

T. C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**LACTOBASİLLUS BREVIS MİKROORGANİZMASININ ÇOĞALMA
KİNETİĞİNİN CYY (CEVAP YÜZEYİ YÖNTEMİ) İLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Aybek YİĞİT
DANIŞMAN: Prof. Dr. Nahit AKTAŞ

VAN-2014

T. C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**LACTOBASİLLUS BREVIS MİKROORGANİZMASININ ÇOĞALMA
KİNETİĞİNİN CYY (CEVAP YÜZEYİ YÖNEMİ) İLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Aybek YİĞİT

Bu çalışmayı 2013-FBE-YL-031 no'lu proje ile destekleyen Yüzüncü Yıl
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

VAN-2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Anabilim Dalı Fizikokimya Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Nahit AKTAŞ danışmanlığında, Aybek YİĞİT tarafından hazırlanan “Lactobasillus Brevis mikroorganizmasının çoğalma kinetiğinin CYY (cevap yüzeyi yöntemi) ile incelenmesi” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 08/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Nahit AKTAŞ (Danışman)

İmza:

Üye: Yard.Doç.Dr.Şenol KUBİLAY

İmza:

Üye:Yard.Doç.Dr.TekinŞAHAN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nunTarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

LACTOBASİLLUS BREVIS MİKROORGANİZMASININ ÇOĞALMA KİNETİĞİNİN CYY (CEVAP YÜZEYİ YÖNTEMİ) İLE İNCELENMESİ

AYBEK, Yiğit

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nahit AKTAŞ

Ocak 2014, 51 sayfa

Bu çalışmanın amacı; gelişen teknolojiyle beraber endüstride iyi tanınan bakteri kültürlerinden Lactobacillus Brevis' in çoğalma koşullarını Cevap Yüzey Yöntemi (Design Expert 8.0.7.1 deneme sürümü) kullanarak optimize etmek ve çoğalma kinetiklerini araştırıp gözlemlemektir. Tezin kapsamı 2 bölümden oluşmaktadır.

Birinci bölümde; uygun mikroorganizma ve bu mikroorganizmanın büyüme ortamları belirlenmiştir. Ayrıca çoğalma hızını etkileyen en önemli parametreler; pH, sıcaklık (°C) ve Cd iyonu derişimi (mg/L) olarak alınmış ve bu parametrelerin uygun aralıkları tespit edilmiştir.

İkinci bölümde; cevap yüzey yöntemi içindeki merkezi kompozit tasarım ile özgül çoğalma hızı yanıt olarak alınarak yukarıda bahsedilen parametrelerin optimizasyonu çalışılmış ve Lactobacillus Brevis için en iyi özgün çoğalma hızı koşulları pH 5.72, sıcaklık 33.01°C ve Cd derişimi ise 34.01 mg/L olarak bulunmuştur. Bu optimum koşullar altında maksimum özgül çoğalma hızı 0.0797 1/saat olarak model eşitliğinden hesaplanmıştır. Ayrıca bu sonuç deneylerle doğrulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Cevap Yüzey Yöntemi, Lactobasillus Brevis, Merkezi Kompozit Tasarım, Optimizasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GROWTH KINETICS OF LACTOBACILLUS BREVIS MICROORGANISM BY RSM (RESPONSE SURFACE METHODOLOGY)

AYBEK, Yigit

Master Thesis, Department of Chemistry

Thesis Advisor: Prof. Dr. Nahit AKTAŞ

January 2014, 51 pages

Aim of this study is; to optimize the growth conditions of Lactobacillus Brevis a well-known bacteria culture together with developing technology in the industry by using Response Surface Methodology (Design Expert 8.0.7.1 trial version) and observe of growth kinetics. The scope of the thesis consists of two sections.

In the first part, a suitable microorganism and growth medium of it was determined. Also, the most important parameters influencing the growth rate were taken as pH, temperature (°C) and Cd ion concentration (mg/L) and the appropriate ranges of them were determined.

In the second part, the specific growth rate taken as response using central composite design within response surface methodology optimization of the parameters mentioned above have been studied and the best specific growth rate conditions of lactobacillus brevis were determined as pH 5.72, temperature 33.01 °C and Cd concentration 34.01 mg/L, respectively. Under these optimum conditions, the maximum specific growth rate was calculated to be 0.0797 hour⁻¹ from the model equation. Furthermore, these results were confirmed by experiments.

Key words: Response Surface Methodology, Lactobacillus brevis, Central Composite Design, Optimization

ÖN SÖZ

Çalışmalarım boyunca her türlü desteği ve imkânı sağlayarak beni motive eden, bilgi ve önerilerinden faydalandığım ve bundan sonraki yaşantımda da bilgisine her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Nahit AKTAŞ'a; her konuda bilgi ve engin tecrübelerini benden esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarım için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, yardımları ve katkılarıyla beni yönlendiren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Tekin ŞAHAN'a;

Tezimin her aşamasında bana yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Dilara ÖZTÜRK'e;

Bilgi ve fikirlerine danıştığım, beni daima destekleyen arkadaşlarım, Uzman Erhan ÖZTÜRK , Uzman Pınar ILGIN'a ;

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yanımda olan, laboratuvar çalışmalarımda beni geç saatlere kadar bekleyen, sonsuz sabır ve desteği için biricik annem Atiye YİĞİT'e; eğitimim için teşvik ve takdirleriyle daima yanımda olan, hiçbir konuda fedakârlıktan kaçınmayarak bugünlere gelmemi sağlayan, her türlü sevincimi ve sıkıntımı benimle paylaşarak hayatımı anlamlı kılan değerli rahmetli babam'a ve canım aileme teşekkürler.

Çalışmalarım da hiçbir cihazı benden esirgemeyen merkezi laboratuvar çalışanlarına ve müdürlüğüne sonsuz teşekkürler.

Bu çalışmayı 2013-FBE-YL-031 no'lu proje ile destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Aybek YİĞİT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
EKLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Virüsler	1
1.2. Mantarlar	2
1.3. Protozoalar	2
1.4. Bakteri	3
1.4.1. Bakterilerin metabolizması	4
1.4.2. Bakterilerde büyüme ve üreme	6
1.4.3. Teknoloji ve endüstrideki önemi	7
1.4.4. Bakteri çeşitleri	9
1.4.5. Lactobasilluslar	9
1.4.6. Lactobacillus brevis	10
1.4.7. Lactobacillus brevisin hücre yapısı ve metabolizması	11
1.5. Mikroorganizmalar için genel çoğalma eğrisi	11
1.6. Metabolik Sitokiyometri	13
1.7. Mikroorganizma Çoğalma Kinetiği	14
1.8. Deney Sistemlerinin Optimizasyonu ve Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)	16
1.8.1. Deneysel verilerden matematiksel model geliştirme	17
2. KAYNAK BİLDİRİŞLER	20

3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler	25
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	26
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Liyofilize ortamdaki bakterilerin canlandırılması	27
3.2.2. Aşı Ortamının Hazırlanması	28
3.2.3. Bakterilerin optimum çoğalma şartlarının belirlenmesi	28
3.2.4. Bakteri için Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması	29
3.3. Deneysel Dizayn ve Optimizasyon	31
3.3.1. Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)	31
3.3.2. Sonuçların Optimizasyonu	33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Özgül Çoğalma Koşullarının Optimizasyonu	35
4.1.1. MKT deneyleri ve sonuçları	35
4.1.2. Sonuçların optimizasyonu	40
5. GENEL SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR	42
EKLER	47
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Lactobacillus Brevis mikroskobik görüntüsü	10
Şekil 1.2. Mikroorganizma çoğalma eğrisi	11
Şekil 3.1. Konsantrasyon-absorbans kalibrasyon grafiği	29
Şekil 3.2. Biokütle konsantrasyonu ölçümlerinde kullanılan	
Şekil 4.1. Kuru mikroorganizma yoğunluğuna karşılık zaman grafiği (a) ve $\ln x/x_0$ 'a karşılık zaman grafiği (b).	36
Şekil 4.2. Teorik olarak hesaplanan değerlere karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı	38
Şekil 4.3. Sabit pH değerinde (5.50) Cd iyonunun ve sıcaklığın özgül çoğalma hızına etkisi	38
Şekil 4.4. Sabit Cd(II) konsantrasyonunda (35 mg/L) sıcaklığın ve pH' nın özgül çoğalma hızına etkisi	39
Şekil 4.5. Sabit sıcaklık değerinde (32.5 °C) Cd(II) iyonunu ve sıcaklığın özgül çoğalma hızına etkisi	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Bakteri metabolizmasında beslenme tipleri	5
Çizelge 3.1. Bakterilerin canlandırılmasında kullanılan ortamın bileşimi	26
Çizelge 3.2. Aşı ortamının bileşimi	27
Çizelge 3.3. Katı besiyeri ortamı bileşimi	27
Çizelge 3.4. Bakterilerin çoğalması için besi ortamı	28
Çizelge 3.5. MKT için değişkenlerin kodlu ve kodsuz değerleri	31
Çizelge 3.6. MKT için önerilen deney programı	32
Çizelge 4.1. MKT için önerilen deney programı	34
Çizelge 4.2. MKT için regresyon analiz sonuçları	35

EKLER DİZİNİ

	Sayfa
EK1 Merkezi Kompozit Tasarım İstatistiksel Verileri	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece sıcaklığı
L	Litre
ml	Mililitre
mg	Miligram
g	Gram
C_0	Başlangıç konsantrasyonu
mmol	Milimol
dak	Dakika
nm	Nanometre
%	Yüzde
N	Deney sayısı
n°	Merkezdeki deney sayısı
R	İdeal gaz sabiti (J/mol.K)
R^2	Regresyon kararlılık indeksi
X	Kodlu değişken
β_i	Regresyon katsayısı
ζ_i	Bağımsız değişken
ε	Deneysel hata
DF	Serbestlik derecesi
S	Substrat konsantrasyonu (mg/l veya g/l)U
U	Substrat tüketim hızı (mg.k/h)
X	Kuru mikroorganizma konsantrasyonu (1/hacim)
μ	Özgül çoğalma hızı (1/sa)
T	Mutlak sıcaklık (K)
μL	Mikro litre
mm	Milimetre

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
ATP	Adenozin trifosfat
PKD	Plastik Katı Destekler
PCS	Plastik Kompozit Destekler
PAS	Peynir Altı Suyu
UV-VIS	Ultraviolet-Visible Spectrophotometry
PDA	Patates Dekstroz Agar
NRRL	Northem Region Research Laboratory
ppm	Part Per Milion (Milyonda Bir)
rpm	Rotation Per Minute (Dakikada Dönme)
CYY	Cevap Yüzeyi Yöntemi
FFD	Fractional Factorial Design
PBD	Plackett-Burman Design
SA	Steepest Ascent
MKT	Merkezi Kompozit Tasarım
RSM	Response Surface Methodology
WHO	World Health Organization

1. GİRİŞ

Artan insan nüfusu ve hızla gelişen sanayi beraberinde teknolojik alanda da hızlı bir araştırmayı olağan hale getirmiştir. Özellikle sanayiye öncülük eden biyoteknolojideki ilerlemeler canlı mikroorganizmaları ve fonksiyonlarını daha iyi anlama ve mikroorganizmaları teknolojinin hizmetine sunma yönünde bir adım kazandırmıştır. Son zamanlarda biyoteknolojik alanlarda yapılan çalışmalar mikroorganizmaların kullanımıyla günümüz ihtiyaçlarının karşılanması üzerine yoğunlaşmıştır.

Mikroskop yardımıyla görülebilen, çoğunlukla tek hücreli, basit yapıdaki organizmalara mikroorganizma denir. Mikroorganizmalar, bazı yüksek organizmalar da görülmeyen bazı ortak özellikleri ile birbirine benzeyen ilkel yapıları canlılardır (Özçelik, 1996). Bu tek hücreli canlıları 4 grup altında incelemek mümkündür. Bunlar; virüsler, mantarlar, protozoalardır, bakterilerdir.

1.1. Virüsler

Virüsler temel yapı taşlarının az miktarının kompleks bir yapı oluşturmalarından meydana gelen basit yapıda mikroorganizmalardır. Canlı ve cansız özellik gösterebilen organizmalardır. Canlılık özelliği üreyebilmesi, cansızlık özelliği ise içine yerleşip onu üreme amacıyla kullanacağı bir hücre bulamadığı zaman kristal bir yapıya dönüşmeleridir. Virüsler tek tip nükleik asit içeren ve boyutları 20 ile 300 nanometre arasında değişebilen organizmalardır. Virüsler de DNA ve RNA'dan yalnızca birisi bulunurken, prion yapılarında hiç nükleik asit bulunmamaktadır (Anonim, 2010).

Nükleik asidi koruyan kapsid adı verilen protein yapısında kılıfları vardır. Kapsid, virüsü tanımlamada önemli olan kapsomer adı verilen daha küçük ünitelerden oluşmuştur. Ayrıca kapsidin nükleik asidi koruma, hücre dışında yaşama ve yeni hücrelere virüsün girmesini sağlama gibi özellikleri vardır. Kapsomerleri oluşturan yapı üniteleri helikal simetri, kübik simetri veya kompleks yapı gibi belirli bir simetri içerisinde bulunurlar. Virüslerde proteinler; kapsidde, glikoproteinler; zarf yapılarında yer alırlar ve virüslere değişik özellikler sağlarlar. Lipidler, virüslerin zarf kısmında yer alırlar ve buldukları virüsler etere duyarlı özellik taşırlar (Unate, 1985).

1.2. Mantarlar

Bulduğumuz çevrede sıklıkla karşımıza çıkan mantarlar aşağı yukarı 100.000 civarında türe sahiptir. Mantarlar (funguslar) ökaryotik hücre yapısında protistalardır. Mantarlar klorofilsiz, fotosentez yapmayan, absorpsiyonla beslenen genellikle tek hücreli bazen de çok hücreli canlılardır. Mantar hücreleri etrafında iyi gelişmiş bir hücre çeperi yer alır. Hücre çeperi yapısı kitin, selüloz veya her ikisini karışımından oluşabilir (Öner,1992). Mantarlar görünüm olarak iki çeşit görünüme sahiptirler. Bazıları ipliğimsi bir görünüme sahip olan küf mantarlarıdır. Diğerleri ise maya kokusunda ve krem kıvamındadır ki bunlara maya mantarları denir. Örneğin bozulmuş meyve ve sebzeler, ekme gibi gıda maddelerinin üzerinde sıklıkla küf mantarlarını görebiliriz. Mantarların ürettiği veya mantarlardan elde edilen vitaminler, anti mikrobik maddeler ve bazı ilaçlar vardır.

Mantarlarının vejetatif formları hif adı verilen ipliksi yapılardan oluşur. Hifler çok çeşitli mikroskopik görünümde olabilirler. Hiflerin dallanması, birbirine sarılması ve bazen de birleşmesi ile oluşan yapıya misel, vejetatif yapının tümüne birden tallus adı verilir. Mikroskopik özelliklerinden dolayı türün tanımlanmasında bundan yararlanır. Miseller çevre koşulları uygun olduğunda sporları oluştururlar. Olgunlaşan sporlar, uygun çevre koşullarında kendi türlerine özel mantarlar oluştururlar. Sporlar eşeyli ve eşeysiz olmak üzere ikiye ayrılırlar. Eşeyli (seksüel) sporlar; zigospor, bir kese içerisinde askospor ve basidium içerisinde basidio sporlardır. Eşeysiz (seksüel olmayan) sporlar hifler üzerinde tomurcuklanarak oluşan blastosporlar, çeperi kalınlaşıp, protoplazması yoğunlaşan hücrelerden klamidosporlar ve hiflerin sepyalara bölünmesiyle oluşan artrosporlardır (Aksit ve ark., 1996).

