

*Rhizopus delemar* ile LİPAZ ve ASİT  
FOSFATAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ ve  
AĞIR METAL BİYOBİRİKİMİNİN  
EŞZAMANLI OLARAK İNCELENMESİ

MEHTAP ERŞAN

DOKTORA TEZİ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2011

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Rhizopus delemar* ile LİPAZ ve ASİT FOSFATAZ ENZİMLERİNİN  
ÜRETİMİ ve AĞIR METAL BİYOBİRİKİMİNİN EŞZAMANLI  
OLARAK İNCELENMESİ**

**MEHTAP ERŞAN**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI**

**YRD. DOÇ. DR. ÜNSAL AÇIKEL**

**SİVAS**

**2011**

Bu Tez Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı  
Tarafından M-323 Nolu Doktora Tez Projesi İle Desteklenmiştir.

Bu Tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 24.09.2008 Tarihli ve 7 Sayılı Toplantısında Kabul Edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Klavuzu Adlı Yönergeye Göre Hazırlanmıştır.

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı' nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL

---

Üye Doç. Dr. Meltem SARIOĞLU CEBECİ

---

Üye Doç. Dr. Sema SALGIN

---

Üye Yrd. Doç. Dr. Dilek İMREN

---

Üye (Danışman) Yrd. Doç. Dr. Ünsal AÇIKEL

---

#### ONAY

Bu tez çalışması, 26/05/2011 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Sevgili Annem, Oğlum Erdem ve Kızım Elvin ERŞAN' a

## ÖZET

### *Rhizopus delemar* ile LİPAZ ve ASİT FOSFATAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİMİ ve AĞIR METAL BİYOBİRİKİMİNİN EŞZAMANLI OLARAK İNCELENMESİ

Mehtap ERŞAN

Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ünsal AÇIKEL

2011, 137 sayfa

Bu tez çalışmasında, *R. delemar* tarafından üretilen ve metal biyobirikiminde doğrudan rol oynayan asit fosfataz enzimi ve metal biyobirikiminde etkili olmayan lipaz enzimi üretimi incelenmiştir. Fermantasyon ortamına eklenen indükleyicilerin, yüzey aktif maddelerin ve inhibitörlerin lipaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bazı ticari yağlar ve tribütirin indükleyici olarak kullanıldığında lipaz aktivitesi sırasıyla ayçiçek yağı > soya yağı > fındık yağı > mısır yağı > tribütirin zeytinyağı şeklinde azalmıştır. Ayrıca karıştırma hızı ve havalandırma oranının lipaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Yüzey aktif maddelerin lipaz aktivitesine etkisinin araştırılması için iki farklı yüzey aktif madde olan Tween-80 ve rhamnolipid, tribütirin ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Maksimum lipaz aktivitesi, indükleyici ve yüzey aktif madde olarak Tween-80 birlikte kullanıldığında elde edilmiştir. *R. delemar*'ın lipaz enzimi üretimi üzerine melas ve sakkarozun etkisi birlikte incelenmiştir. Aktivatörlerin varlığında lipaz aktivitesi NaCl > KCl > CaCl<sub>2</sub> > MgCl<sub>2</sub> > arap zıncığı > EDTA şeklinde azalmış ve en yüksek aktivite 964.55 µmol/L-dak olarak elde edilmiştir. Fermantasyon ortamındaki ağır metal iyonlarının varlığı lipaz aktivitesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ağır metal iyonlarının varlığında lipaz aktivitesi sırasıyla Fe(II) > Mn(II) > Co(II) > Ni(II) şeklinde azalmıştır.

Benzer şekilde *R. delemar*'ın asit fosfataz enzimi üretmesi için uygun besin ortamı bileşenleri ve ortam pH' ı belirlenmiştir. Mikroorganizmanın her iki enzim

aktivitesi üzerine ağır metal iyonlarının, Cu(II), Zn(II) ve Ni(II) etkileri incelenmiştir. Ağır metalsiz ortamda mikroorganizmanın maksimum-özgün (intrinsic) özgül üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve Monod sabiti ( $K_s$ ),  $0649 \text{ sa}^{-1}$  ve  $1.8928 \text{ g/L}$  olarak hesaplanmıştır. Asit fosfataz üretimi üzerine, ağır metal iyonlarının inhibisyonu sabiti ve maksimum görünür özgül üreme hızları bulunmuştur. Ni(II) ve Cu(II) iyonlarının *R. delemar*' in üremesi üzerine etkisi yarışmalı inhibisyondur ve inhibisyon sabitleri sırasıyla  $67.11 \text{ mg Ni(II)/L}$  ve  $82.30 \text{ mg Cu(II)/L}$  olarak bulunmuştur. *R. delemar*' in üremesi üzerine Zn(II) iyonunun inhibisyon tipi, kısmi yarışmalı inhibisyon ve inhibisyon sabiti,  $179.21 \text{ mg Zn(II)/L}$  olarak bulunmuştur.

Michaelis–Menten sabitleri ( $K_m$ ) ve reaksiyonun ileri yöndeki maksimum hız sabiti ( $V_m$ ), metal içermeyen ortamda sırasıyla  $3.17 \text{ mM}$  ve  $833.3 \text{ } \mu\text{mol/L-dak}$  olarak bulunmuştur. Ni(II) ve Cu(II) iyonlarının varlığı asit fosfataz aktivitesini inhibe etmiştir. Ni(II) ve Cu(II) iyonlarının reaksiyonun maksimum hızını,  $V_m$ , azaltması yarışmasız tip inhibisyon kinetiğine uyduğunu gösterir ve inhibisyon sabitleri sırasıyla  $50 \text{ mg Ni(II)/L}$ ,  $100 \text{ mg Cu (II)/L}$  olarak hesaplanmıştır. Zn(II) iyonlarının spesifik üreme hızı ve *R. delemar*' in asit fosfataz aktivitesi  $25 \text{ mg/L Zn(II)}$  konsantrasyonuna kadar artmış, bu derişimden sonra azalmaya başlamıştır. Asit fosfataz aktivitesi için Zn(II) iyonlarının inhibisyon tipi, yarışmasız-karışık tip inhibisyon olarak belirlenmiştir. Yarışmasız-karışık tip inhibisyon için Zn(II) iyonlarının inhibisyon sabiti  $100 \text{ mg Zn(II)/L}$  olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın bu aşamasında ise *R. delemar*' in üreyen, üreme peryodunu tamamlamış ve kimyasal/ısı olarak öldürülmüş hücrelerin Cu(II), Ni(II) ve Zn(II) iyonları için biyobirikim ve/veya biyosorpsiyon sonuçları karşılaştırılmıştır. Maksimum metal giderimi üreyen hücrelerde elde edilirken, en düşük metal giderim kapasitesi üreme peryodunu tamamlamış hücrelerde elde edilmiştir.

*R. delemar*' in üremesi, asit fosfataz aktivitesi ve metal biyobirikimi Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ve Box-Behnken deney dizaynı kullanılarak, pH, sıcaklık ve başlangıç metal iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak optimize edilmiştir. Elde edilen matematiksel modeller, ANNOVA (Analysis of variance) istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiş, modellerin doğruluğu ve geçerliliği tartışılmıştır.

**Key words:** *R. delemar*, lipaz, asit fosfataz, biyobirikim, Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)

**ABSTRACT**  
**INVESTIGATION of SIMULTANEOUS LIPASE and ACID PHOSPHATASE  
PRODUCTION and HEAVY METAL BIOACCUMULATION by *R. delemar***

Mehtap ERŞAN

Doctorate Thesis, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assistant Prof. Ünsal AÇIKEL

2011, 137 pages

In this thesis study, the production of acid phosphatase enzyme which plays a role directly in metal bioaccumulation and lipase enzyme which does not participate directly in metal bioaccumulation by *R. delemar* were investigated. The effects of inducers, surface-active materials, activators, and inhibitors in the fermentation medium on lipase activity in *R. delemar* were investigated. In the presence of certain commercial oils and tributyrin as an inducer, lipase activity decreased in the order of sunflower oil > soybean oil > hazelnut oil > corn oil > tributyrin > olive oil. In addition, the effects of the stirring and aeration rates on lipase activity were investigated. To investigate the effect of surface-active materials on lipase activity 2 different surface-active materials, Tween-80 and rhamnolipid (biosurfactant), were used as comparatives with tributyrin. Maximum lipase activity was observed in the fermentation medium containing Tween-80 as both an inducer and surface-active material. The combined effects of molasses and sucrose on lipase production by *R. delemar* were also investigated. Lipase activity in the presence of activators decreased in the order of NaCl > KCl > CaCl<sub>2</sub> > MgCl<sub>2</sub> > gum arabic > EDTA, and maximum lipase activity of 964.55 µmol/L-dak was obtained. The presence of heavy metal ions in the fermentation media severely inhibited lipase activity. Lipase activity in the presence of heavy metal ions decreased in the order of Fe(II) > Mn(II) > Co(II) > Ni(II).

In a similar way, to produce acid phosphatase enzyme by *R. delemar*, the optimum growth medium components and pH were determined. The effects of heavy metal ions, Cu(II), Zn(II) and Ni(II) ions on acid phosphatase activity were investigated. Maximum intrinsic specific growth rate ( $\mu_m$ ) and Monod constant ( $K_s$ ) in metals-free medium were determined as 0.0649 h<sup>-1</sup> and 1.8928 g/L. The inhibition type of heavy



metal ions on acid phosphatase enzyme production was determined and the values of inhibition constant and the forward direction maximum reaction rates were found. The inhibition types of Ni(II) and Cu(II) ions on growth rate of *R. delemar* were found to be a competitive inhibition and the inhibition constants of Ni(II) and Cu(II) ions were found to be 67.11 mg Ni(II)/L and 82.30 mg Cu(II)/L, respectively. The inhibition type of Zn(II) ion on growth rate of *R. delemar* was found to be an uncompetitive inhibition and the inhibition constant of Zn(II) ion was found to be 179.21 mg Zn(II)/L.

Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ) and maximum forward velocity of the reaction ( $V_m$ ) were determined as 3.17 mM and 833.3 mol/L min, respectively, in metal-free medium. In the presence of Ni(II) and Cu(II) ions, the activity of acid phosphatase was inhibited. Addition of Ni(II) and Cu(II) ions decreased the maximum reaction velocity,  $v_m$ , showed noncompetitive-type inhibition kinetics and the inhibition constants were determined as 50 mg Ni(II)/L, 100 mg Cu (II)/L, respectively. The presence of Zn(II) ions on both the specific growth rate and acid phosphatase activity of *R. delemar* affected as activator up to 25 mg/L Zn(II) concentration, than the inhibition effect of Zn(II) ions began. The inhibition type of Zn(II) ions for acid phosphatase activity was found to be non-competitive mixed type inhibition. The value of non- competitive mixed type inhibition constant for Zn(II) ions was determined as 100 mg Zn(II)/L.

In the next stage, the Cu(II), Ni(II) and Zn(II) bioaccumulation and/or biosorption studies by growing, resting and chemically/thermally killed cells of *R. delemar* were carried out, and the results were compared. Maximum metal removal was obtained by growing cells, while the resting cells have the lowest metal capacity.

The growth and acid phosphatase activity of *R. delemar* and metal bioaccumulation were optimized by response surface methodology (RSM) and a Box-Behnken experimental design was used to study the interactive effects of pH, temperature and initial metal ion concentration on these input parameters. The mathematical models obtained were evaluated by Anova (Analysis of variance) statistical method, the accuracy and significance of these models were discussed.

**Key words:** *R. delemar*, lipase, acid phosphatase, bioaccumulation, Cu(II), Ni(II), Zn(II), Response Surface Methodology (RSM)

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca teorik ve pratik anlamda yardımcı olarak yönlendiren, Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Ünsal AÇIKEL' e değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile yol göstererek çalışmamı yönlendiren ve destekleyen Sayın Hocam Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL' e emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca verdiği destekten dolayı Sayın Hocam Doç. Dr. Sevil ÇETİNKAYA' ya teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren ve hayatımın her anında bana güç veren canım annem ve babama, sevgili kardeşime, her konuda sabırla yardımcı olan eşime desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Tez projemi destekleyerek bana maddi olarak sağlayan CÜBAP (M-353)' a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER DİZİNİ.....	xxi
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Canlıların Sınıflandırılması ve Mikroorganizmalar.....	4
2.2 Mikroorganizmaların Büyüme Ortamı.....	5
2.2.1 Mikroorganizmanın Büyümesine Etki Eden Parametreler.....	5
2.2.1.1 pH.....	5
2.2.1.2 Sıcaklık.....	5
2.2.1.3 Oksijen İhtiyacı.....	6
2.2.1.4 Nem Miktarı (Su Aktivitesi).....	7
2.3 Mikroorganizmaların Üreme Evreleri.....	7
2.3.1 Gecikme Evresi (Başlangıç Evresi).....	7
2.3.2 Üstel Üreme Evresi.....	7
2.3.3 Duraklama Evresi.....	8
2.3.4 Sabit Evre.....	8
2.3.5 Ölüm Evresi.....	8
2.4 <i>Rhizopus delemar</i> .....	9
2.5 Enzimler.....	9
2.5.1 Enzim-Substrat Kompleksi Oluşum Modelleri.....	11
2.5.2 Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	13
2.5.3 Enzimlerin Katalitik Özellikleri.....	14
2.5.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler.....	15
2.5.4.1 pH Etkisi.....	15
2.5.4.2 Sıcaklık Etkisi.....	15
2.5.4.3 Substrat Konsantrasyonu Etkisi.....	15
2.5.4.4 Aktivatörler.....	15
2.5.5 Fermantasyon ve Enzimatik Tepkimelerde Reaksiyon Hızlarının Tayini Yöntemleri.....	16
2.6 Lipaz Enzimi ve Üretimi.....	17
2.7 Asit Fosfataz Enzimi ve Üretimi.....	19
2.8 Atıksu Kirliliği.....	20
2.8.1 Organik Kirleticiler.....	20
2.8.1.1 Karbon Bileşikleri.....	20
2.8.1.2 Azot Bileşikleri.....	20
2.8.1.3 Fosfor Bileşikleri.....	20
2.8.2 İnorganik Kirleticiler.....	20

2.8.2.1 Bakır (Cu(II)) Kirliliği .....	21
2.8.2.2 Nikel (Ni(II)) Kirliliği .....	22
2.8.2.3 Çinko (Zn(II)) Kirliliği.....	22
2.8.3 Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi.....	22
2.8.4 Ağır Metal Giderim Mekanizmaları (Biyobirikim).....	23
2.9. Adsorpsiyon İzotermi.....	24
2.10 Enzimlerin Kinetik özellikleri İçin Michaelis Menten Modeli.....	25
2.11 Biyosorpsiyon .....	28
2.11.1 Biyosorpsiyon Verimi.....	28
2.12 Biyobirikim Deneyleri.....	29
2.12.1 Mikroorganizma Özgül Üreme Hızı.....	29
2.12.2 Metal İyonu İçermeyen Ortamda Üreme Kinetiğinin Modellenmesi.....	29
2.12.3 Metal İyonu İçeren Ortamda Üreme Kinetiğinin Modellenmesi.....	30
2.13 Yüzey Cevap Yöntemi (CYY).....	31
2.13.1 Yüksek-Dereceli Tasarımlar İçin Faktör Seviyeleri.....	33
2.13.2 Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması.....	33
2.13.3 CYY İçin Kullanılan Tasarım Modelleri .....	34
<b>3 MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>37</b>
3.1 Mikroorganizma ( <i>R. delemar</i> ) Üretimi .....	37
3.2 Enzim Üretim Ortamları.....	38
3.2.1 <i>R. Delemar</i> 'ın Lipaz Enzimi Üretmesi İçin Uygun Besin Ortamlarının Hazırlanması .....	38
3.2.2 <i>R. delemar</i> 'ın Asit Fosfataz Enzimi Aktivitesi ve Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	40
3.3 Analitik Ölçüm Yöntemleri.....	41
3.3.1 Lipaz Enzim Aktivitesi.....	41
3.3.2 Biyokütle Analizi.....	41
3.3.3 Sakkaroz Analizi.....	41
3.3.4 Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini.....	42
3.4 Metal İyonları İçeren Biyobirikim Ortamının Hazırlanması.....	42
3.4.1 Biyobirikim Deneyleri.....	42
3.4.2 <i>R. delemar</i> 'ın Biyosorpsiyon Deneyleri İçin Hazırlanması.....	42
<b>4 BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
4.1 <i>R. delemar</i> ile Lipaz Enzim Aktivitesi İçin En İyi Koşulların Saptanması.....	45
4.1.1 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu İçeren Ortamda Yağların ve Yüzey Aktif Maddelerin Karbon Kaynağı ve İndükleyici Olarak Etkisi.....	45
4.1.1.1 Ticari Yağların ve Tributirinin Etkisi.....	45
4.1.1.2 Ayçiçeği Yağı Miktarının Etkisi.....	47
4.1.1.3 Yüzey Aktif Maddelerin Etkisi.....	47
4.1.1.4 Tween-80 Miktarının Etkisi.....	49
4.1.2 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu İçeren Ortamda Sıcaklığın Etkisinin Araştırılması.....	50
4.1.2.1 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Karıştırma Hızının Etkisi.....	51

4.1.2.2 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Hava Giriş Hızının Etkisi.....	52
4.1.3 Melas ve Sakkaroz Enzim Aktivitesi Üzerine Birlikte Etkisi.....	53
4.1.4 Melas, Sakkaroz ve Ayçiçeği Yağının Enzim Aktivitesi Üzerine Birlikte Etkisi.....	55
4.1.5 Aktivatörlerin Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	57
4.1.6 Ağır Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi.....	58
4.2 <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Üretimi .....	60
4.2.1 Ni(II) İyonları Varlığında ve Metalsiz Ortamda <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Üretimi.....	60
4.2.2 Ni(II) İyonlarının <i>R. Delemar</i> ' in Üremesine Etkisi.....	61
4.2.3 <i>R. delemar</i> ' in Üreme Hızı Üzerine Ni(II) İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi.....	62
4.2.4 Ni(II) İyonunun <i>R.delemar</i> ' in Üreme Hızı Üzerindeki İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi.....	63
4.2.5 <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Aktivitesine Ni(II) İyonlarının Etkisi..	64
4.2.6 Asit Fosfataz Aktivitesi İçin Ni(II) İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi.....	66
4.2.7 <i>R. delemar</i> ' in Ni(II) Biyobirikimi.....	66
4.2.8 <i>R. delemar</i> ' in Üreyen (Growing), Üreme Periyodunu Tamamlamış (Resting) ve Ölü (Dead) Hücrelerinin Ni(II) Sorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması.....	69
4.2.9 Cu(II) İyonları Varlığında ve Metalsiz Ortamda <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Üretimi.....	72
4.2.10 Cu(II) İyonlarının <i>R. Delemar</i> ' in Üremesine Etkisi.....	73
4.2.11 <i>R.delemar</i> ' in Üreme Hızı Üzerine Cu(II) İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi.....	73
4.2.12 Cu(II) İyonunun <i>R.delemar</i> ' in Üreme Hızı Üzerindeki İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi.....	75
4.2.13 <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Aktivitesine Cu(II) İyonlarının Etkisi	75
4.2.14 Asit Fosfataz Aktivitesi İçin Cu(II) İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi.....	77
4.2.15 <i>R. delemar</i> ' in Cu (II) Biyobirikimi.....	77
4.2.16 <i>R. delemar</i> ' in Üreyen, Üreme Periyodunu Tamamlamış ve Ölü Hücrelerinin Cu(II) Sorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması...	80
4.2.17 Zn(II) İyonları Varlığında ve Metalsiz Ortamda <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Üretimi.....	82
4.2.18 Zn(II) İyonlarının <i>R. Delemar</i> ' in Üremesine Etkisi .....	84
4.2.19 <i>R. delemar</i> ' in Üreme Hızı Üzerine Zn(II) İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi.....	84
4.2.20 Zn(II) İyonunun <i>R.Delemar</i> ' in Üreme Hızı Üzerindeki İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi.....	85
4.2.21 <i>R. delemar</i> ' in Asit Fosfataz Aktivitesine Zn(II) İyonlarının Etkisi .....	86
4.2.22 Asit Fosfataz Aktivitesi İçin Zn(II) İnhibisyon Sabitlerinin Belirlenmesi.....	89
4.2.23 <i>R. delemar</i> ' in Zn (II) Biyobirikimi.....	89

4.2.24 <i>R. delemar</i> ' ın Üreyen, Üreme Periyodunu Tamamlamış ve Ölü Hücrelerinin Zn(II) Sorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması	91
4.3 Yüzey Cevap Yöntemiyle Yapılan Tasarım Çalışmaları.....	95
4.3.1 <i>R. delemar</i> ile Maksimum Asit Fosfataz Aktivitesi Elde Etmek İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	97
4.3.2 <i>R. delemar</i> Üremesi İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	102
4.3.3 <i>R. delemar</i> ' ın Zn(II) Biyobirikimi İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	107
4.3.4 Deney Doğrulama.....	112
5 SONUÇLAR.....	113
KAYNAKLAR.....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	123
EKLER.....	124
EK 1 Sakkaroz Derişiminin Tayini.....	124
Ek 2 Biyokütle Derişimi Tayini.....	126
Ek 3 Lipaz Aktivitesi Tayin Yöntemi .....	128
Ek 4 Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini.....	129
EK 5 Design Expert Paket Programına Uyum.....	130

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Mikroorganizma büyüme evreleri.....	8
Şekil 2.2 Enzim katalizli ve katalizsiz reaksiyonların aktivasyon enerjisi.....	12
Şekil 2.3 Anahtar kilit modeli.....	12
Şekil 2.4 Enzim –substrat kompleksinin oluşumu.....	13
Şekil 2.5 Kofaktörlerin sınıflandırılması .....	14
Şekil 2.6 a,b,c,d Genel kuadratik yüzey şekilleri .....	32
Şekil 2.7 a-c Faktör dizilerinin fonksiyonu olarak cevapların olası davranışlar...	33
Şekil 2.8 Kübik BBD ve faktöriyel dizayn.....	36
Şekil 3.1 Karıştırılmalı ve havalandırılmalı biyoreaktör.....	39
Şekil 4.1 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, indükleyici olarak farklı yağlar kullanılarak elde edilen enzim aktivitelerin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>indükleyici</sub> = %0.5, K.H.=150 rpm) .....	46
Şekil 4.2 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, ayçiçeği yağı konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.=150 rpm) .....	47
Şekil 4.3 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, indükleyici olarak farklı yüzey aktif maddeler kullanıldığında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>yüzey aktif madde</sub> = %0.5, K.H.=150 rpm).....	48
Şekil 4.4 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, Tween-80 konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.=150 rpm).....	50
Şekil 4.5 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı sıcaklıklarda elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>ayçiçeği yağı</sub> = %0.5, K.H.=150 rpm).....	51
Şekil 4.6 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı karıştırma hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>ayçiçeği yağı</sub> = %0.5).....	52

Şekil 4.7	Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı hava giriş hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>ayçiçeği yağı</sub> = %0.5, K.H.= 100 rpm).....	53
Şekil 4.8	Karbon kaynağı olarak melas ve artan konsantrasyonlarda sakkarozu birlikte içeren ortamlarda enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 150 rpm)...	54
Şekil 4.9	Karbon kaynağı olarak melas ve artan konsantrasyonlarda sakkarozu birlikte içeren ortamlarda mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 150 rpm). ....	55
Şekil 4.10	Karbon kaynağı olarak melas ve sakkaroz, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamda enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>sakkaroz</sub> = 5.0 g/L, C <sub>ayçiçeği yağı</sub> = %0.5, K.H.= 150 rpm).....	56
Şekil 4.11	Karbon kaynağı olarak melas ve sakkaroz, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamda mikroroganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH= 8.0,T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C <sub>sakkaroz</sub> = 5.0 g/L, C <sub>ayçiçeği yağı</sub> = %0.5, K.H.= 150 rpm).....	57
Şekil 4.12	Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı aktivatörlerin etkisiyle enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 100 rpm).....	58
Şekil 4.13	Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda ağır metallerin etkisiyle enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C <sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 100 rpm).....	59
Şekil 4.14	Metal iyonu içermeyen ve 25 mg/L Ni(II) iyonu içeren fermentasyon ortamlarında, asit fosfataz aktivitesinin ve biyokütle konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=5.0; C <sub>nişasta</sub> =20 g/L; T= 30 °C).....	61
Şekil 4.15	Ni(II) içermeyen ortam ve 0-50 mg/L aralığında, artan konsantrasyonlarda Ni(II) iyonları içeren ortamlarda, <i>R. delemar</i> ' ın üreme hızı için çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri (P <sub>H</sub> =5.0; T= 30 °C).....	63
Şekil 4.16	Ni(II) içermeyen ortamda ve 10-50 mg/L aralığında Ni(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda asit fosfataz enzimi için Lineweaver-Burk grafikleri (P <sub>H</sub> =5.0; T= 30 °C).....	65



Şekil 4.17	Ni(II) iyonu için biyobiriken Ni(II) iyonu konsantrasyonu (mg /L) ve birim kuru ağırlık temelinde biyobiriken Ni(II) iyonu miktarının (mg Ni(II) / g kuru ağırlık) pH ile değişimi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C; $C_{Ni,i} = 50$ mg/L).....	67
Şekil 4.18	Enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol} / \text{L} - \text{dak}$ ) ve biyokütle konsantrasyonunun pH ile değişimi (g/L) ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C; $C_{Ni,i} = 50$ mg/L).....	67
Şekil 4.19	Biyobiriken Ni(II) iyonlarının konsantrasyonu (mg/L), birim kuru ağırlık için biyobiriken Ni(II) iyonlarının miktarı (mg Ni(II)/ g kuru ağırlık) ve enzim aktivitesinin zamanla değişimi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C; $C_{Ni,i} = 50$ mg/L). ....	68
Şekil 4.20	<i>R. Delemar</i> 'ın Ni(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon izotermi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $\text{pH} = 5.0$ ; $T = 30$ °C; $t_{inkübasyon} = 48$ sa).....	71
Şekil 4.21	Metal iyonu içermeyen ve 25 mg/L Cu(II) iyonu içeren fermentasyon ortamlarında, asit fosfataz aktivitesinin ve biyokütle konsantrasyonunun zamanla değişimi ( $\text{pH} = 5.0$ ; $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C).....	72
Şekil 4.22	Cu(II) içermeyen ortam ve 0-100 mg/L aralığında, artan konsantrasyonlarda Cu(II) iyonları içeren ortamlarda, <i>R. delemar</i> 'ın üreme hızı için çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri ( $\text{pH} = 5.0$ ; $T = 30$ °C).....	74
Şekil 4.23	Cu(II) içermeyen ortamda ve 0-100 mg/L aralığında Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda asit fosfataz enzimi için Linewear-Burk grafikleri ( $\text{pH} = 5.0$ ; $T = 30$ °C).....	76
Şekil 4.24	Cu(II) iyonu için biyobiriken Cu(II) iyonu konsantrasyonu (mg / L) ve birim kuru ağırlık temelinde biyobiriken Cu(II) iyonu miktarının (mg Cu(II) / g kuru ağırlık) pH ile değişimi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C; $C_{Cu,i} = 50$ mg/L).....	78
Şekil 4.25	Enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol}/\text{L}-\text{dak}$ ) ve biyokütle konsantrasyonunun pH ile değişimi (g/L) ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C; $C_{Cu,i} = 50$ mg/L).....	79
Şekil 4.26	Biyobiriken Cu(II) iyonlarının konsantrasyonu (mg/L), birim kuru temel için biyobiriken Cu(II) iyonlarının miktarı (mg Cu(II)/g kuru ağırlık) ve enzim aktivitesinin zamanla değişimi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; $T = 30$ °C; $C_{Cu,i} = 50$ mg/L).....	79

Şekil 4.27 <i>R. Delemar'</i> in Cu(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon izotermi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; pH= 5.0; T= 30 °C; $t_{inkübasyon} = 48$ sa).....	82
Şekil 4.28 Metal iyonu içermeyen ve 50 mg/L Zn(II) iyonu içeren fermentasyon ortamlarında, asit fosfataz aktivitesinin ve biyokütle konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=5.0; $C_{nişasta} = 20$ g/L; T= 30 °C). .....	83
Şekil 4.29 Zn(II) içermeyen ortam ve 0-100 mg/L aralığında. artan konsantrasyonlarda Zn(II) iyonları içeren ortamlarda. <i>R. delemar'</i> ın üreme hızı için çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri (pH=5.0; T= 30 °C).....	85
Şekil 4.30 Metal içermeyen ortam ve artan konsantrasyonlarda 0-25 mg/L Zn(II) iyonları içeren ortam için <i>R. delemar</i> mantarının Monod eşitliği (pH=5.0; T= 30 °C).....	87
Şekil 4.31 Zn(II) içermeyen ortam ve 50-100 mg/L aralığında Zn(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda asit fosfataz enzimi için Lineweaver-burk grafikleri (pH=5.0; T= 30 °C).....	88
Şekil 4.32 Zn(II) iyonu için biyobiriken Zn(II) iyonu konsantrasyonu (mg/L) ve birim kuru ağırlık temelinde biyobiriken Zn(II) iyonu miktarının (mg Zn(II)/g kuru ağırlık) pH ile değişimi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; T= 30 °C; $C_{Zn,i} = 50$ mg/L).....	90
Şekil 4.33 Enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ ) ve biyokütle konsantrasyonunun pH ile değişimi (g/L) ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; T= 30 °C; $C_{Zn,i} = 50$ mg/L).....	90
Şekil 4.34 Biyobiriken Zn(II) iyonlarının konsantrasyonu (mg/L). birim kuru temel için biyobiriken Zn(II) iyonlarının miktarı (mg Zn(II)/g kuru ağırlık) ve enzim aktivitesinin zamanla değişimi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; T= 30 °C; $C_{Zn,i} = 50$ mg/L).....	91
Şekil 4.35 <i>R. Delemar'</i> ın Zn(II) gideriminde üreyen. üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon izotermi ( $C_{nişasta} = 20$ g/L; pH= 5.0; T= 30 °C; $t_{inkübasyon} = 48$ sa).....	94
Şekil 4.36-(a) CYY ile elde edilen, enzim aktivitesinin pH ve sıcaklıkla değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile elde edilen, enzim aktivitesinin pH ve sıcaklıkla değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	99
Şekil 4.37-(a) CYY ile elde edilen, enzim aktivitesinin $C_{Zn,i}$ ve sıcaklıkla değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile elde edilen, enzim aktivitesinin $C_{Zn,i}$ ve sıcaklıkla değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	100

Şekil 4.38-(a) CYY ile, enzim aktivitesinin $C_{Zn,i}$ ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, enzim aktivitesinin $C_{Zn,i}$ ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	101
Şekil 4.39-(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	104
Şekil 4.40 -(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun $C_{Zn,i}$ ve sıcaklık ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun $C_{Zn,i}$ ve sıcaklık ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	105
Şekil 4.41- (a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun $C_{Zn,i}$ ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun $C_{Zn,i}$ ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	106
Şekil 4.42 -(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	109
Şekil 4.43 -(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve $C_{Zn,i}$ ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve $C_{Zn,i}$ ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	110
Şekil 4.44 -(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin pH ve $C_{Zn,i}$ ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin pH ve $C_{Zn,i}$ ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği.....	111

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Çeşitli atık sularda bulunan ağır metaller ve izin verilebilen miktarları .....	21
Çizelge 3.1 Mikroorganizma üretiminde kullanılan minimal besin ortamı içeriği.....	27
Çizelge 3.2 Ankara Şeker Fabrikasından temin edilen melasın bileşimi.....	38
Çizelge 3.3 Asit fosfataz üretiminde kullanılan aşı ortamı içeriği.....	40
Çizelge 3.4 Asit fosfataz üretiminde kullanılan fermantasyon ortamı içeriği.	40
Çizelge 4.1 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve çeşitli ticari yağlar ve tributirinin içeren besin ortamının bileşimi.....	46
Çizelge 4.2 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve çeşitli yüzey aktif maddeler içeren besin ortamının bileşimi.....	48
Çizelge 4.3 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren besin ortamının bileşimi.....	50
Çizelge 4.4 Karbon kaynağı olarak melas ve sakkarozu birlikte içeren besin ortamının bileşimi.....	54
Çizelge 4.5 Karbon kaynağı olarak melas ve sakkaroz, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren besin ortamının bileşimi.....	56
Çizelge 4.6 Spesifik üreme hızı ve maksimum biyokütle konsantrasyonunun metal içermeyen ve içeren ortamlar için karşılaştırılması (pH=5.0; nişasta konsantrasyonu= 20 g/L; T= 30 °C; t <sub>inkübasyon</sub> = 48 sa).....	62
Çizelge 4.7 Ni(II) içermeyen ortamda ve Ni(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarının varlığında elde edilen maksimum spesifik üreme hızları ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması (P <sub>H</sub> =5.0; T= 30 °C).....	64
Çizelge 4.8 Farklı mikroorganizma türlerinden elde edilen asit fosfataz aktivitesi için K <sub>m</sub> sabitlerinin değerleri.....	65
Çizelge 4.9 Metal içermeyen ve artan Ni(II) iyonu derişimlerinde maksimum aktivite, maksimum Michaelis-Menten sabitleri ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması (P <sub>H</sub> =5.0; T= 30 °C).....	66

Çizelge 4.10	Biyobiriken Ni(II) iyonu konsantrasyonu ve birim biyokütle miktarı için biyobiriken Ni(II)iyonu miktarının, Ni(II) iyonu içeren asit fosfataz üretim ortamında ortamda yaşayan, tutuklu ve ölü hücre için karşılaştırılması ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L} = 20 \text{ g/L}$ ; $P_H=5.0$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).....	70
Çizelge 4.11	<i>R. delemar</i> ' ın Ni(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon sabitleri ( $C_{nişasta}= 20 \text{ g/L}$ ; $pH= 5.0$ ; $pH= 5.0$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).....	70
Çizelge 4.12	Spesifik üreme hızı ve maksimum biyokütle konsantrasyonunun metal içermeyen ve içeren ortamlar için karşılaştırılması ( $pH=5.0$ ; $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L}$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $t_{inkübasyon}= 48 \text{ sa}$ ).....	73
Çizelge 4.13	Cu(II) içermeyen ortamda ve Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarının varlığında elde edilen maksimum spesifik üreme hızları ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması ( $pH=5.0$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	75
Çizelge 4.14	Metal içermeyen ve artan Cu(II) iyonu derişimlerinde maksimum aktivite, maksimum Michaelis-Menten sabitleri ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması ( $P_H=5.0$ ; $T=30 \text{ }^\circ\text{C}$ )....	77
Çizelge 4.15	Biyobiriken Cu(II) iyonu konsantrasyonu ve birim biyokütle miktarı için biyobiriken Ni(II)iyonu miktarının, Cu(II) iyonu içeren asit fosfataz üretim ortamında ortamda yaşayan, tutuklu ve ölü hücre için karşılaştırılması ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L}$ ; $pH=5.0$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).....	81
Çizelge 4.16	<i>R. Delemar</i> ' ın Cu(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon sabitleri ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L} = 20 \text{ g/L}$ ; $pH= 5.0$ ; $pH= 5.0$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).....	81
Çizelge 4.17	Spesifik üreme hızı ve maksimum biyokütle konsantrasyonunun metal içermeyen ve içeren ortamlar için karşılaştırılması ( $pH=5.0$ ; $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L} = 20 \text{ g/L}$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).....	84
Çizelge 4.18	Zn(II) içermeyen ortamda ve Zn(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarının varlığında elde edilen maksimum spesifik üreme hızları ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması ( $pH=5.0$ ; $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	86

Çizelge 4.19	Maksimum spesifik üreme hızı ve Michaelis- Menten sabitlerinin metal içeren ve içermeyen ortamlar için Zn(II) iyonu konsantrasyonları ve maksimum büyüme hızları için inhibisyon sabitleri (pH=5.0; T= 30 °C).....	88
Çizelge 4.20	Biyobiriken Zn(II) iyonu konsantrasyonu miktarı ve birim Biyokütle miktarı için biyobiriken Zn(II)iyonu miktarının, Zn(II) iyonu içeren asit fosfataz üretim ortamında ortamda yaşayan, tutuklu ve ölü hücre için karşılaştırılması (C <sub>Nişasta</sub> =20 g/L; P <sub>H</sub> =5.0; T=30 °C; t <sub>inkübasyon</sub> = 48 sa).....	93
Çizelge 4.21	<i>R. Delemar</i> 'ın Zn(II) gideriminde üreyen. üreme peryodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon sabitleri (nişasta konsantrasyonu= 20 g/L; pH= 5.0; pH= 5.0; T= 30 °C; t <sub>inkübasyon</sub> = 48 sa).....	94
Çizelge 4.22	Bağımsız değişken aralıkları ve cevap değişkenleri.....	95
Çizelge 4.23	Uygulanan pH sıcaklık ve Zn(II) derişimleri ile elde edilen cevap değişkenleri.....	96
Çizelge 4.24	Cevap yüzeyi lineer model için, sıcaklık, pH ve C <sub>zn,i</sub> fonksiyonu olarak asit fosfataz aktivitesinin varyans analizi (ANNOVA) modellenmesi.....	97
Çizelge 4.25	Cevap yüzeyi quadratik model için, sıcaklık, pH ve C <sub>zn,i</sub> fonksiyonu olarak <i>R. Delemar</i> üremesinin varyans analizi (ANNOVA) .....	102
Çizelge 4.26	Cevap yüzeyi quadratik model için, sıcaklık, pH ve C <sub>zn,i</sub> fonksiyonu olarak <i>R. Delemar</i> ' ın Zn (II) biyobirikimi için varyans analizi (ANNOVA) .....	107
Çizelge 4.27	CYY için elde edilen deneysel sonuçlar ile deney doğrulama değerlerinin karşılaştırılması.....	112

## SİMGELER DİZİNİ

$C_0$	Başlangıç metal iyonu derişimi (mg metal iyonu/L çözelti),
$C$	Herhangi bir anda adsorpsiyon ortamında adsorplanmadan kalan metal iyonu derişimi (mg metal iyonu /L çözelti),
$X$	Mikroorganizmanın (adsorbent) çözeltideki derişimi (g mikroorganizma/L çözelti)'dir.
$q$	Dengede birim biyosorbent tarafından biyosorblanan kirletici miktarı (mg metal iyonu/g mikroorganizma miktarı)
$t$	Zaman (dakika)'dır.
$C_{ads}$	Dengede mikroorganizma tarafından adsorplanan metal iyonu derişimi (mg metal iyonu (mg/L)'dir.
$\%Y$	Biyosorpsiyon verimi
$\mu$	Özgöl üreme hızı ( $sa^{-1}$ ),
$X$	Kuru mikroorganizma derişimi (g /L),
$t$	Zaman (sa, h)'dir.
$I$	İnhibisyona neden olan bileşenin (ağır metalin) derişimi (mg/L),
$K_I$	İnhibisyon sabiti (mg/L)
$K_s$	Monod sabiti (g/L)
$K_m$	Michaelis-Menten sabiti (mM)
$S$	Katı madde miktarı
$P$	Polarizasyon
$\mu_m$	Ağır metalsiz ortamda mikroorganizmanın maksimum-özüün (intrinsic) özüün üreme hızı ( $sa^{-1}$ )
$v_m$	Reaksiyonun ileri yöndeki maksimum hızı ( $\mu mol/L.dak$ )
$N$	Deney sayısı
$k$	Bağımsız değişken sayısı
$n_0$	Merkezdeki deney sayısını ifade eder.
$\beta$	Katsayı vektörü
rpm	devir/dak
BBD	Box-Behnken dizayn
CYY	Cevap yüzey yöntemi
CCD	Merkezi bileşke tasarımı (Central composite design)
DM	Doehlert Matrix

## 1 GİRİŞ

Enzimler hücrenin içinde gerçekleşen binlerce kimyasal reaksiyonu katalizleyen moleküllerdir. Teknolojinin ilerlemesi ve biyoteknolojinin enzimler üzerinde yoğunlaşması ile kullanım alanları oldukça genişlemiştir. Dünyada üretilen enzimlerin yaklaşık %80'i mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalar kullanılarak her yıl üretilen saf enzimlerin miktarları 500 ton gibi değerlere ulaşmıştır. Ayrıca enzimleri diğer proteinlerden ayırmak ve saf halde elde etmek de mümkün hale gelmiştir (Beynon ve Bond, 1989)

Esterifikasyon ve transesterifikasyon zincirleri için mükemmel bir katalizör olan lipaz, aynı zamanda endüstriyel uygulamalarda birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle mikrobiyal kaynaklı lipazlar, biyoteknolojik uygulamalar ve organik kimyada yüksek oranda kullanılmaktadırlar. Lipaz (triacilgliserol hidrolaz), kamçılı bir mantar olan *Rhizopus* türü mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir.

Günümüzde mikrobiyal kaynaklı lipazlar, gıda endüstrisinde, eczacılıkta transesterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında, kozmetik sanayiinde kullanılan ürünlerin içeriğindeki kimyasal maddelerin sentezlenmesinde, deri, kağıt ve deterjan endüstrilerinde, yağların hidrolizi amacı ile kullanılmaktadır. Tüm bu geleneksel kullanım alanlarının yanı sıra, lipazlar son yıllarda atıksuların arıtımında da geniş uygulama alanları bulmaktadırlar. Gıda endüstrisi, evsel ve lokanta atıksuları, mezbaha, deri endüstrileri atıksuları, ağır metallerle birlikte, düşük biyobozunma özelliği gösteren yüksek miktarlarda sıvı ve katı yağlar içermektedirler. Bu kaynaklardan gelen atıksuların biyolojik yöntemlerle arıtımı, lipazların yeni ve ümit verici uygulamalarından biridir (Lairon vd., 1978).

Taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde oldukça yaygın olarak kullanılan ağır metal iyonlarının neden olduğu su kirliliği önemli bir kirlilik türüdür. Ağır metal kirliliği içeren atıksular suda yaşayan ve bu suyu kullanan canlılar için oldukça zehirli etkiye sahip, inorganik karakterli sulardır. Bu tür kirleticileri içeren atıksuların, su standartlarına göre kontrolünün yapılması ve atıksudaki derişimlerinin mutlaka istenen seviyelere düşürülmesi gereklidir. Ağır metal içeren atıksuların



konvansiyonel yöntemlerle arıtımının yanısıra, bazı mikroorganizmaların ağır metal biyobirikimiyle metal gideriminde etkin bir rol oynadığı bilinmektedir (Açikel ve Ersan 2010).

Üreyen hücreler (growing cells), üreme periyodunu tamamlamış hücreler (resting cells), ölü hücreler (dead cells) ve biyolojik kaynaklı sorbentlere dayanan arıtım yöntemleri, toksik metal miktarlarının uluslararası düzeyde kabul edilebilir sınır değerlere düşürülmesi için verimli, ekonomik ve çevre dostu alternatif yöntemler oluşturmaktadır. Ağır metal giderim prosesinde en önemli ilerleme, metal gideriminden sorumlu metalleri katalizleyen enzimlerin belirlenmesidir.

*R. delemar* mikroorganizması belirli bileşenleri içeren besin ortamlarında ve uygun pH değerinde asit fosfataz enzimini üretir. Metal giderimi hücreye bağlı metal fosfat olarak ağır metallerle çöken, inorganik fosfatı serbest bırakan hücreye bağlı fosfataz aracılığı ile gerçekleştirilir. Metal biyobirikimi ön üreme esnasında üretilen asit tipi fosfataz aracılığı ile gerçekleştirilir. Asit fosfataz uygun organik veya inorganik fosfat kaynağından  $\text{HPO}_4^{-2}$  'yi serbest bırakır. Bu fonksiyonu üreme periyodunu tamamlamış ve/veya tutuklanmış mikroorganizma hücreleri de gösterebilir (Gadd,1990). Hidrojen fosfat  $\text{M}^{+2}$  ile stokiyometrik olarak çökerek, hücre yüzeyine  $\text{MHPO}_4$  oluşturmak üzere sıkıca bağlanır. *R. delemar*' ın asit fosfataz üretmesi besin ortam bileşeni olarak mısır maserasyon sıvısı ve nişasta kullanarak sağlanmaktadır (Tsekova ve Galobova, 2003).

Bu tez çalışmasında *R. delemar* mikroorganizmasıyla ağır metal iyonlarının biyobirikiminde doğrudan rol oynayan asit fosfataz enziminin, metal biyobirikiminde doğrudan rol oynamayan, fakat atıksulardaki lipidlerin gideriminde etkin olan lipaz enziminin üretimi incelenmiştir. *R. delemar* lipazının en uygun üreme koşullarının saptanması amacıyla ortam pH' ının, sıcaklığının, besin ortamı bileşenlerinin, indükleyicilerin ve yüzey aktif maddelerin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada karbon kaynaklarının mikroorganizma konsantrasyonu ve lipaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için substrat olarak glikoz, sakkaroz ve melas kullanılmış, yüzey aktif madde olarak tween 80' in etkisi incelenmiş ayrıca ticari yağların aktivite üzerine etkileri araştırılmış ve bunların optimum değerleri bulunmaya çalışılmıştır. Benzeri şekilde *R. delemar*' ın asit fosfataz enzimi üretmesi için uygun besin ortamı bileşenleri ve ortam pH' ı belirlenmiştir. Mikroorganizmanın her iki enzim aktivitesi üzerine ağır metal iyonlarının, Cu(II), Zn(II) ve Ni(II) etkileri incelenmiştir.

Ağır metalsiz ortamda mikroorganizmanın maksimum- (intrinsic) özgül üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve Monod sabiti ( $K_s$ ) hesaplanmıştır. Daha sonra *R. delemar*' ın üreme hızı üzerine ağır metal iyonlarının inhibisyon türü belirlenmiştir. Ortamda ağır metal iyonlarının bulunmasının maksimum-görünür (apparent) özgül üreme hızlarını ( $\mu_m$ ) azalttığı belirlenerek değerleri saptanmıştır. Mikroorganizmanın ürettiği asit fosfataz enzimi için Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve reaksiyonun ileri yöndeki maksimum hızı ( $v_m$ ) belirlenmiştir. Ortamda bulunan ağır metal iyonlarının asit fosfataz enzimi üretimi üzerindeki inhibisyon türü belirlenerek inhibisyon sabitinin ve ileri yöndeki maksimum hızların değerleri saptanmıştır. Çalışmaların daha sonraki aşamasında asit fosfataz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilen Cu(II), Ni(II) ve Zn(II) biyobirikimi ve/veya biyosorpsiyonu üreyen hücreler, üreme periyodunu tamamlamış hücreler ve ısıl işlemden geçirilerek öldürölmüş hücrelerle gerçekleştirilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, maksimum metal gideriminin üreyen *R. delemar* hücreleriyle elde edilirken, üreme periyodunu tamamlamış hücrelerin en düşük metal kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir.

Mikroorganizma üremesi, asit fosfataz üretimi ve metal biyobirikim koşullarını tasarlamak amacıyla yüzey cevap yöntemi (CYY, response surface method, RSM) kullanılmıştır. Elde edilen değerler, ANNOVA (Analysis of variance) istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiş, kullanılan yöntemin doğruluğu ve geçerliliği tartışılmıştır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Canlıların Sınıflandırılması ve Mikroorganizmalar

Canlıların belirli özellikleri göz önüne alınarak yapılan gruplandırmaya sınıflandırma veya biyosistemantik denir. Sınıflandırmayı inceleyen bilim dalına sistemantik (taksonomi) denir. Canlılar temel olarak 6 grupta sınıflandırılır. Bunlar monera, protista, bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve mikroorganizmalardır. Protista (mikroorganizma) grubundaki canlılar iki sınıfa ayrılırlar.

- a. Prokaryotlar: En ilkel tek hücreli canlılar olan bu grubun başlıcaları bakteriler, virüsler, bakteriyofajlar ve mavi-yeşil alglerdir.
- b. Ökaryotlar: Prokaryotlardan daha gelişmiş canlılar grubudur. Hücre yapılarında farklılıklar vardır. Mantarlar, tek hücreli hayvanlar (protozoalar) ve su yosunları (algler) bu gruba girerler (Pekin, 1980).

Mantarlar, çok hücreli ve tek hücreli olabilen ökaryotik canlıları kapsayan bir canlılar alemi ve şapkalı mantarların tümüne halk arasında verilen genel addır. Mantarlar (funguslar) çok şekilli ve hakiki çekirdeğe sahip oldukları için bakterilerden, fotosentetik pigmentleri olmadığı için alg ve yosunlardan ayrılır. Mantarlar şapkalı mantarlar, küf mantarları ve mayalar olmak üzere üçe ayrılırlar. Şapkalı mantarlar klorofil içermediklerinden çoğunlukla ölü veya ölmek üzere olan bitki ve bitkisel artıklar üzerinde saprofit olarak yaşarlar. Küf mantarları özellikle havada bulunan sporları nemli ve besinli ortamda çoğalarak meydana gelen mantarlardır. Binlerce çok küçük (mikroskobik) mantarın biraraya gelmesiyle oluşur. Küf yapmayı sağlarlar. çevredeki atıkları çürüterek doğaya katkıda bulunurlar. Sütü ekşitirler, sirke yapımını sağlarlar. Ekmek yapımında da maya olarak kullanılırlar. Hastalık yapanları ise çok çeşitli hastalıklara yol açar. Hatta bu hastalıklar öldürücü olabilir. Küf mantarlarından hif denilen organlarıyla antibiyotik (penisilin) üretilmiştir. Bir kısmı hayvanlar ve insanların üzerinde parazit olarak yaşarlar. Mayalar ise mantarların alt grubudur ve tek hücreli canlılardır. Hücre büyüklüğüne göre bakterilerle yüksek mantarlar arasında yer alırlar (Shuler ve Kargı, 1992).

## **2.2 Mikroorganizmaların Büyüme Ortamı**

Mikroorganizmaların gelişme ve büyümeleri için gerekli besinleri ve uygun koşulları içeren ortama 'besi' ya da besin yeri (ortamı) adı verilir. Mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürmelerini sağlayan besinlere substrat denir. Mikroorganizmaların gelişmeleri için besin olarak bol miktarda karbonlu ve azotlu organik maddelerden yararlanılır. Karbon mikroorganizmanın enerji kaynağıdır. Fakat aynı karbon kaynaklarını parçalama şekilleri mikroorganizmadan mikroorganizmaya çok değişiklik gösterir. Ekseri mayalar nişastayı ya hiç ya da yeter derecede hızlı parçalayamadıkları halde, hidrokarbonlarda olduğu gibi şekerleri kolaylıkla parçalayabilirler. Parçalanma ilk olarak parçalayıcı enzimlerin substrata adaptasyonlarından sonra meydana gelir.

Azot kaynağı olarak genelde  $\text{NH}_4$  ve  $\text{NO}^{-3}$  gibi anorganik azotlu maddeler asimile edilebilir. Ürün, pürin, çeşitli aminoasitler, pepton, maya ekstraktı ve protein azot kaynağı olarak sıkça kullanılır. Ancak besin yerinin hazırlanmasında bunların dışında belirli oranda fosfor ve kükürt içeren organik ya da inorganik maddeler ile O, H, P, S, K, Ca, Mg, Fe, ve kısmen eser element olarak Mn, Cu, Zn, Mo, Co, Ni, V, B ve Na' a gereksinim duyulur. Bu eser elementlerin pek çoğu diğer tuzlar ve kompleks maddeler içinde bulaşmış bir halde bulunurlar (Bailey ve Ollis, 1977; Pekin, 1980; Gözükara, 1997).

