

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DOLGULU KOLON BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE A-AMİLAZ
VE SELÜLAZ ENZİMİNİN EŞ ZAMANLI BİYOSENTEZİ**

Fatıma ASLAN

Yüksek Lisans Tezi

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2025

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**DOLGULU KOLON BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE A-AMİLAZ VE
SELÜLAZ ENZİMİNİN EŞ ZAMANLI BİYOSENTEZİ**

Tez Yazarı
Fatıma ASLAN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN

TEMMUZ 2025
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı:	Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sisteminde α -Amilaz ve Selüloz Enziminin Eş Zamanlı Biyosentezi
Yazarı:	Fatıma ASLAN
İlk Teslim Tarihi:	16.06.2025
Savunma Tarihi:	14.07.2025

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Doç. Dr. Ayşe BİÇER Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza

Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Dolgu Kolon Biyoreaktör Sisteminde α -Amilaz ve Selüloz Enziminin Eş Zamanlı Biyosentezi” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

14.07.2025

Fatıma ASLAN



ÖNSÖZ

Lignoselülozik biyokütle, doğada yaygın olarak bulunması ve mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilen besin bileşenlerine sahip olması nedeniyle, sürdürülebilir biyoteknolojik proseslerde potansiyel bir kaynak olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, artan küresel talebe rağmen, yüksek üretim maliyetleri α -amilaz ve selüloz enzimlerinin endüstriyel ölçekte yaygın olarak kullanımını sınırlamaktadır. Katı hal fermentasyonu ile mikrobiyal α -amilaz ve selüloz enzimlerinin iki aşamalı optimizasyonunun gerçekleştirildiği bu tez çalışmasının temel amacı, tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünlerin değerlendirilmesi yoluyla hem çevresel hem de ekonomik açıdan sürdürülebilir üretim modellerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktır.

Tez çalışmasının hayata geçmesine doğrudan katkı sunan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN'e, bilimsel rehberliği ve sabrıyla sürecin her aşamasında yanımda olduğu için en içten teşekkürlerimi sunarım. Deneylerin gerçekleştirilmesinde laboratuvar olanaklarını sağlayan Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'ne; teknik destekleriyle katkıda bulunan tüm akademik ve idari personele ve bu süreçte manevi desteklerini her zaman hissettiren kıymetli aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP) tarafından **MF.25.43** protokol numaralı proje ile desteklenmiştir.

Fatma ASLAN
ELAĞ, 2025

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
EKLER LİSTESİ.....	xii
SİMGELER.....	xiii
KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. FERMENTASYON TEKNOLOJİSİ.....	2
2.1. Modern Fermentasyon Prosesine Genel Bir Bakış	2
2.1.1. Üst Akım İşlemleri	3
2.1.2. Alt Akım İşlemleri.....	9
2.2. Derin Kültür Fermentasyonu	10
2.3. Katı Hal Fermentasyonu.....	11
2.3.1. Katı Hal Fermentasyonunun Kısa Tarihi	12
2.3.2. Katı Hal Fermentasyonunda Etkin Olan Faktörler	13
2.3.3. Katı Hal Fermentasyonu Biyoreaktörleri.....	18
2.3.4. Katı Hal Biyoreaktörlerinde İşletim ve Ölçeklendirme Sorunları	26
2.3.5. Katı Hal Fermentasyonunda Alt Akım İşlemleri.....	27
2.3.6. Katı Hal Fermentasyonu ile Derin Kültür Fermentasyonunun Karşılaştırılması	28
3. CEVAP YÜZEYİ YÖNTEMİ	32
3.1. Merkezi Kompozit Tasarım	32
4. ENZİMLER	34
4.1. Enzimlerin Yapısı.....	34
4.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	36
4.2.1. Hidrolazlar	37
4.3. Endüstriyel Enzim Kaynakları	39
4.3.1. Mikroorganizmalar.....	39
4.3.2. Hayvanlar ve Bitkiler.....	42
4.4. Küresel Enzim Pazarı	42
5. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI	44
5.1. α -Amilaz Üretimi.....	44
5.2. Selüloz Üretimi	47
5.3. Eş Zamanlı Enzim Üretimi	49
6. MATERYAL VE METOT	53
6.1. Materyaller.....	53
6.1.1. Katı Substratlar.....	53
6.1.2. Mikroorganizma.....	53
6.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Laboratuvar Cihazları.....	53

6.2. Metot.....	55
6.2.1. Katı Substratların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	56
6.2.2. Mikrobiyal Kültürün Hazırlanması ve Saklama Koşulları	58
6.2.3. Deneysel Tasarım.....	59
6.2.4. Enzim Ekstraksiyonu.....	62
6.2.5. Enzim Aktivite Tayini	62
7. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	66
7.1. Katı Substratların Temel Bileşen Analizi	66
7.2. Fermentasyon Ortamı Optimizasyonu	66
7.3. Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sistemi İşletim Koşullarının Optimizasyonu.....	80
8. SONUÇLAR.....	89
ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	92
EKLER	107
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sisteminde α -Amilaz ve Selüloz Enziminin Eş Zamanlı Biyosentezi

Fatıma ASLAN

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Temmuz 2025, Sayfa: xiv + 106

Bu çalışmada, *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 suşu kullanılarak, mısır kepeği ve fındık küspesinden oluşan bir substrat karışımı üzerinde katı hal fermentasyonu (KHF) yöntemiyle α -amilaz ve selüloz enzimlerinin eşzamanlı üretimi gerçekleştirilmiştir. Her bir enzim için en uygun fermentasyon ortam bileşimi erlenmayerlerde optimize edilmiş ve ardından laboratuvar ölçekli dolgulu kolon biyoreaktör sisteminde işletim koşullarının enzim üretimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Her iki optimizasyon aşamasında Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) yaklaşımı kullanılmıştır. Erlenmayer deneylerinde α -amilaz için optimum ortam bileşimi kütlege %25 mısır kepeği, %75 fındık küspesi, 6.0 ml inokülüm hacmi ve 1.6 ml azot kaynağı; selüloz için ise %52 mısır kepeği, %48 fındık küspesi, 4.8 ml inokülüm hacmi ve 1.5 ml azot kaynağı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda en yüksek α -amilaz (120.3 U/g) ve selüloz (1138.4 U/g) aktivitelerine sırasıyla 114 ve 90 saatlik inkübasyon sonunda ulaşılmıştır. Optimum ortam bileşimleri dolgulu kolon biyoreaktör sistemine aktarılmış ve α -amilaz için 0.154 l/dk hava akış hızı, 35.8 °C sıcaklık ve 15 g dolgu miktarı; selüloz için ise 0.164 l/dk hava akış hızı, 35.5 °C sıcaklık ve 14.5 g dolgu miktarı koşullarında sırasıyla 190.9 U/g ve 1354.8 U/g enzim aktivitelerine ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile mısır kepeği ve fındık küspesi gibi endüstriyel yan ürünlerin belirli oranlarda karıştırılarak katı hal fermentasyonunda substrat olarak değerlendirilebileceği ve uygun optimizasyon stratejileri ile ticari olarak değerli enzimlerin üretilebileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Katı hal fermentasyonu, *Bacillus amyloliquefaciens*, Dolgulu kolon biyoreaktörü, α -Amilaz, Selüloz, Mısır kepeği, Fındık küspesi

ABSTRACT

Simultaneous Biosynthesis of α -Amylase and Cellulase Enzymes in a Packed-Bed Bioreactor System

Fatima ASLAN

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering

July 2025, Pages: xiv + 106

This study focused on the simultaneous production of α -amylase and cellulase enzymes through solid-state fermentation (SSF) using *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 on a substrate mixture composed of maize bran and hazelnut oil cake. The optimal fermentation medium composition for each enzyme was first optimized in Erlenmeyer flasks. Subsequently, the effects of operational parameters on enzyme production were evaluated in a laboratory-scale packed-bed bioreactor. Central Composite Design (CCD) was used in both optimization steps.

For α -amylase, the optimum medium consisted of 25% (w/w) maize bran, 75% hazelnut oil cake, 6.0 ml inoculum volume, and 1.6 ml nitrogen source. For cellulase, the optimal composition was 52% maize bran, 48% hazelnut oil cake, 4.8 ml inoculum volume, and 1.5 ml nitrogen source. Under these conditions, maximum α -amylase (120.3 U/g) and cellulase (1138.4 U/g) activities were obtained after 114 and 90 hours of incubation, respectively.

The optimized media were then applied to the packed-bed bioreactor. The highest α -amylase activity (190.9 U/g) was observed at 0.154 L/min airflow rate, 35.8 °C temperature, and 15 g packing material. Maximum cellulase activity (1354.8 U/g) was reached at 0.164 L/min airflow, 35.5 °C, and 14.5 g packing.

These results demonstrate that agro-industrial by-products can be effectively used as a mixed substrate in SSF, and that commercially valuable enzymes can be produced through proper medium and process optimization.

Keywords: Solid-state fermentation, *Bacillus amyloliquefaciens*, Packed-bed bioreactor, α -Amylase, Cellulase, Maize bran, Hazelnut oil cake

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Endüstriyel ölçekli bir biyoprosesin şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. Ortam optimizasyonunda kullanılan yöntemler	6
Şekil 2.3. Karıştırırmalı tank biyoreaktörünün şematik gösterimi	10
Şekil 2.4. Katı hal fermentasyonu sistemlerinin tanımlayıcı özellikleri.....	11
Şekil 2.5. Tepsili biyoreaktörün genel yapısı	18
Şekil 2.6. Lignoselülozik biyokütle dönüşümüne yönelik tipik bir katı hal dolgulu kolon biyoreaktörünün şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.7. Raimbault dolgulu kolon biyoreaktörü sistemi	21
Şekil 2.8. Döner tamburlu biyoreaktörün genel yapısı ve çalışma prensibi	23
Şekil 2.9. Karıştırırmalı tamburlu biyoreaktörün genel yapısı.....	24
Şekil 2.10. Gaz-katı akışkan (a) ve püskürtmeli (b) yatak biyoreaktörlerinin genel yapısı	26
Şekil 3.1. Üç faktörlü bir merkezi kompozit tasarımın şematik gösterimi	33
Şekil 4.1. Peptit bağının oluşumu	34
Şekil 4.2. Proteinlerin yapısal organizasyonunu oluşturan dört temel düzey	35
Şekil 4.3. Enzimlerin sınıflandırılması ve katalitik özellikleri	36
Şekil 4.4. Amilazların nişasta üzerindeki etkileri sonucu açığa çıkan ürünler	37
Şekil 4.5. <i>Trichoderma reesei</i> kaynaklı selülozların selüloz molekülü üzerindeki etki mekanizması	39
Şekil 4.6. <i>B.amyoliquefaciens</i> 'in uygulama alanları.....	41
Şekil 6.1. Dolgulu kolon biyoreaktör sisteminin genel yapısı	55
Şekil 6.2. KHF yöntemiyle yürütülen mikrobiyal enzim üretimine ilişkin deneysel akış şeması	56
Şekil 6.3. Katı substratların fiziksel görünüşleri ve deneylerde kullanılan fraksiyonlar.....	56
Şekil 6.4. Katı substratların temel bileşen analizleri.....	57
Şekil 6.5. Stok kültürden mikroorganizmanın canlandırılması ve kültür ortamlarına aktarımı	58
Şekil 6.6. KHF deneyleri	58
Şekil 6.7. Ön deneme çalışmaları sonucu elde edilen substrat yataklarının fiziksel görünüşleri	60
Şekil 6.8. Enzim ekstraksiyonuna ilişkin işlem basamaklarının şematik gösterimi	62
Şekil 6.9. α -Amilaz aktivite tayininde kullanılan analiz yöntemi	63
Şekil 6.10. Selüloz aktivite tayininde kullanılan analiz yöntemi	63
Şekil 6.11. α -amilaz (a) ve selüloz (b) örneklerinde gözlemlenen renk değişimleri	65
Şekil 7.1. Ortam optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve tahmin edilen enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması: a) α -amilaz, b) selüloz.....	68
Şekil 7.2. Ortam optimizasyonuna ilişkin studentleştirilmiş artıkların dağılımı: a) α -amilaz, b) selüloz.....	72

Şekil 7.3. α -Amilaz ortam optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: substrat miktarı (a), inokülüm hacmi (b), azot kaynağı miktarı (c) ve inkübasyon süresinin (d) α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....	73
Şekil 7.4. Selülaz ortam optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: substrat miktarı (a), inokülüm hacmi (b), azot kaynağı miktarı (c) ve inkübasyon süresinin (d) selülaz aktivitesi üzerine etkisi.....	74
Şekil 7.5. α -Amilaz ortam optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b), AD (c), BC (d) BD (e) ve CD (f) ikili etkileşimlerinin α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkileri	76
Şekil 7.6. Selülaz ortam optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b), AD (c), BC (d) BD (e) ve CD (f) ikili etkileşimlerinin selülaz aktivitesi üzerindeki etkileri	77
Şekil 7.7. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve tahmin edilen enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması: a) α -amilaz, b) selülaz	81
Şekil 7.8. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin studentleştirilmiş artıkların dağılımı: a) α -amilaz, b) selülaz.....	84
Şekil 7.9. α -Amilaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: hava akış hızı (a), sıcaklık (b) ve dolgu miktarının (c) α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....	85
Şekil 7.10. Selülaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: hava akış hızı (a), sıcaklık (b) ve dolgu miktarının (c) selülaz aktivitesi üzerine etkisi	85
Şekil 7.11. α -Amilaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b) ve BC (c) ikili etkileşimlerinin α -amilaz aktivitesi üzerine etkileri	86
Şekil 7.12. Selülaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b) ve BC (c) ikili etkileşimlerinin selülaz aktivitesi üzerine etkileri.....	87

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Hücre metabolizması ve mikrobiyal büyüme için gerekli olan elementler.....	5
Tablo 2.2. Katı hal fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan substratlar ve kimyasal bileşimleri.....	14
Tablo 2.3. Katı hal ve derin kültür fermentasyon yöntemlerinin karakteristik farklılıkları	28
Tablo 2.4. Katı hal fermentasyonunun avantajları	30
Tablo 2.5. Katı hal fermentasyonunun dezavantajları ve çözüm önerileri.....	31
Tablo 4.1. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstriyel uygulamaları.....	40
Tablo 6.1. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal madde ve bileşenler	53
Tablo 6.2. Çalışma kapsamında kullanılan çözeltilere ilişkin bilgiler	54
Tablo 6.3. Çalışma kapsamında kullanılan laboratuvar cihazlarına ilişkin bilgiler	54
Tablo 6.4. Ortam optimizasyonu için seçilen faktörler ve seviyeleri	59
Tablo 6.5. Biyoreaktör işletim koşulları için seçilen faktörler ve seviyeleri.....	59
Tablo 6.6. Ortam optimizasyonu ve biyoreaktör işletim koşullarına ait MKT deney matrisleri	61
Tablo 7.1. Ortam optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve model tarafından öngörülen enzim aktivite değerleri	67
Tablo 7.2. α -Amilaz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları.....	68
Tablo 7.3. Selüloz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları	68
Tablo 7.4. α -Amilaz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları	69
Tablo 7.5. Selüloz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları	70
Tablo 7.6. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve model tarafından öngörülen enzim aktivite değerleri	80
Tablo 7.7. α -Amilaz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları.....	81
Tablo 7.8. Selüloz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları.....	81
Tablo 7.9. α -Amilaz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	82
Tablo 7.10. Selüloz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	83
Tablo 8.1. α -Amilaz üretimi optimizasyonuna dair literatürde bildirilen bazı aktivite değerleri	90
Tablo 8.2. Selüloz (CMCaz) üretimi optimizasyonuna dair literatürde bildirilen bazı aktivite değerleri	90

EKLER LİSTESİ

	Sayfa
Ek- 1: Maltoz Standart Eğrisi	107
Ek- 2: Glukoz Standart Eğrisi	108



SİMGELER

C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
Ca ²⁺	: Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
Co ²⁺	: Kobalt(II) iyonu
CoCl ₂	: Kobalt klorür
Cu ²⁺	: Bakır (II) iyonu
CuSO ₄	: Bakır (II) sülfat
Fe	: Demir
Fe ³⁺	: Demir (III) iyonu
FeCl ₃	: Demir (III) klorür
FeSO ₄	: Demir (II) sülfat
H	: Hidrojen
Hg ²⁺	: Cıva (II) iyonu
K	: Potasyum
K ⁺	: Potasyum iyonu
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum fosfat
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
Mg	: Magnezyum
Mg ²⁺	: Magnezyum (II) iyonu
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
MgSO ₄ ·7H ₂ O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
Mn ²⁺	: Mangan (II) iyonu
MnCl ₂	: Mangan (II) klorür
N	: Azot
Na	: Sodyum
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum fosfat
Na ₂ MoO ₄	: Disodyum molibdat
NaCl	: Sodyum klorür
NH ₄ Cl	: Amonyum klorür
NiCl ₂	: Nikel (II) klorür
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
O	: Oksijen
P	: Fosfor
q_p	: Spesifik ürün oluşum hızı (g ürün/g hücre.sa)
S	: Kükürt
X	: Belirli bir andaki toplam hücre konsantrasyonu (g/L)
$Y_{P/S}$	: Birim substrat başına elde edilen ürün miktarı (g ürün/g substrat)
$Y_{X/S}$	: Birim substrat başına üretilen hücre (biyokütle) miktarı (g hücre/g substrat)
Zn ²⁺	: Çinko (II) iyonu
ZnCl ₂	: Çinko klorür
μ	: Spesifik büyüme hızı (sa ⁻¹)
q_P	: Spesifik ürün oluşum hızı (g ürün/g hücre·sa)

KISALTMALAR

AYB	: Akışkan yatak biyoreaktörü
CMC	: Karboksimetil selüloz
CMCaz	: Karboksimetil selülaz
DKF	: Derin kültür fermentasyonu
DKB	: Dolgulu kolon biyoreaktörü
DTB	: Döner tamburlu biyoreaktör
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FK	: Fındık küspesi
KHF	: Katı hal fermentasyonu
KTB	: Karıştırmalı tamburlu biyoreaktör
MK	: Mısır kepeği
PBT	: Plackett-Burman tasarımı
PYB	: Püskürtmeli yatak biyoreaktörü
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TM	: Taguchi metodu
TSTF	: Tek seferde tek faktör
UDE	: Ultrason destekli ekstraksiyon
YKHF	: Yarı katı hal fermentasyonu
YSA	: Yapay sinir ağları

1. Giriş

Enzimler, canlı organizmalar tarafından sentezlenen ve biyokimyasal reaksiyonları yüksek özgülük ve katalitik verimlilikle gerçekleştirebilen biyokatalizörlerdir. Günümüzde, atık oluşumunu azaltan ve kaynak kullanımını daha verimli hale getiren üretim yaklaşımlarının önem kazanmasıyla birlikte, enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kimyasal katalizörlere alternatif olarak kullanımına yönelik eğilim giderek artmaktadır. Özellikle α -amilaz ve selüloz gibi hidrolitik enzimler; gıda, tekstil, kâğıt, yem ve biyoyakıt üretimi gibi birçok alanda önemli bir yere sahiptir. Ancak bu enzimlerin ticari ölçekte üretimi, genellikle yüksek maliyetli hammaddelerin kullanımını gerektirmesi ve proses sırasında ortaya çıkan büyük miktarda atık su nedeniyle ekonomik ve çevresel açıdan sınırlayıcı olabilmektedir. Bu durum, üretim süreçlerinin daha sürdürülebilir hale getirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Katı hal fermentasyonu, özellikle mikrobiyal enzim üretimi açısından oldukça elverişli bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Bu sistem; düşük nem içeriğiyle çalışması, enerji ve su tüketiminin az olması ve pahalı besiyerlerine ihtiyaç duymaması gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. En dikkat çekici özelliği ise kolayca temin edilebilen ve çoğunlukla âtıl durumda bulunan tarımsal atıklar ile endüstriyel yan ürünlerin doğrudan ya da sınırlı bir ön işleme katı substrat olarak değerlendirilebilmesine olanak tanımasıdır. Bu yönüyle katı hal fermentasyonu hem ekonomik uygulanabilirlik hem de çevresel sürdürülebilirlik açısından güçlü bir potansiyel taşımaktadır.

Bu çalışmada, hidrolitik enzim üreticisi olarak ön plana çıkan *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinin NRRL B-645 suşu ile mısır kepeği ve fındık küspesinden oluşan bir substrat karışımı kullanılarak α -amilaz ve selüloz enzimlerinin eşzamanlı biyosentezine yönelik iki aşamalı bir optimizasyon süreci gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada ortam bileşimi optimize edilmiş; ardından elde edilen optimum kompozisyonlar, Raimbault tipi dolgu kolon biyoreaktör sistemine aktararak işletim koşullarının enzim üretimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Her iki optimizasyon aşamasında da Merkezi Kompozit Tasarım (MKT) yaklaşımı kullanılmıştır.

Literatürde genellikle tek bir substrat kullanılarak yalnızca bir enzimin üretimine odaklanıldığı ya da farklı tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünlerin enzim üretimi üzerindeki etkilerinin ayrı ayrı değerlendirildiği görülmektedir. Bu çalışmada ise farklı lignoselülozik materyallerin bir arada kullanılmasının mikrobiyal büyüme ve enzim üretimi üzerinde sinerjik etkiler oluşturabileceği düşüncesiyle substrat karışımı tercih edilmiştir. Böyle bir yaklaşım, aynı üretim sistemi içerisinde birden fazla enzimin verimli şekilde sentezlenebilmesi açısından potansiyel bir avantaj sunmaktadır.

2. FERMENTASYON TEKNOLOJİSİ

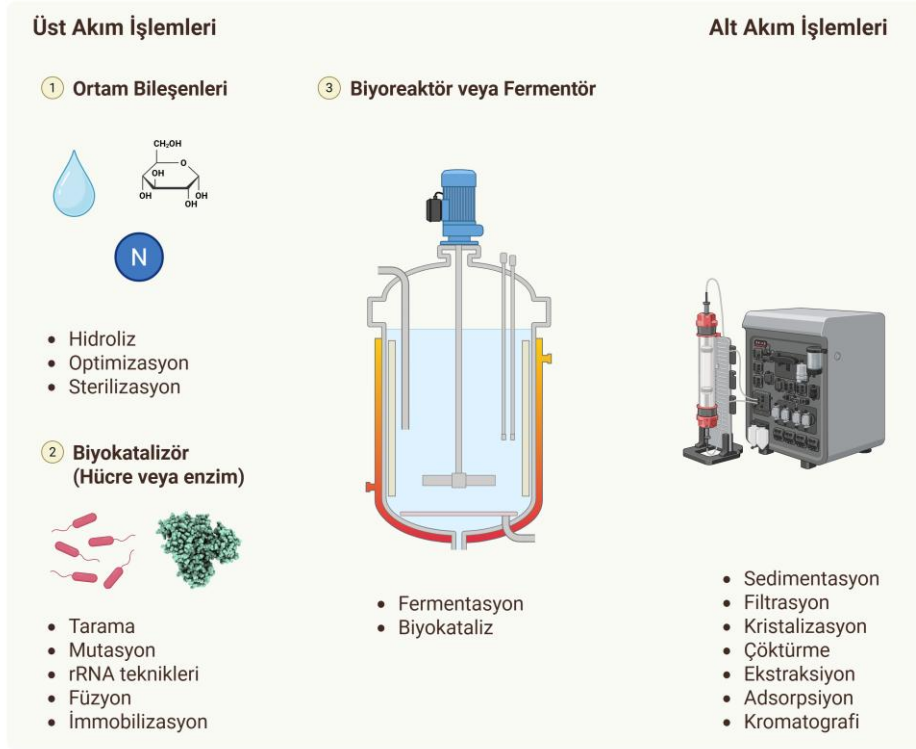
Fermentasyon kavramı, maya hücrelerinin meyve ya da maltlanmış tahıl özütlerini işlemesi sonucu açığa çıkan karbondioksit kabarcıklarının ekstrakta ‘kaynıyormuş’ izlenimi vermesi nedeniyle ‘kaynatmak’ anlamına gelen Latince *fervere* fiilinden türetilmiş olup uzun bir süre sadece biyokimyasal bir terim olarak tarif edilmiştir [1]. Bu bağlamda fermentasyon, organik bileşiklerin katabolize edilerek enerjinin üretilmesiyle ilgilidir ve anaerobik koşullar altında, fermente edilebilir organik bileşiklerin mikroorganizmalar (bakteriler, küfler, mayalar ya da karışık kültürler) tarafından alkol, organik asit ve karbondioksit gibi nihai ürünlere dönüştürüldüğü bir süreç olarak tanımlanmaktadır [2]. Pasteur’ün tabiriyle fermentasyon ‘havasız yaşam’ dır (*la vie sans l’air*) [3]. Endüstriyel biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, fermentasyon kavramının içeriği, sürecin anaerobik ya da aerobik olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinden, başka bir deyişle, kullanılan enerji metabolizmasının türünden bağımsız olarak, bitki ve hayvan hücrelerinin veya mikroorganizmaların ürün üretimine yönelik kullanımını içeren herhangi bir prosesi tanımlayacak biçimde genişletilmiştir [4]. Bu noktada maya ile etanol üretimi hem pirüvik asidin etanole indirgenmesi hem de endüstriyel ürün eldesi nedeniyle fermentasyon terimini iki anlamıyla da karşılayan bir örnektir.

Fermentasyon teknolojisi; gıda, tarım, ilaç, kimya ve enerji gibi çeşitli endüstrilerde ihtiyaç duyulan ürünlerin üretiminde hücre ya da enzimlerin kullanıldığı biyoteknolojik bir disiplindir [5]. Hedef ürün biyokütlenin kendisi olabileceği gibi (tek hücre proteini) [6], hücre içi metabolitler (bazı glikoproteinler ve glutamat dehidrogenaz, β -fruktofuranosidaz gibi enzimler) [7-9] ya da üretildikten sonra ortama salgılanan hücre dışı metabolitler (amino asitler, rekombinant proteinler, polimerik maddeler, amilaz, ksilanaz, proteaz gibi enzimler) [10-12] de olabilir.

2.1. Modern Fermentasyon Prosesine Genel Bir Bakış

Modern fermentasyon proseslerinin ana hedefi, üretimi en verimli şekilde gerçekleştirerek hem zaman hem de maliyet açısından avantaj sağlamak ve biyoteknolojik ürün miktarını en üst düzeye çıkarmaktır [13]. Bu hedef doğrultusunda, substrat ve mikroorganizma türü gibi üretim stratejisini belirleyen temel unsurların seçilmesi; ayrıca, besin bileşimi, sıcaklık, pH, nem oranı, karıştırma ve havalandırma gibi proses verimliliğini doğrudan etkileyen parametrelerin optimize edilmesi gerekir.

Şekil 2.1’de şeması verilen tipik bir fermentasyon prosesi, temelinde biyoreaktörlerin yer aldığı bir sistemdir ve üst akım ile alt akım işlemlerinden oluşur.



Şekil 2.1. Endüstriyel ölçekli bir biyoprosesin şematik gösterimi [4].

2.1.1. Üst Akım İşlemleri

Üst akım işlemleri; üretimde kullanılacak organizmanın seçimi ve geliştirilmesi, kültür ortamının tasarlanması, uygun biyoreaktör ve ekipmanın belirlenmesi, proses işletim koşullarının optimize edilmesi ve organizmanın fermentörde optimum şartlar altında çoğaltılmasını kapsar [14].

Organizmanın Seçimi

Fermentasyon prosesinde kullanılan organizma, bir hayvan hücresi (genellikle farelerden izole edilmiş memeli hücreleri) ya da endüstriyel açıdan değerli bir mikroorganizma (bakteri, maya veya küfler) olabilir. İlgili organizma, tarama gibi standart teknikler kullanılarak istenen özelliklere sahip olan aday organizmalar arasından seçildikten sonra rekombinant DNA teknikleri ya da mutasyon yoluyla geliştirilebilir [15]. Öte yandan, hücre füzyonu yöntemiyle organizmanın özellikleri başka bir organizmanın avantaj sağlayabilecek özellikleriyle kombine halde kullanılabilir [16].

Biyokatalizör olarak yalnızca hücreler değil; hayvan, bitki veya mikroorganizma kökenli enzimler de tercih edilebilir. Bu enzimlerin yapısal özellikleri ve katalitik aktiviteleri, protein mühendisliği yöntemleriyle geliştirilebilir; ayrıca, proses performansını artırmak amacıyla immobilizasyon teknikleriyle stabilize edilebilir [17].

Katalizör olarak hücrelerin kullanılması durumunda bu süreç genellikle 'fermentasyon', enzimlerin kullanılması durumunda ise 'biyokataliz' olarak adlandırılır [4].

Biyoteknolojik ürün üretiminde yaygın olarak mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Bu durumun temel nedenleri aşağıda maddeler hâlinde sunulmuştur [14]:

- ✓ İkilenme sürelerinin kısa olması nedeniyle ürün talebine hızlı yanıt verebilmeleri
- ✓ Çeşitli biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirme yetenekleri sayesinde geniş yelpazede ürün üretimine olanak tanınmaları
- ✓ Genetik manipülasyona yatkın olmaları nedeniyle ürün veriminin artırılabilmesi veya istenen özellikte ürün sentezinin sağlanabilmesi
- ✓ Farklı çevresel koşullara kolayca uyum sağlayabilmeleri
- ✓ Düşük maliyetli karbon ve azot kaynaklarını kullanarak katma değerli ürünler üretebilmeleri

Ortam Bileşenlerinin Seçimi

Fermentasyon ortamında kullanılmak üzere seçilen ham maddeler veya ortam bileşenleri, mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu karbon ve azot kaynaklarını, mineralleri, aerobik koşullar altında çalışılıyorsa oksijen moleküllerini ve bazı fermentasyon prosesleri için büyüme faktörlerini içermelidir.

Mikrobiyal büyüme için gerekli olan enerji, ışık ya da ortam bileşenlerinin oksidasyonuyla sağlanır. Endüstriyel biyoteknolojide kullanılan mikroorganizmalar genellikle kemoorganotroftur, diğer bir deyişle, enerji kaynakları karbondhidratlar, lipitler ve proteinler gibi organik bileşiklerdir [18]. Karbon kaynakları, mikroorganizmalar tarafından hem biyosentez hem de enerji üretiminde kullanıldığı için kültür ortamının en önemli bileşenidir. Karbon kaynağının seçiminde, mikroorganizmanın ve nihai ürünün türü, birim substrat başına biyokütle verimi (Y_{XS}), ham maddenin maliyeti ve ulaşılabilirliği gibi pek çok faktör göz önünde bulundurulur [19]. Fermentasyon proseslerinde, tanımlanmış karbon kaynakları (örneğin basit şekerler ve nişasta gibi polisakkaritler) kullanıldığı gibi; şeker kamışı melası, malt şurubu ve soya küspesi gibi kompleks karbon kaynakları da tercih edilmektedir [20]. Kompleks karbon kaynakları, karbon elementinin yanı sıra mikroorganizmalara ihtiyaç duydukları diğer besin maddelerini de sağlar.

Kültür ortamı nükleik asit, protein ve koenzimlerin üretiminde görev alan azot elementini de içermelidir. Karbon kaynaklarına benzer şekilde, azot kaynakları da tanımlanmış veya karbon, kükürt, fosfor ve eser metaller gibi farklı bileşenler içeren kompleks kaynaklar (pepton ve maya ekstraktı) olabilir. Tanımlanmış azot kaynakları, kimyasal içeriği tam olarak bilindiği için hassas bir şekilde kontrol edilebilen ve amonyum sülfat, monosodyum glutamat ve üre gibi bileşenleri içeren sentetik besiyerleridir [19].

Mikroorganizmalar için gerekli olan temel bileşenlerden bir diğeri ise minerallerdir. Fosfor, kükürt, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir, mikroorganizmalar için en önemli altı makro-minerali oluşturur. Bu mineraller, mikroorganizmaların çeşitli biyokimyasal reaksiyonları sürdürebilmesi ve sağlıklı bir şekilde büyüebilmesi için hayati öneme sahiptir. Bununla birlikte, çinko, bakır, kobalt, manganez, nikel ve molibden gibi mikromol düzeyinde gerekli olan mikro-mineraller ise genellikle enzimlerin kofaktörleri olarak reaksiyonların katalize edilmesinde ve proteinlerin yapısal olarak korunmasında rol oynar [19, 21]. İlgili minerallerin bazıları kompleks karbon ve azot kaynaklarında ya da ortama ilave edilen suda bulunabilirken bazılarının ise doğrudan eklenmesi gerekir. Tablo 2.1’de, kültür ortamında bulunması gereken temel elementlerin bir listesi sunulmuştur.

Bunların dışında, bazı fermentasyon proseslerinde kültür ortamı; amino asitler, nükleik asitler ve vitaminler gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenemeyen ya da biyokütle (X) oluşumunu destekleyen ve spesifik büyüme hızını (μ) artıran büyüme faktörlerini de içermelidir [19].

Laboratuvar ölçeğinde formüle edilen bir kültür ortamı, gerekli bileşenleri sağlamak açısından yeterli olabilir; ancak aynı ortam, büyük ölçekli fermentasyon sistemlerine doğrudan uyarlanamayabilir. Bu nedenle, endüstriyel ölçekli biyoteknolojik proseslerde kullanılacak ham maddelerin; birim substrat başına yüksek hücre (Y_{XS}) veya ürün verimi (Y_{PS}) sağlaması, yüksek spesifik ürün oluşum hızı (q_P)’na izin vermesi, istenmeyen ürün oluşumuna neden olmaması, üst akım ve alt akım işlemleri sırasında sorun oluşturmaması, kaliteli ve kolay ulaşılabilir olması beklenir [18]. Bazı ortam bileşenleri, biyoyararlanımı artırmak amacıyla öğütme gibi fiziksel ya da hidroliz gibi kimyasal ön işlemlere tabi tutulur. Ayrıca, hemen hemen tüm fermentasyon proseslerinde sterilizasyon prosedürü temel bir basamak olarak yer alır. Bu işlemlerin ardından, fermentasyon ortamının optimizasyonu gerçekleştirilir.

Tablo 2.1. Hücre metabolizması ve mikrobiyal büyüme için gerekli olan elementler [22, 23].

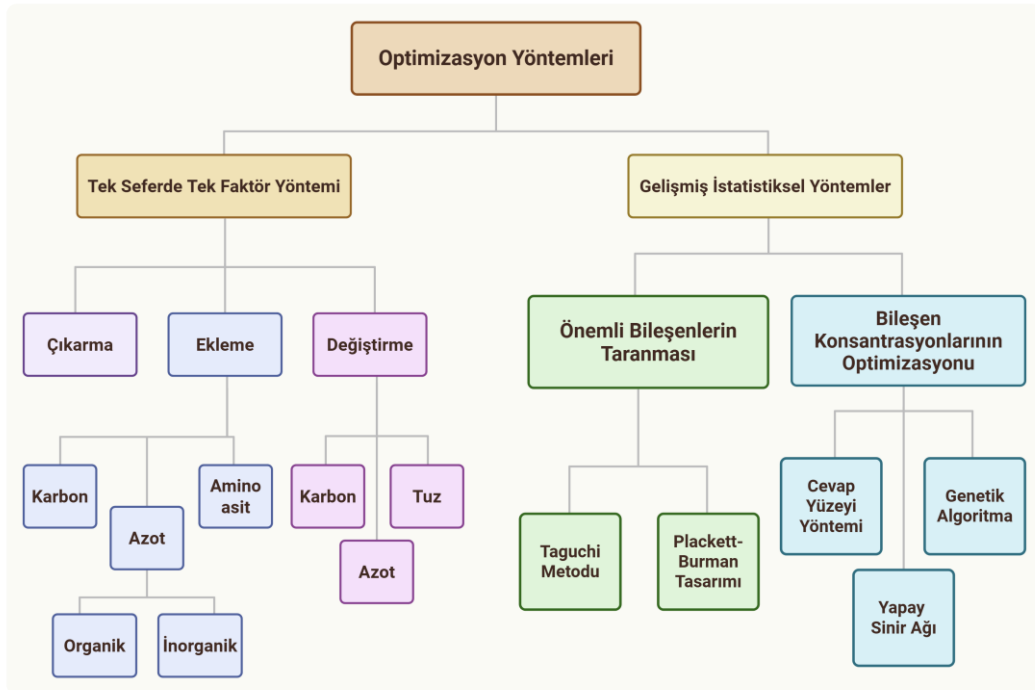
Element	İşlevi	Bulunduğu Bazı Kaynaklar
C	Yapı taşı, enerji kaynağı	Soya küspesi, mısır likörü, basit şekerler
H	Yapı taşı, solunum, ATP üretimi	Su, asidik ortamlardan gelen protonlar
O	Organik moleküller	Hava
N	Nükleik asitler, proteinler	Pepton, maya özütü, tuzlar, amino asitler, NH_4^+
P	Nükleik asitler, fosfolipitler	Fosfatlar
S	Amino asitler, koenzimler	Sülfatlar
Na	Kofaktör, katyon	Na_2HPO_4 , NaCl
Mg	Kofaktör, katyon	MgCl_2 , MgSO_4
Ca	Kofaktör, katyon	CaCl_2
K	Kofaktör, katyon	KH_2PO_4 , K_2HPO_4
Fe	Kofaktör, sitokromlar	FeSO_4 , FeCl_3
Eser metaller	Kofaktörler	ZnCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 , NiCl_2 , MnCl_2 , Na_2MoO_4

Ortam Optimizasyonu

Optimizasyon işlemi, bir cevap üzerinde hangi faktörlerin etkili olduğunu ve bu faktörlerin hangi seviyelerde kullanılması gerektiğini belirlemek için uygulanan tekniklerin genel adıdır [24].

Ortam optimizasyonu, maksimum ürün konsantrasyonunu sağlayan en uygun besin bileşimini elde etmek amacıyla yapılır. Şekil 2.2’de ortam optimizasyonunda kullanılan yöntemlere ilişkin bir şema sunulmuştur.

Ortam optimizasyonu çalışmalarında başvurulmuş en eski teknik Tek Seferde Tek Faktör (TSTF) yöntemidir. Bu yöntemde, diğer faktörler sabit tutulurken, her seferinde yalnızca bir faktör üzerinde değişiklik yapılır. Ardından, seçilen ortam bileşenlerinin konsantrasyonları (faktör seviyeleri) istenen bir aralıkta ayarlanır [25]. TSTF yöntemi, kullanılan yaklaşıma göre çıkarma, ekleme ve değiştirme deneyleri olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Çıkarma deneylerinde, kültür ortamından tek tek çıkarılan ortam bileşenlerinin hedef ürünün üretimi üzerindeki etkileri incelenirken ekleme deneylerinde, karbon ve azot kaynağı ilavesinin etkileri değerlendirilir. Değiştirme deneylerinde ise ekleme deneylerinde ürün üretimi üzerinde olumlu etki gösteren karbon ve azot kaynakları, ortam bileşiminde olan diğer karbon ve azot kaynaklarının yerine tamamen ya da kısmen kullanılmaya çalışılır [26].



Şekil 2.2. Ortam optimizasyonunda kullanılan yöntemler [26].

TSTF yönteminin en önemli dezavantajlarından biri, bileşenler arası etkileşimleri tahmin etmenin güç olmasıdır [27]. Bununla birlikte, analiz edilmesi gereken değişken sayısının artması, yöntemin uygulanmasını zaman ve maliyet açısından zorlaştırmakta [28]; bu durum, yeterli sayıda deneyin gerçekleştirilememesine, dolayısıyla optimum noktanın gözden kaçırılmasına yol açabilmektedir [27]. Yine de bu yöntemin, günümüzde halen kullanıldığı ve kolay olması sebebiyle hakkında hiçbir şey bilinmeyen ortamlar için iyi bir tarama aracı olabileceği bildirilmiştir [26].

Mikrobiyal metabolizma, doğası gereği bir dizi girift reaksiyonu içerdiği için çeşitli faktörler, bu reaksiyon ağının farklı bölümlerini etkilemektedir [26]. Bu nedenle, deney verilerinin güvenilirliğini ve fermentasyon prosesinin verimliliğini artıracak; aynı zamanda, işçilik maliyeti ve üretim için gerekli olan süreyi azaltacak gelişmiş optimizasyon tekniklerine ihtiyaç duyulmuştur. Bunun bir sonucu olarak, ortam optimizasyonu için istatistiksel yöntemlere, başka bir deyişle, deneysel tasarıma yönelmenin geleneksel TSTF yönteminin sınırlamalarını aşabileceği düşünülmüş ve 1992 yılında Fisher tarafından Deneysel Tasarım Teorisi önerilmiştir. Bu teoriye göre, her seferinde yalnızca bir değişkenin değiştirilmesi yerine birden fazla değişkenin eş zamanlı değiştirilmesi ürün üretimi açısından daha verimli bir yöntemdir [29].

Deneysel tasarım, çeşitli faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve cevap üzerindeki eş zamanlı etkileri hakkında olabildiğince çok bilgiye mümkün olduğunca az işlemle ulaşmak için yürütülen bir dizi stratejik deneyi içermektedir. Bu nedenle, belirli bir ürünün üretimine ilişkin literatürden bilgi edinildikten sonra, iki veya daha fazla faktörün bir cevap üzerindeki etkisini analiz etmek amacıyla deneylerin tasarlanması, TSTF yöntemine kıyasla daha etkili bir yaklaşım sunmaktadır [30, 31].

Deneysel tasarım yöntemlerinden biri olan Plackett-Burman Tasarımı (PBT), çok sayıda faktörün mevcut olduğu durumlarda, cevap üzerinde etkisi olmayan faktörlerin hızlı bir şekilde elenmesi için kullanılan iki seviyeli bir tarama tasarımıdır [32]. Bu tasarımın ‘iki seviyeli’ olması, faktörlerin yalnızca yüksek ve düşük seviyelerde test edildiği uç noktaların kullanıldığını; ‘tarama tasarımı’ olması ise tam faktöriyelde olduğu gibi tüm olası faktör kombinasyonlarının denenmediğini, bunun yerine etkili faktörlerin hızlı bir şekilde belirlenmesine olanak tanıyan sınırlı sayıda koşulun test edildiğini ifade eder. PBT’de sadece hedef ürünün üretimi üzerinde anlamlı etkilere sahip olan faktörler tarandığı için toplam deney sayısı önemli ölçüde azalır [33]. Ancak faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimleri göz ardı edildiği için faktörler arası etkileşimlerin önemli olduğu süreçlerde bu yöntemle elde edilen sonuçlar yanıltıcı olacaktır. Bu nedenle, PBT, deneysel tasarım için bir çıkış noktası olarak kabul edilmeli ve bir deney seti belirlemek amacıyla kullanılmalıdır [26].

Taguchi Metodu (TM), PBT’nin faktörler arası etkileşimleri göz ardı etmesi ve varyasyonların azaltılmasına yönelik optimizasyon sağlamaması gibi sınırlamaları aşmak amacıyla Dr. Genichi

Taguchi tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde, faktörlerin cevap üzerindeki bağımsız etkilerini ve her seviyenin eşit şekilde test edilmesini sağlamak amacıyla ortogonal diziler kullanılır; böylece, minimum sayıda deneyle birden fazla faktörün etkisi eş zamanlı olarak analiz edilebilir. Bununla birlikte, kontrol edilemeyen değişkenlerin (gürültü), istenen cevap (sinyal) üzerindeki etkileri minimize edilerek süreç verimi ve ürün kalitesi artırılır [34]. Ancak TM, yalnızca iki faktör arasındaki etkileşimleri dikkate aldığı için çoklu faktör etkileşimlerinin söz konusu olduğu sistemlerde doğrudan uygulandığında yetersiz kalabilmektedir [26].

Biyoprosesler gibi oldukça karmaşık sistemlere yönelik güncel yaklaşımlarda, veri odaklı yöntemler ile yapay zekâ tabanlı modeller gibi ileri matematiksel araçların entegrasyonu giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri, beynin öğrenme yeteneğini taklit eden Yapay Sinir Ağı (YSA) modelleridir [35].

YSA'lar, dış ortamdan alınan giriş verilerinin her birinin, 'önem derecesini belirleyen' bir ağırlık değeriyle çarpılması ve ardından bu değerlerin toplanarak bir aktivasyon fonksiyonu aracılığıyla işlenmesi esasına dayanır. Sinyal gücü yeterli bir eşik değerini aşarsa nöron aktif olur ve böylece bir çıktı üretilir. Bu çıktı üretim mekanizması, ağıın öğrenme sürecinin temelini oluşturur. Öğrenme aşamasında, ağıın tahmin ettiği çıktılar ile gerçek değerler arasındaki farkı en aza indirmek amacıyla hata fonksiyonları kullanılır. Eğitim süreci boyunca, elde edilen hata geri bildirimine göre ağıın parametreleri yinelemeli olarak güncellenir ve bu sayede modelin doğruluk oranı kademeli olarak artırılır. Eğitim tamamlandıktan sonra, YSA'nın yalnızca eğitim verilerini ezberlemediğini, aynı zamanda daha önce karşılaşmadığı durumları da genelleyeabildiğini göstermek amacıyla, daha önce sisteme sunulmamış veri kümeleriyle doğrulama işlemi gerçekleştirilir. Bu özellikleri sayesinde YSA'lar, klasik matematiksel ifadelerle tanımlanması güç olan biyoteknolojik proseslerin karmaşık ve dinamik yapısını modellemede etkili bir araç haline gelmiştir [36].

Genetik algoritmalar (GA), doğal seçim mekanizmalarından esinlenen ve çok değişkenli problemlerin çözümünde kullanılan stokastik optimizasyon yöntemleridir. Bu yöntemlerde, başlangıçta rastgele oluşturulan bir popülasyon üzerinde çalışılır ve ilgili popülasyonda her bireyin (çözüm adayları) uygunluk değeri hesaplanır. Seçilim, çaprazlama ve mutasyon gibi işlemler kullanılarak oluşturulan yeni bireyler, çözüm uzayında daha yüksek performans gösteren çözümler üretmek amacıyla evrimleşir. Belirlenen bir yakınsama kriterine ulaşılması ya da maksimum iterasyon sayısının tamamlanması durumunda algoritma sonlandırılır [37]. GA'ların stokastik doğası, çözüm sürecine belirli bir düzeyde rastlantısallık katarak geniş çözüm uzaylarının etkin şekilde taranmasını mümkün kılar. Bununla birlikte, algoritma, çözüm sürecinde daha iyi bireyler üretmek için hangi bölgelerde arama yapacağını uygunluk değerlerine dayanarak kendi belirler. Böylece her denemede yeni bir dış müdahaleye ihtiyaç duyulmadan daha iyi sonuçlar elde edilir [26, 37]. GA'lar, fermentasyon gibi çok sayıda değişkenin etkileşim halinde olduğu proseslerde,

ortam bileşenlerinin optimum konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan bir yaklaşımdır [38].

Fermentasyon

Fermentasyon, mikroorganizmaların uygun çevresel koşullar altında gelişerek hedef ürünü sentezlediği biyoteknolojik bir süreçtir. Bu sürecin kontrollü bir şekilde yürütülebilmesi için kullanılan biyoreaktörler, mikrobiyal kültürü dış ortamdan izole eden; sıcaklık, pH, nem ve oksijen gibi temel parametreleri istenen aralıkta tutabilen sistemlerdir. Substratın etkili bir biçimde dönüştürülmesi ve ürün veriminin artırılması, büyük ölçüde biyoreaktörün yapısal özelliklerine ve işletim koşullarına bağlıdır [39, 40]. Bu nedenle, biyoreaktörün işletim koşullarının optimize edilmesi, ürün verimliliği ve süreç başarısı açısından kritik bir adımdır. Ancak bu optimizasyon sürecinde dikkate alınacak parametreler, kullanılan biyoreaktör sistemine göre değişiklik gösterebilir. Bu bağlamda, her bir biyoreaktör tipi sahip olduğu teknik özellikler doğrultusunda ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

Fermentasyon sisteminin tasarımı ve kullanılacak biyoreaktörün belirlenmesi; hammadde temini, yatırım ve işletme maliyetleri, iş gücü ihtiyacı, ürün verimi, ekonomik getiri ve çevresel sürdürülebilirlik gibi birçok etkenin birlikte analiz edilmesini gerektirir. Endüstriyel ölçekte yürütülen uygulamalarda ise karar sürecini yönlendiren temel unsur, geri kazanılan ürün miktarı başına en düşük sermaye maliyetinin sağlanmasıdır. Bununla birlikte, prosesin çevresel etkilerini en aza indirmek amacıyla atık yönetimi, enerji tüketimi ve yan ürün kontrolü gibi unsurlar da dikkate alınmalıdır [41].

Fermentasyon prosesleri; substratın fiziksel özelliklerine göre derin kültür, yarı katı hal ve katı hal fermentasyonu; besleme stratejisine göre kesikli, yarı kesikli ve sürekli sistemler; hücre ya da enzimlerin kullanım biçimine göre serbest veya immobilize sistemler; oksijen varlığına göre ise aerobik, mikroaerobik ve anaerobik prosesler olmak üzere farklı kategorilere ayrılmaktadır. Bu çalışmada, fermentasyon türleri yalnızca substratların fiziksel özellikleri esas alınarak sınıflandırılmış ve genel hatlarıyla ele alınmıştır.

2.1.2. Alt Akım İşlemleri

Alt akım işlemleri; biyokütlenin ve çözünmeyen katı bileşenlerin fermentasyon sıvısından uzaklaştırılması (santrifüj ve filtrasyon), farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olan bileşenlerin ayrılması (ultrafiltrasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi), hedef ürünle benzer özellikler taşıyan safsızlıkların giderilmesi (kromatografik teknikler) ve ürünün depolamaya uygun hâle getirilmesi (liyofilizasyon ve kristalizasyon) aşamalarından oluşmaktadır [19].

