

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAGNETİK NANOTANECİK İÇEREN ALGİNATA TUTUKLANMIŞ
MİKROORGANİZMA İLE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ

Aslı KAÇAR

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MAGNETİK NANOTANECİK İÇEREN ALGİNATA TUTUKLANMIŞ MİKROORGANİZMA İLE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ

Aslı KAÇAR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

Çalışmanın amacı, *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizmasının tutuklanarak, glukozdan laktik asit üretimi, fermentasyon ortam koşullarının Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesi ve kinetik hız sabitlerinin bulunmasıdır. Tutuklama da Fe₃O₄ nanoparçacıkları kullanılmıştır. Fe₃O₄ nanoparçacıkları birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş, sentezlenen Fe₃O₄ nanoparçacıkları APTES ve Dopamin ile ayrı ayrı fonksiyonelleştirilmiştir. Fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄ nanoparçacıkları ve aljinat-Fe₃O₄ nanoparçacıkları ile ayrı ayrı hücre tutuklama deneyleri gerçekleştirilmiş, tutuklanan *Lactobacillus casei* hücrelerinden laktik asit üretimi çalışılmıştır. Nanotaneciklere istenilen oranda tutuklama gerçekleşmediği için çalışmanın devamında mikroorganizma, nanoyapıda Fe₃O₄ içeren kalsiyum aljinata tutuklanarak laktik asit üretimi üzerine üretim parametreleri incelenmiştir. pH ve sıcaklık etkilerinin incelendiği ön çalışmalarda, 6.5 pH ve 25 °C sıcaklık değerlerinde 14.3 g/L laktik asit elde edilmiştir. RSM deneylerinde mikroorganizma derişimi, substrat derişimi ve deney süresi parametrelerinin laktik asit derişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Laktik asit derişiminde en yüksek sonuçlara, mikroorganizma derişiminin 4.5 g/L ve substrat derişiminin 30 g/L alınarak başlatıldığı ve deney süresinin 96 saat sürdüğü çalışmalarda varılmıştır. Bu değerler sonucunda laktik asit derişimi 28.1 g/L değerine ulaşmıştır. Elde edilen bu koşullarda tutuklanmış mikroorganizmaların tekrar kullanımını incelenmiş ve dördüncü kullanım sonunda laktik asit derişiminin %72.8 i korunmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünde tutuklanmış mikroorganizmalarla laktik asit üretim kinetiği incelenmiş, kinetiğin substrat aktivasyon modeline uyduğu belirlenmiştir. Kinetik sabitleri sırasıyla; $r_{smax}= 11.385$ mmol/L.h, $K_1= 31.9012$ mmol/L ve $K_2=0.7285$ mmol/L olarak bulunmuştur. Çalışmada etkinlik katsayısı yaklaşık 1.00 bulunmuş ve gözenek içi ve dışı difüzyonve kütle aktarım kısıtlamaları olmadığı belirlenmiştir. Böylece, bulunan hız denklemindeki sabitler, kısıtlamasız durumdaki gerçek hız sabitleri olarak ele alınmıştır.

Ocak 2021, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fe₃O₄ Nanoparçacıklar, Fonksiyonelleştirme, Tutuklanmış Mikroorganizma, Laktik Asit Üretimi

ABSTRACT

Master Thesis

LACTIC ACID PRODUCTION WITH IMMOBILIZED MICROORGANISM ON ALGINATE WITH MAGNETIC NANOPARTICLE

Aslı KAÇAR

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

Supervisor: Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

The aim of the study is to immobilized *Lactobacillus casei* (DSM20011) microorganism, to produce lactic acid from glucose, optimize fermentation conditions with Response Surface Method (RSM) and to find kinetic rate constants. Fe₃O₄ nanoparticles were used in the immobilized. Fe₃O₄ nanoparticles were synthesized by co-precipitation method, and the synthesized Fe₃O₄ nanoparticles were functionalized separately with APTES and Dopamine. Cell immobilized experiments were performed separately with functionalized Fe₃O₄ nanoparticles and alginate- Fe₃O₄ nanoparticles, and lactic acid production from immobilized *Lactobacillus casei* cells was studied. Since the desired amount of immobilized of the nanoparticles could not occur, the microorganism was immobilized in the calcium alginate containing nanostructure of Fe₃O₄ and the production parameters on lactic acid production were examined. In the preliminary studies investigated the effects of pH and temperature, 14.3 g/L lactic acid was obtained at 6.5 pH and 25 ° C temperatures. The effects of microorganism concentration, substrate concentration and test duration parameters on lactic acid concentration were investigated in RSM experiments. The highest results in lactic acid concentration have been reached in the studies in which the microorganism concentration was 4.5 g/L, the substrate concentration was 30 g/L and the test period lasted 96 hours. As a result of these values, the lactic acid concentration reached 28.1 g/L. In these conditions, reuse of immobilized microorganisms were examined and 72.8% of the lactic acid concentration was preserved at the end of the fourth use. In the second part of the study, lactic acid production kinetics with immobilized microorganisms were examined, and it was determined that the kinetics fit the substrate activation model. Kinetic constants, respectively; $r_{smax} = 11.385$ mmol/L.h, $K_1 = 31.9012$ mmol/L and $K_2 = 0.7285$ mmol/L. In the study, the efficiency coefficient was found to be approximately 1.00 and it was determined that there were no observation the intra and interparticle resistances. Thus, the constants in the found rate equation are considered as real rate constants in the unresistance state.

January 2021, 83 page

Key Words: Fe₃O₄ Nanoparticles, Functionalization, Immobilized Microorganism, Lactic Acid Production

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarını takip ederek danışmanlığında çalışmak istediğim, bu isteğimi en olumlu şekilde karşılayıp kabul eden, ön araştırma, ders aşaması, tez çalışmaları ve tüm aşamalar boyunca beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini her zaman en içtenlikle paylaştan, sabır ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen, disiplinine hayran olduğum, desteğini en zorlu zamanlarımda hep hissettiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR' a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca desteklerini sunan Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU ve Prof. Dr. Afife GÜVENÇ' e, yüksek lisans dönemim boyunca hem araştırmalarımda hem deneylerimde her şeyi danışabildiğim, her zaman güleryüz ve hoşgörüsüyle karşılayan değerli hocam Araş. Gör. Dr. Rahime SONGÜR' e, demir oksit nanoparçacıkları sentezi çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde ve sonuçlarının yorumlanmasında destek olan hocalarım Prof. Dr. Nuray YILDIZ, Araş. Gör. Dr. Ceren ATİLA DİNÇER ve Araş. Gör. Dr. Yavuz GÖKÇE' ye, kinetik model çalışmalarını gerçekleştirmemiz fikrini sunan Doç. Dr. Emir Hüseyin ŞİMŞEK' e, HPLC çalışmalarım boyunca bilgisine danıştığımız, konu hakkında çok yardımcı olan Uzm. Dr. Nilüfer VURAL' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda bilgi birikimini aktaran ve her zaman yardım sağlayan çalışma arkadaşım Elif UZUN' a, çalışmalarımız boyunca birbirimize destek olduğumuz İrem ÖNDER' e teşekkürlerimi sunarım. Her zaman desteklerini arkamda hissettiğim değerli arkadaşlarım Kübra POLAT ve Nurşen ÖCAL' a ve varlığıyla güç veren, en büyük desteğim Akın ERGÜN' e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman düşüncelerimde beni destekleyen, sabır ve sevgileriyle yanımda olan canım ailem, her zaman yanımda olduğunu bildiğim ve hissettiğim babam Hakan KAÇAR, annem Selma KAÇAR ve kardeşim Efe KAÇAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Aslı KAÇAR

Ankara, Ocak 2021

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 ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 Laktik Asitin Yapısı ve Özellikleri	3
2.2 Laktik Asit Kullanım Alanları.....	4
2.3 Laktik Asit Üretimi.....	6
2.3.1 Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakteri türleri	8
2.4 Tutuklama Tanımı	9
2.4.1 Tutuklamanın önemli özellikleri.....	10
2.4.1.1 Kararlılık	11
2.4.1.2 Kinetik özellikler	12
2.4.2 Tutuklamanın çeşitleri / yöntemleri	12
2.4.2.1 Adsorpsiyon	14
2.4.2.2 Çapraz bağlanma	15
2.4.2.3 Kovalent bağlanma	16
2.4.2.4 Kapsülleme	17
2.4.2.5 Hapsetme.....	17
2.5 Nanoyapılar ve Nanoyapılara Tutuklama Yöntemleri.....	18
2.5.1 Tutuklamada kullanılan nanoyapıların fonksiyonelleştirilme işlemleri.....	20
2.6 Kaynak Araştırması.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1 Materyal.....	33
3.2 Yöntem	33

3.2.1 Mikroorganizma ve kültür koşulları.....	33
3.2.2 Mikroorganizma kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması	35
3.2.3 Fermentasyon ile laktik asit üretimi.....	36
3.3 Analiz Sistemi	37
3.3.1 Laktik asit kalibrasyon doğrusunun oluşturulması.....	38
3.4 Tutuklama Yöntemleri	39
3.4.1 Fe ₃ O ₄ sentezi, tutuklama ve fonksiyonelleştirme.....	39
3.4.2 Na-aljinat' a tutuklama	42
3.4.2.1 Na-aljinat' a tutuklanmış <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) ile fermentasyon	43
3.5 Laktik Asit Üretimi İçin Ortam Koşulları Tasarımı	44
3.5.1 Cevap yüzey yöntemi (RSM) ile ortam koşullarının optimizasyonu.....	45
3.6 Tepkime Kinetik Modeli.....	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1 Fe ₃ O ₄ Nanoyapılarının Sentezi ve Fonksiyonelleştirilmesi.....	48
4.2 Mikroorganizma Çoğalması ve Fe ₃ O ₄ Nanoyapılarına Tutuklama	51
4.3 Fe ₃ O ₄ içeren Ca-Aljinat' a Tutuklanmış Mikroorganizmalar İle Laktik Asit Üretimi	55
4.3.1 Başlangıç pH' ı etkisi	57
4.3.2 Sıcaklık etkisi.....	60
4.3.3 Karıştırma hızı etkisi	61
4.4 Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) İle Ortam Koşullarının Optimizasyonu	62
4.5 Tekrar Kullanılabilirlik.....	72
4.6 Kinetik Model.....	67
5. SONUÇ.....	74
5.1 Değerlendirme	74
5.2 Öneriler	76
KAYNAKLAR	77
EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.....	81
EK 2 Mikroorganizma Çoğalma Ortamından Alınan Örneklerin Seyreltme Oranları, Absorbans, Yaş ve Kuru Hücre Derişimi Değerleri	82
ÖZGEÇMİŞ.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	Önem seviyesi
$C_2H_3NAO_2$	Sodyum asetat
$C_6H_{11}NO_7$	Amonyum sitrat
$C_6H_{12}O_6$	Glukoz
$C_{10}H_{11}FN_2O_2$	Maya özütü
$C_{13}H_{24}O_4$	Pepton
$C_{14}H_{24}O_9$	Agar
$C_{64}H_{124}O_{26}$	Tween 80
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
$CaCO_3$	Kalsiyum karbonat
$CH_3CH(OH)COOH$	Laktik asit
C_{LA0}	Başlangıç laktik asit derişimi
C_{LA}	Laktik asit derişimi
C_X	Mikroorganizma derişimi
C_S	Substrat derişimi
CO_2	Karbondioksit
C_p	Özgöl ısı
Fe_3O_4	Demir oksit
$FeSO_4$	Demir sülfat
g	Gram
H_2SO_4	Sülfürik asit
J	Joule
K_2HPO_4	Di-potasyum fosfat
K	Kelvin
K_a	Ayrışma sabiti
kJ	kiloJoule
L	Litre
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum sülfat heptahidrat
$MnSO_4 \cdot 6H_2O$	Mangan (II) sülfat hegzahidrat
mL	Mililitre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
$NaCl$	Sodyum klorür
$NaOH$	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
η	Etkinlik katsayısı
Pa	Pascal
R^2	Regresyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
r_{s0}	Başlangıç tepkime hızı
r_u	Ürün tepkime hızı
t	Zaman, h
T	Sıcaklık, °C
°C	Santigrat

Kısaltmalar

APTES	(3-aminopropil) trietoksisilan
CCD	Central composite design (merkezi kompozit deney tasarımı)
CNT	Karbon nanotüp
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EBRT	Boş yatak kalma süresi
EDC	1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid
FDA	Gıda ve İlaç Yönetimi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GIT	Gastrointestinal geçiş
GO	Grafen oksit
GRAS	Güvenli olarak kabul edilir
HPLC	High performance liquid chromatography
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LAB	Laktik asit bakterisi
MRS	Man, Rogosa ve Sharpe
MWNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
NHS	N-hidroksisüksinimid
PLA	Poli laktik asit
PVDF	Poliviniliden florid
RSM	Response surface methodology (cevap yüzey yöntemi)
TBAP	Üç fazlı hava ikmal reaktörü
THF	Tetrahidrofur
UV/VIS	Ultraviole/Visible
ZnO	Çinko oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Laktik asit enantiyomerleri, L(+) laktik asit ve D(-) laktik asit.....	3
Şekil 2.2 Laktik asit üretimi için homofermentatif yol.....	7
Şekil 2.3 Laktik asit üretimi için heterofermentatif yol.....	8
Şekil 2.4 Farklı tutuklama yöntemlerinin şematik gösterimleri	14
Şekil 2.5 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.6 Dopamin ile fonksiyonelleştirilmiş Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.7 Sülfö-NHS varlığında veya yokluğunda EDC kullanılarak karboksilatlı CNT' ler üzerindeki proteinin kovalent tutuklanması	23
Şekil 2.8 GO/ZnO destek malzemesinin ve <i>Candida rugosa</i> lipaz' ın GO/ZnO yapısına tutuklanmasının şematik gösterimi	24
Şekil 2.9 Serbest ve tutuklanmış hücrenin bağıl aktivitelerine pH ve sıcaklığın etkileri.....	25
Şekil 2.10 (a) pH = 7.0'da çözeltide tutuklanmış ve serbest enzimin optimum sıcaklığının araştırılması.(b) Birkaç döngü için yeniden kullanımdan sonra tutuklanmış enzimin bağıl enzim aktivitesi.....	26
Şekil 2.11 Serbest ve tutuklanmış enzimin bağıl aktivitelerine pH ve sıcaklığın etkileri.....	26
Şekil 2.12 Serbest ve tutuklanmış enzimler için Michaelis-Menten grafikleri.....	28
Şekil 2.13 Ca-aljinata tutuklanmış <i>L. Delbrueckii</i> ile laktik asit üretiminde başlangıç pH değeri ve sıcaklığın etkisi.....	29
Şekil 2.14 Dondurarak kurutmadan sonra ananasın taranan elektron mikroskobu (SEM) mikrografları; (A) GIT geçişinden önce ananas yüzeyi; (B) GIT geçişinden sonra ananas yüzeyi; (C) <i>L. casei</i> CSL3, GIT geçişinden önce ananas yüzeyinde tutuklanmış; (D) <i>L. casei</i> CSL3, GIT geçişinden sonra ananas yüzeyinde tutuklanmış.....	31
Şekil 3.1 Yaş hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiğı.....	36
Şekil 3.2 Kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiğı.....	36
Şekil 3.3 Standart laktik asit çözeltisi için HPLC kromatogramı.....	38
Şekil 3.4 Laktik asit kalibrasyon doğrusu.....	39
Şekil 3.5 Deney yöntemi basamaklarının şematik gösterimi.....	44
Şekil 4.1 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının şematik gösterimi.....	49
Şekil 4.2 Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -APTES nanoparçacıklarına ait olan FTIR analizi sonuçları...50	50
Şekil 4.3 Dopamin ile fonksiyonelleştirilmiş Fe ₃ O ₄ nanoparçacıklarının formüsel gösterimi.....	50
Şekil 4.4 Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -Dopamin nanoparçacıklarına ait olan FTIR analizi sonuçları.....	51
Şekil 4.5 Fe ₃ O ₄ ve Fe ₃ O ₄ -Dopamin nanoparçacıklarına ait olan FTIR analizi sonuçları.....	51
Şekil 4.6 <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) için hücre çoğalma eğrisi (MRS ortamı, T; 30 °C, pH; 6.5, çalkalama hızı; 150 rpm)	52
Şekil 4.7 Serbest <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) hücreleri ile yapılan deneyler sonucunda zamana karşı laktik asit derişimi değışimi (MRS ortamı, T; 30 °C, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç yaş hücre miktarı: 0.3 g).....	53

Şekil 4.8 Tutuklanmış <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) hücreleri ile yapılan deneyler sonucunda zamana karşı laktik asit derişimi değişimi (MRS ortamı, T; 30 °C, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı).....	57
Şekil 4.9 Tutuklanmış <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) hücreleri ile farklı pH koşullarında yapılan deneyler sonucunda laktik asit derişimi değerleri (MRS ortamı, T; 30 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı)	59
Şekil 4.10 Tutuklanmış <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) hücreleri ile Fe ₃ O ₄ ' lü ve Fe ₃ O ₄ ' süz yapılan deneyler sonucunda laktik asit derişimi değerleri (MRS ortamı, T; 30 °C, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı)	60
Şekil 4.11 Tutuklanmış <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) hücreleri ile farklı sıcaklık koşullarında yapılan deneyler sonucunda laktik asit derişimi değerleri (MRS ortamı, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı).....	61
Şekil 4.12 Cevap yüzey yöntemi grafiğine göre sabit sürede substrat ve mikroorganizma derişimlerinin laktik asit derişimi üzerine etkileri (t=72 h).....	65
Şekil 4.13 Cevap yüzey yöntemi grafiğine göre sabit mikroorganizma derişiminde substrat derişimi ve sürenin laktik asit derişimi üzerine etkileri (C _x =3,0 g/L).....	66
Şekil 4.14 Cevap yüzey yöntemi grafiğine göre sabit substrat derişiminde mikroorganizma derişimi ve sürenin laktik asit derişimi üzerine etkileri (C _s =20 g/L).....	67
Şekil 4.15 Her bir substrat derişiminde başlangıç tepkime hızları.....	68
Şekil 4.16 Her bir substrat derişiminde laktik asit üretimi verimi.....	68
Şekil 4.17 Substrat derişimiyle başlangıç tepkime hızlarının değişimi.....	69
Şekil 4.18 Sigmaplot 10.0 programı üzerinde hesaplanan r _s değerleri.....	70
Şekil 4.19 Tekrar deneyleri sonucu üretilen laktik asit derişimleri.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Laktik asidin fiziksel özellikleri.....	4
Çizelge 3.1 <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) için Man, Rogosa ve Sharpe (MRS).....	34
Çizelge 3.2 HPLC analiz koşulları.....	38
Çizelge 3.3 RSM ile deney tasarımı seviye ve aralık değerleri.....	45
Çizelge 3.4 Oluşan deney seti verileri.....	46
Çizelge 4.1 UV analiz sonuçlarına göre tutuklanmış nanoyapılar ile fermentasyon işlemi sonrası alınan sıvıdaki mikroorganizma derişim miktarları.....	54
Çizelge 4.2 <i>Lactobacillus casei</i> (DSM20011) mikroorganizması ile laktik asit üretiminde 3 faktör için RSM deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değişkeni değerleri.....	62
Çizelge 4.3 Laktik asit derişimi için RSM deney tasarımı ile elde edilen ANOVA analizi sonuçları.....	63
Çizelge 4.4 Laktik asit derişimi için RSM deney tasarımı sonunda elde edilen standart sapma, R^2 ve hassasiyet değerleri.....	64
Çizelge 4.5 Maksimum laktik asit derişimi için cevap yüzey yöntemiyle elde edilen optimum değerler.....	64

1. GİRİŞ

Endüstriyel uygulamalarda enzim/mikroorganizmaların kullanımı sınırlıdır (Mutha vd. 2012). Çözünen ya da serbest haldeki hücreler, genellikle reaksiyonun sonunda geri kazanılamaz. Hücre teknolojisinin yeni ve değerli bir alanı, hücrelerin aktivitesi için destekler veya taşıyıcılar olarak işlev gören membranlar ve parçacıklar gibi çözünmeyen polimerlere tutuklanması ile ilgilidir. Hücreler sürekli bir katalitik süreç boyunca fiziksel olarak sınırlandırılır, reaksiyon karışımından geri kazanılabilir ve tekrar tekrar kullanılabilir, böylece sürecin ekonomisi iyileştirilebilir (Smith 2009).

Tüm hücreler, biyokataliz, çevresel izleme, farmakoloji, gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlarda fonksiyonel algılama için kullanılır. Serbest hücre çözeltide kararsızdır ve geri dönüştürülmesi güç olup, sonraki ürünlerin ayrılması ve saflaştırılmasını etkiler (Zhuang vd. 2017). Tutuklanmış hücreler çözünür karşılıklarına göre daha kararlıdır (Smith 2009). Tüm hücrenin tutuklanması, bu dezavantajların üstesinden gelmek için etkili yollardan biridir ve tekrar kullanımını kolaylaştırabilir, ürünün saflaştırılmasını basitleştirebilir (Zhuang vd. 2017).

Hücre tutuklaması tekniklerinde; katı desteklere fiziksel adsorpsiyon, hidrojel içinde tutulma, hücrelerin çapraz bağlanması ve taşıyıcılara kovalent bağlanma yer almaktadır (Zhuang vd. 2017).

Biyokatalizörlerin pratik kullanımı ve tutuklama için çeşitli destek malzemeleri ve teknolojileri geliştirilmiştir. Nano ölçekli destek ve biyokatalizin basit kombinasyonunun ötesinde, sinerjik bir etki enzim stabilizasyonu, susuz bir organik çözücüde biyo dönüşüm, hassas tespit için biyosensörlerin geliştirilmesi, yüksek güç yoğunluğu için biyoyakıt hücreleri ve bir elektroenzimatik biyo-dönüşüm sisteminin geliştirilmesi gibi yenilikçi sonuçların elde edilmesine yardımcı olmuştur (Min and Yoo, 2014).

Son yıllarda tutuklama etkinliğinin iyileştirilmesine olanak sağlamak amacıyla nanoyapı malzemeleri kullanımı tercih edilmiştir. Kullanılan nanoyapı malzemeleri olarak, çeşitli nanomateryaller, manyetik nanopartiküller, karbon nanotüpler, silika bazlı

nanomateryaller, selüloz bazlı membran, polimerler ve reçinelerden bahsedilebilir (Ameri vd. 2020). Fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller, tutuklama için geniş yüzey alanları sağlama gibi birçok avantaj sunar (Akhond vd. 2016).

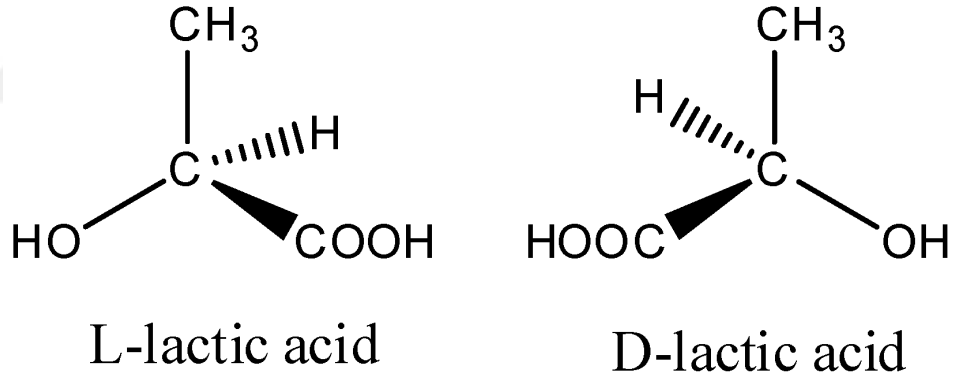
Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizmasının tutuklanarak, glukoz ile laktik asit üretimi amaçlanmıştır. Tutuklama için Fe₃O₄ nanaoparçacıklarından faydalanılmıştır. Öncelikle fonksiyonelleştirilen Fe₃O₄ nanaoparçacıkları, daha sonra ise aljinat ile birleştirilmiş Fe₃O₄ nanaoparçacıkları kullanılarak, hücre tutuklamasının ve akabinde laktik asit üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalar yapılmıştır. Fermentasyon ortamı sıcaklığı, karıştırma hızı, başlangıç pH' ı, tutuklama için kullanılan Na-aljinat miktarları için farklı koşullar denenerek optimum çalışma değerlerine ulaşılmıştır. Fermentasyon ortamında kullanılan mikroorganizma derişimi, substrat derişimi ve fermentasyon süresi için ise optimum koşulların belirlenmesi için Cevap Yüzey Yöntemine (RSM) başvurulmuştur. Ayrıca, çalışmaların son aşamasında tepkimenin kinetik modeli belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Laktik Asitin Yapısı ve Özellikleri

Laktik asit (2-hidroksipropanoik asit), biyoteknoloji endüstrisindeki en önemli organik asitlerden biridir. $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ kimyasal formülünü sunan, üç karbon atomlu organik bir omurgaya sahip optik olarak aktif bir moleküldür. Karboksil grubuna bitişik hidroksil grubu mevcut olduğundan α -hidroksi asit olarak sınıflandırılır. Asimetrik karbonu nedeniyle iki optik izomer, l (+)- laktik asit veya S-laktik asit ve d (-)- laktik asit veya R-laktik asit formunda bulunur (Vandenbergh vd. 2018). Şekil 2.1’ de laktik asit formları verilmiştir.

Laktik asit ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) yaşamın pek çok alanında bulunur. İnsanlar ve hayvanlar için en önemli fonksiyonu, kas dokularına enerji sağlamasıdır.



Şekil 2.1 Laktik asit enantiyomerleri, L(+) laktik asit ve D(-) laktik asit (Cinelli vd. 2019)

D(-) laktik asitin yüksek dozda kullanımını insan vücudu için zararlı olduğundan, gıda ve ilaç endüstrilerinde L(+) laktik asitin kullanımını tercih edilmektedir. Bu nedenle D(-) laktik asit üretimi ile ilgili yapılan çalışma sayısı azdır. Ancak D(-) laktik asitin günümüzde biyobozunur bir polimer olan polilaktik asitin özelliklerini iyileştirici yönde etkisi olduğundan üretimi de önem kazanmıştır (Eldeleklioğlu, B. 2009).

Çizelge 2.1’ de laktik asite ait bazı fiziksel özellikler verilmiştir.

Çizelge 2.1 Laktik asidin fiziksel özellikleri (OMAY, D. 2010)

Molekül ağırlığı	90.08 g.mol ⁻¹
Erime noktası	289.8 K
Kaynama noktası	66.7 Pa' da 355 K, 1733.2 Pa' da 395 K
Ayrışma sabiti, 298 K' de K _a	1.37x10 ⁻⁴
Yanma ısısı	1361 kJ mol ⁻¹
Özgül ısı, 293 K' de C _p	190 J.mol ⁻¹ K

2.2 Laktik Asit Kullanım Alanları

Laktik asit ilk kez 1780 yılında İsveçli kimyager Scheele tarafından ekşi sütte bulunmuştur. Diğer bazı bilim adamları Scheele' nin asidin saf olmadığını ve asetik asidin başka bir yapı ile birleşmiş ve modifiye olmuş hali olduğunu iddia etmişlerdir. Berzelius, Scheele' nin deneylerini tekrarlamış ve laktik asidin saf bir asit olduğunu 1808 yılında doğrulamıştır. Braconnat ise, laktik asidin varlığını 1813 yılında tekrar ispatlamış ancak Scheele' ninkinden farklı olduğunu iddia etmiştir. Laktik asidin varlığı en son 1833 yılında Gay-Lussac tarafından ispat edilmiştir. Laktik asit fermentasyonu ise ilk olarak 1839 yılında, Fremy tarafından, şeker pancarı, süt şekeri, nişasta ve dekstrin gibi maddeleri kullanarak gerçekleştirilmiştir. Laktik asidin ilk ticari üretimi ise 1881 yılında Charles Avery tarafından yapılmıştır. İlk başarılı endüstriyel kullanım alanı deri ve tekstil sektörlerinde 1894 yılında başlamış ve üretim yıllık hacmi 5 ton civarında olmuştur (OMAY, D. 2010).

Laktik asit, gıdalarda kullanılan en eski asitlerden biridir. Laktik asidin ilk ticari kullanımları, lezzet vermek, pH düzenlemesi, mikrobiyal kalitenin iyileştirilmesi ve mineral takviyesi için gıda ürünleri ve içeceklerdir. Şekerleme, unlu mamüller, bira, şarap, içecekler, süt ürünleri ve et ürünleri, laktik asidin kullanıldığı ürün çeşitlerine örnek olarak verilebilir. Peynir üretiminde pH' ı ayarlamak ve lezzet verici bir madde olarak ilave edilir (Dziezak, J.D. 2003).

Laktik asit, hem doğal olarak hem de lahana turşusu, yoğurt ve diğer fermente gıdalarda olduğu gibi in situ fermentasyon ürünü olarak bulunur. Laktik asit aynı zamanda birçok canlı organizmada da temel metabolik bir ara maddedir. Sodyum ve potasyum laktatlar, ticari olarak doğal veya sentetik laktik asidin nötrleştirilmesiyle üretilir. Bir gıda katkı maddesi olarak kullanılacak laktik asit, karbonhidratların fermentasyonu veya asetaldehit ve hidrojen siyanitten laktonitril oluşumu ve ardından hidrolizi içeren kimyasal bir prosedürle elde edilebilir (Ramis-Ramos, G. 2003).

