

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

cis, cis-MUKONİK ASİTİN *Pseudomonas putida* BİYOKATALİZÖRLÜĞÜNDE
MİKROBİYAL ÜRETİMİ

Fatma Elif UZUN

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2018

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Fatma Elif UZUN tarafından hazırlanan “*cis, cis*-Mukonik Asitin *Pseudomonas putida* Biyokatalizörlüğünde Mikrobiyal Üretimi” adlı tez çalışması 24/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



Danışman : Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:



Başkan : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Deniz TANYOLAÇ
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN

Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

24/12/2018



Fatma Elif UZUN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

cis, cis-MUKONİK ASİTİN *Pseudomonas putida* BİYOKATALİZÖRLÜĞÜNDE MİKROBİYAL ÜRETİMİ

Fatma Elif UZUN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

Çalışmanın amacı, *Pseudomonas putida* KT2440 hücreleri ile sodyum benzoattan *cis, cis*-mukonik asitin (ccMA) mikrobiyal üretimi ve fermentasyon ortamı koşullarının deney tasarım yöntemi ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesidir. Çalışma sırasında öncelikle, *Pseudomonas putida* KT2440 hücreleri ile ccMA üretiminde yer alan Na-benzoat (substrat), glukoz, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄ derişimi, sıcaklık ve başlangıç pH'ının üretime etkisi incelenmiştir. Üretimde yer alan 11 ortam koşulundan en etkili olanların belirlenmesi amacıyla Plackett-Burman deney tasarımı uygulanmıştır. Belirlenen etkili faktörlerin optimize edilmesi ise, cevap yüzey yöntemi (RSM) olan merkezi kompozit deney tasarımı (CCD) ile gerçekleştirilmiştir. Plackett-Burman deney tasarımı sonucunda ccMA üretime, Na-benzoat, glukoz, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂ derişimi, sıcaklık ve başlangıç pH'ının pozitif, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ ve FeSO₄ derişiminin negatif etkisi olduğu belirlenmiştir. Pareto grafiğinde "Bonferroni" limitinin üzerinde kalan Na-benzoat, NaCl, (NH₄)₂SO₄ derişimi ve başlangıç pH'ı; ccMA üretiminde en etkili faktörler olarak belirlenmiştir. Daha sonra, bu faktörlerin etkileri RSM ile incelenmiş ve optimum değerleri sırasıyla; 16.93 mM, 0.9 g/L ve 1.8 g/L ve 7.97 olarak belirlenmiştir. Diğer faktörlerin optimum değerleri ise; 20 mM glukoz, 35 °C sıcaklık, 18 g/L Na₂HPO₄, 10 g/L KH₂PO₄, 150 µM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ ve 13 µM FeSO₄ olarak belirlenmiştir. Optimize edilmemiş koşullar altında 0.126 mM ccMA, optimize edilmiş koşullar altında 0.401 mM ve RSM ile 0.5895 mM ccMA elde edilmiştir. Böylece, optimize edilmemiş koşullarla karşılaştırıldığında RSM kullanılarak üretimde yaklaşık 6 kat artış meydana gelmiştir.

Aralık 2018, 99 sayfa

Anahtar Kelimeler: *cis, cis*-Mukonik asit, adipik asit, mikrobiyal üretim, *Pseudomonas putida*.

ABSTRACT

Master Thesis

MICROBIAL SYNTHESIS of *cis, cis*-MUCONIC ACID with *Pseudomonas putida*

Fatma Elif UZUN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

The aim of the study is the microbial production of *cis, cis*-muconic acid (ccMA) by *Pseudomonas putida* KT2440 cells with using Na-benzoate and the optimization of the fermentation medium conditions by experimental design method. During the study, the effects on the production of medium conditions such as Na-benzoate (substrate), glucose, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄ concentrations, temperature and initial pH were investigated. Plackett-Burman experimental design was used to determine the most effective ones in eleven fermentation conditions. Optimization of the determined effective factors was accomplished with the central composite design (CCD), which is response surface method (RSM). As a result of the Plackett-Burman design, it was determined that Na-benzoate, glucose, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂ concentrations, temperature and initial pH have positive effects, but NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄ ve FeSO₄ concentrations have negative effects on the ccMA production. In Pareto chart, the effects (Na-benzoate, NaCl, (NH₄)₂SO₄ concentrations and initial pH) above the “Bonferroni” limit was determined to be the most effective parameters on production. Then, the effects of these factors were examined with RSM and their optimum values were determined as; 16.93 mM, 0.9 g/L and 1.8 g/L and 7.97, respectively. The optimum values of the other parameters were determined as; 20 mM glucose, 35 °C temperature, 18 g/L Na₂HPO₄, 10 g/L KH₂PO₄, 150 µM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ and 13 µM FeSO₄. ccMA concentrations under non-optimized condition, optimized condition and with using RSM were obtained; 0.126, 0.401 and 0.5895 mM, respectively. Thus, compared with the non-optimized conditions, about 6-fold increase was achieved on the ccMA production by using RSM.

December 2018, 99 pages

Key Words: *cis, cis*-Muconic acid, adipic acid, microbial production, *Pseudomonas putida*.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın en başından itibaren beni daima destekleyen, bilgi ve tecrübeleriyle bilimsel anlamda her zaman yol gösterici olan, ilgi ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen, her anlamda yanımda olduğunu hissettiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansımın ilk dönemlerinde derslerine girmekten büyük keyif aldığım, öneri ve fikirleriyle çalışmalarımı her daim destekleyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Afife GÜVENÇ'e (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) çok teşekkür ederim. Çalışmamın ilk aşamalarında karşılaştığım zorluklarda bilgi ve birikimiyle yol gösterip bu güçlükleri kolaylıkla atlatmamı sağlayan değerli hocam Dr. Nilüfer VURAL'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü) çok teşekkür ederim.

Laboratuvara geldiğim ilk günden beri samimiyeti ve yardımseverliği ile yanımda olan, çalışmamı yakından takip ederek yardım ve önerilerini hiç bir zaman esirgemeyen, her türlü dert ve sevincimi içtenlikle dinleyip desteğini hep hissettiren, çalışmalarında göstermiş olduğu titizliği kendime örnek aldığım sevgili hocam Araş. Gör. Rahime SONGÜR'e (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü) içtenlikle teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başlama kararını aldığım andan itibaren bana yoldaş olan, uzun ve yorucu çalışma saatlerinde varlığıyla beni motive eden, birbirimizin sevinç ve üzüntüsünü paylaştığımız canım arkadaşım Azime ARIKAYA'ya desteğini esirgemeyip yanımda olduğu için çok teşekkür ediyorum.

'*cis*, *cis*-Mukonik Asitin *Pseudomonas putida* Biyokatalizörlüğünde Mikrobiyal Üretimi' konulu yüksek lisans çalışmamı 17L0443004 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi ile destekleyen Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Son olarak, yaşamımın her anında olduğu gibi yüksek lisans çalışmam süresince de beni destekleyip asla yalnız bırakmayan, sıkıntı ve sevinçlerime ortak olan, destekleriyle bu süreci başarıyla tamamlamamı sağlayan sevgili babam Aydın UZUN'a ve annem Melda UZUN'a, küçüklüğümden beri kendime örnek aldığım, kararlarımda önemli rol oynayan, bilgi ve pratik zekasına hayranlık duyduğum canım abim Mehmet Serdar UZUN'a her şey için çok teşekkür ediyor ve çalışmamı onlara ithaf ediyorum.

Fatma Elif UZUN
Ankara, Aralık 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 <i>cis, cis</i> -Mukonik Asitin Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2 <i>cis, cis</i> -Mukonik Asitin Kullanım Alanları	5
2.3 <i>cis, cis</i> -Mukonik Asitin Kimyasal Üretimi	5
2.4 <i>cis, cis</i> -Mukonik Asitin Biyokimyasal Üretimi	6
2.4.1 Aromatik bileşiklerinden mukonik asit üretiminde katekolden orto ayrılması yol izi ile mukonik asit üretimi	6
2.4.2 Yenilenebilir kaynaklardan <i>de novo</i> yol izi ile mukonik asit üretimi.....	7
2.4.3 3-dehidroşikimat ile mukonik asit üretimi	8
2.4.4 Antranilat ile mukonik asit üretimi.....	9
2.5 Sodyum Benzoat	10
2.5.1 Sodyum benzoatın yapısı ve özellikleri	10
2.5.2 Sodyum benzoatın kullanım alanları	11
2.6 Mikrobiyal Üretim	12
2.7 Mikroorganizmalar	13
2.7.2 Mikroorganizmaların adlandırılması.....	15
2.7.3 Mikroorganizmaların çoğalmasına etki eden faktörler.....	15
2.7.4 Mikroorganizmalarda beslenme.....	17
2.8 Bakteriler	18
2.8.1 Bakterilerin morfolojik özellikleri.....	18
2.8.2 Bakterilerin hücre yapısı	20
2.9 <i>Pseudomonas putida</i>	21
2.9.1 Sınıflandırılması	22
2.9.2 Hücre yapısı ve metabolizma	23
2.10 İstatistiksel Deney Tasarımı	23
2.11.1 Varyans Analizi	26
2.11.2 Plackett-Burman deney tasarımı	28
2.11.3 Cevap yüzey yöntemi (RSM).....	30
2.11.4 Merkezi kompozit deney tasarımı (Central composite design, CCD).....	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	41
3.1 Materyal	41
3.2 Yöntem	41
3.2.1 Mikroorganizma ve kültür koşulları.....	41
3.2.2 Mikroorganizma kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması	43
3.2.4 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit üretimi için ortam koşulları tasarımı	46

3.2.5 Plackett-Burman deney tasarımı ile ortam koşullarının belirlenmesi	47
3.2.6 Cevap yüzey yöntemi (RSM) ile ortam koşullarının optimizasyonu.....	48
3.3 Analiz Sistemi	49
3.3.1 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit ve Na-benzoat kalibrasyon doğrularının oluşturulması.....	51
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	53
4.1 Mikroorganizma Çoğalma Eğrisi	54
4.2 <i>cis, cis</i> -Mukonik Asit Üretimi İçin Deney Tasarımı.....	55
4.2.1 Plackett-Burman deney tasarımı ile en etkili ortam koşullarının belirlenmesi	57
4.2.2 Cevap yüzey yöntemi (RSM) ile ortam koşullarının optimizasyonu.....	66
5. SONUÇ.....	82
5.1 Değerlendirme	82
5.2 Öneriler	86
KAYNAKLAR	88
EKLER.....	93
EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.....	94
EK 2 Mikroorganizma Çoğalma Ortamından Alınan Örneklerin Seyreltme Oranları, Absorbans, Yaş ve Kuru Hücre Derişimi Değerleri.....	95
EK 3 Mikroorganizma Çoğalma Eğrisi için Elde Edilen Mikroorganizma Derişimi Değerleri	96
EK 4 Ön Çalışmalar Sonucu Elde Edilen Mikroorganizma Derişimi Sonuçları	97
EK 5 Ön Çalışmalar Sonucu Elde Edilen <i>cis, cis</i> -Mukonik Derişimi Sonuçları	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Önem seviyesi
C_x	Mikroorganizma derişimi, g/L
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
CO_2	Karbondioksit
$FeSO_4$	Demir sülfat
g	Gram
H_2SO_4	Sülfürik asit
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
L	Litre
$MgSO_4$	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
MS_{Hata}	Hata değeri için karelerin ortalaması
MS_{x_i}	i. bağımsız değışken için karelerin ortalaması
N_2O	Diazotmonoksit
Na-Benzoat	Sodyum benzoat
NaCl	Sodyum klorür
Na_2HPO_4	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
nm	Nanometre
$^{\circ}C$	Santigrat
R^2	Regresyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SS_{Hata}	Hata değeri için karelerin toplamı
SS_{x_i}	i. bağımsız değışken için karelerin toplamı
t	Zaman, h
T	Sıcaklık, $^{\circ}C$
X_i	i.-bağımsız değışkeninin kodlanmamış (gerçek) değeri
X_i^*	Merkez noktasındaki i.bağımsız değışkeninin kodlanmamış değeri
x_i	i. bağımsız değışkenin (faktör) kodlanmış değeri
x_i^2	i. bağımsız değışkenin karesel etkisi
$x_i x_j$	i. ve j. bağımsız değışkenin ikili etkileşimi
$x_i x_j x_k$	i., j. ve k. bağımsız değışkenin etkileşimi
ΔX_i	Merkez noktasındaki gerçek değeri ile bir değışkenin üst veya alt seviyesindeki gerçek değeri arasındaki mesafe

Kısaltmalar

ADO	Antranilat 1,2-dioksijenaz
AroY	Protokatekuat dekarboksilaz
AroZ	3-Dehidroşikimat dehidrataz

CatA	Katekol 1,2-dioksijenaz
CCD	Central composite design (merkezi kompozit deney tasarımı)
ccMA	<i>cis, cis</i> -Mukonik asit
DAHP	3-Deoksi-D-arabino heptulosonat-7-fosfat
DHS	3-Dehidroşikimat
DHQ	3-Dehidrokinat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E4P	Eritoz 4-fosfat
E.C.	Enzyme commission
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PEP	Fosfoenolpiruvat
PET	Polietilentereftalat
RSM	Response surface methodology (cevap yüzey yöntemi)
DOE	Design of experiment (deney tasarımı)
LB	Luria Bertani
UV/VIS	Ultraviolet/Visible
HPLC	High performance liquid chromatography
PVDF	Poliviniliden florid
PBD	Plackett-Burman design

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>cis, cis</i> -Mukonik asitin molekül yapısı	4
Şekil 2.2 Mukonik asitin izomerlerinden elde edilen endüstriyel ürünler	5
Şekil 2.3 Katekol orto ayrılması yol izi ile aromatik bileşiklerden mukonik asit sentezi.....	7
Şekil 2.4 3-dehidroşikimat yolu ile mukonik asit sentezi	9
Şekil 2.5 Antranilat ile mukonik asit sentezi	10
Şekil 2.6 Sodyum benzoatın molekül yapısı	11
Şekil 2.7 Mikroorganizmaların mikroskop altında görüntüleri.....	13
Şekil 2.8 Farklı bakteri morfolojileri	19
Şekil 2.9 Bir bakterinin temel hücre yapısı.....	20
Şekil 2.10 Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarının karşılaştırılması	20
Şekil 2.11 <i>Pseudomonas putida</i> PRS2000'nin elektron mikroskopu altında görüntüsü.....	21
Şekil 2.12 Bir süreç veya deneyin genel şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.13 Olasılık grafiği.....	26
Şekil 2.14 Alfa değerlerine göre merkezi kompozit deney tasarımı türleri	33
Şekil 2.15 <i>P.putida</i> KT2440-JD1 biyokatalizörlüğünde benzoik asitten <i>cis, cis</i> -mukonik asit üretimi	37
Şekil 3.1 Deney yöntemi basamaklarının şematik gösterimi	41
Şekil 3.2 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) hücrelerinin katı ortamda çoğalmış hali	45
Şekil 3.3 Yaş hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiği.....	45
Şekil 3.4 Kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiği.....	45
Şekil 3.5 <i>cis, cis</i> -mukonik asit-su çözeltisinin (0.03 mM) HPLC kromatogramı	48
Şekil 3.6 Na-benzoat-su çözeltisinin (0.6 mM) HPLC kromatogramı.....	48
Şekil 3.7 <i>cis, cis</i> -Mukonik asitin <i>Pseudomonas putida</i> biyokatalizörlüğünde sodyum benzoattan üretiminin t=32 saat örneğinin HPLC kromatogramı.....	49
Şekil 3.8 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit kalibrasyon doğrusu.....	49
Şekil 3.9 Na-benzoat kalibrasyon doğrusu	50
Şekil 4.1 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) yaş hücre çoğalma eğrisi.....	52
Şekil 4.2 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile <i>cis, cis</i> -mukonik asit üretimi için yapılan ön çalışmalarda elde edilen mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi	53
Şekil 4.3 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile <i>cis, cis</i> -mukonik asit üretimi için yapılan ön deneylerde elde edilen <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişiminin zamanla değişimi	54

Şekil 4.4 Mikroorganizma derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı faktörlerin % katkı sonuçlarının ekran görüntüsü	58
Şekil 4.5 <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı faktörlerin % katkı sonuçlarının ekran görüntüsü	60
Şekil 4.6 Mikroorganizma derişimi için Plackett-Burman deney tasarımında yer alan 11 faktörün Pareto grafiği.....	64
Şekil 4.7 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımında yer alan 11 faktörün Pareto grafiği.....	64
Şekil 4.8 Plackett-Burman deney tasarımında yer alan faktörlerin <i>cis, cis</i> -mukonik asit üretimine pozitif ve negatif etkileri	66
Şekil 4.9 Mikroorganizma derişimi için gözlenen deneysel verileri ile tahmin edilen değerlerin değişimi	71
Şekil 4.10 Na-benzoat derişimi ile pH'ın mikroorganizma derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	69
Şekil 4.11 Na-benzoat ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikil etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	69
Şekil 4.12 Na-benzoat ile (NH ₄) ₂ SO ₄ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	73
Şekil 4.13 pH ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	74
Şekil 4.14 pH ile (NH ₄) ₂ SO ₄ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	74
Şekil 4.15 NaCl ile (NH ₄) ₂ SO ₄ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	75
Şekil 4.16 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için gözlenen deneysel verileri ile tahmin edilen değerlerin değişimi	76
Şekil 4. 17 Na-benzoat ile pH'ın <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	77
Şekil 4.18 Na-benzoat ile NaCl derişiminin <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	77
Şekil 4.19 Na-benzoat ile (NH ₄) ₂ SO ₄ derişiminin <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	78
Şekil 4.20 pH ile NaCl derişiminin <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	79
Şekil 4.21 pH ile (NH ₄) ₂ SO ₄ derişiminin <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	80
Şekil 4.22 NaCl ile (NH ₄) ₂ SO ₄ derişiminin <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimine ikili etkisinin a) cevap yüzey grafiği b) kontur çizimi ile gösterimi	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>cis, cis</i> -Mukonik asitin fiziksel ve kimyasal özellikleri	4
Çizelge 2.2 Sodyum benzoatın fiziksel ve kimyasal özellikleri	11
Çizelge 2.3 <i>Pseudomonas putida</i> türü için sınıflandırma	22
Çizelge 2.4 Varyans analizi tablosu	27
Çizelge 2.5 11 faktör ve 12 deneyden oluşan Plackett-Burman tasarım matrisi	29
Çizelge 2.6 <i>cis, cis</i> -Mukonik asitin mikrobiyal üretimi ile ilgili çalışmalar	34
Çizelge 3.1 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) için Luria Bertani (LB) çoğalma ortamı içeriği	41
Çizelge 3.2 Plackett-Burman deney tasarımı seviye ve aralık değerleri	48
Çizelge 3.3 RSM ile deney tasarımı seviye ve aralık değerleri	49
Çizelge 3.4 HPLC analiz koşulları	48
Çizelge 4.1 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile <i>cis, cis</i> -mukonik asit üretiminde 11 faktör için Plackett-Burman deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değerleri	56
Çizelge 4.2 Mikroorganizma derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları	59
Çizelge 4.3 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları	59
Çizelge 4.4 Mikroorganizma ve <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı standart sapma, R^2 ve hassasiyet değerleri	60
Çizelge 4.5 <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile <i>cis, cis</i> -mukonik asit üretiminde 4 faktör için RSM deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değerleri	65
Çizelge 4.6 Mikroorganizma derişimi için RSM deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları	66
Çizelge 4.7 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için RSM deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları	67
Çizelge 4.8 Mikroorganizma ve <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimi için RSM deney tasarımı sonunda elde edilen standart sapma, R^2 ve hassasiyet değerleri	67
Çizelge 4.9 <i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için cevap yüzey yöntemiyle elde edilen optimum değerler	81
Çizelge 4.10 Mikroorganizma ve <i>cis, cis</i> -mukonik asit derişimi için cevap yüzey yöntemiyle elde edilen optimum değerler	81

1. GİRİŞ

Dikarboksilik asitler, yüksek kimyasal reaktiviteleri ve biyobozunur polimerlerin üretiminde öncü madde olarak kullanılmaları sebebiyle kimya endüstrisinde gün geçtikçe daha fazla dikkat çekmektedir (Gorden vd. 2015). Fumarik asit, itakonik asit ve adipik asit gibi önemli birçok doymamış dikarboksilik asit çift bağları ve ikili karboksilik grupları sayesinde endüstriyel öneme sahip olup, sentetik reçine ve biyobozunur polimer üretmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Xie vd. 2014).

Günümüzde yıllık yaklaşık 2.6 milyon tonluk bir üretime ve 6.3 milyar dolarlık küresel bir piyasaya sahip olan (Bhatia vd. 2016) adipik asit, kimya endüstrisinde üretilen en yaygın dikarboksilik asittir. Adipik asit, esas olarak naylon-6,6 üretiminde iki reaktanttan biri olarak kullanılmaktadır. Adipik asit kimyasal olarak, petrokimyasal kaynaklardan olan sikloheksanol ve sikloheksanonun nitrik asit ilavesiyle oksidasyonu ile elde edilmektedir. Bu kimyasal üretim, yüksek sıcaklık ve birden fazla tepkime adımı gerektirmekte olup, bir sera gazı olan diazot monoksit (N_2O) birikmesine neden olmaktadır (Gorden vd. 2015). N_2O emisyonu, dünya çapında insan kaynaklı emisyonun % 5-8'ini oluşturmaktadır. Aynı zamanda N_2O emisyonu küresel ısınmaya, ozon incelmesine, asit yağmuruna ve sise neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucu, N_2O 'nun küresel ısınmaya etkisinin CO_2 'den 280 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Xie vd. 2014).

Adipik asitin üretiminde kullanılan kimyasal yol izinin çevreye olumsuz etkileri ve sonlu fosil kaynaklarına bağımlılığı nedeniyle, son yıllarda biyoteknolojik üretim süreçlerine olan ilgi artmaktadır. Günümüzde, adipik asitin biyoteknolojik üretimine dair herhangi bir yol izi bulunmamaktadır. Bu nedenle, adipik asitin öncü maddesi olan *cis*, *cis*-mukonik asitin biyoteknolojik yolla üretimi ve hidrojenasyon ile adipik asite dönüştürülmesi tercih edilmektedir (Weber vd. 2012).

Literatürde *cis, cis*-mukonik asitin biyokatalitik üretimi için genel olarak iki yaklaşım tanımlanmaktadır. İlk yaklaşım; benzoat, toluen ya da katekol gibi substratların ve biyokatalizör olarak *Pseudomonas putida* mutanı ya da pEcatA plazmidi içeren *Escherichia coli* BL21 (DE3)'nin kullanıldığı tüm hücre biyotransformasyonudur (Gorden vd. 2015).

cis, cis-Mukonik asitin biyokatalitik üretimi için ikinci yaklaşım, D-glukozdan birçok basamak ile dönüşümüdür. pKD136/pKD8.243A/pKD8.292 plazmidi içeren *E. coli* AB2834 mutant bakterisi D-glukozdan katekol ve daha sonra *cis,cis*-mukonik asit üretimi için kullanılmaktadır. Katekolden *cis, cis*-mukonik asit dönüşümünü pKD8.292 plazmidindeki *catA* genine şifrelenmiş katekol-1,2 dioksijenaz enzimi katalizlemektedir (Gorden vd. 2015).

cis, cis-Mukonik asitin mikrobiyal üretimi ile elde edilen verimin yüksek olması için istenilen özelliklere sahip mikroorganizma belirlendikten sonra bu mikroorganizma türüne en uygun substrat, karbon ve azot kaynakları seçilmelidir. Biyokatalizörün performansını arttırmak için substrat, karbon ve azot kaynaklarının türü ve derişimlerine, ortamın pH, sıcaklık, oksijen derişimi değerlerine ve kofaktör ihtiyacına dikkat edilmelidir. Fermentasyon ortamında inhibisyonu önlemek için beslenen substrat ve oluşan ürün derişimlerinin etkisini incelemek gerekmektedir. Üretilen maddenin farklı alanlarda endüstriye kazandırılması amacıyla biyoteknolojik yöntem ile üretimde optimum koşulların belirlenmesi ürün derişim ve verimini arttırmak için önemlidir. Son yirmi yıldır, endüstriyel biyoteknolojinin sürdürülebilirlik, çevre dostu olması ve ucuz hammaddelerinin kullanılması gibi sunduğu avantajlara bağlı olarak bu bileşimin de biyoteknolojik yolla üretilmesi önemli alternatif bir yol olmaktadır (Vardon vd. 2016).

Mikrobiyal yolla ürün elde edilmesinde mikroorganizmanın çoğalabilmesi ve istenilen ürünü maksimum verimlilikte üretebilmesi için bazı parametrelerin (faktörlerin) optimize edilmesi gerekmektedir. Bir mikrobiyal ürün üretiminin optimize edilebilmesi, geleneksel ya da istatistiksel yolla gerçekleştirilebilmektedir. Geleneksel yöntem, araştırmanın her aşamasında sadece bir faktörün değiştirilmesi ve diğer faktörlerin sabit

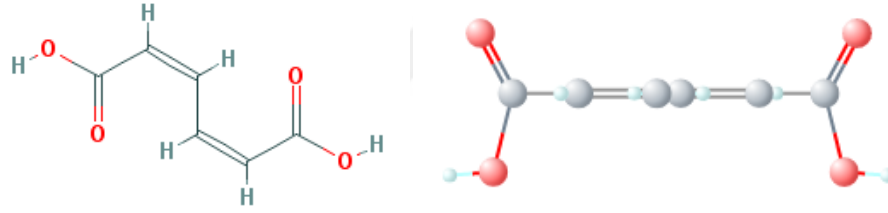
bir değerde tutulması ile uygulanmaktadır. Buna karşın istatistiksel deney tasarımları kısa zamanda ve daha güvenilir sonuç elde edebilme, ürün üzerine etki eden faktörlerin etkileşimini belirleyebilme, uygulanan deney sayısında azalma gibi avantajlara sahiptir. Bu nedenle, istatistiksel deney tasarım yöntemleri zaman, enerji ve parasal yönden daha ekonomik yöntemlerdir (Özkan vd. 2013).

Bu çalışmada, *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) mikroorganizması tarafından sodyum benzoat ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi için üretim ortamı tasarımı Plackett-Burman deney tasarımı ile gerçekleştirilmiştir. Faktör sayısı çok olduğunda en etkili faktörlerin belirlenmesinde uygulanan bu yöntemde; sodyum benzoat, glukoz, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄ derişimi, sıcaklık ve pH'ın üretime etkisi incelenmiştir. Plackett-Burman deney tasarımı ile en etkili faktörler ve seviyeleri belirlendikten sonra bu faktörlerin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Üretim ortamı koşulları seviye ve aralıkları belirlenerek Design Expert (7.0) ile tasarımı gerçekleştirilmiş ve optimum koşullar elde edilmiştir. Bu amaçla, *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri uygun ortam koşullarında çoğaltılmış ve optimize edilecek üretim ortamına aktarılarak fermentasyon gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *cis, cis*-Mukonik Asitin Yapısı ve Özellikleri

Mukonik asit, reaktif dikarboksilik grupları ve eşlenik çift bağ içeren stereoözümlü yapısı sayesinde gelecek vadeden bir kimyasaldır. *Trans, trans*-mukonik asit, *cis, trans*-mukonik asit ve *cis, cis*-mukonik asit olmak üzere üç izomere sahiptir (Xie vd. 2014). *cis, cis*-Mukonik asit (IUPAC adı: (2*Z*,4*Z*)-hekza-2,4-diendioik asit, CAS No: 1119-72-8) şeker ve lignin türevi aromatik bileşiklerin biyolojik olarak dönüştürülmesiyle yenilenebilir kaynaklardan üretilebilen çoklu doymamış dikarboksilik asittir (Vardon vd. 2016). Kapalı formülü $C_6H_6O_4$ olan *cis, cis*-mukonik asitin açık formülü ve üç boyutlu yapısı şekil 2.1’de, *cis, cis*-mukonik asite ait bazı fiziksel ve kimyasal özellikler ise çizelge 2.1’de verilmiştir.



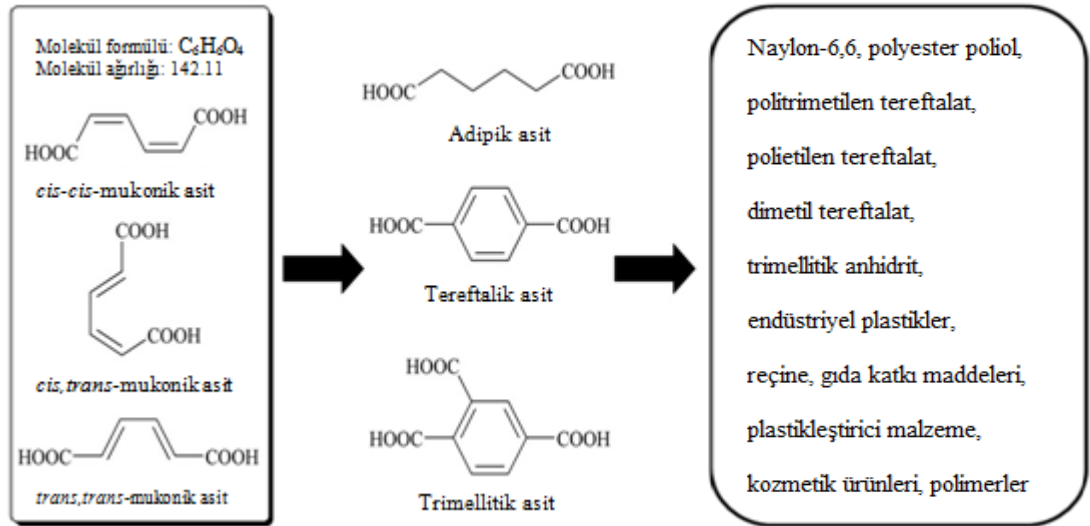
Şekil 2.1 *cis, cis*-Mukonik asitin molekül yapısı

Çizelge 2.1 *cis, cis*-Mukonik asitin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik	<i>cis, cis</i> -Mukonik Asit
IUPAC Adı	(2 <i>Z</i> ,4 <i>Z</i>)-hekza-2,4-diendioik asit
Molekül Formülü	$C_6H_6O_4$
Molekül Ağırlığı (g/mol)	142.11
Renk/Görünüş	Beyaz kristaller
Erime Noktası (°C)	194-195
Kaynama Noktası (°C)	345
Yoğunluk (g/mL)	1.366
Çözünürlük	Etanol, 2-propanol, asetik asit, su
Sağlık Açısından Zararı	Tahriş edici

2.2 *cis, cis*-Mukonik Asitin Kullanım Alanları

Mukonik asitin *trans*, *trans*-mukonik asit, *cis*, *trans*-mukonik asit ve *cis*, *cis*-mukonik asit izomerlerine sahip olması sayesinde sanayinin birçok alanında hammadde olarak kullanılmakta ve adipik asit, tereftalik asit ve trimellitik asit gibi ticari açıdan önemli kimyasal maddelerin üretiminde geniş yer bulmaktadır (Şekil 2.2). Mukonik asitin izomerlerinden elde edilen bu kimyasal maddeler endüstri açısından önemli olan; naylon-6,6, polimetilentereftalat, polietilentereftalat (PET), dimetiltereftalat, trimellitik anhidrit, endüstriyel plastikler, reçineler, polyester polioller, gıda katkı maddeleri, plastikleştirici malzeme, polimerler ve bazı kozmetik ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır (Bui vd. 2013).



Şekil 2.2 Mukonik asitin izomerlerinden elde edilen endüstriyel ürünler (Xie vd. 2014)

2.3 *cis, cis*-Mukonik Asitin Kimyasal Üretimi

Mukonik asit üretimi için geleneksel kimyasal prosesler; yenilenemeyen petrol esaslı hammaddelerden, yüksek derişimli ağır metal katalizörleri ile üretim ya da katekolden *cis*, *cis*-mukonik asit ve *cis*, *trans*-mukonik asit karışımının elde edilmesi prosesine dayanmaktadır. Bu prosesler çevre kirliliği ve petrol kaynaklarının tükenmesine neden

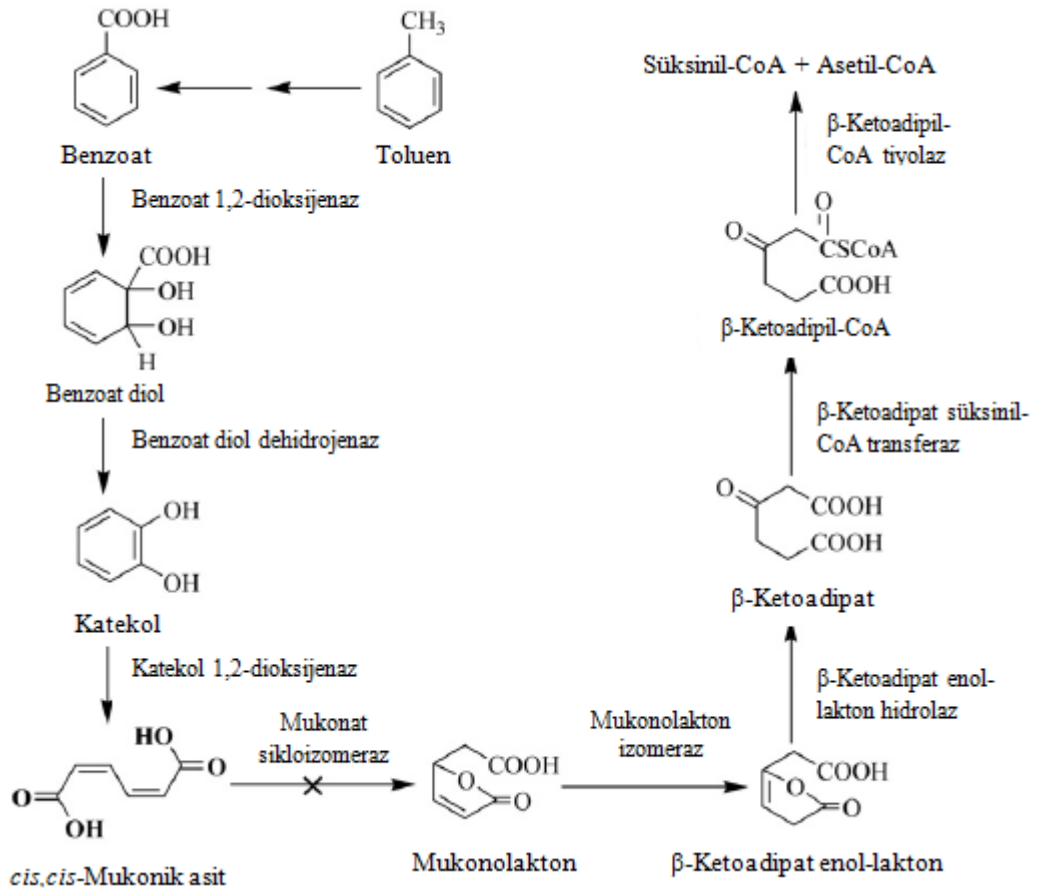
olup, aynı zamanda yüksek maliyetli ayırma işlemi gerektirmektedir. Biyoteknolojik prosesler ise sürdürülebilir, çevre dostu, düşük maliyetli ve ucuz karbonhidrat hammaddelerine dayanmaktadır (Pandell vd. 1976).