Endüstriyel uygulamalar için üretilen biyoteknolojik ürünlerde saflık derecesi çoğu zaman öncelikli bir parametre olarak değerlendirilmezken, terapötik kullanım için geliştirilen ürünlerde

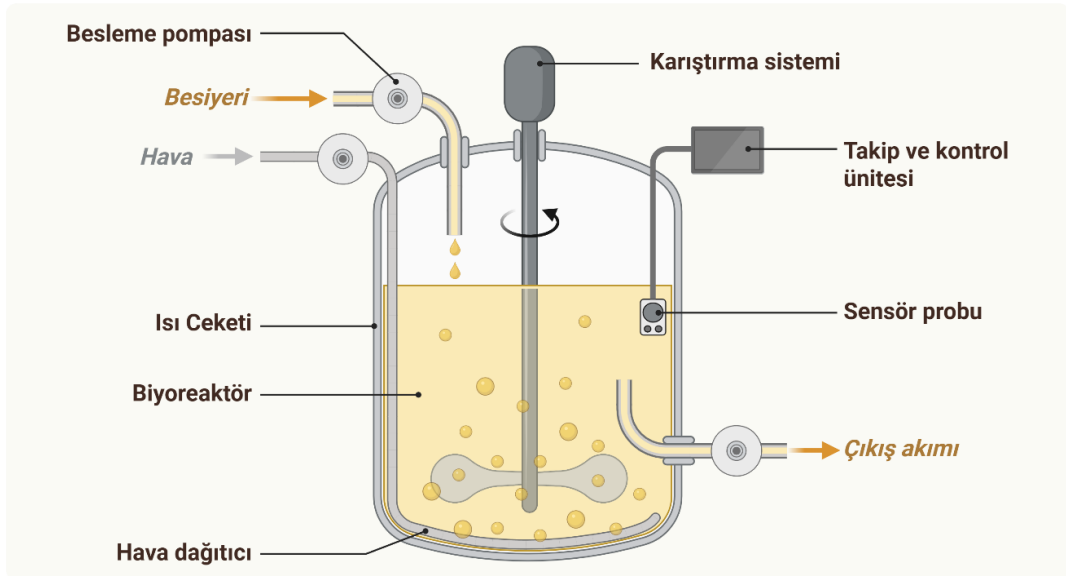
yüksek saflık düzeyi kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, hedeflenen saflık düzeyi, ürünün geri kazanımı sırasında izlenecek ayrıştırma stratejisini belirler. Ayrıca, elde edilen ürünün kirlilik profili ve safsızlıkların özellikleri dikkate alınmalı; seçilen yöntem, ürünün yapısal bütünlüğünü bozmayacak nitelikte olmalıdır [42].

2.2. Derin Kültür Fermentasyonu

Derin kültür fermentasyonu (DKF), besin maddelerinin tamamen çözündüğü ya da süspansiyon halinde bulunduğu sıvı bir ortamda mikroorganizmaların kontrollü olarak üretildiği bir fermentasyon tekniğidir [43]. Bu yöntemde, substratlar mikroorganizmalar tarafından hızla tüketilir ve metabolik aktiviteleri sonucu oluşan ürünler doğrudan sıvı faza salınır. Bu nedenle, besin maddelerinin sisteme sürekli olarak ilave edilmesi veya belirli aralıklarla yeni bir besiyeri kullanılarak fermentasyonun tekrar başlatılması gerekir [44].

Mikroorganizma ile aşılınmış sıvı kültür ortamı içeren bir erlenin optimum sıcaklık ve çalkalama hızında inkübe edilmesi en temel DKF örneğidir.

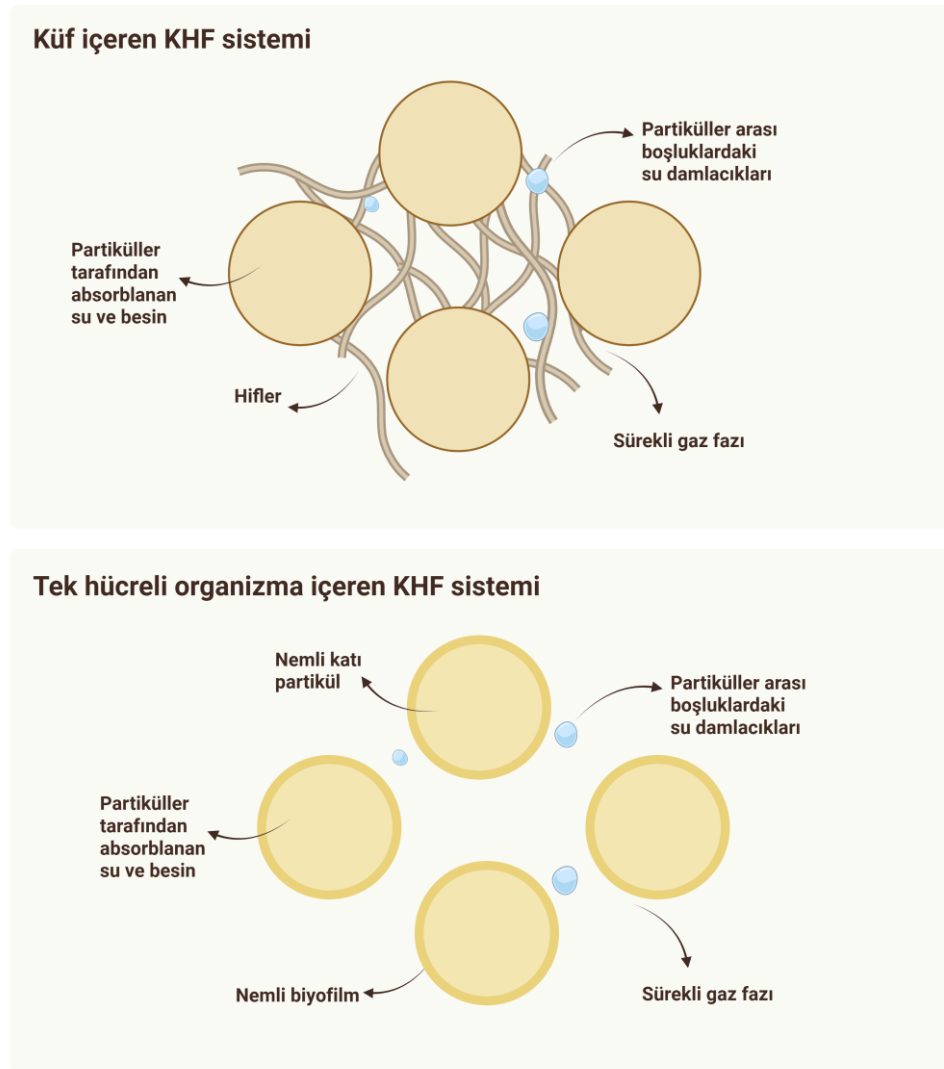
Endüstriyel ölçekli proseslerde farklı tasarımlara sahip pek çok DKF biyoreaktörü kullanılabilir. Ancak, sıvı karışımının ve oksijen transferinin etkinliği, sıcaklık kontrolünün kolaylığı, üretim standartlarına uygunluk, ölçeklendirilebilirlik gibi nedenlerle karıştırılmalı tank biyoreaktörleri yaygın olarak tercih edilmektedir [45, 46]. Şekil 2.3'te karıştırılmalı tank biyoreaktörünün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.3. Karıştırılmalı tank biyoreaktörünün şematik gösterimi

2.3. Katı Hal Fermentasyonu

Katı hal fermentasyonu (KHF), serbest suyun bulunmadığı ya da sınırlı miktarda mevcut olduğu ortamlarda, mikroorganizmaların katı partiküller üzerinde ve kontrollü koşullar altında gelişiminin sağlandığı bir fermentasyon tekniğidir [47]. Şekil 2.4'te verildiği üzere, bu sistemlerde suyun büyük bir bölümü katı partikül matrisi tarafından absorbe edilmekte; partiküller arasında yer yer su damlacıklarına ve yüzeylerinde ince su filmlerine rastlanabilmesine rağmen, su fazı süreklilik göstermemektedir. Bu nedenle, partiküller arası boşlukların önemli bir kısmı gaz fazı ile doludur. KHF sistemlerinin ayırt edici özelliği, sınırlı serbest su varlığına rağmen mikrobiyal metabolizmanın sürdürülebilmesi için gerekli mikroçevresel koşulların sağlanabiliyor olmasıdır.



Şekil 2.4. Katı hal fermentasyonu sistemlerinin tanımlayıcı özellikleri [47].

2.3.1. Katı Hal Fermentasyonunun Kısa Tarihi

KHF, kökleri Antik Dönem'e kadar uzanan kadim bir geçmişe sahiptir. M.Ö. 2600 yılına ait olan arkeolojik kalıntılar, Mısırlıların fermentasyon tekniğiyle ekmek ürettiğini ortaya koymaktadır [48]. Benzer şekilde, Asya'da, *Penicillium roqueforti* küfıyla yapılmış olan peynir üretimi, KHF'nin kaydedilmiş ilk örneklerindendir. Bununla birlikte, modern fermentasyon teknolojisinin temelini oluşturan koji prosesinin M.Ö. 1000'li yıllarda Çin'de geliştirildiği, 7. yüzyılda ise yöntemin Budist rahipler aracılığıyla Japonya'ya taşındığı bilinmektedir. Yine aynı dönemde, birçok Güneydoğu Asya ülkesinde, soya fasulyesinin *Rhizopus oligosporus* ile işlenmesiyle elde edilen "tempeh" (et ikamesi) gibi çeşitli gıdaların üretildiği rapor edilmiştir [49]. "Natto" ise üretiminde bir bakterinin (*Bacillus subtilis*) kullanıldığı Japonya'ya özgü tek gıdadır [50]. Buharda pişirilmiş pirinç ya da diğer tahılların üzerinde *Aspergillus oryzae* gibi küflerin yetiştirilmesiyle hazırlanan ve yüksek miktarda enzim içeren koji, Uzak Doğu'da günlük diyetin ayrılmaz bir parçası olan "shoyu" (soya sosu), "miso" (soya ezmesi) gibi fermente gıdaların ve "sake"nin (pirinç şarabı) fermentasyonunu başlatmak için kullanılmaktadır [51]. İçerisine tuz, şeker ya da nişasta ilave edilen et, balık ve hayvansal ürünlerin fermentasyon tekniğiyle muhafaza edilmesi de binlerce yıl öncesine dayanır. Japonya'da, palamut balığının *Aspergillus* türleriyle fermente edilip kurutulmasıyla üretilen "katsuobushi", günümüzde Uzak Doğu'da ve Afrika'nın bazı bölgelerinde halen uygulanmaya devam eden balık fermentasyonunun bir örneğidir [50].

Keşfi Yakın Çağ'dan öncesine uzanan gallik asidin, Tieghem tarafından yapılan fermentasyon çalışmaları sonucunda, *A. niger*'den elde edilebileceğinin anlaşılması; ilerleyen zamanlarda deri tabaklama işleminin geliştirilmesine, fermentasyon tekniğinin deri ve kâğıt endüstrisi gibi farklı alanlarda da kullanılan bir yöntem haline gelmesine öncülük etmiştir. Bununla birlikte, Takamine'nin buğday kepeği üzerinde *A. oryzae* yetiştirmek suretiyle diastatik enzim elde etmek için tasarladığı proses, KHF'nin gıda endüstrisine (gıda işleme) yönelik uygulamaları için önemli bir adımdır. KHF prosesinden yararlanılarak kompostlama ve katı atık arıtımı tekniklerinin geliştirilmesi de yine 19. yüzyıl sonlarına denk gelen kayda değer ilerlemelerdir [49, 50].

20. yüzyılın başlarında KHF tekniğiyle mikrobiyal enzimlerin ve organik asitlerin üretildiği yeni bir dönemin kapıları aralanmış, tambur biyoreaktörler gibi KHF prosesine uygun olan fermentörler tasarlanmıştır [49]. Steroid dönüşümünde kullanılan mantar sporlarının KHF ile elde edilmesi, penisilinin hem sıvı hem de katı kültürlerde üretilmesi gibi pek çok gelişmenin yaşandığı 1940'lı yıllar, halk arasında 'Fermentasyon Teknolojisinin Altın Çağı' olarak adlandırılmaktadır. İkinci Dünya Savaşı sırasında KHF'ye dayanan penisilin üretimi, savaş sonrasında, KHF prosesinin kontrolündeki güçlükler, prosesin otomatik olarak işletilememesi ve teknik bilgi yetersizlikleri gibi nedenlerle Batı'da terk edilmiş olup penisilin, aseton, bütanol gibi ürünlere olan talebin de artmasıyla birlikte, DKF endüstriyel ölçekte uzun bir süre neredeyse tercih edilen tek yöntem haline gelmiştir [52, 53]. 1960'lardan 1980'lere uzanan zaman diliminde ise kanser araştırmaları için

önemli olan mikotoksinlerin mantar kültürlerinden elde edilmesi ve hayvan yemlerinin besin değerini arttırmak için kullanılan proteinlerin (tek hücre proteini) üretilmesi gibi pek çok çalışma yapılmış olup çeşitli substrat ve mikroorganizmalar kullanılarak KHF'ye dair teknolojik ve ekonomik açıdan uygulanabilirliği yüksek prosesler geliştirilmiştir [49]. Sonraki on yılda, kinetik çalışmalar ve modellemeler üzerine yeni teorilerin ortaya konulması, KHF'de kullanılmak üzere kolon biyoreaktörlerin tasarlanması gibi önemli adımlar atılmış; KHF tekniğiyle birincil ve ikincil metabolitlerin üretimi üzerine araştırmalar yapılmıştır [53]. 2000'li yıllarda ise fermente gıdaların ve ikincil metabolitlerin üretiminde sağladığı avantajlar sebebiyle, KHF'nin uygulama alanı, özellikle Batı ülkelerinde büyük ölçüde genişlemiştir [48].

Günümüzde KHF proteaz, selüloz ve lipaz gibi enzimlerin; alkaloid, antibiyotik, bitki büyüme faktörleri gibi ikincil metabolitlerin; sitrik asit, oksalik asit, fumarik asit gibi organik asitlerin; biyosüpfaktanlar, biyopestisitler, biyoyakıtlar, biyosüpfaktanlar ve aromatik bileşikler gibi ürünlerin düşük hacimli üretiminde umut vadeden bir proses olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, çevre için tehlikeli olan maddelerin biyoremediasyonunda; ilaçlar, ağır metaller ve endüstriyel atıklar gibi kirleticilerin biyodetoksifikasyonunda; mahsul kalıntılarının besin zenginleştirme amacıyla biyotransformasyonunda potansiyel avantajlar sunmaktadır.

2.3.2. Katı Hal Fermentasyonunda Etkin Olan Faktörler

Katı substratın kimyasal ve fiziksel özellikleri, substrat yatağının özellikleri ve nem içeriği, fermentasyon ortamının pH'sı ve sıcaklığı, sistemin havalandırma ve karıştırma gibi mekanik özellikleri KHF'de etkin olan faktörlerdir.

Mikroorganizma Türü

KHF proses verimliliğini belirleyen en temel unsurlardan biri, seçilecek mikroorganizmanın katı substrat üzerinde gelişme gösterebilmesi ve aynı zamanda substratı parçalayıp kullanılabilir besin bileşenlerine dönüştürebilecek enzimatik kapasiteye sahip olmasıdır. Teorik su aktivitesi kavramı esas alınarak yapılan genel kabule göre 0.5–0.6 a_w ve daha düşük su aktivitelerine gereksinim duyan küf ve mayalar, KHF prosesleri için en uygun mikroorganizmalardır. Buna karşın 0.8–0.9 a_w gibi nispeten daha yüksek su aktivitelerinde gelişim gösterebilen bakterilerin yer aldığı çok sayıda KHF prosesi tanımlanmış olup zamanla ilgili kabulün doğru olmadığı anlaşılmıştır [54]. Örneğin *B. subtilis*, *B. thuringiensis* ve *Lactobacillus sp.* gibi bakteri türlerinin KHF'de başarılı bir şekilde enzim ürettiği bildirilmiştir [55]. Benzer şekilde, *Streptomyces sp.* gibi aktinomisetlerin de katı substratlar üzerinde bol miktarda koloni oluşturduğu, çeşitli enzimler ürettiği ve ekstrem şartlara karşı yüksek direnç gösterdikleri rapor edilmiştir [56].

Katı Substratın Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

KHF’de kullanılan katı substratların çoğu tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünlerdir [57]. Hasat işleminden arta kalan sap, saman, koçan, yaprak, tohum kabukları gibi tarımsal atıklar ve mahsullerin işlenerek daha değerli ürünlere dönüştürülmesi sonucu oluşan melas, küspe, kepek, posa, yağ keki gibi endüstriyel yan ürünler; polisakkaritler, proteinler, lifler, yağ asitleri ve biyoaktif bileşikler bakımından zengin biyokütledir [58].

Nispeten düşük maliyetli ve kolay temin edilebilir olmaları nedeniyle tarımsal atıklar ile endüstriyel yan ürünlerin katı substrat olarak değerlendirilmesi, katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde önemli bir avantaj sağlar. Bu tür lignoselülozik kaynakların tekrar işlenmesiyle, içeriklerinde bulunabilen fenolik bileşikler ve çeşitli toksik kirleticilerin çevreye salınımı da büyük ölçüde engellenmiş olur [59]. Hem zengin kimyasal içerikleri hem de sundukları ekonomik ve çevresel katkılar nedeniyle bu biyomateriyaller, mikrobiyal büyüme için gerekli olan besin öğelerini ve nemi sağlayabilen, aynı zamanda mikroorganizmaların tutunarak çoğalabileceği fiziksel bir ortam sunabilen yapıları sayesinde araştırmacıların dikkatini çeken sürdürülebilir substrat alternatifleri arasında yer almaktadır.

Tablo 2.2’de detaylı kimyasal bileşimleri gösterilen tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünlerin çoğu, temelde selüloz (%40–50), hemiselüloz (%20–30) ve ligninden (%20–35) oluşan lignoselülozik biyokütledir. Bununla birlikte, nişasta, pektin ve diğer lifleri de içerebilirler [55, 60].

Tablo 2.2. Katı hal fermentasyonunda yaygın olarak kullanılan substratlar ve kimyasal bileşimleri [61].

Tarımsal atık veya endüstriyel yan ürün	% Katı madde miktarı				
	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin	Protein	Kül
Arpa kabuğu	39.0	12.0	22.0	-	7.0
Arpa samanı	33.8–46.8	21.9–30.0	9.6–13.8	-	4.4
Mısır koçanı	33.7	31.9	6.1	-	8.5
Mısır sapları	35.0–39.0	16.8–42.0	7.0–7.3	-	24.9
Yulaf samanı	31.7–39.4	23.3–28.2	4.1–23.6	-	3.2
Pirinç samanı	19.6–36.2	19.0–50.4	8.3–9.9	-	14.7
Çavdar samanı	34.4–37.6	30.5	19.0–30.8	-	5.7
Buğday samanı	32.9–49.8	23.7–25.0	8.9–22.1	-	3.6–4.7
Ayçiçeği kabuğu	29.4	29.4	29.4	-	2.1
Ayçiçeği sapları	38.5–42.1	29.7–33.5	13.4–17.5	-	8.6–9.2
Buğday kepeği	9.0–12.0	38.9	3.0–5.0	9.6–18.7	0.04–8.1
Pirinç kepeği	34.0	28.2	24.8	5.8–8.3	-
Çavdar kepeği	5.0–6.0	-	3.5–4.4	14.4–18.0	2.8–6.2
Üzüm posası	9.2–14.5	4.0–10.3	11.6–41.3	7.0–23.5	4.7–9.5
Elma posası	47.5	27.8	14.8–22.4	6.0–7.0	1.1–5.1
Şeker kamışı küspesi	36.9–45.7	25.60–29.58	18.9–26.1	2.18	2.8
Kenevir yağı keki	22.5	14.2	16.7	24.8	7.5
Keten yağı keki	8.2	4.6	6.0	32.8	5.3
Kabuksuz kabak yağı keki	4.4	6.7	0.7	38.3	7.8

Besin ve destek görevi görmeleri sebebiyle, sıvı besinlerin emdirildiği inert katı destek materyallerine kıyasla çok daha yaygın kullanılan katı substratlar; aynı zamanda, karbon temelli olmalarından ötürü önemli bir dezavantajı da beraberinde getirir. Katı substratın mikroorganizmalar tarafından parçalanması sonucu ortamın fiziksel özellikleri değişebilir, dolayısıyla ısı ve kütle transferi azalabilir. Bu durumun proses boyunca az çok sabit bir fiziksel yapıya sahip inert bir destek materyali kullanılarak aşılabileceği, böylece ısı ve kütle transferinin daha iyi kontrol edilebileceği; ek olarak, ürün geri kazanımının da daha kolay yapılabileceği bildirilmiştir [62]. Pirinç kabuğu ve şeker kamışı küspesi gibi nispeten düşük besin içeriğine sahip olan ancak yüksek porozite (partiküller arası ve partikül içi boşluklar) sağlayan tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünler kütle ve ısı transferini kontrol etmek için inert katı destek materyali olarak kullanılmaktadır [63]. Tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünlerin yanı sıra, bazen optimum mikrobiyal büyüme için gerekli olan tüm maddeleri sağlamak amacıyla; fermentasyon ortamına kalsiyum, magnezyum, demir, fosfor, potasyum, kükürt, manganez, bakır, iyot, çinko, kobalt gibi makro ve mikro-minareller de ilave edilmektedir [60, 64, 65].

Maliyet, ulaşılabilirlik ve kimyasal bileşimin yanı sıra substratın partikül boyutu, yüzey alanı, su tutma kapasitesi gibi özellikleri de katı substrat seçiminde önemli olan kriterlerdir. En önemli fiziksel faktör, katı substratın yüzey alanı/hacim oranını etkileyen partikül boyutudur. Uygun partikül boyutu, besin ve oksijen talebinin her ikisini birden karşılayabilecek düzeyde olmalıdır [66]. Genel olarak, optimum partikül boyutundan daha küçük partikül boyutları, hacim başına daha geniş bir yüzey alanı sağlar ve mikroorganizmanın substratla temasını arttırır. Buna karşın, substratın topaklaşmasına neden olacağından oksijen transferini olumsuz etkiler [67]. Optimum partikül boyutundan daha büyük partikül boyutları ise hacim başına küçük bir yüzey alanı verir. Bu durum oksijen transferini olumlu etkilese de mikroorganizmanın substratla temasını azaltır [66]. Bununla birlikte, substratın partikül boyutu fermentasyon süresi boyunca sabit kalmaz, azalma eğilimi gösterir [53].

Nem İçeriği

Mikroorganizmaların aktivite için gereksinim duyduğu su miktarı, ortam veya substratın su aktivitesi (a_w) şeklinde niceliksel olarak ifade edilir. Su aktivitesi, substratın içerdiği serbest su miktarının bir göstergesidir. Dolayısıyla KHF'de kullanılabilecek mikroorganizmanın türünü belirler [48]. Yüksek nem içeriği, katı substrat partiküllerinin topaklanmasına ve yüzey alanı/hacim oranının azalmasına neden olur. Bu durum, oksijen transferinin sınırlandırılmasına ve mikrobiyal ürün üretiminde önemli bir düşüşe yol açar [68, 69]. Düşük nem içeriği ise mikrobiyal büyümeyi olumsuz etkiler. Nem içeriğinin korunması için küf fermentasyonlarında fermentasyon ortamına aralıklı olarak uygun miktarda su eklenebilir. Buna karşın, katı ortamın kurumasını engellemek için yaygın olarak KHF sistemlerine doymuş (%100 bağıl neme sahip) hava beslenir [70].

pH

Katı substratın doğası, heterojen ortam ve uygun online pH ölçüm yöntemlerinin olmaması nedeniyle KHF’de pH’nın ölçülmesi ve kontrol edilmesi pratikte neredeyse imkansızdır [71]. Dolayısıyla, KHF prosesleri için genellikle geniş bir pH aralığında büyüeyebilen mikroorganizmaların seçilmesi önerilir [72].

Her mikroorganizma, büyüme ve aktivite için belirli bir pH aralığına ve bu aralık içinde maksimum performans sergilediği optimum bir pH değerine sahiptir. Geniş bir pH aralığında (2.0–9.0) büyüeyebilen küfler için optimum pH aralığı 3.8–6.0’dır. Mayalar da küfler gibi geniş bir pH aralığında (2.5–8.5) büyüeyebilir, ancak optimum pH değerleri 4–5’tir. Bakteriler ise genellikle nötr pH değerlerinde büyümektedir [48, 53].

Villegas vd. tarafından, pH ölçümünün; katı kültür ortamının suda süspansiyon edildikten sonra potansiyometrik bir elektrot ya da standart bir pH elektrodu kullanılarak yapılması önerilmiştir [73].

Sıcaklık

Fermentasyonda optimum sıcaklık değerleri 20–40 °C arasında değişen ve 50 °C’nin altında maksimum büyüme gösteren mezofilik mikroorganizmalar kullanılır. Bununla birlikte, KHF’de mikrobiyal büyüme önemli miktarda metabolik ısı üretir. Bir KHF prosesinde kg hücre kütlesi başına 100–300 kJ ısı üretildiği bildirilmiştir [74].

KHF’de açığa çıkan metabolik ısının uzaklaştırılması pek çok nedenle oldukça güçtür. Örneğin katı substratın düşük transfer katsayısı ve zayıf termal iletkenliği ısının uzaklaştırılmasını zorlaştırır [75]. Aynı zamanda, KHF, ısıyı absorbe edebilen suyu çok az miktarda içerir. Başka bir deyişle, katı ortamın ortalama özgül ısısı suyunkinden çok daha düşüktür. Bu nedenle sıcaklık hızla yükselebilmektedir. Substrattan ısının etkin bir şekilde uzaklaştırılamaması sıcaklık gradyanlarının oluşmasına ve substratın lokal olarak aşırı ısınmasına neden olur [76].

Sıcaklık gradyanlarının meydana gelmesi; istenmeyen metabolik sapmalar, ortamın nem içeriğinde azalma, düşük ürün verimi gibi pek çok soruna yol açar. Ek olarak, metabolik aktiviteden kaynaklanan ve fermentasyon sırasında sistemde biriken ısı, yoğunlaşma meydana getirerek çok miktarda suyun katı kültür ortamına geri dönmesine neden olur ve bu durum katı substratın heterojenliğini artırır [77].

KHF’de ısı transfer sorununa çözüm getirmek için pek çok yöntem kullanılmıştır. Isının dağıtılması için biyoreaktörü çevreleyen bir ceket içerisinde suyun sirküle edilmesi, katı ortamın çalkalanması ya da aralıklı olarak karıştırılması bunlardan bazılarıdır. Ancak katı substratın zayıf termal iletkenliği ve genellikle KHF ortamının statik doğası nedeniyle bu tür yöntemler metabolik ısıyı dağıtmak için yetersiz kalmaktadır [76].

Şimdiye kadar ısı birikimiyle başa çıkmak için geliştirilmiş en iyi yöntemin zorlamalı havalandırma olduğu ve ısıнын yaklaşık %80'ine kadarını uzaklaştırabildiği için sıklıkla tercih edildiği rapor edilmiştir [53]. Bununla birlikte, katı kültür ortamının kurumasıyla sonuçlanacak düzeyde nem kaybının olmaması için sisteme kuru hava yerine doymuş hava beslenmesi önerilmektedir [78].

Havalandırma

Aerobik fermentasyonlarda, mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu oksijenin partiküller arasındaki boşluklardan biyokütleye taşınması; üretilen karbondioksitin ise yine partiküller arası boşluğa yayılarak sistemden uzaklaştırılması gerekir. Bu nedenle katı kültür ortamı havalandırılmalı ve/veya karıştırılmalıdır.

Havalandırma işleminin KHF'de birden fazla rolü vardır. Havalandırma ile aerobik mikroorganizmaların oksijen gereksinimi karşılanırken; aynı zamanda, heterojen sistemin ısı ve kütle transferi (metabolik ısıнын ve üretilen karbondioksit ile diğer uçucu metabolitlerin uzaklaştırılması) sağlanır. Havalandırmada dikkat edilmesi gereken noktalar havanın akış hızı ve kalitesidir. Havalandırma işlemi, fermentasyon sırasında ortaya çıkan metabolik ısıнын uzaklaştırılmasında başat rol oynadığı için sisteme kaliteli ve optimize edilmiş akış hızına sahip havanın beslenmesi sıcaklık kontrolünü iyileştirir [79, 80]. Ek olarak, akış hızının mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumunu olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir [81].

Sisteme yüksek akış hızında beslenen kuru hava, ısıнын uzaklaştırılmasında son derece etkin olmakla birlikte katı fermentasyon ortamının nem kaybetmesine yol açar. Bu nedenle, substratın kurumasını engellemek ve sistemin sıcaklık ve nem gradyanlarını kontrol etmek için yaygın olarak doymuş hava kullanılır [79]. Bununla birlikte, oksijen transfer hızı; fermentasyon ortamının nem içeriği, katı yatağın porozitesi ve derinliği, kültür kabındaki deliklerin sayısı, biyoreaktörün tasarımı gibi pek çok ortam özelliği ve işletim parametresinden etkilenir [82].

Karıştırma

Karıştırma işlemi, sürekli ya da periyodik olarak karıştırılan KHF biyoreaktörlerinde sistemin temel bileşenlerinden biridir. Havalandırma ile benzer bir işleve sahip olmakla birlikte, fermentasyon ortamının homojenliğini artırır [83]. Ancak bu işlem, katı substratın yapısını bozmamalı ve ortamda kümeleşmeye neden olmamalıdır. Ayrıca, kullanılan mikroorganizma karıştırma sırasında oluşan kesme kuvvetlerine dayanıklı olmalıdır. Bu kuvvetler, özellikle küf miselyumlarını tahrip ederek hücre hasarına yol açabilmektedir [84]. Bu nedenle, bu tür sistemlerde genellikle düşük karıştırma hızları tercih edilir ya da karıştırma işlemi aralıklı olarak gerçekleştirilir [85]. Bununla birlikte, karıştırma işlemi, katı substrat yüzeyiyle sıkı temas hâlinde olmayan bakteri ve maya hücrelerinin kullanıldığı KHF proseslerinde daha yaygın kullanılır [48].

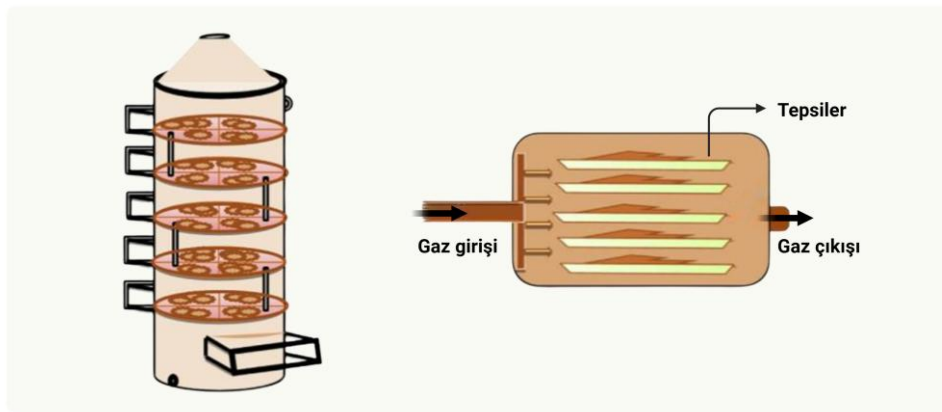
2.3.3. Katı Hal Fermentasyonu Biyoreaktörleri

KHF’de kullanılan biyoreaktörler, sistemdeki havalandırma ve karıştırma özelliklerine göre farklı kategorilere ayrılmaktadır. Bu doğrultuda, Mitchell vd. tarafından tanımlanan dört temel biyoreaktör tipi aşağıda sunulmuştur [47]:

1. Karıştırma işleminin yapılmadığı ve havalandırmanın zorlamasız olarak gerçekleştirildiği statik yataklı biyoreaktörler (tepsili biyoreaktör gibi)
2. Karıştırma işleminin yapılmadığı ve havalandırmanın zorlamalı olarak gerçekleştirildiği statik yataklı biyoreaktörler (dolgulu kolon biyoreaktörü gibi)
3. Karıştırma işleminin sürekli ya da aralıklı olarak yapıldığı ve havalandırmanın zorlamasız olarak gerçekleştirildiği biyoreaktörler (döner tamburlu biyoreaktör gibi)
4. Karıştırma işleminin sürekli ya da aralıklı olarak yapıldığı ve havalandırmanın zorlamalı olarak gerçekleştirildiği biyoreaktörler (akışkan yatak biyoreaktörü gibi)

Tepsili Biyoreaktörler

Tepsili biyoreaktörler (TB), genellikle ahşap, paslanmaz çelik veya plastik gibi malzemelerden üretilmiş, tabanında yatay hava geçişine olanak sağlayan deliklere sahip tepsilerden oluşur. Bu tepsilerin üzerine 5–15 cm kalınlığında yayılmış aşılınmış katı substrat tabakası yerleştirilir. Tepsiler, aralarında yeterli boşluklar kalacak şekilde, sıcaklık ve nemin kontrol altında tutulduğu inkübasyon odalarına veya cihazlarına istiflenir [49]. Üst yüzeyleri açık olan bu sistemlerde hava ile temas doğal olarak gerçekleşir. Sıcaklık kontrolü, odaya giren havanın sıcaklığının ayarlanmasıyla; nem kontrolü ise ortama püskürtülen steril su ile sağlanır. Metabolik ısının uzaklaştırılması ise esas olarak tepsi duvarları aracılığıyla ortama iletim yoluyla gerçekleşir. Ancak karıştırma uygulansa bile, endüstriyel ölçekli sistemlerde bu pasif soğutma yeterli olmaz ve etkin ısı ve kütle transferinin sağlanamaması, substratın verimli kullanılmasını olumsuz etkiler [86]. TB’nin genel yapısı Şekil 2.5’te şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 2.5. Tepsili biyoreaktörün genel yapısı [49].

TB’lerde katı substrat yatağının kalınlığı, sistemin verimliliğini doğrudan etkileyen kritik bir parametredir. Literatürde, 37 °C’lik ortam sıcaklığında pirinç kepeği üzerine inoküle edilen *Rhizopus oligosporus* ile yürütülen bir fermentasyon sürecinde, yatağın 5 cm derinliğinde sıcaklığın 50 °C’ye kadar yükseldiği bildirilmiştir [86]. Aşırı sıcaklık artışı, oksijen yetersizliği ve nem kaybı gibi durumların önüne geçilebilmesi için, substrat tabakasının ince tutulması gereklidir. Ancak bu durum, TB sistemlerinde işlenebilecek substrat miktarını sınırlandırır. Ayrıca, bu sistemler yüksek alan ihtiyacı, kontaminasyona açıklık ve iş yükünün fazla olması gibi dezavantajlara da sahiptir [87].

Küf fermentasyonlarında, miselyum gelişimiyle birlikte substrat yatağında kekleşme meydana gelebilir; bu durum, hava akışına karşı ek bir direnç oluşturarak başlangıçta sınırlı olan ısı ve kütle transferinin daha da verimsiz hale gelmesine yol açar. Karıştırma düzeneği entegre edilmiş TB çeşitleri geliştirilmiş olsa da bu işlem mikroorganizmalarda yapısal hasara neden olabilir. Nitekim bazı çalışmalar, karıştırma uygulanmayan TB proseslerinin, karıştırmalı versiyonlara kıyasla daha yüksek ürün verimi sağlayabildiğini göstermiştir [88].

Tepsili biyoreaktörlere dair geniş bir literatür birikiminin bulunması, bu sistemlerin farklı endüstriyel uygulamalarda yaygın şekilde tercih edilmesini sağlamaktadır [67, 89]. Pektinaz, selüloz ve fitaz gibi birçok ticari enzim üretiminde hâlen en çok kullanılan KHF biyoreaktör tipi TB’dir. Ayrıca geleneksel koji fermentasyonu gibi bazı özel üretim süreçleri de endüstriyel ölçekte tepsili sistemlerde yürütülmektedir [90].

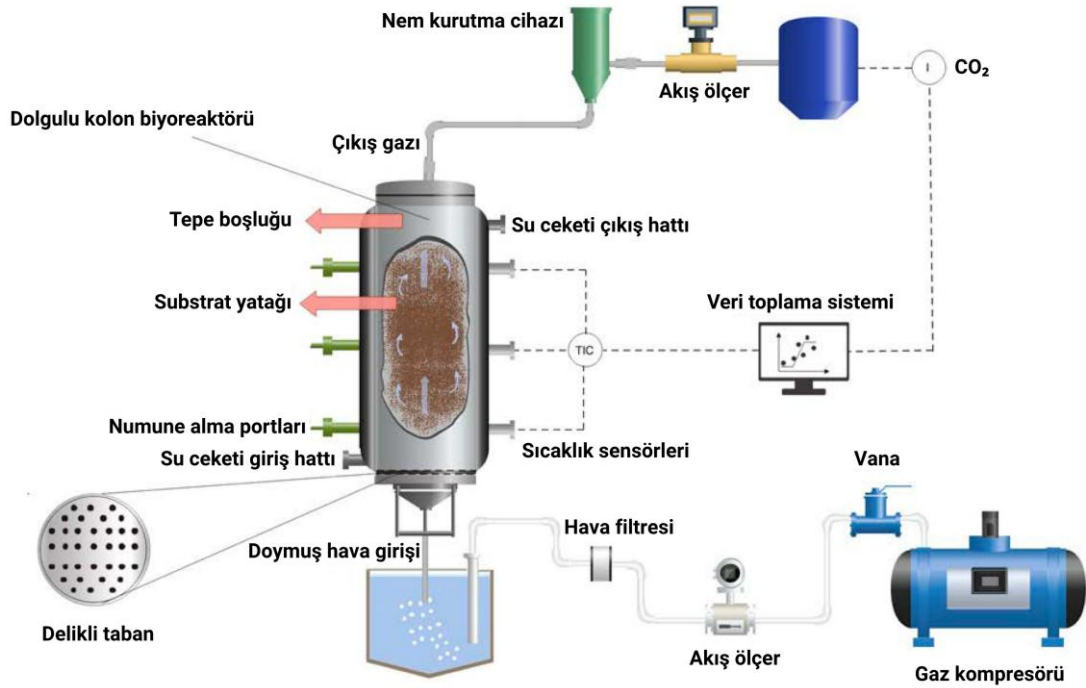
Dolgulu Kolon Biyoreaktörü

TB’de karşılaşılan sorunları aşmak amacıyla geliştirilen dolgulu kolon biyoreaktörü (DKB), sabit yataklı yapıda olup içerisinde önceden aşılınmış katı substratın bulunduğu kapalı bir sistemdir. Genellikle silindirik yapıda olan DKB’ler cam ya da metal tüpler şeklinde tasarlanır.

DKB’nin en belirgin özelliği, substrat yatağı boyunca uygulanan zorlamalı hava akışdır. Zorlamalı havalandırma, mikroorganizmaların oksijen ihtiyacını karşılamakla birlikte, mikrobiyal büyüme sırasında açığa çıkan ısıyı ve karbondioksiti uzaklaştırmaya yardımcı olur. Aynı zamanda yatak neminin korunmasını sağlar [91].

Silindirik cam veya metal tüplerden oluşan DKB tasarımlarında, etkin ısı transferini sağlamak amacıyla reaktör duvarına yerleştirilen ısı ceketleri ya da yatak içerisine entegre edilen soğutma plakaları gibi sistem bileşenleri bulunabilir. Ayrıca, bazı DKB modellerinde yatak homojenliğini artırmak, nem seviyesini dengelemek veya kanallaşma oluşması durumunda substrat yatağını yeniden düzenlemek amacıyla aralıklı karıştırma uygulanmaktadır [92].

Tipik bir DKB sistemine ilişkin şematik gösterim Şekil 2.6’da sunulmuştur.

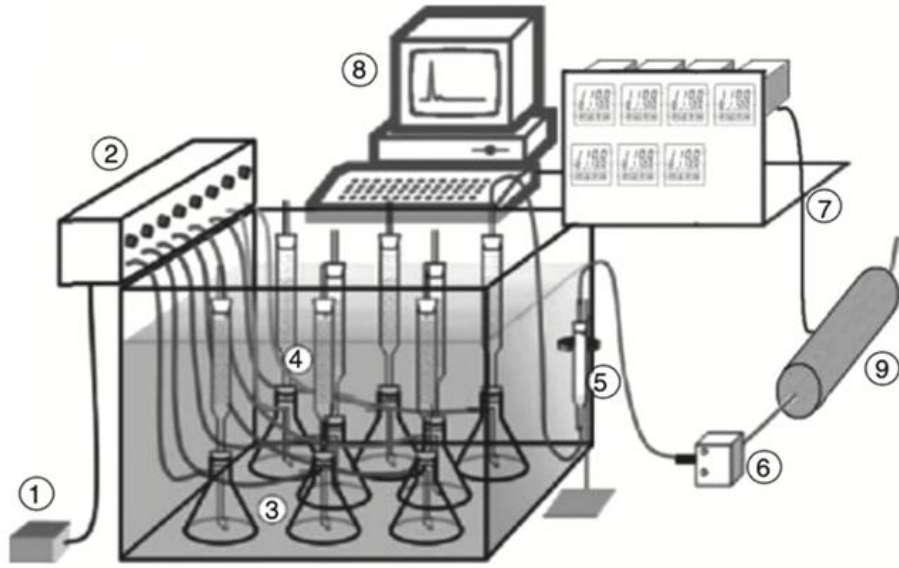


Şekil 2.6. Lignoselülozik biyokütle dönüşümüne yönelik tipik bir katı hal dolgulu kolon biyoreaktörünün şematik gösterimi [92].

DKB'ler, KHF uygulamalarında enzim, organik asit, sekonder metabolit ve spor üretimi amacıyla laboratuvar düzeyinde en yaygın kullanılan sistemler arasında yer almaktadır. İşlem ölçeğine bağlı olarak kolonların yapısı ve üretildikleri malzeme değişkenlik göstermekle birlikte; laboratuvar ölçekli uygulamalarda etkin havalandırma sağlamak ve oluşabilecek sıcaklık gradyanlarını en aza indirmek amacıyla genellikle küçük çapa (2–4 cm), ince cidara (1–2 mm) ve kısa yüksekliğe (10–20 cm) sahip cam kolonlar tercih edilmektedir [86].

Literatürde 'Raimbault Kolonları' olarak anılan, termoregülasyonlu bir su banyosuna yerleştirilmiş çok sayıda küçük DKB ünitesinden oluşan bir sistem; ortam bileşiminin optimizasyonu, mikrobiyal büyümenin izlenmesi ve çıkış gazındaki oksijen ve karbondioksit analizlerine olanak sağlaması nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır [93]. Bu sistemde, her bir kolona önceden aşılınmış katı substrat yerleştirilir ve kolonların alt ve üst kısımlarında bulunan delikler aracılığıyla hava akışı sağlanır. Kolonların tabanından geçirilen steril ve doymuş hava, substrat yatağı boyunca yukarı yönde ilerlerken; çıkış gazının debisi bir akış ölçer aracılığıyla ölçülür ve bu gaz, oksijen ile karbondioksit bileşimini analiz eden bir sistemle entegre olarak değerlendirilir [94].

Şekil 2.7'de Raimbault dolgulu kolon biyoreaktör sisteminin bir şeması sunulmuştur.



Şekil 2.7. Raimbault dolgu kolon biyoreaktörü sistemi [94]:

(1) hava pompası; (2) hava dağıtım sistemi; (3) nemlendiriciler; (4) sıcaklığı kontrol edilen bir su banyosuna daldırılmış fermentasyon kolonları (dolgu kolon biyoreaktörleri); (5) filtre; (6) akış sensörü; (7) kontrol ekranı; (8) veri toplama ve kontrol yazılımına sahip bilgisayar; (9) O₂, CO₂, nem ve çıkış sıcaklığının takibi için gaz analizörü

Kolonlara verilen havanın neden olduğu konveksiyon etkisi sayesinde, sıcaklık gradyanlarına ilişkin sorunlar bu tip biyoreaktörlerde önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Ayrıca, kolonun alt çeperinden uygulanan zorlamalı havalandırma, fermentasyon ilerledikçe azalan dolgu gözenekliliğini dengeleyerek hava geçişini sürdürülebilir kılmaktadır. Ancak ısı ve kütle transferinin etkinliği, yalnızca havalandırmaya değil, aynı zamanda substratın yeterli partiküller arası boşluklara sahip olmasına da bağlıdır [54]. Doymuş hava kullanılarak gerçekleştirilen zorlamalı havalandırma, kuru havaya kıyasla substrat yatağındaki nem ve sıcaklık gradyanlarını belirgin şekilde iyileştirmektedir. Ancak mikrobiyal aktivite sonucu oluşan metabolik ısınn fermentasyon süresince tamamen giderilmesi mümkün değildir [95].

Kapalı bir sistem olması nedeniyle DKB’de kontaminasyon riski oldukça düşüktür. Bunun yanı sıra, aynı reaktör ünitesinin hem fermentasyon hem de nihai ürün ekstraksiyonu amacıyla kullanılabilmesi; biyoreaktör hacmi başına daha yüksek miktarda substrat yüklenebilmesi ve her bir kolonun bağımsız çalışabilmesi sayesinde farklı parametrelerin aynı deney seti içinde değerlendirilebilmesi DKB’nin önemli avantajlarından [55, 94]. Öte yandan, substrat yatağının sıkışması, zorlamalı havalandırma ile çalışan DKB’lerde yaygın olarak karşılaşılan bir sorundur. Bu durum, hava akışının belli kanallardan ilerlemesine, yatak basıncının düşmesine ve dolayısıyla ısı transferinde kısıtlamalara yol açmaktadır [91].

Küçük ölçekli DKB’ler, daha büyük sistemlere yönelik ölçeklendirme çalışmalarında referans alınabilecek veri üretimi açısından önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bu amaca hizmet edebilmesi

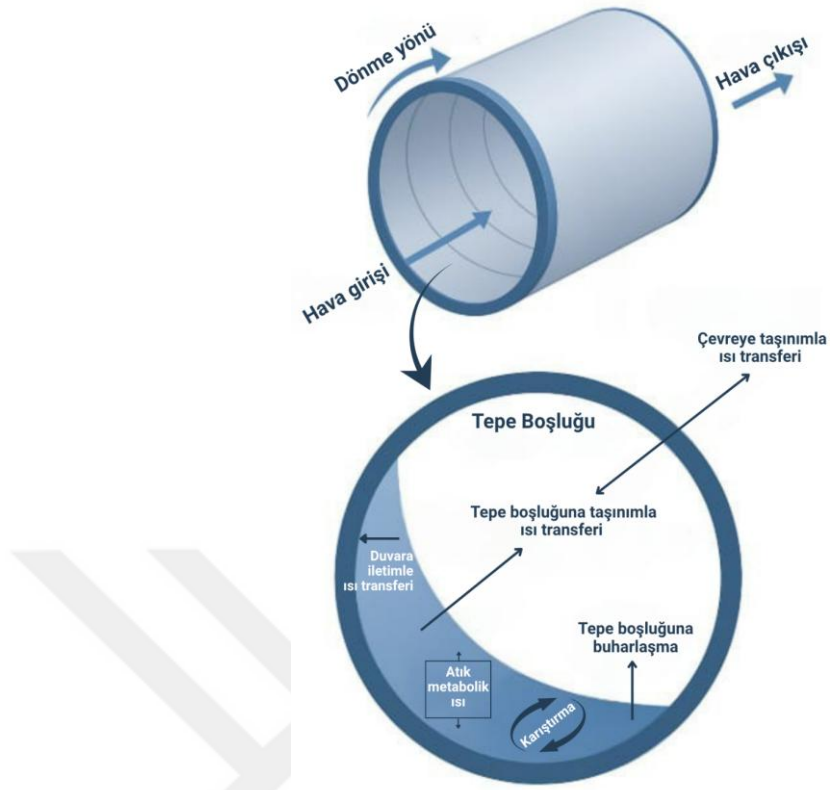
için sistemin fiziksel olarak düzgün çalışması gerekir. Başka bir deyişle, hava akışının reaktöre girişinden çıkışına kadar, katı substrat yatağını homojen şekilde geçmesi beklenir. Substrat yatağı içinde çatlak oluşumu ya da reaktör duvarı ile yatak arasında boşluklar meydana gelmesi durumunda, hava daha az dirençli olan bu bölgeleri tercih ederek ilerler ve ‘kanallaşma’ olarak bilinen istenmeyen bir akış profili oluşur. Kanallaşmanın varlığı, hava girişi ile çıkışı arasındaki sıcaklık profilinin izlenmesiyle değerlendirilebilir [92].

Eğer biyoreaktöre doymuş hava verilirse ve hava yatak boyunca düzgün bir şekilde dağılırsa, mikrobiyal metabolizma sonucu oluşan ısı ve konvektif hava akışıyla tanışınan ısının birleşik etkisi, hava girişi ile çıkışı arasında yatayda monoton bir sıcaklık artışı oluşturur [47].