### **2.2.1 Mikroorganizmanın Büyümesine Etki Eden Parametreler**

#### **2.2.1.1 pH**

Mikroorganizmanın gelişmesi için besin ortamının pH' ı çok önemlidir. Birçok bakteri nötral ortamda gelişir. Üreme için optimum pH, enzim üretimi ve ürün oluşumu için olan optimum pH' dan farklı olabilir. Aynı zamanda pH, organik asitlerin üretimi, asitlerin özellikle de aminoasitlerin kullanımı veya bazların üretimi nedeni ile de değişebilir. Bir tampon veya aktif pH kontrol sistemi aracılığı ile pH kontrolü sağlanabilir (Shuler ve Kargı, 1992).

#### **2.2.1.2 Sıcaklık**

Her mikroorganizmanın gelişebildiği en düşük sıcaklık, en hızlı gelişebildiği sıcaklık ve gelişebildiği en yüksek sıcaklık vardır. Mikroorganizmalar en uygun üredikleri sıcaklık aralığına göre ;

- 1) Psikrofilik
- 2) Termofilik
- 3) Hiper termofilik
- 4) Mezofilik olmak üzere dört gruba ayrılır.

Optimum sıcaklık mikroorganizmanın üreyebildiği maksimum sıcaklığa daha yakındır. Maksimum sıcaklığın üzerinde mikroorganizmanın içindeki proteinler denatüre olur. Minimum sıcaklığın altında sitoplazmik membran donar, besin taşıma ve proton yükü (gradienti) oluşturamaz. 45 °C ile 80 °C de üreyen mikroorganizmalar termofilik olarak, 80 °C' nin üstündekiler hiper termofilik olarak adlandırılır. Bunlar kaynayan sıcak sularda, denizin dibindeki hidrotermal deliklerde yaşarlar. Mikroorganizmalarda yüksek sıcaklığa dayanıklı makromoleküller vardır. Mezofillerin optimum üreme sıcaklığı 25°C-45 °C' dir. Doğadaki mikroorganizmaların çoğu mezofiliktir.

### 2.2.1.3 Oksijen İhtiyacı

Mikroorganizmalar O<sub>2</sub> ihtiyaçlarına göre aşağıdaki gibi gruplandırılırlar;

1. Aeroblar: %21 oranında oksijen varlığında üreyenler ve daha fazla O<sub>2</sub> içeren ortamlarda (hiperbarik oksijende) üreyenler bu grupta toplanır.
2. Mikroaerofilikler: Oksijen miktarı havadakinden daha az (%17) olduğunda üreyen mikroorganizmalar. Bunlar oksijenle yapısı bozulan enzimlere sahiptirler.
3. Fakültatifler: Hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında üreyenler.
4. Anaeroblar: Son elektron alıcı olarak O<sub>2</sub>' yi kullanacak solunum sistemi olmayanlar anaerobik mikroorganizmalardır. İki tip anaerobik organizma vardır.

**Aerotolerant anaeroblar:** O<sub>2</sub>' nin varlığında da üreyenler ve O<sub>2</sub>' ye toleranslı olanlar.

**Zorunlu anaeroblar:** O<sub>2</sub> varlığında üremeyenler. Zorunlu anaeroblar oksijen metabolizmasının bazı ürünlerini detoksifiye edemediklerinden ölürler. Oksijen indirgenğinde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve hidroksil radikalleri (OH<sup>-</sup>) oluşur. Zorunlu anaeroblarda flavin enzimleri vardır. Bu da O<sub>2</sub> ile kendiliğinden reaksiyona girerek bu toksik ürünleri üretir. Aeroblarda bu toksik oksijen ürünlerini ortadan kaldıracak enzim sistemleri vardır. Bazı durumlarda daha iyi bir oksijensiz koşul yaratmak için fermentasyon sıvısı içine CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> verilir (Shuler ve Kargı, 1992).

#### **2.2.1.4 Nem Miktarı (Su Aktivitesi)**

Mikroorganizmalar için mevcut olan suyun miktarı ortama şeker ve tuz katıldığında azalır. Su aktivitesi gıdanın yüzeyinde mikroorganizmanın kullanabileceği sudur. Eğer ortam yüksek osmotik basınca sahipse ortamın su aktivitesi düşüktür. Mikroorganizmalar düşük su aktiviteli ortamda ancak içlerindeki erir madde konsantrasyonunu arttırarak yani içlerini daha hipertonic yaparak dışarıdan su çekerler. Bu amaçla bakteriler kolin, prolin, glutamik asit ve diğer amino asitleri ya dışarıdan taşıy ya da kendisi sentezler. Mantarlar ve algler ise arabitol, gliserol, mannitol gibi poli alkoller veya sakkaroz biriktirerek dışarıdan su çekerler. Poli alkoller ve amino asitler hücreye zarar vermezler. Halofilik bakterilerde  $K^+$  ve glycine betaine, aşırı halofilik bakteride ise ectoine bu rolü görür.

### **2.3 Mikroorganizmaların Üreme Evreleri**

Sıvı besiyerine belirli sayıda mikroorganizma ekilecek ve düzenli aralıklarla bu besiyerinden alınan örneklerin her milimetresindeki mikroorganizma sayısı sayılacak olursa bunların düzenli ve aynı hızda üremedikleri görülür. Mikroorganizmaların üremesinde zamana bağlı olarak dört evre vardır.

#### **2.3.1 Gecikme Evresi (Başlangıç Evresi)**

Bu dönemde mikroorganizmaların üremesinde bir gecikme gözlenir.

Gecikme evresi aşağıdaki durumlarda görülür;

1. Eğer aşı durgun evredeki mikroorganizmadan veya üreme periyodunu tamamlamış kültürden alınmış ise gecikme evresi gözlenir.
2. Hücreler ısı, radyasyon veya toksik kimyasallarla muamele edildikten sonra yeni bir ortama ekilirlerse gecikme evresi görülür. Çünkü bu hücrelerin kendisini onarması için zaman gerekir.
3. Zengin bir besiyerinden alınan mikroorganizma zayıf içerikli bir besiyerine ekilirse gecikme evresi görülür. Üstel üreme evresine girmiş mikroorganizmalar aşı olarak aynı içerikli taze bir ortama ekilirse gecikme evresi görülmez (Tsekova ve Galabova, 2003).

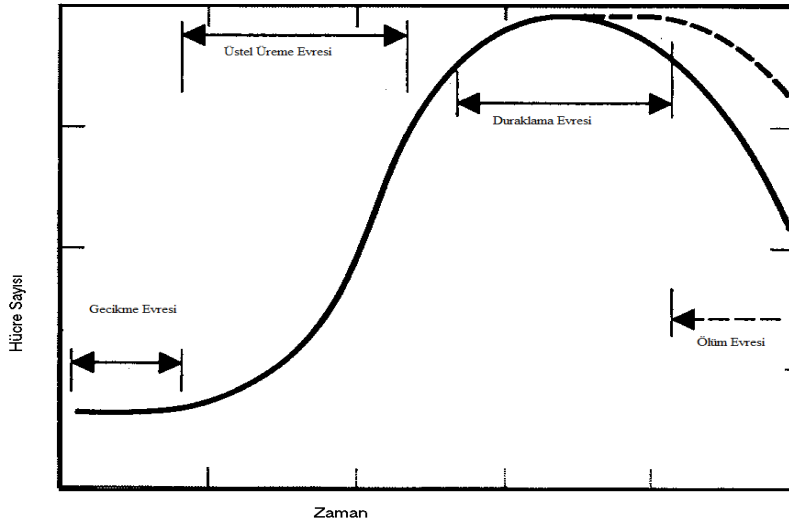
#### **2.3.2 Üstel Üreme Evresi**

Mikroorganizma sayısının hızla arttığı dönemdir. Her 20 dakikada bakteri türü mikroorganizmaların sayısı iki katına çıkar. Bu evrede mikroorganizmaların canlı, genç

ve üretken olduğu kabul edilir. Mikroorganizma sayısı ya da konsantrasyonu belirli bir düzeye ulaştınca üstel üreme evresine ulaşılır. Üstel üreme evresinde mikroorganizmalar üstel olarak arttığı için kesikli kültürlemede ortamdaki besinler giderek azalır. Ortamda inhibe edici ürünlerde oluşabileceği için mikroorganizmalar maksimum konsantrasyona ulaşmayabilir.

### 2.3.3 Duraklama Evresi

Üstel üreme evresinden evreden sonra mikroorganizmaların yaşlanması ve ölüm olayının belirginleşmesi nedeni ile çoğalma hızında azalma gözlenir. Buna duraklama evresi denir. Duraklama evresi, hızlı büyümeden bir strese tepki haline geçiş dönemidir, DNA tamiri, antioksidan metabolizması ve besin taşınması ile ilişkili genlerin ifadesinde bir artış olur (Hecker ve Völker, 2001).



Şekil 2.1. Mikroorganizma büyüme evreleri

### 2.3.4 Sabit Evre

Bu evrede kimi mikroorganizmalar ürer, kimileri ölür ve bazıları da çoğalmadan yaşamlarını sürdürür. Bu üç etmen birbirini dengelediği için mikroorganizma sayısında zamana göre net bir artış gözlenmez.

### 2.3.5 Ölüm Evresi

Bu evrede mikroorganizmaların ölüm hızları arttığı için zamanla konsantrasyonlarında

azalma gözlenir. Bu evrede mikroorganizmaların dışa salgıladığı enzimlerden dolayı hücre zarlarında parçalanma ve hidroliz olayları belirgin bir hal alır. Hidrolitik ve lipolitik enzimlerin medana getirdiği bu olaya genel olarak 'lisis' denir (Pekin, 1980; Shuler ve Kargi, 1992).

### **Kemostat:**

Hücreler uzun süre sabit çevrede tutulmak istendiğinde devamlı kültür tekniği kullanılır. Burada sabit bir hacimde taze besiyeri ortama sürekli olarak ilave edilir. Yine aynı hacimde besiyeri ortamdan devamlı uzaklaştırılır. Böyle bir sistem dengededir. Bu sistemde hücre sayısı ve besin durumu sabittir. Sisteme yatışkın durumda çalışan sistem (steady system) denir. Devamlı kültür aletine kemostat denir. Bu sistem hem kültürün popülasyon yoğunluğu hem de kültürdeki büyüme oranını kontrol eder. Seyrelme oranı, karbon ve azot kaynağı gibi sınırlı besin konsantrasyonu kemostat kontrolünde kullanılır. Bu alette popülasyon yoğunluğu rezervuarlarda bulunan sınırlı besinin konsantrasyonu ile kontrol edilir. Büyüme oranı ise akış oranı ile kontrol edilir. Bu akış oranı (besiyerine ilave edilen taze besiyeri oranı) ve besiyerindeki madde miktarı ayarlanabilir. Kemostatdaki hücre yoğunluğu (hücre/ml) ortamdaki sınırlı besin seviyesi ile kontrol edilir (<http://www.metindigrak.com/mikrobioloji/gelisme.htm>).

### **2.4 *Rhizopus delemar***

*Rhizopus delemar*, etkili ağır metal biyosorbenti olarak bilinir (Tsekova ve Galabova, 2003). Spor oluşturan bir küf mantarı türüdür. Optimum çoğalma sıcaklığı 30-35 °C olup, minimum 5-7 °C ve maksimum 44-49 °C olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında ürer. Koloniler çoğalma periyodunun değişik evrelerinde beyazdan kahverengiye dönüşerek ve genellikle sıvı besin ortamının yüzeyinde 10 mm yüksekliğine ulaşabilen küf oluşturarak ürerler. Filamental yapının oluşması yaklaşık olarak 10-15 gün, rengin kahverengiye dönmesi 15-20 günlük bir süre alır. Patates dekstroz agar, malt özütü, maya özütü, glikoz ve soya pepton gibi besinleri içeren ortamlarda özellikle pH 5.0-5.5 aralığında hızlı büyürler. Besin ortamı çok asidik olmamak kaydıyla diğer pH' larda da ürerler (Sağ, 2006).

### **2.5 Enzimler**

Enzimler, protein yapısında, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden organizma için



önemli maddelerdir. Enzimler reaksiyon esnasında harcanmaz ve ortamda kalırlar. Her enzimin bir substratı vardır. Her enzim özgül bir kimyasal reaksiyonu katalize eder. Mikroorganizma metabolik aktivitesini sürdürebilmesi için bir değil birden çok enzim sistemine ihtiyaç duyar. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde (endoenzimler), bir kısmı da hücre dışında (ekzoenzimler) görev yaparlar. Ekzoenzimler hücre dışında bulunan besinleri hücre içine alınacak hale getirir. Endoenzimler ise hücrenin yapı taşlarının oluşturulmasında ve hücre için gerekli enerjinin sağlanmasında görev alırlar. Bir molekül enzim bir dakika içinde bir milyon substrat molekülünü etkileyebilir.

Enzimler, yapı ve uyum enzimleri olarak ikiye ayrılırlar.

■ **Yapı enzimleri:** Bakteri hücresinde her zaman, yani sentezlenecek madde olmadan da vardır. Bu enzimler genelde bakterinin yapı taşlarının sentezinde görev alırlar.

■ **Uyum enzimleri:** Bir uyarı varlığında oluşan enzimlerdir. Uyarı bittiğinde miktarları çok azalır.

Bir kısım enzimler işlevleri sırasında kendilerini aktive eden protein yapıda olmayan organik moleküllere gerek duyarlar. Bu moleküllere prostetik grup ya da **koenzim** adı verilir. Enzimlerin protein kısmına apoenzim, apoenzim ve koenzimden oluşan komplekse ise haloenzim denir. Apoenzimler özgül etki göstermelerine karşılık, koenzimler bir çok apoenzime bağlanarak çeşitli kimyasal reaksiyonlara katılabilirler. Bazı enzimler ise, aktive olabilmek için koenzimler dışında **kofaktör** denilen bazı aktivatör maddelere ihtiyaç duyarlar (Şekil 2.2). Bu enzimler kofaktör olmaksızın etkinlik gösteremezler. Kofaktörler çoğunlukla metalik iyonlardır. Başlıcaları ise Fe(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II)' dir. Eğer enzim koenzim ve kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif ise enzimin bu haline haloenzim adı verilir. Eğer enzim koenzim ve kofaktörden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelecek olursa enzimin diyalize edilemeyen ve yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif şekline ise apoenzim adı verilir (Gözükara, 1997).

Enzimler, aktivite gösterirken bir çok dış etmenden etkilenir. Bunların başlıcaları şunlardır.

■ Enzimler etkinlik gösterirken çevre sıcaklığından direkt olarak etkilenirler. Her enzimin en etkin olduğu bir optimum, az etkin olduğu bir minimum bir de maksimum sıcaklık sınırı vardır. Ortamın pH derecesinden de enzimler etkilenir. Enzimlerin etkinlik gösterdikleri optimum, minimum ve maksimum pH değerleri bulunur.

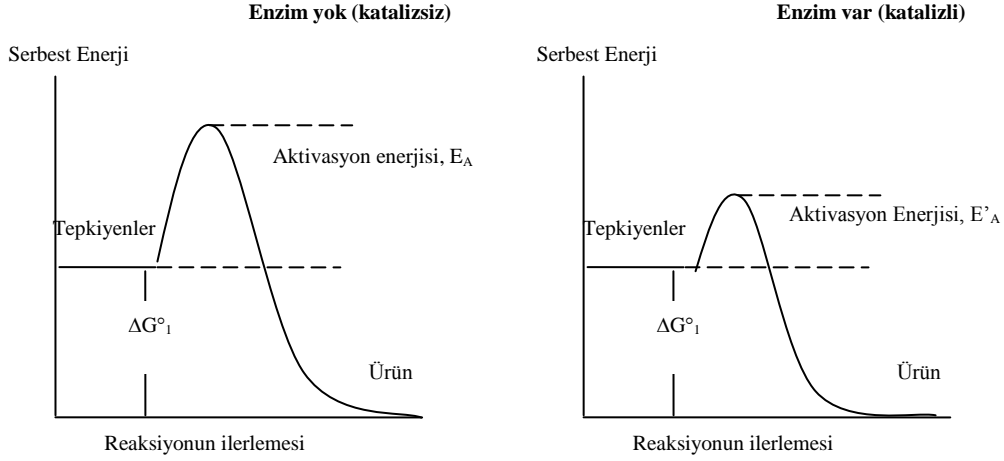
- Enzimlerin etkilediği substratın, ortamdaki konsantrasyonu ne kadar fazla ise, enzimin etkinliği o denli azalma gösterir.
- Ortamda tuz yoğunluğu fazla ise enzimatik etkinlik azalır.
- Ortamda bulunan çeşitli kimyasal maddeler, enzimlerin yapısında bozulmaya neden olacaklarından etkinliklerinde de azalmaya neden olurlar.
- Ultraviyole, X ışınları gibi fiziksel etmenlerden enzimlerin işlevleri olumsuz etkilenir (<http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite03.pdf>).

Katalizleme olayı, enzimin üzerinde bulunan ve etkin bölge olarak bilinen çok küçük bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Katalizleme sırasında substrat etkin bölgeye bağlanır. Maksimum katalitik etki, bu bölgede bulunan fonksiyonel grupların en uygun konuma gelmesiyle oluşur (Pekin, 1980; Ekiz, 1985). Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilse de aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmaları gerekmez. Son yıllarda geliştirilen yöntemlerle hücreden arı sistemlerde fakat yine hücrel organelleri ve molekülleri kullanarak enzimleri hücre dışında sentez etmek mümkün hale gelmiştir. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler olarak ortam pH'ı, sıcaklık, substrat derişimi, zaman, çeşitli iyonların derişimleri ışık gibi faktörler sırlanabilir (Gözükara, 1997).

Substrat ve enzimin birbiriyle bağlanmasıyla ilişkili çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Birinci hipotez anahtar-kilit modelidir. Bu hipotezde substratın aktif merkezde enzime bağlanırken anahtar kilit gibi bağlandığı kabul edilmiştir. İkinci hipotez ise indüklenmiş uyum hipotezidir. Bu hipotezde ise enzim substratı olmadığı zaman serbest olarak bulunmaktadır. Ancak substratı ile buluşacak olursa enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır (Shuler ve Kargı, 2002). 1913 yılında Michaelis-Menten enzim substrat ilişkisini incelemiş ve bugün kendi adı ile anılan eşitliği türetmiştir.

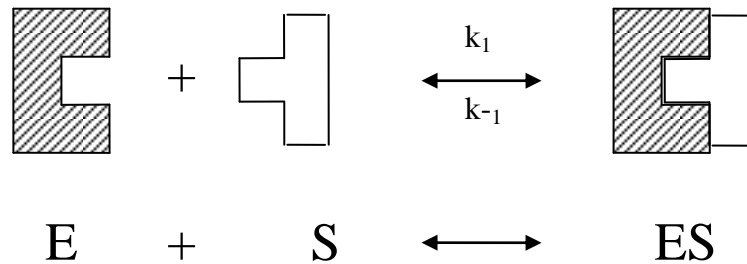
### **2.5.1 Enzim-Substrat Kompleksi Oluşum Modelleri**

Enzimler katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini, substrata bağlanarak ve enzim substrat kompleksi oluşturarak düşürürler. Enzimler serbest enerji değişimini ya da denge sabitini etkilemezler. Şekil 2.2' de enzimin reaksiyonun aktivasyon enerjisine etkisini görülmektedir. Enzim üzerindeki, substrat ile etkileşen küçük gruplar, birçok durumda düşük enerjili reaksiyon yolu sağlayarak aktivasyon enerjisini azaltırlar ve bu nedenle reaksiyonu hızlandırırlar.

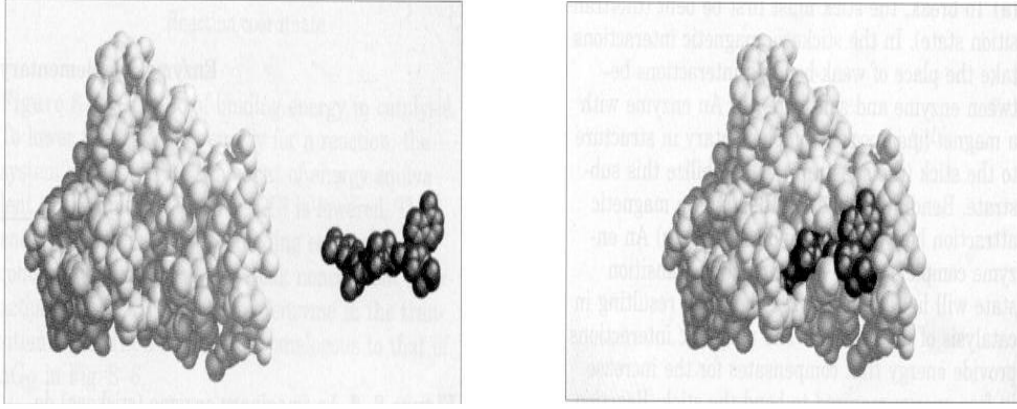


Şekil 2.2 Enzim katalizli ve katalizsiz reaksiyonların aktivasyon enerjileri (Shuler ve Kargi, 2002).

X – ışını ve Raman spektroskopisi kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar enzim–substrat (ES) kompleksinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ancak enzim–substrat etkileşimi moleküler açıdan henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu etkileşim farklı enzim – substrat kompleksleri için farklı olabilir. Enzim ve substrat arasındaki etkileşim genellikle zayıf van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı ES komplekslerinin oluşumunu sağlar. Substrat aktif bölge olarak bilinen enzimin özel bir bölgesine bağlanır. Substrat bağıl olarak küçük bir moleküldür ve çok daha büyük olan enzim molekülünde belli bir bölgeye yapısal olarak uyar. Bu etkileşimi anlatan en basit model Şekil 2.3’ de verilen enzimi kilit, substratı anahtar olarak alan anahtar – kilit modelidir (Erdal, 2004).



Şekil 2.3 Anahtar kilit modeli

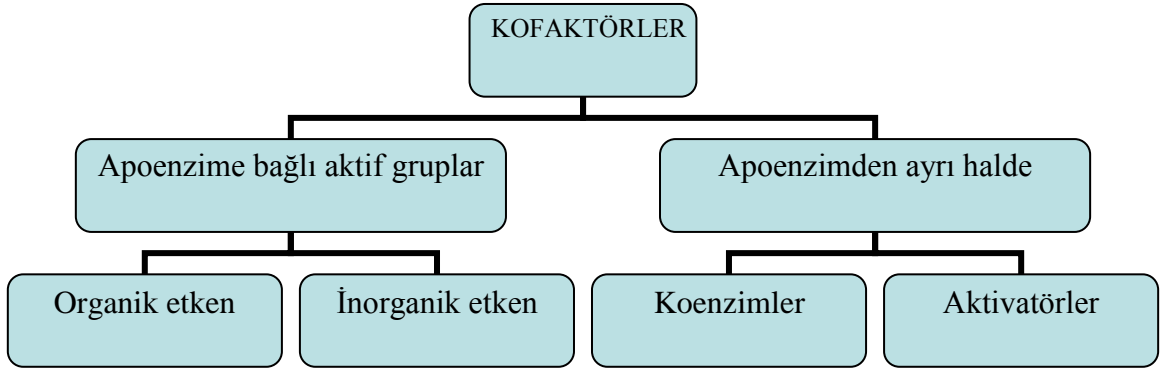


Şekil 2.4 Enzim –substrat kompleksinin oluşumu

Enzim üzerindeki spesifik amino asit yan zincirleri, metal iyonları, koenzimler gibi fonksiyonel gruplar, substrat ile geçici olarak etkileşebilirler (Şekil 2.4) ve reaksiyon için substratı aktive ederler.

### 2.5.2 Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler kullandıkları substratın veya katalize ettikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılmaktadır. Genellikle enzimler, enzimin etkilediği substratın sonuna “ase = az” eki getirilerek adlandırılmaktadır. Örneğin, üreaz üreyi amonyak ve karbondioksit ayırmaktadır. Amilaz ise nişastayı hidroliz eden enzimdir. Enzimler 6 esas sınıfa ayrılmıştır. Bunlar; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır. Her sınıf ayrıca alt sınıflara ve alt sınıflar da gruplara ayrılmıştır. Yeni keşfedilen ve sayıları hızla artan enzimler Uluslararası Biyokimya Derneği (International Union of Biochemistry–IUB) tarafından yeni bir sınıflandırmaya tabi tutulmuştur. Enzimlerin sınıflandırılmasına yönelik IUB sistemine göre her enzimin sistematik bir kod numarası (E.C) vardır. Her enzime sistematik bir kod numarası verilmiştir. Kod numaraları birbirinden ayrılmış 4 sayıdan oluşmaktadır. Bu sayılardan birincisi enzimin girdiği esas sınıfı, ikincisi alt sınıfını, üçüncüsü grubunu, dördüncü sayı ise enzimin o gruptaki kendine özgü olan sıra numarasıdır (Bailey ve Ollis, 1977; Shuler ve Kargı, 1992).



Şekil 2.5 Kofaktörlerin sınıflandırılması (Pekin, 1980; Erdal, 2004)

### 2.5.3 Enzimlerin Katalitik Özellikleri

Enzimler biyolojik reaksiyonları katalize ettikleri için biyokatalizörler sınıfına girerler. Doğal enzimler molekül büyüklükleri bakımından genellikle kolloidal tanecikler sınıfına girerler. Bu nedenle kimyasal kataliz yönünden enzimler mikro heterojen katalizörler olarak adlandırılabilirler.

Bir enzim yüzlerce farklı atomlardan yapılmış bir kimyasal bileşiği etkilerken bu molekülün belirli bir bölgesini seçerek buradan bir veya iki atomu veya fonksiyonel bir grubu molekülün ana yapısını bozmadan koparır veya ilave eder. Başka bir kimyasal bileşik substrat yapısına çok benzese ve bazı grupların yerleri hafifçe değişik olsa bile enzim bu iki maddeyi birbirinden ayırt edebilmektedir (Gözükara, 1997).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri katalize ettikleri reaksiyon hızını tayin ederek saptanır. Enzim aktivitesi turnover sayısı ile belirlenir. Turnover sayısı 1 mol aktif enzim tarafından 1 dakikada ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Enzim örneklerinin spesifik aktivitelerini tanımlamak için turnover sayısı yerine 'enzim birimi' veya 'ünitesi' de kullanılır. Enzim birimi (U) dakikada 1 mikromol substrat dönüşümünü katalizleyen miligram enzim miktarı olarak tanımlanır. Reaksiyon spesifiklikleri bakımından enzimler 4 gruba ayrılırlar.

1. Salt spesifiklik: Bir enzim yalnız bir reaksiyonu hızlandırabiliyorsa böyle enzimlere salt ( mutlak) spesifik enzimler adı verilir.
2. Grup spesifikliği: Bu sınıfa giren enzimlerin etki alanı salt spesifik enzimlerden biraz daha geniştir. Örneğin pepsin enzimi bazı peptid bağlarının hidrolizinde

etki eden bir katalizördür.

3. Reaksiyon veya bağ spesifikliği: Kimi enzimler belli bir reaksiyon türlerini katalizlerler. Mesala lipazlar tüm trigliseridlerin tepkimelerini hızlandırırılar. Yalnız hız artışı yağın çeşidine göre değişiklik gösterir.

4. Stereokimyasal spesifiklik: Eğer bir enzim bir bileşğin yalnız bir stereokimyasal şekli üzerine etki ediyorsa, bu tür enzimler bu gruba girerler. Örneğin arjinaz enzimi l-arjininin üzerine etki yaparken d-arjinine hiç bir etki yapmaz (Bailey ve Ollis, 1977; Pekin, 1980).

## **2.5.4 Enzim Aktivitesine Etki Eden Parametreler**

### **2.5.4.1 pH Etkisi**

Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH' a o enzimin optimum pH' ı denir. Genellikle optimum pH değerinden uzaklaştıkça aktivite düşer, enzim denature olur veya inaktif hale geçer. Enzim çalışmalarında optimum pH da çalışabilmek için tampon çözeltiler kullanılır

### **2.5.4.2 Sıcaklık Etkisi**

Enzim reaksiyonları aktivite sıcaklık ilişkisi bakımından incelendiğinde kimyasal reaksiyonlardan farklılık gösterir. Enzim reaksiyonlarında belirli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızının dolayısıyla aktivitenin arttığı görülür. Enzimatik reaksiyonlar da bu sıcaklık sınırları içerisinde Arrhenius kanununa uymaktadırlar. Enzimler protein yapısında oldukları için belirli bir sıcaklıktan sonra yapıları bozulmaya başlayarak, denatüre olurlar.

### **2.5.4.3 Substrat Konsantrasyonu Etkisi**

Substrat konsantrasyonu arttıkça, reaksiyon hızının arttığı, dolayısıyla enzim aktivitesinin arttığı görülür. Substrat konsantrasyonu belirli bir değere ulaşıncı iki ihtimal sözkonusudur: substratın inhibe edici etkisi varsa reaksiyonun yavaşladığı gözlemlenir, inhibe edici bir etkisi yoksa, substrat konsantrasyonu ne kadar artırılırsa artırılırsın hızın değişmeden sabit kaldığı gözlemlenir.

### **2.5.4.4 Aktivatörler**

Genellikle enzim aktivatörleri, küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir.

Bunlar kofaktörlerin tersine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörler iki gruba ayrılırlar.

- i) sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayanlar
- ii) serbest enzimlerle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler

Sadece enzimlerle birleşen aktivatörler küçük metal iyonlarıdır. Örneğin karbonhidraz ve karboksipeptidazın aktivatörü Zn (II) veya Co (II) 'dir.

### **2.5.5 Fermantasyon ve Enzimatik Tepkimelerde Reaksiyon Hızlarının Tayini Yöntemleri**

Fermantasyon, substratın bakteriler, mantarlar veya diğer mikroorganizmalar aracılığıyla, genellikle ısı vererek ve köpürerek kimyasal olarak bozunması olayıdır. Fermantasyon anaerobik şartlarda, yani oksidatif fosforilasyon olmadığı durumlarda, glikoliz yoluyla ATP üretimini sağlayan önemli bir biyokimyasal süreçtir.

Fermantasyonda glikoz (veya başka bir substrat) hidrojenlerini teker teker kaybederek enerji üretimini sağlar. Oksijen olmadığı için bu parçalanma sonucunda, ortaya çıkan basit organik bileşikler hücrenin kullanabileceği, nihai elektron alıcısı ve hidrojen alıcıları olurlar. Fermantasyonun son adımı (pirüvatın fermantasyon ürünlerine dönüşmesi) enerji üretme dahi, bu süreç anaerobik bir hücre için önemlidir, çünkü glikozun pirüvata dönüşmesi sırasında harcanan nikotinamid adenin dinükleotit'in ( $NAD^+$ ) yenilenmesini sağlar; glikolizin devamı için bu gereklidir. Örneğin alkol fermantasyonunda pirüvattan oluşan asetaldehit,  $NADH^+ H^+$  tarafından etanola dönüşür, bu da hücreden dışarı atılır. Glikozun fermantasyonunda genelde en sık üretilen basit bileşik pirüvat veya ondan türemiş bir veya bir kaç bileşiktir: bunlar arasında etanol, laktik asit, hidrojen, bütirik asit ve aseton sayılabilir. Şeker ve amino asitlerin fermantasyonu çeşitli canlılarda görülmekle beraber, bazı ender organizmalar alkanolik asitler, pürinler, pirimidinler ve başka bileşikler de fermente edebilir. Çeşitli fermantasyon tipleri ürettikleri ürünlere göre adlandırılırlar. Fermantasyon terimi biyokimyada oksijen yokluğunda enerji üreten reaksiyonlar için kullanılmasına karşın, gıda endüstrisinde daha genel bir anlam taşır, mikroorganizmaların oksijen varlığında yaptığı degradasyon reaksiyonlarını da kapsar (sirke fermantasyonu gibi). Biyoteknolojide bu terim daha da genel kullanılır ve büyük fermentörlerde üretilen mikroorganizmalarla gerçekleştirilen her türlü ürün üretime (proteinler dahil) fermantasyon denir. Fermantasyon proseslerinde zamana göre azalan substrat ya da

oluşan ürünler tayin edilerek reaksiyon hızları hesaplanır. Reaksiyon hızlarının tayini için, reaksiyon karışımlarından belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak substrat ya da ürün derişimindeki değişimler ölçülür. Burada dikkat edilecek en önemli nokta örnek alındıktan sonra, analiz sonuna kadar geçen süre içerisinde, örnekteki reaksiyonun devamını önlemek başka bir deyimle örnekteki reaksiyonu durdurmaktır. Alınan örneği birdenbire soğutmak ya da ısıtmak, örnek içerisine etkin bir inhibitör katmak, enzim ya da mikroorganizmayı ortamdaki ayırmak veya denatüre ederek etkisiz hale getirmek gibi işlemler bu amaç için kullanılabilir (Pekin, 1983).

## **2.6 Lipaz Enzimi ve Üretimi**

Lipazlar, enzimler içerisinde yağ asitlerini sentezleyen veya yağları hidrolizleyen lipolitik enzimler olduğundan önemli bir grup oluştururlar ve lipazlar gliserin ile yağ asitlerinden oluşan esterleri hidroliz eden enzimler olarak tanımlanır. Lipazlar sulu ortamda katı ve sıvı yağların ve diğer lipidlerin hidrolizini katalizleyerek diaçilgliserinler, monoaçilgliserinler, gliserin ve serbest yağ asitlerini oluştururlar. Enzimatik hidroliz tepkimesine lipoliz adı verilir.

Lipazların doğal substratları uzun zincirli yağ asitlerinin gliserin esterleri suda çok az çözünürler. Lipazlar, enzimin çözündüğü sulu faz ve su ile karışmayan substrat fazı arasındaki ara yüzeyde ester bağlarının hidrolizini katalizler. Gliseridler tercih edilen substratlarsa da lipaz enzimleri yağ asitlerinin diğer alkollerle yaptıkları esterleri de hidrolizleyebilirler. Ancak suda çözünen esterlere karşı aktiviteleri oldukça düşüktür. Lipazlar spesifik seçiciliği olan biyokimyasal katalizörler olup belirli özellikte ve yapıdaki ester bağlarına etkilidirler. Bu nedenle kimyasal katalizörlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan ürünlerin kontrolü mümkün değilken lipazlarla yapılan reaksiyonlar kontrol altında tutulabilir, istenmeyen yan ürünlerin oluşumu engellenebilir ya da minimum düzeyde tutulabilir. Lipaz enzimi ile katalizlenen enzimatik reaksiyonların bir diğer önemli avantajı reaksiyonların kimyasal prosese göre nispeten daha ılımlı koşullarda (nötral pH, sıcaklık, atmosferik basınç gibi) gerçekleştirilmesidir. Lipazlar substrat spesifikliklerinden dolayı reaksiyonu daha seçimli gerçekleştirirler. Lipolizinin spesifikliği ve derecesi kullanılan lipaza bağlıdır. Dünyada ticari olarak üretilen enzimlerin % 3' ünü lipazlar oluşturur. Lipazlar özelliklerine göre, spesifik olmayan lipazlar, 1,3-spesifik lipazlar ve yağ asidi spesifik lipazlar olarak üç ayrı grupta incelenir.



**Spesifik Olmayan Lipazlar:** Bu gruba giren lipazlar, trigliseridlerin tüm pozisyonlarındaki açıl gruplarını koparabilme yeteneğine sahip olup, sonuçta trigliseridleri, gliserin ve serbest yağ asitlerine parçalarlar. Reaksiyonda ana ürün olarak diaçil ve monoaçil gliserinler oluşur. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* ve *Geotrichum candidum* tarafından üretilen lipazlar bu gruba girerler (Elibol vd., 1997).

**(1,3)-Spesifik Lipazlar:** Bu gruba giren lipazlar nötral yağları eşdeğer konuma sahip olan 1 ve 3 pozisyonlarından spesifik olarak hidrolizlerler. Reaksiyon sonunda, triaçilgliserinlerden yağ asitleri, 1,2(2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşur. 1,2(2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler kimyasal olarak kararsız olup sırasıyla 1,3-diaçilgliserinlere ve 1,3-monoaçilgliserinlere izomerleşirler. Böylece oluşan izomerler enzim tarafından tekrar substrat olarak kullanılabilir ve sonuçta 1,3-spesifik lipazlar da spesifik olmayan lipazlar gibi trigliserinleri, gliserin ve serbest yağ asitlerine kadar parçalayabilirler. Pankreas, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* ve *Mucor* türlerinden elde edilen lipazlar 1,3-spesifiktir (Haas vd., 1992; Hatzinikolaou vd., 1996).

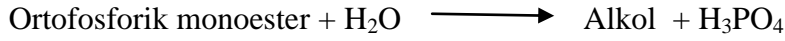
**Yağ Asidi Spesifik Lipazlar:** Yağ asidi spesifik lipazlar, açilgliserinlerdeki bazı yağ asitlerine spesifik olup, sadece bu yağ asidlerinin oluşturduğu ester bağlarını parçalarlar. Yağ asidi spesifik lipazlar, içesterleşme reaksiyonunda kullanılırsa, oluşacak ürünler çok sınırlıdır ve bu sayede amaca uygun triaçil gliserinler sentezlenebilmektedir. *Geotrichum candidum* tarafından üretilmiş lipazın, uzun zincirli bir yağ asidine özel bu tipinin, esterlerin hidrolizi için bir çok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Baillargeon vd., 1989).

Lipaz enzimleri, iç esterleşme prosesinde, serbest halden çok ekonomik açıdan daha uygun olan tutuklanmış halde kullanılırlar. Enzim tutuklanması için organik çözücülerden etkilenmeyen, inert desteklerin (taşıyıcı) kullanılması gerektiğinden, enzim tutuklanmasında kizelgur, diatome toprağı, selite, hidrosiapatit gibi inorganik taşıyıcıların kullanılması uygundur. Literatürde lipaz enzimini tutuklamak için kullanılan diğer malzemeler ise, silika jel, oyuklu elyaf, prepolimer reçineler, poliüretan prepolimerler, Ca-aljinat, reçineler (amberlite), jeller (octyl sefaroze, diaion), sefadeks, PVC, kitin, kitosan, agaroz ve sefarozdur (Sharma vd., 2001).

## 2.7 Asit Fosfataz Enzimi ve Üretimi

Fosfatazlar fosfomonoesterazlardır ve çeşitli fosfat esterlerinin, C-O-P bağlarının hidrolizini katalizlerler. pH değerlerine göre asit yada alkali fosfataz olarak sınıflandırılırlar (Stauffer, 1989). Asit fosfataz insan prostat bezinde bulunur ve prostat kanserinin tanısında kullanılır (Goldberg, 1966). Ölçülebilir büyüklükteki asit fosfataz aktivitesi, buğday tohumu kullanılarak, lipaz üretimi sırasında substrat olarak tracetin kullanıldığında elde edilmiştir (Singer, 1948).

Asit fosfataz enzimi pH=7' nin altında aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



Molekül ağırlıkları benzer üç farklı izoenzimi vardır. Optimum pH aralığı 4.0-5.5 arasında değişir. Enzim aktivitesi olan geniş bir esteraz molekülüdür. İnhibitörleri; florür, molibdat ve ortofosfat'dır (Verjee, 1969). Bu enzimler doğal ortamda oluşur, hayvan dokuları, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunur (Waymack ve Van Etten, 1991). Asit ve alkali fosfatazların peynirde oluştuğu bilinmesine rağmen, peynirin oluşumu sırasında düşük pH değerleri nedeniyle daha aktiftir (optimum pH=5). Peynir olgunlaşması sırasında, fosfatça zengin peptitler üretilir ki bunlar, fosfat artıklarının koruyucu etkisi yüzünden daha fazla proteolize dirençlidir ve serbest amino asitlerin aşırı oluşumu gözlenir. (Larsen ve Parada, 1988). Asit fosfataz aktivitesinin peynirde bulunmasına rağmen bu enzimin kaynağı tartışmalıdır ancak saflaştırılarak elde edilebilmiştir. (Fox vd., 1993; Bingham ve Zittle, 1963). Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretebilen bu enzim son yıllarda yapılan bazı araştırmalara konu olmuştur. *Lactobacillus plantarum* DPC2739 isimli bakterinin ürettiği dış hücresel asit fosfataz incelenmiş, optimum üretim şartları 40 °C sıcaklık ve pH 3.5-5 aralığında bulunmuştur (Abdallah vd., 1999). Asit fosfataz ürettiği bilinen diğer mikroorganizmalar; *Escherichia coli* (Horiuchi ve Mizuno, 1959), *Saccharomyces cerevisiae* (Schmidt, 1963), *Neurospora crassa* (Nyc, 1967), *Euglena gracilis* (Blum, 1956) ve *R. delemar*'dır. Ağır metal gideriminde asit fosfataz üreten mikroorganizmalardan yararlanılmasına rağmen fosfatazın metal giderim mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak asit fosfatazın ( $\text{HPO}_4^{-2}$ ), hücre duvarında metallerle bağ yaparak fosfataz bileşikleri

oluşturduğu ( $PbHPO_4$ ,  $CdHPO_4$ ,  $UO_2HPO_4$ ) ve metal giderimini bu şekilde sağladığı düşünülmektedir.

## **2.8 Atıksu Kirliliği**

Evsel, endüstriyel, tarımsal ve diğer kullanımlar sonucu kirlenmiş veya özellikleri kısmen veya tamamen değişmiş sulara atıksu denilmektedir. Doğaya arıtılmadan verilen her 1 litre suyun, 8 litre tatlısuyu kirlettiği bilinmektedir. Kirletici kaynakları dört sınıfta toplanmaktadır. Bunlar; evsel atıksular, endüstriyel atıksular, tarımsal kirleticiler ve doğal kirleticiler olarak sıralanabilir. Kirleticiler yapı olarak aynı zamanda organik kirleticiler ve inorganik kirleticiler olarak ikiye ayrılmaktadır. Organik kirleticiler yapısında C elementi bulunan kirleticilerdir.

### **2.8.1 Organik Kirleticiler**

#### **2.8.1.1 Karbon Bileşikleri**

Atıldıkları endüstriye bağlı olarak yağ, petrol ürünleri, gres, aromatik organik bileşikler (fenol, benzen, toluen), yüzey aktif maddeler (surfaktanlar, deterjanlar), karbohidratlar, proteinler, pestisitler, halojenli aromatik bileşikler ve siyanürlerden oluşur.

#### **2.8.1.2 Azot Bileşikleri**

Endüstriyel atık sularda mevcut azot bileşikleri daha çok karbona bağlı olup, proteinler, aminler, nitroso bileşikleri, azotlu aromatik/alifatik bileşikler, nitrat, nitrit ve amonyum tuzlarından ibarettir. Evsel atık sularda proteinler, üre ve ürik asit en önemli azot bileşikleridir.

#### **2.8.1.3 Fosfor Bileşikleri**

Atık sularda mevcut fosfor bileşikleri daha çok fosfat tuzları ve organik bağlı fosfor bileşikleri halindedir. Fosfat bileşikleri evsel atık sularda daha fazla bulunur.

### **2.8.2 İnorganik Kirleticiler**

İnorganik kirleticiler atıksularda bulunan ağır metaller ve minerallerdir. Endüstriyel atıksularda ağır metal olarak genellikle  $Cu^{+2}/Cu$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cr^{+3}/Cr^{+6}$ ,  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $K^+$  ve  $Na^+$  bulunduğu gibi değişik anyonlar  $SO_3^{-2}$ ,  $PO_4^{-3}$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $F^-$ ,  $NH_4^+$ ,  $SO_3^{-2}$ ,  $CN^-$  da mineral halinde bulunur (Kargı, 1993).

Çizelge 2.1. Çeşitli atık sularda bulunan ağır metaller ve izin verilebilen miktarları (İleri, 2000)

Ağır metal iyonu (mg/L)	İçme kullanma suyu (TS266) (maks)	Sulama suyu (SKKY teknik usuller tebliği) (maks)	Metal endüstrisi direkt deşarjı (SKKY) (maks)
Ag	0.05	0.10	0.10
Cd	0.01	0.01	0.50
Cr	0.01	0.10	0.50
Cu	1.00	2.00	3.00
Hg	0.01	0.01	0.05
Ni	0.50	0.5	3.00
Pb	0.50	5.0	2.00
Zn	5.00	2.0	5.00

(SKKY: Su kirliliği kontrolü yönetmeliği numune alma ve analiz. metodları tebliği, TS: Türk standartları)

Endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan atıksuların içinde bazen eser bazen de yüksek miktarda ağır metaller bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Ağır metal giderimi yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Birincisi toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasıdır. İkincisi ise bazı değerli metalleri tekrar kazanarak ekonomik açıdan kar elde etmektir (Bayhan, 1996)

Birçok mikroorganizmanın çözünmüş ağır metalleri ve radyoaktif elementleri biyosorbe etme özelliği olduğu bilinmektedir. Bunlar bakteri, maya, alg gibi mikroorganizmalardır. Günümüzde de mikroorganizmalar kullanılarak ağır metal giderimi çalışmaları devam etmekte ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Brown vd., 2000).

### 2.8.2.1 Bakır (Cu(II)) Kirliliği

Çözünür bakır bileşikleri insan sağlığı için en büyük tehdidi oluşturmaktadır. Bakıra uzun süreli maruz kalma burun, ağız ve göz tahrişine ve baş ağrılarına neden olmaktadır. Bakırın yüksek miktarda alımı karaciğer hastalıklarına ve kornea rahatsızlıklarına neden olur. Kıyı ve deniz suyunda bulunması gereken standart Cu (II) değeri 0,01 mg/L'dir.

Gübre ve tarım ilaçları bilinen en fazla Cu(II) kirlenici kaynağıdır. Petrokimya, metal, kimya, selüloz ve kağıt-karton endüstrileri de aynı zamanda Cu(II) kirliliğine

neden olmaktadır. Bakır, kirli suda Cu(II) iyonları, hidroliz ürünleri CuCO<sub>3</sub> veya organik kompleksleri şeklinde bulunur. Cu(II) iyon kirliliğinin giderilmesinde kullanılan konvansiyonel yöntemler; indirgeyerek çöktürme, iyon değişirme, buharlaştırarak geri kazanma, elektroliz gibi yöntemlerdir (Kutsal, 1995). Ancak bu yöntemlerin ekonomik olmayışı ve zaman gerektirmesi nedeniyle alternatif yöntemlerin arayışına girilmiştir. Bu nedenle mikroorganizmaların biyosorpsiyon yeteneğinden faydalanılarak ağır metal giderimi üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

#### **2.8.2.2 Nikel (Ni(II)) Kirliliği**

Nikelin fazla miktarda alınması akciğer, burun, prostat ve gırtlak kanseri riskini artırır. Doğum kusurları, astım, kronik bronşit ve kalp rahatsızlıklarına sebep olur. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) nikel bileşenlerini grup 1' de (insanlarda kansere yol açtığına dair yeterli kanıt bulunan), nikeli grup 2B' de (insanlarda kansere yol açma olasılığı bulunan) listelemiştir. Kıyı ve deniz suyunda bulunması gereken standart Ni(II) değeri 0,1 mg/L'dir. Ni(II) kirliliğine en fazla elektrokimyasal kaplama endüstrilerinin neden olduğu bilinmektedir. Ters ozmoz, evaporasyon, membran filtrasyonu, iyon değişimi gibi arıtma yöntemleri de kullanılmakla birlikte uygulandığındaki kolaylık ve ekonomik olması nedenleriyle hidroksit çöktürmesi ile elektrokoagülasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca mikroorganizmalarla biyosorpsiyon ile Ni(II) giderimi çalışmaları yapılmaktadır.

#### **2.8.2.3 Çinko (Zn(II)) Kirliliği**

Çinko zehirlenmesi bol miktarda terleme, güçsüzlük ve hızlı soluk alıp verme gibi rahatsızlıklara neden olur (<http://www.lenntech.com/periodic-chart.htm>). Kıyı ve deniz suyunda bulunması gereken standart Zn(II) değeri 0,1 mg/L'dir. Maden endüstrisi, metal endüstrisi, elektrik, elektronik, mutfak ve ev eşyaları üreten sanayi tesislerinin atıklarında bulunur. Yükseltgenme çökelme yöntemi ile ortama kireç, soda ve/veya sodyum hidroksit katılarak nötrale edilir, hidroksitleri şeklinde çöktürülerek atıksudan uzaklaştırılır. Ayrıca çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak, biyosorpsiyon yöntemi ile atıksulardan uzaklaştırılabilir de henüz tam anlamıyla uygulamaya geçilememiştir.

#### **2.8.3 Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi**

Ağır metal kirliliği endüstriyel prosesler, maden işletmeleri ve atık materyallerden kaynaklanan önemli bir kirlilik türüdür.

Uzun biyolojik yarı ömürleri ve biyolojik yöntemlerle giderilememesi nedeni ile insan sağlığını, denizleri, ekolojik sistemi tehdit eder. Yağ ve suda artan ağır metal kirliliği problemleri araştırmacıları bu kirliliği kaldırma yöntemlerini araştırmaya yöneltmiştir.

Suda bulunan ağır metal iyonlarını uzaklaştırmak için kullanılan geleneksel yöntemler, kimyasal çöktürme, yükseltgenme ve indirgenme prosesleri, filtrasyon, iyon değişimi, elektrokimyasal yöntemler, ters ozmos, membran teknolojileri, aktif karbon üzerine adsorpsiyon ve buharlaştırma olarak sıralanabilir (Kadukova ve Stofko, 2007). Ancak bu yöntemler fazla enerji gereksinimi, kimyasal ihtiyaçlar, zor ayırım yapılması, düşük verimliliği ve diğer birçok dezavantajları nedeni ile tercih edilmez (Volesky, 2001). Biyolojik giderim metodları canlı, tutuklu ve ölü mikroorganizmalar gibi biyolojik adsorbanlar ağır metallerin seviyesini uluslararası kabul edilebilir limitlere kadar düşürebilir. Bu yöntemlerin ucuz ve çevre dostu olması ise tercih sebebidir (Wang ve Chen, 2009; Vijayaraghavan ve Yun, 2008)

#### **2.8.4 Ağır Metal Giderim Mekanizmaları (Biyobirikim)**

Ağır metal iyonlarının mikroorganizmalar üzerine biyosorpsiyonu incelendiğinde, kullanılan mikroorganizmanın hücre yapısına bağlı olarak değişik mekanizmaların etkili olduğu görülmektedir (Leborans ve Novillo, 1996). Ağır metal giderim prosesleri iki basamaklı olarak oluşmaktadır.

**i-) Metabolizmaya bağlı giderim (biyobirikim):** Metabolik hareketlerle birlikte hücre içinde metal iyonlarının biyobirikimidir. Enerji gerektiren bir süreçtir.