Ayrıca, bu organik asit kozmetik endüstrisinde, pH düzenleyici, antimikrobiyal madde, nemlendirici olarak kullanılmaktadır. Farmasötik endüstrisinde, sodyum laktat sıklıkla parenteral ve intravenöz çözeltilerde elektrolit olarak kullanılırken, kalsiyum laktat kalsiyum eksikliği tedavisi için ve bir antikanser madde olarak kullanılır. Kimya endüstrisinde ise laktik asit, akrilik asit, piruvik asit, biyosolventler ve esterler gibi birçok önemli ürünün öncüsüdür.

Laktik asidin en belirgin uygulamalarından biri, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu bir alifatik polyester olan polilaktik asidin (PLA) yapı taşıdır. PLA genellikle solventsiz bir eriyik işleminde laktik asit yoğunlaşmasının bir ürünü olan laktidin halka açma polimerizasyonu yoluyla sentezlenir. Bu polimer, özellikle laktik asidin 1 (+) izomerinden üretildiğinde, implantlar, sütürler, kemik fiksasyonu, doku mühendisliğinde iskele ve kontrollü ilaç salınımı gibi birçok biyomedikal uygulamada, ayrıca ambalajlama, yapısal diğer uygulamalarda da kullanılabilir. Küresel laktik asit talebinin 2020 yılına kadar 1.96×10^6 ton, PLA talebinin ise 1.21×10^6 ton olarak tahmin edildiği belirtilmektedir (Vandenbergh vd. 2018).

2.3 Laktik Asit Üretimi

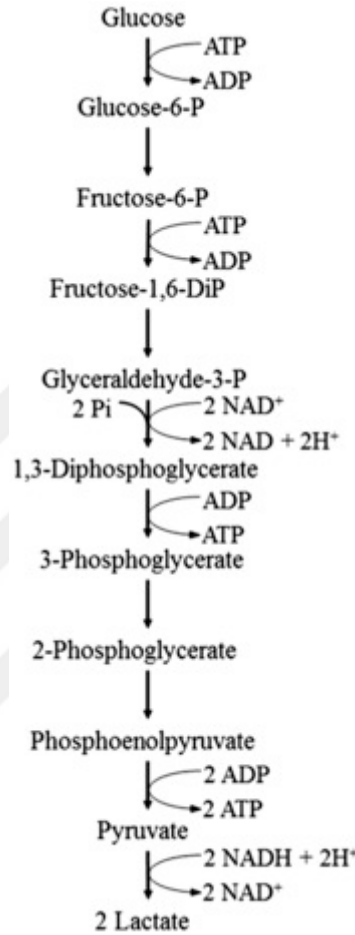
Laktik asit, kimyasal veya biyolojik sentez yoluyla üretilebilir. Kimyasal sentez genellikle laktonitrilin güçlü asitlerin kullanımı ile hidrolizi şeklinde gerçekleştirilir. Bu işlem ile rasemik karışım (d ve l-laktik asit) elde edilir. Biyolojik (enzimatik) sentez ile optik olarak daha saf laktik asit üretilebilir. Bu stereoselektivite, laktik asidin biyolojik sentezinin avantajlı olarak kabul edilmesinin ana nedenlerinden biridir, çünkü optik saflık laktik asidin hemen hemen tüm uygulamaları için önemlidir. Örneğin, d (-) - laktik asit insanlar ve hayvanlar tarafından metabolize edilmez. PLA' nın kristallik ve gerilme direnci de doğrudan optik saflıkla ilişkilidir (Vandenberghe vd. 2018).

Laktik asit elde etmenin mikrobiyolojik ve kimyasal yöntemlerinin üretim maliyetleri benzerdir ve çok rekabetçidir. Yaygın kullanımdaki bir biyosentez yöntemi, glikoz ile başlar ve stereospesifik laktat dehidrojenaz kullanılarak hem l (+) hem de d (-) izomerlerine dönüştürülebilen piruvat üretir; ancak, sadece l (+) formu ticari olarak üretilir. Rasemik karışım her zaman kimyasal sentez ile elde edilir. Sentetik laktik asit, normalde fermentasyon yoluyla elde edilen üründe bulunan kirletici maddelerden arındırılmıştır ve bu nedenle tamamen renksiz ve muhtemelen daha stabildir. Laktik asit ve tuzları oldukça higroskopiktir ve bu nedenle genellikle katı formda değil, konsantre çözeltilerde (ağırlıkça % 60-80) kullanılır. Bu çözeltiler renksiz ve kokusuzdur ve hafif tuzlu bir tada sahiptir (Ramis-Ramos, G. 2003).

Laktik asit bakterileri (LAB) ve laktik asit üreten mantarlar gibi mikroorganizmalar, metabolik yollarından optik olarak saf laktik asit üretmek amacıyla yaygın olarak araştırılmış ve çalışılmıştır. LAB, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Yönetimi' nden (FDA) Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilir (GRAS) statüsünü almış ve laktik asit üretimi için en önemli mikroorganizmalardır (Vandenberghe vd. 2018).

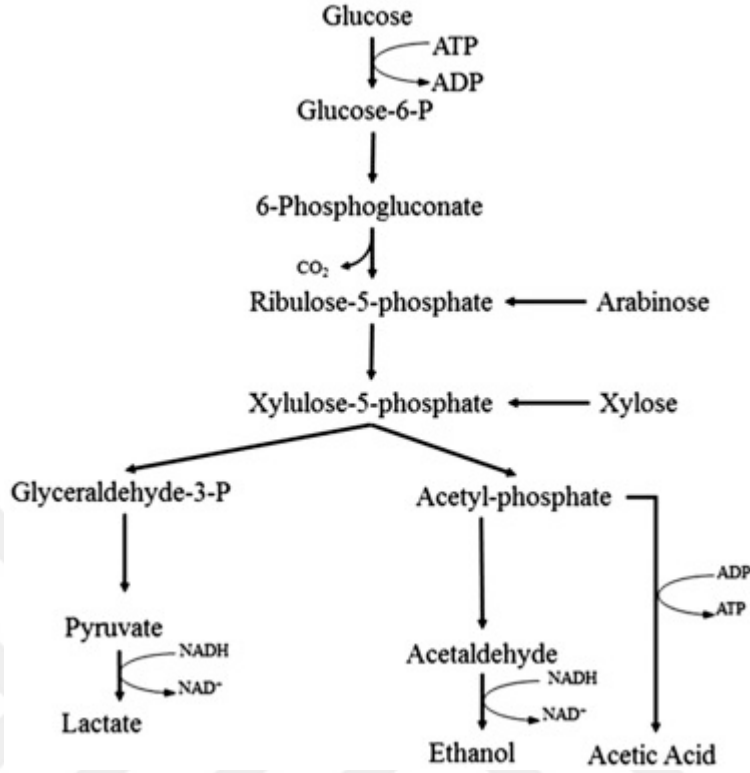
LAB, metabolik yollarına göre üç fizyolojik gruba ayrılabilir.

1. Zorunlu homofermentat LAB, glikoliz yoluyla heksozları oksitleyerek ana son ürün olarak laktik asit üretir; fruktoz 1,6 difosfat aldolaz enzimine sahiptirler (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Laktik asit üretimi için homofermentatif yol

2. Zorunlu heterofermentat LAB, pentoz-fosfat yolu yoluyla heksozları ve pentozları okside eder ve sadece laktik asit değil aynı zamanda CO₂, asetik asit ve / veya etanol üretir; fosfoketolaz enzimine sahiptirler (Şekil 2.3).
3. Son olarak, fakültatif heterolaktik LAB, heksozları metabolize etmek için glikolitik yolu (fruktoz 1,6 difosfat aldolaz içerir) kullanır ve pentozları metabolize edebilmeleri için indüklenebilir bir fosfoketolaz sentezler (Vandenberghe vd. 2018).



Şekil 2.3 Laktik asit üretimini için heterofermentatif yol

2.3.1 Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakteri türleri

Zorunlu homofermentatif LAB' ın türleri arasında; *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus amylophilus* ve *Enterococcus faecalis* bulunur.

Zorunlu heterofermentatif LAB' ın türleri arasında; *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus latocus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus lacacus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus amylophilus* ve *Enterococcus faecalis* bulunur.

Fakültatif heterolaktik LAB' ın türleri arasında *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus sake* vardır.

Genellikle, glikoz ve sukroz, laktik asidin mikrobiyal üretimi için en uygun karbon kaynaklarıdır. Ayrıca amino asitler, vitaminler ve mineraller formundaki azot da, iyi üretim verimleri sağlamak için önemli parametrelerdir. Çoğu zaman, pahalı azot kaynakları olan maya özütü veya peptonun ortama ilavesi gereklidir. Dolayısıyla, azot bakımından zengin organik atıkların kullanılması, üretim maliyetlerini en aza indirmenin bir alternatifi olabilir. Alternatif karbon kaynaklarının kullanımı, laktik asit üretimi için geniş çapta çalışılmıştır. Bunlar, tarım ve gıda endüstrilerinden yan ürünler, nişastalı ve lignoselülozik biyokütle, peynir altı suyu, gliserol, alg biyokütlesi içerir (Vandenbergh vd. 2018).

2.4 Tutuklama Tanımı

Endüstriyel uygulamalarda enzim/mikroorganizmaların kullanımı sınırlıdır, çünkü hücrelerin çoğu katalitik işlem tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımlarından aktif enzimlerin yüksek maliyetle izolasyonu, arıtılması ve geri kazanımı bakımından oldukça kararsızdır. Bu sebeplerden ötürü endüstriler, yüksek fraktozlu şuruplar veya ampisilin gibi yarı sentetik antibiyotikler gibi birçok ürünü üretmek için serbest enzimlerin sınırlı bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Bunu yapmak için, enzim, bazı katı desteğin yüzeyinde tutuklanmalıdır. Veya kayıp olmadan sürekli substrat akışını ürüne dönüştürebilmek için değiştirilmelidir. Bu teknikler aynı zamanda tüm hücreleri ve bazen de ölü hücreleri yaşatacak şekilde uyarlanmıştır. Bununla birlikte, işlemin bir mikrop enzimi tarafından gerçekleştirilebilecek bir dizi adım gerektirmesi durumunda bütün hücreler avantajlıdır. Aynı zamanda, yüksek reaksiyon hızlarında çalışan büyük hücre popülasyonları ile sürekli çalışan süreçlere izin verme avantajına sahiptirler. Hareketsizleştirilmiş hücreler, genellikle mikroskobik olarak küçük küreler veya elyafa tutturulmuş halde, yüksek fraktozlu şuruplar, aspartik asit ve biyoteknolojinin diğer birçok ürünü yapmak için kullanılırlar (Mutha vd. 2012).

Ticari enzimlerin neredeyse % 95' i, çeşitli alanlarda, çoğunlukla tek kullanımlık bazda doğrudan tüketilen çözünebilir bir biçimde satın alınmaktadır. Çözünen ya da serbest haldeki enzimler, genellikle reaksiyonun sonunda geri kazanılamaz. Enzim teknolojisinin yeni ve değerli bir alanı, enzimlerin enzim aktivitesi için destekler veya taşıyıcılar olarak

işlev gören membranlar ve parçacıklar gibi çözünmeyen polimerlere tutuklanması ile ilgilidir. Enzimler sürekli bir katalitik süreç boyunca fiziksel olarak sınırlandırılır ve reaksiyon karışımından geri kazanılabilir ve tekrar tekrar kullanılabilir, böylece sürecin ekonomisi iyileştirilebilir. Hücre içermeyen formda ısıyla hızla inaktive olan bazı enzimler inert polimerik desteklere tutunarak stabilize edilebilirken diğer örneklerde böyle çözülmemiş enzimler sulu olmayan ortamlarda kullanılabilir. Bütün mikrop hücreleri aynı zamanda poliakrilamid boncuklar içinde tutuklanabilir ve çok çeşitli katalitik işlevler için kullanılır (Smith 2009).

Yeni enzimlerin çeşitliliği ve muhtemelen ucuza ulaşabilecek tüm organizma sistemleri, özellikle ilaç ve tanı alanlarında, geleceğe yönelik heyecan verici olanaklar sunmaktadır. Tutuklanmış katalizörlerin mevcut uygulamaları ağırlıklı olarak endüstriyel proseslerle sınırlıdır, örneğin L-amino asitler, organik asitler ve fruktoz şurubu üretimi. Tutuklanmış biyokatalizörlerin gelecekteki potansiyeli, serbest biyokatalizörleri kullanan mevcut süreçlere alternatif olmaktan ziyade yeni uygulamalar ve yeni ürün geliştirmeye dayanır. Tutuklanmış hücreler çözünür karşılıklarına göre daha kararlıdır ve saflaştırılmış, yarı saflaştırılmış veya bütün hücre formunda yeniden kullanılabilirler. Tutuklanmış hücrelerin katalitik özellikleri, daha geniş veya daha titiz reaksiyon koşulları altında işlem yapılmasına izin vermek için çoğunlukla olumlu şekilde değişebilir; örneğin tutuklanmış glikoz izomeraz 60 ve 65 °C arasındaki sıcaklıklarda 1000 saat boyunca sürekli olarak kullanılabilir (Smith 2009).

2.4.1 Tutuklamanın önemli özellikleri

Hücre tutuklaması, çözünür protein katalizörlerini veya yükün sürekli olarak geçmesine izin verilen bir reaktör sistemindeki hücrelerin bireysel yüzdürme işlemini sınırlar. Hücre tutuklaması, fermentasyon teknolojisinde biyosensör, biyoelektronik sensör ve enzim terapötiklerinin geliştirilmesinde kullanılır.

Hücre tutuklaması, yüzey fazında sabitlemede kullanılır; bununla birlikte, ince partiküllü, membranöz veya monolitik küreler biçiminde olabilir. Tutuklama, enzim fazlarında (polimerik matris) enzimlerin adsorpsiyon veya fiziksel tutulması kullanılarak kovalent

bağlama yoluyla elde edilir. Tutuklanmış enzimin doğası karakteristik olarak matris ve enzim fazının karakterine bağlıdır (Mutha vd. 2012).

Tutuklanmamış enzimlerin dezavantajları;

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin kullanımı sınırlıdır. Enzimler nispeten dengesizdir ve ısı ile hızla inaktive edilirler. Katalitik işlem tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımlarından aktif enzimlerin izolasyonu, saflaştırılması ve geri kazanılması için yüksek maliyet ödemesi gereklidir. Kesikli işlemlerde çözünür enzimler için ekonomik değildir, çünkü her reaksiyondan sonra aktif enzim kaybolur.

Tutuklanmış enzimlerin avantajları;

Dezavantajlar, tutuklanmış hücreler kullanılarak aşılabılır. Tutuklanmış hücreler sürekli bir katalitik süreç boyunca fiziksel olarak hapsedilir. Tutuklanmış hücreler reaksiyon karışımından geri kazanılabilir ve tekrar tekrar kullanılır ve böylece sürecin ekonomisi iyileştirilebilir. Sürekli olarak çalıştırılabilirler ve kolayca kontrol edilebilirler. Ürünler kolaylıkla ayrılabilir ve enzim özellikleri (aktivite ve stabilite) olumlu şekilde değiştirilebilir.

Hücrelerin tutuklanmasından sonra, özellikle de fiziksel ve kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri en iyi şekilde anladığımız zaman, en iyi şekilde kullanılabilir. Bu tür enzimlerde, destekleyici matris tarafından kendilerine yüklenen mikroçevre ve kendi etkilerinin ürünleri nedeniyle, kararlılık ve kinetik özelliklerinde değişiklikler meydana gelir (Mutha vd. 2012).

2.4.1.1 Kararlılık

İnorganik taşıyıcılara bağlanan enzimler çözünemezken, genellikle 4 ya da 23 °C' de depolandığında organik polimerlere tutunanlardan daha kararlıydı. Enzimlerin kararlılığı, taşıyıcının enzimatik proteini denatüre ya da stabilize edebilen bir mikroçevre

sağlamasına bağı olarak, çözünmezlik üzerinde ya artar ya da azalır. Enzim moleküllerini bir matriste tutuklayarak karşılıklı saldırıdan izole etmek, proteolitik (protein parçalayan) enzimlerin otomatik parçalanmasıyla inaktivasyonu azaltır. Denatüre edici ajanlara kararlılık bazen çözünmezlik üzerine değışir (Smith 2009).

2.4.1.2 Kinetik özellikler

Kinetik özellikler genellikle bir enzimin çözünmezliğı üzerine spesifik aktivitesinde azalmaktadır. Bir enzimin çözünmez hale gelmesinden sonra, kendisini, serbest çözeltilde var olanla büyük ölçüde farklı olabilecek bir mikro ortamda bulur. Yeni mikro çevre, destek matrisinin tek başına fiziksel ve kimyasal karakterinin bir sonucu olabilir veya matrisin enzimatik reaksiyonda yer alan substratlar veya ürünlerle etkileşimlerinden kaynaklanabilir (Smith 2009).

Michaelis sabiti, taşıyıcı matriste karşıt yük substrat kullanıldığında, birden fazla sırayla azalmaktadır. Bu düşük iyonik mukavemetlerde ve nötr substratlar kullanıldığında meydana gelir. Substratın yığın solüsyondan tutuklanmış hücrenin mikro çevreye difüzyonu, enzim reaksiyon oranını sınırlayabilir. Substratın çözünmeyen partikül üzerinden geçme oranı difüzyon filminin kalınlığını etkiler ve bu da substratın enzim çevresinde derişimini ve dolayısıyla reaksiyon oranını belirler. Büyük moleküllerin difüzyonu, matristen steirik etkileşimlerle de sınırlıdır. Bu, bağlanmış enzimlerin yüksek moleküler ağırlıklı substratlara göreceli etkinliğini yansıtır. Genellikle düşük molekül ağırlıklı substratlara kıyasla daha düşük bulunur. Bununla birlikte, bazı durumlarda bir avantaj olabilir, çünkü tutuklanmış hücreler büyük inhibitör moleküller tarafından saldırıya karşı korunabilir (Smith 2009).

2.4.2 Tutuklamanın çeşitleri / yöntemleri

Uygulamada hücre tutuklaması için hem fiziksel hem de kimyasal yöntemler rutin olarak kullanılır. Fiziksel olarak, enzimler çözülmeyen bir matriste absorbe edilebilir, bir jel içine sıkışabilir veya bir mikrokapsül içine veya yarı geçirgen bir zarın arkasına

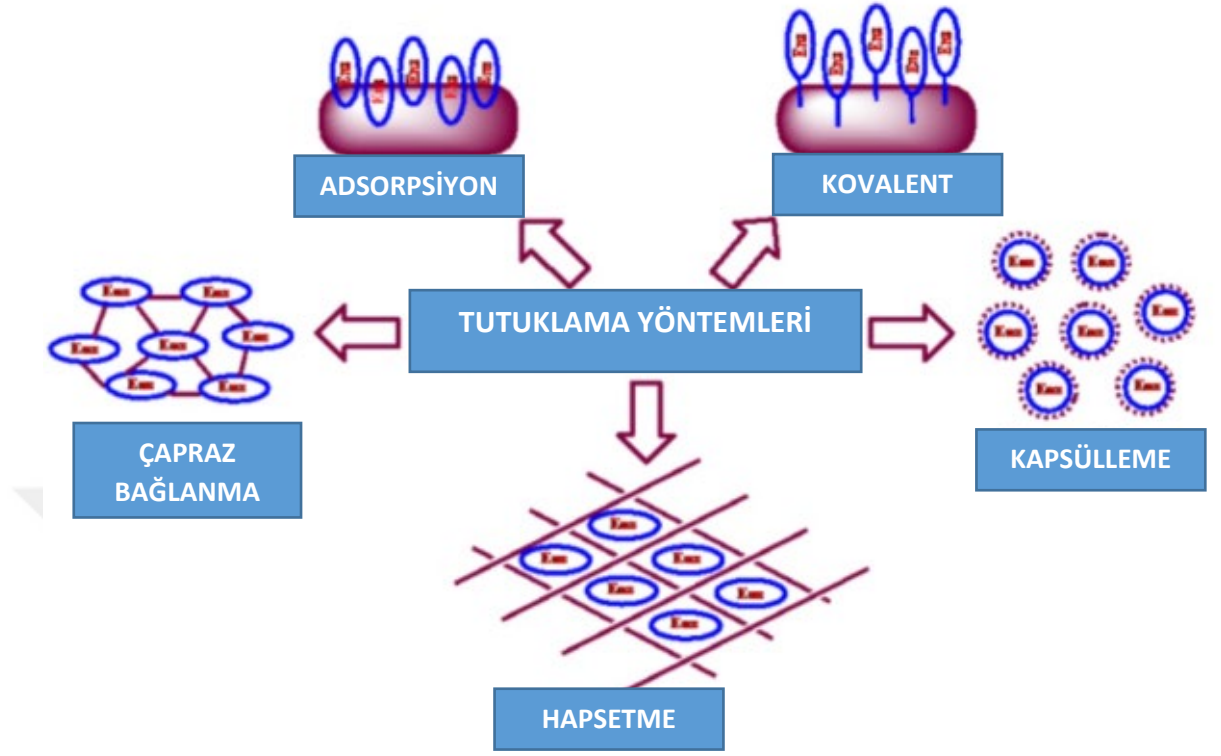
kapsüllenebilir. Kimyasal olarak enzimler katı desteklere kovalent veya çapraz bağlı olabilir (Smith 2009).

Enzimlerin zorunlu olmayan işlevsel grupları vasıtasıyla seramik, cam, demir, zirkonyum ve titanyum gibi inorganik taşıyıcılara, sefaroze ve selüloz gibi doğal polimerlere, naylon, poliakrilamid ve diğer vinil polimerleri ve kopolimerler gibi sentetik polimerlere kovalent bağlanması için çok sayıda kimyasal reaksiyon kullanılmıştır. Bu prosedürlerin birçoğunda enzimlerin taşıyıcılara kovalent olarak bağlanması spesifik değildir, yani enzimin taşıyıcıya kimyasal aktif grupları vasıtasıyla rastgele dağıtılmasıyla bağlanır (Smith 2009).

Daha yeni çalışmalar enzimin katalitik aktivitesini etkilemeden yüksek aktiviteli bir taşıyıcıya bağlandığı hücre tutuklama teknikleri geliştirmeye çalışmıştır. Jel matrislerindeki enzimlerin yakalanması, enzim varlığında polimerizasyon veya çökeltme/pıhtılaşma tepkimelerinin gerçekleştirilmesi ile başarılıdır. Poliakrilamidler, kolajen, silika jel, vb. uygun matrisler olduğu kanıtlanmıştır, ancak sıkıştırma işlemi nispeten zordur ve düşük enzim aktivitesine neden olur (Smith 2009).

Tutuklamanın yöntemleri, dört ana kategoriye ayrılır; inert bir taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyon, polimerize bir jelin kafeslerine eklenme, iki fonksiyonlu bir reaktif ile çapraz bağlama ve reaktif çözünmeyen bir desteğe kovalent bağlanmasıdır (Mutha vd. 2012) (Şekil 2.4).

Bu yöntemler, katalizörün matrise (taşıyıcıya) fiziksel olarak bağlı olmasına bağlıdır. Seçilen matris, tutuklanmış hücre arıtımının operasyonel kararlılığını arttırmalıdır. Bu amaçla kullanılan taşıyıcılar organik (doğal veya sentetik) veya inorganik özelliklere sahip gözenekli veya gözeneksiz malzemeler olabilir. Katalizör, polimere kovalent olarak bağlanabilir, fiziksel olarak polimer üzerine adsorbe edilir, kendisi ve muhtemelen başka bir inert protein ile çapraz bağlanabilir, bir polimer matris içine sıkıştırılabilir veya bir polimerde kapsüllenebilir (Mutha vd. 2012).



Şekil 2.4 Farklı tutuklama yöntemlerinin şematik gösterimleri
 (<http://www.indusgenex.com/immobilized-enzymes.html> Erişim Tarihi: 17.10.2020.)

2.4.2.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, hücreleri tutuklamak için kullanılan tekniklerden en eskidir; 1916' da Nelson ve Griffin, invertazın adsorbe edilmesi için odun kömürü ve alüminyum hidroksit kullanıyordu. O zamandan beri geniş bir yelpazede organik ve inorganik maddeler enzim emilimi için destekler olarak kullanıldı. Odun kömürü, çeşitli selüloz türevleri ve iyon değiştirici reçineler gibi organik maddeler ve silis, alümina, titanyum, cam ve çeşitli doğal olarak bulunan mineraller de dahil olmak üzere inorganik malzemeler kullanılmıştır (Mutha vd. 2012).

Bir enzimin bir katıya fiziksel adsorpsiyonu, tutuklanmış hücreleri hazırlamanın en basit yoludur. Metod, bir enzim çözeltisini katı ile karıştırarak enzim proteini ve matrisin yüzeyi arasındaki spesifik olmayan fiziksel etkileşime bağlıdır. Çeşitli tipteki bileşikler;

kalsiyum fosfat (α -amilaz), odun kömürü (katalaz), selofan - glutaraldehid ile çapraz bağlama, inorganik adsorbanlar - (glukoz oksidaz), odun kömürü ve DEAE-sefadeks (invertaz), agaroz jel, DEAE-sefadeks (amiloglükosidaz) ve selüloz (subtilisin).

Bir enzimin adsorbe edilmesi işlemi enzimin ve polimer desteğinin karıştırılmış bir reaktör içinde temas ettirilmesi ya da bir destek malzemesinden oluşturulmuş paketlenmiş bir yatak, boru ya da zar yoluyla enzimin süzülmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu işlem sırasında, elektrostatik, hidrofobik etkileşimler veya matriste bağlı benzer bağlanma gibi farklı spesifik ve spesifik olmayan kuvvetler uygulanır. Adsorbe edilen enzim miktarı, taşıyıcının birim yüzeyine derişimine bağlıdır ve spesifik aktivitenin azalmasıyla doyunluğa yaklaşan enzimin derişiminin artmasıyla aktivite artar. Prosedür, enzimin, pH, çözücünün doğası, iyonik kuvvet, enzim ve adsorbent derişimi ve sıcaklık gibi uygun koşullar altında karıştırılmasını içerir (Mutha vd. 2012).

Bu nedenle, işlemde hiçbir reaktif güç kullanılmadığından, tutuklanmış hücrelerde konformasyonel değişiklikler yoktur. Alümina, aktif karbon (odun kömürü), killer, kollajen, cam diatomlu toprak, hidroksipatit, selüloz metal oksitler ve çeşitli silisli malzemeler yaygın olarak kullanılan adsorbanlardır. Enzimlerin fiziksel adsorpsiyonu hidrofobik etkileşimlerdir. Adsorpsiyon, hem iyonik hem de hidrofob çekim kuvvetlerine dayanmaktadır. Söz konusu zayıf bağlar nedeniyle, proteinin desorpsiyonu, sıcaklık, pH, iyonik mukavemet veya substratın varlığı değişikliklerine bağlıdır. Adsorpsiyon avantajı; çözünmeyen enzimler için reaktif gerekmez. Etkinleştirme adımlarının yalnızca en az olması gerekir. Adsorpsiyon ucuzdur, kolayca uygulanır. Bağlanma, kimyasal bağlanma araçlarından ziyade enzimatik proteine daha az zarar verici olma eğilimindedir; bağlanma esas olarak hidrojen bağları, çoklu tuz bağlantıları ve Van der Wall' un kuvvetleri tarafından yapılmaktadır (Mutha vd. 2012).

2.4.2.2 Çapraz bağlanma

Proteinlerin moleküller arası çapraz bağlanması, hücre tutuklaması için bir başka yöntemdir. Enzim, destek matrisine kovalent olarak bağlanmasından beri, bu yöntemi kullanarak çok az desorpsiyon oluşabilir. Proteinin ya diğer protein moleküllerine ya da

çözünmeyen bir destek matrisi üzerindeki fonksiyonel gruplara moleküller arası çapraz bağlanmasıyla başarılır. Bir enzimin çapraz bağlanması pahalıdır ve yetersizdir, çünkü protein materyalinin bazıları kaçınılmaz olarak nispeten düşük enzim aktivitesi ile sonuçlanan bir destek olarak davranır. Çapraz bağlama yöntemi, diğer yöntemlerden biriyle birlikte en iyi şekilde kullanılır. Adsorbe edilen enzimleri stabilize etmek için daha yaygın olarak kullanılır (Mutha vd. 2012).

2.4.2.3 Kovalent bağlanma

Enzim çözünürlüğü için kullanılan yaygın yöntemdir. Enzimler, amino asitlerin zincirlerinden yapılır ve uygun aktif destekli kimyasal bağlar oluşturmak için kullanılabilen çok sayıda reaktif yan zincire sahiptir. Teknik, enzim ve destek matrisi arasında kovalent bağların oluşumunu içerir. Belirli bir proteinin çözülmediği tepkime türünün seçimi için, seçim sınırlı kalır, çünkü bağlanma reaksiyonu, enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olmayan koşullar altında gerçekleştirilir. Bu yöntemde enzimin aktif bölgesi kullanılan reaktiflerden etkilenmemelidir (Mutha vd. 2012).