Genellikle hava, reaktörün alt kısmından verilerek üstten çıkışı sağlanır. Bu durumda, mikrobiyal büyümenin devam ettiği bir süreçte, yatak yüksekliği boyunca sıcaklık değerinin yukarı doğru arttığı düzenli bir profil gözlenmelidir. Yatak boyunca meydana gelen eksenel sıcaklık gradyanları, hava akışının yatak içindeki düzgünlüğü hakkında dolaylı bilgi sunmaktadır [92]. Nitekim çeşitli çalışmalarda, bu amaçla farklı yatak yüksekliklerinden alınan sıcaklık verileri değerlendirilmiştir [96-98]. Bir çalışmada, yatakta beklenen monoton sıcaklık artışının gerçekleştiği ve fermentasyon sürecinin büyük bölümünde sıcaklıkların şu sıra ile arttığını bildirilmiştir [66]: $T_{3cm} < T_{6cm} < T_{9cm} < T_{12cm} < T_{15cm}$ (alt simge, ölçümün yapıldığı yatak yüksekliğini göstermektedir). Ancak bazı diğer çalışmalarda bu sıcaklık artışı düzeninin tüm fermentasyon süresi boyunca korunamadığı ve farklı yüksekliklerde sıcaklık dalgalanmaları gözlemlendiği rapor edilmiştir [96-99]. Bu durum, yatakta kanallaşma oluştuğuna işaret etmektedir [92].

Döner Tamburlu Biyoreaktör ve Karıştırılabilir Tamburlu Biyoreaktör

Şekil 2.8’de gösterildiği üzere, döner tamburlu biyoreaktör (DTB), yatay ya da hafif eğimli bir silindirik gövdeye sahiptir ve substrat yatağı, tambur duvarı ve gaz tepe boşluğu olmak üzere üç temel bileşenden oluşur. Bu sistemde, sıcaklık ve bağıl nem değeri önceden ayarlanmış olan hava akımı, substrat yatağının içerisine verilmez; doğrudan tepe boşluğuna yönlendirilir. Başka bir ifadeyle, hava substrat yatağından zorlamalı olarak geçirilmez; havalandırma, substrat yüzeyinin tepe boşluğundaki gaz fazı ile temas etmesi yoluyla sağlanır [84]. Substrat yatağının hacmi genellikle reaktörün toplam hacminin %10–40’ı arasında değişmekte olup etkili oksijen ve karbondioksit transferinin sağlanabilmesi için bu oranın düşük tutulması önerilmektedir [100, 101]. DTB sistemlerinde tamburun dönme hareketi, substrat yatağının yuvarlanarak karıştırılmasını sağlar ve karıştırma yöntemi; kullanılan mikroorganizmanın fizyolojik özelliklerine bağlı olarak sürekli, aralıklı ya da hibrit şekilde gerçekleştirilebilir. Sürekli karıştırma uygulamalarında, substratın fiziksel homojenliğinin artırılması ve aerobik koşulların iyileştirilmesiyle birlikte oksijen transferinin daha etkin gerçekleşmesi hedeflenir [102].



Şekil 2.8. Döner tamburlu biyoreaktörün genel yapısı ve çalışma prensibi [102].

Mikrobiyal metabolizma sonucu açığa çıkan ısı, bir yandan substrat yüzeyinden tepe boşluğuna doğru difüzyonla, diğer yandan tamburun iletken gövdesi aracılığıyla çevre ortamına iletilerek uzaklaştırılır [103]. Isı uzaklaştırma hızının yetersiz olması, substrat yatağında ısı birikimine neden olarak fermentasyon sürecinde istenmeyen sıcaklık artışlarına yol açar; bu durum, mikroorganizma gelişimini ve ürün oluşumunu olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle sıcaklık kontrolünün başarısı, dönme hareketiyle oluşturulan karıştırmanın etkinliğine ve dolayısıyla tamburun dönüş hızına bağlıdır [104, 105].

DTB’lerde sürekli karıştırma uygulamalarında genellikle 1–15 RPM aralığında düşük dönme hızları tercih edilmekle birlikte, daha yüksek hızlar da kullanılabilir.

Çok düşük dönme hızları (1–3 RPM), substrat yatağının tambur iç yüzeyinden bütün hâlinde aşağı kaymasına ve karıştırmanın yetersiz kalmasına neden olabilir. Bu sorunun aşılması için iki strateji geliştirilmiştir: İlki, dönme hızının 10–50 RPM gibi yüksek değerlere çıkarılmasıdır; ancak bu yaklaşım, mikroorganizmaların kesme kuvvetine maruz kalarak zarar görmesine yol açabilir [106]. İkinci yöntem ise, tambur iç yüzeyine düz veya kavisli bölmeler yerleştirilerek substratın daha yumuşak ve dengeli biçimde karıştırılmasını sağlamaktır. Yapılan bir çalışmada, kavisli bölmelerle donatılmış sistemlerde radyal ve eksenel yöndeki karıştırma etkinliğinin, düz bölmeli sistemlere

kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [107]. Ancak bu tür tasarımlar, yükleme ve boşaltma işlemlerini daha karmaşık hâle getirerek sistemin operasyonel esnekliğini azaltabilir [108].

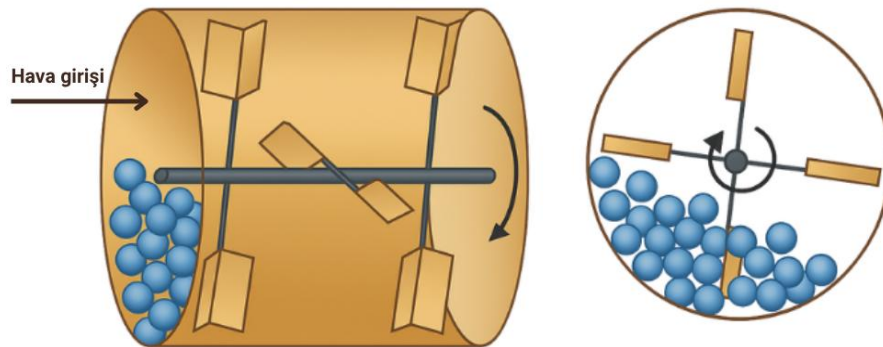
DTB sistemlerinde karşılaşılan bir diğer önemli sınırlama, tepe boşluğundaki gaz fazının eksenel yönde tıkaç akış (plug flow) karakteri göstermesidir [106]. Bu durum, substrat yatağı boyunca eksenel sıcaklık gradyanlarının oluşmasına ve ısı dağılımının homojenliğini kaybetmesine yol açmaktadır. Bu problemin eksenel karıştırma sağlayan açılı bölmeler aracılığıyla azaltılabileceğini belirtilmiştir [68, 107]. Bununla birlikte, sistem boyunca birden fazla noktadan hava giriş ve çıkışı sağlanması gerekliliği, DTB'nin yapısal tasarımını önemli ölçüde karmaşıktırlandırmaktadır [108].

Hava sirkülasyonunun sağlandığı ve sürekli karıştırma mekanizmasına sahip DTB sistemleri, laboratuvar ve pilot ölçekli KHF uygulamalarında yaygın olarak tercih edilmektedir [86].

Aralıklı karıştırma prensibiyle çalışan DTB'ler ise durma anında tepsili biyoreaktör gibi statik çalışırken, döndüğünde klasik DTB işleyişine benzer bir karıştırma sağlar. Bu mod, substrat yatağında topaklaşmayı azaltmakta ve filamentli mikroorganizmaların mekanik hasara uğramasını engelleyerek prosesin verimliliğini artırmaktadır [102, 104]. Ayrıca, aralıklı karıştırma ve havalandırma uygulamalarının; ortam sıcaklığı, nem oranı, gaz transferi ve homojenlik gibi parametrelerin kontrolünde avantaj sağladığı bildirilmektedir [103].

Karıştırmalı tamburlu biyoreaktörlerde (KTB), tambur gövdesi sabit olup karıştırma işlemi, tambur içindeki merkezi eksene bağlı olarak dönen kürekler aracılığıyla gerçekleştirilir. Havalandırma sistemi ise DTB'de olduğu gibi, hava akımının substrat yatağından geçirilmeden doğrudan tepe boşluğuna yönlendirilmesi esasına dayanır.

Çalışma prensibi bakımından DTB'lerle büyük oranda benzerlik gösteren KTB'nin şematik gösterimi Şekil 2.9'da sunulmuştur.



Şekil 2.9. Karıştırmalı tamburlu biyoreaktörün genel yapısı [84].

Akışkan Yatak Biyoreaktörü ve Püskürtmeli Yatak Biyoreaktörü

Gaz–katı akışkan yatak biyoreaktörü (AYB), alt kısmında delikli bir hava dağıtım plakası bulunan dikey konumlandırılmış silindirik bir hazneye sahiptir. Sistemin üst bölümünde, substratın kümeleşerek çökmesini önleyen bir topak kırıcı ve akışkanlaşan yatağın genleşmesine olanak sağlayan bir tepe boşluğu yer alır. Katı substrat partiküllerinin süspansiyon hâline getirilmesi ve gaz–katı–sıvı fazlarının etkin bir biçimde karışması, alt plakadan zorlamalı olarak verilen hava akımıyla sağlanır [109].

Akışkanlaştırma için gerekli olan akış hızları, etkili bir ısı ve kütle transferi sağlamakla birlikte, ortamın soğutulmasına da katkı sunar [110, 111]. Öte yandan, yüksek akış hızları, başta küf fermentasyonları olmak üzere, kesme kuvveti kaynaklı hücresel hasara neden olabilir. Bununla birlikte, akışkanlaştırma mekanizması, yalnızca ince partiküller üzerinde etkili çalışır. KHF’de sıkça kullanılan iri, yapışkan ve heterojen substratlar için bu sistemin uygulanabilirliği sınırlıdır [112].

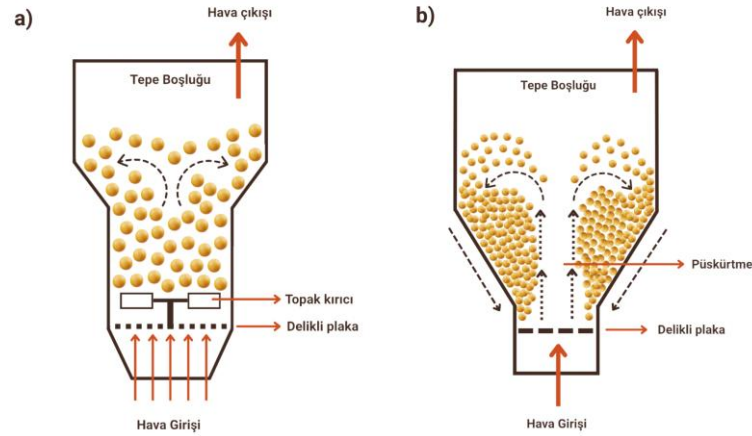
AYB performansı, katı substratın fiziksel özelliklerinden doğrudan etkilenmektedir [113]. Özellikle homojen partikül boyutu, yatağın düzgün biçimde akışkanlaştırılabilmesi açısından kritik bir parametredir. Farklı boyutlarda partiküllerin bulunduğu durumlarda, daha küçük olanlar kolaylıkla akışkanlaşabilirken, daha büyük partiküller sistemde durağan kalabilir [114].

Gaz–katı püskürtmeli yatak biyoreaktörü (PYB), AYB sistemine benzer yapısal özellikler taşımakla birlikte, karıştırma mekanizmasında temel farklılıklar gösterir. Bu sistemde mekanik karıştırıcılar bulunmaz; substratın homojen dağılımı, yatağa yüksek hızda verilen hava akımıyla sağlanır. Gazın merkezden püskürtülmesiyle birlikte substrat partiküllerinin bir bölümü yukarı taşınırken, hazne duvarlarının eğimli yapısı sayesinde diğer partiküller aşağı yönde hareket eder. Bu karşılıklı akış yönleri, katının sürekli şekilde sirküle edilmesini sağlar [115].

PYB sisteminin, AYB’ye göre önemli avantajları olduğu bildirilmiştir [116, 117]. Örneğin, iri ve düzensiz yapıya sahip partiküller PYB’de öğütme işlemine gerek duyulmaksızın etkin biçimde püskürtülebilirken; AYB’de akışkanlaştırılamayan substratlar bu sistemde işlenebilir. Ayrıca, daha düşük akış hızlarında çalışabilmesi sayesinde PYB, enerji gereksinimini minimize eder. Bu yönüyle, KHF uygulamalarında kullanılan heterojen, yapışkan veya geniş boyut dağılımına sahip substratlar için oldukça elverişli bir ortam sağlar [118].

PYB’de gaz akımıyla sağlanan sirkülasyon, karıştırma etkinliğini artırarak sistemde daha yüksek ısı ve kütle transfer hızlarının elde edilmesine olanak tanır [119, 120]. Buna ek olarak, akışkanlaşma için gerekli minimum hava hızı AYB’ye kıyasla daha düşük seviyededir; bu durum enerji tüketimini azaltan önemli bir avantaj sunar [48].

Şekil 2.10’da AYB ve PYB’nin genel yapısı şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.10. Gaz-katı akışkan (a) ve püskürtmeli (b) yatak biyoreaktörlerinin genel yapısı [47].

2.3.4. Katı Hal Biyoreaktörlerinde İşletim ve Ölçeklendirme Sorunları

KHF biyoreaktör tasarımı ve işletimiyle ilgili temel sorunlardan biri sistemde biriken metabolik ısının etkin bir şekilde uzaklaştırılamamasıdır. Partiküller arası boşluğun hava tarafından doldurulduğu bir katı substrat yatağından atık metabolik ısıyı uzaklaştırmak, sürekli su fazından uzaklaştırmaktan daha zordur. Başka bir deyişle, sürekli su fazının termal özellikleri, yani sıvı suyun termal iletkenliği ve ısı kapasitesi, partiküller arası hava içeren nemli bir katı substrat yatağına göre daha üstündür [103]. Katı kültür ortamı veya fermente yatağın sıcaklığının çok yükselmesi, mikrobiyal büyüme ve ürün oluşumunu olumsuz yönde etkiler. Dolayısıyla biyoreaktör tasarımı ve proses optimizasyonu bu sorunu iyileştirebilecek nitelikte olmalıdır [39]. Isı dağılımından kaynaklanan güçlükler, yaygın olarak buharlaştırmalı soğutma ile aşmaya çalışılmış ve bu işlemin üretilen metabolik ısının büyük ölçüde giderilmesine yardımcı olduğu kaydedilmiştir. Büyük ölçekli sistemlerde ise bu sorunun üstesinden gelmek için pek çok tasarım geliştirilmiş ancak bunlardan çok azı metabolik ısının uzaklaştırılmasında başarılı sonuçlar vermiştir [121]. KHF proseslerinin bir diğer sorunu, kullanılan katı substratların (tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünler) fiziksel ve kimyasal karmaşıklığıdır. Katı substratın heterojen yapısı, biyoreaktör tasarımının geliştirilmesi ve etkin bir şekilde işletilmesi için iyi anlaşılması gereken reaksiyon kinetiği ve sitokiyometrisi hakkında niceliksel bilgiye ulaşmayı zorlaştırır [84]. Bununla birlikte, porozite, su tutma kapasitesi, yüzey alanı, dayanıklılık gibi özelliklerinden kaynaklanan pek çok fark, katı kültür ortamlarının da farklı davranmasına neden olacağından biyoreaktör tasarımında ya da seçiminde bu faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekir [72]. Fermentasyon esnasında substratın kullanımı sonucu uğradığı değişim, başka bir deyişle, substrat yatağının kekleşmesi, proses kontrolünde zorluklara yol açar ve endüstriyel ölçekli KHF sistemlerinin geliştirilmesinde önemli bir sorun teşkil eder [122]. Bir diğer önemli sorun ise ısının etkin bir

şekilde dağıtılması ve substrat ile mikroorganizma temasının artırılması için yapılan karıştırma işlemine karşı mikroorganizmaların hassasiyet göstermesidir [123]. Örneğin, substratın karıştırılması ısı ve kütle transferini iyileştirirken, aynı zamanda, küf misellerine zarar vererek büyüme ve ürün oluşumunu olumsuz yönde etkileyebilir [86]. Mikroorganizma hassasiyeti, optimum bir dönme hızı kullanılarak kontrol edilebilir ancak biyoreaktörün boyutu, kullanılması gereken optimum rpm'nin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığından biyoreaktörün tasarımıyla ilişkili faktörlere dayalı olarak belirlenmelidir. Bununla birlikte, karıştırma işlemi biyoreaktör içerisine yerleştirilen bölmelerle de sağlanabilir. Bölmelerin sayısı ve yerleştirildiği aralıklar etkin bir karıştırmanın gerçekleştirilebilmesi için önemli bir faktördür [121]. Proses optimizasyonu ve ölçeklendirme için mikrobiyal solunumun takip ve kontrolünün son derece önemli olduğu rapor edilmiştir [124].

Son yıllarda, KHF biyoreaktörlerinin tasarımı ve işletimi üzerine araştırmalar yapılmaya devam edilmiş ancak sorunlar ağırlıklı olarak tepsili biyoreaktörler, döner tamburlu biyoreaktörler ve dolgulu kolon biyoreaktörleri etrafında çözümlenmiştir [54]. Öte yandan, KHF’de meydana gelen temel süreçler (özellikle taşınım olayları ve mikrobiyal büyüme) ile biyoreaktörlerin tasarım ve işletiminin KHF performansı üzerine etkileri hakkındaki bilgi eksikliği nedeniyle KHF’nin büyük ölçekli sistemlere uygulanabilirliği halen yeterince iyi anlaşılamamıştır.

2.3.5. Katı Hal Fermentasyonunda Alt Akım İşlemleri

Fermentasyon sonrası elde edilen nihai ürünün konsantrasyon ve saflık bakımından kalitesini arttırmak amacıyla gerçekleştirilen alt akım işlemlerinde, kullanılacak yöntemin seçimi ürünün doğasına (hücre içi ya da hücre dışı olup olmadığı ve fizikokimyasal özellikleri), fermentasyon türüne, hücrelerin durumuna (serbest ya da immobilize) ve kullanılan biyokatalizöre (enzim ya da mikroorganizma) bağlıdır [125]. Fermente katının tamamının ürün olarak kullanıldığı KHF proseslerinin yanı sıra nihai ürünün katıdan geri kazanılıp saflaştırılmasını gerektiren KHF prosesleri de vardır. Bu tür KHF proseslerinde kullanılan ekstraksiyon işlemi DKF proseslerinde gereksinim duyulmayan bir adımı temsil eder. Bununla birlikte, ekstraksiyonu takip eden alt akım işlemlerinin genel prensipleri her iki proses için de benzerdir [47].

Enzimlerin geri kazanımında tercih edilen yöntemler, ürünün doğasına ve kullanım amacına göre değişiklik göstermektedir. Tekstil, kâğıt, yem ve gıda endüstrisi gibi pek çok endüstride ham preparat olarak kullanılan enzimlerin çoğu kültür ortamına salındığından su ya da tampon çözeltilerle basit bir şekilde ekstrakte edilebilir. Laboratuvar ölçeğinde yapılan bazı çalışmalar, enzim geri kazanımında etkin olan faktörlerin ekstraksiyon süresi, ekstraksiyonun tekrar sayısı, çözücü tipi, çalkalama hızı ve katı-çözücü oranı (veya çözücü hacmi) olduğunu göstermektedir [126, 127]. Bununla birlikte, sıcaklık ve pH, enzim stabilitesi üzerinde etkili olduğundan ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraktın pH değeri dikkat edilmesi gereken diğer

hususlardır [128]. Optimum olmayan sıcaklık ve pH değerlerinin yanı sıra, katı ile çözücü arasındaki düşük temas alanı nedeniyle etkin bir şekilde gerçekleştirilemeyen kütle transferinin ekstraksiyon işleminde aktivite kayıplarına yol açabileceği rapor edilmiştir [129]. Mikrobiyal büyüme esnasında gerçekleşen reaksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan istenmeyen yan ürünler nedeniyle bazı uygulamalar için enzimlerin daha fazla saflaştırılması istenebilir. Bu durumda, enzimler amonyum sülfat gibi tuzlarla ya da asitlerle çöktürüldükten sonra ultrafiltrasyon ya da kolon kromatografisiyle saflaştırılır. Ancak ileri saflaştırma işlemleri, proses maliyetlerinin artmasına ve aktivite kayıplarına neden olmaktadır [130]. Alt akım işlemleri sonucu açığa çıkan katı atıkların bazıları ürün olarak (hayvan yemi gibi) ya da çeşitli proseslerde ham madde olarak (anaerobik çürütme yoluyla biyogaz eldesi gibi) kullanılmakla birlikte uygun bir şekilde bertaraf edilmesi gereken katı atıklar da vardır [47, 131].

2.3.6. Katı Hal Fermentasyonu ile Derin Kültür Fermentasyonunun Karşılaştırılması

KHF ve DKF sistemlerine ilişkin kapsamlı bir karşılaştırmaya Tablo 2.3'te yer verilmiştir.

Tablo 2.3. Katı hal ve derin kültür fermentasyon yöntemlerinin karakteristik farklılıkları [52, 67, 108].

Katı Hal Fermentasyonu	Derin Kültür Fermentasyonu
Serbest su yoktur.	Su, kültür ortamının ana bileşenidir.
Katı substratın nem içeriği %12–70 aralığındadır.	
Mikroorganizmalar nemli katı substrattan beslenir	Mikroorganizmalar sıvı ortamdan beslenir
Besin konsantrasyon gradyanı vardır.	Besin konsantrasyon gradyanı yoktur.
Gaz, sıvı ve katı olmak üzere üç fazdan oluşur ve gaz sürekli fazdır. Gerekli oksijen gaz fazdan sağlanır.	Esas olarak sıvı fazdan oluşur ve sıvı sürekli fazdır. Gerekli oksijen sistemde çözünmüş halde bulunur.
Ortam heterojendir.	Ortam homojendir.
Proses düşük enerji tüketimine ihtiyaç duyar.	Proses yüksek enerji tüketimine ihtiyaç duyar.
Mikroorganizmalar katı substrata tutunur veya nüfuz eder.	Mikroorganizmalar sıvı kültür ortamında homojen bir şekilde dağılım gösterir.
Karıştırma zor ya da imkânsızdır. Bazı mikroorganizmalar karıştırmaya veya çalkalamaya karşı hassastır.	Karıştırma işlemi kolaydır.
Besin difüzyonundaki kısıtlamalar mikrobiyal büyümeyi olumsuz etkiler.	Besin difüzyonunda mikrobiyal büyümeyi olumsuz etkileyecek sınırlamalar meydana gelmez.
Fermentasyon sonunda ortamdaki substrat nemlidir.	Fermentasyon sonunda ortam sıvıdır.
Fermentasyon sonunda ürün konsantrasyonu yüksektir.	Fermentasyon sonunda ürün konsantrasyonu düşüktür.
Fermentasyon parametrelerinin online olarak izlenmesi ve kontrol edilmesi zordur.	Fermentasyon parametreleri online olarak takip ve kontrol edilebilir.
İnokülüm miktarı yüksektir (%10'dan fazla).	İnokülüm miktarı düşüktür (%10'dan az).
Metabolik ısının uzaklaştırılması zordur.	Sıcaklık kontrolü kolaydır.
Ekstraksiyon işlemi basit ve kontrol edilebilirdir.	Alt akım işlemleri genellikle karmaşıktır.
Az miktarda atık su oluşur.	Çok miktarda atık su oluşur.
Basit tasarıma sahip biyoreaktörler kullanılır.	Yüksek teknoloji biyoreaktörler kullanılır.
Hammadde maliyeti düşüktür.	Hammadde maliyeti yüksektir.
Ekipman yatırımı düşüktür.	Ekipman yatırımı yüksektir.
Ürün verimi yüksektir.	Ürün verimi düşüktür.

DKF, başta enzimler olmak üzere, biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan en yaygın yöntemdir. Bunun temel sebebi sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi proses faktörlerinin takip ve kontrolünün kolay olmasıdır [64]. DKF’de mikroorganizmalar büyüme döngüsü boyunca sabit bir sıcaklığa maruz kalır ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu (yüksek yoğunluğa sahip kültürlerde çok zor olsa da) genel anlamda makul bir seviyede tutulabilir. Buna karşın çözünmüş oksijen transferine ciddi sınırlamalar getirebilecek seviyelerde köpük oluşumu görülebilir [132]. KHF’de ise üretilen metabolik ısının uzaklaştırılmasındaki yetersizlikler nedeniyle sıcaklık, mikrobiyal büyüme için optimum olan değerin çok üzerine çıkarak katı substratın nem kaybetmesine ya da sulanmasına yol açabilir [47, 67]. Bununla birlikte, partikül yüzeyinde serbest şekilde bulunan oksijenin; partikül yüzeyinde bir biyofilm içerisinde bulunan ya da partiküle nüfuz etmiş olan biyokütlenin önemli bir kısmına ulaşmasında ciddi kısıtlamalar olabilir. Benzer şekilde, partiküller içinde besin konsantrasyonu gradyanları meydana gelebilir [113]. Öte yandan, mikroorganizmaların gereksinim duyduğu oksijen, gaz fazdan karşılandığı için sistem daha düşük miktarda enerji tüketir [55]. Ek olarak, DKF’nin aksine, mevcut biyokütle miktarı KHF’de kolaylıkla saptanamaz [132].

DKF’de hava kaldırmalı ya da kabarcık kolon biyoreaktörleri kullanılarak biyokütlenin kesme hasarından etkilenmesi minimuma indirilebilirken, KHF’de katı substrat partiküllerinin hareketi kesme hasarına yol açabilir. Özellikle mikroorganizma olarak küflerin kullanıldığı sistemlerde hifler ciddi bir hasara uğrayabilir [47].

DKF; sterilizasyon, karıştırma, havalandırma ve ürün saflaştırma işlemlerinin kolay yapılabilmesi ve sürecin büyük ölçekli sistemlere uygulanabilmesi gibi nedenlerle de sıkça tercih edilir [64, 132]. Buna karşın, DKF proseslerinin yüksek miktarda enerji tüketmesi, pahalı kültür ortamları gerektirmesi ve çok fazla atık su oluşturması hem maliyet hem de çevre açısından önemli sorunlar teşkil etmektedir. KHF, düşük su aktivitesi sebebiyle, DKF’ye göre bakteriyel kontaminasyona karşı daha dirençlidir. Bu nedenle sterilizasyon için daha az enerji gerektirir [132]. Bununla birlikte, KHF, ucuz ve kolay ulaşılabilir tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünlerin doğal formlarda substrat ve/veya enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine olanak sağlar. Ancak katı substratın besin bileşimi ve kalitesinin partiden partiye değişmesi fermentasyon işleminin verimliliğiyle ilgili sorunlara yol açabilir [55, 64]. Öte yandan, KHF prosesleri, ekstraktlar üzerinde toksik etki gösterebilecek organik çözücülere ihtiyaç duymaz ve nispeten çok daha az miktarda atık su üretir. Ek olarak, daha düşük sermaye yatırımı ve işletim maliyeti, daha az karıştırma ve alt akım işlemi gibi avantajlara sahiptir. Bu bağlamda KHF, maliyeti azaltan ve atık yönetimini destekleyen sürdürülebilir bir biyoproses olarak ön plana çıkmaktadır [133]. Ancak KHF’de kullanılan katı substratların heterojen yapıda olması kinetik ve modelleme çalışmalarında; ısı ve kütle transfer mekanizmalarının tam anlaşılabilmesi ve kontrol edilememesi ise biyoreaktörlerin tasarlanması, işletilmesi ve büyük ölçeklere uygulanmasında sorunlara yol açmaktadır [103]. Buna karşın

KHF’de, DKF’ye göre daha yüksek kalite ve verimde ürün elde edilir. Bu durum ‘mikroorganizmanın genellikle izole edildiği doğal ortama oldukça benzeyen KHF şartları altında daha iyi bir performans gösterdiği’ şeklinde açıklanmaktadır [54].

Pek çok enzim için daha yüksek stabilite ve verimlilik sağlayan KHF, substrat inhibisyonuna daha az duyarlı olduğu, başka bir deyişle, yüksek substrat miktarlarını tolere edebildiği için proses daha yüksek nihai ürün konsantrasyonuyla sonuçlanır. Ayrıca KHF’de mikroorganizmalar glikoz, gliserol veya diğer karbon kaynakları gibi çok sayıda substratın varlığında katabolik represyona karşı direnç gösterir [134]. Öte yandan, bazı enzimlerin sadece KHF’de indüklendiği ve bazı küflerin, sadece hiflerinin doğrudan gaz faza maruz kaldığı KHF’de spor ürettiği bilinmektedir [47].

Tablo 2.4 ve Tablo 2.5’te sırasıyla KHF’nin avantajları, dezavantajları ve çözüm önerileri verilmiştir.

Tablo 2.4. Katı hal fermentasyonunun avantajları [48, 108].

Biyolojik Avantajları	Enzim Üretimindeki Biyolojik Avantajları DKF’ye göre elde edilen ürün hacmi fazladır. DKF’ye göre daha yüksek verim sağlanır. DKF’ye göre sentezlenen enzimler daha stabil özellik gösterir. DKF’ye göre katabolik represyona karşı direnç seviyesi yüksektir. DKF’ye göre yüksek substrat konsantrasyonlarına karşı tolerans daha fazladır. Diğer Biyolojik Avantajları Karmaşık yapılu doğal substratlar genellikle eksiksiz bir ortam sağlar. Havalandırma işlemi kolaydır. Düşük su gereksinimi çevre kirliliğinin en aza indirilmesine yardımcı olur. Köpük oluşumu gözlenmez. Mantar sporları inokülüm olarak kullanılabilir ve uzun süre saklanabilir.
Prosesle Sağladığı Avantajlar	Enzim Üretim Proseslerindeki Avantajları Biyoreaktörler genellikle küçük hacimlidir ve çok yer kaplamaz. Yüksek hacimde substrat kullanılabilir. Proseslere Sağladığı Diğer Avantajlar İşlenmemiş doğal kaynaklardan elde edilen substratlar kullanılabilir. Doğal kaynaklar basit ön işlemlerle fermentasyona uygun hale getirilebilir. Daha yüksek ürün konsantrasyonları elde edildiği için alt akım maliyetleri daha düşüktür. Ürün ekstraksiyonu için az miktarda çözücü gerekir. Köpük kırıcı gibi kimyasalların kullanımına gerek duyulmaz. Havalandırma kolay sağlanır.
Çevresel Avantajları	Ürün üretimi esnasında çevre kirliliğine yol açabilecek atıkların oluşumu çok azdır. Daha az atık su üretir.
Ekonomik Avantajları	Son derece ucuz, çeşitli ve atıl doğal karbon kaynaklarının ve tarım/gıda endüstrisi yan ürünlerinin substrat olarak kullanımına olanak sağlar. Basit, modifiye edilebilir, uygun maliyetli ve kullanıcı dostu biyoreaktörler kullanılır. KHF prosesi ekonomik açıdan oldukça caziptir ve ekonomik olarak uygulanabilirliği kanıtlanmıştır. Genellikle daha düşük enerji gereksinimine sahiptir.

Tablo 2.5. Katı hal fermentasyonunun dezavantajları ve çözüm önerileri [48].

Dezavantajları	Çözüm Önerileri
Sıcaklık ve pH kontrolü, oksijen transferi ile kütle ve ısı transferine ek olarak; substrat ve nem gradyanlarının oluşumu gibi mühendislik kaynaklı çeşitli sorunlar söz konusudur. Hücre kütlesi, besin maddeleri, sıcaklık, pH ve nem içeriği sistemde homojen bir dağılım göstermez.	Sıcaklık, oksijen ve karbondioksit gradyanlarının oluşumu online olarak ölçülebilir ve prosesi kontrol etmek için kullanılabilir.
Substrat yatağının sürekli olarak havalandırılması zordur.	Zorlamalı havalandırma ile kontrol edilebilir. Zorlamalı havalandırma aynı zamanda sıcaklığı da kontrol edebilir.
Mikroorganizmanın metabolik aktiviteleri ve büyümesi sonucunda açığa çıkan ısı, katı substratın sıcaklığını artırarak substratın kurumasına ya da aşırı nemlenmesine yol açabilir.	Metabolik ısıyı uzaklaştırabilecek sıcaklık gradyanları oluşturulabilir.
Mikrobiyal büyüme için biyokütlenin saptanması zordur.	Online ölçüm teknikleri geliştirilebilir ve bunlar prosesin kontrol edilmesi için kullanılabilir.
Kinetik çalışmalar hala zordur.	Verilerin etkin tahmini ve optimizasyonu için matematiksel modeller geliştirilebilir.

3. CEVAP YÜZEYİ YÖNTEMİ

Cevap Yüzeyi Yöntemi (CYY), ortam ve işletim koşullarının optimizasyonunda, üç seviyeli tam faktöriyel tasarıma gerek duyulmadan, cevap değişkeni ya da değişkenleri için ikinci dereceden (kuadratik) bir model geliştirmeye olanak sağlayan istatistiksel bir yaklaşımdır [135]. Bu yaklaşımda, sistemin optimum çalışma koşullarını belirlemek ya da istenen cevap özelliklerini karşılayan bir çalışma aralığını tanımlamak amaçlanır. Bu doğrultuda, probleme en uygun CYY tasarımı seçilir; oluşturulan deney matrisi doğrultusunda deneyler gerçekleştirilir ve elde edilen verilerle matematiksel bir model oluşturularak modelin uygunluğu değerlendirilir. Son aşamada, modelin geçerliliği test edilerek süreç optimizasyonu sağlanır [136].

CYY’de, faktörlerin cevap üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla Denklem 3.1’de verilen kuadratik regresyon modeli yaygın olarak kullanılmaktadır [137].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

Burada Y , bağımlı değişken olan cevabı; X_i ve X_j cevap üzerindeki etkileri incelenen bağımsız değişkenleri (faktörler); β_0 sabit terimi temsil etmektedir. β_i , β_{ii} ve β_{ij} ise sırasıyla faktörlerin doğrusal, kuadratik ve etkileşim etkilerini ifade eden terimlerin katsayılarıdır.

Çok terimli kuadratik regresyon modeli, faktörlerin cevap üzerindeki tekil etkilerinin yanı sıra, faktörler arası etkileşimlerin cevap üzerindeki birleşik etkilerinin de eşzamanlı olarak analiz edilmesine olanak sağlar. Bununla birlikte, model sonuçlarının iki veya üç boyutlu yüzey grafikleri ile görselleştirilmesi, bağımsız değişkenlerin cevap üzerindeki etkilerini yorumlamaya yardımcı olur. Ancak mikroorganizmaların metabolik karmaşıklığı, biyokimyasal etkileşimlerin doğrusal olmayan yapısı ve sistem kinetiklerine dair bilgi eksikliği, biyolojik süreçler için güvenilir modeller geliştirilmesini güçleştirmektedir [36]. Ayrıca, beşten fazla değişkenin bir arada değerlendirilmesi hem deney tasarımını hem de veri analizini zorlaştırmaktadır [26].

CYY kapsamında en sık tercih edilen tasarım Merkezi Kompozit Tasarım (MKT)’dır [138].

3.1. Merkezi Kompozit Tasarım

Bu yaklaşımda, deney matrisi üç ana bileşenden oluşur. Bunlardan birincisi, her bir faktörün iki düzeyde (+1 ve -1) incelendiği deneysel koşulları temsil eden faktöriyel noktalardır. Faktöriyel noktaların varlığı, faktörlerin doğrusal etkilerinin (A, B, C gibi) ve etkileşim etkilerinin (AB, AC, BC gibi) öngörülmesini sağlar. Bir diğer bileşen, tüm faktörlerin orta düzeyde (0) tutulduğu koşulu ifade eden merkez noktasıdır. Bu nokta, cevap yüzeyinde eğrilik olup olmadığının

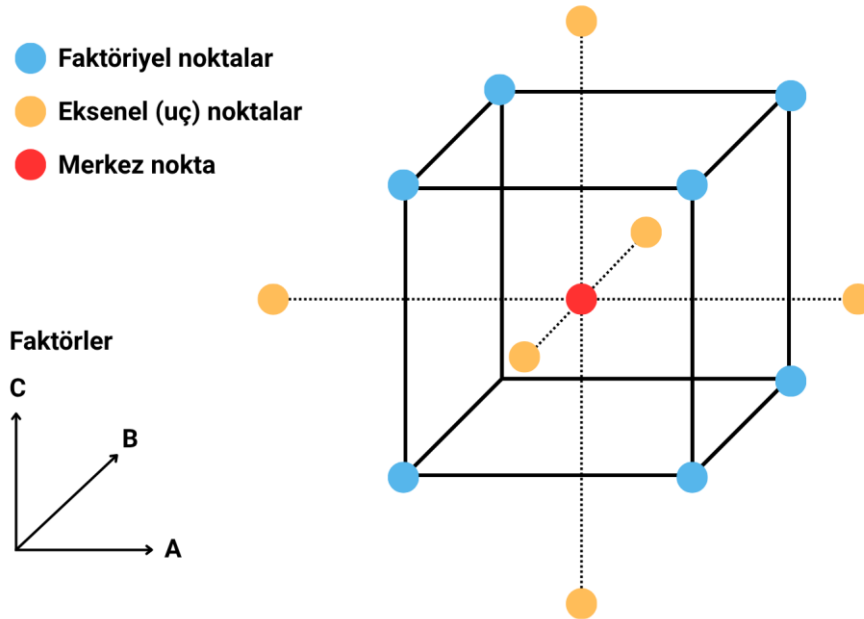
değerlendirilmesine olanak sağlar. Ayrıca bu noktada deneyler, modelin doğruluğunu test etmek ve deneysel (saf) hatayı tahmin edebilmek amacıyla birden fazla kez tekrarlanır. Sonuncusu ise eksenel (uç) noktalar olup bu noktalarda tüm faktörler ortalama düzeyde tutulurken bir faktörün düzeyleri ortalamanın üstünde ve altında bulunan ekstrem değerleri alır. Eksenel noktaların sayısı, tasarımda bulunan faktör sayısının iki katına eşit olup bu noktalar sayesinde kuadratik terimler (A^2 , B^2 , C^2 gibi) modele dâhil edilebilir [26, 138].

MKT’de toplam deney sayısı (N), Denklem 3.2 ile verilmektedir [139].

$$N = 2^n + 2n + n_c \quad (3.2)$$

Burada n , bağımsız değişken sayısını; 2^n , faktöriyel nokta sayısını; $2n$, eksenel nokta sayısını ve n_c , merkez nokta tekrar sayısını ifade etmektedir.

Şekil 3.1’de, A, B ve C faktörlerini içeren bir merkezi kompozit tasarım şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.1. Üç faktörlü bir merkezi kompozit tasarımın şematik gösterimi [140].

4. ENZİMLER

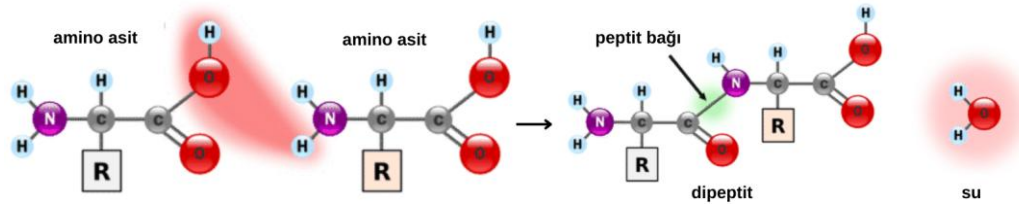
Organizmalar, varoluşları gereği termodinamik açıdan kararsızdır. Canlı bir sistemin termodinamik dengeye ulaşması, su ve karbondioksit oluşturarak yanma sürecine girmesi anlamına gelir. Bu nedenle, organizmalar, hayatta kalmak için ihtiyaç duydukları enerjiyi üretirken, termodinamik eğilimlerini sınırlayan ve reaksiyon hızlarını kontrol altına alan kinetik yeteneklere de sahip olmalıdır. Bu noktada enzimler, katalitik aktiviteleri nedeniyle enerjinin kontrollü bir şekilde üretilmesinde ve serbest bırakılmasında hayati bir rol oynar [141].

Canlı bir hücredeki biyokimyasal reaksiyonların, organizmaya zarar vermeden istikrarlı bir şekilde devam edebilmesi, enzimlerin yüksek spesifiklik ve verimlilikle çalışmasına bağlıdır. Burada ‘spesifiklik’ kavramı, enzimlerin yalnızca belirli substratlara özgü olmasını, ‘verimlilik’ kavramı ise ilgili reaksiyonları yüksek hızlarda katalize etme yeteneğini ve turnover sayısını ifade eder [142, 143]. Örneğin, katalaz enzimi için turnover sayısı, aktif merkezin molü başına saniyede 10^7 mol substratın ürüne dönüştürülmesidir. Bu enzim, katalitik olmayan yol ile kıyaslandığında, hidrojen peroksiti su ve oksijene 3.5×10^8 kat daha hızlı parçalar. Nispeten basit yapılı mikroorganizmalardan, oldukça gelişmiş organizmalara kadar tüm canlılarda biyokimyasal reaksiyonların bu denli hızlı katalize edilebilmesi, ortam sıcaklığında yaşamın sürdürülebilmesini sağlar [143]. Enzimlerin katalitik işlevleri, üç boyutlu protein yapılarıyla yakından ilişkilidir [142].

4.1. Enzimlerin Yapısı

Organizmanın bütünlüğünü ve işlevselliğini korumak için gerekli olan ılımlı şartlarda etkin şekilde çalışabilen enzimler, genellikle farklı sayılarda amino asit kalıntısından oluşan protein yapılı biyomoleküllerdir. Bununla birlikte, bazı RNA’lar (ribozimler) da enzimatik işlev gösterebilir.

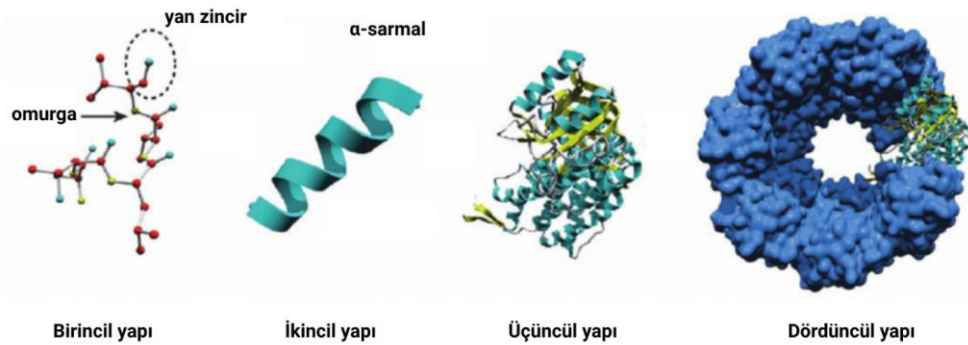
Şekil 4.1’de verildiği üzere, protein yapısını oluşturan amino asitler, birbirlerine peptit bağı adı verilen kovalent bağlarla bağlanır. Bu bağlar, bir amino asidin karboksil grubunun (-COOH) karbon atomuyla bir diğer amino asidin α -amino grubunun (-NH₂) azot atomu arasında kurulur. R grupları ise amino asitlerin kimyasal özelliklerini belirleyen yan gruplardır [144].



Şekil 4.1. Peptit bağının oluşumu [145].

Proteinlerin yapısal organizasyonu dört temel düzeyde incelenmektedir. Birincil (primer) yapı, genetik kod tarafından belirlenen amino asit dizisinin oluşturduğu polipeptit zincirini ifade eder. Bu yapı, proteinlerin biyolojik olarak işlevsel hale gelmesini sağlayan üç boyutlu katlanma süreçlerinin temel belirleyicisidir. İkincil (sekonder) yapı, polipeptit zincirinde birbirine yakın konumda bulunan amino asit kalıntılarının karbonil ve amid grupları arasında oluşan hidrojen bağları aracılığıyla meydana gelir. Globüler proteinlerin ikincil yapısında yaygın olarak bulunan ve hidrojen bağlarıyla stabilize edilen yapısal motiflerden biri de α -sarmal (α -heliks) yapıdır; bu yapı çoğu enzimin yapısal bütünlüğünde önemli bir rol oynar. Üçüncül (tersiyer) yapı, birincil yapıda birbirinden uzak konumda bulunan amino asit kalıntıları arasında gerçekleşen hidrofobik etkileşimler, disülfid köprüleri, iyonik bağlar ve Van der Waals kuvvetleri gibi çeşitli etkileşimler sonucunda polipeptit zincirinin üç boyutlu katlanmış halini oluşturur. Bu yapının dış yüzeyi genellikle polar, iç bölgesi ise apolar (hidrofobik) amino asitler açısından zengindir. Üçüncül yapı, enzimlerin çevresel ortama, özellikle sulu fazlara uyum sağlayacak şekilde katlanmasını ve böylece kararlı bir konformasyon kazanmasını mümkün kılar. Substratların, prostetik grupların ve kofaktörlerin bağlandığı bölgeleri içeren bu yapı, enzim ile çevresi arasındaki olumsuz termodinamik etkileşimleri en aza indirerek biyolojik işlevin gerçekleşmesini sağlayan aktif yapıyı oluşturur [146]. Son olarak, dördüncül (kuaterner) yapı, birden fazla polipeptit zincirinin (alt birimlerin) bir araya gelerek oluşturduğu yapıdır. Bu alt birimler benzer veya farklı işlevler üstlenebilir. Dördüncül yapı, özellikle çok alt birimli enzim komplekslerinde yaygın olup, bazı enzimlerin işlevsel hale gelmesi için gereklidir [147]. Enzim aktivitesi, yani kimyasal bir reaksiyonu katalize etme kapasitesi ise aktif merkezin yapısıyla doğrudan ilişkilidir. Aktif merkez, genellikle birincil yapıda birbirinden uzak olan ancak üç boyutlu yapıda yakın konumda bulunan az sayıda amino asit kalıntısından oluşur ve kataliz işlemi bu bölgede gerçekleşir. Protein molekülünün geri kalan kısmı, yapısal bütünlüğü destekleyen bir iskele görevi görür.

Şekil 4.2’de, proteinlerin yapısal organizasyonunu oluşturan birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül düzeyler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Proteinlerin yapısal organizasyonunu oluşturan dört temel düzey [148].

4.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, 1961 yılında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Nomenklatur Komitesi'nin yönergelerine göre [149], katalize edilen kimyasal reaksiyonun türü baz alınarak sırasıyla oksidoredüktazlar (EC 1), transferazlar (EC 2), hidrolazlar (EC 3), liyazlar (EC 4), izomerazlar (EC 5) ve ligazlar (EC 6) olmak üzere altı ana sınıfa ayrılmış olup 2018 yılında bu sınıflandırmaya yeni bir ana sınıf olan translokazlar (EC 7) eklenmiştir (Bkz. Şekil 4.3) [150]. Bu bağlamda, her bir enzim, Enzim Komitesi (EC) tarafından atanmış dört basamaklı bir numara ile tanımlanmaktadır. İlk rakam ana sınıfı, ikinci rakam alt sınıfı (kimyasal grubun türü), üçüncü rakam alt grubu (reaksiyona katılan özel kimyasal gruplar) ve dördüncü rakam enzimin alt grup içerisinde tanınmasını sağlayan seri numarasını belirtir. Örneğin α -amilaz enzimi EC 3.2.1.1 numarası ile tanımlanır. Burada EC 3, hidrolazlar ana sınıfını; EC 3.2, glukozilazlar alt sınıfını (bir polisakkaritin şeker alt birimleri arasındaki bağları hedef alan enzimleri); EC 3.2.1, glukozidazlar alt grubunu (O- ve S-glukozil bileşiklerini hidrolize eden enzimleri); EC 3.2.1.1 ise doğrudan α -amilazı ifade eder [151].



Şekil 4.3. Enzimlerin sınıflandırılması ve katalitik özellikleri [152].

Enzim sınıfları arasında yüksek aktiviteleri, zorlu koşullara karşı dayanıklı olmaları, kolay ve düşük maliyetle üretililebilmeleri ve genellikle koenzimlere gereksinim duymayan basit yapılı hücre dışı enzimler olmaları nedeniyle hidrolazların endüstriyel açıdan önem taşıyan başlıca enzim sınıfı olduğu bildirilmiştir [153].

4.2.1. Hidrolazlar

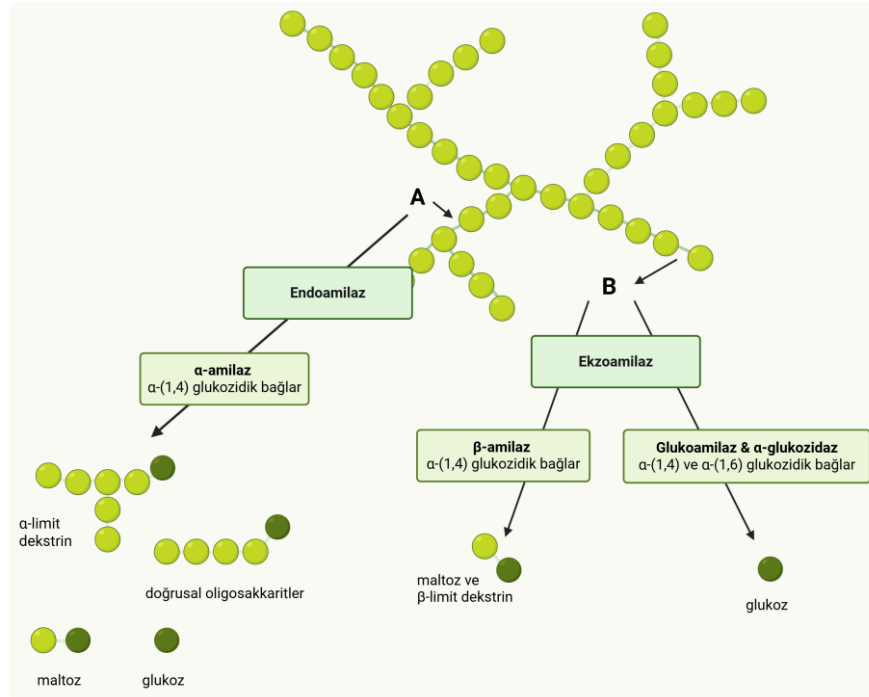
Kimyasal bağların su etkisiyle kırılmasını, başka bir deyişle, hidroliz reaksiyonlarını katalize eden hidrolazlar (EC 3), substrat özgüllüklerine göre farklı alt sınıflara ayrılır. Örneğin EC 3.4 alt sınıfı, peptit bağları üzerinde etki gösteren enzimlerden oluşur.