2.4 *cis*, *cis*-Mukonik Asitin Biyokimyasal Üretimi

2.4.1 Aromatik bileşiklerinden mukonik asit üretiminde katekolden orto ayrılması yol izi ile mukonik asit üretimi

Aromatik bileşikler, dünya biyokütlesinin yaklaşık dörtte birini içermekte ve doğadaki organik bileşiklerin en yaygın ikinci sınıfıdır. Benzoat, toluen, benzen, fenol, anilin, antranilat, mandelat ve salisilat gibi birçok aromatik bileşik, bazı bakteriler tarafından ara bileşik olan katekole dönüştürülmek üzere oksidasyona uğramaktadırlar. Katekolün aromatik halkası, bakterinin türüne bağlı olarak orto ve meta olmak üzere iki yolla ayrılabilir (Wells ve Ragauskas, 2012). Katekolün orto ayrılması yol izinde, katekol 1,2-dioksijenaz (E.C. 3.1.11.1, catA) enzimi aromatik halkanın intradiol ayrılmasını sağlayarak mukonik asiti üretmektedir (Şekil 2.3) (Xie vd. 2014).

Benzoat kararlı, suda çözünebilen ve uçucu olmayan bir bileşiktir, bu nedenle de su fazlı bir sistemde kullanımı kolaydır (Yoshikawa vd. 1990). Bu avantajlarının yanında oldukça düşük fiyatlı olması benzoatı, mukonik asit üretiminde kullanılan en yaygın hammaddelerden biri haline getirmektedir. β -ketoasit yol izine göre benzoat öncelikle benABC tarafından kodlanan benzoat 1,2-dioksijenaz (E.C. 1.14.12.10) ile katalize edilen benzoat diolüne dönüştürülür. Daha sonra benzoat diolünün katekole dekarboksilasyonu, benD tarafından kodlanan benzoat diol dehidrojenaz (E.C. 1.3.1.25)



Şekil 2.3 Katekol orto ayrılması yol izi ile aromatik bileşiklerden mukonik asit sentezi (Xie vd. 2014)

tarafından gerçekleştirilir. Katekolün hidroksil grupları arasındaki halka bölünmesi CatA ile kodlanan katekol 1,2-hidrojenaz tarafından gerçekleştirilir ve mukonik asit oluşur. Mukonik asit daha sonra catB tarafından kodlanan mukonat sikloizomeraz (E.C. 5.5.1.1) ile mukonolaktona dönüştürülür. Mukonolakton birkaç metabolik adımdan sonra trikarboksilik asit ara maddelerine dönüştürülür (Şekil 2.3).

2.4.2 Yenilenebilir kaynaklardan *de novo* yol izi ile mukonik asit üretimi

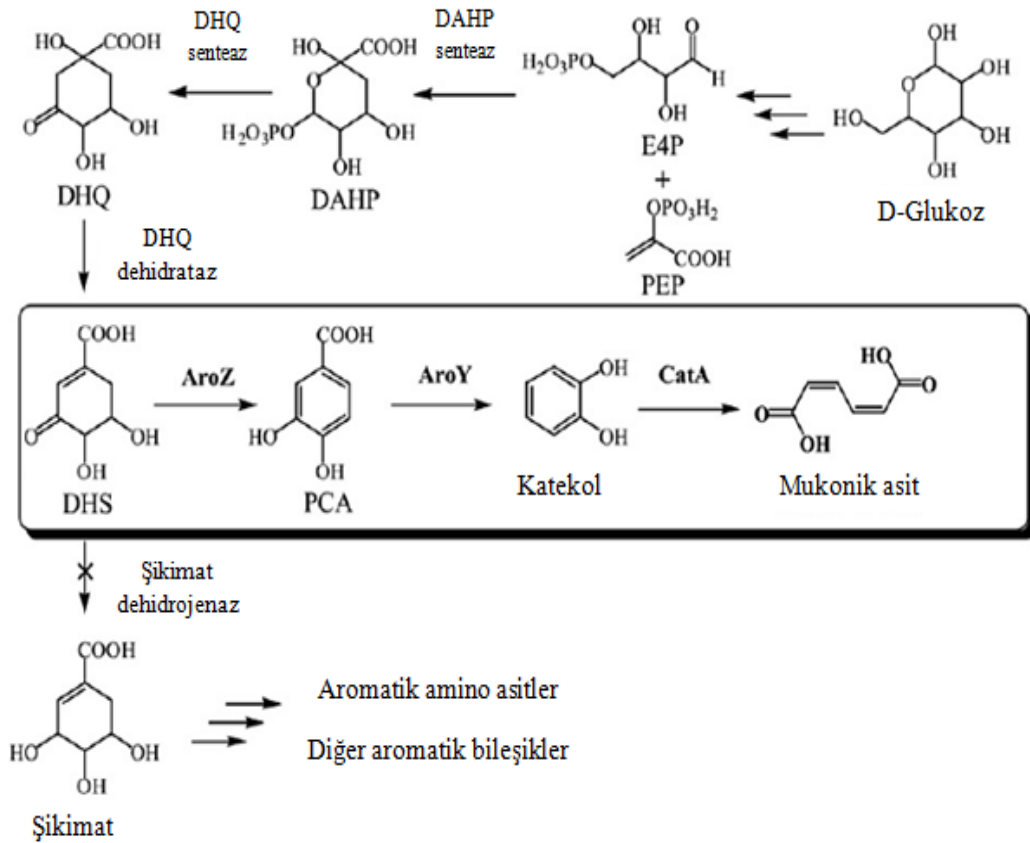
Mevcut durumda, yukarıda bahsedilen yöntemlerin hiç biri toksik ve petrol esaslı hammadde sorununu ortadan kaldırmamaktadır. İlk olarak Draths ve Frost (1994), “engineered *Escherichia coli*” ile substrat olarak nişastadan ve mısır, şeker kamışı, şeker pancarı ve odun hamurunda bulunan lignoselülozdan elde edilebilen D-glukoz

kullanarak mukonik asit sentezi için alternatif bir yol uygulamışlardır. Yeni bir *de novo* biyosentetik yola dayalı bu umut verici yaklaşım, daha önce uygulanan yöntemlere kıyasla daha çevre dostu ve sürdürülebilir bir mukonik asit üretimi sağlamaktadır (Xie vd. 2014).

2.4.3 3-dehidroşikimat ile mukonik asit üretimi

D-glukozun mukonik asite biyokatalitik olarak dönüştürülmesi için yapay biyosentetik bir yol oluşturmayı gerektirmektedir (Şekil 2.4). Metabolik mühendislik ürünü bu yol, mikroorganizmalarda ve bitkilerde aromatik amino asitlerin biyosentetik yolu olan şikimik asit yol izine dayanmaktadır. Şekil 2.4'den de görüldüğü gibi bu yolla; ilk olarak fosfoenolpiruvat (PEP) ve eritoz 4-fosfat (E4P), *E. coli*'deki DAHP senteaz (EC 2.5.1.54) tarafından 3-deoksi-D-arabino heptulosonat-7-fosfata (DAHP) katalizlenir. İkinci adımda DAHP, DHQ senteaz (EC 4.2.3.4, aroB ile kodlanmıştır) tarafından 3-dehidrokinata (DHQ) dönüştürülür. Daha sonra DHQ, DHQ dehidrataz (EC 4.2.1.10, aroD ile kodlanmıştır) tarafından 3-dehidroşikimata (DHS) dönüştürülür ve DHS şikimat dehidrojenaz (EC 1.1.1.25, aroE ile kodlanmıştır) aracılığıyla şikimik asite indirgenir ve böylece NADPH tüketilir (Xie vd. 2014).

Yapısında şikimat dehidrojenaz enziminin bulunmadığı *E.coli* mutanlığı, aroZ (3-dehidroşikimat dehidratazı kodlar, AroZ), aroY (protokatekuat dekarboksilazı kodlar, AroY) ve catA gibi heterolog genlerin bulunduğu konakçı organizma olarak tercih edilmiştir (Bui vd. 2013). Şikimat dehidrojenaz enzimi yokluğunda şikimik asit yolu bloke edilmiş olur ve böylece DHS şikimata dönüştürülemez. Bu aşamada DHS substrat görevi görerek AroZ tarafından protokatekuata dönüştürülür. Daha sonra, AroY protokatekuattan katekol oluşmasını katalize eder ve CatA katekolü mukonik asite dönüştürür (Şekil 2.4).

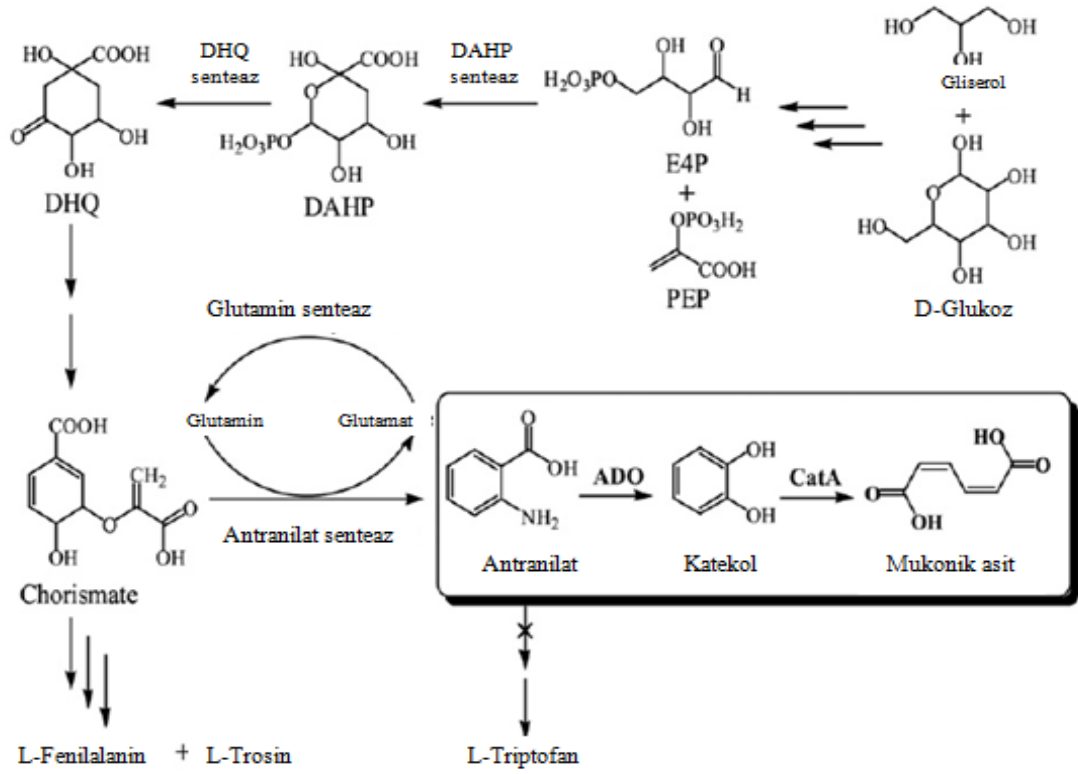


Şekil 2.4 3-dehidroşikimat yolu ile mukonik asit sentezi (Xie vd. 2014)

(E4P: eritroz 4-fosfat, PEP: fosfoenolpiruvat, DAHP: 3-deoksi-D-arabino heptulosonat-7-fosfat, DHQ: 3-dehidrokinat, DHS: 3-dehidroşikimat, AroZ: 3-dehidroşikimat dehidrataz, AroY: protokatekuat dekarboksilaz, CatA: katekol 1,2-dioksijenaz)

2.4.4 Antranilat ile mukonik asit üretimi

Şikimik asit yolu ile *E.coli*'de bir çok ara maddenin dönüşümü sonucunda chorismate oluşmaktadır (Şekil 2.5). Triptofan biyosentetik yolunda ise, chorismate antranilat sentez tarafından antranilata dönüştürülür. Bu yapay biyosentetik yolda, triptofan yolundaki ilk ara madde olan antranilat *Pseudomonas aeruginosa*'daki antranilat 1,2-dioksijenaz (ADO) ile katekole dönüştürülür, daha sonra *Pseudomonas putida*'dan elde edilen CatA ile katekolden mukonik asit elde edilir (Şekil 2.5) (Xie vd. 2014).



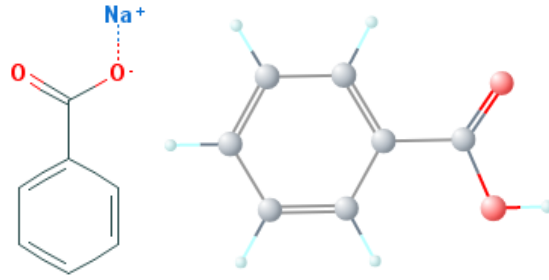
Şekil 2.5 Antranilat ile mukonik asit sentezi (Xie vd. 2014)

(E4P: eritroz 4-fosfat, PEP: fosfoenolpiruvat, DAHP: 3-deoksi-D-arabino heptulosonat-7-fosfat, DHQ: 3-dehidrokinat, ADO: antranilat 1,2-dioksijenaz, CatA: katekol 1,2-dioksijenaz)

2.5 Sodyum Benzoat

2.5.1 Sodyum benzoatın yapısı ve özellikleri

Sodyum benzoat, $\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_2$ kapalı formülüne sahip, E211 kodlu gıda koruyucu olarak kullanılan bir kimyasaldır. Benzoik asidin sodyum tuzu olup, suda çözündüğünde bu formda bulunmaktadır. Sodyum hidroksit ve benzoik asit ile tepkimeye girerek üretilen sodyum benzoatın (Na-benzoat, Cas No: 532-32-1) açık formülü ve üç boyutlu yapısı şekil 2.6'da, sodyum benzoata ait bazı fiziksel ve kimyasal özellikler ise çizelge 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.6 Sodyum benzoatın molekül yapısı

Çizelge 2.2 Sodyum benzoatın fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik	Sodyum Benzoat
IUPAC Adı	Sodyum benzoat
Molekül Formülü	NaC ₇ H ₅ O ₂
Molekül Ağırlığı (g/mol)	144.10
Renk/Görünüş	Beyaz toz kristaller
Erime Noktası (°C)	410-430
Yoğunluk (g/mL)	1.497
Çözünürlük	Su, amonyak, piridin, methanol, etanol, 1,4-dioksan

2.5.2 Sodyum benzoatın kullanım alanları

Sodyum benzoat, bakteriyostatik ve fungitatik özelliğinden dolayı E211 koduyla gıda koruyucu olarak kullanılan bir kimyasaldır. En yaygın olarak salata sosları (sirke, asetik asit), karbonatlı içecekler (karbonik asit), reçeller ve meyve suları (sitrik asit), turşu (asetik asit) ve baharat gibi asidik gıdalarda, ilaç ve kozmetikte kullanılmaktadır. Sodyum benzoat ve potasyum benzoat, ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından “genel olarak güvenli” bileşikler arasında listelenen ve gıdalarda en fazla % 0.1 derişimde mevcut olabilmektedir (Lennerz vd. 2014).

Sodyum benzoat, aminoasitleri bağlayabilme özelliği sayesinde üre döngüsü bozuklukları için bir tedavi olarak kullanılmaktadır. Böylece, aminoasitlerin atılımına ve amonyak seviyesinin azalmasına yardımcı olmaktadır. Son zamanlardaki araştırmalar, sodyum benzoatın şizofreni ve hiperaktivite tedavisinde faydalı olabileceğini göstermiştir (Lennerz vd. 2014).

2.6 Mikrobiyal Üretim

“Biyoteknoloji” terimi, ilk kez 1991 yılında Macar mühendis Karl Erkey tarafından ortaya çıkmış ve o yıllarda biyoteknoloji, biyolojik kökenli hammaddelerden yeni ürünlerin üretimi için canlı organizmaların kullanımını kapsamaktadır. 1981’de Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) biyoteknolojiyi, “maddelerin biyolojik faktörlerle elde edilme prosesinin, bilimsel ve mühendislik ilkelerine dayanarak uygulanması” şeklinde tanımlamıştır (McCreath vd. 2017).

Son yıllarda biyoteknoloji terimi, biyoteknoloji ile birbirinin yerine kullanılmıştır ve genetik modifikasyonla ve moleküler biyoloji yöntemlerinin hedeflenen kullanımıyla neredeyse eşanlı hale gelmiştir. Avrupa Biyoteknoloji Federasyonu ise biyoteknolojiyi, “mikroorganizma/doku hücrelerinin endüstriyel uygulamalarında kullanılmak üzere biyokimya, mikrobiyoloji ve mühendislik bilimlerinin bütünleştirilmesi” şeklinde tanımlamaktadır. OECD’nin 2003 yılındaki tanımı ise, “bilimsel ve mühendislik ilkelerinin, mal ve hizmetlerin sağlanması için biyolojik ajanlarla madde üretim proseslerine uygulanmasıdır; yeni biyoteknoloji, sorunları çözmek veya ürünler üretmek için hücrel ve moleküler süreçlerin kullanımını içerir.” şeklindedir (McCreath vd. 2017).

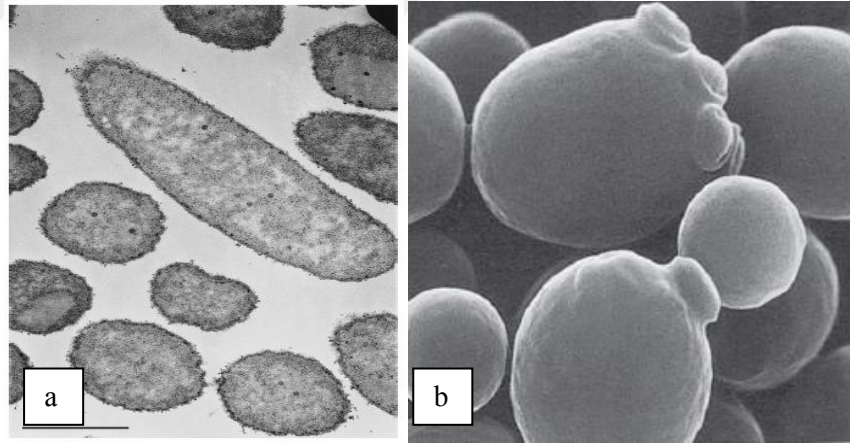
Bu nedenle, biyoteknoloji; mikroorganizma ve doku hücreleri, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, genetik, fizyoloji ve biyokimya gibi doğa bilimlerinin yanı sıra birçok mühendislik alanından da faydalanarak, yeni ilaçlar ve doğal olarak var olmayan ürünlerin üretilmesi ve geliştirilmesi için ortaya çıkan disiplinler arası bir alandır (McCreath vd. 2017).

Mikrobiyal üretim, mikroorganizma veya türevleri aracılığıyla substratların fermentasyon ile gıda, enzim, organik asit, alkoller ve polimerler gibi değerli ürünlere dönüştürülmesidir. Mikroorganizmalar; özellikle bakteri, mantar ve mayalar, geleneksel fermente gıdalar, süt ürünleri, enzim, vitamin, polisakkarit, polihidrik alkol, pigment,

lipit ve glikolipidlerin üretimi gibi dünya çapında birçok endüstriyel ve geleneksel gıda sektöründe kullanılmaktadır. Bu ürünlerin bazıları ticari olarak üretilirken, diğerleri sahip oldukları potansiyel nedeniyle biyoteknoloji alanında değerlidir. Günümüzde, ekonomik olarak önemli fermentasyon ürünlerinin geliştirilmiş üretimi, hedeflenen genetik mühendisliği tekniklerine geniş fayda sağlamıştır (Bhownik vd. 2018).

2.7 Mikroorganizmalar

Mikroorganizma veya mikrop, tek hücreli formunda veya bir hücre kolonisinde bulunabilen mikroskopik bir organizmadır. Mikroorganizmalara bakteri, maya, küf ve algler örnek verilebilmektedir. Tek bir hücre, çıplak gözle görülemezken tek bir hücreden milyonlarcası çoğalarak koloni adı verilen ve çıplak gözle görülebilen yapılar oluşturmaktadır (Demain 2000). Şekil 2.7'de *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 2.7 Mikroorganizmaların mikroskop altında görüntüleri (Demain 2000)

a. *Escherichia coli*, b. *Saccharomyces cerevisiae*

2.7.1 Mikroorganizmaların sınıflandırılması

Mikroorganizmaların gözle görülemeyecek kadar küçük olması çoğu özelliğinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, yapılan sınıflandırmalar mikrobiyolojik

tekniklerin geliştirilmesiyle yeniden düzenlenmiştir. Mikroorganizmaların farklı özelliklerinin göz önünde bulundurulmasıyla yapılan sınıflandırmalar aşağıda sıralanmıştır.

✓ **Hücre yapılarına göre:**

1. Prokaryotik hücreye sahip mikroorganizmalar (bakteriler),
2. Ökaryotik hücreye sahip mikroorganizmalar (mantar, maya, alg ve protozoa),
3. Tam bir hücre yapısı göstermeyen, yaşamaları için gerekli metabolik aktiviteleri yetersiz olan (canlı bir organizmaya ihtiyaç duyan) mikroorganizmalar (virüsler).

olarak sınıflandırılmaktadır.

✓ **Oksijen ihtiyaçlarına göre:**

1. Aerobik mikroorganizmalar: Üreme ve yaşamaları için havadaki oksijene ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır.
2. Fakültatif mikroorganizmalar: Aerobik ve anaerobik koşullarda üreyebilme özelliğine sahiptir.
3. Anaerobik mikroorganizmalar: Üreme ve yaşamaları için havadaki oksijene ihtiyaç duymayan mikroorganizmalardır.
4. Mikroaerofilik mikroorganizmalar: Bu mikroorganizmalar, oksijen oranı % 1–5'e kadar düşürülmüş ortamlarda veya ortamdaki CO₂ miktarı % 5–10'e ulaştığında üreme ve yaşama olanağına sahiptir.

✓ **Sıcaklık ihtiyaçlarına göre:**

1. Psikrofil (soğuk seven) mikroorganizmalar
2. Mezofil (ılık seven) mikroorganizmalar
3. Termofil (sıcak seven) mikroorganizmalar

✓ **Karbon kaynağına göre:**

1. İnorganik karbon kaynağından yararlananlar (Ototrof): Kendisi için gerekli olan karbonu inorganik karbonlu bileşiklerden elde eden mikroorganizmalardır.

2. Organik karbon kaynağından yararlananlar (Heterotrof): Karbon kaynağı olarak organik bileşiklerden (karbonhidrat, amino asit, vitamin vs.) yararlanan mikroorganizmalardır (Pamir 1985).

2.7.2 Mikroorganizmaların adlandırılması

Mikroorganizmalar adlandırılırken belli bir düzen ve kurala göre yapılması, pratiklik kazandırıp büyük yarar sağlamaktadır. Mikroorganizmaların bilimsel olarak adlandırılırken iki kelime kullanılmaktadır. Bu kelimelerden ilki cinsini, ikincisi ise türünü belirtmektedir. Cins ismi genellikle mikroorganizmayı bulan kişinin adını veya morfolojik, fizyolojik veya diğer özelliklerini gösteren bir kelimedenden oluşabilmektedir. Tür adı ise mikroorganizmanın çeşitli karakterlerini (koloni rengi, yer, sebep olduğu hastalık, biçim vs.) yansıtmaktadır.

Her iki ismi de italik harflerle, koyu renkte ya da altı çizili olarak yazılır (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi* vs.). Cins ismi, *B. cereus*, *S. typhi*, *Staph. aureus* (*S. aureus*), *Pr. vulgaris* (*P. vulgaris*) şeklinde kısaltılarak yazılabilmektedir.

2.7.3 Mikroorganizmaların çoğalmasına etki eden faktörler

Mikroorganizmaların çoğalmaları ortam sıcaklığı, pH, nem, osmotik basınç, radyasyon, yüzey gerilimi, besin türü ve miktarları gibi birçok faktörün etkisi altındadır. Bu etkenlerden her birinin mikroorganizmanın çoğalabilmesi için minimum (en düşük), maksimum (en yüksek) ve optimum (ideal: en uygun) değeri vardır.

Mikroorganizmaların hızlı bir şekilde çoğalabildikleri en uygun koşullara optimum (ideal) değer denmektedir. Mikroorganizmaların cins ve türüne bağlı olarak besin ve ortam koşulları farklılıklar göstermektedir.

- ✓ **Ortam sıcaklığı:** Mikroorganizmaların üremelerini büyük ölçüde etkilemektedir. Mikroorganizmalar, kendi türlerine özgü farklı sıcaklıklarda çoğalmaktadırlar. Minimum ve maksimum değerler arasında en iyi çoğalma gösterdikleri sıcaklık derecesine optimum sıcaklık denir. Optimum sıcaklık, her zaman maksimuma daha yakındır.

Mikroorganizmalar, maksimum sıcaklığın üzerinde bir değerde proteinlerin denatüre olması sonucunda ölmektedirler. Mikroorganizmalar, soğuğa sıcaktan daha fazla dayanmaktadır. Minimum sıcaklığı geçince çoğalmaları duran mikroorganizmaların bu sınırın üzerinde bir sıcaklık değerine ulaşılsa bile yaşamlarını hala sürdürebildikleri görülmektedir.

- ✓ **Radyasyon:** Mikroorganizmaların gelişimlerini olumsuz yönde etkileyip, ölmelerine neden olmaktadır. Pratikte mikrobiyoloji alanında radyasyon; sterilizasyon, dezenfeksiyon ve mutasyonlar oluşturmada kullanılmaktadır.
- ✓ **Su (nem):** Mikroorganizmaların çoğalmasında, gıda maddelerinin girişinde ve içeride biriken metabolitlerin, diğer maddelerin dışarı çıkışında ve metabolik olaylarda çok önemli göreve sahiptir. Çoğalma ortamlarında bulunan maddelerin bakteriler tarafından alınabilmesi ancak bunların suda çözünebilir olmaları ile mümkündür ve su aracılığı ile bakteriye girmektedir. Aynı şekilde, bakterinin yapısındaki enzim veya metabolitlerin dışarı çıkabilmesinde de su önemli rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların gelişebilmesi için ortamda yeterli miktarda su bulunması gerekmektedir.
- ✓ **Oksijen:** Oksijen ihtiyacı, mikroorganizmaların türüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yaşamlarını sürdürebilmeleri için bazı türler oksijenli (aerop) ortama, bazıları oksijensiz (anaerop) ortama, bazıları ise az oksijenli (mikroaerofil) ortama ihtiyaç duyarlarken, bir grup mikroorganizma da her ortamda (fakültatif) yaşamını sürdürebilmektedir.
- ✓ **pH:** Bir ortamın pH'ı, içinde bulunan hidrojen iyonların derişimi ile ölçülmektedir. Bir sıvının pH'ı 1 ile 14 arasında değişiklik göstermektedir. Ortam pH'ı optimum

değerler içerisinde olduğunda çoğalma ve gelişme sağlıklı bir şekilde gerçekleşmektedir. Minimum veya maksimum pH değerlerine yaklaştıkça üreme azalır ve durur. Asit ortamı seven mikroorganizmalar (maya, küf, laktobasil vs.) yanı sıra bazı ortamlarda üreyenler de (mikoplazma, toprak bakterileri, *V. cholera* vs.) vardır. İnsan ve hayvanlarda hastalık meydana getirenler genellikle konakçının sıvı ve dokularının pH derecesinde (7.0-7.4) üremektedirler.

- ✓ **Osmotik basınç:** Osmotik basınç; yarı geçirgen zarla ayrılmış iki farklı ortamın içinde eriyen maddelerin derişimi ile ilgilidir. Her iki tarafın osmotik basıncı veya eriyen maddelerin derişimi eşitleninceye kadar geçiş gerçekleşmekte ve bu olaya osmosis denmektedir. Mikroorganizmalar, çoğaldıkları sıvı ortamın osmotik basıncı ile hücre içindeki osmotik basınç arasında bir denge kurmuşlardır. Bu denge, yarı geçirgen olan hücre membranları yardımı ile devam ettirilmektedir. Mikroorganizmaların en iyi çoğalabildikleri ortamın osmotik basıncı, bakteri içindeki ile aynı olduğu duruma isotonik denir. Böylelikle, bakteri zarlarından giriş ve çıkış kolay gerçekleşmekte olup, bakteri gelişmesine ve çoğalmasına devam etmektedir.

Mikroorganizmalar buldukları ortamlarda optimum koşullar altında, iyi bir çoğalma ve gelişme göstermektedir. Ancak bu uygun şartlar, uzun süre devam etmez ve belli bir zaman sonra mikroorganizmaların üremeleri yavaşlar ve durur. Eğer olumsuz koşullar değiştirilmez ve iyileştirilmezse mikroorganizma ölümleri başlayarak giderek artar ve canlı mikroorganizma sayısında azalmalar meydana gelebilir. Bu ortamlarda canlı kalmayı başarabilen mikroorganizmalarda da morfolojik bazı değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Pamir 1985).

2.7.4 Mikroorganizmalarda beslenme

Mikroorganizmaların, enerji sağlayabilmesi, gelişebilmesi, çoğalması ve yaşayabilmesi için beslenmesi ve bu nedenle de çeşitli gıda maddeleri gerekmektedir. Bu maddelerin bir bölümü doğrudan ortamdan sağlanırken, bir kısmı da hücre içinde

sentezlenmektedir. Böylece mikroorganizmanın yaşamı için gerekli olan mikro ve makro moleküller hazırlanarak gerekli yerlerde kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların yapıları incelendiğinde; kuru ağırlıklarının % 95'inden fazla bir kısmını bazı temel elementlerin (karbon, hidrojen, oksijen, nitrojen, fosfor, sülfür, kalsiyum, potasyum, magnezyum ve demir) oluşturduğu görülmektedir. Bu elementler mikroorganizma tarafından buldukları ortamdan fazla miktarlarda alındıklarından makro element olarak adlandırılmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından daha az ihtiyaç duyulan mikro element olarak adlandırılan maddeler de (manganez, çinko, kobalt, nikel ve bakır) bulunmaktadır (Pamir 1985).

2.8 Bakteriler

Bakteriler, prokaryotik hücre yapısı ve ortalama 0.5-1 µm çapa ve 0.5-2 µm uzunluğa sahip tek hücreli canlılardır. Besinsel gereksinimi basit ve çevresel koşullara hızlı uyum sağlamaktadırlar.

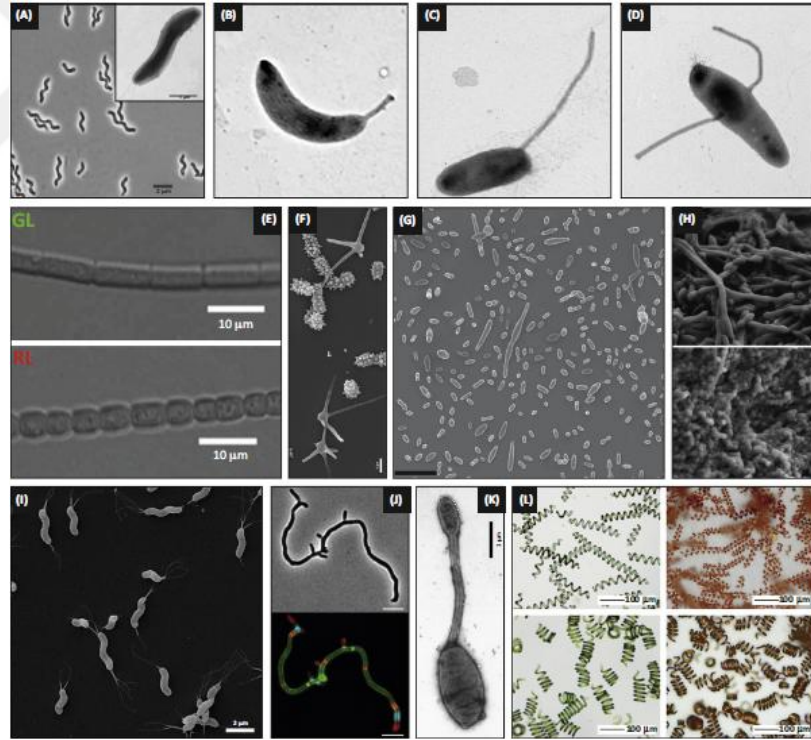
2.8.1 Bakterilerin morfolojik özellikleri

Bakteriler, morfolojik yapıları bakımından kok (yuvarlak biçimli), basil (çomak biçimli), spiral (sarmal biçimli) ve pleomorfik (değişik biçimli) şeklinde dörde ayrılmaktadır.