Kovalent bağlanma, pH, iyonik kuvvet veya substrat tarafından tersine çevrilmemiş bir bağlanma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, bir enzimin aktif bölgesi kimyasal reaksiyon ve enzim hareketsiz bırakılarak engellenebilir. Kimyasal bağların oluşumunda yer alan çeşitli enzim grupları amino, imino, amid hidroksil, karboksil, tiyol, metiltiol, guanidil, imidazol ve fenol halkasıdır. Proteinlerin işlevsel grupları, hafif koşullar altında kovalent bağlama için kullanılır. Önemli fonksiyonel gruplar şunlardır; zincirin alfa amino grupları ve lizin ve argininin epsilon amino grupları, zincir ucunun alfa karboksil grubu ve aspartik ve glutamik asitlerin beta ve gama karboksil grupları, tirozin fenol halkası, sistein tiol grubu, serin ve teoninin hidroksil grupları, histidin imidazol grubu ve triptofanın indol grubu. Kullanılan aktive polimerler diazo, karbodimid veya azid grupları ile birleştirilen hidro jellerdir (Mutha vd. 2012).

2.4.2.4 Kapsülleme

Kapsülleme, substrata temas etmek için enzime geniş yüzey alanı sağlar. Bu yöntem faydalıdır, çünkü birçok enzim tek bir aşamada tutuklanabilir. Enzimler mikrokapsüller içerisinde tutuklanabilir. Bunlar organik polimerlerden hazırlanır. Zarlar enzimi kuşatır ve substrat ve ürünler için yarı geçirgen kalır. Bu kolay ve ekonomik bir tekniktir. Çözeltideki biyokatalizörün kararlılığı bu tekniğin önemli bir parçasıdır. Bu yöntem yüksek molekül ağırlıklı yüzeyler için geçerli değildir. Bazen tutuklama prosedürü sırasında enzimin inaktivasyonu oluşur ve enzim membran duvarına dahil edilebilir. Enzim sızıntısı, mikrokapsül vasıtasıyla gerçekleşir. Bu tekniği kullanarak, uygun boyuttaki kapsüller elde edilebilir. Difüzyon sınırlaması da kontrol edilir. Kapsüller, etil selüloz, nitroselüloz, polistiren, polivinil asetat, poliamin glikol, polietilen vs. den üretilir (Mutha vd. 2012).

2.4.2.5 Hapsetme

Teknik, enzimlerin bir polimer matrisinin kafesine bağlanmasına veya onları yarı geçirgen membranlara çevrelemesine dayanır. Bu, substratların ve ürünlerin difüzyonuna izin verirken proteinlerin serbest kalmasını engeller. Bu yöntemde, enzimin kendisi membrana veya jel matrisine bağlanmaz ve birleştirme yöntemi ile karşılaştırıldığında biyolojik aktivitenin biraz inaktivasyonu vardır. Enzim moleküllerinin aktif bölgeleri kimyasal bağlar tarafından engellenmez ve enzim doğal haliyle kalır (Mutha vd. 2012).

Yöntemin gerçekleştirilmesi kolaydır. Enzimler polimer öncüllerinin bir çözeltisinde çözülür. Polimerler poliakrilamid jeller veya doğal jeller (selüloz triasetat, agar, jelatin veya alginat) olabilir. Düşük moleküler ağırlıklı enzimlerin jelden sızmasını önlemek için, jelin ortalama gözenek boyutu mümkün olduğunca yüksek olmalıdır. Gözenek boyutunun aşırı difüzyon sınırlaması değişkenliği kontrol edilmelidir (Mutha vd. 2012).

Avantajları; en yüksek enzim derişimine sahiptir. Enzimler, aktivite kaybına neden olabilecek herhangi bir kimyasal değişiklik veya bağlanma olmaksızın olabilir. Çoklu

enzim sistemleri, tutuklanma enzim sistemlerini muhafaza etmek için yaşayan canlı metot olduğundan kolaylıkla kullanılabilir. Dezavantajları; poliakrilamid jel, canlı hücrelerin hassas enzimleriyle birlikte kullanılır. Polimerizasyon sırasında oluşan serbest radikaller toksiktir. Agar ve carragenin hafif ısı ile depolimerize edilebilir. Canlı hücreler için kalsiyum aljinat tutuklama için uygun jeldir (Mutha vd. 2012).

2.5 Nanoyapılar ve Nanoyapılara Tutuklama Yöntemleri

Tüm hücreler, biyokataliz, çevresel izleme, farmakoloji, gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlarda fonksiyonel algılama için kullanılır. Bu arada, bütün hücre bir mini reaktör olarak gerekli tüm kofaktörleri ve enzimleri içerir. Bu nedenle, ilaç ara ürünlerinin ve değerli kimyasalların hazırlanması için sıklıkla biyokatalizör olarak kullanılırlar. Bununla birlikte, serbest hücre çözeltide kararsızdır ve geri dönüştürülmesi güç olup, sonraki ürünlerin ayrılması ve saflaştırılmasını etkiler. Tüm hücrenin tutuklanması, bu dezavantajların üstesinden gelmek için etkili yollardan biridir ve tekrar kullanımını kolaylaştırabilir, ürünün saflaştırılmasını basitleştirebilir (Zhuang vd. 2017).

Hücre tutuklaması tekniklerinde; katı desteklere fiziksel adsorpsiyon, hidrojel içinde tutulma, hücrelerin çapraz bağlanması ve taşıyıcılara kovalent bağlanma yer alıyor. Bu yöntemler arasında, fiziksel adsorpsiyon, hücre yapılarının daha küçük dalgalanmalarına bağlı olarak biyoaktivite üzerinde nispeten az etkiye sahiptir. Bununla birlikte, zayıf bağlanma, hücrelerin sızıntısına neden olabilir. Çapraz bağlama reaktifi hücre toksisitesine sahip olduğu ve hücre kütlesi aktarımını ve geçirgenliği etkilemek için hücre yüzeyi üzerindeki proteini etkilediğinden, çapraz bağlama ve kovalent bağlama kullanarak güçlü bağlar hücrelerin sızıntısını azaltırken, hücrelerin aktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Üstelik, kovalent yöntem, hücre yüzeyinin bir enzim veya doğal aktif bir grup göstermedikçe veya hücre yüzeyi üzerinde aldehitler gibi reaktif grupların kimyasal olarak üretilmedikçe başarmak zordur. Bu nedenle hücre tutuklaması için umut verici pratik bir yöntem geliştirmek özellikle önemlidir (Zhuang vd. 2017).

Biyokatalizörlerin pratik kullanımı ve tutuklama için çeşitli destek malzemeleri ve teknolojileri geliştirilmiştir. Son zamanlarda, moleküler biyoteknoloji ve nanoteknolojide

büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Nano ölçekli desteklerin en büyük avantajı olan geniş yüzey alanı, çok daha yüksek bir yükleme yoğunluğuna olanak sağlamış ve böylece birim hacim veya kütle başına görünen biyokatalitik aktivite önemli ölçüde artmıştır. Kısa bir süre sonra, araştırma odağı nano ölçekli materyallerin elektriksel iletkenlik ve manyetizma gibi diğer özelliklerine kaymıştır. Sonuç olarak, nano ölçekli destek ve biyokatalizin basit kombinasyonunun ötesinde, sinerjik bir etki enzim stabilizasyonu, susuz bir organik çözücüde biyo dönüşüm, hassas tespit için biyosensörlerin geliştirilmesi, yüksek güç yoğunluğu için biyoyakıt hücreleri ve bir elektrozimatik biyo-dönüşüm sisteminin geliştirilmesi gibi yenilikçi sonuçların elde edilmesine yardımcı olmuştur (Min and Yoo, 2014).

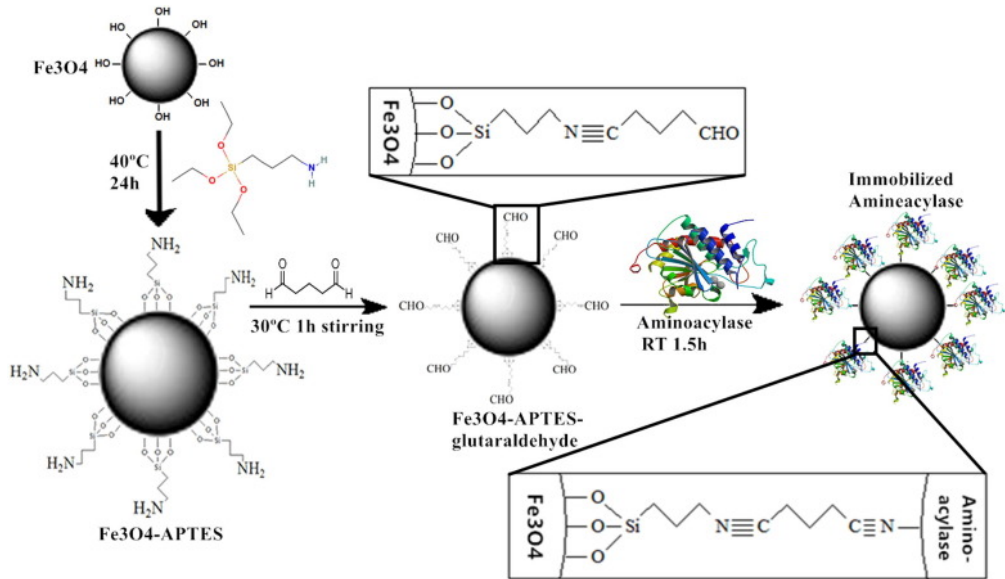
Son yıllarda tutuklama teknolojisindeki çalışmalar oldukça artış göstermiş ve tutuklama etkinliğinin iyileştirilmesine olanak sağlamak amacıyla yüksek yüzey alanlarından dolayı nanoyapı malzemeleri kullanımı tercih edilmiştir. Tutuklama için taşıyıcı veya destek olarak kullanılan nanoyapı malzemeleri olarak, çeşitli nanomateryaller, manyetik nanopartiküller, karbon nanotüpler, silika bazlı nanomateryaller, selüloz bazlı membran, polimerler ve reçinelerden bahsedilebilir (Ameri vd. 2020).

Fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller, tutuklama için geniş yüzey alanları sağlama gibi birçok avantaj sunar. Manyetik alan uygulaması altında süpernatanttan kolayca ayrılabilirler, iyi biyoyumludurlar, geri dönüştürülebilirler ve birkaç kez tekrar kullanılabilirler. Örneğin, silika kaplı manyetik nanopartiküller, aminosilan molekülleri kullanılarak yüzey fonksiyonelleştirmede kullanılabilen fonksiyonel gruplardan oluşur ve bunlar da glutaraldehit (birleştirme ajanı) ile sonradan aktive edilebilir. Aminosilan ile modifiye edilmiş manyetik / silika çekirdek / kabuk nanopartiküllerinin hücre tutuklama protokollerinde başarıyla uygulandığı belirtilmelidir (Akhond vd. 2016).

2.5.1 Tutuklamada kullanılan nanoyapıların fonksiyonelleştirilme işlemleri

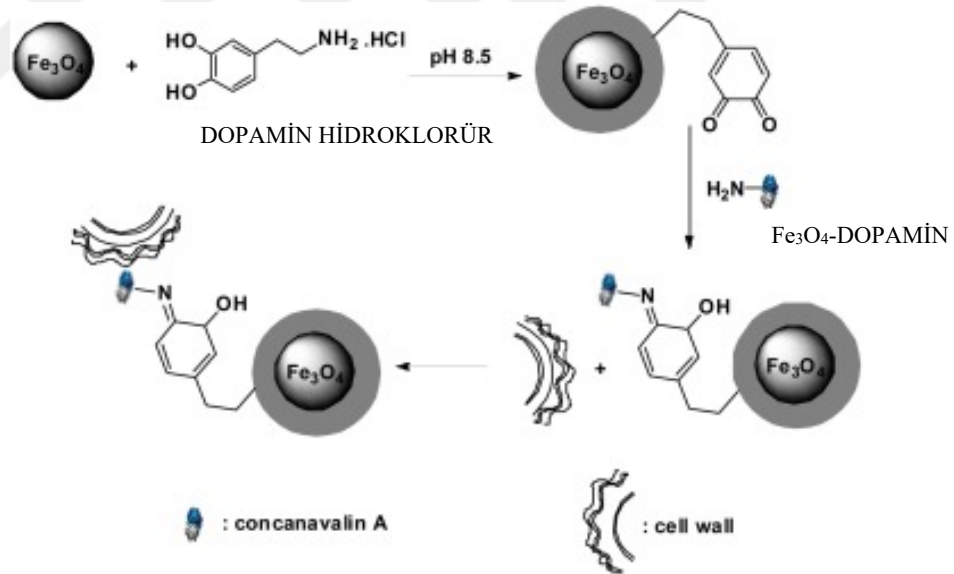
Manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarının süperparamanyetizması, kuantum boyutu etkisi ve yüzey sınır etkisi nedeniyle özel fiziksel ve kimyasal özellikleri vardır. Bununla birlikte, hücreleri manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarına doğrudan tutuklamak zordur. Bu nedenle, manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yüzeylerini modifiye ederek hazırlanması, modifikasyonu ve dağılımının geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşan çalışmalar yapılmıştır (Feng vd. 2016).

(3-aminopropil) trietoksisilan (APTES), Fe_3O_4 ' ün hidrokisiliyle aşılabilir olduğundan, manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarının fonksiyonelleştirmek için tercih edilmektedir. Fe_3O_4 -APTES nanoyapılarının oluşurken, APTES Fe_3O_4 nanoyapılarına Si-O bağları ile bağlanmaktadır. Böylece, Fe_3O_4 -APTES oluşumunda Fe-O-Si bağları oluşmaktadır. Destekte hem glutaraldehit hem de manyetik nanopartiküllerin kullanılması, hızlı bir iyileşme ile daha yüksek tutuklama verimliliği sağlamaktadır (Akhond vd. 2016). Oluşan Fe_3O_4 -APTES nanoparçacıklara, glutaraldehit ile çapraz bağlama yapılarak daha güçlü fonksiyonelleştirme sağlanmış ve hazırlanan aminoasilaz çözeltisi Fe_3O_4 -APTES-glutaralehit yapısına tutuklanmıştır (Şekil 2.5). (Feng vd. 2016).



Şekil 2.5 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıklarının şematik gösterimi (Feng vd. 2016)

Manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarını fonksiyonelleştirmek için dopamin de kullanılmaktadır. Bitkilerden veya hayvanlardan ekstrakte edilen proteinin bir grubu olan lektin, bakterilerin yüzeyindeki spesifik karbonhidrat kısımlarına güçlü bir şekilde bağlanabilir. ConA, *Canavalia ensiformis*' ten ekstrakte edilen yaygın ve kolaylıkla elde edilebilen bir lektin olup, tutuklanmış hücreler için yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, conA, mannoz ve glukozla bağlanan bir proteindir, böylece de *E. coli* gibi gram negatif bakterilerin terminal (uç, kutup) karbohidratlarını özel olarak tanıyabilir. Polidopamin kaplamada sunulan artık kinon fonksiyonel gruplar, Michael eklenmesi ve Schiff baz oluşumu ile kovalent olarak conA' yı polidopamin ile eşleştirebilen conA' nın nükleofilik amino gruplarına karşı reaktiftir. Manyetik nano- Fe_3O_4 -Dopamin' e başarılı bir şekilde aşılınmış olan conA, FTIR spektrumunda conA' nın amino grubu ve manyetik nanotaşıyıcının polidopaminde bulunan kinon grubunun oluşturduğu Schiff baz bağının CN bağlarına dayandırılabilir. Bu yapılara ait fonksiyonel gösterim ise şekil 2.6' da gösterilmektedir.



Şekil 2.6 Dopamin ile fonksiyonelleştirilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıklarının şematik gösterimi (Zhuang vd. 2017)

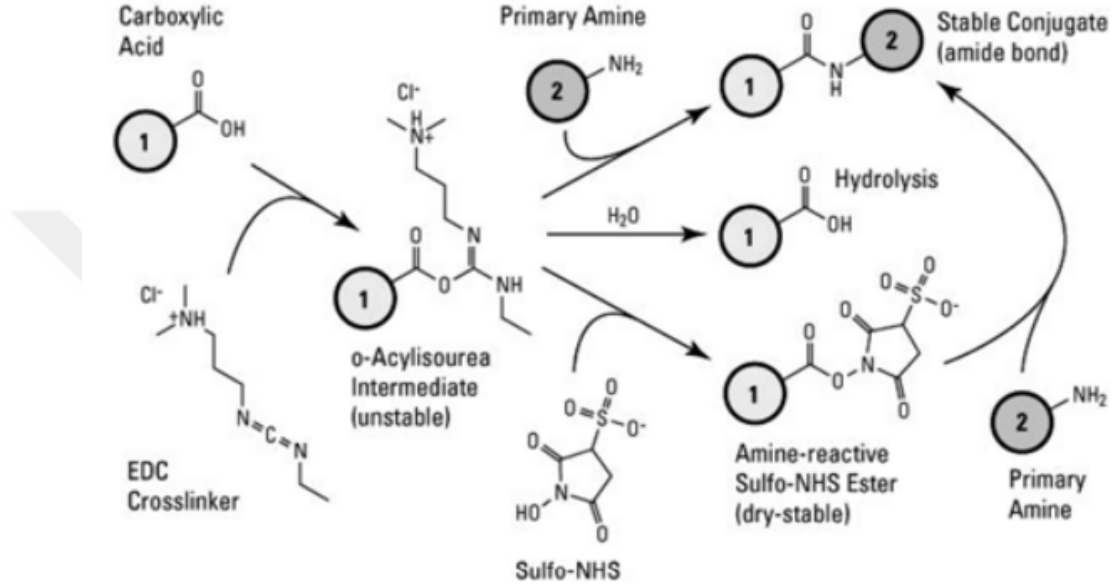
Çok sayıda nanomateriyal türü arasında, iki boyutlu (2D) bir bal peteği kafes olan grafen, dikkat çekici kimyasal kararlılık, mekanik mukavemet, biyolojik uyumluluk ve toksisite eksikliği sunar, bu nedenle birçok özel alanda büyük bir geleceği vardır. Grafenin bir öncüsü olan grafen oksit (GO) levhalar, hem oksijenli polar alanlardan hem de onlara

geleneksel bir blok ko-polimerin ikili özelliklerini veren aromatik polar olmayan alanlardan oluşur. Aynı zamanda uygun mekanik güce, iyi biyoyumluluğa, yüksek özgül yüzey alanına, ölçeklenebilir üretime, kontrol edilebilir yüzey kimyasına ve tam işlevsel gruplara sahiptirler, bu nedenle GO' nun özellikleri tutuklama için onu ideal bir taşıyıcı yapar (Zhang vd. 2017). Ek olarak, GO' ların yüzeyinde tutuklama için hem fiziksel adsorpsiyon hem de kovalent bağlanma yöntemi uygulanabilir (Ameri vd 2020).

1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), karbon bazlı nanomateryaller üzerinde biyokatalizörün kovalent tutuklaması için yaygın olarak kullanılan çapraz bağlama reaktifidir. Örneğin, karbon nanotüpler (CNT' ler), ilk önce yüzeydeki karboksil gruplarını fonksiyonelleştirmek için bir H₂SO₄ ve HNO₃ (genellikle 3: 1, v / v%) karışımı ile oksitlenmiştir. Şekil 2.7' de gösterildiği gibi, EDC, CNT' ler üzerindeki karboksil grupları ile reaksiyona girmiş ve bir amin-reaktif o-asilizoüre ara maddesi oluşturmuştur. Ara ürün daha sonra enzimin maruz kalan amin grupları ile kararlı amid bağları oluşturmuştur. Ara ürün kararsız ve hidrolize duyarlı olduğundan, tutuklama verimliliği iyi değildir, bu nedenle N-hidroksisüksinimid (NHS) veya sülfon-NHS, ara ürünü stabilize etmek için uyarlanmış ve sonuçta yarı kararlı bir amin-reaktif NHS-ester elde edilmiştir. Son olarak, amin-reaktif NHS-ester, biyokatalizörün amin grupları ile reaksiyona girmiş ve kararlı bir amid-bağı oluşturmuştur. Böylece tutuklama verimliliği önemli ölçüde 10 - 20 kat artmıştır. Bu yaklaşım çeşitli enzimlerde yaygın olarak uygulanmıştır (Min and Yoo, 2014).

Karboksil grubunun yanı sıra, amin-, ester- ve asetil grupları da biyokatalizörün kovalent bağlanması için fonksiyonelleştirilmiştir. Yüzeyde karboksil-, amin- ve ester-terminal gruplarına sahip olacak şekilde çok duvarlı karbon nanotüpler (MWNT' ler) hazırlanmıştır. MWNT' ler, poli-aminle sonlandırılmış MWNT' leri (MWNTs-NH) *Candida antartica*' dan (CALB) elde edilen lipaz B, sırasıyla fonksiyonelleştirilmiş MWNT' ler üzerinde tutuklanmıştır (Şekil 2.7). Sonuç olarak, MWNT' lerin ağırlığının % 25' i kadar yüksek enzim yüklemeleri elde edilmiş. Tutuklanmış CALB sadece yüksek katalitik aktivite sergilemekle kalmadı, aynı zamanda iyileştirilmiş depolama ve operasyonel stabilite sergiledi (Min and Yoo, 2014).

Çeşitli lipazlar ve esterazlar ayrıca amin fonksiyonlu grafen oksit ve MWNT üzerinde çapraz bağlama reaktifi olarak glutaraldehit ile tutuklanmıştır. Yapısal ve biyokimyasal karakterizasyon yapıldı ve sonuç olarak nanomateryalin eğriliğinin tutuklama verimini, katalitik davranışını ve enzimin ikincil yapısını etkilediği doğrulanmıştır (Min and Yoo, 2014).



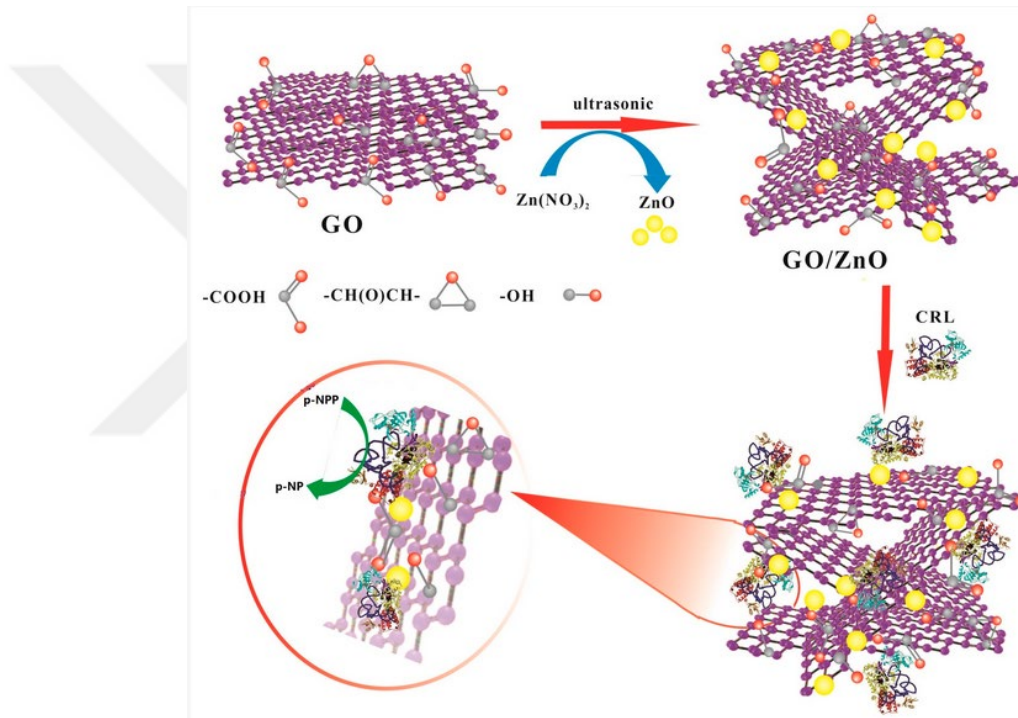
Şekil 2.7 Sülfö-NHS varlığında veya yokluğunda EDC kullanılarak karboksilatlı CNT' ler üzerindeki proteinin kovalent tutuklaması (Min and Yoo, 2014)

Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri, enzim mühendisliğinde potansiyel bir materyal olarak enzimlerin ve substratların aktif bölgesi arasında daha hızlı elektron transferini teşvik etme konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Bu avantajları sayesinde kataliz, ilaç dağıtım ve biyoloji gibi birçok alanda kullanılmıştır (Zhang vd. 2017).

ZnO nanopartiküllerini GO ile entegre ederek hazırlanan hidrojen bağı ve / veya tamamlayıcı elektrostatik çekim gibi moleküller arası etkileşimler yoluyla tutuklama için yeni bir taşıyıcı sunulabilmektedir. GO / ZnO kombine destek malzemesinin oluşumu Şekil 2.8' de gösterilmiştir. Hidroksil, epoksi, karbonil ve karboksil grupları dahil olmak üzere birçok oksijen içeren gruba sahiptir, böylece fonksiyonel gruplar ve geniş yüzey alanı enzim ile etkileşime girecek şekilde tutulabilir. Bu gruplar grafenin özelliklerini hidrofobikten güçlü hidrofiliğe değiştirir ve negatif yüklü karboksilat gruplarının varlığı,

elektrostatik etkileşimler yoluyla proteinlere bağlanmayı teşvik edebilir. Ek olarak, ZnO nanopartikülleri hidrofilitir, dolayısıyla bu kompleks suda iyi dağılılabirliğe sahiptir ve bu da tutuklamayı uygun hale getirir (Zhang vd. 2017).

GO / ZnO kompozitlerinin yeni bir taşıyıcı olarak potansiyel uygulanabilirliğini değerlendirmek için model enzim olarak *Candida rugosa* lipaz (CRL) seçilmiştir. Şekil 2.8’ de destek malzemesi oluşumu ve enzimin bağlandığı yapı halleri gösterilmiştir (Zhang vd. 2017).

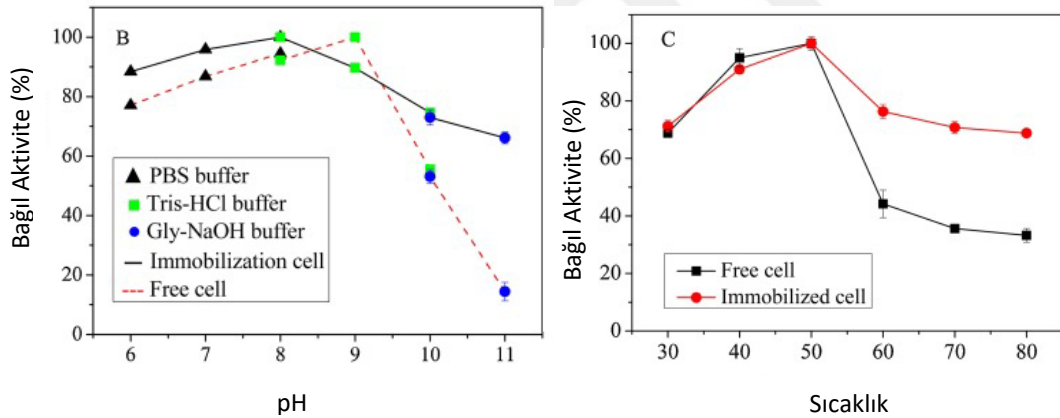


Şekil 2.8 GO/ZnO destek malzemesinin ve *Candida rugosa* lipaz’ ın GO/ZnO yapısına tutuklanmasının şematik gösterimi (Zhang vd. 2017)

2.6 Kaynak Araştırması

Mikroorganizma veya enzimlerin tutuklama işlemi ile farklı amaçlar için kullanılması amaçlanan çalışmalara dair bazı örnekler bu bölümde sunulmuştur. Nanoyapılara tutuklama çalışmaları genellikle enzimler üzerine gerçekleştirilmiştir, ancak *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* ve *Lactobacillus rhamnosus* gibi mikroorganizma ile yapılan çalışmalarda mevcuttur.

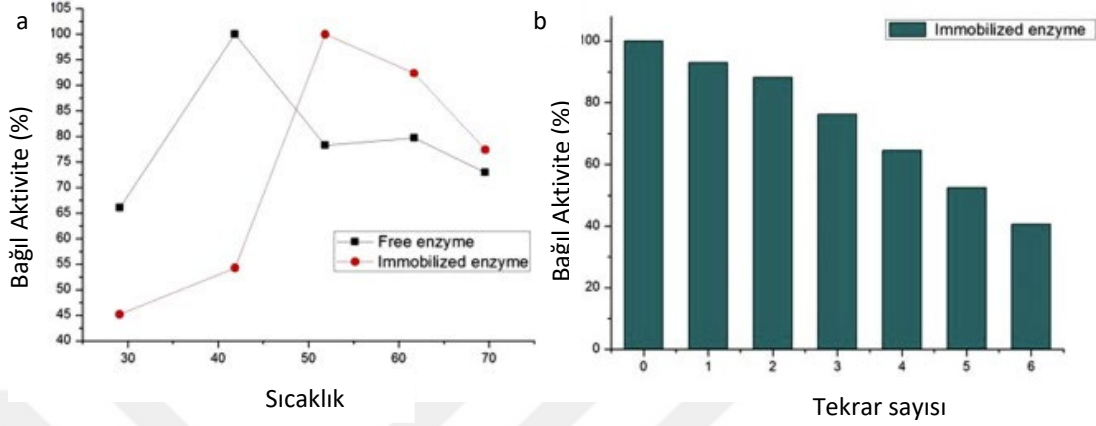
Literatürde Zhuang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, gliserol dehidrojenaz barındıran rekombinant *E. coli* tutuklanmıştır. Tutuklanmış enzimler için yararlı olduğu kanıtlanan ConA, *Canavalia ensiformis*' ten ekstrakte edilen yaygın ve kolaylıkla elde edilebilen bir lektindir. Bu çalışmada, hücre yüzeyinin mannozu ve manyetik nanopartiküllere ilave edilmiş conA arasındaki spesifik tanımayı kullanarak yeni bir tutuklama yöntemi geliştirilmiştir. İlk olarak dopamin ile fonksiyonelleştirilmiş ve sonra ConA ilave edilmiş Fe₃O₄ nanopartikülleri ile manyetik nanotaşıyıcı hazırlanmıştır. Manyetik nanotaşıyıcı içine yeni bir hücre süspansiyonu ilave edilmiş ve karışım, tutuklama için inkübe edilmiştir. Şekil 2.9' da görüldüğü gibi, 50 °C, pH 8' de maksimum aktivite gözlenmiştir (% 99). Sıcaklık arttıkça, serbest hücrenin bağıl aktivitesi, tutuklanmış hücreye göre azalmıştır. 80 °C' de tutuklanmış hücre % 70 başlangıç aktivitesi, serbest hücre ise yarısı kadar aktivite göstermiştir. Hücre aşılmasını conA nanoparçacıklarının yüzeyine tutuklama ile tercih edilen bir kararlılık gözlenmiştir. 10 döngüden sonra ilk faaliyetinin yaklaşık % 62' sini korumuştur (Zhuang vd. 2017).