Endüstriyel açıdan önemli olan hidrolazlar arasında amilazlar, selülozlar, ksilanazlar, proteazlar ve lipazlar yer almaktadır [152].

Amilazlar

Amilazlar, doğrusal (amiloz) ve dallanmış (amilopektin) glukoz zincirlerinden oluşan nişasta moleküllerini [154], dekstrinler gibi çeşitli ürünlere ya da sırasıyla maltotrioz ve maltoz gibi daha az glukoz birimine sahip olan polimerlere veya glukozlara parçalayan enzimlerdir [155, 156].

Amilazlar, endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Şekil 4.4'te, amilazların nişasta üzerindeki etkilerini ve son ürünleri gösteren bir şema verilmiştir.



Şekil 4.4. Amilazların nişasta üzerindeki etkileri sonucu açığa çıkan ürünler [157]: A molekül içi, B zincir uçlarındaki bağları temsil etmektedir.

Endüstride yaygın olarak kullanılan α -amilaz (EC 3.2.1.1; endo-1,4- α -D-glukan glukonohidrolaz), nişastanın iç kısmındaki α -1,4-O-glukozidik bağları rastgele parçalayarak çeşitli zincir uzunluklarına sahip olan doğrusal veya dallanmış oligosakkaritleri, maltoz moleküllerini ve glukoz birimlerini açığa çıkaran bir endoamilazdır [158]. Çoğu α -amilaz enzimi metaloenzimdir, bu nedenle yapısal bütünlük, stabilite ve aktivite için kalsiyum iyonuna (Ca^{2+}) gereksinim duyar [159]. β -amilaz (EC 3.2.1.2; α -1,4-glukan maltohidrolaz) nişasta moleküllerinin indirgen olmayan zincir uçlarını parçalayarak ardışık maltoz birimleri oluşturan bir ekzoamilazdır. Amilopektin ve glikojen gibi dallanmış polisakkaritlerdeki bağları kırma yeteneği sınırlı olduğu için hidroliz işlemi tamamlanamaz ve sonuçta maltoz birimlerinin yanı sıra dekstrin üniteleri de kalır [159, 160]. Glukoamilaz ise amiloz ve amilopektinin indirgen olmayan ucundaki son α -(1,4) glukozidik bağlarla birlikte α -(1,6) glukozidik bağları da kırarak glukoz birimleri açığa çıkaran bir ekzoamilazdır [159].

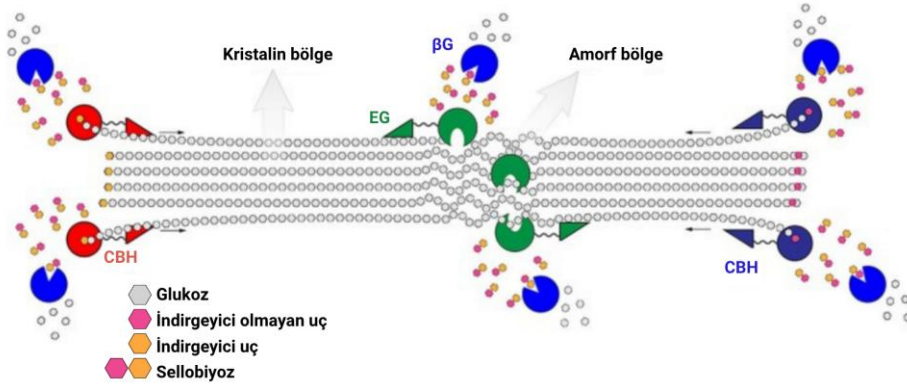
Selülazlar

Selülazlar, selülozun kristalin ve amorf bölgelerden oluşan heterojen yapısını parçalamak amacıyla birlikte işlev gören ve β -1,4-glukozidik bağları hidrolize ederek selülozu çello-oligosakkaritler, sellobiyozlar ve glukozu dönüştüren farklı enzimlerden oluşan bir sistemdir. Enzim Komitesi tarafından selülazlar; endoglukanazlar (EC 3.2.1.4), indirgeyici ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.176), indirgeyici olmayan ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91) ve β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) olarak sınıflandırılır [161].

Selüloz, bu enzim sistemi tarafından kademeli olarak hidrolize edilir [161, 162]:

- i. Endoglukanazlar selüloz molekülü üzerinde indirgeyici olan ve olmayan uçları açığa çıkaran çentikler ve çello-oligosakkaritler üretir. Bu enzimler genellikle amorf bölgede etkindir.
- ii. Ekzoglukanazlar veya diğer adıyla sellobiyohidrolazlar, sellobiyozlar oluşturmak üzere çentikler üzerinde hareket eder.
- iii. β -glukozidazlar ise sellobiyozları hidrolize ederek glukoz birimleri oluşturur ve hidroliz reaksiyonu tamamlanır.

EG, endoglukanaz; CBH, sellobiyohidrolaz; β G: β -glukozidaz enzimlerini temsil etmek üzere Şekil 4.5'te selülaz enzimlerinin selüloz molekülü üzerindeki etki mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 4.5. *Trichoderma reesei* kaynaklı selülaazların selüloz molekülü üzerindeki etki mekanizması [163].

4.3. Endüstriyel Enzim Kaynakları

Ticari enzimler bitki, hayvan ya da mikroorganizmalardan elde edilebilir ancak endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu mikroorganizma kaynaklıdır.

4.3.1. Mikroorganizmalar

Bakteriler, küfler ve mayalar gibi çeşitli mikroorganizmalar, ticari açıdan önem arz eden pek çok enzimi üretebilme yeteneğine sahiptir. Büyük bir çoğunluğunu hidrolazlar ve oksidoredüktazların oluşturduğu endüstriyel enzimler, günümüzde tarım, gıda, kimya, ilaç, kozmetik gibi pek çok sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, mikrobiyal enzimler, çevre kirliliğinin kontrolünde de önemli bir ürün grubu haline gelmiştir [159]. Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel uygulama alanlarına ilişkin örnekler Tablo 4.1’de derlenmiştir.

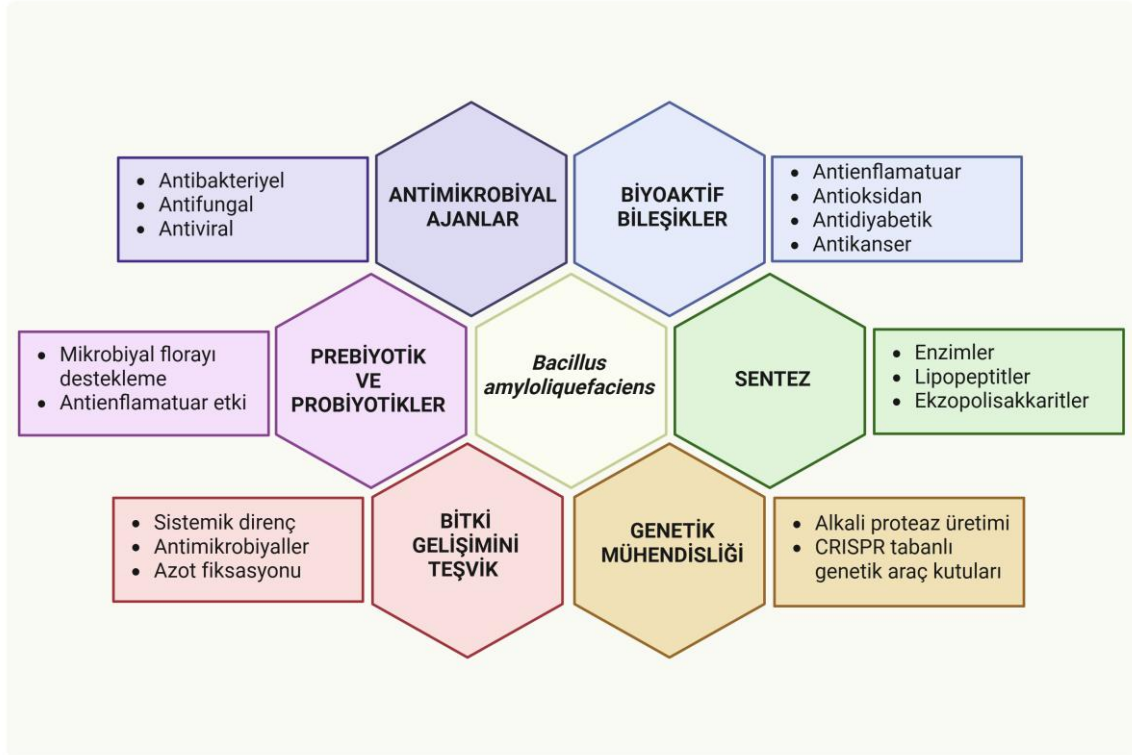
Bitki ve hayvan kaynaklı enzimlerle karşılaştırıldığında, mikrobiyal enzimlerin tercih edilmesinin pek çok nedeni bulunmaktadır. Mikroorganizmalar, basit yapıları olmaları nedeniyle daha düşük üretim maliyetleriyle enzim elde edilmesine olanak tanır. Bu organizmaların kolay ulaşılabilir kaynaklar olması ve hızlı üreme yetenekleri, fermentasyon yoluyla kısa sürede yüksek miktarlarda enzim üretimini mümkün kılar. Ayrıca mikrobiyal hücrelerin metabolik yapıları araştırmacılar tarafından detaylı biçimde tanımlanmış olup, bu durum üretim sürecinin daha kolay kontrol edilebilmesine olanak sağlar. Mikrobiyal enzimler, genellikle bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere kıyasla daha aktif ve kararlı bir yapıya sahiptir. Bunun yanı sıra, mikrobiyal enzimlerin yapıları ve aktiviteleri, rekombinant DNA teknolojileri ve protein mühendisliği yöntemleri aracılığıyla endüstriyel ihtiyaçlara uygun şekilde optimize edilebilmektedir. Günümüzde, ekstrem pH, sıcaklık ve tuzluluk gibi çevresel koşullara ya da ağır metal ve organik çözücü içeren zorlu ortamlara dayanıklı enzimler üretebilen yeni bakteri ve mantar türleri keşfedilmektedir. Bu nedenle mikrobiyal enzimlerin endüstrideki önemini her geçen gün artmaktadır [153, 164-167].

Tablo 4.1. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstriyel uygulamaları [168].

Endüstri	Enzim	Kullanım Alanı	Mikroorganizma
İçecek	α -Amilaz	Nişasta hidrolizi	<i>Bacillus</i> türleri, <i>Aspergillus</i> türleri
	Selülaz	Meyvelerin sıvılaştırılması	<i>Trichoderma atroviride</i>
	Naringinaz	Acılığın giderilmesi	<i>Aspergillus niger</i>
Süt ve Süt Ürünleri	Aminopeptidaz	Peynir olgunlaştırma	<i>Lactobacillus</i> türleri
	Katalaz	Peynir işleme	<i>Aspergillus niger</i>
	Asit proteinaz	Sütün pıhtılaştırılması	<i>Aspergillus</i> türleri
Fırıncılık	Transglutaminaz	Katmanlı hamurun dayanıklılığı	<i>Streptoverticillium</i> ve <i>Streptomyces</i> türleri
	Lipaz	Hamur stabilitesinin artırılması	<i>Aspergillus niger</i>
	Maltojenik α -Amilaz	Ekmeklerin raf ömrünün artırılması	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Hayvan Yemi	Ksilanaz	Nişasta sindiriminin iyileştirilmesi	<i>Bacillus</i> türleri, <i>Aspergillus</i> türleri
	Fitaz	Fosforun serbest bırakılması	<i>Aspergillus niger</i>
	β -glukanaz	Sindirimin iyileştirilmesi	<i>Aspergillus niger</i>
Organik Sentez	Glukozil transferaz	Oligosakkaritlerin sentezi	<i>Bacillus</i> türleri
	Glukoz izomeraz	Yüksek fruktozlu mısır şurubunun üretimi	<i>Corynebacterium</i> türleri, <i>Streptomyces murinus</i>
	Lakkaz	Tekstil boyaları, kozmetik pigmentleri, tatlandırıcılar ve pestisitlerin üretimi	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Deterjan	Amilaz	Karbonhidrat lekelerinin çıkarılması	<i>Bacillus subtilis</i>
	Selülaz	Renklerin netleştirilmesi	<i>Aspergillus niger</i>
	Proteaz	Protein lekelerinin çıkarılması	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Kozmetik	Endoglukozidaz	Diş ve diş eti bakımı	<i>Mucor hiemalis</i>
	Süperoksit dismutaz	Serbest radikallerin giderimi, cilt bakımı	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Lakkaz	Saç boyası	<i>Bacillus subtilis</i>
Polimer	Tirozinaz	Lignin ve kitosanın polimerizasyonu	<i>Trichoderma reesei</i>
	Glikoz oksidaz	Anilinlerin polimerizasyonu	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Transglutaminaz	Proteinin çapraz bağlanması	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
Kâğıt	Amilaz	Mürekkep giderimi	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Proteaz	Biyofilm giderimi	<i>Bacillus subtilis</i>
	Lakkaz	Klorsuz ağartma, lignin giderimi	<i>Bacillus subtilis</i>
Deri	Amilaz	Liflerin ayrılması	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus</i> türleri
	Lipaz	Yağların giderilmesi	<i>Aspergillus flavus</i>
	Nötr Proteaz	Kıl giderimi, ıslatma	<i>Bacillus subtilis</i>
Atık Yönetimi	Amilaz	Sebze atıklarının biyoremediasyonu	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Aspergillus</i> türleri
	Lipaz	Ham petrol hidrokarbonlarının bozunması	<i>Candida tropicalis</i>
	Manganez peroksidaz	Fenolik bileşiklerin bozunması	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Bacillus amyloliquefaciens

Başta toprak olmak üzere su, bitkiler, hayvanlar ve çeşitli gıda kaynakları gibi pek çok farklı ekolojik nişten izole edilebilen *B. amyloliquefaciens*, taksonomik olarak *Bacillus subtilis* tür kompleksine, Firmicutes şubesine, Bacilli sınıfına ve Bacillaceae familyasına ait; aerobik, çubuk şeklinde ve Gram-pozitif bir bakteri türüdür [169, 170]. Bu mikroorganizma, geniş fizyolojik tolerans aralığı ve yüksek metabolik esnekliği sayesinde düşük maliyetli üretim ortamlarında kolaylıkla kültüre edilebilir [171]. Ayrıca mezofilik α -amilaz, asit-stabil α -amilaz, alkaline proteaz, selüloz, glukana, ksilana, lipaz, aminotransferaz, pektinaz, kitinaz ve peroksidad gibi çeşitli enzimleri üretme kapasitesine sahiptir [172, 173]. Bununla birlikte, lizozim, antibiyotikler ve antimikrobiyal peptitler içeren karmaşık biyofilmler oluşturabilir; patojen mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etki gösteren ikincil metabolitleri sentezleyebilir ve aktiviteleri sonucunda probiyotik kolonizasyonunu destekleyen fermente edilebilir ürünler açığa çıkarabilir [170, 174, 175]. Şekil 4.6’da verildiği üzere, *B. amyloliquefaciens*, başta ticari enzim üretimi olmak üzere endüstriyel biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 4.6. *B. amyloliquefaciens*'in uygulama alanları [176].

4.3.2. Hayvanlar ve Bitkiler

Endüstriyel enzimlerin büyük bir çoğunluğu mikroorganizma kaynaklı olsa da hayvan ve bitkilerden elde edilen bazı enzimler günümüzde halen önemini korumaktadır. Hücre kültürü teknikleriyle üretilen hayvan kaynaklı enzimlere doku plazminojen aktivatörü ve ürokinaz örnek verilebilir [177, 178]. Benzer şekilde, katalaz enzimi, karaciğerden izole edilen ve gıda endüstrisinde kullanılan bir enzimdir [179, 180]. Asidik fosfataz ve invertaz bitki kaynaklı enzimlere örnek verilebilir. Ek olarak, papain enzimi, papaya bitkisinden elde edilmekte; gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [181, 182].

Hayvansal veya bitkisel doku ve sıvılardan ekstrakte edilen ham enzimler, ayırma ve saflaştırma işlemlerine tabi tutulur. Bitkisel ve hayvansal dokular, mikroorganizmalara göre, potansiyel tehlikeli maddeleri (endojen enzim inhibitörleri, fenolik bileşikler, proteazlar gibi) daha fazla içerdiği veya salgıladığı için bitki ve hayvan kaynaklı enzimlerin saflaştırılması oldukça zordur [164]. Bitkilerin mevsimsel koşullardan etkilenmesi, hayvansal hücrelerin hassas olması nedeniyle zor üretilmesi; düşük verim, yüksek maliyet ve kontaminasyon riski gibi pek çok faktör, enzim üretiminde bitki ve hayvanların kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle, bitki ve hayvanlar genellikle mikroorganizmalardan temin edilmesi mümkün olmayan enzimlerin üretiminde tercih edilmektedir [153, 179].

4.4. Küresel Enzim Pazarı

Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarına hizmet veren yaklaşık 12 büyük üretici ve 400 küçük tedarikçi vardır. Küresel enzim üretiminin %75'ine yakını Danimarka merkezli Novozymes, ABD merkezli DuPont ve İsviçre merkezli Roche tarafından gerçekleştirilmektedir [183]. Sektör, sınırlı kâr marjları ve yüksek teknoloji gereksinimiyle birlikte yoğun bir rekabet ortamına sahiptir [184]. 2015'te endüstriyel enzimlere yönelik küresel talebin yaklaşık 4.6 milyar dolar olduğu; 2016-2021 yıllarında ise bu talebin hızla artarak 2021 yılında 6.3 milyar dolara ulaştığı rapor edilmiştir [184]. Günümüzde biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan 500'den fazla ticari ürünün üretiminde enzimlerin kullanıldığı bilinmektedir [185, 186].

Endüstriyel enzim kullanımında Avrupa ve Kuzey Amerika ilk sıralarda olmakla birlikte, son yıllarda Asya-Pasifik, Orta Doğu ve Afrika'daki gelişmekte olan ülkeler de enzim pazarının yükselen aktörleri arasında yer almaktadır. Bu bölgelerdeki artan enzim kullanımı; çevreye duyarlı yeşil teknoloji çözümlerine olan ilgi, rekabet gücündeki artış ve ürün değerinin iyileştirilmesiyle ilişkilendirilmektedir [183]. Bu eğilim, biyoteknolojideki hareketliliği artırmış ve endüstriyel enzim kullanan endüstrilerin yaygınlaşmasına katkı sağlamıştır [187]. Örneğin, yalnızca lipaz enzimine yönelik küresel pazar hacmi 2015–2020 yılları arasında yaklaşık 590.5 milyon dolar

düzeyine ulaşmış; 2014 yılı itibarıyla en yüksek lipaz tüketimi Asya-Pasifik pazarında gerçekleşmiştir [188, 189].

Endüstriyel enzimler ilaç, tekstil, deterjan, deri, gümüş geri kazanımı ve atık yönetimi gibi pek çok sektörde kullanım alanı bularak dünya genelindeki satışlarda en büyük emtia kategorisini oluşturmaktadır [40]. Mikrobiyal enzim satışlarındaki istikrarlı artış, tüketici ürünleri ve biyoyakıt üretimine yönelik talebin yükselmesiyle ilişkilendirilmektedir [190]. Küresel enzim pazarının 2020–2027 yılları arasında %7.1’lik yıllık bileşik büyüme oranıyla gelişeceği öngörülmektedir [191]. İlgili öngörüler, özellikle enzimatik biyoyakıt üretiminde kaydedilen süreç geliştirmelerine dayanmakta; bu ilerlemenin immobilize biyokatalizörlerin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini artırarak pazarda ölçek büyütmeyle yönelik önemli fırsatlar sunacağı düşünülmektedir [192, 193].

Enzim türleri arasında en büyük pazar payı yaklaşık %60 ile proteazlara aittir [185]. Bunun yanında, lipazlar, fitazlar ve karbohidrazlar da hızla büyüyen enzim grupları arasında yer almaktadır [187]. Enzim kullanımı, özellikle tekstil, kâğıt ve imalat gibi endüstrilerde daha çevreci üretim süreçlerinin geliştirilmesi, hammadde tüketiminin azaltılması ve atık oluşumunun sınırlandırılması amacıyla giderek yaygınlaşmaktadır [194].

5. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

Mikroorganizmaların enzim sentezleme kapasitesi, endüstriyel biyoteknoloji uygulamalarında sürdürülebilir ve ekonomik üretim modellerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu kapsamda, lignoselülozik biyokütlenin KHF yoluyla biyolojik olarak işlenmesi hem atıkların çevresel etkisini azaltmakta hem de katma değerli ürünlerin üretimini mümkün kılmaktadır. *Bacillus* türleri, yüksek hidrolitik enzim üretim kapasiteleri ve çevresel koşullara dayanıklılıkları nedeniyle mikrobiyal enzim üretiminde ön plana çıkan bakterilerdir.

Bu bölümde, başta *B. amyloliquefaciens* olmak üzere, çeşitli *Bacillus* türleriyle gerçekleştirilen KHF çalışmaları derlenmiştir. Literatürde; substrat türü, nem düzeyi, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, inokülüm miktarı ile ilave karbon ve azot kaynaklarının kullanımına ilişkin pek çok faktörün enzim üretimi üzerindeki etkilerinin detaylı biçimde incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, *Bacillus* türlerinin KHF sistemlerinde enzim üretimi açısından taşıdığı potansiyeli ortaya koymakta ve tez kapsamında yürütülen deneysel tasarımın bilimsel altyapısını oluşturmaktadır.

Literatür çalışmaları, enzim üretim hedeflerine göre α -amilaz, selüloz ve bu iki enzimin birlikte üretimini amaçlayan eşzamanlı yaklaşımlar olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılmıştır. Her başlıkta, enzim verimini etkileyen parametreler, kullanılan tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünler ile uygulanan optimizasyon stratejileri dikkate alınarak, seçilmiş çalışmalar üzerinden genel bir değerlendirme yapılmıştır. Bununla birlikte, α -amilaz ve selüloz enzimlerinin eşzamanlı üretimine odaklanan çalışmalara literatürde seyrek rastlanmakta; bu enzimlerin çoğunlukla ayrı ayrı ya da farklı enzim kombinasyonlarıyla üretildiği görülmektedir.

5.1. α -Amilaz Üretimi

α -Amilaz üretimine yönelik çalışmalarda, *Bacillus* türlerinin çeşitli lignoselülozik ve organik atıklarla birlikte KHF sistemlerinde başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir. Bu çalışmalarda, tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünler potansiyel substratlar olarak değerlendirilmiş; ayrıca fermentasyon koşulları ile kullanılan deneysel tasarım yaklaşımlarının enzim verimi üzerinde belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir.

Buğday kepeği, α -amilaz üretimi açısından sağladığı yüksek verim nedeniyle KHF ortamlarında sıkça tercih edilen substratlar arasında yer almaktadır. *B. amyloliquefaciens* S8TS ile yapılan bir çalışmada, buğday sapı, buğday lapası, buğday kepeği ve pirinç kabuğu gibi çeşitli tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve en yüksek α -amilaz aktivitesine (3.65 U/mg) buğday kepeği içeren ortamda ulaşılmıştır. Optimum koşullar; maya ekstraktı, pepton, nişasta, CaCl_2 , MgSO_4 , FeSO_4 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren çözeltiyle

nemlendirilmiş buğday kepeği, %10 (v/w) vejetatif inokülüm, 37 °C sıcaklık, pH 7 ve 72 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir [195]. Buğday kepeğinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise *B. amyloliquefaciens* KCP2 ile α -amilaz üretiminin optimizasyonu araştırılmış; PBT ile taranan değişkenler arasında cevap üzerindeki en etkili faktörler nişasta, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve CaCl_2 olarak belirlenmiştir. Bu faktörlerin optimum düzeyleri ise MKT yöntemiyle 0.01 g nişasta, 0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 5 mM CaCl_2 olarak saptanmıştır [196].

Buğday kepeği içeren KHF ortamlarında α -amilaz üretimi, *B. amyloliquefaciens* dışında farklı *Bacillus* türleriyle de araştırılmıştır. Buğday, arpa, mısır ve nohut unu; maş fasulyesi, arhar, muz, patates ve soya kabukları; buğday ve pirinç kepeği, hardal ve Hindistan cevizi küspesi ile şeker kamışı bagasının katı substrat olarak değerlendirildiği bir çalışmada, *B. amyloliquefaciens*'e ek olarak, *B. licheniformis* suşunun α -amilaz üretim kapasitesi de incelenmiştir. Bu çalışmada, *B. amyloliquefaciens* için en yüksek α -amilaz aktivitesi (173.28 U/ml), buğday unu kullanılarak 37 °C sıcaklık, pH 7, %80 (v/w) nem içeriği ve 72 saatlik inkübasyon süresi koşullarında elde edilmiştir. *B. licheniformis* ise buğday kepeğiyle yürütülen fermentasyonda, 40 °C sıcaklık, pH 6, %80 (v/w) nem içeriği ve 48 saatlik inkübasyon süresi altında benzer bir aktivite (171.89 U/ml) göstermiştir. Ortama %1 (w/w) maltoz ve 0.15 M NH_4Cl ilavesi, *B. amyloliquefaciens* için 167.44–167.11 IU/ml, *B. licheniformis* için ise 178.46–172.36 IU/ml düzeyinde α -amilaz aktivitesi sağlamıştır. Benzer şekilde, ortama %1 (w/w) tripton ve soya peptonu eklenmesi her iki suşta da enzim sentezini artırmıştır. Saflaştırılan enzimlerin 65 °C'de ve pH 6–7 aralığında maksimum aktivite gösterdiği, ayrıca Ca^{2+} , Fe^{3+} ve Mn^{2+} iyonlarının enzim aktivitesini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir [197]. *B. licheniformis* AT70 ile yürütülen başka bir çalışmada, sekiz farklı atık materyal katı substrat olarak değerlendirilmiştir. Bu atıklar arasında muz, patates ve portakal kabukları, hurma atığı, pirinç ve buğday kepeği ile yerel üretimden elde edilen tatlı atıkları yer almaktadır. Deneyler sonucunda, en yüksek α -amilaz aktivitesi buğday kepeği ve hurma atığı kullanıldığında elde edilmiştir [198]. Topraktan izole edilip *B. licheniformis* JQ946217 olarak tanımlanan suş ile KHF ortamında α -amilaz üretiminin araştırıldığı bir diğer çalışmada, maksimum α -amilaz aktivitesine, katı substrat olarak buğday kepeğinin kullanıldığı ortamda, 35 °C, pH 7 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda ulaşıldığı; bununla birlikte, enzimin geniş bir pH aralığında (6–8) stabilite gösterdiği rapor edilmiştir [199]. *B. subtilis* D19 ile yapılan bir çalışmada, muz kabuğu, pirinç kepeği, portakal kabuğu, buğday kepeği ve çam elması kabuğu katı substrat olarak kullanılmış ve maksimum α -amilaz aktivitesine (640 U/g) buğday kepeği içeren KHF ortamında ulaşılmıştır. Bununla birlikte, ortamın %1 (w/w) nişasta ile desteklenmesinin enzim aktivitesini (670 U/g) artırdığı bildirilmiştir. Farklı azot kaynaklarının test edildiği aynı çalışmada, maya ekstraktı ilavesinin, diğer azot kaynaklarıyla karşılaştırıldığında en yüksek α -amilaz aktivitesini (594 U/g) sağladığı rapor edilmiştir. İki seviyeli tam faktöriyel deney tasarımına göre; pH 9, %70 (v/w) nem, %1 (w/w) nişasta, %1 (w/w) maya ekstraktı ve %5 (v/w) inokülüm içeren ortam

koşullarında maksimum α -amilaz aktivitesine (1239 U/g) ulaşılmıştır. Ayrıca çalışmada, nişasta konsantrasyonu, ortam pH'ı ve nem içeriği değişkenlerinin optimizasyonu amacıyla MKT kullanılmış; bu üç faktörün birlikte optimize edilmesiyle α -amilaz üretiminin üç kattan fazla artırıldığı gösterilmiştir [200]. Bir diğer çalışmada ise *Bacillus* sp. KR1 suşu ile α -amilaz üretimi amacıyla buğday kepeği, buğday samanı, mısır kepeği, mısır samanı ve pirinç kepeği olmak üzere beş farklı tarımsal atık ve endüstriyel yan ürün substrat olarak değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmada, en yüksek α -amilaz aktivitesi buğday kepeğinde (82.60 ± 0.636 U/gds) elde edilirken, en düşük aktivite buğday samanı (69.37 ± 0.932 U/gds) ile rapor edilmiştir. Buğday kepeğiyle yürütülen çalışmada, α -amilaz aktivitesi 40 °C sıcaklık, pH 7.5, %10 (v/w) inokülüm ve 1:2 (w/v) substrat/nem oranına sahip ortamda, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek düzeye ulaşmıştır. Ek karbon ve azot kaynakları incelendiğinde, çözünür nişastanın en etkili indükleyici olduğu, maya ekstraktının ise α -amilaz aktivitesi üzerinde belirgin bir artırıcı etki sağladığı belirlenmiştir [201]. Sıcaklık ve hava akışının kontrol edilebildiği laboratuvar ölçekli dolgulu kolon biyoreaktörde gerçekleştirilen bir çalışmada, katı substrat olarak buğday kepeği kullanılmış ve α -amilaz üretimi *Bacillus* sp. KR-8104 ile değerlendirilmiştir. Havalandırma hızı, başlangıç nem oranı ve inkübasyon sıcaklığının enzim üretimi üzerindeki eş zamanlı etkileri, BBT ile optimize edilmiştir. Optimum koşullar 37 °C sıcaklık, %72 başlangıç nem oranı ve 0.15 l/dk akış hızı olarak belirlenmiş; bu koşullarda ortalama α -amilaz aktivitesi 473.8 U/g kuru fermente substrat olarak raporlanmıştır. Ayrıca biyoreaktör boyunca enzim üretiminin kolonun alt kısımdan üst kısmına doğru azaldığı gözlemlenmiştir [202].

İlgili çalışmalar incelendiğinde, *Bacillus* türleri ile yürütülen KHF süreçlerinde buğday kepeğinin hem tek başına hem de çeşitli karbon ve azot kaynaklarıyla birlikte kullanıldığında α -amilaz üretiminde yüksek verim sağladığı görülmektedir. Bu durum, buğday kepeğinin içerdiği lif, selüloz, yağ ve protein gibi besleyici bileşenlerin mikrobiyal gelişim ve enzim sentezini desteklemesiyle ilişkilendirilmektedir [203, 204].

Literatürde buğday kepeği yaygın olarak incelenmiş olmakla birlikte, diğer lignoselülozik kaynaklara yönelik çalışmaların sayısı nispeten daha azdır. Örneğin bir çalışmada, *Bacillus* türlerinin mısır koçanı, mısır samanı, patates kabuğu ve yer fıstığı kabuğu gibi çeşitli tarımsal atıklar kullanılarak α -amilaz üretim performansları karşılaştırılmıştır. Denenen türler arasında en yüksek enzim üretimi *B. subtilis* ile elde edilmiş; α -amilaz aktivitesi patates kabuğu içeren fermentasyon ortamında 3.05 U/ml düzeyine ulaşmıştır. Ayrıca, substrat konsantrasyonundaki artışın enzim üretimini olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir [205]. *Bacillus* türleriyle yürütülen bir diğer çalışmada, nişasta açısından zengin bir manyok işleme atığı olan 'crueira' katı substrat olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, α -amilaz üretimini etkileyen başlıca faktörler başlangıç pH'ı, başlangıç nem içeriği ve sıcaklık olarak belirlenmiş ve bu faktörler MKT yaklaşımıyla optimize edilmiştir. Deneyler, 24., 48. ve 72. saatlerde numune alınarak takip edilmiş; en yüksek enzim

aktivitesi (437.76 U/g) ise başlangıç pH'ı 6, nem içeriği %60 (v/w) olan ve 37 °C sıcaklıkta yürütülen fermentasyon koşullarında 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edilmiştir. α -Amilaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı 65 °C, etkin pH aralığı ise 4–6 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, Co^{2+} , Ca^{2+} ve K^{+} iyonlarının enzim aktivitesini artırdığı, Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının ise inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir [206]. *B. licheniformis* VO1 ile gerçekleştirilen bir çalışmada; muz, elma, portakal ve kavun kabukları substrat olarak değerlendirilmiştir. Deneyler sonucunda, en yüksek α -amilaz aktivitesinin 45 °C sıcaklık, pH 6 ve 48 saatlik inkübasyon koşullarında, elma kabuğu içeren ortamda elde edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca, elma kabuğu içeren ortama farklı karbon ve azot kaynakları eklendiğinde, maksimum enzim üretiminin sırasıyla nişasta ve maya ekstraktı ilavesiyle sağlandığı bildirilmiştir [207]. Can Gio Mangrov ormanından izole edilen *B. amyloliquefaciens* M37 suşunun α -amilaz üretim potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada ise katı substrat olarak %70 nem içeriğine sahip olan soya küspesi kullanılmıştır. %7.5 (v/w) inokülüm miktarı ile 37 °C'de inkübasyona bırakılan ortamda en yüksek enzim aktivitesine (1039 IU/g) 36. saatin sonunda ulaşılmıştır [208].

Sadece tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünler değil, gıda ve mutfak atıkları da α -amilaz üretimi amacıyla çeşitli çalışmalarda potansiyel substratlar olarak değerlendirilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen bir çalışmada hem karbon hem de azot kaynağı işlevi gören kurutulmuş mutfak atıkları kullanılarak *B. amyloliquefaciens* KCP2 ile α -amilaz üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek α -amilaz aktivitesine, başlangıç pH'ı 8, substrat/nem oranı 1:3 (w/v) ve inokülüm miktarı %30 (v/w) olan katı ortamda, 37 °C sıcaklıkta ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda ulaşılmıştır. Kısmen saflaştırılan enzim, 60 °C'de gerçekleştirilen sakkarifikasyon sürecinde mutfak atıklarını %80 verimlilikle indirgen şekerlere dönüştürmüştür [209]. Malezya'daki bir kaplıcadan izole edilen *B. licheniformis* HULUB1 ve *B. subtilis* SUNGB2 ile yapılan bir diğer çalışmada, tahıl, sebze, tavuk ve ton balığı içeren ve evsel mutfak atığı kompozisyonunu temsil eden bir karışım kullanılarak α -amilaz üretimi araştırılmıştır. Her iki izolat, 65 °C ve pH 6 koşullarında sırasıyla 18.15 U/ml ve 22.14 U/ml α -amilaz aktivitesi göstermiş; enzimlerin 55–85 °C sıcaklık ve pH 5–9 aralığında stabil kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu suşların karışık kültürü ile yürütülen fermentasyon sürecinde, 12. günün sonunda atık materyalin toplam kuru madde içeriğinde %43–45 oranında azalma gözlemlenmiştir [210].

5.2. Selüloz Üretimi

Literatürde, *Bacillus* türleriyle yürütülen KHF temelli selüloz üretimini içeren çalışma sayısının α -amilaz üretimine kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Bu alandaki güncel çalışmalarda, *Bacillus* suşlarının lignoselülozik biyokütlelerin enzimatik olarak parçalanmasındaki etkinliği öne çıkmakta; besin profili iyileştirilmiş tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünlerin hayvan yemi olarak değerlendirilmesine yönelik uygulamalar giderek daha fazla araştırılmaktadır

[211-214]. Örneğin, yapılan bir çalışmada *Reticulitermes labralis*'in bağırsağından izole edilen *B. subtilis* RLI2019 suşunun genom analizi, %99.41 oranında probiyotik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuş; suşun selülotik ve hemiselülotik enzimler açısından yüksek aktivite sergilediği raporlanmıştır. Buğday samanı kullanılarak gerçekleştirilen 7 günlük fermentasyon sonunda, selülozik fraksiyonlara ait lif içeriklerinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir: nötral deterjan lifi %5.8, asit deterjan lifi %10.3, hemiselüloz %1 ve lignin %4.7 oranında azalmıştır. Ayrıca, ortamda 664.9 µg/ml düzeyinde indirgen şeker birikimi ile birlikte 1.22 U/ml endoglukanaz ve 6.68 U/ml ksilanaz aktivitesi tespit edilmiş; elde edilen bulgular doğrultusunda lignoselülozik matriksin etkin biçimde parçalandığı bildirilmiştir [215]. Benzer şekilde, deve gastrointestinal kanalından izole edilen *B. amyloliquefaciens* D1B3 suşuyla yürütülen bir çalışmada, suşun probiyotik potansiyeli ile selülaz üretim kapasitesi birlikte ele alınmıştır. Katı substrat olarak buğday kepeğinin kullanıldığı fermentasyon ortamı için sıvı/katı oranı %1.19, pH 6.2 ve 36.99 °C olarak belirlenen optimum koşullarda 0.0144 g/l.dk selülaz aktivitesi elde edilmiştir. İzolatın in vitro koşullarda düşük pH değerlerine ve safra tuzuna karşı dirençli olduğu, ayrıca patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, D1B3 suşunun hem bağırsak mikrobiyotasını destekleme potansiyeli hem de selüloz içeriği yüksek materyallerin sindirilebilirliğini artırma kapasitesi açısından yem fermentasyon süreçlerine çok yönlü katkı sağlayabileceği ifade edilmiştir [216].

Doğrudan selülaz üretimine odaklanan çalışmalarda, genellikle *Aspergillus* ve *Trichoderma* türleri gibi küfler tercih edilmiş [217-220]; *Bacillus* cinsiyle yürütülen araştırmalar ise nispeten sınırlı kalmıştır. *B. licheniformis* MA1 suşu ile yürütülen bir çalışmada, selülaz üretiminin artırılmasına yönelik olarak iki aşamalı bir optimizasyon yaklaşımı benimsenmiştir. İlk aşamada, enzim verimi üzerinde etkili olan değişkenlerin belirlenmesi amacıyla PBT kullanılmış; karboksimetil selüloz (CMC), mısır koçanı ve pepton cevap üzerindeki en etkili faktörler olarak belirlenmiştir. Ardından, bu üç faktörün seviyeleri BBT ile optimize edilmiştir. Mısır koçanının karbon kaynağı olarak değerlendirildiği optimum koşullar altında elde edilen selülaz aktivitesi, optimize edilmemiş ortama kıyasla 6,8 kat artarak 199.7 ± 0.34 U/ml seviyesine ulaşmıştır. Ayrıca, enzimatik işleme tabi tutulan elma suyu örneklerinde meyve suyu verimi (%88.2) kontrol grubuna (%75.4) kıyasla belirgin şekilde arttığı rapor edilmiştir. [221]. *Bacillus* sp. JS14 ile yapılan bir çalışmada, katı substrat olarak buğday kepeği kullanılmış ve selülaz üretimi üzerinde etkin olan faktörler MKT ile optimize edilmiştir. En yüksek selülaz aktivitesine 400 g/l buğday kepeği, %10 inokülüm, 45 °C sıcaklık, pH 6.5 koşullarında, 5 günlük inkübasyonun sonunda ulaşılmıştır [222]. *B. subtilis* MS 54 suşu ile gerçekleştirilen bir çalışmada, KHF koşullarında selülaz üretiminin optimize edilmesi amacıyla iki aşamalı bir deneysel tasarım yaklaşımı benimsenmiştir. İlk aşamada, toplam sekiz değişkenin (mısır kepeği, badem kabuğu, kazein, MgSO₄, inokülüm miktarı, başlangıç pH'ı, nem oranı ve inkübasyon süresi) enzim üretimi üzerindeki etkisini belirlemek

amacıyla PBT kullanılmıştır. Ardından, en etkili üç faktör olan mısır kepeği, badem kabuğu ve nem içeriği, MKT ile optimize edilmiştir. En yüksek CMCaz (karboksimetil selüloz) aktivitesine 5 g mısır kepeği ve 3.5 g badem kabuğu içeren ortamda 72 saatlik inkübasyon sonunda ulaşılmış; enzim aktivitesinin 96. saate kadar kademeli olarak, 120–144 saat arasında ise nispeten daha hızlı düştüğü rapor edilmiştir [223]. *B. subtilis* ile yürütülen başka bir çalışmada, tarımsal atıklar olan saman, palmye lifleri ve muz braktelerinin substrat olarak değerlendirilme potansiyeli incelenmiş; en yüksek selüloz aktivitesi palmye lifleri içeren KHF ortamında ve 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilmiştir [224]. *B. subtilis* PJK6 suşunun kullanıldığı bir diğer çalışmada, katı substrat olarak buğday kepeği seçilmiş ve selüloz üretimi üzerine etki eden faktörler (inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, inokülüm miktarı ve substrat/nem oranı) MKT kullanılarak optimize edilmiştir. En yüksek selüloz aktivitesine (1.14 IU/ml); sıcaklığı 45 °C, pH'ı 6, inokülüm miktarı %14, buğday kepeği/su oranı 1:4 olan ortamda, 72 saatlik inkübasyon sonucunda ulaşılmıştır. Yalnızca musluk suyuyla nemlendirilmiş buğday kepeğinin kullanıldığı bu çalışmada, enzim aktivitesi üzerinde en belirleyici faktörlerin sıcaklık ve inkübasyon süresi olduğu, pH'ın ise daha sınırlı bir etki gösterdiği rapor edilmiştir [225]. Soya sütü üretimi sırasında açığa çıkan bir yan ürün olan okaranın katı substrat olarak potansiyelinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, izole edilip *B. subtilis* Pa5 olarak tanımlanan bakteri suşu ile KHF ortamında selüloz üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek CMCaz (48.42 ± 0.87 IU/g) ve sellobiyaz (154.50 ± 2.15 IU/g) aktivitesi; sıcaklığı 30 °C, başlangıç nem içeriği %71.5, inokülüm miktarı %10 (v/w) olan ve 10 g okara içeren ortamda, 48 saat süren fermentasyon sonunda elde edilmiştir [226].

5.3. Eş Zamanlı Enzim Üretimi

Mikrobiyal enzimlerin eşzamanlı üretimi, proses verimliliğini artırma, üretim maliyetlerini azaltma ve tek bir fermentasyon süreciyle birden fazla katma değerli ürün elde etme potansiyeli nedeniyle endüstriyel biyoteknoloji alanında dikkat çeken bir yaklaşımdır. Özellikle lignoselülozik biyokütlenin değerlendirildiği KHF sistemlerinde, aynı mikroorganizma tarafından birden fazla enzimin sentezlenmesi ekonomik ve çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda, substrat kompozisyonu, fermentasyon parametreleri ve ekstraksiyon yöntemlerinin eşzamanlı enzim sentezi üzerindeki etkileri farklı açılardan ele alınmıştır.

Literatürde *Bacillus* türleri ile yürütülen ve endüstriyel enzimlerin eşzamanlı üretimini konu alan çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Bu bağlamda öne çıkan çalışmalardan biri, *Bacillus* sp. TMF-1 suşu ile yürütülmüş olup; α -amilaz, selüloz, proteaz ve pektinaz enzimlerinin aynı üretim sürecinde sentezlendiği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada, buğday kepeği, mısır kepeği, soya küspesi, ayçiçeği küspesi, zeytinyağı posası ve mısır perikarpı katı substrat olarak değerlendirilmiş; bu materyallerin hem doğal hem de çeşitli ön işlemlerden geçirilmiş formlarının

enzim üretimi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Uygulanan ön işlemler arasında asit/alkali muamelesi, ultrason ve mikrodalga destekli yöntemler yer almıştır. Elde edilen bulgulara göre, alkali işlem görmüş mısır perikarpı ile en yüksek α -amilaz (50.75 IU/g) ve proteaz (50.5 IU/g) aktivitesine ulaşılmıştır. Selüloz üretiminde en iyi sonuç alkali işlem uygulanmış mısır kepeği ile elde edilirken (1.19 IU/g), en yüksek pektinaz aktivitesine (64.90 IU/g) ise doğal formda kullanılan soya küspesiyle ulaşılmıştır [227]. *B. subtilis* ile soya küspesi kullanılarak KHF koşullarında α -amilaz, proteaz ve selüloz enzimlerinin eşzamanlı üretiminin gerçekleştirildiği başka bir çalışmada, fermentasyon sonrası enzim ekstraksiyonunu optimize etmek ve verimi artıracak en uygun yöntemi belirlemek amacıyla klasik ekstraksiyon yöntemi ile ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) tekniği karşılaştırılmıştır. KHF süreci 30 °C’de 72 saat inkübasyon süresiyle yürütülmüş ve başlangıçtaki enzim aktiviteleri sırasıyla 109.01 IU/g (α -amilaz), 29.62 IU/g (proteaz) ve 0.86 IU/g (selüloz) olarak belirlenmiştir. Klasik ekstraksiyon sürecinde; pH, karıştırma hızı, katı/sıvı oranı ve ekstraksiyon süresi değişkenleri BBT ile optimize edilmiştir. Model sonuçlarına göre en yüksek ekstraksiyon verimi α -amilaz için ~820 IU, proteaz için ~240 IU ve selüloz için ~7.5 IU olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık, UDE yöntemi daha kısa sürede (2.5–10 dakika) ve daha düşük sıvı hacmiyle daha yüksek konsantrasyonlu enzim çözeltisi sağlamış; α -amilaz ve proteaz ekstraksiyonunda sırasıyla 825 IU ve 330 IU seviyelerine ulaşılmıştır. Ancak selüloz enziminin geri kazanımı açısından klasik yöntem daha etkili bulunmuş ve bu durum, selülozun substrata sıkı bir şekilde bağlandığı için ekstraksiyon işleminde yüksek karıştırma hızına ihtiyaç duyulduğu şeklinde açıklanmıştır. İlgili enzimlerin eşzamanlı üretimi için soya küspesi gibi düşük maliyetli substratların kullanılabileceği ve UDE’nin özellikle α -amilaz ve proteaz ekstraksiyonunda yüksek verim ve ürün konsantrasyonu sağladığı bildirilmiştir [228].

Pirinç kabuğu, pirinç samanı, buğday samanı ve şeker kamışı bagasının substrat olarak kullanım potansiyellerinin araştırıldığı, aynı zamanda farklı azot kaynakları içeren çözeltilerin KHF ortamı üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, *Bacillus* sp. BBXS-2 ile ekstraselüler α -amilaz ve proteaz enzimlerinin eşzamanlı üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda en uygun katı substratın 5 g/l kazein, 3 g/l pepton, 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l KH_2PO_4 , 10 g/l NaCl ve 2 g/l CaCl_2 içeren çözeltiyle (1 ml/g substrat) nemlendirilmiş buğday samanı olduğu belirlenmiştir. Başlangıç pH’ı 8.5 ve sıcaklığı 45 °C olan fermentasyon ortamında, 5 günlük inkübasyon süresinin sonunda en yüksek α -amilaz ve proteaz aktiviteleri sırasıyla 6.900 U/g ve 12.189 U/g olarak rapor edilmiştir. Steril olan ve olmayan fermentasyon koşullarının karşılaştırıldığı deneylerde, yüksek sıcaklık ve alkali pH’ın mikrobiyal kontaminasyonu sınırladığı ve sterilizasyon işleminin enzim üretimi üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, elde edilen ham enzimlerin deterjanla birlikte kullanımında, leke giderme kapasitesinin ticari ürünlere kıyasla %200’e kadar arttığı rapor edilmiştir [229]. α -Amilaz ve proteazın eşzamanlı üretiminin gerçekleştirildiği bir diğer çalışmada, mikrobiyal enzim üreticisi olarak *B. licheniformis*

ZB-05 kullanılmış; katı substrat olarak portakal, muz, elma ve pirinç kabukları ile buğday kepeği, mercimek kepeği ve mısır küspesi değerlendirilmiştir. Her iki enzim için de en uygun substratın pirinç kabuğu olduğu belirlenen çalışmada, maksimum α -amilaz (443 U/g) ve proteaz (469.000 U/g) üretimi; %30 nem içeriğine sahip ortamda, α -amilaz için %20, proteaz için ise %30 inokülüm oranlarında ve 36 saatlik inkübasyon sonunda elde edilmiştir. Ayrıca, test edilen azot kaynakları arasında α -amilaz ve proteaz üretimi açısından en uygun inorganik ve organik kaynaklar; sırasıyla %1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %2 Bacto karaciğer ekstraktı (sığır karaciğerinden elde edilen hidrolizat), %2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve %1 Bacto kasaminoasit olarak belirlenmiştir. İlave karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde, %2 çözünür nişasta α -amilaz üretimini, %1 maltoz ise proteaz üretimini artırmıştır. En uygun ekstraksiyon ortamını belirlemek amacıyla distile su, musluk suyu, %2 SDS, 50 mM NaCl, 50 mM asetat tamponu (pH 6.0; α -amilaz için) ve 50 mM fosfat tamponu (pH 8.5; proteaz için) ayrı ayrı denenmiştir. Enzimlerin katı matriksten en verimli şekilde geri kazanımı, musluk suyu ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilmiştir [230].