**ii-) Metabolizmadan bağımsız giderim (pasif metal giderimi, biyosorpsiyon):**

Ölü mikroorganizmalarla yapılan adsorpsiyon işlemi genellikle biyosorpsiyon olarak tanımlanmaktadır (Tsezos ve Volesky, 1981). Biyosorpsiyondan sorumlu mekanizmaların tam olarak nasıl gerçekleştiği anlaşılmamasına rağmen fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, elektrostatik hareketler gibi birçok mekanizmanın birlikte rol oynadığı düşünülmektedir (Sağ, 2001; Volesky, 2008; Wang ve Chen, 2006) Biyolojik giderim prosesleri, metal gideriminin olduğu yere göre de sınıflandırılabilir (Veglio ve Beolchini, 1997; Vieira ve Volesky, 2000).

i- Hücre dışında birikim (mikroçökme)

ii- Hücre yüzeyinde birikim (fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon, elektrostatik etkileşimler, iyon değişimi, kompleksleşme)

iii- Hücre içinde birikim (metal iyonları hücre zarından içeri difüzlenerak hücre

stoplazmasında biriktirilir)

Mikroorganizmalar tarafından üretilen asit fosfataz gibi enzimlerin, ağır metal iyonlarının gideriminde rol oynadığı görülmüştür (Whiteley, 2006). Metal giderimi hücreye bağlı metal fosfat olarak ağır metallerle çöken, inorganik fosfatı serbest bırakan hücreye bağlı fosfataz aracılığı ile gerçekleştirilir. Metal biyobirikimi ön üreme esnasında üretilen asit tipi fosfataz aracılığı ile gerçekleştirilir. Asit fosfataz uygun organik veya inorganik fosfat kaynağından  $\text{HPO}_4^{-2}$  'yi serbest bırakır. Bu fonksiyonu üreme periyodunu tamamlamış ve/veya tutuklanmış mikroorganizma hücreleri de gösterebilir. Hidrojen fosfat,  $\text{M}^{+2}$  ile stokiyometrik olarak çökerek hücre yüzeyine  $\text{MHPO}_4$  oluşturmak üzere sıkıca bağlanır. Bu mekanizma ile metal içeren çözeltilerde Cd, U, Sr ve Pb iyonlarının *Citrobacter sp* grubu bakteriyel hücreler kullanılarak biyobirikiminin gerçekleştiği rapor edilmiştir (Macaskie vd., 1987). *Streptomyces longwoodensis* tarafından kurşun ve uranyumun hücre duvarındaki fosfata metal bağlandığı bilinmektedir. Azot veren bakterilerin uranyum giderim mekanizması, hücre duvarındaki polifosfat grubuna da bağlıdır ve oldukça karmaşıktır (Macaskie ve Dean, 1989). Mantar ve mayalar da enzimatik mekanizmaların ve fosfataz enziminin ağır metal giderimindeki rolü hakkında çok az çalışma vardır. Cu iyonları içeren ortamlarda *R. delemar* ve *Aspergillus niger* mantarlarının dış hücresel ve hücresel asit fosfataz üretimi ve ağır metal giderimindeki rolü üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Tsekova vd., 2002). Fosfataz grupları sadece enzimatik mekanizmalarla metal gideriminde değil, aynı zamanda biyosorpsiyonda da önemli rol oynamaktadır. *R. delemar*' ın hücre duvarı pH 3.0' ın üzerinde iken, pozitif yüklü kitosan ve negatif yüklü fosfat iyonları ve glukuronik asitten oluşur. Fazla miktarda fosfat, glukuronik asit ve kitin-kitosan kompleksinin varlığı metallerin iyon değişimi ve bağ yapma olasılığını artırır (Sağ, 2001).

## 2.9. Adsorpsiyon İzotermi

### Langmuir Adsorpsiyon İzotermi

Langmuir adsorpsiyon izotermi doğrusal formda aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$1 = \frac{q}{K + q} = \frac{q_{max}}{1 + Ce} + 1 = q_{max} \quad (2.1)$$

1/q değerlerine karşılık 1/C<sub>e</sub> değerleri grafiğe geçirildiğinde, elde edilen doğrunun eğiminden K/q<sub>max</sub> ve düşey kesim noktasından 1/q<sub>max</sub> değerleri bulunur. Burada; q<sub>max</sub>, maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mg/g); C<sub>e</sub> adsorbanla dengede olan sıvı faz derişimi (mg/L); K, Langmuir adsorpsiyon sabitidir (mg/L) (Langmuir, 1916).

### Freundlich Adsorpsiyon İzotermi

Fruendlich adsorpsiyon izotermi de doğrusal formda aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$\ln q = \ln K_f + 1/n \ln C_e \quad (2.2)$$

ln q değerlerine karşılık ln C<sub>e</sub> değerleri grafiğe geçirildiğinde, elde edilen doğrunun eğiminden 1/n ve düşey eksenin kesim noktasından ln K<sub>f</sub> değeri bulunur. Burada; q, adsorpsiyon kapasitesi (mg/g); C<sub>e</sub>, adsorbanla dengede olan sıvı faz derişimi (mg/L); K<sub>f</sub> ve n, Freundlich adsorpsiyon sabitleridir (Freundlich, 1907).

### 2.10 Enzimlerin Kinetik özellikleri İçin Michaelis Menten Modeli

Sabit derişimdeki pekçok enzimin reaksiyon hızı substrat derişimine bağlı olarak artar, daha sonra substrat derişiminin daha da arttırılmasıyla sabit hale gelir. Bu derişim doygunluk kinetiği olarak adlandırılır. 1913 yılında *Leonard Michaelis* ve *Menten* doygunluk kinetiğini enzimatik reaksiyonlar için ifade eden eşitliği türetmişlerdir. *Michaelis Menten* eşitliği, kimyasal reaksiyon mühendisliğinde Langmuir-Hinshelwood eşitliği ve mikroorganizma kinetiğinde de Monod eşitliğinin analogudur. Bir enzimatik reaksiyonda enzim-substrat kompleksi önemli bir ara bileşik oluşturur. Enzimatik reaksiyonların genel ifadesi aşağıdaki gibidir (2.3).



E: Enzim

S: Substrat

P: Ürün

ES: Enzim-substrat kompleksi

k<sub>1</sub>: ES kompleksi oluşumu için ileri yöndeki reaksiyon hız değışmezi

k<sub>-1</sub>: ES kompleksinin E ve S'a bozunma reaksiyonu için geri yöndeki hız değışmezi

k<sub>2</sub>: ES kompleksinin E ve P'ye dönüşüm reaksiyonu için ileri yöndeki hız değışmezi



$$v = \frac{v_m S}{K_m + S} \quad (2.4)$$

Bu eşitlik reaksiyonun maksimum ilerleme hızını,  $V_m$  ve Michaelis-Menten sabitini,  $K_m$  verir.  $K_m$  maksimum reaksiyon hızının yarısının elde edildiği substrat konsantrasyonudur.  $K_m$  azaldıkça enzimin substrata olan ilgisi artar. Michaelis-Menten eşitliğinin her iki tarafının ters çevrilip doğrusallaştırılmasıyla Lineweaver-Burk eşitliği elde edilir.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S} \quad (2.5)$$

$1/S$ 'e karşı  $1/V$  grafiğe geçirildiğinde, kesim noktasından maksimum enzimatik reaksiyon hızı  $V_m$  ( $\mu\text{mol/L.dak}$ ), eğimden Michaelis-Menten sabiti  $K_m$  (mM) hesaplanır (Lineweaver ve Burk, 1934). Birçok madde enzimatik reaksiyonların hızını azaltabilir. Enzimatik reaksiyonların hızını azaltan maddelere enzim inhibitörleri denir. Inhibitörler tersinir ve tersinmez inhibitörler olarak ikiye ayrılır. Tersinir inhibitörler inhibisyon mekanizmalarına göre yarışmalı, yarışmasız ve kısmi yarışmalı olmak üzere üçe ayrılır.

### Yarışmalı İnhibisyon

Bir kısım inhibitörler substratın enzime bağlandığı bölgeye bağlanmaktadır. Bu tip inhibitörlere yarışmalı inhibitor, meydana gelen inhibisyona ise yarışmalı inhibisyon denir (Shuler ve Kargı, 1992).



Enzimatik dönüşümü gösteren eşitlik ise aşağıdaki gibidir.

$$v = \frac{v_m S}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad (2.7)$$

Bu eşitlikte maksimum reaksiyon hızı değişmezken substrat afinitesi azalmaktadır Bu durumda, substratın bağlama merkezine görünür ilgisi azalırken, maksimum reaksiyon

hızı değişmeden kalmakta,  $K'_{m,app}$  ise artmaktadır.

### Yarışmasız İnhibisyon

Eğer inhibitor aktif merkezin dışından bir noktadan enzime bağlanarak inhibisyona neden oluyorsa bu tip inhibitörlere yarışmasız inhibitor, meydana gelen inhibisyona da yarışmasız inhibisyon denir. Yarışmasız inhibitörler genellikle enzimin üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olarak inhibisyona neden olmaktadır. Yarışmasız inhibisyonların bir kısmı geriye dönüşlü bir kısmı ise geriye dönüşsüzdür. Doğal olarak meydana gelen yarışmasız inhibitörler ara metabolitlerdir. Yarışmasız inhibisyonda  $K'_{m,app}$  sabit kalırken maksimum kimyasal reaksiyon hızı ( $V_m$ ) azalır. Yarışmasız enzim inhibisyonu aşağıdaki şekildeki gibi tanımlanır (Shuler ve Kargı, 1992).

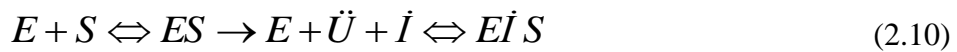


Yarışmasız inhibisyon için denklik aşağıdaki gibidir.

$$v = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{K_m}{S}\right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad (2.9)$$

### Kısmi Yarışmalı İnhibisyon

Eğer bir inhibitor serbest enzime değil de, herhangi bir ürün üretmeksizin, enzim-substrat kompleksine bağlanarak, bir inhibisyona neden oluyorsa bu tip inhibitörlere kısmi yarışmalı inhibitor, meydana gelen inhibisyona da kısmi yarışmalı inhibisyon adı verilmektedir. Kısmi yarışmalı inhibisyonda hem  $K_m$  hem de  $V_m$  belirli oranlarda azalır (Shuler ve Kargı, 1992).



$$v = \frac{v_m S}{\left( \frac{K_m}{\left( 1 + \frac{I}{K_I} \right)} + S \right) \left( 1 + \frac{I}{K_I} \right)} \quad (2.11)$$

## 2.11 Biyosorpsiyon

Biyosorpsiyon zamana karşı adsorplanan metal iyonu miktarı Cads.(mg/L) ve/veya birim mikroorganizma kütlesi tarafından adsorplanan metal iyonu miktarının (q, mg metal iyonu /g mikroorganizma), zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle incelenir.

t: Zaman (dakika)'dır.

q ise Eşitlik 2.2 ile tanımlanabilir:

$$q = \frac{C_0 - C}{X} \quad (2.12)$$

Burada,

C<sub>0</sub>: Başlangıç metal iyonu derişimi (mg metal iyonu /L çözelti),

C: Herhangi bir anda adsorpsiyon ortamında adsorplanmadan kalan metal iyonu derişimi (mg metal iyonu /L çözelti),

X: Mikroorganizmanın (adsorbent) çözeltideki derişimi (g mikroorganizma/L çözelti)'dir.

### 2.11.1. Biyosorpsiyon Verimi

Adsorpsiyon verimi, dengede adsorplanan metal iyonu derişiminin başlangıç metal iyonu derişimine oranı olarak tanımlanmıştır (Eşitlik 2.13).

$$Y(\%) = \frac{C_{ads}}{C_o} \quad (2.13)$$

Burada,

$C_{ads}$ : Dengede mikroorganizma tarafından adsorplanan metal iyonu derişimi (mg metal iyonu/L çözelti)'dir.

## 2.12 Biyobirikim Deneyleri

### 2.12.1 Mikroorganizma Özgöl Üreme Hızı

Kesikli sistemde üstel üreme evresinde mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi özgöl üreme hızı ile ifade edilir (Eşitlik 2.14) (Pekin, 1983; Kargı, 1993).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.14)$$

$t=0$  anında  $X=X_o$ ,  $t=t$  anında  $X=X$  sınır koşullarında Eşitlik 2.12 'in integrasyonu ile Eşitlik 2.15 elde edilir.

$$\ln \frac{X}{X_o} = \mu t \quad (2.15)$$

Bu eşitliklerde;

$\mu$  : Özgöl üreme hızı ( $sa^{-1}$ ),

$X$ : Kuru mikroorganizma derişimi (g /L),

$t$  : Zaman (sa)'dır.

### 2.12.2 Metal İyonu İçermeyen Ortamda Üreme Kinetiğinin Modellenmesi

Kesikli sistemde substrat inhibisyonunun gözlenmediği durumda, substrat konsantrasyonuyla mikroorganizmanın özgöl üreme hızı arasındaki ilişki *Monod eşitliği* ile verilir (Shuler ve Kargı, 2002).

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (2.16)$$

$\mu$ : Özgül üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ ),

$\mu_m$ : Maksimum özgül üreme hızı ( $\text{sa}^{-1}$ ),

$K_s$ : Monod doygunluk sabiti ( $\text{g/L}$ )'dir.

Monod eşitliğinin her iki tarafının tersinin alınıp doğrusallaştırılmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} \quad (2.17)$$

$1/S$ 'e karşı  $1/\mu$  grafiğinin, y eksenini kesim noktasından  $\mu_m$ , doğrunun eğiminden ise  $K_s$  bulunur. Düşük  $K_s$  değeri mikroorganizmanın düşük substrat derişimlerinde de hızlı ürediğini gösterir.

### 2.12.3 Metal İyonu İçeren Ortamda Üreme Kinetiğinin Modellenmesi

Besin ortamında ağır metal iyonları gibi mikroorganizmaların üremesini engelleyecek veya yavaşlatacak etkiye sahip maddelerin bulunması durumunda, bu maddelerin mikroorganizma özgül üreme hızı üzerinde gösterdikleri inhibisyon etkisi inhibisyon modellerine göre ifade edilmektedir.

Tek bir metal iyonunun inhibisyona neden olduğu durumda bu bileşenin, mikroorganizmanın özgül üreme hızı üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi yarışmalı, yarışmasız ve kısmi yarışmalı inhibisyon olarak sınıflandırılabilir. Bu inhibisyonları ifade eden modeller Eşitlik 2.18, 2.19 ve 2.20 'de verilmektedir (Pekin, 1983; Kargı, 1993).

Yarıřmalđ inhibisyon modeli:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad (2.18)$$

Yarışmasız inhibisyon modeli:

$$\mu = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{K_s}{S}\right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad (2.19)$$

Kısmi yarıřmalđ inhibisyon modeli:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{\left( \frac{K_s}{\left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} + S \right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad (2.20)$$

Burada;

I : İnhibisyona neden olan bileşenin (ağır metalin) derişimi (mg/L),

K<sub>I</sub> : İnhibisyon sabiti (mg/L)'dir.

Her üç inhibisyon türünde de I derişimi arttıkça mikroorganizmanın üremesi azalmakta ve özgül üreme hızı değerleri düşmektedir (Pekin, 1983; Kargı, 1993).

### 2.13 Yüzey Cevap Yöntemi (CYY)

Yüzey cevap yöntemi (Response Surface Method, RSM) bazı girdi değerkenleriyle bir veya daha fazla çıktı değerkeninin arasındaki ilişkiyi inceler. Yöntem ilk kez G.E.P Box ve K. B. Wilson tarafından 1951' de ortaya atılmıştır. CYY temelde tasarlanmış deneylerle elde edilmiş verilere uydurulan polinomlar yardımıyla öngörü (tasarım) yapabilmeyi sağlar.

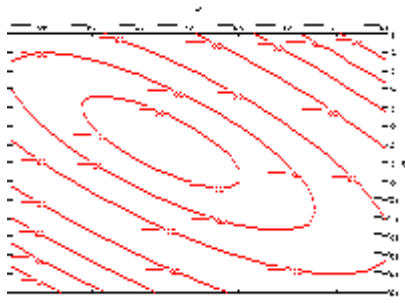
CYY’de, karmaşık sistemlerin modellenmesi için genelde ikinci dereceden polinomlar kullanılsa da daha yüksek dereceden polinomların da kullanılması mümkündür:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \dots$$

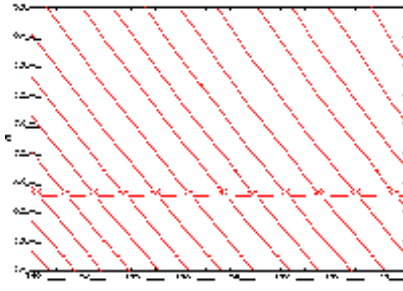
veya daha genel bir ifadeyle

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i<j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \dots$$

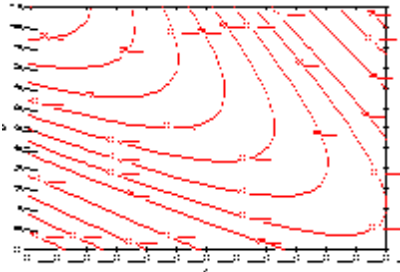
Cevap yüzeyi modelinin oluşturulması toplanmış verilerle yukarıda gösterilen  $\beta$  katsayılarının tahmin edilmesiyle gerçekleştirilir. Bu katsayıların tahmin edilmesi en küçük kareler regresyonu ile mümkündür. Şekil 2.6 a-d araştırmacıların karşılaştığı genel kuadratik yüzey şekilleri gösterilmektedir.



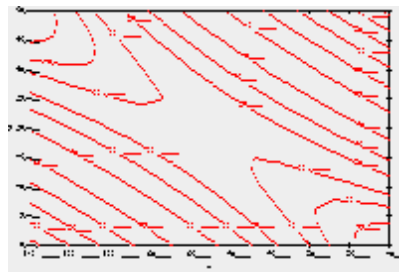
Şekil 2.6a. Zirve



Şekil 2.6b. Yamaç



Şekil 2.6c. Yükselen Bayır



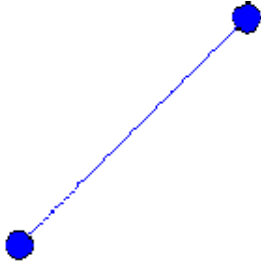
Şekil 2.6d. Eyer

Şekil 2.6 a,b,c,d Genel kuadratik yüzey şekilleri

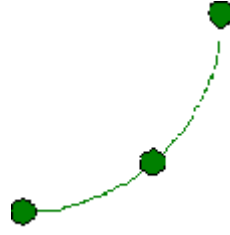
(Zirve:  $F(x,y)$  işlemi için optimum en yüksek değerleri veren noktalar, yamaç:  $F(x,y)$  işlemi için koşulları sağlayan çizgiler, bayır:  $F(x,y)$  işlemi için düz olmayan eğimli çizgiler, eyer:  $F(x,y)$  gerçek işlemi için herhangi bir koşulu sağlayan noktalar)

### 2.13.1 Yüksek-Dereceli Tasarımlar İçin Faktör Seviyeleri

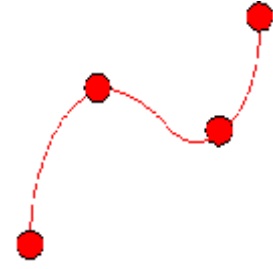
Şekil 2.7a-c kadar cevapların olası davranışlarını, faktör dizilerinin fonksiyonu gibi göstermektedir. Her durumda cevabın değerinin şeklin altından üste doğru arttığı ve faktör dizilerinin soldan sağa doğru arttığı farz edilir.



Şekil 2.7a Doğrusal fonksiyon



Şekil 2.7 b Kuadratik fonksiyon



Şekil 2.7c Kübik fonksiyon

Şekil 2.7 Faktör dizilerinin fonksiyonu olarak cevapların olası davranışları

Eğer bir cevap Şekil 2.7a 'daki gibi davranırsa, bu davranışı nitelendiren tasarım matrisi iki seviyeli (düşük ve yüksek) faktörlere ihtiyaç duyar. Bu model, basit iki seviyeli faktöryel ve kesirli faktöryel tasarımların temel varsayımıdır. Eğer cevap Şekil 2.7b 'deki gibi davranırsa, bu davranışı nitelendirmek için gerekli minimum seviye sayısı üçtür. İki-seviyeli tasarımın merkez noktalarına eklemeler mantıklı olarak farz edilebilir, fakat bir çok matrikste muamelenin düzenlenmesi bütün kuadratik etkilerin birbirini etkilemesine sebep olur. Merkez noktalı ve iki seviyeli metot, bireysel saf kuadratik etkileri tahmin ederken, onları etkili bir şekilde bulur. Tasarım matrisi yaratan bir çözüm, Şekil.2.7c 'deki basit kıvrımın tahminine üç-seviyeli faktör tasarımı kullanılarak izin verir (Lindman, 1974).

### 2.13.2 Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması

Deney tasarımı yapılırken kaç deney yapılacağı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır,

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k < 5 \quad (2.21)$$



$$N = 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (2.22)$$

$N$  = Deney sayısı

$k$  = Bağımsız değişken sayısı

$n_0$  = Merkezdeki deney sayısını ifade eder.

Bağımsız değişken düzeyleri ( $\alpha$ ) de Eşitlik 2.23 ve 2.24 yardımı ile hesaplanır.

$$\alpha = 2^{k/4} \quad k < 5 \quad (2.23)$$

$$\alpha = 2^{(k-1)/4} \quad k > 5 \quad (2.24)$$

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

$$\begin{Bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{Bmatrix} + \begin{Bmatrix} \varepsilon_0 \\ \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{Bmatrix} \quad (2.25)$$

$$y = X\beta + \varepsilon \quad (2.26)$$

$\beta$  katsayı vektörü, en küçük kareler farkı yöntemi kullanılarak elde edilen Eşitlik 2.26 ile hesaplanır.

$$\beta = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (2.27)$$

Katsayı vektörü bulunup yerine konulmasıyla, cevap yüzeyi de bulunmuş olur (Ohata vd., 2003). CYY kullanılarak karmaşık deney sistemleri için en iyi deney koşulları, Doehlert matrix (DM), merkezi bileşke tasarımı (CCD) ve üç boyutlu dizayn olan Box-Behnken (BBD) gibi yöntemlerle belirlenir ve modellenir.

### 2.13.3 CYY İçin Kullanılan Tasarım Modelleri

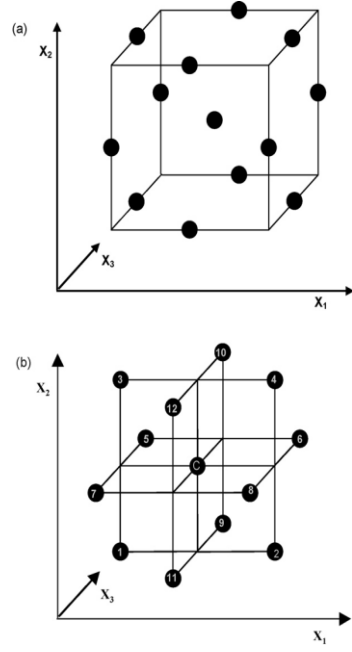
CYY; tepki (response) değişkenine etki eden çok sayıda değişkenin olması durumunda; problemlerin analiz edilmesinde kullanılan istatistiksel tekniklerin ve matematiksel ifadelerin birleşimidir. Yeni ürünün formülasyonunda, var olan ürün tasarımının iyileştirilmesinde, süreç tasarımında, sürecin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. CYY için kullanılan tasarım modelleri Doehlert Matrix (DM),

Merkezi bileşke tasarımı (CCD: Central composite design) ve üç boyutlu dizayn modeli olan Box-Behnken tasarımı (BBD)'dir. Ancak ikinci dereceden modeller içermesi ve üç boyutlu grafikler çizilebilmesi nedeniyle CCD ve BBD tasarımları daha çok kullanılmaktadır.

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

Box-Behnken dizayn (BBD) ikinci derceden modeller içerir. Bağımsız değişkenler ile çıktı değerleri arasında doğrusal olmayan bağlantılar bulunabilir. Elde edilen sonuçlar cevap yüzeyi üzerinde kontürler halinde gösterilir. Üç değişken faktör için çizilen grafikte orta noktaların birleştirilmesi ile kübik yüzey elde edilir ve gösterimi iki şekilde (Şekil 2.8) yapılabilir.

Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan model için, gerçekleşmesi beklenen grafiklerin üç boyutlu olarak çizilebilmesi, yöntemdeki deneysel hataların görülebilmesi ve quadratik model için parametrelerin seçiminin yapılabilmesi nedeni ile RSM için kullanılan en iyi tasarım modelidir. Bu nedenle birçok çalışmada tasarım için BBD seçilmiştir. Kannan ve arkadaşları (2004), karbon kullanarak Cu(II), Cd(II) ve Ni(II) gibi ağır metal iyonlarının adsorpsiyonunu incelemiş çalışmalarının ikinci adımında BBD kullanarak deney sisteminin tasarımı gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 2.8 Kübik BBD ve faktöriyel dizayn

Sulu fazda bulunan Rhodamine 6G, çitosan ve aktif karbon kullanılarak uzaklaştırılmış ve BBD ile tasarımı yapılmıştır (Annadurai vd., 2000). Matthews ve arkadaşları (1981), arsenik içeren çözeltilerde enzimatik reaksiyonları tasarlamak için BBD'dan faydalanmışlardır. Elde edilen sonuçlardan enzimatik reaksiyonlar için CYY kullanımının uygun olduğu anlaşılmıştır.

### 3 MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Mikroorganizma (*R. delemar*) Üretimi

Mikroorganizma olarak lipaz ve asit fosfataz enzimlerini ürettiği ve ağır metal biyobiriktiği bilinen bir mantar türü *Rhizopus delemar* seçilmiştir. *R. delemar* (NRRL 2872) Amerikan Tarım Bakanlığı'ndan temin edilmiş olup çalışmalarda kullanılmak üzere laboratuvarında üretilmiştir.

Mikroorganizmalar 100 mL çalışma hacmine sahip, 250 mL' lik erlenlerde, 30 °C sabit sıcaklık ve 150 devir/dak karıştırma hızında çalıştırılan çalkalamalı su banyosunda üretilmiştir. *R. delemar* çoğalması için minimal besin ortamı bileşimi, karbon ve azot kaynakları Çizelge 3.1.'de sunulmuştur. Sterilizasyon işlemi sıvı ve katı besin ortamlarının, 1.2 atm basınç ve 121 °C' da 20 dakika süre ile otoklavda tutulması ile gerçekleştirilmiştir. Steril hale getirilen besin ortamları oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve aşı yapılmaya hazır hale getirilmiştir. Aşılama işlemleri gecikme evresini tamamlamış hücrelerle steril ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Besin ortamlarının başlangıç pH' ı 6' ya ayarlanmıştır.

Çizelge 3.1.Mikroorganizma üretiminde kullanılan minimal besin ortamı içeriği

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Glikoz	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
Maya özütü	2

## 3.2 Enzim Üretim Ortamları

### 3.2.1 *R. Delemar'* in Lipaz Enzimi Üretmesi İçin Uygun Besin Ortamlarının Hazırlanması

Deneylerde karbon kaynağı olarak Ankara Şeker Fabrikasından temin edilen melas kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Şekerin kristallenme yolu ile elde edilmesiyle son ana şurup olarak geri kalan melas önemli miktarda sakkaroz içerir. Ayrıca melas şeker dışı maddeler bakımından da zengindir. Melas %50 sakkaroz, %30 şeker dışı maddeler ve %20 oranında da su içermektedir. Şeker dışı maddelerin yaklaşık %10'unu kül teşkil eder. Kül melasın yanmasından sonra geri kalan anorganik maddedir. Geri kalan %20 ise organik şeker dışı maddelerdir. Melasda bulunan şeker dışı maddeler Çizelge 3.2' de verilmektedir. Lipaz enziminin üretiminde kullanılan sıvı besin ortamları 1.0, 2.0, 5.0 ve 10 g/L melas sakkarozu içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca mantarın üretimi için hazırlanan sıvı besin ortamları, minimal besin ortamı bileşenlerini içermektedir. Mikroorganizmalar öncelikle, laboratuvar koşullarında en uygun üreme sıcaklığı olan 25 °C' de sıvı besin ortamlarında üretilerek aktifleştirilmiştir. Üreme çalışmaları için hazırlanan besin ortamları otoklav'da sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.2 Ankara Şeker Fabrikasından temin edilen melasın bileşimi

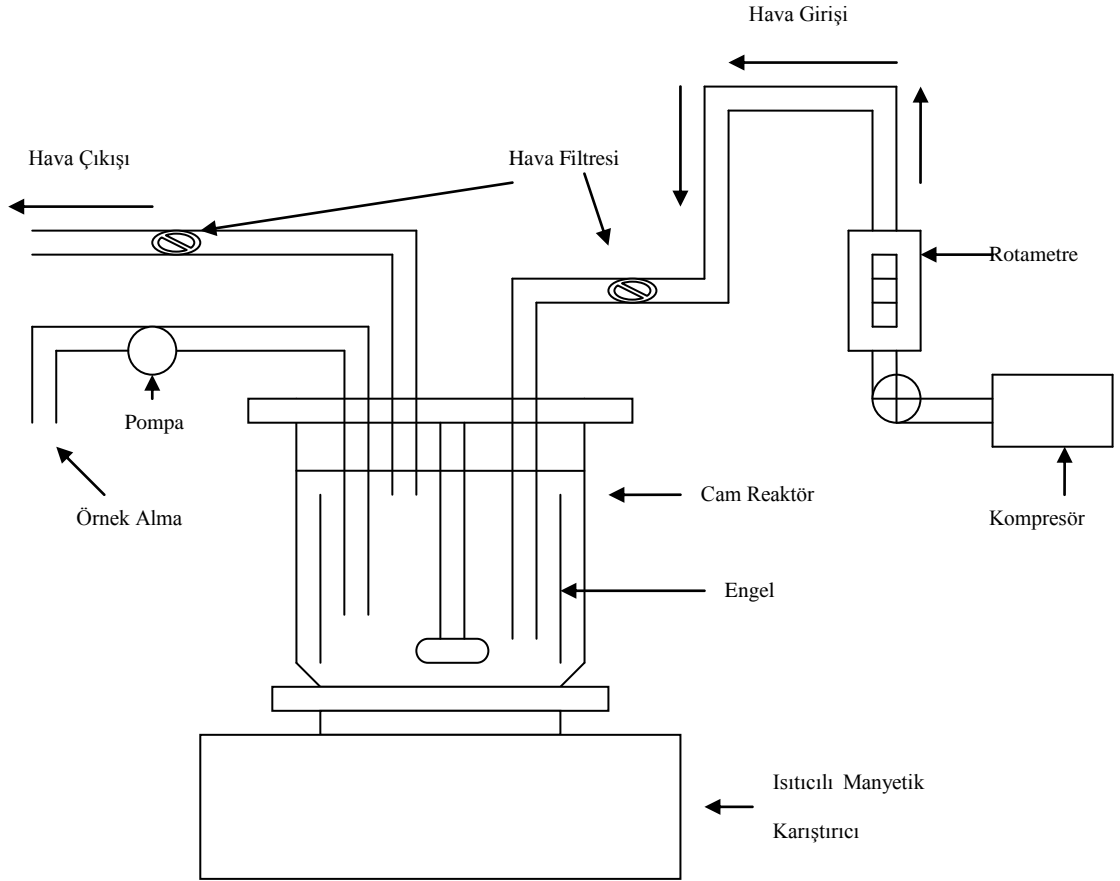
S <sup>a</sup>	% 83.92
P <sup>b</sup>	% 50.03
Q <sup>c</sup>	% 59.62
Invert şeker	% 0.406-0.500
Betain	% 5.0 -6.0
Toplam N <sub>2</sub>	% 2.0
Rafinoz	% 0.8 – 1.0
Yoğunluk	1.3

<sup>a</sup> Katı madde miktarı

<sup>b</sup> Polarizasyon

<sup>c</sup> P/S

Ekimler en uygun aşı hacmi belirlenene kadar 1 mL aşı hacmi ile yapılmıştır. Benzeri biçimde en uygun çoğalma ortamı pH' ı belirlenene kadar, besin ortamlarının pH' ı 6.0' ya ayarlanmıştır. Besin ortamlarından belirli zaman aralıklarında, belirli hacimlerde alınan örnekler filtrasyon işleminden geçirildikten sonra, berrak sıvıda enzim aktivitesi ölçülmüş ve glikoz analizi yapılmıştır. Mavi bant süzgeç kağıdının üstünde kalan mikroorganizmalar, konsantrasyonlarının belirlenmesi için ayrılmıştır.



Şekil 3.1 Karıştırılmalı ve havalandırılmalı biyoreaktör.

Kesikli düzende yürütülen fermentasyon çalışmalarının bir kısmı 250 ml' lik, 100 ml çalışma hacmine sahip erlenlerde, sabit karıştırma hızı ve sıcaklıkta çalışan çalkalamalı su banyosunda ve orbital karıştırılmalı inkübatörde yürütülmüştür. En uygun karıştırma hızı ve hava giriş hızının belirlendiği diğer çalışmalarda ise 100 mL çalışma hacmine sahip, 150 ml' lik pyreks camdan yapılmış, silindirik bir tepkime kabı kullanılmıştır. Tepkime kabının kapağı üzerinde hava giriş ve çıkış delikleri, örnek alma

deliği ve karıştırıcı mil yatağı bulunmaktadır. Tepkime kabı içinde vorteks oluşumu önleyici levha ile dört kanatlı karıştırıcı ve bağlı olduğu şaft vardır. Tepkime kabı sabit sıcaklığa ayarlanabilen bir manyetik karıştırıcı üzerinde oturtulmuştur. Deney süresince belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin analizlenmesi ile sonuçlar elde edilmiştir.

### **3.2.2 *R. delemar*' in Asit Fosfataz Enzimi Aktivitesi ve Besin Ortamlarının Hazırlanması**

Aşılama için besin ortamı (Çizelge 3.3) içeren erlenler, 150 devir/dak hızında, 30 °C sıcaklıkta ve 24 saat orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Ortam pH' ı, mikroorganizmanın asit fosfataz enzimi üretmesi için en uygun pH değeri olan 4.8'e ayarlanmıştır. Aşılama işlemi üstel üreme evresinin başlangıcındaki hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Optimum aşı oranı (Aşı miktarı/biyoreaktör üretim hacmi) 10/1000 olarak belirlenmiştir (Galabova vd., 1993, Tsekova ve Galabova, 2003).

*R. delemar*' dan asit fosfataz üretimi için, fermantasyon ortamı (Çizelge 3.4) olarak, 100 ml çalışma hacmine sahip reaktörler kullanılmıştır. Hazırlanan besin ortamları otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.3 Asit fosfataz üretiminde kullanılan aşı ortamı içeriği

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Çözünebilir nişasta	20
Mısır meserasyon sıvısı	20
Pepton	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1

Çizelge 3.4 Asit fosfataz üretiminde kullanılan fermantasyon ortamı içeriği

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Çözünebilir nişasta	40
Mısır meserasyon sıvısı	20

### **3.3 Analitik Ölçüm Yöntemleri**

Belirli zaman aralıklarında fermantasyon ortamlarından steril olarak alınan örnekler filtrasyon ve/veya santrifüjleme işleminden geçirilmiş, sıvı kısım metal iyonları, sakkaroz derişiminin ve enzim aktivitelerinin tayininde, dipte çökelen kısım veya filtrasyon kağıdının üzerinde kalan kısım ise mikroorganizma derişiminin bulunmasında kullanılmıştır.

#### **3.3.1 Lipaz Enzim Aktivitesi**

Enzim aktivite tayininde para-nitrophenil palmitate (p-NPP, Sigma 037H5002) substrat olarak kullanılmış ve spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır (Jain vd., 2005, Wonderwülbecke vd., 1992). Ortamda para-nitrophenil palmitate substrat olarak görev yapmaktadır (EK 3). p-nitrofenol aktivitesi 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 1 U lipaz aktivitesi 37 °C’de, 1 dakikada açığa çıkan 1 mikromol p-nitrofenol olarak ifade edilir.

#### **3.3.2 Biyokütle Analizi**

Reaksiyon ortamından alınan belirli hacimdeki örnek daha önceden darası alınmış mavi bant süzgeç kağıdı aracılığı ile süzülür. Süzgeç kağıdı 2-3 kez saf su ile yıkanır ve 8 saat süre ile 80 °C’ ye ayarlanmış etüvde kurutulur. Etüvden alındıktan sonra sabit tartıma gelince süzgeç kağıdının ağırlığı bulunur. Süzgeç kağıdının son ağırlığı ile darası arasındaki fark alınıp örnek hacmine bölünerek mikroorganizma konsantrasyonu bulunur. Ayrıca biyokütle analizi türbidimetrik yöntem kullanılarak da yapılmıştır. Bu yöntemin ayrıntıları EK 2’ de verilmektedir.

Alınan örnekteki yaş maya derişimi g/L cinsinden spektrofotometrik olarak 360 nm’de absorbans okunarak tayin edilmiştir. Daha sonra yaş ağırlık, yaş ağırlık-kuru ağırlık mikroorganizma çalışma doğrusundan yararlanarak kuru mikroorganizma derişimine geçilmiştir.

#### **3.3.3 Sakkaroz Analizi**

Glikoz tayininde Miller yöntemi kullanılmıştır (Forouchi ve Gunn, 1983). Öncelikli olarak DNS eriyiği ve Rochella tuzu eriyiği hazırlanır. Glikoz içeriği tayin edilecek örnekler 20 mL’lik deney tüplerine sırasıyla 2 mL örnek + 2mL DNS eriyiği olmak üzere koyulur. Daha sonra hazırlanan bu tüpler kaynatılır. Çıkarılan örnekler



soğutulduktan sonra herbirinin üzerine 1 mL rochella tuzu eriyiği ve 5 mL damıtık su eklenir. Örnekteki sakkaroz derişimi g/L cinsinden, sakkarozun dinitrosalisilikasit ile verdiği turuncu-koyu kırmızı renkli kompleks yardımıyla spektrofotometrik olarak (575 nm) bulunur.

#### **3.3.4 Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini**

Fosfataz aktivitesinin ölçümü için substrat olarak fosfataz substrat (Sigma 117K8210) kullanılmıştır (EK 4). Fosfataz aktivitesi, 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Tsekova ve Galabova, 2003).

#### **3.4 Metal İyonları İçeren Biyobirikim Ortamının Hazırlanması**

Ni(II), Cu(II) ve Zn(II) çözeltileri, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O kristallerinin damıtık suda çözülmesi ile elde edilen 1.0 g/L metal iyonu içeren stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır. Fermantasyon ortamındaki Ni(II) iyonu derişimi 10 ve 50 mg/L aralığında değiştirilmiştir. Cu(II) ve Zn(II) iyonlarının derişimi ise 10 ve 100 mg/L aralığında değiştirilmiştir.

Fermentasyon ortamlarının pH değeri 1 mol/L derişiminde hazırlanan HNO<sub>3</sub> stok çözeltilerinin seyreltilmesi ile hazırlanan 0.1 mol/L, 0.01 mol/L ara çözeltilerin yeteri kadar eklenmesi ile ayarlanmıştır. Metal iyonlarının eklenmesinden sonra besin ortamları 120 °C sıcaklıkta, 20 dakika süreyle otoklavda sterillemiştir.

#### **3.4.1 Biyobirikim Deneyleri**

Biyobirikim deneyleri orbital çalkalayıcıda 30 °C sıcaklıkta 150 devir/dak karıştırma hızında 126 saat süresiyle yapılmıştır. Fermentasyon ortamından alınan 5ml hacmindeki örnek 6030 x g 5 dakika santrifüjlenmiş sıvı fazdan alınan 2 ml hacmindeki örnek serbest metal iyonunun tayini biyobiriktilirmeyen, ortamda serbest Ni 351.5 nm, Zn 213.9 nm ve Cu 217.9 nm' de, HCL Photron Hollow Cathode lamba kullanılarak, GBC Avanta marka atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçülmüştür.

#### **3.4.2 *R. delemar*' ın Biyosorpsiyon Deneyleri İçin Hazırlanması**

Metal giderim kapasitelerini karşılaştırmak için üreyen (living), üremeyen (resting)-yaş, kuru (dead) hücreler için biyosorpsiyon deneyleri yapılmıştır. *R. delemar* 30 °C

sıcaklıkta kesikli reaktörde üretildikten sonra, üstel üreme periyodunun sonunda (48-72 saat) fermantasyon ortamından santrifüjle ayrılmış ve damıtık su ile iki kez yıkanmıştır. Yaş hücreler, biyosorpsiyon ortamlarındaki derişimleri 1 g/L olacak şekilde süspanse hale getirilmiştir. Ölü hücreleri elde etmek için, yaş hücreler %1 formaldehid kullanarak inaktive edilmiş ve daha sonra 60 °C sıcaklıkta 24 saat bekletilerek kurutulmuştur. Biyosorpsiyon çalışmaları için 1.0 g kuru hücre 100 ml damıtık suda suspense hale getirilmiş ve homojenizatörde 20 dakika 8000 devir/dak' da homojenize edilmiştir. Mikroorganizma çözeltileri, metal içeren ortamlara eklenmeden önce pH 1 molL<sup>-1</sup> , 0.1 molL<sup>-1</sup> , 0.001 molL<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> eklenerek ayarlanmıştır. Bu homojen hale getirilmiş mikroorganizma çözeltilerinden, metal içeren ortamlara 10 mL eklenerek, ortamlardaki mikroorganizma konsantrasyonunun 1 gL<sup>-1</sup> olması sağlanmıştır.

Ortamlardan belli aralıklarla alınan örneklerdeki, biyosorbe edilmeyen metal iyonu miktarları AAS kullanılarak ölçülmüştür.

## 4 BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında öncelikle, *R. delemar* mikroorganizmasıyla ağır metal iyonlarının biyobirikiminde doğrudan rol oynayan asit fosfataz enziminin ve metal biyobirikiminde doğrudan rol oynamayan, fakat atıksulardaki lipidlerin gideriminde etkin olan lipaz enziminin üretimi incelenmiştir. *R. delemar* lipazının en uygun üreme koşullarının belirlenmesi amacıyla ortam pH' ının, sıcaklığının, besin ortamı bileşenlerinin, indükleyicilerin ve yüzey aktif maddelerin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada karbon kaynaklarının mikroorganizma konsantrasyonu ve lipaz aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için substrat olarak glikoz, sakkaroz ve melas kullanılmış, yüzey aktif madde olarak tween 80'in etkisi incelenmiş ayrıca ticari yağların aktivite üzerine etkileri araştırılmış ve bunların optimum değerleri bulunmaya çalışılmıştır (Sağ 2006, Açıkel vd., 2011). Benzeri şekilde *R. delemar*' ın asit fosfataz enzimi üretmesi için uygun besin ortamı bileşenleri ve ortam pH'ı belirlenmiştir. Mikroorganizmanın her iki enzim aktivitesi üzerine ağır metal iyonlarının, Cu(II), Zn(II) ve Ni(II), etkileri incelenmiştir.

### 4.1 *R. delemar* ile Lipaz Enzim Aktivitesi İçin En İyi Koşulların Saptanması

*R. delemar*' ın lipaz enzimi üretimi için en uygun pH 8.0 olarak saptanmış ve deneyler bu pH değerinde yürütülmüştür. Karbon kaynakları olarak, glikoz, sakkaroz ve melas kullanıldığında, elde edilen maksimum enzim aktiviteleri ve mikroorganizma konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Karbon kaynakları arasında en yüksek enzim aktivitesi, melas kullanılan ortamda 4.73 µmol/L-dak olarak saptanmıştır. En yüksek mikroorganizma konsantrasyonu, 10 g/L melas sakkarozu kullanılan ortamda 2.28 g kuru mikroorganizma ağırlığı/L olarak elde edilmiştir (Çelebi, 2005). Melas kullanıldığında en yüksek enzim üretiminin elde edilmesi, melas sakkarozunun yanısıra, melas içindeki diğer bileşiklerin, amino asitler, organik asitler, vitaminler, inorganik katyonlar ve anyonlarında enzim aktivitesini arttırıcı yönde etki yapmasından kaynaklanmaktadır.

## **4.1.1 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu İçeren Ortamda Yağların ve Yüzey Aktif Maddelerin Karbon Kaynağı ve İndükleyici Olarak Etkisi**

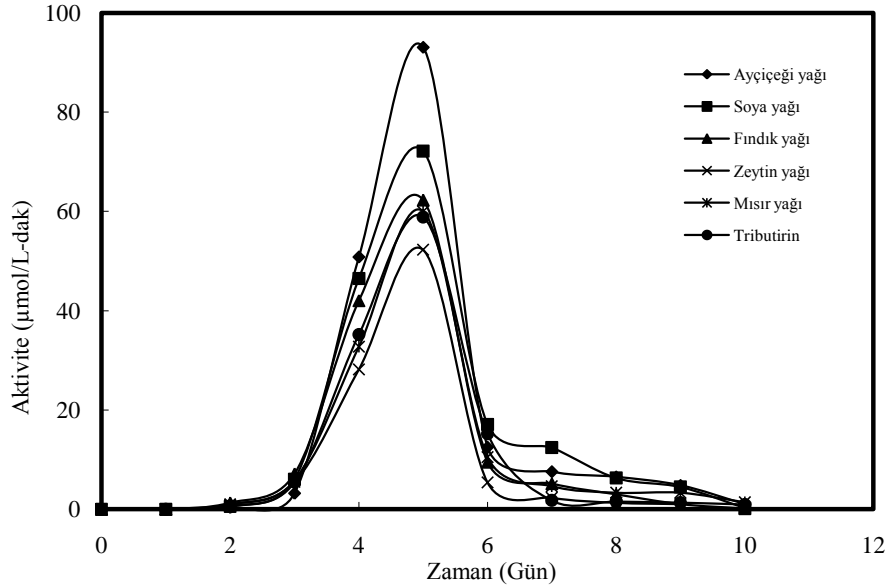
### **4.1.1.1 Ticari Yağların ve Tributirinin Etkisi**

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda yağların ve tributirinin indükleyici olarak etkisi Çizelge 4.1' de bileşimi verilmiş olan ortamda incelenmiştir (Sağ, 2006). Enzim üretimi üzerinde indükleyici olarak etkisi incelenen yağlar ayçiçeği yağı, soya yağı, fındık yağı, zeytin yağı, mısır yağı ve tributirindir. Ticari yağlar satış yerlerinden alınmış ve % 0.5 oranında fermentasyon ortamlarında kullanılmıştır. Ayrıca karbon kaynağı olarak 1.0 g/L melas sakkarozu tüm fermentasyon ortamlarına eklenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi 93.07  $\mu\text{mol/L-dak}$  olmak üzere ayçiçek yağı içeren ortamda elde edilmiştir (Şekil 4.2). Daha önce yapılan deneylerde, karbon kaynağı olarak sadece 1 g/L melas sakkarozu içeren ortamda, maksimum enzim aktivitesi 4.73  $\mu\text{mol/L-dak}$  değerinde iken, indükleyici eklenmesi ile ulaşılan aktivite değerlerinin arttığı gözlenmektedir. Elde edilen bu değer aynı konsantrasyonda tek başına glikoz içeren ortama göre 47.2, sakkaroz içeren ortama göre 36.8, melas içeren ortama göre 19.7 kez daha büyüktür. Ortama karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ile birlikte indükleyici olarak yağlar eklendiğinde maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 5. gününde elde edilmiştir. Diğer ticari yağlar melas ile birlikte kullanıldığında da enzim aktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiş ve elde edilen aktiviteler sırasıyla ayçiçeği yağı, soya yağı, fındık yağı, mısır yağı, tributirin ve zeytin yağı şeklinde azalmıştır. Fermentasyon ortamına eklenen yağların aktiviteyi değiştirme nedeni olarak, içerdikleri yağ asitleri ve doymamış bağ yapıları gösterilmektedir. Bu asitler yapılarına göre tekli ya da çoklu doymamış bağlar içerebilir. Oleik asit 18 karbonlu ve bir adet çift bağ içeren, linoleik asit, 18 karbonlu ve 2 adet çift bağ içeren, palmitik asit ise 16 karbonlu ve çift bağ içermeyen yağ asitleridir. Ayçiçeği yağı linoleik asit, fındık yağı linoleik asit zeytinyağı oleik asit, soya yağı linoleik asit, mısır yağı doymuş palmitik ve doymamış yağ (linoleik) asitlerini içerir. Yapılan çalışmalar, fermentasyon ortamına eklenen yağ asitlerinin lipaz enzimi aktivitesini artırıcı yönde etki ettiğini, aşırı miktardaki yağ asitlerinin aktiviteyi olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Ancak ayçiçeği ve soya yağının aktiviteyi nasıl arttırdığı tam olarak açıklanamamıştır (Wang, 2008). Ayçiçeği yağının içerdiği yağ asitleri miktarının ve doymamış bağ yapısının fazlalığı nedeniyle enzime bağlanarak fermentasyon

ortamındaki aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir. Zeytinyağı içeren fermentasyon ortamlarında ise *Rhizopus* türü mikroorganizma üremesinin ve hücre içi lipaz aktivitesini arttığı gösterilmiştir (Salleh vd., 1993). Aşırı miktarda eklenen zeytinyağının ise aktiviteyi olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Wang vd., 2006).

Çizelge 4.1 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve çeşitli ticari yağlar ve tributirinin içeren besin ortamının bileşimi

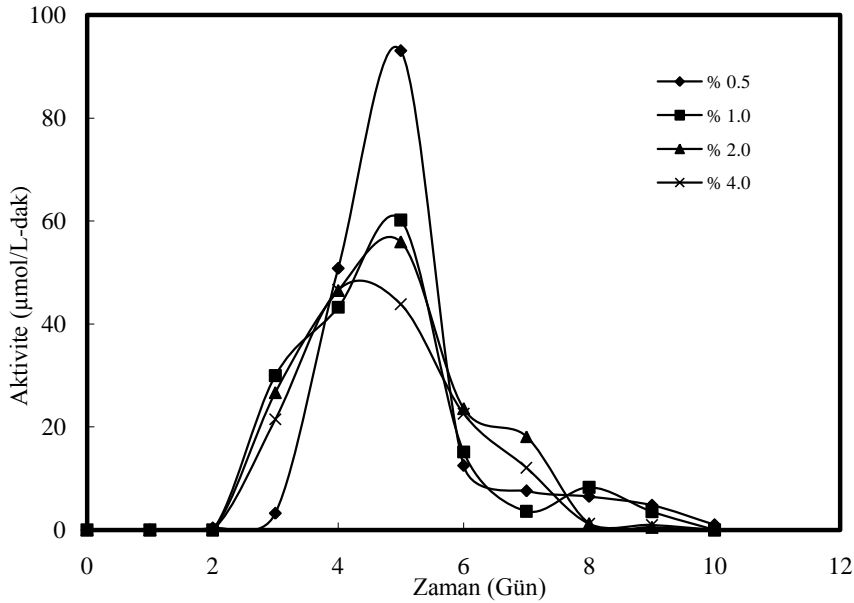
Madde	Konsantrasyon (g/L)
Melas sakkarozu	1
İndükleyici	% 0.5 (0.5 ml)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
Maya özütü	2



Şekil 4.1 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, indükleyici olarak farklı yağlar kullanılarak elde edilen enzim aktivitelerin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub>=1.0 g/L, C<sub>indükleyici</sub> = %0.5, K.H.=150 devir/dak).