- ✓ **Kok:** Mikroskopta yuvarlak şekilde görülebilen, küre şeklindeki bakterilerdir. Çapları, ortalama 0.8-1.5 µm'dir. Bireysel koklar, üreme fazında ortadan bölünme şekillerine göre yan yana gelerek veya gruplar halinde değişik morfolojik formlar oluşturmaktadır.
- ✓ **Basil:** Çomak şeklindedirler. Ortalama 0.5–1 µm eninde ve 1–5 µm boyunda ve cins ve türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Zincir biçiminde, uç uca dizilebilirler. Bu görünüm, streptobasil olarak adlandırılır.

- ✓ **Spiral:** Sarmal şeklindeki bakterilerdir. Boyları 4-20 µm arasında değişmektedir. Spiroket ve spiril olmak üzere 2 çeşidi mevcuttur. Spiroketler; uzun bir eksen etrafında helezoni şeklinde sarılmış yumuşak bir yapıya sahiptir, bükülebilir ve uzun eksen etrafında dönerek hareket edebilmektedirler. Spiriller ise, sert yapılı olup kıvrımlı bir gövde yapısına sahiptir, tek kıvrımlı (virgül şeklinde) olanlarına vibrio adı verilmektedir.
- ✓ **Pleomorfik:** Kok, basil ve spiral dışında özel morfolojik karakter gösterenler bu grupta değerlendirilmektedir (Pamir 1985).

Şekil 2.8’de bakterilerin çeşitlilik gösteren bazı morfolojik özelliklerinden örnekler gösterilmiştir.

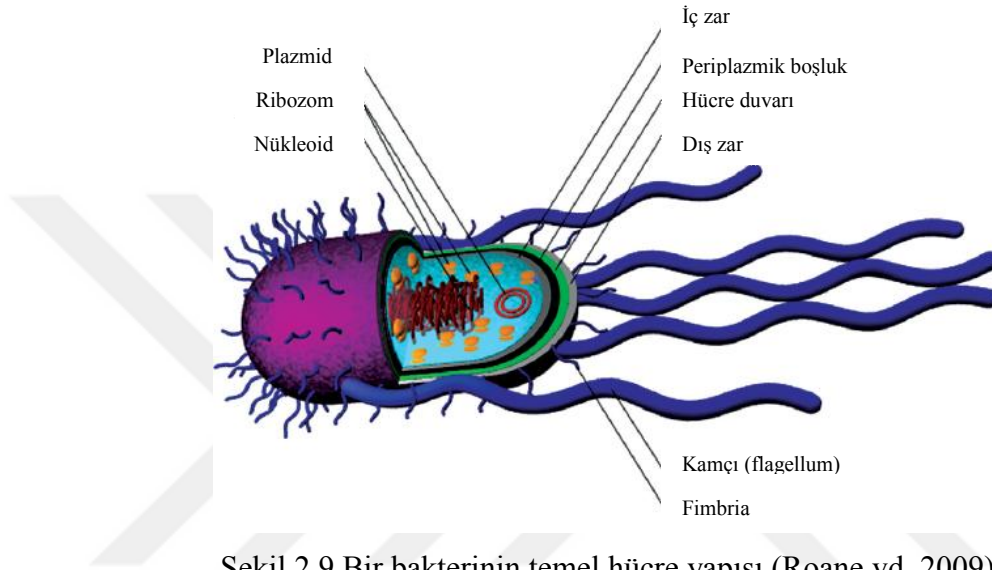


Şekil 2.8 Farklı bakteri morfolojileri (Caccamo ve Brun 2018)

- a. Spiral şekilli metanotrop, b. *Caulobacter crescentus*, c. *Asticcacaulis excentricus*, d. *Asticcacaulis biprosthecum*, e. *Fremyella diplosiphon*, f. *Prosthecomicrobium hirschii*, g. *Dinoroseobacter shibae*, h. *Lactococcus lactis*, ı. *Helicobacter pylori*, j. *Streptomyces venezuelae*, k. *Hyphomonas adhaerens*, l. *Spirulina (Arthrospira platensis)*

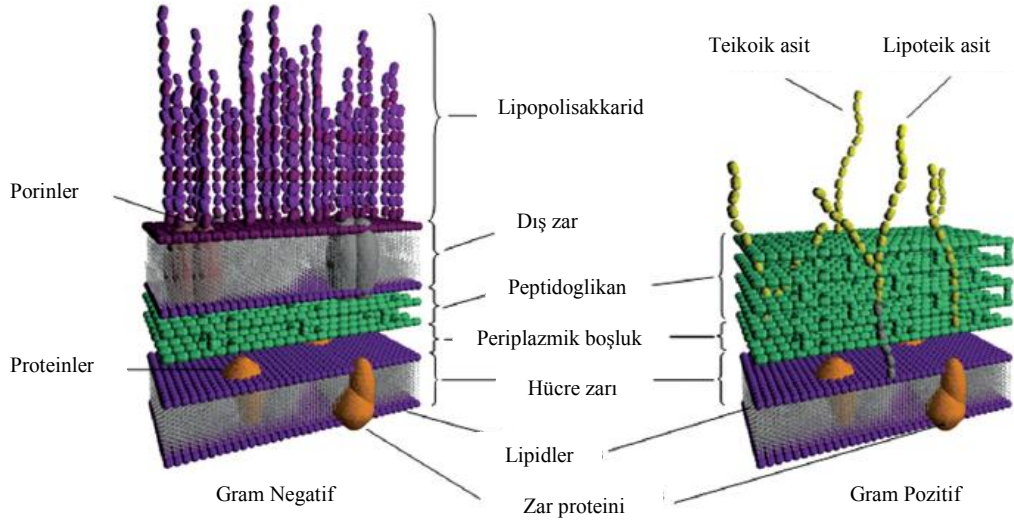
2.8.2 Bakterilerin hücre yapısı

Bakterilerin hücre yapısı, dış yapı (hücre duvarı, kapsül, flagella, fimbria) ve iç yapı (sitoplazmik membran, mezozom, nukleus, ribozom, sitoplazmik granüller, sporlar vb.) şeklinde iki temel kısma ayrılmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Bir bakterinin temel hücre yapısı (Roane vd. 2009)

Bakteriler hücre duvarlarının yapısına göre gram-pozitif ve gram-negatif olarak 2 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.10). Bu farklılık, bakterilerin çevreye karşı dayanıklılığını belirlemede yardımcı olmaktadır. Örneğin, *Bacillus* ve *Clostridium* gibi gram-pozitif bakterilerin sahip oldukları kalın hücre duvarı, toprakta bulunan sert fiziksel koşullarına karşı dirençli olmalarını sağlamaktadır. Diğer yandan, *Pseudomonas* ve *Shewanella* gibi gram-negatif bakterilerde hücre duvarının daha karmaşık yapısı, metabolizma için gerekli besin maddelerini elde etmek için çözünen maddeler ile kolay etkileşimde bulunmalarına olanak sağlamaktadır (Roane vd. 2009).

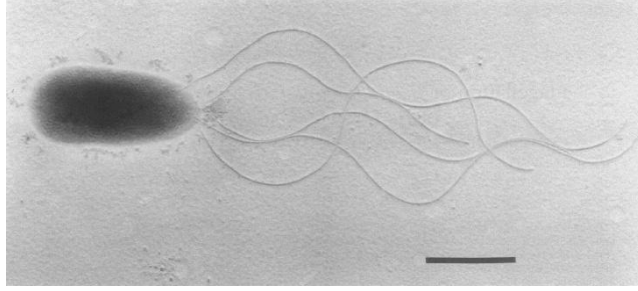


Şekil 2.10 Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarının karşılaştırılması (Roane vd. 2009)

Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı, periplazmik boşluk adı verilen ince bir peptidoglikan tabakası ile ayrılan iç ve dış zardan oluşmaktadır. Hücre duvarının dış tarafında, lipopolisakkarit molekülleri dışarı uzanarak çevre ile hücre etkileşimlerini sağlamaktadır. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında ise, kalın bir peptidoglikan tabakası içeren tek bir hücre zarı yer almaktadır. Böylece, teikotik asitler hücreden dışarı uzanarak çevre ile etkileşimlere aracılık etmektedir (Roane vd. 2009).

2.9 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida, oksijenin bol olduğu toprak ve su habitatlarının çoğunda bulunan çubuk şeklinde, kamçılı, gram-negatif bir bakteridir (Şekil 2.11). Çoğalması için optimum sıcaklık aralığı 25-30 °C olup, ortamdaki kolayca izole edilebilmektedir. *Pseudomonas putida*, bitki köklerini kolonize eden bir suş olan KT2440 dahil olmak üzere birçok suşa sahiptir. Bitki kökünün yüzeyi, bakterilerin kökteki besinlerden yararlanmasını sağlamaktadır. Böylece, *Pseudomonas putida* bitki büyümesini uyararak patojenlere karşı bitkileri korumaktadır. Bu nedenle bitki gelişimini desteklemeye yardımcı olması açısından araştırmacılar tarafından biyomühendislik alanında biyopestisit üretmek için kullanılmaktadır (Espinosa-Urgel vd. 2000).



Şekil 2.11 *Pseudomonas putida* PRS2000'nin elektron mikroskopu altında görüntüsü, 1 µm (Harwood vd. 1989)

Pseudomonas putida, toluen gibi organik çözücülerini ayrıştırabilen, stiren yağın biyobozunur plastik olan polihidroksialkanoatlara (PHA) dönüştürebilen çok çeşitli aerobik metabolizmaya sahiptir. *Pseudomonas* cinsinden olan farklı türlerinin, özellikle de insanlarda önde gelen ölümcül hastalıklardan birine sebep olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın araştırılmasında büyük önem kazanmıştır. Nonpatojenik yapısı, çok yönlülüğü ve kullanım kolaylığı sayesinde birçok araştırmacı *Pseudomonas putida*'dan yararlanmaktadır (Nelson vd. 2002).

2.9.1 Sınıflandırılması

Pseudomonas putida'nın bilimsel sınıflandırılması çizelge 2.3'te gösterilmiş olup, diğer isimleri ise; *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas arvilla*, *Arthrobacter siderocapsulatus*, *Pseudomonas striata*, *Pseudomonas rugosa*, *Pseudomonas incognita*, *Pseudomonas convexa*, *Pseudomonas eisenbergii*, *Bacillus putidus*, *Bacillus fluorescens putidus* ve *Arthrobacter siderocapsulatus* şeklinde sıralanmaktadır.

Çizelge 2.3 *Pseudomonas putida* türü için sınıflandırma

	Sınıflandırma
Alem	Bakteri
Şube	Proteobakteri
Sınıf	Gamma proteobakteri
Sıra	Pseudomonadales
Aile	Pseudomonadaceae
Cins	<i>Pseudomonas</i>
Tür	<i>Pseudomonas putida</i>

2.9.2 Hücre yapısı ve metabolizma

Pseudomonas putida, aerobik metabolizmaya sahip, çubuk şeklinde gram-negatif bir bakteridir. Protein ve peptid salgılanması ve ticareti, protein modifikasyonu ve onarımı, ve proteinlerin, peptitlerin ve glikopeptidlerin degradasyonu dahil olmak üzere çeşitli çevresel stresleri tolere edebilmektedir. Ayrıca yapısında fiziksel ve kimyasal streslere cevap olarak bir adaptasyon mekanizması sağlayabilen önemli lipitler yer almaktadır. Tüm bu özellikler *Pseudomonas putida*'nın topraktaki toksik maddelerden kurtulması ve kontamine bölgelerde gelişebilmesine olanak sağlamaktadır (Manzano vd. 2005).

Pseudomonas putida, kompleks metabolizması ve kirliliği kontrol edebilmesi sayesinde çevre açısından önemlidir. Hücre yapısındaki plazmidler sayesinde çevresel stresi algılayıp, su kirliliğine sebep olan benzen, toluen ve ksilen gibi hidrokarbonların oksidatif tepkime yoluyla bozunmasında geniş rol oynamaktadır (Manzano vd. 2005).

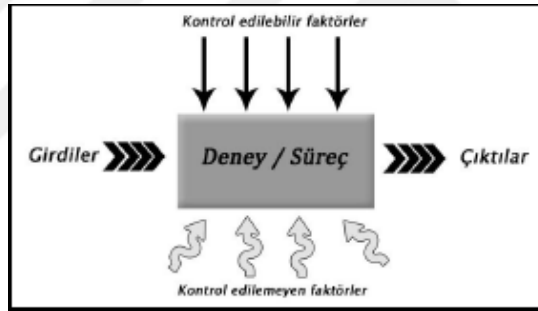
2.10 İstatistiksel Deney Tasarımı

Optimizasyon; bir sistem, süreç veya ürünün performansında maksimum fayda elde etmek amacıyla iyileştirme yapmak anlamına gelmektedir. Optimizasyon terimi, kimyada mümkün olan en iyi cevabı veren bir prosedürün uygulanacağı koşulları belirleme yöntemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bezerra vd. 2008).

Geleneksel olarak optimizasyon, bir parametrenin değiştirilerek diğerlerinin sabit tutulması ile bir faktörün deneysel bir cevap üzerindeki etkisini izleyerek gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, incelenen değişkenler arasındaki etkileşimleri içermemesi ve bu nedenle parametrenin cevap üzerindeki tüm etkilerini göstermemesidir (Lundstedt vd. 1998). Tek faktörlü optimizasyonun bir diğer dezavantajı ise, araştırmayı yürütmek için gerekli olan deney sayısındaki artıştır, bu da zaman ve giderlerin artmasına ve ayrıca reaktif maddelerin ve malzemelerin tüketiminde artışa yol açmaktadır (Bezerra vd. 2008).

Bu problemi çözmek için çok değişkenli istatistiksel teknikler kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. En uygun çok değişkenli istatistiksel teknikler arasında Plackett-Burman deney tasarımı ve cevap yüzey yöntemi (response surface methodology, RSM) bulunmaktadır (Bezerra vd. 2008).

Deney/süreç, kontrol altındaki çeşitli durum ve koşulların, **deney birimlerinin** bilinmeyen karakteristik özellikleri üzerindeki etkisini test etmek amacıyla uygulanan bir işlem veya süreç olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.12). **Deney tasarımı** (design of experiment, DOE) ise, incelenen değişkenlerin farklı seviye değerlerinden oluşan bir matris tarafından tanımlanan belirli bir deney kümesidir. Bu terim genel anlamda, tasarımın varyasyonunu doğrudan etkileyen koşulların ortaya konulduğu deneylerle ilişkili olmaktadır (Bezerra vd. 2008).



Şekil 2.12 Bir süreç veya deneyin genel şematik gösterimi (Sağol 2015)

Deney tasarımında birbirinden bağımsız olarak değiştirilebilen durum veya koşullar **bağımsız değişken** (independent variable) veya **faktör** olarak adlandırılmaktadır. Bağımsız değişken olarak pH, sıcaklık, reaktif derişimi, mikrodalga ışın süresi, akış oranı ve atomizasyon sıcaklığı örnek gösterilebilmektedir. Bir faktörün **seviye** (level) değerleri ise, deneylerin gerçekleştirilmesi için gereken farklı değerler olarak tanımlanmaktadır. Faktörler iki ya da daha fazla seviyeye sahip olabilmektedirler. Örneğin, spektrofotometrik bir yöntemin optimizasyonunda bağımsız değişken olan pH; 4, 5, 6, 7 ve 8 olmak üzere beş seviyede incelenebilmektedir (Bezerra vd. 2008).

Cevap (response) veya **bağımlı değişken** (dependent variable), deneylerden elde edilen sonuçların ölçülen değerleridir. Cevap değişkeni olarak; analitik sinyal (absorbans, net emisyon yoğunluğu ve elektriksel sinyal), bir maddenin geri kazanımı, kromatografik pikler arasındaki rezolüsyon, kalan karbonun yüzdesi veya son asitlik örnek verilebilmektedir (Bezerra vd. 2008). Deney birimlerinden elde edilen gözlem değerlerine Ronal Alymer Fisher tarafından geliştirilen ve oldukça yaygın bir teknik olan **Varyans Analizi (ANalysis Of VAriance-ANOVA)** uygulanarak araştırma konusu olan faktör ve faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı belirlenmeye çalışılmaktadır (Şenoğlu ve Acıtaş 2014).

Benzer çevresel koşullarda aynı denemeye maruz kalan deney birimlerinden alınan ölçümlerin benzer olması beklenmektedir fakat bu durumun kontrol edilebilmesi zordur. Deney birimleri arasındaki kontrol edilemeyen farklılıklara **deneysel hata** (experimental error) denir. **Bloklama** (blocking), **rastgeleleştirme** (randomization) ve **tekrar** (replication) deney tasarımının olmazsa olmaz ilkeleridir (Şenoğlu ve Acıtaş 2014).

Deneyin hassaslığını arttırmak için aralarında sistematik farklar bulunan deney birimleri, kendi içinde homojen, kendi aralarında heterojen olacak şekilde blok adı verilen gruplara bölünmektedir. Bu işleme bloklama denir. Bloklama yapılarak deneysel hatanın minimuma indirilmesi hedeflenmektedir. Deney tasarımında deney birimlerinin mümkün olduğunca olması istenmekte ve bloklama kavramı da bu amaca yönelik olarak kullanılmaktadır (Şenoğlu ve Acıtaş 2014).

Deney birimleri arasındaki farklılıkların, ölçüm değerleri üzerindeki sistematik etkisini kontrol altına almak için rastgeleleştirme yapılmaktadır. Rastgeleleştirme, deney birimlerinin denemelere uygulanma olasılıklarının eşit olmasını sağlamaktadır (Şenoğlu ve Acıtaş 2014).

Deneylerin uygulandıkları deney birimi sayısına tekrar denir. Tekrar sayısının artması deneysel hatanın küçülmesine, dolayısıyla deneme etkilerine ait tahminlerin ve testlerin hassasiyetlerinin artmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, fazla sayıda tekrar yapmak

teorik olarak istenen bir durum olmakla beraber pratikte maliyetinin deneye ayrılan bütçeyi aşması, istenilen sayıda ve özellikte deney birimine ulaşılamaması gibi sorunlara yol açabilmektedir.

Deneysel tasarımların belli aşamalar söz konusudur. Bu aşamalar;

- (i) Deneyin planlanması ve tasarımı,
- (ii) Deneyin yapılması ve verinin elde edilmesi,
- (iii) Veri analizi ve sonuçların yorumlanması

şeklinde sıralanabilmektedir (Şenoğlu ve Acıtaş 2014).

2.11.1 Varyans Analizi

Deneysel tasarımlardan elde edilen verilerin analiz edilerek değerlendirilmesinde kullanılan varyans analizi, cevap değişkeni üzerindeki kontrol edilebilir faktör ve deneysel hatalardan kaynaklanan değişimleri hesaplamaktadır (Sağol 2015).

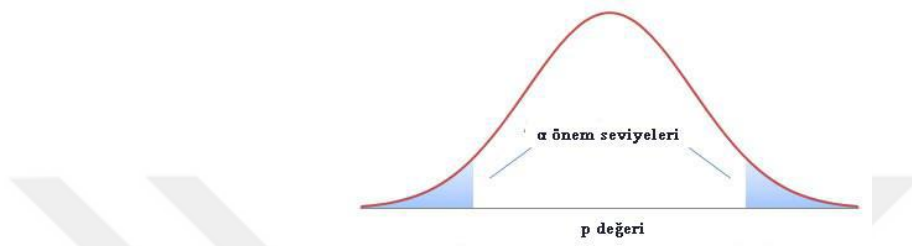
Elde edilen veriler varyans analizi ile değerlendirilmeden önce, örnek ortalamaları ile ana kütle ortalaması arasında fark olup olmadığını sınavan hipotez testleri kurulmalıdır. Bu hipotezlerden ilki H_0 hipotezi, her bir deneyden elde edilen cevabın ($\mu_1, \mu_2, \mu_3, \dots$) ana kütle ortalaması (μ) ile arasında hiçbir farkın olmadığını kabul etmektedir. Diğer hipotez ise H_1 olarak belirtilen alternatif hipotezdir. Bu hipotez, cevap değişkenine ait verilerin anakütle ortalaması ile arasında bir fark olduğunu savunmaktadır (Eşitlik 2.1 ve 2.2) (Sağol 2015).

$$H_0: \mu_i = \mu_j, \mu_{i,j}; i \neq j; i,j: 1,2,3,\dots,k \quad (2.1)$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \neq \dots \neq \mu_{i,j} \quad (2.2)$$

Hipotez testlerinin geçerliliği F testi uygulanarak yapılmaktadır. F testine göre; veriler üzerinden p (olasılık) değerleri belirlenmektedir. Verilerden elde edilen p değerleri ile

şekil 2.13'te verilen grafik elde edilir. Bu grafikteki taralı alanlar, p değerlerinin minimum olduğu ve H_0 hipotezinin reddedileceği aralıktır. Bu aralık α önem seviyesi olarak adlandırılmaktadır. Uygulamada önem seviyesi genellikle; 0.1, 0.05, 0.01 değerleri olarak alınmaktadır. Grafikte bu aralık dışında kalan kısım ise güven aralığı olarak nitelendirilir. Güven aralığı da kullanılan α değerine bağlı olarak % 90, % 95, % 99 değerlerini alabilmektedir (Sağol 2015).



Şekil 2.13 Olasılık grafiği (Sağol 2015)

Varyans analizi ile p değerlerinin belirlenmesinde çizelge 2.4'te verilen varyans analizi kullanılmaktadır. Çizelge 2.4'te en soldaki sütunda yer alan x_1 , x_2 , x_3 terimleri cevap değişkenindeki değişimden sorumlu olan ana faktörleri temsil etmektedir. x_1x_2 , x_1x_3 gibi ikili terimler ise ana faktörlerin birbiriyle olan etkileşimlerinin cevap değişkeni üzerindeki etkisini belirlemede kullanılmaktadır. Benzer şekilde $x_1x_2x_3$ ise üç faktörün birbirleriyle olan etkileşimini temsil etmektedir. x_1^2 , x_2^2 gibi ifadeler ise faktörlerin karesel etkilerini göstermektedir (Sağol 2015).

Varyans analizi tablosundan elde edilen p değerleri, eşitlik 2.3'te verilen karar kuralına göre değerlendirilerek, değişkenlik kaynağının cevap değişkeni üzerindeki etkisinin anlamlı olup olmadığı belirlenmektedir (Sağol 2015).

$$P < \alpha \text{ veya } F_0 > F_{\text{tablo}} \quad (2.3)$$

Çizelge 2.4 Varyans analizi tablosu (Sağol 2015)

Değişkenlik Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Karelerin Ortalaması	F_0	p değeri
Model	$(x_1x_2x_3-1)$				
x_1	(x_1-1)	SS_{x_1}	MS_{x_1}	MS_{x_1}/MS_{Hata}	
x_2	(x_2-1)	SS_{x_2}	MS_{x_2}	MS_{x_2}/MS_{Hata}	
x_3	(x_3-1)	SS_{x_3}	MS_{x_3}	MS_{x_3}/MS_{Hata}	
x_1x_2	$(x_1-1)(x_2-1)$	$SS_{x_1x_2}$	$MS_{x_1x_2}$	$MS_{x_1x_2}/MS_{Hata}$	
x_1x_3	$(x_1-1)(x_3-1)$	$SS_{x_1x_3}$	$MS_{x_1x_3}$	$MS_{x_1x_3}/MS_{Hata}$	
x_2x_3	$(x_2-1)(x_3-1)$	$SS_{x_2x_3}$	$MS_{x_2x_3}$	$MS_{x_2x_3}/MS_{Hata}$	
$x_1x_2x_3$	$(x_1-1)(x_2-1)(x_3-1)$	$SS_{x_1x_2x_3}$	$MS_{x_1x_2x_3}$	$MS_{x_1x_2x_3}/MS_{Hata}$	
x_1^2	$(x_1-1)^2$	$SS_{x_1^2}$	$MS_{x_1^2}$	$MS_{x_1^2}/MS_{Hata}$	
x_2^2	$(x_2-1)^2$	$SS_{x_2^2}$	$MS_{x_2^2}$	$MS_{x_2^2}/MS_{Hata}$	
x_3^2	$(x_3-1)^2$	$SS_{x_3^2}$	$MS_{x_3^2}$	$MS_{x_3^2}/MS_{Hata}$	
Hata	$(n-x_1x_2)$	SS_{Hata}	MS_{Hata}	F_{Hata}	
Toplam	$(n-1)$	SS_{Toplam}			

2.11.2 Plackett-Burman deney tasarımı

Plackett Burman tasarımı çok faktörlü süreçlerde, tüm parametrelerin az sayıda deneyle taranarak, anlamlılık derecelerine göre elenmesini sağlayan etkili ve sık kullanılan bir deney tasarımıdır. Sadece faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde Plackett-Burman deney tasarımı son derece etkin bir yaklaşımdır. Dolayısıyla bu tasarım genellikle faktörlerin etkili/etkisiz şeklinde sınıflandırıldığı çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışma ile belirlenen kritik faktörler daha ileri deney tasarımlarına dahil edilmektedir (Yerlikaya 2013).

Plackett ve Burman (1946) tarafından yayınlanmış bir çalışma ile 11 faktörün ana etkilerinin 12 deney ile incelenebileceği ortaya konulmuştur (Çizelge 2.5). Ancak kesirli

faktöriyel tasarımda olduğu gibi burada da ikili ve daha yüksek dereceden etkileşimlerin etkisi hesaplanamamaktadır (Sağol 2015).

İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlarda, çok sayıda faktör söz konusu olduğunda deney sayısı son derece fazladır (2^k ; k faktör sayısı). Dolayısıyla, k sayıda faktörün k + 1 sayıda deney ile incelenebildiği Plackett-Burman gibi iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımlar kullanışlı olabilmektedir. Bu şekilde, zaman ve maliyet açısından azalma söz konusu olmaktadır (Yerlikaya 2013).

Plackett-Burman deney tasarımı, birinci dereceden polinom denklem ile açıklanmaktadır (Eşitlik 2.4).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (2.4)$$

Modelin açık ifadesi Eşitlik 2.5'te verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_i x_i \quad (2.5)$$

Burada, Y cevap değişkenini, x_1 - x_i faktörleri, β_0 sabiti ve β_1 - β_i faktörlerin katsayılarını ifade etmektedir (Yerlikaya 2013).

Çizelge 2.5 11 faktör ve 12 deneyden oluşan Plackett-Burman tasarım matrisi (Plackett ve Burman 1946)

Deney	Faktör										
	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}	x_{11}
1	+ ¹	- ¹	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Pozitif (+) değerler faktörlerin yüksek seviyesini, negatif (-) değerler ise faktörlerin düşük seviyelerini göstermektedir.

2.11.3 Cevap yüzey yöntemi (RSM)

Cevap yüzey yöntemi, 1950'li yıllarda Box ve Wilson tarafından geliştirilmiştir. RSM, bilimsel ve mühendislik alanındaki proseslerde ilgili problemin çözümünü bulmak amacıyla ortaya çıkan, deneysel strateji, matematiksel model ve istatistiksel sonucu bir araya getiren bir yöntemdir (Eldeleklioğlu vd., 2009). Deneysel tasarıma ilişkin elde edilen deneysel verilere ampirik modellerin uyumunu temel alan bir matematiksel ve istatistiksel teknikler grubundan oluşmaktadır. Bu amaca yönelik olarak, cevap yüzey yönteminde bir sistemi tanımlamak için doğrusal ya da kare polinom fonksiyonları kullanılmakta ve deney koşullarının optimizasyonu araştırılmaktadır (Bezerra vd. 2008).

Bir optimizasyon yöntemi olan RSM uygulamasındaki aşamalar aşağıda verilmiştir (Bezerra vd. 2008):

1. Araştırmanın amaç ve deneyimlerine göre, problem ve deneysel bölgenin tanımlanmasıyla sistem üzerindeki etkiye sahip bağımsız değişkenler, seviye, aralıkları ve cevap değişkeninin seçilmesi,
2. Deney tasarımının seçimi ve elde edilen deney matrisine göre deneylerin gerçekleştirilmesi,
3. Elde edilen deneysel verilerin bir polinom fonksiyonunun uyumu aracılığıyla matematik-istatistiksel analizi,
4. Modelin uygunluğunun değerlendirilmesi,
5. Deneylerde yer alan her değişken için optimum değerlerin belirlenmesi.

Çok sayıda değişken söz konusu sistemin cevabını etkileyebilmektedir. Bu değişkenlerin her birinin katkılarını tanımlamak ve kontrol etmek oldukça zordur. Bu nedenle, deneysel değişken arasından hangisinin tek başına ve etkileşimlerinin daha önemli olduğunu belirlemek için tarama tasarımları yapılmaktadır. Tam veya kısmi iki seviyeli faktöriyel tasarım yöntemleri verimli ve ekonomik olmaları sayesinde sistemi etkileyen en önemli değişkenleri belirlemek için kullanılabilir (Lundstedt vd. 1998).

RSM'de kullanılacak en basit model doğrusal bir fonksiyona dayanmaktadır. Uygulaması için elde edilen cevapların aşağıdaki denkleme uyması gerekmektedir:

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2.6)$$

Burada, Y cevap değişkenini, k değişkenlerin sayısını, β_0 sabit terimi, β_i doğrusal parametrelerin katsayılarını, x_i değişkenleri, ve ε deneysel hatayı veya gürültüyü ifade etmektedir (Bezerra vd. 2008).

Sistemde kavislenme yer almakta ise, sistem aşağıdaki ikinci dereceden polinom denklemi ile tanımlanmaktadır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.7)$$

Burada, β_{ij} etkileşim parametrelerinin katsayılarını ifade etmektedir.

Kritik bir noktayı belirlemek için, polinom fonksiyonunun aşağıda verilen denkleme göre ikinci dereceden terimleri içermesi gerekir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.8)$$

Burada, β_{ii} karesel parametrenin katsayılarını ifade etmektedir.

Değişken seviyelerinin kodlanması, incelenen her gerçek değer boyutsuz değerlere sahip bir ölçek içindeki koordinatlara dönüştürülmesini sağlamaktadır. Aşağıdaki denklem, gerçek bir değeri (X_i) belirli bir deney tasarımına göre kodlanmış bir değere (x_i) dönüştürmek için uygulanmaktadır:

$$x_i = \left(\frac{X_i - X_i^*}{\Delta X_i} \right) \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte, x_i ; i.-bağımsız değişkeninin kodlanmış değerini, X_i ; i.-bağımsız değişkeninin kodlanmamış (gerçek) değerini, X_i^* ; merkez noktasındaki i.-bağımsız değişkeninin kodlanmamış değerini ve ΔX_i ise merkezi noktadaki gerçek değer ile bir değişkenin üst veya alt seviyesindeki gerçek değer arasındaki mesafeyi ifade etmektedir (Bayraktar 2001).

Verilerin fonksiyona uydurulmasından sonra bulunan matematiksel model, bazen çalışılan deneysel alanı tatmin edici bir şekilde tanımlayamaz. Uydurulan modelin kalitesini değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) uygulaması güvenilir bir

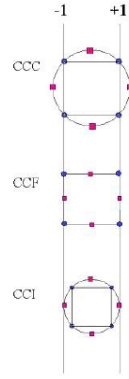
yoldur. ANOVA'nın amacı, değişkenlerin seviyelerinin kombinasyonundaki değişimi, oluşturulan cevapların ölçümlerine özgü rastgele hatalardan kaynaklanan değişikliklerle karşılaştırmaktır. Bu karşılaştırma ile, deneysel varyans kaynakları dikkate alınarak cevapları öngörmek için kullanılan regresyonun önemini değerlendirmek mümkündür (Bezerra vd. 2008).

Literatürde sıklıkla kullanılan cevap yüzeyi deney tasarımları arasında merkezi kompozit tasarım (central composite design, CCD) yer almaktadır.

2.11.4 Merkezi kompozit deney tasarımı (Central composite design, CCD)

Merkezi kompozit deney tasarımı, daha az deney sayısı ile daha fazla bilgi elde etmeyi sağlamasıyla faktöriyel tasarımlara etkili bir alternatif olmaktadır (Alireza 2013). Merkezi kompozit deney tasarımını diğer tasarım yöntemlerinden ayıran en önemli özellik, aksel noktaların (α) yer almasıdır. Bu aksel noktalar, her bir deney faktörü için düşük ve yüksek olmak üzere fazladan iki seviyede geney gerektirmektedir. Böylece, faktörlerin beş seviyeden oluşmasıyla, karesel etkilerinin net bir şekilde ifade edilmes sağlanmaktadır. Alfa terimi, istenilen deney özelliklerine ve faktör sayısına göre farklı değerler almaktadır (Croarkin ve Tobias 2015).