Mikrobiyal enzim üreticisi olarak *B. subtilis* NRRL B-4219 suşunun kullanıldığı bir çalışmada, selüloz ve pektinaz enzimlerinin eşzamanlı üretimi araştırılmış; katı substrat olarak asitle muamele edilmiş ve belirli oranlarda karıştırılmış fındık kabuğu, portakal kabuğu ve elma posası değerlendirilmiştir. En yüksek enzim aktiviteleri, %20 elma posası, %30 portakal kabuğu ve %50 fındık kabuğu içeren karışımda elde edilmiş; selüloz aktivitesi 0.5 U/ml, pektinaz aktivitesi ise 8.27 U/ml olarak ölçülmüştür. Fındık kabuğunun tek başına kullanıldığı ortamda, elma posası ve portakal kabuğuna kıyasla daha yüksek pektinaz üretildiği; ancak karışık substrat kullanımının özellikle pektinaz aktivitesini artırarak daha yüksek verim sağladığı rapor edilmiştir [231]. *B. subtilis* M-11 suşu ile yürütülen başka bir çalışmada ise selüloz ve proteazın eşzamanlı üretimi için en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla; arpa, fasulye, nohut ve yulaf unu ile mısır koçanı, yulaf sapı ve buğday kepeği katı substratlar olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, her iki enzim için de en yüksek aktivitenin yulaf unu kullanılan fermentasyon ortamında sağlandığını ortaya koymuştur. Deneysel tasarım aracı olarak kullanılan BBT'nin hem substrat seçimi hem de fermentasyon değişkenlerinin optimizasyonu açısından etkili sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Ayrıca, düşük maliyetle üretilen bu enzimlerin geniş pH (7.0–9.5) ve sıcaklık (25–60 °C) aralıklarında yüksek stabilite gösterdiği ve deterjan endüstrisinde kullanımı açısından güçlü bir potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir [232].

KHF ile *Bacillus* türleri kullanılarak yürütülen eşzamanlı enzim üretimi çalışmalarının büyük kısmı, fermentasyon ortamı bileşenleri ve enzim ekstraksiyonuna yönelik optimizasyonlara odaklanmaktadır. Bu kapsamda; substrat türü, başlangıç nemi, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi faktörlerin enzim verimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiş; buğday kepeği, soya küspesi ve pirinç kabuğu gibi tarımsal atık ve endüstriyel yan ürünler yaygın biçimde kullanılmıştır. Ancak bu çalışmaların çoğunda ilgili materyallerin etkisi bağımsız olarak incelenmiş; çok bileşenli substrat

karışımlarının sağlayabileceği olası sinerjik etkiler büyük ölçüde göz ardı edilmiştir. Oysa literatürde, bu tür karışımların besin dengesini iyileştirme, mikrobiyal gelişimi destekleme ve enzim üretimini artırma potansiyeline sahip olduğu; tek bir yan ürünün gerekli tüm besin bileşenlerini sağlamada yetersiz kalabileceği sıklıkla vurgulanmaktadır [233-236]. Ayrıca, uygun fermentasyon ortamlarının belirlenmesine karşın, bu koşulların biyoreaktör sistemlerine aktarımı ve işletim parametrelerinin optimizasyonuna ilişkin verilerin sınırlı olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, mısır kepeği ve fındık küspesi içeren bir substrat karışımı kullanılarak α -amilaz ve selülaz enzimlerinin eşzamanlı biyosentezi için ortam bileşimi optimize edilmiş; elde edilen optimum koşullar dolgu kolon biyoreaktör sistemine aktarılmış ve her bir enzim için işletim parametreleri ayrı ayrı optimize edilerek mevcut literatürdeki boşluğun giderilmesine katkı sağlanmıştır.



6. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, çalışma kapsamında kullanılan mikroorganizma, katı substratlar, çözeltiler, laboratuvar cihazları ve biyoreaktör sistemine ilişkin bilgiler ile uygulanan deneysel yöntemler detaylı bir şekilde sunulmuştur.

6.1. Materyaller

6.1.1. Katı Substratlar

Katı substrat olarak kullanılan endüstriyel yan ürünlerden fındık küspesi, Altaş Yağ Sanayi A.Ş.'den; mısır kepeği ise Sunar Mısır Entegre Tesisleri Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den temin edilmiştir.

6.1.2. Mikroorganizma

Hidrolitik enzim üretim potansiyeli nedeniyle tercih edilen *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 suşu, ABD Ulusal Tarımsal Kullanım Araştırma Merkezi'ne (NRRL, National Center for Agricultural Utilization Research) ait kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

6.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Laboratuvar Cihazları

Analitik saflıkta temin edilen kimyasallar, kullanılan çözeltiler ve laboratuvar cihazlarına ilişkin bilgilere sırasıyla Tablo 6.1, Tablo 6.2 ve Tablo 6.3'te yer verilmiştir.

Tablo 6.1. Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal madde ve bileşenler

Kimyasal Madde/Bileşen	Firma
Bakteriyolojik pepton	CONDA (Pronadisa)
Yeast extract	CONDA (Pronadisa)
Sodyum klorür	Merck EMSURE®
Agar agar	ChemSolute
Amonyum sülfat	Sigma®
Maltoz monohidrat	Merck
Glukoz monohidrat	Merck
Sodyum fosfat monobazik	Fluka Analytical
Sodyum fosfat dibazik	Carlo Erba Reagents
Sodyum hidroksit	Tekkim
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich
3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS)	Bostonchem
Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat	Scharlau
Çözünür nişasta	Merck
Karboksimetilselüloz (CMC)	MP Biomedicals, LLC
Sülfürik asit	AnalaR NORMAPUR®
Aseton	ISOLAB Chemicals

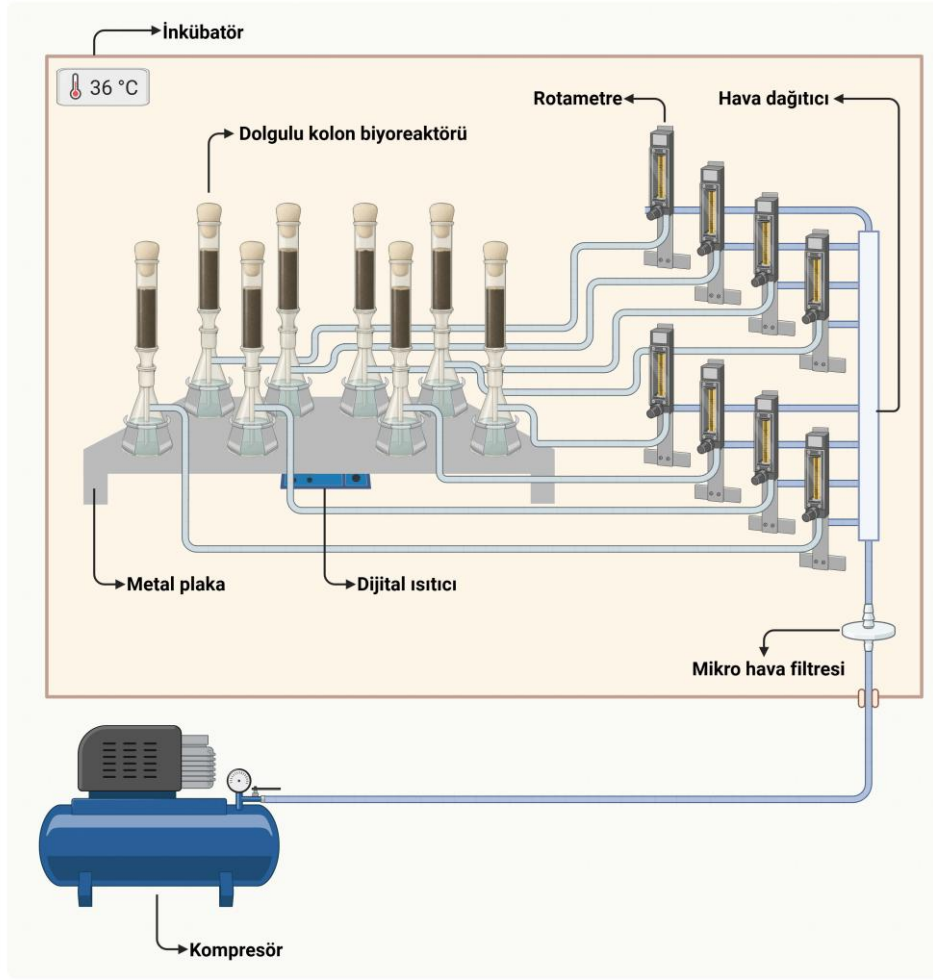
Tablo 6.2. Çalışma kapsamında kullanılan çözeltilere ilişkin bilgiler

Çözelti	Kullanım Amacı
% 0.2 (w/v) maltoz standart çözeltisi	Maltoz standart eğrisinin hazırlanması
% 0.2 (w/v) glukoz standart çözeltisi	Glukoz standart eğrisinin hazırlanması
% 99.5 (v/v) aseton çözeltisi	Ekstraktif madde analizi
0.5 N sodyum hidroksit çözeltisi	Hemiselüloz analizi
%72 (v/v) sülfürik asit çözeltisi	Lignin analizi
6,7 mM sodyum klorür içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.9)	α -Amilaz ekstraksiyonu ve seyreltilmesi
50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.2)	Selülaz ekstraksiyonu ve seyreltilmesi
% 1 (w/v) nişasta çözeltisi (sodyum fosfat tamponunda, pH 6.9)	α -Amilaz aktivite tayini
% 1 (w/v) CMC çözeltisi (sodyum fosfat tamponunda, pH 7.2)	Selülaz (CMCaz) aktivite tayini
1 M sodyum hidroksit çözeltisi	Ortam ve tampon pH'larının ayarlanması
1 M hidroklorik asit çözeltisi	Ortam ve tampon pH'larının ayarlanması
96 mM DNS, 2 M NaOH, 5.3 M potasyum sodyum tartarat içeren renk reaktifi	İndirgen şeker tayini

Tablo 6.3. Çalışma kapsamında kullanılan laboratuvar cihazlarına ilişkin bilgiler

Laboratuvar Cihazları	Kullanım Amacı	Marka/Model
Dijital hassas terazi	Kimyasal madde ve substratların tartımı	Shimadzu BL-320H
Laboratuvar ölçekli blender	Katı substratların öğütülmesi	Spice & Herb Grinder IC-10B
Etüv	Katı örneklerin kurutulması	JEIO TECH ON-22G
Dijital ısıtıcı manyetik karıştırıcı	Ortam ve çözeltilerin hazırlanması	Weightlab Instruments WN-H320
Otoklav	Ortam ve malzemelerin sterilizasyonu	Lab Companion ST-G Series
Laminer hava kabini	Mikroorganizma inokülasyonu	Thermo Scientific Safe 2020
Orbital çalkalamalı inkübatör	Mikroorganizma inkübasyonu	GFL
Masa tipi pH metre	Ortam ve çözeltilerin pH ölçümü	Thermo Scientific Lab Star PH111
Vorteks karıştırıcı	Numunelerin homojenizasyonu	Weightlab Instruments WN-2800
Masaüstü santrifüj	Büyük partiküllerin ayrılması	Nüve NF 800
Mikrosantrifüj	Süpernatant eldesi	DaiHan Scientific CF-10
Su banyosu	Enzim inkübasyonu	Nüve ST 402
UV-VIS Spektrofotometre	Absorbans ölçümleri	Thermo Scientific GENESYS 10S
Dolgulu kolon biyoreaktör sistemi	Mikrobiyal enzim üretimi	-

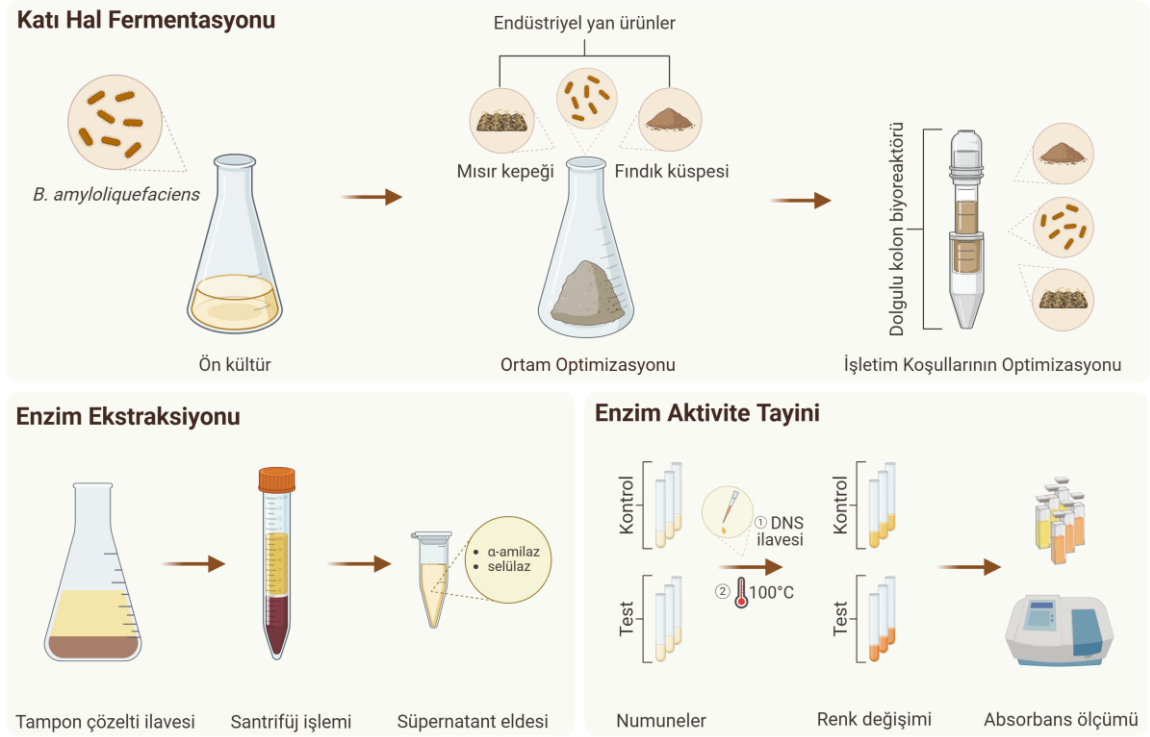
Çalışmanın ikinci aşamasında, biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu, daha önce TÜBİTAK projesi kapsamında temin edilen Raimbault tipi dolgulu kolon biyoreaktör sistemi ile yürütülmüştür. Sistem; inkübasyon kabini, kolonlar, şiliftli erlenler, gaz kompresörü, hava dağıtıcı, rotametreler ve sıcaklık kontrollü bir ısıtıcıdan oluşmaktadır. Alt kısımları delikli olarak tasarlanan, 3 cm çapında ve 20 cm yüksekliğindeki kolonlar; 250 ml hacme sahip, hava girişi için cam boru içeren şiliftli erlenler üzerine yerleştirilmiştir. Kolon ve şiliftli erlenlerden oluşan biyoreaktör birimleri, alt merkezinde dijital göstergeli bir ısıtıcının bulunduğu metal bir plaka üzerine sabitlenmiştir. Gaz kompresöründen çıkan hava, çok çıkışlı bir hava dağıtıcı aracılığıyla rotametrelere yönlendirilmiş; her bir rotametre, ilgili şiliftli erlene bağlanmıştır. Bu sayede, kolona ulaşmadan önce nem kazanan hava, substrat yatağının nem seviyesinin korunmasına olanak tanımıştır. Dolgulu kolon biyoreaktör sisteminin genel yapısı Şekil 6.1'de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 6.1. Dolgulu kolon biyoreaktör sisteminin genel yapısı

6.2. Metot

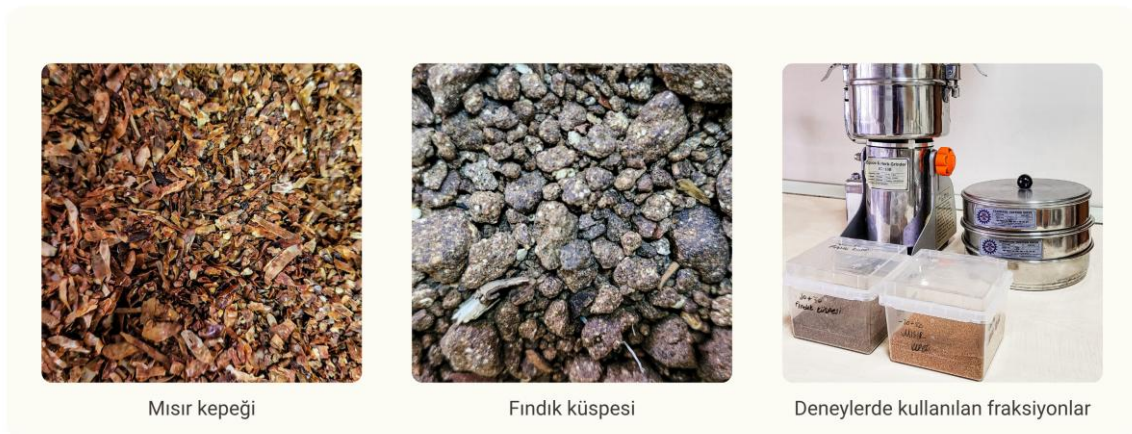
Bu bölümde, tez kapsamında yürütülen deneysel çalışmalar ve izlenen yöntemler sunulmuştur. Mikrobiyal enzim üretimi amacıyla tasarlanan bu çalışma, KHF tekniği temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Deneysel süreci oluşturan tüm aşamalar, ilgili alt başlıklar altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır. İlk aşamada, katı substrat olarak değerlendirilen endüstriyel yan ürünlere yönelik ön hazırlık işlemleri ve karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Devamında, *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 suşuna ait kültür hazırlığı tamamlanmış ve deneysel tasarım doğrultusunda fermentasyon deneyleri yürütülmüştür. Belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda enzim ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş; ardından enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışma boyunca takip edilen deneysel sürecin genel akışı ise Şekil 6.2’de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 6.2. KHF yöntemiyle yürütülen mikrobiyal enzim üretimine ilişkin deneysel akış şeması

6.2.1. Katı Substratların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

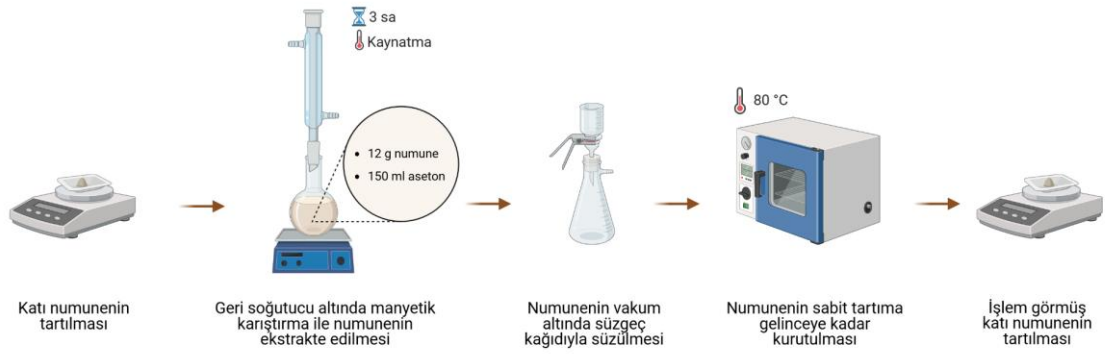
Şekil 6.3'te fiziksel görünümleri verilen mısır kepeği ile findik küspesi, biyoyararlanımı artırmak amacıyla öğütülmüş ve ASTM standartlarına uygun elekler kullanılarak farklı partikül boyutlarına ayrılmıştır. Eleme işlemi sonucunda elde edilen -30+50 mesh aralığındaki fraksiyonlar, hava geçirmez kaplar içerisinde +4 °C'de muhafaza edilerek fermentasyon deneylerinde kullanılmıştır.



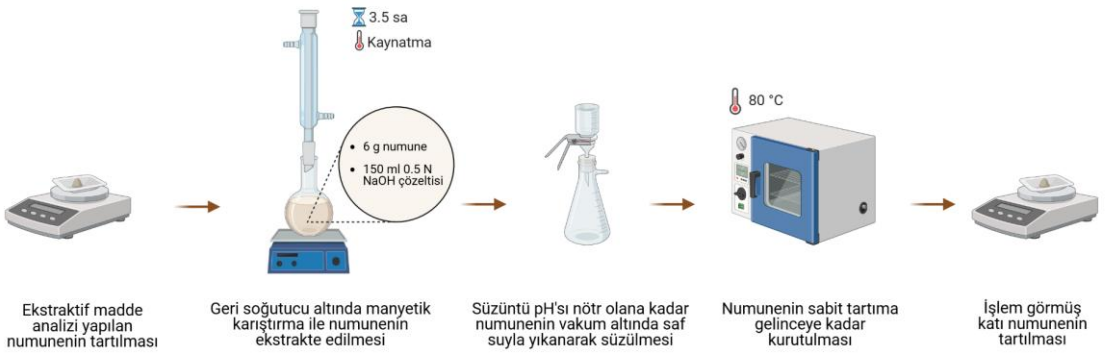
Şekil 6.3. Katı substratların fiziksel görünümleri ve deneylerde kullanılan fraksiyonlar

Katı substratların ekstraktif madde, hemiselüloz, lignin ve selüloz içeriklerinin belirlenmesinde Li vd. tarafından önerilen yöntem esas alınmış [237] olup bu yönteme ilişkin detaylar Şekil 6.4'te sunulmuştur.

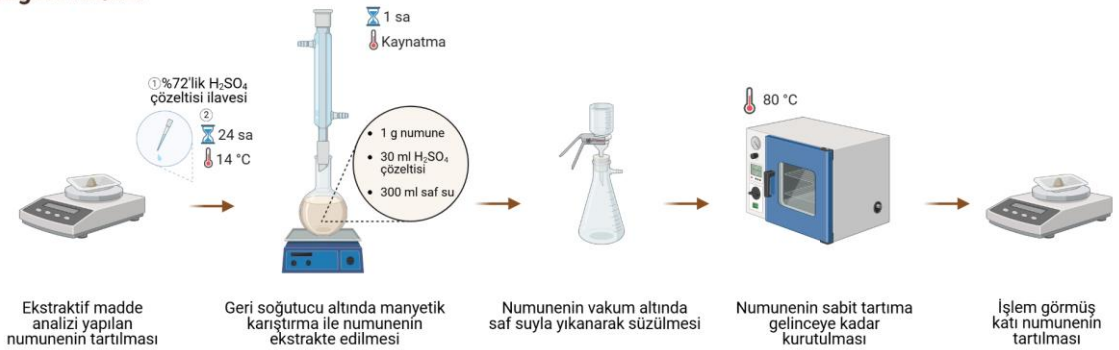
Ekstraktif Madde Analizi



Hemiselüloz Analizi



Lignin Analizi



Selüloz Analizi

Katı numunelerin ihtiva ettiği selüloz miktarı; ekstraktif madde, hemiselüloz ve ligninin kütlece yüzde miktarlarının çıkarılmasıyla elde edilmiştir.

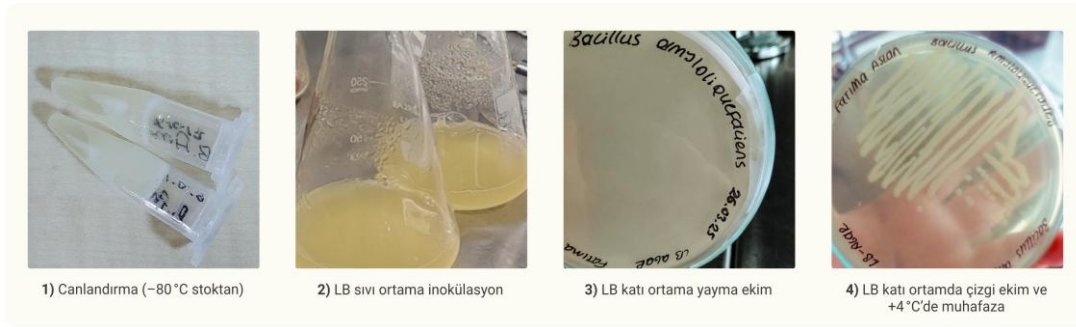
Şekil 6.4. Katı substratların temel bileşen analizleri

6.2.2. Mikrobiyal Kültürün Hazırlanması ve Saklama Koşulları

–80  C’de saklanan stok kültürden canlandırılan *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 bakterisinin çoğaltılması ve saklanması standart formülasyonlara göre hazırlanan [238] ve otoklavda (121  C, 1.2 bar, 15 dk) sterilize edilen Luria-Bertani (LB) sıvı ve agar besiyerleri kullanılmıştır. LB sıvı besiyerinde çoğaltılan bakteriyel kültür, sırasıyla yayma ve çizgi ekim yöntemiyle agar içeren besiyerlerine aktarılmış; elde edilen stok kültürler +4  C’de saklanmış ve iki haftada bir yenilenmiştir.

KHF çalışmalarında kullanılan  n kültürü hazırlamak amacıyla, +4  C’de muhafaza edilen katı kültürden  ze yardımıyla alınan mikroorganizma kolonisi, aseptik koşullar altında 50 ml LB sıvı besiyeri içeren 250 ml’lik erlene aktarıldıktan sonra 16 saat orbital çalkalamalı inkübatörde (37  C ve 150 rpm) inkübe edilmiştir. Elde edilen  n kültürler, her bir deney koşulu için belirlenen oranlarda inokülüm olarak kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların saklanması ve KHF deneylerinin yürütülmesine ilişkin görseller, sırasıyla şekil 6.5 ve şekil 6.6’da sunulmuştur.



şekil 6.5. Stok kültürden mikroorganizmanın canlandırılması ve kültür ortamlarına aktarımı



şekil 6.6. KHF deneyleri

6.2.3. Deneysel Tasarım

α -Amilaz ve selüloz enzim aktivitelerinin (U/g) cevap değişkenleri olarak seçildiği optimizasyon çalışmaları iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, fermentasyon ortamının optimizasyonu amacıyla enzim üretimi üzerinde etkili olduğu öngörülen faktörler seçilmiş ve her bir enzim için maksimum aktiviteye ulaşılan optimum ortam kompozisyonları belirlenmiştir. İkinci aşamada ise elde edilen ortam bileşimleri dolgu kolon biyoreaktör sistemine taşınarak biyoreaktör işletim koşulları optimize edilmiştir. Her bir optimizasyon adımı için kullanılan deney matrisleri, MKT ilkelerine göre Design Expert 10 yazılımı aracılığıyla tasarlanmıştır. Optimizasyon süreçlerine ilişkin varyans analizleri (ANOVA) ile cevap yüzeyi grafiklerinin oluşturulması da aynı yazılım aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon ortamının ve biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu için belirlenen bağımsız değişkenlere ait deneysel düzeyler Tablo 6.4 ve Tablo 6.5'te sunulmuştur.

KHF'nin karakteristik yapısını koruyacak en uygun nem düzeyi, ön denemeler sonucunda 1:1.5 (w/v) katı-sıvı oranı ile sağlanmıştır. Bu bağlamda ortam optimizasyonu için her koşulda toplam katı madde miktarı 10 g olacak şekilde sabit tutulmuş; varyasyon, mısır kepeği ve fındık küspesinin birbiriyle olan oranına göre oluşturulmuştur. Deneysel tasarımda substrat miktarı (% MK) değişkeni, kütlece % mısır kepeği (MK) oranı esas alınarak tanımlanmış olup %100 değeri yalnızca mısır kepeği içeren, %0 değeri ise sadece fındık küspesinden oluşan ortamı ifade etmektedir. Benzer şekilde, toplam sıvı hacmi tüm deneylerde 15 ml'de sabitlenmiş; inokülüm ve azot kaynağı belirlenen miktarlarda eklendikten sonra kalan hacim musluk suyu ile tamamlanmıştır. Musluk suyu, mikrobiyal gelişimi destekleyen mineral içeriği ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilmiştir. Azot kaynağı çözeltisi ise Selen [239] tarafından bildirilen formülasyona göre 10 kat derişik olarak hazırlanmıştır. İlgili stok çözelti, 50 g/l bakteriyolojik pepton, 25 g/l maya ekstraktı ve 50 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içermektedir.

Tablo 6.4. Ortam optimizasyonu için seçilen faktörler ve seviyeleri

Bağımsız Değişken	Sembol	-2	-1	0	+1	+2
Substrat miktarı (% MK)	A	0	25	50	75	100
İnokülüm hacmi (ml)	B	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5
Azot kaynağı miktarı (ml)	C	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
İnkübasyon süresi (sa)	D	24	54	84	114	144

Tablo 6.5. Biyoreaktör işletim koşulları için seçilen faktörler ve seviyeleri

Bağımsız Değişken	Sembol	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Hava akış hızı (l/dk)	A	0.100	0.130	0.175	0.220	0.250
Sıcaklık (°C)	B	31.0	32.6	35.0	37.4	39.0
Dolgu miktarı (g)	C	10	12	15	18	20

Ortam optimizasyonu sonucu elde edilen optimum bileşimler, dolgu kolon biyoreaktör sistemine aktarılırken 1:1.5 (w/v) katı-sıvı oranı korunmuştur. Örneğin, 10 g dolgu miktarı içeren deney koşuluna kıyasla, 20 g dolgu miktarı kullanılan koşulda ortam kompozisyonu, tüm bileşenlerin iki katı olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ortam optimizasyonu deneylerinde, sıvı kaybını en aza indirmek amacıyla katı substrat, azot kaynağı çözeltisi ve su ayrı ayrı sterilize edilmiştir. Buna karşılık, substrat porozitesinin rehidrasyonla bozulmasını önlemek amacıyla biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu için gerçekleştirilen deneylerde tüm ortam bileşenleri birlikte otoklavlanmıştır. Her iki uygulamada da ortam bileşenleri laminar hava kabineye alınarak oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış; ardından aseptik koşullarda inoküle edilmiş ve cam çubukla karıştırıldıktan sonra inkübasyona alınmıştır.

Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna geçilmeden önce, dolgu kolon biyoreaktör sisteminde substrat yatağının nem dengesini etkileyen koşulları değerlendirmek amacıyla sabit sıcaklıkta (37 °C) ön deneyler gerçekleştirilmiştir. Farklı hava akış hızları (0.1–0.5 l/dk) ve dolgu miktarlarının (5–20 g) substrat yatağındaki nemlenme ve kuruma eğilimleri üzerindeki etkileri gözlemlenmiş; bulgular doğrultusunda deneysel tasarım için uygun çalışma aralıkları belirlenmiştir. İlgili koşullarda elde edilen örnekler Şekil 6.7’de gösterilmiştir.



Şekil 6.7. Ön deneme çalışmaları sonucu elde edilen substrat yataklarının fiziksel görünimleri

DKB sisteminde gerçekleştirilen ön deneme çalışmaları kapsamında, yüksek hava akış hızlarında substrat yatağında kuruma eğiliminin arttığı; düşük hava akış hızlarında ise bu eğilimin dolgu miktarındaki artışla birlikte belirginleştiği gözlemlenmiştir. 5 g dolgu miktarıyla yürütülen denemelerde, 0.1 l/dk hava akış hızının nem dengesini korumada yeterli olduğu; ancak akış hızının artırılmasıyla birlikte substratın topaklanma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Öte yandan, 20 g dolgu miktarında 0.1 l/dk hava akış hızının, 0.25 l/dk'ya kıyasla nemin korunmasında daha elverişli olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, dolgu miktarı için 10–20 g ve hava akış hızı için 0.1–0.25 l/dk değerleri, MKT kapsamında yürütülen deneysel planlamada uç noktaları temsil edecek şekilde belirlenmiştir.

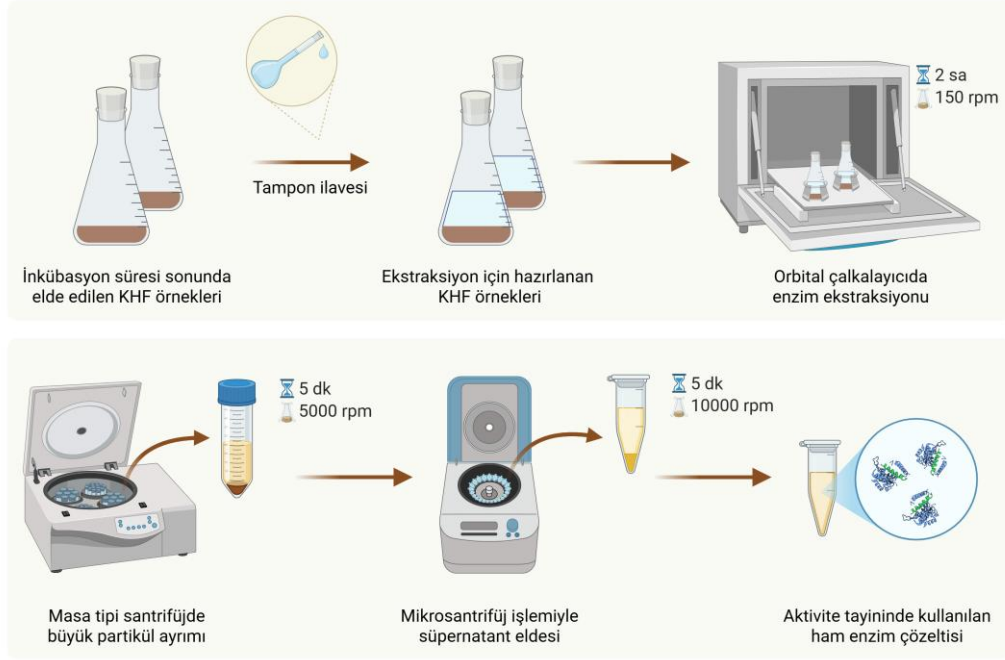
Fermentasyon ortamı ve biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu için takip edilen deney koşulları Tablo 6.6'da sunulmuştur.

Tablo 6.6. Ortam optimizasyonu ve biyoreaktör işletim koşullarına ait MKT deney matrisleri

Ortam Optimizasyonuna Ait MKT Deney Matrisi					İşletim Koşullarına Ait MKT Deney Matrisi			
Deney No	A: Substrat Miktarı (% MK)	B: İnokülüm Hacmi (ml)	C: Azot Kaynağı Miktarı (ml)	D: İnkübasyon Süresi (sa)	Deney No	A: Hava Akış Hızı (l/dk)	B: Sıcaklık (°C)	C: Dolgu Miktarı (g)
1	25	3.0	1.0	54	1	0.130	32.6	12
2	75	3.0	1.0	54	2	0.220	32.6	12
3	25	6.0	1.0	54	3	0.130	37.4	12
4	75	6.0	1.0	54	4	0.220	37.4	12
5	25	3.0	2.0	54	5	0.130	32.6	18
6	75	3.0	2.0	54	6	0.220	32.6	18
7	25	6.0	2.0	54	7	0.130	37.4	18
8	75	6.0	2.0	54	8	0.220	37.4	18
9	25	3.0	1.0	114	9	0.100	35.0	15
10	75	3.0	1.0	114	10	0.250	35.0	15
11	25	6.0	1.0	114	11	0.175	31.0	15
12	75	6.0	1.0	114	12	0.175	39.0	15
13	25	3.0	2.0	114	13	0.175	35.0	10
14	75	3.0	2.0	114	14	0.175	35.0	20
15	25	6.0	2.0	114	15	0.175	35.0	15
16	75	6.0	2.0	114	16	0.175	35.0	15
17	0	4.5	1.5	84	17	0.175	35.0	15
18	100	4.5	1.5	84	18	0.175	35.0	15
19	50	1.5	1.5	84	19	0.175	35.0	15
20	50	7.5	1.5	84	20	0.175	35.0	15
21	50	4.5	0.5	84				
22	50	4.5	2.5	84				
23	50	4.5	1.5	24				
24	50	4.5	1.5	144				
25	50	4.5	1.5	84				
26	50	4.5	1.5	84				
27	50	4.5	1.5	84				
28	50	4.5	1.5	84				
29	50	4.5	1.5	84				
30	50	4.5	1.5	84				

6.2.4. Enzim Ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonuna ilişkin basamaklar Şekil 6.8’de şematik olarak gösterilmiştir.

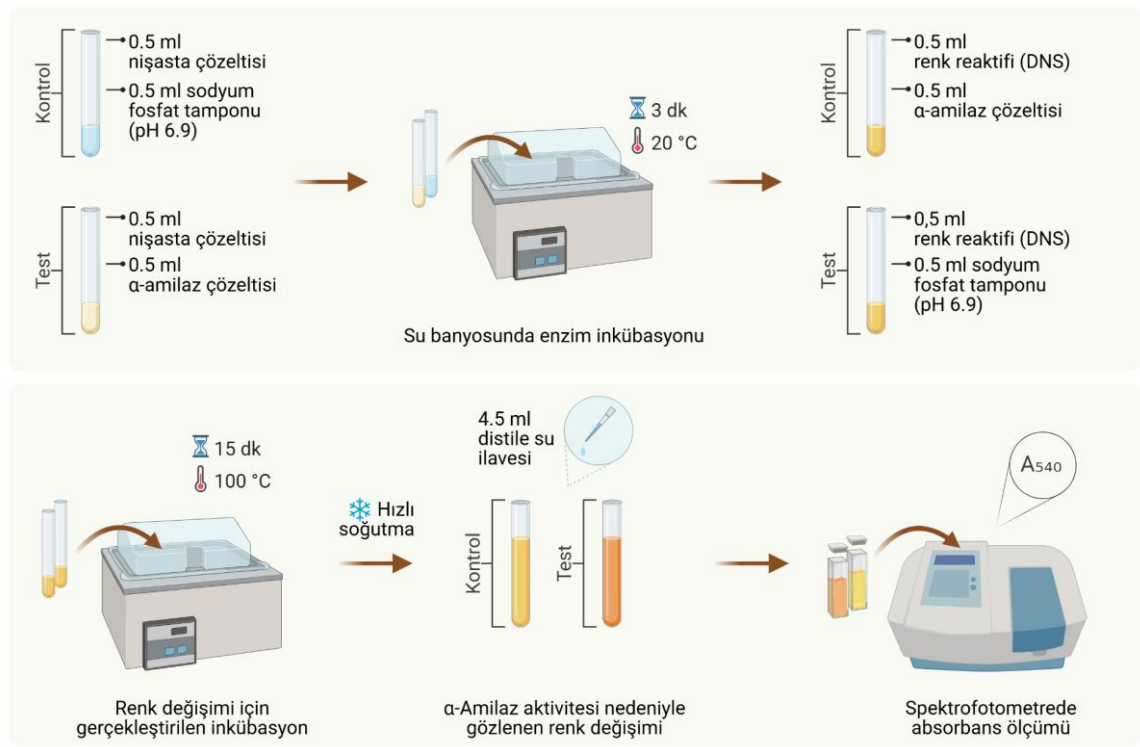


Şekil 6.8. Enzim ekstraksiyonuna ilişkin işlem basamaklarının şematik gösterimi [240].

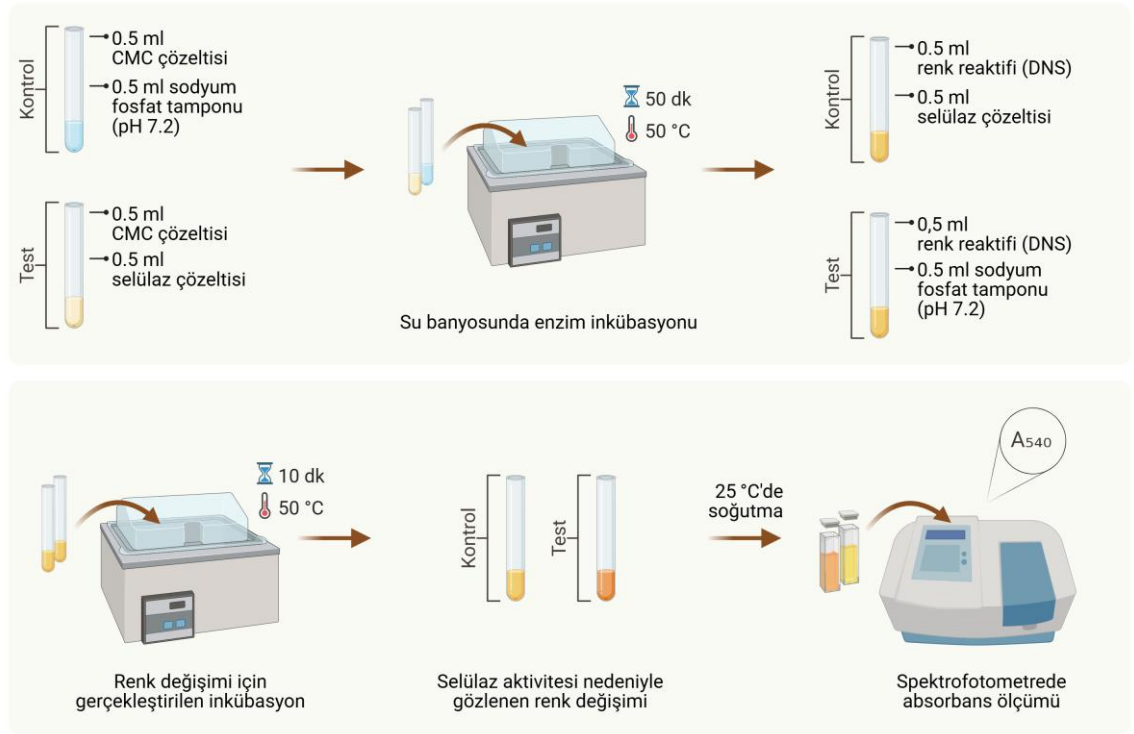
Deneysel tasarımla belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda, KHF örneklerine α -amilaz (pH 6.9) ve selüloz (pH 7.2) aktivite tayinlerinde kullanılan sodyum fosfat tampon çözeltileri eklenmiş ve ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, DKB’lerden alınan fermentasyon ortamları erlenlere aktarılmış ve aynı ekstraksiyon protokolü uygulanmıştır. Her ekstraksiyon işlemi için tampon çözeltisi miktarı, 1 g katı substrat başına 10 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen süpernatantlar, enzim aktivite tayininde ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

6.2.5. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivite tayinlerinde indirgen şeker miktarının belirlenmesi amacıyla 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır [241]. Bu yöntem, α -amilaz ve selüloz enzimlerinin sırasıyla nişasta ve karboksimetil selüloz (CMC) polimerlerini hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan maltoz ve glukoz birimlerinin renk reaktifi (DNS çözeltisi) ile tepkimeye girerek renk değişimi oluşturması prensibine dayanmaktadır. Çalışmada selüloz aktivitesi, CMC substratı üzerindeki CMCaz (endoglukanaz) etkisi üzerinden değerlendirilmiştir. Kullanılan analiz yöntemlerine ilişkin detaylar Şekil 6.9 ve 6.10’da verilmiştir.



Şekil 6.9. α -Amilaz aktivite tayininde kullanılan analiz yöntemi [242].



Şekil 6.10. Selüloz aktivite tayininde kullanılan analiz yöntemi [243].

Enzim çözeltileri, α -amilaz ve selüloz aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere sırasıyla 6.9 ve 7.2 pH'ya sahip olan sodyum fosfat tampon çözeltileriyle 10 kat seyreltilmiş; ölçümden kaynaklanan hataların minimize edilmesi amacıyla her deney seti 3 paralel şekilde çalışılmıştır. Kontrol ve test gruplarına ait absorbans değerleri, spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüş; her biri için kaydedilen absorbans (A) değerlerinin ortalaması alınmıştır. Bu ortalama değerler kullanılarak, Denklem 6.1 aracılığıyla ΔA_{540nm} Test değerleri hesaplanmıştır.

$$\Delta A_{540nm} Test = A_{540nm} Test - A_{540nm} Kontrol \quad (6.1)$$

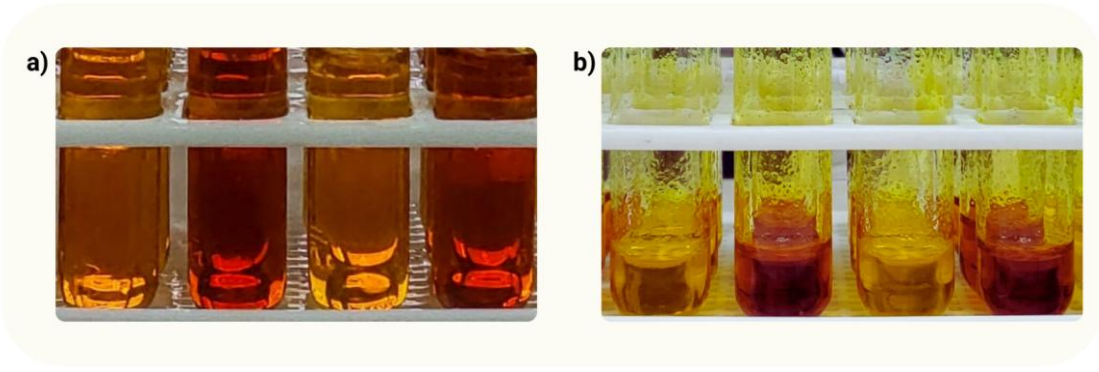
Her bir numune için hesaplanan ΔA_{540nm} test değeri, Ek-1 ve Ek-2'de verilen maltoz ve glukoz standart eğrilerinden elde edilen doğru denkleminde yerine yazılarak serbest bırakılan maltoz (mg) ve glukoz konsantrasyonları (μ mol) belirlenmiş; Denklem 6.2, Denklem 6.3 ve Denklem 6.4 kullanılarak maltoz ve glukoz konsantrasyonlardan enzim aktivitelerine (U/ml ve U/g) geçilmiştir [224, 242]. Bir ünite (U) α -amilaz aktivitesi, 20 °C ve 6.9 pH'da, 3 dakika içinde nişastadan 1 mg maltozu serbest bırakan enzim miktarı olarak; bir ünite (U) selüloz aktivitesi, standart deney koşulları altında dakikada 1 μ mol glukozu serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\alpha\text{-Amilaz Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\text{Maltoz Konsantrasyonu (mg)} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Enzim hacmi (ml)}} \quad (6.2)$$

$$\text{Selüloz Aktivitesi (U/ml)} = \frac{\text{Glukoz Konsantrasyonu (\mu mol)}}{\text{İnkübasyon Süresi (dk)} \times \text{Enzim hacmi (ml)}} \quad (6.3)$$

$$\text{Enzim aktivitesi (U/g)} = \text{Enzim aktivitesi (U/ml)} \times \frac{\text{Ekstraksiyon Hacmi (ml)}}{\text{Katı Substrat Miktarı (g)}} \quad (6.4)$$

Şekil 6.11'de, DNS reaktifi ile gerçekleşen renkli kompleks oluşumuna bağlı olarak α -amilaz (a) ve selüloz (b) örneklerinde gözlenen renk değişimleri sunulmuştur.



Şekil 6.11. α -amilaz (a) ve selüloz (b) örneklerinde gözlemlenen renk değişimleri

7. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez kapsamında yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar sistematik biçimde sunulmuş ve literatürde yer alan verilerle karşılaştırılarak tartışılmıştır. İlk olarak, kullanılan katı substratların temel bileşen analizine yer verilmiş; ardından, fermentasyon ortamının ve dolgu kolon biyoreaktör sistemi işletim koşullarının optimizasyonu kapsamında ulaşılan veriler değerlendirilmiştir.

7.1. Katı Substratların Temel Bileşen Analizi

Yapılan analizler sonucunda, mısır kepeğinin %32.98 ekstraktif madde, %26.75 selüloz, %33.56 hemiselüloz ve %6.71 lignin içerdiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, diğer çalışmalarda belirtilen değer aralıklarıyla örtüşmektedir [244, 245]. Literatürde mısır kepeğinin büyük oranda çözünmeyen diyet lifinden oluştuğu [246]; bunların yanı sıra; peptitler, amino asitler, büyüme faktörleri gibi azotlu bileşenler ve fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu [247, 248]; ayrıca potasyum, kalsiyum, sodyum gibi mineraller ile folat, riboflavin ve tiamin gibi B grubu vitaminleri de içerdiği bildirilmiştir [249]. Ayrıca, granüler yapısı sayesinde geniş yüzey alanı sağlayarak enzim-substrat etkileşimini artırdığı [223] ve bu özellikleri nedeniyle bakteriyel ve fungal suşlar kullanılarak yürütülen KHF süreçlerinde yaygın olarak tercih edildiği belirtilmiştir [250, 251].

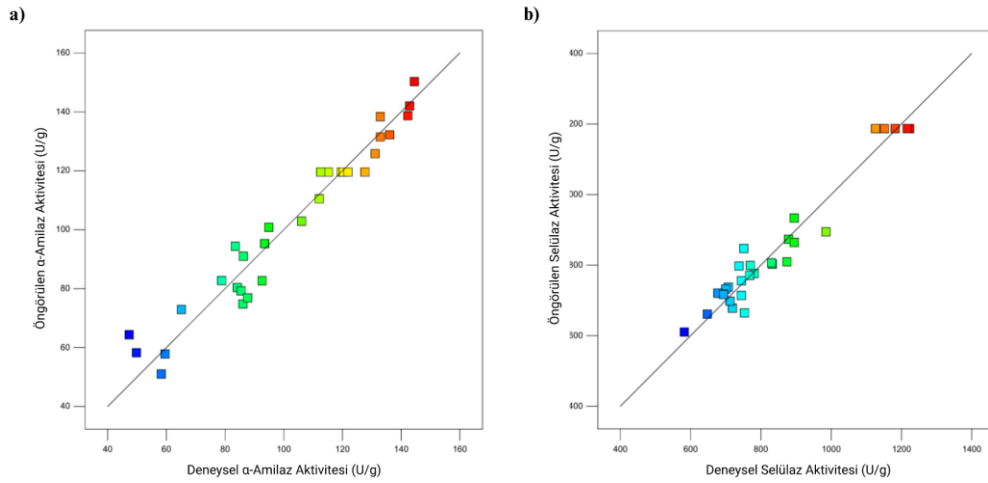
Yapılan analizler sonucunda, fındık küspesinin ise %27.04 ekstraktif madde, %36.65 selüloz, %28.42 hemiselüloz ve %7.89 lignin içerdiği saptanmıştır. Literatürde, fındık küspesine ilişkin lignoselülozik bileşim verilerinin sınırlı olduğu [252]; mevcut çalışmaların ise daha çok protein içeriği, amino asit profili ve biyoaktif peptit üretimi gibi besinsel ve fonksiyonel özelliklere odaklandığı bildirilmiştir [253-255]. Bununla birlikte, kabuk, zar ve küspe gibi fındık yan ürünlerinin; biyoaktif bileşikler, protein, diyet lifi, yağ asitleri, vitaminler, mineraller ve fitosteroller gibi besin bileşenleri açısından zengin olduğu rapor edilmiştir [252]. Ayrıca fındık küspesi ekstraktlarındaki fenolik bileşik içeriğinin, öğütülmüş fındık içlerine kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [256, 257]. Bu durumun, bu çalışmada elde edilen yüksek ekstraktif madde oranını açıklayabileceği düşünülmektedir.