Şekil 2.9 Serbest ve tutuklanmış hücrenin bağıl aktivitelere pH ve sıcaklığın etkileri

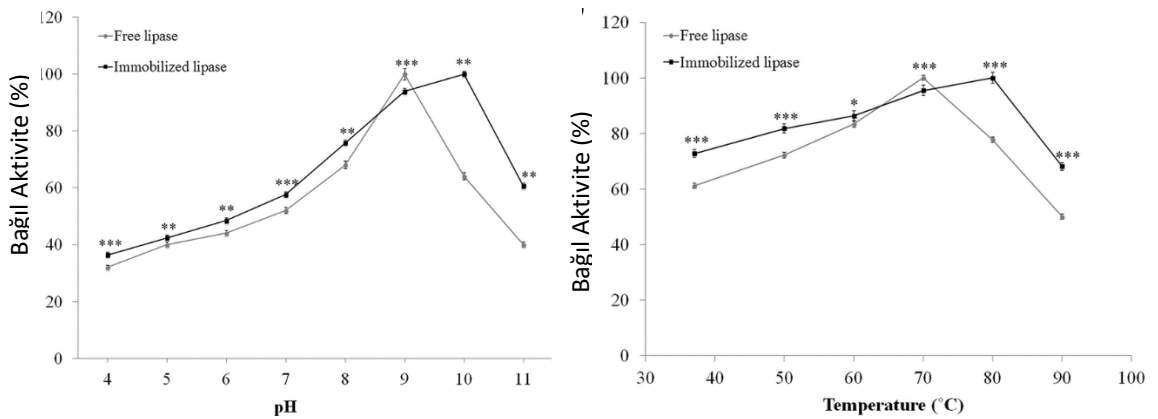
Feng ve arkadaşlarının, Aminoasilaz, 3- (aminopropil) trietoksisilan (APTES) modifikasyonu ile manyetik demir oksit (Fe₃O₄) nanopartiküllerine kovalent bağlanma yoluyla yaptıkları tutuklama çalışmasında, manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri kimyasal çöktürme ile hazırlanmıştır. Sonuçlar, optimal nanopartikül derişiminin, glutaraldehit derişimlerinin, çapraz bağlanma süresinin ve tutuklama süresinin sırasıyla 8 mg / mL, % 1.0, 1 saat ve 1.5 saat olduğunu göstermiştir. Tutuklanmış enzim, 42-52 °C' lik optimum sıcaklık aralığında serbest enzime kıyasla, uygun ısıl ve pH kararlılığı göstermiştir. Buna

ek olarak, tutuklanmış enzim 6 geri dönüşümden sonra aktivitesinin % 40' ını korumuştur ve manyetik olarak geri kazanımı kolaydır (Feng vd. 2016) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 (a) pH = 7.0'da çözeltide tutuklanmış ve serbest enzımın optimum sıcaklığının araştırılması.(b) Birkaç döngü için yeniden kullanımdan sonra tutuklanmış enzımın bağıl enzim aktivitesi

Ameri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, ilk olarak GO nano levhaları (3-aminopropil) trietoksisilan (APTES) kullanılarak hazırlanmış ve fonksiyonelleştirmeye tabi tutulmuştur. Daha sonra, sentezlenmiş nanoyapı, *Bacillus atrophaeus* FSHM2'nin termoalkalofilik lipazını (BaL) tutuklamak için uygulanmıştır. Şekil 2.11' de görüldüğü gibi, maksimum serbest BaL aktivitesi pH 9.0' da gözlenirken, GO-NH₂ üzerinde tutuklanmış BaL, pH 10.0' da maksimum aktivitesini sergilemiştir. Tutuklanmış BaL, 80 °C' de en yüksek verimliliğini göstermiştir. 10 döngüden sonra tutuklanmış BaL aktivitesinde % 25' lik düşüş göstermiştir ve bu durum, enzımın inaktivasyonuna atfedilebilir (Ameri vd. 2020).

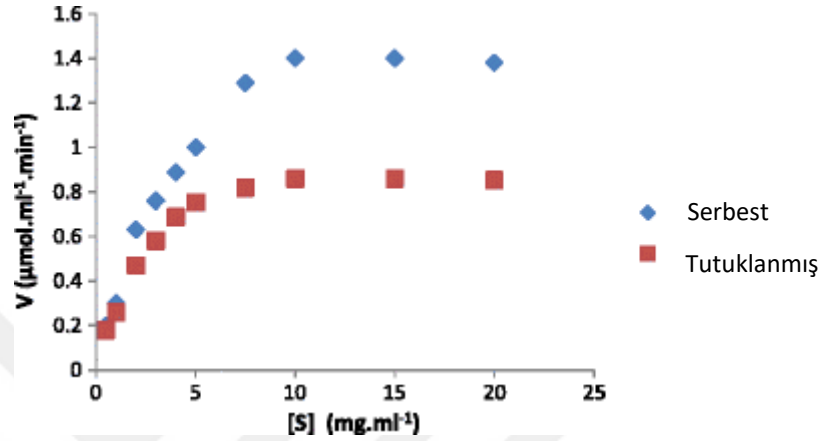


Şekil 2.11 Serbest ve tutuklanmış enzımın bağıl aktivitesine pH ve sıcaklığın etkileri

Zhang ve arkadaşları, daha iyi enzim tutuklaması için GO'yu ZnO nanopartiküller ile entegre eden yeni bir destekleyici materyal tasarlamışlardır. GO / ZnO kompozitlerinin yeni bir taşıyıcı olarak potansiyel uygulanabilirliğini değerlendirmek için model enzim olarak *Candida rugosa* lipaz (CRL) seçilmiştir. Sonuçlara göre, GO / ZnO kompozitleri üzerindeki enzim yükleme miktarının g başına yaklaşık 73.52 mg protein olduğu görülmüştür. Aktivite deneyinde, tutuklanmış lipaz GO / ZnO @ CRL, ısıl kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik açısından özellikle mükemmel performans sergilemiştir. 50 °C' de 30 dakika içinde, serbest enzim, GO @ CRL ve ZnO @ CRL, başlangıç aktivitelerinin sırasıyla % 64, % 62 ve % 41' ini kaybetmiştir. Bununla birlikte, GO / ZnO @ CRL, 50 °C' de 180 dakika sonra hala % 63' lük aktivitesini korumuştur. GO / ZnO @ CRL' nin 14 kez yeniden kullanımından sonra, ilk aktivitenin % 90' ı korunmuştur. GO ile fonksiyonelleştirilmiş ZnO nanopartiküller, çok çeşitli uygulamalarda enzim tutuklamak için taşıyıcılar olarak büyük potansiyele sahip olabilir (Zhang vd. 2017).

Literatürde Akhond ve arkadaşları tarafından araştırılan çalışmada, silika kaplı manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde α -amilazın kovalent tutuklaması için yeni bir yöntem sunulmuştur. Değiştirilmiş manyetik nanopartiküllerin domuz pankreas α -amilazının kovalent tutuklanması için potansiyeli araştırılmıştır. Sentez ve tutuklama işlemleri basit ve hızlıdır. Birlikte çökeltme yöntemi, daha sonra sol-jel reaksiyonu ile silika ile kaplanan manyetik demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerinin (NP'ler) sentezi için kullanılmıştır. Amino-işlevli NP' ler, silika kaplı NP' lerin 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ile işlenmesi ve ardından α -amilazın glutaraldehit ile kovalent olarak tutuklanması yoluyla hazırlanmıştır. Destekte hem glutaraldehit hem de manyetik nanopartiküllerin kullanılması, hızlı bir iyileşme ile daha yüksek tutuklama verimliliği sağlamıştır. Tutuklama reaksiyonu için optimum enzim derişimi ve inkübasyon süresi sırasıyla 150 mg ve 4 saattir. Bu tutuklama üzerine, α -amilaz başlangıçtaki spesifik aktivitesinin % 50' den fazlasını korumuştur. Tutuklanmış enzimin maksimum katalitik aktivitesi için 45 °C' de optimum pH 6.5 idi. Enzim reaksiyonunun Michaelis-Menten kinetik davranışını izlediği bulunmuştur (Şekil 2.12). Tutuklanmış enzim ve onun serbest hali üzerindeki kinetik çalışmalar, kabul edilebilir bir K_m ve V_{max} değişikliği ortaya çıkarmıştır. K_m değerleri, serbest ve tutuklanmış enzimler için sırasıyla 4 ve 2.5 mM olarak bulunmuştur. V_{max} değerleri ise sırasıyla 1.75 ve 1.03 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ gelmiştir. Tutuklanmış amilazın

reaksiyon karışımından hızlı bir şekilde ayrılması, manyetik olarak aktif bir destek uygulandığında elde edilmiştir. Serbest enzime kıyasla, tutuklanmış enzim termal olarak stabildir ve 9 döngü için yeniden kullanılabilirliği sonucunda başlangıç aktivitesinin % 68' ini korumuştur (Akhond vd. 2016).



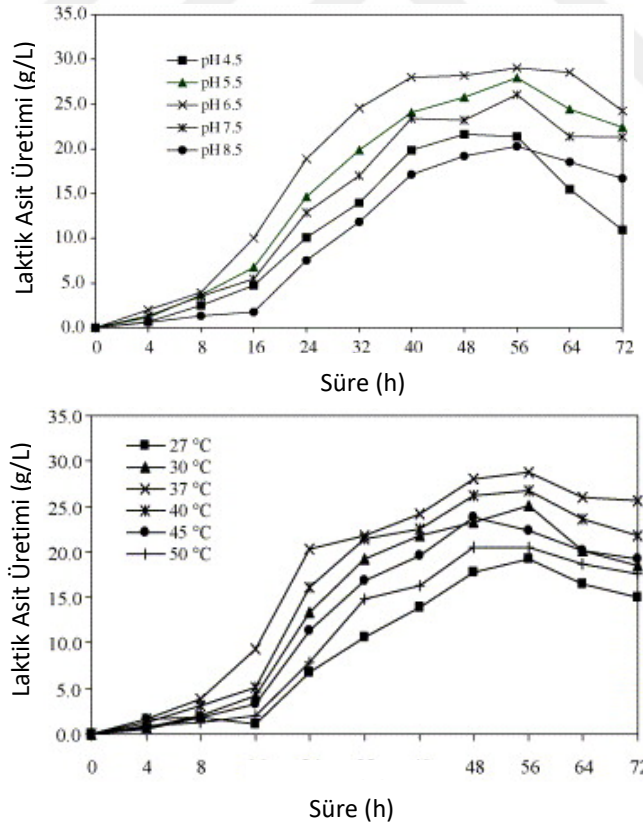
Şekil 2.12 Serbest ve tutuklanmış enzimler için Michaelis-Menten grafikleri

Literatürde Chen ve arkadaşları, atık gazlarda sıklıkla bulunan, yüksek derecede toksik gaz halindeki THF' nin uzaklaştırılması üzerine çalışmış ve işlem tutuklanmış hücrelerle yüklü, yeni geliştirilen bir üç fazlı hava ikmal biyoreaktöründe (TPAB) gerçekleştirilmiştir. TPAB' de atık gazların uzaklaştırılmasında 10. gün sonunda iyi bir performans sergilenmiş ve verimlilik % 90' ın üzerinde gözlenmiştir. Uzaklaştırma verimliliği 70. gün sonunda kademeli olarak % 60' a düşmüştür. Bunun sebebi, bu süre zarfında tutuklanmış boncuklar önemli ölçüde şişip kırıldıkça, boncuk boyutu üçte bir oranında azalmış, bundan dolayı THF ile boncuklar arasındaki etkili temas alanı ve bozunma oranı düşmüştür.

Boş yatak kalma süresinin (EBRT) (80, 100, 120 ve 140 s) eleme kapasitesi üzerindeki etkileri farklı giriş yükleri altında değerlendirilmiştir. Eleme kapasitesi 80 s' lik EBRT' de $25.9 \text{ g m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ iken, 140 s' lik EBRT' de $37.8 \text{ g m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ e ulaşmıştır. Yüksek gaz halindeki THF derişimi, yüksek bir substrat itici güce yol açmış, bu da TPAB' da THF uzaklaştırılmasını arttırmıştır. Bu çalışma, gaz halindeki THF' nin tam ölçekli olarak uzaklaştırılması için alternatif bir yöntem sağlar ve tutuklanmış boncuklarda belirli bir indirgeyicinin biyokütlesini belirlemek için yararlı bir araç sunar (Chen, Ruan vd. 2020).

Aşağıda laktik asitin tutuklama yöntemleri ile üretimine dair araştırmalara yer verilmiştir.

Idris and Suzana' nın yaptıkları literatür çalışmasında, sıvı ananas atığının laktik aside fermentasyonu, 72 saat boyunca anaerobik koşullarda tutuklanmış *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii* ATCC 9646 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tutuklama matrisi olarak kalsiyum aljinat kullanılmış ve sodyum aljinat derişimi, boncuk çapı, başlangıç pH ve sıcaklığının hücre büyümesi, glikoz tüketimi ve laktik asit üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Maksimum laktik asit derişimi, 29.02 g/L yani % 92.7' lik bir verim ile başlangıç pH 6.5' de elde edilmiştir. En yüksek laktik asit üretimi 37 °C' de elde edilmiş ve % 91.7 verimle 28.73 g/L olmuştur (Şekil 2.13). Ayrıca maksimum laktik asit üretimi için optimum süre, 56 saatlik fermentasyon süresi olarak bulunmuştur. İlk pH 4.5' den 6.5' e yükseltildiğinde, K_s değerleri 7.221 g/L' ye yükselmiştir. Başlangıç pH' ndaki daha fazla artış ile K_s değerleri 0.574 g/L' ye düşmüştür. En yüksek K_s değeri, ilk pH 6.5 olduğunda elde edilmiştir (Idris and Suzana, 2006).

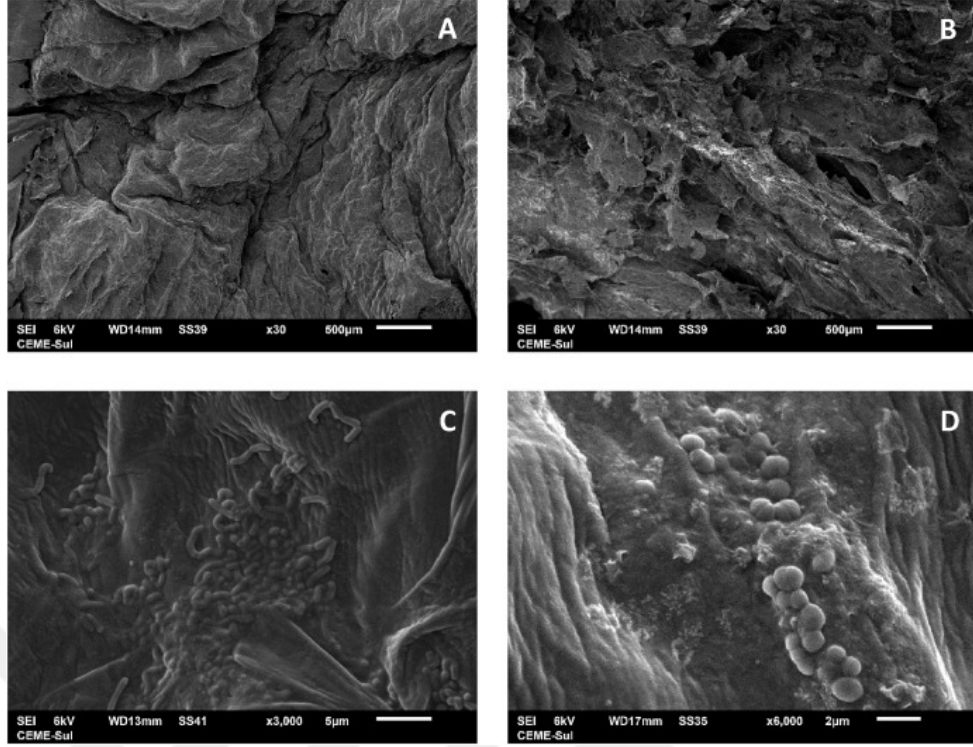


Şekil 2.13 Ca-aljinata tutuklanmış *L. delbrueckii* ile laktik asit üretiminde başlangıç pH değeri ve sıcaklığın etkisi

Bahry ve arkadaşlarının yürüttüğü, Lübnan endüstrisinden katı keçiyoynuzu atığının değerlendirilmesi üzerine yapılan çalışmada, aljinat boncuklarda tutuklanmış *Lactobacillus rhamnosus* ve cevap yüzey yöntemi kullanılarak laktik asit üretimini optimize etmek araştırılmıştır. Sonuçlar, pH ve aljinat derişiminin laktik asit üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Deneysel sonuçlar, aljinat derişimindeki artışın laktik asit verimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. % 2' lik aljinat derişimi, 22 g / L derişiminde laktik asit oluşumu ve % 77' lik verim sağlamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 6.4' lük bir pH optimal değer olarak bulunmuştur (Bahry vd. 2019).

Lactobacillus casei CSL3' ün tutuklanması ile gerçekleştirilen çalışma, Petit Suisse peynirinde saklama ve GIT' den in vitro geçiş sırasında yaşayabilirliğinin değerlendirilmesi üzerine gerçekleştirilmiştir. Probiyotik bakterilerin tutuklanmasında en uygun desteği değerlendirmek için üç kurutulmuş meyve kullanılmıştır. *L. casei* CSL3, Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı besi yerinde büyütülmüştür. Susuz kalmış ananas, guava ve kivi parçalarında (≈1.0 cm³ küpler) hücre tutuklaması gerçekleştirilmiş, 43 günlük saklama süresi sonunda, ananasın daha yüksek bir bakteri derişimini muhafaza ettiği gözlemlenerek, tutuklama desteği olarak kullanılmasına karar verilmiştir (Vitola vd. 2020). Tutuklanmış mikroorganizma tarafından laktik asit oluşumundaki kademeli artış, bakterinin serbest durumuna kıyasla yüksek bir metabolik aktiviteyi sürdürdüğünü göstermektedir (Kourkoutas vd. 2005; Mitropoulou vd. 2013) .

Gastrointestinal geçiş koşulları, serbest veya tutuklanmış formda probiyotik canlılığını etkilememiştir. Serbest bakteri içeren peynir, soğutulmuş depolamanın 1. haftasında analiz edildiğinde, tutuklanmış bakteri içeren peynirden daha yüksek GIT sayıları göstermiştir. Bununla birlikte, 8. hafta sonrasında, GIT sırasında serbest veya tutuklanmış bakteri sayıları benzer gelmiştir. Şekil 2.14' de görüldüğü gibi, gastrointestinal geçişten geçtikten sonra, bitki dokusunun GIT öncesindeki görüntüye kıyasla hasar gördüğü kaydedilmiştir. *L. casei* CSL3, yüksek asitliği olan ve farklı enzimlerin bulunduğu düşmanca bir ortam bulduğunda, morfolojisini basilden kokoid formuna değiştirmiştir (Vitola vd. 2020).



Şekil 2.14 Dondurarak kurutmadan sonra ananasın taranan elektron mikroskobu (SEM) mikrografları; (A) GIT geçişinden önce ananas yüzeyi; (B) GIT geçişinden sonra ananas yüzeyi; (C) *L. casei* CSL3, GIT geçişinden önce ananas yüzeyinde tutuklanmış; (D) *L. casei* CSL3, GIT geçişinden sonra ananas yüzeyinde tutuklanmış (Vitola vd. 2020)

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, laktik asit (LA) fermentasyonu, çeşitli fermentasyon stratejileri kullanılarak, *Lactobacillus plantarum* 23 suşunun tutuklanmış hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Karbon kaynağı olarak glikoz ve alternatif, nispeten ucuz bir karbon kaynağı *Chlorella vulgaris* ESP-31 mikroalginin hidrolizati kullanılmıştır.

Maksimum üretkenliğe pH 5.5' de 3.49 g/L/saat değeri ile ulaşılmıştır. 40 g/L glikoz derişiminde maksimum üretkenliğe 4.28 g/L/sa değeri ile ulaşılmıştır. Mikroalgal şekerler, kesikli ve sürekli üretim yöntemlerinde LA fermentasyonunda glikoz yerine kullanılarak çalışma yapılmıştır. Kesikli fermentasyon yönteminde, 46.53 g/L miktarında mikroalgal şekerler kullanılmış ve LA derişimi 45.55 g/L, üretkenlik 7.56 g/L/saat ve verim 0.93 g/g değerlerindedir. Aynı koşullar altında glikoz kullanmaya göre daha yüksek sonuçlanmıştır. Sürekli fermentasyon yöntemi ise, 100 g/L mikroalgal şeker ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen LA derişim, üretkenlik ve verim değerleri sırasıyla 39.72 g/L, 9.93 g/L/saat ve 0.99 g/g olarak sonuçlanmıştır. Bu çalışmada, tutuklanmış *L.*

plantarum 23' ün hem glikoz hem de mikroalgal şekerleri kullanarak yüksek LA üretimi sağlayabildiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, mikroalgal şekerlerin geleneksel olarak LA fermentasyonunda kullanılan saf ve basit şekerlerin yerini alabileceğini göstermiştir (Chen, Hong vd. 2020).

Araştırılan literatür çalışmalarından yola çıkılarak, son yıllarda tutuklama materyali olarak Fe₃O₄ nanoyapısının sıkça kullanıldığı ayrıca Grafen Oksit nanomateryali kullanımının da yaygınlaştığı görülmektedir. Sıkça karşılaşılmasa da bazı çalışmalarda da iki farklı nanomateryalin (örneğin; Grafen Oksit ve Çinko Oksit) birlikte kullanıldığı çalışmalarda mevcuttur. Çalışmaların tamamında görülmüştür ki, tutuklanmış hücre veya enzimin, serbest olan haline göre aktiviteleri daha verimli sonuçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücreleri DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)' den liyofilize (dondurularak kurutma) olarak temin edilmiş ve -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

Pepton, et özütü, maya özütü, glukoz, Tween 80, di-potasyum fosfat, sodyum asetat, amonyum sitrat, magnezyum sülfat heptahidrat, mangan (II) sülfat heksahidrat mikroorganizma sıvı besisi ve fermentasyon ortamları hazırlamak için kullanılmıştır. Bu bileşenlere ek olarak agar ilavesi ile katı besisi ortamı hazırlanmıştır. Sodyum hidroksit ve sülfürik asit ise ortam pH' ını ayarlamak için kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta Merck ve Sigma' dan, analizlerde kullanılan çözücüler ise HPLC saflığında olup Merck' den temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler ve özellikleri EK 1' de verilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikroorganizma ve kültür koşulları

Lactobacillus casei (DSM20011) çoğalma ortamı olarak Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) ortamı kullanılmıştır. Ortamın içeriğinde pepton, et özütü, maya özütü, glukoz, Tween 80, di potasyum fosfat, sodyum asetat, amonyum sitrat, magnezyum sülfat heptahidrat, mangan (II) sülfat heksahidrat bileşikleri bulunmaktadır. Karışımdaki bileşenlerin derişimleri Çizelge 3.1' de verilmiştir. Ortamın pH' ı NaOH ve H₂SO₄ çözeltisi ile 6.5' e ayarlanmıştır. Katı üreme ortamı için ise aynı bileşimlere sahip ortama 15 g/L agar eklenmiştir. Hazırlanan çoğalma ortamları 121 °C' de 20 dakika süre ile otoklav cihazında (Hirayama HV-85L) sterillemiştir. Sterilizasyonu tamamlanan katı ortam steril petri kaplarına sıcak haliyle dökülmüş ve donması için UV ışını altında bekletilmiştir. Kullanıma hazır ortamlar +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2 *Lactobacillus casei* (DSM20011) için Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) çoğalma ortamı içeriği (<http://www.dsmz.de>)

Bileşen	Kimyasal Formülü	Derişim (g/L)
Pepton	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	10
Et özütü	-	10
Maya özütü	C ₁₀ H ₁₁ FN ₂ O ₂	5
Tween 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	1
Glukoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	20
Di-potasyum fosfat	K ₂ HPO ₄	2
Sodyum asetat	C ₂ H ₃ NAO ₂	5
Amonyum sitrat	C ₆ H ₁₁ NO ₇	2
Magnezyum sülfat heptahidrat	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
Mangan (II) sülfat heksahidrat	MnSO ₄ .6H ₂ O	0.05
Agar*	C ₁₄ H ₂₄ O ₉	15

*Katı ortam hazırlanırken kullanılmıştır.

Liyofilize haldeki mikroorganizma ilk olarak 50 mL' lik MRS sıvı ortamına aktarılarak canlandırılmıştır. Bu işlem 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızı ve 24 saat koşullarında orbital çalkalayıcıda (Labcon 5081U) gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda ölçek büyütme için, erlenden 10 mL alınarak 100 mL' lik MRS sıvı ortamına aktarılmıştır. Katı ortama ise, mikroorganizmalar öze yardımıyla aktarılmış ve 30 °C' de 24 saat süreyle inkübatörde (Shel Lab) çoğalmaları sağlanmıştır. Tüm ekim işlemleri steril kabinde (Holten S-2010 1.8) gerçekleştirilmiştir.

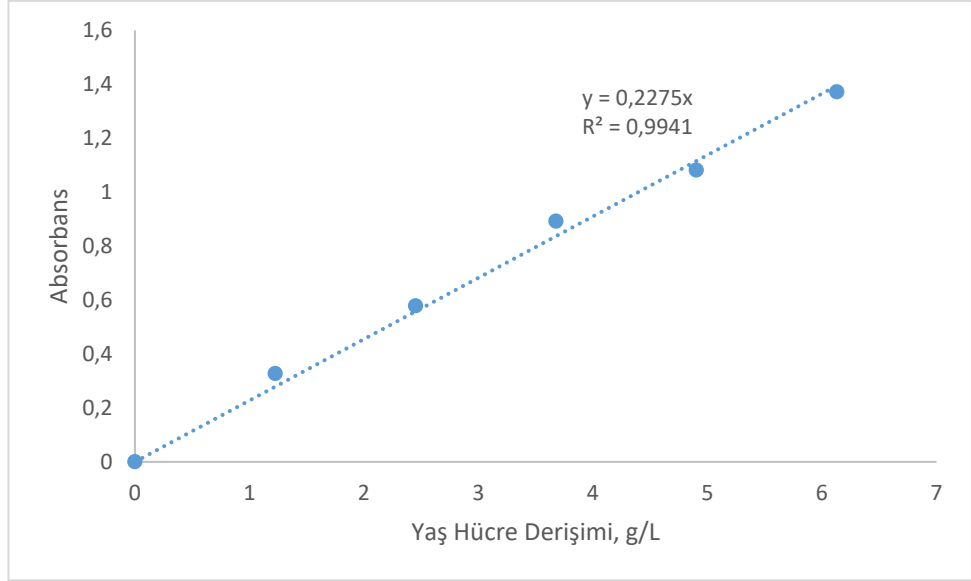
3.2.2 Mikroorganizma kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Fermentasyon ortamına aktarılacak hücre miktarının her deney seti için yaklaşık olarak aynı olması önemlidir. Aktarılacak mikroorganizma derişimini belirlemek amacıyla absorbans- hücre derişimi kalibrasyon doğrularının oluşturulması gerekmektedir. Bunun için, 250 mL' lik erlene 100 mL' lik çoğalma ortamı konulup, mikroorganizmalar ekilmiş ve mikroorganizma derişiminin zamanla değişim grafiği oluşturulmuştur. *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücrelerinin absorbans verdiği en uygun dalga boyu değeri 660 nm olarak belirlenmiştir. Buna göre çoğalma süresince her saat başı erlenden 2 ml' lik örnekler alınıp, UV-VIS spektrofotometresinde analizlenmiştir.