#### 4.1.1.2 Ayçiçeği Yağı Miktarının Etkisi

Ana karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, ayçiçeği yağı miktarının lipaz aktivitesi üzerine etkisi, %0.5-%4.0 arasında değişen konsantrasyonlarda ayçiçeği yağı içeren ortamda araştırılmıştır. Ayçiçeği yağı konsantrasyonu arttıkça, enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2). Maksimum enzim aktivitesi, % 0.5 oranında ayçiçeği yağı içeren ortamda, 93.07  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.2 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, ayçiçeği yağı konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL,  $C_{\text{melas sakkarozu}}=1.0$  g/L, K.H.=150 devir/dak).

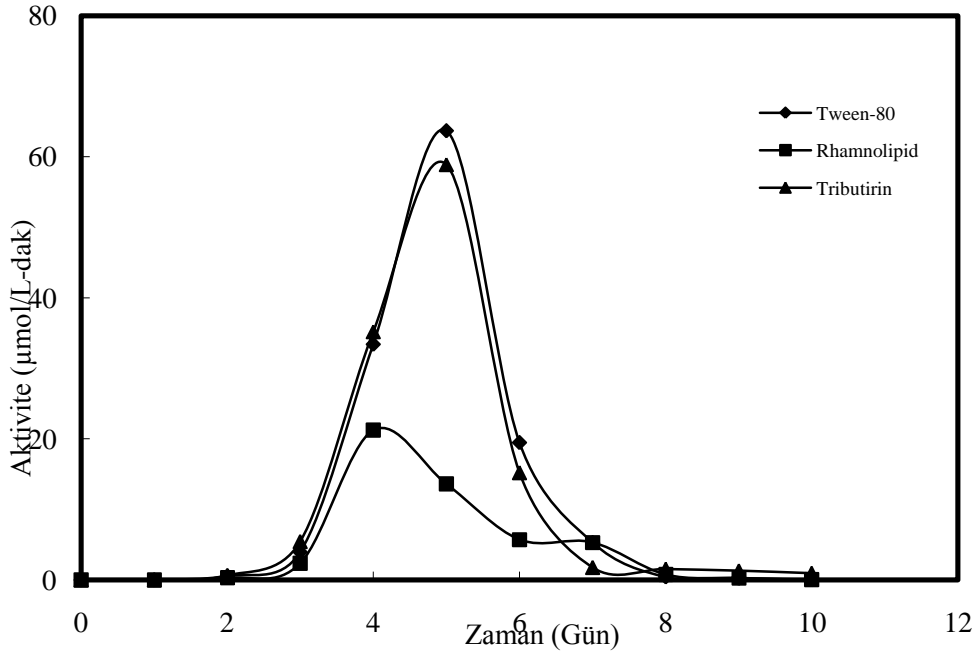
#### 4.1.1.3 Yüzey Aktif Maddelerin Etkisi

Yüzey aktif maddeler, esas olarak dış hücresel enzimin fermentasyon sıvısına salgılanmasını arttırmaktadırlar. Yüzey aktif maddelerin enzim üretimi üzerindeki etkisini görmek için, iki farklı yüzey aktif madde tween-80 ve rhamnolipid (biyosurfaktan), tributirin ile karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla yüzey aktif maddeler, fermentasyon ortamlarına % 0.5 oranında eklenmiştir. Yüzey aktif maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelendiği deneyler için besin ortamı bileşimi Çizelge 4.2' de verilmektedir.

Şekil 4.3.'de de görüldüğü gibi, tween-80 kullanılan ortamda, tributirin ve rhamnolipid kullanılan ortamlara göre, daha yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve çeşitli yüzey aktif maddeler içeren besin ortamının bileşimi

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Melas sakkarozu	1
Yüzey Aktif Madde	% 0.5 (0.5 ml)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
Maya özütü	2



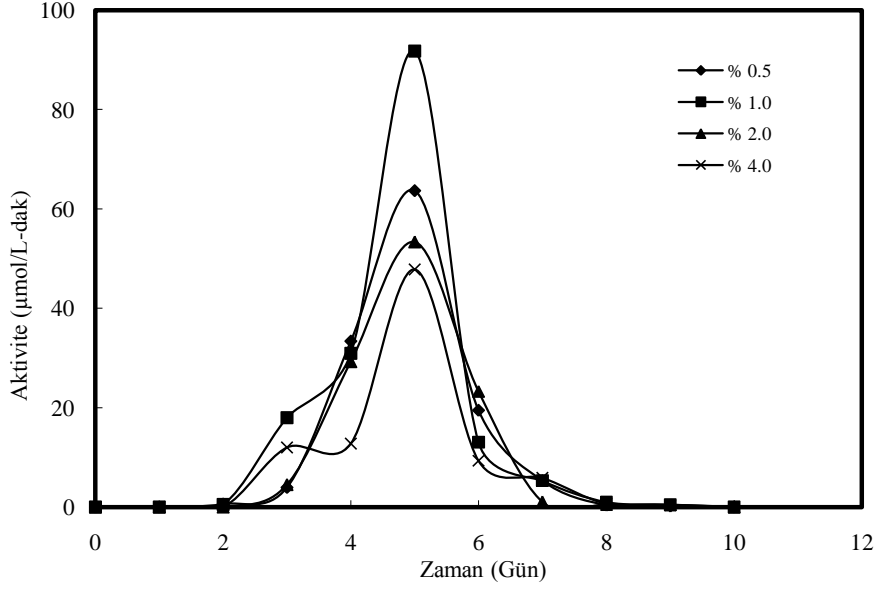
Şekil 4.3 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, indükleyici olarak farklı yüzey aktif maddeler kullanıldığında elde edilen enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub>=1.0 g/L, C<sub>yüzey aktif madde</sub> = %0.5, K.H.=150 devir/dak).

Tween-80 içeren ortamda, yüzey aktif madde içermeyen ortama göre enzim aktivitesi 13.5 kez artarak 63.68  $\mu\text{mol/L}$ -dak değerine ulaşmıştır. Tween-80 hem bir yüzey aktif maddedir hem de kimyasal yapısı bazı enzim substratlarına benzediğinden, bir indükleyici olarak etkimektedir. Literatürde yeralan çalışmalarda yüzey aktif madde olarak tween-80 kullanılan ortamda tween 80' in mikroorganizma için karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve enzim aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Li vd., 2001, Espinoza vd., 1990). Ticari bir biyosurfaktan olan rhamnolipid ile de yüzey aktif madde içermeyen ortama göre 4.5 kez daha yüksek bir enzim aktivitesi değerine ulaşılmıştır. Yüzey aktif maddelerin aktiviteyi arttırdığı gösterilmesine rağmen yağ asitleri eklenen ortamlardaki kadar yüksek aktivite elde edilememiştir (Wang vd., 2008). Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

#### **4.1.1.4 Tween-80 Miktarının Etkisi**

Enzim aktivitesi için kullanılan yüzey aktif maddenin yapısı çok önemlidir. İyonik olan yüzey aktif maddelerin (AOT, BOTMAC) enzim inhibisyonuna neden olduğu bilinmektedir. Tween-80 ve tween-60 gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddeler, mikroorganizma için karbon kaynağı olarak kullanılır ve ortamın arayüzey alanını genişletir. Bu nedenle enzim aktivitesini artırır. Bu tez çalışmasında ana karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, tween-80 miktarının lipaz aktivitesi üzerine etkisi, %0.5-%4.0 arasında değişen konsantrasyonlarda tween-80 içeren ortamlarda araştırılmıştır. Tween-80 konsantrasyonu %1' e kadar artırıldıkça enzim aktivitesinin arttığı, daha yüksek tween-80 konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.4). % 1 oranında tween-80 içeren ortamda elde edilen maksimum enzim aktivitesi, 91.73  $\mu\text{mol/L}$ -dak olarak bulunmuştur. Tween-80 içeren ortamda, yüzey aktif madde içermeyen ortama göre enzim aktivitesi 19.4 kez artmıştır. Farklı bir ortamda Yan Liu ve arkadaşları (2000), *C. Rugosa* lipazı aktivitesini arttırmak için ortama %1-5 (w/v) aralığında değişen oranlarda tween-80 eklemiş ve %2 oranında tween-80 için optimum değerler elde etmişlerdir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak fazla miktarda yüzey aktif maddenin enzimatik reaksiyon hızını artırmadığı gösterilmiştir.





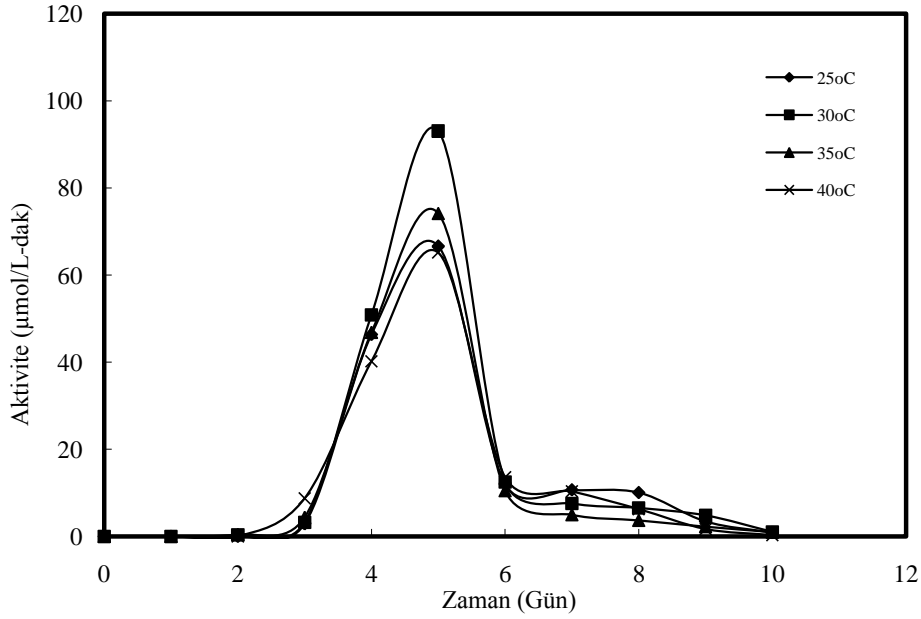
Şekil 4.4. Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda, Tween-80 konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub>=1.0 g/L, K.H.=150 devir/dak).

#### 4.1.2 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu İçeren Ortamda Sıcaklığın Etkisinin Araştırılması

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda sıcaklığın etkisi Çizelge 4.3' de bileşimi verilen besin ortamında araştırılmıştır.

Çizelge 4.3 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren besin ortamının bileşimi

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Melas sakkarozu	1
Ayçiçeği yağı	% 0.5 (0.5 ml)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
Maya özütü	2

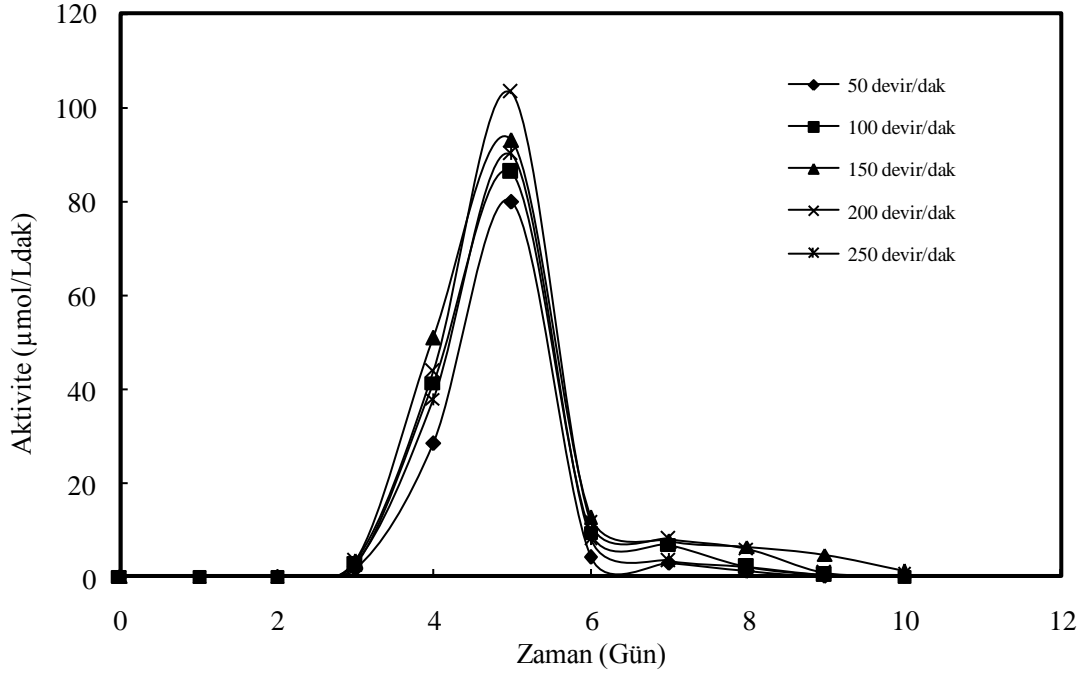


Şekil 4.5 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı sıcaklıklarda elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, V= 100 mL,  $C_{\text{melas sakkarozu}}=1.0$  g/L,  $C_{\text{ayçiçeği yağı}} = \%0.5$ , K.H.=150 devir/dak).

Şekil 4.5' de farklı sıcaklıklarda elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi verilmektedir. En uygun sıcaklık aralığı, 30-35 °C olup, bu sıcaklık aralığında elde edilen en yüksek enzim aktiviteleri sırasıyla 93.07 ve 74.17 µmol/L-dak olarak saptanmıştır.

#### 4.1.2.1 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Karıştırma Hızının Etkisi

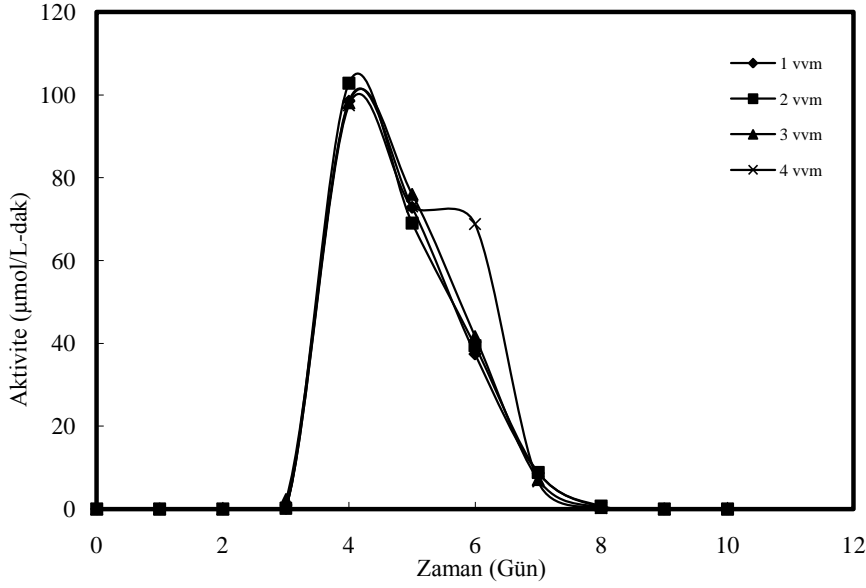
*R. delemar* ile lipaz enziminin üretimi üzerine karıştırma hızının etkisi, Çizelge 5.3'de bileşimi verilen besin ortamında incelenmiştir. Şekil 4.6' da farklı karıştırma hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi verilmektedir. En yüksek aktivite bu kez 200 devir/dak karıştırma hızında, 103.12 µmol/L-dak olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.6 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı karıştırma hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub>=1.0 g/L, C<sub>ayçiçeği yağı</sub> = %0.5).

#### 4.1.2.2 Karbon Kaynağı Olarak Melas Sakkarozu, İndükleyici Olarak Ayçiçeği Yağı İçeren Ortamda Hava Giriş Hızının Etkisi

*R. delemar* ile lipaz enziminin üretimi üzerine hava giriş hızının etkisi, karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve Çizelge 4.3' de bileşimi verilen besin ortamında incelenmiştir. Farklı hava giriş hızlarında zamanla enzim aktivitelerindeki değişim Şekil 4.7' de verilmektedir. Maksimum enzim aktivitesi 2 vvm hava giriş hızında, fermentasyonun 4. gününde 102.83 µmol/L-dak olarak elde edilmiştir. 4 vvm hava giriş hızında ise fermentasyonun 4. gününden başlayarak, 6. günde dahil olmak üzere 97.47 µmol/L-dak ile 68.80 µmol/L-dak arasında yüksek ve uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmiştir. Havalandırmanın varlığı hem enzim aktivitesini arttırmış, hem de daha erken ve uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmesini sağlamıştır.



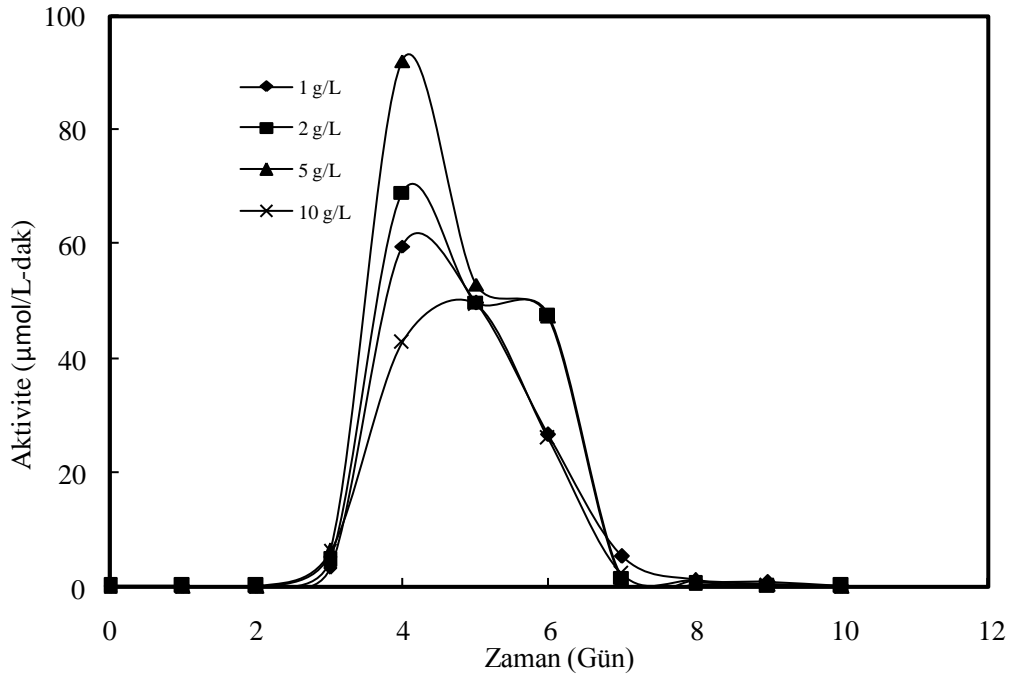
Şekil 4.7 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı hava giriş hızlarında elde edilen enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL,  $C_{\text{melas sakkarozu}} = 1.0$  g/L,  $C_{\text{ayçiçeği yağı}} = \%0.5$ , K.H.= 100 devir/dak).

#### 4.1.3 Melas ve Sakkarozun Enzim Aktivitesi Üzerine Birlikte Etkisi

Sakkaroz ve melasın birlikte kullanılmasının, karbon kaynağının etkisini arttırırken, melasın içindeki diğer bileşenlerinde etkisi ile *R. delemar*' in lipaz aktivitesini arttırıcı yönde etki yapacağı öngörülmektedir. Ancak melas konsantrasyonu şeker dışı maddelerin inhibisyonundan kaçınmak için optimum melas sakkarozu değerinde sabit tutulmalıdır. Bu amaçla 1.0 g/L derişiminde melas sakkarozu içeren ortamda sakkaroz konsantrasyonu, 1.0, 2.0, 5.0 ve 10.0 g/L aralığında arttırılmıştır (Çizelge 4.4). Maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 4. gününde 92.27 µmol/L-dak olarak 5.0 g/L sakkaroz içeren ortamda elde edilmiştir (Şekil 4.8). Bu değer melas içermeyen ortamda, enzim aktivitesini arttırıcı maksimum sakkaroz konsantrasyonu değerini doğrulamıştır. 1.0 g/L melas sakkarozu ve 5.0 g/L sakkaroz içeren ortamda elde edilen maksimum enzim aktivitesi, aynı konsantrasyonda sadece sakkaroz içeren ortama göre 36.5 kez daha büyüktür. Aynı konsantrasyonda sadece melas içeren ortama göre de 19.5 kez daha büyüktür.

Çizelge 4.4 Karbon kaynağı olarak melas ve sakkarozu birlikte içeren besin ortamının bileşimi

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Melas sakkarozu	1
Sakkaroz	1, 2, 5 ve 10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
Maya özütü	2

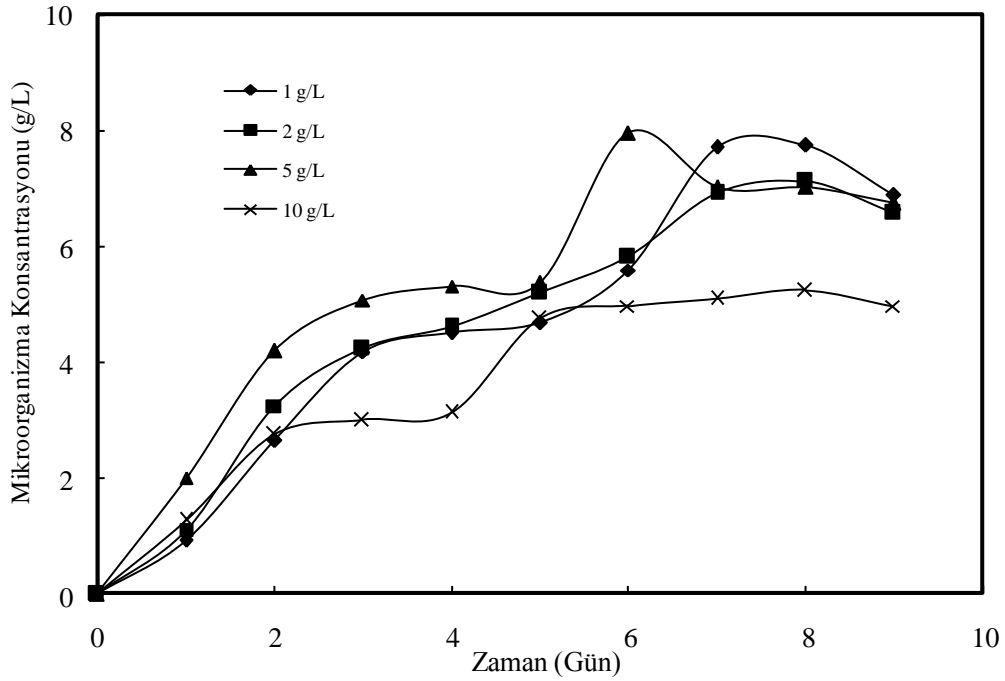


Şekil 4.8 Karbon kaynağı olarak melas ve artan konsantrasyonlarda sakkarozu birlikte içeren ortamlarda enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 150 devir/dak).

Öte yandan en düşük enzim aktivitesi 10.0 g/L konsantrasyonda sakkaroz içeren ortamda fermentasyonun 5. gününde 49.33 µmol/L-dak olarak elde edilmiştir.

Şekil 4.9' da ise sabit konsantrasyonda melas içeren ortamda sakkaroz konsantrasyonunun artırılmasının mikroorganizma konsantrasyonu üzerindeki etkisi görülmektedir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu 5.0 g/L konsantrasyonda sakkaroz içeren ortamda 7.95 kuru mikroorganizma ağırlığı/L olarak elde edilmiştir. 10.0

g/L sakkaroz konsantrasyonu sadece sakkaroz içeren ortamda olduğu gibi hem enzim üretimi hem de mikroorganizma çoğalması üzerinde inhibisyon etkisi yapmaktadır.



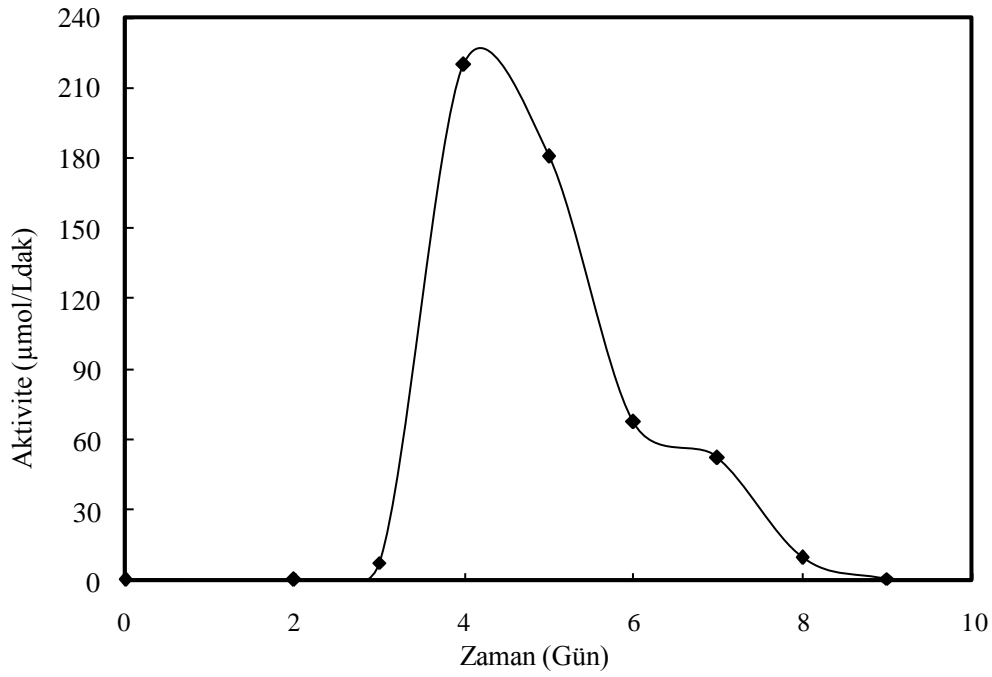
Şekil 4.9 Karbon kaynağı olarak melas ve artan konsantrasyonlarda sakkarozu birlikte içeren ortamlarda mikroorganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 150 devir/dak).

#### 4.1.4 Melas, Sakkaroz ve Ayçiçeği Yağının Enzim Aktivitesi Üzerine Birlikte Etkisi

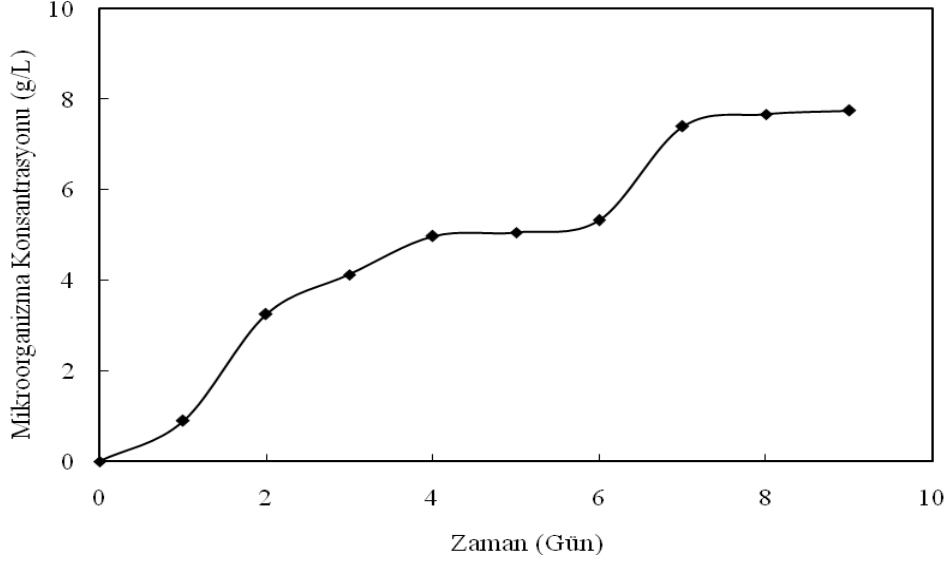
Melas ve sakkarozun fermentasyon ortamında birlikte kullanımı, melas içeren ortama indükleyici olarak ayçiçeği yağı eklenmesi ile hemen hemen aynı oranda enzim aktivitesinde bir artışa neden olmuştur. Elde edilen bu bulgular paralelinde, melas ve sakkarozu birlikte içeren ortama, indükleyici olarak ayçiçeği yağı eklenerek enzim aktivitesinin daha da artırılması planlanmıştır. Melas, sakkaroz ve ayçiçeği yağını birlikte içeren besin ortamının bileşimi, Çizelge 4.5' de verilmiştir. Fermentasyonun 4. gününde 219.71  $\mu\text{mol/L-dak}$ 'lık bir maksimum enzim aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.10). Elde edilen bu değer, sakkaroz ve melası birlikte içeren ortamda elde edilen enzim aktivitesinden 2.38 kez daha büyüktür. 4. ve 7. günler arasında göreceli olarak yüksek ve kararlı, uzun süreli bir enzim aktivitesi gözlenmiştir. Melas, sakkaroz ve ayçiçeği yağını birlikte içeren ortamda, mikroorganizma konsantrasyonu 7.74 kuru mikroorganizma ağı. /L değerine ulaşmaktadır (Şekil 4.11).

Çizelge 4.5 Karbon kaynağı olarak melas ve sakkaroz, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren besin ortamının bileşimi

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Melas sakkarozu	1
Ayçiçeği konsantrasyonu	%0.5 oranında (0.5 ml)
Sakkaroz	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
Maya özütü	2



Şekil 4.10 Karbon kaynağı olarak melas ve sakkaroz, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamda enzim aktivitesinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C<sub>sakkaroz</sub>= 5.0 g/L, C<sub>ayçiçeği yağı</sub>= %0.5, K.H.= 150 devir/dak).



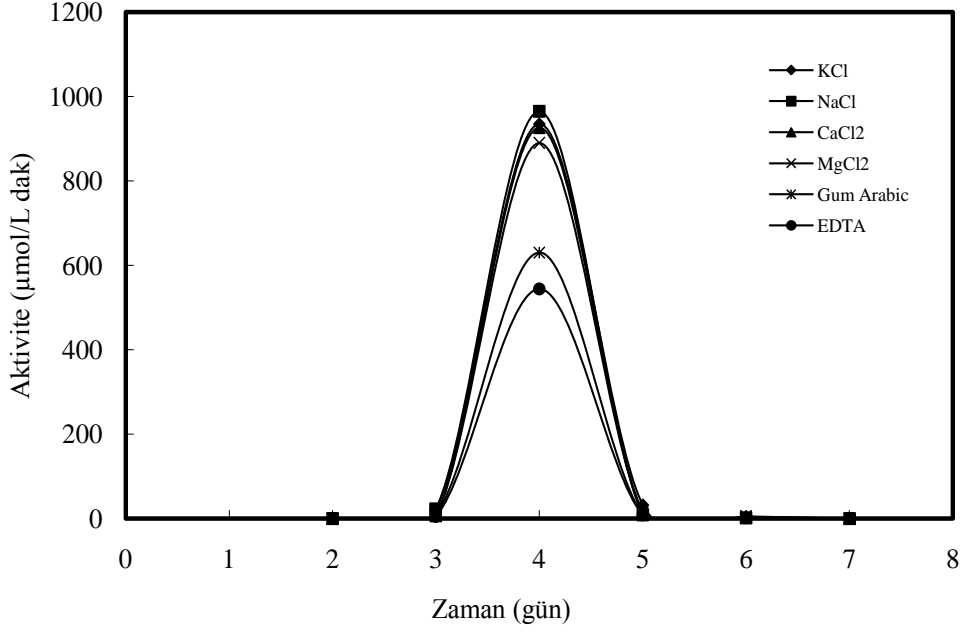
Şekil 4.11 Karbon kaynağı olarak melas ve sakkaroz, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamda mikrororganizma konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH= 8.0,T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, C<sub>sakkaroz</sub>= 5.0 g/L, C<sub>ayçiçeği yağı</sub>= %0.5, K.H.= 150 devir/dak).

#### 4.1.5 Aktivatörlerin Lipaz Aktivitesine Etkisi

Aktivatörlerin *R. delemar*' in üremesi ve lipaz enzimi üretmesi üzerine etkilerini incelemek için NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, arap zankı ve EDTA gibi farklı aktivatörler kullanılmıştır. Aktivatörlerin etkisini incelemek için fermantasyon ortamına 0.5 g/L aktivatör eklenmiştir. Lipaz aktivitesi aktivatörlerin varlığında NaCl>KCl>CaCl<sub>2</sub>>MgCl<sub>2</sub>>arap zankı>EDTA şeklinde azalmış ve en fazla aktivite 964.55 µmol/L-dak olarak NaCl kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.12).

*R. delemar*' in lipaz aktivitesi, fermantasyon ortamına eklenen Na(I), K(I), Ca(II) ve Mg(II) iyonları ile sırasıyla 1.91, 1.85, 1.83, 1.76 kat artmıştır. Bu iyonların katalitik aktiviteyi arttıran kofaktör olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Metal iyonlarını bağlayan bir molekül olan EDTA ise lipaz aktivitesini etkilememiştir. Bunun nedeni EDTA'nın süpernatant (üst faz) sıvı fazda bulunan iyonlardan ziyade diğer bileşiklerle kompleksler oluşturmasıdır.





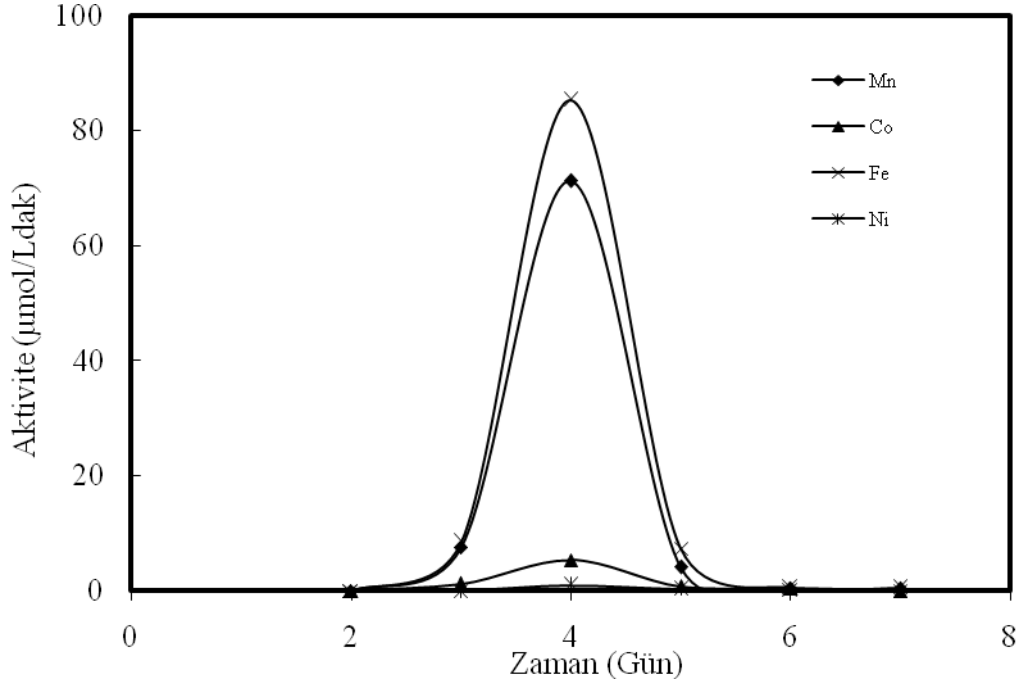
Şekil 4.12 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda farklı aktivatörlerin etkisiyle enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 100 devir/dak).

Maksimum biyokütle konsantrasyonu CaCl<sub>2</sub> eklenen fermantasyon ortamında 4.44 g kuru mikroorganizma ağırlığı/L. olarak elde edilmiştir. Aktivatörlerin varlığında mikroorganizma konsantrasyonu sırasıyla CaCl<sub>2</sub>>KCl>NaCl>arap zamkı>MgCl<sub>2</sub>>EDTA şeklinde azalmıştır.

#### 4.1.6 Ağır Metal İyonlarının Lipaz Aktivitesine Etkisi

Ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesine etkisinin incelenmesi için, fermantasyon ortamlarına 0.1 g/L derişimlerinde Fe(II), Mn(II), Co(II) ve Ni(II) metal iyonları eklenmiştir. Lipaz aktivitesi, ağır metal iyonları varlığında Fe>Mn>Co>Ni şeklinde azalmıştır (Şekil 4.13). Co(II) ve Ni(II) tuzları lipaz aktivitesini oldukça fazla düşürdüğünden enzim konfirmasyonunu değiştirdiği düşünülmektedir.

Karbon kaynağı olarak melas ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı kullanıldığında enzim aktivitesi 93.07 µmol/L-dak iken, Fe(II) içeren ortamda (85.23 µmol/L-dak) ve Mn(II) içeren ortamda (71.25 µmol/L-dak) yaklaşık olarak aynı elde edilmiştir.



Şekil 4.13 Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu, indükleyici olarak ayçiçeği yağı içeren ortamlarda ağır metallerin etkisiyle enzim aktivitelerinin zamanla değişimi (pH= 8.0, T=30 °C, V= 100 mL, C<sub>melas sakkarozu</sub> =1.0 g/L, K.H.= 100 devir/dak).

Mikroorganizma konsantrasyonu ağır metal iyonu varlığında, enzim aktivitesinde olduğu gibi sırasıyla Fe>Mn>Co>Ni şeklinde elde edilmiştir. Maksimum mikroorganizma konsantrasyonu Fe iyonları varlığında 5.51 g kuru mikroorganizma ağırlığı/L olarak elde edilmiştir. Ni iyonları mikroorganizma büyümesini oldukça fazla inhibe etmiş ve mikroorganizma konsantrasyonu 2.78 g kuru mikroorganizma ağırlığı /L olarak azalmıştır. Lipaz aktivitesine ağır metallerin etkisi üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır.

Bilinen lipaz enzimi inhibitörleri Ag(I), Al(III), Mn(II), Sn(II) ve Zn(II)' dir. Güçlü inhibitörler Hg(II) ve Fe(II)' dir. Ca(II) ve Mg(II) lipaz aktivatörleri olarak bilinir. Fe(III) ve Cu(II) metal iyonları ise lipaz enzimi için inhibitördür. Bütün metal iyonları *Flavobacterium odoratum* mikroorganizmasından üretilen lipaz için inhibitördür. Mn(II) %70, Fe(II) %52 oranında aktiviteyi inhibe etmiştir (Labuschagne vd., 1997). Aynı şekilde bu tez çalışmasında *R. delemar* ile elde edilen lipaz enzimi için Mn(II) Fe(II) iyonlarına göre daha fazlainhibisyona neden olmuştur. Ancak *Pseudomonas sp.* KWI-56 mikroorganizmasından lipaz üretiminde inhibitor olarak bilinen Fe(II), Fe(III), Cu(II) ve Mg(II) gibi ağır metallerin aktivator rolü oynadığı

görülmüştür (Iızumı vd., 1990). *Pseudomonas aeruginosa* LP602 mikroorganizmasından üretilen lipaz için Cd(II), Co(II) enzim aktivitesini %80 oranında arttırırken, Zn(II) aktiviteyi %48 oranında azaltmıştır (Dharmstithi ve Kuhasuntisuk, 1998). Enzimlerin EDTA ile muamelesinde aktivitenin değişmediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada Na(I) ve K(I) iyonlarının *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 lipazının aktivitesini %20-30 düşürürken, Mg(II) ve Ca(II) iyonlarının arttırdığı bulunmuştur (Sharon vd., 1998). Ağır metal iyonları aktif merkezin şeklini ve/veya yerini değiştirerek enzimi inhibe etmektedir.

## 4.2 *R. delemar*' in Asit Fosfataz Üretimi

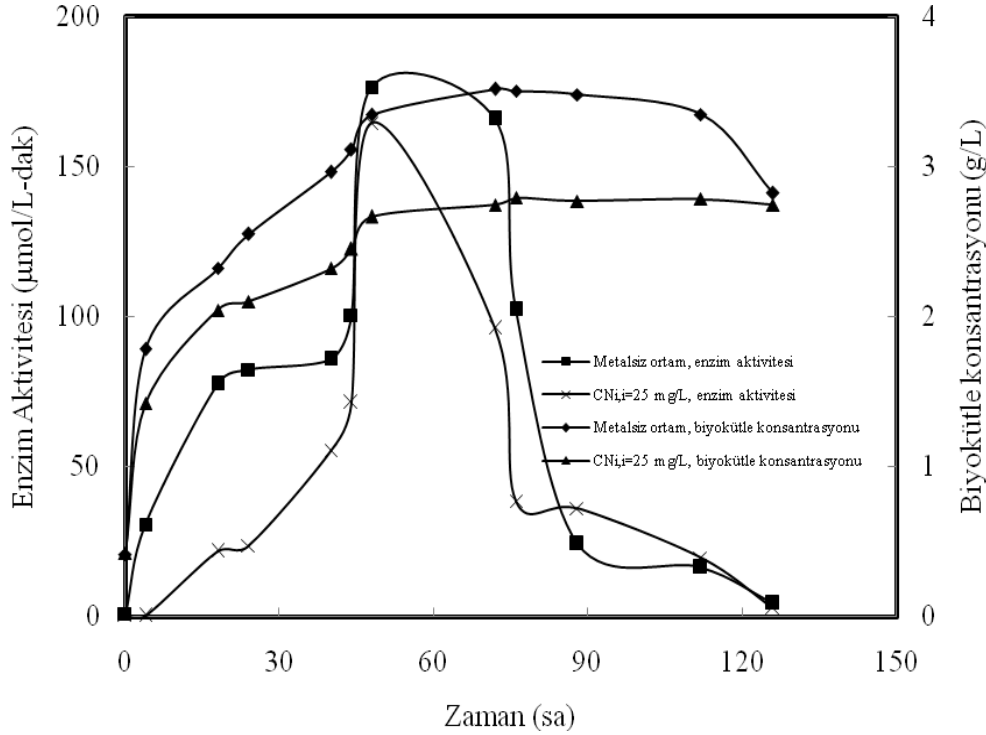
### 4.2.1 Ni(II) İyonları Varlığında ve Metalsiz Ortamda *R. delemar*' in Asit Fosfataz Üretimi

*R. delemar*' in asit fosfataz üretiminde aşılama sonrasında gözlemlenen gecikme evresi (lag phase) ortamda Ni(II) iyonları konsantrasyonunun artmasıyla 4. saatin sonuna kadar uzamıştır. Bu adaptasyon periyodundan sonra *R. delemar* hücreleri hızlı bir şekilde büyümüş ve biyokütle konsantrasyonu zamanla üstel olarak (logarithmic phase) artmıştır. Üremenin yavaşlama evresi (deceleration phase), üstel evresini takip etmiş 48 ve 72. saatler arasında gerçekleşmiştir.

Maksimum biyokütle konsantrasyonu pH 5.0' de, yavaşlama evresinin sonunda (72–76 sa) 3.515 g/L olarak elde edilmiştir (Açikel ve Ersan, 2010). Bu fazdan sonra maksimum biyokütle konsantrasyonu yaklaşık sabit kalmıştır (Şekil 4.14).

Asit fosfataz üretimi kültürasyon zamanıyla artmıştır. Maksimum enzim aktivitesine ikinci günde ulaşılmıştır. *R. delemar*'ın maksimum asit fosfataz üretimi, mikroorganizma üretiminin çok olduğu üstel üreme fazının son evresinde gerçekleşmiştir (48 sa). Ancak kültür koşullarına bağlı olarak enzim üretimi 72 sa devam etmiştir. Asit fosfatazla birlikte mikroorganizma büyümesi benzer şekilde devam etmiştir. Maksimum asit fosfataz aktivitesi metal iyonu içermeyen kültür ortamında, pH 5.0 değerinde, 176.41  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak elde edilmiştir. Ni(II) iyonlarının varlığında da, maksimum asit fosfataz aktivitesi üremenin üstel üreme evresinin sonunda (48 sa) elde edilmiştir. Bununla beraber asit fosfataz aktivitesi göreceli olarak kısa bir zaman periyodunda kararlı kalmış daha sonra hızla azalmıştır.

Fermentasyon ortamının pH'ı *R. delemar*' ın büyümesi süresince bir miktar azalmıştır. Maksimum asit fosfataz aktivitesinin elde edildiği, kültürasyonun 48. saatinde fermentasyon ortamının pH'ı 4.72 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.14 Metal iyonu içermeyen ve 25 mg/L Ni(II) iyonu içeren fermentasyon ortamlarında, asit fosfataz aktivitesinin ve biyokütle konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=5.0;  $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30^{\circ}C$ ).

#### 4.2.2 Ni(II) İyonlarının *R. Delemar*' ın Üremesine Etkisi

Fermentasyon ortamında Ni(II) iyonlarının varlığı *R. delemar* üremesini inhibe etmiştir. Üstel üreme evresinin sonunda (48 sa) biyokütle konsantrasyonu Ni(II) iyonlarının konsantrasyonunun 10-50 mg/L aralığında arttırılmasıyla 2.884' den 1.677 g/L' ye azalmıştır (Çizelge 5.6). 20 g/L nişasta konsantrasyonunda pH 5.0'de üremenin 48. saatinde biyokütle konsantrasyonu 3.3427 g/L ve spesifik üreme hızı da  $0.0499 \text{ sa}^{-1}$  olarak elde edilmiştir. Biyokütle konsantrasyonu ve spesifik üreme hızı inhibitör konsantrasyonuna bağlıdır. Ni(II) iyonu konsantrasyonu arttıkça her ikisi de azalmaktadır. En düşük spesifik üreme hızı ve biyokütle konsantrasyonu, 50 mg/L Ni(II) iyonunun bulunduğu ortamda sırasıyla  $0.0478 \text{ sa}^{-1}$  ve 1.677 g/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6 Spesifik üreme hızı ve maksimum biyokütle konsantrasyonunun metal içermeyen ve içeren ortamlar için karşılaştırılması (pH=5.0;  $C_{\text{nişasta}} = 20 \text{ g/L}$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t_{\text{inkübasyon}} = 48 \text{ sa}$ )

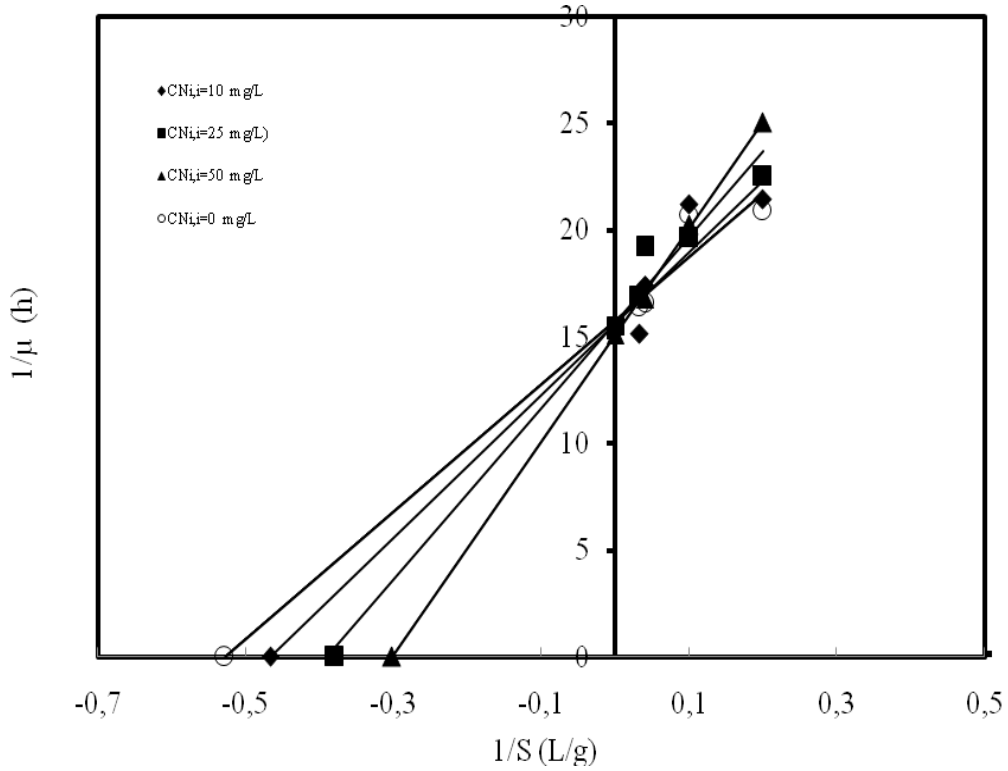
$C_{\text{Ni},i}$ (mg/L)	Spesifik üreme hızı $\mu(\text{sa}^{-1})$	Biyokütle konsantrasyonu (g/L)
0	0.0499	3.3427
10	0.0497	2.8838
25	0.0487	2.6648
50	0.0478	1.6770

#### 4.2.3 *R. delemar*' in Üreme Hızı Üzerine Ni(II) İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi

Mikrobiyal üreme üzerine inhibisyonun etkisi enzim inhibisyonuna benzer olarak tanımlanır. Mikroorganizmaların spesifik üreme hızına inhibitörlerin etkisi yarışmalı, yarışmasız ve kısmi yarışmalıdır.

Maksimum spesifik üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve Monod doygunluk sabitlerinin ( $K_s$ ) artan Ni(II) iyonu derişimi ile değişimi, Ni(II) iyonu içermeyen ortamlarla karşılaştırılarak Çizelge 4.7.'de verilmiştir. *R. delemar*' in üreme hızı üzerine, Ni(II) inhibisyonunun etkisini araştırmak için çift taraflı (double-reciprocal) doğrusallaştırılmış Monod eşitliği kullanılmıştır.  $1/S$  değerine karşı çizilen  $1/\mu$  grafiğinin, eğiminden  $K_s/\mu_m$ , y eksenini kesim noktasından ise  $1/\mu_m$  değeri bulunmaktadır. Mikroorganizmanın metalsiz ortamda maksimum spesifik üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve doygunluk sabiti ( $K_s$ )  $0.0649 \text{ sa}^{-1}$  ve  $1.8928 \text{ g/L}$  olarak bulunmuştur. Çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden, Ni(II) iyonu konsantrasyonunun 10-50 mg/L aralığında arttırılmasının, *R. delemar*' in üreme hızı üzerine etkisinin, yarışmalı inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.15).

Yarışmalı inhibisyonun net etkisi görünür Monod sabitlerinin,  $K_{s,app}$ , değerlerinin artması ve buna bağlı olarak da reaksiyon hızının azalmasıdır. Doğunluk sabitinin veya yarı hız sabiti  $K_s$ ' in düşük değerleri mikroorganizmanın substrat için yüksek bir ilgiye sahip olduğunu gösterir. Maksimum spesifik üreme hızları Ni(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarıyla yaklaşık olarak sabit kalmakta ve  $0.0652 \text{ sa}^{-1}$  olarak elde edilmektedir ve elde edilen bu değer Ni(II) içermeyen ortamda elde edilen maksimum spesifik üreme hızı ile aynıdır. Yarışmalı inhibisyon substratın yüksek konsantrasyonları kullanılarak engellenebilir.



Şekil 4.15 Ni(II) içermeyen ortam ve 0-50 mg/L aralığında, artan konsantrasyonlarda Ni(II) iyonları içeren ortamlarda, *R. delemar*'ın üreme hızı için çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri ( $P_H=5.0$ ;  $T=30^\circ\text{C}$ ).