Bir merkezi kompozit deney tasarım matrisinin grafiksel gösterimi şekil 2.14'te verilmiştir. Bu tasarımda daire üzerinde bulunan aksel noktaların merkeze olan uzaklığı seviye aralıklarına ve faktör sayısına göre değişiklik göstermektedir. Standart bir merkezi kompozit tasarım matrisi dairesel simetriye (CCC) sahip olup, bu tasarımda faktörlerin beş seviyesine ihtiyaç duyulmaktadır. Aksel noktaların, faktörlerin düşük (-1) ve yüksek (+1) noktaları ile aynı hizada olduğu tasarımlar ise CCF olarak adlandırılmaktadır. Bu tasarımlar genel olarak faktörlerin beş seviyeye uygun olmadığı tasarımlar için kullanılmaktadır. CCI olarak gösterilen tasarımlar ise, faktör seviyelerinin dar aralıklarla değerlendirilmesi gerektiği durumlarda, aksel noktalar faktörlerin düşük ve yüksek seviyeleri arasında seçilerek kullanılmaktadır (Croarkin ve Tobias 2015).



Şekil 2.14 Alfa değerlerine göre merkezi kompozit deney tasarımı türleri (Croarkin ve Tobias 2015)

Merkezi kompozit deney tasarımı için gerçekleştirilecek deney sayısı eşitlik 2.10'da verilmiştir:

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad (2.10)$$

Burada, k ; bağımsız değişken sayısını ve n_0 ; merkez noktasındaki tekrar sayısını ifade etmektedir (Murthy vd. 2000).

Literatürde mukonik asitin mikrobiyal üretimine dair çalışmaların yer aldığı çizelge 2.6'da mukonik asit üretimi için β -ketoasidat yol izi kullanılarak *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium* ve *Sphingobacterium* gibi mikroorganizmaların genel olarak benzoatı substrat olarak kullandığı görülmektedir.

Çizelge 2.6 *cis, cis*- Mukonik asitin mikrobiyal üretimi ile ilgili çalışmalar

No	Kaynak	Mikroorganizma	Substrat	Metot	Mukonik asit derişimi (mM)	Verim,% (mol/mol)
1	Maxwell, 1982. US Patent 4355107.	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31916	Toluen	Fed-batch	40.11	-
2	Schmidt ve Knackmuss, 1984	<i>Pseudomonas</i> sp. strain B13	Benzoat	Fed-batch	52.07	91
3	Hsieh, 1984. US Patent 4480034.	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31916	Toluen	Fed-batch	88.66	-
4	Hsieh vd. 1985. US Patent 4535059.	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31916	Toluen	Fed-batch	105.55	-
5	Maxwell, 1986. US Patent 4588688.	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31916	Katekol	Fed-batch	37.29	100
6	Mizuno vd. 1988.	<i>Arthrobacter</i> sp. mutant strain T8626	Benzoat	Fed-batch	310.32	96
7	Imada vd. 1989. US Patent 4871667.	<i>Corynebacterium lilium</i> ATCC 21793	Benzoat	Batch	9.85	4.7
8	Imada vd. 1989. US Patent 4871667.	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i> ATCC 13870	Benzoat	Batch	17.59	8.5
9	Imada vd. 1989. US Patent 4871667.	<i>Microbacterium ammoniaphilum</i> ATCC 21645	Benzoat	Batch	17.59	8.5
10	Imada vd. 1989. US Patent 4871667.	<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 13826	Benzoat	Batch	18.29	8.8
11	Imada vd. 1989. US Patent 4871667.	<i>Arthrobacter</i> sp. mutant T-8626-11	Benzoat	Batch	31.66	91
12	Hsieh, 1990. US Patent 4968612.	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 31916	Toluen	Fed-batch	189.99	-
13	Chua ve Hsieh, 1990.	<i>Pseudomonas</i> sp. mutant strain DCB-71	Toluen	Fed-batch	316.65	-
14	Draths ve Frost, 1994.	Engineered <i>E.coli</i> strain AB2834	Glukoz	Batch	16.88	30
15	Bang vd. 1996.	<i>Pseudomonas putida</i> mutant strain BM014	Benzoat	Fed-batch	227.99	100
16	Choi vd. 1997.	<i>Pseudomonas putida</i> mutant strain BM014	Benzoat	Fed-batch	94.99	-
17	Niu vd. 2002.	Engineered <i>E.coli</i> WN1/pWN2.248	Glukoz	Fed-batch	258.95	22
18	Liu vd. 2003.	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> mutant strain M2128	Benzoat	Fed-batch	21.81	47
19	Wu vd. 2004.	<i>Sphingobacterium</i> sp. GCG	Benzoat	Batch	0.70	4
20	Wu vd. 2006.	<i>Sphingobacterium</i> sp. mutant strain M4115	Benzoat	Batch	3.94	28

Çizelge 2.6 *cis, cis*-Mukonik asitin biyoteknolojik üretimi ile ilgili çalışmalar (devam)

No	Makale adı	Mikroorganizma	Substrat	Metot	Mukonik asit derişimi (g/L)	Verim,% (mol/mol)
21	Kaneko vd. 2011.	Engineered <i>E.coli</i> BL21 (DE3)/pEcatA	Katekol	Fed-batch	415.17	100
22	Weber vd. 2012.	Engineered <i>S.cerevisiae</i> strain	Glukoz	Batch	0.01	0.01
23	van Duuren vd. 2012.	<i>Pseudomonas putida</i> mutant strain KT2440–JD1	Benzoat	Fed-batch	130.18	100
24	Curran vd. 2013.	Engineered <i>S.cerevisiae</i> strain MuA12	Glukoz	Batch	0.98	0.89
25	Sun vd. 2013.	Engineered <i>E.coli</i> strain MA-4	Glukoz ve gliserol	Batch	2.74	2.2
26	Bui vd. 2013. US Patent 20130030215 A1.	Engineered <i>E.coli</i> strain WN1/pWN2.248	Glukoz	Fed-batch	416.57	30
27	Yocum vd. 2013.	Engineered <i>E.coli</i> strain MYR428	Glukoz	Fed-batch	112.58	-
28	Xie vd. 2014.	<i>Pseudomonas</i> sp. mutant strain 1167	Benzoat	Batch	50.66	61
29	Vardon vd. 2016.	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Benzoat	Fed-Batch	242.76	100

cis, cis-Mukonik asitin mikrobiyal üretimine yönelik yapılan ilk çalışmalardan biri, *Pseudomonas putida* ATCC 31916 ile fed-batch proses kullanılarak 29 °C ve pH'ın 6.4 olduğu koşullarda 400 mM katekolden *cis,cis*-mukonik asit üretimine dayalı yapılan çalışmadır. Burada, 5.3 g/L ürün elde edilmiş ve % 100 verime ulaşılmıştır (Maxwell 1986).

Substrat olarak benzoatın kullanıldığı bir çalışmada, *Arthrobacter* T8626 mutant türü ile fed-batch prosesle 30 °C ve pH'ın 7-9 olduğu koşullarda *cis,cis*-mukonik asitin mikrobiyal üretimi gerçekleştirilmiştir. Tepkime öncesinde mikroorganizmanın topraktan izolasyonu yapılmış ve mor ötesi ışınlarla mutasyonu gerçekleştirilmiştir. 48 saat boyunca belli aralıklarla az miktarlarda sisteme benzoat eklemesi ile 44.1 g/L (% 96 verim) *cis, cis*-mukonik asit üretilmiştir. Substrat besleme aralıklarının ürün derişimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 5 g/L benzoat 24 saat aralıklarla beslenmiş ve 256 saat sonunda 40 g/L ürün elde edilmiştir. Benzoat 2 saat aralıklarla

beslendiğinde ise 48 saat sonunda 44.1 g/L ürün elde edilmiştir. Bunun sonucunda substrat inhibisyonunu önlemek için sisteme belli aralıklarla küçük miktarlarda benzoat eklemesi yapılması ile daha kısa sürede yüksek derişimde *cis,cis*-mukonik asit elde edildiği görülmüştür. HPLC analizi ile *cis, cis*-mukonik asitin yanında izomerlerinin de oluştuğu gözlenmiştir (Mizuno vd. 1988).

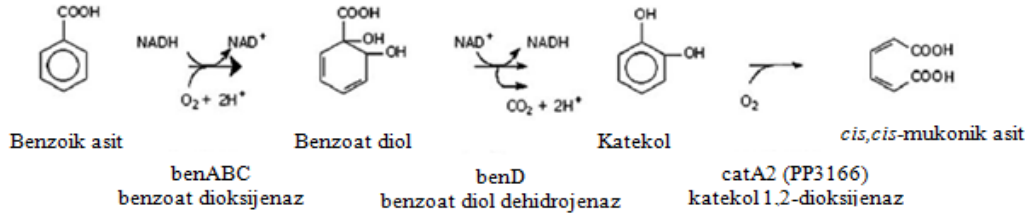
Pseudomonas putida BM104 mutanti ile fed-batch proses kullanarak, bilgisayar kontrollü çözünmüş oksijen beslemesi ile benzoik asitten *cis, cis*-mukonik asit üretilmiştir. Bu çalışmada, 42 saatte 32 g/L ürün % 100 verimle elde edilmiştir (30 °C ve pH: 7). Üretimin yanında, *Pseudomonas putida* BM104'ün topraktan izolasyonu yapılmış ve farklı kolonilerindeki *cis, cis*-mukonik asit üretim miktarı karşılaştırılmıştır. Karbon kaynağı olarak ortamda bulunan glukoz, maya ekstraktı ve sodyum benzoatın hücre kütlesine ve *cis, cis*-mukonik asit miktarına olan etkisi incelenmiş ve ana karbon kaynağının glukoz olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda sodyum benzoat derişiminin katekol 1,2-dioksijenaz enzimi aktivitesine etkisi incelenmiş ve substrat derişiminin 10 mM'ın üstünde olması halinde enzim ve hücre büyümesi üzerinde inhibisyona sebep olduğuna ve bu nedenle derişimin 7-10 mM arasında olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ana karbon kaynağı olan glukoz tüketilirken aynı zamanda çok miktarda oksijen de tüketildiğinden sisteme belirli aralıklarla bilgisayar kontrollü çözünmüş oksijen beslemesi yapılmıştır. Çözünmüş oksijen varlığının hücre kütlesine, tüketilen glukoz ve benzoat miktarına ve üretilen *cis, cis*-mukonik asit miktarına etkisi incelenmiştir. Çözünmüş oksijen ilavesi ile *cis, cis* mukonik asit miktarında artış meydana geldiği gözlenmiştir (Bang vd. 1996).

Sphingobacterium sp. GCG kullanılarak benzoik asitten fed-batch prosesle 0.1 g/L *cis, cis*-mukonik asit (verim: % 4) üretilmiştir. *Sphingobacterium sp. GCG* için farklı bileşimlere sahip kültür ortamları ile çalışılmıştır. Üretim, sıcaklığın 27 °C ve pH'ın 7.1-7.5 arasında değiştiği koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, benzoik asit derişimi etkisi, kompleks karbon kaynakları ile hücre büyümesindeki artışın zamana karşı derişimi, kompleks karbon kaynaklarının *cis, cis*-mukonik asit miktarının zamanla derişimine etkisi, azot kaynağı, EDTA-Fe (III) ve fed-batch fermentasyonu etkisi incelenmiştir (Wu vd. 2004).

Bir diğer çalışmada ise; *Sphingobacterium sp.* M4113/M4115 kullanılarak 2 g/L benzoattan fed-batch prosesle *cis, cis*-mukonik asit üretilmesi amaçlanmıştır. En yüksek verimin *Sphingobacterium sp.* M4115 mutanrı kullanıldığında elde edildiği görülmüştür (0.56 g/L *cis, cis*-mukonik asit, verim: % 28). Üretim, sıcaklığın 27 C ve pH'ın 7.1-7.5 arasında değiştiği koşullarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, farklı kültür ortamlarının üretim miktarına etkisi, farklı mutant türlerinin üretim miktarına, hücre büyümesine, substrat tüketime etkisi ve EDTA-FeCl₃'n enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir (Wu vd. 2006).

Rekombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)/pEcatA mikroorganizmasının kullanıldığı çalışmada fed-batch prosesle katekoldan 12 saatte 59 g/L *cis, cis*-mukonik asit üretilmiştir (20 C, pH: 7.5). 12 saat sonunda optimum koşullarda belli aralıklarla 10 mM katekol eklemeleri ile yan ürün oluşmadan istenen ürünü elde etmeyi başarmışlardır. Tktilen katekol mol miktarı başına elde edilen teorik verim % 100 (mol/mol) dür. Bu çalışmada katekol derişiminin etkisi incelenmiş ve yüksek verimde ürün eldesi için katekol derişiminin 40 mM'ın altında olması gerektiğini aksi halde substrat inhibisyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir. Katekolün 40 mM'ın üzerindeki derişimlerinde, enzim ve mikrobiyal hücreler üzerinde toksik etki meydana getirdiği saptanmıştır (Kaneko vd. 2011).

van Duuren vd. 2012 yılında yaptıkları çalışmalarında *Pseudomonas putida* KT2440 türevi olan *Pseudomonas putida* KT2440-JD1 biyokatalizörlüğünde benzoattan *cis, cis*-mukonatın pH kontrollü fed-batch sistemde üretimini incelemişlerdir (şekil 2.15). Benzoat derişiminin 50 mM ve *cis, cis*-mukonat derişiminin 600 mM'ın üzerine çıkıldığında mikroorganizma üzerinde inhibisyon etkisi oluştuğu görülmüştür. Sonuç olarak 18.5 g/L *cis, cis*-mukonat (verim: %100) retilmiştir.



Şekil 2.15 *P.putida* KT2440-JD1 biyokatalizöründe benzoik asitten *cis, cis*-mukonik asit üretimi (van Duuren vd. 2012)

Son yıllarda, mukonik asitin mikrobiyal üretiminde kullanılan mikroorganizmaların rekombinant teknolojisi ile geliştirilmesi üzerine durulmuştur. 2012’de *Saccharomyces cerevisia* hücreleri kullanılarak mukonik asit üretimine ilişkin yapılan çalışmada plazmidler yardımıyla gen aktarımı üzerine araştırmalar yapılmıştır. Üretimin dehidroşikimat yol izi izlenerek gerçekleştirilip ve substrat olarak katekolün kullanıldığı çalışmada 141 mg/L *cis, cis*-mukonik asit elde edilmiştir (30 °C, pH: 7.5). Farklı mikroorganizmalardan elde edilen katekol 1,2-dioksijenaz enzimi genleri için Michaelis-Menten sabitleri olan K_m ve V_{max} hesaplanmıştır. Bunun yanısıra farklı katekol 1,2-dioksijenaz enzimi genlerinin (CatA, CatA (optimize edilmiş), HQD2, DEHA2C14806g) 1 g/L katekolden elde edilen *cis, cis*-mukonik asit üretimine etkisi incelenmiş ve en yüksek *cis, cis*-mukonik asit miktarının HQD2 geni kullanıldığında elde edildiği görülmüştür (Curran vd. 2012).

Stenotrophomonas maltophilia strain KB2 ile substrat olarak katekolün yer aldığı çalışmada, *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 mikroorganizmasına yapılan gen aktarımları ile yüksek enzim aktivitesi elde edilmesi amaçlanmış ve katekol 1,2-dioksijenaz enziminin 40 °C ve pH 8 iken maksimum aktivite gösterdiği belirlenerek bu koşullar altında *cis, cis*-mukonik asit üretimi gerçekleştirilmiştir. Kinetik parametreler olan Michaelis-Menten sabitleri ($K_m=12.8 \mu\text{M}$, $V_{max}=1,218.8 \text{ U/mg protein}$) farklı katekol derişimleri (0-100 μM) ele alınarak Michaelis-Menten kinetik modeli aracılığıyla hesaplanmıştır. Katekol derişimi 10, 50 ve 100 μM iken analizler yapılmış ve en yüksek *cis, cis*-mukonik asit miktarının (30 μM , verim: %100) 100 μM katekol varlığında elde edildiği görülmüştür. Ayrıca, substrat spesikliğini belirlemek amacıyla *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 hücrelerinin içerdiği katekol 1,2-dioksijenaz

enzim aktivitesine farklı substratların (katekol, 3-metilkatekol, 4-metilkatekol, 3-klorokatekol, 4-klorokatekol, 3,5-diklorokatekol, 4,5-diklorokatekol, hidrokinon) etkisi incelenmiş ve en yüksek aktivitenin (%100 ± 0) katekol varlığında elde edildiği belirlenmiştir (Guzik vd. 2013).

Genetik modifikasyon üzerine başka bir çalışmada ise, *Klebsiella pneumoniae* hücreleri *cis, cis*-mukonik asit üretimi için uygun olmazken gen aktarımı ile mikroorganizmanın genetiği değiştirilmiş ve katekolden 72 saat sonunda 2.1 g/L *cis, cis*-mukonik asit elde edilmiştir (37 °C). Bunun yanında, mikroorganizmanın farklı mutant türlerinin üretilen *cis, cis*-mukonik asit ve tüketilen katekol miktarlarına etkisi incelenmiştir (Jung vd. 2015).

Vardon vd. (2016) yaptıkları çalışmada, “engineered” *Pseudomonas putida* KT2440 ile 34.5 g L⁻¹ mukonat üretimini, kültür ortamından mukonik asitin geri kazanımını, mukonik asitin hidrojenasyonu ile bio-adipik asit üretimi ve biyo-adipik asitin naylon 6,6’ya polimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Fed-batch proses ile benzoatın biyolojik dönüşümüyle mukonik asit üretimi için *Pseudomonas putida* KT2440-CJ102 kullanılmıştır. Benzoat gibi aromatik bileşikler için mukonik asit, katekolden oksidatif halka açılmasıyla üretilmektedir. Bu çalışmada, glukoz büyümeyi desteklemek için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Son yirmi yıldır, endüstriyel biyoteknolojinin sürdürülebilirlik, yüksek seçicilik, doğa dostu olması ve yenilenebilir hammaddelerinin kullanılması gibi sunduğu avantajlara bağlı olarak bu alanda önemli gelişmeler meydana gelmiştir. Bu nedenle, biyoteknolojik alanda adipik asit üretiminde mukonik asitin öncü olarak kullanılması ve mikrobiyal yolla üretilmesi gelecek vadede alternatif bir yol olmaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)'den liyofilize (dondurulup-kurutulmuş) olarak temin edilmiş ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

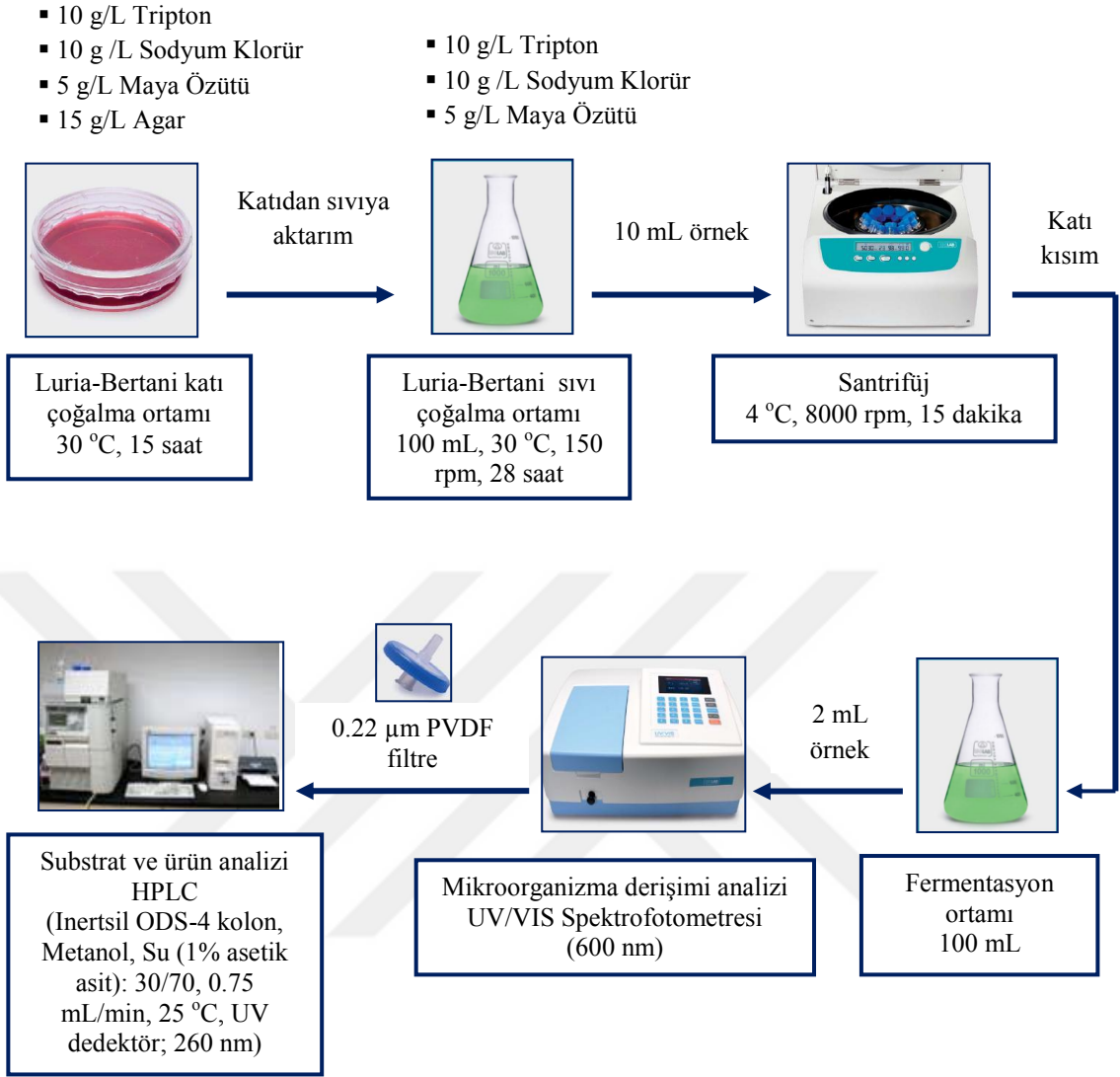
Tripton, maya özütü, sodyum klorür ve agar mikroorganizma sıvı ve katı besi ortamı hazırlamak için, sodyum benzoat (Na-benzoat); substrat, glukoz; karbon kaynağı, disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum klorür, amonyum sülfat, magnezyum sülfat, kalsiyum klorür ve demir sülfat ise fermentasyon ortamı bileşenleri olarak, sodyum hidroksit ve sülfürik asit ise ortam pH'ını ayarlamak için kullanılmıştır. Deneylede kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta Merck, Sigma, Riedel'den, analizlerde kullanılan asetik asit ve metanol ise HPLC saflığında olup Merck'ten temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri EK 1'de verilmiştir.

3.2 Yöntem

Deney sırasında izlenen basamaklar şekil 3.1'de şematik olarak gösterilmiştir.

3.2.1 Mikroorganizma ve kültür koşulları

Pseudomonas putida KT2440 (DSM 6125) çoğalma ortamı olarak içeriği çizelge 3.1'de verilen Luria Bertani (LB) ortamı kullanılmıştır. Ortam pH'ı 1 M NaOH ve 0.01 M H₂SO₄ çözeltisi ile 7.0'ye ayarlanmıştır. Katı üreme ortamı için ise aynı bileşime sahip ortama 15 g/L agar eklenmiştir. Hazırlanan çoğalma ortamları 121 °C'de ve 20 dakika süre ile otoklav cihazında (Hirayama HV-85L) steril edilmiştir. Sterilizasyonu tamamlanan katı ortam steril petri kaplarına dökülmüş ve 1 saat süreyle katı hale gelmesi için UV ışını altında bekletilmiştir. Kullanıma hazır ortamlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



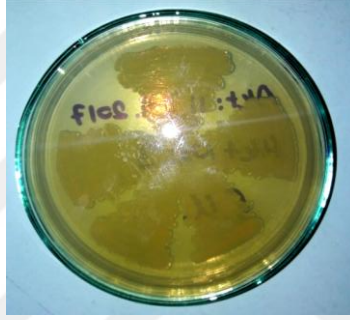
Şekil 3.1 Deney yöntemi basamaklarının şematik gösterimi

Çizelge 3.1 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) için Luria-Bertani (LB) çoğalma ortamı içeriği (Vardon vd. 2016)

Bileşen	Derişim (g/L)
Tripton	10
Sodyum klorür	10
Maya özütü	5
Agar ¹	15

¹Katı ortam hazırlanırken kullanılmıştır.

Liyofilize haldeki mikroorganizma ilk olarak 10 mL'lik LB sıvı ortamına aktarılarak canlandırılmıştır. Sıvı ortamdaki mikroorganizma çoğalma işlemi, aynı ortamı içeren 250 mL'lik erlenlerde 100 mL çalışma hacminde orbital çalkalayıcıda (Labcon 5081U) gerçekleştirilmiştir (30 °C, 150 rpm). Katı ortama ise, mikroorganizmalar öze yardımıyla aktarılmış ve çalkalamasız olarak 30 °C'de 15 saat süreyle inkübatörde (Shel Lab) çoğalmaları sağlanmıştır. Sıvı besi ortamlarında ölçek büyütme, sıvı ve katı besi ortamına ekim işlemlerinin tümü steril kabinde (Holten S-2010 1.8) gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücrelerinin katı ortamda çoğalmış hali şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücrelerinin katı ortamda çoğalmış hali

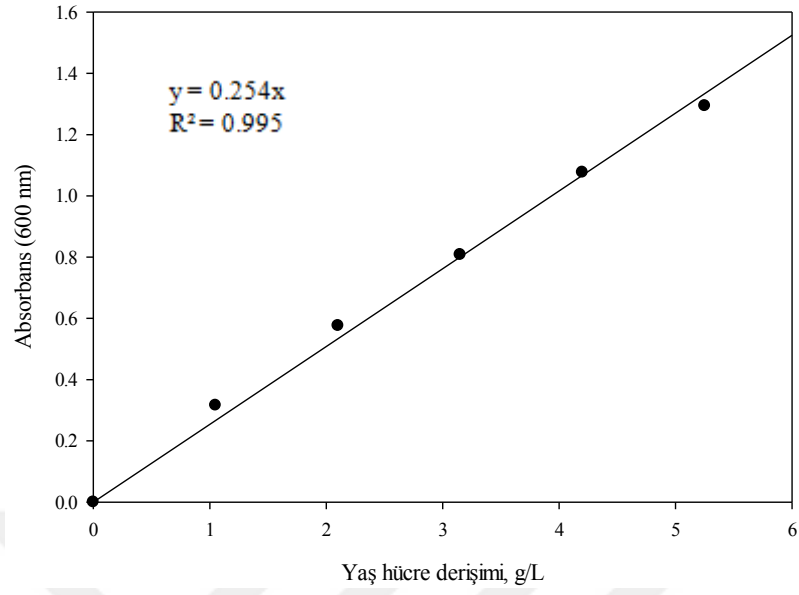
(LB ortamı, pH:7.0, 15 h, 30 °C)

3.2.2 Mikroorganizma kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

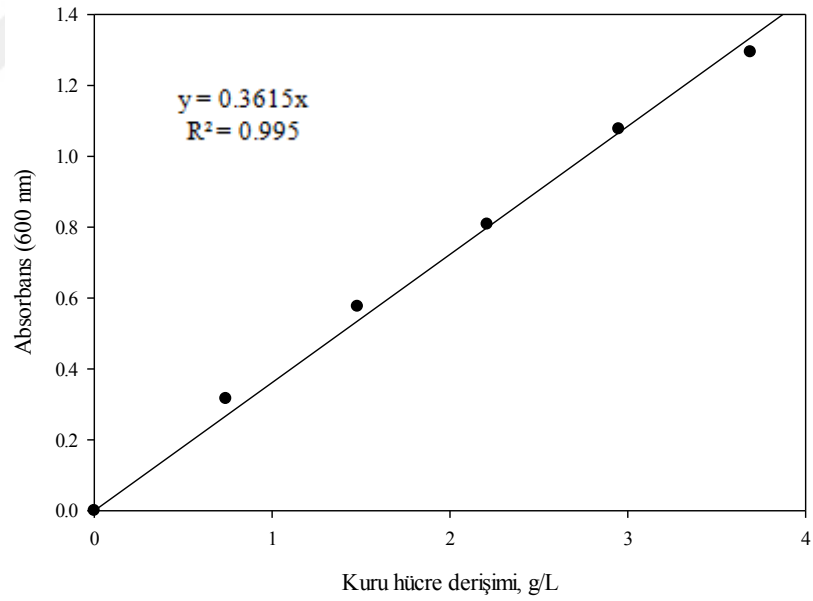
Fermentasyon süresince ortamdaki mikroorganizma derişimini belirlemek amacıyla hücre derişimi-absorbans kalibrasyon doğrularının oluşturulması gerekmektedir. Bunun için öncelikle mikroorganizma derişiminin zamanla değişim grafiği oluşturulmuştur. Mikroorganizma çoğalma eğrisinin oluşturulması amacıyla 100 mL LB ortamı içeren 250 mL'lik erlenlerde 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızında çoğalma gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırması ve UV/VIS spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1601) 400-800 nm absorbans aralığının taranması sonucunda *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücrelerinin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu değeri 600 nm olarak belirlenmiştir. Buna göre çoğalma süresince ortamdan belirli aralıklarla

alınan 2 mL'lik örnekler UV/VIS spektrofotometresinde 600 nm'de analizlenmiştir. Analizler sonucunda 28. saatten sonra absorbansın giderek düştüğü gözlenmiş ve buna göre çoğalmanın 28 saatte tamamlandığı sonucuna varılmıştır.

Hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması için 250 mL'lik 2 adet erlenlerin her biri 100 mL'lik LB ortamı içerecek şekilde hazırlanmış ve bu ortamlarda mikroorganizma çoğalma işlemi eşanlı olarak 28 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. 100 mL'lik çoğalma ortamının 50 mL'si yaş hücre derişimini, diğer 50 mL'si ise kuru hücre derişimini belirlemek için kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak, ortamdan alınan 50 mL'lik örnek 4 °C, 8000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir (Santrifüj cihazı: Hettich Rotina 35 R). Sıvı kısım atılarak katı kısım, darası alınmış santrifüj tüpleri ile tartılmış ve elde edilen yaş hücre kütlesi örnek hacmine (50 mL) bölünerek yaş hücre derişimi hesaplanmıştır. Aynı işlem kuru hücre derişimini belirlemek için de gerçekleştirilmiş, santrifüj sonrası elde edilen katı kısım sabit tartıma gelene kadar etüvde (Nüve, EN400) kurutulmuştur. Sabit tartım sonucu elde edilen kuru hücre kütlesi örnek hacmine (50 mL) bölünerek kuru hücre derişimi hesaplanmıştır. Eşanlı olarak gerçekleştirilen 100 mL'lik diğer çoğalma ortamından ise belirli aralıklarla alınan örnekler LB ortamı ile seyreltilmiş (0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mL mikroorganizma çoğalma ortamı / 2 mL) ve UV/VIS spektrofotometresinde 600 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Ardından her bir seyreltme oranına karşılık gelen yaş ve kuru hücre derişimleri hesaplanmıştır (EK 2). Buna göre, elde edilen yaş hücre derişimi-absorbans ve kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafikleri sırasıyla şekil 3.3-3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3 Yaş hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiği



Şekil 3.4 Kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiği

3.2.3 Fermentasyon ile *cis*, *cis*-mukonik asit (ccMA) üretimi

Fermentasyon 250 mL'lik erlenlerde 100 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Üretim ortamı sodyum benzoat, glukoz, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ ve FeSO₄ bileşenlerinin belli derişimlerde ortama eklenmesinin ardından pH'ının NaOH ve H₂SO₄ çözeltileri ile ayarlanmasıyla hazır hale getirilmiş ve 121 °C'de ve 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterillenmiştir.

Fermentasyon başlatılırken mikroorganizmanın çoğaltıldığı LB ortamından alınan 10 mL'lik örnek 4 °C, 8000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılarak katı kısmın tartılmasıyla 10 mL'lik LB ortamı örneğinin yaklaşık 0.4 g yaş hücre içerdiği belirlenmiştir. Buna göre her fermentasyon işlemi, yaklaşık 0.4 g yaş hücrenin 100 mL'lik üretim ortamına aktarılması ile başlatılmıştır.

Üretim, belirlenen sıcaklık ve başlangıç pH'ında 150 rpm çalkalama hızında orbital çalkalayıcıda 32 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon esnasında belirli aralıklarla ortamdaki alınan 2 mL'lik örneklerin UV/VIS spektrofotometresinde 600 nm'de absorbansı ölçülerek fermentasyon süresince mikroorganizma derişimindeki değişim izlenmiştir. Alınan örnekler daha sonra ürün derişimini belirlemek amacıyla HPLC'de (Thermo Finnigan Spectra System) analizlenmek üzere 0.22 µm'lik PVDF filtrelerden süzülerek viallere doldurulmuştur. Fermentasyon ortamına aşılama ve örnek alma işlemlerinin tümü steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 *cis*, *cis*-Mukonik asit üretimi için ortam koşulları tasarımı

Çalışmanın amacı, *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile sodyum benzoattan *cis*, *cis*-mukonik asitin mikrobiyal üretimi ve fermentasyon ortamı koşullarının deney tasarım yöntemi ile optimizasyonun gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla öncelikle faktör olarak belirlenen 11 ortam koşulundan (başlangıç pH'ı, sıcaklık, sodyum benzoat (substrat), glukoz, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄ derişimi) üretimde en etkili olanların belirlenmesi amacıyla Plackett-

Burman deney tasarımı (Plackett-Burman design, PBD) uygulanmıştır. Belirlenen etkili faktörlerin optimize edilmesi ise, cevap yüzey yöntemi (Response surface method, RSM) olan merkezi kompozit deney tasarımı (Central composite design, CCD) ile gerçekleştirilmiştir. Her iki tasarımda da cevap değişkeni olarak *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi ve mikroorganizma derişimi seçilmiştir. Deney tasarımı sırasında gerçekleştirilen deneylerde “batch” işletim uygulanmıştır.