1.3. Protozoalar

Protozoalar toprakta, tatlı ve tuzlu suda yaşayabilen tek ve çok hücreli yapılardan oluşan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaların hücrelerinde çekirdek, sitoplazma ve hücre zarları vardır. Sitoplazmalarında bulunan özelleşmiş yapılara "organel" denilmekte; hareket, sindirim, boşaltım gibi hayatsal faaliyetlerini bunlarla sağlamaktadırlar (Aksit ve ark., 1996). Organel olarak; çekirdek, endoplazmik

retikulum, ribozom, golgi aygıtı, mitokondri, lizozom, peroksizom, mikrotübüller ve filamentler bulundurlar. Protozoalar hareket organelleri olarak yalancıayaklar, kamçılar, siller, sirlar ve tentaküller olarak görülen çoğu bir çekirdekli, (monoenergid), bir kısmı da her zaman çok çekirdek taşıyan (polienergid) mikroorganizmalardır. Bazıları ise yaşamlarının belli bir kısmında çok çekirdek taşırlar. Birçok protozoanın etrafında sert bir zar bulunur. Böylelikle olumsuz çevre koşullarına daha dayanıklı şekilleri oluşur. Sert bir duvar yapısı bulunmayan mikroorganizmalar ise dış ortamdan besin maddeleri alıp beslenebilir bu şekillerine ise trofozoid veya vejetatif şekil denir. Beslenme şekillerinde ototrof, çürükçül, parazit, kommensal, miksotrof ya da heterotrof beslenme görülür. Protozoalar boşaltımda ise en belirgin özelliklerinden biri, ritmik olarak şişen ve küçülen vurgan (kontraktil) kofulların bulunmasıdır. Birçok denizel türde ve parazitlerde bu vurgan kofullar görülmez. Çoğalmalarında, eşeysiz olarak; boyuna bölünme, enine bölünme, zırh oluşturduktan sonra ikiye bölünme, hücre dışı tomurcuk oluşturma ve hücre içi tomurcuk oluşturma görülür. Eşeyli çoğalmalarında; kaynaşma (hologami), merogami ve konjugasyon görülür. Tek olarak ya da koloni şeklinde yaşayan tek hücreli canlılardır. Bugüne kadar 60.000 kadar cinsi tanımlanmış ve tanımlanan türlerin yaklaşık 1/4'ü parazit olarak bilinmektedir.

1.4. Bakteri

Tek hücreli mikroorganizmalar olup çeşitli şekilleri bulunan bakterilerin boyları 0,5µm ile 20 µm arasındadır. Bir kısmı spiral şekilli, bir kısmı küresel, bir kısmı çubuksu olabilir. Her ortamda bakterilere rastlamamız mümkündür. Toprakta, deniz suyunda, okyanusun tatlı su derinliklerinde, yer kabuğunda, insan derisinde, hayvanların bağırsaklarında, asitli sıcak su kaynaklarında, radyoaktif atıklarda çoğalabilen türleri vardır (Fredrickson ve ark., 2004). Bir gram toprakta bulunan bakteri hücre sayısı 40 milyon, bir mililitre tatlı suda ise 1 milyondur. Dünyada toplu olarak beş nonilyon (5×10^{30}) bakteri bulunmakta, ve bunlar dünyanın biokütlesinin çoğunu oluşturmaktadırlar (Whitman ve ark., 1998). Atmosferden azot fiksasyonu, gıdaların geri dönüşümü ve ayrıca bazı önemli dönüşümler bakterilere bağlıdır fakat bu bakterilerin çoğu henüz tanımlanamamış ve bakteri şubelerinin sadece yaklaşık olarak yarısı laboratuarda kültürlenebilen türlere sahiptir (Rappé ve Giovannoni, 2003).

İnsan vücudunda bulunan bakteri sayısı, vücutta bulunan hücre sayısının yaklaşık olarak on katı kadardır, özellikle deri ve sindirim yolu içinde fazla sayıda bakteri bulunur (Sears, 2005). Bu bakterilerin çoğunluğu bağışıklık sisteminin koruyucu etkisiyle zararsız hale gelmiş durumda olsalar da bir kısmı da yararlı (probiyotik) olabilirken bazıları patojen bakterilerdir ve bazı hastalıklara neden olurlar; kolera, frengi, şarbon, cüzzam ve veba bu cins hastalıklara dahildir. Yaygın olarak görülen ölümcül bakteriyel hastalık türü solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Verem bu hastalıklardan biri olup tek başına yılda iki milyon kişi öldürür (WHO, 2008). Gelişmiş ülkelerde bakteriyel hastalıkların tedavisinde ve çeşitli hayvancılık çalışmalarında antibiyotikler kullanılır. Endüstride bakteriler; atık su arıtması, peynir ve yoğurt üretimi, biyoteknoloji, antibiyotik ve diğer kimyasalların imalatında önemli rol oynarlar (Ishige ve ark., 2005).

1.4.1. Bakterilerin metabolizması

Bakteriler mikroorganizmalardan farklı olarak çok büyük bir çeşitlilik gösterir (Xu, 2006). Metabolik olarak bu özelliklerin bir bakteri grubu içinde dağılımı geleneksel olarak onların taksonomisini tanımlamak için kullanılmış ama bu özellikler çoğu defa modern genetik sınıflandırmaya uygun gelmemiştir (Zillig, 1991). Bakteriyel metabolizmayı besinsel gruplara ayırırken üç ana özellik kullanılır; büyüme için kullanılan enerji türü, karbon türü ve elektron vericisi. Çizelge 1.1'de bakteri metabolizmasında beslenme tipleri verilmiştir.

Solunum yapan organizmalar için kullanılan bir diğer tanımlama ise, aerobik veya anaerobik solunum için kullanılan elektron alıcılarıdır (Hellingwerf ve ark., 1994).

Çizelge 1.1. Bakteri metabolizmasında beslenme tipleri

Beslenme Tipi	Enerji Kaynağı	Karbon Kaynağı	Örnekler
Fototroflar	Güneş Işığı	Organik Bileşikler veya Karbon Fiksasyonu	Siyano Bakteriler, Kükürt Bakteriler, Mor Bakteriler
Litotroflar	İnorganik Bileşikler	Organik Bileşikler veya Karbon Fiksasyonu	Thermodesulfobacteria, Hidrogenohipaceae, Nitrospirea
Organotroflar	Organik Bileşikler	Organik Bileşikler veya Karbon Fiksasyonu	Bacillus, Clostridium, Enterobacteriaceae

Bakterilerde karbon metabolizması ya heterotroftir yani organik bileşikler karbon kaynağı olarak kullanılır ya da ototroftir yani hücresel karbon, karbon dioksitin karbon fiksasyonu (sabitleme) ile elde edilir. Ototrofik bakteriler arasında fototrofik siyanobakteriler, yeşil kükürt bakterileri ve bazı mor bakteriler sayılabilir olmakla birlikte birçok kemolitrofik türde, örneğin azotlayıcı ve kükürt yükseltgeyici bakteriler de bu grupta yer alır (Zumft, 1997). Bakterilerin enerji metabolizması ya fototrofiye, yani ışığın fotosentez yoluyla kullanımına ya da kemotrofiye, yani enerji için kimyasal bileşiklerin kullanımınıdır ki bu bileşiklerin çoğu oksijen veya ona alternatif başka elektron alıcıları yoluyla yükseltgenir (aerobik veya anaerobik solunum).

Bakteriler ya inorganik ya da organik bileşikleri elektron verici olarak kullanmalarına göre sırasıyla litotrof veya organotrof olarak tanımlanırlar. Kemotrofik organizmalar, hem enerji korunumu (solunum veya fermantasyon ile) hem de biosentetik tepkimeler için bu elektron vericilerini kullanırlar. Buna karşın fototrofik mikroorganizmalar onları sadece biyosentetik amaçla kullanırlar.

Solunum yapan mikroorganizmalar enerji kaynağı olarak kimyasal bileşikler kullanırlar. Solunumda açığa çıkan enerji ile ATP (adenozin tri fosfat) üretilir ve metabolizma yürümeye devam eder. Aerobik solunum yapan mikroorganizmalarda oksijen elektron alıcısı olarak kullanılır. Anaerobik solunum yapan mikroorganizmalarda nitrat, sülfat veya karbon dioksit gibi başka inorganik bileşikler elektron alıcısı olarak kullanılır. Bunlar neticesinde ekolojide büyük önem taşıyan

denitrifikasyon (amonyağın serbest azota çevrilmesi) sülfat indirgenmesi ve asetogenez süreçleri meydana gelir.

Kemotroflarda, bir elektron alıcısının olmadığı durumlarda bir diğer olası yaşam yolu fermantasyondur. Bunda indirgeniş substratlardan elde edilen elektronlar yükseltgenmiş ara ürünlere aktarılarak fermantasyon ürünleri meydana getirilir, örneğin laktik asit, etanol, hidrojen, butirik asit gibi. Substratların sahip olduğu enerji seviyesi ürünlerin sahip olduğu enerji seviyesinden daha yüksek olması sayesinde fermantasyon gerçekleşir. Böylece mikroorganizmalar ATP sentezler ve metabolizmalarını çalıştırabilirler (Drake ve ark., 1997; Morel ve ark., 1998).

Solunum yapamayan anaerob mikroorganizmalar fermantasyon ile enerji üretip indirgeyici güç elde ederlerken bu sırada yan ürünleri (biracılıkta etanol gibi) atık olarak salgırlar. Seçmeli anaeroblar (fakültatif anaeroblar), içinde buldukları çevresel şartlara göre fermantasyon ile farklı elektron alıcıları arasında seçim yaparlar.

Litotrofik mikroorganizmalar enerji kaynağı olarak inorganik bileşikleri kullanırlar. Elektron vericileri olarak sıklıkla hidrojen, karbon monoksit, amonyak (nitrikasyona yol açar), feröz demir ve diğer indirgenmiş metal iyonları ve bazı indirgenmiş kükürt bileşikleri kullanılır. Metan gazı metanotrofik mikroorganizmalar tarafından hem bir elektron kaynağı hem de karbon sentezlenmesinde bir substrat olarak kullanılması bakımından dikkat çekici bir bileşiktir (Dalton, 2005). Hem aerobik fototrofi hem de kemolitotrofide, oksijen son elektron alıcısı olarak kullanılır ancak anaerobik koşullarda ise inorganik bileşikler kullanılır. Çoğu litotrofik mikroorganizma ototroftir buna karşın organotrofik mikroorganizmalar heterotroftir.

Karbon dioksitin fotosentezle fiksasyonuna ek olarak bazı bakteriler, nitrojenaz enzimini kullanarak azot gazını sabitleyler (azot fiksasyonu). Çevre açısından önemli olan bu özellik, yukarıda belirtilmiş metabolik türlerin her birindeki bazı mikroorganizmalarda görülür ama evrensel değildir (Zehr ve ark., 2003).

1.4.2. Bakterilerde büyüme ve üreme

Tek hücreli mikroorganizmalarda çok hücreli mikroorganizmalı canlılardan farklı olarak büyüme ve üreme sıkı bir şekilde birbirine bağlıdır. Bakteriler belli bir boyaya kadar büyür ve sonra eşeysiz üreme şekli olan ikiye bölünme ile çoğalırlar (Koch,

2002). Uygun koşullar sağlandığı zaman bakteriler büyük bir hızla büyür ve ürerler; bakteri topluluklarının sayısı her 9,8 dakikada ikiye katlanabilir (Eagon ve ark., 1962). Hücre bölünmesinde kalıtsal olarak birbirinin aynı iki yavru hücre oluşur. Bazı bakteriler, eşeysiz üremelerine rağmen, daha karmaşık yapılar meydana gelirken, bunlar yavru hücrelerin yayılmasını kolaylaştırır. Örnek olarak myxobacteria'larda tohum yapıları ve streptomyces'te hif oluşumu verilebilir. Bazı bakterilerde ise tomurcuklanma ile üreme görülebilir (hücre yüzeyindeki meydana gelen bir uzantı kopunca bir yavru hücre meydana gelir). Laboratuvar şartlarında bakteriler sıklıkla katı veya sıvı ortamda büyütülürler. Katı büyüme ortamı olarak agar kullanılır ve bunlar aracılığıyla bir bakteri türünün saf bir kültürü elde edilir. Ancak, büyüme hızının ölçülmesi ya da büyük miktarda hücrenin eldesi gerektiğinde sıvı büyüme ortamları kullanılır. Katılaştırılan bir ortam içinde çoğalan bakteriler homojen bir hücre süspansiyonu oluşturabilir, böylece kültürün eşit olarak bölünmesi ve başka kaplara aktarımı kolay olur. Fakat sıvı ortamda tek bakteri hücrelerini oluşturmak zordur. Seçici ortam (belli besin maddeleri eklenmiş veya eksik bırakılmış veya antibiyotik eklenmiş ortam) belli mikroorganizmaların kimlik tespitine yardımcı olur (Thomson ve Bertram, 2001).

Bakteri üretmek için kullanılan birçok laboratuvar tekniğinde, fazla miktarda hücrenin hızlı ve ucuz olarak üretilmesi için fazla miktarda besin kullanılır. Ancak, bazı doğal ortamlarda besin miktarı sınırlı olduğundan bakteriler ilelebet çoğalmaya devam edemezler. Bazı mikroorganizmalar yeterli miktarda besin olunca son derece hızlı çoğalır. Yaz aylarında bazı göllerde bulunan yosun ve siyanobakteriyel büyüme örnek teşkil edebilir (Paerl ve ark., 2001). Bazı mikroorganizmaların da sert çevresel koşullara adaptasyonları vardır. Örnek olarak; streptomyces'in rakip mikroorganizmaları engellemek için çoklu antibiyotik salgılaması verilebilir (Challis ve Hopwood, 2003). Doğada bulunan birçok mikroorganizma besin teminini kolaylaştıran ve çevresel koşullara karşı koruyucu topluluklar halinde (biyofilm gibi) yaşar (Kooijman ve ark., 2003). Bu ilişkiler bazı canlı veya canlı türlerinin büyümesi için şart olabilir (sintrofi).

1.4.3. Teknoloji ve endüstrideki önemi

Bakterilerin bazı laktobasil cinsleri, maya ve küflerle beraber, fermante edilmiş besinlerin (peynir, turşu, soya sosu, sauerkraut, sirke, şarap ve yoğurt gibi)

hazırlanmasında yıllardır kullanılmaktadır (Johnson ve Lucey, 2006; Hagedorn ve Kaphammer, 1994).

Bakteriler çeşitli organik bileşikleri parçalayabilme, atıkların işlenmesi ve değerlendirilmesinde de (bioremediation) kullanılırlar. Petrolde bulunan hidrokarbonları sindirebilen bakteriler çoğu zaman petrol saçılmalarının temizlenmesinde de kullanılırlar (Cohen, 2002). 1989' da Exxon Valdez de meydana gelen tanker kazasının ardından Prince William Sound kıyılarına gübre dökülerek bu doğal bakterilerin çoğalması sağlanmıştı. Bu yöntem, çok miktarda petrol kaplanmamış kıyılarda etkili olmuştur. Bakteriler ayrıca endüstriyel toksik atıkların geri dönüşümünde de kullanılırlar (Neves ve ark., 2006). Kimya endüstrisinde, enantiyomerik olarak saf kimyasalların üretilmesinde (bunlar ilaç ve tarımsal kimyasalların hammaddesidir) bakteriler önemli rol oynarlar (Liese ve Filho, 1999).