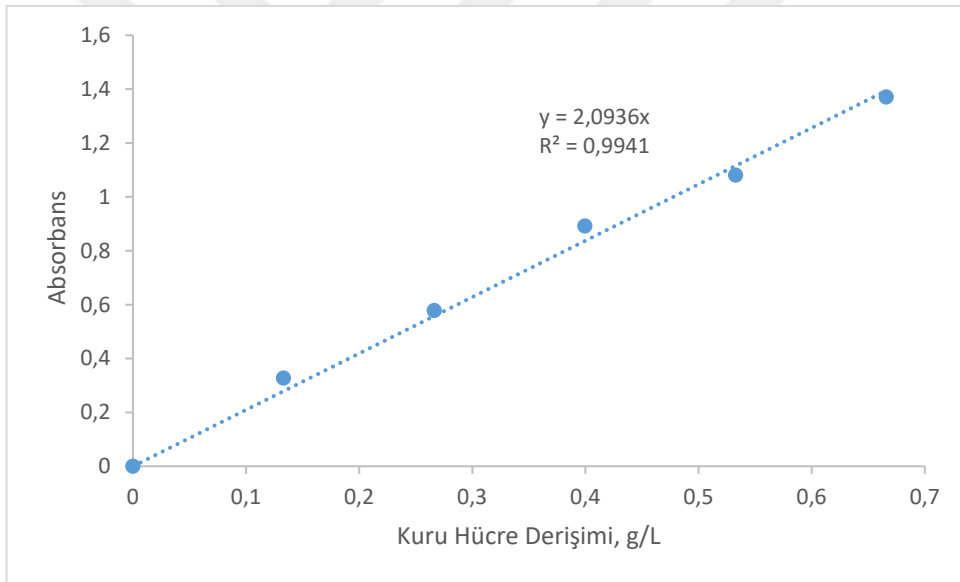
Aynı zamanda 2 farklı erlende daha, eşit ekim yapılmasına dikkat edilerek, çoğalma başlatılmıştır. Bu çoğalma deneylerinin başlatılmasının sebepleri; yaş hücre ve kuru hücre ağırlıklarına bakılması, seyreltme yapılarak farklı seyreltme oranlarında mikroorganizma derişim değerlerine ulaşılmıştır.

Yaş hücre ağırlığını belirleyebilmek için erlenden 50 mL' lik örnek alınmış, darası alınmış iki falcon tüpe paylaştırılmış, 4 °C, 8000 rpm' de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 35 R). Sıvı kısım atılarak katı kısmın kütlesine ulaşılmıştır. 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.

Seyreltme yapılması için alınan örnekler MRS ortamı ile seyreltilmiş (0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 mL mikroorganizma çoğalma ortamı / 2 mL) ve UV-VIS spektrofotometresinde analizlenmiştir. Ardından her bir seyreltme oranının absorbans değerlerine 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 3.1 ve şekil 3.2 verilmiştir.



Şekil 3.1 Yaş hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiği



Şekil 3.2 Kuru hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafiği

3.2.3 Fermentasyon ile laktik asit üretimi

Fermentasyon 250 mL' lik erlenlerde 100 mL çalışma hacminde gerçekleştirilmiştir. Üretim ortamı; pepton, et özütü, maya özütü, glukoz, Tween 80, di potasyum fosfat, sodyum asetat, amonyum sitrat, magnezyum sülfat heptahidrat, mangan (II) sülfat heksahidrat bileşenlerinin belli derişimleri ile hazırlanmış, NaOH ve H₂SO₄ çözeltileri ile pH ayarı yapılmıştır. 121 °C' de 20 dakika süre otoklavlanarak sterillemiştir.

Fermentasyon başlatılırken mikroorganizmanın çoğaltıldığı MRS ortamından alınan 10 mL' lik örnek 4 °C, 8000 rpm, 15 dakika koşulları altında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılarak katı kısım tartılmış ve 10 mL' lik MRS ortamı örneğinin yaklaşık 0.3 g yaş hücre içerdiği belirlenmiştir. Buna göre her fermentasyon işleminde yaklaşık 0.3 g yaş hücre 100 mL' lik üretim ortamına eklenmiş ve fermentasyon başlatılmıştır. Fermentasyon başlatılırken her bir erlene % 1 (w/v) olacak şekilde CaCO₃ ilave edilmiştir. Bu ilavenin sebebi, fermentasyon ortamında laktik asidin ürün inhibisyonuna yol açmasına engel olmaktır.

Üretim, 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 120 saat süre için orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon esnasında belli aralıklarla ortamdan örnekler alınmıştır. Mikroorganizma UV-VIS spektrofotometresinde analiz edilmiştir. Zaman değişimi ile mikroorganizma derişimindeki değişim gözlenmiştir. Ürün derişimini belirlemek amacıyla ise HPLC' de (Thermo Finnigan Spectra System) analiz yapılır. Bunun için yine belli aralıklarla alınan örnekler ependorf tüplere konup ve 4 °C, 13000 rpm, 15 dakika koşulları altında santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım 0.22 µm' lik PVDF filtrelerden süzülerek viallere doldurulmuştur.

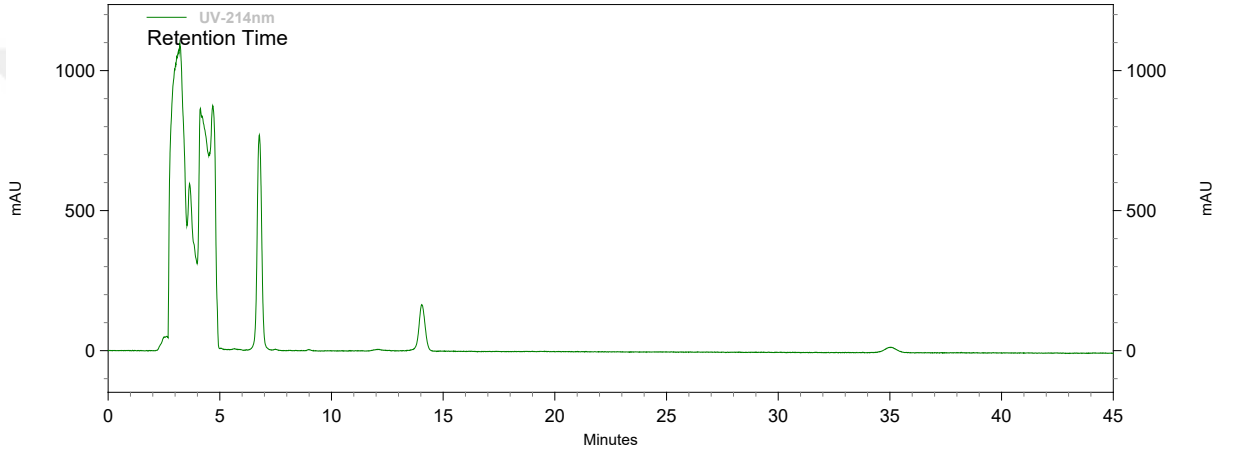
Deneylelerin tamamı kontrol edilebilirliğin sağlanması ve deneysel hatanın en aza indirilmesi amacıyla iki tekrarlı yapılmıştır. Laktik asit üretimi sonunda elde edilen verim için efektif verim hesabına başvurulmuştur. Fermentasyon sonunda oluşan laktik asit derişiminin, ortamda başlangıçtaki glukoz derişimine yüzdesel oranı hesaplanmıştır (Omay, D. 2010).

3.3 Analiz Sistemi

Üretilen laktik asit 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 3.2' de verilmiştir. Laktik asidin standart çözeltisine ait kromatogram şekil 3.3' de verilmiştir. Belirtilen analiz koşullarında şekil 3.3' de bulunan laktik asit çözeltisi kromatogramına göre, laktik asitin kalma süresi yaklaşık 7 dakikadır.

Çizelge 3.2 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)	Su (% 0.2 (v/v) HCl) : Asetonitril (80 : 20)	0.8 mL/min	5 µL	30 °C	214 nm

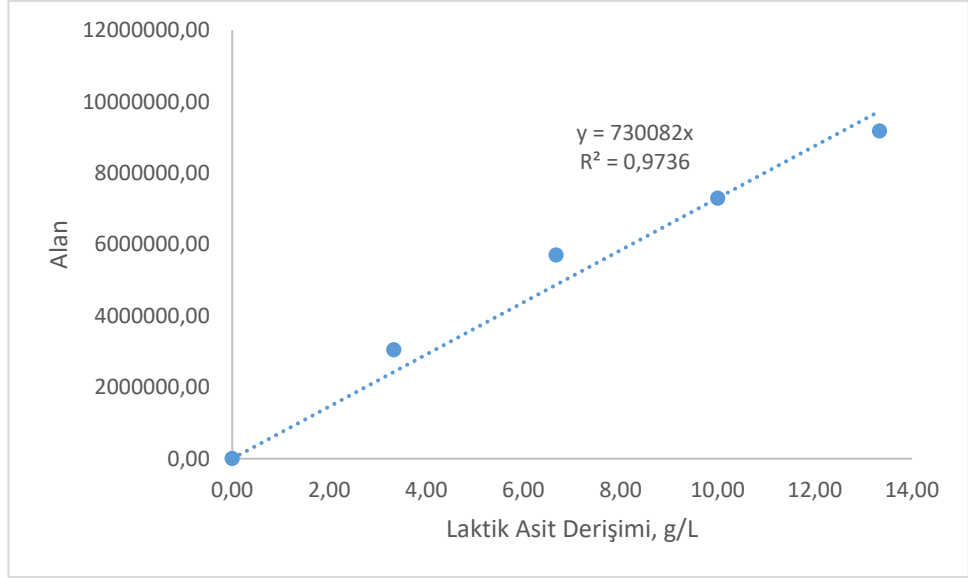


Şekil 3.3 Standart laktik asit çözeltisi için HPLC kromatogramı

Üretilen Fe_3O_4 nanoparçacıklarının ve fonksiyonelleştirilen Fe_3O_4 -APTES ve Fe_3O_4 -Dopamin nanoparçacıklarının sentezlerinin başarılı olup olmadığını kontrol etmek için ise FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir ve piklerin olması gereken yerlere dikkat edilmiştir.

3.3.1 Laktik asit kalibrasyon doğrusunun oluşturulması

Laktik asit kalibrasyon doğrusunun oluşturulması için 3.33, 6.66, 10, 13.33 g/L derişimlerinde standart çözeltiler hazırlanmış ve Çizelge 3.2’ de verilen koşullarda HPLC’ de analizlenmiştir. Standart çözeltilerin analizleri sonucu oluşturulan kalibrasyon doğrusu şekil 3.4’ de gösterilmiştir.

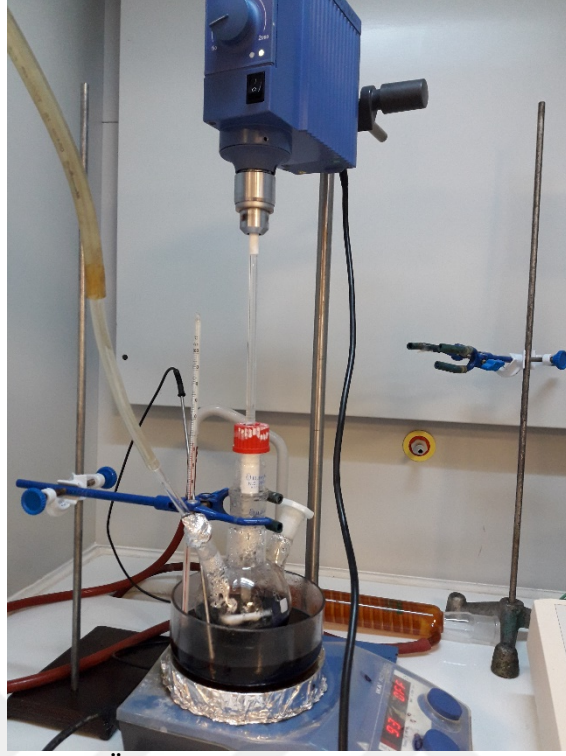


Şekil 3.4 Laktik asit kalibrasyon doğrusu

3.4 Tutuklama Yöntemleri

3.4.1 Fe₃O₄ sentezi, tutuklama ve fonksiyonelleştirme

Bu çalışmada, çok az sayıda çalışmada kullanılmış olan, mikroorganizmayı nanoparçacıklara tutuklama işlemi üzerinde durulmuştur. Öncelikle, manyetik nanoparçacık olan Fe₃O₄ sentezi yapılmıştır. Sentez aşamasında birlikte çöktürme metodu tercih edilmiştir. Fe₃O₄ sentezi için, FeCl₂.4H₂O ve FeCl₃.6H₂O demir tuzları sulu HCl içinde çözülmüştür. Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonlarının mol oranı 0.5' dir (Dinçer, C. 2015). Bu çözelti, inert atmosfer altında sulu NaOH çözeltisi içine aktarılmıştır. Güçlü mekanik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Santrifüj yapılmış ve manyetik parçacıklar elde edilmiştir. Ultra saf su ile yıkama ve 60 °C vakum etüvünde 24 saat kurutma yapılmıştır. Üretim aşamasındaki kurulan mekanizma ve üretilen Fe₃O₄ nanoparçacıkları resim 3.1 ve 3.2' de gösterilmiştir.



Resim 3.1 Üretim aşamasında kurulan mekanizma



Resim 3.2 Üretilen Fe₃O₄ tanecikleri

Literatür araştırmaları sonucunda, *Lactobacillus casei* (DSM20011) ile tutuklama yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple, referans alabilmek için *Lactobacillus casei* (DSM20011) gibi gram pozitif olan bakterilerin tutuklamasının yapıldığı çalışmalar incelenmiştir. *Lactobacillus casei* (DSM20011)' i manyetik nanoparçacık olan Fe₃O₄' e tutuklamak için, 30 mL' lik mikroorganizma oğaltılmış ortamdan alınıp, içerisine 0.5 g

Fe₃O₄ nanoparçacıkları ilave edilmiştir. 4 °C ve 150 rpm koşullarında 2 saat karışmaya bırakılmıştır.

Tutuklama süresi sonlandıktan sonra, tutuklanmış Fe₃O₄ nanoparçacıkları mıknatısla toplanarak sıvısı alınmıştır. Tutuklanmış Fe₃O₄ nanoparçacıkları ise iki defa steril ultra saf su ile yıkanmıştır. Hem alınan sıvının hem de yıkama sonrası sıvılarının UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601) ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra yıkanan tutuklanmış Fe₃O₄ nanoparçacıkları fermentasyon ortamına konmuş ve üretimin gerçekleşip gerçekleşmeyeceği gözlenmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarında Fe₃O₄ nanoparçacıklarının farklı kimyasallar ile fonksiyonelleştirilerek tutuklama işlemine hazırlandığı görülmüştür. Bu sebeple, uygun olanları seçilerek Fe₃O₄ nanoparçacıklarının fonksiyonelleştirilmesi üzerine çalışılmıştır.

İlk olarak, APTES (3-Aminopropiltrioksilan) kullanılarak fonksiyonelleştirme yapılmıştır. Bu işlem için, 0.173 g Fe₃O₄ nanoparçacıkları ile 17.3 ml çözelti hazırlanmıştır, çözeltinin % 50' si etanolden oluşmaktadır. Fe₃O₄ çözeltisi ve 57.67 µL APTES bir şişeye konarak, azottan geçirilmiştir. 40 °C ve 150 rpm koşullarında 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra, mıknatıs ile toplanmış ve üçer defa sırasıyla ultra saf su ve etanol ile yıkanmıştır. Ardından, 60 °C vakum etüvünde bir gece kurutulmuştur. Böylece, Fe₃O₄-APTES nanoparçacıkları oluşturulmuştur. Ayrıca, Fe₃O₄-APTES-glutaraldehit nanoparçacıkları üretimi için de çalışma yapılmıştır. Çapraz bağlanma ile bağlanan glutaraldehit, nanoparçacıkları aktive ettiği ve düşük derişimlerde protein bağlanma oranını arttırdığı için çalışmalarda tercih edilebilmektedir (Feng vd. 2016). Glutaraldehit ile fonksiyonelleştirme için hacimce % 2 glutaraldehit eklenmiştir.

İkinci olarak ise, Dopamin kullanılarak fonksiyonelleştirme yapılmıştır. Bu işlem için, 0.120 g Fe₃O₄ nanoparçacıkları, 50 mL' lik 10 mM ve 8.5 pH değerindeki Tris-HCl tamponu ile karıştırılarak 30 dakika ultrasonikasyon işlemine bırakılmıştır. Karışıma aşamalı olarak 125 mg Dopamin ilave edilmiştir. Dopamin ilavesinden sonra düşen pH

değerinin 8.5' e ayarlanabilmesi için NaOH eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve 200 rpm koşullarında 3 saat karışmaya bırakılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra, mıknatıs ile toplanmış ve beş defa ultra saf su ile yıkanmıştır. Böylece, Fe₃O₄-Dopamin nanoparçacıkları oluşturulmuştur.

Hem Fe₃O₄-APTES hem de Fe₃O₄-Dopamin nanoparçacıkları, mikroorganizmalı ortamlara ilave edilmiş ve 4 °C, 150 rpm, 2 saat koşulları altında tutuklama yapılmıştır. Bu çalışmada nanoparçacık-mikroorganizma oranı, 2 mg fonksiyonelleştirilmiş nanoparçacığa 0.4232 g/mL mikroorganizma içeren 20 mL mikroorganizma ortamı şeklindedir. Süre tamamlandıktan sonra, yine yıkamalar yapılmış ve alınan sıvı ile yıkama sıvılarının UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601) ile analizleri yapılmıştır.

Fe₃O₄, Fe₃O₄-APTES ve Fe₃O₄-Dopamin nanoparçacıklarının FTIR analizleri yapılarak, piklerin nerelerde geldiğine dikkat edilmiş, literatür araştırması ile karşılaştırılarak üretimlerinin başarılı olup olmadıkları kontrol edilmiştir.

3.4.2 Na-aljinata tutuklama

Lactobacillus casei (DSM20011) mikroorganizmasını Fe₃O₄, Fe₃O₄-APTES ve Fe₃O₄-Dopamin nanoparçacıklarına tutuklayıp, daha sonra fermentasyon ortamına koyup, laktik asit üretimini gözlemlediğimizde sonuçlar başarısız olmuştur. Bu sebeple, yaygın bir yöntem olan mikroorganizmayı Na-aljinat' a tutuklama seçilmiştir.

Na-aljinat' a tutuklama işlemi için, 25 mL % 2' lik Na-aljinat çözeltisine 0.5 g Fe₃O₄ nanoparçacıkları eklenmiştir. Mikroorganizmalı ortam santrifüjlenmiş ve çöken kısım üzerine bir miktar Na-aljinat ve Fe₃O₄ nanoparçacıkları bulunan karışım ilave edilip çözünmesi beklenmiştir. Fe₃O₄ nanoparçacıkları katılarak gerektiği zaman pelletlerin ortamdaki ayrılmasının kolaylığı amaçlanmıştır. Çözündükten sonra tamamı karıştırılmıştır. Homojen hale gelene kadar çalkalama ve karıştırma yapılmıştır. Bir behere hazırlanmış olan % 2' lik CaCl₂ konmuş, üzerine hazırlanmış homojen karışım pasteur pipeti yardımıyla damla damla ilave edilmiştir. Karışım CaCl₂ çözeltisiyle

kariştığı an pelletler oluşmaya başlamıştır. Elde edilen pelletler 2 saat sfire +4 °C' de buzdolabında tutulmuş, ardından süzülmüştür. Süzülen pelletler % 0.5' lik CaCl₂ çözeltilisine aktarılmış, buzdolabında kullanım için saklanmıştır. Pellet çapları yaklaşık 2-3 mm olarak ölçülmüştür.

3.4.2.1 Na-aljinata tutuklanmış *Lactobacillus casei* (DSM20011) ile fermentasyon

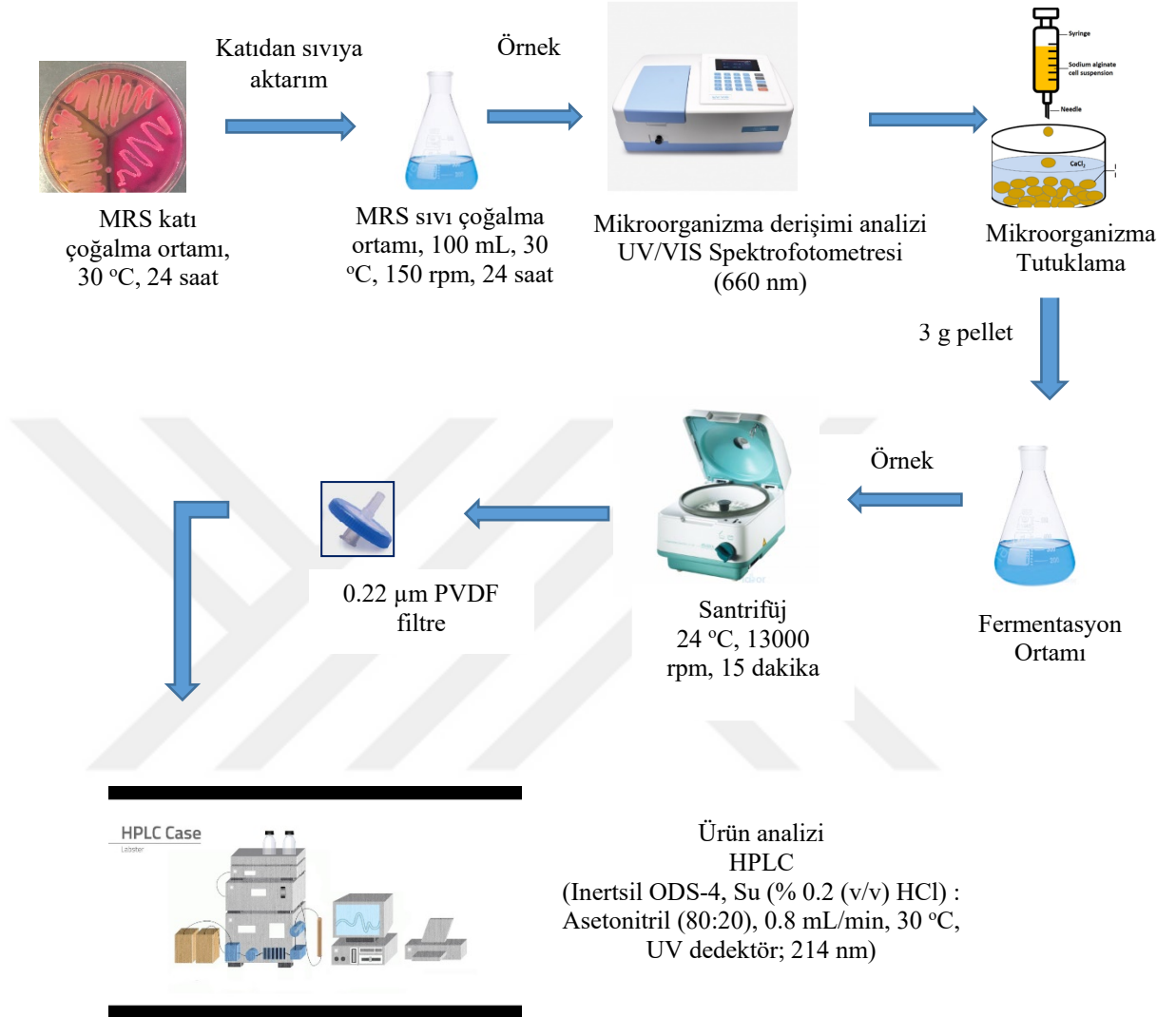
Fermentasyon 250 mL' lik erlenlerde 100 mL çalışma hacminde gerçekteştirilmiştir. Üretim ortamı aynı şekilde hazırlanmış, pH ayarı yapılmıştır. 121 °C' de 20 dakika süre otoklavlanarak sterillemiştir.

Serbest mikroorganizma ile çalışılırken, her fermentasyon işleminde yaklaşık 0.3 g yaş hücre 100 mL' lik üretim ortamına eklenmiş ve fermentasyon başlatılmıştır. Dolayısıyla, tutuklanmış mikroorganizma ile yapılan deneylerde de 100 mL' lik çalışma hacimli üretim ortamında 0.3 g yaş hücre bulunmalıdır. Bunun için ne kadar kütlede pellet kullanılması gerektiği hesap edilmiştir. Örneğin; 1.5 g yaş hücre ile yapılan tutuklamada 15 g pellet üretilmiş ise fermentasyonda 0.3 g yaş hücre bulunması için 3 g pelletin fermentasyon ortamına ilave edilmesi gerekir.

Fermentasyon başlatılırken her bir erlene % 1 (w/v) olacak şekilde CaCO₃ ilave edilmiştir. Bu ilavenin sebebi, fermentasyon ortamında laktik asidin ürün inhibisyonuna yol açmasına engel olmaktır. Üretim, 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 96 saat süre için orbital çalkalayıcıda gerçekteştirilmiştir. Ürün derişimini belirlemek amacıyla fermentasyon esnasında belli aralıklarla ortamdaki örnekler alınmıştır. Alınan örnekler ependorf tüplere konup ve 4 °C, 13000 rpm, 15 dakika koşulları altında santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım 0.22 µm' lik PVDF filtrelerden süzülerek viallere doldurulmuş ve HPLC (Thermo Finnigan Spectra System) analizi yapılması için +4 °C' de saklanmıştır.

Deneylein tamamı kontrol edilebilirliğin sağlanması ve deneysel hatanın en aza indirilmesi amacıyla iki tekrarlı yapılmıştır.

Deney esnasında izlenen adımlar şekil 3.5' de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Deney yöntemi basamaklarının şematik gösterimi

3.5 Laktik Asit Üretimi İçin Ortam Koşulları Tasarımı

Lactobacillus casei (DSM20011) mikroorganizması kullanılarak, substrat olan glukozdan laktik asit üretimi için farklı koşullarda deneyler tasarlanmıştır. Fermentasyon ortamı sıcaklığı, karıştırma hızı, başlangıç pH' ı, tutuklama için kullanılan Na-aljinat miktarları için farklı koşullar denenerek optimum çalışma değerlerine ulaşılmıştır. Fermentasyon ortamında kullanılan mikroorganizma derişimi, substrat derişimi ve

fermentasyon süresi için ise optimum koşulların belirlenmesi için cevap yüzey yöntemi (RSM) uygulanmıştır.

Tüm çalışma koşulları için belirlenmiş olan optimum koşullarda, son olarak tekrar kullanılabilirlik deneyleri yapılmış ve tutuklanan mikroorganizmaların birden fazla defa kullanımının laktik asit üretimini ne şekilde etkilediği gözlenmiştir.

3.5.1 Cevap yüzey yöntemi (RSM) ile ortam koşullarının optimizasyonu

Deneylelerdeki çalışma koşullarının bir kısmı farklı değerler denenerek belirlenmiş iken mikroorganizma derişimi, substrat derişimi ve süre faktörleri için cevap yüzey yönteminin (RSM) kullanımı tercih edilmiştir. Design Expert 7.0 programı kullanılarak, belirlenen faktörlerin optimize edilmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon için, Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Method, RSM) olan Merkezi Kompozit Deney Tasarımı (Central Composite Design, CCD) kullanılmıştır. 3 seviyeli deneysel tasarım uygulanmış, merkez noktada 6 deney olmak üzere toplam 20 deneylik set elde edilmiştir. Deney koşulları için belirlenen seviye ve aralık değerleri çizelge 3.3' de, oluşan deney seti ise çizelge 3.4' de verilmiştir. 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. Tasarımda cevap değişkeni olarak laktik asit derişimi seçilmiştir.

Çizelge 3.3 RSM ile deney tasarımı seviye ve aralık değerleri

No	Faktör	-1.68	-1	0	+1	+1.68
1	C _x , g/L	0.5	1.5	3.0	4.5	5.5
2	C _s , g/L	3.2	10	20	30	36.8
3	t, sa	31.6	48	72	96	112.4

¹C_x: Mikroorganizma derişimi, C_s:Substrat derişimi,
t:Zaman

Çizelge 3.4 Oluşan deney seti verileri

No	C _X ¹ , g/L	C _S ¹ , g/L	t ¹ , h
1	1.5	10	48
2	4.5	10	48
3	1.5	30	48
4	4.5	30	48
5	1.5	10	96
6	4.5	10	96
7	1.5	30	96
8	4.5	30	96
9	0.5	20	72
10	5.5	20	72
11	3	3.2	72
12	3	36.8	72
13	3	20	31.6
14	3	20	112.4
15	3	20	72
16	3	20	72
17	3	20	72
18	3	20	72
19	3	20	72
20	3	20	72

3.6 Tepkime Kinetik Modeli

Tutuklanmış mikroorganizma ile laktik asit üretimi kinetiği enzimatik tepkime kinetiği gibi düşünülebilir. Beş farklı substrat derişimi değeri (10, 20, 30, 40, 50 g/L) deneyler yapılmıştır. Her deney, 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 120 saat süre için orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir.