Design Expert (7.0) programı kullanılarak gerçekleştirilen istatistiksel deney tasarımında kontrol edilebilirliğin sağlanması ve deneysel hatanın en aza indirilmesi amacıyla her deney seti iki kez tekrarlanmıştır. Sonuçların birbirine yakın olduğu belirlenmiş ve bu nedenle elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır.

3.2.5 Plackett-Burman deney tasarımı ile ortam koşullarının belirlenmesi

Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak 11 üretim ortamı koşulunun (Na-benzoat, glukoz, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , CaCl_2 , FeSO_4 derişimi, başlangıç pH'ı ve sıcaklık) önemi araştırılmıştır. Bu tasarım, faktörlerin birbirleriyle etkileşimini göz önünde bulundurmeyen birinci dereceden bir modele dayanmaktadır (Kumar vd. 2011). Plackett-Burman deney tasarımında faktörlerin aralık ve seviye değerleri, yapılan ön deneylere ve literatür verilerine (4 mM glukoz, 6 g/L KH_2PO_4 , 2.25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13.56 g/L Na_2HPO_4 , 1 g/L NaCl , 2 mM MgSO_4 , 18 μM FeSO_4 , 100 μM CaCl_2 , pH: 7.2, 30 °C sıcaklık) dayanarak belirlenmiştir (Johnson vd. 2016).

Ortam koşullarının seviye ve aralık değerleri çizelge 3.2'de verilen Plackett-Burman deney tasarımı 3 seviye (düşük seviye: -1, orta seviye: 0, yüksek seviye: +1) ve 15 deney (run) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler, LB ortamında çoğaltılan hücrelerin 10 mL'sinin santrifüjlenerek sıvı kısmından ayrılan yaklaşık 0.4 g yaş hücrenin, deney tasarımı ile belirlenen 100 mL ortam içeren 250 mL erlenlere aktarılmasıyla başlatılmış olup, fermentasyon işlemi; belirlenen sıcaklık ve başlangıç pH'ında, 150 rpm çalkalama hızında, 32 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Plackett-

Burman deney tasarımıyla elde edilmiş en etkili faktörlerin optimum değerleri, cevap yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.2 Plackett-Burman deney tasarımı seviye ve aralık değerleri

No	Faktör	-1	0	+1
1	Na-Benzoyat derişimi, mM	10.0	15.0	20.0
2	Glukoz derişimi, mM	0.0	10.0	20.0
3	Sıcaklık, °C	25.0	30.0	35.0
4	Başlangıç pH'ı	6.0	7.0	8.0
5	Na ₂ HPO ₄ derişimi, g/L	10.0	14.0	18.0
6	KH ₂ PO ₄ derişimi, g/L	2.0	6.0	10.0
7	NaCl derişimi, g/L	0.5	1.0	1.5
8	(NH ₄) ₂ SO ₄ derişimi, g/L	1.0	2.0	3.0
9	MgSO ₄ derişimi, mM	1.0	2.0	3.0
10	CaCl ₂ derişimi, µM	50.0	100.0	150.0
11	FeSO ₄ derişimi, µM	13.0	18.0	23.0

3.2.6 Cevap yüzey yöntemi (RSM) ile ortam koşullarının optimizasyonu

Cevap yüzey yöntemi, cevap değişkenlerinin deneysel faktörlere olan bağıllığını faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin göz önünde bulundurarak incelemek için kullanılmıştır (Kumar vd. 2011). Plackett-Burman deney tasarımı ile üretime etki eden en önemli faktörlerin (başlangıç pH'ı, Na-benzoat, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişimi) optimum değerlerine ulaşmak amacıyla merkez noktasında 6 tekrarlı olarak oluşturulan merkezi kompozit deney tasarımı uygulanmıştır. Ortam koşullarının seviye ve aralık değerleri çizelge 3.3'te verilen merkezi kompozit deney tasarımı 5 seviye (-2, -1, 0, +1, +2) ve 30 deney (run) şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Tüm deneyler Plackett-Burman deney tasarımında da belirtildiği gibi, fermentasyon 0.4 g yaş hücrenin merkezi kompozit deney tasarımı ile belirlenen 100 mL ortam içeren 250 mL erlenlere aktarılmasıyla başlatılmış olup, üretim; belirlenen sıcaklık ve başlangıç pH'ında, 150 rpm çalkalama hızında, 32 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Diğer faktörlerin değerleri ise, Plackett-Burman deney tasarımı sonucunda; 18 g/L Na₂HPO₄, 10 g/L KH₂PO₄, 20 mM glukoz, 1 mM MgSO₄, 150 µM CaCl₂, 13 µM FeSO₄ ve 35 °C olarak belirlenmiş ve bu değerlerde sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.3 RSM ile deney tasarımı seviye ve aralık değerleri

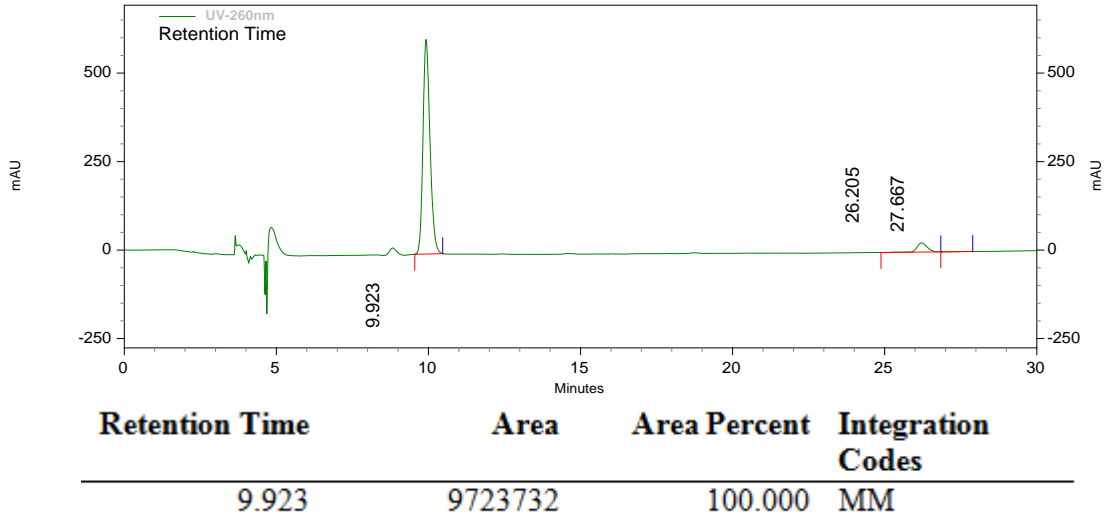
No	Faktör	-2	-1	0	+1	+2
1	Na-Benzoyat derişimi, mM	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0
2	Başlangıç pH'ı	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
3	NaCl derişimi, g/L	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
4	(NH ₄) ₂ SO ₄ derişimi, g/L	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8

3.3 Analiz Sistemi

cis, cis-Mukonik asit ve Na-benzoat analizleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC, Thermo Finnigan Spectra System), mikroorganizma derişim analizleri ise Diod Array dedektör kullanılarak UV/VIS spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601) ile gerçekleştirilmiştir. HPLC analiz koşulları çizelge 3.4'te verilmiştir. Çizelge 3.4'te verilen koşullarda *cis, cis*-mukonik asitin kalma süresi 9-10 dakika, Na-benzoatın kalma süresi ise, 27 dakikadır. *cis, cis*-Mukonik asit ve Na-benzoatın standart çözeltilerinin kromatogramları sırasıyla şekil 3.5-3.6'da verilmiştir. *cis, cis*-Mukonik asitin *Pseudomonas putida* biyokatalizörlüğünde Na-benzoattan üretiminin t=32. saat ve 10 kat seyreltilmiş haldeki örneklerine ait HPLC kromatogramı ise şekil 3.7'de gösterilmiştir. Şekil 3.7'de *cis, cis*-mukonik asitin kalma süresi 10 dakika iken, Na-benzoatın kalma süresi 30 dakikadır.

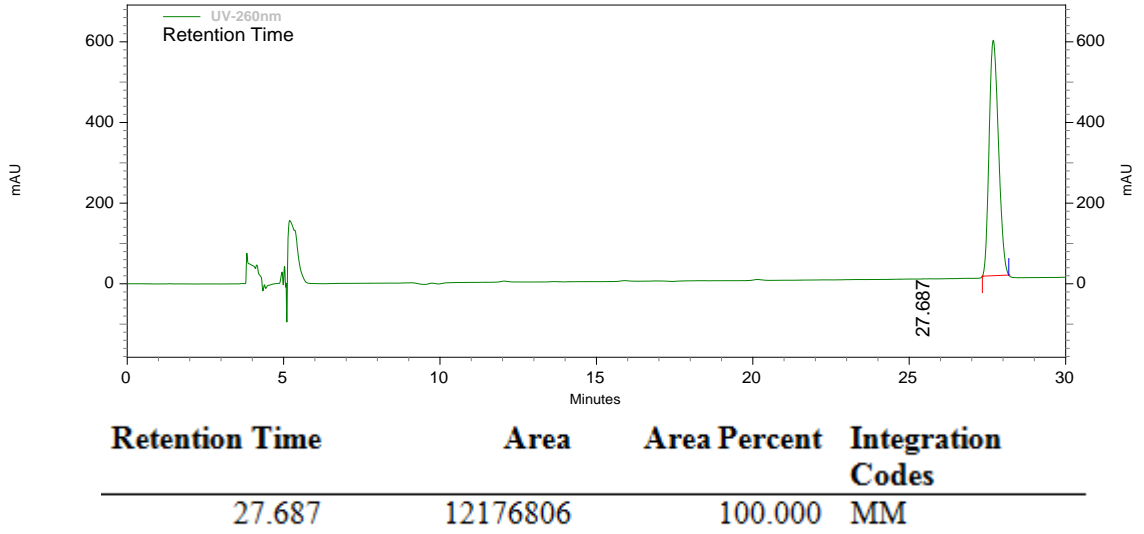
Çizelge 3.4 HPLC analiz koşulları

HPLC	Kolon	Taşıyıcı Faz	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	UV Dedektör Dalga Boyu
Thermo Finnigan Spectra SYSTEM	Inertsil ODS-4 (5µm, 4.6x250 mm)	Metanol/su (%1 (v/v) asetik asit): 30/70	0.75 mL/min	10 µL	25 °C	260 nm



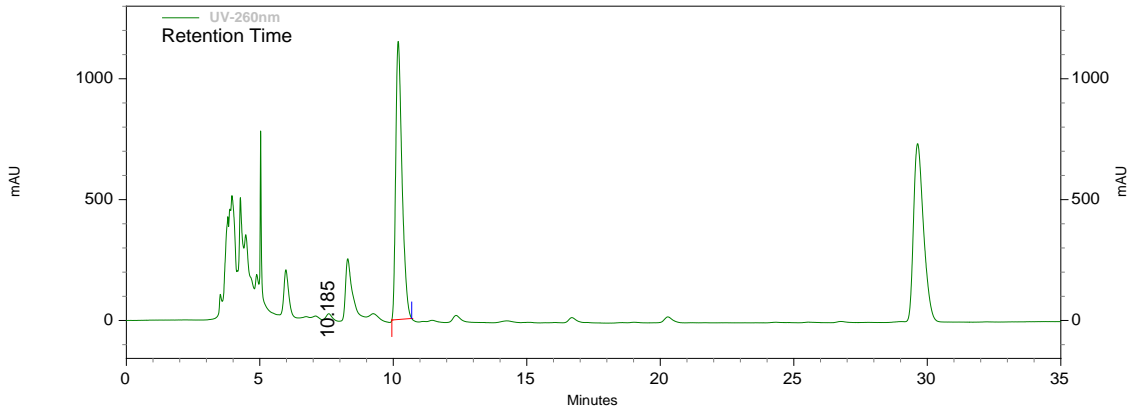
Şekil 3.5 *cis, cis*-Mukonik asit-su çözeltisinin (0.03 mM) HPLC kromatogramı

(HPLC: Thermo Finnigan Spectra System, kolon: Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6x250 mm), taşıyıcı faz: metanol/su (%1 (v/v) asetik asit) 30/70, akış hızı: 0.75 mL/min, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kolon sıcaklığı: 25 °C, UV dedektör dalga boyu: 260 nm)



Şekil 3.6 Na-benzoat-su çözeltisinin (0.6 mM) HPLC kromatogramı

(HPLC: Thermo Finnigan Spectra System, kolon: Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6x250 mm), taşıyıcı faz: metanol/su (%1 (v/v) asetik asit) 30/70, akış hızı: 0.75 mL/min, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kolon sıcaklığı: 25 °C, UV dedektör dalga boyu: 260 nm)



Retention Time	Area	Area Percent	Integration Codes
10.185	18957287	50.100	MM
29.638	18881928	49.900	MM

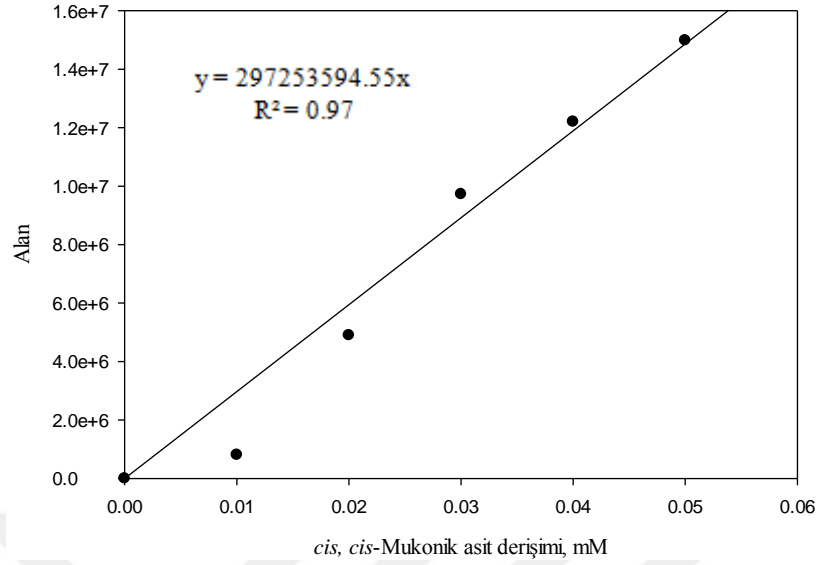
Şekil 3.7 *cis, cis*-Mukonik asitin *Pseudomonas putida* biyokatalizörlüğünde sodyum benzoattan üretiminin t=32 saat örneğinin HPLC kromatogramı

(RSM Deney No: 11, 20 mM Na-benzoat, 20 mM glukoz, 35 °C sıcaklık, pH:8.0, 18 g/L Na₂HPO₄, 10 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L NaCl, 1.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 150 µM CaCl₂, 13 µM FeSO₄)

(HPLC: Thermo Finnigan Spectra System, kolon: Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6x250 mm), taşıyıcı faz: metanol/su (%1 (v/v) asetik asit) 30/70, akış hızı: 0.75 mL/min, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kolon sıcaklığı: 25 °C, UV dedektör dalga boyu: 260 nm)

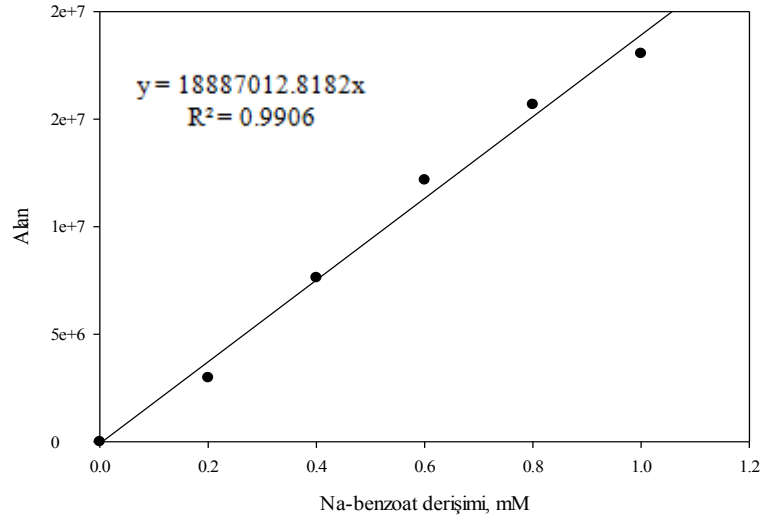
3.3.1 *cis, cis*-Mukonik asit ve Na-benzoat kalibrasyon doğrularının oluşturulması

cis, cis-Mukonik asit ve Na-benzoat kalibrasyon doğrularının oluşturulması için *cis, cis*-mukonik asitten 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 mM, Na-benzoattan ise 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mM derişimlerinde standart çözeltiler hazırlanmış ve çizelge 3.5'te verilen koşullarda HPLC'de analizlenmiştir. Standart çözeltilerin analizleri sonucu oluşturulan *cis, cis*-mukonik asit ve Na-benzoat kalibrasyon doğruları sırasıyla şekil 3.8-3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.8 *cis, cis*-Mukonik asit kalibrasyon doğrusu

(HPLC analiz koşulları: Thermo Finnigan Spectra System, kolon: Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6x250 mm), taşıyıcı faz: metanol/su (%1 (v/v) asetik asit) 30/70, akış hızı: 0.75 mL/min, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kolon sıcaklığı: 25 °C, UV dedektör dalga boyu: 260 nm)



Şekil 3.9 Na-benzoat kalibrasyon doğrusu

(HPLC analiz koşulları: Thermo Finnigan Spectra System, kolon: Inertsil ODS-4 (5 µm, 4.6x250 mm), taşıyıcı faz: metanol/su (%1 (v/v) asetik asit) 30/70, akış hızı: 0.75 mL/min, enjeksiyon hacmi: 10 µL, kolon sıcaklığı: 25 °C, UV dedektör dalga boyu: 260 nm)

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

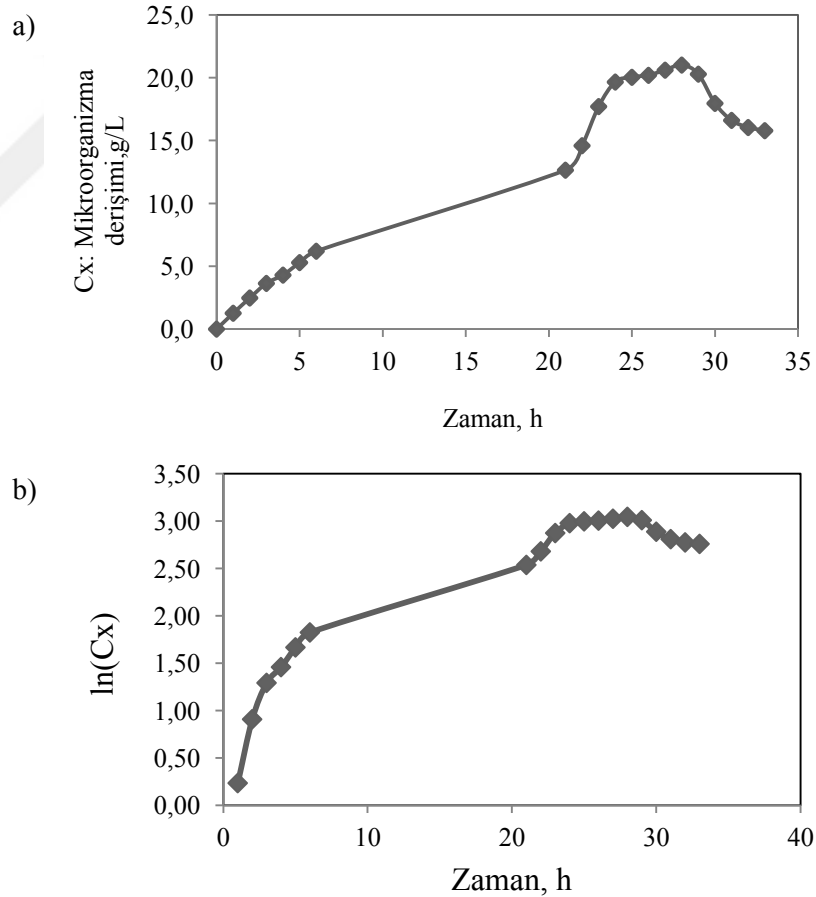
Çalışmanın başlangıcında liyofilize haldeki *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri, içeriği çizelge 3.1’de verilen 10 mL Luria Bertani (LB) ortamına aktarılarak canlandırılmış ve daha sonra 100 mL LB ortamında 250 mL’lik erlenlerde çoğaltılmıştır (30 °C, pH: 7.0, 150 rpm). Yaş hücre derişimi-absorbans ve kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş, bu grafikler yardımıyla mikroorganizma çoğalma eğrisi elde edilmiştir. Böylece, *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi için gerekli ön çalışmalar tamamlanmıştır.

Pseudomonas putida KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde 11 adet parametre yer almaktadır. *cis*, *cis*-Mukonik asit derişimini arttırmak için ortam koşullarının optimum değerlerini belirlemek gerekmektedir. İstatistiksel deney tasarım yöntemlerinden olan cevap yüzey yöntemi (RSM), 11 ortam koşulunu optimize etmek için kullanıldığında $N=2^k+2k+n_0$ formülüne göre 149 adet deney elde edilmektedir. Burada k; faktör sayısını, n_0 ; merkez noktasındaki tekrar sayısını ifade etmektedir (Murthy vd. 2000). Faktöriyel deney tasarımı olan Plackett-Burman, deney sayısını azaltıp minimum sayıda deney kullanarak üretime etki eden en önemli değişkenleri tanımlamak için kullanılan etkili bir yöntemdir (Rajendran vd. 2009). Buna göre, *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde yer alan bütün değişkenler dikkate alınarak öncelikle Plackett-Burman deney tasarımının uygulanmasıyla en etkili faktörler belirlenmiş, ardından bu faktörler kullanılarak RSM ile üretim faktörlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Buna göre çalışmanın amacı, *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri tarafından sodyum benzoattan *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi ve Plackett-Burman deney tasarımı ile ortam koşulları arasından (sodyum benzoat, glukoz, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$ derişimi, sıcaklık ve pH) üretimde en etkili olanlarının belirlenmesi ve etkili parametrelerin cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla, ortam koşulları seviye ve aralıkları belirlenerek Design Expert (7.0) ile tasarımı gerçekleştirilmiş ve optimum koşullar elde edilmiştir.

4.1 Mikroorganizma oğalma Eğrisi

Pseudomonas putida KT2440 (DSM 6125) oğalma eğrisinin oluşturulması için 100 mL LB ortamı içeren 250 mL'lik erlenlerde 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızında çoğalma gerçekleştirilmiştir. Çoğalma suresince ortamdan belirli aralıklarla alınan 2 mL'lik rnekler UV-VIS spektrofotometresinde 600 nm'de analizlenmiştir (EK 3). Analizler sonucunda 28. saatten sonra absorbansın giderek dřtđđđ gözlenmiş ve buna göre çoğalmanın 28 saatte tamamlandıđđ sonucuna varılmıştır. Yaş hücre derişimi-absorbans ve kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafikleri (şekil 3.3-3.4) yardımıyla mikroorganizma derişiminin zamanla değişim eğrileri çizilmiş ve şekil 4.1'de verilmiştir. 28 saat sonunda 21.0 g/L mikroorganizma derişimine ulaşılmıştır.



şekil 4.1 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) yaş hücre çoğalma eğrileri

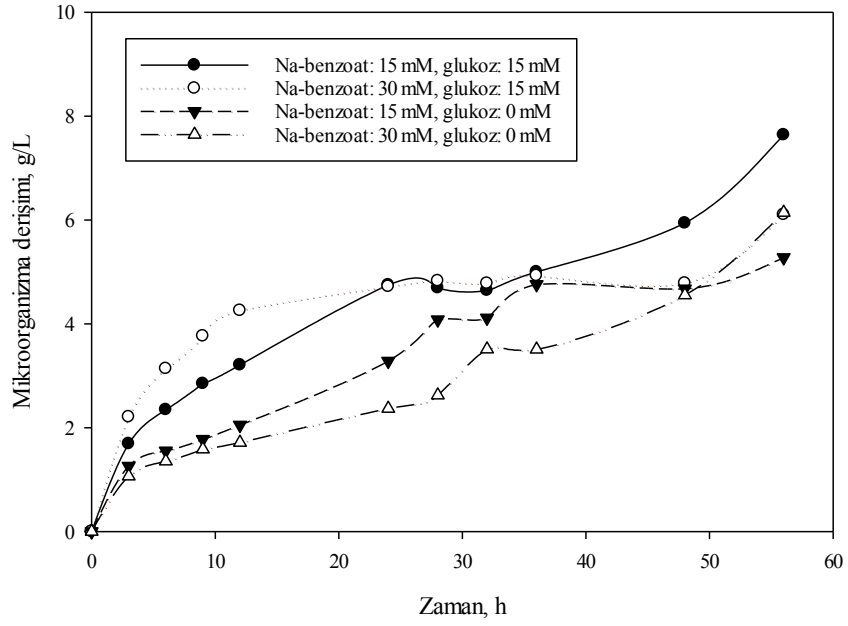
a. Mikroorganizma derişimi-zaman, b. Üstel oğalma eğrisi, lnC_x-zaman

(C_x: Mikroorganizma derişimi, LB ortamı: pH: 7.0, T: 30 °C, alkalama hızı: 150 rpm)

4.2 *cis, cis*-Mukonik Asit Üretimi İçin Deney Tasarımı

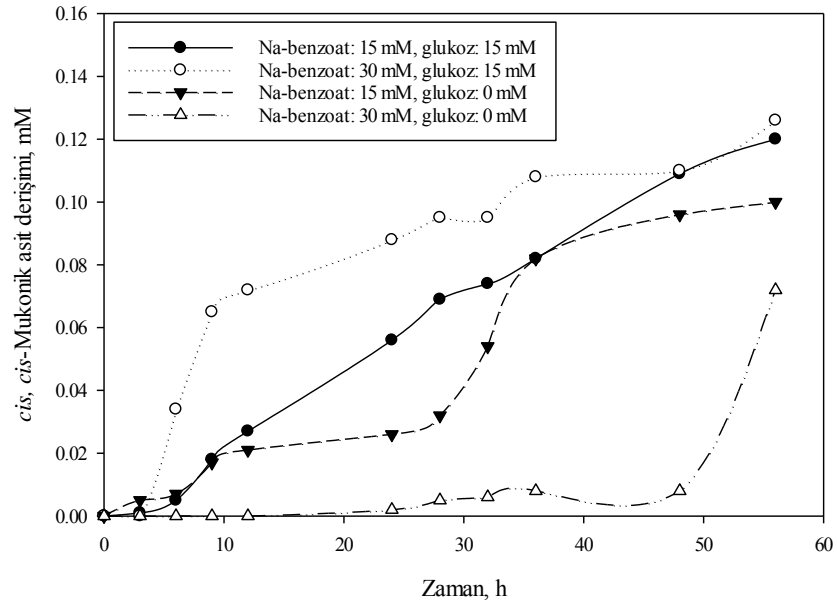
Pseudomonas putida KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis, cis*-mukonik asit üretiminde, *cis, cis*-mukonik asit ve mikroorganizma derişimini arttırmak için yapılacak istatistiksel deney tasarımında yer alan faktörlerin aralık ve seviye değerlerini belirlemek amacıyla bazı ön deneyler gerçekleştirilmiştir. Ön deneylerde kullanılan üretim ortamı koşulları ve substrat (Na-benzoat) derişimi literatür araştırmaları sonucunda belirlenmiştir (Johnson vd. 2016). Gerçekleştirilen ön çalışmalarında hazırlanan ortamların her biri, fermentasyon ortamı bileşenlerinden; 6 g/L KH₂PO₄, 2.25 g/L (NH₄)₂SO₄, 13.56 g/L Na₂HPO₄, 1 g/L NaCl, 2 mM MgSO₄, 18 µM FeSO₄, 100 µM CaCl₂ içermektedir. Buna ek olarak ön deneylerde substrat (Na-benzoat) ve glukoz derişiminin etkisini incelemek amacıyla, 15 mM Na-Benzoat ve 15 mM glukoz, 30 mM Na-benzoat ve 15 mM glukoz, 15 mM Na-benzoat ve 0 mM glukoz, 30 mM Na-benzoat ve 0 mM glukoz içeren dört adet ortam hazırlanmıştır.

Fermentasyon süresince 3., 6., 9., 24., 28. ve 32. saatlerde 2 mL'lik örnekler alınarak mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimindeki değişimler izlenmiş olup, elde edilen sonuçlar sırasıyla EK 4-5'te verilmiştir. *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis, cis*-mukonik asit üretimi için yapılan ön çalışmalarda elde edilen mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi şekil 4.2'de, *cis, cis*-mukonik asit derişiminin zamanla değişimi ise şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi için yapılan ön çalışmalarda elde edilen mikroorganizma derişiminin zamanla değişimi

(pH: 7.2, T: 30 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç yaş hücre miktarı: 0.4 g)



Şekil 4.3 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi için yapılan ön deneylerde elde edilen *cis*, *cis*-mukonik asit derişiminin zamanla değişimi

(pH: 7.2, T: 30 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç yaş hücre miktarı: 0.4 g).

Mikroorganizma derişiminin zamanla değişimini veren Şekil 4.2 incelendiğinde, 15 mM glukoz içeren ortamlarda mikroorganizma ęoęalmasının daha fazla olduğu görülmüŐ, böylece *Pseudomonas putida* hücrelerinin ęoęalmak için glukozu karbon kaynağı olarak kullandığı sonucuna varılmıştır. *cis, cis*-Mukonik asit derişimin zamanla değişimini gösteren Şekil 4.3'te ise, Na-benzoat derişiminin en fazla olduğu (30 mM) ve 15 mM glukoz içeren ortamda en yüksek *cis, cis*-mukonik asit derişimine ulaşılmıştır.

4.2.1 Plackett-Burman deney tasarımı ile en etkili ortam koşullarının belirlenmesi

Deney tasarım yöntemi ile faktörlerin sonucu ne kadar etkilediği ve hangi faktörün daha önemli ve etkisinin daha yüksek olduğu ortaya koyulmaktadır. Tek faktör-tek zaman yöntemi olarak bilinen klasik optimizasyon ęok sayıda deney gerektiren ve zaman alan bir sreğ olurken deneysel tasarım kullanılarak yapılan optimizasyon ęalıŐmaları daha az deney sayesinde daha kısa sürede sonuç elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Aytar vd., 2013).

Pseudomonas putida KT2440 (DSM 6125) mikroorganizması tarafından sodyum benzoattan *cis, cis*-mukonik asit üretimi için üretim ortamı tasarımı ilk aşamada Plackett-Burman deney tasarımı ile geręekleŐtirilmiŐtir. Faktör sayısı ęok olduğunda en etkili faktörlerin belirlenmesinde uygulanan bu yöntemde ęizelge 3.2'de gösterilen 11 adet ortam koşulundan en etkili faktörlerin belirlenmesi amacıyla Plackett-Burman uygulanmıştır. Bu amaçla, Design Expert (7.0) yardımıyla hazırlanan Plackett-Burman deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değişkeni değerleri ęizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde 11 faktör için Plackett-Burman deney tasarımı matrisi ve elde edilen cevap değerleri

No	x_1^a , mM	x_2^b , mM	x_3^c , °C	x_4^d , g/L	x_5^e , g/L	x_6^f , g/L	x_7^g , g/L	x_8^h , g/L	x_9^i , g/L	x_{10}^j , µM	x_{11}^k , µM	Cevap değişkenleri	
												M.O. ^l derişimi, g/L	ccMA ^m derişimi, mM
1	20.0	0.0	35.0	8.0	18.0	2.0	0.5	1.0	3.0	50.0	23.0	5.990	0.186
2	10.0	0.0	25.0	6.0	10.0	2.0	0.5	1.0	1.0	50.0	13.0	5.560	0.026
3	10.0	20.0	25.0	8.0	18.0	2.0	1.5	3.0	3.0	50.0	13.0	6.940	0.005
4	15.0	10.0	30.0	7.0	14.0	6.0	1.0	2.0	2.0	100.0	18.0	8.670	0.074
5	20.0	20.0	25.0	8.0	18.0	10.0	0.5	1.0	1.0	150.0	13.0	5.440	0.382
6	15.0	10.0	30.0	7.0	14.0	6.0	1.0	2.0	2.0	100.0	18.0	8.790	0.112
7	20.0	20.0	25.0	6.0	10.0	10.0	0.5	3.0	3.0	50.0	23.0	5.550	0.039
8	20.0	20.0	35.0	6.0	10.0	2.0	1.5	1.0	3.0	150.0	13.0	4.090	0.069
9	10.0	0.0	25.0	8.0	10.0	10.0	1.5	1.0	3.0	150.0	23.0	4.980	0.036
10	15.0	10.0	30.0	7.0	14.0	6.0	1.0	2.0	2.0	100.0	18.0	9.030	0.101
11	10.0	0.0	35.0	6.0	18.0	10.0	0.5	3.0	3.0	150.0	13.0	3.760	0.064
12	20.0	0.0	25.0	6.0	18.0	2.0	1.5	3.0	1.0	150.0	23.0	1.330	0.003
13	20.0	0.0	35.0	8.0	10.0	10.0	1.5	3.0	1.0	50.0	13.0	4.850	0.074
14	10.0	20.0	35.0	6.0	18.0	10.0	1.5	1.0	1.0	50.0	23.0	4.940	0.069
15	10.0	20.0	35.0	8.0	10.0	2.0	0.5	3.0	1.0	150.0	23.0	6.880	0.075

^a x_1 : Na-Benzozat derişimi, ^b x_2 : Glukoz derişimi, ^c x_3 : Sıcaklık, ^d x_4 : Başlangıç pH'ı, ^e x_5 : Na₂HPO₄ derişimi, ^f x_6 : KH₂PO₄ derişimi, ^g x_7 : NaCl derişimi, ^h x_8 : (NH₄)₂SO₄ derişimi, ⁱ x_9 : MgSO₄ derişimi, ^j x_{10} : CaCl₂ derişimi, ^k x_{11} : FeSO₄ derişimi, ^l M.O.: Mikroorganizma, ^m ccMA: *cis*, *cis*-Mukonik asit

Cevap değişkenleri (mikroorganizma ve *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi) için Plackett-Burman deney tasarımı sonucunda faktörlerin üretime % katkıları karşılaştırıldığında sıcaklık faktörünün % katkı değerinin; mikroorganizma derişimi için % 0.070 (Şekil 4.4), *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için ise % 0.14 (Şekil 4.5) olarak elde edildiği ve diğer faktörlerden oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle ANOVA (Analysis of Variables) testi sonuçları alınmadan önce daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak adına sıcaklık faktörü ihmal edilerek şekil 4.4'te "e" ile simgelenmiş, diğer faktörler ise "Main Effect" olarak seçilerek "M" ile simgelenmiş olup, cevap değişkenlerinden olan mikroorganizma ve *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için elde edilen ANOVA analizi sonuçları sırasıyla çizelge 4.2-4.3'te verilmiştir.