Bakteriler, biyolojik haşere kontrolünde haşere ilaçlarının yerine kullanılabilirler. En sık kullanılan örneği, gram pozitif bir toprak bakterisi olan *Bacillus thuringiensis* (BT olarak da adlandırılır). BT nin alt-türleri kelebeklere (Lepidoptera türlerine) özgül bir böcek öldürücü olarak kullanılır (Aronson ve Shai, 2001). Özel olmalarından ötürü bu böcek öldürücüler çevre dostu olarak kabul edilir; insanlara, yabani hayvanlara, polinasyon yapan ve diğer faydalı böceklere etkileri çok az veya hiç yoktur (Bozsisik, 2006; Chattopadhyay ve ark., 2004).

Bakteriler kolaylıkla çoğaltılabilmelerinden ötürü moleküler biyoloji, genetik ve biyokimyada birer araç olarak kullanılırlar. Bakteri DNA'sında mutasyon yapıp bunun fenotipini (dış görünüş) inceleyen araştırmacılar genlerin, enzimlerin ve metabolik patikaların işlevlerini belirleyebilmekte, sonra edindikleri bilgileri daha karmaşık canlı ve canlı gruplarına uygulayabilmektedirler (Serres ve ark., 2001). Muazzam miktarda enzim kinetiği ve gen verileri, canlıların matematiksel modellerinde kullanılarak hücrenin biyokimyasının anlaşılması amaçlanmaktadır. Üzerinde çok çalışılmış olan bazı bakterilerde bu mümkündür. Örneğin *Escherichia coli* metabolizmasının modelleri üretilmekte ve denenmektedir (Almaas ve ark., 2004; Reed ve ark., 2003). Bakteri metabolizması ve genetiğinin önemli ölçüde anlaşılabilir olması sayesinde bakterilerin biyoteknoloji de kullanılarak yeniden tasarımı mümkün olmakla birlikte onların tedavi amaçlı proteinleri (insülin, büyüme faktörleri veya antikorlar gibi) daha etkin şekilde üretmekte mümkün olabilmektedir (Graumann ve Premstaller, 2006; Walsh, 2005).

1.4.4. Bakteri çeşitleri

Bakteriler çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilir.

a) Şekillerine Göre Bakteriler

- 1- Basil, çubuk şeklinde olan bakteriler (Lactobacilluslar, Brevis, Bulgaricus. vs)
- 2- Kok, yuvarlak bakteriler Diplokok, yan yana bulunan iki kok bakterisi Streptokok, yan yana sıralanmış kok bakterileri Stafilokok, topluluk oluşturan kok bakterileri.
- 3- Spiral, spiral şeklini almış bakterilerdir.
- 4- Vibrio, virgül şeklini almış bakterilerdir.

b) Oksijen Kullanma Durumuna Göre Bakteriler

- 1- Aerob, oksijenli ortamda yaşayan bakteriler
- 2- Geçici aerob bakteriler
- 3- Geçici anaerob bakteriler
- 4- Anaerob, oksijensiz ortamda yaşayan bakteriler

c) Gram Boyasına Göre Bakteriler

- 1- Gram-pozitif bakteriler, gram boyası ile boyanır
- 2- Gram-negatif bakteriler, gram boyası ile boyanamazlar

d) Beslenme Şekillerine Göre Bakteriler

Heterotrof bakteriler ve ototrof bakteriler olmak üzere ikiye ayrılırlar

Heterotrof Bakteri

- a) Saprot (çürükçül) Bakteriler
- b) Parazit Bakteriler

Ototrof Bakteri

- a) Fotosentetik Ototrof Bakteriler
- b) Kemosentetik Ototrof Bakteriler

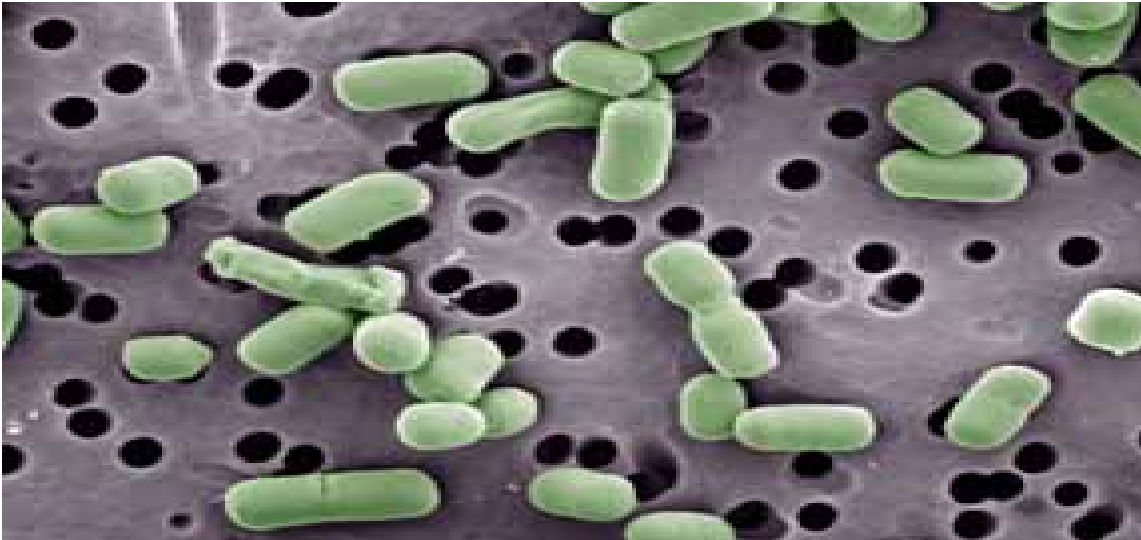
1.4.5. Lactobasilluslar

Lactobacillus; gram pozitif fakültatif anaerobik ya da mikroaerofilik bakterilerin bir cinsidir (Cohen, 2002). Lactobacillus türü, laktozu ve diğer şeker türlerini laktik

aside dönüştürdüklerinden ötürü laktik asit bakterileri olarak bilinen grubunun alt gruplarından birini oluşturmaktadırlar. En yaygın tür olup genelde iyi huylu olarak bilinirler. Simbiyotik olarak insanlarda doğal floranın küçük bir kısmı olarak vajinada ve gastrointestinal sistemde bulunurlar. Örneğin; *Lactobacillus Brevis*, *Lactobacillus Bulgaricus*.

1.4.6. *Lactobacillus brevis*

Ana görevi laktik asit üretmek olan *L.Brevis* heksoz (şeker) fermente edebilen gram-pozitif olup spor oluşturan mikroorganizmalardır. *L.Brevis* laktik asit bakterilerinin, bir cinsidir.



Şekil 1.1. *Lactobacillus Brevis* mikroskobik görüntüsü

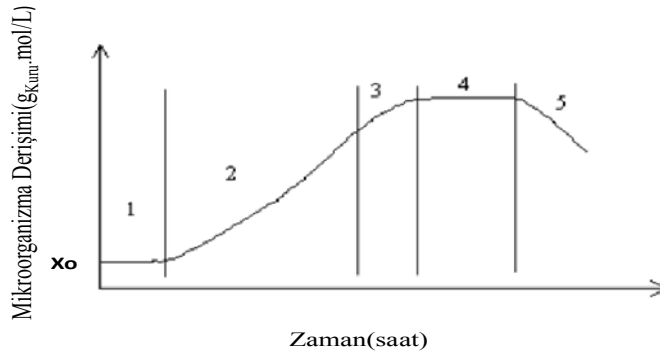
Laktik asit bakterilerinin önemli özelliklerinden biride yiyecek ve içeceklerin korunması için kullanılmasıdır. Laktik asit bakterileri; bira, şarap ve bazı besinlerin üretimi için önemlidir. Diğer laktik asit üreten bakterilerle birlikte *L. Brevis* lahana turşusu gibi bazı gıdaların fermantasyonun da önemli bir rol oynar. *L. Brevis* bakterisi gıda kaynaklarından da izole edilebilir (Sakamoto ve Kanta, 2002).

1.4.7. *Lactobacillus brevis* hücre yapısı ve metabolizması

L. Brevis genel olarak laktobasil, tek başına düzenlenmiş gram pozitif, çubuk şeklinde spor oluşturan bakterilerdir. *L. brevis* bakteriler aerob (oksijenli solunum yapan) olup hareketli ve probiyotiktirler (Cohen, 2002). Fermantasyon da *L. brevis* diğer laktik asit bakterileri için de en çok kullanılanıdır. Bu metabolik özellik ile şeker (heksozlar) CO₂ ve etanol üreten, 6-fosfoglukonat ile laktik aside dönüştürülür. İki ATP (enerji) oksidatif substrat düzeyinde fosforilasyon ile üretilir. Fermantasyonda son ürün olarak, laktik asit inhibe edilerek diğer mikroorganizmaların büyümesini ve ürünlerin pH'sını düşürerek peynir, yoğurt, mayalanmış sütler gibi gıdaların üretimine katkıda bulunur (Rappé ve Giovannoni, 2003).

1.5. Mikroorganizmalar için genel çoğalma eğrisi

Buldukları ortamdan var olan besin gruplarını alan ve bunları hücresel bileşiklere dönüştürüp bölünerek ya da birleşerek çoğalan canlılardır. Mikroorganizmaların çoğalması ise sayısal artış ya da kütleli artış şeklinde gerçekleşir. Kesikli sistemde mikroorganizmaların çoğalmasında ise 5 dönem gözlenir (Şekil 1. 2) (Kargı, 1993).



Şekil 1.2. Mikroorganizma çoğalma eğrisi.

Gelişme ya da gecikme dönemi (1)

Buldukları yeni ortama mikroorganizmaların uyum sağlayıp, çoğalmaya başlayıncaya kadar geçirdikleri döneme gelişme ya da gecikme dönemi denir. Bu süreç de mikroorganizmada besi ortamının bileşiminden ve koşullarından kaynaklanan bazı içsel değişiklikler meydana gelir. Yeni enzimler sentezlenir, bazı enzimlerin oluşumu durdurulur. Mikroorganizmanın bu süreç de hücre ağırlığında çok az artma olsa dahi hücre sayısında fazla bir değişiklik olmaz. Ekonomik yönden bu sürecin kısa olması daha uygun olur. Bu nedenle yüksek konsantrasyonda aktif hücre kütlesi aşısı olarak kullanılmalı, ortam bileşimi ve koşulları uygun olmalı ve ortamda toksik ya da inhibe etki gösterebilecek herhangi bir madde bulunmamalıdır.

Logaritmik ya da üstel üreme dönemi (2)

Mikroorganizmanın konsantrasyonu belirli bir seviyeye ulaştığı anda üstel üreme dönemine gelinir. Besi ortamının bileşimine ve koşullarına uyum sağlayan mikroorganizmalar, bu dönemde maksimum hızla çoğalır. Bu süreç de ortamda bulunan mikroorganizmaların canlı ve genç olduğu kabul edildiği gibi ölüm oranı da ihmal edilir. Hücrelerin kütlesinde zaman içerisinde üstel olarak artış gözlenir ve üreme hızı besi maddesi konsantrasyonundan bağımsız hareket eder.

Duraklama dönemi (3)

Mikroorganizmanın yaşlanması ve ölüm olayının belirginleşmesi nedeni ile bu dönemde logaritmik döneme kıyasla üreme hızında bir azalma gerçekleşir.

Sabit dönem (4)

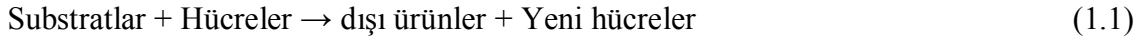
Mikroorganizmaların bazıları bu dönem de çoğalırken bazıları ya ölür ya da üremeden yaşamlarını devam ettirirler. Etkenlerden üçü birbirini dengelediğinde hücre konsantrasyonunda zamanla oluşan bir artış ya da azalış gözlenmez. Sabit dönemde içerisinde toplam hücre kütlesi değişmemekle birlikte canlı ve aktif hücre konsantrasyonu genelde azalır. Yeterli besin maddesi dış ortamda kalmadığında mikroorganizmalar hücre içi kaynakları tüketmeye başlarlar. Süreci geciktirebilmek için hücrelerin oluşturduğu toksik maddeleri buldukları ortamdan uzaklaştırmak gerekir.

Ölüm dönemi (5)

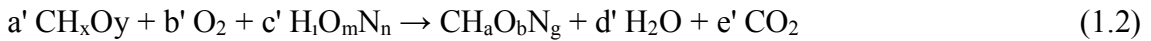
Mikroorganizmalar için mikrobiyal kinetiğin son dönemi olan bu süreçte canlının ölüm hızı arttığından zamanla konsantrasyonunda azalma gözlenir. Bu dönem başlamadan önce hücreler taze besin ortamına aktarılırsa yeniden canlanıp çoğalabilirler (Bailey ve Ollis, 1986; Kargı, 1993; Pekin, 1979).

1.6. Metabolik Sitokiyometri

Canlı bir hücre içinde enzimlerle katalizlenmiş birbirinden bağımsız binden fazla reaksiyon ile kütle ve enerji aktarımlarının olduğu bir biyoreaktördür. Canlı hücrede gerçekleşen kimyasal reaksiyonların aktivitelerinin hepsine birden "metabolizma" denir. Organizma ihtiyaç duyduğu besinleri (substratları) çevresinden çeker ve bunları biyolojik bileşiklere çevirir. Özümlenen substratların bir bölümü enerji, bir bölümü de biyosentez ya da ürün üretimi için kullanılır. Hücre derişimi zamanla artar ve aşağıdaki genel otokatalitik reaksiyonla ifade edilir;



Biyolojik tepkimelerin sitokiyometrisi mikroorganizma türüne ve dış etmenlere bağlı olarak değişim gösterir. Aerobik mikroorganizmalar için çoğalma reaksiyonu;

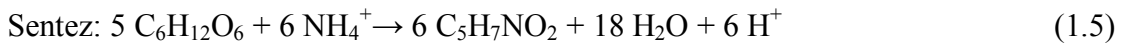
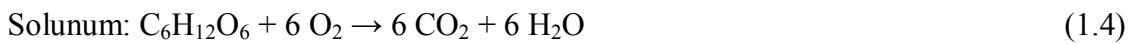


Karbon kaynağı Azot kaynağı Mikroorganizma bileşimi

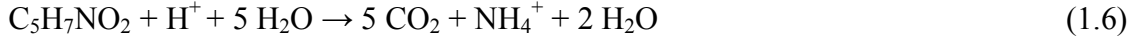
formunda verilir ve solunum katsayısı aşağıdaki şekilde tanımlanır.

$$\text{Solunum katsayısı} = \text{mol CO}_2(\text{oluşan}) / \text{mol O}_2(\text{tüketilen}) = e' / b' \quad (1.3)$$

Substrat olarak glikoz kullanılıyorsa ve mikroorganizmanın elementel bileşimi $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ (Andrews, 1981) olarak alınır, kütle denkliği ifadeleri aşağıdaki gibi yazılabilir;



Ölen mikroorganizmaların oksidasyonu için (iç solunum);



1.7. Mikroorganizma Çoğalma Kinetiği

Kesikli sistemde üstel çoğalma bölgesinde mikroorganizma konsantrasyonu zamanla değişimi özgül çoğalma hızı ile karakterize edilir ve aşağıdaki eşitlik ile verilir,

$$\frac{dx}{dt} = \mu X \quad (1.7)$$

Burada;

X : kuru mikroorganizma yoğunluğu ($\text{g}_{\text{Kuru}}/\text{L}$)

μ : Özgül çoğalma hızı (1/zaman)

Bu eşitlik;

$t=0$ anında $X = X_0$

$t=t$ anında $X = X$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \quad (1.8)$$

Bu evrede özgül substrat tüketim hızı Eşitlik 1. 9 ile verilir.

$$U = \frac{-1}{x} \frac{ds}{dt} \quad (1.9)$$

Burada;

U : Substrat tüketim hızı (mg.k/h)

S : Substrat konsantrasyonu (mg/L veya g/L)'dir.