#### 4.2.4 Ni(II) İyonunun *R.delemar*' ın Üreme Hızı Üzerindeki İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi

Yarışmalı inhibisyon için Şekil 4.16' daki çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden hesaplanan görünür  $K_{s,app}$  değerleri Ni(II) konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrunun eğiminden  $K_s/K_i$  kesim noktasından  $K_s$  bulunmuştur. *R. delemar*' ın spesifik üreme hızı için Ni(II) iyonlarının inhibisyon sabiti 67.11 mg Ni(II)/L olarak bulunmuştur. Yarışmalı inhibisyonda inhibisyon sabiti inhibitör konsantrasyonundan daha büyüktür. Görünür Monod sabitinin artışı üzerine daha düşük inhibitor konsantrasyonlarındaki  $I_{Ni}/K_{Ni}$  inhibisyon teriminin katkısı daha yüksek inhibitor konsantrasyonlarındakinden daha düşüktür.

Çizelge 4.7 Ni(II) içermeyen ortamda ve Ni(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarının varlığında elde edilen maksimum spesifik üreme hızları ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması ( $P_H=5.0$ ; sıcaklık= 30°C)

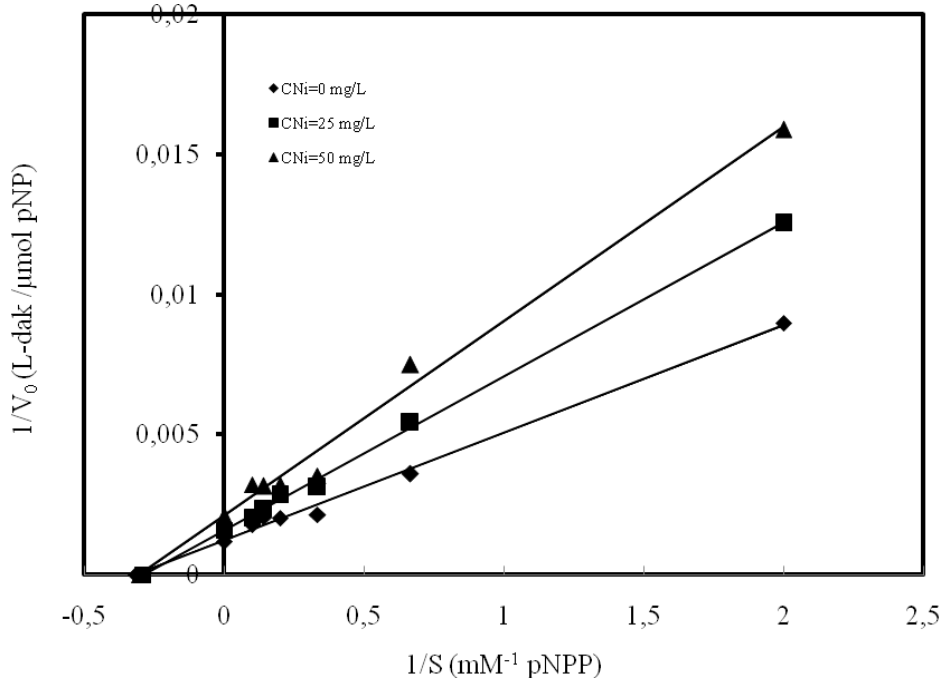
$C_{Ni,i}$ (mg/L)	$\mu_{maks}$ (1 /sa)	$K_s$ (g/L)	$R^2$
0	0.0649	1.8928	0.9827
10	0.0654	2.1442 <sup>a</sup>	0.9721
25	0.0644	2.6407 <sup>a</sup>	0.9835
50	0.0662	3.3102 <sup>a</sup>	0.9990

<sup>a</sup>: Görünür Monod sabitleri

#### 4.2.5 *R. delemar*' in Asit Fosfataz Aktivitesine Ni(II) İyonlarının Etkisi

Asit fosfataz aktivitesi Ni(II) içeren fermentasyon ortamlarında pek az azalmaktadır. 25 mg/L Ni(II) iyonları içeren ortamda maksimum fosfataz aktivitesi, üstel üreme evresinin sonunda (48 sa), 164.4  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak bulunmuştur (Şekil 4.14). Ni(II) iyonlarının konsantrasyonunun arttırılmasıyla asit fosfataz aktivitesinin azaldığı görülmüştür. *R. delemar*' la asit fosfataz enziminin biyosentezinde Ni(II) iyonlarının varlığında gecikme evresi oluşmamıştır. Asit fosfataz biyosentezi Ni(II) iyonları tarafından bastırılmamıştır. Maksimum enzim aktivitesi Ni(II)' siz ortamla aynı zamanda elde edilmiştir.

Enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesine Ni(II) iyonlarının inhibisyon etkisi, reaksiyon karışımındaki Ni(II) iyon konsantrasyonu 25-50 mg/L arasında arttırılarak araştırılmıştır. Enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesi üzerine Ni(II) inhibisyon tipinin belirlenmesi için Michaelis-Menten kinetiği uygulanmıştır.  $1/S$ 'e karşı  $1/V$  grafiği, eğimi  $K_m/V_m$  ve y eksenini kesim noktası  $1/V_m$  olan bir doğru verir (Şekil 4.16). Bu çalışmada bulunan Michaelis-Menten sabiti Çizelge 4.8' de literatürde daha önceden farklı mikroorganizmaların asit fosfataz aktivitesi için bulunmuş olan Michaelis-Menten sabitleri ile karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Michaelis-Menten sabiti,  $K_m$  ve reaksiyonun ileri yöndeki maksimum hızı,  $V_m$ , Ni(II) içermeyen ortamda 3.17 mM ve 833.3  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9).



Şekil 4.16 Ni(II) içermeyen ortamda ve 10-50 mg/L aralığında Ni(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda asit fosfataz enzimi için Lineweaver-Burk grafikleri ( $P_H=5.0$ ;  $T= 30\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Ni(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarda eklenmesi, maksimum reaksiyon hızını önemli derecede azaltmış, fakat enzim kompleksinin substrata ilgisini etkilememiştir. Bu durumda Michaelis-Menten sabitleri yaklaşık olarak sabit kalmaktadır. Bu tip inhibisyon yarışmasız inhibisyon olarak bilinmektedir. Cıva, bakır ve gümüş gibi ağır metal bileşiklerinin çeşitli enzimler için yarışmasız inhibitörler olduğu rapor edilmiştir (Shuler ve Kargı, 1992, Labuschagne vd., 1997).

Çizelge 4.8 Farklı mikroorganizma türlerinden elde edilen asit fosfataz aktivitesi için  $K_m$  sabitlerinin değerleri

Mikroorganizma adı	$K_m$ (mM)	Referans
<i>Aspergillus niger</i>	4.70	Tsekova vd., 2002
<i>Aspergillus niger</i>	0.38	Huang ve Shindo, 2000
<i>Aspergillus nidulans</i>	0.47	Nozawa vd., 1998
<i>Humicola lutea</i>	1.30	Micheva-Viteva vd., 2000
<i>R. delemar</i>	0.325	Tsekova ve Galobova, 2003
<i>R. delemar</i>	3.17	Bu tez çalışması



Çizelge 4.9 Metal içermeyen ve artan Ni(II) iyonu derişimlerinde maksimum aktivite ve maksimum Michaelis-Menten sabitleri karşılaştırılması ( $P_H=5.0$ ;  $T= 30^\circ C$ )

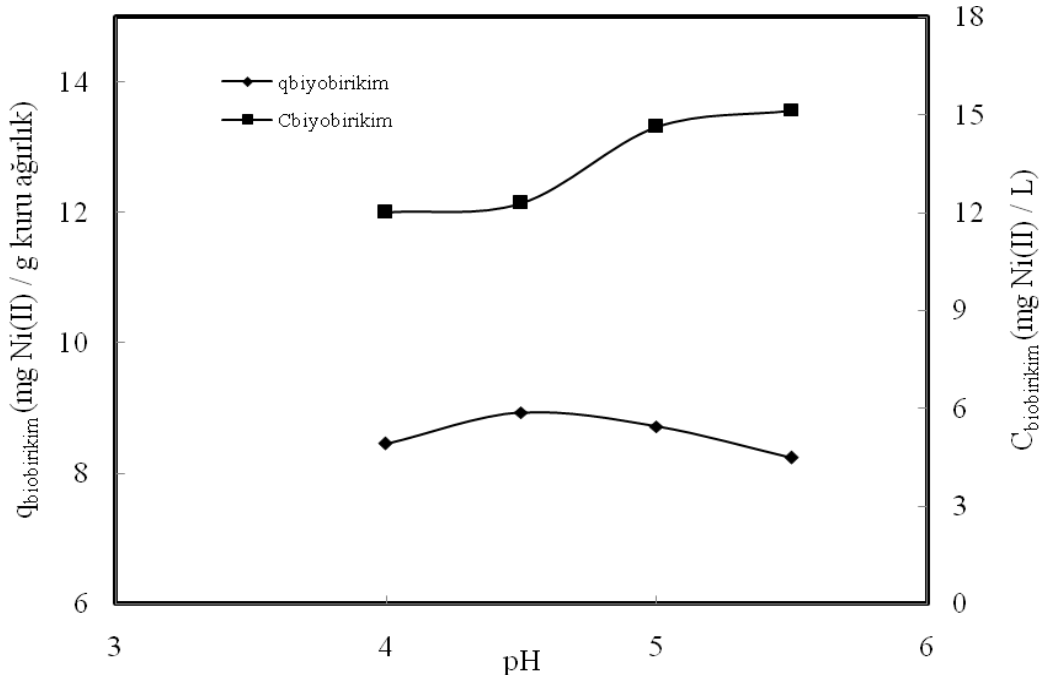
$C_{Ni,i}$ (mg/L)	$v_{maks}$ ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )	$K_m$ (mM)	$R^2$
0	833.3	3.17	0.9904
25	625.0	3.44	0.9984
50	476.2	3.29	0.9943

#### 4.2.6 Asit Fosfataz Aktivitesi İçin Ni(II) İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi

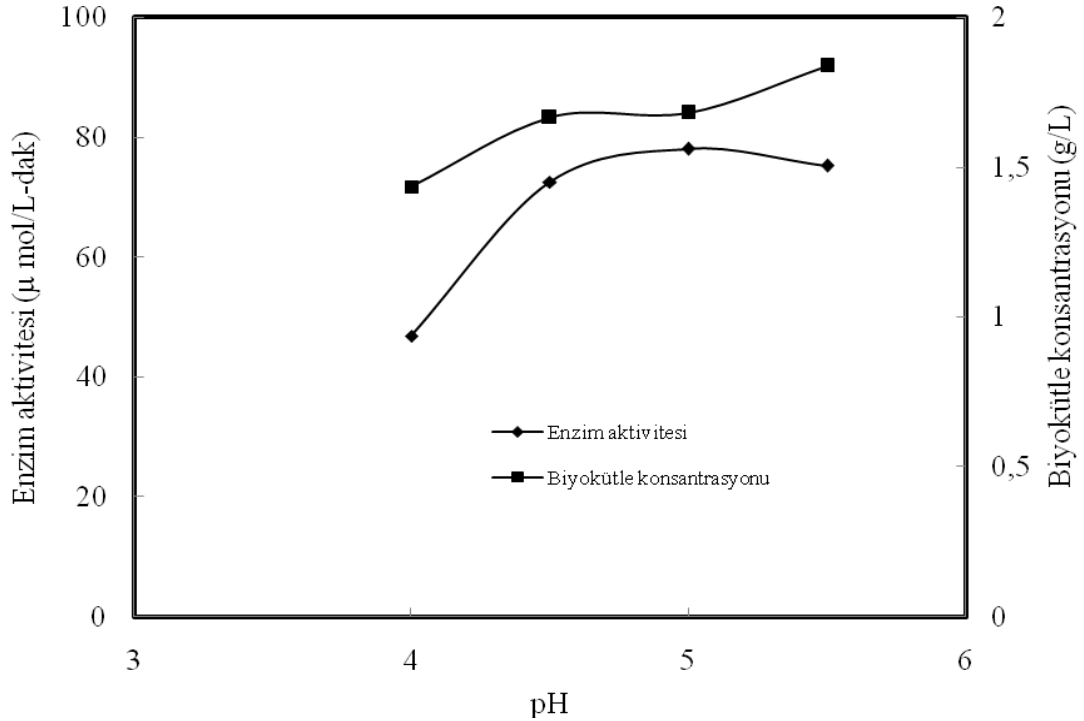
Inhibitor konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilen  $1/V_m.app$  değerleri eğimi  $1/V_m K_i$  kesim noktası  $1/V_m$  olan düz bir doğru verir. Enzimatik reaksiyon hızı üzerine Ni(II) iyonları için inhibisyon sabiti 50 mg Ni(II)/L olarak saptanmıştır.

#### 4.2.7 *R. delemar*'ın Ni(II) Biyobirikimi

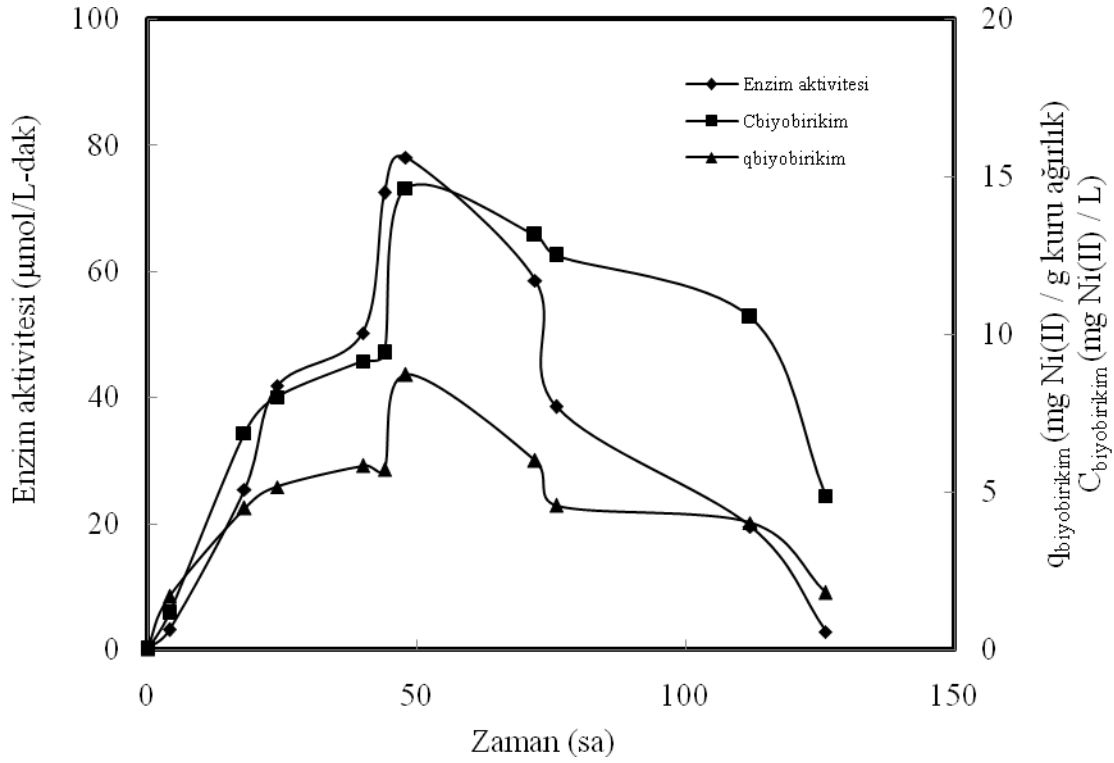
*R. delemar*' la Ni(II) iyonlarının maksimum biyobirikimi pH 5.0-5.5 aralığında elde edilmiştir. Bu pH aralığında aynı zamanda maksimum enzim aktivitesi değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.17 ve 4.18). 50 mg/L başlangıç Ni(II) iyonu konsantrasyonunda  $C_{Ni,i}$ , pH 5.0 ve  $25^\circ C$  sıcaklıkta, biyobiriktirilen Ni(II) iyonu konsantrasyonu (mg/L), kuru ağırlık temeli üzerinde biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Ni(II) iyon miktarları (mg Ni(II)/g kuru ağırlık) ve asit fosfataz aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 4.19' da gösterilmiştir.



Şekil 4.17 Ni(II) iyonu için biyobiriken Ni(II) iyonu konsantrasyonu (mg / L) ve birim kuru ağırlık temelinde biyobiriken Ni(II) iyonu miktarının (mg Ni(II) / g kuru ağırlık) pH ile değişimi (nişasta konsantrasyonu= 20 g/L; sıcaklık= 30 °C;  $C_{Ni,i}$ = 50 mg/L).



Şekil 4.18 Enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ ) ve biyokütle konsantrasyonunun pH ile değişimi (g/L) (nişasta konsantrasyonu= 20 g/L; sıcaklık= 30 °C;  $C_{Ni,i}$ = 50 mg/L).



Şekil 4.19 Biyobiriken Ni(II) iyonlarının konsantrasyonu (mg/L), birim kuru ağırlık için biyobiriken Ni(II) iyonlarının miktarı (mg Ni(II)/ g kuru ağırlık) ve enzim aktivitesinin zamanla değişimi ( $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30$  °C;  $C_{Ni,i} = 50$  mg/L).

Biyobiriktirilen Ni(II) iyonu konsantrasyonu gecikme evresi süresince yavaş, üstel üreme evresinde hızlı bir şekilde artmıştır ve üremenin 48. saatinde yani üstel üreme evresinin sonunda maksimum değerine ulaşmıştır. Maksimum asit fosfataz aktivitesi de *R. delemar* üremesinin aynı basamağında elde edilmiştir. Asit fosfataz Ni(II) biyobirikiminde doğrudan rol oynadığından bu beklenen bir sonuçtur. Daha sonra biyobiriktirilen Ni(II) iyon konsantrasyonu üremenin yavaşlama ve durgun evreleri (stationary growth phase) boyunca yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Üremenin ölüm fazının (death phase) başlangıcında (126 sa) biyobiriktirilen Ni(II) iyonu konsantrasyonu azalmaya başlamış, metal giderimini ve üremenin durgun fazının veya denge basamağının ardından Ni(II) iyonlarının ortama geri bırakıldığı saptanmıştır. Zamanla biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Ni(II) iyon miktarlarının değişimine gelince, biyobirikim eğrisinin görüntüsü pek az değişmiştir. Genç hücre konsantrasyonu göreceli olarak düşük olduğundan, biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Ni(II) iyon miktarlarında hızlı bir artış, gecikme evresinde ve üstel üreme evresinin başlangıcında gözlenmiştir. Mikroorganizma konsantrasyonu arttığında

ve yaklaşık olarak sabit bir değere ulaştığında zamanla biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Ni(II) iyon miktarlarındaki artış azalmıştır.

#### **4.2.8 *R. delemar*' ın Üreyen (Growing), Üreme Periyodunu Tamamlamış (Resting) ve Ölü (Dead) Hücrelerinin Ni(II) Sorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması**

*R. delemar* 'ın üreyen (growing), üreme periyodunu tamamlamış (resting) ve ölü (dead) hücrelerinin Ni(II) sorpsiyon kapasiteleri, sorpsiyon izotermlerine uyumu araştırılmıştır (Çizelge 4.10). Deneysel ve yöntem tarafından önerilen denge giderimi arasındaki en iyi uyum Freundlich modeli kullanılarak elde edilmiştir. Freundlich izoterminden elde edilen  $K_F$  ve  $n$  değerleri Çizelge 4.11' de sunulmaktadır. Kesim noktası  $K_F$  sorpsiyon kapasitesine işaret eder. Eğim sorpsiyon kapasitesi üzerine konsantrasyonun etkisini ve sorpsiyon şiddetini temsil eder. Ni(II) iyonları ölü hücrelerle düşük başlangıç metal iyonu konsantrasyonlarında etkin biçimde sorbe edilmektedir. 48 saatin sonunda *R. delemar* 'ın mikroorganizma üremesinin yüksek olması nedeniyle Ni(II) iyonlarının daha düşük konsantrasyonlarında üreyen hücrelerle biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Ni(II) iyon miktarları ölü hücrelerle elde edilene göre daha düşüktür. Üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreler için sorpsiyon izotermlerinin karşılaştırılması iyi sorbe edilen Ni(II) iyonlarının dik eğimlerle yükselen izotermelere sahip olduklarını ve daha yüksek sorbe edilen konsantrasyon değerlerine,  $q_{eq}$ , karşı geldiklerini göstermektedir (Şekil 4.20). Biyosorpsiyon metabolizmadan bağımsız bir prostestir. Dolayısıyla hem yaşayan hem ölü hücrelerle gerçekleştirilebilir. Üstel üreme fazının sonunda, fermentasyon ortamlarından santrifüjlenerek ayrılan yaş *R. delemar* hücreleriyle, Ni(II) iyonlarının gideriminin, üreyen hücrelerin biyobirikiminden ve ölü hücrelerin biyosorpsiyonundan daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum Ni(II) gideriminin asit fosfataz enziminin aktivitesi aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Asit fosfataz enzimi *R. delemar*' ın üreme periyodunu tamamlamış, suda suspense hale getirilmiş yaş hücrelerinde de fonksiyonunu göstermiştir. Bununla beraber *R. delemar* üreme ortamından ayrıldıktan sonra asit fosfataz enziminin aktivitesi azalmaktadır. *R. delemar*' ın üreyen üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücrelerinin metal giderim yolları hemen hemen aynıdır. Biyokütlenin birimkütlesi başına biyobiriktirilen Ni(II) iyonu miktarları, artan Ni(II) konsantrasyonu ile artmasına rağmen daha yüksek Ni(II) iyon giderim verimlilikleri bütün biyokütle tipleri için daha düşük Ni(II) konsantrasyon değerlerinde elde edilmiştir. 25 mg/L Ni(II) iyon konsantrasyonunun üzerinde Ni(II)

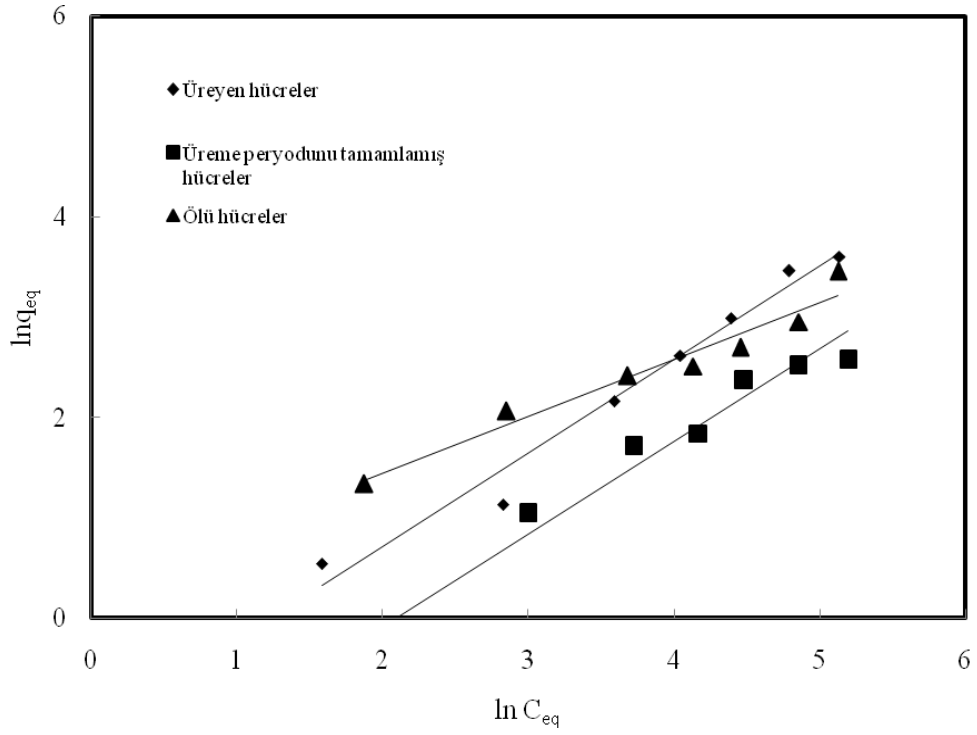
biyobirikim verimliliklerinde azalma gözlenmektedir.

Çizelge 4.10 Biyobiriken Ni(II) iyonu konsantrasyonu ve birim biyokütle miktarı için biyobiriken Ni(II)iyonu miktarının, Ni(II) iyonu içeren asit fosfataz üretim ortamında ortamda yaşayan, tutuklu ve ölü hücre için karşılaştırılması ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L}$ ;  $P_H=5.0$ ;  $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ )

Üreyen hücreler için biyobirikim					Üreme periyodunu tamamlamış hücreler için biyosorpsiyon				Biyosorpsiyon		
$C_{Ni(II)}$ (mg/L)	Enzim	$C_{biyob.}$ (mg/L)	$q_{biyob.}$ (mg/g)	$Y_{ver.}$ (%)	Enzim	$C_{biyos.}$ (mg/L)	$q_{biyos.}$ (mg/g)	$Y_{ver.}$ (%)	$C_{biyos.}$ (mg/L)	$q_{biyos.}$ (mg/g)	$Y_{ver.}$ (%)
	aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )				aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )						
10.29	162.70	5.43	1.72	52.77	10.87	3.72	0.64	36.15	3.80	3.80	36.93
25.15	164.40	8.29	3.11	32.96	9.87	5.12	2.86	20.36	7.88	7.88	31.33
50.86	78.00	14.63	8.72	28.76	7.52	9.43	5.61	18.54	11.20	11.20	22.02
74.57	55.46	17.43	13.69	23.37	6.31	10.29	6.31	13.80	12.29	12.29	16.48
100.86	45.47	20.00	19.94	19.83	5.85	13.19	10.78	13.08	14.79	14.79	14.66
147.43	43.47	26.87	31.74	18.23	5.85	19.43	12.52	13.18	19.16	19.16	13.00
200.29	40.41	30.29	36.63	15.12	3.34	20.00	13.26	9.98	31.75	31.75	15.85

Çizelge 4.11 *R. Delemar'* in Ni(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon sabitleri ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L}$ ;  $pH= 5.0$ ;  $pH= 5.0$ ;  $T= 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).

	$K_F$	n
Üreyen hücreler	0.318797	0.9299
Üreme periyodunu tamamlamış hücreler	0.146139	0.9207
Ölü hücreler	1.357847	0.5669

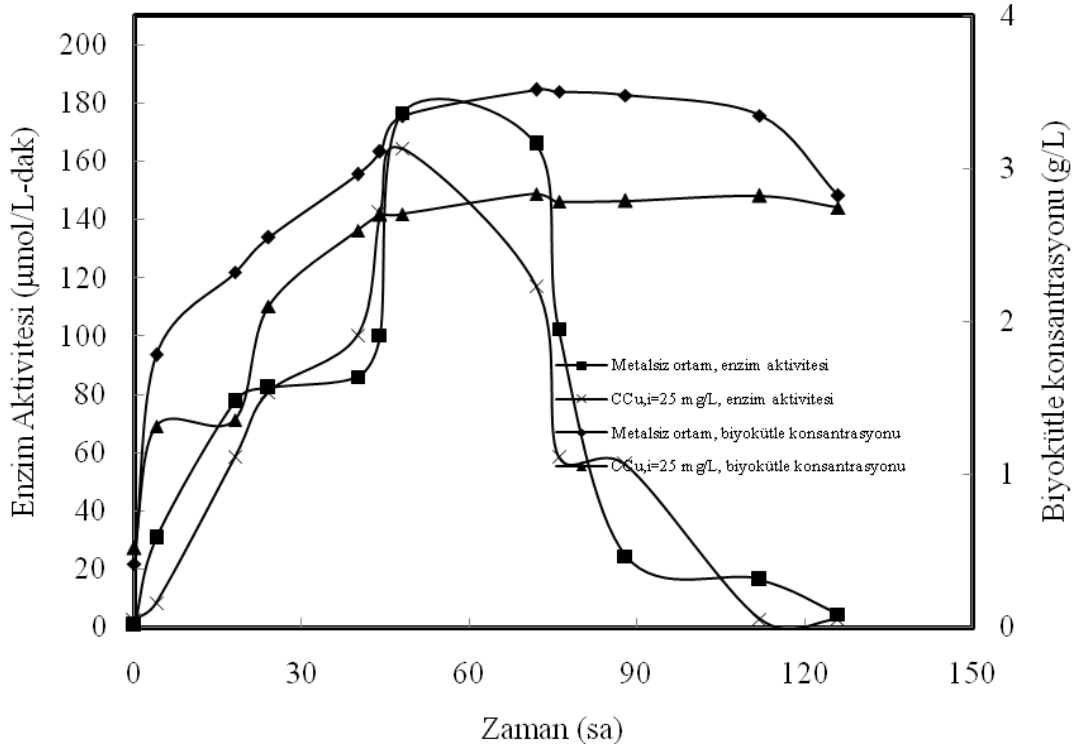


Şekil 4.20 *R. Delemar*' ın Ni(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon izotermi ( $C_{nişasta} = 20$  g/L; pH= 5.0; T= 30 °C;  $t_{inkübasyon} = 48$  sa).

#### 4.2.9 Cu(II) İyonları Varlığında ve Metalsiz Ortamda *R. delemar*' in Asit Fosfataz Üretimi

*R. delemar*' in asit fosfataz üretiminde aşılama sonrasında gözlemlenen gecikme evresi ortamda Cu(II) iyonları konsantrasyonunun artmasıyla 4. saatin sonuna kadar uzamıştır. Bu adaptasyon periyodundan sonra *R. delemar* hücreleri hızlı bir şekilde büyümüş ve biyokütle konsantrasyonu zamanla üstel olarak artmıştır. Üremenin yavaşlama evresi, üstel evresini takip etmiş 48-72 saatler arasında gerçekleşmiştir.

Maksimum biyokütle konsantrasyonu pH 5.0' de, yavaşlama evresinin sonunda (48–72 sa) 2,833 g/L olarak elde edilmiştir. Bu evreden sonra maksimum biyokütle konsantrasyonu yaklaşık sabit kalmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 Metal iyonu içermeyen ve 25 mg/L Cu(II) iyonu içeren fermentasyon ortamlarında, asit fosfataz aktivitesinin ve biyokütle konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=5.0;  $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30^{\circ}C$ ).

Asit fosfataz üretimi kültüvasyon zamanıyla artmıştır. Maksimum enzim aktivitesine ikinci günde ulaşılmıştır. *R. delemar*'ın maksimum asit fosfataz üretimi, mikroorganizma üretiminin çok olduğu üstel üreme fazının son evresinde

gerçekleşmiştir (48 sa). Asit fosfataz üretimi mikroorganizmanın durgun evresine kadar artmıştır. Kültür koşullarına bağlı olarak enzim aktivitesi 72. saate kadar devam etmiştir. Ancak bu saatten sonra aktivite hızla azalmıştır.

Fermentasyon ortamının pH'ı *R. delemar*'ın üremesi süresince bir miktar azalmıştır. Maksimum asit fosfataz aktivitesinin elde edildiği, kültürasyonun 48. saatinde fermentasyon ortamının pH'ı 4.85 olarak kaydedilmiştir.

#### 4.2.10 Cu(II) İyonlarının *R. Delemar*' ın Üremesine Etkisi

Fermentasyon ortamında Cu(II) iyonlarının varlığı *R. delemar* üremesini inhibe etmiştir. Üstel üreme evresinin sonunda (48 sa) biyokütle konsantrasyonu Cu(II) iyonlarının konsantrasyonunun 10–100 mg/L aralığında arttırılmasıyla 3.3427' den 1.943 g/L' ye azalmıştır (Çizelge 4.12). İnhibitör konsantrasyonuna bağlı olan biyokütle konsantrasyonu ve spesifik üreme hızı da Cu(II) iyonu konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. En düşük spesifik üreme hızı ve biyokütle konsantrasyonu, 100 mg/L Cu(II) iyonunun bulunduğu ortamda sırasıyla 0.0345 sa<sup>-1</sup> ve 1.943 g/L, olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.12 Spesifik üreme hızı ve maksimum biyokütle konsantrasyonunun metal içermeyen ve içeren ortamlar için karşılaştırılması (pH=5.0; C<sub>nişasta</sub> = 20 g/L; T= 30 °C; t<sub>inkübasyon</sub> = 48 sa)

C <sub>Cu,i</sub> (mg/L)	Spesifik üreme hızı μ(sa <sup>-1</sup> )	Biyokütle konsantrasyonu (g/L)
0	0.0499	3.3427
10	0.0484	3.2880
25	0.0433	2.7000
50	0.0411	2.0570
75	0.0403	2.0000
100	0.0345	1.9430

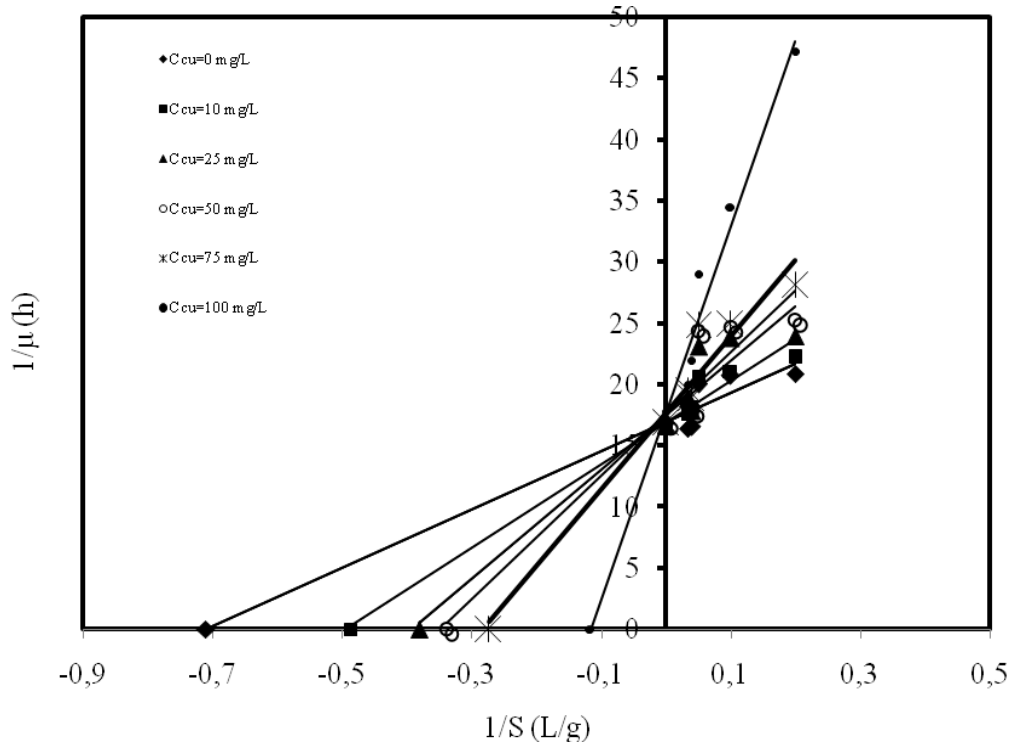
#### 4.2.11 *R.delemar*' ın Üreme Hızı Üzerine Cu(II) İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi

Maksimum spesifik üreme hızı (μ<sub>m</sub>) ve Monod doygunluk sabitlerinin (K<sub>s</sub>) artan



Cu(II) iyonu derişimi ile değişimi, Cu(II) iyonu içermeyen ortamlarla karşılaştırılarak Çizelge 4.13' de verilmiştir.

*R. delemar*'ın üreme hızı üzerine, Cu(II) inhibisyonunun etkisini araştırmak için çift taraflı (double-reciprocal) doğrusallaştırılmış Monod eşitliği kullanılmıştır. Mikroorganizmanın metalsiz ortamda maksimum spesifik üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve doğunluk sabiti ( $K_s$ )  $0.0649 \text{ sa}^{-1}$  ve  $1.8928 \text{ g/L}$  olarak bulunmuştur. Çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden, Cu(II) iyonu konsantrasyonunun  $10\text{-}100 \text{ mg/L}$  aralığında arttırılmasının, *R. delemar*'ın üreme hızı üzerine etkisinin, yarışmalı inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.22). Yarışmalı inhibisyonun net etkisi görünür Monod sabitlerinin,  $K_{s,app}$ , değerlerinin artması ve buna bağlı olarak da reaksiyon hızının azalmasıdır. Maksimum spesifik üreme hızları Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarıyla yaklaşık olarak sabit kalmakta ve  $0.0590 \text{ sa}^{-1}$  olarak elde edilmektedir ve elde edilen bu değer Cu(II) içermeyen ortamda elde edilen maksimum spesifik üreme hızı ile yakındır.



Şekil 4.22 Cu(II) içermeyen ortam ve  $0\text{-}100 \text{ mg/L}$  aralığında, artan konsantrasyonlarda Cu(II) iyonları içeren ortamlarda, *R. delemar*'ın üreme hızı için çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri ( $P_H=5.0$ ;  $T= 30^\circ\text{C}$ ).

#### 4.2.12 Cu(II) İyonunun *R.delemar*' ın Üreme Hızı Üzerindeki İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi

Yarışmalı inhibisyon için Şekil 5.22' deki çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden hesaplanan görünür  $K_{s,app}$  değerleri Cu(II) konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrunun eğiminden  $K_s/K_i$  kesim noktasından  $K_s$  bulunmuştur (Çizelge 4.13). *R. delemar*' ın spesifik üreme hızı için Cu(II) iyonlarının inhibisyon sabiti 82.30 mg Cu(II)/L olarak bulunmuştur. Görünür Monod sabitinin artışı üzerine daha düşük inhibitör konsantrasyonlarındaki  $I_{Ni}/K_{Ni}$  inhibisyon teriminin katkısı daha yüksek inhibitör konsantrasyonlarındakinden daha düşüktür.

Çizelge 4.13 Cu(II) içermeyen ortamda ve Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarının varlığında elde edilen maksimum spesifik üreme hızları ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması ( $P_H=5.0$ ;  $T= 30$  °C)

$C_{Cu,i}$ (mg/L)	$\mu_{maks}$ (1/sa)	$K_s$ (g/L)	$R^2$
0	0,0649	1.8928	0.982
10	0,0609	2.0548	0.978
25	0,0598	2.6245	0.943
50	0,0592	2.9540	0.930
75	0,0591	3.6508	0.953
100	0,0561	8.5786	0.978

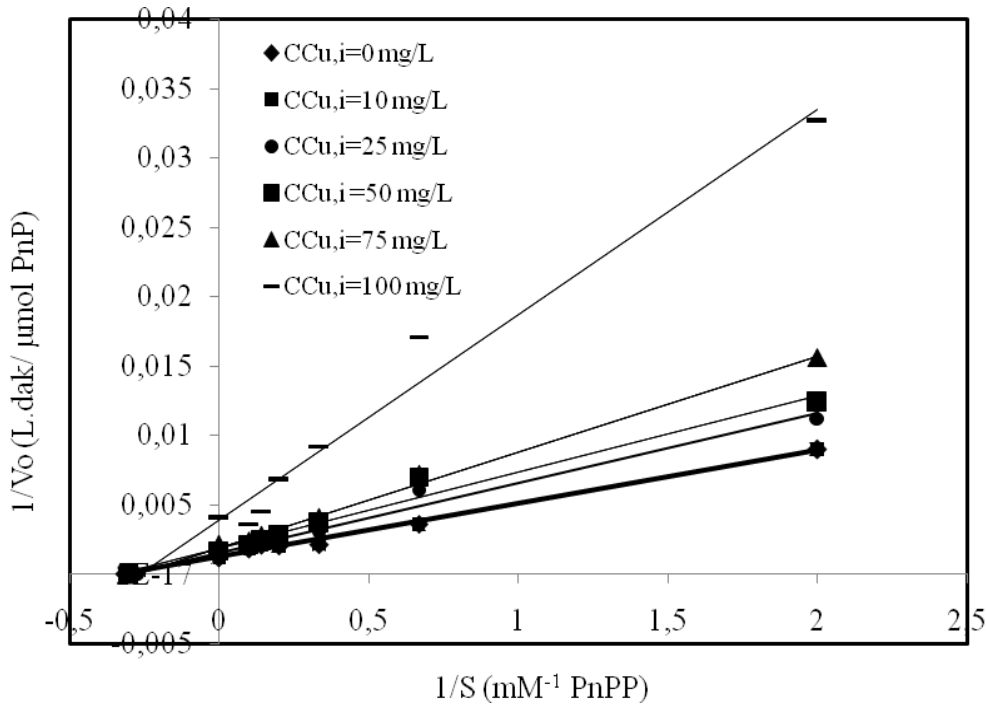
<sup>a</sup>: Görünür Monod sabitleri

#### 4.2.13 *R. delemar*' ın Asit Fosfataz Aktivitesine Cu(II) İyonlarının Etkisi

Asit fosfataz aktivitesi Cu(II) içeren fermentasyon ortamlarında azalmaktadır. 25 mg/L Cu(II) iyonları içeren ortamda maksimum fosfataz aktivitesi, üstel üreme evresinin sonunda (48 sa), 164.70  $\mu$ mol/L-dak olarak bulunmuştur (Şekil 4.21). Cu(II) iyonlarının konsantrasyonunun arttırılmasıyla asit fosfataz aktivitesinin azaldığı görülmüştür. *R.*

*delemar*' la asit fosfataz enziminin biyosentezinde Cu(II) iyonlarının varlığında gecikme evresi oluşmamıştır. Asit fosfataz biyosentezi Cu(II) iyonları tarafından bastırılmamıştır. Maksimum enzim aktivitesi Cu(II)' sız ortamla aynı zamanda elde edilmiştir.

Enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesine Cu(II) iyonlarının inhibisyon etkisi, reaksiyon karışımındaki Cu(II) iyon konsantrasyonu 10-100 mg/L arasında arttırılarak araştırılmıştır (Çizelge 4.14). Enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesi üzerine Cu(II) inhibisyon tipinin belirlenmesi için Michaelis-Menten kinetiği uygulanmıştır (Şekil 5.24).



Şekil 4.23 Cu(II) içermeyen ortamda ve 0-100 mg/L aralığında Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda asit fosfataz enzimi için Lineweaver-Burk grafikleri ( $P_H=5.0$ ;  $T=30\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarında eklenmesi, maksimum reaksiyon hızını oldukça fazla azaltmış, ancak enzim kompleksinin substrata ilgisini etkilememiştir. Bu nedenle Michealis-Menten sabitleri yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Cu(II) iyonun çeşitli enzimler için yarışmasız inhibitör olduğu bilinmektedir (Shuler ve Kargı, 1992). Ag(II), Hg(II), Cu(II) veya Pb(II) gibi iki değerlikli iyonlar protein zincirindeki cysteine

uzantılarının yan gruplarındaki -SH gruplarıyla reaksiyona girmektedir (Chandan ve Shahani, 1965; Liebeton vd, 2001). Cu(II) ile yapılan bazı çalışmalarda Cu(II) iyonunun *R. delemar*' dan üretilen asit fosfataz aktivitesini arttırdığı belirtilirken (Tsekova ve Galabova, 2003), bazı çalışmalarda aktiviteyi olumsuz yönde etkileyerek azalttığı gösterilmiştir (Huang ve Shindo, 2000). Literatürde çeşitli enzimler için ağır metal iyonlarının  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini arttırdığı, azalttığı ve değiştirmedeği birçok çalışma bulunmaktadır. Huang ve Shindo (2000), yaptıkları çalışmada, fermantasyon ortamına eklenen Cu(II) iyonlarının asit fosfataz için maksimum reaksiyon hızını azalttığı ancak enzim kompleksinin substrata olan ilgisini arttırdığını göstermiştir. Bu nedenle asit fosfataz için Cu(II) iyonlarının inhibisyon etkisi, kimi çalışmalarda yarışmasız- kısmi yarışmalı (mixed) tip inhibisyon olarak rapor edilmiştir.

Çizelge 4.14 Metal içermeyen ortam ve artan Cu(II) iyonu derişimlerinde maksimum aktivite ve maksimum Michaelis-Menten sabitleri karşılaştırılması (pH=5.0; T= 30°C)

$C_{Cu,i}$ (mg/L)	$V_{maks}$ ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )	$K_m$ (mM)	$R^2$
0	833.3	3.17	0.990
10	769.23	3.15	0.976
25	625.00	3.18	0.980
50	588.23	3.29	0.975
75	476.19	3.19	0.994
100	250.00	3.25	0.977

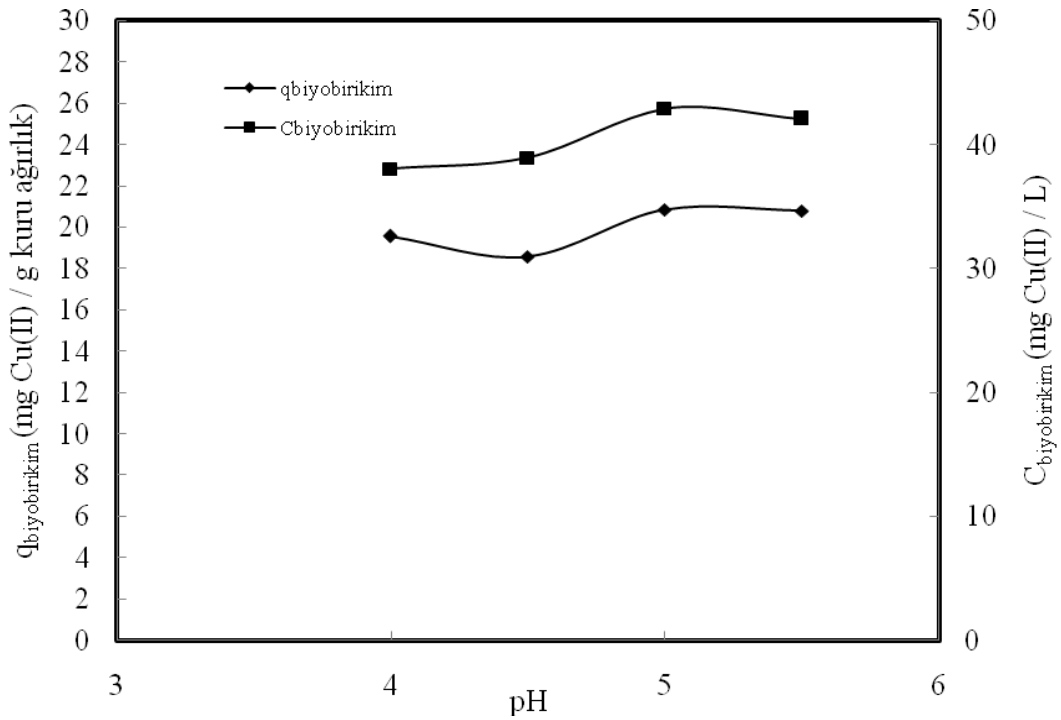
#### 4.2.14 Asit Fosfataz Aktivitesi İçin Cu(II) İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi

İnhibitor konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilen  $1/V_{m,app}$  değerleri eğimi  $1/V_m K_i$ , kesim noktası  $1/V_m$  olan düz bir doğru verir. Enzimatik reaksiyon hızı üzerine Cu(II) iyonları için inhibisyon sabiti 100 mg Cu (II)/L olarak saptanmıştır.

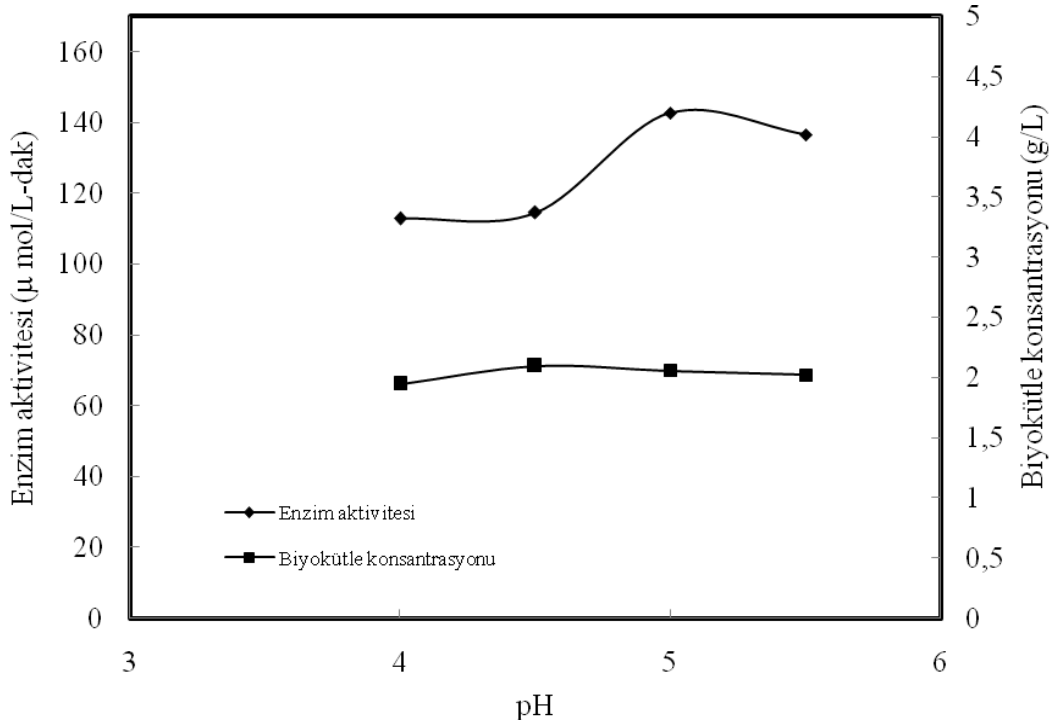
#### 4.2.15 *R. delemar*' ın Cu (II) Biyobirikimi

*R. delemar* için Cu(II) iyonlarının maksimum biyobirikimi pH 5.0-5.5 aralığında elde edilmiştir. Bu pH aralığında aynı zamanda maksimum enzim aktivitesi değerleri elde

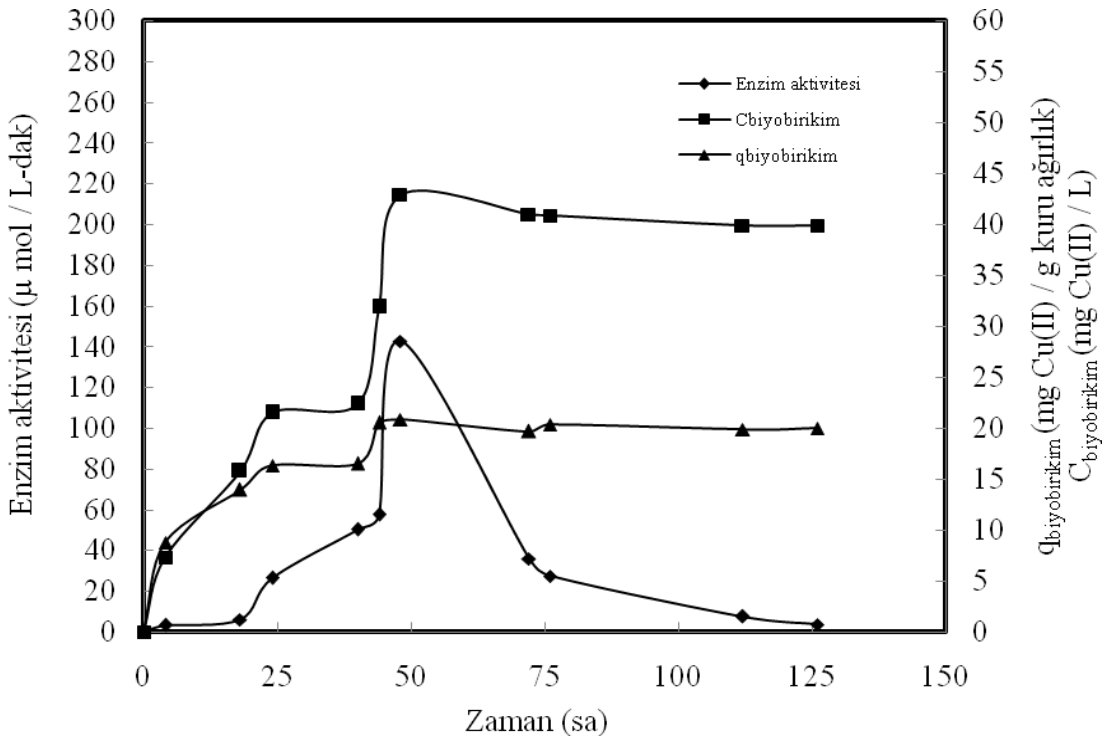
edilmiştir (Şekil 4.24 ve 4.25). 50 mg/L başlangıç Cu(II) iyonu konsantrasyonunda  $C_{Cu,i}$ , pH 5.0 ve 25 °C sıcaklıkta biyobiriktirilen Cu(II) iyonu konsantrasyonu (mg/L), kuru ağırlık temeli üzerinden biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Cu(II) iyonu miktarları (mg Cu(II)/g kuru ağırlık) ve asit fosfataz aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 4.26' de gösterilmiştir. Biyobiriktirilen Cu(II) iyonu konsantrasyonu gecikme evresi süresince yavaş ve üstel üreme evresinde hızlı bir şekilde artmıştır ve maksimum değerine 48 sa' de ulaşılmıştır. Maksimum asit fosfataz aktivitesi de *R. delemar* üremesinin aynı basamağında elde edilmiştir. Asit fosfataz Cu(II) biyobirikiminde doğrudan rol oynadığından bu beklenen bir sonuçtur. Daha sonra biyobiriktirilen Cu(II) iyon konsantrasyonu üremenin yavaşlama ve durgun evreleri boyunca yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Zamanla biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Cu(II) iyon miktarlarının değişimine gelince, biyobirikim eğrisinin görüntüsü çok benzerdir.