Her bir substrat derişiminde başlangıç tepkime hızlarının ($r_{\dot{u}}$) belirlenmesi için zamana karşı laktik asit derişimi grafiği çizilmiştir. Grafiğin eğimi eşitlik 3.1 ile belirlenerek, başlangıç tepkime hızları hesaplanmıştır. Eşitlikteki C_{LA0} , laktik asidin başlangıç ($t=0$) derişimini; C_{LA} , t anındaki laktik asit derişimini göstermektedir.

$$r_{\dot{u}} = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\Delta C_{LA}}{\Delta t} = \frac{C_{LA} - C_{LA0}}{t}, r_{\dot{u}} = \left[\frac{\text{mol}}{\text{L.dk}} \right] \quad (3.1)$$

$$r_{\ddot{u}} = r_{\text{smax}} * \frac{C_S^2 / K_1^2}{1 + C_S / K_2 + C_S^2 / K_1^2} \quad (3.2)$$

Eşitlik 3.2 hız denkleminde yer alan kinetik sabitler (r_{smax} , K_1 , K_2) için Sigmaplot programı kullanılarak hesaplanmıştır. Programa eşitlik 3.2 denkleminin çözümü için glukoz derişimi ile başlangıç tepkime hızı girilmiştir. Denklemin çözümü ile substrat derişimleri ve başlangıç tepkime hızları (C_{s0} , $r_{\ddot{u}}$) verileri kullanılarak, maksimum tepkime hızı (r_{smax}) ve denklem sabitleri (K_1 ve K_2) elde edilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, Fe_3O_4 nanoyapıları sentezlenmiş, sentezlenen Fe_3O_4 nanoyapıları fonksiyonelleştirilmiş ve mikroorganizma tutuklama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise laktik asit üretimi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

4.1 Fe_3O_4 Nanoyapılarının Sentezi ve Fonksiyonelleştirilmesi

Fe_3O_4 nanoyapıları birlikte çöktürme metodu ile sentezlenmiştir. Daha sonrasında Fe_3O_4 nanoyapıları fonksiyonelleştirilmiştir.

Manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarının süperparamanyetizması, kuantum boyutu etkisi ve yüzey sınır etkisi nedeniyle özel fiziksel ve kimyasal özellikleri vardır. Bununla birlikte, hücreleri manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarına doğrudan tutuklamak zordur. Bu nedenle, manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yüzeylerini modifiye ederek hazırlanması, modifikasyonu ve dağılımının geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşan çalışmalar yapılmıştır (Feng vd. 2016).

Fonksiyonelleştirilmiş manyetik nanopartiküller, tutuklama için geniş yüzey alanları sağlama gibi birçok avantaj sunar. Manyetik alan uygulaması altında süpernatanttan kolayca ayrılabilirler, iyi biyouyumludurlar, geri dönüştürülebilirler ve birkaç kez tekrar kullanılabilirler (Akhond vd. 2016).

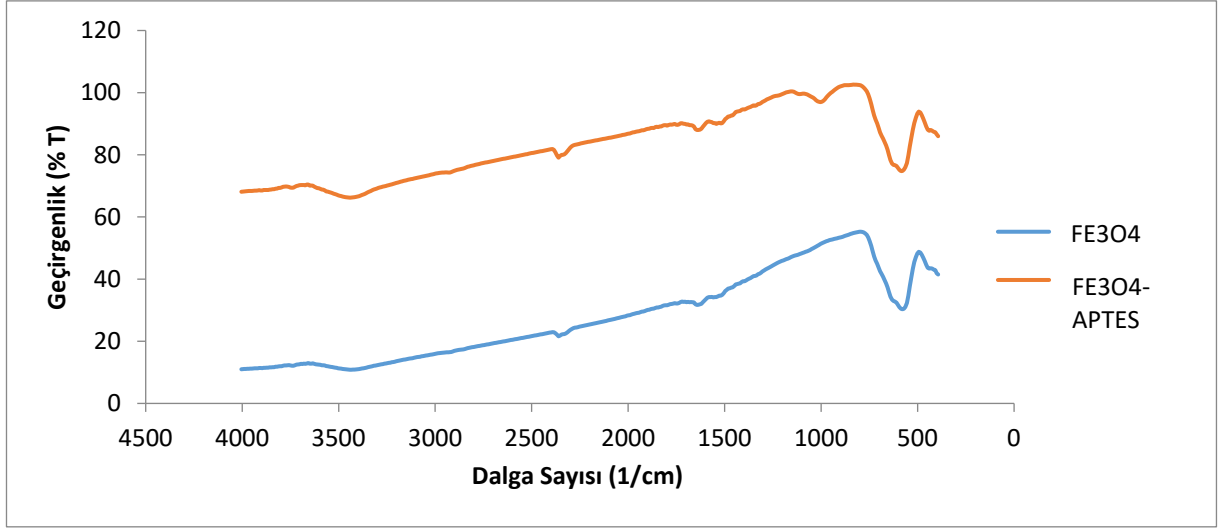
Üretilen Fe_3O_4 nanoyapılarının ve fonksiyonelleştirilen Fe_3O_4 -APTES ve Fe_3O_4 -Dopamin nanoparçacıklarının sentezlerinin başarılı olup olmadığını kontrol etmek için ise FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir ve piklerin olması gereken yerlere dikkat edilmiştir.

Fe_3O_4 -APTES nanoyapılarının oluşurken, APTES Fe_3O_4 nanoyapılarına Si-O bağları ile bağlanmaktadır (Şekil 4.1) (Feng vd. 2016). 1000 cm^{-1} 'deki pik, Si-O bağlarının bükülme titreşimine aittir. 3420 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleri O-H gerilimli titreşime aitken, 1633

cm^{-1} ' deki absorpsiyon pikleri O-H deforme titreşime aittir. Şekil 4.1' de de görüldüğü gibi, Fe_3O_4 ' ün IR spektrumu ile karşılaştırıldığında, Fe_3O_4 -APTES IR spektrumu, 584 ve 1000 cm^{-1} ' de daha büyük absorpsiyon pikleri gösterir ki bu da Fe-O-Si bağlarının oluştuğunu gösterir, diğer 3420, 2934 ve 1633 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piklerinde neredeyse hiç fark gözükmemektedir. Bu özellikler yüzey değişikliğinin başarılı olduğunu ve APTES' in manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyine bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.2).

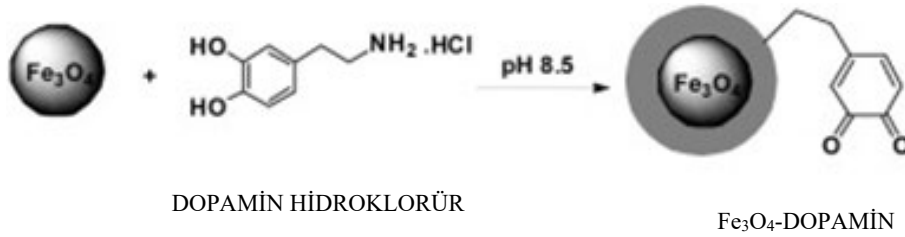


Şekil 4.1 APTES ile fonksiyonelleştirilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıklarının şematik gösterimi (Feng vd. 2016)

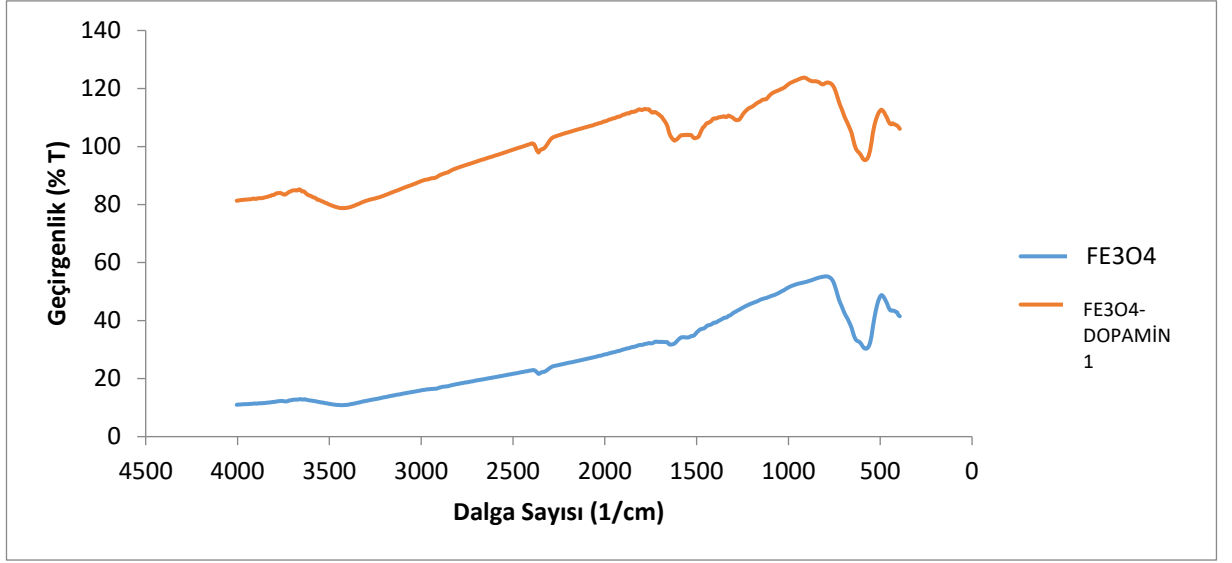


Şekil 4.2 Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-APTES nanoparçacıklarına ait olan FTIR analizi sonuçları

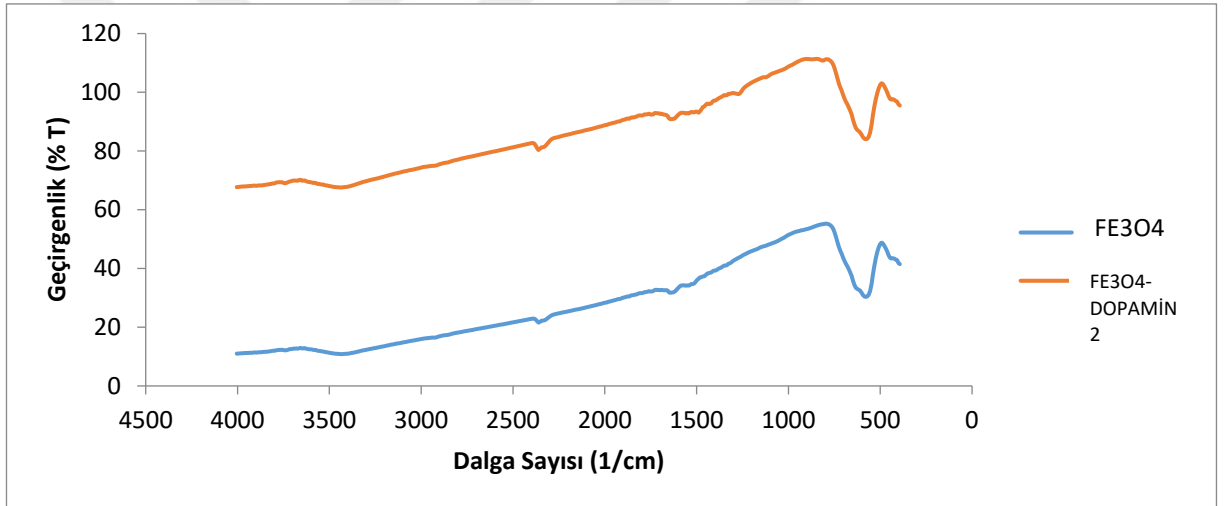
Fe₃O₄-Dopamin nanoyapılarının oluşum formülü şekil 4.3’ de gösterilmiştir (Zhuang vd. 2017). Şekil 4.4 ve şekil 4.5’ de Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-Dopamin nanoyapılarının IR spektrumlarının karşılaştırması gösterilmektedir. 580 cm⁻¹’ deki pik, Fe₃O₄ spektrumundaki Fe-O bağlarının titreşimine karşılık gelmektedir. 3400 cm⁻¹’ deki pikler O-H bağlarını, 2400 cm⁻¹’ deki pikler C-H bağlarını ve 1600 cm⁻¹’ deki pikler C=O bağlarını belirtmektedir.



Şekil 4.3 Dopamin ile fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄ nanoparçacıklarının formüsel gösterimi (Zhuang vd. 2017)



Şekil 4.4 Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-Dopamin nanoparçacıklarına ait olan FTIR analizi sonuçları

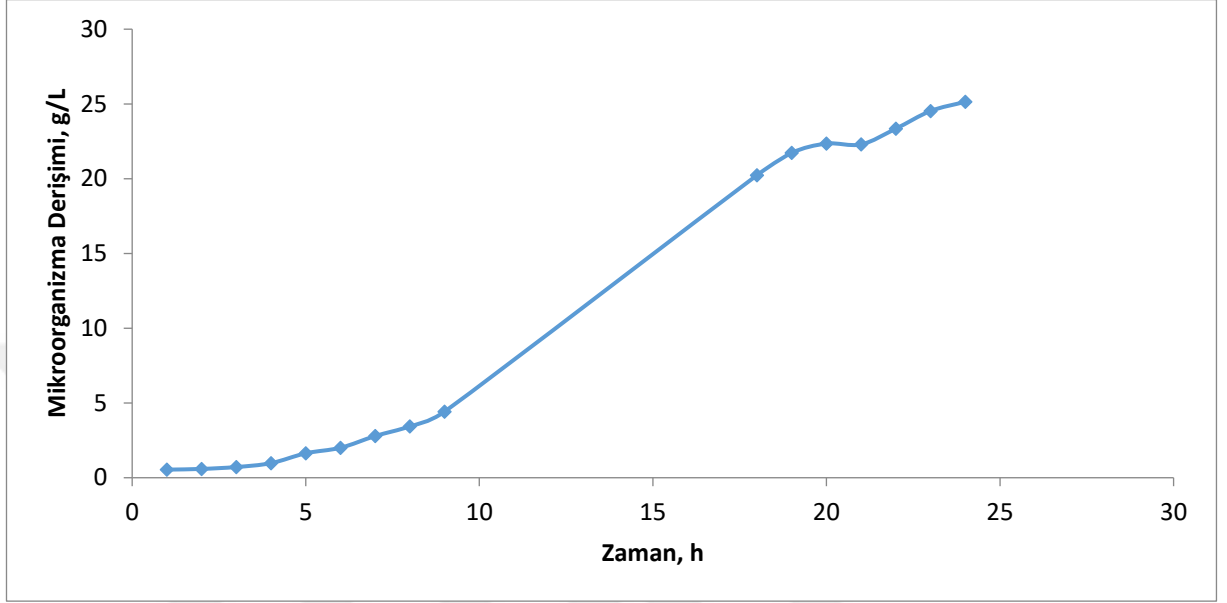


Şekil 4.5 Fe₃O₄ ve Fe₃O₄-Dopamin nanoparçacıklarına ait olan FTIR analizi sonuçları

4.2 Mikroorganizma Çoğalması ve Fe₃O₄ Nanoyapılarına Tutuklama

Bu çalışmada, mikroorganizma tutuklama işlemlerinin öncesinde *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizmasının çoğalma eğrisinin oluşturulması için 100 mL MRS ortamı içeren 250 mL' lik erlenlerde 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızında çoğalma gerçekleştirilmiştir. Çoğalma süresince ortamdan belirli aralıklarla alınan 2 mL' lik örnekler UV-VIS spektrofotometresinde 660 nm' de analizlenmiştir. Çoğalmanın 24 saatte tamamlandığı kararlaştırılmıştır. Yaş hücre derişimi-absorbans (Şekil 3.2) ve kuru

hücre derişimi-absorbans kalibrasyon grafikleri (Şekil 3.3) yardımıyla zamana karşı mikroorganizma derişimi eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.6). 24 saat sonunda 24.52 g/L mikroorganizma derişimine ulaşılmıştır.



Şekil 4.6 *Lactobacillus casei* (DSM20011) için hücre çoğalma eğrisi (MRS ortamı, T; 30 °C, pH; 6.5, çalkalama hızı; 150 rpm)

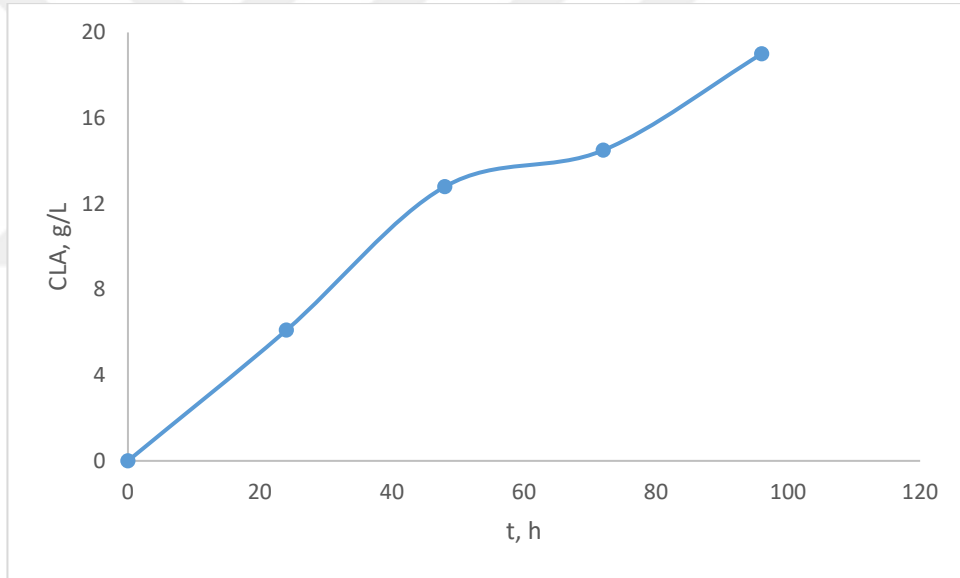
Lactobacillus casei (DSM20011) mikroorganizmasının serbest hali ile laktik asit üretimi için, mikroorganizma MRS ortamı bulunan sıvı ortama ekilip 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızı koşullarında 24 saat boyunca çoğalma işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda 10 mL örnek 4 °C, 8000 rpm 15 dakika koşulları altında santrifüjlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g yaş hücre 100 mL' lik üretim ortamına eklenmiş ve fermentasyon başlatılmıştır. Üretim, 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 96 saat süre için orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon esnasında belli aralıklarla ortamdan örnekler alınmış ve üretilen laktik asit derişimini belirlemek amacıyla ise HPLC' de analiz yapılmıştır.

Analiz sonuçlarına göre, 24. saat sonunda alınan örnekte üretilen laktik asit derişimi 6.1 g/L gelmiştir. Fermentasyonun devamında 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerin analizinden gelen sonuçlar ise sırasıyla 12.8, 14.5, 19.0 g/L olarak çıkmıştır (Şekil 4.7).

Fermentasyon ortamında başlangıçta 20 g/L derişiminde glukoz bulunmaktadır. Fermentasyon esnasında glukoz laktik aside dönüşmektedir, kuramsal temeller kısmında laktik asit üretimi yöntemlerinde konudan detaylı bahsedilmiştir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). Fermentasyonun 96. saatinde hesap edilmiş 19.0 g/L laktik asit derişimine göre, deney sonucundan alınan verim % 95' dir. Böylece fermentasyonun başarılı olduğu sonucuna ulaşılmış ve deney süresinin ideal 96 saat süreceği gözlenmiştir.

Deneyleerin tamamı kontrol edilebilirliğin sağlanması ve deneysel hatanın en aza indirilmesi amacıyla tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrar deneyleerinde de, HPLC' deki analiz sonuçlarına göre üretilen laktik asidin hesaplanan derişimleri benzer sonuçlarda gelmiştir.



Şekil 4.7 Serbest *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücreleri ile yapılan deneyleer sonucunda zamana karşı laktik asit derişimi değişimi (MRS ortamı, T; 30 °C, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç yaş hücre miktarı: 0.3 g)

Daha sonra, hem sentezlenen manyetik nanoyapı Fe₃O₄ hem de fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄ nanoyapıları tutuklama için kullanılmıştır. Bölüm 4.1' de Fe₃O₄, Fe₃O₄-APTES ve Fe₃O₄-Dopamin nanoyapılarının başarılı olarak üretildiği FTIR analizleri sonuçları ile gözlenmiştir.

Tutuklama için, 30 mL' lik 1.5 g/L derişimde mikroorganizma çoğaltılmış ortamdan alınarak içerisinde 0.5 g Fe₃O₄ nanoparçacıkları ilave edilmiştir. 4 °C ve 150 rpm koşullarında 2 saat karışmaya bırakılmıştır. Tutuklama süresi sonlandıktan sonra, tutuklanmış Fe₃O₄ nanoyapıları mıknatısla toplanarak sıvısından ayrılmıştır. Tutuklanmış Fe₃O₄ nanoyapıları ise iki defa steril ultra saf su ile yıkanmıştır. Hem alınan sıvının hem de yıkama sonrası sıvılarının UV-VIS spektrofotometresi ile mikroorganizma analizleri gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç mikroorganizma miktarı 0.606 g iken APTES, APTES-Glutaraldehit ve Dopamin ile fonksiyonelleştirilen Fe₃O₄ nanoyapılarındaki tutuklanan mikroorganizma derişim değerlerinin UV analiz sonuçları çizelge 4.1' de verilmiştir. Fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄ nanoparçacıkları ile tutuklama işlemi, mikroorganizmanın yüksek yapılı olması sebebiyle başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1 UV analiz sonuçlarına göre nanoparçacıkların tutuklama işlemi sonrası alınan sıvıdaki mikroorganizma miktarları

	Fe ₃ O ₄ - APTES	Fe ₃ O ₄ - APTES- Glutaraldehit	Fe ₃ O ₄ - Dopamin 1	Fe ₃ O ₄ - Dopamin 2
Mikroorganizma Miktarı (g)	0.5922	0.5994	0.5625	0.5745

Yapılan tutuklama deneylerinde sonuç başarısız geldiği için farklı yol izlenme kararı alınmış, farklı bir literatür kaynağı referans alınarak tutuklama için kullanılan mikroorganizma miktarı azaltılmıştır. Ancak bu deneylerde de sonuçlar başarısız gelmiştir.

Nanoyapılar üzerinde gerçekleştirilen tutuklamaların büyük çoğunluğu enzimler ile gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma ile yapılan çalışmalarda ise tutuklama işlemi çoğunlukla aljinata tutuklama olarak yapılmıştır. Literatürde mikroorganizmanın nanoyapılara tutuklanması ile ilgili bulunan nadir çalışmalardan Zhuang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Escherichia coli* dopamin ile fonksiyonelleştirilmiş Fe₃O₄

nanoparçacıklarına tutuklanarak, serbest ve tutuklanmış hücrenin gliserol dehidrojenaz aktivitesi üzerindeki pH, sıcaklık, tuz derişimi gibi etkileri araştırılmıştır. 9 mg/mL hücre süspansiyonu kullanılarak tutuklama gerçekleştirilmiştir. En yüksek tutuklama verimi pH 8.0, tutuklama süresi 2 saat ve sıcaklık 4 °C koşullarında % 91 olarak elde edilmiştir (Zhuang vd. 2017).

Bai ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, polidopamin (PD) ile kaplanmış Fe₃O₄ nanoparçacıklarına *Sphingomonas* sp. Y2 tutuklanmıştır. Nonilfenol polietoksilatları (NPEOs) parçalayan bakteri *Sphingomonas* sp. türü Y2 verimi değerlendirilmiştir. 2 mg/mL hücre süspansiyonu kullanılmış ve tutuklama yöntemi ile 1. ve 2. günde sırasıyla % 79.5 ve % 99.9 NPEO' lar bozunma verimi sergilemiştir (Bai vd. 2018).

Ayrıca literatürde, fitaz, lakkaz, maltogenaz, selülaz, amilaz vb. enzimler nanoyapılara tutuklanarak gerçekleştirilen çalışmaların çok sayıda örnekleri vardır.

4.3 Fe₃O₄ içeren Ca-Aljinat' a Tutuklanmış Mikroorganizmalar İle Laktik Asit Üretimi

Hücrelerin çeşitli matrislerde tutuklanması iki amaca hizmet eder; hücre yoğunluğunu artırır ve hücreler durgunluk aşamasındayken ve aktif olarak büyümediğinde fermentasyonu gerçekleştirir. Tutuklanmış hücreler, gelişmiş hücre yüklemesi, substrat inhibisyonunu ve fermentasyon sırasında düşük hücre yoğunluklarını hafifleterek LA üretkenliğini artırmak için kullanılabilir. (Chen vd. 2020).

Önceki çalışmaların ardından, Ca-Aljinat' a tutuklama işlemi ile çalışmaya devam etme kararı alınmıştır. Bu çalışmalar gerçekleştirilirken, biyoreaktör ortamından tutuklanmış mikroorganizmaların rahat ayrılması amacıyla manyetik alan oluşturma düşüncesiyle Fe₃O₄ içeren Ca-Aljinat' a tutuklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Deneyleerde, % 2 sodyum aljinat derişimi ile çalışılmıştır.

Çok düşük sodyum aljinat derişimi, çok yumuşak boncuklara neden olur, % 1 ve daha düşük aljinat derişiminde, boncuklar çok yumuşak ve düşük mekanik mukavemette olmaları nedeniyle kolayca kırılırlar. Bu durumda bakteriler boncuklardan kolayca sızarlar (Bahry vd. 2019).

Sodyum aljinat deriminin % 2' nin üzerine çıkarılması ise boncukları sertleştirir, % 2' den daha yüksek aljinat derişimlerinde kütle kısıtlaması sebebiyle şekerlerin hücre gözeneklerine sızması daha zor olacağı için glikoz ve fruktoz tüketiminde gecikmeye yol açabilmektedir (Ercan vd. 2013).

Serbest mikroorganizma ile çalışılırken, her fermentasyon işleminde yaklaşık 0.3 g yaş hücre 100 mL' lik üretim ortamına eklenmiş ve fermentasyon başlatılmıştır. *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizmasının tutuklanmış hali ile laktik asit üretimi için yapılan deneylerde ise, 100 mL' lik çalışma hacimli üretim ortamında 0.3 g yaş hücre bulunmalıdır. Bunun için ne kadar kütlede pellet kullanılması gerektiği hesap edilmiştir. Örneğin; 1.5 g yaş hücre ile yapılan tutuklamada 15 g pellet üretilmiş ise fermentasyonda 0.3 g yaş hücre bulunması için 3 g pelletin fermentasyon ortamına ilave edilmesi gerekir. Hesap edilen miktar, steril koşullarda tartım yapılarak üretim ortamına eklenmiştir. Üretim, 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 120 saat süre için orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir.

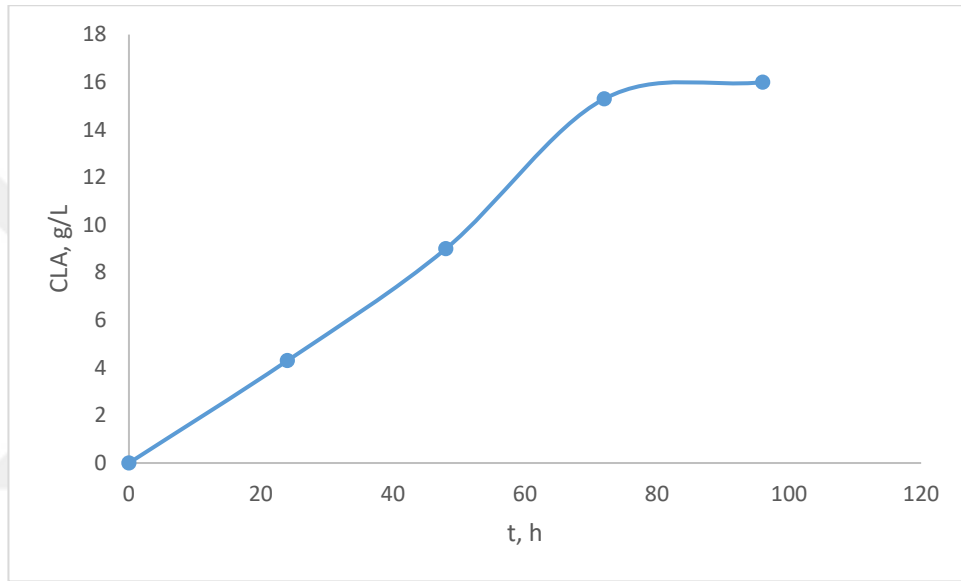
Fermentasyon esnasında belli aralıklarla ortamdan örnekler alınmış ve üretilen laktik asit derişimini belirlemek amacıyla ise HPLC' de analiz yapılmıştır.

Analiz sonuçlarına göre, 24. saat sonunda alınan örnekte üretilen laktik asit derişimi 4.3 g/L gelmiştir. Fermentasyonun devamında 48, 72 ve 96. saatlerde alınan örneklerin analizinden gelen sonuçlar ise sırasıyla 9.0, 15.3 ve 16.0 g/L olarak çıkmıştır (Şekil 4.8).

Fermentasyon ortamında başlangıçta 20 g/L derişiminde glukoz bulunmaktadır. Fermentasyonun 96. saatinde hesap edilmiş 16.0 g/L laktik asit derişimine göre, deney

sonucundan alınan verim % 80' dir. Deney süresinin ideal 96 saat süreceği gözlenmiştir. Bu süre, mikroorganizmanın serbest hali ile yapılan çalışmalar ile aynı gelmiştir.

Deneyleerin tamamı kontrol edilebilirliğinin sağlanması ve deneysel hatanın en aza indirilmesi amacıyla tekrarlı olarak yapılmıştır. Tekrar deneyleerinde de, HPLC' deki analiz sonuçlarına göre üretilen laktik asidin hesaplanan derişimleri benzer sonuçlarda gelmiştir.



Şekil 4.8 Tutuklanmış *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücreleri ile yapılan deneyleer sonucunda zamana karşı laktik asit derişimi değişimi (MRS ortamı, 20 g/L glukoz, T; 30 °C, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı)

Tutuklanmış mikroorganizmalarda farklı koşulların deneyleere etkisi araştırılmış, farklı koşul olarak pH, sıcaklık ve karıştırma hızı parametreleri değerlendirilmiştir.