Karelerin ortalaması, her iki değişim kaynağının (model ve hata varyansı) her birinin karelerinin toplamının, ilgili serbestlik derecelerine bölünmesiyle elde edilmektedir. Fisher varyans oranı olarak bilinen F değeri, faktörlerin verilerindeki ortalama istatistiksel varyansı ne kadar iyi tanımladığı hakkında bilgi sağlamaktadır. Genelde, model varyansına bağlı karelerin ortalaması değerinin, hata varyansına bölünmesiyle hesaplanmaktadır. F değeri ne kadar yüksekse, faktörlerin önem derecesi de o kadar fazladır (Patil vd. 2016).

Faktörlerin her birinin önemini belirlemede kullanılan bir diğer araç ise değişkenlerin p değerleridir. p değeri, büyüklüğü ne kadar küçükse, o kadar anlamlı olan bir bağıntı katsayısıdır (Murthy vd. 2000). Mikroorganizma ve *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için ANOVA testi sonuçları incelendiğinde modelin p değerlerinin sırasıyla 0.0026 ve 0.0060 olması modelde hatanın meydana gelme ihtimalinin sırasıyla % 0.26 ve % 0.60 ve bu değerlerin 0.05'ten küçük olması % 95 güven seviyesinde yer aldığını, böylece iki cevap değişkeni için de modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Buna göre, uyum eksikliği p değerlerinin sırasıyla 0.3798 ve 0.5671 olması iki cevap değişkeni için de modelde uyum eksikliği olmadığını yani modelin anlamlı olduğunun diğer bir göstergesidir (Çizelge 4.2-4.3).

Mikroorganizma derişimi için üretimi etkileyen değişkenler arasından Na-Benzolat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ ve CaCl₂'ün p değerlerinin 0.05'ten

küçük olması sebebiyle önemli faktörler olarak belirlenmiştir. *cis*, *cis*-Mukonik asit derişimi için bu faktörler; Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ ve FeSO₄ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2-4.3).

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A-NB	-0.97	2.81	4.71
B-G	1.23	4.53	7.58
C-T	0.12	0.042	0.070
D-pH	1.64	8.09	13.53
E-Na ₂ HPO ₄	-0.58	1.03	1.72
F-KH ₂ PO ₄	-0.21	0.13	0.22
G-NaCl	-1.01	3.05	5.11
H-(NH ₄) ₂ SO ₄	-0.28	0.24	0.40
J-MgSO ₄	0.38	0.44	0.74
K-CaCl ₂	-1.22	4.50	7.54
L-FeSO ₄	-0.16	0.078	0.13

Şekil 4.4 Mikroorganizma derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı faktörlerin % katkı sonuçlarının ekran görüntüsü

(A-NB: Na-benzoat derişimi (x_1); B-G: Glukoz derişimi (x_2); C-T: Sıcaklık (x_3); D-pH: başlangıç pH'ı (x_4); E-Na₂HPO₄: Na₂HPO₄ derişimi (x_5); F-KH₂PO₄: KH₂PO₄ derişimi (x_6); G-NaCl: NaCl derişimi (x_7); H-(NH₄)₂SO₄ derişimi (x_8); J-MgSO₄: MgSO₄ derişimi (x_9); K-CaCl₂: CaCl₂ derişimi (x_{10}); L-FeSO₄: FeSO₄ derişimi (x_{11}))

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A-NB	0.080	0.019	15.64
B-G	0.042	5.208E-003	4.28
C-T	7.667E-003	1.763E-004	0.14
D-pH	0.081	0.020	16.31
E-Na ₂ HPO ₄	0.065	0.013	10.41
F-KH ₂ PO ₄	0.050	7.500E-003	6.16
G-NaCl	-0.086	0.022	18.23
H-(NH ₄) ₂ SO ₄	-0.085	0.022	17.67
J-MgSO ₄	-0.038	4.408E-003	3.62
K-CaCl ₂	0.038	4.408E-003	3.62
L-FeSO ₄	-0.035	3.745E-003	3.08

Şekil 4.5 *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı faktörlerin % katkı sonuçlarının ekran görüntüsü

(A-NB: Na-benzoat derişimi (x_1); B-G: Glukoz derişimi (x_2); C-T: Sıcaklık (x_3); D-pH: başlangıç pH'ı (x_4); E-Na₂HPO₄: Na₂HPO₄ derişimi (x_5); F-KH₂PO₄: KH₂PO₄ derişimi (x_6); G-NaCl: NaCl derişimi (x_7); H-(NH₄)₂SO₄ derişimi (x_8); J-MgSO₄: MgSO₄ derişimi (x_9); K-CaCl₂: CaCl₂ derişimi (x_{10}); L-FeSO₄: FeSO₄ derişimi (x_{11}))

Çizelge 4.2 Mikroorganizma derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları

Değişimin Kaynağı	Karelerin Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F	Yorum
Model	24.90	10	2.49	68.40	0.0026	Anlamlı
x ₁ : Na-Benzoat	2.81	1	2.81	77.27	0.0031	
x ₂ : Glukoz	4.53	1	4.53	124.34	0.0015	
x ₄ : pH	8.09	1	8.09	222.10	0.0007	
x ₅ : Na ₂ HPO ₄	1.03	1	1.03	28.20	0.0130	
x ₆ : KH ₂ PO ₄	0.13	1	0.13	3.69	0.1504	
x ₇ : NaCl	3.05	1	3.05	83.79	0.0028	
x ₈ : (NH ₄) ₂ SO ₄	0.24	1	0.24	6.54	0.0834	
x ₉ : MgSO ₄	0.44	1	0.44	12.22	0.0396	
x ₁₀ : CaCl ₂	4.50	1	4.50	123.67	0.0016	
x ₁₁ : FeSO ₄	0.078	1	0.078	2.15	0.2385	
Uyum Eksikliği	0.042	1	0.042	1.25	0.3798	Önemsiz
Hata	0.067	2	0.034			

Çizelge 4.3 *cis, cis*-Mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları

Değişimin Kaynağı	Karelerin Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F	Yorum
Model	0.12	10	0.012	38.42	0.0060	Anlamlı
x ₁ : Na-Benzoat	0.019	1	0.019	60.70	0.0044	
x ₂ : Glukoz	5.208E-003	1	5.208E-003	16.60	0.0267	
x ₄ : pH	0.020	1	0.020	63.27	0.0041	
x ₅ : Na ₂ HPO ₄	0.013	1	0.013	40.41	0.0079	
x ₆ : KH ₂ PO ₄	7.500E-003	1	7.500E-003	23.91	0.0164	
x ₇ : NaCl	0.022	1	0.022	70.74	0.0035	
x ₈ : (NH ₄) ₂ SO ₄	0.022	1	0.022	68.56	0.0037	
x ₉ : MgSO ₄	4.408E-003	1	4.408E-003	14.05	0.0331	
x ₁₀ : CaCl ₂	4.408E-003	1	4.408E-003	14.05	0.0331	
x ₁₁ : FeSO ₄	3.745E-003	1	3.745E-003	11.94	0.0408	
Uyum Eksikliği	1.763E-004	1	1.763E-004	0.46	0.5671	Önemsiz
Hata	7.647E-004	2	3.823E-004			

Mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen standart sapma, R² ve hassasiyet değerleri çizelge 4.4'te verilmiştir. İki cevap değişkeni için de standart sapma değerlerinin küçük olması, verilerin ortalamaya yakın olduğunu göstermiştir. Modelin R² değeri, mikroorganizma derişimi için 0.9956, *cis, cis*-mukonik asit derişimi için 0.9923 olarak elde edilmiş ve bu değerlerin 1'e oldukça yakın olduğu görülmüştür. Aynı zamanda iki cevap değişkeni için de

“Predicted R²” ve “Adjusted R²” değerlerinin birbirine yakın olması deneysel veriler ile tahmin edilen değerler arasında uyum sağlandığını göstermiştir.

Çizelge 4.4 Mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımı standart sapma, R² ve hassasiyet değerleri

Özellik	Cevap değişkenleri	
	Mikroorganizma derişimi için	<i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için
Standart Sapma	0.1900	0.0180
R ² Değeri	0.9956	0.9923
Düzeltilmiş R ² Değeri (Adjusted)	0.9811	0.9664
Tahmini R ² Değeri (Predicted)	0.8962	0.7772
Hassasiyet (Adequate Precision)	43.602	23.925

Plackett-Burman deney tasarımı sonunda sistemi tanımlayan faktörlerin katsayılarını içeren, mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişiminin kodlanmış değerlerini ifade eden denklemler sırasıyla eşitlik 4.1-4.2’de verilmiştir.

$$Y_1 = 5.03 - 0.48x_1 + 0.61x_2 + 0.82x_4 - 0.29x_5 - 0.11x_6 - 0.50x_7 - 0.14x_8 + 0.19x_9 - 0.61x_{10} - 0.081x_{11} \quad (4.1)$$

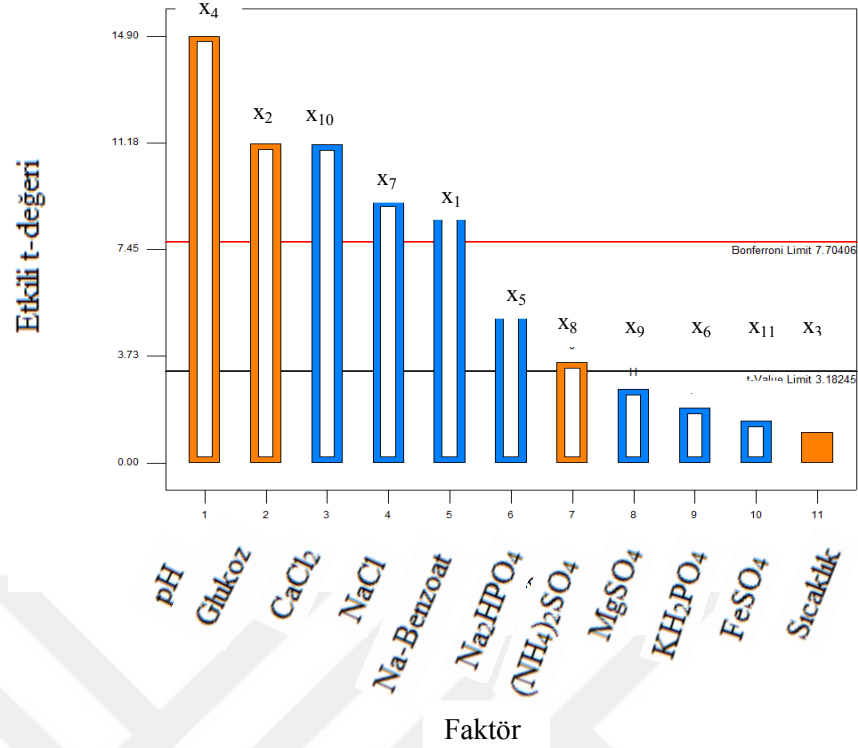
$$Y_2 = 0.086 + 0.040x_1 + 0.021x_2 + 0.041x_4 + 0.033x_5 + 0.025x_6 - 0.043x_7 - 0.042x_8 - 0.019x_9 + 0.019x_{10} - 0.018x_{11} \quad (4.2)$$

Burada, Y₁: Mikroorganizma derişimini, g/L, Y₂: *cis, cis*-Mukonik asit derişimini, mM, x₁: Na-Benzoat derişimini, mM, x₂: Glukoz derişimini, mM, x₄: Başlangıç pH’ı, E: Na₂HPO₄ derişimini, g/L, x₅: Na₂HPO₄ derişimini, g/L, x₆: KH₂PO₄ derişimini, g/L, x₇: NaCl derişimini, g/L, x₈: (NH₄)₂SO₄, g/L, x₉: MgSO₄ derişimini, mM, x₁₀: CaCl₂ derişimini, μM, x₁₁: FeSO₄ derişimini, μM ifade etmektedir.

Faktörlerin mikroorganizma derişimi üzerindeki etkileri şekil 4.6’da Pareto grafiğinde gösterilmiştir. Pareto grafiğinde, x eksenindeki sütunlar her bir faktörün cevap üzerindeki etkisinin büyüklüğünü göstermektedir. Şekil 4.6’dan mikroorganizma derişimine başlangıç pH’ı, sıcaklık, glukoz ve MgSO₄ derişiminin pozitif; sodyum

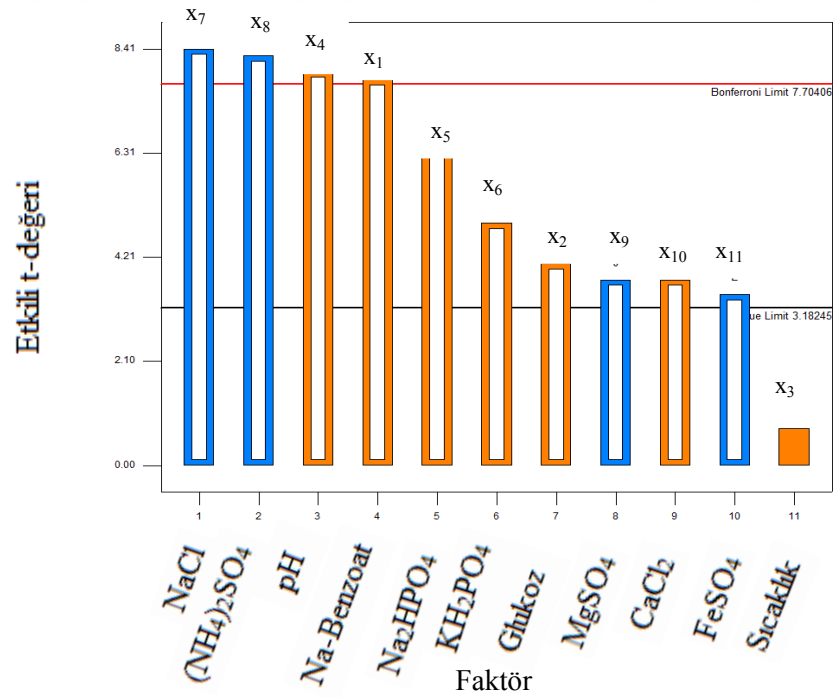
benzoat, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 ve FeSO_4 derişiminin ise negatif etkisi olduğu görülmektedir. Ayrıca, “Bonferroni” limitin üzerinde kalan faktörlerin (Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH’ı, NaCl , CaCl_2), t-değeri limiti üzerinde kalan faktörlere (Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH’ı, Na_2HPO_4 , NaCl , MgSO_4 ve CaCl_2) kıyasla daha önemli olduğu belirlenmiştir (Dholariya vd. 2014). Buna göre, mikroorganizma derişimi için cevabı etkileyen en önemli beş faktör Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH’ı, NaCl ve CaCl_2 ’dir (Şekil 4.6).

Faktörlerin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi üzerindeki etkileri ise şekil 4.7’deki Pareto grafiğinde gösterilmiştir. Şekil 4.7’den *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine başlangıç pH’ı, sıcaklık, sodyum benzoat, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , glukoz ve CaCl_2 derişiminin pozitif; NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 ve FeSO_4 derişiminin ise negatif etkisi olduğu görülmüştür. “Bonferroni” limitin üzerinde kalan faktörler; Na-benzoat, pH, NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olurken, t-değeri limiti üzerinde kalan faktörler ise Na-benzoat, glukoz, başlangıç pH’ı, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , CaCl_2 ve FeSO_4 ’dir. “Bonferroni” limitin üzerinde kalan faktörler üretimdeki en etkili faktörler olarak belirlendiğinden (Dholariya vd. 2014), *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için cevabı etkileyen en önemli dört faktör Na-benzoat, başlangıç pH’ı, NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6 Mikroorganizma derişimi için Plackett-Burman deney tasarımında yer alan 11 faktörün Pareto grafiği

(□ Pozitif etki, □ Negatif etki)



Şekil 4.7 *cis, cis*-Mukonik asit derişimi için Plackett-Burman deney tasarımında yer alan 11 faktörün Pareto grafiği

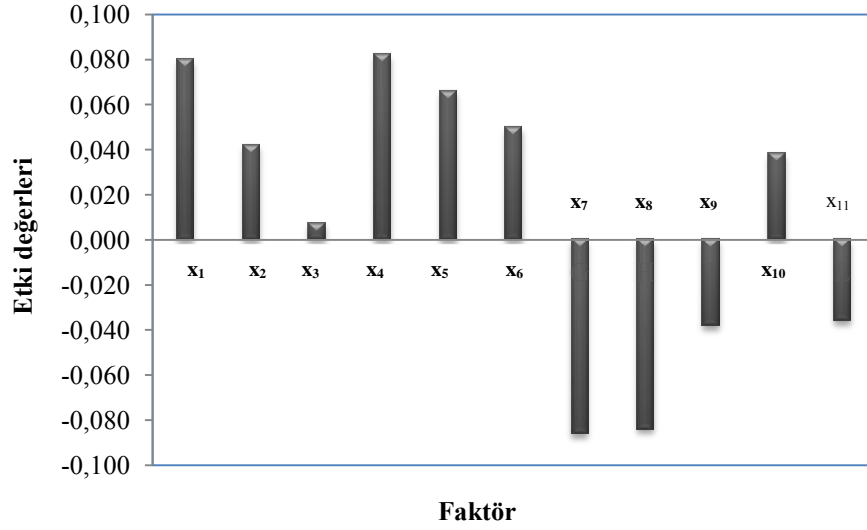
(□ Pozitif etki, □ Negatif etki)

Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak ve deney tasarımında amaç *cis*, *cis*-mukonik asit üretimini arttıran en uygun koşulları belirlemek olduğundan, RSM ile optimizasyonu gerçekleştirilmek üzere en önemli faktörlerin belirlenmesine yönelik değerlendirmeler cevap değişkenlerinden biri olan *cis*, *cis*-mukonik asit üzerinden yapılmıştır. Buna göre bir sonraki adımda, *cis*, *cis*-mukonik asit cevap değişkeni için en etkili faktörler olarak belirlenen Na-benzoat, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişimi ve pH'ın RSM ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her faktörün cevap üzerindeki pozitif ve negatif etkisi aşağıda verilen eşitlik 4.3'e göre hesaplanmış ve hesaplanan değerler aracılığıyla şekil 4.8'de yer alan grafik oluşturulmuştur:

$$E_{(x_i)} = \frac{2(\sum M_{i+} - \sum M_{i-})}{N} \quad (4.3)$$

Burada E_(x_i); faktörlerin etki değerlerini, M_{i+} ve M_{i-}; ölçülen faktörün (x_i) sırasıyla yüksek ve düşük seviyelerinde elde edilen *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi değerlerini, N ise deney sayısını ifade etmektedir (Mu vd. 2005).

Na-benzoat, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişimi ve başlangıç pH'ının RSM'de kullanılmak üzere seviye ve aralık değerleri, *cis*, *cis*-mukonik asit üretimine pozitif ve negatif etkilerinin verildiği şekil 4.8'deki grafiğe göre belirlenmiştir. Şekil 4.8'e göre, en önemli faktörler olarak belirlenen Na-benzoat derişimi ve başlangıç pH'ı üretime pozitif etki, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişimi ise negatif etki göstermektedir. Buna göre; pozitif etki gösteren faktörlerin Plackett-Burman deney tasarımı matrisindeki (Çizelge 4.1) en yüksek (+1) değerleri (Na-benzoat: 20 mM, başlangıç pH'ı: 8.0), negatif etki gösteren faktörlerin ise en düşük (-1) değerleri (NaCl: 0.5 g/L, (NH₄)₂SO₄: 1.0 g/L) RSM ile optimizasyonda orta seviye olarak kabul edilmiş ve RSM deney tasarım matrisi (Çizelge 3.3) oluşturulmuştur. RSM deney tasarımı deneyleri gerçekleştirilirken; Plackett-Burman deney tasarımı yönteminde incelenen diğer parametre değerleri için pozitif etki gösteren diğer faktörlerden glukoz, sıcaklık, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ ve CaCl₂ en yüksek (+1) değerlerinde (glukoz: 20 mM, sıcaklık: 35 °C, Na₂HPO₄: 18 g/L, KH₂PO₄: 10 g/L ve CaCl₂: 150 µM), negatif etki gösteren MgSO₄ ve FeSO₄'ın ise en düşük (-1) değerlerinde (MgSO₄: 1 mM, FeSO₄: 13 µM) sabit tutulmuştur.



Şekil 4.8 Plackett-Burman deney tasarımında yer alan faktörlerin *cis, cis*-mukonik asit üretimine pozitif ve negatif etkileri

(x₁: Na-Benzoat derişimi, x₂: Glukoz derişimi, x₃: Sıcaklık, x₄: başlangıç pH'ı, x₅: Na₂HPO₄ derişimi, x₆: KH₂PO₄ derişimi, x₇: NaCl derişimi, x₈: (NH₄)₂SO₄ derişimi, x₉: MgSO₄ derişimi, x₁₀: CaCl₂ derişimi, x₁₁: FeSO₄ derişimi)

4.2.2 Cevap yüzey yöntemi (RSM) ile ortam koşullarının optimizasyonu

Pseudomonas putida KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis, cis*-mukonik asit üretiminde Plackett-Burman deney tasarımı ile en önemli faktör olarak belirlenen 4 ortam koşulunun (Na-benzoat, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişimi, başlangıç pH'ı) optimizasyonu amacıyla 2⁴ tam faktöriyel merkezi kompozit deney tasarımı uygulanmıştır. Cevap değişkenleri olarak ise Plackett-Burman deney yönteminde de olduğu gibi *cis, cis*-mukonik asit ve mikroorganizma derişimi seçilmiştir. Bu amaçla, Design Expert (7.0) yardımıyla hazırlanan deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değişkeni değerleri çizelge 4.5'te verilmiştir.

RSM deney tasarımı sonunda sistemi tanımlayan faktörlerin katsayılarını içeren, mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişiminin kodlanmış değerlerini ifade eden denklemler sırasıyla eşitlik 4.4-4.5'te verilmiştir. Mikroorganizma derişimi için eşitlik 4.4'te verilen model denklemi lineer, *cis, cis*-mukonik asit derişimi için eşitlik 4.5'te verilen model denklemi ise quadratik modele uymaktadır.

$$Y_1 = 4.48 - 0.55x_1 - 0.25x_2 + 0.051x_3 + 0.063x_4 - 0.12x_1x_2 + 0.055x_1x_3 - 0.10x_1x_4 + 6.063E-004x_2x_3 - 0.055x_2x_4 + 0.17x_3x_4 \quad (4.4)$$

$$Y_2 = 0.53 - 3.846E-003x_1 + 0.035x_2 + 0.021x_3 - 0.015x_4 + 0.011x_1x_2 + 8.906E-003x_1x_3 - 0.035x_1x_4 + 5.619E-003x_2x_3 - 0.011x_2x_4 + 0.022x_3x_4 - 0.091x_1^2 - 0.077x_2^2 - 0.017x_3^2 - 0.017x_4^2 \quad (4.5)$$

Burada, Y_1 : Mikroorganizma derişimini, g/L, Y_2 : *cis*, *cis*-Mukonik asit derişimini, mM, x_1 : Na-Benzoat derişimini, mM, x_2 : başlangıç pH'ını, x_3 : NaCl derişimini, g/L, x_4 : $(NH_4)_2SO_4$ derişimini, g/L ifade etmektedir.

Çizelge 4.5 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis, cis*-mukonik asit üretiminde 4 faktör için RSM deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değerleri

No	x_1^a , mM	x_2^b	x_3^c , g/L	x_4^d , g/L	Cevap değişkenleri	
					M.O. ^e derişimi, g/L	ccMA ^f derişimi, mM
1	20.0	7.0	0.5	1.0	4.9133	0.2153
2	20.0	9.0	0.5	1.0	4.4082	0.2875
3	25.0	8.5	0.7	1.4	3.6928	0.4007
4	20.0	8.0	0.5	1.0	4.7167	0.5895
5	15.0	8.5	0.7	1.4	5.0390	0.3439
6	25.0	7.5	0.3	0.6	4.3001	0.3565
7	15.0	7.5	0.3	0.6	5.0213	0.2245
8	20.0	8.0	0.5	1.8	4.8779	0.5251
9	25.0	8.5	0.3	1.4	2.8752	0.2186
10	20.0	8.0	0.5	1.0	4.5595	0.5759
11	20.0	8.0	0.5	1.0	4.5222	0.5551
12	20.0	8.0	0.9	1.0	4.7639	0.5780
13	30.0	8.0	0.5	1.0	3.2821	0.1656
14	25.0	7.5	0.7	1.4	4.6067	0.2155
15	25.0	7.5	0.7	0.6	4.3040	0.3118
16	20.0	8.0	0.5	1.0	4.4101	0.4404
17	15.0	8.5	0.3	0.6	4.7560	0.4012
18	20.0	8.0	0.5	1.0	4.2745	0.5768
19	15.0	7.5	0.3	1.4	5.1393	0.3225
20	20.0	8.0	0.5	0.2	4.3178	0.4571
21	15.0	7.5	0.7	0.6	4.9113	0.2725
22	10.0	8.0	0.5	1.0	5.8586	0.2215
23	15.0	7.5	0.7	1.4	5.3083	0.3043
24	20.0	8.0	0.1	1.0	4.7049	0.4051
25	25.0	8.5	0.3	0.6	3.8166	0.4470
26	25.0	8.5	0.7	0.6	3.5002	0.4109
27	25.0	7.5	0.3	1.4	4.1212	0.1632
28	15.0	8.5	0.7	0.6	4.3924	0.3372
29	20.0	8.0	0.5	1.0	4.2608	0.4487
30	15.0	8.5	0.3	1.4	4.6185	0.2986

^a x_1 : Na-benzoat derişimi, ^b x_2 : başlangıç pH'ı, ^c x_3 : NaCl derişimi, ^d x_4 : (NH₄)₂SO₄ derişimi, ^eM.O.: Mikroorganizma, ^fccMA: *cis, cis*-Mukonik asit

RSM ile deney tasarımı sonucunda mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi için elde edilen ANOVA testi sonuçları sırasıyla çizelge 4.6-4.7'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde modelin p değerlerinin sırasıyla <0.0001 ve 0.0006 olması modelde hatanın meydana gelme ihtimalinin sırasıyla % 0.01 ve % 0.06 ve bu değerlerin 0.05'ten küçük olması % 95 güven seviyesinde yer aldığını, böylece iki

cevap değişkeni için de modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Buna göre, uyum eksikliği p değerlerinin sırasıyla 0.2256 ve 0.5006 olması iki cevap değişkeni için de modelde uyum eksikliği olmadığını yani modelin anlamlı olduğunu diğer bir göstergesidir (Çizelge 4.6 ve 4.7).

Mikroorganizma derişimi için RSM deney tasarımında üretimi etkileyen değişkenler arasından x_1 (Na-benzoat derişimi), x_2 (başlangıç pH'ı), x_3x_4 (NaCl ve $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin ikili etkileşimi) p değerlerinin 0.05'ten küçük olması sebebiyle önemli faktörler olarak belirlenmiştir. *cis*, *cis*-Mukonik asit derişimi için bu faktörler; x_2 (başlangıç pH'ı), x_1^2 (Na-benzoat derişiminin karesi) ve x_2^2 (pH'ın karesi) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6-4.7). Üretimde en etkili faktörler mikroorganizma derişimi için x_1 (Na-benzoat) (p değeri: <0.0001), *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için x_1^2 (p değeri: <0.0001) ve x_2^2 (p değeri: <0.0001)'dir. RSM sonucunda elde edilen mikroorganizma ve *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için standart sapma, R^2 ve hassasiyet değerleri çizelge 4.8'de verilmiştir. İki değişken için de standart sapma değerlerinin küçük olması, Plackett-Burman deney tasarımında da olduğu gibi verilerin ortalamaya yakın olduğunu göstermiştir. Modellerin R^2 değeri, mikroorganizma derişimi için 0.9040, *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için 0.8537 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.6 Mikroorganizma derişimi için RSM deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları

Kaynak	Karelerin Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F	Yorum
Model	9.78	10	0.98	17.90	< 0.0001	Anlamlı
x_1 :Na-Benzoat	7.17	1	7.17	131.26	< 0.0001	
x_2 :pH	1.52	1	1.52	27.73	< 0.0001	
x_3 :NaCl	0.062	1	0.062	1.14	0.2984	
x_4 : $(NH_4)_2SO_4$	0.096	1	0.096	1.76	0.2004	
x_1x_2	0.22	1	0.22	4.01	0.0597	
x_1x_3	0.048	1	0.048	0.87	0.3614	
x_1x_4	0.17	1	0.17	3.11	0.0939	
x_2x_3	5.881E-006	1	5.881E-006	1.0766E-004	0.9918	
x_2x_4	0.048	1	0.048	0.88	0.3593	
x_3x_4	0.45	1	0.45	8.20	0.0099	
Uyum Eksikliği	0.88	14	0.063	2.02	0.2256	Önemsiz

Çizelge 4.7 *cis, cis*-Mukonik asit derişimi için RSM deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları

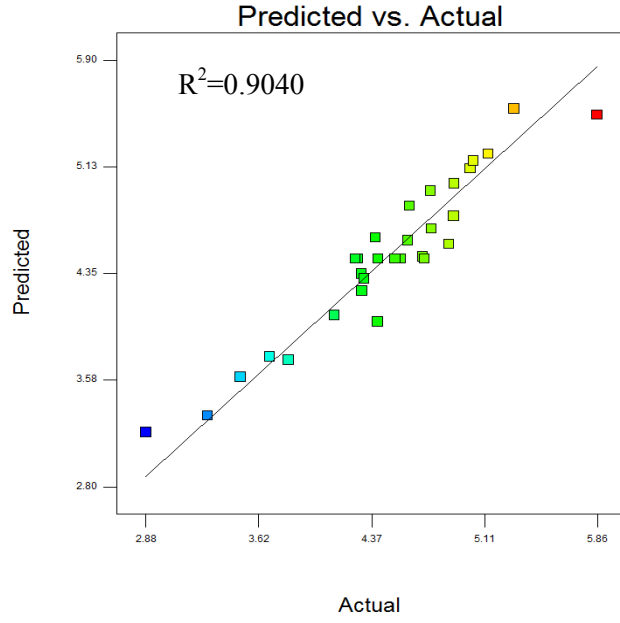
Kaynak	Karelerin Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F değeri	p-değeri Prob>F	Yorum
Model	0.42	14	0.030	6.25	0.0006	Anlamlı
x ₁ :Na-Benzoat	3.550E-004	1	3.550E-004	0.073	0.7902	
x ₂ :pH	0.029	1	0.029	5.95	0.0276	
x ₃ :NaCl	0.011	1	0.011	2.24	0.1550	
x ₄ :(NH ₄) ₂ SO ₄	5.349E-003	1	5.349E-003	1.10	0.3098	
x ₁ x ₂	1.873E-003	1	1.873E-003	0.39	0.5433	
x ₁ x ₃	1.269E-003	1	1.269E-003	0.26	0.6161	
x ₁ x ₄	0.020	1	0.020	4.08	0.0616	
x ₂ x ₃	5.051E-004	1	5.051E-004	0.10	0.7511	
x ₂ x ₄	1.908E-003	1	1.908E-003	0.39	0.5396	
x ₃ x ₄	8.024E-003	1	8.024E-003	1.66	0.2175	
x ₁ ²	0.23	1	0.23	47.41	< 0.0001	
x ₂ ²	0.16	1	0.16	33.61	< 0.0001	
x ₃ ²	7.906E-003	1	7.906E-003	1.63	0.2207	
x ₄ ²	8.012E-003	1	8.012E-003	1.65	0.2178	
Uyum Eksikliği	0.050	10	4.951E-003	1.07	0.5006	Önemsiz

Çizelge 4.8 Mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi için RSM deney tasarımı sonunda elde edilen standart sapma, R² ve hassasiyet değerleri

Özellik	Cevap değişkenleri	
	Mikroorganizma derişimi için	<i>cis, cis</i> -Mukonik asit derişimi için
Standart Sapma	0.2300	0.0700
R ² Değeri	0.9040	0.8537
Düzeltilmiş R ² Değeri (Adjusted)	0.8535	0.7171
Tahmini R ² Değeri (Predicted)	0.7207	0.3582
Hassasiyet (Adequate Precision)	16.791	7.6700

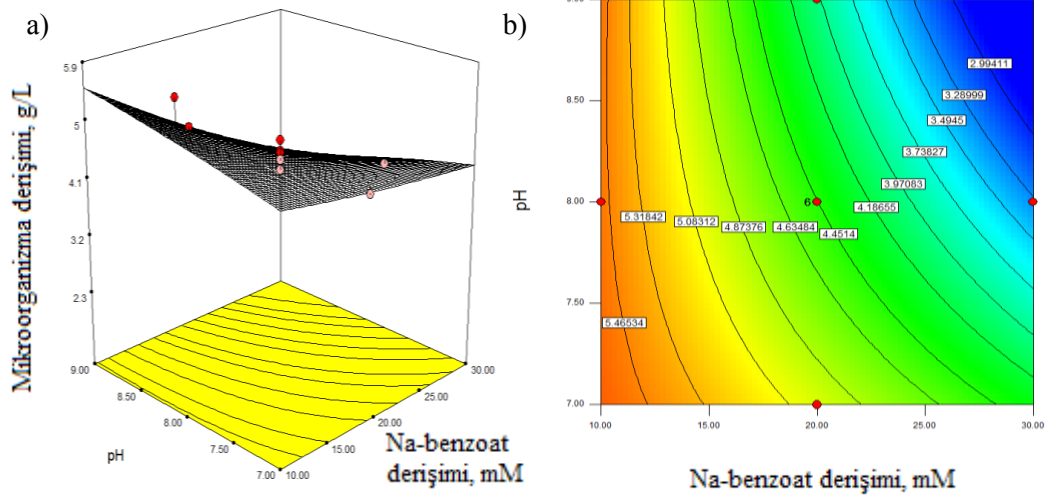
Mikroorganizma derişimine uygun modelden elde edilen değerlerle (predicted) gerçek değerlerin (actual) ilişkisini grafiksel olarak veren şekil 4.9'da, modelin; yapılan deneyleri % 90.40 oranında temsil ettiği görülmektedir.