Şekil 4.24 Cu(II) iyonu için biyobiriktirilen Cu(II) iyonu konsantrasyonu (mg / L) ve birim kuru ağırlık temelinde biyobiriktirilen Cu(II) iyonu miktarının (mg Cu(II) / g kuru ağırlık) pH ile değişimi ( $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30$  °C;  $C_{Cu,i} = 50$  mg/L).



Şekil 4.25 Enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ ) ve biyokütle konsantrasyonunun pH ile değişimi ( $\text{g/L}$ ) ( $C_{\text{nişasta}} = 20 \text{ g/L}$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $C_{\text{Cu,i}} = 50 \text{ mg/L}$ ).



Şekil 4.26 Biyobiriken Cu(II) iyonlarının konsantrasyonu ( $\text{mg/L}$ ), birim kuru temel için biyobiriken Cu(II) iyonlarının miktarı ( $\text{mg Cu(II)/g kuru ağırlık}$ ) ve enzim aktivitesinin zamanla değişimi ( $C_{\text{nişasta}} = 20 \text{ g/L}$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $C_{\text{Cu,i}} = 50 \text{ mg/L}$ ).

Genç hücre konsantrasyonu göreceli olarak düşük olduğundan, biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Cu(II) iyon miktarlarında hızlı bir artış, gecikme evresinde ve üstel üreme evresinin başlangıcında gözlenmiştir. Mikroorganizma konsantrasyonu arttığında ve yaklaşık olarak sabit bir değere ulaştığında zamanla biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Cu(II) iyon miktarlarındaki artış azalmıştır.

*R. delemar* ile Cu(II) giderimi, üstel üreme evresinde ve canlı hücrenin olduğu fermantasyon ortamında en fazladır. Kurutulmuş-ölü hücrelerle elde edilen Cu(II) giderimi üreme periyodunu tamamlamış, yaş hücrelerle elde edilen Cu(II) gideriminden daha fazladır. Bunun nedeni üreme periyodunu tamamlamış yaş hücrelerin, asit fosfataz aktivitesinin düşük olması yani metal gideriminde enzimatik mekanizmaların rol oynamamasıdır. Öte yandan hücreler hala canlı olduğundan Cu(II) inhibisyonu yüksek, Cu(II) giderim kapasitesi düşüktür. Ölü hücrelere uygulanan kimyasal ve ısı işlemler metal biyosorpsiyon kapasitesini artırır.

#### **4.2.16 *R. delemar*' ın Üreyen, Üreme Periyodunu Tamamlamış ve Ölü Hücrelerinin Cu(II) Sorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması**

*R. delemar*' ın üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücrelerinin Cu(II) sorpsiyon kapasiteleri, sorpsiyon izoterm sabitleri hesaplanarak karşılaştırıldı (Çizelge 4.15). Deneysel ve yöntem tarafından önerilen denge giderimi arasındaki en iyi uyum Freundlich izotermi kullanılarak elde edildi. Freundlich izoterminden elde edilen  $K_F$  ve  $n$  değerleri Çizelge 4.16' da sunulmaktadır. Üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreler için, Freundlich adsorpsiyon izoterminden elde edilen sabitlerin değerleri karşılaştırıldığında görülmektedir ki, en yüksek kapasite ve şiddetle üreyen hücreler Cu(II) giderimi yapmakta, bunu ölü hücreler ve üreme periyodunu tamamlamış hücreler izlemektedir. Enzimatik aktivitenin özellikle yüksek Cu(II) derişimlerinde, ortamdan uzaklaştırılan Cu(II) miktarını arttırmada etkili olduğu, üreyen hücreler için elde edilmiş olan adsorpsiyon izotermine daha dik yükselmesinden anlaşılmaktadır (Şekil 4.27).

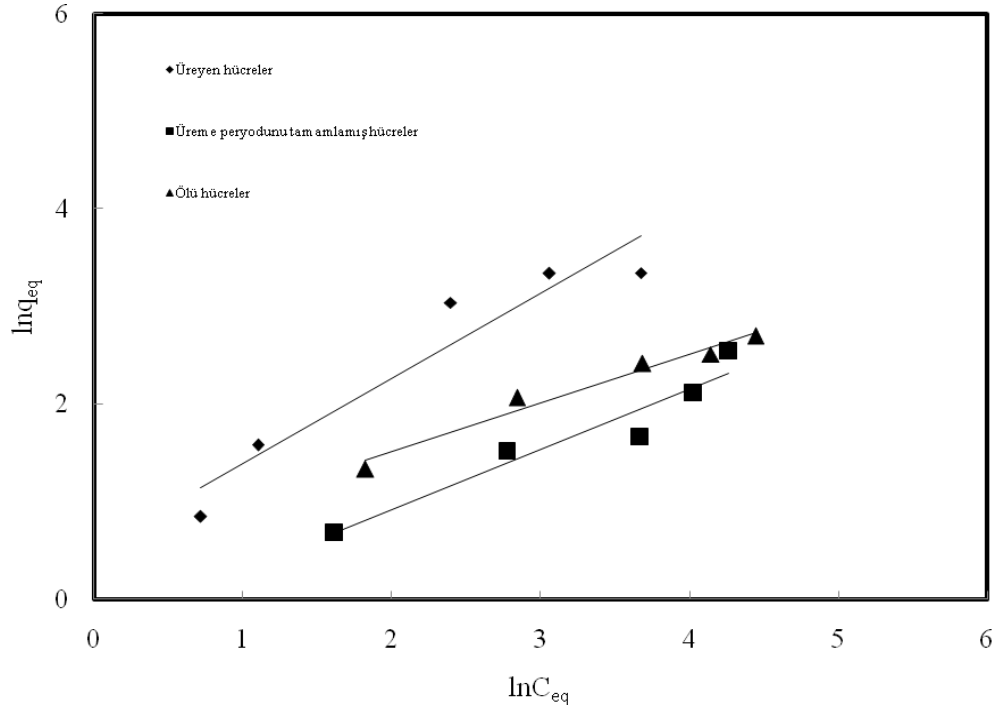
Çizelge 4.15 Biyobiriken Cu(II) iyonu konsantrasyonu ve birim biyokütle miktarı için biyobiriken Cu(II)iyonu miktarının, Cu(II) iyonu içeren asit fosfataz üretim ortamında ortamda yaşayan, tutuklu ve ölü hücre için karşılaştırılması ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L}$ ;  $P_H = 5.0$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ )

Üreyen hücreler için biyobirikim					Üreme periyodunu tamamlamış hücreler için biyobirikim				Biyosorpsiyon		
$C_{Cu,i}$	Enzim	$C_{biyobir.}$	$q_{biyobir.}$	$Y_{ver.}$	Enzim	$C_{biyos.}$	$q_{biyos.}$	$Y_{ver.}$	$C_{biyos.}$	$q_{biyos.}$	$Y_{ver.}$
(mg/L)	Aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )	(mg/L)	(mg/g)	(%)	Aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )	(mg/L)	(mg/g)	(%)	(mg/L)	(mg/g)	(%)
9.99	172.78	7.94	2.33	79.48	11.42	4.95	1.97	49.70	4.89	4.89	48.85
25.01	164.42	13.10	4.85	52.37	10.31	9.02	4.55	36.42	10.39	10.39	40.87
50.99	142.68	42.9	20.85	85.61	9.19	11.70	5.25	23.34	18.67	18.67	37.37
74.13	139.9	53.82	28.14	60.94	8.91	18.99	8.23	16.12	24.31	24.31	32.14
100.05	52.95	60.69	28.36	60.62	8.08	28.74	12.64	28.27	30.18	30.18	30.18

Çizelge 4.16 *R. Delemar*' in Cu(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon sabitleri ( $C_{nişasta} = 20 \text{ g/L}$ ;  $pH = 5.0$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t_{inkübasyon} = 48 \text{ sa}$ ).

	$K_F$	n
Üreyen hücreler	1.6837	1.148
Üreme periyodunu tamamlamış hücreler	0.7261	1.620
Ölü hücreler	1.6820	2.016





Şekil 4.27 *R. Deleamar*' in Cu(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon izotermi ( $C_{nişasta} = 20$  g/L; pH= 5.0; T= 30 °C;  $t_{inkübasyon} = 48$  sa).

#### 4.2.17 Zn(II) İyonları Varlığında ve Metalsiz Ortamda *R. deleamar*' in Asit Fosfataz Üretimi

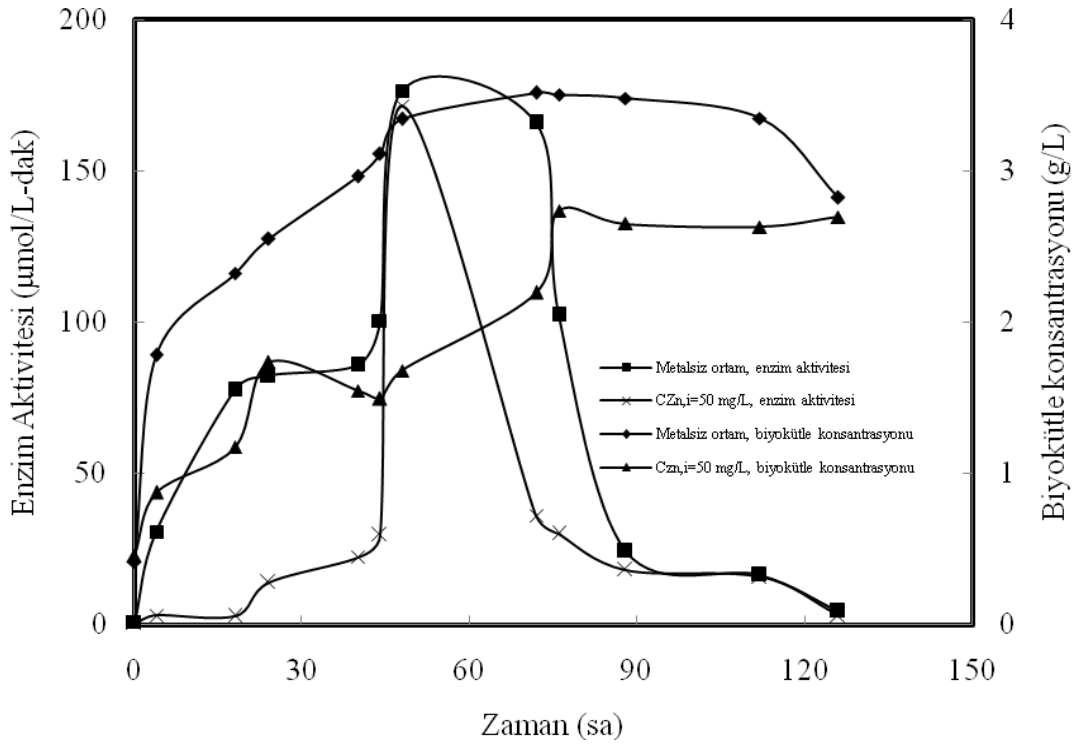
Bazı ağır metallerin enzim üretimine aktivatör etkisi gösterebildiği bilinmektedir. Zn(II) da bu metallerden birisidir. Zn(II) iyonları *R.deleamar*' in asit fosfataz üretimine iki şekilde etki etmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (10-25 mg/L) aktivator etki gösterirken, artan Zn(II) konsantrasyonlarında (50-100 mg/L) inhibisyon etkisi görülmüştür. Bu nedenle düşük derişimlerde Zn(II) için inhibisyon kinetiğine uyum gözlenmemiştir.

*R. deleamar*' in asit fosfataz üretiminde aşılama sonrasında gözlemlenen gecikme evresi ortamda Zn(II) iyonları konsantrasyonunun artmasıyla 4. saatin sonuna kadar uzamıştır. Eklenen Zn(II) iyonlarının gecikme evresini uzattığı görülmüştür. Bu adaptasyon periyodundan sonra *R. deleamar* hücreleri hızlı bir şekilde üremiş ve biyokütle konsantrasyonu zamanla üstel olarak artmıştır. Üremenin yavaşlama evresi, üstel evresini takip etmiş 88-120 saatlar arasında gerçekleşmiştir.

Maksimum biyokütle konsantrasyonu pH 5.0'de, yavaşlama evresinin sonunda (48–76 sa) 2.736 g/L olarak elde edilmiştir. Bu evreden sonra maksimum biyokütle konsantrasyonu yaklaşık sabit kalmıştır (Şekil 4. 28).

Asit fosfataz üretimi kültürasyon zamanıyla artmıştır. Maksimum enzim aktivitesine ikinci günde ulaşılmıştır. *R. delemar*'ın maksimum asit fosfataz üretimi, mikroorganizma üretiminin çok olduğu üstel üreme fazının son evresinde gerçekleşmiştir (48 sa). Asit fosfataz üretimi durgun evresine kadar artmıştır. Kültür koşullarına bağlı olarak enzim aktivitesi 72 sa devam etmiştir. Ancak bu saatten sonra aktivite hızla azalmıştır.

Fermantasyon ortamının pH'ı *R. delemar*'ın üremesi süresince bir miktar azalmıştır. Maksimum asit fosfataz aktivitesinin elde edildiği, kültürasyonun 48. saatinde fermantasyon ortamının pH'ı 4.89 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.28 Metal iyonu içermeyen ve 50 mg/L Zn(II) iyonu içeren fermentasyon ortamlarında, asit fosfataz aktivitesinin ve biyokütle konsantrasyonunun zamanla değişimi (pH=5.0;  $C_{nişasta}$ = 20 g/L; T= 30°C).

#### 4.2.18 Zn(II) İyonlarının *R. Delema*' ın Üremesine Etkisi

Fermentasyon ortamında Zn(II) iyonlarının varlığı *R. delema* üremesini genellikle inhibe etmiştir. 10-25 mg/L Zn(II) iyonlarının varlığı mikroorganizmanın spesifik üreme hızını arttırmıştır. Üstel üreme evresinin sonunda (48 sa) biyokütle konsantrasyonu Zn(II) iyonlarının konsantrasyonunun 10-100 mg/L aralığında arttırılmasıyla 2.68 g/L 'den 2.53 g/L' ye azalmıştır (Çizelge 4.17). Biyokütle konsantrasyonu ve spesifik üreme hızı inhibitör konsantrasyonuna bağlıdır. Zn(II) iyonu konsantrasyonu arttıkça her ikisi de azalmaktadır. En düşük spesifik üreme hızı ve biyokütle konsantrasyonu, 100 mg/L Zn(II) iyonunun bulunduğu ortamda sırasıyla 0,0430 sa<sup>-1</sup> ve 2.530 g/L olarak bulunmuştur.

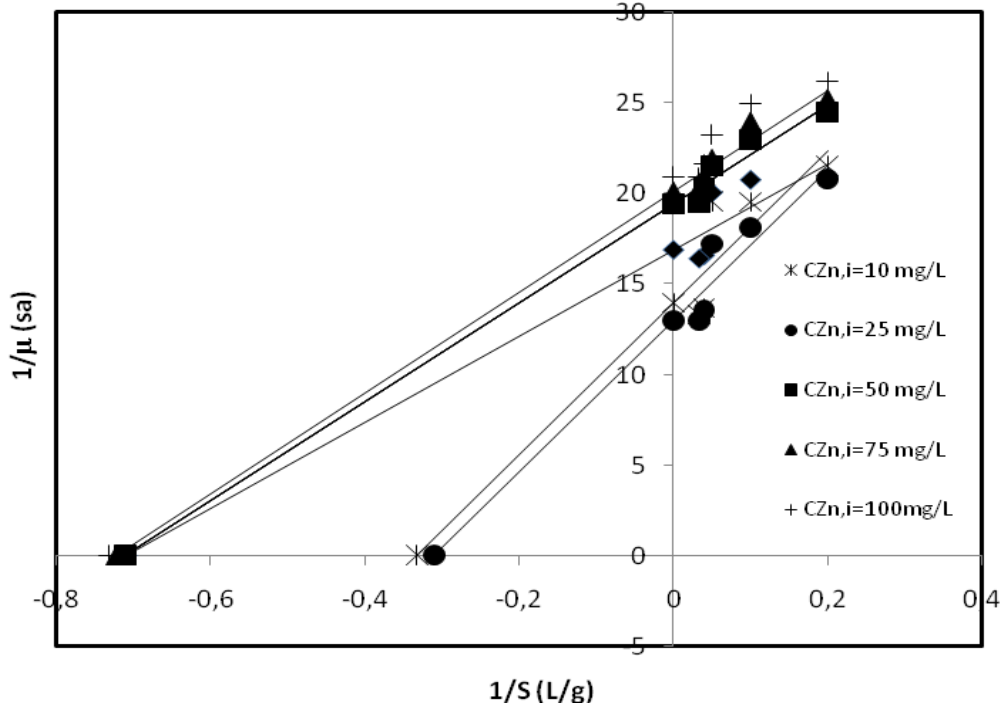
Çizelge 4.17 Spesifik üreme hızı ve maksimum biyokütle konsantrasyonunun metal içermeyen ve içeren ortamlar için karşılaştırılması (pH=5.0; C<sub>nişasta</sub>= 20 g/L; T= 30 °C; t<sub>inkübasyon</sub>= 48 sa)

C <sub>Zn,i</sub> (mg/L)	Spesifik üreme hızı μ(sa <sup>-1</sup> )	Biyokütle konsantrasyonu (g/L)
0	0.0499	3.34
10	0.0511	2.51
25	0.0582	2.68
50	0.0465	2.57
75	0.0457	2.53
100	0.0430	2.53

#### 4.2.19 *R. delema*' ın Üreme Hızı Üzerine Zn(II) İnhibisyon Tipinin Belirlenmesi

Maksimum spesifik üreme hızı (μ<sub>m</sub>) ve Monod doygunluk sabitlerinin (K<sub>s</sub>) artan Zn(II) iyonu derişimi ile değişimi, Zn(II) iyonu içermeyen ortamlarla karşılaştırılarak Çizelge 4.17' de verilmiştir. Çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden, Zn(II) iyonu konsantrasyonunun 50-100 mg/L aralığında arttırılmasının, *R. delema*' ın üreme hızı üzerine etkisinin kısmi yarışmalı tip inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır. Kısmi yarışmalı inhibisyonun net etkisi görünür Monod sabitlerinin K<sub>s,app</sub> değerlerinin

azalması ve buna bağlı olarak da reaksiyon hızının azalmasıdır (Şekil 4.29). Doygunluk sabitinin veya yarı hız sabiti  $K_s$ ' in düşük değerleri mikroorganizmanın substrat için yüksek bir ilgiye sahip olduğunu gösterir (Shuler ve Kargı, 2002). Maksimum spesifik üreme hızları Zn(II) iyonlarının düşük konsantrasyonlarıyla (10-25 mg/L) artarken, yüksek konsantrasyonlarıyla (50-100 mg/L) azalmaktadır.



Şekil 4.29 Zn(II) içermeyen ortam ve 0-100 mg/L aralığında artan konsantrasyonlarda Zn(II) iyonları içeren ortamlarda *R. delemar*'ın üreme hızı için çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri (pH=5.0; T= 30 °C).

#### 4.2.20 Zn(II) İyonunun *R.Delemar*'ın Üreme Hızı Üzerindeki İnhibisyon Sabitinin Belirlenmesi

Kısmi yarışmalı inhibisyon için Şekil 4.30' daki çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden hesaplanan görünür  $K_{s,app}$  değerleri Zn(II) konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrunun eğiminden  $K_s/K_i$  kesim noktasından  $K_s$  bulunmuştur (Çizelge 4.18). *R. delemar*'ın spesifik üreme hızı için Zn(II) iyonlarının inhibisyon sabiti 179.21 mg Zn(II)/L olarak bulunmuştur.

Zn(II) iyonları varlığında spesifik üreme hızının azalan substrat konsantrasyonunu ile azaldığı görülmüştür. Kısmi yarışmalı inhibisyon modeline göre.

*R. delemar* ' ın maksimum spesifik üreme hızı Zn(II) ve K<sub>s</sub> değerlerinde azalmadır. Zn (II) iyonlarının kısmi yarışmalı inhibisyon modeline uyan değerleri için spesifik üreme hızları Çizelge 4.18 'de verilmiştir.

Çizelge 4.18 Zn(II) içermeyen ortamda ve Zn(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarının varlığında elde edilen maksimum spesifik üreme hızları ve inhibisyon sabitlerinin karşılaştırılması (pH=5.0; T= 30 °C)

C <sub>Zn,i</sub> (mg/L)	μ <sub>maks</sub> (L/sa)	K <sub>s</sub> (g/L)	R <sup>2</sup>
0	0,0649	1,8928	0,982
10	0,0812	4,1007 <sup>a</sup>	0,977
25	0,0834	3,9123 <sup>a</sup>	0,989
50	0,0534	1,4119 <sup>a</sup>	0,953
75	0,0501	1,2674 <sup>a</sup>	0,992
100	0,0489	1,1978 <sup>a</sup>	0,990

<sup>a</sup>: Görünür Monod sabitleri

#### 4.2.21 *R. delemar* ' ın Asit Fosfataz Aktivitesine Zn(II) İyonlarının Etkisi

Enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesine Zn(II) iyonlarının inhibisyon etkisi, reaksiyon karışımındaki Zn(II) iyon konsantrasyonu 10-100 mg/L arasında arttırılarak araştırılmıştır. Enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesi üzerine Zn(II) inhibisyon tipinin belirlenmesi için Michaelis-Menten kinetiği uygulanmıştır.

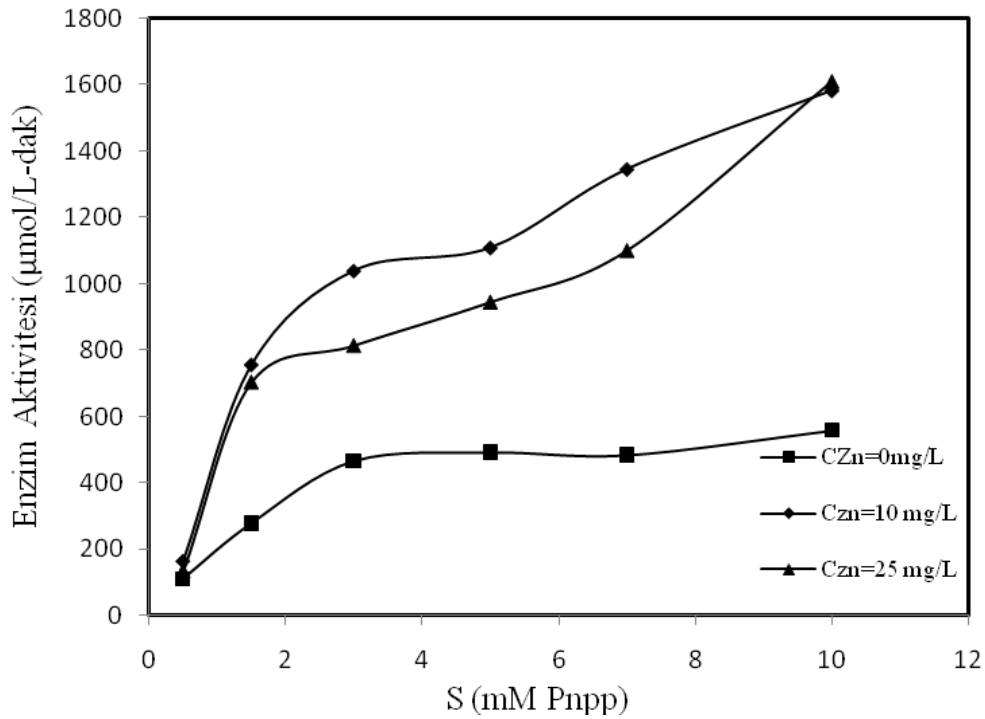
Zn(II) iyonunun (10-25 mg/L) derişimleri için aktivasyon etkisi Şekil 4.30' da görülmektedir. Görüldüğü gibi 10 mg/L substrat derişiminde, enzim aktivitesi oldukça artmıştır. artan Zn(II) konsantrasyonlarında (50-100 mg/L) inhibisyon etkisi görülmüştür. Bu nedenle düşük derişimlerde Zn(II) için inhibisyon kinetiğine uyum gözlenmemiştir. Ancak 25 mg/L Zn(II) iyonu eklenen ortamda aktivitenin azalmaya başladığı görülmektedir. 50 mg/L Zn(II) iyonu eklendiğinden itibaren inhibisyon etkisi başlamıştır. 50-100 mg/L derişimleri için inhibisyon kinetiği uygulanabilmiştir.

Asit fosfataz aktivitesi (50-100 mg/L) Zn(II) içeren fermentasyon ortamlarında azalmaktadır. 50 mg/L Zn(II) iyonları içeren ortamda maksimum fosfataz aktivitesi, üstel üreme evresinin sonunda (48 sa), 171,393 μmol/L-dak olarak bulunmuştur (Şekil 4.28). Zn(II) iyonlarının konsantrasyonunun arttırılmasıyla asit fosfataz aktivitesinin

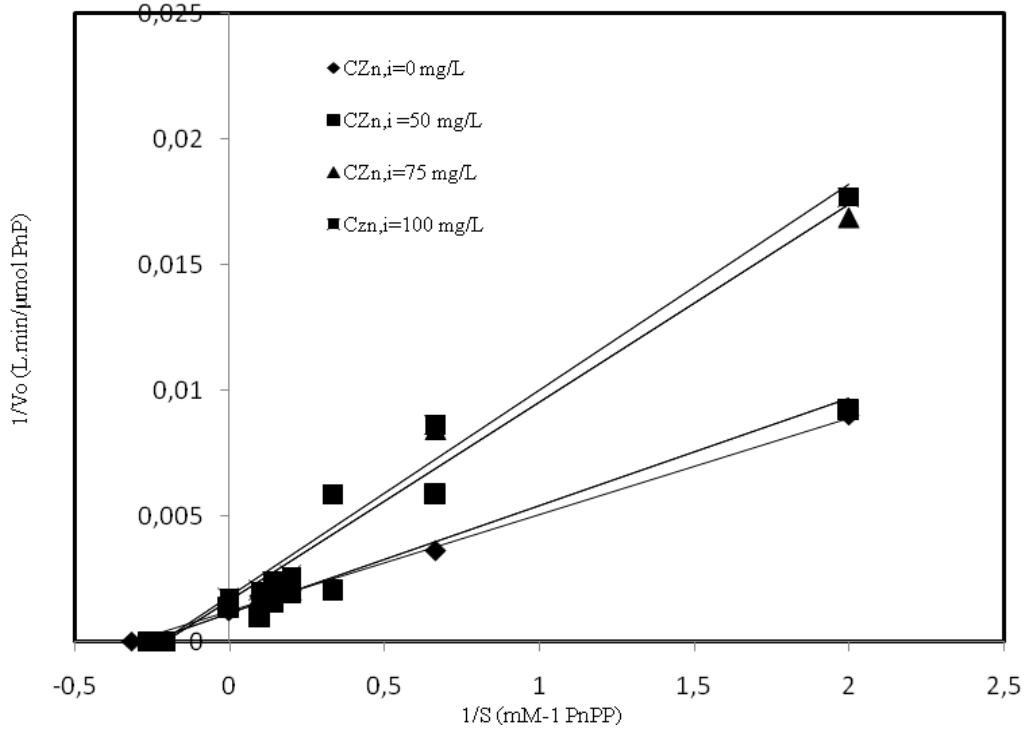
azaldığı görülmüştür. *R. delemar*' la asit fosfataz enziminin biyosentezinde Zn(II) iyonlarının varlığında gecikme evresi oluşmamıştır. Asit fosfataz biyosentezi Zn(II) iyonları tarafından bastırılmamıştır. Maksimum enzim aktivitesi Zn(II)' suz ortamlar aynı zamanda elde edilmiş ancak düşük deşimlerde aktivite artmaya devam etmiştir (Çizelge 4.19).

Zn(II) konsantrasyonu 50 ile 100 mg/L arasında değiştirilerek enzimin p-nitrofenilfosfataz aktivitesine inhibisyon tipi Michaelis-Menten kinetiği uygulanarak belirlenmiştir. Çizilen  $1/V-1/S$  doğrusal grafiğinden eğim  $K_m/V_m$  ve y ekseninin kestiği noktadan  $1/V_m$  bulunmuştur (Şekil 4.31).

Artan Zn(II) iyonlarına rağmen maksimum tepkime hızı önemli derecede azalmakta ve bununla beraber Michaelis-Menten sabitleri belirgin derecede artmaktadır. Bu tip inhibisyon yarışmasız karışık (mixed) tip inhibisyon olarak bilinmektedir.



Şekil 4.30 Metal içermeyen ortam ve artan konsantrasyonlarda 0-25 mg/L Zn(II) iyonları içeren ortam için *R. delemar* mantarının Monod eşitliği (pH=5.0; T= 30 °C).



Şekil 4.31 Zn(II) içermeyen ortam ve 50-100 mg/L aralığında Zn(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda asit fosfataz enzimi için Lineweaver-burk grafikleri (pH=5.0; T= 30 °C).

Çizelge 4.19 Metal içermeyen ortam ve artan Zn(II) iyonu derişimlerinde maksimum aktivite ve maksimum Michaelis-Menten sabitleri karşılaştırılması (pH=5.0; T= 30 °C)

$C_{Zn.i}$ (mg/L)	$v_{max}$ ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )	$K_m$ (mM)	$R^2$
0	833.3333	3.1666	0.990
10	1000.0000	2.0000	0.971
25	909.0909	2.7272	0.939
50	769.2308	3.7692	0.933
75	625.0000	4.3750	0.964
100	588.2353	4.8823	0.977

#### 4.2.22 Asit Fosfataz Aktivitesi İçin Zn(II) İnhibisyon Sabitlerinin Belirlenmesi

İnhibitor konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilen  $1/V_{m,app}$  değerleri eğimi  $1/V_m K_i$ , kesim noktası  $1/V_m$  olan düz bir doğru verir. Enzimatik reaksiyon hızı üzerine Zn(II) iyonları için inhibisyon sabiti 100 mg Zn(II)/L olarak saptanmıştır.

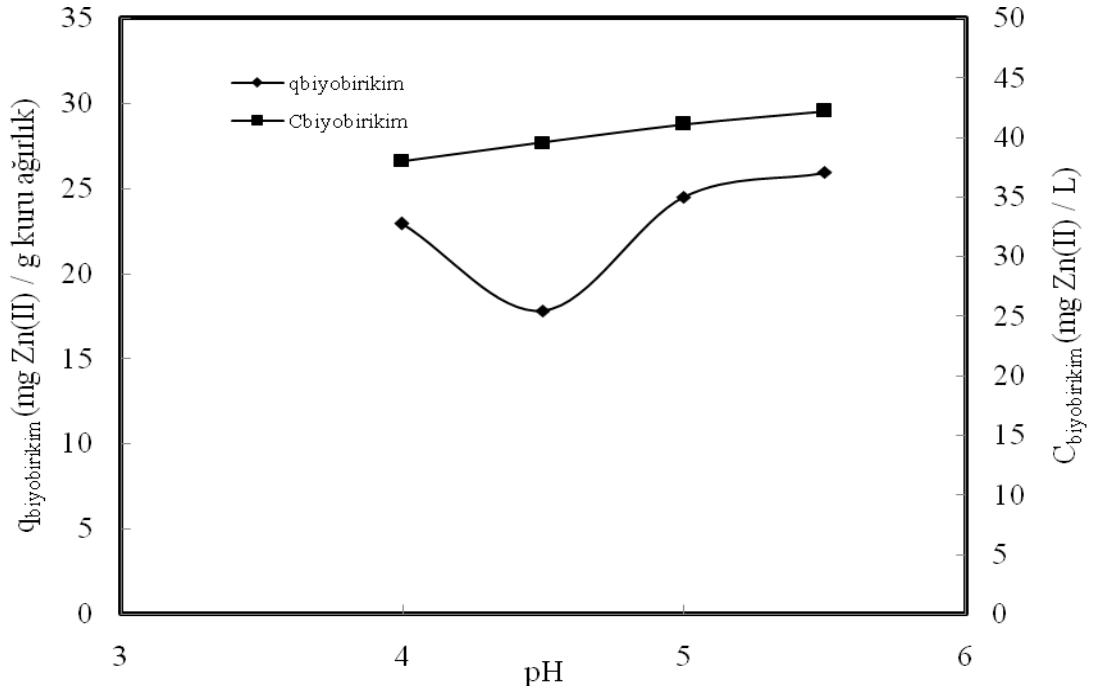
#### 4.2.23 *R. delemar*' ın Zn (II) Biyobirikimi

*R. delemar* için Zn(II) iyonlarının maksimum biyobirikimi pH 5.0-5.5. aralığında elde edilmiştir. Bu pH aralığında aynı zamanda maksimum enzim aktivitesi değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.32 ve 4.33). 50 mg/L başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonunda  $C_{Cu,i}$ , pH 5.0 ve 25 °C sıcaklıkta biyobiriktirilen Zn(II) iyonu konsantrasyonu (mg/L), kuru ağırlık temeli üzerinden biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Zn(II) iyonu miktarları (mg Zn(II)/g kuru ağırlık) ve asit fosfataz aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 4.33' de gösterilmiştir. Biyobiriktirilen Zn(II) iyonu konsantrasyonu gecikme evresi süresince yavaş ve üstel üreme evresinde hızlı bir şekilde artmıştır ve maksimum değerine 48 sa' de ulaşılmıştır.

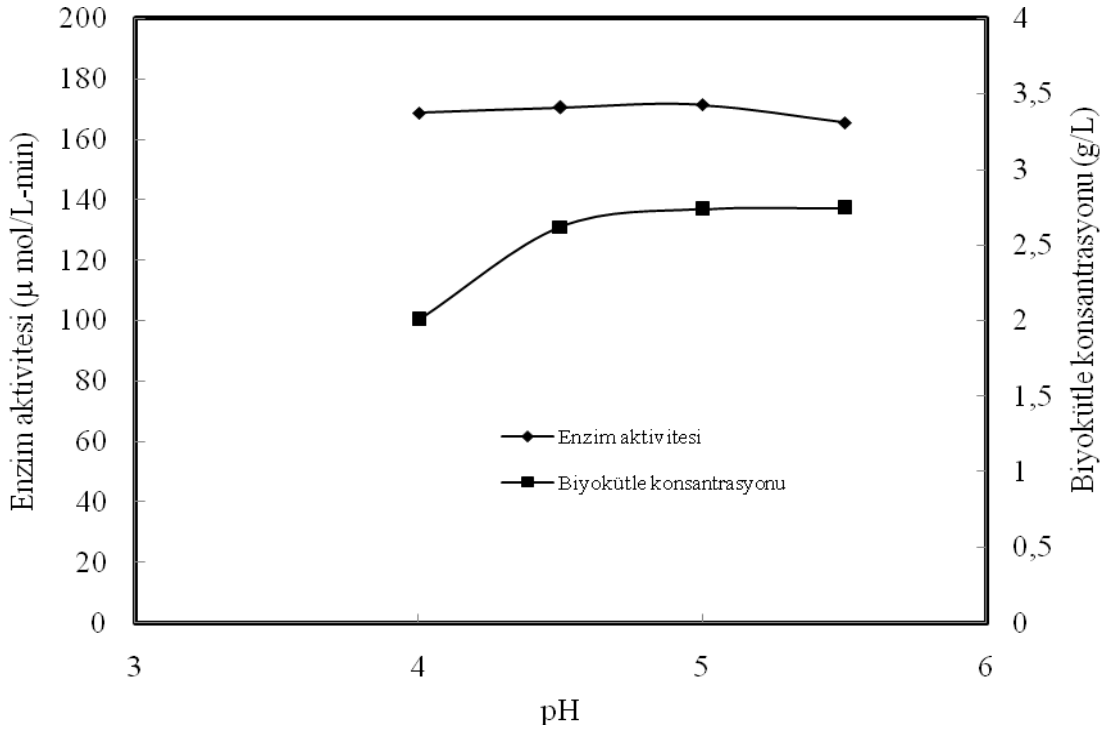
Maksimum asit fosfataz aktivitesi de *R. delemar* üremesinin aynı basamağında elde edilmiştir. Asit fosfataz Zn(II) biyobirikiminde doğrudan rol oynadığından bu beklenen bir sonuçtur. Daha sonra biyobiriktirilen Zn(II) iyon konsantrasyonu üremenin yavaşlama ve durgun evreleri boyunca yaklaşık olarak sabit kalmıştır. Zamanla biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Zn(II) iyon miktarlarının değişimine gelince, genç hücre konsantrasyonu göreceli olarak düşük olduğundan, biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Zn(II) iyon miktarlarında hızlı bir artış, gecikme evresinde ve üstel üreme evresinin başlangıcında gözlenmiştir. Mikroorganizma konsantrasyonu arttığında ve yaklaşık olarak sabit bir değere ulaştığında zamanla biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Zn(II) iyon miktarlarındaki artış azalmıştır.

*R. delemar* ile Zn(II) giderimi, üstel üreme evresinde ve canlı hücrenin olduğu fermantasyon ortamında en fazladır. Biyosorpsiyonun gerçekleştirildiği fermantasyon ortamında elde edilen biyosorpsiyon değeri ise biyobirikimin olduğu enzim üretilmeyen canlı ortama göre daha fazladır. Bunun nedeni olarak Zn(II) iyonun *R. delemar*' ın biyogiderimde inhibisyon etkisi yapması olarak düşünülebilir.

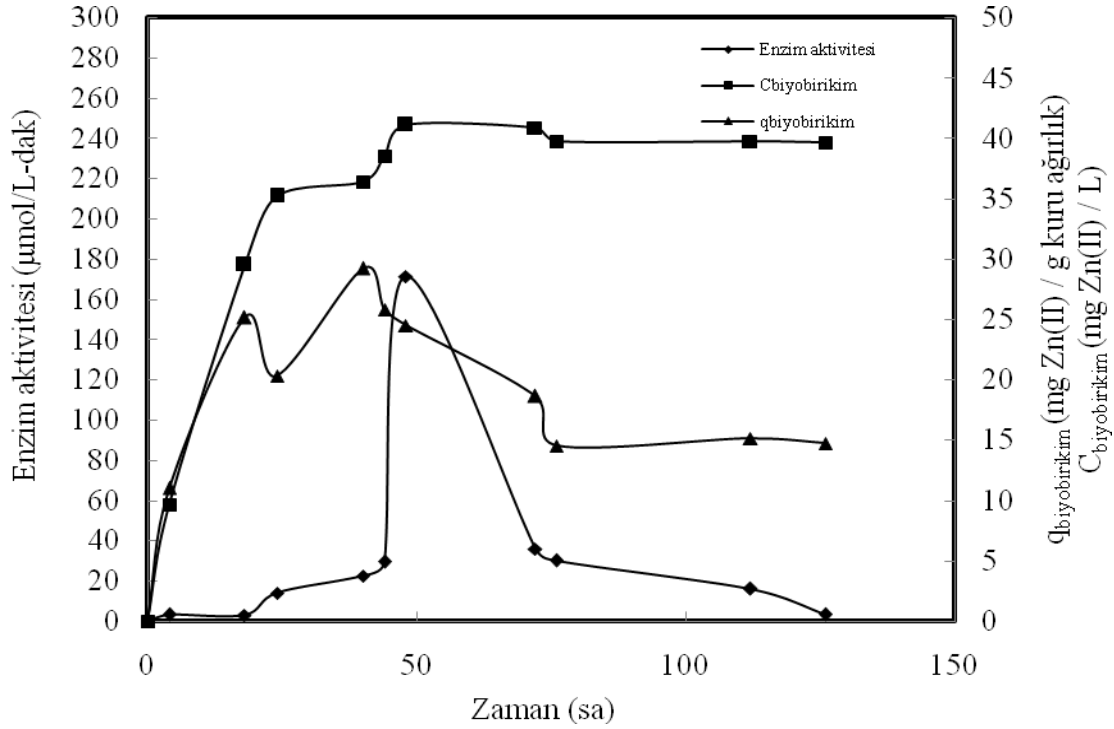




Şekil. 4.32 Zn(II) iyonu için biyobiriken Zn(II) iyonu konsantrasyonu (mg/L) ve birim kuru ağırlık temelinde biyobiriken Zn(II) iyonu miktarının (mg Zn(II)/g kuru ağırlık) pH ile değişimi ( $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30$  °C;  $C_{Zn.i} = 50$  mg/L).



Şekil 4.33 Enzim aktivitesi (µmol/L-dak) ve biyokütle konsantrasyonunun pH ile değişimi (g/L) ( $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30$  °C;  $C_{Zn.i} = 50$  mg/L).



Şekil 4.34 Biyobiriken Zn(II) iyonlarının konsantrasyonu (mg/L), birim kuru temel için biyobiriken Zn(II) iyonlarının miktarı (mg Zn(II)/g kuru ağırlık) ve enzim aktivitesinin zamanla değişimi ( $C_{nişasta} = 20$  g/L;  $T = 30$  °C;  $C_{Zn,i} = 50$  mg/L).

#### 4.2.24 *R. delemar*' ın Üreyen, Üreme Periyodunu Tamamlamış ve Ölü Hücrelerinin Zn(II) Sorpsiyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması

*R. delemar*' ın üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücrelerinin Zn(II) sorpsiyon kapasiteleri, sorpsiyon izotermine uyumu araştırıldı (Çizelge 4.20). Deneysel ve yöntem tarafından önerilen denge giderimi arasındaki en iyi uyum Freundlich izotermi kullanılarak elde edildi. Freundlich izoterminden elde edilen  $K_F$  ve  $n$  değerleri Çizelge 4.21' de sunulmaktadır. Zn(II) iyonları ölü hücrelerle düşük başlangıç metal iyonu konsantrasyonlarında etkin biçimde sorbe edilmektedir. 48 saatin sonunda *R. delemar*' ın mikroorganizma üremesinin yüksek olması nedeniyle Zn(II) iyonlarının daha düşük konsantrasyonlarında üreyen hücrelerle biyokütlenin birim kütlesi başına biyobiriktirilen Zn(II) iyon miktarları ölü hücrelerle elde edilene göre daha düşüktür. Üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreler için sorpsiyon izotermine karşılaştırılması iyi sorbe edilen Zn(II) iyonlarının dik eğimlerle yükselen izotermine sahip olduklarını ve daha yüksek sorbe edilen konsantrasyon değerlerine,  $q_{eq}$ , karşı geldiklerini göstermektedir (Şekil 4.35). Üstel üreme fazının sonunda,

fermentasyon ortamlarından santrifüjlenerek ayrılan yaş *R. delemar* hücreleriyle, Zn(II) iyonlarının gideriminin, üreyen hücrelerin biyobirikiminden ve ölü hücrelerin biyosorpsiyonundan daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum Zn(II) gideriminin asit fosfataz enziminin aktivitesi aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. *R. delemar* üreme ortamından ayrıldıktan sonra asit fosfataz enziminin aktivitesi azalmaktadır. *R. delemar*'ın üreyen üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücrelerinin metal giderim yolları hemen hemen aynıdır. Biyokütlenin birimkütle başına biyobiriktirilen Zn(II) iyonu miktarları, artan Zn(II) konsantrasyonu ile artmasına rağmen daha yüksek Zn(II) iyon giderim verimlilikleri bütün biyokütle tipleri için daha düşük Zn(II) konsantrasyon değerlerinde elde edilmiştir. 25 mg/L Zn(II) iyon konsantrasyonunun üzerinde Zn(II) biyobirikim verimliliklerinde azalma gözlenmektedir. Ancak enzim aktivitesi olan ortam için verimlilik 50 mg/L Zn(II) iyonu içeren ortama kadar azalmamıştır. Biyobiriken Zn(II) iyonu miktarı üreyen hücre için ölü hücrede bulunan değerden daha büyüktür. Zn(II) giderim kapasitesi üreyen hücre için en fazladır bunu ölü hücre takip etmektedir.

Özdemir ve arkadaşları (2009), Cd(II), Cu(II), Ni(II), Mn(II) ve Zn(II) gibi ağır metallerin termofilik bakteriler *Geobacillus toebii sub. Sp. Decanicus* (G1) ve *Geobacillus thermoleovorans sub sp. Stromboliensis* (G2) tarafından biyosorpsiyonunu incelemiş ve karşılaştırmışlardır. 100 ml hacmindeki kesikli reaktörlerde 20 ml hacmindeki metal çözeltilerde ölü hücrelerle gerçekleştirilen deneylerde 30-38 °C sıcaklık ve 15-120 dakika sürede gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlardan G1 için 10-50 mg/L başlangıç metal hacmine kadar Zn için elde edilen q(mg/g) değerlerinin daha yüksek olduğu (15.2 mg/g), ancak 250 mg/L metal iyonu derişimlerinde Cu(II) biyosorpsiyonunun (38.4 mg/g) ve Ni(II) biyosorpsiyonunun (35.6 mg/g). Zn(II) iyonuna (28.0 mg/g) göre daha fazla olduğu görülmektedir. G2 için yapılan çalışmalarda ise 10-190 mg/L metal içeren ortamlarda Zn biyosorpsiyonun (20.7mg/g). Cu(II) (20.6mg/g) ve Ni(II) (13.4mg/g)'e göre daha iyi olduğu görülmektedir. Bu sonuçlardan G1 ve G2 için Zn'nun diğer metallerden daha az inhibisyon etkisi olduğu söylenebilir. Ancak başlangıç metal konsantrasyonunun da biyosorpsiyon verimliliğini değiştiren bir unsur olduğu da görülmektedir.

Huang ve Shindo (2000), ise toprakta bulunan ağır metallerin asit fosfataz aktivitesine inhibisyon etkisini serbest ve immobilize enzim için incelemişlerdir. pH 5 ve 5.5 için kısmi yarışmalı inhibisyon etkisini gözlemlerken pH 6 için karışık tip

inhibisyon modeli elde edilmiştir. Abdallah ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus plantarum* DPC2739 isimli mikroorganizmadan asit fosfataz elde etmiş ve ağır metallerin inhibisyon etkisini incelemiştir. Optimum pH aralığı 3.5-5.5 aralığında elde edilmiş. bu aralıkta kültür ortamına eklenen BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgO<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ve ZnCl<sub>2</sub> gibi ağır metallerin asit fosfataz üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Sonuçlardan ZnCl<sub>2</sub> ve MgO<sub>2</sub> 'in aktiviteyi değiştirmedığı. CoCl<sub>2</sub> 'nin aktiviteyi %4 oranında düşürdüğü ve diğer metallerin de aktiviteyi bir miktar artırdığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında Zn(II) iyonlarının düşük derişimlerde (0-25 mg/L) aktivatör ve yüksek derişimlerde (50-100 mg/L) inhibitör olarak etki ettiği ve Cu(II) iyonlarının inhibisyona neden olduğu görülmüştür. Aynı şekilde Ni(II) iyonları da asit fosfataz enzimi için inhibisyona neden olmuş, diğer metallerden daha fazla enzimatik reaksiyon hızını azaltmıştır. Biyobirikim için en düşük değerler de Ni(II) iyonlarıyla elde edilmiştir.

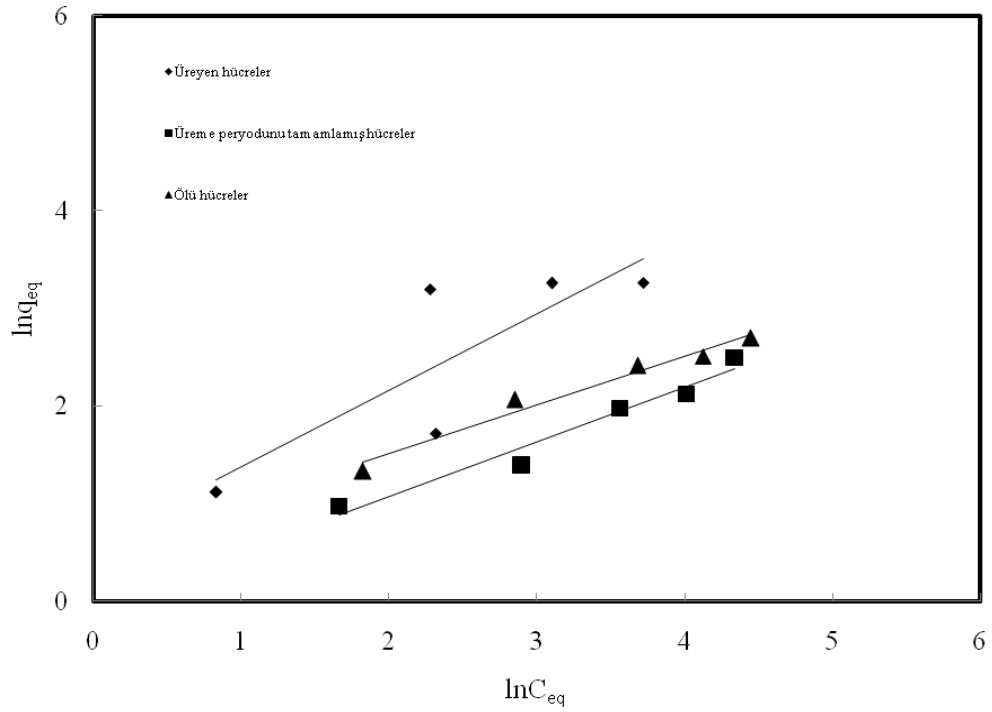
Metal iyonlarının giderimi üstel üreme evresini sonunda *R. delemar* 'ın aktivitesinin olduğu ortam, aktivitesinin olmadığı ortam ve ölü hücre için aşağıdaki tabloda kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlardan aktivitenin en yüksek olduğu ortamda verimliliğin de buna bağlı olarak en yüksek değerine ulaştığı görülmüştür.