Mikroorganizma başlangıç konsantrasyonunun iki katına çıkması için geçen süre ise ikilenme süresi olarak adlandırılır.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1.10)$$

Bu bölgedeki hücre üreme verimi, sabit üreme şartları altında ortamda tüketilen substrat konsantrasyonu ile mikroorganizma konsantrasyonu arasındaki sabit oran olarak tanımlanır ve aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$\frac{YX}{S} = \frac{-\Delta X}{\Delta S} = \frac{-(X - X_0)}{(S - S_0)} \quad (1.11)$$

Burada;

S_0 = Başlangıç substrat konsantrasyonu (mg/L veya g/L)

X_0 = Başlangıç kuru mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)

Bu ifadede negatif işaret sistemdeki mikroorganizma konsantrasyonunun artması ile substratın zamanla azaldığını ifade eder.

Ölüm bölgesinde (5 nolu bölge) üretme ortamında sistemde substrat tükenmiş ve ayrıca hücrelerin ürettiği toksik madde miktarı yükselmiştir. Koşullarda ölüm kinetiği aşağıdaki şekilde ifade edilebilir;

$$\frac{dN}{dt} = -k_d N \quad (1.12)$$

$$N = N_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (1.13)$$

Bu eşitliklerde N , plato bölgesinin sonundaki hücre konsantrasyonunu, k_d ise ölüm hız sabitini gösterir.

Mikroorganizmalar tarafından substrat tüketim hızı ise aşağıdaki eşitlik ile verilmektedir (Bailey ve Ollis, 1986).

$$\frac{-ds}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} + Mx \quad (1.14)$$

Bu ifadede S substrat konsantrasyonunu, YX/S mikroorganizmaya ait verim faktörünü (büyüyen mikroorganizma kütlesi/tüketilen substrat kütlesini), m ise yaşam faktörünü (birim zamanda mikroorganizma kütlesi başına tüketilen substrat kütlesi) gösterir (Seker, 1995). Özgül üretim hızı da özgül çoğalma hızına bağlı aşağıdaki eşitlikle verilir;

$$U = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = a\mu + b \quad (1.15)$$

$\alpha > 0, \beta = 0$ ' a büyüme oranlı, $\alpha = 0, \beta > 0$ ' büyüme oransız ve $\alpha > 0, \beta > 0$ 'a karma oranlı fermantasyon olarak isimlendirilir (Kargı, 1993).

1.8. Deney Sistemlerinin Optimizasyonu ve Cevap Yüzey Yöntemi (CYY)

Endüstriyel sahalarda bulunan işletmelerin yapılandırılması beraberinde büyük sorunlar da getirmektedir. Sorunların ilki, kurulacak olan sistemin en uygun koşullarda çalıştırılması, istenen kalitede ürünün elde edilmesi ve en ekonomik maliyetin sağlanmasıdır. Teknolojik bir işletmede kaliteli ve daha etkin ürün elde edilmesi için pH, sıcaklık, konsantrasyon vb. gibi ayarlanabilen parametreler önemlidir. Bu parametrelerin en uygun değerlerinin belirlenmesi için birden fazla deney yapmak gerekebilir. Bu deneyler zaman, malzeme ve maliyet giderimini arttırmaktadır (Şahan, 2008).

Bir kimyasal tepkimede; tepkime mekanizması hakkında yeterli bilgi varsa, başlangıç reaksiyon koşulu ve sonuç arasında bir mekanistik model kurulabilir (Hwang ve Hansen, 1997). Yapılan biyoteknolojik çalışmalarda, örneğin; atık suların biyolojik olarak arıtılmasında veya mikrobiyal çoğalma gibi işlemlerde bir model kurmak için yeterli miktar da temel bilgi yoktur. Bu durumda, deneysel modeller ve istatistiksel analiz yöntemleri önemli bir rol oynar ve süreci etkileyen şartların optimizasyonu, verimi ve maliyetini düşürme de önemli avantajlar sağlar (Öztürk, 2010). Bu yöntemlerin etkin ve etkili kullanımı ile sürecin kontrol edilmesi oldukça kolaydır. Bu yöntemlerin başında Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) gelmektedir.

1.8.1. Deneysel verilerden matematiksel model geliştirme

İstatistiksel ve matematiksel verileri bir arada değerlendiren bir algoritmaya sahip olan CYY gerek endüstriyel gerekse de bilimsel çalışmalarda bilimciler tarafından çoğunlukla tercih edilen bir model geliştirme metodudur. Endüstriyel sahalarda çok fazla kullanım alanı olmakla beraber, literatür çalışmalarında optimum deney şartlarını belirlemede son zamanlarda sıkça kullanılmaktadır (Myers ve Montgomery, 2002; Şahan ve ark., 2010).

Çoğu deneysel çalışmada, beklenen cevap (bağımlı değişken, y) sistem içerisinde kontrol edilebilen parametrelere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Birçok CYY probleminde, cevap ile bağımsız değişken arasında ilişki bilinmemektedir. Pratikte CYY'nin uygulanmasındaki ilk basamak cevap (bağımlı değişken) ile işletim parametreleri (bağımsız değişkenler) arasında bir model geliştirmektir. Geliştirilen yaklaşım modeli, tamamen sistemde bağımsız değişkenlerin değiştirilmesi ile gözlenen sonuçlardan üretilmektedir. Elde edilen bu veriler, istatistiksel tekniklerin birleşiminden oluşan çoklu regresyonla analiz edilerek bir sonuç model oluşturulur. Regresyon ve korelasyon analizleri, optimum deney şartlarını belirlemede kullanılan istatistiksel yöntemlerdendir. Sonuç olarak oluşturulan model, proses değişkenlerini içeren ve deney sonuçlarını ifade eden matematiksel bir biçimdir.

Seçilen bağımsız değişkenlerin aralığına bağlı olarak, geliştirilen model düşük veya yüksek dereceli bir polinom şeklinde olabilir. Eğer beklenen cevap, bağımsız değişkenlerin artışı yada azalışı ile doğrusal olarak değişim gösteriyorsa model 1. dereceden bir polinom olur. Aşağıdaki eşitlik doğrusal bir modeli temsil etmektedir (Myers ve Montgomery, 2002).

$$y = \beta_0 + \beta_1\zeta_1 + \beta_2\zeta_2 + \beta_3\zeta_3 + \dots + \beta_k\zeta_k + \varepsilon \quad (1.16)$$

Burada;

y : Cevap (bağımlı değişken)

β_i : Regresyon katsayısı

ζ_i : Bağımsız değişken

ε : Deneysel hata (sistemde oluşan gürültü)

olarak tanımlanır.

Eşitlik 1.16 da bağımsız değişkenler (ζ_i) doğal birimleri cinsinden verilmiştir. Birçok CYY' de uygun olan bu doğal değişkenler kodlanmış formlarında da kullanılır. Aşağıdaki eşitlikler doğal değişkenlerin kodlanmış formlara dönüşümlerini göstermektedir.

$$\text{Kodlanmış form } (X_i) = \zeta_i - \zeta_i^0 / \Delta \zeta_i$$

$$\Delta \zeta_i = \zeta_i^{\max} - \zeta_i^{\min}$$

$$\zeta_i^0 = (\zeta_i^{\max} + \zeta_i^{\min}) / 2$$

Eşitlik 1.16 kodlanmış formda yazılırsa;

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad \text{olur.}$$

Boyutsuz koordinat sisteminde en yüksek kodlu seviye (+1), en düşük kodlu seviye (-1) ve merkez nokta ise 0 ile gösterilir.

Eğer istenen cevap, sistemde değiştirilen bağımsız değişkenlere göre bir kavislenme içeriyorsa bu durumda cevap fonksiyonunu iyi bir uyum için daha yüksek dereceden ifade etmek gerekir. Aynı zamanda bağımsız parametrelerin içsel etkileşimleri de istenen cevap üzerinde etkili olabilir. Bu durumda matematiksel modeli tanımlarken, bağımsız değişkenlerin doğrusal terimlerini, yüksek dereceden terimlerini ve iç etkileşim terimlerini göz önünde bulundurmak gerekir. Bu model quadratik model olarak ifade edilir. Cevabın ikinci dereceden ve iç etkileşimlerin olduğu k sayıdaki bağımsız değişkenli bir quadratik model eşitlik 1.17'de verilmektedir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1.17)$$

Deneysel tasarım yapılırken kaç tane deneyin yapılacağı aşağıdaki eşitliklere göre belirlenir.

$$N = 2^k + 2k + n^0 \quad k < 5 \quad (1.18)$$

$$N = 2^{k-1} + 2k + n^0 \quad k > 5 \quad (1.19)$$

Bu eşitliklerde;

N: Deney sayısını

k: Bağımsız değişken sayısı

n^0 : Merkezdeki deney sayısını göstermektedir.

Düşünülen tez kapsamında gerekli besi ortamlarında *Lactobacillus brevis* bakterisinin özgül çoğalma hızının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu bakterinin besi ortamı bileşenlerinden en etkili olan parametrelerin (pH, sıcaklık ve metal iyonu konsantrasyonu gibi) optimizasyonu son yıllarda artan öneme sahip olan ve sıkça kullanılan CYY yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. *Lactobacillus* türü bakteriler fermantasyon ortamlarında sıkça kullanılması nedeniyle laktik asit ve alkol endüstrisinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca endüstriyel atık su arıtması, biyoteknoloji, kimya ve gıda sektöründe önemli rol oynarlar. Bundan dolayı; bakterilerin etkin ve ekonomik olarak elde edilmesine yönelik olduğu için bu çalışmanın literatüre orijinal katkı sağlayacağı ve bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı kanaatini taşımaktayız.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Ho ve ark. (1997), çalışmalarında biyofilm fermantasyonunda % 50 zirai madde ile %50 polipropilen içeren yuvarlak ve halkalı plastik destekli kompozitler ve *Lactobacillus casei* yardımıyla laktik asit üretiminin optimizasyonunu araştırmışlardır. Biyoreaktördeki proseste PCS (plastik kompozit destekler) ve kontrol hücreleri ile optimum şartlar 66 gün, pH 5 ve 37 °C' de gerçekleştirilmiştir. Reaktörün hacmi 600 ml olarak belirlenmiş ve her bir reaktörün ortamı 2 – 5 gün arasında 17 defa değiştirilmiştir. Bu süreçte PCS'ler biyofilm oluşumunda büyük bir rol oynamış ve yüksek oranda tutunmayı başarıp, biyofilmle çok iyi bir uyum sağladığı görülmüştür.

Tanyolaç ve Beyanal (1997), *Pseudomonas putidia* (strain no: P71) bakterisinin biyofilm oluşturma özellikleri ile ilgili yaptıkları çalışmada substrat inhibisyonu altında küre şeklindeki biyopartiküllerin ortalama biyofilm yoğunluğu ve performanslarının hesaplanmasını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada maksimum substrat tüketim teorisinin etkin difüzyon katsayısına karşın biyofilm yoğunluğuna bağlayan eşitlikler türetmişlerdir.

Demirci ve ark.(1997), *Saccharomyces cerevisia* maya kültürünü kullanarak tekrarlı fermantasyon biyofilm reaktörlerinde 50 gr/L glikozdan 25 gr/L etanol üretmişlerdir. Bu çalışmada PKD'ler (% 40 soya kabağı, % 5 soya unu, % 5 maya özütü ve tuz, % 50 polipropilen) geliştirilerek biokütle ile birlikte brabender cihazına konmuş ve bazı halkalara dönüştürülerek bir biyofilm tabakası oluşturmuşlardır. Daha sonra fermantasyonla etil alkol elde etmişlerdir. Bu çalışmada etanol konsantrasyona (gr/L) karşı zaman (gün) grafiği ile bir model oluşturmuşlardır.

Uslu (1999), *R.arrhizus* mikroorganizmasının Kurşun(II), Kadmiyum(II), Bakır(II) iyonlarının bulunduğu ortamda pH, sıcaklık, metal iyonu derişimi ve sakaroz derişimi gibi parametrelerin üremesi üzerindeki etkileri araştırmıştır. Metal iyonlarının tek tek buldukları üreme ortamında başlangıç metal iyon derişimleri mg/L olarak; eşit derişimlerde birlikte buldukları üreme ortamında ise başlangıç metal iyon derişimleri mg/L olarak almıştır.

Carla ve Roberto (2001), çalışmalarında yine MKT (Design Expert Versiyon 5.0) kullanarak *C. guilliermondii* FTI 20037 mayasından xlitol üretiminin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Piriñten hidrolizat yoluyla elde edilen xlitolun

aşılama ve başlangıçtaki xlose konsantrasyonlarının etkileri candida tarafından çeşitli aşılama oranları kullanılarak CYY ile gerçekleştirilmişlerdir. FFD ve MKT kullanarak optimizasyonu tamamlanmışlardır. Maksimum xlitol konsantrasyonunu 82 g/L ve asılma yüzdesini de % 3 olarak bulmuşlardır.

Aktaş (2003), akışkan yatak biyofilm reaktörlerini kullanarak peynir altı atık suyunun arıtılmasını ve sistem performansının modellenmesi gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışma da uygun destek maddesi olarak aktif karbon kullanılmış ve mikroorganizmanın destek malzemesi üzerinde biyofilm oluşturulması sağlamıştır. Peynir altı suyu bu sistem sayesinde arıtılmış ve çeşitli statiksel programlar (MKT, EXEL ve CYY) kullanılarak sistem modellenmiştir.

Bober ve Demirci (2004), plastik destekli bileşikleri biyofilm reaktörlerinde kullanarak *Lactococcus lactis* subsp mayası ile laktik asit fermantasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ancak bu çalışmada pH kontrollü ve pH kontrolsüz fermantasyonda 48 saat eşit ring ve diskler alınarak nisin üretimi, azot miktarı azaltılarak gerçekleştirilmiş ve glikoz ekleyerek sonuçları gözlemlemişlerdir. Sonuçlar nisinin PCS kontrolündeki üretiminde herhangi bir artışı olmadığını göstermemiştir. Nisin üretiminin metabolizması ve *L. lactis* in nisine absorbansı plastik destekli bileşiklerin gölgesinde kalmış ve en az limite ulaştığını görmüşlerdir. Bununla beraber araştırmanın verimli olabilmesi için nisinin absorbansının düşürülmesi gerektiğini önermişlerdir.

Yao ve ark. (2006), lipaz enzim üretimi için kültür ortamını CYY kullanılarak optimize etmişlerdir. İlk aşamada Plackett-Burman (PB) kültür ortamındaki komponentlerin etkilerini geliştirmek için kullanmışlardır. Lipaz üretiminde en etkili parametrelerin soya yağı, soya tozu ve K_2HPO_4 olduğunu görmüşler ve bu 3 faktörü, MKT (Merkezi Kompozit Tasarım) kullanılarak optimizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Optimizasyon şartları lipaz üretiminin 5000'den 6230 IU/ml çıktığını göstermişlerdir. Böylece Lipaz fermantasyonu 51 fermantöründe 9600 IU/ml'ye ulaşmıştır.

Okur (2006), Hacettepe Üniversitesi'nde vermiş olduğu tezde de peynir altı suyundan 9 çeşit maya içinden, *K. Marxianus* mayasıyla % 99 verimle optimum koşullarda etil alkol üretmiştir. Bu optimum koşullarda, *K. Marxianus* Y-1175 maya kültürü 30 °C ve 60 g/L PAS ortamında 27 saat içinde % 45.3 verimle 18.7 g/L konsantrasyonunda etil alkol üretmiş ve 48 saat içinde laktozun tamamını kullanmıştır.