4.3.1 Başlangıç pH' ı etkisi

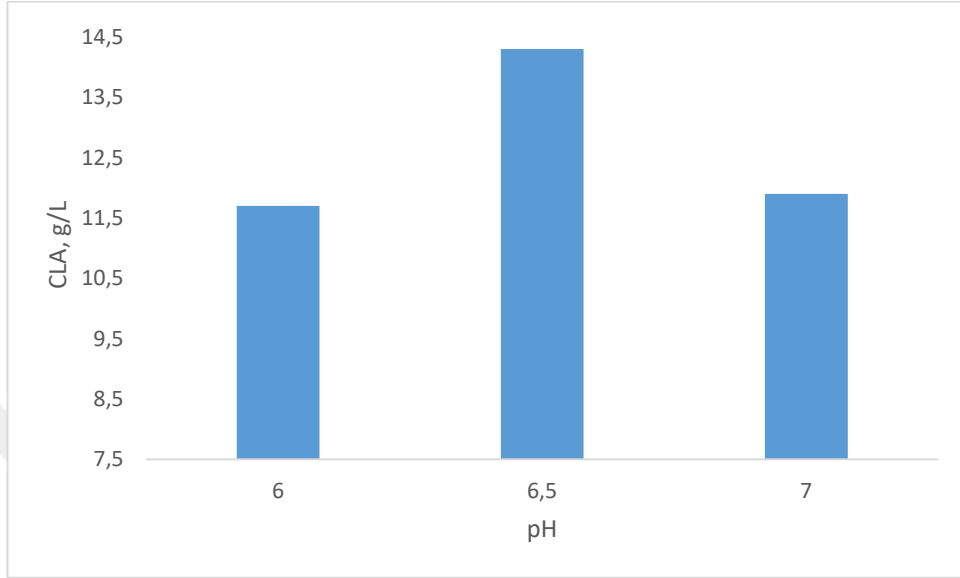
pH, mikrobiyal metabolizmanın en az iki yönünü etkilediği için fermentasyonda çok önemli bir parametredir, bunlar; enzimlerin metabolizması ve besinlerin hücelere taşınmasıdır (Panesar vd. 2010).

Laktik asit bakterileri için kritik pH değeri 4' dür ve optimum büyüme pH' ı 4.5 ile 6.4 arasındadır (Nancib vd. 2001). pH, laktik asidin pKa' sına (yaklaşık 3.9) yaklaştığında, laktik asidin ayrışmamış formunun, ayrışmış laktat formundan daha inhibe edici bir etki oynadığı bilinmektedir. 4' den düşük bir pH' da, ayrışmamış asit formu ihmal edilemez. Ancak 6' dan büyük bir pH, laktik asidin neredeyse tamamen ayrışmasına yol açar ve laktat oluşumu gerçekleştirdiği için asit inhibisyonu önlenmiş olur bu da optimal fermentasyon pH' ının 6 civarında olduğunu açıklar (Pal vd. 2009).

L. casei, fakültatif heterolaktik laktik asit bakterisidir. Fakültatif heterolaktik LAB, laktik asit üretimi yol izinde, glikozları metabolize etmek için fruktoz 1,6 difosfat aldolaz içeren glikolitik yolu kullanır (Vandenberghe vd. 2018). Bu çalışmada, laktik asit üretimi esnasında kullanılmakta olan bu enzimin aktivitesinin pH 6.5 değerinde daha aktif olduğu görülmüştür, pH 6.5 değerinin aşağısında ve üzerinde ise enzim aktivitesinin de azalmasıyla birlikte laktik asit verimleri düşük kalmıştır.

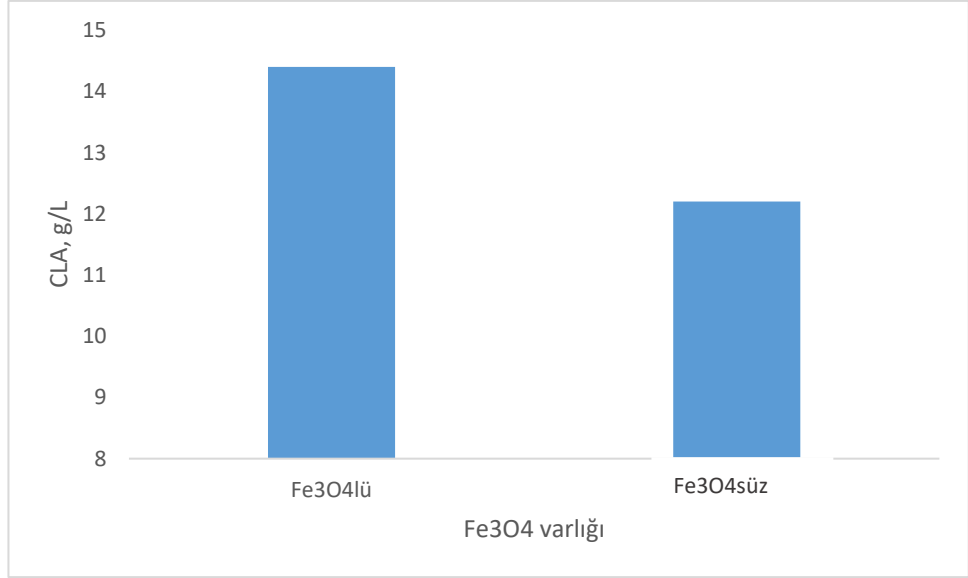
Deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlardan, 6.5' lik bir pH optimal değer olarak bulunmuştur. Bu pH değerinde üretilen laktik asit miktarı 14.3 g/L ile % 71.5 verimdedir (Şekil 4.9). Bahry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* tutuklanarak laktik asit üretilmiştir, % 4 hücre tutuklamasının yapıldığı ve 65 g/L şeker derişiminin kullanıldığı bu çalışmada pH 6.4 değerinde % 77 verim ile en yüksek laktik asit üretimine ulaşılmıştır (Bahry vd. 2019). Bu çalışmaya ile Bahry ve arkadaşlarının çalışmasını kıyaslayacak olursak, bu çalışmada % 10 hücre tutuklaması ile hücre miktarı daha yüksek iken, Bahry ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada substrat derişim miktar daha yüksektir, ancak her iki durumda da verimlilik değerleri yakın çıkmıştır. Ayrıca bu optimum pH sonucu, *L. delbrueckii* kullanılarak ve 31.3 g/L glukoz başlangıç derişimi ile laktik asit üretimini maksimize ettiği bildirilen Idris ve Suzana (Idris ve Suzana, 2006) sonucu ile aynıdır. Bu çalışmada, maksimum laktik asit derişimi, 29.02 g/L yani % 92.7' lik bir verim ile başlangıç pH 6.5' de elde edilmiştir. Benzer şekilde Panesar ve diğerleri (Panesar vd. 2010) maksimum laktoz dönüşüm oranı ve pH değeri 6.5 olan 33.5 g / L optimum laktik asit üretimi bulmuşlardır. Krischke ve diğerleri (Krischke vd, 1991) ise yaptıkları çalışmada 6.0 ile 6.5 arasındaki bir pH aralığının *Lactobacillus casei* tarafından laktik asit üretimi için optimal olduğunu bildirmiştir.

Sonuç olarak, tutuklanmış *L. casei* için gözlemlenen optimum pH, beklendiği gibi sıvı fazdaki benzer mikroorganizmalar için literatürde bildirilen optimum değerlere benzer ve yakındır.



Şekil 4.9 Tutuklanmış *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücreleri ile farklı pH koşullarında yapılan deneyler sonucunda laktik asit derişimi değerleri (MRS ortamı, 20 g/L glukoz, T; 30 °C, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı)

Ayrıca, optimal bulunan değer pH 6.5' de Fe₃O₄ nanoparçacıkları varlığında ve Fe₃O₄ nanoparçacıkları bulunmadığında uygulanan tutuklamalar ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar ile Fe₃O₄ nanoparçacıklarının pelletlerde bulunmasının bir dezavantaj oluşturup oluşturmadığı durumu kontrol edilmiş, deneyler Fe₃O₄ nanoparçacıklarının bulunduğu ve bulunmadığı pelletler ile gerçekleştirilmiştir. Fe₃O₄ bulunduğu durumda laktik asit üretiminin daha avantajlı olduğu görülmüştür. Aynı koşullarda yapılan deneyler karşılaştırıldığında %18 daha fazla laktik asit üretimi sağlandığı görülmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Tutuklanmış *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücreleri ile Fe₃O₄' lü ve Fe₃O₄' süz yapılan deneyler sonucunda laktik asit derişimi değerleri (MRS ortamı, 20 g/L glukoz, T; 30 °C, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı)

4.3.2 Sıcaklık etkisi

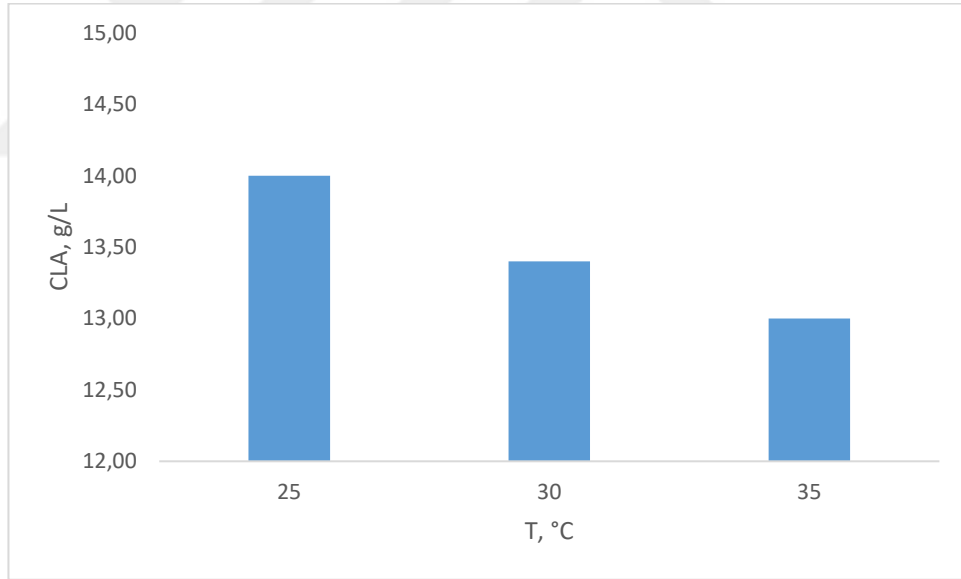
Sıcaklık, mikroorganizmanın büyümesini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Türlerin çoğu, içinde büyüebilecekleri karakteristik bir sıcaklık aralığına sahiptir, ancak tüm sıcaklık aralığında aynı hızda büyümeyebilirler. Mikrobiyal büyüme, hücre ile enzimler tarafından katalize edilen kimyasal reaksiyon hızı tarafından yönetilir (Idris and Suzana, 2006).

Bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi, her enzim reaksiyonunun da gerçekleştiği optimum bir sıcaklık düzeyi vardır. Optimum noktanın biraz üzerinde enzimler etkisiz olmasına karşın, sıcaklık düşünce tekrar etkili hale geçebilirler. Fakat bu sıcaklığın devamı ya da sıcaklığın biraz daha yükselmesi enzimlerin etkinliğini sonsuz olarak ortadan kaldırır (B. Çınar, 2012).

Çalışmalarda 25 °C sıcaklık optimum değer olarak bulunmuş, bu değerdeki laktik asit derişimi 14 g/L olarak sonuçlanmıştır (Şekil 4.11). 25 °C' nin üzerinde de çalışmalar gerçekleştirilmiş, sıcaklığın artırılması hücre büyümesini desteklememiş, dolayısıyla laktik asit üretimi azalmıştır. *L. casei*, bu sıcaklıklarda glikozu daha az metabolize

edebilmiştir. *L. delbrueckii* kullanılarak ve 31.3 g/L glukoz başlangıç derişimi ile laktik asit üretimini üzerine çalışma yapan Idris ve Suzana, en yüksek laktik asit üretimini % 91.7 verimle 37 °C’ de elde etmiştir (Idris and Suzana, 2006). Bu farklılık tutuklamada kullanılan destek maddesinden ve mikroorganizma farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sıcaklığın *L. casei* ile laktik asit üretimi üzerindeki etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise, 38 °C ve 41 °C’ de benzer bir biyokütle elde edilmiş, 45 °C’ ye kadar artan sıcaklıkla ise fermentasyon döngüsü azalmıştır. 45 °C’ deki suş, 41 °C’ de olanlardan daha düşük üretkenlik ve nihai laktik asit derişimi göstermiştir. Bunun nedeni kısmen enzim aktivitesinin belirli bir eşik değerine kadar sıcaklıkla artmasıdır. Eşik değerlerin üzerinde enzimle katalizlenen reaksiyonların hızı, enzimin denatürasyonu nedeniyle sıcaklıkla azalır (Qin vd, 2012).



Şekil 4.11 Tutuklanmış *Lactobacillus casei* (DSM20011) hücreleri ile farklı sıcaklık koşullarında yapılan deneyler sonucunda laktik asit derişimi değerleri (MRS ortamı, 20 g/L glukoz, pH;6.5, çalkalama hızı: 150 rpm, başlangıç pellet miktarı: 0.3 g yaş hücreye karşılık gelen pellet miktarı)

4.3.3 Karıştırma hızı etkisi

Çalkalama hızı, fermentasyon sürecinde besin maddelerinin yığın fazdan hücrelere verimli bir şekilde aktarılması için anahtar bir parametredir (Liu ve Shen, 2008).

Çalışmada 100, 150 ve 200 rpm değerlerinde deneyler yapılmış, 150 rpm değeri optimum karıştırma hızı olarak bulunmuştur. 100 rpm değerinde istenilen verim elde edilememiş, 200 rpm değerinde ise pelletlerin bazılarında parçalanmalar gözlenmiştir.

4.4 Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) İle Ortam Koşullarının Optimizasyonu

Laktik asit üretimi için yapılan ön deneylerde, fermentasyon ortamı sıcaklığı, karıştırma hızı, başlangıç pH' ı, tutuklama için kullanılan Na-aljinat miktarları için farklı koşullar denenerek optimum çalışma değerlerine ulaşılmıştır. Fermentasyon ortamında kullanılan mikroorganizma derişimi, substrat derişimi ve fermentasyon süresi için ise optimum koşulların belirlenmesi için cevap yüzey yöntemine (RSM) başvurulmuştur.

Design Expert 7.0 programı kullanılarak, Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Method, RSM) olan Merkezi Kompozit Deney Tasarımı (Central Composite Design, CCD) kullanılmıştır. 3 seviyeli deneysel tasarım uygulanmış (Çizelge 3.3), merkez noktada 6 deney olmak üzere toplam 20 deneysel set elde edilmiştir. Cevap değişkeni için elde edilen gerçek (deneysel) değerler çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2 *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizması ile laktik asit üretiminde 3 faktör için RSM deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değişkeni değerleri

No	C_X^1 , g/L	C_s^1 , g/L	t^1 , h	Cevap Değişkeni C_{LA}^1 , g/L
1	1.5	10	48	4.83
2	4.5	10	48	7
3	1.5	30	48	20
4	4.5	30	48	22.6
5	1.5	10	96	7.2
6	4.5	10	96	8
7	1.5	30	96	22
8	4.5	30	96	28.1
9	0.5	20	72	6.6
10	5.5	20	72	16
11	3	3.2	72	3
12	3	36.8	72	19.2
13	3	20	31.6	11.3

Çizelge 4.2 *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizması ile laktik asit üretiminde 3 faktör için RSM deney tasarım matrisi ve elde edilen cevap değişkeni değerleri (devam)

14	3	20	112.4	13
15	3	20	72	13.5
16	3	20	72	13.9
17	3	20	72	13.4
18	3	20	72	14
19	3	20	72	13
20	3	20	72	11.7

¹C_X: Mikroorganizma derişimi, C_S:Substrat derişimi,
t:Zaman, C_{LA}: Laktik asit derişimi

RSM ile deney tasarımı sonucunda laktik asit derişimi için elde edilen modele ilişkin istatistik sonuçları ANOVA testi verileri olarak çizelge 4.3’ de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde modelin Prob>F değerinin <0.0001 olması, modelde hatanın meydana gelme ihtimalinin % 0.01 ve bu değer 0.05’ten küçük olması % 95 güven seviyesinde yer aldığı, böylece cevap değişkeni için modelin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Laktik asit derişimi için RSM deney tasarımında üretimi etkileyen değişkenler arasından, substrat ve mikroorganizma derişimi için Prob>F değerlerinin 0.05’ den küçük geldiği görülmüştür. Dolayısıyla bu iki terim (C_X, C_S) başlangıç tepkime hızı için önemli faktörlerdir. Bu iki terim arasından da substrat derişimi (C_S) Prob>F değeri <0.0001 olduğundan model için en önemli terim kabul edilmiştir. RSM sonucunda elde edilen laktik asit derişimi için standart sapma, R² ve hassasiyet değerleri çizelge 4.4’ de verilmiştir. Modelin R² değeri, laktik asit derişimi için 0.8730 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 Laktik 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	701.2434	3	233.7478	36.64979	< 0.0001	Anlamlı
A:M.O. Derişimi	55.28999	1	55.28999	8.669029	0.0095	
B:Substrat Derişimi	632.1518	1	632.1518	99.11636	< 0.0001	
C:Zaman	13.80162	1	13.80162	2.163984	0.1607	
Uyum Eksikliği	98.51101	11	8.955547	12.66697	0.0058	Önemsiz

Çizelge 4.4 Laktik asit derişimi için RSM deney tasarımı sonunda elde edilen standart sapma, R² ve hassasiyet değerleri

	Cevap Değişkeni
Özellik	Laktik asit derişimi
Standart Sapma	2.5254
R ² Değeri	0.8730
Düzeltilmiş R ² Değeri (Adjusted)	0.8491
Tahmini R ² Değeri (Predicted)	0.7693
Hassasiyet (Adequate Precision)	20.2621

RSM deney tasarım programı sonucunda oluşan, laktik asit derişimi değerinin hesaplanabileceği eşitlik ise aşağıdaki şekildedir (Eşitlik 4.1).

$$C_{LA} = -7.23064 + 1.341395 * C_X + 0.680355 * C_S + 0.041887 * t \quad (4.1)$$

Laktik asit derişiminde en yüksek sonuçlara, mikroorganizma derişiminin 4.64 g/L ve substrat derişiminin 36.59 g/L alınarak başlatıldığı ve deney süresinin 110 saat sürdüğü çalışmalarda varılmıştır (Çizelge 4.5). Bu değerler sonucunda laktik asit derişimi 28.5 g/L değerine ulaşmıştır. Bu sonuca göre aynı koşullar ile tekrarlı iki deney daha gerçekleştirilmiş ve gelen sonuçların ortalaması 28.02 g/L laktik asit derişimi değerinde olmuştur. Yüzde sapma değeri ise % 1.65 değerindedir.

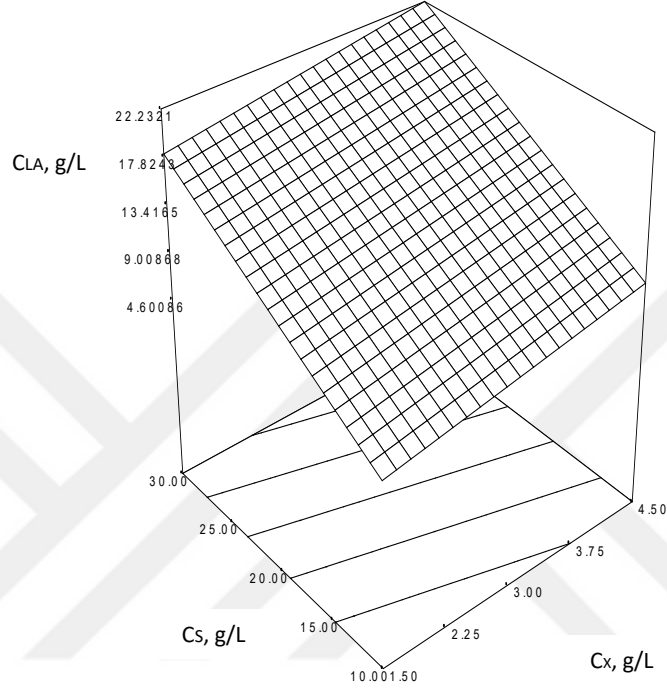
Çizelge 4.5 Maksimum laktik asit derişimi için cevap yüzey yöntemiyle elde edilen optimum değerler

Faktör	Optimum Değer
C _X : Mikroorg. Derişimi, g/L	4.64
C _S : Substrat derişimi, g/L	36.59
t: Zaman, h	110.16
C _{LA} : Laktik Asit Derişimi, g/L	28.5

Cevap değişkenleri için tahmin edilen modellerin görselleştirilmesi cevap yüzey grafikleri ile gerçekleştirilmektedir.

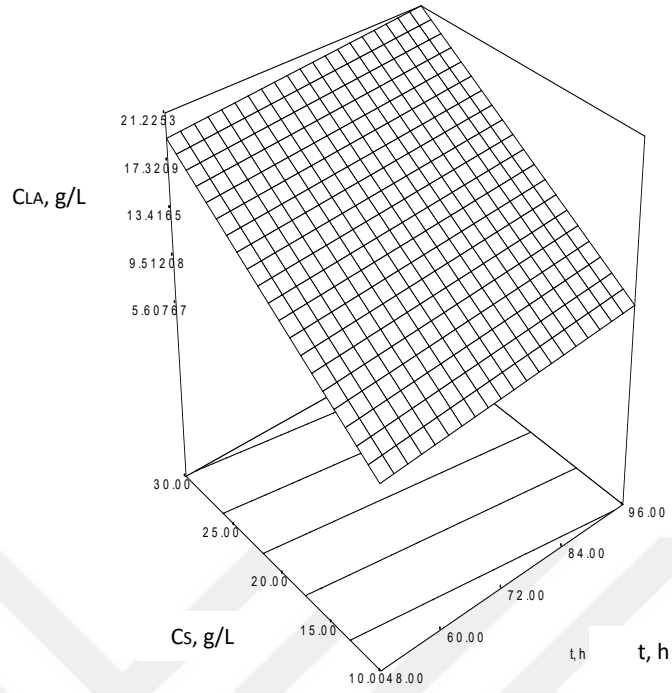
Sabit sürede cevap yüzey yöntemi grafiğine göre substrat ve mikroorganizma derişimlerinin laktik asit derişimi üzerine etkileri şekil 4.12' de incelenmiş, hem substrat

hem de mikroorganizma derişimi arttıkça laktik asit derişiminde de artış sağlanmıştır. Mikroorganizma derişimi sabit tutulduğunda substrat derişimindeki artış ile beraber üretilen laktik asit miktarı, substrat derişimi sabit tutulduğunda mikroorganizma derişimindeki artışa bağlı olarak üretilen laktik aside göre daha fazladır.



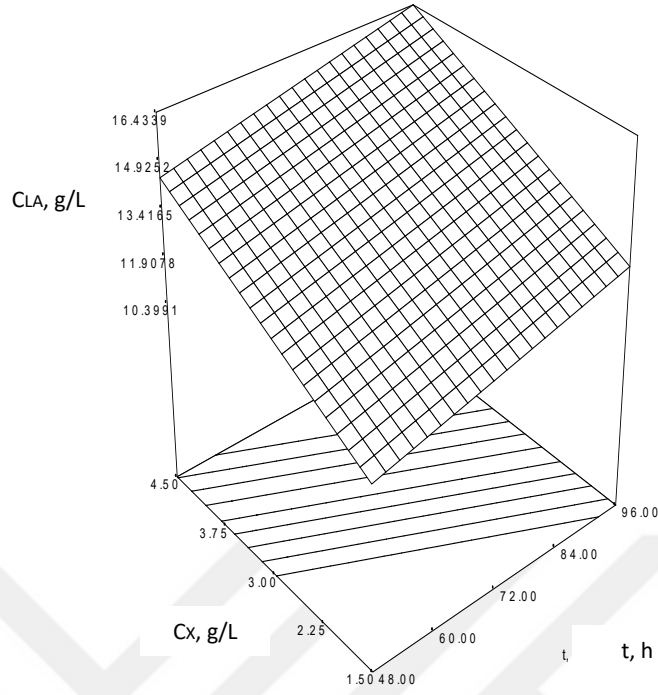
Şekil 4.12 Cevap yüzey yöntemi grafiğine göre sabit sürede substrat ve mikroorganizma derişimlerinin laktik asit derişimi üzerine etkileri (t=72 h)

Sabit mikroorganizma derişiminde cevap yüzey yöntemi grafiğine göre substrat derişimi ve sürenin laktik asit derişimi üzerine etkileri şekil 4.13' de incelenmiş, hem substrat derişimi hem de süre arttıkça laktik asit derişiminde de artış sağlanmıştır. Ayrıca, substrat derişimindeki artışın laktik asit üretimine katkısı daha fazladır.



Şekil 4.13 Cevap yüzey yöntemi grafiğine göre sabit mikroorganizma derişiminde substrat derişimi ve sürenin laktik asit derişimi üzerine etkileri ($C_X=3.0$ g/L)

Sabit substrat derişiminde cevap yüzey yöntemi grafiğine göre mikroorganizma derişimi ve sürenin laktik asit derişimi üzerine etkileri şekil 4.14' de incelenmiş, hem mikroorganizma derişimi hem de süre arttıkça laktik asit derişiminde de artış gözlenmiştir. Süredeki artışa göre mikroorganizma derişimindeki artışın laktik asit derişimi üzerindeki olumlu etkisi daha fazla olmuştur.

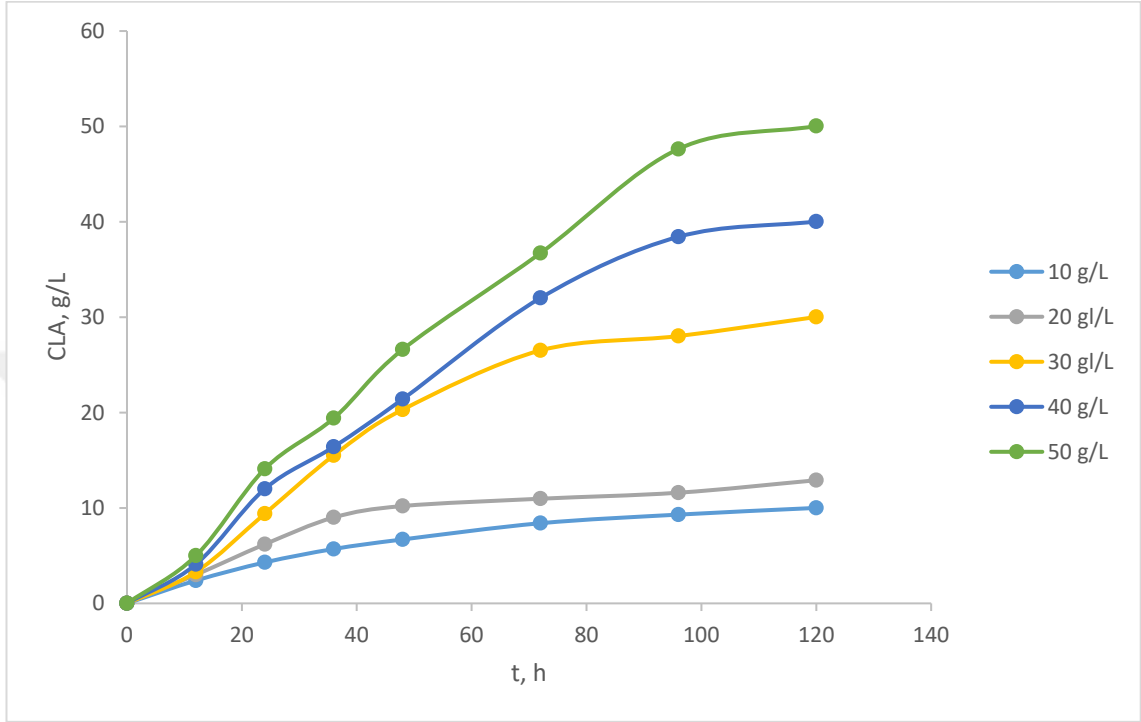


Şekil 4.14 Cevap yüzey yöntemi grafiğine göre sabit substrat derişiminde mikroorganizma derişimi ve sürenin laktik asit derişimi üzerine etkileri ($C_s=20$ g/L)

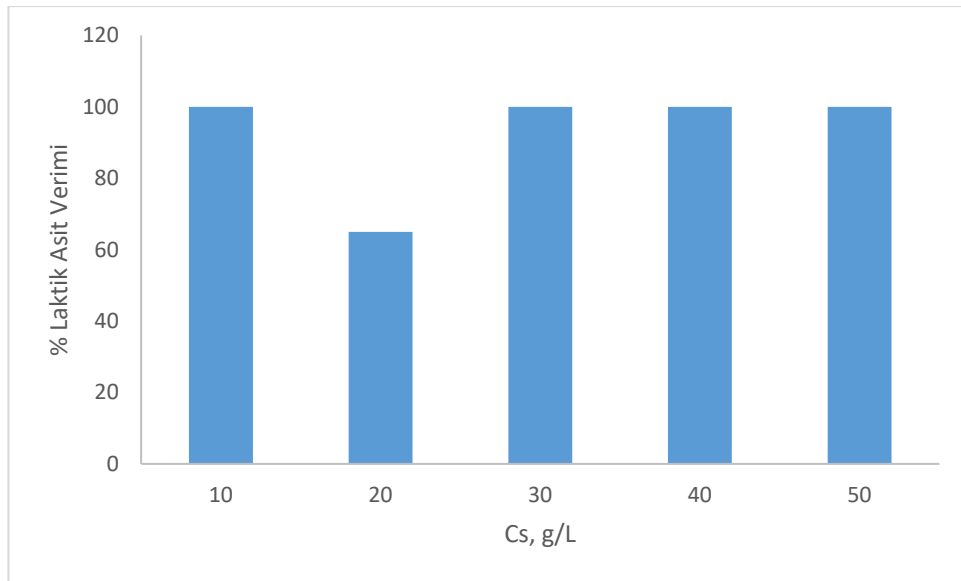
4.5 Kinetik Model

Tutuklanmış mikroorganizma ile laktik asit üretimi için kinetik model incelemek amacıyla, beş farklı substrat derişimi değerinde (10, 20, 30, 40, 50 g/L) deneyler yapılmıştır. Her bir deneyde 4.6 g/L mikroorganizma fermentasyon ortamına ilave edilmiştir. Bunun sebebi, kinetik model tasarımı çalışmasından önce RSM ile ortam koşulları optimizasyonu üzerine çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda mikroorganizma derişimi için optimum değer 4.64 g/L hesaplanmıştır. Deneyler, 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 120 saat süre için orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 12, 24, 36, 48, 72, 96 ve 120. saat örnekleri alınıp, analizlenmiştir. Deneylerin tamamı kontrol edilebilirliğin sağlanması ve deneysel hatanın en aza indirilmesi amacıyla iki tekrarlı yapılmıştır.