Çizelge 4.20 Biyobiriken Zn(II) iyonu konsantrasyonu miktarı ve birim biyokütle miktarı için biyobiriken Zn(II)iyonu miktarının. Zn(II) iyonu içeren asit fosfataz üretim ortamında ortamda yaşayan. tutuklu ve ölü hücre için karşılaştırılması (C<sub>nişasta</sub> = 20 g/L; pH=5.0; T= 30 °C; t<sub>inkübasyon</sub> = 48 sa)

Üreyen hücreler için biyobirikim					Üreme periyodunu tamamlamış hücreler için biyobirikim				Biyosorpsiyon			
C <sub>Zn.i</sub> (mg/L)	Enzim Aktivitesi (µmol/L- dak)	C <sub>biyobir.</sub> (mg/L)	q <sub>biyobir.</sub> (mg/g)	Y <sub>ver.</sub> (%)	Enzim Aktivitesi (µmol/L- dak)	C <sub>biyobir.</sub> (mg/L)	q <sub>biyobir.</sub> (mg/g)	Y <sub>ver.</sub> (%)	Enzim Aktivitesi (µmol/L- dak)	C <sub>biyobir.</sub> (mg/L)	q <sub>biyoabir.</sub> (mg/g)	Y <sub>ver.</sub> (%)
9.99	756.63	7.69	3.06	76.98	11.98	4.74	2.66	48.07	1.671	4.64	4.64	46.4
25.15	703.13	15.02	5.59	74.99	21.40	7.03	4.02	34.89	3.42	11.23	11.23	41.81
50.86	171.39	41.11	24.5	80.83	20.34	15.75	7.25	31.3	2.62	16.04	16.04	38.94
74.01	167.77	51.82	26.03	69.90	11.705	18.89	8.41	25.52	2.39	25.28	25.28	32.18
100.10	58.52	58.85	26.12	58.82	13.66	23.31	12.15	23.34	1.03	31.22	31.22	31.22

Çizelge 4.21 *R. Delemar*'ın Zn(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon sabitleri ( $C_{nişasta} = 20$  g/L; pH= 5.0; T= 30 °C;  $t_{inkübasyon} = 48$  sa).

	$K_F$	n
Üreyen hücreler	1.8094	1.2771
Üreme periyodunu tamamlamış hücreler	0.9579	1.7921
Ölü hücreler	1.6702	2.004



Şekil 4.35 *R. Delemar*'ın Zn(II) gideriminde üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreleri için Freundlich sorpsiyon izotermi grafiği ( $C_{nişasta} = 20$  g/L; pH= 5.0; T= 30 °C;  $t_{inkübasyon} = 48$  sa).

### 4.3 Yüzey Cevap Yöntemiyle Yapılan Tasarım Çalışmaları

Klasik biyobirikim deneyleri sonucunda belirlenen en uygun pH ve sıcaklık aralıkları dikkate alınarak, deney sisteminin yüzey cevap yöntemiyle, deneysel çalışma aralıkları, en düşük pH değeri olarak 4.0 en yüksek pH değeri olarak 5.5, en düşük sıcaklık değeri olarak 25 °C, en yüksek sıcaklık değeri olarak 36 °C seçilmiştir. Tasarım çalışmaları için düşük derişimlerde aktivator etkisi göstermesi nedeniyle ağır metal olarak Zn(II) seçilmiştir. Sisteme eklenen Zn(II) derişimi 10-50 mg/L derişim aralığında değiştirilmiştir. Kullanılan değerler ve cevap değişkenleri Çizelge 4.22’ de gösterilmiştir.

Design Expert 7.00 (deneme versiyonu, Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) paket program ile yapılması gereken deney setleri belirlenmiş, elde edilen sonuçlar programa uygulanmıştır (Açikel vd., 2010). pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) derişimi bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, asit fosfataz aktivitesi, mikroorganizma derişimi ve metal biyobirikimi için elde edilen deneysel ve yöntem tarafından öngörülen değerler Çizelge 4.23’ de karşılaştırılmaktadır.

Çizelge 4.22 Bağımsız değişken aralıkları ve cevap değişkenleri

Bağımsız değişken	Semboller		Kodlanmış düzeyler		
	Kodlanmamış	Kodlanmış	-1	0	1
pH	X <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>	4.00	4.75	5.50
T (°C)	X <sub>2</sub>	x <sub>2</sub>	25.0	30.5	36.0
C <sub>Zn,i</sub> (mg/L)	X <sub>3</sub>	x <sub>3</sub>	10	30	50

Çizelge 4.23 Uygulanan pH, sıcaklık ve Zn(II) derişimleri ile elde edilen cevap değişkenleri

SET	Gerçek Değerler			Asit fosf. Aktivitesi ( $\mu\text{mol/L-dak}$ )			Mikroorg. Derişimi (g/L)			Metal Biyobirikimi (mg/L)		
	pH	T	$C_{\text{Zn,i}}$	Yöntem değerler	Deneysel değerler	% Hata	Yöntem değerler	Deneysel değerler	% Hata	Yöntem değerler	Deneysel değerler	% Hata
1	0	1	1	633.07	666.11	-5.21	2.59	2.58	0.63	34.39	34.00	1.17
2	0	0	0	757.87	746.32	1.52	3.09	3.10	-0.20	16.50	16.66	-0.91
3	0	0	0	757.87	746.32	1.52	3.09	3.10	-0.20	16.50	16.66	-0.91
4	0	-1	1	572.68	596.13	-4.09	2.42	2.42	0.33	21.56	21.40	0.79
5	-1	1	0	711.66	721.42	-1.37	3.57	3.57	0.04	20.79	20.2	2.95
6	0	0	0	757.87	785.32	-3.62	3.09	3.10	-0.20	16.50	16.9	-2.32
7	1	-1	0	804.09	792.31	1.46	3.02	3.00	0.81	12.05	12.3	-1.99
8	-1	0	1	526.46	512.21	2.70	2.63	2.61	0.82	28.35	28.11	0.85
9	0	-1	-1	882.68	845.00	4.19	2.73	2.73	0.21	3.76	3.96	-4.80
10	0	0	0	757.87	752.21	0.74	3.09	3.0	3.02	16.50	16.75	-1.45
11	0	1	-1	943.07	912.21	3.27	3.85	3.84	0.38	6.69	6.86	-2.36
12	1	1	0	864.48	841.32	2.67	3.80	3.81	-0.06	20.37	20.42	-0.21
13	-1	0	-1	836.46	836.32	0.017	2.99	3.00	-0.17	5.60	5.93	-5.53
14	1	0	0	757.87	721.21	4.83	3.09	3.1027	-0.29	16.50	16.5	0.04
15	-1	-1	0	651.27	661.00	-1.5	3.06	3.04	0.89	13.36	13.21	1.14
16	1	0	1	679.28	645.96	4.90	2.30	2.28	1.22	27.48	27.96	-1.68
17	1	0	-1	989.28	1100	-11.19	3.51	3.51	0.04	4.73	7.50	-1.08

#### 4.3.1 R. delemar ile Maksimum Asit Fosfataz Aktivitesi Elde Etmek İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi

Eşitlik 4.1 tarafından ifade edilen yöntem pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun fonksiyonu olarak asit fosfataz aktivitesini göstermektedir. Elde edilen eşitlik lineer eşitlik ve denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\text{Enzim aktivitesi} = 757.73 + 81.08x_1 + 30.83x_2 - 159.14x_3 \quad (4.1)$$

Eşitlik 5.1' in istatistiksel anlamı F testiyle kontrol edildi. Cevap yüzeyi lineer eşitlik için varyans analizi (ANNOVA) Çizelge 4.24 'de verilmiştir.

Çizelge 4.24 Cevap yüzeyi lineer eşitlik için, sıcaklık, pH ve  $C_{zn,i}$  fonksiyonu olarak asit fosfataz aktivitesinin varyans analizi (ANNOVA)

Kaynak	Kareler toplamı (Sum of squares)	DF	Ortalamanın Karesi (Mean square)	F- Değeri	Probabilite (P)>F	
Model	$2.628 \cdot 10^5$	3	87599.58	55.46	0.0001	uyumlu
Arta kalan (Residual)	20531.86	13	1579.37			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	18423.91	9	2047.10	3.88	0.1021	
Hata (Pure error)	2107.95	4	526.99			
Düzeltilmiş toplam	$2.833 \cdot 10^5$	16				
$R^2 = 0.9275$	$R^2_{Adj} = 0.9108$	$R^2_{Pred} = 0.8564$	$R = 0.9632$			

Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için yöntemde Prob>F diye ifade edilen olasılık değerinin 0.05'ten küçük olması gerekir. 0.1000' den büyük olduğu durumlarda tasarım cevap değişkenleri için anlamsız olur. F değeriyle birlikte  $R^2$  değerinin de incelenmesi ANNOVA tarafından öngörülen eşitliğe uyumu için önemli bir parametredir. Elde edilen verilerle tasarım uyumlu değilse uyum eksikliği vardır (not significant). Uyumlu ise (significant) yöntem uyumludur denir. Öngörülen eşitliğe

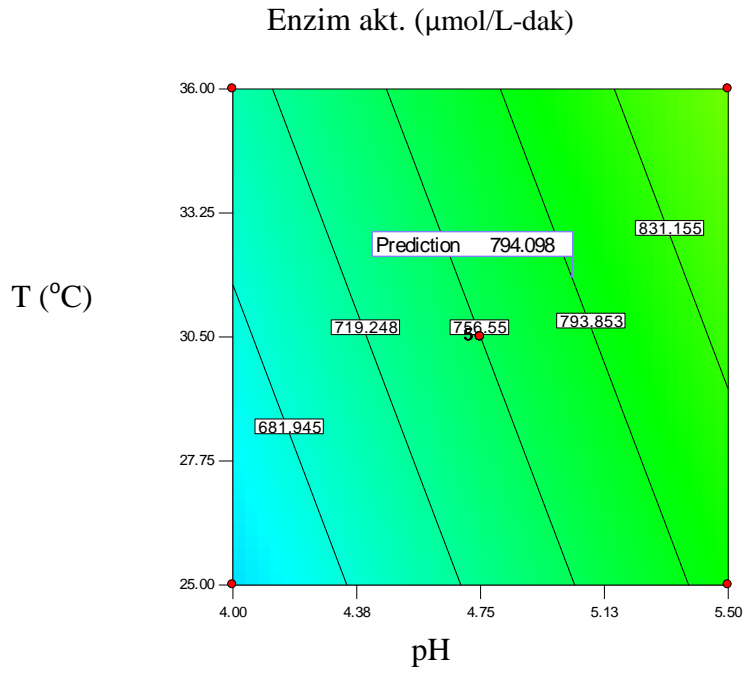


uyumu için  $R^2$  değeri incelendiğinde ise yöntem değeri ile gerçek değeri arasında çok büyük bir fark olmaması gereklidir.  $R^2$  ne kadar 1'e yakınsa yöntem o kadar gerçekçidir.

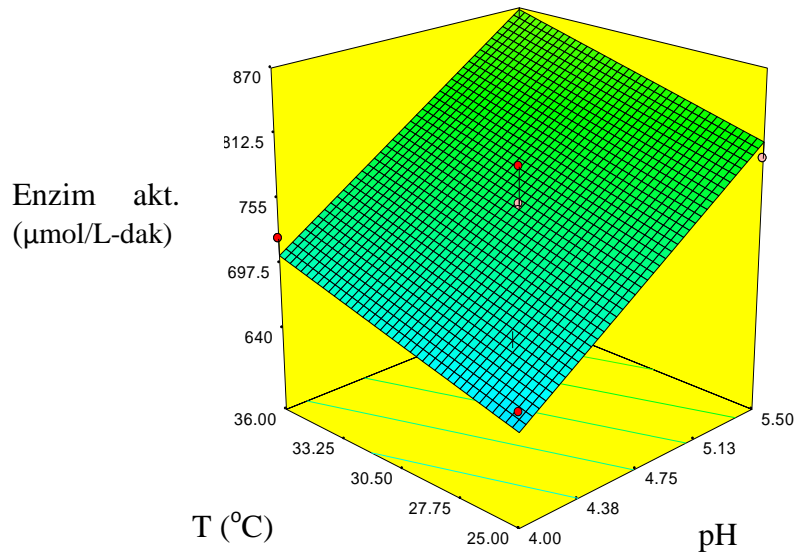
Yöntem için F değeri 55.46 olarak bulunmuştur. Öngörülen F değerinden ve probabilitate değerininin 0.0001'den küçük olmasından yöntemin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Asit fosfataz aktivitesi için 0.9275' lik  $R^2$  değeri yöntemin doğruluğuna işaret eder. Yüzde olarak ifade edildiğinde,  $R^2$  enzim aktivitesi için %90.30 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %9.7' sinin yöntemle ifade edilemediğini göstermektedir.  $R^2_{Pred}$  (0.8564),  $R^2_{Adj}$  (0.9108) ile iyi bir uyum içerisindedir. Eğer yöntemde pekçok değişken varsa ve örnek miktarı çok değilse  $R^2_{Adj}$ ,  $R^2$  den belirgin şekilde küçük olabilir. Sonuç olarak bu değerlerin birbirine ve 1'e yaklaşması yöntemin başarısını göstermektedir.

Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir. Sinyal gürültü oranınının ise 4' ün üstünde olması beklenir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı 24.922 yeterli sinyale işaret etmektedir. Uyum eksikliği (lack of fit), regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel kümedeki verileri göstermek için yöntemin başarısını ölçer. Eşitlik 5.1' in regresyonundan elde edilen uyum eksikliği anlamlı değildir (P=0.1021). Anlamlı olmayan uyum eksikliği iyidir ve öngörülen eşitliğinin değişkenlerin değerlerinin herhangi bir kombinasyonunda asit fosfataz aktivitesini önermek için yeterli olduğunu göstermektedir. Asit fosfataz aktivitesi için lineer bir eşitlik elde edilmiş olması incelenen parametrelerin birbirini etkilemediğini göstermektedir. Bir başka deyişle örneğin asit fosfataz aktivitesi için elde edilen pH optimumu, çalışılan sıcaklık aralığında değişmez.

Eşitlik 4.1' in regresyonunun grafiksel gösterimlerine cevap yüzeyleri denir. Üç boyutlu cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri design expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekil 4.36, 4.37 ve 4.38 ile gösterilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü gibi ortam pH' ı 5.03' e, sıcaklık 31.82 °C' ye ve başlangıç metal iyonu derişimi 30.15 mg/L' ye kadar artırılmasıyla, asit fosfataz aktivitesinin 794.098  $\mu\text{mol/L-dak}$ ' ya kadar arttığı gözlenmiştir.

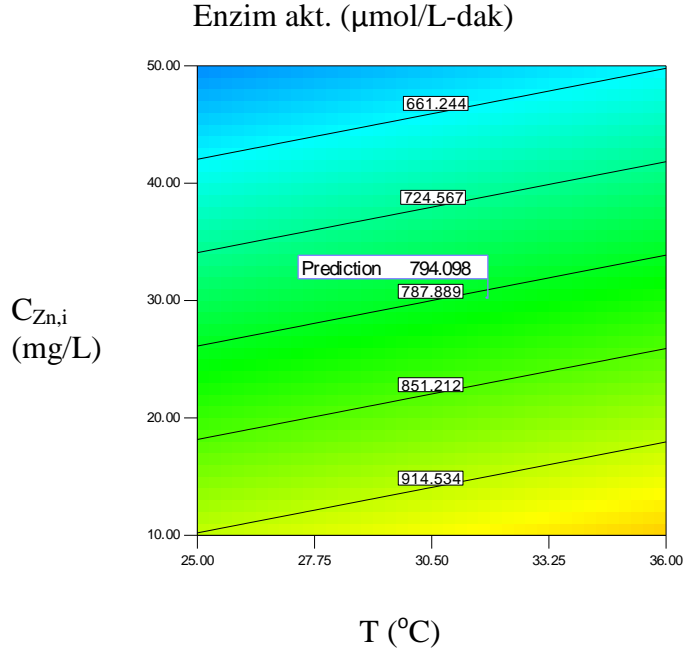


(a)

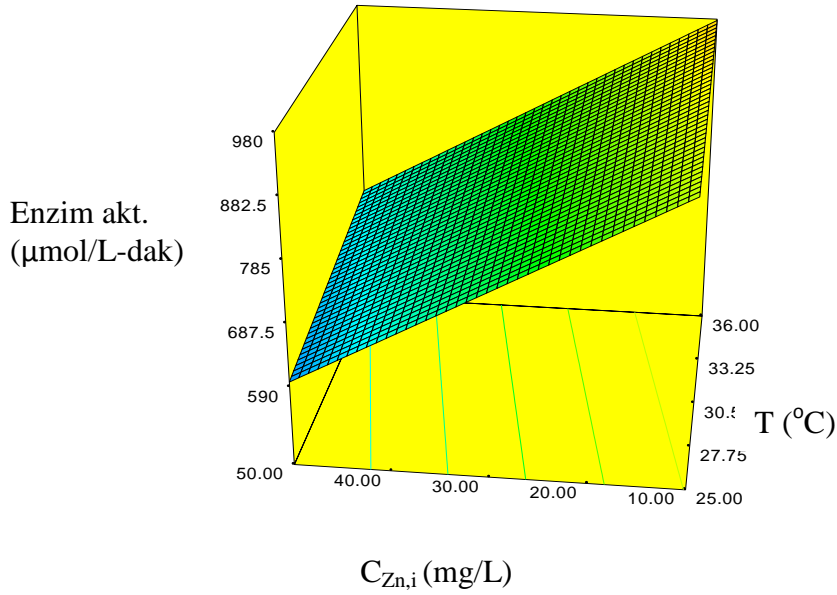


(b)

Şekil 4.36-(a) CYY ile, enzim aktivitesinin pH ve sıcaklıkla değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, enzim aktivitesinin pH ve sıcaklıkla değişimini gösteren üç boyutlu grafiği

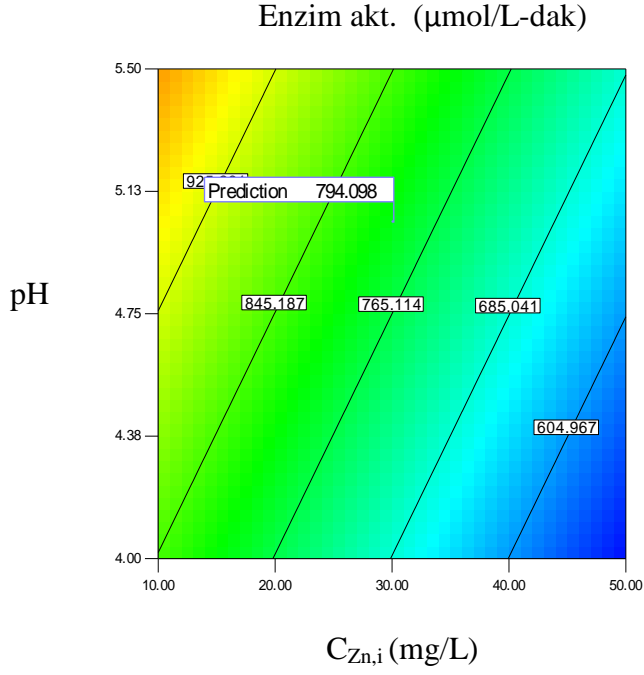


(a)

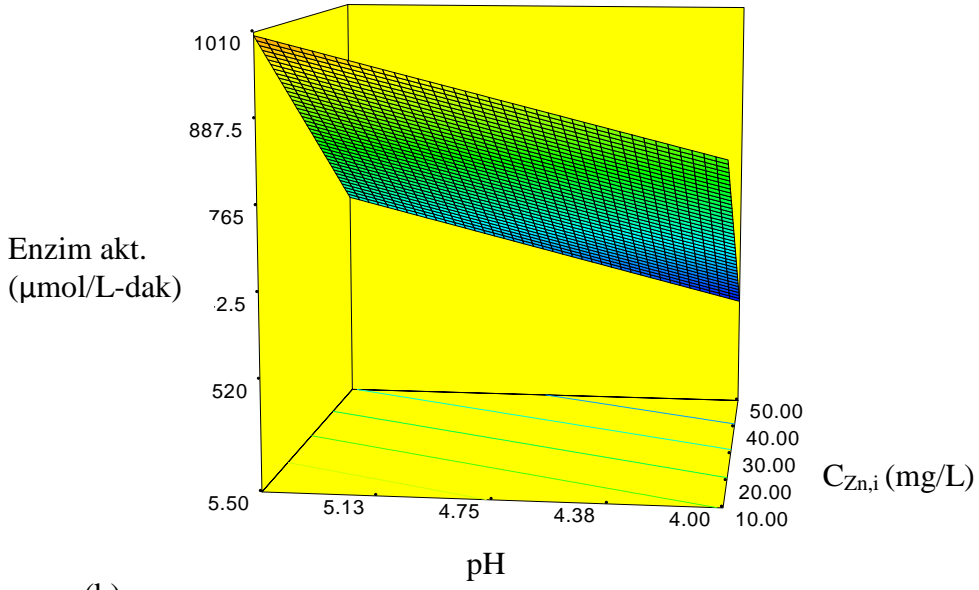


(b)

Şekil 4.37-(a) CYY ile, enzim aktivitesinin  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklıkla değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, enzim aktivitesinin,  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklıkla değişimini gösteren üç boyutlu grafiği



(a)



(b)

Şekil 4.38-(a) CYT ile, enzim aktivitesinin  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYT ile, enzim aktivitesinin  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği

#### 4.3.2 *R. delemar* Üremesi İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi

Eşitlik 4.2 tarafından ifade edilen yöntem pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun fonksiyonu olarak *R. delemar* konsantrasyonunu göstermektedir. Elde edilen eşitlik kuadratik bir eşitliktir ve denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\text{Mikroorganizma konsantrasyonu} = 3.08 + 0.048 x_1 + 0.33 x_2 - 0.40 x_3 + 0.07 x_1 x_2 + 0.21 x_1 x_3 - 0.24 x_2 x_3 + 0.12 x_1^2 - 0.16 x_2^2 - 0.35 x_3^2 \quad (4.2)$$

Eşitlik 4.2' nin istatistiksel anlamı F testiyle kontrol edildi. Cevap yüzeyi kuadratik eşitlik için varyans analizi (ANNOVA) Çizelge 5.25 'de verilmiştir.

Çizelge 4.25 Cevap yüzeyi kuadratik eşitlik için, sıcaklık, pH ve  $C_{zn,i}$  fonksiyonu olarak *R. Delemar* üremesinin varyans analizi (ANNOVA)

Kaynak	Kareler toplamı (Sum of squares)	DF	Ortalamanın Karesi (Mean square)	F- Değeri	Probabilite (P)>F	
Model	3.20	9	0.36	273.75	<0.0001	uyumlu
Arta kalan (Residual)	$9.089 \cdot 10^{-3}$	7	$1.29 \cdot 10^{-3}$			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	$9.75 \cdot 10^{-4}$	3	$3.25 \cdot 10^{-4}$	0.16	0.9178	
Hata (Pure error)	$8.11 \cdot 10^{-3}$	4	$2.082 \cdot 10^{-3}$			
Düzeltilmiş toplam	3.21	16				
$R^2 = 0.9972$	$R^2_{Adj} = 0.9935$	$R^2_{Pred} = 0.9912$	$R = 0.9986$			

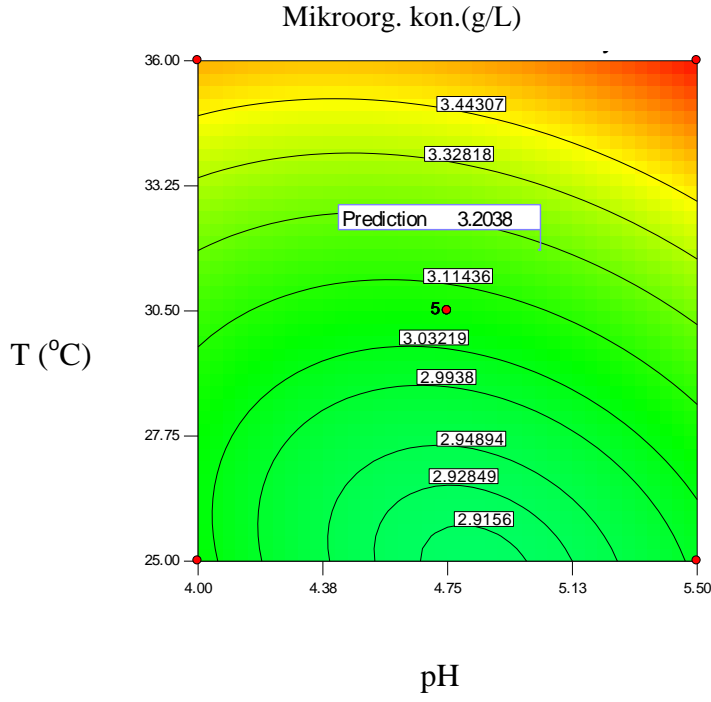
Model için F değeri 273.75 olarak bulunmuştur. Model F değerinden ve probabilitate değerininin küçük olmasından yöntemin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Mikroorganizma konsantrasyonunun öngörülmesi için  $R^2 = 0.9972$  değeri yöntemin doğruluğuna işaret eder. Yüzde olarak ifade edildiğinde,  $R^2$  enzim aktivitesi için % 99.72 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedebileceğini, toplam değişimin yalnız %0.0028' sinin yöntemle ifade edilemediğini göstermektedir. Bire yakın

regresyon katsayısı değerleri deneysel verilerin yöntemle iyi bir uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

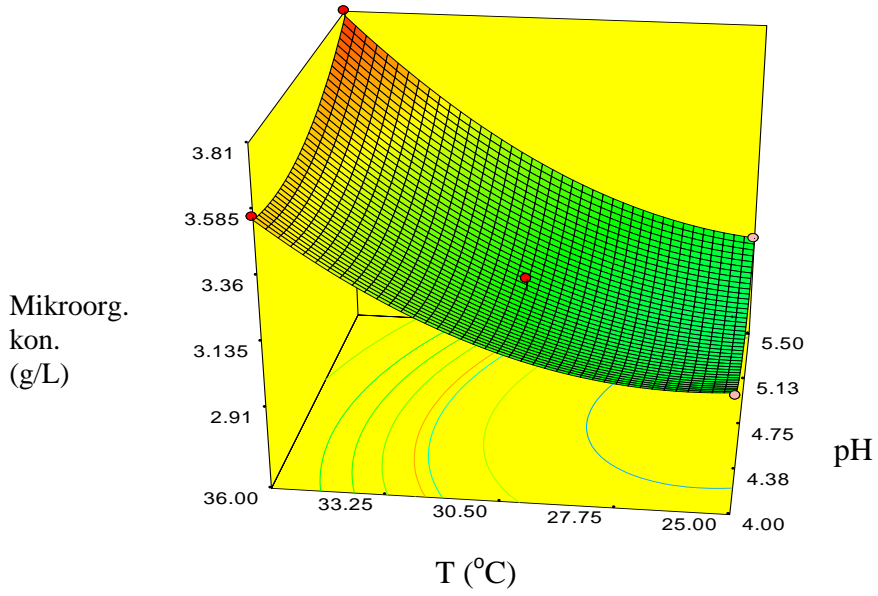
Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranının 56.674 olarak bulunmuştur. Bu değerin 4' den büyük olması yeterli sinyale işaret etmektedir. Eşitlik 4.2' in regresyonundan elde edilen uyum eksikliği anlamlı değildir (P=0.9178). Anlamlı olmayan uyum eksikliği iyidir ve model eşitliğinin değişkenlerin değerlerinin herhangi bir kombinasyonunda mikroorganizma konsantrasyonunu aktivitesini önermek için yeterli olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık, pH ve Zn(II) derişiminin hem lineer etkisinin hem de ikinci derceden etkisinin mikroorganizma konsantrasyonu üzerinde önemli olduğu 0.05' den daha küçük probabilitelerden anlaşılmaktadır. Öte yandan çalışılan başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun pH ya da sıcaklığa bağlı olarak da etki ettiği, pH ve sıcaklığın da birlikte etki ettiği görülmektedir. Çalışılan aralıkta sıcaklık, pH ve Zn(II) derişiminin artmasıyla mikroorganizma derişiminin artması beklenmektedir.

Eşitlik 4.2' nin regresyonunun grafiksel gösterimlerine cevap yüzeyleri denir. Üç boyutlu cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri design expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekil 4.39, 4.40 ve 4.41 ile gösterilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü gibi ortam pH' ı 5.03' e, sıcaklık 31.82 °C' ye ve başlangıç metal iyonu derişimi 30.15 mg/L' ye kadar artırılmasıyla, mikroorganizma konsantrasyonunun 3.2038 g/L' ye kadar arttığı gözlenmiştir.

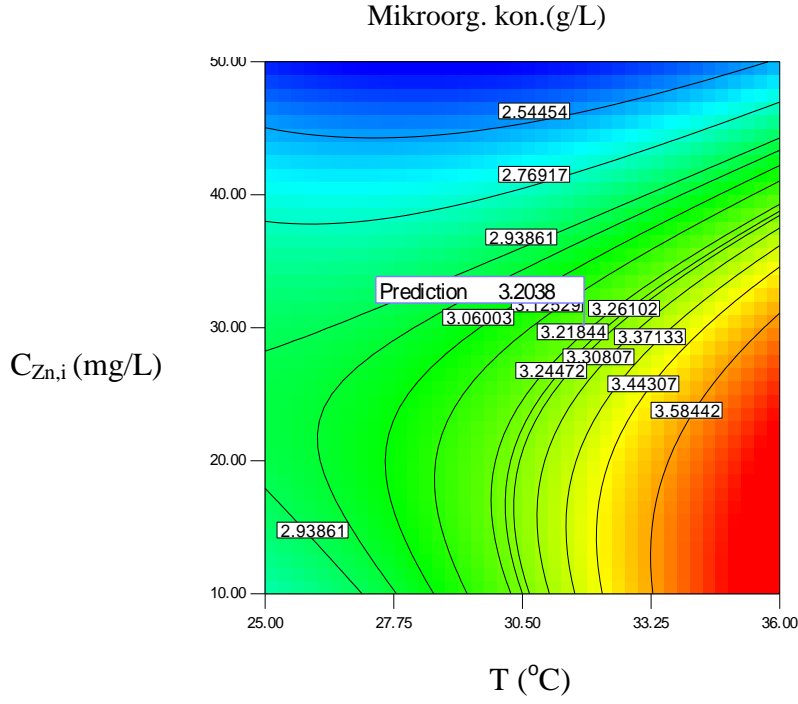


(a)

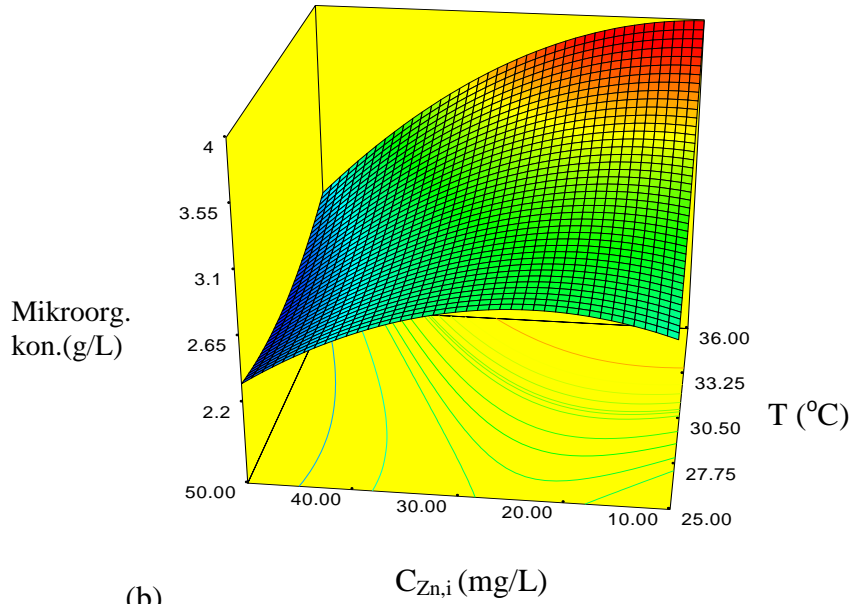


(b)

Şekil 4.39-(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği



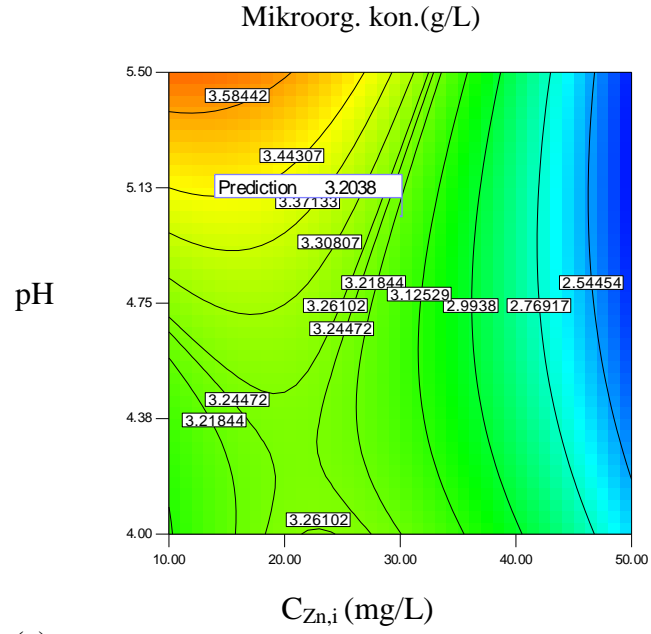
(a)



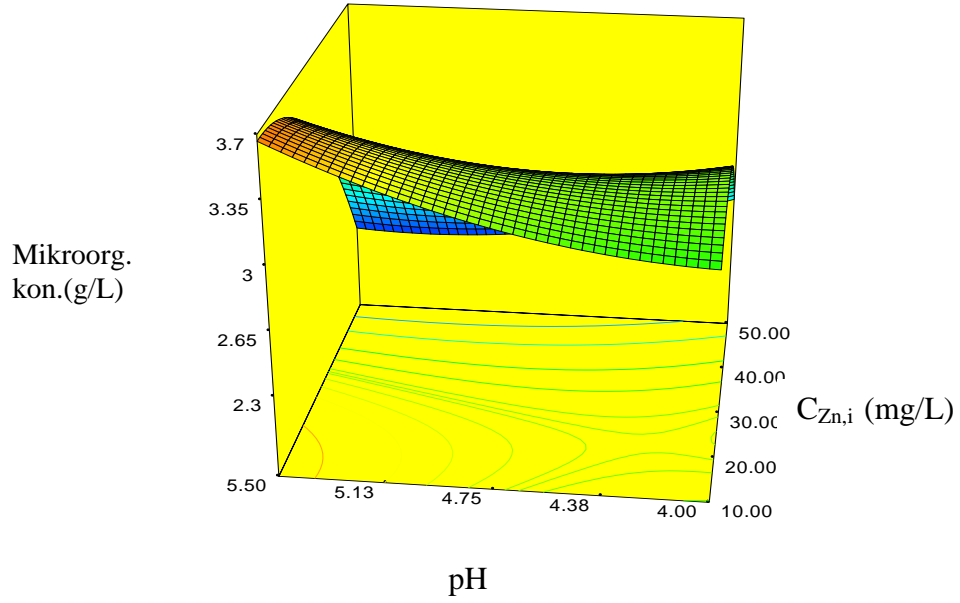
(b)

Şekil 4.40-(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklık ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve sıcaklık ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği





(a)



(b)

Şekil 4.41-(a) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, mikroorganizma konsantrasyonunun  $C_{Zn,i}$  ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği

#### 4.3.3 R. Delemar'ın Zn(II) Biyobirikimi İçin Deney Koşullarının Belirlenmesi

Eşitlik 4.3 tarafından ifade edilen model pH, sıcaklık ve başlangıç Zn(II) konsantrasyonunun fonksiyonu olarak *R. delemar* konsantrasyonunu göstermektedir. Elde edilen eşitlik quadratik bir eşitliktir ve denklemi aşağıdaki gibidir.

$$\text{Zn(II) biyobirikimi} = 16.69 - 0.25 x_1 + 3.83 x_2 + 11.24 x_3 - 0.28 x_1x_2 + 0.25 x_1x_3 + 2.42 x_2x_3 - 9.5 \cdot 10^{-3} x_1^2 - 0.15 x_2^2 + 0.013 x_3^2 \quad (4.3)$$

Eşitlik 4.3'ün istatistiksel anlamı F testiyle kontrol edildi. Cevap yüzeyi quadratik eşitlik için varyans analizi (ANNOVA) Çizelge 4.26 'da verilmiştir.

Çizelge 4.26 Cevap yüzeyi quadratik eşitlik için, sıcaklık, pH ve  $C_{Zn,i}$  fonksiyonu olarak *R. Delemar*'ın Zn (II) biyobirikimi için varyans analizi (ANNOVA)

Kaynak	Kareler toplamı (Sum of squares)	DF	Ortalamanın Karesi (Mean square)	F- Değeri	Probabilite (P)>F	
Model	1152.72	9	128.08	4008.86	<0.0001	uyumlu
Arta kalan (Residual)	0.22	7	0.032			
Uyum eksikliği (Lack of fit)	0.14	3	0.046	2.15	0.2362	
Hata (Pure error)	0.086	4	0.021			
Düzeltilmiş toplam	1152.95	16				
$R^2 = 0.9998$	$R^2_{Adj} = 0.9996$	$R^2_{Pred} = 0.9980$	$R = 0.9989$			

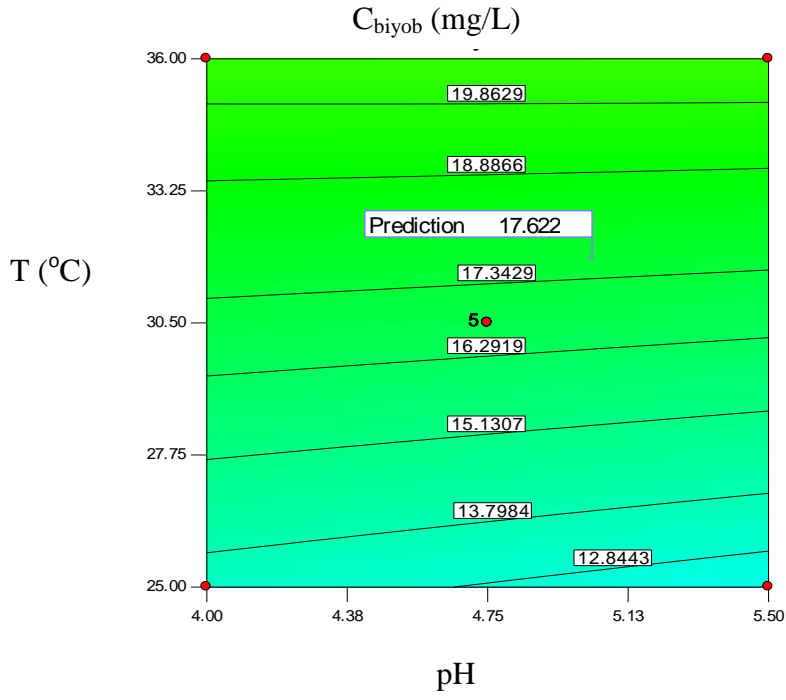
Yöntem için F değeri 4008.65 olarak bulunmuştur. Yöntem F değerinden ve probabilitate değerininin 0.0001'den küçük olmasından modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Asit fosfataz aktivitesi için 0.9998'lik  $R^2$  değeri yöntemin doğruluğuna işaret eder. Yüzde olarak ifade edildiğinde,  $R^2$  enzim aktivitesi için %99.98 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %0.02'sinin modelle ifade edilemediğini göstermektedir.  $R^2_{Pred}$  (0.9980),  $R^2_{Adj}$  (0.9996) ile iyi

bir uyum içerisindedir. Eğer eşitlikte pekçok değişken varsa ve örnek miktarı çok değilse  $R^2_{Adj}$ ,  $R^2$  den belirgin şekilde küçük olabilir. Sonuç olarak bu değerlerin birbirine ve 1' e yaklaşması yöntemin başarısını göstermektedir.

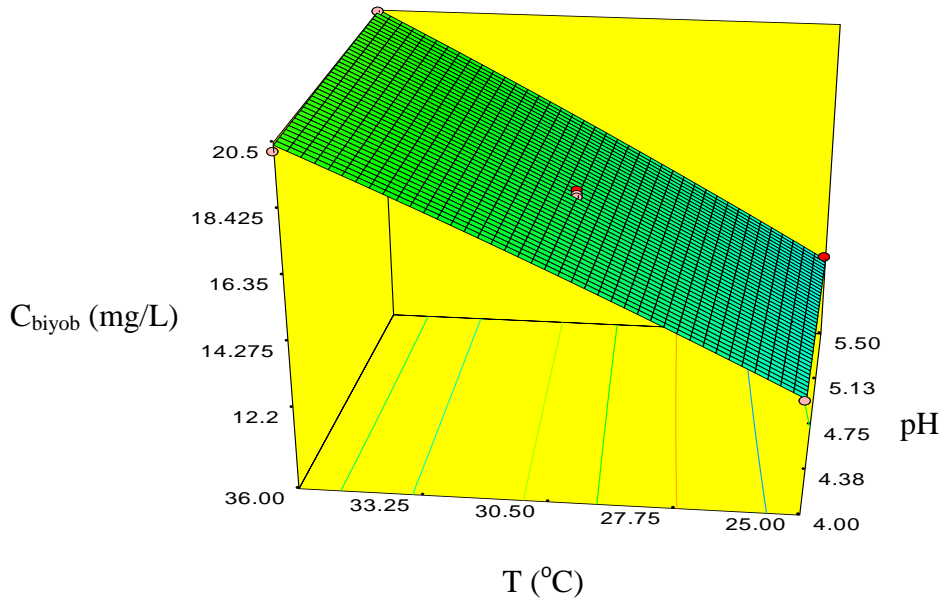
Yeterli kesinlik (adequate precision), sinyal gürültü oranını gösterir. Sinyal gürültü oranının ise 4' ün üstünde olması beklenir. Bu çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı 219.819 yeterli sinyale işaret etmektedir. Uyum eksikliği (lack of fit), regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel kümedeki verileri göstermek için yöntemin başarısını ölçer. Eşitlik 4.3' ün regresyonundan elde edilen uyum eksikliği anlamlı değildir (P=0.2362). Anlamlı olmayan uyum eksikliği iyidir ve model eşitliğinin değişkenlerin değerlerinin herhangi bir kombinasyonunda asit fosfataz aktivitesini önermek için yeterli olduğunu göstermektedir. Asit fosfataz aktivitesi için quadratik bir eşitlik elde edilmiş olması incelenen parametrelerin birbirini etkilediğini göstermektedir.

Katsayıların herbirinin anlamlı olup olmadığını kontrol etmek için p değeri kullanılmıştır. pH' ın, sıcaklığın ve başlangıç Zn(II) derişiminin birinci dereceden biyobirikim üzerinde etkisili olduğu 0.05' den daha küçük probabilitelerinden anlaşılmaktadır. Öte yandan çalışılan başlangıç Zn(II) konsantrasyonu aralığında, biyobirikim üzerine pH ve sıcaklığın, pH ve derişimin, sıcaklık ve derişimin birlikte etki ettiği görülmektedir. Başlangıç Zn(II) derişimi, ortam sıcaklığı azaldıkça ve en uygun pH değerinden uzaklaştıkça biyobirikimin azalması beklenir.

Eşitlik 5.3' ün regresyonunun grafiksel gösterimlerine cevap yüzeyleri denir. Üç boyutlu cevap yüzeyleri ve kontur grafikleri design expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekil 4.42, 4.43 ve 4.44 ile gösterilmiştir. Grafiklerden de görüldüğü gibi ortam pH' ı 5.03' e, sıcaklık 31.82 °C' ye ve başlangıç metal iyonu derişiminin 30.15 mg/L' ye kadar artırılmasıyla, Zn(II) biyobirikiminin 17.622 mg/L' ye kadar arttığı gözlenmiştir.

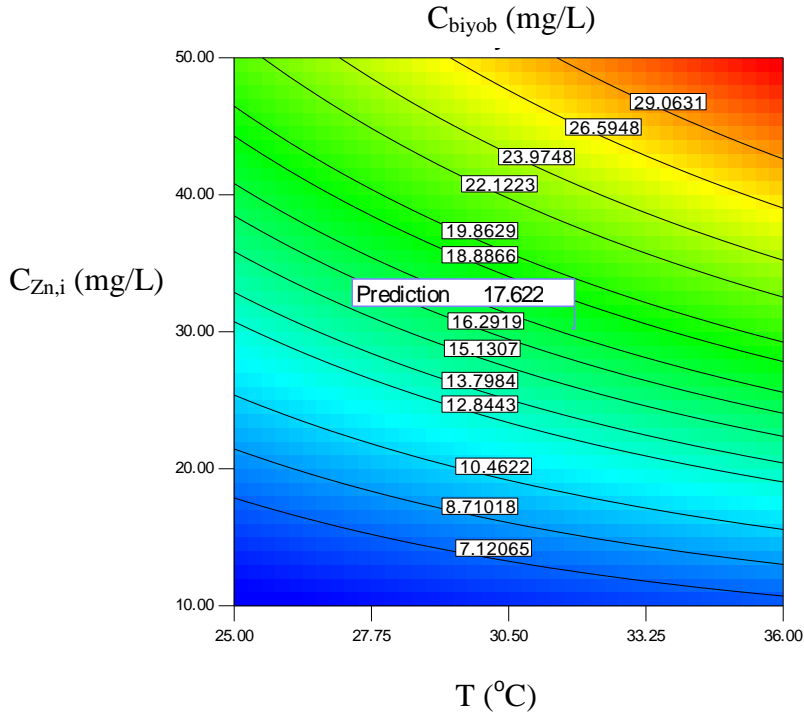


(a)

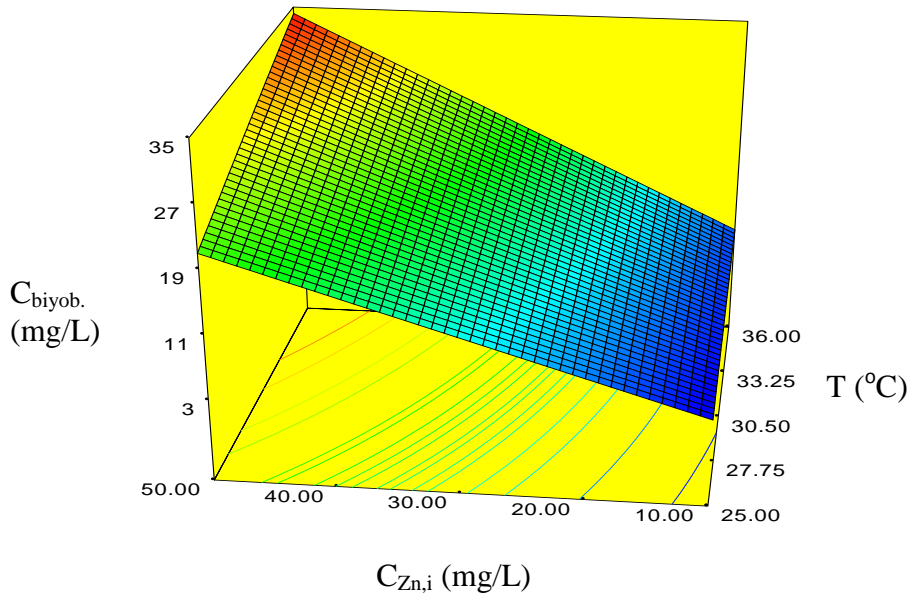


(b)

Şekil 4.42-(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve pH ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği

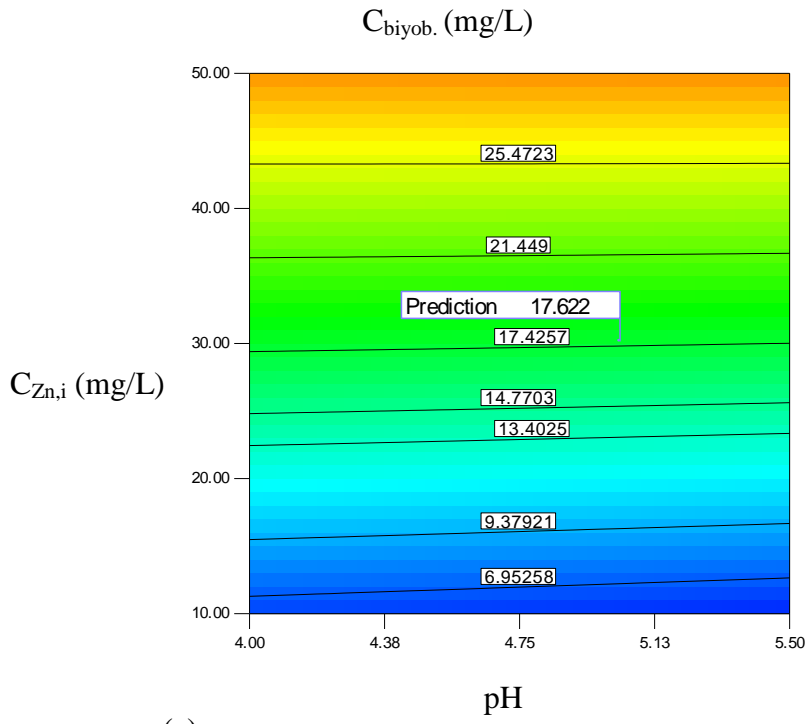


(a)

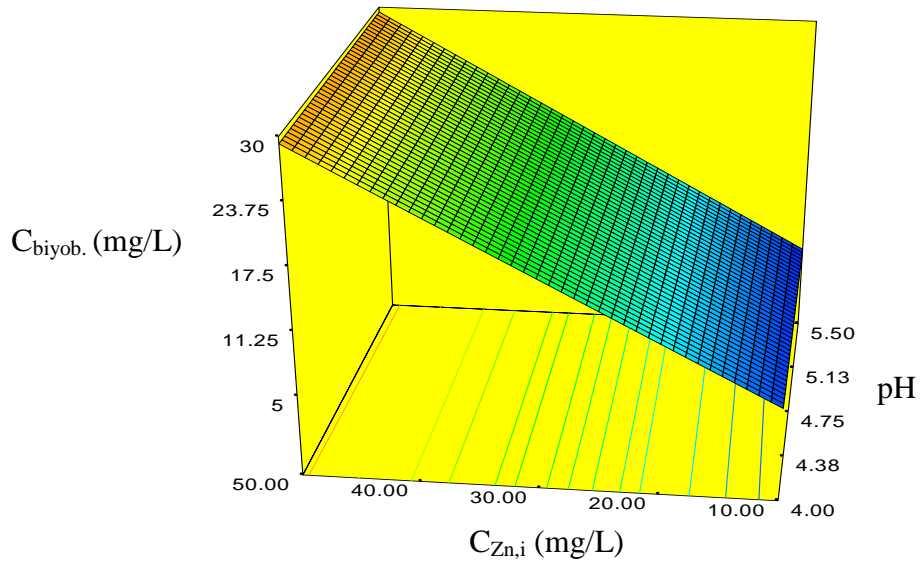


(b)

Şekil 4.43-(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve  $C_{Zn,i}$  ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin sıcaklık ve  $C_{Zn,i}$  ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği



(a)



(b)

Şekil 4.44-(a) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin pH ve  $C_{\text{Zn,i}}$  ile değişimini gösteren kontür grafiği (b) CYY ile, Zn(II) biyobirikiminin pH ve  $C_{\text{Zn,i}}$  ile değişimini gösteren üç boyutlu grafiği

#### 4.3.4 Deney Doğrulama

CYY ile elde edilen deney sonuçlarını doğrulamak ve deneysel değerlerden sapmayı görebilmek için optimum koşullarda (pH=5.03, T = 31.82 °C, C<sub>Zn,i</sub> = 30.15 mg/L) deney tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.27 ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.27 CYY ile elde edilen deneysel sonuçlar ile deney doğrulama değerlerinin karşılaştırılması

Deney parametreleri	Tasarım sonuçları	Deney doğrulama sonuçları	% Hata
Asit fosfataz aktivitesi (μmol/L-dak)	798.098	791.420	0.84
Mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)	3.2038	3.401	5.79
Zn(II) biyobirikimi (mg/L)	17.62	16.98	3.77

## 5 SONUÇLAR

Bu çalışmada *R. delemar* ile lipaz enziminin üretimi için en uygun fermentasyon şartlarının bulunmasına çalışılmıştır. Karbon kaynağı olarak 1.0 g/L melas sakkarozu içeren ortamda, indükleyicilerin etkisini incelemek için ticari yağlar ve tributirin kullanılmıştır. Ticari yağlar melas ile birlikte kullanıldığında enzim aktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiş ve elde edilen aktiviteler sırasıyla ayçiçeği yağı, soya yağı, fındık yağı, mısır yağı, tributirin ve zeytin yağı şeklinde azalmıştır.