7.2. Fermentasyon Ortamı Optimizasyonu

α -Amilaz ve selüloz üretimine ilişkin fermentasyon ortamı optimizasyonu deneylerinde elde edilen enzim aktivite değerleri ile model tarafından öngörülen değerler, karşılaştırmalı olarak Tablo 7.1’de sunulmuş; bu değerler arasındaki ilişkiye ait grafiksel gösterim ise Şekil 7.1’de verilmiştir.

Tablo 7.1. Ortam optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve model tarafından öngörülen enzim aktivite değerleri

Deney No	A:	B:	C: Azot	D:	Cevap Değişkeni 1		Cevap Değişkeni 2	
	Substrat	İnokülüm	Kaynağı	İnkübasyon	α -Amilaz Aktivitesi		Selüloz Aktivitesi	
	Miktarı	Hacmi	Miktarı	Süresi	(U/g)		(U/g)	
	(% MK)	(ml)	(ml)	(sa)	Gözlenen	Öngörülen	Gözlenen	Öngörülen
1	25	3.0	1.0	54	84.2	80.36	719.3	667.68
2	75	3.0	1.0	54	58.3	51.02	647.6	661.33
3	25	6.0	1.0	54	131.1	125.8	712.4	697.6
4	75	6.0	1.0	54	86.1	74.78	744.7	755.68
5	25	3.0	2.0	54	85.5	79.22	832.6	802.8
6	75	3.0	2.0	54	59.6	57.8	737.8	797.28
7	25	6.0	2.0	54	132.9	138.33	707.7	737.5
8	75	6.0	2.0	54	93.5	95.23	830.3	806.4
9	25	3.0	1.0	114	106.1	102.87	700	732.13
10	75	3.0	1.0	114	87.7	76.85	693.8	717.71
11	25	6.0	1.0	114	142.3	138.68	878.9	873.13
12	75	6.0	1.0	114	86.2	90.98	895.1	933.13
13	25	3.0	2.0	114	94.9	100.8	677.7	720.43
14	75	3.0	2.0	114	78.9	82.7	693.8	716.83
15	25	6.0	2.0	114	144.5	150.28	781.7	776.2
16	75	6.0	2.0	114	112.1	110.51	751.7	847.03
17	0	4.5	1.5	84	142.9	142.02	582.8	610.19
18	100	4.5	1.5	84	65.1	72.9	754	664.67
19	50	1.5	1.5	84	49.9	58.24	744.7	713.87
20	50	7.5	1.5	84	132.9	131.49	895.1	863.99
21	50	4.5	0.5	84	47.4	64.27	767.9	770.57
22	50	4.5	2.5	84	92.6	82.65	874.2	809.59
23	50	4.5	1.5	24	83.5	94.37	770.2	799.24
24	50	4.5	1.5	144	136.1	132.15	985.3	894.32
25	50	4.5	1.5	84	115.2	119.55	1151.8	1186.87
26	50	4.5	1.5	84	119.6	119.55	1221.2	1186.87
27	50	4.5	1.5	84	120.3	119.55	1126.3	1186.87
28	50	4.5	1.5	84	112.6	119.55	1223.5	1186.87
29	50	4.5	1.5	84	127.7	119.55	1216.5	1186.87
30	50	4.5	1.5	84	121.9	119.55	1181.9	1186.87



Şekil 7.1. Ortam optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve tahmin edilen enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması: a) α -amilaz, b) selüloz

MKT tarafından oluşturulan bu grafik, cevap değişkeninin deneysel ve model tarafından öngörülen değerleri arasındaki ilişkiyi göstermekte; veri noktalarının doğrusal uyum çizgisi etrafında kümelenmesi, modelin yüksek uyum ve tahmin gücüne sahip olduğunu ortaya koymaktadır [258]. Şekil 7.1’de sunulan grafik, ortam optimizasyonu kapsamında elde edilen ve model tarafından öngörülen enzim aktivite değerleri arasında kabul edilebilir düzeyde bir sapma olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, modellerin istatistiksel anlamlılığı varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklı model türlerine ait karşılaştırmalı analiz sonuçları α -amilaz ve selüloz için sırasıyla Tablo 7.2 ve Tablo 7.3’te, anlamlı bulunan modellere ilişkin ANOVA verileri ise Tablo 7.4 ve Tablo 7.5’te sunulmuştur.

Tablo 7.2. α -Amilaz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları

Model Türü	p -değeri Prob > F	Uyum Eksikliği p -değeri	Düzeltilmiş R^2	Tahmini R^2	Sonuç
Lineer	< 0.0001	0.0069	0.6936	0.6288	
2FI	0.8241	0.0044	0.6487	0.5804	
<u>Kuadratik</u>	<u>0.0001</u>	<u>0.0608</u>	<u>0.8934</u>	<u>0.7072</u>	<u>Önerilen</u>
Kübik	0.0802	0.1493	0.9490	0.0469	

Tablo 7.3. Selüloz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları

Model Türü	p -değeri Prob > F	Uyum Eksikliği p -değeri	Düzeltilmiş R^2	Tahmini R^2	Sonuç
Lineer	0.8498	0.0007	-0.1005	-0.1607	
2FI	0.9859	0.0003	-0.3810	-0.7623	
<u>Kuadratik</u>	<u>< 0.0001</u>	<u>0.1334</u>	<u>0.8992</u>	<u>0.7339</u>	<u>Önerilen</u>
Kübik	0.3631	0.0890	0.9140	-0.8652	

Tablo 7.4. α -Amilaz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	22935.27	14	1638.23	18.85	0.0001
A-Substrat Miktarı (% MK)	7165.67	1	7165.67	80.28	< 0.0001
B-İnokülüm Hacmi (ml)	8048.34	1	8048.34	90.17	< 0.0001
C-Azot Kaynağı Miktarı (ml)	506.92	1	506.92	5.68	0.0308
D-İnkübasyon Süresi (sa)	2141.37	1	2141.37	23.99	0.0002
AB	469.81	1	469.81	5.26	0.0366
AC	62.81	1	62.81	0.70	0.4147
AD	11.06	1	11.06	0.12	0.7298
BC	187.01	1	187.01	2.10	0.1683
BD	92.64	1	92.64	1.04	0.3245
CD	0.86	1	0.86	9.586E-003	0.9233
A ²	250.47	1	250.47	2.81	0.1146
B²	1044.81	1	1044.81	11.71	0.0038
C²	3641.24	1	3641.24	40.79	< 0.0001
D ²	67.77	1	67.77	0.76	0.3973
Artık (Kalıntı)	1338.88	15	89.26		
Uyum Eksikliği	1199.14	10	119.91	4.29	0.0608
Saf Hata	139.73	5	27.95		
Düzeltilmiş Toplam	24274.15	29			
Ortalama	101.72				
R ²	0.945				
Düzeltilmiş R ²	0.893				
Tahmini R ²	0.707				
Standart Sapma	9.45				
Varyasyon Katsayısı (CV) %	9.29				
Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler	7108.28				
Toplamı (PRESS)					
Yeterli Kesinlik	14.86				

A substrat miktarı (% MK), B inokülüm hacmi (ml), C azot kaynağı (ml) ve D inkübasyon süresi (sa) olmak üzere α -amilaz aktivitesi (U/g) için ANOVA analizi sonucunda önerilen model denklemi kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden sırasıyla Denklem 7.1 ve Denklem 7.2’de verilmiştir.

a-Amilaz Aktivitesi (U/ml)

$$\begin{aligned} &= 119.55 - 17.28A + 18.31B + 4.6C + 9.45D - 5.42AB \\ &+ 1.98AC + 0.83AD + 3.42BC - 2.41BD - 0.23CD \\ &- 3.02A^2 - 6.17B^2 - 11.52C^2 - 1.57D^2 \end{aligned} \quad (7.1)$$

a-Amilaz Aktivitesi (U/ml)

$$\begin{aligned} &= -132.076 + 0.11173A + 41.775B + 120.312C \\ &+ 0.817D - 0.145AB + 0.159AC + 1.108 \times 10^3 AD \\ &+ 4.558BC - 0.053BD - 0.015CD - 4.835 \times 10^3 A^2 \\ &- 2.743B^2 - 46.087C^2 - 1.747 \times 10^4 D^2 \end{aligned} \quad (7.2)$$

Tablo 7.5. Selülaz üretimi için ortam optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	9.997E+005	14	71409.65	19.48	<0.0001
A-Substrat Miktarı (% MK)	4452.65	1	4452.65	1.21	0.2877
B-İnokülüm Hacmi (ml)	33802.52	1	33802.52	9.22	0.0083
C-Azot Kaynağı Miktarı (ml)	2283.45	1	2283.45	0.62	0.4422
D-İnkübasyon Süresi (sa)	13561.26	1	13561.26	3.70	0.0736
AB	5539.08	1	5539.08	1.51	0.2379
AC	117.18	1	117.18	0.032	0.8605
AD	3.71	1	3.71	1.011E-003	0.9751
BC	7263.30	1	7263.3	1.98	0.1796
BD	14659.16	1	14659.16	4.00	0.0640
CD	18721.08	1	18721.08	5.11	0.0391
A²	5.175E+005	1	5.175E+005	141.20	< 0.0001
B²	2.715E+005	1	2.715E+005	74.07	< 0.0001
C²	2.699E+005	1	2.699E+005	73.64	< 0.0001
D²	1.983E+005	1	1.983E+005	54.10	< 0.0001
Artık (Kalıntı)	54975.77	15	3665.05		
Uyum Eksikliği	46654.2	10	4665.42	2.80	0.1334
Saf Hata	8321.57	5	1664.31		
Düzeltilmiş Toplam	1.055E+006	29			
Ortalama	850.02				
R ²	0.948				
Düzeltilmiş R ²	0.899				
Tahmini R ²	0.734				
Standart Sapma	60.54				
Varyasyon Katsayısı (CV) %	7.12				
Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler	2.807E+005				
Toplamı (PRESS)					
Yeterli Kesinlik	13.47				

A substrat miktarı (% MK), B inokülüm hacmi (ml), C azot kaynağı (ml) ve D inkübasyon süresi (sa) olmak üzere selülaz aktivitesi (U/g) için ANOVA analizi sonucunda önerilen model denklemi kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden sırasıyla Denklem 7.3 ve Denklem 7.4'te verilmiştir.

Selülaz Aktivitesi (U/ml)

$$\begin{aligned}
&= 1186.87 + 13.62A + 37.53B + 9.75C + 23.77D \\
&+ 18.61AB + 2.71AC + 0.48AD - 21.31BC + 30.27BD \\
&- 34.21CD - 137.36A^2 - 99.48B^2 - 99.2C^2 - 85.02D^2
\end{aligned} \tag{7.3}$$

Selülaz Aktivitesi (U/ml)

$$\begin{aligned}
&= -2147.185 + 19.911A + 384.259B + 1518.438C \\
&+ 17.025D + 0.496AB + 0.217AC + 6.417 \times 10^4 AD \\
&- 28.408BC + 0.673BD - 2.28CD - 0.22A^2 - 44.215B^2 \\
&- 396.788C^2 - 0.094D^2
\end{aligned} \tag{7.4}$$

Ortam optimizasyonu modellerine ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçlarında, kuadratik modellerin F testine ait p -değerleri α -amilaz için 0.0001, selüloz için ise <0.0001 olarak hesaplanmıştır. Her iki değer de 0.05 anlamlılık düzeyinin altında olması, kurulan modellerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

α -Amilaz ve selüloz için determinasyon katsayıları (R^2) sırasıyla 0.9448 ve 0.9479 olarak hesaplanmış olup bu değerler modellerin cevap değişkenlerindeki varyasyonun sırasıyla %94.48 ve %94.79'unu açıklayabildiği anlamına gelmektedir. R^2 değerinin 1'e yaklaşması, modelin hem veriyle uyumunun hem de tahmin gücünün yüksek olduğunu göstermektedir [259].

Modelde kullanılan terim sayısı ve örneklem büyüklüğü dikkate alınarak oluşturulan düzeltilmiş R^2 değerinin; çok sayıda terim bulunması ve örneklem büyüklüğünün yeterince kapsayıcı olmaması durumunda R^2 değerinden belirgin şekilde düşük olabileceği bildirilmiştir [258]. α -Amilaz ve selüloz için hesaplanan düzeltilmiş R^2 değerleri sırasıyla 0.8934 ve 0.8992'dir ve elde edilen R^2 değerleriyle aralarındaki kabul edilebilir düzeydeki farklar, kurulan modellerin kapsayıcılığını desteklemektedir.

Tahmini R^2 değerleri ise model tarafından öngörülen ve deneysel olarak elde edilen değerler arasındaki uyumu ortaya koymaktadır [260]. Biyoteknolojik süreçlerde hata ve varyasyon oranlarının görece yüksek olduğu dikkate alındığında, α -amilaz ve selüloz için sırasıyla 0.7072 ve 0.7339 olarak belirlenen tahmini R^2 değerlerinin yeterli olduğu söylenebilmektedir [206].

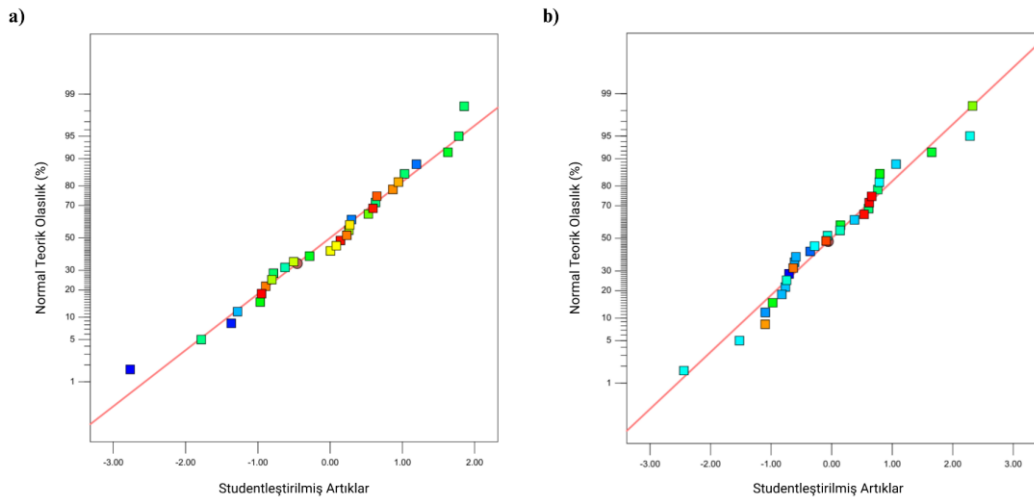
Kuadratik modellerin uyum eksikliği p -değerleri, α -amilaz ve selüloz için sırasıyla 0.0608 ve 0.1334 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler 0.05'ten büyük olduğu için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. α -Amilaz için elde edilen p -değeri, yaygın olarak kabul gören anlamlılık değeri olan 0.1'in altında kalmakta ve sınır değeri olan 0.05 düzeyine yakın bir değerde bulunmaktadır. Ancak model terimlerinin istatistiksel olarak anlamlı olması ve tanısal grafiklerde ciddi bir sapma gözlenmemesi durumunda, p -değerinin 0.1'in altında kalmasının modelin geçerliliğini olumsuz yönde etkilemeyeceği bildirilmiştir [261]. Nitekim KHF yöntemiyle yürütülen enzim üretimi çalışmalarında 0.05–0.1 arasında olan p -değerlerinin model geçerliliği açısından kabul edilebilir olduğu örneklere rastlanmaktadır [262]. Selüloz için elde edilen uyum eksikliği F-değeri 2.80 ve buna karşılık gelen p -değeri 0.1334 olup bu değerler, modelin istatistiksel açıdan geçerli olduğunu desteklemektedir.

α -Amilaz ve selüloz için hesaplanan ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla 101.72 ± 9.45 ve 850.02 ± 60.54 olup, varyasyon katsayıları (CV) %9.29 ve %7.12 olarak belirlenmiştir. Varyasyon katsayısı (CV, %), standart sapmanın ortalamaya oranının yüzdelik olarak ifade edilmesiyle elde edilen ve modelin tekrarlanabilirliğini ifade eden bir terimdir. Kurulan modellerde CV değerinin %10'un altında kalması, modelin yeterli tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir [263]. Literatürde α -amilaz ve selüloz enzimlerinin ortam

optimizasyonuna yönelik yürütülen bazı çalışmalarda ise CV değerleri sırasıyla %9.15 ve %9.51 olarak bildirilmiş olup ilgili veriler, bu çalışmada elde edilen değerleri desteklemektedir [264, 265].

İstatistiksel analizlerin temel amacı, deneysel faktörlerin gürültüye kıyasla anlamlı sinyaller oluşturup oluşturmadığını belirlemektir [260]. Modelin sinyal-gürültü oranını gösteren yeterli kesinlik (adequate precision) değerleri, α -amilaz için 14.86 ve selülaz için 13.47 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin, minimum kabul edilebilir eşik olan 4'ü önemli ölçüde aşması, modelin tasarım aralığı içerisinde güvenilir tahminlerde bulunabildiğini ve istatistiksel açıdan anlamlı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır [223].

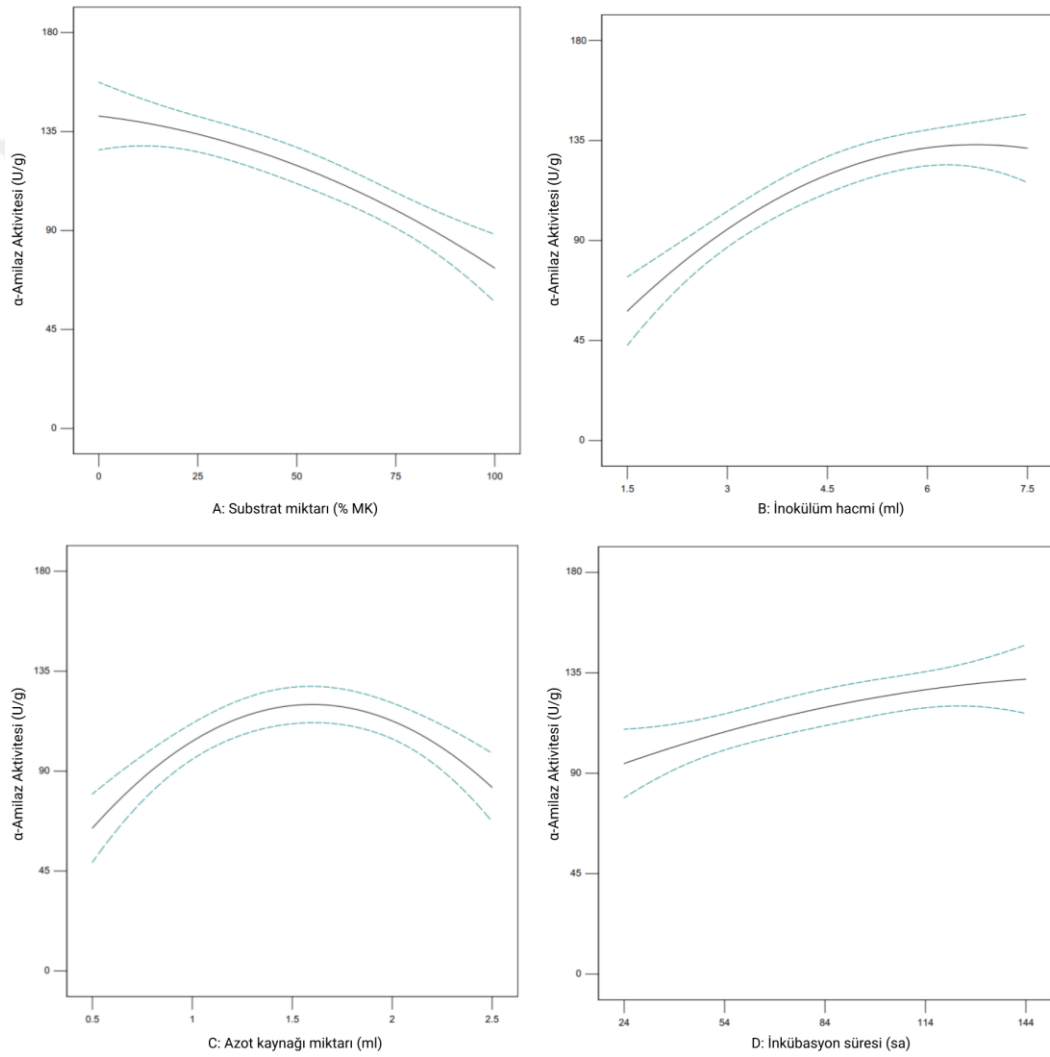
Model yeterliliğinin değerlendirilmesi, oluşturulan modelin geçerli, güvenilir ve istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek açısından kritik öneme sahiptir. Bu kapsamda gerçekleştirilen artık (kalıntı) analizi, modelin hata terimlerinin rastgele dağılıp dağılmadığını incelemeyi amaçlamaktadır. Studentleştirilmiş artıklar, her bir gözlem için hesaplanan artık değerlerin, ilgili tahmine ait standart hataya oranlanmasıyla elde edilmekte olup istatistiksel olarak anlamlı sapma gösteren gözlemlerin belirlenmesinde kullanılan bir ölçüttür. Artıkların normal dağılıma uygunluğunu değerlendirmek amacıyla kullanılan normal olasılık grafiğinde, noktaların doğrusal eksen boyunca hizalanması; normal dağılım varsayımının sağlandığını ve cevap değişkenine herhangi bir dönüşüm uygulanmasına gerek olmadığını göstermektedir [266]. Şekil 7.2'de, ortam optimizasyonu çalışmalarına ilişkin modelin yeterliliğini değerlendirmek amacıyla oluşturulan studentleştirilmiş artıkların normal dağılım grafiği sunulmuştur. Noktaların genel olarak doğrusal eksen boyunca hizalanması, artıkların normal dağılım varsayımını büyük ölçüde karşıladığını göstermektedir. Uç bölgelerde gözlenen sınırlı sapmalar ise, biyolojik sistemlere özgü doğal varyasyonlar kapsamında değerlendirildiğinde tolere edilebilir düzeydedir [267].



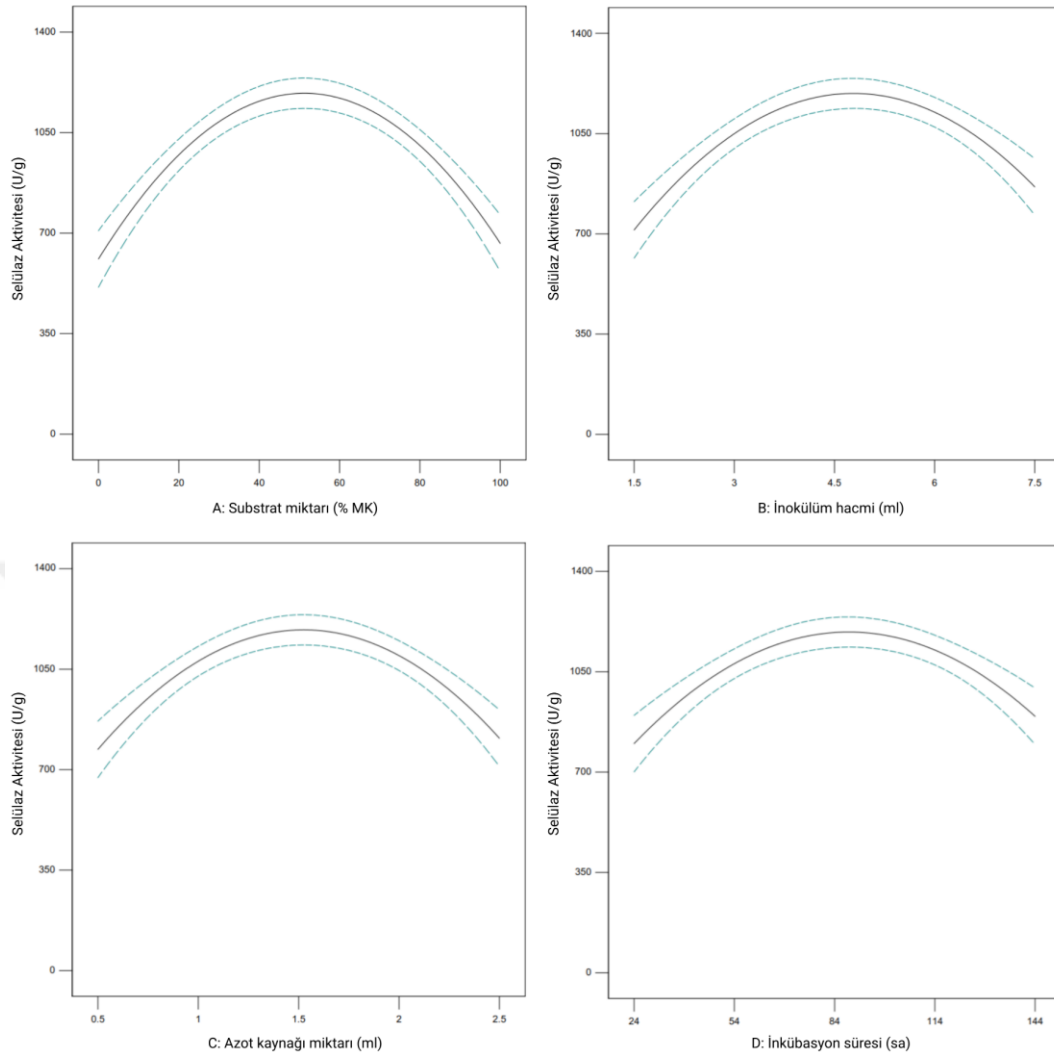
Şekil 7.2. Ortam optimizasyonuna ilişkin studentleştirilmiş artıkların dağılımı: a) α -amilaz, b) selülaz

F-testine ilişkin p -değerinin 0.05'in altında olması, ilgili model teriminin cevap üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir [267]. Bu kapsamda, α -amilaz üretimi üzerinde anlamlı etkisi bulunan model terimleri A, B, C, D, AB, B² ve C²; selülaz üretimi üzerinde ise B, CD, A², B², C² ve D² olarak belirlenmiştir.

Ortam optimizasyonu için seçilen faktörlerin α -amilaz ve selülaz üretimi üzerindeki etkilerini gösteren tek faktör grafikleri sırasıyla Şekil 7.3 ve Şekil 7.4'te sunulmuştur.



Şekil 7.3. α -Amilaz ortam optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: substrat miktarı (a), inokülüm hacmi (b), azot kaynağı miktarı (c) ve inkübasyon süresinin (d) α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 7.4. Selülag ortam optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: substrat miktarı (a), inokulum hacmi (b), azot kaynağı miktarı (c) ve inkübasyon süresinin (d) selülag aktivitesi üzerine etkisi

Mısır kepeği baz alınarak tanımlanan substrat miktarına ilişkin tek faktör grafiğinde, α -amilaz aktivitesinin sadece fındık küspesi içeren ortamda en yüksek değerine ulaştığı, buna karşın mısır kepeği miktarı arttıkça aktivitenin düştüğü görülmektedir (Şekil 7.3a). Mısır kepeği miktarındaki artışın α -amilaz üretimi üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğu düşünülmektedir. Farklı substratların aynı enzim üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, benzer şekilde negatif bir etki gözlenmiş ve bu durum lignoselülozik yapıya sahip substratlarda yer alan yüksek orandaki selüloz ve hemiselüloz içeriğinin enzim üretimi üzerinde sınırlayıcı etkiye sahip olabildiği şeklinde açıklanmıştır [227, 268]. Bir diğer substrat miktarına ilişkin tek faktör grafiğinde ise selülag aktivitesinin mısır kepeği ve fındık küspesini hemen hemen aynı miktarda içeren ortamda en yüksek değerine ulaştığı gözlenmektedir (Şekil 7.4a). Bu durum, birlikte kullanılan mısır kepeği ve fındık küspesinin selülag üretimi için son derece iyi bir katı substrat karışımı olduğunu ortaya

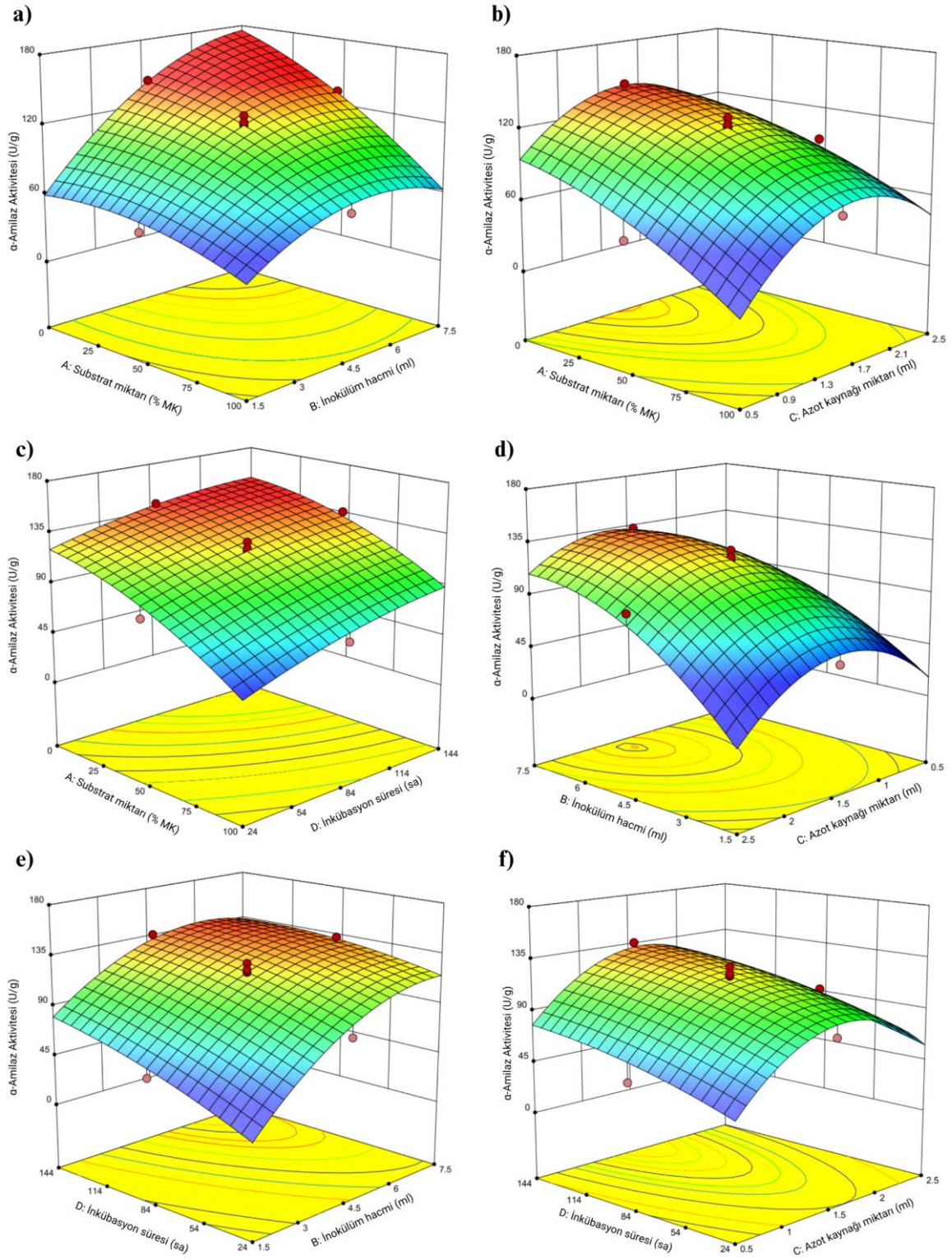
koymaktadır. Benzer bir eğilim, *B. subtilis* kullanılarak gerçekleştirilen ve mısır kepeği ile badem kabuğu içeren başka bir çalışmada da rapor edilmiştir; söz konusu çalışmada, her iki substratın birbirlerine yakın miktarlarda kullanıldığı koşullarda verimin arttığı belirtilmiştir. Substrat bileşimleri farklı olmakla birlikte, iki çalışmada da gözlemlenen bu eğilim, karbon kaynakları arasında sağlanan dengenin selüloz sentezi üzerinde belirleyici bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [223].

İnokülüm hacmine ilişkin tek faktör grafiklerinde, α -amilaz ve selüloz aktivitelerinin sırasıyla yaklaşık olarak 6 ml ve 5 ml'ye kadar arttığı, sonrasında ise azaldığı görülmektedir (Şekil 7.3b ve Şekil 7.4b). Bu durum, literatürde, düşük inokülüm hacimlerinde mikroorganizmaların substratı kullanıp enzim üretebilecek yeterli sayıya ulaşmalarının daha uzun zaman aldığı; yüksek inokülüm hacimlerinde ise artan biyokütlenin substratı daha hızlı tüketmesi ve böylece metabolik aktivitenin zayıflaması şeklinde açıklanmıştır [222, 269]. Optimum düzeyde enzim sentezi, biyokütle artışı ile besin maddesi yeterliliği arasındaki dengenin korunmasıyla mümkün olmaktadır [270].

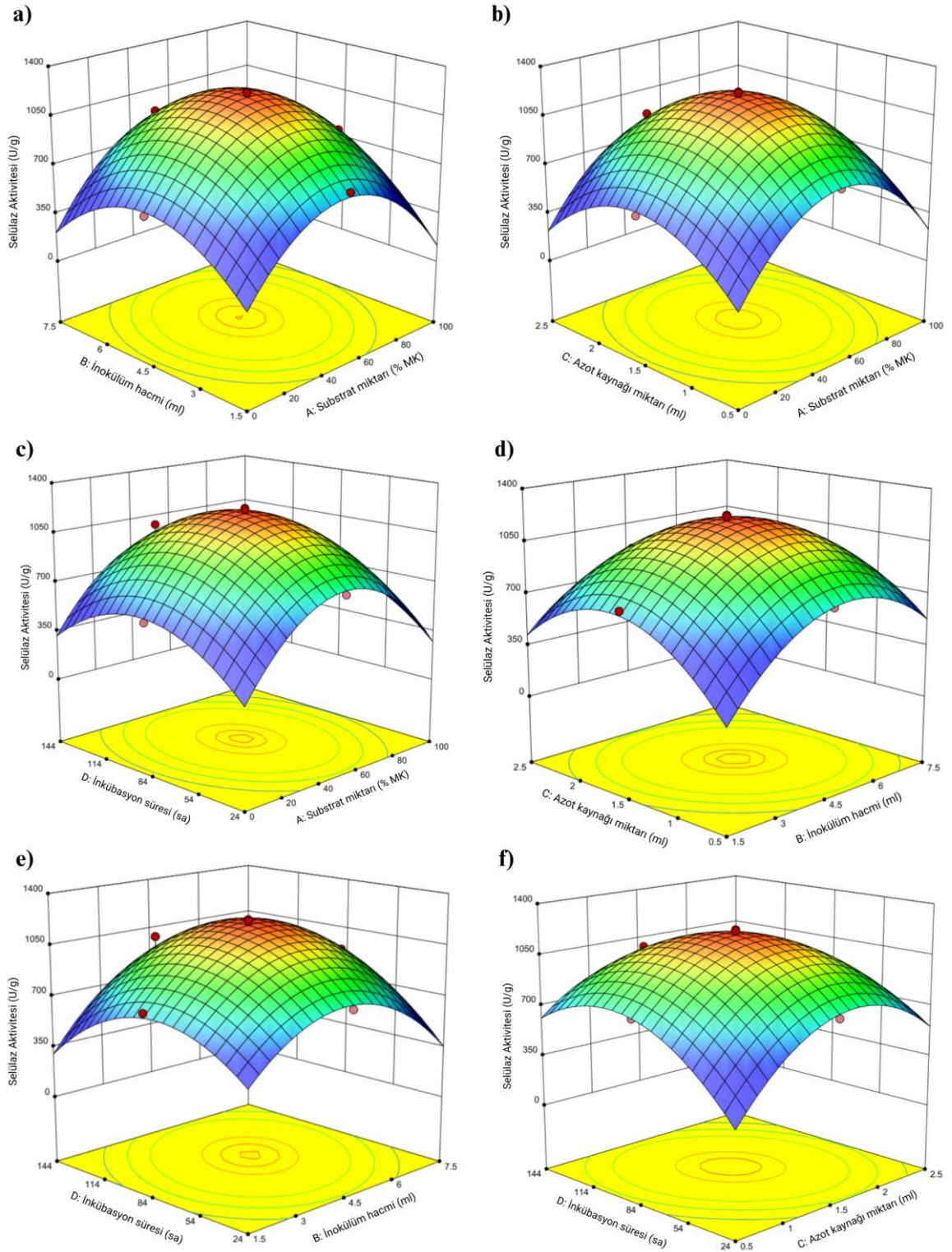
Azot kaynağı miktarına ilişkin tek faktör grafiklerinde, α -amilaz ve selüloz aktivitelerinin her ikisinin de yaklaşık olarak 0.5–1.5 ml aralığında artış gösterdiği, bu noktadan itibaren ise azaldığı gözlenmektedir (Şekil 7.3c ve Şekil 7.4c). Bu durum, azot kaynağının belirli bir düzeye kadar enzim üretimini desteklediğini; ancak yüksek konsantrasyonlarda baskılayıcı etki gösterdiği şeklinde açıklanabilir. Literatürde, optimum değerin üzerinde kullanılan azot kaynaklarının mikrobiyal enzim üretimini sınırlayabildiği bildirilmiştir [265]. Azot kaynağı miktarına bağlı olarak enzim aktivitelerinin önce artması, ardından düşmesi, bu faktörün α -amilaz ve selüloz üretimi üzerinde kuadratik etki oluşturduğunu göstermektedir.

İnkübasyon süresine ilişkin tek faktör grafiklerinde, selüloz aktivitesinin yaklaşık 90. saate kadar artıp sonrasında azaldığı; α -amilaz aktivitesinin ise inkübasyon süresi uzadıkça artmaya devam ettiği görülmektedir (Şekil 7.3d ve Şekil 7.4d). Literatürde, KHF yöntemiyle yürütülen enzim üretimi çalışmalarında uzun inkübasyon sürelerine rastlanmaktadır. Örneğin bir çalışmada α -amilaz üretiminin 5 gün boyunca artarak devam ettiği, bu süreden sonra ise üretim hızının azaldığı bildirilmiştir. Aktivite kaybının ise termal bozulma, besin tükenmesi ve proteaz kaynaklı yıkımla ilişkili olabileceği ifade edilmiştir [229]. Bir diğer çalışmada ise maksimum selüloz aktivitesine 5 günlük inkübasyon süresi sonunda ulaşıldığı rapor edilmiştir [222]. Bu durum, *Bacillus* türlerinde α -amilaz ve selüloz üretiminin uzun süreli fermentasyon koşullarında maksimum düzeye ulaşabileceğini ve optimum sürenin kullanılan suş ve ortam koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Design Expert 10 programı kullanılarak oluşturulan cevap yüzeyi grafikleri, α -amilaz ve selüloz için sırasıyla Şekil 7.5 ve Şekil 7.6'da sunulmuştur.



Şekil 7.5. α -Amilaz ortam optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b), AD (c), BC (d) BD (e) ve CD (f) ikili etkileşimlerinin α -amilaz aktivitesi üzerindeki etkileri



Şekil 7.6. Selülaaz ortam optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b), AD (c), BC (d) BD (e) ve CD (f) ikili etkileşimlerinin selülaaz aktivitesi üzerindeki etkileri

Şekil 7.5a’da, mısır kepeği baz alınarak tanımlanan substrat miktarı (A) ile inokülüm hacminin (B) α -amilaz aktivitesi üzerindeki birleşik etkisine yer verilmekte olup bu etkileşim model tarafından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Mısır kepeği miktarındaki artışa bağlı olarak enzim aktivitesinin azalması, fındık küspesinin α -amilaz sentezi açısından daha uygun bir besin bileşimine sahip olduğunu göstermektedir. İnokülüm hacminin orta düzeyde (yaklaşık 4.5–5 ml) tutulduğu koşullarda aktivitenin genel olarak arttığı; ancak fındık küspesinin baskın olduğu substrat kombinasyonlarında, yüksek α -amilaz aktivitesine ulaşılabilmesi için inokülüm hacminin artırılması gerektiği görülmektedir. Şekil 7.6a’da ise en yüksek selüloz aktivitesine, mısır kepeği ve fındık küspesinin eşit oranlarda bulunduğu ve inokülüm hacminin yaklaşık 4.5 ml’de tutulduğu koşullarda ulaşılmıştır. Grafik yüzeyinde gözlenen simetrik yapı hem substrat oranı hem de inokülüm hacmi açısından belirli bir optimum aralığın varlığını ortaya koymakta; bu sınırların aşılması durumunda ise enzim aktivitesinde düşüş yaşandığını göstermektedir. α -Amilaz ve selüloz üretiminin maksimum düzeylere farklı substrat bileşimleriyle ulaşması, her enzimin farklı metabolik yollarla sentezlendiğini ve buna bağlı olarak farklı ortam koşullarına gereksinim duyduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim substrat karışımlarının eş zamanlı enzim üretimi üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, substrat optimizasyonunun her bir enzime özgü olarak tasarlanması gerektiği vurgulanmıştır [231].

Substrat (A) ve azot kaynağı (C) miktarının α -amilaz aktivitesi üzerindeki birleşik etkisini gösteren Şekil 7.5b’de, mısır kepeği ve azot kaynağının her ikisinin de yüksek düzeyde bulunması, enzim aktivitesinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Buna karşılık, fındık küspesi ve azot kaynağının birlikte artması durumunda gözlenen aktivite kaybı görece daha sınırlıdır. Şekil 7.6b’de ise mısır kepeği ve fındık küspesinin hemen hemen aynı miktarlarda bulunduğu ve azot kaynağının yaklaşık 1.5 ml’de tutulduğu koşullarda selüloz aktivitesinin maksimum değere ulaştığı görülmektedir. Bu durum, iki substratın karbon kaynakları açısından birbirini tamamlayıcı özellik göstermesinin yanı sıra, azot düzeyinin dengeli olmasıyla açıklanabilir. Yukarıda bahsi geçen çalışmada, iki lignoselülozik bileşenin farklı oranlarda karıştırılmasıyla pektinaz ve selüloz üretiminin anlamlı şekilde değiştiği ve bu değişimin, özellikle selüloz, hemiselüloz ve lignin içeriklerindeki farklılıklara bağlı olarak gerçekleştiği ve optimum enzim üretimi için substratların kimyasal yapısının belirleyici rol oynadığı belirtilmiştir [231].

Şekil 7.5c ve Şekil 7.6c’de substrat miktarı (A) ve inkübasyon süresinin (D) sırasıyla α -amilaz ve selüloz aktivitesi üzerindeki birleşik etkisine yer verilmektedir. α -Amilaz aktivitesi, fındık küspesi miktarının ve inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte artma eğilimi gösterirken; selüloz aktivitesi ise her iki parametrenin orta düzeyde tutulduğu koşullarda maksimum seviyeye ulaşmıştır.

İnokülüm hacmi (B) ile azot kaynağı miktarının (C) enzim aktiviteleri üzerindeki birleşik etkilerine yer verilen grafikler incelendiğinde, her iki enzim için de azot kaynağı miktarının

yaklaşık 1.5 ml olduğu koşullarda maksimum aktivite elde edildiği görülmektedir (Şekil 7.5d ve Şekil 7.6d). Ancak inokülüm hacmine ilişkin optimum değerler enzime göre farklılık göstermektedir: α -amilaz üretimi için en yüksek aktivite 7.5 ml inokülüm hacminde elde edilirken; selüloz için bu değer yaklaşık 4.5 ml'dir. Bu durum, inokülüm hacminin gerek mikrobiyal büyüme dinamikleri gerekse ortam nemi üzerindeki etkileriyle bağlantılı olabilir. Literatürde de belirtildiği üzere, yüksek inokülüm hacmi ortamın nem içeriğini artırarak mikrobiyal gelişmeyi ve enzim üretimini olumsuz yönde etkileyebilirken; düşük inokülüm hacmi ise fermentasyonun başlaması için gerekli hücre yoğunluğuna ulaşılmasını geciktirebilmektedir [269, 271].

Inokülüm hacmi (B) ve inkübasyon süresi (D) değişkenlerinin enzim aktiviteleri üzerindeki birleşik etkileri karşılaştırıldığında, α -amilaz ve selüloz üretimi açısından farklı eğilimler gözlenmiştir (Şekil 7.5e ve Şekil 7.6e). α -Amilaz aktivitesi, inokülüm hacminin yüksek, inkübasyon süresinin uzun (yaklaşık 144 saat) olduğu koşullarda maksimum seviyeye ulaşmıştır. Buna karşılık, selüloz aktivitesinde en yüksek değer, inokülüm hacminin orta düzeyde ve inkübasyon süresinin yine uzun ancak daha sınırlı bir aralıkta (yaklaşık 84–104 saat) tutulduğu koşullarda elde edilmiştir.

Azot kaynağı miktarı (C) ile inkübasyon süresi (D) arasındaki etkileşimin α -amilaz üretimi üzerindeki etkisini gösteren Şekil 7.5f'te, azot kaynağının yaklaşık 1.5 ml ve inkübasyon süresinin yüksek olduğu koşullarda enzim aktivitesinin arttığı; bu değerlerin dışına çıkıldığında ise aktivitenin azaldığı gözlenmektedir. Selüloz üretimine ilişkin aynı etkileşimi gösteren Şekil 7.6f'te ise model tarafından istatistiksel olarak anlamlı bir etki belirlenmiştir ($p < 0.05$). Grafik yüzeyindeki belirgin parabolik yapı, her iki faktörün de ikinci dereceden etkili olduğunu ve optimum aralıkların dışına çıkıldığında üretim düzeyinde kayda değer bir düşüş yaşandığını ortaya koymaktadır. Bu sonuç, üretim verimliliğinin yalnızca tekil parametrelere değil, bu faktörlerin birlikte oluşturduğu dengeye bağlı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, enzim üretiminde maksimum verimin elde edilebilmesi için yalnızca bireysel parametrelerin değil, parametreler arası etkileşimlerin de dikkate alınması gerekmektedir.

α -Amilaz ve selüloz üretimi için gerçekleştirilen ortam optimizasyonu deneyleri sonucunda, her iki enzim için farklı optimum koşullar belirlenmiştir. α -Amilaz üretimi için optimum koşullar; %25 oranında mısır kepeği, %75 oranında fındık küspesi, 6.0 ml inokülüm hacmi, 1.6 ml azot kaynağı miktarı ve 114 saatlik inkübasyon süresi olarak tanımlanmış; bu noktada model tarafından 156.73 U/g'lik maksimum α -amilaz aktivitesi öngörülmüştür. Aynı koşullarda gerçekleştirilen doğrulama deneylerinden elde edilen aktivite değeri 120.3 U/g olmuş ve bu sonuç, model tahminine yaklaşık %76.75 oranında bir yakınlık göstermiştir. Benzer şekilde, selüloz üretimi için en uygun koşullar %52 oranında mısır kepeği, %48 oranında fındık küspesi, 4.8 ml inokülüm hacmi, 1.5 ml azot kaynağı ve 90 saat inkübasyon süresi olduğu belirlenmiş; model bu koşullarda maksimum 1193.61 U/g selüloz aktivitesi öngörmüştür. Doğrulama deneylerinden ise

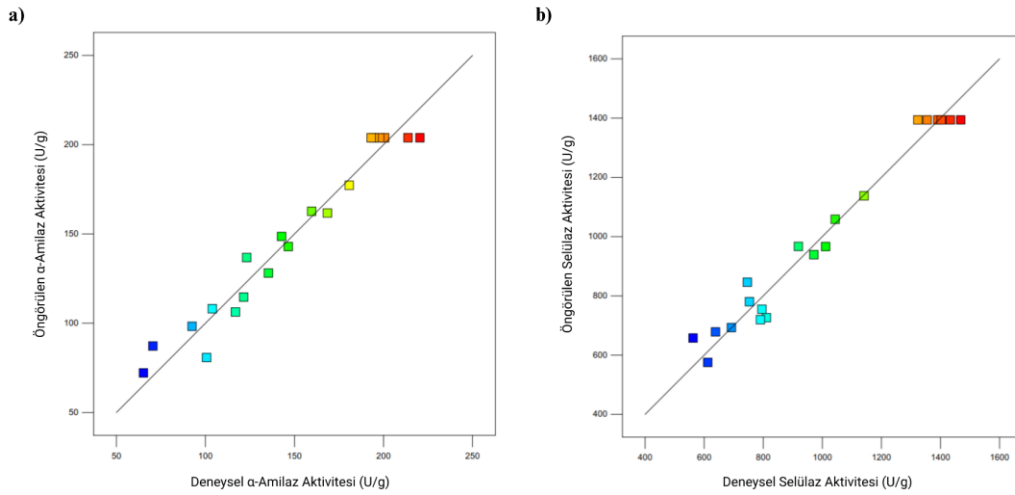
1138.4 U/g'lık bir aktivite elde edilmiş ve bu değer, model öngörüsünün %95.37'sine karşılık gelmiştir. Elde edilen sonuçlar, optimizasyon modelinin özellikle selüloz üretimi açısından yüksek doğrulukla çalıştığını, α -amilaz için ise genel eğilimi başarıyla yansıtmakla birlikte bazı sapmalar olabileceğini göstermektedir.