Yao ve Tian (2006), tarafından yapılan bir çalışmada *Candida sp.* 99–125 mayası kullanılarak kültür ortamındaki Lipas üretimi CYY ile optimize edilmiştir. Deneysel çalışmalardaki bulguların hesabı sırası ile Plackett-Burman, Steepest Ascent ve MKT kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. İlk aşamada Plackett-Burman kültür ortamındaki komponentlerin (X_1): 3%, 4%; (NH_4)₂SO₄ (X_2): 0.1%, 0.125%; K₂HPO₄ (X_3): 0.3%, 0.4%; KH₂PO₄ (X_4): 0.1%, 0.125%; soya tozu (X_5): 5.5%, 6.5%; MgSO₄ (X_6): 0.05% ve 0.06%; Span 60 (X_7): 0.1% etkilerini incelemek için kullanılmıştır. Lipaz üretiminde en etkili parametrelerin soya yağı, soya tozu ve K₂HPO₄ olduğu görülmüştür. Bu 3 faktör Steepest- Ascent deneylerinde ele alınarak miktarları Soya yağı, soya tozu ve K₂HPO₄ yaklaşık olarak (w/v) 1,0575 –0,6925 –0.037 bulunmuştur. Ve bu değerler MKT’ de kullanılarak optimizasyon sonlandırılmıştır. R² değeri 0.91 olarak bulunmuştur. Model yaklaşık olarak lipaz üretimindeki maksimum değerlerin (w/v) soya yağı % 4.187, soya tozu % 5.840, K₂HPO₄ % 0.284, olduğunu ve bu parametrelerin lipaz aktivitesine olan etkileri 3 boyutlu grafiklerde de vermişlerdir.

Yuying Sun ve ark. (2007), tarafından yapılan benzer bir çalışmada *Microbacterium sp.* OU01 bakterisinden chitosanase üretimi için istatistiksel optimizasyon ve substrat indüksiyonu kullanılarak bizlerin de yararlandığı Plackett–Burman, Steepest Ascent ve MKT gibi istatistiksel programlarını kullanmışlardır. Plackett için 19 parametre almışlardır. 7 dummy 12 etkin parametre vermişlerdir. X_1 maya özütü 3.0 (g/L), X_2 (NH_4)₂SO₄ 20.0, X_3 (g/L) MgSO₄ 7H₂O 1.0, X_4 (gr/L) K₂HPO₄ 3H₂O 0.7, X_5 (gr/L) KH₂PO₄ 0.3, X_6 (gr/L) NaCl 5.0, X_7 (gr/L) glikoz 0.5, X_8 (gr/L) chitosan tozu 10.0, X_9 (C) İnkübasyon sıcaklığı 30-32 °C, X_{10} (mL/500 mL) Fermantasyon tutuklanması 80-100, X_{11} başlangıç pH 2.1, X_{12} (saat) İnkübasyon zamanı alınarak en etkin parametreler seçmişlerdir. Daha sonra Steepest-Ascent programında (NH_4)₂SO₄, MgSO₄ 7H₂O ve başlangıç pH alınarak deneyler gerçekleştirmişlerdir. 2. deneyde optimum şartlara ulaşmışlar ve (NH_4)₂SO₄ 19.0 gr, MgSO₄.7H₂O 1.2 gr, başlangıç pH’ 2 ve Chitosanase Aktivitesi/U mL 12.0 ile 86.54 olarak bulmuşlardır.

Gönen ve Aksu (2007), tarafından yapılan bir çalışmada *Candida Utilis*’ in büyüme ortamındaki parametrelerin büyüme ve bakır akümülyasyonları üzerinde etkileri incelenmiş, melastaki sukros ve bakır testi yapmıştır. Başlangıçtaki bakır varken sukros konsantrasyonu 15 gr/L olduğu takdirde çoğalma oranı en fazla 0,133 h bulunmuştur.

Sukros konsantrasyonları 5 ile 15 gr/L arasında ve % 33 verim için 15 gr/L sukros ve 50 mg/L bakır kullanmıştır. CYY kullanılarak bu iki parametrenin etkisi geliştirilip optimize etmişlerdir.

Byron ve ark., (2007), glikoz ve odun içeren sekerler üzerinde *Saccharomyces cerevisia* mayasını kullanarak etil alkol üretmişlerdir. Ancak odun üzerinden etil alkol eldesinin verimli olabilmesi için maya üzerinde genetik değişiklikler yapılmış ancak selüloz üzerinde çok büyük bir verim alınmamasına rağmen glikozdan çok iyi bir verim elde etmişlerdir.

Şahan (2008), yaptığı çalışmada CYY kullanarak ağır metallerinin biyosorpsiyon koşullarını optimize etmiştir. Bu çalışmada PBD(Plackett-Burman Dizayn), SA(Steepest Ascent) ve MKT(Merkezi Kompozit Tasarım) istatistiksel programları sıra ile kullanılmış ve ağır metallerin biyosorpsiyonu üç boyutlu grafikler, ANOVA tablosu ve belli bir güven aralığında bulunan modeller hesaplanarak optimizasyon gerçekleştirmiştir.

Yöntem (2010), bu çalışmasında gelişen teknolojiyle beraber endüstride iyi tanınan bazı maya kültürlerinin çoğalma koşullarını Cevap Yüzey Yöntemi (Design Expert 6.0 deneme sürümü) kullanarak optimize etmek ve biyofilm popülasyonlarını zirai madde, polipren karışımından meydana gelen plastik kompozit desteklerler (PKD) üzerinde araştırıp gözlemlemiştir.

Lasrado ve Gudipati (2013) çalışmasında XOS (Xylo-oligosakaridler) üzerinde yetiştirilen *Lactobacillus brevis* NCDC01'dan D-xylosidase'nın saflaştırılması ve karakterizasyonunu yapmışlar. Ultra-filtrasyon, DEAE selüloz iyon değişimi ve Sephacryl S-100 jel filtrasyon kromatografi tekniklerinden oluşan üç ardışık adımı belirgin homojenliğe kadar enzimi saflaştırmak için kullanmışlar ve monomerik SDS-PAGE üzerinde yaklaşık 58.0 kDa'lık bir görünür moleküler kütleyle sahip olduğunu bulmuşlar. Optimum PH ve sıcaklığın sırasıyla 6.0 ve 40 °C olduğunu bulmuşlardır. Enzimin 5.5-7.5 pH aralığı üzerinde ve 30 dakika boyunca 50 °C'ye kadar kararlı kaldığını gözlemlemişler. Enzim aktivitesi veya dengesi için herhangi bir metal iyon gerektirmemiş ama tamamen Hg^{2+} , Pb^{2+} , p-klorocivabenzonat (p-chloromercuribenzoate, PCMB), oksalik asit ve sitrik asit tarafından inhibe edilmiş. Bu çalışmanın *Lactobacillus brevis* NCDC01-D-xylosidase saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerine yapılan ilk çalışma olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Jaiswal ve Abu-Ghannam (2013) kontrollü pH ve çözünmüş oksijen altında laktik asit bakterileri (LAB) kullanılarak probiyotik lahana suyu üretimi için kinetik çalışma yapmışlar. Ayrıca polifenolik içeriğinde probiyotik fermantasyonu ve antioksidan kapasitesi etkisini araştırmışlar. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* için sonuçları 24 saat fermantasyondan sonra 9.19, 9.47 ve 10.6 log CFU/ml olarak bulmuşlar. Laktik asit (LA)fermente lahana suyunun son ürünü olmuş ve *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. brevis* için konsantrasyonları 6.97, 9.69 and 12.2 g/l LA 'na ulaşmış. LAB fermantasyon toplam fenolik içeriği (TCK)ve ilk hammaddenin toplam flavonoid içeriği (TFC) % 75'den fazla tutmuş ve antioksidan kapasitesi için de benzer sonuçları gözlemlemişler.

Bu çalışmanın amacı, *Lactobacillus brevis* ve *Aspergillus oryzae* ile solid-state fermantasyon (SSF) tarafından soya küspesinde tripsin inhibitörü bozulmasını optimize etmekmiş ve fitik asit, ham protein, ham yağ ve amino asit profili üzerinde SSF etkisini belirlemekmiş. Box-Behnken tasarımı ile yanıt yüzey yöntemi (RSM) SSF'i optimize etmek için kullanılmış. *L. brevis* fermantasyonu için RSM den türetilen uygun koşulları pH = 5.1; aşılama büyüklüğü = % 10; süresi = 72 saat; su oranı = 1.5 olarak belirlemişler ve Tripsin inhibitörlerinin en az içeriği 6.4 mg-1 g kuru madde olarak bulmuşlar. *A. oryzae* fermantasyon için RSM den türetilen optimum koşullar şunlarmış: su oranı tabaka = 0.81; inokulum büyüklüğü =% 4; süresi = 120 saat ve tripsin inhibitörlerinin en az içeriği 1.6 mg-1 g kuru madde olarak bulmuşlar. hem *L. brevis* hem de *A. oryzae* için (sırasıyla 57.1 ve % 89.2) tripsin inhibitörleri önemli ölçüde azalmış. *L. A. oryzae* fermantasyonu belli bir oranda fitik asit (% 34.8) ve ham yağ (% 22.0) içerikleri bozulmuş ise de *L. brevis* fermantasyonu , fitik asit (% 0.4) ve ham yağ (% 5.2) önemli ölçüde etkilenmemiş. Ham protein içeriği *L. brevis* ve *A. oryzae*'nin fermantasyonundan (6.4 ve% 12.9) sonra artırılmış. Üreaz etkinliği *L. brevis* ve *A. oryzae* için (83.3 ve % 58.3) büyük ölçüde düşürülmüş. Sonuç olarak *A. oryzae* ve *L. brevis.* ile SSF azaltılmış tripsin inhibitörü içeriği ve soya küspesinde modifiye makro besinleri azalmış.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

Tez kapsamında aşağıdaki araç gereçler etkili bir şekilde kullanılmıştır. Cihazların marka ve modeli ile hangi amaç için kullanıldığı aşağıda belirtilmiştir.

1. Buzdolabı (*Bosh*): Soğutma ve muhafaza etme işlemlerinde yararlanıldı.
2. Etüv (*Memmert*) : Kurutma, saklama gibi süreçler için kullanıldı.
3. Shaker (*Heidolp, Unimax 1010*): Aşılama, üreme ve fermantasyon işlemleri için kullanıldı.
4. Mikro pipet (*Brand ve Isolab*): Hacim ölçümlerinde süreci hızlandıran alet.
5. pH metre (*Naomed WTV 240L*): pH (asit-baz) ölçümlerinde faydalanıldı.
6. Hassas Terazî (*Precisa, XB220A*): Ağırlık tayini ölçümleri için kullanıldı.
7. Santrifüjler (*MPV ve Sigma3-18*) Bidistile ve Monodistile Su sistemi (GFL): Çökme prosesi için tercih edilen cihaz.
8. Laminer Kabin (*ESCO*): Steril ortam ve doğru akım için kullanılan cihaz
9. Otomatik bek alevi (*IBS*): Katı ve sıvı ekimlerde mikroorganizmalardan steril etmek amacıyla kullanıldı.
10. Dairesel Hareketli Çalkalamalı İnkübatör (*Jeio-Tech model of SI-600R, Seoul, Korea*): Aşılama, üreme ve fermantasyon işlemleri için kullanıldı.
11. Otoklav (*Raypa-AE-28/75 DRY*): Bütün sıvı ve katı aşı ortamları, cam malzemeler, organik maddeler, plastik destekler ve daha birçok maddenin sterilizasyonu işlemlerinde kullanıldı.
12. UV-VIS spektrofotometre (*Genesys 10S uv-vis spektrofotometre*): Mikroorganizma konsantrasyonlarının absorbans tayininde kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

Çalışmalarımızda aktif kullanacağımız *Lactobacillus Brevis* bakterisi NRRL (Northem Region Research Laboratory)'den temin edilmiştir ve bu bakteri özellikle biyoteknolojik alanlarda kullanıldığı ve glikozu karbon kaynağı olarak kullanabildiği için seçilmiştir. Bu çalışmamızda NRRL B-3065 kodlu *Lactobacillus Brevis* mikroorganizmasının çoğalma hızı incelenmiştir.

Bu amaç için yapılan deneysel çalışmalarda ise bakteri özütü (Acumedia, Fluka), pepton (Merck), glikoz (Oxoid), mikrobiyolojik agar (Merck), mineral tuzlar (KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Riedelde Haen), malt özütü (Acumedia), H_2SO_4 (Merck), NaOH (Sigma), etil alkol (Merck) gibi kimyasal malzemeler kullanılmıştır.

Ayrıca diğer sarf malzemelerden drigalsik spatül, erlen, 10 mL'lik tüpler, balon joje, petri kabı, mezür, 25x150 mm kapaklı kültür tüpleri, pipet, pipetör, otomatik dispenser, spatül, 0,45 ve 0.20 μL ' lik mikro filtreler deneysel çalışmalarda sıkça kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Tez çalışmalarımızda izlenen metotlar sırayla aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir.

1. Çalışılan bakterinin literatür yardımı ile belirlenmesi
2. Reçete uygulanıp çalışılan bakterinin canlandırılması ve daha sonra katı besi yerlerine ekimlerinin yapılması
3. Analiz ve ölçümlerin yapılabilmesi için kalibrasyon eğrisinin oluşturulması;
4. Optimizasyon için Design Expert 8.0.7.1 (trial versiyon) içindeki MKT (Merkezi Kompozit Tasarım) deney programının oluşturulması
5. Belirlenen deneylerin yapılarak bakteri için özgül çoğalma hızının hesaplanması ve deney sonuçlarının MKT tarafından analiz edilmesi
6. Elde edilen model eşitliğinin optimize edilmesi

3.2.1. Liyofilize ortamdaki bakterilerin canlandırılması

Temin edilen liyofilize formda bakterilerin canlandırılması için aşağıda tanımlanan bileşimde canlandırma ortamı hazırlanmıştır. Ortamlar hazırlanırken, bakteri kültürü ile beraber verilen reçete dikkate alınmış ve aynen uygulanmıştır. Bakteri canlandırılırken kullanılan ortam bileşimi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Bakteri canlandırmak için, 100 mL erlende 50 mL olacak şekilde hazırlanan canlandırma ortamı 121 °C de 15 dakika süre ile otoklavda sterillemiştir. Sterillenen canlandırma ortamına (ilk hacim 5-7 mL, çözüldükten sonra 50 mL ye transfer) liyofilize formdaki bakteri kültürü aseptik koşullarda aktarılmıştır. Bu canlandırma ortamları 35°C ve 120 rpm’de dairesel hareketle çalkalayan inkübatörde 24 saat bekletilerek bakteri kültürünün canlandırılması sağlanmıştır. 24 saat sonra canlandırma ortamından alınan bakteri kültürü, petri kaplarında hazırlanmış patates dekstroz agar (PDA) katı besi yeri (39 g/L) ortamına aktarılmış ve 35°C de 48 saat etüvde bekletilerek bakterinin katı besi yeri yüzeyinde çoğalmaları sağlanmıştır. 48 saat sonucunda etüvden alınan petri kapları, daha sonraki uygulamalar da kullanılmak üzere +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. İşlemler belli periyotlarla yenilenerek kültürün sürekli aktif kalması sağlanmıştır.

Çizelge 3.1. Bakterilerin canlandırılmasında kullanılan ortamın bileşimi

Bileşenler	Marka	Miktar(g/L)
Meat Extract	Oxoid	5
Yeast Extract	Oxoid	20
Glikoz	Oxoid	1
Tween 80	Merck	2
K ₂ HPO ₄	Merck	5
Na-Asetat	Merck	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	0.2
MnSO ₄ .H ₂ O	Merck	0.05
Casein Pepton	Oxoid	10

Canlandırma ortamında canlandırılan bakteriler daha sonra aşı ortamına aktarılmıştır.