Yüzey aktif madde olarak tween-80 (%1) içeren ortamda elde edilen maksimum enzim aktivitesi, 91.73  $\mu\text{mol/L-dak}$ , rhamnolipid içeren ortamda 58.88  $\mu\text{mol/L-dak}$  ve tributirin içeren ortamda 21.22  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak bulunmuştur.

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu içeren ortamda sıcaklığın etkisi incelenmiş ve en uygun sıcaklık aralığı, 30-35 °C olup, bu sıcaklık aralığında elde edilen en yüksek enzim aktiviteleri sırasıyla 93.07 ve 74.17  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak saptanmıştır.

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı kullanılan ortamda karıştırma hızının (50-250 devir/dak) etkisi incelenmiş ve en yüksek enzim aktivitesi değeri olarak 200 devir/dak karıştırma hızında, 103.12  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak elde edilmiştir.

Karbon kaynağı olarak melas sakkarozu ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı kullanılan ortamda maksimum enzim aktivitesi 2 vvm hava giriş hızında, fermentasyonun 4. gününde 102.83  $\mu\text{mol/L-dak}$  olarak elde edilmiştir. Havalandırmanın varlığı hem enzim aktivitesini arttırmış, hem de daha erken ve uzun süreli enzim aktivitesi gözlenmesini sağlamıştır. Melas ve sakkarozun (1, 2, 5, 10 g/L) birlikte kullanılması, karbon kaynağı etkisini arttırırken maksimum enzim aktivitesi 5.0 g/L sakkaroz kullanılan ortamda 92.27  $\mu\text{mol/L-dak}$ , mikroorganizma konsantrasyonu ise 7.95 kuru mikroorganizma ağı./L olarak elde edilmiştir.

Melas, sakkaroz ve ayçiçeği yağı birlikte kullanılarak enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Sakkaroz ve melası birlikte içeren ortamda elde edilen enzim



aktivitesinden 2.38 kez daha büyük değer elde edilmiştir.

Aktivatörlerin *R. delemar*' in üremesi ve lipaz enzimi üretmesi üzerine etkilerini incelemek için NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, arap zankı ve EDTA gibi farklı aktivatörler kullanılmıştır. Lipaz aktivitesi aktivatörlerin varlığında NaCl>KCl>CaCl<sub>2</sub>>MgCl<sub>2</sub>>arap zankı>EDTA şeklinde azalmış ve en fazla aktivite 964.55 µmol/L-dak olarak NaCl kullanıldığında elde edilmiştir. Maksimum biyokütle konsantrasyonu CaCl<sub>2</sub> eklenen fermentasyon ortamında 4.44 g kuru mikroorganizma ağırlığı/L olarak elde edilmiştir. Aktivatörlerin varlığında mikroorganizma konsantrasyonu sırasıyla CaCl<sub>2</sub>>KCl>NaCl>arap zankı>MgCl<sub>2</sub>>EDTA şeklinde azalmıştır.

Ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesine etkisinin incelenmesi için, fermentasyon ortamlarına Fe(II), Mn(II), Co(II) ve Ni(II) metal iyonları eklenmiştir. Lipaz aktivitesi, ağır metal iyonları varlığında Fe>Mn>Co>Ni şeklinde azalmıştır. Co(II) ve Ni(II) tuzları lipaz aktivitesini oldukęa fazla düşürdüğünden enzimin yapısını değiştirdiği düşünölmektedir. Karbon kaynağı olarak melas ve indükleyici olarak ayçiçeği yağı kullanıldığında enzim aktivitesi Fe(II) içeren ortamda (85.23 µmol/L-dak) ve Mn(II) içeren ortamda (71.25 µmol/L-dak) yaklaşık olarak aynı elde edilmiştir. Mikroorganizma konsantrasyonu ağır metal iyonu varlığında, enzim aktivitesinde olduğu gibi sırasıyla Fe>Mn>Co>Ni şeklinde elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında *R. delemar*' in asit fosfataz üretimi ve ağır metallere biyogiderimi incelenmiştir. İlk olarak Ni(II) iyonları varlığında ve metalsiz ortamda *R. delemar*' in asit fosfataz üretimi incelenmiştir. Maksimum asit fosfataz aktivitesi metal iyonu içermeyen kültür ortamında, pH 5.0 değerinde, 176.41 µmol/L-dak olarak elde edilmiştir. Ni(II) iyonlarının varlığında, maksimum asit fosfataz aktivitesi üremenin üstel üreme evresinin sonunda (48 sa) elde edilmiştir. Maksimum biyokütle konsantrasyonu pH 5.0'de, yavaşlama evresinin sonunda (72–76 sa) 3.515 g/L olarak elde edilmiştir. Bu fazdan sonra maksimum biyokütle konsantrasyonu yaklaşık sabit kalmıştır.

Fermentasyon ortamında Ni(II) iyonlarının varlığı *R. delemar* üremesini inhibe etmiştir. 20 g/L nişasta konsantrasyonunda pH 5.0'de üremenin 48. saatinde biyokütle

konsantrasyonu 3.3427 g/L ve spesifik üreme hızı da 0.0499 sa<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir. En düşük spesifik üreme hızı ve biyokütle konsantrasyonu, 50 mg/L Ni(II) iyonunun bulunduğu ortamda sırasıyla 0.0478 sa<sup>-1</sup> ve 1.677 g/L, olarak bulunmuştur.

Mikroorganizmanın metalsiz ortamda maksimum spesifik üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve doygunluk sabiti ( $K_s$ ) 0.0649 sa<sup>-1</sup> ve 1.8928 g/L olarak bulunmuştur.

*R. delemar*'ın üreme hızı üzerine Ni(II) inhibisyon tipinin belirlenmesi için, maksimum spesifik üreme hızı ( $\mu_m$ ) ve Monod doygunluk sabitlerinin ( $K_s$ ) artan Ni(II) iyonu derişimi ile değişimi, Ni(II) iyonu içermeyen ortamlarla karşılaştırılmıştır. Çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafiklerinden, Ni(II) iyonu konsantrasyonunun 10-50 mg/L aralığında arttırılmasının, *R. delemar*'ın üreme hızı üzerine etkisinin, yarışmalı inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Ni(II) iyonunun *R.delemar*'ın üreme hızı üzerindeki inhibisyon sabitinin belirlenmesi için Monod grafikleri kullanılmış ve *R. delemar*'ın spesifik üreme hızı için Ni(II) iyonlarının inhibisyon sabiti 67.11 mg Ni(II)/L olarak bulunmuştur.

Asit fosfataz aktivitesinde Ni(II) inhibisyon sabitinin belirlenmesi için, inhibitör konsantrasyonuna karşı  $1/V_{m.app}$  değerleri grafiğe geçirilmiş ve enzimatik reaksiyon hızı üzerine Ni(II) iyonları için inhibisyon sabiti 50 mg Ni(II)/L olarak saptanmıştır.

*R. delemar*'ın üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücrelerinin Ni(II) sorpsiyon izotermine uyumu araştırılmış ve deneysel ve yöntem tarafından önerilen denge giderimi arasındaki en iyi uyum Freundlich izotermi kullanılarak elde edilmiştir. Biyokütlenin birimkütle başına biyobiriktirilen Ni(II) iyonu miktarları, artan Ni(II) konsantrasyonu ile artmasına rağmen daha yüksek Ni(II) iyon giderim verimlilikleri bütün biyokütle tipleri için daha düşük Ni(II) konsantrasyon değerlerinde elde edilmiştir.

Cu(II) iyonları varlığında ve metalsiz ortamda *R. delemar*'ın asit fosfataz üretimi incelenmiş, maksimum biyokütle konsantrasyonu pH 5.0'de, yavaşlama evresinin sonunda (48–72 sa) 2.833 g/L olarak elde edilmiştir. Bu evreden sonra maksimum

biyokütle konsantrasyonu yaklaşık sabit kalmıştır.

Fermentasyon ortamında Cu(II) iyonlarının varlığı *R. delemar* üremesini inhibe etmiştir. En düşük spesifik üreme hızı ve biyokütle konsantrasyonu, 100 mg/L Cu(II) iyonunun bulunduğu ortamda sırasıyla 0.0345 sa<sup>-1</sup> ve 1.943 g/L, olarak bulunmuştur.

*R.delemar*' in üreme hızı üzerine Cu(II) inhibisyon tipinin belirlenmesi için çizilen Monod grafiklerinden, Cu(II) iyonu konsantrasyonunun 10-100 mg/L aralığında artırılmasının, *R. delemar*'ın üreme hızı üzerine etkisinin, yarışmalı inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır. Maksimum spesifik üreme hızları Cu(II) iyonlarının artan konsantrasyonlarıyla yaklaşık olarak sabit kalmakta ve 0.0590 sa<sup>-1</sup> olarak elde edilmiştir.

Cu(II) iyonunun *R.delemar*' in üreme hızı üzerindeki inhibisyon sabitinin belirlenmesi için yarışmalı inhibisyona ait olan çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri kullanılmıştır ve *R. delemar*' in spesifik üreme hızı için Cu(II) iyonlarının inhibisyon sabiti 82.30 mg Cu(II)/L olarak bulunmuştur.

Asit fosfataz aktivitesi için Cu(II) inhibisyon sabitinin belirlenmesine çalışılmış ve enzimatik reaksiyon hızı üzerine Cu(II) iyonları için inhibisyon sabiti 100 mg Cu (II)/L olarak saptanmıştır.

*R. delemar* için Cu(II) iyonlarının maksimum biyobirikimi pH 5.0-5.5. aralığında elde edilmiştir. 50 mg/L başlangıç Cu(II) iyonu konsantrasyonunda C<sub>Cu,i</sub>, pH 5.0 ve 25°C sıcaklıkta incelenmiştir. Biyobiriktirilen Cu(II) iyonu konsantrasyonu gecikme evresi süresince yavaş, üstel üreme evresinde hızlı bir şekilde artmış ve maksimum değerine 48 sa'de ulaşmıştır.

Üreyen, üreme periyodunu tamamlamış ve ölü hücreler için, Freundlich adsorpsiyon izoterminden elde edilen sabitlerin değerleri karşılaştırıldığında görülmektedir ki, en yüksek kapasite ve şiddetle üreyen hücreler Cu(II) giderimi yapmakta (1.6837), bunu ölü hücreler (1.6820) ve üreme periyodunu tamamlamış hücreler (0.7261) izlemektedir.

En düşük spesifik üreme hızı ve biyokütle konsantrasyonu, 100 mg/L Zn(II) iyonunun bulunduğu ortamda sırasıyla 0.0430 sa<sup>-1</sup> ve 2.530 g/L olarak bulunmuştur.

*R. delemar*'ın üreme hızı üzerine Zn(II) inhibisyon tipinin belirlenmesi için, çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri kullanılmıştır. Zn(II) iyonu konsantrasyonunun 50-100 mg/L aralığında arttırılmasının, *R. delemar*'ın üreme hızı üzerine etkisinin kısmi yarışmalı tip inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Zn(II) iyonunun *R.delemar*'ın üreme hızı üzerindeki inhibisyon sabitinin belirlenmesi için kısmi yarışmalı inhibisyon ait olan çift taraflı doğrusallaştırılmış Monod grafikleri kullanılmış ve *R. delemar*'ın spesifik üreme hızı için Zn(II) iyonlarının inhibisyon sabiti 179.21 mg Zn(II)/L olarak bulunmuştur.

*R. delemar*'ın asit fosfataz aktivitesine Zn(II) iyonlarının etkisi 10-100 mg/L aralığında incelenmiş ve 50 mg/L Zn(II) iyonu eklendiğinden itibaren inhibisyon etkisi başlamıştır. 50-100 mg/L derişimleri için inhibisyon kinetiği uygulanabilmiştir.

Artan Zn(II) iyonlarına rağmen maksimum tepkime hızı önemli derecede azalmakta ve bununla beraber Michaelis-Menten sabitleri belirgin derecede artmaktadır. Bu tip inhibisyon yarışmasız karışık (mixed) tip inhibisyon olarak bilinmektedir.

Asit fosfataz aktivitesi için Zn(II) inhibisyon sabitlerinin belirlenmiş ve enzimatik reaksiyon hızı üzerine Zn(II) iyonları için inhibisyon sabiti 100 mg Zn(II)/L olarak saptanmıştır.

*R. delemar* için Zn(II) iyonlarının maksimum biyobirikimi pH 5.0-5.5. aralığında elde edilmiştir. 50 mg/L başlangıç Zn(II) iyonu konsantrasyonunda C<sub>Cu,i</sub>, pH 5.0 ve 25 °C sıcaklıkta, biyobiriktirilen Zn(II) iyonu konsantrasyonu gecikme evresi süresince yavaş ve üstel üreme evresinde hızlı bir şekilde artmıştır ve maksimum değerine 48 sa' de ulaşılmıştır.

Deneysel ve yöntem tarafından önerilen denge giderimi arasındaki en iyi uyum Freundlich izotermi kullanılarak elde edilmiştir. K<sub>F</sub> değerlerine bakıldığında Zn(II)

giderim kapasitesi üreyen hücre için en fazladır (1.8094), ölü hücre (1.6702) bunu takip etmektedir.

Design Expert 7.0 kullanılarak Zn(II) için en iyileme deneyleri yapılmış ve asit fosfataz aktivitesi için lineer, mikroorganizma konsantrasyonu ve Zn(II) biyobirikimi için kuadratik eşitliğe tam bir uyum gözlenmiştir.

CYY ile yapılan çalışmalar sonucunda pH 5.03, 31.82 °C ve 30.15 mg/L başlangıç değerleri için deneyler tasarlanmış, asit fosfataz aktivitesi 794.098 µmol/L-dak, mikroorganizma konsantrasyonu 3.2038 g/L ve biyosorplanan Zn(II) miktarı 17.62 mg/L olarak öngörülmüştür. Deney doğrulama deneyi yapılarak sonuçların duyarlılığı ve geçerliliği gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abdallah A.A, Magboul P., L.H. McSweeney. (1999). Department of food science and technology. food chemistry 6515-22 17 semptember 1998.
- Açıkel Ü., Ersan M., Sağ Açıkel Y. (2010). Optimization Of Critical Medium Components Using Response Surface Methodology For Lipase Production By *Rhizopus Delemar*. Food and Bioproducts Processing. 88, 31-39.
- Açıkel Ü., Ersan M. (2010). Acid phosphatase production by *Rhizopus delemar*: A role played in the Ni(II) bioaccumulation process. Journal of Hazardous Materials.184, 632-639.
- Acıkel Ü., Erşan M., Sağ Acıkel Y. (2011). The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. Turk J Biol. 35-44.
- Annadurai G., Lee D.J., Juang R.S., Chin J. (2000). Inst. Chem. Eng. 31-609.
- Bailey J. E., Ollis D. F. (1977). *Biochemical Engineering Fundamentals*: Mc Graw-Hill. USA. Pp: 3-13. 26-28. 50-67. 334-337.
- Baillargeon M.W., Bistline R.G., Sonnet P.E. (1989). Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30. 92-96.
- Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassl M. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*, second ed., Academic Press, Inc., New York
- Bayhan Y.K. (1996). Çapraz akış mikrofiltasyon sistemi kullanılarak *S. Cerevisia* ile endüstriyel atıksulardan ağır metal giderimi : Doktora Tezi. A.Ü. Fen Bilimleri Ens. Çevre Müh. Anabilim Dalı. Erzurum. s 1-3. 6-10.16.21.
- Beynon R.J. and Bond J.S. (1989). *Proteolytic enzymes*, Oxford University Press,Oxford. pp.15-25.
- Bingham E.W., Zittle C.A. (1963). Purification and properties of acid phosphatase in bovine milk. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Blum J. J. (1956). Observation of the acid phosphatases of *Euglena gracilis*. *J. Cell Biol.* 24:223-234.
- Brown P.a. Gill. S.A. and Allen. S.J. (2000). Metal removal from wastewater using peat. wat. Res.. vol. 34. no. 16. p 3907-3916.
- Chandan R.C., Shahani K.M. (1965). Role of sulfhydryl groups in the activity of milk lipase. *J. Dairy Sci.* 48 1413-1418.
- Çelebi B., (2005). *R. delemar* ile lipaz üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dharmsthitı S., Kuhasuntisuk B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 21. 75-80.
- Ekiz H., (1985). *Triasetinin candida cylindracea* lipazı ile hidrolizi ve n-nonan ve metil alkolün çözücü etkileri. Yüksek lisans tezi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Elazığ.
- Elıbol M., Ekiz H.İ., Çağlar M.A. (1997). The solvent effects of ethyl acetate on the hydrolysis of triacetin and tributyrin by a *Candidal lipase*. *Chimica Acta Turcica.* 25. 177-180.

- Erdal E. (2004). Enzimatik tepkimeye ait kinetik parametrelerin tek kesikli çalışmada Lambert W fonksiyonu kullanılarak bulunması. Yüksek lisans tezi. Hacettepe Üniversitesi. Ankara.
- Espinosa E., Sanchez S., Farres A. (1990). Nutritional Factors Affecting Lipase Production by *Rhizopus delemar* Cdbb-H313, *Biotechnol. Lett.* 12 (3) 209–214.
- Forouchi E., Gunn D.J. (1983). Some effects on metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotech. Bioeng.* 25.1905-1911.
- Fox P.F., Law J., McSweeney. P.L.H., Wallace J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In P.F. Fox (Ed). *Cheese chemistry. physics and microbiology* (vol. 1. pp. 389-438). London: Chapman and Hall.
- Freundlich, H. (1907). Ueber die adsorption in Loesungen. *Zeitschrift fr Physikalische Chemie*, 57A, 385-470.
- Gadd GM. (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46:834–40.
- Galabova D., Tuleva B., balasheva M. (1993). Phosphatase activity during growth of *Yarrowta lipolytica*. *FEMS Microbiology Letters* 109:45-8.
- Goldberg A., Takakura. K. ve Rosenthal R. (1966). Hastalığı Gaucher Asit Fosfataz İzoenzimler Serum Elektroforetik ayırmasının. *Prostat Kanseri ve Multipl Miyelom.* *Nature* 211. 41
- Gözükara E. (1997). *Biyokimya 2.* Nobel Tıp Kitapevleri. Pp: 575-580.
- Haas M.J., Cichowicz D.J., Bailey D.G. (1992). Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. *Lipids.* 27. 571-576.
- Hatzinikolaou, D.G., Macris, J.B., Christakopoulos, P., Kekos, D., Kolisis, F.N., Fountoukidis, G., 1996, Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*, *Biotech. Lett.*, 18, 547-552.
- Hecker M. Völker U. (2001). "General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria". *Adv Microb Physiol* 44: 35–91. doi:10.1016/S0065-2911(01) 44011-2. PMID 11407115.
- Horiuchi S. and Mizuno D. (1959). A possible negative feedback phenomenon controlling formation of alkaline phosphomono-esterase in *Escherichia coli*. *Nature (London)* 183:1529-1530
- <http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite03.pdf>
- <http://www.lenntech.com/periodic-chart.htm>
- <http://www.metindigrak.com/mikrobioloji/gelisme.htm>
- Huang Q., Shindo H. (2000). Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. *Soil Biol. Biochem.* 32 1885-1892.
- Izumi T. Nakamura K. Fukase T. (1990). Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas sp.* KWI-56. *Agric Biol Chem* 54: 1253-1258.
- İleri R. (2000). Çevre biyoteknolojisi. sakarya üniv.. Çevre mühendisliği bölümü. adapazarı. 1. Baskı. s 501. 504. 518-522.
- Jain P, Jain S, Gupta MN (2005) A microwave assisted microassay for lipase. *Anal Bioanal Chem*, 381:1480-1482.
- Kadukova J., Stofko M. (2007). Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions. in: M.A. Cato. (Ed). *Environmental Research Trends.* Nove Science Publishers Inc.. New York. pp. 133-152.
- Kannan N., Rajakumar A., Rengasamy G. (2004) “Optimisation of process parameters for surface methodology, *Environ. Technol.* 25(5), 513-522.
- Kargı F. (1993). Çevre mühendisliğinde biyoprosesler. D.E.Ü.. Mühendislik Fakültesi Yayınları. No: 234. İzmir.

- Kutsal T. (1995). Atık Sulardaki Ağır Metal İyonlarının Giderilmesinde Aljinat ve Aljinat-Mikroorganizma Sistemlerinin Dolgulu Kolon Reaktörlerde Kullanılması. TÜBİTAK. KTÇAG-63 no'lu Tez Raporu, Nisan.
- Labuschagne R.B., Tonder A.V. and Litthauer D. (1997). *Flavobacterium odoratum* lipase: isolation and characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 21 pp. 52–58.
- Lairon D, Nalbone G, Lofont H, Lebrordi J, Domingo N, Houton JC, Verger R. (1978). Possible roles of bile lipids and colipase in lipase adsorption. *Biochemistry*. Nov 28;17(24)5263-5269.
- Langmuir, L. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 38, 2221-2295.
- Larsen R.F., Parada J.L. (1988). Acid phosphatases in some cheese and starters. *Sciences des aliments*. 8. 285-294.
- Leborans G.F. and Novillo. A. (1996). "Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium *Olisthodiscus luteus* (Raphidophyceae) Wat. Res. 30. 57-62.
- Li C.Y., Cheng C.Y., Chen T.L. (2001). Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source, *Enzyme Microb. Technol.* 29 (4–5) 258–263.
- Lineweaver H and Burk. D. (1934). "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". *Journal of the American Chemical Society* 56: 658–666.
- Liebeton K., Zacharias A., Jaeger K.E. (2001). Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.* 183 597-603.
- Lindman, H.R. (1974), *Analysis of variance in complex experimental designs*. San Francisco: W. H. Freeman & Co.
- Macaskie L.E., Dean A.C.R. (1989). Microbial metabolism, desolubilization, and deposition of heavy metals: metal uptake by immobilized cells and application to the detoxification of liquid phases. in: A. Mizrahi (Ed). *Advances in Biotechnological Processes; Biological Waste Treatment*. Alan R. Liss Inc., New York. Vol: 12. pp. 159-201.
- Macaskie L.E., Wates J.M., Dean A.C.R. (1987). Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.* immobilized on gel and solid supports: applicability to the treatment of liquid wastes containing heavy metal cations. *Biotechnol. Bioeng.* 30 66-73.
- Matthews R.J, Goode S.R., Morgan S.L. (1981). *Anal. Chim. Acta* 133, 169.
- Nyc. J.F. (1967). A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27:183-188.
- Ohata T., Nakamura Y., Katayama T., Nakamachi E. (2003). Development of optimum process design system for sheet fabrication using response surface method. *Journal of Materials Processing Technology*. Volumes 143-144. 20 December Pages 667-672.
- Ozdemir S., Kilinc E., Poli A., Nicolaus B., Guven K. (2009). Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sp. decanicus and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. stromboliensis: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152 195-206.
- Pekin B. (1980). *Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)*. E. Ü. Kimya Fak. Yayınları. İzmir.
- Pekin B. (1983). *Biyokimya mühendisliği (Biyoteknoloji)*. 2. Kitap. E.Ü. Kim.Fak. Yayınları 4.. İzmir. 409.
- Sağ Y. (2001). Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: a review. *Separ. Purif. Methods* 30 1-48.
- Sağ Y. (2006) *Rhizopus delemar* ile lipaz üretimi. TÜBİTAK MAG Proje 282 104M011.
- Salleh A.B., Musani R., Basri M., Ampon K., Yunus W.M.Z., Razak C.N.A. (1993). Extracellular and intracellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and Factors Affecting Their Production, *Can. J. Microbiol.* 39 (10) 978–981.



- Schmidt G.G. Bartsch. M. C. Lamont. T. Herman. and M. Liss. (1963). Acid phosphatase of baker's yeast: an enzyme of the external cell surface. *Biochemistry*
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19. 627-662.
- Sharon C. Nakazato M. Ogawa HI et al. Lipase-induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21: 292-295. 1998.
- Shuler M.L. and Kargı F. (1992). *Bioprocess Engineering*. Prentice Hall. Englewood Cliffs. N.J.. USA. Pp: 10-58. 148-199.
- Shuler M.L. and Kargı. F. (2002). *Bioprocess Engineering*. 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall PTR. USA.
- Singer T. (1948). Sülfidril Reaktifler tarafından Enzim inhibisyonu Üzerinde Mekanizması *J. Biol. Chem.* 174. 11.
- Stauffer C.E. (1989). *Enzyme assays for food scientists* (2<sup>nd</sup> ed). New York: Van Nostrand Reinhold
- Tsekova K., Galabova D., Todorov K. and Ilieva S. (2002). Phosphatase activity and copper uptake during growth of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 37 pp. 753–758
- Tsekova K. and Galabova D. (2003). Phosphatase production and activity in copper(II) accumulating *Rhizopus delemar*. *Enzyme Microb. Technol.* 33 pp. 926–931.
- Tsezos M. and Volesky B. (1981). “Biosorption of Uranium and Thorium”. *Biotech. and Bioeng.* 23. 583-604.
- Veglio F., Beolchini F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44 301-316.
- Verjee Z. (1969) Isolation of Three Acid Phosphatases from Wheat GermEur. *J. Biochem.* 9. 439.
- Vieira R.H.S.F., Volesky B. (2000). Biosorption: a solution to pollution. *Internatl. Microbiol.* 3, 17-24.
- Vijayaraghavan K., Yun Y.-S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* 26 266-291.
- Volesky B. (2001). Detoxification of metal bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59 203-216.
- Volesky B. (2008). Biosorption and me. *Water Res.* 21 55-60.
- Yan L. Y., He X. J., Hu Y. (2000). Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 523–529.
- Wang J., Chen C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol. Adv.* 24 427-451.
- Wang J., Chen C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27 195-226.
- Wang D. Li, B., Tan T. (2006). Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* lipase by feeding oleic acid, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 43 (1–4) 40–43.
- Wang D, Xu Y, Shan T. (2008). Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal* 41 30–37.
- Waymack. P.P. and Van Etten. R.L. (1991). Isolation and characterization of a homogeneous isoenzyme of wheat germ acid phosphatase. *Archives of biochemistry and biophysics.* 288. 621-633.
- Whiteley C.G., Lee D.J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme Microb. Tech.* 38 291-316.
- Wonderwülbecke T., Kieslich K., Erdman H. (1992). Comparison of lipases by different assays. *Enzyme and Microbial Technology.* 14. 631-639.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Mehtap ERŞAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 02/01/1979
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 581401-Sivas
E-posta Adresi	mersan@cumhuriyet.edu.tr

### Eğitim ve Akademik Durum

Lise	Sivas Lisesi, 1995
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 1999
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2002
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi, 2010

### İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi	Araştırma Görevlisi, 2000
-------------------------	---------------------------

## **EKLER**

### **EK 1 Sakkaroz Derişiminin Tayini**

Besin ortamdaki melas sakkarozunun derişimi sakkarozun dinitro salisilik asit ile yaptığı koyu turuncu renkli kompleks yardımı ile tayin edilir (Miller yöntemi). Bu yöntemde kullanılan analiz çözeltileri, hazırlama şekilleri ve analiz yöntemi aşağıda verilmiştir.

Analiz Çözeltileri:

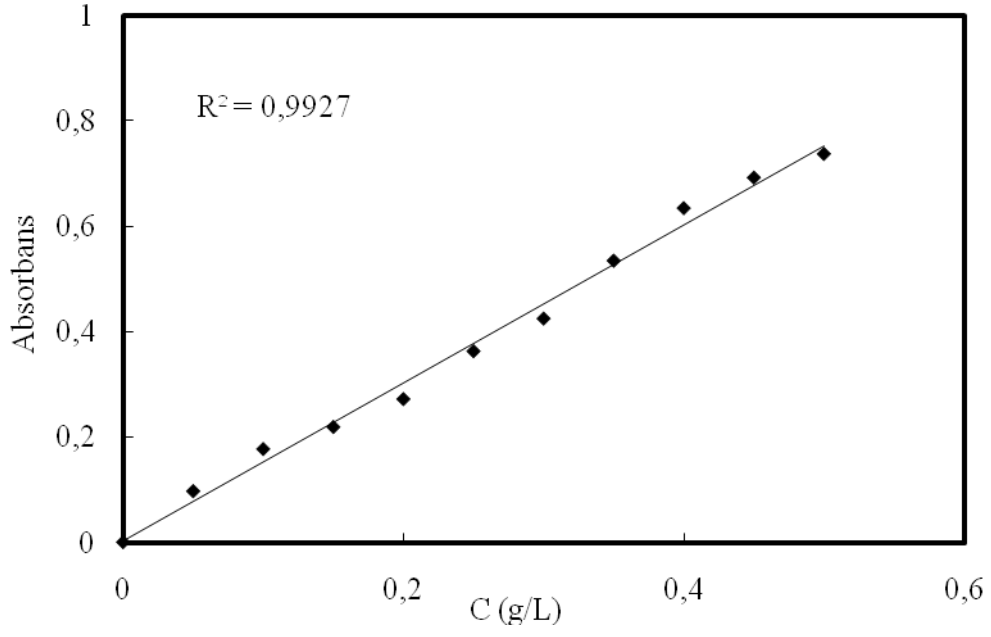
a-DNS Çözeltisi: 10 g dinitro salisilik asit, 10 g sodyum hidroksit ve 1.6 g fenol 1 L damıtık suda çözülür (Bu çözeltiyi kullanmadan hemen önce 100 mL'sine 1 ml %10'luk sodyum sülfid ilave edilir.

b-Rochella Tuzu Çözeltisi: 400 g potasyum sodyum tartarat 1 L damıtık suda çözülür.

c-Sodyum sülfid çözeltisi: 1 g sodyum sülfid 100 mL damıtık suda çözülür.

### **Yöntem**

Besin ortamından alınan örnek santrifüjlenerek mikroorganizmadan ayrılır. Çözelti içerisindeki şeker derişimi 0-0.5 g/L aralında olacak şekilde seyreltilir. Seyreltilen çözeltilerden alınan 2 ml örnek bir deney tüpüne konur ve üzerine 2 mL DNS çözeltisi eklenerek kaynar suda 15 dk bekletilir. Kaynar su banyosundan alınan örneğin üzerine 1 mL Rochella tuzu çözeltisi konularak musluk suyunda soğutulur. Üzerine 5 mL damıtık su ilave edilerek 575 nm'de absorbansı ölçülür (Forouchi ve Gunn, 1983).



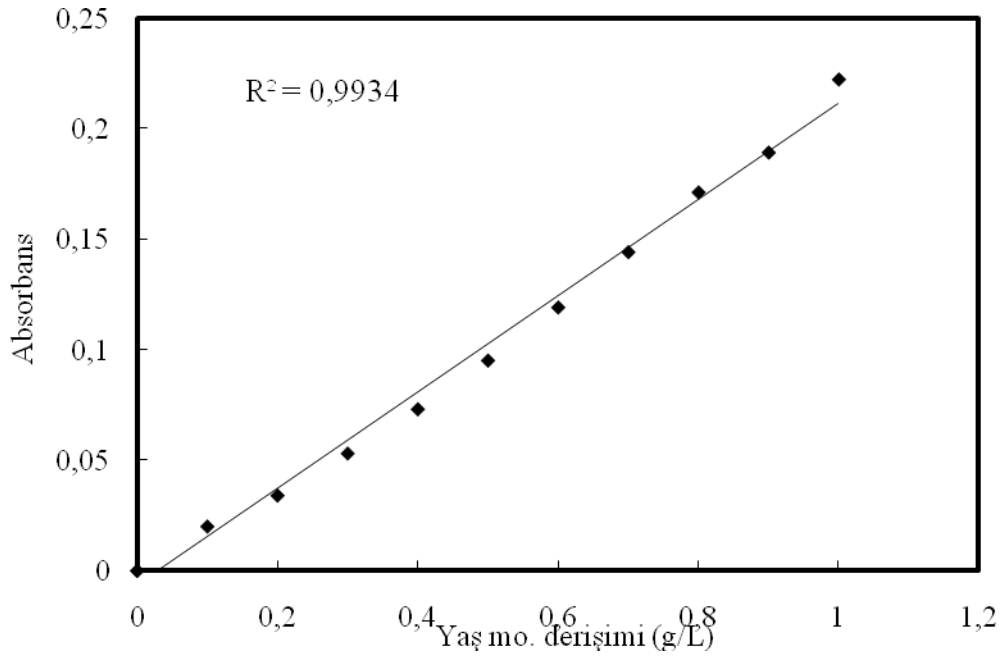
#### A.1 Sakkaroz çalışma doğrusu

$$\text{Absorbans değeri} = a \cdot C_{\text{glukoz}} + b$$

$$C_{\text{sakkaroz}} = (\text{Absorbans değeri} - b) / a$$

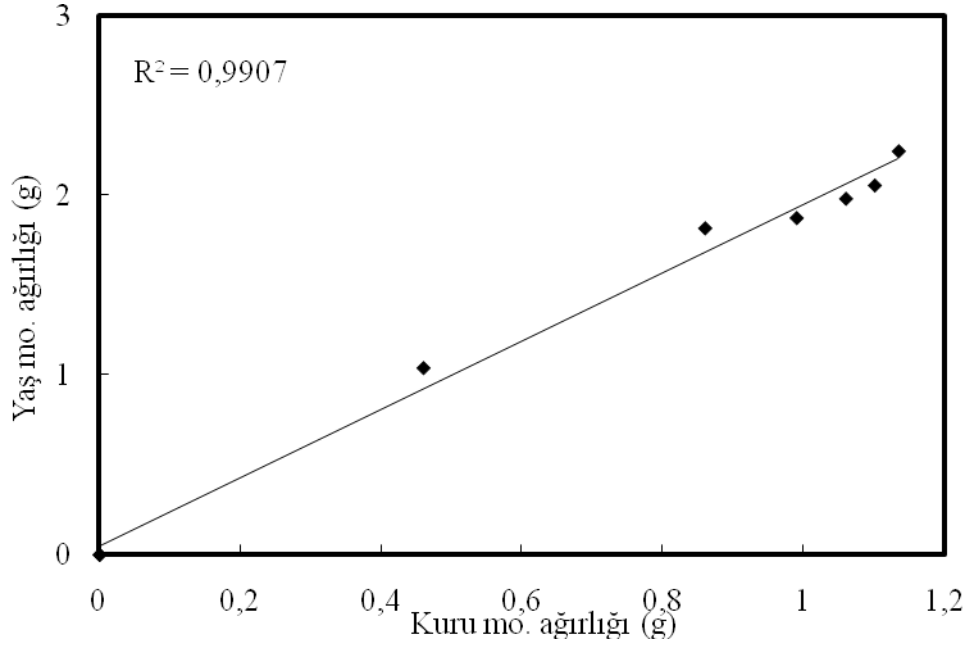
## Ek 2 Biyokütle Derişimi Tayini

Mikroorganizma derişimi spektrofotometrik olarak da tayin edilmiştir. Bunun için öncelikle 1 g/L'ye kadar farklı derişimlerde mikroorganizma içeren çözeltilerin. uygun dalga boyu olarak seçilen 360 nm' de absorbanslarının okunmasıyla *R. delemar* için yaş mikroorganizma çalışma doğruları oluşturulmuştur.



### B.1 Yaş mikroorganizma derişimi çalışma doğrusu

Verilerin değerlendirilmesinde kuru mikroorganizma ağırlığı kullanıldığından. yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek gerekmektedir. Bunun için mikroorganizma sıvı ortamda üretilip santrifüjlenerek ayrılmış, ayrılan mikroorganizmalar farklı ağırlıklarda tartılarak 50°C'deki etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Kuru ağırlığa karşı yaş mikroorganizma ağırlığı grafiğe geçirilerek *R. delemar* mantarı için yaş-kuru mikroorganizma çalışma doğruları elde edilmiştir.



## B.2 Yaş mikroorganizma ağırlığı kuru mikroorganizma ağırlığı çalışma doğrusu

Analiz için besin ortamından alınan belirli hacimdeki örnek 5000 devirde 10 dk santrifüjlenmiş. tüpte kalan mikroorganizma kütlesi saf su ile tekrar aynı hacme seyreltilerek 360 nm'de kör çözeltiye karşı absorbans okunmuş ve çalışma doğruları kullanılarak kuru mikroorganizma ağırlığı saptanmıştır.

### Ek 3 Lipaz Aktivitesi Tayin Yöntemi

p-NPP ve propan-2-ol içeren A çözeltisi ile triton x-100 ve arap zamkı içeren pH' ı 8' e ayarlanmış B çözeltisi yavaşça birbirine karıştırılır ve bir süre beklenir. Daha sonra karışımın pH değeri tris tamponu aracılığı ile 8.5 değerine ayarlanır. Diğer taraftan enzim aktivitesi tayin edilecek fermentasyon ortamından örnek alınarak mavi band süzgeç kağıdında filtre edildikten sonra. gelebilecek safsızlıkları önlemek amacı ile 5000 devir/dak' da 5 dakika süre ile santrifüjlenir. Enzim aktivitesi tayin edilecek örnek çözelti. A ve B çözeltisi karışımına eklenerek. reaksiyon 37 °C' de 150 devir/dak karıştırma hızında. sıcak su banyosunda karıştırılarak 30 dakika süre ile gerçekleştirilir. Reaksiyon ortamından alınan örneklerin absorbansı 410 nm' de okunur. 1 U lipaz aktivitesi 37 °C' de, 1 dakikada açığa çıkan 1 µmol p-nitrophenol olarak ifade edilir (Wonderwülbecke vd., 1992, Jain vd., 2005).

Hesaplamalar:

Lipaz enzimi için molar tükenme katsayısı  $e = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Zamanla pNP konsantrasyonundaki değişim

$$\frac{dc}{dt} (\text{mM} / \text{dak}) = \frac{(da / dt) / \text{dak}}{e(\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm})}$$

Bir enzim birimi (Units), belirli bir pH ve sıcaklıkta dakikada 1 mmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlandığından

Küvetteki enzim birimi (mmol/dak)

$$U = \frac{dc}{dt} (\text{mM} / \text{dak}) (\text{küvetteki hacim})(L)$$

Bu değer küvetteki enzimin hacmine bölünerek küvetteki enzimin mL' si başına enzim birimine dönüştürülür.

$$(U/ml) = \text{küvetteki enzim birimi (mmol/dak veya U) / Küvetteki enzim hacmi (mL)}$$

#### Ek 4. Asit Fosfataz Aktivitesi Tayini

Enzim aktivitesi ölçümü için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Fosfataz aktivitesi için substrat olarak p-nitrofenil fosfat kullanılmıştır. Substrat çözeltisi 0.5 mL A çözeltisinin (90 mM sitrat pH 4.8. 37 °C), 0.5 mL B (15.2 mM p-nitrofenil fosfat) çözeltisine eklenmesi ve karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Kör çözeltisi için aynı reaksiyon karışımı kullanılmış fakat enzim çözeltisi bu aşamada eklenmemiştir. Reaksiyon çözeltisinin sıcaklığı 37 °C 'ye ayarlanmış ve 0.10 mL enzim çözeltisi eklenerek 10 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra 4.0 mL NaOH eklenmiş. kör deneme için enzim çözeltisinden 0.1 mL alınarak kör çözeltisine eklenmiştir. p-nitrofenol aktivitesi 410 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bir ünite fosfataz aktivitesi 1 µmol p-nitrofenolün bir dakikada pH 4.8 ve 37 °C sıcaklıkta belirlenen enzim miktarıdır (Bergmeyer vd., 1974).

Hesaplamalar:

$$\mu\text{mol/L-dak} = (A_{410\text{nm}} \text{ test} - A_{410\text{nm}} \text{ kör})(V_T)(d_f) / (t)(e)(V_e)$$

$V_T$  : Çözeltinin toplam hacmi (mL)

$d_f$  : Seyrelme faktörü

$t$  : Birim dakika başına dakika olarak analiz süresi

$e$  : 410 nm' de p-nitrofenolün milimolar tükenme katsayısı

$V_e$ : mL olarak kullanılan enzim hacmi



## EK 5 Design Expert Paket Programna Uyum

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

**Response 2 Enzim aktivitesi**

### ANOVA for Response Surface Linear Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	2.628E+005	3	87599.58	55.46	< 0.0001
A-pH	52591.73	1	52591.73	33.30	< 0.0001
B-T	7602.68	1	7602.68	4.81	0.0470
C-Cb	2.026E+005	1	2.026E+005	128.28	< 0.0001
Residual	20531.86	13	1579.37		
Lack of Fit	18423.91	9	2047.10	3.88	0.1021
Pure Error	2107.95	4	526.99		
Cor Total	2.833E+005	16			

The Model F-value of 55.46 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, C are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy),

model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 3.88 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure

error. There is a 10.21% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due

to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Std. Dev.	39.74	R-Squared	0.9275
Mean	757.73	Adj R-Squared	0.9108
C.V. %	5.24	Pred R-Squared	0.8564
PRESS	40677.89	Adeq Precision	24.922

The "Pred R-Squared" of 0.8564 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9108.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your

ratio of 24.922 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

<b>Factor</b>	<b>Coefficient Estimate</b>	<b>df</b>	<b>Standard Error</b>	<b>95% CI Low</b>	<b>95% High</b>
Intercept	757.73	1	9.64	736.90	778.55
A-pH	81.08	1	14.0	550.73	111.43
B-T3	0.83	1	14.05	0.47	61.18
C-Cb	-159.14	1	14.05	-189.49	-128.79

**Final Equation in Terms of Coded Factors:**

$$\begin{aligned} \text{Enzim aktivitesi} &= \\ &+757.73 \\ &+81.08 \quad * A \\ &+30.83 \quad * B \\ &-159.14 \quad * C \end{aligned}$$

**Final Equation in Terms of Actual Factors:**

$$\begin{aligned} \text{Enzim aktivitesi} &= \\ &+311.97848 \\ &+108.10667 \quad * \text{pH} \\ &+5.60500 \quad * T \\ &-7.95700 \quad * Cb \end{aligned}$$

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node. In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:  
 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.

- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

**Response 3 Mikroorganizma konsantrasyonu**

**ANOVA for Response Surface Quadratic Model**

**Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]**

Sum of	Mean	F	p-value		
Source	Squares	df	Square	Value	Prob >
<b>F</b>					
Model	3.20	9	0.36	273.75	< 0.0001
<i>A-pH0.018</i>	1	0.018	13.90	0.0074	
<i>B-T0.85</i>	1	0.85	655.81	< 0.0001	
<i>C-Cb1.27</i>	1	1.27	979.67	< 0.0001	
<i>AB0.020</i>	1	0.020	15.10	0.0060	
<i>AC0.18</i>	1	0.18	135.86	< 0.0001	
<i>BC0.23</i>	1	0.23	173.77	< 0.0001	
<i>A<sup>2</sup>0.057</i>	1	0.057	43.62	0.0003	
<i>B<sup>2</sup>0.11</i>	1	0.11	81.45	< 0.0001	
<i>C<sup>2</sup>0.51</i>	1	0.51	389.39	< 0.0001	
Residual	9.089E-003	7	1.298E-003		
<i>Lack of Fit</i>	9.750E-004	3	3.250E-004	0.16	0.9178
<i>Pure Error</i>	8.114E-003	4	2.028E-003		
Cor Total	3.21	16			

The Model F-value of 273.75 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C, AB, AC, BC, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 0.16 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 91.78% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Std. Dev.	0.036	R-Squared	0.9972
Mean	3.05	Adj R-Squared	0.9935
C.V. %	1.18	Pred R-Squared	0.9912
PRESS	0.028	Adeq Precision	56.674

The "Pred R-Squared" of 0.9912 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9935.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 56.674 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Coefficient Factor	Estimate	Standard df	95% CI		High
			Error	Low	
Intercept	3.08	1	0.016	3.04	3.12
A-pH0.048	1	0.013	0.017	0.078	1.00
B-T0.33	1	0.013	0.30	0.36	1.00
C-Cb-0.40	1	0.013	-0.43	-0.37	1.00
AB0.070	1	0.018	0.027	0.11	1.00
AC-0.21	1	0.018	-0.25	-0.17	1.00
BC-0.24	1	0.018	-0.28	-0.19	1.00
A <sup>2</sup> 0.12	1	0.018	0.074	0.16	1.01
B <sup>2</sup> 0.16	1	0.018	0.12	0.20	1.01
C <sup>2</sup> -0.35	1	0.018	-0.39	-0.30	1.01

#### Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 &\text{Mikroorganizma konsantrasyonu=} \\
 &+3.08 \\
 &+0.048 \quad * A \\
 &+0.33 \quad * B \\
 &-0.40 \quad * C \\
 &+0.070 \quad * A * B \\
 &-0.21 \quad * A * C \\
 &-0.24 \quad * B * C \\
 &+0.12 \quad * A^2 \\
 &+0.16 \quad * B^2 \\
 &-0.35 \quad * C^2
 \end{aligned}$$

#### Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 &\text{Mikroorganizma konsantrasyonu =} \\
 &+8.80255 \\
 &-1.99302 \quad * \text{pH} \\
 &-0.27609 \quad * T \\
 &+0.16439 \quad * Cb \\
 &+0.016970 \quad * \text{pH} * T \\
 &-0.014000 \quad * \text{pH} * Cb \\
 &-2.15909\text{E-}003 \quad * T * Cb \\
 &+0.20619 \quad * \text{pH}^2 \\
 &+5.23901\text{E-}003 \quad * T^2 \\
 &-8.66300\text{E-}004 \quad * Cb^2
 \end{aligned}$$

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node. In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.

**Response 1 Metal biyobirikimi**  
**ANOVA for Response Surface Quadratic Model**

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	1152.72	9	128.08	4008.86	< 0.0001	
A-pH0.49		1	0.49	15.34	0.0058	
B-T117.12		1	117.12	3665.86	< 0.0001	
C-Cb1010.93		1	1010.93	31641.57	< 0.0001	
AB0.32		1	0.32	9.99	0.0159	
AC0.25		1	0.25	7.67	0.0277	
BC23.52		1	23.52	736.24	< 0.0001	
A <sup>2</sup> 3.800E-004		1	3.800E-004	0.012	0.9162	
B <sup>2</sup> 0.097		1	0.097	3.04	0.1245	
C <sup>2</sup> 7.116E-004		1	7.116E-004	0.022	0.8856	
Residual		0.22	7	0.032		
Lack of Fit		0.14	3	0.046	2.15	0.2362
Pure Error		0.086	4	0.021		
Cor Total	1152.95		16			

The Model F-value of 4008.86 implies the model is significant. There is only a 0.01% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A, B, C, AB, AC, BC are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy),

model reduction may improve your model.

The "Lack of Fit F-value" of 2.15 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure

error. There is a 23.62% chance that a "Lack of Fit F-value" this large could occur due

to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

Std. Dev.	0.18	R-Squared	0.9998
Mean	16.62	Adj R-Squared	0.9996
C.V. %	1.08	Pred R-Squared	0.9980
PRESS	2.34	Adeq Precision	219.819

The "Pred R-Squared" of 0.9980 is in reasonable agreement with the "Adj R-Squared" of 0.9996.

"Adeq Precision" measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your

ratio of 219.819 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the

design space.

Factor	Coefficient	Standard Estimate	df	95% CI	95% CI	High
				Error	Low	
Intercept		16.69	1	0.080	16.50	16.88
A-pH-0.25		1	0.063	-0.40	-0.098	1.00
B-T3.83		1	0.063	3.68	3.98	1.00
C-Cb11.24		1	0.063	11.09	11.39	1.00
AB0.28		1	0.089	0.071	0.49	1.00
AC0.25		1	0.089	0.036	0.46	1.00
BC2.42		1	0.089	2.21	2.64	1.00
A <sup>2</sup> -9.500E-003		1	0.087	-0.22	0.20	1.01
B <sup>2</sup> -0.15		1	0.087	-0.36	0.054	1.01
C <sup>2</sup> 0.013		1	0.087	-0.19	0.22	1.01

### Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Metal biyobirikimi} &= \\
 &+16.69 \\
 &-0.25 * A \\
 &+3.83 * B \\
 &+11.24 * C \\
 &+0.28 * A * B \\
 &+0.25 * A * C \\
 &+2.42 * B * C \\
 &-9.500E-003 * A^2 \\
 &-0.15 * B^2 \\
 &+0.013 * C^2
 \end{aligned}$$

### Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Metal biyobirikimi} &= \\
 &+7.59979 \\
 &-2.75334 * \text{pH} \\
 &+0.015528 * T \\
 &-0.19065 * Cb \\
 &+0.068485 * \text{pH} * T \\
 &+0.016500 * \text{pH} * Cb \\
 &+0.022045 * T * Cb \\
 &-0.016889 * \text{pH}^2 \\
 &-5.02479E-003 * T^2 \\
 &+3.25000E-005 * Cb^2
 \end{aligned}$$

The Diagnostics Case Statistics Report has been moved to the Diagnostics Node. In the Diagnostics Node, Select Case Statistics from the View Menu.

Proceed to Diagnostic Plots (the next icon in progression). Be sure to look at the:

- 1) Normal probability plot of the studentized residuals to check for normality of residuals.
- 2) Studentized residuals versus predicted values to check for constant error.
- 3) Externally Studentized Residuals to look for outliers, i.e., influential values.
- 4) Box-Cox plot for power transformations.

If all the model statistics and diagnostic plots are OK, finish up with the Model Graphs icon.