in media: Microparticle enhanced cultivation technique, *Critical Reviews in Biotechnology*, 39 (2), 192-201

Karahalil, E., Demirel, F., Evcan, E., Germeç, M., Tari, C., & Turhan, I. (2017). Microparticle-enhanced polygalacturonase production by wild type *Aspergillus sojae*. 3 *Biotech*, 7(6), 361.

Germec, M., Yatmaz, E., **Karahalil, E.**, & Turhan, I. (2017). Effect of different fermentation strategies on β -mannanase production in fed-batch bioreactor system. 3 *Biotech*, 7(1), 77.

Yatmaz, E., **Karahalil, E.**, Germec, M., Ilgin, M., & Turhan, İ. (2016). Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced β -mannanase production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-9.

Yatmaz E., **Karahalil E.**, Germeç M., Öziyici H.R., Karhan M., Duruksu G., Turhan İ., 2015. Enhanced mannanase production from alternative sources by recombinant *Aspergillus sojae*, *Acta Alimentaria*, vol.1, pp.1-1.

Diğer uluslararası dergilerde yayımlanan makaleler

Yatmaz E., Turhan İ., Germeç M., **Karahalil E.** (2017) Using centrifuge and ultrafiltration as downstream processes for the concentration of microbial β -mannanase fermentation media, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, vol.21, pp.133-136,

Uluslararası kongrelerde sunulan ve özeti SCI-Expanded indeksler tarafından taranan hakemli dergilerde yayımlanan bildiriler

Yatmaz E., **Karahalil E.**, Germeç M., Turhan İ. (2014) Optimization of flocculation conditions using chitosan in mannanase production, *Journal of Biotechnology* 185: S58.

Diğer uluslararası kongre veya sempozyum bildirileri

Gurler HN, Erkan SB., Ozcan A., Yilmazer C., **Karahalil E.**, Germeç M, Yatmaz E., Turhan I. “A scale-up processing with different microparticle agent for mannanase fermentation in bioreactor”. International Conference on Agronomy and Food Science and Technology (AgroFood), Istanbul, TURKEY; June, 2019

Erkan SB., Yilmazer C., Ozcan A., Gurler HN., **Karahalil E.**, Germeç M, Yatmaz E., Turhan I.: “The effects of mannanase activity on viscosity in different gums”. International Conference on Agronomy and Food Science and Technology (AgroFood), Istanbul, TURKEY, June, 2019

Karahalil E., Turhan İ. "Low-cost production of polygalacturonase using *Aspergillus sojae*", 3rd International Congress on Food Technology, Nevsehir, TURKEY, October 10-12, 2018

Yatmaz E., Turhan I., Germeç M., Ilgin M., **Karahalil E.**, "Filamentous fungus fermentation to produce microbial β -mannanase in a stirred tank bioreactor by adding microparticle agents", International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture", pp.28-28, Bucharest, ROMANIA, 8-10 June 2017,

Yatmaz E., Turhan İ., Germeç M., **Karahalil E.**, "Using centrifuge and ultrafiltration as downstream processes for the concentration of microbial β -mannanase fermentation media", International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture", pp.80-80, Bucharest, ROMANIA, 8-10 June 2017

Karahalil E., Karahalil-Cengiz E.B. Biotechnological products from the perspective of halal food, The 3rd International Halal and Healthy Food Congress, Istanbul, TURKEY, 30-31 October 2015

Yatmaz E., Turhan İ., Karaoglan M., İnan M., **Karahalil E.**, Germeç M., "Microbial mannanase production with different fermentation methods and characterization of enzyme-produced", Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference, vol.1, pp.2-2, Newark, Delaware, USA, 12-15 July 2015

Yatmaz E., Turhan İ., **Karahalil E.**, Germeç M., "Microparticle usage in *Aspergillus* fermentation: A new approach for enhancing production rates of mannanase in carob extract", Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference, vol.1, pp.1-1, Newark, Delaware, USA, 12-15 July 2015

Yatmaz E., Turhan İ., **Karahalil E.**, Germeç M., "Purification of mannanase from fermentation broth by flocculation, centrifuge and ultrafiltration", vol.1, pp.2-2, Northeast Agricultural & Biological Engineering Conference, Newark, Delaware, USA, 12-15 July 2015

Karahalil E., Turhan İ., Evaluation of some cost effective materials for microbial mannanase production, II. International Congress on Food Technology, Izmir, TURKEY, 2014

Yatmaz E., **Karahalil E.**, Germeç M., Turhan İ., Enhanced mannanase production by using microparticles in recombinant *Aspergillus sojae* fermentation. VI. International Bioengineering Congress "Human Welfare", Izmir, TURKEY, 2013

Yatmaz E., Germeç M., **Karahalil E.**, Turhan İ., Effect of different nitrogen sources on mannanase production from carob pod extract using recombinant *Aspergillus sojae*. VI. International Bioengineering Congress "Human Welfare", Izmir, TURKEY, 2013

a. Ulusal kongre veya sempozyum bildirileri

Tarhan K., Aykut G., Tek S., Yatmaz E., Germeç M., **Karahalil E.**, Turhan İ., Siyah çay ekstraktından fermentasyonla kombucha çayı üretimi, TGDF Gıda Kongresi; Antalya, 2013.

Tarhan K., Aykut G., Tek S., Yatmaz E., Germeç M., **Karahalil E.**, Turhan İ., Farklı çay ekstraktlarından fermentasyonla kombucha çayı üretimi, 4. Geleneksel Gıdalar Kongresi; Adana, 2014.

Germeç M., **Karahalil E.**, Turhan İ., Lignoselülozik bileşenleri içeren pirinç samanının optimum hidroliz koşullarının belirlenmesi, Bursa 3. Uluslararası Gıda Kongresi, Bursa, 26-27 Eylül 2014

Germeç M., **Karahalil E.**, Yatmaz E., Turhan I. Fermentasyon ortamında alüminyum oksit kullanılarak rekombinant *Aspergillus sojae*'nin hücre morfolojisinin kontrolü ve ürettiği enzimin artırılması, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık 2015

Karahalil E., Turhan I. Bazı hayvansal ve bitkisel materyallerin azot kaynağı olarak mannanaz üretiminde kullanımı. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 18-19 Aralık 2015

Karahalil E., Evcan E, Tari C, Turhan İ., Mikrobiyal poligalakturonaz üretiminde mikropartikül kullanımının hücre morfolojisine etkisi, Türkiye 12. Gıda Kongresi, Edirne, 5-7 Ekim 2016

Karahalil E., Turhan I. Fermentasyon tekniği ile katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde işlenmiş hayvansal atıkların substrat olarak kullanımı. 12.Türkiye Gıda Kongresi, Edirne, 5-7 Ekim 2016