3.2.2. Aşı Ortamının Hazırlanması

Aşı ortamı, 250 mL lik erlenlerde 100 mL olacak şekilde Çizelge 3.2’de verilen bileşimde hazırlanmıştır. Bu ortam 121 °C 15 dakika süre ile steril lenmiş ve oda sıcaklığına kadar soğuması sağlandıktan sonra katı besiyerinde bulunan maya kültürleri aşıl anarak 35 °C 120 rpm de dairesel hareketle çalışan inkübatörde 24 saat inkübe edilmiş ve istenen aşı ortamı elde edilmiştir.

Çizelge 3.2. Aşı ortamının bileşimi

Bileşenler	Marka	Miktar(g/L)
Glikoz	Merck	1100
Maya Özütü	Oxoid	100
KH ₂ PO ₄	Merck	42
K ₂ HPO ₄	Merck	37.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	44.4
NaCl	Merck	1.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	2.25
FeCl ₂ .6H ₂ O	Merck	0.37
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	6.15
Tween 80	Merck	2.0

Çoğaltılan bakteriler daha sonra katı ortama ekilerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere soğutucuda muhafaza edilmiştir. Çizelge 3.3’te katı besiyerinin bileşimi verilmiştir.

Çizelge 3.3. Katı besiyeri ortamı bileşimi

Bileşen	Marka	Miktar(g/L)
Maya Özütü (Yeast Extract)	Oxoid	3
Malt Özütü(Malt Extract)	Oxoid	3
Pepton	Oxoid	5
Glikoz	Merck	10
Agar	Oxoid	20

3.2.3. Bakterilerin optimum çoğalma şartlarının belirlenmesi

Canlandırma ortamlarından katı besiyerine aktarılarak muhafaza edilen bakteri kültürlerinin çoğalması için planlanan ve temel karbon kaynağı glikoz olan besi yerlerine ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan bakteri kültürlerinin çoğalmaları üzerine

etki eden en önemli ortam faktörleri literatür araştırması ile belirlendi (pH, sıcaklık ve Cd iyon konsantrasyonu). Kullanılan bu istatistiksel programların en büyük avantajı en az deney sayısı ile en iyi şartlarda ekonomik bir sistem oluşturmaktır. Ayrıca bu programların yardımı ile geleneksel olarak gerçekleştirilen yöntemler ile tespit edilemeyen parametre etkileşimlerinin cevap üzerindeki etkisinin analiz edilmesidir (Şahan, 2010). Bakteri optimizasyonu için kullanılan ortam bileşimi aşağıda verilmiştir.

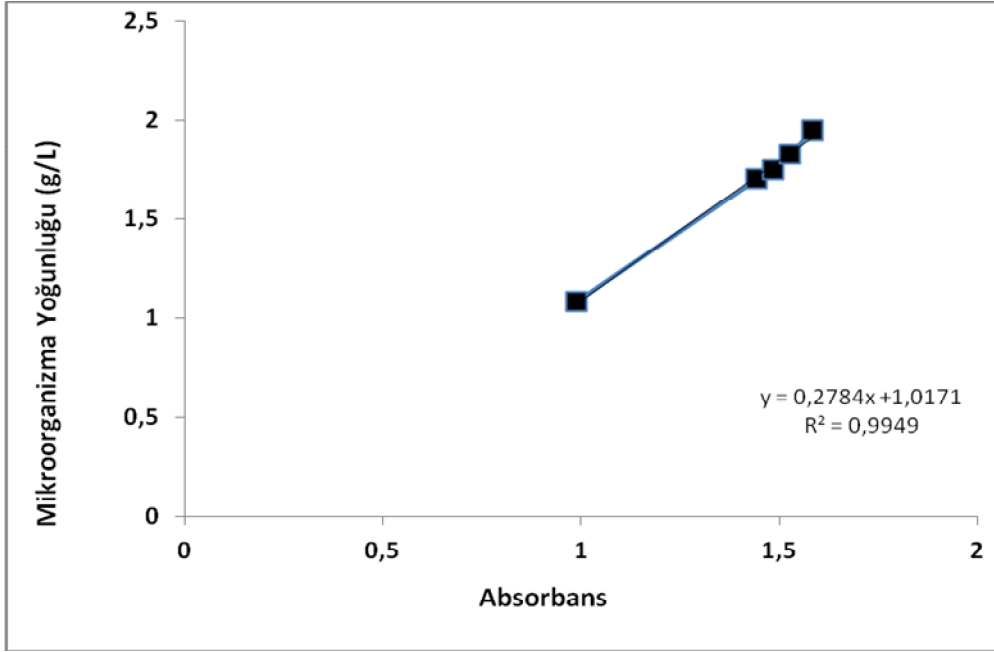
Bakteri kültürü için yapılacak optimizasyon ve çoğalma kinetiği çalışmaları için hazırlanan ortamlara aşılama yapılırken, % 5 (v/v) aşılama oranı kullanılmıştır (Aktaş, 2003).

Çizelge 3.4. Bakterilerin çoğalması için besi ortamı

Bileşenler	Marka	Miktar(g/L)
Glikoz	Merck	0,4
Maya Özüü	Oxoid	1
KH ₂ PO ₄	Merck	0,5
K ₂ HPO ₄	Merck	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	2,44
NaCl	Merck	0,15
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	0,225
FeCl ₂ .6H ₂ O	Merck	0,037
Tween 80	Merck	0.2

3.2.4. Bakteri için Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması

Optimizasyon çalışmalarının analiz ve ölçümlerinin sağlıklı olabilmesi için kalibrasyon doğruları hazırlandı. Farklı konsantrasyonlarda alınan bakterilerin absorbansına 500 nm'de UV-VIS spektrofotometrede bakıldı ve bu değerler için bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Tez başlangıcında yapılan bakteri konsantrasyonları analizlerinde en iyi konsantrasyonu UV-vis. cihazının 500 nm de verdiği görülmüştü. Daha sonra yapılan bütün optimizasyon deneylerindeki biokütle konsantrasyonları bu kalibrasyon doğruları baz alınarak hesaplanmıştır. Aşağıda bütün çalışmalarımızda kullandığımız konsantrasyon-absorbans kalibrasyon doğrusu verilmiştir. Şekil 3.2 de çalışmamızda absorbans değerlerinin ölçümlerinde kullandığımız spektrofotometre verilmiştir.



Şekil 3.1. Konsantrasyon-absorbans kalibrasyon grafiği



Şekil 3.2. Biokütle konsantrasyonu ölçümlerinde kullanılan UV- VIS Spektrofotometre

3.3. Deneysel Dizayn ve Optimizasyon

Bakteri kültürünün çoğalma ortamının optimizasyonu için öncelikle kalibrasyon doğruları oluşturuldu ve daha sonra istatistiksel paket program olan Design-Expert 8.0.7.1 deneme sürümü içindeki MKT kullanılarak deneysel parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirildi.

3.3.1. Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)

MKT, CYY içerisinde bulunan ve en çok kullanılan istatistiksel optimizasyon yöntemidir (Şahan, 2008). MKT üç kısma ayrılabilir. Bunlar iki düzey noktalar, aksiyal noktalar (iki düzey ötesi α) ve merkez noktalarıdır. Yöntemin iki düzey (faktöriyel) noktaları, bir faktörün +1 veya -1 yani en yüksek veya en düşük düzeylerinden oluşur. Aksiyal noktalar, deneycinin belirlediği iki düzey noktalarının daha da ötesinde olan program tarafından Eşitlik 3.1 ile belirlenen $+\alpha$ ve $-\alpha$ değerlerdir. Program bu yolla deneycinin belirlediği düzeyleri genişleterek hatayı azaltmayı amaçlamaktadır.

$$\alpha = 2^{k/4} \text{ (} k = \text{ çalışılan bağımsız değişken sayısı)} \quad (3.1)$$

Merkez noktalar ise; deneysel hatayı tahmin etmek için tekrar edilen noktalarıdır. Parametrelerin iki düzey (faktöriyel) noktalarının orta noktalarıdır. Sonuç olarak MKT' de her bir parametrenin beş düzeyi vardır. Bunlar +1 ve -1 ile ifade edilen faktöriyel noktalar $+\alpha$ ve $-\alpha$ ile ifade edilen aksiyal noktalar, 0 olarak ifade edilen merkez noktalarıdır. MKT, Design-Expert 8.0.7.1 deneme versiyonu kullanılarak uygulandı. Üç değişkenli deneylerin toplam sayısı 20 olarak tespit edildi (= $2k + 2^k + 6$ formülüne göre hesaplandı).

Burada k ; değişkenlerin sayısı olarak ifade edilir. Hatayı tespit etmek için değişkenlerin merkez noktasında toplam 6 deney yapıldı. Optimizasyon prosedüründe yanıt lineer veya kuadratik olarak seçilen değişkenlerle ilgili olabilir. Bir kuadratik model eşitliği aşağıdaki gibi verilebilir (Aktaş, 2005).

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.2)$$

Burada;

\hat{y} : Yanıt (Adsorplanan miktar, mg/g)

β_0 : Sabit katsayı

X_i : Çalışılan değişkenler

β_i : Lineer katsayı

β_{ii} : Quadratik katsayı

β_{ij} : İnteraksiyon katsayısı

k : Parametre sayısı

olarak tanımlanır.

Yanıt ve değişkenler arasındaki etkileşimi elde etmek için ANOVA testi içeren Design-Expert 8.0.7.1 programı kullanılarak Eşitlik 3.2 elde edildi. Modelin uygunluğu belirlenen R^2 ile ifade edildi ve istatistiksel önemi, aynı programda bulunan F testi ile incelendi. F testi iki ölçüm takımının kesinliğini karşılaştırmak için basit bir metoddur. Numuneler, rastgele hata kaynaklarının aynı olduğunun kabul edilebileceği kadar birbirine benzediği sürece, veri takımlarının aynı numuneden elde edilmesine gerek yoktur. F testi null hipotezine dayanır ve bu yüzden kesinliklerin aynı olduğunu kabul eder (Şahan, 2008). İki ölçümün varyanslarının oranı olarak tanımlanan F büyüklüğü, iki ölçüm takımının kesinlikleri arasında bir fark yok ise, hesaplanır ve F' nin beklenen maksimum değeri (belirli bir olasılık seviyesinde) ile karşılaştırılır. Deneysel F değeri, olasılık tablolarından bulunan kritik değeri geçerse, iki standart sapmanın aynı olduğu null hipotezinin sorgulanması için istatistiksel bir dayanak vardır. F testi iki sorunun cevabının aranmasında kullanılır. Bunlardan birincisi; metot A' nın metot B' den daha kesin olup olmadığının araştırılmasında ve ikincisi ise, iki metodun kesinlikleri arasında bir fark olup olmadığının anlaşılmasındadır. Üç değişken ile optimizasyon deneylerinde değişkenlerin kodlu ve kodsuz değerleri ile MKT için önerilen deney programı Çizelge 3.5 ve 3.6' da verilmektedir.

Çizelge 3. 5. MKT için değişkenlerin kodlu ve kodsuz değerleri

Değişkenler	Kodlu değerler				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
pH (X_1)	1.30	3.00	5.50	8.00	9.70
Sıcaklık (X_2) (°C)	11.48	20.00	32.50	45.00	53.52
Cd Cons. (X_3) (mg/L)	9.77	20.00	35.00	50.00	60.23

Çizelge 3.6. MKT için önerilen deney programı

Deney No	pH (X_1)	Sıcaklık (°C, X_2)	Cd Cons. (mg/L, X_3)
1	5.50(0)	11.48($-\alpha$)	35.00(0)
2	5.50(0)	32.50(0)	9.77($-\alpha$)
3	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)
4	8.00(+1)	45.00(+1)	20.00(-1)
5	5.50(0)	32.50(0)	60.23(+ α)
6	9.70(+ α)	32.50(0)	35.00(0)
7	3.00(-1)	20.00(-1)	50.00(+1)
8	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)
9	3.00(-1)	20.00(-1)	20.00(-1)
10	8.00(+1)	20.00(-1)	20.00(-1)
11	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)
12	8.00(+1)	20.00(-1)	50.00(+1)
13	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)
14	3.00(-1)	45.00(+1)	20.00(-1)
15	5.50(0)	53.52(+ α)	35.00(0)
16	1.30($-\alpha$)	32.50(0)	35.00(0)
17	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)
18	8.00(+1)	45.00(+1)	50.00(+1)
19	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)
20	3.00(-1)	45.00(+1)	50.00(+1)

3.3.2. Sonuçların Optimizasyonu

Bu bölümde cevap yüzeyin yapısını karakterize eden ve çalışılan parametrelerin X_1 (pH), X_2 (sıcaklık) ve X_3 (Co) deney koşullarının optimum noktalarının nasıl bulunacağına değinilecektir. Bunun için sadece MKT’ de bulunan quadratik model eşitliği yeterlidir.

CYY’ de elde edilen grafikler optimizasyon için önemli bir rol oynar. Cevap yüzeyi analizi için bilgisayar yazılımı kullanan düzgün grafikleri üreterek bir deneyci genellikle yüzeyin şeklini karakterize edebilir ve mantıklı bir tahminle optimum noktayı tayin

edebilir (Aktaş, 2005; Montgomery, 1996; Şahan ve ark., 2010). Optimum (sabit) noktanın (X_s) tayini için genel bir matematiksel çözüm elde edebiliriz. Matris yöntemiyle ikinci derece (kuadratik) modeli yazarak, aşağıdaki bağıntıya sahip olabiliriz.

$$y = \beta_0 + x^T b + x^T B x_s$$

$$x_s = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \vdots \\ X_k \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \beta_{12}/2 & \beta_{1k}/2 \\ - & \beta_{22} & \beta_{2k}/2 \\ \text{Simetri} & - & \beta_{kk} \end{bmatrix}$$

Burada;

b : Birinci derece regresyon katsayılarının bir vektörü

B : Ana diyagonal bileşenlerinin kuadratik (kare) katsayılarından (β_{ii}) ve diyagonal dışı bileşenlerinin interaksiyon kuadratik katsayılarının (β_{ij} , $i \neq j$) yarısından oluştuğu simetrik matris olarak tanımlanır. Burada x bileşenlerine göre y nin türevi alınır ve sıfıra eşitlenirse;

$$\frac{\partial y}{\partial x} = b + 2Bx_s = 0 \quad (3.3)$$

eşitliği elde edilir. Optimum nokta bu eşitlikten veya

$$x_s = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (3.4)$$

eşitliğinin çözümünden bulunabilir. Buradan bulunan değerler en iyi yanıtı veren değerlerdir ve deneylerle doğrulanmalıdır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

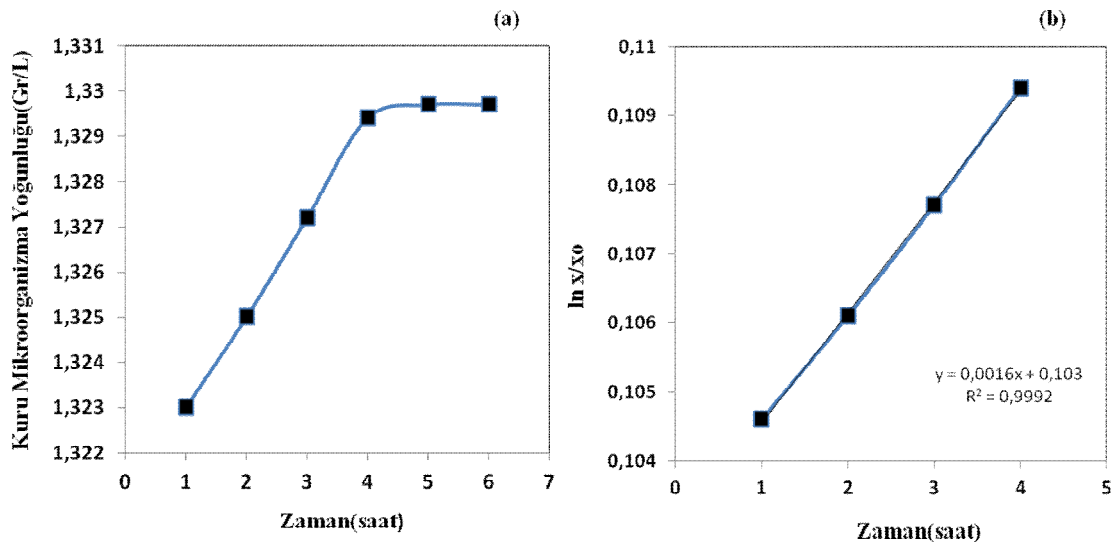
4.1. Özgül Çoğalma Koşullarının Optimizasyonu

Özgül çoğalma koşullarının optimizasyonu tek adımda gerçekleştirilmiştir. Bu adımda; MKT deneyleri gerçekleştirilerek özgül çoğalmayı etkileyen en iyi yanıtın alındığı noktalar belirlenmiştir.