Her bir substrat derişiminde başlangıç tepkime hızlarının (r_0) belirlenmesi için zamana karşı laktik asit derişimi (mol/L) grafiği çizilmiştir (Şekil 4.15). Ayrıca şekil 4.16’ da her bir substrat derişiminde laktik asit üretimi verimleri gösterilmiştir.

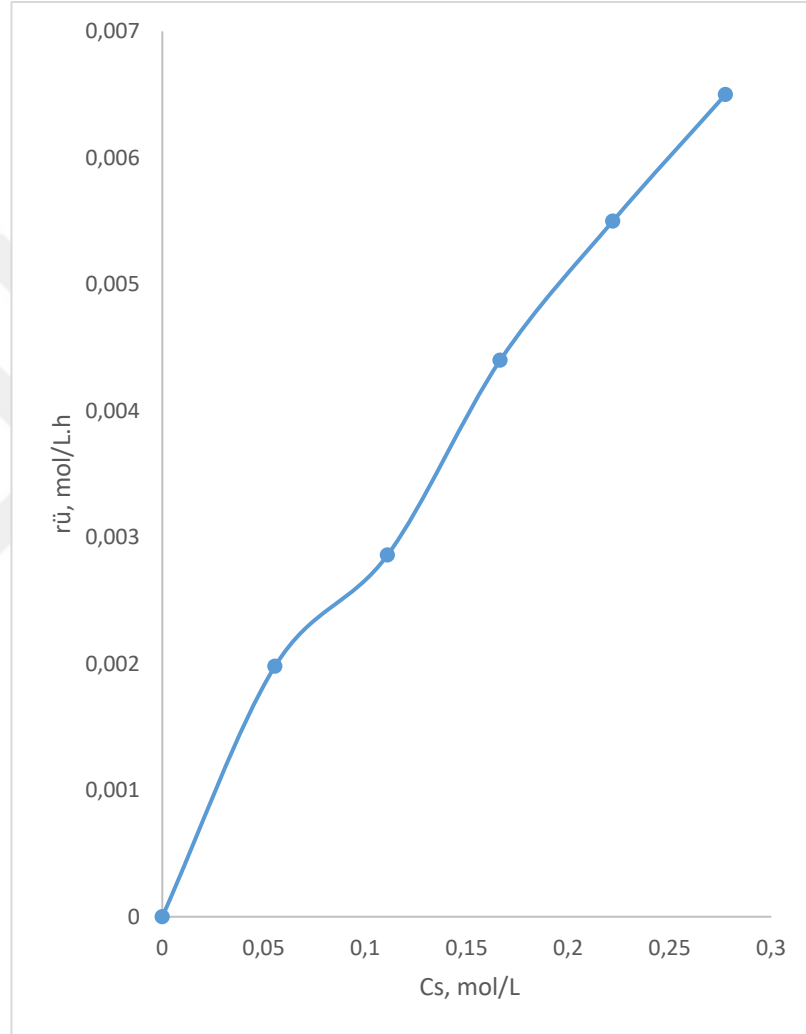


Şekil 4.15 Her bir substrat derişiminde laktik asit derişimi



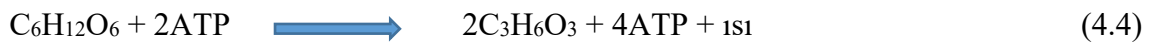
Şekil 4.16 Her bir substrat derişiminde laktik asit üretimi verimi

Zamana karşı çizilen laktik asit derişimi eğrilerinin eğimi, eşitlik 3.1 ile belirlenerek, başlangıç tepkime hızları (mol/L.h) hesaplanmıştır. Eşitlikteki C_{LA0} , laktik asidin başlangıç ($t=0$) derişimini; C_{LA} , t anındaki laktik asit derişimini göstermektedir. Substrat derişimlerine karşılık hesap edilen başlangıç tepkime hızları grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Substrat derişimiyle başlangıç tepkime hızlarının değişimi

Şekil 4.17 grafiğindeki substrat derişimlerine karşılık başlangıç tepkime hızları grafiği incelendiğinde, kinetiğın substrat aktivasyon modeli ile uyumlu olduğu görölmüştür (Bayraktar, E. 1998).

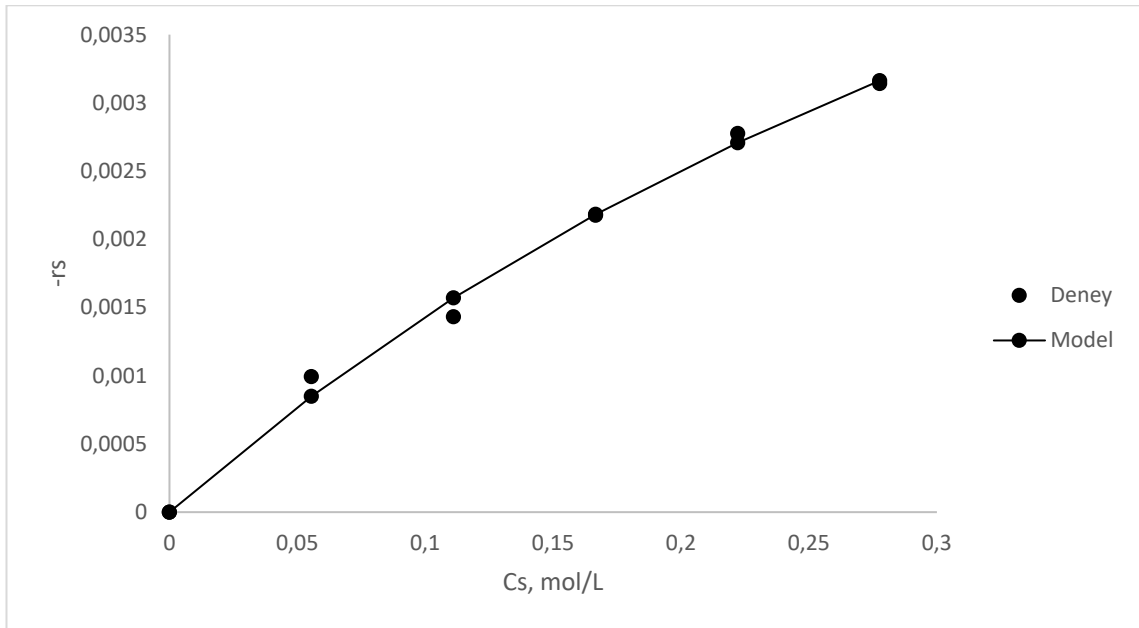


Eşitlik 3.2 hız denkleminde yer alan kinetik sabitler (r_{smax} , K_1 , K_2) için Sigmaplot 10.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Programa öncelikle glukoz derişimi ile başlangıç tepkime hızı girilmiştir. “Statistic”, “Regression Wizard” basamaklarından sonra denklem girme aşamasında eşitlik 3.2 yazılmıştır. Denklemin çözümü ile substrat derişimleri ve başlangıç tepkime hızları (C_{so} , r_s) verileri kullanılarak, maksimum tepkime hızı (r_{smax}) ve denklem sabitleri (K_1 ve K_2) elde edilmiştir. Denklem 4.4’ de basit hali ile gösterilen glukozdan laktik asit oluşum denkleminde de anlaşılacağı gibi $-r_s$ verileri r_u verilerinin yarısıdır. Bu değer dikkate alınarak kinetik veriler hesaplanmıştır.

Kinetik sabitleri sırasıyla; $r_{smax}= 11.385$ mmol/L.h, $K_1= 31.9012$ mmol/L ve $K_2=0.7285$ mmol/L olarak bulunmuştur.

$$-r_s = (11.385) * \frac{C_s^2 / (31.9012)^2}{1 + C_s / (0.7285) + C_s^2 / (31.9012)^2} \quad (4.3)$$

Sigmaplot da elde edilen sonuçlar ile deneysel veriler grafik edilmiş (Şekil 4.18) ve deney ile model sonuçlarının birbiri ile oldukça uyumlu olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.18 Sigmaplot 10.0 programı üzerinde hesaplanan r_s (mol/L.h) değerleri

Tutuklanmış mikroorganizma ile yapılan deneylerin başlangıç tepkime hızlarının bulunması ile kinetik model çıkarılmıştır. Ancak serbest mikroorganizma ile yapılan deneylerden biri referans alınarak (20 g/L substrat içeren MRS ortamı) bu deney için de başlangıç tepkime hızı hesap edilmiştir. Böylece etkinlik katsayısı (η) değeri hesap edilerek gözenek içi hız kısıtlamasının olup olmadığını kontrol edilmek istenmiştir.

$$\eta = \frac{r_{\text{gözlenen}}}{r_{\text{ideal}}} = \frac{r_{\text{tutuklanmış}}}{r_{\text{serbest}}} \quad (4.5)$$

20 g/L substrat içeren MRS ortamı serbest mikroorganizma ile yapılan deney için Eşitlik 3.2 denklemi kullanılarak başlangıç tepkime hızı, 0.00284 mol/L.h hesaplanmıştır. Tutuklanmış mikroorganizma (20 g/L substrat içeren MRS ortamı) ile yapılan deney için hesap edilmiş başlangıç tepkime hızı değeri serbest mikroorganizma (20 g/L substrat içeren MRS ortamı) ile yapılan deney için 0.00282 mol/L.h olarak hesap edilmiş, başlangıç tepkime hızı değerine bölüldüğünde sonuç yaklaşık eşit 1.00 bulunmuştur. Yani, tutuklanmış mikroorganizma ile yapılan deneyin de serbest mikroorganizma ile yapılan deneyle aynı hızda yapılabiliyor olduğunu gösterir. Bu sonuca göre, tutuklanmış mikroorganizma ile yapılan deneylerde gözenek içi ve gözenek dışı hız kısıtlamasının olmadığı sonucuna varılmıştır. Böylece, bulunan hız sabitleri çalışmalarda kısıtlamasız durumdaki gerçek hız sabitleri olarak kullanılabilir.

$$\eta = \frac{0.00284 \text{ mol/L.h}}{0.00282 \text{ mol/L.h}} \cong 1.00 \quad (4.6)$$

Literatürde sıvı ananas atığının laktik aside fermentasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada, 72 saat boyunca anaerobik koşullarda tutuklanmış *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9646 kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada tutuklama matrisi olarak kalsiyum aljinat kullanılmış ve başlangıç glukoz derişimi 31.3 g/L' dir. İlk pH 4.5' den 6.5' e yükseltildiğinde, K_s değerleri 7.221 g/L' ye yükselmiştir. Başlangıç pH' indaki daha fazla artış ile K_s değerleri 0.574 g/L'ye düşmüştür. En yüksek K_s değeri, ilk pH 6.5 olduğunda elde edilmiştir. En yüksek maksimum özgül büyüme değeri olan μ_{max} , 37 °C' de 0.09033 h⁻¹, 45 °C' de ise değer 0.036 h⁻¹ e düşmüştür (Idris and Suzana, 2006).

Literatürde de Akhond ve arkadaşları, silika kaplı manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde α -amilazın kovalent tutuklaması üzerine çalışmışlardır. Bu makalede kinetik çalışmalara da yer verilmiş ve enzim reaksiyonunun Michaelis-Menten kinetik davranışını izlediği bulunmuştur. Tutuklanmış enzim ve serbest hali üzerindeki kinetik çalışmalar, kabul edilebilir bir K_m ve V_{max} değişikliği ortaya çıkarmıştır. K_m değerleri, serbest ve tutuklanmış enzimler için sırasıyla 4 ve 2.5 mM olarak bulunmuştur. V_{max} değerleri ise sırasıyla 1.75 ve 1.03 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ gelmiştir (Akhond vd. 2016).

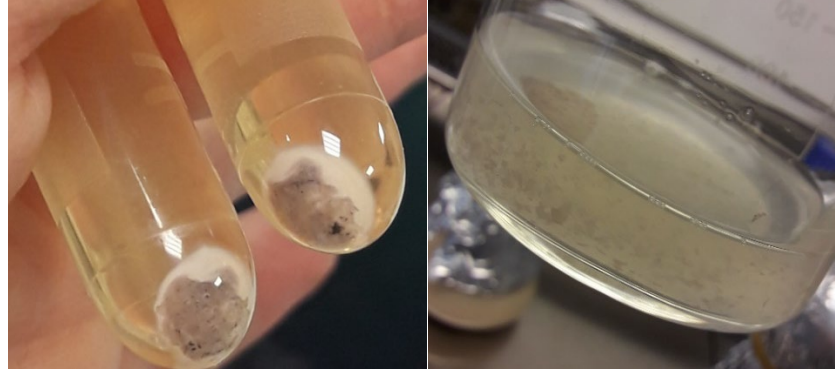
4.6 Tekrar Kullanılabilirlik

Tutuklamanın amaçları arasında, kültür ortamının değiştirilmesinden sonra yeniden kullanma yeteneği, çok önemlidir (Bahry vd. 2019).

Literatür araştırmalarında tutuklama yapılan mikroorganizmaların, ilk deneylerde kullanıldıktan sonra birkaç deneyde daha kullanıma tabi tutuldukları görülmüştür. Tutuklanmış mikroorganizmanın tekrar kullanımının deneylerdeki verimliliği nasıl etkileyeceğini görmek için bu çalışmaların yapılması önemlidir.

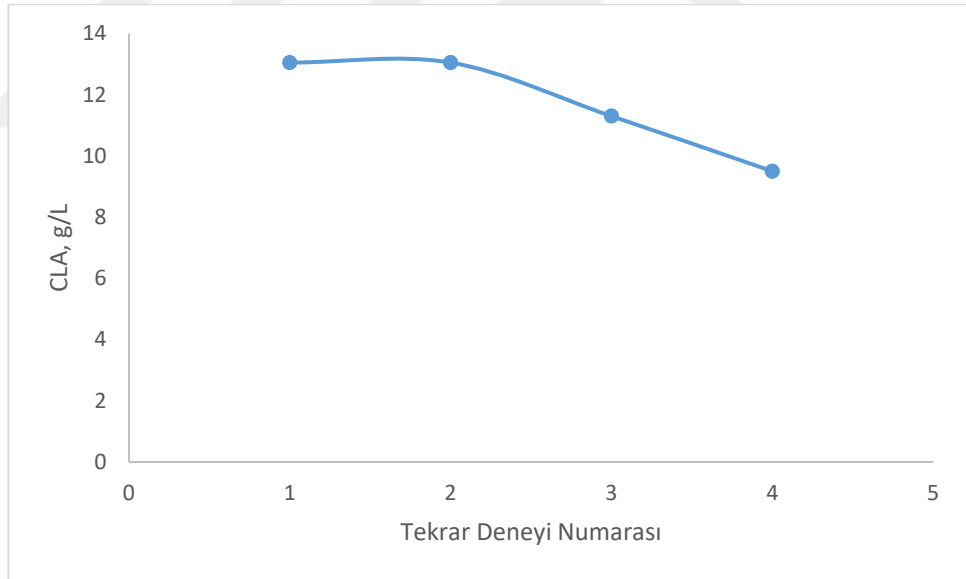
Bu yüksek lisans çalışmasında da 20 g/L substrat içeren MRS ortamına, 4.6 g/L mikroorganizma içeren pelletler ilave edilmiştir. 30 °C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 120 saat süre için orbital çalkalayıcıda deneyler yapılmıştır. 120 saat sonunda ortamdan alınan pelletler steril ultra saf su ile 2-3 defa yıkanıp, süzülüp, taze hazırlanmış olan 20 g/L substrat içeren fermentasyon ortamına alınıp, yeni set deney başlatılmıştır. Her 120. saat sonunda ortamdan örnek alınıp, santrifüjlenip süzülerek analize hazır hale getirilmiştir. Böylece toplamda 4 defa aynı pelletler taze ortam ile buluşarak tekrar tekrar laktik asit üretimi için deneyler gerçekleştirilmiştir.

Ancak üçüncü deney sonunda, ortamda bulanıklık gözlenmiş, pelletlerden Fe_3O_4 nanoparçacıklarının ve mikroorganizmaların sızarak ortama karıştığı anlaşılmıştır (Resim 4.1). Bu durum dördüncü deney sonunda da tekrarlandığından tekrar kullanılabilirlik deneyleri dördüncü deneyde sonlandırılmıştır.



Resim 4.1 Tutuklanmış pelletlerden mikroorganizma sızıntısı

Her bir tekrar deneyinin numuneleri HPLC' de analizlenmiş ve sonuçları şekil 4.19' da gösterilmiştir. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere; 3. ve 4. deneylerde laktik asit derişimi giderek azalmaya başlamıştır. Dördüncü deney sonunda laktik asit derişiminin % 72.8 i korunmuştur.



Şekil 4.19 Tekrar deneyleri sonucu üretilen laktik asit derişimleri

5. SONUÇ

5.1 Değerlendirme

“MAGNETİK NANOTANECİK İÇEREN ALGİNATA TUTUKLANMIŞ MİKROORGANİZMA İLE LAKTİK ASİT ÜRETİMİ” konulu yüksek lisans çalışması kapsamında amaç, *Lactobacillus casei* (DSM20011) mikroorganizmasının tutuklanarak, glukozdan laktik asit üretimi, fermentasyon ortam koşullarının Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) ile optimizasyonunun gerçekleştirilmesi ve kinetik hız sabitlerinin bulunmasıdır.

- Tutuklama da Fe_3O_4 nanoparçacıkları daha geniş yüzey alanı sağlayarak tutuklamayı kolaylaştırmak amacıyla fonksiyonelleştirilerek kullanılmıştır. Fonksiyonelleştirme işleminde APTES ve Dopamin ayrı ayrı kullanılmıştır. Fonksiyonelleştirilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıkları ile tutuklamada istenen verim sağlanamamıştır. Bunun sebebi, mikroorganizmanın yüksek yapılı olmasından kaynaklıdır.
- Fe_3O_4 nanoparçacıklarının manyetik özelliğinden faydalanarak tutuklanmış pelletlerin sıvı ortamdan rahat ayrılması amaçlanarak, aljinat ile Fe_3O_4 nanoparçacıkları birleştirilmiş ve tutuklama işlemi bu şekilde de gerçekleştirilmiştir.
- Yapılan çalışmalara göre, 6.5' lik bir pH optimal değerinde üretilen laktik asit derişimi 14.3 g/L elde edilmiştir. 25 °C sıcaklık optimum değer olarak bulunmuş, bu değerdeki laktik asit derişimi 14g/L olarak elde edilmiştir.
- RSM deneylerinde, mikroorganizma derişimi, substrat derişimi ve süre parametreleri incelenmiş, laktik asit derişiminde en yüksek sonuçlar, mikroorganizma derişiminin 4.64 g/L ve substrat derişiminin 36.59 g/L alınarak başlatıldığı ve deney süresinin 110.16 saat sürdüğü çalışmalarda elde edilmiştir. Bu değerler sonucunda laktik asit derişimi 28.5 g/L değerine ulaşmıştır.

- Tutuklanmış hücreler, tekrarlı deneylere tabi tutulmuşlardır, dördüncü deney sonunda laktik asit derişiminin % 72.8 i korunmuştur. Dördüncü deney sonunda ortamda bulanıklıklar fark edilerek, pelletlerden sızıntı olduğu sonucuna varılmış ve tekrar deneyleri dördüncü döngüde sonlandırılmıştır.
- Laktik asit üretim kinetiği incelenmiş, kinetiğin substrat aktivasyon modeline uyduğu belirlenmiştir. Hız denkleminde yer alan kinetik sabitler (r_{smax} , K_1 , K_2) r_s için SigmaPlot 10.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Kinetik sabitleri sırasıyla; $r_{smax}= 11.385$ mmol/L.h, $K_1= 31.9012$ mmol/L ve $K_2=0.7285$ mmol/L olarak bulunmuştur. Çalışmada etkinlik katsayısı yaklaşık eşit 1.00 bulunmuş ve gözenek içi ve gözenek dışı difüzyon kısıtlaması olmadığı belirlenmiştir. Böylece, bulunan hız denklemindeki sabitler, kısıtlamasız durumdaki gerçek hız sabitleri olarak ele alınmıştır.

5.2 Öneriler

- Son yıllarda yapılan çalışmalarda nanomateryal olarak Grafen Oksit kullanımı yaygınlaşmıştır, hatta iki farklı nanomateryalin (örneğin; Grafen Oksit ve Çinko Oksit) birlikte kullanıldığı çalışmalarda mevcuttur. İkili nanomateryal ile yapılan çalışmalarda gelen verimlilikler çok daha yüksek gelmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında da farklı nanomateryaller ile ya da Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yanı sıra ikinci bir nanomateryal ile fonksiyonelleştirilmesi ile yapılan çalışmalarda daha iyi sonuçlar alınabilir.
- Kovalent bağlama ile tutuklama yöntemi yerine farklı bir tutuklama yöntemi tercih edilerek çalışmada nasıl bir verimlilik gözleneceği üzerine çalışmalar gerçekleştirilebilir. Hatta kovalent ve çapraz bağlanmanın birlikte kullanılarak yapıldığı tutuklama yöntemleri ile de çalışmalar tercih edilebilir.

KAYNAKLAR

- Akhond, M. ve Pashangeh, K. 2016. Efficient Immobilization of Porcine Pancreatic α -Amylase on Amino-Functionalized Magnetite Nanoparticles: Characterization and Stability Evaluation of the Immobilized Enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180, 954-968.
- Ameri, A. ve Shakibaie, M. 2020. Immobilization of Thermoalkalophilic Lipase from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 on Amine-Modified Graphene Oxide Nanostructures: Statistical Optimization and Its Application for Pentyl Valerate Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191, 579-604.
- Anonymous. 2020. Web sitesi:
<http://www.indusgenex.com/immobilized-enzymes.html> Erişim Tarihi: 17.10.2020.
- Anonymous. 2020. Web sitesi:
<http://www.dsmz.de> Erişim Tarihi: 22.08.2020.
- Atila Dinçer, C. 2015. Atmosferik Koşullarda Ve Süperkritik Akışkan Ortamında Fe₃O₄ - Plga Nanokompozitlerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 128, Ankara.
- Bayraktar, E. 1998. Tutuklanmış A. Niger ile Sitrik Asit Üretiminin Gerçekleştiği Üç Fazlı Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Modellenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 154, Ankara.
- Bahry, H. 2019. Optimization of lactic acid production using immobilized *Lactobacillus rhamnosus* and carob pod waste from the Lebanese food industry. *Journal of Biotechnology*, 306, 81-88.
- Bai, N. 2018. Degradation of nonylphenol polyethoxylates by functionalized Fe₃O₄ nanoparticle-immobilized *Sphingomonas* sp. Y2. *Science of The Total Environment*, 615, 462-468.
- Bezerra, M. ve Santelli, R. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5); 965-977.
- Chen, J. ve Hong, Z. 2020. Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 using microalgae as feedstock. *Bioresource Technology*, 308, 123-136.
- Chen, J. ve Ruan, J. 2020. Removal of gaseous tetrahydrofuran via a three-phase airlift bioreactor loaded with immobilized cells of GFP-tagged *Pseudomonas oleovorans* GDT4. *Chemosphere*, 258, 127-138.

- Çınar, B. 2012. *Lactobacillus* Ve *Bifidobacterium* Cinsi Bakterilerin Beta-Glukozidaz Enzim Aktivitesi Ve İzoflavon Hidrolizi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 104, Ankara.
- Dziezak, J. 2003. ACIDS: Natural Acids and Acidulants. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), 12-17.
- Eldeleklioğlu, B. 2009. Peyniraltı suyundan laktik asit üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 130, Ankara.
- Ercan, Y. 2013. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. Bioresource Technology, 135, 365-371.
- Feng, J. ve Yu, S. 2016. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. Chemical Engineering Journal, 286, 216-222.
- Idris, A. ve Suzana, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry, 41, 1117-1123.
- Kourkoutas, Y. 2005. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. Process Biochemistry, 40, 411-416.
- Krischke, W. 1991. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. Applied Microbiology and Biotechnology, 34, 573-578.
- Liu, R. Ve Shen, F. 2008. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). Bioresource Technology, 99, 847-854.
- Min, K. ve Yoo, Y. 2014. Recent Progress in Nanobiocatalysis for Enzyme Immobilization and Its Application. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 19, 553-567.
- Mitropoulou, G. 2013. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production. Journal of Nutrition and Metabolism, 716861.
- Mutha, S. Grewal, P. 2012. Enzyme Technology. Agrobios, India.
- Nancib, N. 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. Bioresource Technology, 78, 149-153.

- Omay, D. 2010. Yemekhane Atıklarından Poli (L-Laktik Asit)'İN Enzimatik Polimerizasyonu Ve Sentezlenen Polimerin Karakterizasyonu Ve Biyobozundurulması. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 243, İstanbul.
- Pal, P. 2009. Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48, 1549-1559.
- Panesar, P. 2010. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53.
- Ramis-Ramos, G. 2003. ANTIOXIDANTS | Synthetic Antioxidants. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 265-275.
- Qin, H. Gong, S. 2012. The Effect Of Temperature On L-Lactic Acid Production and Metabolite Distribution Of *Lactobacillus Casei*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42, 564-573.
- Segel, I.H. 2013. Enzyme Kinetics. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 216-220.
- Selvam, K. ve Govarthanam, M. 2016. Activity and stability of bacterial cellulase immobilized on magnetic nanoparticles. *Chinese Journal of Catalysis*, 37, 1891-1898.
- Smith, J.E. 2009. *Biotechnology*. Cambridge University Press, UK, Fifth Edition.
- Vandenberghe, L. 2018. Chapter 18 - Solid-State Fermentation for the Production of Organic Acids. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 415-434.
- Vitola, H. 2020. *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell immobilization, viability during storage in Petit Suisse cheese and passage through gastrointestinal transit in vitro. *LWT*, 127, 109-120.
- Vuković, A. 2013. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource Technology*, 135, 454-458.
- Zhang, S. ve Shi, J. 2017. Preparation of Carriers Based on ZnO Nanoparticles Decorated on Graphene Oxide (GO) Nanosheets for Efficient Immobilization of Lipase from *Candida rugosa*. *Molecules*, 22(7), 1205.
- Zhao, Z. ve Xie, X. 2016. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycl fermentation system for lactic acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121, 645-651.
- Zhuang, M.Y. ve Wang, C. 2017. Using concanavalinA as a spacer for immobilization of *E. coli* onto magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 63-69.

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 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri

Adı	Kapalı Formül	Erime Sıc., °C	Kaynama Sıc., °C	Molekül Ağırlığı, g/mol	Yoğunluk, g/mL
Pepton	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	-	253	244.33	1.10
Maya özütü	C ₁₀ H ₁₁ FN ₂ O ₂	-	425.2	210.21	1.41
Tween 80	C ₃₂ H ₆₀ O ₁₀	-	695.8	604.81	1.10
Glukoz	C ₆ H ₁₂ O ₆	150-152	-	180.16	1.54
Di-potasyum fosfat	K ₂ HPO ₄	465	-	174.18	2.44
Sodyum asetat	C ₂ H ₃ NaO ₂	324	881.4	82.03	1.53
Amonyum sitrat	C ₆ H ₁₇ N ₃ O ₇	180	309.6	243.22	1.48
Magnezyum sülfat heptahidrat	MgSO ₄ .7H ₂ O	250	-	246.48	1.68
Mangan (II) sülfat heksahidrat	MnSO ₄ .6H ₂ O	-	-	259.51	2.07
Sodyum hidroksit	NaOH	318	1390	39.99	2.130
Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	3	280	98.07	1.840

(<http://www.chemspider.com/>, <http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

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

Seyreltme Oranı	Absorbans değerı (660 nm)	Yaş hücre derişimi, g/L	Kuru hücre derişimi, g/L
Seyreltme yok	2,312	24,52	2,664
0.5 M.O. / 2 mL	1,371	6,13	0,666
0.4 M.O. / 2 mL	1,081	4,904	0,5328
0.3 M.O. / 2 mL	0,892	3,678	0,3996
0.2 M.O. / 2 mL	0,578	2,452	0,2664
0.1 M.O. / 2 mL	0,327	1,226	0,1332