7.3. Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sistemi İşletim Koşullarının Optimizasyonu

α -Amilaz ve selüloz üretimine ilişkin biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu deneylerinde elde edilen enzim aktivite değerleri ile model tarafından öngörülen değerler, karşılaştırmalı olarak Tablo 7.6'da sunulmuş; bu değerler arasındaki ilişkiye ait grafiksel gösterim ise Şekil 7.7'de verilmiştir.

Tablo 7.6. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve model tarafından öngörülen enzim aktivite değerleri

Deney No	A: Hava Akış Hızı (l/dk)	B: Sıcaklık (°C)	C: Dolgu Miktarı (g)	Cevap Değişkeni 1 α -Amilaz Aktivitesi (U/g)		Cevap Değişkeni 2 Selüloz Aktivitesi (U/g)	
				Gözlenen	Öngörülen	Gözlenen	Öngörülen
1	0.130	32.6	12	123.2	136.81	753.5	780.27
2	0.220	32.6	12	65.2	72.18	692.3	692.73
3	0.130	37.4	12	168.5	161.72	1141.2	1137.63
4	0.220	37.4	12	92.5	98.25	810.9	726.49
5	0.130	32.6	18	103.9	108.11	638.3	678.36
6	0.220	32.6	18	70.5	87.24	795.6	754.82
7	0.130	37.4	18	159.7	162.68	1011.5	966.73
8	0.220	37.4	18	146.6	142.96	790.7	719.58
9	0.100	35.0	18	180.8	177.27	971.5	939.12
10	0.250	35.0	15	116.9	106.34	562.6	657.69
11	0.175	31.0	15	100.7	80.80	612.4	575.27
12	0.175	39.0	15	142.8	148.61	746.3	856.14
13	0.175	35.0	10	121.5	114.67	1043.8	1058.56
14	0.175	35.0	20	135.4	128.14	919.1	967.05
15	0.175	35.0	15	200.7	203.85	1468.6	1393.91
16	0.175	35.0	15	213.8	203.85	1433.6	1393.91
17	0.175	35.0	15	220.5	203.85	1390.8	1393.91
18	0.175	35.0	15	197.9	203.85	1402.4	1393.91
19	0.175	35.0	15	194.7	203.85	1355.2	1393.91
20	0.175	35.0	15	193.1	203.85	1323.6	1393.91



Şekil 7.7. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin gözlenen ve tahmin edilen enzim aktivite değerlerinin karşılaştırılması: a) α -amilaz, b) selüloz

Şekil 7.7’de sunulan grafik, biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu kapsamında elde edilen ve model tarafından öngörülen enzim aktivite değerleri arasında kabul edilebilir düzeyde bir sapma olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda, modellerin istatistiksel anlamlılığı varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Farklı model türlerine ait karşılaştırmalı analiz sonuçları α -amilaz ve selüloz için sırasıyla Tablo 7.7 ve Tablo 7.8’de; anlamlı bulunan modellere ilişkin ANOVA verileri ise Tablo 7.9 ve Tablo 7.10’da sunulmuştur.

Tablo 7.7. α -Amilaz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları

Model Türü	p -değeri Prob > F	Uyum Eksikliği p -değeri	Düzeltilmiş R^2	Tahmini R^2	Sonuç
Lineer	0.1535	0.0015	0.1373	-0.0142	
2FI	0.8935	0.0008	-0.0146	-1.1007	
<u>Kuadratik</u>	<u><0.0001</u>	<u>0.2208</u>	<u>0.9163</u>	<u>0.7474</u>	<u>Önerilen</u>
Kübik	0.4511	0.1015	0.9183	-1.5541	

Tablo 7.8. Selüloz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin model değerlendirme sonuçları

Model Türü	p -değeri Prob > F	Uyum Eksikliği p -değeri	Düzeltilmiş R^2	Tahmini R^2	Sonuç
Lineer	0.5960	0.0002	-0.0590	-0.2397	
2FI	0.8994	0.0001	-0.2478	-0.9407	
<u>Kuadratik</u>	<u><0.0001</u>	<u>0.1208</u>	<u>0.9409</u>	<u>0.8096</u>	<u>Önerilen</u>
Kübik	0.2045	0.1160	0.9585	-0.2207	

Tablo 7.9. α -Amilaz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	41384.55	9	4598.28		<0.0001
A-Hava akış hızı (l/dk)	6072.02	1	6072.02		0.0002
B-Sıcaklık (°C)	5549.74	1	5549.74		0.0003
C-Dolgu miktarı (g)	218.91	1	218.91		0.3092
AB	0.66	1	0.66		0.9542
AC	957.03	1	957.03		0.0490
BC	439.56	1	439.56		0.1599
A²	6935.77	1	6935.77		0.0001
B²	14317.08	1	14317.08		<0.0001
C²	12245.96	1	12245.96		<0.0001
Artık (Kalıntı)	1907.06	10	190.71		
Uyum Eksikliği	1287.19	5	257.44		0.2208
Saf Hata	619.87	5	123.97		
Düzeltilmiş Toplam	43291.61	19			
Ortalama	147.44				
R ²	0.9559				
Düzeltilmiş R ²	0.9163				
Tahmini R ²	0.7474				
Standart Sapma	13.81				
Varyasyon Katsayısı (CV) %	9.37				
Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı (PRESS)	10933.96				
Yeterli Kesinlik	13.484				

A hava akış hızı (l/dk), B sıcaklık (°C) ve C dolgu miktarı (g) olmak üzere α -amilaz aktivitesi için ANOVA analizi sonucunda önerilen model denklemi kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden sırasıyla Denklem 7.5 ve Denklem 7.6'da verilmiştir.

$$\alpha\text{-Amilaz Aktivitesi (U/ml)} \quad (7.5)$$

$$= 203.85 - 21.09A + 20.16B + 4C + 0.29AB + 10.94AC \\ + 7.41BC - 21.94A^2 - 31.52B^2 - 29.15C^2$$

$$\alpha\text{-Amilaz Aktivitesi (U/ml)} \quad (7.6)$$

$$= -7152.161 + 2055.747A + 382.308B + 49.16C \\ + 2.711AB + 82.496AC + 1.048BC - 11031.0915A^2 \\ - 5.572B^2 - 3.298C^2$$

Tablo 7.10. Selülaz üretimi için biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Model	1.739E+006	9	1.933E+005	34.62	<0.0001
A-Hava akış hızı (l/dk)	95609.81	1	95609.81	17.13	0.0020
B-Sıcaklık (°C)	88566.70	1	88566.70	15.87	0.0026
C-Dolgu miktarı (g)	10106.78	1	10106.78	1.81	0.2081
AB	52358.48	1	52358.48	9.38	0.0120
AC	13448.00	1	13448.00	2.41	0.1517
BC	2380.50	1	2380.50	0.43	0.5284
A²	6.388E+005	1	6.388E+005	114.45	<0.0001
B²	8.408E+005	1	8.408E+005	150.64	<0.0001
C²	2.616E+005	1	2.616E+005	46.87	<0.0001
Artık (Kalıntı)	55816.90	10	5581.69		
Uyum Eksikliği	42158.52	5	8431.70	3.09	0.1208
Saf Hata	13658.38	5	2731.68		
Düzeltilmiş Toplam	1.795E+006	19			
Ortalama	993.19				
R ²	0.9689				
Düzeltilmiş R ²	0.9409				
Tahmini R ²	0.8096				
Standart Sapma	74.71				
Varyasyon Katsayısı (CV) %	7.52				
Tahminlenmiş Kalıntı Hata Kareler Toplamı (PRESS)	3.418E+005				
Yeterli Kesinlik	15.5				

A hava akış hızı (l/dk), B sıcaklık (°C) ve C dolgu miktarı (g) olmak üzere selülaz aktivitesi için ANOVA analizi sonucunda önerilen model denklemi kodlanmış ve gerçek değerler cinsinden sırasıyla Denklem 7.7 ve Denklem 7.8’de verilmiştir.

$$\text{Selülaz Aktivitesi (U/ml)} \quad (7.7)$$

$$= 1393.91 - 83.67A + 80.53B - 27.2C - 80.9AB + 41AC \\ - 17.25BC - 210.54A^2 - 241.55B^2 - 134.74C^2$$

$$\text{Selülaz Aktivitesi (U/ml)} \quad (7.8)$$

$$= -63445.92 + 57234.164A + 3192.933B + 479.437C \\ - 762.733AB + 309.241AC - 2.44BC - 1.059 \times 10^5 A^2 \\ - 42.7B^2 - 15.244C^2$$

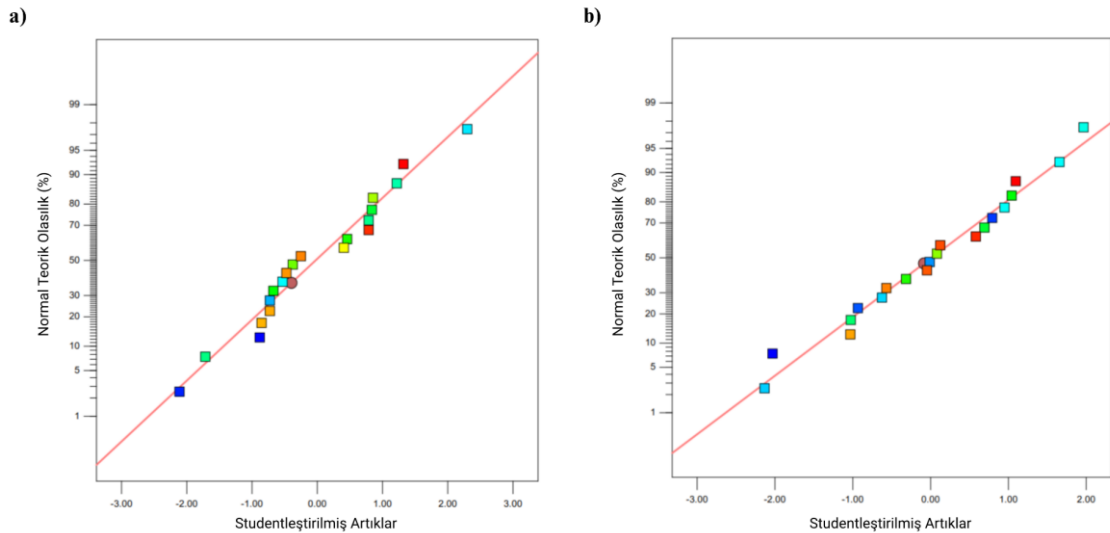
Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu için oluşturulan kuadratik modellerin F-testine ilişkin p -değerleri <0.0001 ; R^2 , düzeltilmiş R^2 ve tahmini R^2 değerleri ise α -amilaz için sırasıyla 0.9559, 0.9163 ve 0.7474, selüloz için sırasıyla 0.9689, 0.9409 ve 0.8096 olarak belirlenmiştir. Fermentasyon optimizasyonu için elde edilen modellerin yorumlanmasında belirtildiği üzere, bu değerler, kurulan modellerin elde edilen verilerle uyum gösterdiğini ve tahmin gücünün yüksek olduğunu olduğunu ortaya koymaktadır.

Kuadratik modellerin uyum eksikliği p -değerleri, α -amilaz için 0.2208 ve selüloz için 0.1208 olup bu değerler yaygın olarak kabul gören anlamlılık değeri olan 0.1'in üzerindedir.

α -Amilaz ve selüloz için hesaplanan ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla 147.44 ± 13.81 ve 993.19 ± 74.71 olup varyasyon katsayıları (CV) %9.37 ve %7.52 olarak belirlenmiştir. Kurulan modellerde CV değerinin %10'un altında kalması, modelin yeterli tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Yeterli kesinlik (adequate precision) değerleri, α -amilaz için 13.48 ve selüloz için 15.5 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin, minimum kabul edilebilir eşik olan 4'ü önemli ölçüde aşması, modelin tasarım aralığı içerisinde güvenilir tahminlerde bulunabildiğini ve istatistiksel açıdan anlamlı bir yapıya sahip olduğuna işaret etmektedir.

Şekil 7.8'de, biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu deneylerine ilişkin modelin yeterliliğini değerlendirmek amacıyla oluşturulan studentleştirilmiş artıkların normal dağılım grafiği sunulmuştur. Noktaların genel olarak doğrusal eksen boyunca hizalanması, artıkların normal dağılım varsayımını büyük ölçüde karşıladığını göstermektedir.

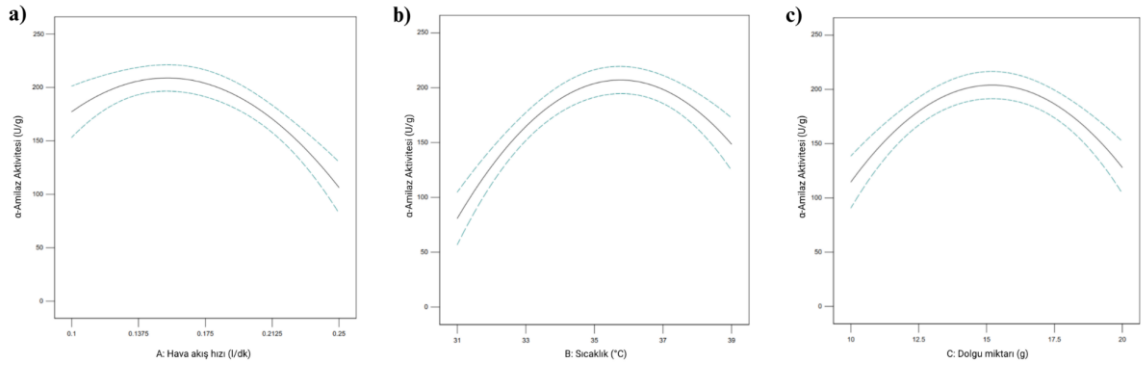


Şekil 7.8. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin studentleştirilmiş artıkların dağılımı: a) α -amilaz, b) selüloz

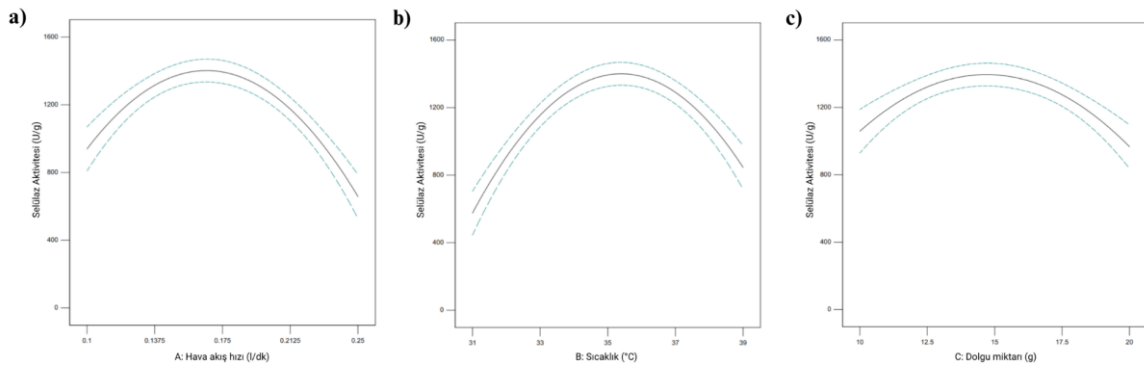
F-testine ilişkin p -değeri 0.05'in altında olan model terimleri, α -amilaz için A, B, AC, A^2 , B^2 , C^2 ve selülaz için A, B, AB, A^2 , B^2 , C^2 olarak belirlenmiştir.

Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonunda kullanılan bağımsız değişkenlerin α -amilaz ve selülaz üretimi üzerindeki etkilerini gösteren tek faktör grafikleri sırasıyla Şekil 7.9 ve Şekil 7.10'da sunulmuştur. Tek faktör grafiklerine bakıldığında, her bir model teriminin enzim üretimi üzerindeki kuadratik etkisi açık bir şekilde görülmektedir.

Hava akış hızına ilişkin tek faktör grafiklerinde, α -amilaz ve selülaz aktivitelerinin sırasıyla yaklaşık olarak 0.15 ve 0.16 l/dk değerlerinde en yüksek aktiviteye ulaştığı gözlemlenmektedir (Şekil 7.9a ve Şekil 7.10a). Bu değerlerin dışında azalan enzim aktiviteleri, nispeten düşük akış hızlarında oksijen ihtiyacının yeterince karşılanamadığını; görece yüksek akış hızlarında ise ortam neminin azaldığını düşündürmektedir. Literatürde dolgu kolon biyoreaktörüyle yapılan bir çalışmada, *Bacillus* için maksimum α -amilaz aktivitesine 0.151 l/dk akış hızında ulaşılmış olup bu veri, elde edilen optimum hava akış hızı değerlerine oldukça yakındır [202].



Şekil 7.9. α -Amilaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: hava akış hızı (a), sıcaklık (b) ve dolgu miktarının (c) α -amilaz aktivitesi üzerine etkisi

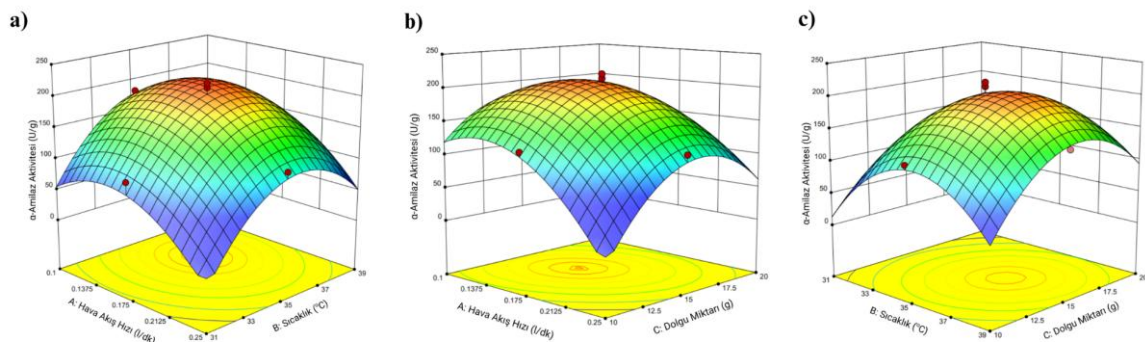


Şekil 7.10. Selülaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin tek faktör grafikleri: hava akış hızı (a), sıcaklık (b) ve dolgu miktarının (c) selülaz aktivitesi üzerine etkisi

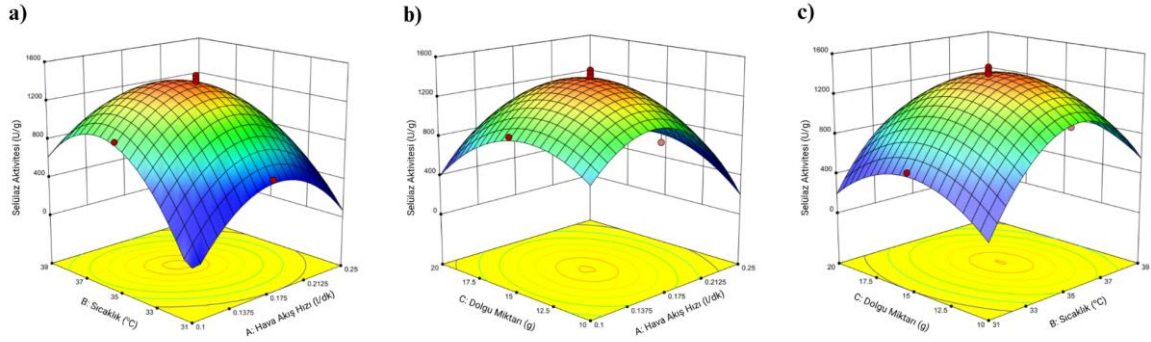
Sıcaklığa ilişkin tek faktör grafiklerinde, α -amilaz ve selüloz aktivitelerinin yaklaşık 35–36 °C aralığında maksimum düzeye ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 7.9b ve Şekil 7.10b). İlgili sıcaklık değerlerinin altında, substrat yatağı fiziksel formunu büyük ölçüde korumaya devam etmiş; bu durum, mikrobiyal büyüme ve enzim üretimi için gerekli biyokimyasal süreçlerin yeterince etkin şekilde gerçekleşmemesiyle ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, yüksek sıcaklık değerlerinde substrat yatağının porozitesinin belirgin şekilde azalması, ısı ve oksijen transferini sınırlayarak enzim sentezini olumsuz etkilemiş ve bu durum düşük aktivite değerleriyle sonuçlanmıştır. Literatürde sıcaklık değerlerindeki küçük farkların enzim üretimi üzerinde son derece büyük etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Örneğin *Bacillus sp.* ile gerçekleştirilen bir çalışmada, 40 °C’deki α -amilaz aktivitesinin, 37 °C’deki aktiviteye göre belirgin şekilde düştüğü rapor edilmiştir [272]. Kullanılan suşların özellikleri ile enzimlerin termal stabilitelere bağlı farklılıklar nedeniyle, maksimum α -amilaz ve selüloz aktivitesine ulaşılan sıcaklık değerlerine ilişkin literatürde oldukça geniş bir aralık bildirilmiştir. Bununla birlikte, maksimum α -amilaz ve selüloz aktivitesine 35 °C’de ulaşılan çalışmalar da mevcuttur [199, 273, 274].

Dolgu miktarına ilişkin tek faktör grafiklerinde, her iki enzim için de en yüksek aktivite değerine yaklaşık 15 g dolgu miktarında ulaşıldığı görülmektedir. Bu durum, bir çalışmada optimumdan daha yüksek dolgu miktarlarında oksijen transferinde sınırlamalar meydana geldiği şeklinde yorumlanmıştır [93].

Design Expert 10 programı kullanılarak oluşturulan cevap yüzeyi grafiklerinde, iki bağımsız değişkenin birlikte değişmesi durumunda α -amilaz ve selüloz aktivitelerinde meydana gelen değişimler üç boyutlu olarak görselleştirilmiştir. Bu grafikler, α -amilaz ve selüloz için sırasıyla Şekil 7.11 ve Şekil 7.12’de sunulmuştur.



Şekil 7.11. α -Amilaz biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b) ve BC (c) ikili etkileşimlerinin α -amilaz aktivitesi üzerine etkileri



Şekil 7.12. Selülag biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonuna ilişkin 3B cevap yüzeyi grafikleri: AB (a), AC (b) ve BC (c) ikili etkileşimlerinin selülag aktivitesi üzerine etkileri

Hava akış hızı (A) ile sıcaklık (B) arasındaki etkileşimin enzim aktivitelerine etkisi, α -amilaz ve selülag için sırasıyla Şekil 7.11a ve Şekil 7.12a’da verilmiştir. Selülag üretimi açısından bu etkileşim, $p=0.0120$ değeriyle model tarafından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Her iki faktörün de kuadratik etkisinin açıkça görüldüğü grafiklerde, enzim aktiviteleri, yaklaşık 0.175 l/dk hava akış hızı ve 35 °C’de en yüksek değerlerine ulaşmaktadır. Literatürde, hava akış hızının hem sıcaklık hem de substratın nem içeriği üzerinde doğrudan etkili olduğu; dolgu kolon biyoreaktörlerinde, hava akış hızının bu parametrelerle olan ikili etkileşimlerinin enzim üretimi üzerinde belirleyici rol oynadığı bildirilmiştir [202].

Şekil 7.11b ve Şekil 7.12b, hava akış hızı (A) ile dolgu miktarı (C) arasındaki etkileşimin sırasıyla α -amilaz ve selülag aktivitesi üzerindeki etkisini göstermektedir. Bu ikili etkileşim, α -amilaz için $p=0.0490$ değeriyle istatistiksel anlamlılık sınırında yer almakta ve modele sınırlı düzeyde katkı sağlayan bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Her iki grafikte de enzim aktiviteleri, yaklaşık 0.175 l/dk hava akış hızı ve 15 g dolgu miktarının olduğu koşullarda maksimum düzeye ulaşmıştır. Ancak bu hava akış hızının üzerine çıkıldığında, her iki enzim için de aktivite düzeylerinde belirgin bir azalma gözlenmektedir. Düşük hava akış hızlarında, katı partikül yüzeylerini saran ince nemli tabakanın kütle transfer direnci oluşturması; bu nedenle de oksijen ve çözünmüş maddelerin mikroorganizmalara ulaşmasının sınırlanması muhtemeldir [275]. Bu bağlamda, hava akış hızındaki artışın kütle transfer sınırlamalarını azaltarak enzim sentezini desteklediği düşünülmektedir. Öte yandan, hava akış hızının 0.175 l/dk’nın üzerine çıkması, substrat yatağında nem kaybına yol açarak mikrobiyal aktiviteyi ve dolayısıyla enzim sentezini olumsuz yönde etkilemiştir.

Sıcaklık (B) ile dolgu miktarı (C) arasındaki etkileşimin enzim aktiviteleri üzerindeki etkisine ilişkin olarak Şekil 7.11c ve Şekil 7.12c’de, hem α -amilaz hem de selülag aktivitesinin sıcaklık ve dolgu miktarının orta düzeyde tutulduğu koşullarda maksimuma ulaştığı, bu değerlerin altına veya üstüne çıkıldığında ise belirgin bir azalma eğilimi gösterdiği görülmektedir. Bu durum,

sıcaklık ve dolgu miktarı gibi fiziksel parametrelerin hem mikrobiyal büyüme hem de kütle transferi üzerinde çift yönlü etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, dolgu miktarının artması, havanın substrat yatağından etkin bir şekilde geçmesini engelleyerek oksijen transferini kısıtlayabilir. Öte yandan, düşük sıcaklıklar mikrobiyal büyüme için yetersiz kalabilirken; yüksek sıcaklıklar mikrobiyal stres oluşturabilir, enzim stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilir ya da yatağın nem oranını artırarak kütle transferini sınırlandırabilir. Bu nedenle, her iki parametrenin de optimum sınırlar içinde tutulması, enzim üretim verimliliği açısından kritik bir gerekliliktir.

α -Amilaz ve selüloz üretimi için gerçekleştirilen proses optimizasyonu deneyleri sonucunda, optimum koşullar, α -amilaz için 0.154 l/dk hava akış hızı, 35.8 C sıcaklık, 15 g dolgu miktarı olarak; selüloz için 0.164 l/dk akış hızı, 35.5 C sıcaklık 14.5 g dolgu miktarı olarak belirlenmiş ve ilgili koşullarda maksimum enzim aktivite değerleri sırasıyla 212.11 U/g ve 1415.31 U/g olarak öngörülmüştür. Aynı koşullarda gerçekleştirilen doğrulama deneylerinden elde edilen α -amilaz ve selüloz aktivite değerleri sırasıyla 190.9 U/g ve 1354.8 U/g olarak elde edilmiştir ve bu değerler model öngörülerinin sırasıyla %90.01 ve %95.63'üne karşılık gelmiştir.

8. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-645 suşu kullanılarak mısır kepeği ve fındık küspesi karışımı üzerinde katı hal fermentasyonu ile α -amilaz ve selüloz enziminin üretimi incelenmiştir; fermentasyon ortamı erlenmayerlerde optimize edildikten sonra, işletim koşullarının etkisi laboratuvar ölçekli dolgu kolon biyoreaktör sisteminde değerlendirilmiştir. Deney matrislerinin tasarımı ve varyans analizleri, MKT ilkelerine göre Design Expert 10 yazılımı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler hâlinde sunulmuştur:

1. Katı substratların temel bileşen analizleri sonucunda mısır kepeğinin %32.98 ekstraktif madde, %26.75 selüloz, %33.56 hemiselüloz ve %6.71 lignin; fındık küspesinin %27.04 ekstraktif madde, %36.65 selüloz, %28.42 hemiselüloz ve %7.89 lignin içerdiği saptanmıştır.
2. Fermentasyon ortam optimizasyonu için α -amilaz ve selüloz üretimine ilişkin oluşturulan kuadratik modellerin sırasıyla F testine ait p -değerleri 0.0001 ve <0.0001; R^2 değerleri 0.9448 ve 0.9479; düzeltilmiş R^2 değerleri 0.8934 ve 0.8992; tahmini R^2 değerleri 0.7072 ve 0.7339 olarak hesaplanmış; her iki modelin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve deneysel verilerle yüksek uyum gösterdiği belirlenmiştir. Uyum eksikliği p -değerleri ise α -amilaz için 0.0608 ve selüloz için 0.1334 olarak hesaplanmıştır.
3. Fermentasyon ortam optimizasyonu için A substrat miktarı (% MK), B inokülüm hacmi (ml), C azot kaynağı (ml) ve D inkübasyon süresi (sa) olmak üzere, α -amilaz ve selüloz üretimi üzerinde anlamlı etkisi olan model terimleri sırasıyla A, B, C, D, AB, B², C² ve B, CD, A², B², C², D² olarak belirlenmiştir.
4. α -Amilaz için optimum ortam bileşimi %25 oranında mısır kepeği, %75 oranında fındık küspesi, 6.0 ml inokülüm hacmi ve 1.6 ml azot kaynağı; selüloz için ise %52 oranında mısır kepeği, %48 oranında fındık küspesi, 4.8 ml inokülüm hacmi ve 1.5 ml azot kaynağı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda en yüksek α -amilaz (120.3 U/g) ve selüloz (1138.4 U/g) aktivitelerine sırasıyla 114 ve 90 saatlik inkübasyon sonunda ulaşılmıştır.
5. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu için oluşturulan kuadratik modellerin F-testine ilişkin p -değerleri <0.0001; R^2 , düzeltilmiş R^2 ve tahmini R^2 değerleri ise α -amilaz için sırasıyla 0.9559, 0.9163 ve 0.7474; selüloz için sırasıyla 0.9689, 0.9409 ve 0.8096 olarak belirlenmiştir. Uyum eksikliği analizinde p -değerlerinin sırasıyla 0.2208 ve 0.1208 olarak bulunması modellerin anlamlı bir uyumsuzluk göstermediğini ortaya koymuştur.
6. Biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu için A hava akış hızı (l/dk), B sıcaklık (°C) ve C dolgu miktarı (g) olmak üzere, α -amilaz ve selüloz üretimi üzerinde anlamlı etkisi

olan model terimleri sırasıyla A, B, AC, A², B², C² ve A, B, AB, A², B², C² olarak belirlenmiştir.

- Optimum işletim koşulları, α -amilaz için 0.154 l/dk hava akış hızı, 35.8 °C sıcaklık ve 15 g dolgu miktarı; selülaz için ise 0.164 l/dk hava akış hızı, 35.5 °C sıcaklık ve 14.5 g dolgu miktarı olarak tanımlanmıştır. Bu koşullarda α -amilaz ve selülaz için sırasıyla 190.9 U/g ve 1354.8 U/g düzeylerinde maksimum enzim aktivitesi elde edilmiştir.

α -Amilaz ve selülaz üretimine ilişkin literatürde yer alan bazı çalışmalardan elde edilen veriler, sırasıyla Tablo 8.1 ve Tablo 8.2’de özetlenmiştir.

Tablo 8.1. α -Amilaz üretimi optimizasyonuna dair literatürde bildirilen bazı aktivite değerleri

<i>Bacillus</i> türü	Yöntem	Optimizasyon Türü	Seçilen Faktörler	α -Amilaz Aktivitesi	Kaynak
<i>B.subtilis</i>	KHF	Ortam	İnkübasyon süresi, başlangıç nem oranı, inokülüm hacmi, partikül boyutu	21.8 U/g	[271]
<i>B.amyloliquefaciens</i>	KHF	Ortam	Soya küspesi, mısır unu ve buğday kepeği oranı, inkübasyon süresi, inokülüm hacmi, başlangıç nem oranı	188.8 U/g	[276]
<i>B.subtilis</i>	KHF	Ortam	İnkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, ilave karbon ve azot kaynaklarının etkisi	345 U/g	[277]
<i>B.subtilis</i>	KHF	Ortam	İnokülüm hacmi, başlangıç pH’sı, ilave karbon ve azot kaynağı miktarı	1239 U/g	[200]
<i>B.amyloliquefaciens</i>	KHF	Ortam ve işletim koşulları	- Substrat miktarı, inokülüm hacmi, azot kaynağı miktarı, inkübasyon süresi - Hava akış hızı, sıcaklık, dolgu miktarı	120.3 U/g 190.9 U/g	Bu çalışma

Tablo 8.2. Selülaz (CMCaz) üretimi optimizasyonuna dair literatürde bildirilen bazı aktivite değerleri

<i>Bacillus</i> türü	Yöntem	Optimizasyon Türü	Seçilen Faktörler	Selülaz Aktivitesi	Kaynak
<i>B.amyloliquefaciens</i>	KHF	Ortam	Soya küspesi, mısır unu ve buğday kepeği oranı, inokülüm hacmi, başlangıç pH’sı, ilave karbon ve azot kaynağı miktarı	186.8 U/g	[172]
<i>B.subtilis</i>	KHF	Ortam	Pepton miktarı, NaH ₂ PO ₄ miktarı, başlangıç pH’sı	473.01 U/g	[278]
<i>B.amyloliquefaciens</i>	KHF	Ortam ve işletim koşulları	- Substrat miktarı, inokülüm hacmi, azot kaynağı miktarı, inkübasyon süresi - Hava akış hızı, sıcaklık, dolgu miktarı	1138.4 U/g 1354.8 U/g	Bu çalışma

ÖNERİLER

Bu çalışma temel alınarak, araştırma sürecinin farklı yönlerden derinleştirilmesi için aşağıdaki öneriler sunulabilir.

Olası sinerjik etkilerin değerlendirilmesi amacıyla farklı tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünleri içeren substrat bileşimlerinin kullanılması eşzamanlı mikrobiyal enzim üretim kapasitesinin artırılması açısından önemli bir potansiyel sunabilir. Öte yandan, gelecek çalışmalarda elde edilen enzimlerin karakterizasyonlarının yapılması endüstriyel uygulama potansiyellerinin belirlenmesine katkı sağlayabilir. Ayrıca, mikroorganizmanın enzim üretim sürecinde hangi metabolik yolları etkinleştirdiği ve hangi gen veya protein gruplarının bu süreçte rol aldığı omik tabanlı yaklaşımlarla ayrıntılı olarak ortaya konabilir.

Laboratuvar ölçekli dolgulu kolon biyoreaktör sisteminde elde edilen optimum koşullar, endüstriyel uygulanabilirliğe yönelik öngörü sağlamak amacıyla daha büyük hacimli pilot sistemlerde yeniden değerlendirilebilir. Bu kapsamda, fermentasyon ortamının ölçek artışıyla birlikte yeniden optimize edilmesi gerekebileceği; hava dağılımı, nem dengesi, kütle ve ısı transferi gibi parametrelerde önemli değişiklikler meydana gelebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bununla birlikte, kullanılan substratların su tutma kapasitesi ve porozite gibi fiziksel özelliklerinin fermentasyon performansı üzerinde etkili olabileceği göz önünde bulundurularak, bu parametrelerin süreç tasarımına dâhil edilmesi yararlı olacaktır.

Son olarak, enerji, gıda ve yem gibi sürdürülebilirliğin giderek önem kazandığı sektörlerde özellikle bu çalışmada üretimleri gerçekleştirilen hidrolitik enzim gruplarının potansiyel kullanım alanlarının araştırılması, ekonomik ve çevresel sürdürülebilirliğe sahip biyoteknolojik üretim stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Benzer şekilde, tarımsal atıklar ve endüstriyel yan ürünlerin, biyoteknolojik üretim süreçlerinde değerlendirilmesine yönelik üniversite-sanayi iş birliğine dayalı çalışmaların, üretim endüstrileri ile entegre şekilde yürütülmesi sürdürülebilir üretim modellerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] E. E. Bassey, "Trends in Fermentation Process, Purification and Recovering of Biomolecules: A Review," *International Journal of Agriculture and Biosciences*, vol. 2, no. 6, pp. 340-343, 2013.
- [2] D. A. Astiasará, Astiasará, I., "Fermented Foods: Composition and Health effects," *Encyclopedia of Food and Health*, vol. 89, pp. 649-655, 2015.
- [3] J. T. Pasteur, *Les microbes organisés: leur rôle dans la fermentation, la putréfaction et la contagion*. Gauthier-Villars, 1878.
- [4] S. O. Enfors, *Fermentation Process Technology*. Stockholm: Royal Institute of Technology (KTH), 2019.
- [5] S. P. Dwivedi, *Fundamentals of Fermentation Technology*. India: Ennoble IP Books and Publications, 2023.
- [6] S. F. S. Reihani, Khosravi-Darani, K., "Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 27, pp. 34-40, 2019.
- [7] L. H. S. Guimarães, Somera, A. F., Terenzi, H. F., Polizeli, M., Jorge, J. A., "Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose," *Process Biochem*, vol. 44, no. 2, pp. 237-241, 2009.
- [8] C. A. Scorer, Buckholz, R. G., Clare, J. J., Romanos, M. A., "The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *Genes-Basel*, vol. 132, no. 1-2, pp. 111-119, 1993.
- [9] Z. D. Su, Guo, Y., Peng, Z. Y., "Production of intracellular enzyme by *Corynebacterium glutamicum* T6-13 protoplasts immobilized in Ca-alginate gels," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 15, no. 7, pp. 791-795, 1993.
- [10] S. Chang, Guo, Y., Wu, B., He, B., "Extracellular expression of alkali-tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 96, pp. 249-256, 2017.
- [11] E. Granum, Kirkvold, S., Myklestad, S. M., "Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion," *Marine Ecology Progress Series*, vol. 242, pp. 83-94, 2002.
- [12] A. S. S. Ibrahim, Al-Salamah, A. A., Elbadawi, Y. B., El-Tayeb, M. A., Ibrahim, S. S. S., "Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus sp.* NPST-AK15 isolated from hypersaline soda lakes," *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, pp. 236-243, 2015.
- [13] T. Keshavarz, "Control of fermentation conditions," in *Encyclopedia of food microbiology*, C. A. T. Batt, M. L. Ed. London: Academic Press, 1999.
- [14] A. Kuila, Sharma, V., *Principles and Applications of Fermentation Technology*. USA: Scrivener Publishing, 2018.
- [15] S. Saxena, *Applied Microbiology*. USA: Springer, 2015, pp. 155-171.
- [16] D. Barh, Azevedo, V., *Omics Technologies and Bio-Engineering (Towards Improving Quality of Life)*. 2018, pp. 233-249.
- [17] C. Bernal, Rodríguez, K., Martínez, R., "Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts," *Biotechnology Advances*, vol. 36, no. 5, pp. 1470-1480, 2018.
- [18] P. F. Stanbury, Whitaker, A., and Hall, S. J., *Principles of Fermentation Technology (3rd ed.)*. Oxford: Elsevier, 2013.
- [19] A. Berenjian, *Essentials in Fermentation Technology*. Switzerland: Springer, 2019.
- [20] S. K. Dahod, Greasham, R., Kennedy, M., *Raw Materials Selection and Medium Development for Industrial Fermentation Processes*. USA: ASM Press, 2010, pp. 659-668.

- [21] P. F. Stanbury, Whitaker, A., Hall, S. J, *Principles of Fermentation Technology*, 2nd ed. USA: Pergamon, 1995.
- [22] W. H. Kampen, H. C. Vogel, Todaro, C. M., Ed. *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design and Equipment*, 3rd ed. (Nutritional requirements in fermentation processes). USA: Elsevier, 2014, pp. 37–57.
- [23] G. M. Walker, White, N. A., K. Kavanagh, Ed. *Fungi: Biology and Applications* (Introduction to fungal physiology). USA: Wiley-Blackwell, 2017, pp. 1–34.
- [24] O. W. Gooding, "Process optimization using combinatorial design principles: parallel synthesis and design of experiment methods," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 297–304, 2004.
- [25] V. Czitrom, "One-Factor-at-a-Time Versus Designed Experiments," *The American Statistician*, vol. 53, no. 2, pp. 126–131, 1999.
- [26] V. Singh, Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C. K. M., "Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review," *Front Microbiol*, vol. 7, 2017.
- [27] M. Gupte, Kulkarni, P., "A study of antifungal antibiotic production by *Thermomonospora* sp. MTCC 3340 using full factorial design," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 78, pp. 605–610, 2003.
- [28] R. Vaidya, Vyas, P., Chhatpar, H. S., "Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, no. 1, pp. 92–96, 2003.
- [29] R. A. Fisher, S. Kotz, Johnson, N. L., Ed. *Breakthroughs in Statistics* (The arrangement of field experiments). New York: Springer-Verlag Inc., 1992, pp. 82–91.
- [30] G. E. P. Box, Hunter, J. S., Hunter, W. G., *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*. New York: Wiley-Interscience, 2005.
- [31] R. Carlson, Carlson, J., *Design and Optimization in Organic Synthesis*, 2nd ed. London, UK: Elsevier, 2005.
- [32] K. Vanaja, Shobha Rani, R. H., "Design of Experiments: Concept and Applications of Plackett Burman Design," *Clinical Research and Regulatory Affairs*, vol. 24, no. 1, pp. 1-23, 2007.
- [33] K. Adinarayana, Ellaiah, P., "Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp.," *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 3, pp. 272–278, 2002.
- [34] S. A. Muhammad, Ahmed, S., Ismail, T., Hameed, A., "Taguchi's experimental design for optimizing the production of novel thermostable polypeptide antibiotic from *Geobacillus pallidus* SAT4," *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 27, no. 1, pp. 11-23, 2014.
- [35] P. Bhagat, "An introduction to neural nets," *Chemical Engineering Progress*, vol. 86, no. 4, pp. 55-60, 1990.
- [36] E. Franco-Lara, Link, H., Weuster-Botz, D., "Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm," *Process Biochem*, vol. 41, no. 10, pp. 2200-2206, 2006.
- [37] S. K. Gupta, "An overview of genetic algorithms: A structural analysis," *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, vol. 6, no. 5, pp. 1305–1310, 2021.
- [38] V. Singh, Khan, M., Khan, S., Tripathi, C. K. M., "Optimization of actinomycin V production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm," *Appl Microbiol Biot*, vol. 82, pp. 379-385, 2009.
- [39] D. Jing and J. Wang, "Controlling the simultaneous production of laccase and lignin peroxidase from *Streptomyces cinnamomensis* by medium formulation," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 5, pp. 1-7, 2012.
- [40] M. Saritha, A. Arora, S. Singh, and L. Nain, "*Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields," *Bioresource technology*, vol. 135, pp. 12-17, 2013.

- [41] L. Paulová, Patáková, P., Brányik, T., "Advanced fermentation processes," in *Engineering aspects of food biotechnology*, J. A. Teixeira, Vicente, A. A. Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013, pp. 89–105.
- [42] R. G. Harrison, Todd, P. W., Rudge, S. R., Petrides, D. P., *Bioseparations Science and Engineering*, 2nd ed. UK: Oxford University Press, 2015.
- [43] R. Subramaniam, Vimala, R., "Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study," *International Journal of Natural Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 480-486, 2012.
- [44] R. Vidyalakshmi, Paranthaman, R., Indhumathi, J., "Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus spp.*," *World Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 1, pp. 89-91, 2009.
- [45] B. F. Yıldırım A., Karataş M., Tanyolaç B., *Moleküler Biyoloji*. Ankara: Nobel Yayınevi, 2010.
- [46] J. J. Zhong, "Recent advances in bioreactor engineering," *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 27, pp. 1035-1041, 2010.
- [47] D. A. Mitchell, N. Krieger, and M. Berovič, "Solid-state fermentation bioreactors," *Springer*, p. 19, 2006.
- [48] M. Manan and C. Webb, "Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing," *J Appl Biotechnol Bioeng*, vol. 4, no. 1, pp. 511-532, 2017.
- [49] A. Pandey, C. R. Soccol, and C. Larroche, *Current developments in solid-state fermentation*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [50] K. Aidoo, R. Hendry, and B. Wood, "Solid substrate fermentations," in *Advances in applied microbiology*, vol. 28: Elsevier, 1982, pp. 201-237.
- [51] D. Vollbrecht, "Feststoff-Fermentation—Ein historischer Überblick," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 69, no. 10, pp. 1403-1408, 1997.
- [52] H. Chen, "Modern solid state fermentation," *Netherlands: Springer*, vol. 599, 2013.
- [53] C. Krishna, "Solid-state fermentation systems—an overview," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 25, no. 1-2, pp. 1-30, 2005.
- [54] L. Thomas, C. Larroche, and A. Pandey, "Current developments in solid-state fermentation," *Biochem Eng J*, vol. 81, pp. 146-161, 2013.
- [55] R. R. Singhania, A. K. Patel, C. R. Soccol, and A. Pandey, "Recent advances in solid-state fermentation," *Biochem Eng J*, vol. 44, no. 1, pp. 13-18, 2009.
- [56] A. L. Orozco, M. I. Pérez, O. Guevara, J. Rodríguez, M. Hernández, F. J. González-Vila, O. Polvillo, and M. E. Arias, "Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 81, no. 2, pp. 247-252, 2008.
- [57] S. R. Couto and M. A. Sanromán, "Application of solid-state fermentation to food industry—a review," *Journal of Food Engineering*, vol. 76, no. 3, pp. 291-302, 2006.
- [58] D. A. Mitchell and N. Krieger, "Solid-state cultivation bioreactors," *Essentials in fermentation technology*, pp. 105-133, 2019.
- [59] K.-Y. Show and X. Guo, *Industrial waste*. BoD—Books on Demand, 2012.
- [60] C. R. Soccol and L. P. Vandenberghe, "Overview of applied solid-state fermentation in Brazil," *Biochem Eng J*, vol. 13, no. 2-3, pp. 205-218, 2003.
- [61] G. Šelo, M. Planinić, M. Tišma, S. Tomas, D. Koceva Komlenić, and A. Bucić-Kojić, "A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation," *Foods*, vol. 10, no. 5, p. 927, 2021.
- [62] L. P. Ooijkaas, F. J. Weber, R. M. Buitelaar, J. Tramper, and A. Rinzema, "Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems," *Trends in Biotechnology*, vol. 18, no. 8, pp. 356-360, 2000.
- [63] H. z. Chen and Q. He, "Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 87, no. 12, pp. 1619-1625, 2012.
- [64] C. S. Farinas, "Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 52, pp. 179-188, 2015.

- [65] A. Pandey, "Solid-state fermentation," *Biochem Eng J*, vol. 13, no. 2-3, pp. 81-84, 2003.
- [66] A. Karimi, S. Shojaosadati, P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, and M. Hashemi, "Porosity changes during packed bed solid-state fermentation," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 20, no. 6, pp. 4022-4027, 2014.
- [67] P. Singh nee Nigam and A. Pandey, "Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues," in *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation: Utilisation of agro-residues*: Springer, 2009, pp. 197-221.
- [68] D. A. Mitchell, M. Berovic, and N. Krieger, "Overview of solid state bioprocessing," 2002.
- [69] D. A. Mitchell, A. Tongta, D. Stuart, and N. Krieger, "The potential for establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 80, no. 1, pp. 114-122, 2002.
- [70] R. D. Divate, C.-C. Wang, S.-T. Chou, C.-T. Chang, P.-M. Wang, and Y.-C. Chung, "Using wheat bran and soybean meal as solid state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, vol. 70, pp. 127-133, 2017.
- [71] S. S. Behera and R. C. Ray, "Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies," *International journal of biological macromolecules*, vol. 86, pp. 656-669, 2016.
- [72] A. Durand, "Bioreactor designs for solid state fermentation," *Biochem Eng J*, vol. 13, no. 2-3, pp. 113-125, 2003.
- [73] E. Villegas, S. Aubague, L. Alcantara, R. Auria, and S. Revah, "Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments," *Biotechnology advances*, vol. 11, no. 3, pp. 387-397, 1993.
- [74] H. W. Doelle, D. A. Mitchell, and C. E. Rolz, *Solid substrate cultivation*. Elsevier Applied Science New York, 1992.
- [75] H. Narahara, Y. Koyama, T. Yoshida, P. Atthasampunna, and H. Taguchi, "Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*," *Journal of fermentation technology*, vol. 62, no. 5, pp. 453-459, 1984.
- [76] S. Manpreet, S. Sawraj, D. Sachin, S. Pankaj, and U. Banerjee, "Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation," *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 2, no. 1, pp. 1-9, 2005.
- [77] B. Rathbun and M. Shuler, "Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: design of fermentation chambers," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 25, no. 4, pp. 929-938, 1983.
- [78] K. Sato, M. Nagatani, and S. Sato, "A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration," 1982.
- [79] A. A. Assamoi, J. Destain, F. Delvigne, G. Lognay, and P. Thonart, "Solid-state fermentation of xylanase from in a multi-layer-packed bed reactor," (in English), *Appl Biochem Biotech*, vol. 145, no. 1-3, pp. 87-98, Mar 2008, doi: 10.1007/s12010-007-8077-z.
- [80] M. L. E. Gutarra, E. D. C. Cavalcanti, L. R. Castilho, D. M. G. Freire, and G. L. Sant'Anna Jr, "Lipase production by solid-state fermentation: Cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors," (in English), *Appl Biochem Biotech*, vol. 121, pp. 105-116, Spr 2005, doi: Doi 10.1385/Abab:121:1-3:0105.
- [81] X. Y. Zhang, H. Mo, J. Zhang, and Z. H. Li, "A solid-state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation," (in English), *Biotechnol Lett*, vol. 25, no. 5, pp. 417-420, Mar 2003, doi: Doi 10.1023/A:1022441225819.
- [82] B. K. Lonsane, G. Saucedo-Castaneda, M. Raimbault, S. Roussos, G. Viniegra-Gonzalez, N. P. Ghildyal, M. Ramakrishna, and M. M. Krishnaiah, "Scale-up Strategies for Solid-State Fermentation Systems," (in English), *Process Biochem*, vol. 27, no. 5, pp. 259-273, Sep 1992, doi: Doi 10.1016/0032-9592(92)85011-P.
- [83] I. Nava, E. Favela-Torres, and G. Saucedo-Castañeda, "Effect of mixing on the solid-state fermentation of coffee pulp with *Aspergillus tamarii*," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 49, no. 3, pp. 391-395, 2011.