4.1.1. MKT deneyleri ve sonuçları

Özgül çoğalmayı etkileyen parametreler pH, sıcaklık, konsantrasyon ve gibi faktörlerin optimizasyonu için MKT uygulandı. Uygulanan MKT ile özgül çoğalma hızı yanıt olarak alındı. MKT deneyleri ve sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Özgül çoğalma hızı hesaplanırken öncelikle kuru mikroorganizma yoğunluğuna karşılık zaman grafiği çizildi (şekil 4.1.a). Bu grafiğin lineer artış gösteren noktaları alınarak bu noktalardan $\ln x/x_0$ 'a karşılık zaman grafiği çizildi (şekil 4.1.b). Çizilen bu grafiğin eğimi hesaplanarak özgül çoğalma hızı elde edildi. Aşağıda örnek olması açısından MKT deney programındaki 9. deneyin özgül çoğalma hızı hesaplanmasında kullanılan grafikler verilmiştir.



Şekil 4.1. Kuru mikroorganizma yoğunluğuna karşılık zaman grafiği (a) ve $\ln x/x_0$ 'a karşılık zaman grafiği (b).

Çizelge 4.1. MKT için önerilen deney programı

Deney No	pH (X ₁)	Sıcaklık (°C, X ₂)	Cd Cons. (mg/L, X ₃)	Özgül Çoğalma (1/saat)
1	5.50(0)	11.48(-α)	35.00(0)	0.0016
2	5.50(0)	32.50(0)	9.77(-α)	0.0004
3	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0850
4	8.00(+1)	45.00(+1)	20.00(-1)	0.0326
5	5.50(0)	32.50(0)	60.23(+α)	0.0016
6	9.70(+α)	32.50(0)	35.00(0)	0.0005
7	3.00(-1)	20.00(-1)	50.00(+1)	0.0008
8	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0790
9	3.00(-1)	20.00(-1)	20.00(-1)	0.0016
10	8.00(+1)	20.00(-1)	20.00(-1)	0.0185
11	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0850
12	8.00(+1)	20.00(-1)	50.00(+1)	0.0017
13	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0816
14	3.00(-1)	45.00(+1)	20.00(-1)	0.0017
15	5.50(0)	53.52(+α)	35.00(0)	0.0028
16	1.30(-α)	32.50(0)	35.00(0)	0.0017
17	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0760
18	8.00(+1)	45.00(+1)	50.00(+1)	0.0090
19	5.50(0)	32.50(0)	35.00(0)	0.0715
20	3.00(-1)	45.00(+1)	50.00(+1)	0.0015

Sonuçların uyumluluğu Çizelge 4.2' de gösterilen regresyon analizi ile değerlendirildi. Sonuçlara göre önerilen modelde $p(0,0001) < 0.05$ olduğu görülmektedir. Bu da önerilen model eşitliğinin istatistiksel olarak yaklaşık %99.50 güven aralığında önemli olduğunu göstermektedir.

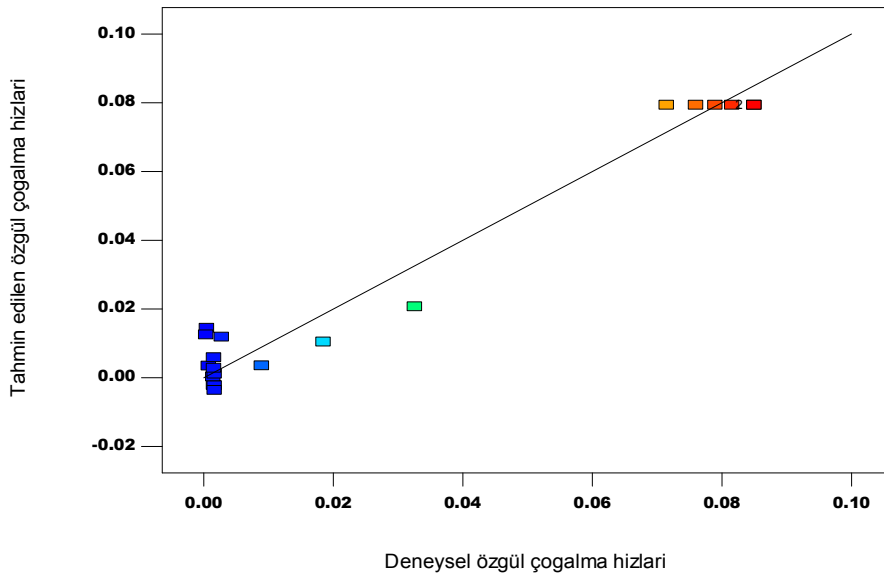
Çizelge 4. 2. MKT için regresyon analiz sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	DF	F-Değeri	p-Değeri	
Model	0.2612	9	29.37	0.0001	Önemli
X ₁	0.215	1	2.42	0.1511	
X ₂	0.4295	1	0.48	0.5030	
X ₃	0.1136	1	1.28	0.2849	
X ₁ X ₂	0.5305	1	0.6	0.4578	
X ₁ X ₃	0.1940	1	2.18	0.1705	
X ₂ X ₃	0.4805	1	0.054	0.8209	
X ₁ ²	0.9229	1	103.76	0.0001	
X ₂ ²	0.8948	1	100.60	0.0001	
X ₃ ²	0.9255	1	104.05	0.0001	

$$R^2 = 0.84$$

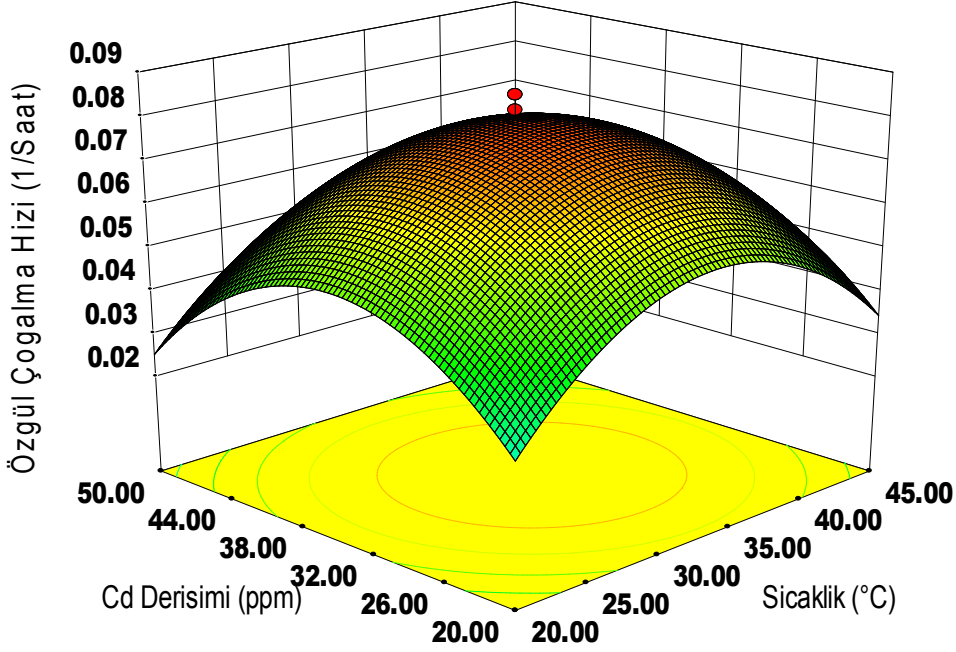
Regresyon analizinden sonra özgül çoğalma hızı Cd konsantrasyonu, pH ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak veren quadratik model eşitliği (model tarafından önerilen) gerçek değerleri için Eşitlik 4.1 de verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Özgül çoğalma hızı}(1/\text{saat})(\text{Gerçek değerler}) = & -0.37146 + 0.048045[\text{pH}] + \\ & 0.010199[\text{Sıcaklık}] + 8.54850\text{E-}003[\text{Cd konsantrasyonu}] + 8.24000\text{E-} \\ & 005[\text{pH}][\text{Sıcaklık}] - 1.31333\text{E-}004[\text{pH}][\text{Cd(konsantrasyonu)}] - 4.13333\text{E-} \\ & 006[\text{Sıcaklık}][\text{Cd(konsantrasyonu)}] - 4.04901\text{E-}003[\text{pH}]^2 - 1.59472\text{E-}004[\text{Sıcaklık}]^2 - \\ & 1.12630\text{E-}004[\text{Cd(konsantrasyonu)}]^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$



Şekil 4.2. Teorik olarak hesaplanan değerlere karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı

Şekil 4.2. model tarafından teorik olarak hesaplanan değerlere karşı gözlenen (deneysel) değerlerin ilişkisini göstermektedir. Deneysel verilerle modelden hesaplanan değerlerin bazı noktalarda uyumlu olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmada, mikroorganizma çoğalma hızına etki eden parametre sayısının fazla ve konunun hassas olmasından ötürü, noktalar arasında belirgin bir uyum gözlenememiştir.

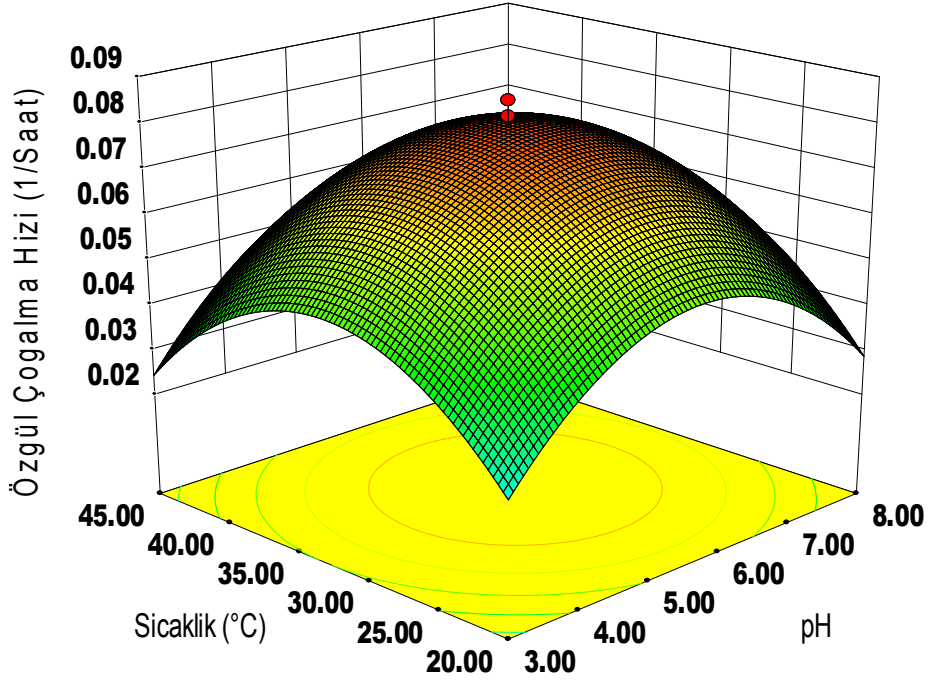


Şekil 4.3. Sabit pH değerinde (5.50) Cd iyonunun ve sıcaklığın özgül çoğalma hızına etkisi

Şekil 4.3’de özgül çoğalma hızı üzerine Cd konsantrasyonunun ve sıcaklığın etkisi görülmektedir. Görüldüğü üzere özgül çoğalma hızı sıcaklık 20 °C den 35 °C ye yükselirken artmaktadır, özgül çoğalma hızının maksimum değerinin ise yaklaşık olarak 35 °C de olduğu görülmektedir. Bu sıcaklığın üzerinde ise özgül çoğalma hızının düştüğü görülmektedir. Özgül çoğalma hızındaki artış ve azalışın nedeni olarak sıcaklığın *L. Bacillus Brevis* enzim sistemi üzerindeki etkisiyle açıklanabilir. Düşük sıcaklık ($T < 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), *L. Bacillus Brevis* üremesi üzerine inhibisyon etkisi yaparken, yüksek sıcaklık ($T > 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) ise enzim sistemini bozmaktadır. Böylece optimum sıcaklığın üzerinde mikroorganizmada ki büyüme sıcaklığın artışıyla birlikte düşer ve ölümler başlar. Benzer bir çalışmada da (Marcobal ve ark., 2006) sıcaklığın *L. Bacillus Brevis* enzim sistemini belli bir sıcaklığa kadar pozitif yönde etkilediği daha sonra ise negatif yönde etki ettiğini vurgulamıştır. Chunlong ve ark.,(2013) çalışmasında pH 4.00-6.00 aralığında ve sıcaklık ise 25-45 °C aralığında çalışmış, optimum sıcaklık 35 °C ve optimum pH’ı ise 5.5 olarak gözlemlemiştir.

Şekilden Cd(II) konsantrasyonunun 20 mg/L den 38 mg/L ye yükselmesiyle özgül çoğalma hızının arttığı ve özgül çoğalma hızının en yüksek olduğu noktanın ise yaklaşık 35 mg/L olduğu görülmektedir. Cd(II) derişimin 38 mg/L nin üstündeki

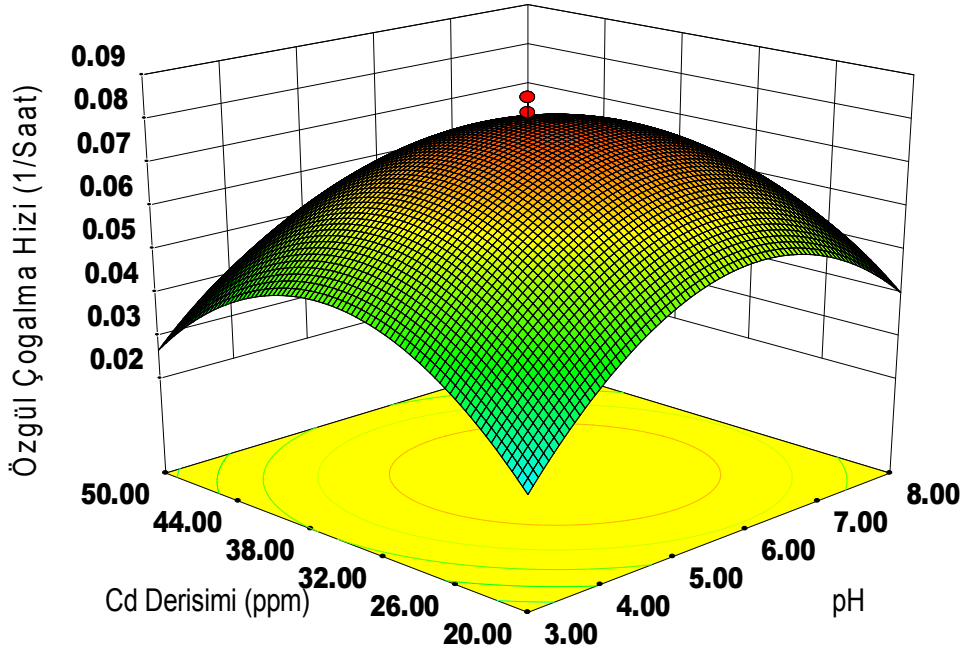
değerlerinde *L. Brevis*in özgül çoğalma hızının azaldığı görülmektedir. Artan konsantrasyonla özgül çoğalma hızındaki bu azalma hücre yüzeyindeki metallere belli bir konsantrasyona kadar hücre tarafından kullanılması ve daha sonra ise doygunluğa ulaşmasıyla birlikte toksik etki yaparak mikroorganizmayı inhibe etmesiyle açıklanabilir (Uslu, 1999).