Cevap değişkenleri için tahmin edilen modellerin görselleştirilmesi cevap yüzey grafikleri ile gerçekleştirilmektedir (Bezerra vd. 2008). Eşitlik 4.4'teki model denklemi kullanılarak oluşturulan ve mikroorganizma derişimine bağımsız değişkenlerin (faktörlerin) ikili etkilerini gösteren cevap yüzey ve kontur grafikleri şekil 4.10-4.15 arasında verilmiştir.



Şekil 4.9 Mikroorganizma derişimi için gözlenen deneysel verileri ile tahmin edilen değerlerin değişimi

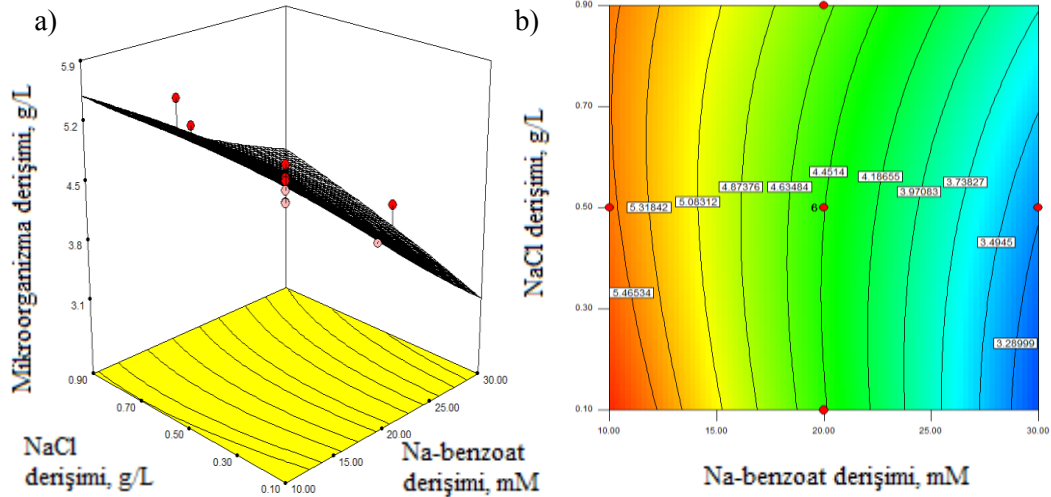
Na-benzoat derişimi ile başlangıç pH'nın mikroorganizma derişimine ikili etkisi şekil 4.10'daki cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.10'a göre, sabit bir pH değerinde Na-benzoat derişiminin artmasıyla mikroorganizma derişiminde azalma meydana geldiği görülmüştür. Bu durumun aromatik bileşiklerin mikroorganizmalar üzerinde toksik etki gösterebilmesinden dolayı (Bang ve Choi, 1995) meydana geldiği düşünölmüştür. Dolayısıyla, Na-benzoat derişiminin belli bir değerin üzerine çıkıldığında mikroorganizma için toksik etki gösterebilmekte ve hücre derişiminin zamanla azalmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, sabit bir Na-benzoat derişiminde pH değerinin arttırılmasıyla mikroorganizma derişiminde azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Bu sonuç, çoğu mikroorganizma için geçerli olduğu gibi (Bang vd. 1996, Wu vd. 2004, Wu vd. 2006, Kaneko vd. 2011, Curran vd. 2012), *Pseudomonas putida* hücrelerinin de yaşayabileceği en uygun ortamın nötr pH değerlerinde olduğunu ve nötral pH değerlerinden uzaklaşıldıkça hücreler için elverişli bir ortam meydana gelmediğini göstermiştir.



Şekil 4.10 Na-benzoat derişimi ile pH'nin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(NaCl: 0.5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$: 1.0 g/L)

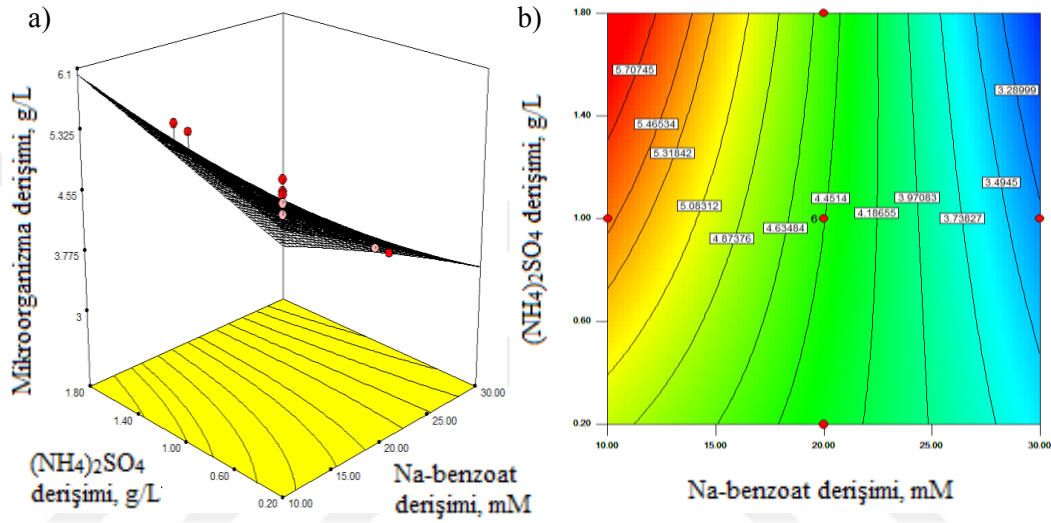
Şekil 4.11'de Na-benzoat derişimi ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile verilmiştir. Şekil 4.11'e göre, NaCl derişiminin sabit değerleri ve Na-benzoat derişiminin azalan değerlerinde mikroorganizma derişiminde artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.11 Na-benzoat ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(başlangıç pH'ı: 8.00, $(NH_4)_2SO_4$: 1.0 g/L)

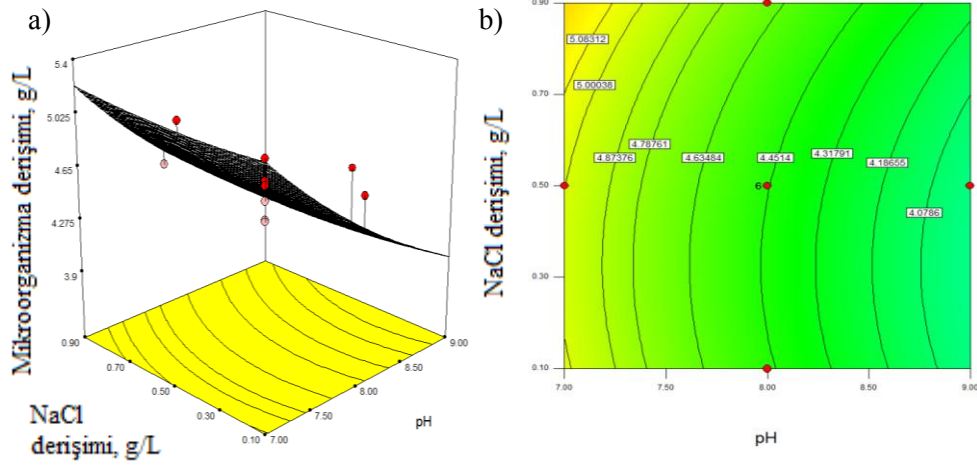
Şekil 4.12’de Na-benzoat ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.12’ye göre, Na-benzoat derişiminin azalan, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin ise artan değerlerinde mikroorganizma derişiminde artış meydana gelmiştir. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin artan değerlerinde mikroorganizma derişiminde de artış meydana gelmesi, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ’ın mikroorganizma için gerekli olan azot kaynağını karşıladığını göstermektedir.



Şekil 4.12 Na-benzoat ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(başlangıç pH’ı: 8.00, NaCl: 0.5 g/L)

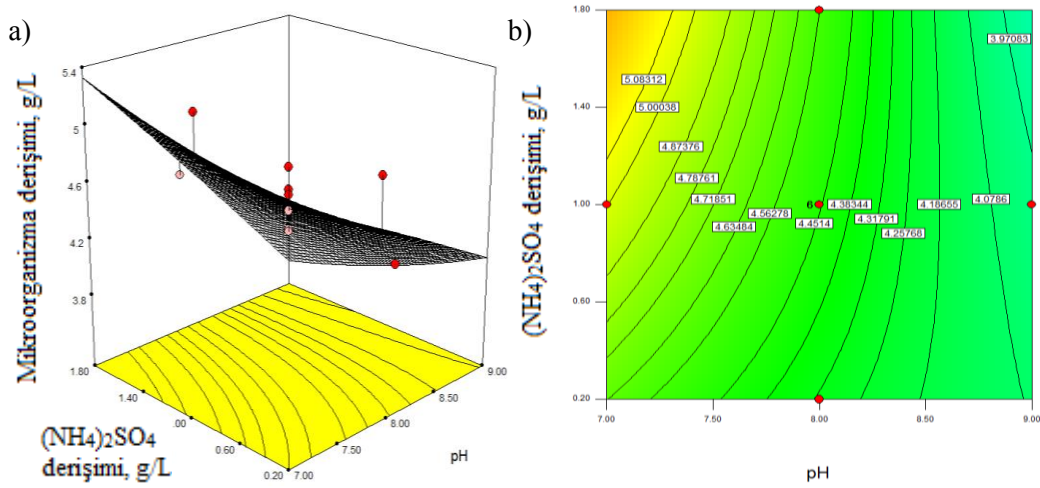
Başlangıç pH’ı ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisi Şekil 4.13’teki cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.13’e göre, NaCl derişiminin sabit değerlerinde pH değerinin azalarak 7.50 değerine yaklaşmasıyla mikroorganizma derişiminde artış meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.13 pH ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(Na-benzoat: 20 mM, $(NH_4)_2SO_4$: 1.0 g/L)

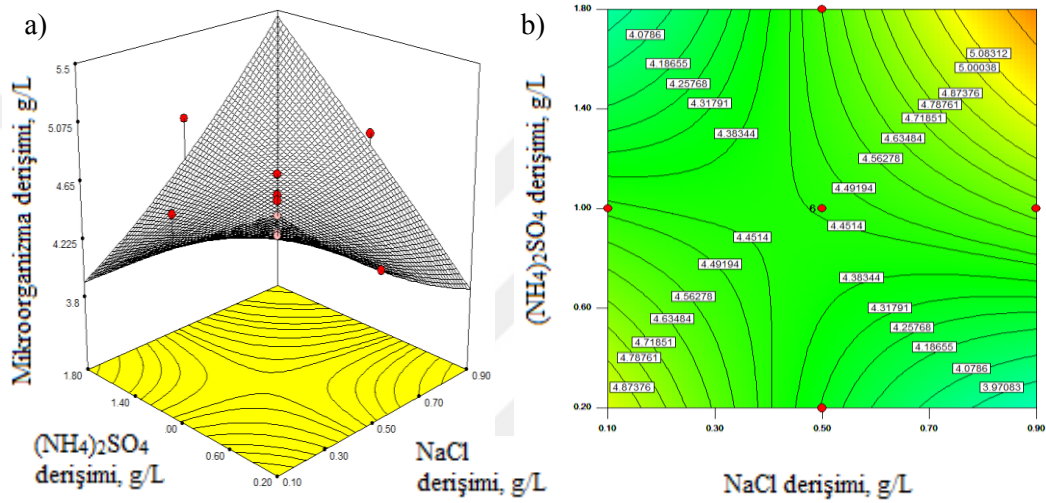
Şekil 4.14'te başlangıç pH'ı ile $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile verilmiştir. Şekil 4.14 incelendiğinde, $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin artan değerlerinde pH'ın da 7.50-7.75 olduğu değerlerde mikroorganizma derişiminde artış olduğu ve 4.72774 g/L mikroorganizma derişimine ulaşıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.14 pH ile $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(Na-benzoat: 20 mM, NaCl: 0.5 g/L)

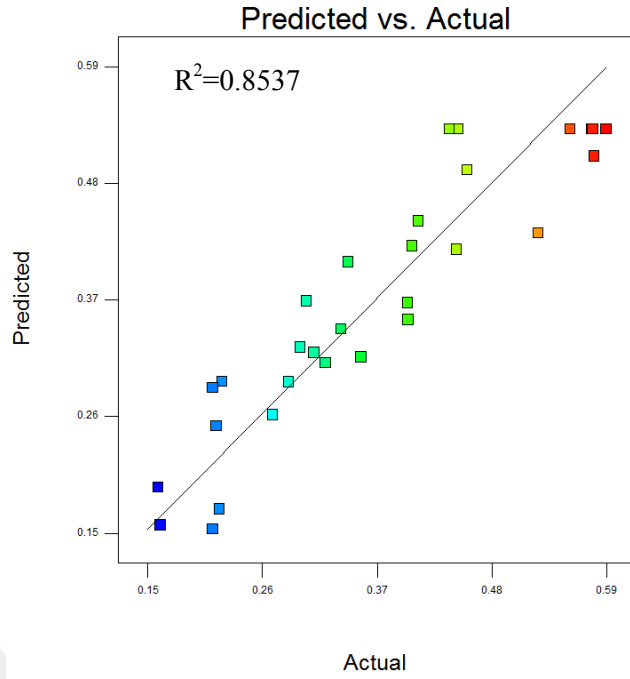
Şekil 4.15'te NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.15 incelendiğinde, oluşan eyer grafiği, mikroorganizma derişimi için NaCl ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişimi arasındaki etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir (Murthy vd., 2000). Özellikle NaCl derişiminin 0.5-07 g/L ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin 1.00-1.40 g/L değerlerinin mikroorganizma derişiminde belirgin etkiler yarattığı ve bu değerlerde mikroorganizma derişimindeki artışın daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.15 NaCl ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(Na-benzoat: 20 mM, başlangıç pH'ı: 8.00)

cis, cis-Mukonik asit derişimine uygun modelden elde edilen değerlerle (predicted) gerçek değerlerin (actual) ilişkisini grafiksel olarak veren şekil 4.16'da, modelin; yapılan deneyleri % 85.37 oranında temsil ettiği görülmektedir. Eşitlik 4.5'teki model denklemi kullanılarak oluşturulan ve *cis, cis*-mukonik asit derişimine bağımsız değişkenlerin (faktörlerin) ikili etkilerini gösteren cevap yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.17-4.22 arasında verilmiştir.

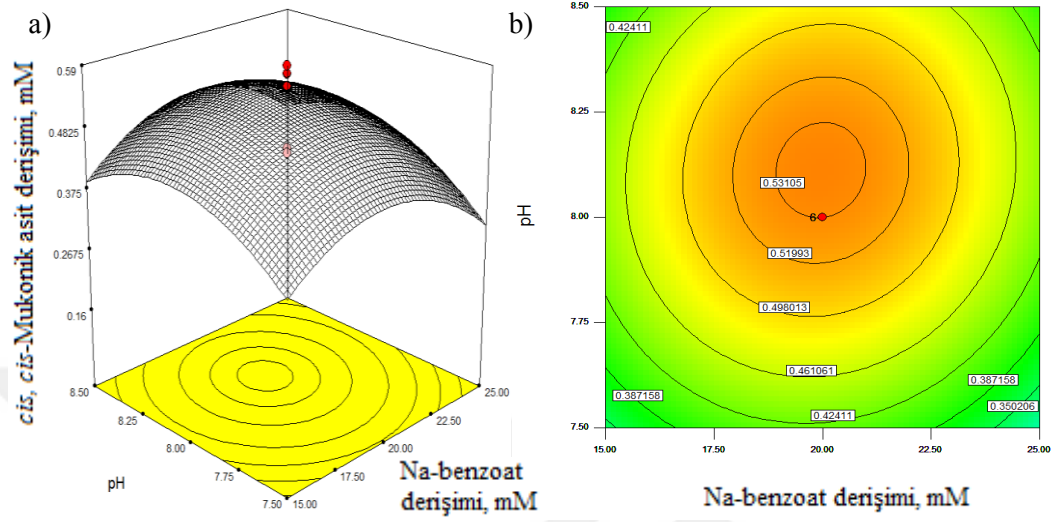


Şekil 4.16 *cis, cis*-Mukonik asit derişimi için gözlenen deneysel verileri ile tahmin edilen değerlerin değişimi

Na-benzoat derişimi ile başlangıç pH'nın *cis, cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisi Şekil 4.17'deki cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde, *cis, cis*-mukonik asit derişimi için, Na-benzoat derişimi ile pH arasındaki ilişkiyi ifade eden kontur plot grafiğinde dairesel bir yapı elde edilmiş olup, bu yapı iki faktörün birbirini etkilemediğini göstermiştir. Na-benzoat derişiminin 17.50-22.50 mM, pH değerinin 7.75-8.25 arasında olduğu koşullarda, maksimum *cis, cis*-mukonik asit derişiminin elde edildiği bölgeye ulaşıldığı görülmüştür. Ayrıca, pH'ın 7.50'den 8.00'e, Na-benzoat derişiminin 15.00 mM'dan 20.00 mM'a artması sonucunda *cis, cis*-mukonik asit derişiminin de 0.3871 mM'dan 0.4979 mM'a arttığı gözlenmiştir.

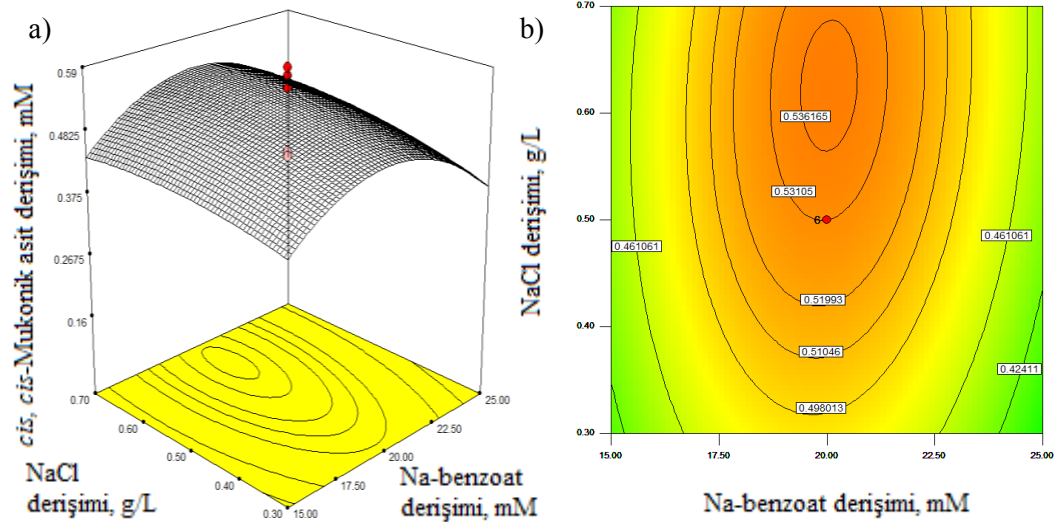
Şekil 4.18'de Na-benzoat derişimi ile NaCl derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile verilmiştir. Şekil 4.18 incelendiğinde; *cis, cis*-mukonik asit üretiminde iki faktör arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerin eliptik bir yapıda elde edilmesi, Na-benzoat ile NaCl derişimi arasında belirgin bir ilişki olduğu ve bu faktörlerin birbirini etkilediğini göstermiştir (Murthy vd., 2000). Na-benzoat derişiminin 17.50-22.50 mM, NaCl derişiminin de 0.40-0.70 g/L arasında olduğu koşullarda *cis, cis*-mukonik asit değerlerinin en yüksek olduğu noktalara ulaşılmıştır.

Dolayısıyla, Na-benzoat derişimi 17.50 mM'ın altına düştüğünde, 22.50 mM'ın üstüne çıktığında ise *cis*, *cis*-mukonik asit derişiminde azalma meydana geldiği gözlenmiştir.



şekil 4. 17 Na-benzoat ile pH'nin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

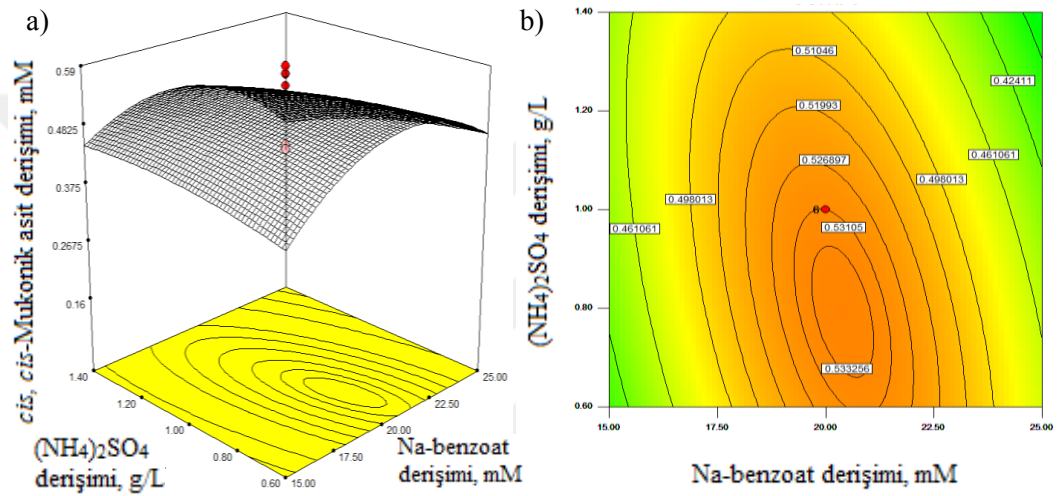
(NaCl: 0.5 g/L, (NH₄)₂SO₄: 1.0 g/L)



şekil 4.18 Na-benzoat ile NaCl derişiminin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(pH:8.00, (NH₄)₂SO₄: 1.0 g/L)

Na-benzoat ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisi Şekil 4.19'da cevap yüzey ve kontur grafiği ile verilmiştir. Şekil 4.19'a göre, *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi için, iki faktör arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerin eliptik bir yapıda elde edilmesi, Na-benzoat ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişimi arasında belirgin bir ilişki olduğu ve bu faktörlerin birbirini etkilediğini göstermiştir. Sabit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişimi değerlerinde ve Na-benzoat derişimi 25.00 mM'dan 20.00 mM'a düştüğünde, *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi 0.4239 mM'dan 0.5070 mM'a ulaşmıştır.

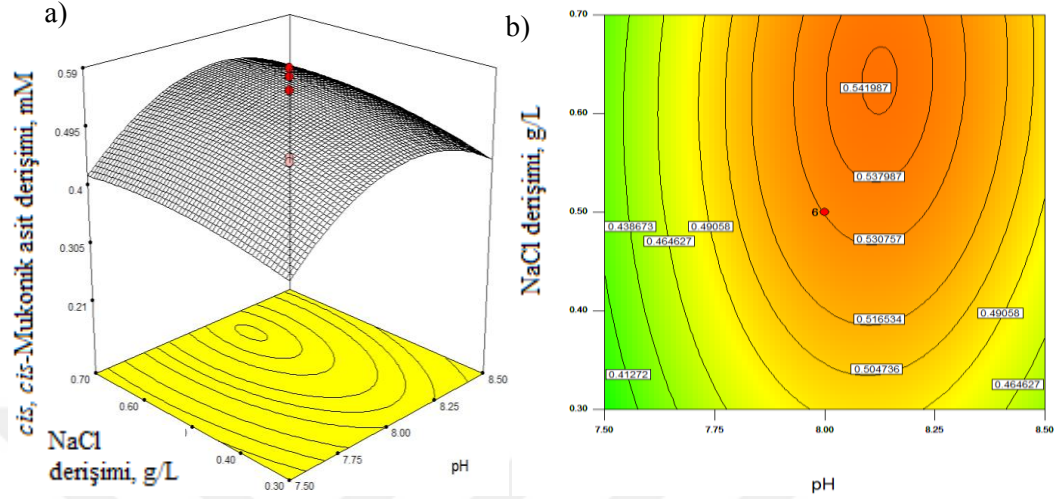


Şekil 4.19 Na-benzoat ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisinin a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(başlangıç pH'ı: 8.00, NaCl: 0.5 g/L)

Şekil 4.20'de başlangıç pH'ı ile NaCl derişiminin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.20 incelendiğinde, *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için, iki faktör arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerin eliptik bir yapıda elde edilmesi, pH ile NaCl derişimi arasında belirgin bir ilişki olduğu ve bu faktörlerin birbirini etkilediğini göstermiştir. Başlangıç pH'ının yaklaşık 8.00, NaCl derişiminin de 0.5-0.7 g/L arasında olduğu koşullarda *cis*, *cis*-mukonik asit derişim değerlerinin yüksek olduğu bölgeye ulaşıldığı tespit edilmiştir. Cevap değişkenlerinden biri olan mikroorganizma derişiminin aksine, nötral pH yerine bazik pH değerlerinin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için daha elverişli olduğu görülmüştür. Şekil 4.18'deki cevap-yüzey grafiğine benzer olarak, NaCl derişimi 0.40 g/L değerinin altına

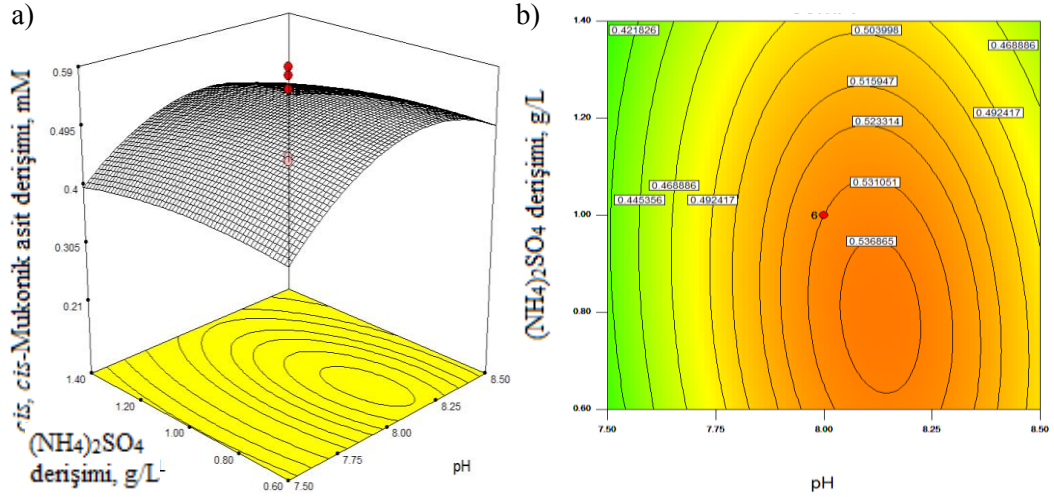
düştüğünde *cis*, *cis*-mukonik asit derişiminde azalma meydana geldiği sonucuna varılmıştır.



şekil 4.20 Başlangıç pH'ı ile NaCl derişiminin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisinin: a. cevap yzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(Na-benzoat: 20 mM, (NH₄)₂SO₄: 1.0 g/L)

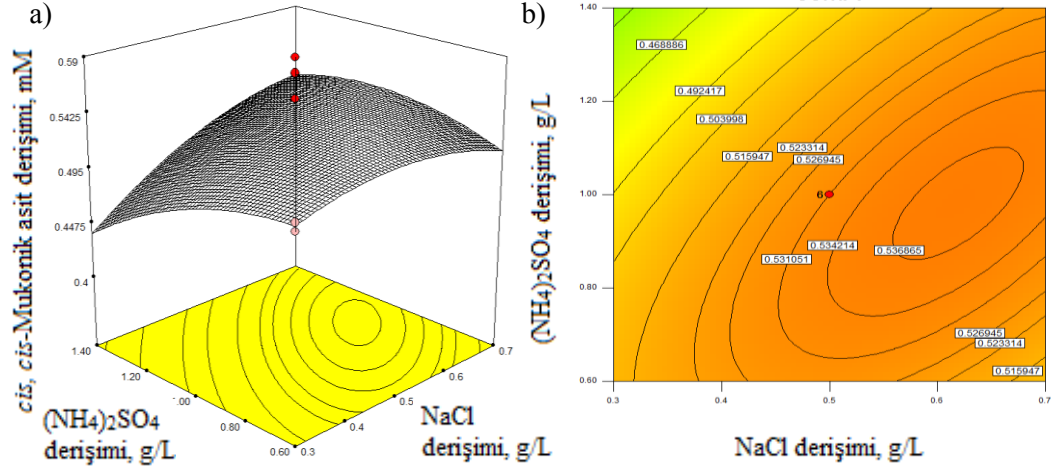
Başlangıç pH'ı ile (NH₄)₂SO₄ derişiminin *cis*, *cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisi şekil 4.21'de cevap yzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. şekil 4.21'e gbre, *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi iin, iki faktb arasıdaki ilişkiyi gsteren grafiklerin eliptik bir yapıda elde edilmesi, pH ile (NH₄)₂SO₄ derişimi arasında belirgin bir ilişki olduğu ve bu faktblerin birbirini etkilediğini gstermiştir. pH'ın 8.00-8.25, (NH₄)₂SO₄ derişiminin de şekil 4.19'a benzer olarak 0.6-1.0 g/L arasında olduğu koşullarda *cis*, *cis*-mukonik asit derişiminin yksek değerlerine ulaşıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca şekil 4.21 incelendiğinde, nbtrel pH değerlerinde, *cis*, *cis*-mukonik asit derişimindeki değişimlerin daha fazla olmasından dolayı, (NH₄)₂SO₄ derişiminin etkisinin daha yksek olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.21 pH ile $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin *cis, cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(Na-benzoat: 20 mM, NaCl: 0.5 g/L)

Şekil 4.22’de NaCl ve $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin *cis, cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisi cevap yüzey ve kontur grafiği ile gösterilmiştir. Şekil 4.22 incelendiğinde, iki faktör arasındaki ilişkiyi gösteren grafiklerin eliptik bir yapıda elde edilmesi, NaCl ile $(NH_4)_2SO_4$ derişimi arasında belirgin bir ilişki olduğu ve bu faktörlerin birbirini etkilediğini göstermiştir. NaCl derişiminin 0.3-05 g/L ve $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin 1.00-1.40 g/L değerlerinin *cis, cis*-mukonik asit derişiminde belirgin etkiler yarattığı ve bu değerlerde *cis, cis*-mukonik asit derişimindeki değişikliklerin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, NaCl derişiminin 0.3-05 g/L aralığında olduğu koşullarda ve $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin 1.40 g/L’den 1.00 g/L’ye düşmesiyle *cis, cis*-mukonik asit derişimi değerlerinde azalma meydana geldiği görülmüştür. Bu durum, NaCl ve $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin mikroorganizma derişimine ikili etkisini gösteren şekil 4.15 ile karşılaştırıldığında NaCl ile $(NH_4)_2SO_4$ derişiminin artan değerlerinde mikroorganizma derişiminin de artan değerler aldığı görülmüştür.