- [84] D. Mitchell, L. de Lima Luz, N. Krieger, and M. Berovič, "Bioreactors for solid-state fermentation. Comprehensive Biotechnology," ed: Elsevier, 2011.
- [85] E. Gasiorek, "Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation," *Chemical Papers*, vol. 62, no. 2, pp. 141-146, 2008.
- [86] C. R. Soccol, E. S. F. Da Costa, L. A. J. Letti, S. G. Karp, A. L. Woiciechowski, and L. P. de Souza Vandenberghe, "Recent developments and innovations in solid state fermentation," *Biotechnology Research and Innovation*, vol. 1, no. 1, pp. 52-71, 2017.
- [87] T. Robinson and P. Nigam, "Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation," *Biochem Eng J*, vol. 13, no. 2-3, pp. 197-203, 2003.
- [88] S. Suryanarayan, "Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience," *Biochem Eng J*, vol. 13, no. 2-3, pp. 189-195, 2003.
- [89] P. Binod, P. Palkhiwala, R. Gaikawari, K. M. Nampoothiri, A. Duggal, K. Dey, and A. Pandey, "Industrial enzymes-present status and future perspectives for India," 2013.
- [90] Z. Vaseghi, G. D. Najafpour, S. Mohseni, and S. Mahjoub, "Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor," *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 48, no. 2, pp. 283-289, 2013.
- [91] S. Arora, R. Rani, and S. Ghosh, "Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects," (in English), *Journal of Biotechnology*, vol. 269, pp. 16-34, Mar 10 2018, doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.01.010.
- [92] D. A. Mitchell, H. A. Ruiz, and N. Krieger, "A critical evaluation of recent studies on packed-bed bioreactors for solid-state fermentation," *Processes*, vol. 11, no. 3, p. 872, 2023.
- [93] L. M. Rocha, B. S. Campanhol, and R. G. Bastos, "Solid-state cultivation of *Aspergillus niger*–*Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse with vinasse in bench packed-bed column bioreactor," *Appl Biochem Biotech*, vol. 193, no. 9, pp. 2983-2992, 2021.
- [94] M. R. Spier, L. Vandenberghe, A. B. P. Medeiros, and C. R. Soccol, "Application of different types of bioreactors in bioprocesses," *Bioreactors: design, properties and applications*, pp. 53-87, 2011.
- [95] M. Gutierrez-Rojas, S. A. A. Hosn, R. Auria, S. Revah, and E. Favela-Torres, "Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation," *Process Biochem*, vol. 31, no. 4, pp. 363-369, 1996.
- [96] A. M. Castro, L. R. Castilho, and D. M. Freire, "Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*," *Biochem Eng J*, vol. 93, pp. 303-308, 2015.
- [97] M. Melikoglu, C. S. K. Lin, and C. Webb, "Solid state fermentation of waste bread pieces by *Aspergillus awamori*: Analysing the effects of airflow rate on enzyme production in packed bed bioreactors," *Food and Bioprocess Processing*, vol. 95, pp. 63-75, 2015.
- [98] L. O. Pitol, A. Biz, E. Mallmann, N. Krieger, and D. A. Mitchell, "Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor," *Chemical Engineering Journal*, vol. 283, pp. 1009-1018, 2016.
- [99] C. Piedrahita-Aguirre, R. Bastos, A. Carvalho, and R. Monte Alegre, "The influence of process parameters in production of lipopeptide iturin A using aerated packed bed bioreactors in solid-state fermentation," *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 37, pp. 1569-1576, 2014.
- [100] M. T. Hardin, D. A. Mitchell, and T. Howes, "Approach to designing rotating drum bioreactors for solid-state fermentation on the basis of dimensionless design factors," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 67, no. 3, pp. 274-282, 2000.
- [101] J. Sargentanis, M. Karim, V. Murphy, D. Ryoo, and R. Tengerdy, "Effect of operating conditions on solid substrate fermentation," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 42, no. 2, pp. 149-158, 1993.
- [102] M. Gowthaman, C. Krishna, and M. Moo-Young, "Fungal solid state fermentation—an overview," *Applied mycology and biotechnology*, vol. 1, pp. 305-352, 2001.

- [103] H. K. Q. Ali and M. Zulkali, "Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review," *Chemical and biochemical engineering quarterly*, vol. 25, no. 2, pp. 255-266, 2011.
- [104] D. A. Mitchell, N. Krieger, D. M. Stuart, and A. Pandey, "New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors," *Process Biochem*, vol. 35, no. 10, pp. 1211-1225, 2000.
- [105] R. Wang, S. M. Shaarani, L. C. Godoy, M. Melikoglu, C. S. Vergara, A. Koutinas, and C. Webb, "Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 47, no. 3, pp. 77-83, 2010.
- [106] G. Saucedo-Castañeda, M. Gutierrez-Rojas, G. Bacquet, M. Raimbault, and G. Viniegra-Gonzalez, "Heat transfer simulation in solid substrate fermentation," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 35, no. 8, pp. 802-808, 1990.
- [107] D. Stuart, D. Mitchell, M. Johns, and J. Litster, "Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena," *Biotechnology and bioengineering*, vol. 63, no. 4, pp. 383-391, 1999.
- [108] L. Wang and S.-T. Yang, "Solid state fermentation and its applications," *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, pp. 465-489, 2007.
- [109] R. Sindhu, A. Pandey, and P. Binod, "Solid-state fermentation for the production of poly (hydroxyalkanoates)," *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol. 29, no. 2, pp. 173-181, 2015.
- [110] C. Foong, J. Janaun, K. Krishnaiah, and A. Prabhakar, "Effect of superficial air velocity on solid state fermentation of palm kernel cake in a lab scale fermenter using locally isolated fungal strain," *Industrial Crops and Products*, vol. 30, no. 1, pp. 114-118, 2009.
- [111] C. Foong, K. Krishnaiah, J. Janaun, D. Subbarao, and A. Prabhakar, "Heat and mass transfer studies of palm kernel cake (PKC) in fluidized bed fermenter," *Industrial Crops and Products*, vol. 30, no. 2, pp. 227-234, 2009.
- [112] U. Hölker, M. Höfer, and J. Lenz, "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi," *Appl Microbiol Biot*, vol. 64, pp. 175-186, 2004.
- [113] D. A. Mitchell, O. F. von Meien, L. F. L. Luz Jr, and M. Berovič, "The scale-up challenge for SSF bioreactors," in *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*: Springer, 2006, pp. 57-64.
- [114] H.-D. Jang and S.-S. Yang, "Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor," *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 14, pp. 6181-6189, 2008.
- [115] M. Olazar, S. Alvarez, R. Aguado, and M. J. San José, "Spouted bed reactors," *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, vol. 26, no. 8, pp. 845-852, 2003.
- [116] P. Gervais, M. Bensoussan, and W. Grajek, "Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate," *Appl Microbiol Biot*, vol. 27, pp. 389-392, 1988.
- [117] F. J. J. Nagel, J. Tramper, M. S. Bakker, and A. Rinzema, "Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 72, no. 2, pp. 231-243, 2001.
- [118] M. Olazar, R. Aguado, M. J. San José, S. Alvarez, and J. Bilbao, "Minimum spouting velocity for the pyrolysis of scrap tyres with sand in conical spouted beds," *Powder Technology*, vol. 165, no. 3, pp. 128-132, 2006.
- [119] A. K. Meghavarman and S. Janakiraman, "Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87)," *Biocatal Agr Biotech*, vol. 11, pp. 124-130, 2017.
- [120] K. Viswanathan, M. Lyall, and B. Raychaudhuri, "Spouted bed drying of agricultural grains," *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 64, no. 2, pp. 223-232, 1986.
- [121] A. Ashok, K. Doriya, D. R. M. Rao, and D. S. Kumar, "Design of solid state bioreactor for industrial applications: an overview to conventional bioreactors," *Biocatal Agr Biotech*, vol. 9, pp. 11-18, 2017.

- [122] E. Gumbira-Sa'id, D. Mitchell, P. Greenfield, and H. Doelle, "A packed bed solid-state cultivation system for the production of animal feed: Cultivation, drying and product quality," *Biotechnol Lett*, vol. 14, pp. 623-628, 1992.
- [123] L. P. Vandenberghe, C. R. Soccol, A. Pandey, and J.-M. Lebeault, "Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*," *Bioresource Technology*, vol. 74, no. 2, pp. 175-178, 2000.
- [124] M. T. Torres-Mancera, A. Figueroa-Montero, E. Favela-Torres, G. Rosales-Zamora, K. M. Nampoothiri, and G. Saucedo-Castañeda, "Online monitoring of solid-state fermentation using respirometry," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier, 2018, pp. 97-108.
- [125] L. Lopez, F. Alagna, L. Bianco, I. De Bari, and C. Fasano, "Handbook Of Biofuels," 2022.
- [126] R. Chaithanya, C. Bhagavathy, and S. Mrudula, "Optimization of process parameters and leaching conditions affecting protease production under solid state fermentation," *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*, vol. 14, no. 1, pp. 87-94, 2012.
- [127] J. Rashid, N. Samat, and W. Yusoff, "Studies on extraction of mannanase enzyme by *Aspergillus terreus* SUK-1 from fermented palm kernel cake," *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, vol. 16, no. 18, pp. 933-938, 2013.
- [128] J. N. Silva, M. G. Godoy, M. L. Gutarra, and D. M. Freire, "Impact of extraction parameters on the recovery of lipolytic activity from fermented babassu cake," *Plos One*, vol. 9, no. 8, p. e103176, 2014.
- [129] H. Zhang and Q. Sang, "Production and extraction optimization of xylanase and β -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob," *Biochem Eng J*, vol. 97, pp. 101-110, 2015.
- [130] S. Negi, S. Gupta, and R. Banerjee, "Extraction and purification of glucoamylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single-stage fermentation," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 49, no. 3, pp. 310-315, 2011.
- [131] M. Marín, A. Artola, and A. Sánchez, "Production of proteases from organic wastes by solid-state fermentation: downstream and zero waste strategies," *3 Biotech*, vol. 8, no. 4, p. 205, 2018.
- [132] P. Poltronieri and O. F. D'Urso, *Biotransformation of agricultural waste and by-products: the food, feed, fibre, fuel (4F) economy*. Elsevier, 2016.
- [133] S. Martins, S. I. Mussatto, G. Martínez-Avila, J. Montañez-Saenz, C. N. Aguilar, and J. A. Teixeira, "Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review," *Biotechnology advances*, vol. 29, no. 3, pp. 365-373, 2011.
- [134] G. Diaz-Godinez, J. Soriano-Santos, C. Augur, and G. Viniegra-González, "Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no. 5, pp. 271-275, 2001.
- [135] J. Zhang and N.-f. Gao, "Application of response surface methodology in medium optimization for pyruvic acid production of *Torulopsis glabrata* TP19 in batch fermentation," *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, vol. 8, pp. 98-104, 2007.
- [136] S. Karimifard and M. R. A. Moghaddam, "Application of response surface methodology in physicochemical removal of dyes from wastewater: a critical review," *Sci Total Environ*, vol. 640, pp. 772-797, 2018.
- [137] Y. Li, B. Guo, Z. Wu, W. Wang, C. Li, G. Liu, and H. Cai, "Effects of Fermented Soybean Meal Supplementation on the Growth Performance and Cecal Microbiota Community of Broiler Chickens," (in English), *Animals-Basel*, vol. 10, no. 6, Jun 2020, doi: ARTN 109810.3390/ani10061098.
- [138] B. Oyejola and J. Nwanya, "Selecting the right central composite design," *Int. J. Stat. Appl*, vol. 5, no. 1, pp. 21-30, 2015.
- [139] D. Kılıç, H. Bayrak, and B. Özkaya, "Mısır Ekmeğindeki Fitik Asit Miktarını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesinde Yanıt Yüzey Yöntemi Yaklaşımı," *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, vol. 44, no. 2, pp. 121-134, 2018.

- [140] H. Hetzner, C. Schmid, S. Tremmel, K. Durst, and S. Wartzack, "Empirical-statistical study on the relationship between deposition parameters, process variables, deposition rate and mechanical properties of aC: H: W coatings," *Coatings*, vol. 4, no. 4, pp. 772-795, 2014.
- [141] A. Narváez, Domínguez, E., *Encyclopedia of Analytical Science* (Enzymes | Overview). Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2005.
- [142] H. M. Eun, *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*. Academic Press, 1996.
- [143] J. R. Whitaker, B. Caballero, Finglas, P. M., Toldrá, F., Ed. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Enzymes | Functions and Characteristics). Academic Press, 2003.
- [144] A. L. Lehninger, *Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function*. New York: Worth Publishers, 1970, p. 833.
- [145] "The Peptide Bond." <https://www.kisa.link/mqcxD> (accessed 12 April, 2025).
- [146] H. Suzuki, *How Enzymes Work: From Structure to Function*. Boca Raton, FL: CRC Press / Taylor & Francis Group, 2021.
- [147] D. L. Nelson, Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2017.
- [148] M. Heim, Römer, L., Scheibel, T., "Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 1, 2010.
- [149] Anonymous, "Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)," *Journal of Biological Sciences Reports*, vol. 4, no. 2, pp. 177–180, 1984.
- [150] Z. Tao, Dong, B., Teng, Z., Zhao, Y., "The Classification of Enzymes by Deep Learning," *IEEE Access*, vol. 8, pp. 89802–89811, 2020.
- [151] "Alpha-amylase (EC 3.2.1.1)." <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EC:3.2.1.1> (accessed 12 April, 2025).
- [152] L. P. S. Vandenberghe, Karp, S. G.; Pagnoncelli, M. G. B., Tavares, M. v. L., Junior, N. L., Diestra, K. V., Viesser, J. A., Soccol, C. R., S. P. Singh, Pandey, A., Singhania, R. R., Larroche, C., Li, Z., Ed. *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (Classification of Enzymes and Catalytic Properties). Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020.
- [153] A. Illanes, *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Netherlands: Springer, 2008.
- [154] S. Kumar, Chakravarty, S., C. S. Nunes, Kumar, V., Ed. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. London, United Kingdom: Academic Press, 2018.
- [155] R. Gupta, Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B., " Microbial α -amylases: a biotechnological perspective," *Process Biochem*, vol. 38, no. 11, pp. 1599–1616, 2003.
- [156] N. S. Reddy, Nimmagadda, A., Rao, K. R. S., "An overview of the microbial α -amylase family," *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 12, pp. 645-648, 2003.
- [157] S. L. Hii, Shun, T. J., Ling, T. C., Ariff, A., "Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications," *Enzyme Research*, 2012, doi: 10.1155/2012/921362.
- [158] A. Pandey, Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R., "Advances in microbial amylases," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 135-152, 2000.
- [159] X. Liu, Kokare, C., G. Brachmachari, Ed. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis, and Industrial Applications*, 2nd ed. (Microbial enzymes of use in industry). 2023.
- [160] M. J. E. C. van der Maarel, van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family," *Journal of Biotechnology*, vol. 94, no. 2, pp. 137-155, 2002.
- [161] V. Juturu, Chuan, J., Patel, A.K.; Larroche, C., Pandey, A., "Microbial cellulases: engineering, production and applications," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 33, pp. 188-203, 2014, doi: 10.1016/j.rser.2014.01.077.
- [162] R. Juturu, Adsul, M., Pandey, A., Patel, A., *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering - Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (Cellulases). Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017.

- [163] C. L. Pirich, Picheth, G. F., Fontes, A. M., Delgado-Aguilar, M., Ramos, L. P., "Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: A review," *Cellulose*, vol. 27, no. 10, pp. 5457–5475, 2020.
- [164] P. Anbu, Gopinath, S. C. B., Cihan, A. C., Chaulagain, B. P., "Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine," *BioMed Research International* pp. 1-3, 2013.
- [165] P. Anbu, "Enhanced production and organic solvent stability of a protease from *Brevibacillus laterosporus* strain PAP04," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 49, no. 4, 2016, Art no. e5178.
- [166] H. W. Blanch, Clark, D. S., *Biochemical Engineering*. USA: CRC Press, 1996.
- [167] L. Liu, Yang, H., Shin, H., Chen, R. R., Li, J., Du, G., Chen, J., "How to achieve high-level expression of microbial enzymes," *Bioengineered*, vol. 4, no. 4, pp. 212-223, 2013, doi: 10.4161/bioe.24761.
- [168] R. Singh, Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K., "Microbial enzymes: industrial progress in 21st century," *3 Biotech*, vol. 6, no. 2, 2016, Art no. 174, doi: 10.1007/s13205-016-0485-8.
- [169] M. S. Ngalimat, Yahaya, R. S. R., Baharudin, M. M. A., Yaminudin, S. M., Karim, M., Ahmad, S. A., Sabri, S., "A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*," *Microorganisms*, vol. 9, no. 7, p. 1418, 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071418>.
- [170] K. W. WoldemariamYohannes, Yu, Z., Li, Q., Wei, H., Liu, X., Wang, Y., Sun, J., Baoguo, S., "Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of *Bacillus amyloliquefaciens*," *J Agr Food Chem*, vol. 68, no. 50, pp. 14709-14727, 2020.
- [171] I. Zalila-Kolsi, Kessentini, S., Tounsi, S., Jamoussi, K., "Optimization of *Bacillus amyloliquefaciens* BLB369 culture medium by response surface methodology for low cost production of antifungal activity," *Microorganisms*, vol. 10, no. 5, p. 1034, 2022, doi: doi.org/10.3390/microorganisms10051034.
- [172] Y. T. Su, Liu, C., Long, Z., Ren, H., & Guo, X. H., "Improved production of spores and bioactive metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation by a rapid optimization process," *Probiotics Antimicro*, vol. 11, pp. 921-930, 2019.
- [173] F. Zhang, Huo, K., Song, X., Quan, Y., Wang, S., Zhang, Z., Gao, W., Yang, C., "Engineering of a genome-reduced strain *Bacillus amyloliquefaciens* for enhancing surfactin production," *Microb Cell Fact*, vol. 19, pp. 1-13, 2020.
- [174] J. H. Han, Shim, H., Shin, J. H., Kim, K. S., "Antagonistic activities of *Bacillus spp.* strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea," *The plant pathology journal*, vol. 31, no. 2, p. 165, 2015.
- [175] W. A. Kasim, Gaafar, R. M., Abou-Ali, R. M., Omar, M. N., Hewait, H. M., "Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley," *Annals of Agricultural Sciences*, vol. 61, no. 2, pp. 217-227, 2016.
- [176] I. Zalila-Kolsi, A. Ben-Mahmoud, and R. Al-Barazie, "*Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications-A Comprehensive Review," (in English), *Microorganisms*, vol. 11, no. 9, Sep 2023. [Online]. Available: [Go to ISI>://WOS:001076857500001](https://doi.org/10.3390/microorganisms11091650).
- [177] G. Pressi, Dal Toso, R., Dal Monte, R., Carturan, G., "Production of Enzymes by Plant Cells Immobilized by Sol-Gel Silica," *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 26, no. 1, pp. 1189–1193, 2003.
- [178] W. W. Su, Arias, R., "Continuous plant cell perfusion culture: bioreactor characterization and secreted enzyme production," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 95, no. 1, pp. 13–20, 2003.
- [179] C. Altamirano, Paredes, C., Illanes, A., Cairó, J. J., Godia, F., "Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium," *Journal of Biotechnology*, vol. 110, no. 2, pp. 171-179, 2004.

- [180] H. Yıldız, Akyılmaz, E., Dinçkaya, E., "Catalase immobilization in cellulose acetate beads and determination of its hydrogen peroxide decomposition level by using a catalase biosensor," *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, vol. 32, no. 3, pp. 443-452, 2004.
- [181] I. N. A. Ashie, Sorensen, T. L., Nielsen, P. M., "Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness," *J Food Sci*, vol. 67, no. 6, pp. 2138-2142, 2002.
- [182] A. M. Pendzhiev, "Proteolytic Enzymes of Papaya: Medicinal Applications," *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 36, pp. 315–317, 2002.
- [183] S. Mokrani and E. Nabti, "Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review," *Int. J. Agric. Sc. Food Technol*, vol. 10, pp. 006-020, 2024.
- [184] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, and X. Wang, "Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering," *Computational and structural biotechnology journal*, vol. 2, no. 3, p. e201209017, 2012.
- [185] A. Kumar and S. Singh, "Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 33, no. 4, pp. 365-378, 2013.
- [186] L. M. Martínez. "Enzymes in Industry." Sepmag Blog. <https://www.sepmag.eu/blog/enzymes-in-industry> (accessed 21 May 2025).
- [187] V. Beniwal, *Industrial enzymes: trends, scope and relevance*. Nova Science Publishers, Incorporated, 2014.
- [188] S. N. Ávila, M. L. Gutarra, R. Fernandez-Lafuente, E. D. Cavalcanti, and D. M. Freire, "Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis," *Biochem Eng J*, vol. 144, pp. 1-7, 2019.
- [189] F. F. Özgen, N. Vardar-Yel, O. S. Roth, L. S. Shahbaz, and G. Vardar-Schara, "Surface residues serine 69 and arginine 194 of metagenome-derived lipase influence catalytic activity," *Biochem Eng J*, vol. 154, p. 107442, 2020.
- [190] D. Mehta and T. Satyanarayana, "Bacterial and archaeal α -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications," *Front Microbiol*, vol. 7, p. 1129, 2016.
- [191] U. S.-G. V. Research, "Market Analysis Report: Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020–2027," 2020. [Online]. Available: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>
- [192] S. Dewan, "Global markets for enzymes in industrial applications. BCC Research: Wellesly, MA, USA," ed, 2021.
- [193] B. Zhang, Y. Weng, H. Xu, and Z. Mao, "Enzyme immobilization for biodiesel production," *Appl Microbiol Biot*, vol. 93, pp. 61-70, 2012.
- [194] J. L. Adrio and A. L. Demain, "Microbial cells and enzymes a century of progress," *Microbial Enzymes and Biotransformations*, pp. 1-27, 2005.
- [195] T. Shahzadi, S. Zahoor, and M. Babar, "Solid State Fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* S8ST for the Production of α -amylase," *Pakistan Journal of Scientific & Industrial Research Series B: Biological Sciences*, vol. 66, no. 1, 2023.
- [196] V. S. Prajapati, U. B. Trivedi, and K. C. Patel, "A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation," *3 Biotech*, vol. 5, pp. 211-220, 2015.
- [197] A. K. Singh, "Production, purification and Characterization of thermostable bacterial α -amylase by solid state fermentation of agro-byproducts," Sam Higginbottom Institute of Agriculture, Technology & Sciences (SHIATS), 2016.
- [198] S. Afrisham, A. Badoei-Dalfard, A. Namaki-Shoushtari, and Z. Karami, "Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 132, pp. 98-106, 2016.

- [199] T. R. Kannan and C. Kanagaraj, "Molecular characteristic of α -amylase enzymes producing from *Bacillus licheniformis* (JQ946317) using solid state fermentation," *Biocatal Agr Biotech*, vol. 20, p. 101240, 2019.
- [200] T. N. Almanaa, P. Vijayaraghavan, N. S. Alharbi, S. Kadaikunnan, J. M. Khaled, and S. A. Alyahya, "Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues," *Journal of King Saud University-Science*, vol. 32, no. 2, pp. 1555-1561, 2020.
- [201] K. Pranay, S. R. Padmadeo, and B. Prasad, "Production of amylase from *Bacillus subtilis* sp. strain KR1 under solid state fermentation on different agrowastes," *Biocatal Agr Biotech*, vol. 21, p. 101300, 2019.
- [202] S. Derakhti, S. A. Shojaosadati, M. Hashemi, and K. Khajeh, "Process parameters study of α -amylase production in a packed-bed bioreactor under solid-state fermentation with possibility of temperature monitoring," *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, vol. 42, no. 3, pp. 203-216, 2012.
- [203] H. U. Ikram-Ul-Haq, Z. Mahmood, and M. M. Javed, "Solid state fermentation for the production of α -amylase by *Paenibacillus amylolyticus*," *Pak J Bot*, vol. 44, pp. 341-346, 2012.
- [204] G. Rajagopalan and C. Krishnan, "Hyper-production of α -amylase from agro-residual medium with high-glucose in SSF using catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103," *Journal of Basic Microbiology*, vol. 50, no. 4, pp. 336-343, 2010.
- [205] C. Obi, O. Okezie, and A. Ezugwu, "Amylase Production by solid state fermentation of agroindustrial wastes using *Bacillus species*," *European Journal of Nutrition & Food Safety*, vol. 4, pp. 408-414, 2019.
- [206] I. M. Gois, A. M. Santos, and C. F. Silva, "Amylase from *Bacillus* sp. Produced by Solid State Fermentation Using Cassava Bagasse as Starch Source," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 63, p. e20170521, 2020.
- [207] N. Akcan, "Bacillus licheniformis VO1'den α -Amilaz Üretimi için Tarımsal Endüstriyel Atıkların ve Fiziksel Faktörlerin İncelenmesi," *Journal of the Institute of Science and Technology*, vol. 11, no. 1, pp. 58-67, 2021.
- [208] N. T. H. My, T. T. Loan, and D. Van Thuoc, "High amylase production by a novel strain of *Bacillus amyloliquefaciens* M37 isolated from Can Gio Mangrove Forest, Vietnam," *Biointerface Res Appl Chem*, vol. 12, p. 4675, 2021.
- [209] B. Bhatt, V. Prajapati, K. Patel, and U. Trivedi, "Kitchen waste for economical amylase production using *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2. Biocatalys Agr Biotechnol 26: 101654," ed, 2020.
- [210] M. J. Msarah, I. Ibrahim, A. A. Hamid, and W. S. Aqma, "Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus spp.* and its application in food waste biodegradation," *Heliyon*, vol. 6, no. 6, 2020.
- [211] N. Akhtar, H. Y. Cai, E. G. Kiarie, and J. Li, "A novel *Bacillus* sp. with rapid growth property and high enzyme activity that allows efficient fermentation of soybean meal for improving digestibility in growing pigs," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 133, no. 1, pp. 3-17, 2022.
- [212] M. Borah, M. Mandal, and B. K. Konwar, "Characterization of probiotic strains of *Bacillus* sp. from fermented palm wine (*Nypa fructicans* sp.) and exploration of cellulolytic potential for use as an addition in animal feed," *International Microbiology*, pp. 1-13, 2024.
- [213] R. Hu, D. Wu, X. Liang, Z. Wang, H. Zou, F. Wu, H. Li, Y. Jiang, Q. Peng, J. Xiao, H. Li, and Z. Zhou, "Solid state fermentation improves the utilization value of cotton stalk," *Industrial Crops and Products*, vol. 230, p. 121113, 2025.
- [214] D. Konkol, E. Jonuzi, E. Popiela, K. Sierżant, M. Korzeniowska, K. Leicht, M. Gumowski, A. Krasowska, M. Łukaszewicz, and M. Korczyński, "Influence of solid state fermentation with *Bacillus subtilis* 67 strain on the nutritional value of rapeseed meal and its effects on performance and meat quality of broiler chickens," *Poultry Sci*, vol. 102, no. 7, p. 102742, 2023.

- [215] G. Liu, K. Zhang, H. Gong, K. Yang, X. Wang, G. Zhou, W. Cui, Y. Chen, and Y. Yang, "Whole genome sequencing and the lignocellulose degradation potential of *Bacillus subtilis* RLI2019 isolated from the intestine of termites," *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, vol. 16, no. 1, p. 130, 2023.
- [216] T. Bouzaïene, M. Ziadi, M. Enneifer, A. Sellami, A. Aydi, A. Cherif, and M. Hamdi, "Cellulolytic bacillus strain: production optimization using wheat bran under solid-state fermentation and investigation of its probiotic potential," *Sustainability-Basel*, vol. 15, no. 10, p. 8394, 2023.
- [217] T. P. Alves, C. C. Triques, E. A. da Silva, M. R. Fagundes-Klen, and S. D. Hasan, "Multi-enzymatic recovery of fungal cellulases (*Aspergillus niger*) through solid-state fermentation of sugarcane bagasse," *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 100, no. 8, pp. 1930-1940, 2022.
- [218] C. O. Bezerra, L. L. Carneiro, E. A. Carvalho, T. P. das Chagas, L. R. de Carvalho, A. P. T. Uetanabaro, G. P. da Silva, E. G. P. da Silva, and A. M. da Costa, "Artificial intelligence as a combinatorial optimization strategy for cellulase production by *Trichoderma stromaticum* AM7 using peach-palm waste under solid-state fermentation," *BioEnergy Research*, vol. 14, no. 4, pp. 1161-1170, 2021.
- [219] K. Chaudhary and A. Padhiar, "Cellulase production by Fungi from agro wastes under solid state fermentation," *Biosci Biotech Res Commun*, vol. 13, no. 3, pp. 1495-1501, 2020.
- [220] J. L. S. Heng and H. Hamzah, "Effects of different parameters on cellulase production by *Trichoderma harzianum* TF2 using solid-state fermentation (SSF)," *Indonesian Journal of Biotechnology*, vol. 27, no. 2, pp. 80-86, 2022.
- [221] M. A. Abdella and G. E. Ibrahim, "Application of statistical designs strategy to improve cellulase production using agro-waste residue by a novel isolate *Bacillus licheniformis* strain-MA1 and assessing the enzyme effect on apple juice quality," *Bmc Microbiol*, vol. 24, no. 1, p. 511, 2024.
- [222] J. Singh and P. Kaur, "Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus sp.* JS14 in solid substrate fermentation using response surface methodology," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 55, pp. 505-512, 2012.
- [223] M. Sharma and B. Kumar Bajaj, "Optimization of bioprocess variables for production of a thermostable and wide range pH stable carboxymethyl cellulase from *Bacillus subtilis* MS 54 under solid state fermentation," *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol. 36, no. 4, pp. 1123-1130, 2017.
- [224] R. Roopa, M. Charulatha, and S. Meignanalakshmi, "Production of cellulase from *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation using fiber wastes of palmyra palm," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 6, no. 6, pp. 2225-2231, 2017.
- [225] P. Kaur, S. Bhardwaj, N. K. Bhardwaj, and J. Sharma, "Lignocellulosic waste as a sole substrate for production of crude cellulase from *Bacillus subtilis* PJK6 under solid state fermentation using statistical approach," *Journal of Carbohydrates*, vol. 1, no. 1, pp. 1-14, 2018.
- [226] L. Shu-bin, Z. Ren-Chao, L. Xia, C. Chu-yi, and Y. Ai-lin, "Solid-state fermentation with okara for production of cellobiase-rich cellulases preparation by a selected *Bacillus subtilis* Pa5," *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 11, p. 2720, 2012.
- [227] A. A. Salim, S. Grbavčić, N. Šekuljica, A. Stefanović, S. Jakovetić Tanasković, N. Luković, and Z. Knežević-Jugović, "Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus sp.* TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products: the evaluation of substrate pretreatment methods," *Bioresource technology*, vol. 228, pp. 193-200, 2017.
- [228] A. A. Salim, S. Grbavčić, N. Šekuljica, M. Vukašinović-Sekulić, J. Jovanović, S. Jakovetić Tanasković, N. Luković, and Z. Knežević-Jugović, "Enzyme production by solid-state fermentation on soybean meal: A comparative study of conventional and ultrasound-assisted extraction methods," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 66, no. 3, pp. 361-368, 2019.

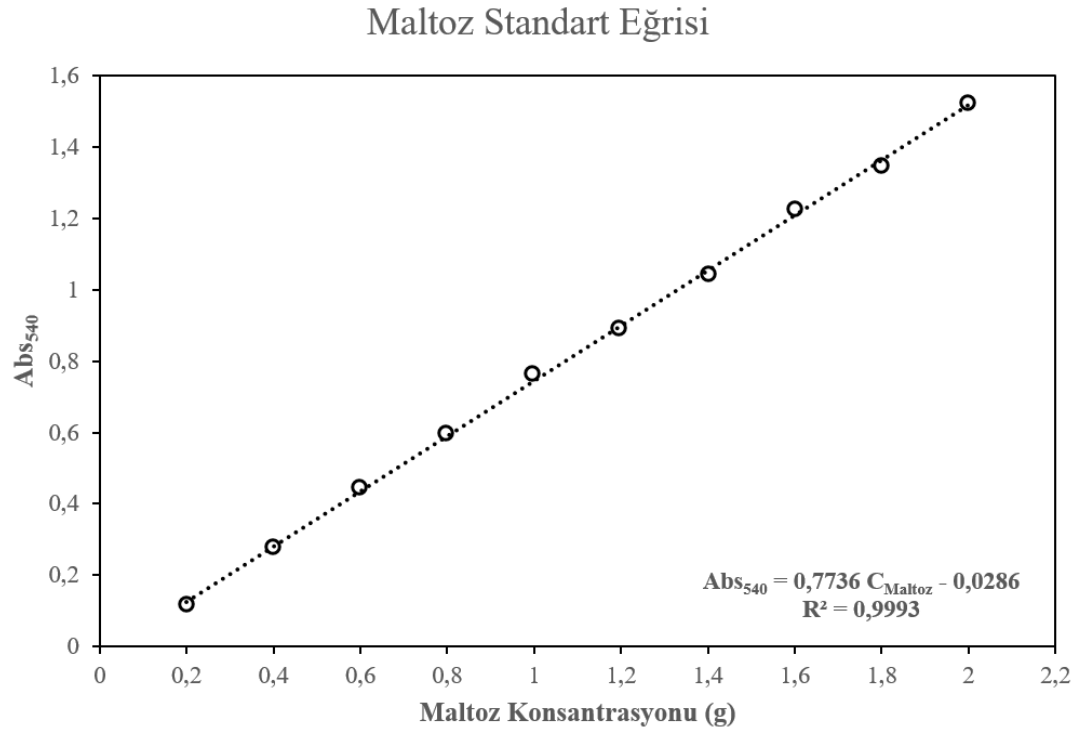
- [229] A. S. Qureshi, I. Khushk, C. H. Ali, Y. Chisti, A. Ahmad, and H. Majeed, "Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass," *Biocatal Agr Biotech*, vol. 8, pp. 146-151, 2016.
- [230] H. Karataş, F. Uyar, V. Tolan, and Z. Baysal, "Optimization and enhanced production of α -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation," *Ann Microbiol*, vol. 63, pp. 45-52, 2013.
- [231] M. Ozzeybek and D. Cekmecelioglu, "Formulation of apple pomace, orange peel, and hazelnut shell mix for co-production of bacterial pectinase and cellulase enzymes by mixture design method," *Biomass conversion and biorefinery*, vol. 14, no. 2, pp. 1853-1861, 2024.
- [232] S. Yazıcı and I. Özmen, "Optimization for coproduction of protease and cellulase from *Bacillus subtilis* M-11 by the Box–Behnken design and their detergent compatibility," *Braz. J. Chem. Eng*, vol. 37, pp. 49-59, 2020.
- [233] D. Filipe, H. Fernandes, C. Castro, H. Peres, A. Oliva-Teles, I. Belo, and J. M. Salgado, "Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste," *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 14, no. 1, pp. 78-91, 2020.
- [234] P. Leite, D. Sousa, H. Fernandes, M. Ferreira, A. R. Costa, D. Filipe, M. Gonçalves, H. Peres, I. Belo, and J. M. Salgado, "Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes," *Curr Opin Green Sust*, vol. 27, p. 100407, 2021.
- [235] P. Poletto, T. A. Polidoro, M. Zeni, and M. M. da Silveira, "Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor," *Lwt-Food Sci Technol*, vol. 79, pp. 92-101, 2017.
- [236] H. Rayhane, J. Meguira, G. Martinez, Y. Kourtis, N. Dumesnil, A. Meddah, and S. Roukas, "From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*," *J Environ Manage*, vol. 252, p. 109496, 2019.
- [237] S. Li, S. Xu, S. Liu, C. Yang, and Q. Lu, "Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas," *Fuel Processing Technology*, vol. 85, no. 8-10, pp. 1201-1211, 2004.
- [238] J. H. Miller, "Experiments in molecular genetics," 1972.
- [239] V. Selen, "*Bacillus amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretiminin katı substrat fermantasyonu ile incelenmesi," Master's thesis, Fırat University, Institute of Science, Elazığ, Türkiye, 2006.
- [240] G. Sütsatan, "Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sisteminde Glukonik Asit Üretimi," Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Fırat Üniversitesi, 2020.
- [241] P. Bernfeld, "Amylases, α and β ," pp. 149-158, 1955.
- [242] Sigma-Aldrich. "Enzymatic assay of α -amylase (EC 3.2.1.1)." Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com> (accessed May 3, 2025).
- [243] Z. E. Elsabayty, S. H. Abdel-Aziz, A. M. Ibrahim, A. A. Guirgis, and G. E. Dawwam, "Purification, biochemical characterization, and molecular cloning of cellulase from *Bacillus licheniformis* strain Z9 isolated from soil," *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 20, no. 1, p. 34, 2022.
- [244] S. S. Smuda, S. M. Mohsen, K. Olsen, and M. H. Aly, "Bioactive compounds and antioxidant activities of some cereal milling by-products," *Journal of food science and technology*, vol. 55, pp. 1134-1142, 2018.
- [245] R. Zhang, L. Huang, Y. Deng, J. Chi, Y. Zhang, Z. Wei, and M. Zhang, "Phenolic content and antioxidant activity of eight representative sweet corn varieties grown in South China," *International journal of food properties*, vol. 20, no. 12, pp. 3043-3055, 2017.
- [246] C. Jiang, R. Wang, X. Liu, J. Wang, X. Zheng, and F. Zuo, "Effect of particle size on physicochemical properties and in vitro hypoglycemic ability of insoluble dietary fiber from corn bran," *Front Nutr*, vol. 9, p. 951821, 2022.

- [247] M. S. Rahman, M. S. Hasan, A. S. Nitai, S. Nam, A. K. Karmakar, M. S. Ahsan, M. J. A. Shiddiky, and M. B. Ahmed, "Recent developments of carboxymethyl cellulose," *Polymers*, vol. 13, no. 8, p. 1345, 2021.
- [248] M. Sharma and B. K. Bajaj, "Cellulase production from *Bacillus subtilis* MS 54 and its potential for saccharification of biphasic-acid-pretreated rice straw," *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, vol. 8, no. 4, pp. 449-456, 2014.
- [249] P. Raw, "Composition of foods raw, processed, prepared usda national nutrient database for standard reference, release 25," *United States Department of Agriculture (USDA)*, 2012.
- [250] S. Romo Sánchez, I. Gil Sánchez, M. Arévalo-Villena, and A. Briones Pérez, "Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste," *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 38, pp. 587-593, 2015.
- [251] S. Singh and B. K. Bajaj, "Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation," *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, vol. 46, no. 7, pp. 717-724, 2016.
- [252] F. D. Ceylan, N. Adrar, B. W. Bolling, and E. Capanoglu, "Valorisation of hazelnut by-products: current applications and future potential," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 39, no. 2, pp. 586-621, 2023.
- [253] B. G. Acan, O. S. Toker, I. Palabiyik, H. R. Pirouzian, K. Bursa, M. Kilicli, M. Yaman, T. Er, and N. Konar, "Physicochemical properties of chocolate spread with hazelnut cake: Comparative study and optimization," *LWT*, vol. 147, p. 111548, 2021.
- [254] I. Atalar, "Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk," *Lwt*, vol. 107, pp. 256-263, 2019.
- [255] L. Y. Aydemir, A. A. Gökbülüt, Y. Baran, and A. Yemenicioğlu, "Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins," *Food Hydrocolloids*, vol. 36, pp. 130-142, 2014.
- [256] M. Bener, F. B. Şen, A. N. Önem, B. Bekdeşer, S. E. Çelik, M. Lalikoglu, Y. S. Aşçı, E. Capanoglu, and R. Apak, "Microwave-assisted extraction of antioxidant compounds from by-products of Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) using natural deep eutectic solvents: Modeling, optimization and phenolic characterization," *Food Chem*, vol. 385, p. 132633, 2022.
- [257] A. Slatnar, M. Mikulic-Petkovsek, F. Stampar, R. Veberic, and A. Solar, "HPLC-MSn identification and quantification of phenolic compounds in hazelnut kernels, oil and bagasse pellets," *Food Res Int*, vol. 64, pp. 783-789, 2014.
- [258] M. Hashemi, S. M. Mousavi, S. H. Razavi, and S. A. Shojaosadati, "Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus sp.* KR-8104 α -amylase at different pH and temperatures," *Industrial Crops and Products*, vol. 43, pp. 661-667, 2013.
- [259] P. Haaland, "Statistical problem solving," *Experimental design in biotechnology*, pp. 1-18, 1989.
- [260] R. Singh, D. C. Sharma, and M. K. Gupta, "Optimization of critical process parameters for amylase production by *Bacillus sp.* using statistical approach (RSM)," *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, vol. 7, no. 3, pp. 7-15, 2017.
- [261] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 9th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2017.
- [262] S. Rajshree and S. Rajni, "Contemporaneous Production of Amylase and Protease through CCD Response Surface Methodology by Newly Isolated *Bacillus megaterium* Strain B69," 2014.
- [263] A. Bandyopadhyay and C. Choudhury, "Crystal violet adsorption on industrial waste (hog fuel ash): equilibrium kinetics with process optimization by response surface modeling," (in English), *Clean Technol Envir*, vol. 20, no. 2, pp. 291-308, Mar 2018, doi: 10.1007/s10098-017-1471-5.
- [264] A. Thakkar and M. Saraf, "Application of statistically based experimental designs to optimize cellulase production and identification of gene," *Natural products and bioprospecting*, vol. 4, pp. 341-351, 2014.

- [265] M. A. Uygut and M. Ş. Tanyildizi, "Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* grown on orange peels," *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, vol. 42, pp. 443-449, 2018.
- [266] S. Mona, A. Kaushik, and C. Kaushik, "Waste biomass of *Nostoc linckia* as adsorbent of crystal violet dye: optimization based on statistical model," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 65, no. 3, pp. 513-521, 2011.
- [267] A. M. Othman, M. Mahmoud, M. Abdelraof, G. S. A. Karim, and A. M. Elsayed, "Enhancement of laccase production from a newly isolated *Trichoderma harzianum* S7113 using submerged fermentation: optimization of production medium via central composite design and its application for hydroquinone degradation," *International journal of biological macromolecules*, vol. 192, pp. 219-231, 2021.
- [268] Z. Merali, S. R. Collins, A. Elliston, D. R. Wilson, A. Käsper, and K. W. Waldron, "Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation," *Biotechnology for biofuels*, vol. 8, pp. 1-13, 2015.
- [269] P. Kashyap, A. Sabu, A. Pandey, G. Szakacs, and C. R. Soccol, "Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid-state fermentation," *Process Biochem*, vol. 38, no. 3, pp. 307-312, 2002.
- [270] S. Ramachandran, A. K. Patel, K. M. Nampoothiri, F. Francis, V. Nagy, G. Szakacs, and A. Pandey, "Coconut oil cake—a potential raw material for the production of α -amylase," *Bioresource technology*, vol. 93, no. 2, pp. 169-174, 2004.
- [271] Z. Baysal, F. Uyar, and Ç. Aytekin, "Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water," *Process Biochem*, vol. 38, no. 12, pp. 1665-1668, 2003.
- [272] M. Hashemi, S. H. Razavi, S. A. Shojaosadati, S. M. Mousavi, K. Khajeh, and M. Safari, "Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 110, no. 3, pp. 333-337, 2010.
- [273] C. Krishna, "Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes," *Bioresource technology*, vol. 69, no. 3, pp. 231-239, 1999.
- [274] R. Vidyalakshmi, R. Paranthaman, and J. Indhumathi, "Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus spp*," *World Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 1, pp. 89-91, 2009.
- [275] S. Bakkiyaraj, M. B. Syed, M. Devanesan, and V. Thangavelu, "Production and optimization of biodiesel using mixed immobilized biocatalysts in packed bed reactor," *Environ Sci Pollut R*, vol. 23, pp. 9276-9283, 2016.
- [276] Y.-t. Su, C. Liu, Z. Long, H. Ren, and X.-h. Guo, "Improved production of spores and bioactive metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation by a rapid optimization process," *Probiotics Antimicro*, vol. 11, no. 3, pp. 921-930, 2019.
- [277] H. Hassan and K. A. Karim, "Optimization of alpha amylase production from rice straw using solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*," *Int J Sci Environ Technol*, vol. 4, no. 1, pp. 1-16, 2015.
- [278] P. Vijayaraghavan, A. Arun, N. A. Al-Dhabi, S. G. P. Vincent, M. V. Arasu, and K. C. Choi, "Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulase and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation," *Biotechnology for biofuels*, vol. 9, no. 1, p. 73, 2016.

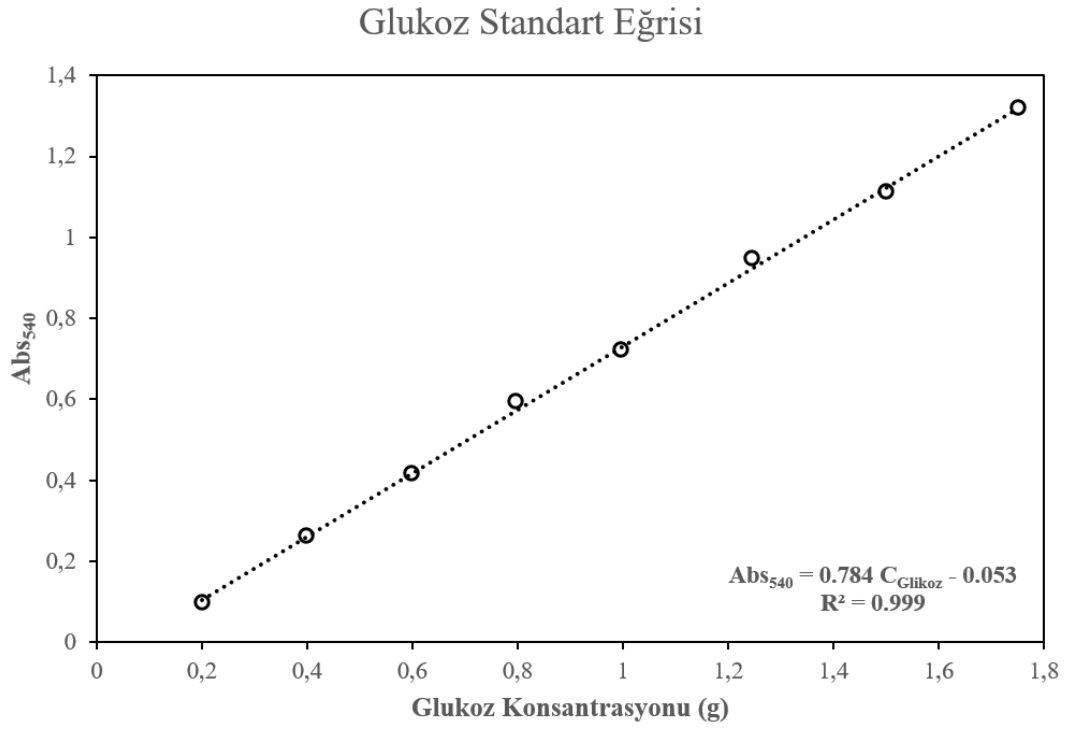
EKLER

EK- 1: MALTOZ STANDART EĞRİSİ



E1. 1. Maltoz standart eğrisi

EK- 2: GLUKOZ STANDART EĞRİSİ



E1. 2. Glukoz standart eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Fatıma ASLAN

KİŞİSEL BİLGİLER

ARAŞTIRMACI BİLGİLERİ

Öğrenci Orcid ID : 0009-0000-7964-9539
Danışman Orcid ID : 0000-0003-0016-0840

EĞİTİM BİLGİLERİ

ARAŞTIRMA DENEYİMİ

- ✓ Spektrofotometre, Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sistemi
- ✓ Java (Düzey: Orta)
- ✓ Polymath, SuperPro Designer, Visual Studio Code

İŞ DENEYİMİ

AKADEMİK FAALİYETLER

Bildiriler:

- Fatıma Aslan, Veyis Selen, Optimization of Cellulase Production by *Bacillus Amyloliquefaciens*, International Yildirim Bayezid Scientific Research and Innovation Symposium-I
- Fatıma Aslan, Veyis Selen, Optimization of α -Amylase Production in Solid-State Fermentation, International Yildirim Bayezid Scientific Research and Innovation Symposium-I

Projeler:

- Glukonik asit (GA) ve Bir Platform Kimyasalı Olan 5-Hidroksimetilfurfuralın (HMF) Biyo-Rafineri Yaklaşımıyla Birlikte Üretimi, TÜBİTAK 122M865, Bursiyer
- Dolgulu Kolon Biyoreaktör Sisteminde α -Amilaz ve Selülaz Enziminin Eş Zamanlı Biyosentezi, FÜBAP MF.25.43, Araştırmacı