Şekil 4.4. Sabit Cd(II) konsantrasyonunda (35 mg/L) sıcaklığın ve pH'ın özgül çoğalma hızına etkisi

Şekil 4.4. Sabit Cd (II) konsantrasyonunda sıcaklığın ve pH'ın özgül çoğalma hızına etkisini göstermektedir. Özgül çoğalma hızının pH 3.0'dan 6.0'a yükselirken arttığı ve pH 6.0'dan 8.0'e yükselirken negatif yönde azalmaya başladığı şekilden görülmektedir. Optimum pH'ın ise yaklaşık olarak 5.5 olduğu gözlenmiştir. pH ve sıcaklığın özgül çoğalma hızı üzerindeki bu etkisi benzer çalışmalarda da gözlenmiştir (Marcobal ve ark., 2006). Ayrıca farklı mikroorganizmalar için özgül çoğalma hızı üzerinde pH ve Cd (II) iyonunun etkisi, Uslu (1999) tarafından da çalışılmış ve benzer etkiler gözlenmiştir.

Şekil 4.5'de ise sabit sıcaklık değerinde Cd konsantrasyonu ve pH'ın etkisi görülmektedir. Cd ve pH'ın etkisi yukarıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.



Şekil 4.5. Sabit sıcaklık değerinde (32. 5 °C) Cd(II) iyonunu ve pH'ın özgül çoğalma hızına etkisi

4.1.2. Sonuçların optimizasyonu

Çalışılan deneysel parametrelerin optimum değerlerinin belirlenmesi matematiksel olarak daha önce belirttiğimiz matris yöntemiyle yapılmıştır (Myers ve Montgomery, 2002; Şahan ve ark., 2010). Bunun için eşitlik 3.3 kullanılmıştır. L. Brevis özgül çoğalma hızı için MKT tarafından önerilen model eşitliği daha önce eşitlik (4.1) de verilmiştir.

Bu eşitlik yardımıyla **b** ve **B** matrislerini oluşturursak;

$$X_s (\text{Stationary points}) = \begin{bmatrix} X_1(\text{pH}) \\ X_2(\text{Sıcaklık}) \\ X_3(\text{Cd derişimi}) \end{bmatrix}, \quad b = \begin{bmatrix} 0.048045 \\ 0.010199 \\ 0.0085485 \end{bmatrix}$$

$$B = \begin{bmatrix} -4.04901E - 003 & 8.24E - 005/2 & -1.31333E - 005/2 \\ 8.24E - 005/2 & -0.0000159472 & -4.13333E - 006/2 \\ -1.31333E - 005/2 & -4.13333E - 006/2 & -1.1263E - 004 \end{bmatrix}$$

matrisleri meydana gelir (Montgomery, 1996).

$X_s = -\frac{1}{2}S^{-1}b$ (Eşitlik 3.3) eşitliğinden değerleri yerine koyarak gerekli işlemleri yaparsak optimum noktaları tespit ederiz.

$$X_s = -1/2 \begin{bmatrix} -250.0346263 & -66.50209024 & 146.9975702 \\ -66.50209024 & -6289.872441 & 154.18644 \\ 146.9975702 & 154.18644 & -8967.162103 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0.048045 \\ 0.010199 \\ 0.0085485 \end{bmatrix}$$

$$= \begin{bmatrix} 5.72 \\ 33.01 \\ 34.01 \end{bmatrix}$$

Eşitlikten elde edilen optimum noktalar aşağıdaki gibi belirlendi.

pH = 5.72

Sıcaklık = 33.01 °C

Cd Konsantrasyonu = 34,01 mg/L

Bu optimum noktalarda teorik olarak hesaplanan özgül çoğalma hızı aşağıda verilmiştir. Ayrıca optimum şartlarda yapılan deneylerle de bu sonuç doğrulanmıştır.

Özgül Çoğalma Hızı (Rate) = 0.0797 1/sa

GENEL SONUÇLAR

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verileri özet olarak aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

1. Başlangıç olarak mikroorganizmalar onlarla beraber gönderilen reçete ile canlandırıldı ve katı besiyerinde muhafaza edilmiştir.
2. Kuru mikroorganizmalara karşı adsorpsiyon kalibrasyon grafiği çizilmiştir.
3. Mikroorganizmalar için ilk başta uygun çoğalma koşulları hazırlanmıştır.
4. Özgül çoğalma hızına etki eden parametreler, pH, sıcaklık, metal iyonu konsantrasyonu (C_0) olarak belirlenmiştir.
5. Optimizasyon için optimuma yakın parametre aralıkları MKT programında kullanılmış ve program tarafından öngörülen deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucu optimum koşullar pH = 5,72, sıcaklık = 33,01°C, Cd(II) konsantrasyonu (C_0) = 34,01 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu optimum noktalarda özgül çoğalma hızı 0.0797 1/s olarak bulunmuştur. Bu sonuç yapılan deneylerle doğrulanmıştır.
6. Sonuçlar literatür ile karşılaştırılmış ve elde edilen verilerin literatüre uygun olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Aksit, F., Akgün, Y., Kiraz, N., 1996. *Mikrobiyoloji*. Editör: Serter, T. Anadolu Üniversitesi Yayınları no: 490, Açıköğretim Fakültesi Yayınları no: 21.
- Aktas, N., 2003. *Akiskan yatak biyofilm reaktörde (AYBR) peyniraltı atık suyunun arıtılması ve sistem performansının modellenmesi*. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Aktas, N., 2005. Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM) , *Enzyme and microbial technology* **37**: 441-447.
- Aktas, N., Boyacı I. H., Mutlu M., Tanyolac A., 2006. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by Kluyveromyces marxianus using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology* **97**: 2252–2259.
- Almaas E, Kovács B, Vicsek T, Oltvai Z, Barabási A, 2004. Global organization of metabolic fluxes in the bacterium Escherichia coli. *Nature* **427 (6977)**: 839–43.
- Aronson AI, Shai Y, 2001. Why Bacillus thuringiensis insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* **195 (1)**: 1–8.
- Bober, J. A., Demirci, A., 2004. Nisin fermentation by lactococcus lactis subsp. Lactis using plastic composite supports in biofilm reactors. *Journal of Scientific Research and Development* Vol. VI. Manuscript FP 04 001.
- Bozsik A, 2006. Susceptibility of adult Coccinella septempunctata (Coleoptera: Coccinellidae) to insecticides with different modes of action. *Pest Manag Sci* **62 (7)**: 651–4.
- Byron, C, H, Chu ., Hung, L., 2007. Genetic improvement of Saccharomyces cerevisia for xylofen fermentation. *Biotechnology Advances* **25**: 425-441.
- Carla J.S.M. Silva., Ines C. Roberto., 2001. Optimization of xylitol production by Candida guilliermondii FTI. *Process Biochemistry*, **36**: 1119–1124
- Challis G, Hopwood D, 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species. *Proc Natl Acad Sci U S a* **100 Suppl 2**: 14555–61.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar N, Bhatnagar R, 2004. Bacterial insecticidal toxins. *Crit Rev Microbiol* **30 (1)**: 33–54.

- Cohen Y, 2002. Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int Microbiol* **5** (4): 189–93.
- Dalton H, 2005. The Leeuwenhoek Lecture 2000 the natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360** (1458): 1207–22.
- Demirci. A., Pometto. A. L., Ho. K. L. G., 1997. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors. *J. Ind. Microbiology* **19**: 299-304.
- Drake H, Daniel S, Küsel K, Matthies C, Kuhner C, Braus-Stromeyer S, 1997. Acetogenic bacteria: what are the in situ consequences of their diverse metabolic versatilityes. *Biofactors* **6** (1): 13–24.
- Eagon R.,2004. *Pseudomonas natriegens*, a marine bacterium with a generation time of less than 10 minutes. *J Bacteriol* **83**: 736–7.
- Fredrickson J, Zachara J, Balkwill D, 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste contaminated vadose sediments at the Hanford site. *Washington state*.
- Gönen, F., Aksu, Z., 2007. Use of response surface methodology (RSM) in the evaluation of growth and copper(II) bioaccumulation properties of *Candida utilis* in molasses medium. *Journal of Hazardous Materials* **154**: 731–738.
- Graumann K, Premstaller A, 2006. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* **1** (2): 164–86.
- Hagedorn S, Kaphammer B, 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 773–800.
- Hellingwerf K, Crielaard W, Hoff W, Matthijs H, Mur L, van Rotterdam B, 1994. Photobiology of bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65** (4): 331–47.
- Ho, K, L, G., Pometto, A ., Hinz, P., 1997. Optimization of L-(1)-lactic acid production by ring and discPlastic composite supports through repeated batch biofilm sfermentation. *Applied and Enviromental Microbiology*, **63**: 2533–2542
- Hwang, S., Hansen, H.L., 1997. Modeling and optimization in anaerobic bioconversion of complex substrates to acidic and butyric acids. *Biotechnology and Bioengineering*, **54** (5): 451–460
- Ishige T, Honda K, Shimizu S, 2005. Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol.*, **9** (2): 174–80.

- Jaiswal A K, Abu-Ghannam N, 2013. Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products* 50:212– 218.
- Johnson M, Lucey J, 2006. Major technological advances and trends in cheese. *J Dairy Sci.*, **89** (4): 1174–8.
- Koch A, 2002. Control of the bacterial cell cycle by cytoplasmic growth. *Crit Rev Microbiol*, **28** (1): 61–77.
- Kooijman S, Auger P, Poggiale J, Kooi B, 2003. Quantitative steps in symbiogenesis and the evolution of homeostasis. *Biol Rev Camb Philos Soc* **78** (3): 435–63.
- Lasrado L D, Gudipati M, 2013. Purification and characterization of β -d-xylosidase from *Lactobacillus brevis* grown on xylo oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers* 92 : 1978– 1983.
- Myers ve Montgomery, 2002. *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Second Edition.
- Neves LC, Miyamura TT, Moraes DA, Penna TC, Converti A, 2006. Biofiltration methods for the removal of phenolic residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **129-132**: 130–52.
- Okur O., 2006. *Peynir atık suyundan etil alkol üretilmesinin modellenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özçelik, A., 1996. “*Genel Mikrobiyoloji*”. Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Isparta.
- Öner, M., 1992. “*Genel Mikrobiyoloji*”. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitapları Serisi, No:94, İzmir.
- Öztürk, Dilara. *Ağrı dağı eteğinden toplanan pomza örnekleri üzerine kurşun (II) adsorpsiyonunun incelenmesi ve ortam koşullarının CYY (cevap yüzeyi yöntemi) ile optimizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Van.
- Paerl H, Fulton R, Moisander P, Dyble J, 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Scientific World Journal* **1**: 76–113.
- Rappé MS, Giovannoni SJ, 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**: 369–94.

- Sahan, Tekin., 2008. *Atık sular da bulunan bazı ağır metallerin biyosorpsiyon ile uzaklaştırılması ve biyosorpsiyon kosullarının optimizasyonu*. (Doktora tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Sakamoto, Kanta,2002. Bira bozulma bakteri ve hop direnç *Lactobacillus brevis*. **Groningen Üniversitesi, Bölüm 1, s. 5-6**.
- Sears CL, 2005. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. ***Anaerobe* 11 (5): 247–51**.
- Serres M, Gopal S, Nahum L, Liang P, Gaasterland T, Riley M, 2001. A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome. ***Genome Biol* 2 (9): RESEARCH0035**.
- Tanyolaç, A., Beyenal, H ., 1997. Prediction of average biofilm density and performance of spherical bioparticle under substrate inhibition. ***John Willey and Sons* 0006- 3592/030319-11**.
- Thomson R, Bertram H, 2001. Laboratory diagnosis of central nervous system infections. ***Infect Dis Clin North Am* 15 (4): 1047–71**.
- Uslu, G., 1999. ***Kurşun(II),Kadmiyum(II),Bakır(II) iyonlarının R.arrhizus'un üreme kinetiğine etkisi ve adsorpsiyonu***. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Yöntem, V.,2010. ***Maya Kültürlerinden Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması***.Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Walsh G, 2005. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. ***Appl Microbiol Biotechnol* 67 (2): 151–9**.
- Whitman W, Coleman D, Wiebe W, 1998. Prokaryotes: the unseen majority. ***Proc Natl Acad Sci U S a* 95 (12): 6578–83**.
- Xu J, 2006. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. ***Mol Ecol* 15 (7): 1713–31**.
- Yao, Q, H., Tian, W, T., 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium production of lipase with *Candida* sp. 99-125. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43: 9–14**.

- You-ling G , Cai-sheng W, Qiu-hua Z, Guo-ying Q, 2013. Optimization of Solid-State Fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for Trypsin Inhibitor Degradation in Soybean Meal. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5): 869-876.
- Yuying Sun., Baoqin Han., Wanshun Liu., Jiquan Zhang., Xingshuang .,2007. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01. *Bioresource Technology* **98**: 1548–1553.
- Zehr J, Jenkins B, Short S, Steward G, 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* **5 (7)**: 539–54.
- Zillig W, 1991. Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Curr Opin Genet Dev* **1 (4)**: 544–51.
- Zumft W, 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol. Biol. Rev* **61 (4)**: 533–616.

EKLER

EK 1. Merkezi kompozit tasarım istatistiksel verileri

(Design-Expert 8.0.7.1 Orijinal çıktısı)

Response: Özgül çoğalma hızı

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	p-value Prob > F
Model	0.024	9	2.612E-003	29.37	< 0.0001 significant
<i>A-pH</i> 2.150E-004	1	2.150E-004	2.420.1511		
<i>B-Temperature</i>	4.295E-005	1	4.295E-005	0.48	0.5030
<i>C-Cd cons.</i>	1.136E-004	1	1.136E-004	1.28	0.2849
<i>AB</i>	5.305E-005	1	5.305E-005	0.60	0.4578
<i>AC</i>	1.940E-004	1	1.940E-004	2.18	0.1705
<i>BC</i>	4.805E-006	1	4.805E-006	0.054	0.8209
<i>A²</i>	9.229E-003	1	9.229E-003	103.76	< 0.0001
<i>B²</i>	8.948E-003	1	8.948E-003	100.60	< 0.0001
<i>C²</i>	9.255E-003	1	9.255E-003	104.05	< 0.0001
Residual	8.895E-004	10	8.895E-005		
<i>Lack of Fit</i>	7.482E-004	5	1.496E-004	5.30	0.0456 significant
<i>Pure Error</i>	1.412E-004	5	2.824E-005		
Cor Total	0.024	19			

The Model F-value of 29.37 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 A², B², C² 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.

ÖZ GEÇMİŞ

Yazar 1984 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladıktan sonra 2005 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında mezun oldu ve 2010 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Fizikokimya bilim dalında yüksek lisansa başladı.