Şekil 4.22 NaCl ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ derişiminin *cis, cis*-mukonik asit derişimine ikili etkisinin: a. cevap yüzey grafiği, b. kontur çizimi ile gösterimi

(Na-benzoat: 20 mM, başlangıç pH'ı: 8.00)

Cevap yüzey yöntemi kullanılarak yapılan deney tasarımı sonucu elde edilen optimum koşullar *cis, cis*-mukonik asit derişimi ve hem mikroorganizma hem de *cis, cis*-mukonik asit derişimi için olmak üzere sırasıyla çizelge 4.9-4.10'da verilmiştir. Çizelge 4.9'da verilen optimum koşullarda gerçekleştirilen deney sonucunda 0.422 mM *cis, cis*-mukonik asit, 4.027 g/L mikroorganizma, çizelge 4.10'da verilen optimum koşullarda gerçekleştirilen deney sonucunda ise, 0.410 mM *cis, cis*-mukonik asit, 4.690 g/L mikroorganizma derişimine ulaşılmıştır.

Çizelge 4.9 *cis, cis*-Mukonik asit derişimi için cevap yüzey yöntemiyle elde edilen optimum değerler

Faktör	Optimum Değer
Na-Benzoat, mM	20.34
pH	8.13
NaCl, g/L	0.61
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, g/L	0.90

Çizelge 4.10 Mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi için cevap yüzey yöntemiyle elde edilen optimum değerler

Faktör	Optimum Değer
Na-Benzoat, mM	16.93
pH	7.97
NaCl, g/L	0.90
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, g/L	1.80

5. SONUÇ

5.1 Değerlendirme

“*cis, cis*-Mukonik asitin *Pseudomonas putida* biyokatalizörlüğünde mikrobiyal üretimi” konulu yüksek lisans çalışması kapsamında amaç, sodyum benzoattan *Pseudomonas putida* KT2440 hücreleri ile *cis, cis*-mukonik asitin mikrobiyal üretimi ve üretim ortamı koşullarının deney tasarım yöntemi ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla, üretim ortamında yer alan 11 parametre arasından üretimde en etkili olanların belirlenmesi Plackett-Burman deney tasarımı ile, bu faktörlerin optimizasyonu ise, cevap yüzey yöntemi olan merkezi kompozit deney tasarımı kullanılarak yapılmıştır.

Pseudomonas putida hücreleri ile *cis, cis*-mukonik asit üretimine ait yapılan çalışmalar incelendiğinde üretim ortamında 11 adet parametrenin (sodyum benzoat (substrat), glukoz, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂, FeSO₄ derişimi, sıcaklık ve başlangıç pH’ı) bulunduğu tespit edilmiştir. *cis, cis*-Mukonik asit üretiminde derişimi arttırmak için bu ortam koşullarının optimum değerlerini belirlemek amacıyla istatistiksel deney tasarımı yöntemleri kullanılmıştır. Optimum değerleri elde etmek amacıyla 11 parametreye cevap yüzey yöntemi uygulandığında çok sayıda deney yapılması gerektiğinden, deney sayısını en aza indirmek amacıyla öncelikle Plackett-Burman kullanılarak bu parametreler arasından üretime etki eden en önemli değışkenler tanımlanmıştır.

Üretim ortamında yer alan 11 parametre arasından en etkili olanların belirlenmesi amacıyla uygulanan Plackett-Burman deney tasarımı 3 seviye ve 15 deney şeklinde gerçekleştirilmiştir. Plackett-Burman deney tasarımı sonucunda, cevap değışkenleri (mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi) için faktörlerin üretime % katkıları karşılaştırıldığında iki cevap değışkeni için de sıcaklık faktörünün üretime katkısının düşük olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, model denkleminde sıcaklık faktörü ihmal edilerek ANOVA sonuçları elde edilmiştir. ANOVA testi ile elde edilen p değerleri incelendiğinde her iki cevap değışkeni için modelin anlamlı olduğu ve modelde uyum eksikliği olmadığı sonucuna varılmıştır.

Cevap değişkenlerinden olan mikroorganizma derişimi için üretimi etkileyen değişkenler arasından Na-benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ ve CaCl₂'ün p değerlerinin 0.05'ten küçük değerlerde ve % 95 güven aralığında olması sebebiyle önemli faktörler olarak belirlenmiştir. *cis, cis*-Mukonik asit derişimi için bu faktörler; Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ ve FeSO₄ olarak belirlenmiştir. ANOVA testine göre p değerleri incelendiğinde *cis, cis*-mukonik asit derişimi için 11 faktörden 10 tanesininin (Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ ve FeSO₄) önemli olduğu görülmüştür. Fakat, cevap yüzey yöntemi ile optimizasyonun gerçekleştirilebilmesi ve deney sayısını en aza indirebilmek için daha az parametre sayısına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, üretimde yer alan en etkili faktörlerin belirlenmesi, her bir faktörün yanıt üzerindeki etkisinin büyüklüğünü gösteren Pareto grafiğinin değerlendirilmesi ve yorumlanması ile yapılmıştır.

Mikroorganizma derişimi için elde edilen Pareto grafiğinde "Bonferroni" limitin üzerinde kalan faktörlerin (Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, NaCl, CaCl₂), t-değeri limiti üzerinde kalan faktörlerle (Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ ve CaCl₂) karşılaştırıldığında daha önemli olduğu belirlenmiştir (Dholariya vd. 2014). Buna göre, mikroorganizma derişimi için yanıtı etkileyen en önemli beş faktör Na-Benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, NaCl ve CaCl₂ olarak belirlenmiştir.

cis, cis-Mukonik asit derişimi üzerindeki etkileri gösteren Pareto grafiğinde ise, "Bonferroni" limitin üzerinde kalan faktörler; Na-benzoat, başlangıç pH'ı, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ olurken, t-değeri limiti üzerinde kalan faktörler ise Na-benzoat, glukoz, başlangıç pH'ı, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ ve FeSO₄'dir. Buna göre, *cis, cis*-mukonik asit derişimi için yanıtı etkileyen en önemli dört faktör Na-benzoat, başlangıç pH'ı, NaCl ve (NH₄)₂SO₄'dir. İki cevap değişkeni için de başlangıç pH'ı, Na-benzoat ve NaCl derişiminin önemli olduğu Pareto grafiği aracılığıyla belirlenmiştir.

Başlangıç pH'ı değerinin diğer faktörlere kıyasla mikroorganizma ve *cis, cis*-mukonik asit derişimi üzerinde etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir. *Pseudomonas putida*

KT2440 hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde nötral pH değerlerinde çalışıldığı görülmüştür (van Duuren vd. 2012, Vardon vd. 2016, Sudarsan vd. 2016, Johnson vd. 2016). *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde önemli bir değişken olan ve substrat görevi gören Na-benzoat, iki cevap değişkeni için anlamlı bir faktör olarak belirlenmiştir. Ayrıca, NaCl hem çoğalma hem de üretim için ortamda yer alması gereken önemli tuzlar arasındadır.

Üretimde en etkili faktörler olarak belirlenen başlangıç pH'ı, Na-benzoat, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişiminin RSM ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu faktörlerin RSM'de kullanılmak üzere seviye ve aralık değerleri, *cis*,*cis*-mukonik asit üretimine pozitif ve negatif etkilerine göre belirlenmiştir. Na-benzoat derişimi ve başlangıç pH'ı üretime pozitif etki, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişimi ise negatif etki göstermektedir.

Başlangıç pH'ı, Na-benzoat, NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişiminin optimizasyonu amacıyla uygulanan RSM deney tasarımı 5 seviye ve 30 deney şeklinde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma ve *cis*,*cis*-mukonik asit derişimi için RSM ile elde edilen ANOVA testi sonuçlarındaki p değerleri incelendiğinde iki cevap değişkeni için de modelin anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır. Mikroorganizma derişimi için RSM deney tasarımında üretimi etkileyen değişkenler arasından x_1 (Na-benzoat derişimi), x_2 (başlangıç pH'ı), x_3x_4 (NaCl ve (NH₄)₂SO₄ derişiminin ikili etkileşimi) p değerlerinin 0.05'ten küçük olması sebebiyle önemli faktörler olarak belirlenmiştir. *cis*, *cis*-Mukonik asit derişimi için bu faktörler; x_2 (başlangıç pH'ı), x_1^2 (Na-benzoat derişiminin karesel etkisi) ve x_2^2 (başlangıç pH'ının karesel etkisi) olarak belirlenmiştir.

Pseudomonas putida KT2440 hücreleri ile ccMA üretimi üzerine en önemli parametre olarak belirlenen sodyum benzoat, NaCl, (NH₄)₂SO₄ derişimi ve başlangıç pH'ının optimum değerleri sırasıyla; 16.93 mM, 0.9 g/L, 1.8 g/L ve 7.97 olarak belirlenmiştir. Plackett-Burman ve RSM deney tasarımı sonucu tüm parametrelerin optimum değerleri; 16.93 mM Na-benzoat, 20 mM glukoz, 18 g/L Na₂HPO₄, 10 g/L KH₂PO₄, 0.9 g/L NaCl, 1.8 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 150 µM CaCl₂, 13 µM FeSO₄ derişimi, pH 7.97 ve 35 °C sıcaklık olarak elde edilmiştir. Bu değerler literatürdeki mutant *Pseudomonas putida* ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde (Johnson vd. 2016) yer alan 4 mM glukoz,

13.56 g/L Na₂HPO₄, 6 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NaCl, 2.25 g/L (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 100 µM CaCl₂, 18 µM FeSO₄ derişimi, pH 7.2 ve 30 °C sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında farklılık göstermektedir.

Literatürde yer alan benzer çalışmalarda *Pseudomonas putida* hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretimi 30 °C'de gerçekleştirilmesine rağmen, Kaneko vd. tarafından gerçekleştirilen 2011 yılındaki çalışmada, katekolün *cis*, *cis*-mukonik asite dönüşümünü sağlayan katekol 1,2-dioksijenaz enziminin optimum sıcaklığının 35 °C olduğu belirtilmiştir. Bu yüksek lisans çalışmasıyla RSM kullanılarak üretim ortamı koşullarının optimizasyonu sonucunda sıcaklığın optimum değerinin 35 °C olarak elde edilmesi katekol 1,2-dioksijenaz enzimi için uygun sıcaklığın 35 °C olduğunu destekler niteliktedir.

Optimize edilmemiş koşullar altında 0.126 mM ccMA, optimize edilmiş koşullar altında 0.401 mM ve RSM ile 0.5895 mM ccMA elde edilmiştir. Böylece, optimize edilmemiş koşullarla karşılaştırıldığında ise, RSM kullanılarak üretimde yaklaşık 6 kat artış elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma Plackett-Burman deney tasarımının, çok faktörlü proseslerde, tüm parametrelerin az sayıdaki deneylerle taranarak, üretim koşullarının optimizasyonu için en önemli değişkenlerin belirlenmesini sağlayan etkili bir tasarım yöntemi olduğunu göstermiştir. Plackett-Burman tasarımı, çok sayıda değişkeni dikkate alarak proses optimizasyonunda gerekli olan bilgi kaybını önlemeyi mümkün kılmıştır. Bu tasarımın kullanımı ile hem mikroorganizma hem de *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi için optimize edilecek değişken sayısı 11'den 4'e düşürülerek az sayıda deneyle optimum değerler belirlenmiştir.

Bu çalışmada, RSM bir bütün olarak (faktörlerin birbirleriyle ve cevap ile etkileşiminin belirlenmesi, faktöriyel tasarım ve cevap yüzeyi analizi), bir biyoprosesin tasarımı ve optimizasyonu için oldukça yeterli olduğunu göstermiştir. Bu yaklaşım, çok sayıda değişken söz konusu olduğunda bu değişkenlerin her birinin sistemin cevabına olan

katkılarını tanımlamak ve kontrol etmek açısından herhangi bir sisteme uygulanabilmektedir.

cis, cis-Mukonik asit üretimine yönelik çalışmalar incelendiğinde ürün derişimini arttırmak için ortam koşullarını optimize etmek amacıyla istatistiksel deney tasarım yönteminin kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, yapılan çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

5.2 Öneriler

cis, cis-Mukonik asitin mikrobiyal üretimi araştırmalarında, mikroorganizma ve ürün derişimini arttırmak üzere gerçekleştirilmesi önerilen adımlar aşağıda sıralanmıştır:

1. *cis, cis*-Mukonik asit derişiminde seçilen mikroorganizma önemli bir faktördür. *cis, cis*- Mukonik asiti verimli bir şekilde üretmek için mikroorganizmaların sahip olması gereken bazı özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:
 - i. Orto-ayrılması yolu ile aromatik substratları metabolize etme,
 - ii. Mukonat sikloizomeraz enzimi bulundurmuyarak mukonik asit oluşumuna izin verme,
 - iii. Mikroorganizmalar için toksik özellik gösteren aromatik bir substrata karşı dirençli,
 - iv. Yüksek katekol 1,2-dioksijenaz (*catA*) aktivitesi gösterme.
2. Aromatik substratlar mikroorganizmalar için toksik özellik gösterdiğinden yüksek toleranslı ve yüksek verim sağlayan mutant/rekombinant mikroorganizmaların kullanılması biyoproseslerin iyileştirilmesi açısından önemlidir.
3. Fermentasyonla *cis, cis*-mukonik asit üretiminde serbest mikroorganizmalar yerine tutuklanmış mikroorganizmaların kullanımı, biyokatalizörün kararlılığını arttırmak, mikroorganizma geri kazanımı ve tekrar kullanılmasını kolaylaştırmak, yan ürünlerin

ortadan kaldırılması, ürün geri kazanımı ve saflaştırma maliyetlerini azaltmak adına avantaj sağlayabilir.

4. Optimum koşulların belirlenmesinin ardından substrat inhibisyonunu önlemek amacıyla yapılacak “fed-batch” işletim deneyleri ile, mikroorganizma ve *cis*, *cis*-mukonik asit derişimleri arttırılabilir. Substratın yüksek derişimlerinde mikroorganizma üzerinde meydana gelebilecek inhibisyon etkisini önlemek amacıyla, “fed-batch” işletim deneylerinde kullanılacak olan Na-benzoat derişimi ön denemeler ve literatür araştırmaları sonucu belirlenmelidir.
5. Mikroorganizma üzerinde meydana gelebilecek substrat ve ürün inhibisyonunu öneleyerek mikroorganizma ve *cis*, *cis*-mukonik asit derişiminin arttırılması amacıyla çift fazlı sistemlerde çalışılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Alireza, A. S. Ataallah, S. G. Majid, E. G. Sarafi, A. Mohammad, E. and Hadi, A. 2013. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling the influence of some operating variables of the lab scale thickener performance. *International Journal of Mining Science and Technology*, 23(5); 717-724.
- Anonymous. 2018. Web sitesi:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/47850?lang=en®ion=TR> Erişim Tarihi: 02.06.2018.
- Aytar, P. Buruk, Y. ve Çabuk, A. 2013. *Streptococcus equi* ile hyaluronik asit üretiminde optimum koşulların plackett burman yöntemi ile belirlenmesi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 11(1); 28-35.
- Bang, S. G. Choi, W. J. Choi, C. Y. and Cho, M. H. 1996. Production of *cis*, *cis*-muconic acid from benzoic acid via microbial transformation. *Biotechnology Bioprocess Eng.*, 1(1); 36-40.
- Bayraktar, E. 2001. Response surface optimization of the separation of DL-tryptophan using an emulsion liquid membrane. *Process Biochemistry*, 37(2); 169-175.
- Bezerra, M. A. Santelli, R. E. Oliveira, E. P. Villar, L. S and Escaleraa, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5); 965-977.
- Bhatia, S. Bhatia, R. and Yang, Y. 2016. Biosynthesis of polyesters and polyamide building blocks using microbial fermentation and biotransformation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(1); 639-663.
- Bhownik, S. N. and Pati, R. T. 2018. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, p. p. 73. India.
- Bui, V. Lau, M. K. MacRae, D. and Schweitzer, D. 2013. US Patent 20130030215 A1.
- Caccamo, P. D. and Brun, Y. V. 2018. The Molecular Basis of Noncanonical Bacterial Morphology. *Trends in Biotechnology*, 26(3); 191-208.
- Choi, W. J. Lee, E. Y. Cho, M. H. and Choi, C. Y. 1997. Enhanced production of *cis*, *cis*-muconate in a cellrecycle bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1); 70–76.
- Chua, J. W. and Hsieh, J. H. 1990. Oxidative bioconversion of toluene to 1,3-butadiene-1,4 dicarboxylic acid (*cis*, *cis*-muconic acid). *World Journal Microbiology Biotechnology*, 6(2); 127–143.
- Croarkin, C. and Tobias, P. 2015. *Engineering Statistics e-Handbook*. Erişim Adresi: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/> Erişim Tarihi: 01.06.2018.
- Curran, K. A. Leavitt, J. Karim, A. S. and Alper, H. S. 2013. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, 15(1); 55–66.

- Draths, K. M. and Frost, J. W. 1994. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D glucose. *Journal of the American Chemical Society*, 116(1); 399–400.
- Demain, A. 2000. Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18(1); 26-31.
- Dholariya, Y. N. Bansod, Y. B. Vora, R. M. Mittal, S. S. Shirsat, A. E. and Bhingara, C. L. 2014. Design and optimization of bilayered tablet of Hydrochlorothiazide using the Quality-by-Design approach. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 4(2); 93–101.
- Eldeleklioğlu, B. 2009. Peyniraltı suyundan laktik asit üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Espinosa-Urgel, M. Salido, A. and Ramos, J. 2000. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. *Journal of Bacteriology*., 182(9); 2363-2369.
- Gorden, J. Zeiner, T. and Brandenbusch, C. 2015. Reactive extraction of *cis*, *cis*-muconic acid. *Fluid Phase Equilibria*, 393(1); 78-84.
- Guzik, U. Hupert-Kocurek, K. and Wojcieszynska, D. 2013. Intradiol dioxygenases - the key enzymes in xenobiotics degradation. *Biodegradation of hazardous and special products*. InTech. p. p. 129-153, Rijeka, Croatia.
- Harwood, C. S. Fosnaugh, K. and Dispensai, M. 1989. Flagellation of *Pseudomonas putida* and Analysis of Its Motile Behavior. *Journal Of Bacteriology*, 171(7); 4063-4066.
- Hsieh, J. H. 1984. US Patent 4480034.
- Hsieh, J. H. Barer, S. J. and Maxwell, P. C. 1985. US Patent 4535059.
- Hsieh, J., H. 1990. US Patent 4968612.
- Imada, Y. Yoshikawa, N. Mizuno, S. and Mikawa, T. 1989. US Patent 4871667.
- Johnson, C. W. Salvachua, D. Khanna, P. Smith, H. Peterson, D. J. and Beckham, G. T. 2016. Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity. *Metabolic Engineering Communications*, 3(1); 111-119.
- Kaneko, A. Ishii, Y. and Kirimura, K. 2011. High-yield production of *cis*, *cis*-muconic acid from catechol in aqueous solution by biocatalyst. *Chemistry Letters*, 40(4); 381–383.
- Kumar, R. Mahajan, S. Kumar, A. and Singh, D. 2011. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilis* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnology*, 28(1); 65–71.
- Lennerz, B. S. Vafai, S. B. Delaney, N. F. Clish, C. B. Deik, A. A. Pierce, K. A. Ludwig, D. S. and Mootha, V. K. 2014. Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Molecular Genetics and Metabolism*., 114(1); 73-79.

- Liu, W. H. Li, R. M. Kung, K. H. and Cheng, T. L. 2003. Bioconversion of benzoic acid to *cis,cis*-muconic acid by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Food Science and Agricultural Chemistry, 5(1); 7-12.
- Lundstedt, T. Seifert, E. Abramo, L. Thelin, B. Nyström, A. Pettersen, J. and Bergman, R. 1998. Experimental design and optimization. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 42(1); 3-40.
- Manzano, A. R. Yuste, L. and Rojo, F. 2005. Levels and Activity of the *Pseudomonas putida* Global Regulatory Protein Crc Vary According to Growth Conditions. Journal of Bacteriology., 187(11); 3678-3686.
- Maxwell, P. C. 1982. US Patent 4355107.
- Maxwell, P. C. 1986. US Patent 4588688.
- McCreath, S. B. and Delgoda, R. 2017. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies, p. p. 549. Jamaica.
- Mizuno, S. Yoshikawa, N. Seki, M. Mikawa, T. and Imada, Y. 1988. Microbial production of *cis, cis*-muconic acid from benzoic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, 28(1); 20-25.
- Mu, X. Q. Xu, Y. Nie, Y. Ouyang, J. and Sun, Z. H. 2005. *Candida parapsilosis* CCTCC M203011 and the optimization of fermentation medium for stereoinversion of (S)-1-phenyl-1,2-ethanediol. Process Biochemistry, 40(7); 2345-2350.
- Murthy, M. S. R. C. Swaminathan, T. Rakshit, S. K. and Kosugi, Y. 2000. Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyloleate by response surface methodology. Bioprocess Engineering, 22(1); 35-39.
- Nelson, K. E. vd. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Environmental Microbiology., 4(12); 799-808.
- Niu, W. Draths, K. M. and Frost, J. W. 2002. Benzene-free synthesis of adipic acid. Biotechnol. Prog., 18(2); 201-211.
- Özkan, C. Yamaç, M. ve Yıldız, Z. 2013. *Pleurotus Ostreatus* Makrofungusu ile Derin Kültür Koşullarında Biyoprotein Üretimini Optimizasyonu. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 13(1); 35-42.
- Pamir, M. H. 1985. Fermentasyon Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 936, 44-132 s., Ankara.
- Patil, M. D. Shinde, K. D. Patel, G. Chisti, Y. and Banerjee, U. C. 2016. Use of response surface method for maximizing the production of arginine deiminase by *Pseudomonas putida*. Biotechnology Reports, 10(1); 29-37.
- Plackett, R. L. and Burman, J. P. 1946. The design of optimum multifactorial experiments, Biometrika, 33(4); 305-325.
- Rajendran, A. and Thangavelu, V. 2009. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. Bioproducts and Biosystems Engineering, 42(5); 985-992.

- Roane, T. M. Reynolds, K. A. Maier, R. M. and Pepper, I. L. 2009. Microorganisms. Environmental Microbiology, p. p. 9-36. Arizona.
- Sağol, E. 2015. İstatistiksel deney tasarımının çayırhan bölgesi linyitlerinin flotasyonunda uygulanması. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Schmidt, E. and Knackmuss, H. J. 1984. Production of *cis*, *cis*-muconate from benzoate and 2-fluoro-*cis*, *cis*-muconate from 3-fluorobenzoate by 3-chlorobenzoate degrading bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 20(5); 351–355.
- Sudarsan, S. Blank, L. M. Dietrich, A. Vielhauer, O. Takors, R. Schmid, A. and Reuss, M. 2016. Dynamics of benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. Metabolic Engineering Communications, 3(1); 97-110.
- Sun, X. Lin, Y. Huang, Q. Yuan, Q. and Yan, Y. 2013. A novel muconic acid biosynthesis approach by shunting tryptophan biosynthesis via anthranilate. Appl. Environ. Microbiol., 79(13); 4024-4030.
- Şenoğlu, B. ve Acıtaş, Ş. 2014. İstatistiksel Deney Tasarımı. Nobel Akademik Yayıncılık. 158-192 s., İstanbul.
- van Duuren, J. B. Wijte, D. Karge, B. dos Santos, V. A. Yang, Y. and Mars, A. E. 2012. pH-stat fed-batch process to enhance the production of *cis*, *cis*-muconate from benzoate by *Pseudomonas putida* KT2440–JD1. Biotechnol. Prog., 28(1); 85–92.
- Vardon, D. R. Rorrer, N. A. Salvachua, D. Settle, A. E. Johnson, C. W. Menart, M. J. Cleveland, N. S. Ciesielski, P. N. Steirer, K. X. Dorgan, J. R. and Beckham, G. T. 2016. *cis*, *cis*-Muconic acid: separation and catalysis to bio-adipic acid for nylon-6,6 polymerization. The Royal Society of Chemistry, 18(11); 3397-3413.
- Weber, C. Brückner, C. Weinreb, S. Lehr, C. Essl, C. and Boles, E. 2012. Biosynthesis of *cis*, *cis*- muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 78(23); 8421–8430.
- Wells, Jr. T. and Ragauskas, A. J. 2016. Biotechnological opportunities with the β -keto adipate pathway. Trends in Biotechnology, 30(12); 627–37.
- Wu, C. M. Lee, T. H. Lee, S. N. Lee, Y. A. and Wu, J. Y. 2004. Microbial synthesis of *cis*, *cis*-muconic acid by *Sphingobacterium* sp. GCG generated from effluent of a styrene monomer (SM) production plant. Enzyme Microbiology Technology, 35(6); 598–604.
- Wu, C. M. Wu, C. C. Su, C. C. Lee, S. N. Lee, Y. A. and Wu, J. Y. 2006. Microbial synthesis of *cis*, *cis*-muconic acid from benzoate by *Sphingobacterium* sp. mutants. Biochem. Eng. J., 29(1); 35–40.
- Xie, N. Z. Liang, H. Huang, R. B. and Xu, P. 2014. Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. Biotechnology Advances, 32(3); 615-622.
- Xie, N. Z. Wang, Q. Y. Zhu, Q. X. Qin, Y. Tao, F. and Huang, R. B. vd. 2014. Optimization of medium composition for *cis*, *cis*-muconic acid production by a *Pseudomonas* sp. mutant using statistical methods. Journal Preparative Biochemistry and Biotechnology, 44(4); 342–54.

- Xu, Q. Li, S. Huang, H. and Wen, J. 2012. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol Adv.*, 30(6); 1685–96.
- Yerlikaya, F. 2013. Paklitaksel nanopartiküllerinin kalite tasarımı ile geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yocum, R. R. Gong, W. Dole, S. Sillers, R. Gandhi, M. and Pero, J. G. 2013. WO Patent 2013116244 A1.
- Yoshikawa, N. Mizuno, S. Ohta, K. and Suzuki, M. 1990. Microbial production of *cis*, *cis*-muconic acid. *J. Biotechnol.*, 14(2); 203–10.



EKLER

- EK 1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve özellikleri
- EK 2 Mikroorganizma çoğalma ortamından alınan örneklerin seyreltme oranları, absorbans, yaş ve kuru hücre derişimi değerleri
- EK 3 Mikroorganizma çoğalma eğrisi için elde edilen mikroorganizma derişimi değerleri
- EK 4 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde ön çalışmalar sonucu elde edilen mikroorganizma derişimi sonuçları
- EK 5 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde ön çalışmalar sonucu elde edilen *cis*, *cis*-mukonik derişimi sonuçları

EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri

Çizelge 1 Çalışmada yer alan kimyasallar ve özellikleri (<https://www.sigmaaldrich.com>, 2018)

Adı	Kapalı Formül	Erime Sıc., °C	Kaynama Sıc., °C	Molekül Ağırlığı, g/mol	Yoğunluk, g/mL
Amonyum sülfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	280	-	132.14	1.770
Asetik asit	C ₂ H ₄ O ₂	16.6	117.9	60.05	1.049
Demir sülfat heptahidrat	FeSO ₄ .7H ₂ O	64	-	278.01	1.897
Disodyum hidrojen fosfat	Na ₂ HPO ₄	243-247	-	141.95	0.500
Glukoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	150-152	-	180.16	1.540
Kalsiyum klorür	CaCl ₂	782	1600	110.98	2.150
Magnezyum sülfat heptahidrat	MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	246.48	1.680
Metanol	CH ₄ O	-98	64.7	32.04	0.791
Potasyum dihidrojen fosfat	KH ₂ PO ₄	253	-	136.08	2.338
Sodyum benzoat	C ₇ H ₅ NaO ₂	450	-	144.10	1.440
Sodyum hidroksit	NaOH	318	1390	39.99	2.130
Sodyum klorür	NaCl	801	1413	58.44	2.165
Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	3	280	98.07	1.840
Tripton	C ₃ H ₅ NO	86	252.4	71.07	1.322

EK 2 Mikroorganizma oğalma Ortamından Alınan rneklerin Seyreltme Oranları, Absorbans, Yaş ve Kuru Hücre Derişimi Değerleri

Çizelge 1 Mikroorganizma oğalma ortamından alınan örneklerin seyreltme oranlarına karşı elde edilen absorbans, yaş ve kuru hücre derişimi değerleri

Seyreltme oranı	Absorbans (600 nm)	Yaş hücre derişimi, g/L	Kuru hücre derişimi, g/L
Seyreltme yok	-	21.00	14.79
0.5 M.O. ¹ / 2 mL	1.294	5.25	3.69
0.4 M.O. / 2 mL	1.077	4.20	2.95
0.3 M.O. / 2 mL	0.808	3.15	2.21
0.2 M.O. / 2 mL	0.576	2.10	1.48
0.1 M.O. / 2 mL	0.316	1.05	0.74

¹M.O.: Mikroorganizma

EK 3 Mikroorganizma oğalma Eğrisi için Elde Edilen Mikroorganizma Derişimi Değerleri

Çizelge 1 Mikroorganizma çoğalması suresince elde edilen absorbans ve mikroorganizma derişimi sonuçları

Zaman, h	Seyreltme oranı	Absorbans (600 nm)	Mikroorganizma derişimi, g/L ¹
0	0	0.000	0.000
1	0	0.321	1.262
2	0	0.630	2.476
3	0	0.925	3.636
4	0	1.093	4.296
5	2 (1 mL M.O./2 mL)	0.673	5.291
6	2 (1 mL M.O./2 mL)	0.788	6.195
21	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	0.804	12.641
22	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	0.928	14.590
23	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	1.126	17.703
24	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	1.250	19.653
25	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	1.274	20.030
26	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	1.284	20.188
27	4 (0.5 mL M.O./2 mL)	1.310	20.596
28	8 (0.25 mL M.O./2 mL)	0.668	21.005
29	8 (0.25 mL M.O./2 mL)	0.645	20.282
30	8 (0.25 mL M.O./2 mL)	0.571	17.955
31	8 (0.25 mL M.O./2 mL)	0.528	16.603
32	8 (0.25 mL M.O./2 mL)	0.510	16.037
33	8 (0.25 mL M.O./2 mL)	0.502	15.785

¹ Seyreltme oranı ile çarpılmış değerler

EK 4 Ön Çalışmalar Sonucu Elde Edilen Mikroorganizma Derişimi Sonuçları

Çizelge 1 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde ön çalışmalar sonucu elde edilen mikroorganizma derişimi sonuçları

Zaman, h	Mikroorganizma derişimi, g/L			
	Na-benzoat: 15 mM, glukoz: 15 mM	Na-benzoat: 30 mM, glukoz: 15 mM	Na-benzoat: 15 mM, glukoz: 0 mM	Na-benzoat: 30 mM, glukoz: 0 mM
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1.690	2.208	1.259	1.065
6	2.345	3.137	1.553	1.352
9	2.848	3.764	1.775	1.583
12	3.207	4.257	2.051	1.713
24	4.750	4.721	3.281	2.367
28	4.696	4.830	4.078	2.624
32	4.646	4.780	4.113	4.509
36	5.000	4.930	4.760	3.207
48	5.941	4.785	4.676	4.556
56	7.639	6.105	5.278	6.145

(pH: 7.2, T: 30 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıçtaki yaş hücre miktarı: 0.4 g)

EK 5 Ön Çalışmalar Sonucu Elde Edilen *cis*, *cis*-Mukonik Derişimi Sonuçları

Çizelge 1 *Pseudomonas putida* KT2440 (DSM 6125) hücreleri ile *cis*, *cis*-mukonik asit üretiminde ön çalışmalar sonucu elde edilen *cis*, *cis*-mukonik asit derişimi sonuçları

Zaman, h	<i>cis</i> , <i>cis</i> -Mukonik asit derişimi, mM			
	Na-benzoat: 15 mM, glukoz: 15 mM	Na-benzoat: 30 mM, glukoz: 15 mM	Na-benzoat: 15 mM, glukoz: 0 mM	Na-benzoat: 30 mM, glukoz: 0 mM
0	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.001	0.000	0.005	0.000
6	0.005	0.034	0.007	0.000
9	0.018	0.065	0.017	0.000
12	0.027	0.072	0.021	0.000
24	0.056	0.088	0.026	0.002
28	0.069	0.095	0.032	0.005
32	0.074	0.095	0.054	0.006
36	0.082	0.108	0.082	0.008
48	0.109	0.110	0.096	0.008
56	0.120	0.126	0.100	0.072

(pH: 7.2, T: 30 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıçtaki yaş hücre miktarı: 0.4 g)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma Elif UZUN

Doğum Yeri : Merzifon/Amasya

Doğum Tarihi : 14.07.1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Samsun Recep Tanrıverdi Lisesi (2009)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü (2015)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı (Şubat 2016 - Aralık 2018)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Standard Profil Grup – Parça, Malzeme ve Proses Ar-Ge Mühendisi (2018-halen)

Ulusal Kongre Sunum

Poster Sunumu:

1. **Uzun, F. E.** Bilgiç, B. ve Bayraktar, E. 2017. *cis, cis*-Mukonik asitin mikrobiyal üretimi. AKMBB (Ankara Kimya Mühendisliği Bölümleri Birlikteliği) Proje Sergisi, Ankara, Türkiye.

Uluslararası Kongre Sunum

Sözlü Sunum:

1. **Uzun, F. E.** Songür, R. and Bayraktar, E. 2017. Design of medium conditions by Plackett Burman method for microbial production of *cis, cis*-muconic acid. Ancon-International Congress on Chemistry and Materials Science, 4-6 Ekim, Ankara, Türkiye.